

DOI: <https://doi.org/10.26565/3083-5615-2025-17-05>

УДК: 576.32/.36: 612.017.2:577.112.85:616-092.9



## Еритроцитарні позаклітинні везикули як універсальні медіатори міжклітинної комунікації та імунної регуляції: структурно-функціональні характеристики, механізми утворення і патофізіологічне значення

Волобуєв Д.О.<sup>1</sup>, [ORCID](https://orcid.org/0009-0000-4580-0667) <https://orcid.org/0009-0000-4580-0667>, e-mail: danalex999@ukr.net

Берест В.П.<sup>1</sup>, [ORCID](https://orcid.org/0000-0001-7779-154X) <https://orcid.org/0000-0001-7779-154X>, e-mail: berest@karazin.ua

Лядов Д.А.<sup>1</sup>, [ORCID](https://orcid.org/0009-0001-1040-9737) <https://orcid.org/0009-0001-1040-9737>, e-mail: danil.liadov.work@gmail.com

Гладких Ф.В.<sup>1,2</sup>, [ORCID](https://orcid.org/0000-0001-7924-4048) <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>, e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

<sup>1</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна  
Міністерства освіти і науки України, Харків, Україна

<sup>2</sup>Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології ім. С.П. Григор'єва  
Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

## Erythrocyte-derived extracellular vesicles act as universal mediators of intercellular communication and immune regulation, possessing distinct structural and functional characteristics, specific mechanisms of formation, and significant pathophysiological roles

Volobuiev D.O.<sup>1</sup>, [ORCID](https://orcid.org/0009-0000-4580-0667) <https://orcid.org/0009-0000-4580-0667>, e-mail: danalex999@ukr.net

Berest V.P.<sup>1</sup>, [ORCID](https://orcid.org/0000-0001-7779-154X) <https://orcid.org/0000-0001-7779-154X>, e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

Liadov D.A.<sup>1</sup>, [ORCID](https://orcid.org/0009-0001-1040-9737) <https://orcid.org/0009-0001-1040-9737>, e-mail: danil.liadov.work@gmail.com

Hladkykh F.V.<sup>1,2</sup>, [ORCID](https://orcid.org/0000-0001-7924-4048) <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>, e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

<sup>1</sup>V.N. Karazin Kharkiv National University

of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>State Organization «Grigoriev Institute for medical Radiology and Oncology  
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, Ukraine

### Ключові слова:

еритроцитарні позаклітинні везикули, міжклітинна комунікація, імунна регуляція, окисно-відновна рівновага, тромбоеутворення, ендотеліальна дисфункція.

### Для кореспонденції:

Волобуєв Данііл Олексійович  
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, кафедра молекулярної та медичної біофізики факультету радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем;  
майдан Свободи, буд. 4, м. Харків, Україна, 61022;  
e-mail: danalex999@ukr.net

© Волобуєв Д.О., Берест В.П.,  
Лядов Д.А., Гладких Ф.В., 2025

### РЕЗЮМЕ

**Актуальність.** Еритроцитарні позаклітинні везикули є функціонально активними наноструктурами, які беруть участь у регуляції міжклітинної взаємодії, імунних реакцій, процесів згортання крові та підтриманні судинного гомеостазу. Їхнє надмірне утворення або накопичення у плазмі крові асоціюється з розвитком оксидативного стресу, мікросудинної дисфункції, тромботичних і запальних ускладнень, що визначає високу актуальність їхнього вивчення.

**Мета роботи** – систематизувати сучасні літературні дані щодо еритроцитарних позаклітинних везикул, узагальнити механізми їхнього утворення, описати структурно-функціональні особливості та висвітлити їхнє патофізіологічне значення як універсальних медіаторів міжклітинної комунікації та імунної регуляції.

**Матеріали та методи.** Пошук інформації проведено в базах даних PubMed, Scopus, Web of Science та Google Scholar. Аналіз включав публікації, що висвітлюють морфологію, біохімічний склад, механізми утворення, функціональну роль і клінічне значення еритроцитарних позаклітинних везикул.

**Результати.** Еритроцитарні позаклітинні везикули утворюються внаслідок старіння клітин або впливу стресових факторів – гіпоксії, окисного, механічного чи імунного навантаження. Вони містять гемоглобін, білки цитоскелета, ліпіди, мікроРНК і ферменти, що відображають метаболічний стан клітини-донору. Ці структури здатні змінювати редокс-гомеостаз, впливати на ендотелій, активувати тромбоцити, модулювати синтез цитокінів і взаємодію імунних клітин. Підвищення їхнього рівня у плазмі крові корелює з ендотеліальною дисфункцією, гіперкоагуляцією, запаленням і пошкодженням тканин. Завдяки своїй біосумісності та низькій імуногенності еритроцитарні позаклітинні везикули розглядаються як перспективна платформа для створення систем цілеспрямованої доставки лікарських речовин і біомолекул.

**Висновки.** Еритроцитарні позаклітинні везикули є універсальними медіаторами клітинної взаємодії, що відіграють ключову роль у регуляції судинних, імунних та метаболічних процесів. Вивчення їхнього складу, біогенезу та біологічних ефектів відкриває нові діагностичні й терапевтичні можливості для корекції патологічних станів різного походження.

#### Для цитування:

Волобуєв Д.О., Берест В.П., Лядов Д.А., Гладких Ф.В. Еритроцитарні позаклітинні везикули як універсальні медіатори міжклітинної комунікації та імунної регуляції: структурно-функціональні характеристики, механізми утворення і патофізіологічне значення. *Каразинський імунологічний журнал*. 2025. Т. 8. № 3(17). С. 370–400. DOI: <https://doi.org/10.26565/3083-5615-2025-17-05>

#### Keywords:

erythrocyte extracellular vesicles, intercellular communication, immune regulation, redox balance, thrombus formation, endothelial dysfunction.

#### For correspondence:

*Volobuiev Daniil Oleksiiovich*  
V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Department of Molecular and Medical Biophysics, School of Radio Physics, Biomedical Electronics and Computer Systems;  
4 Svobody Sq., Kharkiv, Ukraine, 61022;  
e-mail: [danalex999@ukr.net](mailto:danalex999@ukr.net)

© *Volobuiev D.O., Berest V.P., Liadov D.A., Hladkykh F.V., 2025*

#### ABSTRACT

**Background.** Erythrocyte extracellular vesicles are functionally active nanostructures that participate in the regulation of intercellular interactions, immune responses, blood coagulation processes, and maintenance of vascular homeostasis. Their excessive formation or accumulation in blood plasma is associated with the development of oxidative stress, microvascular dysfunction, thrombotic, and inflammatory complications, which determines the high relevance of their study.

**Purpose** – to streamline current literature data on erythrocyte extracellular vesicles, summarize the mechanisms of their formation, describe structural and functional features, and highlight their pathophysiological significance as universal mediators of intercellular communication and immune regulation.

**Materials and Methods.** The information was retrieved from the databases PubMed, Scopus, Web of Science and Google Scholar. The analysis included publications covering the morphology, biochemical composition, mechanisms of formation, functional role and clinical significance of erythrocyte extracellular vesicles.

**Results.** Erythrocyte extracellular vesicles are formed as a result of cell aging or exposure to stress factors – hypoxia, oxidative, mechanical or immune stress. They contain hemoglobin, cytoskeletal proteins, lipids, microRNAs and enzymes that reflect the metabolic state of the donor cell. These structures are able to change redox homeostasis, affect the endothelium, activate platelets, modulate cytokine synthesis and immune cell interaction. An increase in their level in blood plasma correlates with endothelial dysfunction, hypercoagulation, inflammation and tissue damage. Due to their biocompatibility and low immunogenicity, erythrocyte extracellular vesicles are considered a promising platform for the creation of targeted delivery systems for drugs and biomolecules.

**Conclusions.** Erythrocyte extracellular vesicles are universal mediators of cellular interactions that play a key role in the regulation of vascular, immune, and metabolic processes. Studying their composition, biogenesis, and biological effects opens up new diagnostic and therapeutic possibilities for the correction of pathological conditions of various origins.

#### For citation:

Volobuiev DO, Berest VP, Liadov DA, Hladkykh FV. Erythrocyte-derived extracellular vesicles act as universal mediators of intercellular communication and immune regulation, possessing distinct structural and functional characteristics, specific mechanisms of formation, and significant pathophysiological roles. *Karazin Journal of Immunology*. 2025;8(3(17)):370–400. DOI: <https://doi.org/10.26565/3083-5615-2025-17-05>

#### ВСТУП

Позаклітинні везикули (ПВ) – це гетерогенна популяція мембрано-розмежованих органел, що активно вивільняються в позаклітинне середовище еукаріотичними та прокаріотичними клітинами [1, 2]. Їх розглядають як складну систему міжклітинної комунікації, оскільки вони здатні переносити широкий спектр біомолекул, включно з ліпідами, білками та нуклеїновими кислотами, що зумовлює їхню роль у регуляції фізіологічних і патологічних процесів [3]. Сучасні дослідження засвідчують, що ПВ утворюються шляхом різних механізмів мембранного брунькування, а їхній склад та біологічні властивості визначаються клітинним типом, стадією клітинного циклу, умовами мікрооточення та метаболічним статусом клітини [4, 5]. Такий підхід дає змогу розглядати ПВ як динамічну і функціонально багату систему, в якій відображається інтегрована відповідь організму або окремої клітини на вплив внутрішніх чи зовнішніх чинників.

Перші частинки, подібні до ПВ, були запропоновані *Horde E.* наприкінці 1800-х років [6]. Ці історичні спостереження стали підґрунтям для подальших

#### INTRODUCTION

Extracellular vesicles (EVs) are a heterogeneous population of membrane-bound organelles that are actively released into the extracellular environment by eukaryotic and prokaryotic cells [1, 2]. They are considered a complex system of intercellular communication, as they are capable of transporting a wide range of biomolecules, including lipids, proteins, and nucleic acids, which determines their role in the regulation of physiological and pathological processes [3]. Current research shows that PVs are formed by various mechanisms of membrane budding, and their composition and biological properties are determined by cell type, cell cycle stage, microenvironment conditions, and cell metabolic status [4, 5]. This approach allows us to consider PVs as a dynamic and functionally rich system that reflects the integrated response of an organism or individual cell to internal or external factors.

The first particles similar to PVs were proposed by *Horde E.* in the late 1800s [6]. These historical observations became the basis for further research into subcellular structures, although at that time the nature and functions of such particles could not yet be correctly

досліджень субклітинних структур, хоча на той час природа та функції таких частинок ще не могли бути коректно інтерпретовані. Лише зі становленням електронної мікроскопії та біохімічних методів фракціонування стало можливим виділити та описати окремі типи позаклітинних структур, що нині ототожнюються з ПВ.

У 1967 р. *Wolf P.* ідентифікував везикули, що походять з тромбоцитів, і назвав їх «тромбоцитарним пилом» [7]. Це відкриття стало ключовим етапом у розумінні того, що клітини крові можуть активно вивільняти мембранні фрагменти, які беруть участь у системній регуляції гемостазу, запалення та судинного тону. Пізніші дослідження підтвердили, що такі везикули модулюють тромбоцитарну активацію, міжклітинну взаємодію та ремоделювання позаклітинного матриксу, що значно розширило уявлення про їхню біологічну значущість.

Перший опис ПВ еритропоетичного клітинного походження був наданий *Johnstone R.M. et al.* у 1987 р. під час дослідження ретикулоцитів, культивованих *in vitro* [8]. Автори показали, що в процесі дозрівання ретикулоцитів відбувається активне відокремлення мембранних структур, необхідне для видалення надлишкових компонентів клітинної мембрани та оптимізації функціональної активності еритроцитів. Це відкриття сприяло формуванню розуміння того, що ПВ є важливим інструментом клітинного «редагування» структури і складу мембран, що має ключове значення для забезпечення гомеостазу еритроїдної лінії.

Повідомлялося, що ПВ присутні в крові та інших рідинах організму, включаючи слину, грудне молоко, сечу, сперму, мокротиння, спинномозкову рідину та носову рідину [9, 10, 11]. Така широкомасштабна присутність у біологічних рідинах свідчить про універсальний характер механізмів їхнього утворення та потенційну функціональну роль у міжсистемній взаємодії. Встановлено, що ПВ здатні долати біологічні бар'єри, включаючи гематоенцефалічний бар'єр, що суттєво розширює можливості їхнього застосування як природних носіїв для цілеспрямованої доставки біологічно активних молекул. Повідомлялося, що як за фізіологічних, так і за патологічних умов, різні типи клітин, включаючи ендотеліальні клітини, лімфоцити, дендритні клітини, тучні клітини, тромбоцити, лейкоцити, еритроцити, ракові клітини, гемопоетичні клітини, нейрони та олігодендроцити, секретують позаклітинні везикули [12, 13]. Така функціональна універсальність вказує на те, що ПВ можуть виступати інтегративними медіаторами міжклітинної сигналізації в різних тканинах та органах. Їхній склад та біологічні властивості значною мірою визначаються фізіологічним станом клітини-продуцента, рівнем її активації, пошкодження чи трансформації, що підкреслює цінність ПВ як перспективних біомаркерів для діагностики та моніторингу широкого спектра захворювань.

З огляду на узагальнені дані щодо поліфункціональності ПВ та їхнього визначального внеску у міжклітинну комунікацію, стає очевидним, що різні клітинні популяції формують унікальні спектри везикулярних сигнальних платформ, здатних модулювати імунні, метаболічні та регенераторні процеси. На цьому тлі особливий інтерес становлять еритроцитарні ПВ, які, попри відсутність ядерного апарату в клітинах-попередниках, демонструють характерні та відмінні механізми утворення, специфічний молекулярний склад

і інтерпрет. Лише з приходом електронної мікроскопії та біохімічних методів фракціонування стало можливим виділити та описати окремі типи позаклітинних структур, що нині ідентифікуються як ПВ.

У 1967, *Wolf P.* ідентифікував везикули, що походять від тромбоцитів і назвав їх «тромбоцитарним пилом» [7]. Це відкриття стало ключовим етапом у розумінні того, що клітини крові можуть активно вивільняти мембранні фрагменти, які беруть участь у системній регуляції гемостазу, запалення та судинного тону. Пізніші дослідження підтвердили, що такі везикули модулюють тромбоцитарну активацію, міжклітинну взаємодію та ремоделювання позаклітинного матриксу, що значно розширило уявлення про їхню біологічну значущість.

Перше описування ПВ еритропоетичного походження було надано *Johnstone R.M. et al.* у 1987 році під час дослідження ретикулоцитів, культивованих *in vitro* [8]. Автори показали, що в процесі дозрівання ретикулоцитів відбувається активне відокремлення мембранних структур, необхідне для видалення надлишкових компонентів клітинної мембрани та оптимізації функціональної активності еритроцитів. Це відкриття сприяло формуванню розуміння того, що ПВ є важливим інструментом клітинного «редагування» структури і складу мембран, що має ключове значення для забезпечення гомеостазу еритроїдної лінії.

Відомо, що ПВ присутні в крові та інших біологічних рідинах організму, включаючи слюну, грудне молоко, сечу, сперму, мокротиння, спинномозкову рідину та носову рідину [9, 10, 11]. Така широкомасштабна присутність у біологічних рідинах свідчить про універсальний характер механізмів їхнього утворення та потенційну функціональну роль у міжсистемній взаємодії. Встановлено, що ПВ здатні долати біологічні бар'єри, включаючи гематоенцефалічний бар'єр, що суттєво розширює можливості їхнього застосування як природних носіїв для цілеспрямованої доставки біологічно активних молекул. Повідомлялося, що як за фізіологічних, так і за патологічних умов, різні типи клітин, включаючи ендотеліальні клітини, лімфоцити, дендритні клітини, тучні клітини, тромбоцити, лейкоцити, еритроцити, ракові клітини, гемопоетичні клітини, нейрони та олігодендроцити, секретують позаклітинні везикули [12, 13]. Така функціональна універсальність вказує на те, що ПВ можуть виступати інтегративними медіаторами міжклітинної сигналізації в різних тканинах та органах. Їхній склад та біологічні властивості значною мірою визначаються фізіологічним станом клітини-продуцента, рівнем її активації, пошкодження чи трансформації, що підкреслює цінність ПВ як перспективних біомаркерів для діагностики та моніторингу широкого спектра захворювань.

Враховуючи узагальнені дані щодо поліфункціональності ПВ та їхнього визначального внеску у міжклітинну комунікацію, стає очевидним, що різні клітинні популяції формують унікальні спектри везикулярних сигнальних платформ, здатних модулювати імунні, метаболічні та регенераторні процеси. На цьому тлі особливий інтерес становлять еритроцитарні ПВ, які, попри відсутність ядерного апарату в клітинах-попередниках, демонструють характерні та відмінні механізми утворення, специфічний молекулярний склад

і потенційно значущі патофізіологічні функції. Саме це обґрунтовує доцільність поглибленого аналізу їхнього внеску у системну регуляцію та визначення ключових структурно-функціональних характеристик, що формують їхню біологічну активність.

**Мета роботи** – систематизувати сучасні літературні дані щодо еритроцитарних позаклітинних везикул, узагальнити механізми їхнього утворення, описати структурно-функціональні особливості та висвітлити їхнє патофізіологічне значення як універсальних медіаторів міжклітинної комунікації та імунної регуляції.

**Objective** – is to systematize current literature data on erythrocyte extracellular vesicles, summarize the mechanisms of their formation, describe their structural and functional features, and highlight their pathophysiological significance as universal mediators of intercellular communication and immune regulation.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

## MATERIALS AND METHODS OF RESEARCH

Підбір публікацій виконано за базами даних PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Clinical Key Elsevier (<https://www.clinicalkey.com>), Cochrane Library (<https://www.cochranelibrary.com/>), eBook Business Collection (<https://www.ebsco.com/>) та Google Scholar (<https://scholar.google.com/>), у яких висвітлювались відомості про еритроцитарні позаклітинні везикули (ПВ), їхні структурно-функціональні особливості, механізми утворення та патофізіологічне значення. На першому етапі проводили пошук літературних джерел за ключовими словами: *extracellular vesicles, erythrocyte-derived extracellular vesicles, red blood cell microvesicles, erythrocyte vesiculation, RBC-derived EVs, immune modulation, intercellular communication*. На другому етапі вивчалися резюме статей та виключались публікації, які не відповідали критеріям дослідження. До таких належали: роботи, що не містили структурованих експериментальних даних або актуальних оглядових узагальнень; публікації, присвячені іншим типам ПВ без зв'язку з еритроцитарними структурами; повідомлення, що не відповідали принципам доказової медицини або містили фрагментарні відомості.

На третьому етапі вивчали повні тексти відібраних статей на відповідність критеріям включення до списку літератури та релевантність досліджень. Критерії включення публікацій до вибірки, яка підлягала контент-аналізу, були такі:

1. висвітлення сучасних відомостей щодо морфології, біохімічного складу, механізмів утворення та функціональної ролі еритроцитарних ПВ;
2. відповідність досліджень ключовим засадам доказової медицини, включно з описом дизайну, джерел ризиків систематичних похибок, біостатистичних підходів та кількісних оцінок;
3. відкритий доступ до повнотекстової статті або можливість її отримання через бібліотечні ресурси;
4. клінічна або експериментальна релевантність для розкриття мети огляду.

До остаточного аналізу було включено наукові праці, що містили якісно описані дані про механізми везикуляції еритроцитів, їхній ліпідний і білковий профіль, взаємодію ПВ з ендотеліоцитами, тромбоцитами та імунними клітинами, а також відомості щодо їхнього діагностичного та патофізіологічного значення.

The selection of publications was performed using the PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Clinical Key Elsevier (<https://www.clinicalkey.com>), Cochrane Library (<https://www.cochranelibrary.com/>), eBook Business Collection (<https://www.ebsco.com/>), and Google Scholar (<https://scholar.google.com/>), which contained information about erythrocyte extracellular vesicles (EVs), their structural and functional features, mechanisms of formation, and pathophysiological significance. At the first stage, a search for literature sources was conducted using the following keywords: *extracellular vesicles, erythrocyte-derived extracellular vesicles, red blood cell microvesicles, erythrocyte vesiculation, RBC-derived EVs, immune modulation, intercellular communication*. At the second stage, article abstracts were studied and publications that did not meet the research criteria were excluded. These included: works that did not contain structured experimental data or relevant review summaries; publications devoted to other types of EVs unrelated to erythrocyte structures; reports that did not comply with the principles of evidence-based medicine or contained fragmentary information.

In the third stage, the full texts of the selected articles were studied for compliance with the criteria for inclusion in the bibliography and the relevance of the studies. The criteria for including publications in the sample subject to content analysis were as follows:

1. coverage of current information on the morphology, biochemical composition, formation mechanisms, and functional role of erythrocyte EVs;
2. compliance of studies with the key principles of evidence-based medicine, including a description of the design, sources of systematic error risks, 3. biostatistical approaches, and quantitative assessments;
3. open access to the full-text article or the ability to obtain it through library resources;
4. clinical or experimental relevance to the purpose of the review.

The final analysis included scientific papers containing qualitatively described data on the mechanisms of erythrocyte vesiculation, their lipid and protein profile, the interaction of EVs with endothelial cells, platelets, and immune cells, as well as information on their diagnostic and pathophysiological significance.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

## RESULTS AND DISCUSSION

Поглиблене вивчення еритроцитарних ПВ є важливим етапом у розкритті механізмів міжклітинної комунікації та імунної регуляції, оскільки саме

An in-depth study of erythrocyte EVs is an important step in revealing the mechanisms of intercellular communication and immune regulation, since these

ці структури становлять одну з найменш досліджених, але водночас найбільш перспективних компонент кров'яного мікрооточення. На відміну від ПВ іншого клітинного походження, еритроцитарні везикули формуються у процесі фізіологічного старіння еритроцитів, а також під впливом різних стресових чинників – окисного, механічного, гіпоксичного або імуного. Це визначає їхній унікальний молекулярний профіль, специфічну роль у системному метаболізмі та потенційну участь у патогенезі широкого спектра захворювань, зокрема серцево-судинних, гематологічних, аутоімунних і запальних станів.

Для всебічної характеристики зазначених аспектів статтю побудовано за принципом послідовного переходу від морфологічних характеристик і фізико-хімічних властивостей еритроцитарних ПВ до аналізу їхніх функціональних ефектів, зокрема впливу на судинно-ендотеліальну, гемостатичну та імунну системи. Такий підхід дозволяє забезпечити цілісність розгляду, уникнути фрагментарності опису та продемонструвати взаємозв'язки між структурними особливостями везикул і їхньою біологічною активністю.

Перший підрозділ присвячено **морфологічній та розмірній характеристиці еритроцитарних ПВ**, що є базовим для розуміння їхньої функціональної різноманітності. Відомо, що морфологічні параметри, такі як діаметр, товщина мембрани та щільність, безпосередньо пов'язані з механізмами везикуляції та умовами мікрооточення, в яких ці структури формуються. Детальне морфометричне вивчення дозволяє виявити закономірності, притаманні фізіологічному старінню еритроцитів або їхньому ушкодженню, що має суттєве діагностичне значення.

Другий підрозділ узагальнює дані про **кількісну динаміку утворення еритроцитарних ПВ** під впливом ключових стресових факторів – окисного стресу, гіпоксії та механічного навантаження. Ці стани є типовими тригерами порушення мембранної стабільності, зміщення кальцієвого гомеостазу та активації фосфоліпаз, що призводить до інтенсифікації везикуляції. Аналіз таких змін має фундаментальне значення для розуміння, яким чином фізіологічно зумовлені або патологічно індуковані стресові реакції впливають на гематологічну рівновагу.

Третій і четвертий підрозділи сфокусовано на **молекулярному складі еритроцитарних ПВ** – зокрема на їхньому **ліпідному та білковому профілях**. Вивчення фосфоліпідної асиметрії та зовнішньої експозиції фосфатидилсерину дозволяє пояснити механізми розпізнавання таких везикул клітинами-реципієнтами, зокрема макрофагами та ендотеліоцитами. Аналіз білкового складу, у свою чергу, демонструє переважання інтегральних мембранних білків, продуктів деградації цитоскелетних структур та окисно-модифікованих компонентів, що відображає стан еритроцитів-донорів і є індикатором інтенсивності апоптоподібних процесів у кров'яному руслі [14].

П'ятий підрозділ присвячено дослідженню **вмісту гемоглобіну та прооксидантних компонентів у ПВ** і їхньому впливу на **редокс-гомеостаз плазми крові**. Еритроцитарні ПВ є важливими переносниками вільного гемоглобіну, гему та заліза, здатними генерувати реактивні форми кисню, що може сприяти окисненню білків плазми, дисфункції ендотелію та активації запальних каскадів. Цей аспект має не лише патогенетичне, а й клінічне значення, оскільки вміст таких

structures are one of the least studied but at the same time most promising components of the blood microenvironment. Unlike PVs of other cellular origin, erythrocyte vesicles are formed during the physiological aging of erythrocytes, as well as under the influence of various stress factors – oxidative, mechanical, hypoxic, or immune. This determines their unique molecular profile, specific role in systemic metabolism, and potential involvement in the pathogenesis of a wide range of diseases, including cardiovascular, hematological, autoimmune, and inflammatory conditions.

For a comprehensive characterization of these aspects, the article is structured according to the principle of a sequential transition from the morphological characteristics and physicochemical properties of erythrocyte VEs to the analysis of their functional effects, in particular their impact on the vascular-endothelial, hemostatic, and immune systems. This approach ensures the integrity of the consideration, avoids fragmentation of the description, and demonstrates the interrelationships between the structural features of vesicles and their biological activity.

The first section is devoted to **the morphological and dimensional characteristics of erythrocyte PVs**, which is fundamental to understanding their functional diversity. It is known that morphological parameters such as diameter, membrane thickness, and density are directly related to the mechanisms of vesiculation and the microenvironmental conditions in which these structures are formed. A detailed morphometric study allows us to identify patterns inherent in the physiological aging of erythrocytes or their damage, which is of significant diagnostic importance.

The second section summarizes data on **the quantitative dynamics of erythrocyte PV formation** under the influence of key stress factors—oxidative stress, hypoxia, and mechanical stress. These conditions are typical triggers of membrane instability, calcium homeostasis disruption, and phospholipase activation, leading to intensified vesiculation. Analysis of these changes is fundamental to understanding how physiologically determined or pathologically induced stress responses affect hematological balance.

The third and fourth sections focus on **the molecular composition of erythrocyte VEs**, in particular their **lipid and protein profiles**. The study of phospholipid asymmetry and the external exposure of phosphatidylserine allows us to explain the mechanisms of recognition of such vesicles by recipient cells, in particular macrophages and endothelial cells. Analysis of the protein composition, in turn, demonstrates the predominance of integral membrane proteins, products of cytoskeletal structure degradation, and oxidatively modified components, which reflects the state of donor erythrocytes and is an indicator of the intensity of apoptotic processes in the bloodstream [14].

The fifth section is devoted to the study of **hemoglobin and prooxidant components in PV** and their effect on **blood plasma redox homeostasis**. Erythrocyte PVs are important carriers of free hemoglobin, heme, and iron, capable of generating reactive oxygen species, which can contribute to plasma protein oxidation, endothelial dysfunction, and activation of inflammatory cascades. This aspect is not only pathogenetic but also clinically significant, since the content of such vesicles may be an indicator of the severity of oxidative imbalance in the body.

везикул може бути показником тяжкості оксидативного дисбалансу в організмі.

Шостий розділ спрямовано на висвітлення **впливу еритроцитарних ПВ на функціональний стан ендотеліальних клітин, агрегаційну активність тромбоцитів і процес згортання крові**. Відомо, що фосфатидилсерин-позитивні везикули створюють поверхні, що підтримують активацію каскаду коагуляції, сприяють утворенню мікротромбів та зміні судинного тону. Тому оцінка цих процесів є важливою для розуміння ролі еритроцитарних ПВ у розвитку тромботичних ускладнень при серцево-судинних і запальних захворюваннях.

Особливу увагу приділено сьомому підрозділу, який аналізує **імуномодулювальні властивості еритроцитарних ПВ**, зокрема їхню здатність стимулювати синтез цитокінів, регулювати активність моноцитів і макрофагів, а також модифікувати баланс між про- та протизапальними реакціями. Ці ефекти розглядаються як частина більш загального механізму участі еритроцитарних везикул у підтриманні системного імунного гомеостазу та в реалізації толерантності до власних антигенів.

Завершальний, восьмий підрозділ узагальнює відомості про **діагностичне та терапевтичне значення еритроцитарних ПВ**. Їхній кількісний вміст, структурні особливості та молекулярні маркери можуть виступати як потенційні біомаркери гемолітичних, запальних і судинних патологій. Крім того, досліджується можливість використання таких везикул як природних нанотранспортерів для таргетної доставки лікарських засобів, що відкриває перспективи для створення нових біоінженерних терапевтичних платформ.

### 1. Морфологічна та розмірна характеристика еритроцитарних позаклітинних везикул

Незважаючи на виражену гетерогенність ПВ, встановлено, що вони часто демонструють часткове перекриття за фізичними та біохімічними характеристиками, зокрема за розміром, щільністю та молекулярним вмістом [1, 15]. Це створює суттєву методологічну проблему для їх коректного виділення, класифікації та функціонального аналізу, оскільки традиційні методи, такі як диференційне центрифугування, ультрафільтрація чи градієнтне центрифугування за щільністю, не завжди забезпечують чітке розмежування між різними субпопуляціями ПВ [4]. Наявність перехресних характеристик між субтипами призводить до труднощів у стандартизації протоколів та відтворюваності результатів у різних лабораторіях, що особливо важливо при проведенні мультицентрових досліджень або клінічних випробувань, де точність фенотипування ПВ має критичне значення для інтерпретації даних.

Попри зазначені обмеження, узагальнена морфологічна та біохімічна характеристика дозволила сформулювати умовну класифікацію ПВ за декількома критеріями. Найбільш поширеним є поділ за розміром, відповідно до якого виділяють **малі ПВ (<200 нм)**, що включають екзосоми, та **середні/великі ПВ (>200 нм)**, які охоплюють мікроевезикули та апоптотичні тілця [15]. Екзосоми, діаметр яких зазвичай варіює у межах 50–150 нм, утворюються внаслідок ендосомального шляху біогенезу і вивільняються після злиття мультивезикулярних тілець із плазматичною

The sixth section focuses on the **effect of erythrocyte PVs on the functional state of endothelial cells, platelet aggregation activity, and the blood coagulation process**. It is known that phosphatidylserine-positive vesicles create surfaces that support the activation of the coagulation cascade, promote the formation of microthrombi, and alter vascular tone. Therefore, the assessment of these processes is important for understanding the role of erythrocyte PVs in the development of thrombotic complications in cardiovascular and inflammatory diseases.

Particular attention is paid to the seventh section, which analyzes **the immunomodulatory properties of erythrocyte VEs**, in particular their ability to stimulate cytokine synthesis, regulate the activity of monocytes and macrophages, and modify the balance between pro- and anti-inflammatory reactions. These effects are considered as part of a more general mechanism of erythrocyte vesicle involvement in maintaining systemic immune homeostasis and in the realization of tolerance to selfantigens.

The final, eighth section summarizes information on **the diagnostic and therapeutic significance of erythrocyte VEs**. Their quantitative content, structural features, and molecular markers can serve as potential biomarkers of hemolytic, inflammatory, and vascular pathologies. In addition, the possibility of using such vesicles as natural nanocarriers for targeted drug delivery is being investigated, which opens up prospects for the creation of new bioengineered therapeutic platforms.

### 1. Morphological and dimensional characteristics of erythrocyte extracellular vesicles

Despite the pronounced heterogeneity of EVs, it has been established that they often show partial overlap in physical and biochemical characteristics, in particular in size, density, and molecular content [1, 15]. This creates a significant methodological problem for their correct isolation, classification, and functional analysis, since traditional methods such as differential centrifugation, ultrafiltration, or density gradient centrifugation do not always provide a clear distinction between different EV subpopulations [4]. The presence of overlapping characteristics between subtypes leads to difficulties in standardizing protocols and reproducibility of results in different laboratories, which is especially important in multicenter studies or clinical trials, where the accuracy of PV phenotyping is critical for data interpretation.

Despite these limitations, generalized morphological and biochemical characteristics have allowed for the formation of a conditional classification of EVs based on several criteria. The most common classification is based on size, according to which **small PVs (<200 nm)**, including exosomes, and **medium/large PVs (>200 nm)**, including microvesicles and apoptotic bodies, are distinguished [15]. Exosomes, whose diameter usually varies between 50 and 150 nm, are formed as a result of the endosomal pathway of biogenesis and are released after the fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane. In contrast, microvesicles (up to 1 μm) are formed by direct budding of plasma membrane regions, while apoptotic bodies (1–5 μm) are products

мембраною. На відміну від них, мікровезикули (до 1 мкм) формуються шляхом прямого відшнуровування ділянок плазматичної мембрани, тоді як апоптотичні тільця (1–5 мкм) є продуктами програмованої клітинної смерті та містять широкий спектр клітинних компонентів, включно з фрагментами ядра та органел [15].

Додатково до розмірних характеристик ПВ також класифікують за **щільністю** (низька, середня, висока), **біохімічним профілем** (наприклад, CD63<sup>+</sup>/CD81<sup>+</sup>-ПВ, ПВ Annexin A5<sup>+</sup>) та **клітинним походженням** (зокрема, онкосоми – великі везикули, що секретуються пухлинними клітинами). Важливим критерієм є також **фізіологічний або патологічний стан клітини-донора**, зокрема формування гіпоксичних ПВ, які відображають метаболічну адаптацію клітин до низького рівня кисню. Така багатовимірна класифікація дає змогу не лише впорядкувати існуючі знання про різноманіття ПВ, але й краще зрозуміти їхню функціональну роль у міжклітинній комунікації, сигнальних каскадах та патогенезі численних захворювань, включно з онкологічними, серцево-судинними та нейродегенеративними [15].

Отже, сучасні підходи до систематизації ПВ мають комплексний характер і поєднують морфологічні, біохімічні та функціональні параметри. Однак, навіть при наявності таких класифікацій, залишається актуальною проблема чіткої ідентифікації окремих субпопуляцій через значну варіабельність методів виділення та аналізу, що підкреслює потребу у розробці стандартизованих підходів до вивчення ПВ у фундаментальних і клінічних дослідженнях [1].

Еритроцитарні ПВ визначаються характерним набором поверхневих молекул, серед яких ключову роль відіграють тетраспаніни CD9, CD63 та CD81, що беруть участь у формуванні мембранних мікродоменів та регуляції міжклітинних взаємодій [16, 17]. Водночас, для більш точної ідентифікації еритроцитарного походження використовують специфічні маркери, зокрема глікофори (особливо глікофорин А, відомий як CD235a) та білок *band 3*, які є інтегральними мембранними компонентами зрілих еритроцитів і забезпечують специфічність визначення еритроцитарних ПВ серед інших підтипів позаклітинних везикул [17]. Важливою ознакою, що додатково характеризує еритроцитарні ПВ, є зовнішня експозиція фосфатидилсерину, який у нормі локалізується у внутрішньому шарі плазматичної мембрани, а при активації або апоптозі вивертається назовні, що слугує сигналом для розпізнавання фагоцитами та відображає стадію клітинного ушкодження [18].

Кількісне визначення еритроцитарних ПВ найчастіше здійснюється методом проточної цитометрії, де оцінюють наявність у мікрочастинках CD235a<sup>+</sup> або аннексину V<sup>+</sup>, що дозволяє визначити частку еритроцитарного компонента в загальній популяції позаклітинних везикул [19]. Цей підхід забезпечує високу чутливість та специфічність, дозволяючи відстежувати зміни вмісту еритроцитарних ПВ у плазмі при різних фізіологічних і патологічних станах, таких як гіпоксія, запалення або гемолітичні процеси. Для більш глибокого розуміння їхнього молекулярного складу застосовують протеомні та РНК-орієнтовані методи аналізу [19]. Ці підходи дозволяють виявити білкові, ліпідні та нуклеїнові компоненти, які можуть мати патогенетичне значення, а також потенційно виконувати роль біомаркерів при різних захворюваннях.

of programmed cell death and contain a wide range of cellular components, including fragments of the nucleus and organelles [15].

In addition to dimensional characteristics, PVs are also classified by **density** (low, medium, high), **biochemical profile** (e.g., CD63<sup>+</sup>/CD81<sup>+</sup>-PV, Annexin A5<sup>+</sup>-PV), and **cellular origin** (in particular, oncosomes—large vesicles secreted by tumor cells). Another important criterion is **the physiological or pathological state of the donor cell**, in particular the formation of hypoxic EVs, which reflect the metabolic adaptation of cells to low oxygen levels. Such a multidimensional classification allows not only to systematize existing knowledge about the diversity of PVs, but also to better understand their functional role in intercellular communication, signaling cascades, and the pathogenesis of numerous diseases, including oncological, cardiovascular, and neurodegenerative ones [15].

Thus, modern approaches to the systematization of PV are comprehensive in nature and combine morphological, biochemical, and functional parameters. However, even with such classifications, the problem of clear identification of individual subpopulations remains relevant due to the significant variability of isolation and analysis methods, which emphasizes the need to develop standardized approaches to the study of EVs in fundamental and clinical research [1].

Erythrocyte PVs are defined by a characteristic set of surface molecules, among which tetraspanins CD9, CD63, and CD81 play a key role in the formation of membrane microdomains and the regulation of intercellular interactions [16, 17]. At the same time, specific markers are used for more accurate identification of erythrocyte origin, in particular glycoporphins (especially glycoporphin A, known as CD235a) and *band 3* protein, which are integral membrane components of mature erythrocytes and ensure the specificity of erythrocyte PV identification among other subtypes of extracellular vesicles [17]. An important feature that further characterizes erythrocyte EVs is the external exposure of phosphatidylserine, which is normally localized in the inner layer of the plasma membrane, but during activation or apoptosis, it is turned outward, which serves as a signal for recognition by phagocytes and reflects the stage of cell damage [18].

Quantitative determination of erythrocyte PVs is most often performed by flow cytometry, where the presence of CD235a<sup>+</sup> or annexin V<sup>+</sup> in microparticles is assessed, allowing the proportion of the erythrocyte component in the total population of extracellular vesicles to be determined [19]. This approach provides high sensitivity and specificity, allowing tracking of changes in the content of erythrocyte EVs in plasma under various physiological and pathological conditions, such as hypoxia, inflammation, or hemolytic processes. For a deeper understanding of their molecular composition, proteomic and RNA-based analysis methods are used [19]. These approaches allow the identification of protein, lipid, and nucleic components that may be of pathogenetic significance and potentially serve as biomarkers for various diseases.

Surface molecules of erythrocyte PVs play not only a structural but also a functional role in intercellular communication processes. They ensure selective interaction with recipient cells, facilitating the targeted delivery of vesicle contents (Table 1), including proteins, RNA, and lipids, similar to the mechanisms characteristic

Поверхневі молекули еритроцитарних ПВ виконують не лише структурну, а й функціональну роль у процесах міжклітинної комунікації. Вони забезпечують вибіркочу взаємодію з клітинами-реципієнтами, сприяючи цілеспрямованій доставці вмісту везикул (табл. 1), включно з білками, РНК та ліпідами, подібно до механізмів, характерних для вірусів або гормонів [20]. Така здатність робить еритроцитарні ПВ ефективними переносниками біоактивних молекул, що можуть змінювати функціональний стан клітин-мішеней і впливати на перебіг патологічних процесів. Встановлено, що інтегрини, локалізовані на поверхні еритроцитарних ПВ, сприяють їхньому органотропізму, тобто спрямованому транспорту до певних тканин – печінки, легень або головного мозку, що визначає участь цих везикул у регуляції мікросудинного гомеостазу та локальних запальних реакцій.

of viruses or hormones [20]. This ability makes erythrocyte VEs effective carriers of bioactive molecules that can alter the functional state of target cells and influence the course of pathological processes. It has been established that integrins localized on the surface of erythrocyte PVs contribute to their organotropism, i.e., targeted transport to specific tissues, the liver, lungs, or brain – which determines the participation of these vesicles in the regulation of microvascular homeostasis and local inflammatory reactions.

**Таблиця 1.** Ключові компоненти еритроцитарних позаклітинних везикул [16]  
**Table 1.** Key components of erythrocyte extracellular vesicles [16]

Тип компонента Component type	Основні представники Main representatives	Функціональне значення / Пояснення Functional significance / Explanation
Білки Proteins	<ul style="list-style-type: none"> <li>– гемоглобін (HbA, HbS);</li> <li>– білок <i>band 3</i> (аніонообмінник);</li> <li>– спектрин;</li> <li>– анкірин;</li> <li>– актин (елементи цитоскелета);</li> <li>– білки теплового шоку (HSP70);</li> <li>– карбоангідраза;</li> <li>– стоматин;</li> <li>– флотилін;</li> <li>– синексин;</li> <li>– сорцин;</li> <li>– рецептори комплексу CD55 та CD59.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– гемоглобін бере участь у транспорті кисню;</li> <li>– білки цитоскелета (спектрин, анкірин, актин) підтримують форму еритроцита та стабільність мембрани;</li> <li>– білки теплового шоку відповідають за захист від окисного стресу;</li> <li>– флотилін, синексин та сорцин пов'язані з ліпідними рафтами та беруть участь у сигнальних процесах;</li> <li>– CD55 і CD59 захищають еритроцити від руйнування комплекментом [20, 21].</li> </ul>
Ліпіди Lipids	<ul style="list-style-type: none"> <li>– фосфатидилсерин;</li> <li>– фосфатидилетаноламін;</li> <li>– фосфатидова кислота;</li> <li>– холестерин;</li> <li>– сфінгомієлін;</li> <li>– окиснені ліпіди.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– фосфатидилсерин при зовнішній експозиції проявляє прокоагулянтні властивості;</li> <li>– фосфоліпіди забезпечують гнучкість мембрани;</li> <li>– холестерин стабілізує мембрану;</li> <li>– окиснені ліпіди є маркерами старіння або стресу еритроцитів [22, 23].</li> </ul>
мікроРНК (міРНК) microRNA (miRNA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– miR-451;</li> <li>– miR-144;</li> <li>– miR-486;</li> <li>– miR-92a;</li> <li>– miR-125b-5p;</li> <li>– miR-4454.</li> </ul>	<p>Ці мікроРНК регулюють гени, що контролюють еритропоез, антиоксидантний захист і реакцію клітин на стрес. miR-451a є домінуючою в еритроцитах і еритроцитарних ПВ; підвищення рівня деяких міРНК (наприклад, miR-125b-5p) спостерігається у ПВ, які вивільняються зі старіючих або збережених еритроцитів [24, 25].</p> <p>These microRNAs regulate genes that control erythropoiesis, antioxidant protection, and cellular stress responses. miR-451a is dominant in erythrocytes and erythrocytic PVs;</p>

Продовження таблиці 1 / Continuation of Table 1

		An increase in the level of certain miRNAs (e.g., miR125b-5p) is observed in EVs released from aging or preserved red blood cells [24, 25].
Інші РНК	– малі некодувальні РНК; – фрагменти транспортних РНК (тРНК).	Ці фрагменти можуть брати участь у регуляції синтезу білка та міжклітинній комунікації, хоча їх біологічна роль досі вивчається [26].
Other RNAs	– small non-coding RNAs; – fragments of transfer RNAs (tRNAs).	These fragments may be involved in the regulation of protein synthesis and intercellular communication, although their biological role is still being studied [26].
Окиснювальні маркери	– окиснені білки; – ліпідні пероксиди; – кінцеві продукти глікування (AGE – advanced glycation end-products).	Відображають рівень окисного стресу в еритроцитах; накопичення цих сполук свідчить про старіння клітин або патологічні зміни, наприклад при діабеті, гіпоксії чи анеміях [20].
Oxidative markers	– oxidized proteins; – lipid peroxides; – advanced glycation end-products (AGEs).	Reflect the level of oxidative stress in red blood cells; the accumulation of these compounds indicates cell aging or pathological changes, for example, in diabetes, hypoxia, or anemia [20].
Поверхневі маркери	– CD235a (глікофорин А); – тетраспаніни (CD9, CD63, CD81); – CD71 (рецептор трансферину); – анексин V; – фосфатидилсерин (PS).	CD235a є основним маркером еритроцитів; тетраспаніни беруть участь у формуванні везикул і клітинній взаємодії; CD71 виявляється на ранніх еритроїдних клітинах; анексин V використовується для виявлення зовнішнього фосфатидилсерину при активації або апоптозі клітин [17, 18, 19].
Surface markers	– CD235a (glycophorin A); – tetraspanins (CD9, CD63, CD81); – CD71 (transferrin receptor); – annexin V; – phosphatidylserine (PS).	CD235a is the main marker of red blood cells; tetraspanins are involved in vesicle formation and cell interaction; CD71 is found on early erythroid cells; annexin V is used to detect external phosphatidylserine during cell activation or apoptosis [17, 18, 19].

Окрім того, у процесі первинного зв'язування еритроцитарних ПВ із клітинами-реципієнтами беруть участь протеоглікани гепарансульфату, які опосередковують початковий контакт між везикулою та клітинною мембраною, забезпечуючи подальший ендцитоз або злиття мембран [27]. Цей механізм вважається універсальним для багатьох типів позаклітинних везикул і визначає ефективність передачі сигнальних молекул від клітини до клітини.

Крім транспортної функції, позаклітинні везикули, включно з еритроцитарними ПВ, здатні нести молекули головного комплексу гістосумісності, цитокіни та інші ліганди, які беруть участь у модуляції імунної відповіді. Залежно від контексту мікрооточення такі везикули можуть або стимулювати, або пригнічувати імунну активність, сприяючи регуляції запальних процесів, формуванню толерантності або навіть індукції апоптозу та імуносупресії [2]. Таким чином, еритроцитарні ПВ розглядаються не лише як продукти клітинного метаболізму, а й як активні біологічні медіатори, здатні впливати на гомеостаз, імунну рівновагу та міжклітинну взаємодію у фізіологічних і патологічних умовах.

## 2. Кількісна динаміка утворення еритроцитарних позаклітинних везикул під впливом окисного стресу, гіпоксії та механічного навантаження

Везикуляція еритроцитів розглядається як один із ключових фізіологічних механізмів, що забезпечує підтримання структурної та функціональної цілісності клітини протягом усього її життєвого циклу. Цей процес виконує роль своєрідної системи «клітинного очищення», що дозволяє еритроцитам позбавлятися

In addition, heparan sulfate proteoglycans are involved in the initial binding of erythrocyte EVs to recipient cells, mediating the initial contact between the vesicle and the cell membrane, ensuring further endocytosis or membrane fusion [27]. This mechanism is considered universal for many types of extracellular vesicles and determines the efficiency of signal molecule transfer from cell to cell.

In addition to their transport function, extracellular vesicles, including erythrocyte EVs, are capable of carrying major histocompatibility complex molecules, cytokines, and other ligands involved in modulating the immune response. Depending on the context of the microenvironment, such vesicles can either stimulate or suppress immune activity, contributing to the regulation of inflammatory processes, the formation of tolerance, or even the induction of apoptosis and immunosuppression [2]. Thus, erythrocyte EVs are considered not only as products of cellular metabolism, but as active biological mediators capable of influencing homeostasis, immune balance, and intercellular interaction under physiological and pathological conditions.

## 2. Quantitative dynamics of erythrocyte extracellular vesicle formation under the influence of oxidative stress, hypoxia, and mechanical stress

Erythrocyte vesiculation is considered one of the key physiological mechanisms that ensures the maintenance of the structural and functional integrity of the cell throughout its life cycle. This process acts as a kind of «cell cleansing» system, allowing erythrocytes to get rid of potentially harmful or dysfunctional components

від потенційно шкідливих або дисфункціональних компонентів, які накопичуються внаслідок старіння клітини або впливу зовнішніх факторів [28, 29]. До таких компонентів належать денатуровані форми гемоглобіну, неоантигени білка *band 3* та імуноглобулін G (IgG), що фіксуються на поверхні мембрани і можуть сприяти активації імунних механізмів кліренсу [29]. Відомо, що протягом середньої тривалості життя еритроцита (приблизно 120 діб) він втрачає близько 20% площі своєї мембрани, що відображає накопичення ушкоджень та адаптивну реакцію клітини у відповідь на оксидативний або механічний стрес. Ця втрата мембранного матеріалу відбувається у вигляді контрольованого відшнуровування дрібних мембранних фрагментів – ПВ, що є важливим етапом у процесі старіння еритроцитів.

Формування ПВ відбувається шляхом брунькування плазматичної мембрани, яке ініціюється підвищенням внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. Цей кальцієвий приплив зазвичай опосередкований активацією комплементу або дією фізико-хімічних чинників, що порушують гомеостаз клітинної мембрани [30]. Надлишковий  $Ca^{2+}$  активує кальційзалежні фосфоліпази та кальпаїни, які сприяють порушенню симетрії фосфоліпідного шару, екстерналізації фосфатидилсерину та відокремленню везикули від клітини [31]. У результаті утворюються ПВ, що містять різні білкові, ліпідні та нуклеїнові компоненти, зокрема фрагменти цитоскелета, гемоглобін, залишки мембранних білків та інші молекули, які мають важливе біологічне значення. Везикуляція є процесом, який спостерігається як *in vivo*, у кровообігу, так і *in vitro* – наприклад, у процесі зберігання еритроцитів у продуктах крові [30].

Доведено, що під час тривалого зберігання еритроцитів у банках крові накопичуються специфічні ПВ, які утворюються внаслідок тривалого впливу умов консервації, змін осмотичного тиску, рН та окисного стресу [31]. Такі еритроцитарні везикули мають не лише морфологічні відмінності від ПВ, що утворюються *in vivo*, але й специфічні функціональні властивості. Зокрема, встановлено, що еритроцитарні ПВ, індуковані зберіганням, проявляють виражені прозапальні та прокоагулянтні властивості, здатні впливати на реактивність судинного ендотелію та активацію тромбоцитів [32]. Такі зміни можуть сприяти розвитку мікроциркуляторних порушень, підвищенню ризику тромбозу та, ймовірно, відіграють певну роль у патогенезі несприятливих трансфузійних подій.

Еритроцитарні ПВ, що утворюються в процесі тривалого зберігання еритроцитарних концентратів, несуть на своїй поверхні широкий спектр біологічно активних молекул, серед яких антигени, імуноглобуліни, фосфатидилсерин, тканинний фактор, гемоглобін і гем [33]. Ці молекули мають здатність взаємодіяти з клітинами крові, ендотелієм судин і системами кліренсу, модулюючи локальні запальні та коагуляційні реакції. Встановлено, що зовнішня експозиція фосфатидилсерину на мембрані еритроцитарних ПВ сприяє активації згортання крові шляхом утворення фосфоліпідної платформи для збирання коагуляційних комплексів [28, 33]. Одночасно тканинний фактор, присутній на поверхні цих везикул, може ініціювати позаклітинний шлях активації каскаду згортання. Таким чином, еритроцитарні ПВ, що накопичуються при зберіганні крові, мають потенціал

that accumulate as a result of cell aging or the influence of external factors [28, 29]. Such components include denatured forms of hemoglobin, *band 3* protein neoantigens, and immunoglobulin G (IgG), which are fixed on the membrane surface and can contribute to the activation of immune clearance mechanisms [29]. It is known that during the average lifespan of a red blood cell (approximately 120 days), it loses about 20% of its membrane area, reflecting the accumulation of damage and the adaptive response of the cell to oxidative or mechanical stress. This loss of membrane material occurs in the form of controlled shedding of small membrane fragments – RUs, which is an important step in the aging process of red blood cells.

PV formation occurs through budding of the plasma membrane, which is initiated by an increase in the intracellular concentration of calcium ions. This calcium influx is usually mediated by complement activation or the action of physicochemical factors that disrupt cell membrane homeostasis [30]. Excess  $Ca^{2+}$  activates calcium-dependent<sup>+</sup> phospholipases and calpains, which contribute to the disruption of the symmetry of the phospholipid layer, the externalization of phosphatidylserine, and the separation of vesicles from the cell [31]. This results in the formation of PVs containing various protein, lipid, and nucleic components, including cytoskeletal fragments, hemoglobin, membrane protein residues, and other molecules of biological importance. Vesiculation is a process that occurs both *in vivo*, in the bloodstream, and *in vitro*, for example, during the storage of red blood cells in blood products [30].

It has been proven that during prolonged storage of erythrocytes in blood banks, specific PVs accumulate, which are formed as a result of prolonged exposure to preservation conditions, changes in osmotic pressure, pH, and oxidative stress [31]. Such erythrocyte vesicles not only have morphological differences from PVs formed *in vivo*, but also specific functional properties. In particular, it has been established that storage-induced erythrocyte PVs exhibit pronounced pro-inflammatory and procoagulant properties, capable of affecting vascular endothelial reactivity and platelet activation [32]. Such changes may contribute to the development of microcirculatory disorders, increase the risk of thrombosis, and probably play a role in the pathogenesis of adverse transfusion events.

Erythrocyte PVs, which are formed during the long-term storage of erythrocyte concentrates, carry a wide range of biologically active molecules on their surface, including antigens, immunoglobulins, phosphatidylserine, tissue factor, hemoglobin, and heme [33]. These molecules have the ability to interact with blood cells, vascular endothelium, and clearance systems, modulating local inflammatory and coagulation reactions. It has been established that external exposure of phosphatidylserine on the membrane of erythrocyte PVs promotes blood coagulation by forming a phospholipid platform for the assembly of coagulation complexes [28, 33]. At the same time, the tissue factor present on the surface of these vesicles can initiate the extracellular pathway of coagulation cascade activation. Thus, erythrocyte VCs that accumulate during blood storage have the potential to significantly affect the recipient's hemostatic balance during transfusion, contributing to microthrombosis or activation of inflammatory mechanisms in the post-transfusion period.

істотно впливати на гемостатичний баланс реципієнта під час переливання, сприяючи мікротромбоутворенню або активації запальних механізмів у посттрансфузійному періоді.

Дослідження *Asaro R.J. et al.* [34] продемонстрували, що процес везикуляції еритроцитів людини має високу динамічну активність під час їх проходження через мікроциркуляторне русло селезінки, де створюються унікальні механічні та біохімічні умови (рис. 1), сприятливі для утворення ПВ [35].

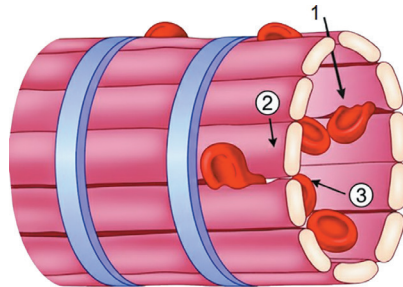


Рис. 1. Синусові щілини селезінки [36]  
Fig. 1. Sinusoidal gaps of the spleen [36]

#### Примітки / Notes:

- 1 – еритроцит, що «проходить» через синусову щілину;
- 2 – ендотеліальна клітина;
- 3 – еритроцит, що перебуває у руслі.
- 1 – red blood cell «passing» through the sinusoidal gap;
- 2 – endothelial cell;
- 3 – erythrocyte in the bed.

Селезінка, як відомо, відіграє провідну роль у так званому «контролі якості» еритроцитів, оскільки через її вузькі синуси проходять клітини, які зазнають значних деформацій. Діаметр еритроцита людини становить близько 8,5 мкм, зафіксований розмір синусової щілини у селезінці людини становить ~1 мкм [37]. У результаті цього механічного напруження відбувається селективне відсіювання старіючих або ушкоджених клітин, а також стимуляція вивільнення мембранних мікроезичул як адаптивної реакції на механічний стрес. Таким чином, везикуляція у селезінці може розглядатися як природний механізм фізіологічного «ремонту» клітинної мембрани, який дозволяє еритроциту продовжити функціонування навіть за умов накопичення структурних пошкоджень.

Проведені числові моделювання, у поєднанні з базовими аналізами механічної взаємодії між цитоскелетом і плазматичною мембраною еритроцита, дозволили поглибити розуміння взаємозв'язку між процесом старіння еритроцитів та метаболічними змінами, що супроводжують цей процес. Модельні дослідження підтвердили, що втрата еластичності мембрани та ослаблення зв'язку між білками цитоскелета (спектрин, анкірин, актин) і білками мембрани зумовлюють підвищену схильність клітини до утворення везикул. У процесі старіння еритроцитів ключову роль відіграє денатурація гемоглобіну, яка виникає під дією оксидативного стресу та призводить до формування нестабільних конформацій білка, здатних зв'язуватися з ділянками прикріплення цитоскелета до мембрани. Це порушує структурну цілісність еритроцита, ініціюючи каскад подій, що веде до вивільнення ПВ.

Процеси старіння еритроцитів тісно пов'язані з везикуляцією і включають накопичення активних

Research by *Asaro R.J. et al.* [34] demonstrated that the process of human erythrocyte vesiculation has high dynamic activity during their passage through the microcirculatory bed of the spleen, where unique mechanical and biochemical conditions are created (Fig. 1) that are conducive to the formation of PVs [35].

The spleen is known to play a leading role in the so-called «quality control» of red blood cells, as cells undergoing significant deformation pass through its narrow sinuses. The diameter of a human red blood cell is about 8.5  $\mu\text{m}$ , and the recorded size of the sinusoidal gap in the human spleen is ~1  $\mu\text{m}$  [37]. As a result of this mechanical stress, aging or damaged cells are selectively filtered out, and the release of membrane microvesicles is stimulated as an adaptive response to mechanical stress. Thus, vesiculation in the spleen can be considered a natural mechanism of physiological «repair» of the cell membrane, which allows red blood cells to continue functioning even under conditions of accumulated structural damage.

Numerical simulations, combined with basic analyses of the mechanical interaction between the cytoskeleton and the plasma membrane of erythrocytes, have deepened our understanding of the relationship between the aging process of erythrocytes and the metabolic changes that accompany this process. Model studies have confirmed that the loss of membrane elasticity and the weakening of the connection between cytoskeletal proteins (spectrin, ankyrin, actin) and membrane proteins cause an increased tendency of cells to form vesicles. Hemoglobin denaturation plays a key role in the aging process of red blood cells. It occurs under the influence of oxidative stress and leads to the formation of unstable protein conformations capable of binding to the sites of attachment of the cytoskeleton to the membrane. This disrupts the structural integrity of the erythrocyte, initiating a cascade of events that leads to the release of PV.

The processes of erythrocyte aging, closely associated with vesiculation, include the accumulation of reactive oxygen species, nitrosative stress, activation of the enzyme nitric oxide synthase (NOS), and the influence

форм кисню, нітрозативний стрес, активацію ферменту синтази оксиду азоту (NOS), а також вплив таких хімічних агентів, як фенілгідразин або іони важких металів ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ). Усі ці чинники сприяють пероксидному окисненню ліпідів мембрани, зміні заряду її поверхні, розриву білково-ліпідних контактів і врешті – відщепленню везикул від клітинної поверхні. Згідно з класичними експериментальними роботами, такі реакції оксидативного пошкодження супроводжуються утворенням метгемоглобіну, накопиченням пероксидів ліпідів і модифікацією білків цитоскелета, що є пусковим фактором для везикуляції [38].

Методологія, яка поєднує високоточне числове моделювання з експериментальними підходами на рівні клітинної мембрани, дала можливість авторам відтворити ключові етапи процесу та критичні фактори, що визначають інтенсивність утворення везикул [35]. Отримані результати свідчать, що ініціація везикуляції є не випадковим процесом, а результатом координованої взаємодії між механічними, метаболічними та окисно-відновними чинниками. Зокрема, навіть незначне підвищення рівня активних форм кисню може суттєво змінювати поведінку мембрани, роблячи її більш схильною до локальних деформацій і мікробрунькування. Таким чином, везикуляція розглядається як важливий механізм адаптації еритроцита до стресових умов, але при надмірній інтенсифікації цього процесу вона може набувати патофізіологічного значення, сприяючи розвитку гемолізу або системного оксидативного дисбалансу.

Узагальнення експериментальних і модельних даних дозволяє стверджувати, що везикуляція еритроцитів є складним, багатофакторним процесом, який відображає тісну взаємодію між структурними властивостями мембрани, метаболічним станом клітини та дією реактивних метаболітів кисню. Такий підхід відкриває перспективи для подальших досліджень, спрямованих на вивчення регуляторних механізмів цього процесу, включно з потенційними фармакологічними стратегіями, здатними зменшити інтенсивність оксидативного стресу та стабілізувати мембрану еритроцита під час старіння.

Процес везикуляції еритроцитів є природним і необхідним компонентом клітинного життєвого циклу, однак за певних умов – зокрема, при зберіганні донорської крові – він може набувати патофізіологічного значення. Розуміння механізмів утворення та біологічних властивостей еритроцитарних ПВ має важливе клінічне значення, оскільки може слугувати основою для вдосконалення технологій зберігання крові, мінімізації трансфузійних ускладнень і розробки нових діагностичних підходів, спрямованих на оцінку якості еритроцитарних препаратів.

### **3. Ліпідний профіль еритроцитарних позаклітинних везикул: зміщення фосфоліпідної асиметрії та зовнішня експозиція фосфатидилсерину**

Аналіз ліпідного складу ПВ різного клітинного походження засвідчив наявність закономірних відмінностей між їхнім вмістом та відповідними вихідними клітинами [39]. Ці розбіжності свідчать про активні перебудови плазматичної мембрани в процесі везикуляції, що зумовлює формування специфічного фосфоліпідного профілю, характерного для ПВ. Найбільш показовими є зміни у співвідношенні основних

of chemical agents such as phenylhydrazine or heavy metal ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ). All these factors contribute to the peroxide oxidation of membrane lipids, changes in the charge of its surface, the rupture of protein-lipid contacts, and ultimately the detachment of vesicles from the cell surface. According to classical experimental studies, such oxidative damage reactions are accompanied by the formation of methemoglobin, the accumulation of lipid peroxides, and the modification of cytoskeletal proteins, which is a trigger for vesiculation [38].

A methodology combining high-precision numerical modeling with experimental approaches at the cell membrane level enabled the authors to reproduce the key stages of the process and the critical factors determining the intensity of vesicle formation [35]. The results obtained indicate that the initiation of vesiculation is not a random process, but rather the result of coordinated interaction between mechanical, metabolic, and redox factors. In particular, even a slight increase in the level of active oxygen species can significantly alter the behavior of the membrane, making it more susceptible to local deformations and microbubble formation. Thus, vesiculation is considered an important mechanism of erythrocyte adaptation to stressful conditions, but when this process is overly intensified, it can acquire pathophysiological significance, contributing to the development of hemolysis or systemic oxidative imbalance.

A synthesis of experimental and model data suggests that erythrocyte vesiculation is a complex, multifactorial process that reflects the close interaction between membrane structural properties, cell metabolic status, and the action of reactive oxygen metabolites. This approach opens up prospects for further research aimed at studying the regulatory mechanisms of this process, including potential pharmacological strategies capable of reducing the intensity of oxidative stress and stabilizing the erythrocyte membrane during aging.

The process of erythrocyte vesiculation is a natural and necessary component of the cell life cycle, but under certain conditions – in particular, during the storage of donor blood it can acquire pathophysiological significance. Understanding the mechanisms of formation and biological properties of erythrocyte EVs is of important clinical significance, as it can serve as a basis for improving blood storage technologies, minimizing transfusion complications, and developing new diagnostic approaches aimed at assessing the quality of erythrocyte preparations.

### **3. Lipid profile of erythrocyte extracellular vesicles: displacement of phospholipid asymmetry and external exposure of phosphatidylserine**

Analysis of the lipid composition of EVs of different cellular origins revealed regular differences between their content and the corresponding source cells [39]. These differences indicate active rearrangements of the plasma membrane during vesiculation, which leads to the formation of a specific phospholipid profile characteristic of EVs. The most indicative are changes in the ratio of the main phospholipid fractions – phosphatidylcholine,

фосфоліпідних фракцій – фосфатидилхоліну, сфінгомієліну, фосфатидилетаноламіну та фосфатидилсерину, а також у балансі між фосфоліпідами та холестеролом. Ці показники, відображені у табл. 2, дозволяють оцінити як структурну стабільність мембран, так і функціональну спрямованість ПВ.

sphingomyelin, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine – as well as in the balance between phospholipids and cholesterol. These indicators, shown in Table 2, allow us to assess both the structural stability of membranes and the functional orientation of PV.

**Таблиця 2.** Ліпідний склад міковезикул різного клітинного походження у порівнянні з вихідними клітинами [39]  
**Table 1.** Lipid composition of microvesicles of different cellular origins compared to the parent cells [39]

Тип клітин або біологічна рідина Cell type or biological fluid	Метод аналізу ліпідів Lipid analysis method	Розмір ПВ (нм) PV size (nm)	Сфінго-мієлін (%) Sphingo myelin (%)	Церамід (%) Ceramide (%)	Фосфатидил-холін (%) Phosphatidylcho line (%)	Фосфатидил-серин (%) Phosphatidylseri ne (%)	Фосфатидил-етаноламін (%) Phosphatidyleth anolamine (%)	Співвідношення холестерин/фосфоліпідів Cholesterol/ phospholipid ratio	Посилання Reference
Плазмові екстрацелюлярні везикули – всі ті ПВ, які присутні у плазмі крові (у співвідношенні до тромбоцитів) Plasma extracellular vesicles – all EVs present in blood plasma (in relation to platelets)	Тонкошарова хроматографія Thin-layer chromatogra phy	–	21 (1)	–	59 (1,8)	3,6 (0,3)	9,4 (0,3)	–	[40]
Збережені еритроцити (53 ± 4 дні) Preserved red blood cells (53 ± 4 days)	Мас-спектрометрія Mass spectrometry	–	(1)	–	(1)	(7)	(0,8)	–	[41]
Зберігання еритроцитів (35–42 дні) Storage of red blood cells (35–42 days)	Мас-спектрометрія Mass spectrometry	100–300	33 (1)	–	26 (1)	10 (1)	30 (1)	–	[42]
Еритроцити зі збідненим запасом аденозинтрифосфату Erythrocytes with depleted adenosine triphosphate reserves	Ферментативний аналіз Enzymatic analysis	~200	26 (0,9)	–	27 (0,9)	–	25 (0,8)	(0,9)	[43]
Стовбурові клітини, отримані з кісткового мозку Stem cells obtained from bone marrow	Мас-спектрометрія Mass spectrometry	50–600	8,6 (1,6)	0,5 (1,9)	25 (1,2)	8 (0,7)	3,7 (0,5)	–	[44]
Тромбоцити Platelets	Мас-спектрометрія Mass spectrometry	–	14 (1,3)	0,7 (1,3)	27 (0,7)	17 (1)	37 (1)	–	[45]

**Примітка / Note:**

Дані наведено у відсотках від загального вмісту ліпідів, визначених кількісно, та у співвідношеннях міковезикула/клітина (у дужках).

Data are presented as percentages of total lipids determined quantitatively and as *microvesicle/cell* ratios (in parentheses).

У зразках еритроцитарного походження, зокрема при зберіганні еритроцитів протягом 35–42 днів, визначено суттєву варіабельність ліпідного складу: вміст сфінгомієліну становив 33%, фосфатидилхоліну – 26%, фосфатидилсерину – 10%, а фосфатидилетаноламіну – 30% [42]. Подібне співвідношення зберігалось при тривалішому зберіганні (53 ± 4 дні), хоча тенденція до підвищення зовнішньої експозиції фосфатидилсерину (ФС) була більш вираженою [41]. Це відображає поступову втрату фосфоліпідної асиметрії мембрани, яка у нормальних еритроцитах підтримується ферментативними системами – фліпазами та флопазами, що регулюють розподіл амфіфільних молекул між внутрішнім і зовнішнім шарами бішару. В умовах зберігання або енергетичного дефіциту

In samples of erythrocytic origin, in particular when erythrocytes were stored for 35–42 days, significant variability in lipid composition was determined: the content of sphingomyelin was 33%, phosphatidylcholine – 26%, phosphatidylserine – 10%, and phosphatidylethanolamine – 30% [42]. A similar ratio was maintained during longer storage (53 ± 4 days), although the tendency toward increased external exposure of phosphatidylserine (PS) was more pronounced [41]. This reflects a gradual loss of phospholipid asymmetry in the membrane, which in normal erythrocytes is maintained by enzymatic systems – flippases and floppases, which regulate the distribution of amphiphilic molecules between the inner and outer layers of the bilayer. Under conditions of storage or energy deficiency

(зокрема при зниженні рівня аденозинтрифосфату – АТФ) ці системи порушуються, внаслідок чого фосфатидилсерин переміщується на зовнішню поверхню мембрани, і стає маркером старіння клітин і сигналом для фагоцитозу [43, 44].

Отримані результати також демонструють, що у мікровезикулах, виділених з еритроцитів зі збідненим запасом АТФ, спостерігається порівняно низький рівень фосфатидилетаноламіну – 25% (0,8) та фосфатидилхоліну – 27% (0,9), при цьому вміст сфінгомієліну знижується до 26% (0,9) [43, 44]. Зміна фосфоліпідного складу за такого енергетичного стану підтверджує роль АТФ-залежних мембранних транспортерів у збереженні структурної цілісності еритроцитів. Наявність цих зрушень також пояснює посилену тенденцію до везикуляції, що є одним із ключових механізмів елімінації дефектних клітинних компонентів.

Особливості ліпідного профілю виявлено і для інших клітинних типів. У стовбурових клітинах кісткового мозку частка сфінгомієліну становила 8,6% (1,6), фосфатидилхоліну – 25% (1,2), фосфатидилсерину – 8% (0,7), а фосфатидилетаноламіну – 3,7% (0,5) [45]. Такий профіль свідчить про більш упорядковану мембранну організацію з переважанням насичених ліпідів, що потенційно забезпечує вищу стабільність мембран, але знижує їхню деформаційну здатність. Водночас підвищений вміст сфінгомієліну може сприяти формуванню жорсткіших ліпідних доменів, що полегшує відшнуровування ПВ у процесі клітинного ремоделювання.

Плазмові ПВ, які циркулюють у кров'яному руслі, характеризувалися переважанням фосфатидилхоліну (59%) та сфінгомієліну (21%), тоді як фосфатидилсерин становив лише 3,6% (0,3), а фосфатидилетаноламін – 9,4% (0,3) [40]. Такий склад свідчить про те, що більшість циркулюючих ПВ мають зовнішню мембрану, подібну до плазматичної мембрани клітин походження, однак не демонструють вираженої зовнішньої експозиції фосфатидилсерину. Імовірно, ці ПВ утворюються переважно внаслідок фізіологічного шедінгу, а не апоптотичних процесів, що відрізняє їх від еритроцитарних везикул, які формуються за умов старіння або зберігання.

Для порівняння, у тромбоцитах відзначено відносно високий вміст фосфатидилетаноламіну (37%) та фосфатидилсерину (17%) при рівні фосфатидилхоліну 27% [46]. Така композиція забезпечує високу прокоагулянтну активність тромбоцитарних ПВ, оскільки експонований фосфатидилсерин слугує платформою для активації каскаду згортання крові. Відповідно, саме ця ліпідна конфігурація має безпосереднє клінічне значення в контексті тромбогенезу.

Загалом аналіз даних табл. 2 підтверджує, що формування ПВ супроводжується суттєвим перерозподілом фосфоліпідів між моношарами мембрани, із втратою нормальної асиметрії та підвищенням зовнішньої експозиції фосфатидилсерину. Цей процес є універсальним маркером клітинного старіння, стресу або апоптозоподібних змін, але його ступінь варіює залежно від клітинного типу та метаболічного стану. В еритроцитах цей механізм особливо чітко проявляється під час зберігання, що має практичне значення для трансфузійної медицини, оскільки надлишкове утворення ПВ може впливати на мікроциркуляцію, коагуляційний статус та імунні реакції реципієнта [41, 42, 43, 44].

(in particular, when the level of adenosine triphosphate (ATP) decreases), these systems are disrupted, causing phosphatidylserine to move to the outer surface of the membrane, becoming a marker of cell aging and a signal for phagocytosis [43, 44].

The results also show that in microvesicles isolated from erythrocytes with depleted ATP reserves, there is a relatively low level of phosphatidylethanolamine – 25% (0.8) and phosphatidylcholine – 27% (0.9), while the sphingomyelin content decreases to 26% (0.9) [43, 44]. The change in phospholipid composition under such energy conditions confirms the role of ATP-dependent membrane transporters in maintaining the structural integrity of erythrocytes. The presence of these shifts also explains the increased tendency toward vesiculation, which is one of the key mechanisms for eliminating defective cell components.

Lipid profile characteristics were also identified for other cell types. In bone marrow stem cells, the proportion of sphingomyelin was 8.6% (1.6), phosphatidylcholine – 25% (1.2), phosphatidylserine – 8% (0.7), and phosphatidylethanolamine – 3.7% (0.5) [45]. This profile indicates a more orderly membrane organization with a predominance of saturated lipids, which potentially provides higher membrane stability but reduces their deformation capacity. At the same time, the increased content of sphingomyelin may contribute to the formation of more rigid lipid domains, which facilitates the uncoupling of PVs during cell remodeling.

Plasmic VPs circulating in the bloodstream were characterized by a predominance of phosphatidylcholine (59%) and sphingomyelin (21%), while phosphatidylserine accounted for only 3.6% (0.3) and phosphatidylethanolamine accounted for 9.4% (0.3) [40]. This composition indicates that most circulating PVs have an outer membrane similar to the plasma membrane of the cells of origin, but do not show pronounced external exposure of phosphatidylserine. Presumably, these VPs are formed mainly as a result of physiological shedding rather than apoptotic processes, which distinguishes them from erythrocyte vesicles that are formed under conditions of aging or storage.

For comparison, platelets have a relatively high content of phosphatidylethanolamine (37%) and phosphatidylserine (17%) with a phosphatidylcholine level of 27% [46]. This composition ensures high procoagulant activity of platelet VPs, since exposed phosphatidylserine serves as a platform for the activation of the blood coagulation cascade. Accordingly, it is this lipid configuration that has direct clinical significance in the context of thrombogenesis.

Overall, analysis of the data in Table 2 confirms that PV formation is accompanied by a significant redistribution of phospholipids between the monolayers of the membrane, with a loss of normal asymmetry and an increase in the external exposure of phosphatidylserine. This process is a universal marker of cellular aging, stress, or apoptosis-like changes, but its degree varies depending on cell type and metabolic state. In erythrocytes, this mechanism is particularly evident during storage, which is of practical importance for transfusion medicine, since excessive PV formation can affect microcirculation, coagulation status, and immune responses in the recipient [41, 42, 43, 44].

Reduced lipid bilayer asymmetry and external exposure of phosphatidylserine are key characteristics

Зменшення асиметрії ліпідного бішару та зовнішня експозиція фосфатидилсерину є ключовими характеристиками еритроцитарних ПВ і відображають не лише структурно-функціональний стан клітин-донорів, а й механізми їх фізіологічного старіння та деградації у кров'яному руслі. Ці закономірності потребують подальшого вивчення з урахуванням впливу метаболічних факторів, тривалості зберігання та умов мікрооточення на стабільність мембранних структур.

#### **4. Білковий склад еритроцитарних позаклітинних везикул: переважання інтегральних мембранних білків і деградація цитоскелетних структур**

За результатами дослідження *Jetulio Pereira de Oliveira Junior та співавт.*, еритроцити людини продукують ПВ двох основних типів – малих (діаметром близько 80–100 нм) та великих (160–200 нм) [47]. Ці дві популяції суттєво відрізняються за щільністю, білковим складом і антигенною структурою, що відображає складну організацію мембрани еритроцитів і неоднорідність процесів їхнього везикулярного брунькування.

Застосування комплексного протеомного аналізу дозволило ідентифікувати 1812 білків, присутніх у складі еритроцитарних ПВ. Виявлено, що ПВ збагачені інтегральними мембранними білками, зокрема білками смуги 3, смуги 4.1, смуги 4.2, анкірином-1 та глікофорином А, тоді як частка цитоскелетних компонентів, таких як спектрини, значно знижена. Це свідчить про часткову деградацію цитоскелетних структур під час утворення везикул, що узгоджується з відомими механізмами старіння еритроцитів, коли втрата зв'язку між мембраною і цитоскелетом сприяє формуванню везикулярних фрагментів [48, 49].

Електронно-мікроскопічний аналіз показав, що дія кальцієвих іонофорів (іономіцин, A23187) спричиняє втрату двовигнуті форми еритроцитів, зниження мембранного потенціалу та локальне від'єднання цитоскелета від плазматичної мембрани, що призводить до формування сферичних везикул різного розміру. Цей процес супроводжується збільшенням кривизни мембрани та зміною її механічних властивостей, зокрема зменшенням жорсткості, що створює умови для брунькування мембранних ділянок [50].

Протеомне профілювання продемонструвало суттєве збагачення еритроцитарних ПВ білками, залученими до кальційзалежних процесів – зокрема, анексину А7, сорцином і білком PDCD6. Ці білки беруть участь у регуляції іонних каналів, гомеостазу кальцію та мембранного злиття, що підтверджує ключову роль кальцію в механізмах везикуляції. Окрім цього, у складі ПВ ідентифіковано малі ГТФази Rab-1A, Rab-5B, Rab-5C, Rab-10 та Rap-1b, які контролюють транспорт мембранних структур і сигнальні шляхи інтегринів. Аналіз генної онтології виявив переважне збагачення білками, що регулюють інтегрин-залежну адгезію, транспорт везикул та клітинну відповідь на механічний стрес.

З точки зору функціональної організації, великі еритроцитарні ПВ переважно містять білки ліпідних рафтів, такі як стоматин, тоді як малі – кальційзв'язуючі білки та компоненти, пов'язані з апоптотичними процесами. Це свідчить про те, що везикули можуть формуватися з різних мікродоменів плазматичної мембрани, що відображає складність топографії еритроцитарної плазмалеми [49].

of erythrocyte PVs and reflect not only the structural and functional state of donor cells, but also the mechanisms of their physiological aging and degradation in the bloodstream. These patterns require further study, taking into account the influence of metabolic factors, storage duration, and microenvironment conditions on the stability of membrane structures.

#### **4. Protein composition of erythrocyte extracellular vesicles: predominance of integral membrane proteins and degradation of cytoskeletal structures**

According to the results of a study by *Jetulio Pereira de Oliveira Junior et al.*, human erythrocytes produce two main types of EVs: small (with a diameter of about 80–100 nm) and large (160–200 nm) [47]. These two populations differ significantly in density, protein composition, and antigenic structure, reflecting the complex organization of the erythrocyte membrane and the heterogeneity of their vesicular budding processes.

The use of comprehensive proteomic analysis allowed the identification of 1,812 proteins present in the composition of erythrocyte VPs. It was found that VPs are enriched with integral membrane proteins, in particular proteins of band 3, band 4.1, band 4.2, ankyrin-1, and glycophorin A, while the proportion of cytoskeletal components, such as spectrins, is significantly reduced. This indicates partial degradation of cytoskeletal structures during vesicle formation, which is consistent with known mechanisms of erythrocyte aging, where the loss of communication between the membrane and the cytoskeleton contributes to the formation of vesicular fragments [48, 49].

Electron microscopic analysis showed that the action of calcium ionophores (ionomycin, A23187) causes the loss of the biconcave shape of erythrocytes, a decrease in membrane potential, and local detachment of the cytoskeleton from the plasma membrane, leading to the formation of spherical vesicles of various sizes. This process is accompanied by an increase in membrane curvature and a change in its mechanical properties, in particular a decrease in rigidity, which creates conditions for the budding of membrane areas [50].

Proteomic profiling has demonstrated a significant enrichment of erythrocyte PVs with proteins involved in calcium-dependent processes, in particular annexin A7, sorcin, and PDCD6 protein. These proteins are involved in the regulation of ion channels, calcium homeostasis, and membrane fusion, confirming the key role of calcium in vesiculation mechanisms. In addition, small GTPases Rab-1A, Rab-5B, Rab-5C, Rab-10, and Rap-1b, which control the transport of membrane structures and integrin signaling pathways, have been identified in the composition of PVs. Gene ontology analysis revealed a predominant enrichment of proteins that regulate integrin-dependent adhesion, vesicle transport, and cellular response to mechanical stress.

In terms of functional organization, large erythrocyte PVs predominantly contain lipid raft proteins such as stomatins, while small ones contain calcium-binding proteins and components associated with apoptotic processes. This suggests that vesicles can be formed from different microdomains of the plasma membrane,

Важливим спостереженням дослідження стало те, що еритроцитарні ПВ активно взаємодіють з клітинами імунної системи [51, 52]. Експерименти з нейтрофілами показали, що після інкубації понад 80% цих клітин містять флуоресцентно мічені везикули, що підтверджує ефективне поглинання. Кріоелектронна мікроскопія з імуноміченням CD235a продемонструвала два типи взаємодії: пряме злиття ПВ із плазматичною мембраною нейтрофілів і рецептор-опосередковану інтерналізацію. Внутрішньоклітинно локалізовані ПВ виявлялися в цитоплазмі нейтрофілів, що вказує на можливість їх функціонального впливу на клітинну активність.

Функціональні дослідження засвідчили, що наявність еритроцитарних ПВ у середовищі інкубації знижує фагоцитарну здатність нейтрофілів щодо *Escherichia coli*, особливо після 60 та 90 хв спостереження ( $p < 0,01$ ), проте не впливає на життєздатність клітин ( $p > 0,05$ ). Ймовірним механізмом цього ефекту є зовнішня експозиція фосфатидилсерину, який взаємодіє з білками системи комплементу, зокрема C1q, та діє як сигнал «поглинання без активації», що пригнічує фагоцитарну активність.

Отримані результати свідчать, що еритроцитарні ПВ є не просто побічним продуктом деградації клітин, а складним регуляторним елементом міжклітинної взаємодії. Їхній білковий склад, збагачення інтегральними мембранними компонентами та кальційзв'язуючими білками, а також присутність фосфатидилсерину свідчать про багаторівневу участь цих структур у процесах підтримання гомеостазу, регуляції імунних реакцій та кліренсу старіючих клітин.

Крім того, фізико-хімічні властивості еритроцитарних ПВ, зокрема стабільна щільність, наявність гемоглобіну та однорідний показник заломлення (~1,42), вказують на їх потенціал як природних наноструктур для транспортування біологічно активних молекул. Це відкриває перспективи їхнього використання як біосумісних носіїв для цілеспрямованої доставки лікарських препаратів, і вже продемонстровано експериментальні підходи з використанням еритроцитарних везикул для транспортової терапії [53, 54].

Формування еритроцитарних ПВ супроводжується зміною фосфоліпідної асиметрії мембрани, деградацією цитоскелетних білків та підвищенням частки інтегральних мембранних компонентів. Виявлені зміни відображають механізми старіння еритроцитів і водночас вказують на потенційну участь цих везикул у системній міжклітинній комунікації. Еритроцитарні ПВ залишаються перспективним об'єктом для дослідження їхнього впливу на імунну регуляцію, тромбогенність і можливості терапевтичного застосування.

#### **5. Вміст гемоглобіну та прооксидантних компонентів у еритроцитарних позаклітинних везикулах і їхній вплив на редокс-гомеостаз плазми крові**

За нормальних умов формування ПВ є частиною фізіологічного механізму елімінації пошкоджених або окиснених компонентів клітини, що дозволяє підтримувати функціональну стабільність мембрани еритроцита. Водночас у патологічних станах, таких як серпоподібноклітинна анемія, дефіцит глюкозо-6-фосфатдегідрогенази або під час тривалого зберігання еритроцитарної маси, інтенсивність везикуляції

reflecting the complexity of the topography of the erythrocyte plasmalemma [49].

An important observation of the study was that erythrocyte VPs actively interact with immune system cells [51, 52]. Experiments with neutrophils showed that after incubation, more than 80% of these cells contain fluorescently labeled vesicles, confirming effective uptake. Cryo-electron microscopy with CD235a immunolabeling demonstrated two types of interaction: direct fusion of PVs with the plasma membrane of neutrophils and receptor-mediated internalization. Intracellularly localized PVs were found in the cytoplasm of neutrophils, indicating the possibility of their functional influence on cellular activity.

Functional experiments showed that the presence of erythrocyte PV in the incubation medium reduces the phagocytic ability of neutrophils against *Escherichia coli*, especially after 60 and 90 min of observation ( $p < 0.01$ ), but does not affect cell viability ( $p > 0.05$ ). The probable mechanism of this effect is the external exposure of phosphatidylserine, which interacts with complement system proteins, in particular C1q, and acts as a «take-up without activation» signal that inhibits phagocytic activity.

The results obtained indicate that erythrocyte PVs are not simply a by-product of cell degradation, but a complex regulatory element of intercellular interaction. Their protein composition, enrichment with integral membrane components and calcium-binding proteins, as well as the presence of phosphatidylserine, indicate the multilevel involvement of these structures in the processes of maintaining homeostasis, regulating immune responses, and clearing aging cells.

In addition, the physicochemical properties of erythrocyte PVs, in particular their stable density, the presence of hemoglobin, and a uniform refractive index (~1.42), indicate their potential as natural nanostructures for the transport of biologically active molecules. This opens up prospects for their use as biocompatible carriers for targeted drug delivery, and experimental approaches using erythrocyte vesicles for transport therapy have already been demonstrated [53, 54].

The formation of erythrocyte PVs is accompanied by a change in the phospholipid asymmetry of the membrane, degradation of cytoskeletal proteins, and an increase in the proportion of integral membrane components. The changes detected reflect the mechanisms of erythrocyte aging and, at the same time, indicate the potential involvement of these vesicles in systemic intercellular communication. Erythrocyte EVs remain a promising subject for research into their effect on immune regulation, thrombogenicity, and therapeutic applications.

#### **5. The content of hemoglobin and prooxidant components in erythrocyte extracellular vesicles and their effect on blood plasma redox homeostasis**

Under normal conditions, the formation of EV is part of the physiological mechanism of elimination of damaged or oxidized cell components, which allows maintaining the functional stability of the erythrocyte membrane. At the same time, in pathological conditions such as sickle cell anemia, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, or during prolonged storage of erythrocyte mass, the intensity of vesiculation increases significantly, and the chemical profile of PVs becomes prooxidant [55].

істотно зростає, а хімічний профіль ПВ набуває прооксидантного характеру [55].

Основним внутрішнім білковим компонентом ПВ є гемоглобін, який у позаклітинному середовищі втрачає антиоксидантний захист цитозолу еритроцитів, зокрема глутатіон, пероксиредоксин 2, глутатіонпероксидазу та каталазу. Унаслідок цього гемоглобін у складі ПВ легко піддається автоокисненню з утворенням супероксиду та перекису водню [56, 57]. Метгемоглобін, що виникає при цьому процесі, виступає каталізатором реакцій, подібних до реакції Фентона, в яких бере участь відновлене залізо, утворюючи гідроксильний радикал – один із найагресивніших прооксидантів у біологічних системах. Така реакційна активність сприяє окисненню фосфоліпідів і білкових компонентів мембрани ПВ, зокрема білків цитоскелета та мембранних комплексів.

На поверхні ПВ виявляють значну кількість залишкового гему, який здатен каталізувати утворення активних форм кисню безпосередньо у плазмі крові. Ці процеси ініціюють перекисне окиснення ліпідів плазми та модифікацію білкових структур, що призводить до порушення антиоксидантної рівноваги і зниження біодоступності оксиду азоту. Зменшення концентрації оксиду азоту асоціюється з ендотеліальною дисфункцією, вазоконстрикцією, активацією тромбоцитів і підвищенням експресії молекул адгезії, таких як VCAM-1, ICAM-1 та P-селектин, що створює умови для розвитку запальної реакції судинної стінки [58].

У складі ПВ ідентифіковано значну кількість продуктів перекисного окиснення ліпідів, карбонільованих білків, окиснених фосфоліпідів і фрагментів цитоскелетних білків, включаючи спектрин і анкірин. Такі компоненти є маркерами хронічного оксидативного пошкодження еритроцитарної мембрани, що передують везикуляції [59]. Вважається, що основними каталізаторами цих реакцій є ферменти, асоційовані з мембраною, зокрема NADPH-оксидаза та ксантинооксидаза, які продукують супероксид і перекис водню [60]. Після вивільнення в кровообіг ПВ здатні зберігати активність цих ферментів, підтримуючи генерацію активних форм кисню та створюючи локальне прооксидантне мікросередовище.

Додатковим джерелом окиснювальної активності є залізо у відновленій формі, що вивільняється під час деградації гему. У присутності перекису водню це залізо ініціює ланцюгову реакцію ліпідної пероксидації, яка супроводжується утворенням токсичних альдегідів, таких як малоновий діальдегід і 4-гідроксинафталеналь. Ці сполуки утворюють ковалентні зв'язки з білками плазми, змінюючи їхню структуру і функцію та знижуючи антиоксидантну ємність плазми [61, 62]. Унаслідок цього плазмові білки, зокрема альбумін, ферменти антиоксидантної системи та компоненти системи комплементу, втрачають функціональну активність, що посилює системне оксидативне навантаження [63].

Вивільнення ПВ у кровообіг є подією, яка має двоїстий вплив на редокс-гомеостаз плазми. З одного боку, ПВ можуть бути джерелом прооксидантів, спричиняючи генерацію активних форм кисню та азоту, а з іншого – виконувати роль переносників ферментів антиоксидантного захисту, що тимчасово стабілізують окисно-відновну рівновагу [64, 65]. За нормальних умов ПВ містять пероксиредоксин 2, глутатіонпероксидазу, каталази та тіоредоксинредуктази, які забезпечують

The main internal protein component of PV is hemoglobin, which in the extracellular environment loses the antioxidant protection of the erythrocyte cytosol, in particular glutathione, peroxiredoxin 2, glutathione peroxidase, and catalase. As a result, hemoglobin in PV is easily auto-oxidized to form superoxide and hydrogen peroxide [56, 57]. The methemoglobin that arises in this process acts as a catalyst for reactions similar to the Fenton reaction, in which reduced iron participates, forming a hydroxyl radical—one of the most aggressive pro-oxidants in biological systems. Such reaction activity promotes the oxidation of phospholipids and protein components of the PV membrane, in particular cytoskeletal proteins and membrane complexes.

A significant amount of residual heme is found on the surface of the PV, which is capable of catalyzing the formation of active oxygen species directly in the blood plasma.

These processes initiate the peroxidation of plasma lipids and the modification of protein structures, leading to a disruption of the antioxidant balance and a decrease in the bioavailability of nitric oxide. A decrease in nitric oxide concentration is associated with endothelial dysfunction, vasoconstriction, platelet activation, and increased expression of adhesion molecules such as VCAM-1, ICAM-1, and P-selectin, which creates conditions for the development of an inflammatory reaction in the vascular wall [58].

A significant amount of lipid peroxidation products, carbonylated proteins, oxidized phospholipids, and cytoskeletal protein fragments, including spectrin and ankyrin, have been identified in PV. These components are markers of chronic oxidative damage to the erythrocyte membrane, which precedes vesiculation [59]. It is believed that the main catalysts of these reactions are membrane-associated enzymes, in particular NADPH oxidase and xanthine oxidase, which produce superoxide and hydrogen peroxide [60]. After being released into the bloodstream, PVs are able to maintain the activity of these enzymes, supporting the generation of active oxygen species and creating a local prooxidant microenvironment.

An additional source of oxidative activity is iron in its reduced form, which is released during heme degradation. In the presence of hydrogen peroxide, this iron initiates a chain reaction of lipid peroxidation, accompanied by the formation of toxic aldehydes such as malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. These compounds form covalent bonds with plasma proteins, altering their structure and function and reducing the antioxidant capacity of plasma [61, 62]. As a result, plasma proteins, in particular albumin, antioxidant system enzymes, and complement system components, lose their functional activity, which increases systemic oxidative stress [63].

The release of PV into the bloodstream is an event that has a dual effect on plasma redox homeostasis. On the one hand, PVs can be a source of pro-oxidants, causing the generation of active forms of oxygen and nitrogen, and on the other hand, they can act as carriers of antioxidant defense enzymes that temporarily stabilize the redox balance [64, 65]. Under normal conditions, PVs contain peroxiredoxin 2, glutathione peroxidase, catalase, and thioredoxin reductase, which ensure the neutralization of active forms of oxygen and maintain the homeostatic level of oxidative processes. However, in cases of increased oxidative stress, when the activity of erythrocyte antioxidant defense enzymes decreases,

знешкодження активних форм кисню та підтримку гомеостатичного рівня оксидативних процесів. Проте у випадках підвищеного оксидативного стресу, коли знижується активність ферментів антиоксидантного захисту еритроциту, у складі ПВ переважають окиснені форми білків і ліпідів, що зміщує баланс у бік окиснення [66, 67, 68].

Накопичення таких ПВ у плазмі крові супроводжується зменшенням рівня відновленого глутатіону, порушенням циклу регенерації NADPH і підвищенням концентрації перекисних продуктів. Це призводить до виснаження антиоксидантного резерву плазми, зниження активності каталази та глутатіонпероксидази, які переходять у неактивні форми під впливом надлишку перекису водню. В умовах такого дисбалансу відбувається каскадне утворення гідроксильних радикалів і пероксильних радикалів, які посилюють окиснення плазмових ліпідів і мембран клітин крові. Це, у свою чергу, підвищує крихкість еритроцитів, сприяє гемолізу та подальшому вивільненню гему, формуючи самопідтримувальний цикл оксидативного пошкодження [61].

У плазмі крові прооксидантні ПВ активно взаємодіють з ендотеліальними клітинами, тромбоцитами та лейкоцитами, індукуючи експресію молекул адгезії та секрецію прозапальних цитокінів. Було показано, що ПВ, багаті на метгемоглобін і ферилгемоглобін, активують Toll-подібний рецептор 4 на ендотеліальних клітинах, що призводить до підвищення судинної проникності, рекрутування імунних клітин та формування локального запалення [69, 70]. Крім того, під впливом таких везикул відбувається активація тромбоцитів і зростання коагуляційного потенціалу плазми, що сприяє мікротромбозу та вазооклюзії. Подібні механізми встановлені при серпоподібноклітинній анемії, де висока кількість еритроцитарних ПВ корелює з тяжкістю судинних ускладнень і рівнем системного запалення [71, 72].

Порушення редокс-гомеостазу під впливом ПВ проявляється не лише активацією запальних і коагуляційних каскадів, але й прямими змінами метаболічної активності плазми. Відомо, що підвищений рівень гідропероксидів ліпідів і білкових карбонілів спричиняє інактивацію ферментів енергетичного обміну та системи згортання, зокрема глутатіонредуктази та тіоредоксинредуктази, які забезпечують підтримку відновного стану клітинних білків. Такі зміни ведуть до глибоких метаболічних порушень, що поглиблюють анемічний і запальний стан.

У контексті клінічної практики кількісні та якісні характеристики еритроцитарних ПВ розглядаються як інформативні маркери системного оксидативного навантаження. Висока концентрація ПВ, що містять окиснені форми гемоглобіну, є предиктором інтенсивності гемолізу, запалення та судинних ускладнень [73]. Одночасно оцінка ферментного профілю ПВ, зокрема рівня пероксиредоксину 2, глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази та каталази, може бути використана для визначення функціональної спроможності антиоксидантної системи організму. Зниження активності цих ферментів у складі ПВ є маркером виснаження еритроцитарного редокс-резерву [74].

Таким чином, еритроцитарні ПВ відіграють двоїсту роль у підтриманні або порушенні редокс-гомеостазу плазми крові. За фізіологічних умов вони забезпечують елімінацію пошкоджених клітинних компонентів

oxidized forms of proteins and lipids predominate in the composition of PV, shifting the balance towards oxidation [66, 67, 68].

The accumulation of such PVs in blood plasma is accompanied by a decrease in the level of reduced glutathione, a disruption of the NADPH regeneration cycle, and an increase in the concentration of peroxide products. This leads to depletion of the plasma antioxidant reserve, a decrease in the activity of catalase and glutathione peroxidase, which become inactive under the influence of excess hydrogen peroxide. Under conditions of such imbalance, there is a cascade formation of hydroxyl radicals and peroxy radicals, which enhance the oxidation of plasma lipids and blood cell membranes. This, in turn, increases the fragility of erythrocytes, promotes hemolysis and further release of heme, forming a self-sustaining cycle of oxidative damage [61].

In blood plasma, prooxidant ROS actively interact with endothelial cells, platelets, and leukocytes, inducing the expression of adhesion molecules and the secretion of proinflammatory cytokines. It has been shown that PVs rich in methemoglobin and ferrylhemoglobin activate Toll-like receptor 4 on endothelial cells, leading to increased vascular permeability, recruitment of immune cells, and the formation of local inflammation [69, 70]. In addition, these vesicles activate platelets and increase plasma coagulation potential, contributing to microthrombosis and vaso-occlusion. Similar mechanisms have been established in sickle cell anemia, where a high number of erythrocyte VCs correlates with the severity of vascular complications and the level of systemic inflammation [71, 72].

Redox homeostasis disruption under the influence of PV manifests itself not only in the activation of inflammatory and coagulation cascades, but also in direct changes in plasma metabolic activity. It is known that elevated levels of lipid hydroperoxides and protein carbonyls cause inactivation of energy metabolism and coagulation system enzymes, in particular glutathione reductase and thioredoxin reductase, which maintain the reductive state of cellular proteins. Such changes lead to profound metabolic disorders that exacerbate anemia and inflammation.

In the context of clinical practice, the quantitative and qualitative characteristics of erythrocyte PVs are considered informative markers of systemic oxidative stress. High concentrations of PVs containing oxidized forms of hemoglobin are predictors of the intensity of hemolysis, inflammation, and vascular complications [73]. At the same time, assessment of the enzyme profile of PEs, in particular the level of peroxiredoxin 2, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase, can be used to determine the functional capacity of the body's antioxidant system. A decrease in the activity of these enzymes in the PV is a marker of depletion of the erythrocyte redox reserve [74].

Thus, erythrocyte PVs play a dual role in maintaining or disrupting the redox homeostasis of blood plasma. Under physiological conditions, they ensure the elimination of damaged cell components and can temporarily transport antioxidant defense enzymes. However, under conditions of pathological oxidative stress, PVs are transformed into active mediators of oxidation capable of initiating a cascade of inflammatory and thrombotic reactions. Understanding the mechanisms of their formation, composition, and biological activity is of important pathogenetic and diagnostic significance.

і можуть тимчасово переносити ферменти антиоксидантного захисту. Проте за умов патологічного оксидативного стресу ПВ перетворюються на активних медіаторів окиснення, здатних ініціювати каскад запальних і тромботичних реакцій. Розуміння механізмів їх утворення, складу та біологічної активності має важливе патогенетичне і діагностичне значення. Подальші дослідження в цьому напрямку відкривають перспективи для розробки нових стратегій лікування, спрямованих на відновлення редокс-рівноваги, зокрема за допомогою антиоксидантних і мембранопротекторних засобів, що діють на рівні ПВ [65].

#### **6. Вплив еритроцитарних позаклітинних везикул на функціональний стан ендотеліальних клітин, агрегаційну активність тромбоцитів і процес згортання крові**

Важливою особливістю еритроцитарних ПВ є їхній прямий вплив на ендотеліальні клітини, які вистилають судинну стінку і забезпечують бар'єрну, метаболічну та антикоагулянтну функції. Встановлено, що ПВ, які містять вільний гемоглобін і гем, спричиняють значне підвищення продукції активних форм кисню в ендотеліальних клітинах, що веде до активації окисно-відновних сигнальних шляхів, включаючи NF-κB, p38 MAPK та JNK [75]. Активація цих каскадів індукуює експресію молекул адгезії – ICAM-1, VCAM-1 і E-селектину, що сприяє адгезії лейкоцитів до ендотелію, ініціюючи запальний процес у судинній стінці. Крім того, ПВ можуть модифікувати біодоступність NO, який є ключовим вазодилатором і регулятором судинного тону. Вільний гемоглобін, який переноситься у складі ПВ, здатний зв'язувати NO з утворенням нітрату, що призводить до вазоконстрикції, зниження судинної реактивності та підвищення ризику гіпертензії [76].

Дослідження показують, що еритроцитарні ПВ не лише впливають на судинну реактивність, але й безпосередньо змінюють морфофункціональний стан ендотелію. Під їхнім впливом спостерігається порушення міжендотеліальних контактів, зміна проникності судинної стінки та дестабілізація цитоскелетних структур, що вказує на втрату бар'єрної функції. У культурах ендотеліальних клітин після інкубації з ПВ відзначено зниження експресії VE-кадгерину та β-катеніну, які є ключовими компонентами щільних міжклітинних контактів [77]. Крім того, підвищення рівня вільного гему, що вивільняється з ПВ, ініціює утворення гідроксильних радикалів за механізмом реакції Фентона, що підсилює локальне окиснення ліпідів і білків у мембранах ендотеліальних клітин. Такий процес супроводжується активацією апоптозу через сигнальні шляхи, залежні від каспаз-3 та каспаз-9, що може сприяти розвитку мікросудинної дисфункції [78].

Вплив ПВ на тромбоцити має не менш важливе патофізіологічне значення. Поверхневі фосfolіпіди, зокрема фосфатидилсерин, а також мікроРНК, білкові фактори і гемоглобін, що містяться у ПВ, сприяють активації тромбоцитів навіть без участі класичних агоністів, таких як тромбін або АДП [79]. Встановлено, що при контакті ПВ з тромбоцитами відбувається підвищення рівня внутрішньоклітинного кальцію, збільшення експресії глікопротеїну IIb/IIIa та вивільнення тромбоксану A<sub>2</sub>, що стимулює агрегацію тромбоцитів і посилює тромбоутворення [80]. ПВ також

Further research in this area opens up prospects for the development of new treatment strategies aimed at restoring redox balance, in particular with the help of antioxidant and membranoprotective agents that act at the level of PV [65].

#### **6. The effect of erythrocyte extracellular vesicles on the functional state of endothelial cells, platelet aggregation activity, and the blood coagulation process**

An important feature of erythrocyte EVs is their direct effect on endothelial cells, which line the vascular wall and provide barrier, metabolic, and anticoagulant functions. It has been established that EVs containing free hemoglobin and heme cause a significant increase in the production of reactive oxygen species in endothelial cells, leading to the activation of redox signaling pathways, including NF-κB, p38 MAPK, and JNK [75]. Activation of these cascades induces the expression of adhesion molecules—ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin—which promotes leukocyte adhesion to the endothelium, initiating an inflammatory process in the vascular wall. In addition, EVs can modify the bioavailability of NO, which is a key vasodilator and regulator of vascular tone. Free hemoglobin, which is transported as part of EVs, is capable of binding NO to form nitrate, which leads to vasoconstriction, decreased vascular reactivity, and an increased risk of hypertension [76].

Studies show that erythrocyte EVs not only affect vascular reactivity but also directly alter the morphofunctional state of the endothelium. Under their influence, there is a disruption of interendothelial contacts, a change in the permeability of the vascular wall, and destabilization of cytoskeletal structures, indicating a loss of barrier function. In endothelial cell cultures after incubation with EVs, a decrease in the expression of VEcadherin and β-catenin, which are key components of tight intercellular contacts, was noted [77]. In addition, an increase in the level of free heme released from EVs initiates the formation of hydroxyl radicals via the Fenton reaction mechanism, which enhances local oxidation of lipids and proteins in endothelial cell membranes. This process is accompanied by the activation of apoptosis through signaling pathways dependent on caspase-3 and caspase-9, which may contribute to the development of microvascular dysfunction [78].

The effect of EVs on platelets is no less important in pathophysiological terms. Surface phospholipids, in particular phosphatidylserine, as well as microRNAs, protein factors, and hemoglobin contained in EVs, promote platelet activation even without the involvement of classical agonists such as thrombin or ADP [79]. It has been established that when EVs come into contact with platelets, there is an increase in intracellular calcium levels, an increase in the expression of glycoprotein IIb/IIIa, and the release of thromboxane A<sub>2</sub>, which stimulates platelet aggregation and enhances thrombus formation [80]. EVs can also act as transport carriers of bioactive molecules, in particular prostaglandins and lysophospholipids, which

можуть діяти як транспортні носії біоактивних молекул, зокрема простагландинів та лізофосфоліпідів, які опосередковано модулюють тромбоцитарну функцію. Така взаємодія створює сприятливе мікросередовище для формування тромбу, особливо у зонах уповільненого кровотоку або ендотеліального ушкодження.

Крім активації тромбоцитів, ПВ безпосередньо впливають на плазмові фактори згортання крові. Доведено, що вони беруть участь у прискоренні активації фактора X та протромбіну, формуючи каталізаторну поверхню для збирання коагуляційних комплексів [81]. У плазмі крові пацієнтів із серпоподібноклітинною анемією або іншими гемолітичними станами рівень ПВ суттєво підвищений, що корелює зі збільшенням активності тромбіну, рівня D-димерів та укороченням активованого часткового тромбопластинового часу. Такі зміни свідчать про системну гіперкоагуляцію та схильність до мікротромбозу. Наявність великої кількості ПВ у циркуляції також асоціюється з посиленням утворенням мікротромбів у мікросудинах селезінки, нирок і легенів, що є характерним для багатьох гемолітичних патологій [82].

ПВ чинять також опосередкований вплив на систему фібринолізу. Показано, що вони можуть зв'язувати інгібітор активатора плазміногену-1, зменшуючи активність тканинного активатора плазміногену і тим самим пригнічуючи лізис фібрину [83]. Це додатково сприяє стабілізації тромбу і подовженню його резистентності до деградації. При патологічних станах, таких як серпоподібноклітинна анемія або дефіцит глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, цей ефект набуває особливої вираженості, посилюючи ризик тромбоемболічних ускладнень.

Важливим аспектом дії ПВ є їхня роль у передачі міжклітинних сигналів, що впливають на регуляцію судинного тону, запалення та гемостаз. Через перенесення РНК, білків і ліпідів ПВ здатні змінювати фенотип клітин-мішеней, зокрема ендотеліоцитів і тромбоцитів, сприяючи їхній активації або дисфункції. Наприклад, мікроРНК, що містяться у складі ПВ, можуть модифікувати експресію генів, пов'язаних з продукцією NO, ангіогенезом або клітинною адгезією [84]. Такий механізм міжклітинної комунікації створює новий рівень регуляції судинного гомеостазу, який виходить за межі класичних гуморальних впливів.

Загалом, накопичення еритроцитарних ПВ у плазмі крові слід розглядати як маркер і водночас активний медіатор патологічних процесів, пов'язаних із порушенням редокс-гомеостазу, ендотеліальної дисфункції та гіперкоагуляційних станів. Їхній вплив на ендотелій, тромбоцити та систему згортання є багатовекторним і взаємопідсилювальним: ПВ підвищують продукцію активних форм кисню, порушують антикоагулянтний потенціал ендотелію, індукують активацію тромбоцитів та прискорюють коагуляційний каскад. Ці процеси формують патологічне коло, яке сприяє розвитку мікросудинної дисфункції, ішемічних уражень та тромботичних ускладнень [85].

У цьому контексті ПВ розглядаються не лише як вторинний продукт гемолітичних процесів, але і як потенційна терапевтична мішень. Модулювання їх утворення, кліренсу або функціональної активності може відкрити нові можливості для профілактики судинних ускладнень у пацієнтів із патологіями, що супроводжуються хронічним оксидативним стресом. Подальші дослідження мають

indirectly modulate platelet function. This interaction creates a favorable microenvironment for thrombus formation, especially in areas of slow blood flow or endothelial damage.

In addition to activating platelets, VPs directly affect plasma coagulation factors. They have been shown to participate in the acceleration of factor X and prothrombin activation by forming a catalytic surface for the assembly of coagulation complexes [81].

In the blood plasma of patients with sickle cell anemia or other hemolytic conditions, the level of VADs is significantly increased, which correlates with an increase in thrombin activity, D-dimer levels, and a shortening of activated partial thromboplastin time. These changes indicate systemic hypercoagulation and a tendency to microthrombosis. The presence of large amounts of PV in circulation is also associated with increased microthrombus formation in the microvessels of the spleen, kidneys, and lungs, which is characteristic of many hemolytic pathologies [82].

PVs also have an indirect effect on the fibrinolysis system. It has been shown that they can bind to plasminogen activator inhibitor-1, reducing the activity of tissue plasminogen activator and thereby inhibiting fibrin lysis [83]. This further contributes to thrombus stabilization and prolongs its resistance to degradation. In pathological conditions such as sickle cell anemia or glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, this effect is particularly pronounced, increasing the risk of thromboembolic complications.

An important aspect of the action of VCs is their role in the transmission of intercellular signals that affect the regulation of vascular tone, inflammation, and hemostasis. By transporting RNA, proteins, and lipids, EVs are capable of altering the phenotype of target cells, particularly endothelial cells and platelets, promoting their activation or dysfunction. For example, microRNAs contained in EVs can modify the expression of genes associated with NO production, angiogenesis, or cell adhesion [84]. This mechanism of intercellular communication creates a new level of vascular homeostasis regulation that goes beyond classical humoral influences.

In general, the accumulation of erythrocyte VEs in blood plasma should be considered as a marker and, at the same time, an active mediator of pathological processes associated with redox homeostasis disorders, endothelial dysfunction, and hypercoagulable states. Their effect on the endothelium, platelets, and the coagulation system is multidirectional and mutually reinforcing: VPs increase the production of active oxygen species, disrupt the anticoagulant potential of the endothelium, induce platelet activation, and accelerate the coagulation cascade. These processes form a pathological circle that contributes to the development of microvascular dysfunction, ischemic lesions, and thrombotic complications [85].

In this context, VADs are considered not only as a secondary product of hemolytic processes, but also as a potential therapeutic target. Modulating their formation, clearance, or functional activity may open up new opportunities for the prevention of vascular complications in patients with pathologies accompanied by chronic oxidative stress. Further research should focus on elucidating the mechanisms of interaction between VADs and endothelial cells and platelets, as well as on developing methods for controlling their plasma levels as a biomarker of thrombotic events. Based on the

бути спрямовані на з'ясування механізмів взаємодії ПВ з ендотеліальними клітинами та тромбоцитами, а також на розробку методів контролю їхнього рівня у плазмі як біомаркера ризику тромботичних подій. З урахуванням накопичених доказів, можна стверджувати, що еритроцитарні ПВ є ключовими елементами міжклітинної комунікації у системі кровообігу, що визначають рівновагу між гемостазом і тромбозом, а також суттєво впливають на прогресування судинних уражень при різних патологічних станах [1, 86].

#### **7. Імуномодулювальні властивості еритроцитарних позаклітинних везикул: стимуляція синтезу цитокінів і взаємодія з моноцитами та макрофагами**

Літературні дані свідчать, що еритроцитарні ПВ здатні впливати на ключові ланки вродженої та адаптивної імунної відповіді, при цьому спектр їхніх ефектів визначається умовами формування ПВ, їхнім біохімічним складом і клітинним контекстом. У дослідженнях *in vitro* встановлено, що додавання еритроцитарних ПВ до мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMC) супроводжується посиленням секреції прозапальних хемокінів та цитокінів, а також підвищенням виживання нестимульованих PBMC [1, 87, 88]. Такий комплекс змін може відображати активацію сигнальних шляхів, залучених у відповіді на зовнішні стимулятори, зокрема шляхів, асоційованих з рецепторами розпізнавання патернів. Підвищення виживання PBMC за відсутності додаткових стимулів дозволяє припускати участь еритроцитарних ПВ у модифікації механізмів клітинної стійкості, що традиційно спостерігається при активації вродженого імунітету.

Існують дані, що ключову роль у запуску синтезу прозапальних цитокінів відіграє взаємодія між екзосомною фракцією тромбоцитарних, ендотеліальних або еритроцитарних ПВ та моноцитами, які реагують на зовнішні сигнали найбільш чутливо [88]. Ймовірно, це включає передачу міжклітинних сигналів через мембранні білки ПВ або транспортування внутрішньоклітинних компонентів, здатних модифікувати транскрипційні процеси моноцитів. Значущим є також встановлений ефект посилення реплікації мітоген-активованих CD4<sup>+</sup> і CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцитів, що реалізується через вплив на антигенпрезентувальні клітини. Такий механізм відповідає концепції, згідно з якою ПВ можуть опосередковано змінювати інтенсивність адаптивної відповіді, регулюючи якість та кількість ко-стимулювальних сигналів.

Результати, отримані у дослідженні Фішера та співавт., підтвердили здатність еритроцитарних ПВ індукувати синтез прозапальних медіаторів PBMC і водночас змінювати функціональну активність тромбоцитів, що проявляється посиленням утворенням контактів тромбоцитів з нейтрофілами та моноцитами після інкубації з ПВ [88]. Такі зміни можуть бути ознакою активації адгезивних механізмів, характерних для системної запальної відповіді. У трансфузіологічних ситуаціях це має особливе значення, оскільки формування тромбоцитарно-лейкоцитарних агрегатів часто розглядається як один з ранніх маркерів розвитку посттрансфузійних реакцій.

Надзвичайно важливою є також встановлена здатність еритроцитарних ПВ із збережених одиниць крові зв'язуватися з моноцитами та активувати ендотеліальні клітини за участю β-інтегринзалежного механізму [89]. Така взаємодія може спричиняти

accumulated evidence, it can be argued that erythrocyte EVs are key elements of intercellular communication in the circulatory system, determining the balance between hemostasis and thrombosis, and significantly influencing the progression of vascular lesions in various pathological conditions [1, 86].

#### **7. Immunomodulatory properties of erythrocyte extracellular vesicles: stimulation of cytokine synthesis and interaction with monocytes and macrophages**

Literature data indicate that erythrocyte EVs are capable of influencing key links in the innate and adaptive immune response, with the spectrum of their effects determined by the conditions of EV formation, their biochemical composition, and cellular context. *In vitro* studies have shown that the addition of erythrocyte PVs to peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) is accompanied by increased secretion of proinflammatory chemokines and cytokines, as well as increased survival of unstimulated PBMCs [1, 87, 88]. This complex of changes may reflect the activation of signaling pathways involved in the response to external stimuli, in particular pathways associated with pattern recognition receptors. The increase in PBMC survival in the absence of additional stimuli suggests the involvement of erythrocyte PVs in the modification of cellular resistance mechanisms, which is traditionally observed during the activation of innate immunity.

There is evidence that the interaction between the exosomal fraction of platelet, endothelial, or erythrocyte PVs and monocytes, which are most sensitive to external signals, plays a key role in triggering the synthesis of proinflammatory cytokines [88]. This probably involves the transmission of intercellular signals through PV membrane proteins or the transport of intracellular components capable of modifying the transcriptional processes of monocytes. Also significant is the established effect of enhancing the replication of mitogen-activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, which is achieved through the influence on antigen-presenting cells. This mechanism is consistent with the concept that PVs can indirectly alter the intensity of the adaptive response by regulating the quality and quantity of co-stimulatory signals.

The results obtained in the study by Fisher et al. confirmed the ability of erythrocyte PVs to induce the synthesis of proinflammatory mediators in PBMCs and, at the same time, to alter the functional activity of platelets, manifested by increased formation of contacts between platelets and neutrophils and monocytes after incubation with PVs [88]. Such changes may be a sign of activation of adhesive mechanisms characteristic of the systemic inflammatory response. This is particularly important in transfusion situations, as the formation of platelet-leukocyte aggregates is often considered one of the early markers of post-transfusion reactions.

The established ability of erythrocyte PVs from stored blood units to bind to monocytes and activate endothelial cells through a β-integrin-dependent mechanism is also extremely important [89]. Such interaction can cause an increase in the expression of adhesion molecules, which, in turn, facilitates the recruitment of leukocytes to the

підвищення експресії молекул адгезії, що, у свою чергу, полегшує рекрутування лейкоцитів до судинної стінки, формуючи умови для локальної запальної реакції. У трансфузійних сценаріях подібні механізми часто пов'язують із розвитком запальних ускладнень, оскільки активація ендотелію та моноцитів є однією з ранніх подій, що передують генерації прозапальних цитокінів і стимуляції нейтрофільно-тромбоцитарної взаємодії [88, 90].

Протилежні за напрямком ефекти еритроцитарних ПВ спостерігалися у дослідженнях, де макрофаги попередньо піддавали дії зимозану А або ліпополісахариду. У цих умовах фагоцитовані ПВ демонстрували імуносупресивну дію, що проявлялося зниженням вивільнення фактора некрозу пухлини- $\alpha$  і збільшенням продукції інтерлейкіну-8 [91]. Такий зсув цитокінового профілю може відобразити адаптаційний механізм, спрямований на обмеження надмірної запальної активності, що нерідко спостерігається після інтенсивної активації макрофагів. Цей феномен привертає увагу, оскільки свідчить про можливість регуляції макрофагальних функцій через процес фагоцитозу ПВ, що потенційно включає передачу регуляторних мікромолекул або мембранних ліпідних компонентів, здатних впливати на транскрипційні каскади клітини-ефектора.

Імуносупресивні ефекти еритроцитарних ПВ підтверджені і в експериментальних моделях сингенних трансфузій, де формування CD9- та CD81-позитивних ПВ супроводжувалося пригніченням реакцій гіперчутливості уповільненого типу, опосередкованих мікроРНК-150 [92]. За цих умов спостерігалось зниження активації Т-клітин та підвищення інтенсивності апоптозу ефекторних клітин, що узгоджується з моделлю індукції периферичної толерантності. Такий механізм, ймовірно, включає пряме перенесення регуляторних мікроРНК до Т-клітин або опосередкований вплив на антигенпрезентувальні клітини, що змінює характер подальшої імунної відповіді.

Окремої уваги потребують еритроцитарні ПВ, утворені внаслідок інфікування еритроцитів *Plasmodium*. Встановлено, що такі ПВ здатні змінювати функціональний стан первинних макрофагів та нейтрофілів людини [31]. Вплив може включати модифікацію фагоцитарної активності, регуляцію експресії рецепторів розпізнавання патернів, а також зміну секреції прозапальних медіаторів, що є критично значущим у патогенезі малярійної інфекції.

Узагальнюючи, еритроцитарні ПВ демонструють широкий та неоднорідний спектр імуномодуляторних ефектів – від вираженої прозапальної активності до здатності пригнічувати імунну відповідь. Така варіабельність свідчить про складну багатofакторну природу їхньої дії та підкреслює важливість подальшого вивчення цих структур у трансфузіології, імунології та інфекційних хворобах, особливо з огляду на їхній потенціал модулювати реактивність імунної системи у клінічно значущих станах.

Перспективним напрямком досліджень є подальше вивчення взаємодії еритроцитів і їхніх ПВ із дендритними клітинами, макрофагами та Т-лімфоцитами, а також визначення потенціалу їхнього використання в імунотерапії. Ураховуючи здатність еритроцитів впливати на дозрівання дендритних клітин і формування Th1-відповіді, модулювання цих процесів може стати підґрунтям для нових терапевтичних стратегій у лікуванні аутоімунних, запальних і пухлинних захворювань [87].

vascular wall, creating conditions for a local inflammatory response. In transfusion scenarios, such mechanisms are often associated with the development of inflammatory complications, since the activation of the endothelium and monocytes is one of the early events preceding the generation of pro-inflammatory cytokines and the stimulation of neutrophil-platelet interaction [88, 90].

Opposite effects of erythrocyte PVs were observed in studies where macrophages were pretreated with zymosan A or lipopolysaccharide. Under these conditions, phagocytosed PVs demonstrated an immunosuppressive effect, manifested by a decrease in the release of tumor necrosis factor- $\alpha$  and an increase in the production of interleukin-8 [91]. Such a shift in the cytokine profile may reflect an adaptive mechanism aimed at limiting excessive inflammatory activity, which is often observed after intense macrophage activation. This phenomenon is noteworthy because it indicates the possibility of regulating macrophage functions through the process of phagocytosis of PV, which potentially involves the transfer of regulatory micromolecules or membrane lipid components capable of influencing the transcriptional cascades of effector cells.

The immunosuppressive effects of erythrocyte PVs have also been confirmed in experimental models of syngeneic transfusions, where the formation of CD9- and CD81-positive PVs was accompanied by suppression of delayed-type hypersensitivity reactions mediated by microRNA-150 [92]. Under these conditions, a decrease in T-cell activation and an increase in the intensity of effector cell apoptosis were observed, which is consistent with the model of peripheral tolerance induction. This mechanism probably involves the direct transfer of regulatory microRNAs to T cells or an indirect effect on antigen-presenting cells, which alters the nature of the subsequent immune response.

Erythrocytic PVs formed as a result of *Plasmodium* infection of erythrocytes deserve special attention. It has been established that such PVs are capable of altering the functional state of primary human macrophages and neutrophils [31]. The effect may include modification of phagocytic activity, regulation of pattern recognition receptor expression, and changes in the secretion of proinflammatory mediators, which is critically important in the pathogenesis of malaria infection.

In summary, erythrocyte PVs demonstrate a wide and heterogeneous spectrum of immunomodulatory effects, ranging from pronounced pro-inflammatory activity to the ability to suppress the immune response. Such variability indicates the complex multifactorial nature of their action and emphasizes the importance of further study of these structures in transfusion medicine, immunology, and infectious diseases, especially given their potential to modulate the reactivity of the immune system in clinically significant conditions.

A promising area of research is the further study of the interaction of erythrocytes and their PVs with dendritic cells, macrophages, and T lymphocytes, as well as determining their potential for use in immunotherapy. Given the ability of erythrocytes to influence the maturation of dendritic cells and the formation of the Th1 response, the modulation of these processes may become the basis for new therapeutic strategies in the treatment of autoimmune, inflammatory, and neoplastic diseases [87].

### **8. Діагностичне та терапевтичне значення еритроцитарних позаклітинних везикул у розвитку та корекції патологічних процесів різного походження**

Зростаюча кількість експериментальних робіт демонструє, що ПВ еритроцитарного походження є не просто побічним продуктом клітинного метаболізму, а активними учасниками патогенетичних процесів. Вони здатні ініціювати або посилювати тромбоз, впливати на гемостаз, модулювати перебіг інфекційних та запальних хвороб, а також брати участь у розвитку злоякісних новоутворень [20, 93, 94]. У пацієнтів із серпоподібноклітинною анемією, тромбозом, серцево-судинними патологіями та дефіцитом глюкозо-6-фосфатдегідрогенази відзначається підвищення рівня еритроцитарних ПВ у плазмі крові, що корелює з тяжкістю клінічного перебігу захворювань [94, 95].

Ці спостереження стали підґрунтям для розгляду ПВ як перспективних діагностичних і прогностичних біомаркерів. Вміст і концентраційні профілі таких везикул можуть відображати стан еритроцитів і системну відповідь організму на патологічні стимули [93, 94]. Їхній біохімічний склад включає фосфоліпіди, фосфатидилсерин, білки цитоскелета, гемоглобін, а також фрагменти РНК і мікроРНК, що дозволяє їм виконувати сигнальні функції в клітинних мережах.

Однією з особливостей еритроцитарних ПВ є їхня висока стабільність і біосумісність. Завдяки відсутності ядра й імуногенних білків поверхні, вони мають низький ризик викликати імунну відповідь, що робить їх придатними для використання як природні нанотранспортери терапевтичних агентів [54]. Ці властивості зумовили зростаючий інтерес до використання еритроцитарних ПВ як платформ для розробки систем цілеспрямованої доставки лікарських речовин, нуклеїнових кислот і регуляторних молекул. Дослідження показали, що такі везикули можуть ефективно переносити малу інтерферуючу РНК (siRNA) або імуномодулювальні РНК, забезпечуючи стабільність і тривале перебування в кровообігу [54, 96, 97].

Крім того, завдяки здатності проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр і зберігати структурну цілісність у плазмі, еритроцитарні ПВ розглядаються як перспективні носії для лікування нейродегенеративних і онкологічних захворювань. Їхній природний склад фосфоліпідів і мембранних білків дозволяє взаємодіяти з рецепторами клітин-мішеней, забезпечуючи високий ступінь специфічності доставки.

Попри ці переваги, практичне застосування еритроцитарних ПВ стикається з низкою труднощів. До них належать стандартизація методів їх виділення, очищення та кількісної оцінки, а також вивчення впливу умов зберігання на їхній біологічний профіль. Складність полягає також у гетерогенності популяцій ПВ: навіть у межах одного зразка вони можуть різнитися за розміром, щільністю і складом, що потребує вдосконалення аналітичних підходів [54, 96, 97].

Підсумовуючи, можна констатувати, що еритроцитарні ПВ є не лише маркерами клітинного старіння чи пошкодження, але й активними регуляторами міжклітинних взаємодій. Їх участь у контролі запалення, тромбоутворення та клітинної сигналізації відкриває широкі перспективи для використання в клінічній практиці. Подальші дослідження мають бути

### **8. Diagnostic and therapeutic significance of erythrocyte extracellular vesicles in the development and correction of pathological processes of various origins**

A growing number of experimental studies show that erythrocyte-derived PVs are not simply a by-product of cellular metabolism, but active participants in pathogenetic processes. They are capable of initiating or exacerbating thrombosis, affecting hemostasis, modulating the course of infectious and inflammatory diseases, and participating in the development of malignant neoplasms [20, 93, 94]. In patients with sickle cell anemia, thrombosis, cardiovascular pathologies, and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, there is an increase in the level of erythrocyte VEs in blood plasma, which correlates with the severity of the clinical course of diseases [94, 95].

These observations have led to the consideration of PVs as promising diagnostic and prognostic biomarkers. The content and concentration profiles of such vesicles may reflect the state of red blood cells and the body's systemic response to pathological stimuli [93, 94]. Their biochemical composition includes phospholipids, phosphatidylserine, cytoskeletal proteins, hemoglobin, as well as RNA and microRNA fragments, which allows them to perform signaling functions in cellular networks.

One of the features of erythrocyte VEs is their high stability and biocompatibility. Due to the absence of a nucleus and immunogenic surface proteins, they have a low risk of causing an immune response, which makes them suitable for use as natural nanotransporters of therapeutic agents [54]. These properties have led to growing interest in the use of erythrocyte VEs as platforms for the development of targeted delivery systems for drugs, nucleic acids, and regulatory molecules. Studies have shown that such vesicles can effectively transport small interfering RNA (siRNA) or immunomodulatory RNA, ensuring stability and prolonged residence in the bloodstream [54, 96, 97].

In addition, due to their ability to penetrate the blood-brain barrier and maintain structural integrity in plasma, erythrocyte PVs are considered promising carriers for the treatment of neurodegenerative and oncological diseases. Their natural composition of phospholipids and membrane proteins allows them to interact with target cell receptors, ensuring a high degree of delivery specificity.

Despite these advantages, the practical application of erythrocyte PVs faces a number of difficulties. These include standardizing methods for their isolation, purification, and quantitative assessment, as well as studying the effect of storage conditions on their biological profile. The complexity also lies in the heterogeneity of PV populations: even within a single sample, they can vary in size, density, and composition, which requires the improvement of analytical approaches [54, 96, 97].

In summary, it can be stated that erythrocyte PVs are not only markers of cellular aging or damage, but also active regulators of intercellular interactions. Their involvement in the control of inflammation, thrombosis, and cellular signaling opens up broad prospects for their use in clinical practice. Further research should be aimed at developing effective methods of their bioengineering, as well as creating therapeutic strategies based on the use of these natural nanostructures as biocompatible

спрямовані на розробку ефективних методів їх біоінженерії, а також на створення терапевтичних стратегій, що базуються на використанні цих природних наноструктур як біосумісних систем доставки для лікування різних патологічних станів [20, 96, 97, 98].

delivery systems for the treatment of various pathological conditions [20, 96, 97, 98].

## ВИСНОВКИ

Еритроцитарні позаклітинні везикули становлять ключовий елемент клітинно-плазматичної взаємодії, здатний активно впливати на функціональний стан ендотеліальних клітин, тромбоцитів і компонентів коагуляційної системи. Вони беруть участь у формуванні запальної реакції, активації тромбоутворення та розвитку мікросудинної дисфункції. Їхня присутність у циркуляції відображає інтенсивність клітинного стресу та може бути предиктором судинних ускладнень при різних патологічних станах.

Кількість і молекулярний склад еритроцитарних позаклітинних везикул суттєво змінюються при оксидативному стресі, гіпоксії, гемолітичних анеміях та запальних захворюваннях. Виявлено, що підвищення рівня цих структур у плазмі крові корелює з активацією ендотелію, підвищенням тромбінутворення та зниженням фібринолітичної активності. Такі зміни можуть використовуватися як потенційні діагностичні й прогностичні біомаркери системної гіперкоагуляції та ендотеліальної дисфункції.

Завдяки своїй природній біосумісності, тривалій циркуляції, низькій імуногенності та здатності переносити біологічно активні молекули, еритроцитарні позаклітинні везикули розглядаються як інноваційна терапевтична платформа. Вони можуть використовуватися як вектори для цілеспрямованої доставки лікарських засобів, нуклеїнових кислот і білків у тканини-мішені, відкриваючи нові перспективи у лікуванні тромботичних, запальних, серцево-судинних і онкологічних патологій.

## CONCLUSIONS

Erythrocyte extracellular vesicles are a key element of cell-plasma interaction, capable of actively influencing the functional state of endothelial cells, platelets, and components of the coagulation system. They are involved in the formation of inflammatory reactions, activation of thrombus formation, and the development of microvascular dysfunction. Their presence in circulation reflects the intensity of cellular stress and may be a predictor of vascular complications in various pathological conditions.

The number and molecular composition of erythrocyte extracellular vesicles change significantly during oxidative stress, hypoxia, hemolytic anemia, and inflammatory diseases. It has been found that an increase in the level of these structures in blood plasma correlates with endothelial activation, increased thrombin formation, and decreased fibrinolytic activity. Such changes can be used as potential diagnostic and prognostic biomarkers of systemic hypercoagulation and endothelial dysfunction.

Due to their natural biocompatibility, long circulation, low immunogenicity, and ability to carry biologically active molecules, erythrocyte extracellular vesicles are considered an innovative therapeutic platform. They can be used as vectors for the targeted delivery of drugs, nucleic acids, and proteins to target tissues, opening up new prospects in the treatment of thrombotic, inflammatory, cardiovascular, and oncological pathologies.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Thangaraju K., Neerukonda S.N., Katneni U., Buehler P.W. Extracellular vesicles from red blood cells and their evolving roles in health, coagulopathy and therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 22, № 1. P. 153. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22010153>
2. van Niel G., D'Angelo G., Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018. Vol. 19, № 4. P. 213–228. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
3. Гладких Ф.В. Мезенхімальні стовбурові клітини: екзосоми та кондиціоновані середовища як інноваційні стратегії у лікуванні хворих на аутоімунні захворювання. *Клінічна та профілактична медицина України*. 2023. Т. 6, № 28. С. 121–130. DOI: <https://doi.org/10.31612/2616-4868.6.2023.15>
4. Гладких Ф.В. Безклітинні біологічні засоби: фокус на кондиціоновані середовища мезенхімальних стовбурових клітин. *Одеський медичний журнал*. 2023. № 185, № 4. С. 75–82. DOI: <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2023-4-15>
5. Матвєєнко М.С., Гладких Ф.В., Олексюк О.Б. Терапевтичний потенціал екзосом із мезенхімальних стромальних клітин при сепсисі. *Каразинський імунологічний журнал*. 2024. Т. 7, № 1(13). С. 84–97. DOI: <https://doi.org/10.26565/3083-5615-2024-13-09>
6. Horder E. Blood dust or blood granules: a new constituent of the blood? *Lancet*. 1899. Vol. 154. P. 1015. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)59201-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)59201-6)
7. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology*. 1967. Vol. 13, № 3. P. 269–288. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>
8. Johnstone R.M., Adam M., Hammond J.R., Orr L., Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of Biological Chemistry*. 1987. Vol. 262, № 19. P. 9412–9420.
9. Yáñez-Mó M., Siljander P.R., Andreu Z., Zavec A.B., Borràs F.E., Buzas E.I., et al. Biological properties of extracellular vesicles and

## REFERENCES

1. Thangaraju K, Neerukonda SN, Katneni U, Buehler PW. Extracellular vesicles from red blood cells and their evolving roles in health, coagulopathy and therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;22(1):153. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22010153>
2. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018;19(4):213–28. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
3. Gladkikh FV. Mesenchymal stem cells: exosomes and conditioned media as innovative strategies in the treatment of patients with autoimmune diseases. *Clinical and Preventive Medicine of Ukraine*. 2023;6(28):121–30. (in Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.31612/2616-4868.6.2023.15>
4. Gladkikh FV. Cell-free biological agents: focus on conditioned media of mesenchymal stem cells. *Odesa Medical Journal*. 2023;(4):75–82. (in Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2023-4-15>
5. Matvieienko MS, Gladkikh FV, Oleksiuk OB. Therapeutic potential of exosomes from mesenchymal stromal cells in sepsis. *Karazin Journal of Immunology*. 2024;7(1):84–97. DOI: <https://doi.org/10.26565/3083-5615-2024-13-09>
6. Horder E. Blood dust or blood granules: a new constituent of the blood? *The Lancet*. 1899;154:1015. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)59201-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)59201-6)
7. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology*. 1967;13(3):269–88. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>
8. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(19):9412–20.
9. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and

- their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015. Vol. 4. P. 27066. DOI: <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
10. Szatanek R., Baj-Krzyworzecka M., Zimoch J., Lekka M., Siedlar M., Baran J. The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. Vol. 18, № 6. P. 1153. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18061153>
  11. Robbins P.D., Morelli A.E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature Reviews Immunology*. 2014. Vol. 14, № 3. P. 195–208. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri3622>
  12. Harding C., Heuser J., Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*. 1983. Vol. 97, № 2. P. 329–339. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
  13. Pan B.T., Johnstone R.M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983. Vol. 33, № 3. P. 967–978. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5)
  14. Said A.S., Rogers S.C., Doctor A. Physiologic impact of circulating RBC microparticles upon blood-vascular interactions. *Frontiers in Physiology*. 2018. Vol. 8. P. 1120. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01120>
  15. Théry C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsitohaina R., et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2018. Vol. 7, № 1. P. 1535750. DOI: <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
  16. Joshi U., George L.B., Highland H. Red blood cell extracellular vesicles: new frontiers in hematological biomarker discovery. *Frontiers in Medicine*. 2025. Vol. 12. P. 1644077. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2025.1644077>
  17. Joshi U., George L.B., Highland H. Determination of the role of miR-451a on Plasmodium falciparum red blood cell stages, oxidative stress, and proteomic profiling. *Molecular Biology Reports*. 2024. Vol. 51, № 1. P. 1041. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09938-z>
  18. Avenick D., Kidd L., Istvan S., Dong F., Richter K., Edwards N., et al. Effects of storage and leukocyte reduction on the concentration and procoagulant activity of extracellular vesicles in canine packed red cells. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2021. Vol. 31, № 2. P. 221–230. DOI: <https://doi.org/10.1111/vec.13050>
  19. Xiong Z., Oriss T.B., Cavaretta J.P., Rosengart M.R., Lee J.S. Red cell microparticle enumeration: validation of a flow cytometric approach. *Vox Sanguinis*. 2012. Vol. 103, № 1. P. 42–48. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2011.01577.x>
  20. Ma S.R., Xia H.F., Gong P., Yu Z.L. Red blood cell-derived extracellular vesicles: an overview of current research progress, challenges, and opportunities. *Biomedicine*. 2023. Vol. 11, № 10. P. 2798. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicine11102798>
  21. Chiangjong W., Netsirisawan P., Hongeng S., Chutipongtanate S. Red blood cell extracellular vesicle-based drug delivery: challenges and opportunities. *Frontiers in Medicine*. 2021. Vol. 8. P. 761362. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.761362>
  22. Tissot J.D., Rubin O., Canellini G. Analysis and clinical relevance of microparticles from red blood cells. *Current Opinion in Hematology*. 2010. Vol. 17, № 6. P. 571–577. DOI: <https://doi.org/10.1097/moh.0b013e32833ec217>
  23. Westerman M., Porter J.B. Red blood cell-derived microparticles: an overview. *Blood Cells, Molecules & Diseases*. 2016. Vol. 59. P. 134–139. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2016.04.003>
  24. Huang H., Zhu J., Fan L., Lin Q., Fu D., Wei B., et al. MicroRNA profiling of exosomes derived from red blood cell units: implications in transfusion-related immunomodulation. *BioMed Research International*. 2019. Vol. 2019. P. 2045915. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/2045915>
  25. Bakkour S., Acker J.P., Chafets D.M., Inglis H.C., Norris P.J., Lee T.H., et al. Manufacturing method affects mitochondrial DNA release and extracellular vesicle composition in stored red blood cells. *Vox Sanguinis*. 2016. Vol. 111, № 1. P. 22–32. DOI: <https://doi.org/10.1111/vox.12390>
  26. Biagiotti S., Canonico B., Tiboni M., Abbas F., Perla E., Montanari M., et al. Efficient and highly reproducible production of red blood cell-derived extracellular vesicle mimetics for the loading and delivery of RNA molecules. *Scientific Reports*. 2024. Vol. 14, № 1. P. 14610. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-65623-y>
  27. Mathieu M., Martin-Jaular L., Lavieu G., Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*. 2019. Vol. 21, № 1. P. 9–17. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
  28. Bebesi T., Kitka D., Gaál A., Szgyártó I.C., Deák R., Beke-Somfai T., et al. Storage conditions determine the characteristics of red blood cell derived extracellular vesicles. *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12, № 1. P. 977. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04915-7>
  29. Leal J.K.F., Adjobo-Hermans M.J.W., Bosman G.J.C.G.M. Red blood cell homeostasis: mechanisms and effects of microvesicle generation their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015;4:27066. DOI: <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
  10. Szatanek R., Baj-Krzyworzecka M., Zimoch J., Lekka M., Siedlar M., Baran J. The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(6):1153. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18061153>
  11. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature Reviews Immunology*. 2014;14(3):195–208. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri3622>
  12. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*. 1983;97(2):329–39. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
  13. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983;33(3):967–78. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5)
  14. Said AS, Rogers SC, Doctor A. Physiologic impact of circulating RBC microparticles upon blood-vascular interactions. *Frontiers in Physiology*. 2018;8:1120. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01120>
  15. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2018;7(1):1535750. DOI: <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
  16. Joshi U, George LB, Highland H. Red blood cell extracellular vesicles: new frontiers in hematological biomarker discovery. *Frontiers in Medicine*. 2025;12:1644077. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2025.1644077>
  17. Joshi U, George LB, Highland H. Determination of the role of miR-451a on Plasmodium falciparum red blood cell stages, oxidative stress, and proteomic profiling. *Molecular Biology Reports*. 2024;51(1):1041. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09938-z>
  18. Avenick D, Kidd L, Istvan S, Dong F, Richter K, Edwards N, et al. Effects of storage and leukocyte reduction on the concentration and procoagulant activity of extracellular vesicles in canine packed red cells. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2021;31(2):221–30. DOI: <https://doi.org/10.1111/vec.13050>
  19. Xiong Z, Oriss TB, Cavaretta JP, Rosengart MR, Lee JS. Red cell microparticle enumeration: validation of a flow cytometric approach. *Vox Sanguinis*. 2012;103(1):42–8. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2011.01577.x>
  20. Ma SR, Xia HF, Gong P, Yu ZL. Red blood cell-derived extracellular vesicles: an overview of current research progress, challenges, and opportunities. *Biomedicine*. 2023;11(10):2798. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicine11102798>
  21. Chiangjong W, Netsirisawan P, Hongeng S, Chutipongtanate S. Red blood cell extracellular vesicle-based drug delivery: challenges and opportunities. *Frontiers in Medicine*. 2021;8:761362. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.761362>
  22. Tissot JD, Rubin O, Canellini G. Analysis and clinical relevance of microparticles from red blood cells. *Current Opinion in Hematology*. 2010;17(6):571–7. DOI: <https://doi.org/10.1097/moh.0b013e32833ec217>
  23. Westerman M, Porter JB. Red blood cell-derived microparticles: an overview. *Blood Cells, Molecules & Diseases*. 2016;59:134–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2016.04.003>
  24. Huang H, Zhu J, Fan L, Lin Q, Fu D, Wei B, et al. MicroRNA profiling of exosomes derived from red blood cell units: implications in transfusion-related immunomodulation. *BioMed Research International*. 2019;2019:2045915. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/2045915>
  25. Bakkour S, Acker JP, Chafets DM, Inglis HC, Norris PJ, Lee TH, et al. Manufacturing method affects mitochondrial DNA release and extracellular vesicle composition in stored red blood cells. *Vox Sanguinis*. 2016;111(1):22–32. DOI: <https://doi.org/10.1111/vox.12390>
  26. Biagiotti S, Canonico B, Tiboni M, Abbas F, Perla E, Montanari M, et al. Efficient and highly reproducible production of red blood cell-derived extracellular vesicle mimetics for the loading and delivery of RNA molecules. *Scientific Reports*. 2024;14(1):14610. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-65623-y>
  27. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*. 2019;21(1):9–17. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
  28. Bebesi T, Kitka D, Gaál A, Szgyártó IC, Deák R, Beke-Somfai T, et al. Storage conditions determine the characteristics of red blood cell derived extracellular vesicles. *Scientific Reports*. 2022;12(1):977. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04915-7>
  29. Leal JKF, Adjobo-Hermans MJW, Bosman GJCGM. Red blood cell homeostasis: mechanisms and effects of microvesicle generation

- in health and disease. *Frontiers in Physiology*. 2018; Vol. 9. P. 703. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00703>
30. Salzer U., Zhu R., Luten M., Isobe H., Pastushenko V., Perkmann T., et al. Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin. *Transfusion*. 2008; Vol. 48, № 3. P. 451–462. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01549.x>
31. Hezel M.E.V., Nieuwland R., Bruggen R.V., Juffermans N.P. The ability of extracellular vesicles to induce a pro-inflammatory host response. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; Vol. 18, № 6. P. 1285. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18061285>
32. Straat M., Böing A.N., Tuip-De Boer A., Nieuwland R., Juffermans N.P. Extracellular vesicles from red blood cell products induce a strong pro-inflammatory host response, dependent on both numbers and storage duration. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2016; Vol. 43, № 4. P. 302–305. DOI: <https://doi.org/10.1159/000442681>
33. Antonelou M.H., Seghatchian J. Insights into red blood cell storage lesion: toward a new appreciation. *Transfusion and Apheresis Science*. 2016; Vol. 55, № 3. P. 292–301. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2016.10.019>
34. Asaro R.J., Zhu Q., Cabrales P. Erythrocyte aging, protection via vesiculation: an analysis methodology via oscillatory flow. *Frontiers in Physiology*. 2018; Vol. 9. P. 1607. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01607>
35. Zhu Q., Salehyar S., Cabrales P., Asaro R.J. Prospects for human erythrocyte skeleton-bilayer dissociation during splenic flow. *Biophysical Journal*. 2017; Vol. 113, № 4. P. 900–912. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.05.052>
36. Mebius R.E., Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*. 2005; Vol. 5, № 8. P. 606–616. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri1669>
37. Deplaine G., Safeukui I., Jeddi F., Lacoste F., Brousse V., Perrot S., et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood*. 2011; Vol. 117, № 8. P. e88–e95. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-312801>
38. Mohanty J.G., Nagababu E., Rifkind J.M. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in Physiology*. 2014; Vol. 5. P. 84. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084>
39. Pollet H., Conrard L., Cloos A.S., Tyteca D. Plasma membrane lipid domains as platforms for vesicle biogenesis and shedding? *Biomolecules*. 2018; Vol. 8, № 3. P. 94. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom8030094>
40. Weerheim A.M., Kolb A.M., Sturk A., Nieuwland R. Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry*. 2002; Vol. 302, № 2. P. 191–198. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5552>
41. Bicalho B., Holovati J.L., Acker J.P. Phospholipidomics reveals differences in glycerophosphoserine profiles of hypothermally stored red blood cells and microvesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; Vol. 1828, № 2. P. 317–326. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.10.026>
42. Laurén E., Tigestu-Sahle F., Valkonen S., Westberg M., Valkeajärvi A., Eronen J., et al. Phospholipid composition of packed red blood cells and that of extracellular vesicles show a high resemblance and stability during storage. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2018; Vol. 1863, № 1. P. 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.09.012>
43. Lutz H.U., Liu S.C., Palek J. Release of spectrin-free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion. I. Characterization of spectrin-free vesicles. *The Journal of Cell Biology*. 1977; Vol. 73, № 3. P. 548–560. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.73.3.548>
44. Лядов Д.А. Вплив патологічних факторів на структуру і функцію мембран еритроцитів: від молекулярного рівня до клінічних наслідків. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія Медицина*. 2025. Т. 33, № 3 (54). С. 438–468. DOI: <https://doi.org/10.26565/2313-6693-2025-54-11>
45. Hu Q., Wang M., Cho M.S., Wang C., Nick A.M., Thiagarajan P., et al. Lipid profile of platelets and platelet-derived microparticles in ovarian cancer. *BBA Clinical*. 2016; Vol. 6. P. 76–81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.06.003>
46. de Oliveira Junior G.P., Welsh J.A., Pinckney B., Palu C.C., Lu S., Zimmerman A., et al. Human red blood cells release microvesicles with distinct sizes and protein composition that alter neutrophil phagocytosis. *Journal of Extracellular Biology*. 2023; Vol. 2, № 11. P. e107. DOI: <https://doi.org/10.1002/jex.2.107>
47. Allan D., Thomas P., Limbrick A.R. The isolation and characterization of 60 nm vesicles ('nanovesicles') produced during ionophore A23187-induced budding of human erythrocytes. *The Biochemical Journal*. 1980; Vol. 188, № 3. P. 881–887. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj1880881>
48. Salzer U., Hinterdorfer P., Hunger U., Borcken C., Prohaska R. Ca(++)-dependent vesicle release from erythrocytes involves in health and disease. *Frontiers in Physiology*. 2018;9:703. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00703>
30. Salzer U, Zhu R, Luten M, Isobe H, Pastushenko V, Perkmann T, et al. Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin. *Transfusion*. 2008;48(3):451–62. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01549.x>
31. Hezel MEV, Nieuwland R, Bruggen RV, Juffermans NP. The ability of extracellular vesicles to induce a pro-inflammatory host response. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(6):1285. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18061285>
32. Straat M, Böing AN, Tuip-De Boer A, Nieuwland R, Juffermans NP. Extracellular vesicles from red blood cell products induce a strong pro-inflammatory host response, dependent on both numbers and storage duration. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2016;43(4):302–5. DOI: <https://doi.org/10.1159/000442681>
33. Antonelou MH, Seghatchian J. Insights into red blood cell storage lesion: toward a new appreciation. *Transfusion and Apheresis Science*. 2016;55(3):292–301. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2016.10.019>
34. Asaro RJ, Zhu Q, Cabrales P. Erythrocyte aging, protection via vesiculation: an analysis methodology via oscillatory flow. *Frontiers in Physiology*. 2018;9:1607. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01607>
35. Zhu Q, Salehyar S, Cabrales P, Asaro RJ. Prospects for human erythrocyte skeleton-bilayer dissociation during splenic flow. *Biophysical Journal*. 2017;113(4):900–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.05.052>
36. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(8):606–16. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri1669>
37. Deplaine G, Safeukui I, Jeddi F, Lacoste F, Brousse V, Perrot S, et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood*. 2011;117(8):e88–95. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-312801>
38. Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind JM. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in Physiology*. 2014;5:84. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084>
39. Pollet H, Conrard L, Cloos AS, Tyteca D. Plasma membrane lipid domains as platforms for vesicle biogenesis and shedding? *Biomolecules*. 2018;8(3):94. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom8030094>
40. Weerheim AM, Kolb AM, Sturk A, Nieuwland R. Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry*. 2002;302(2):191–8. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5552>
41. Bicalho B, Holovati JL, Acker JP. Phospholipidomics reveals differences in glycerophosphoserine profiles of hypothermally stored red blood cells and microvesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;1828(2):317–26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.10.026>
42. Laurén E, Tigestu-Sahle F, Valkonen S, Westberg M, Valkeajärvi A, Eronen J, et al. Phospholipid composition of packed red blood cells and that of extracellular vesicles show a high resemblance and stability during storage. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2018;1863(1):1–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.09.012>
43. Lutz HU, Liu SC, Palek J. Release of spectrin-free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion. I. Characterization of spectrin-free vesicles. *The Journal of Cell Biology*. 1977;73(3):548–60. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.73.3.548>
44. Liadov DA. The impact of pathological factors on the structure and function of erythrocyte membranes: from the molecular level to clinical consequences. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Medicine*. 2025;33(3):438–68. DOI: <https://doi.org/10.26565/2313-6693-2025-54-11>
45. Hu Q, Wang M, Cho MS, Wang C, Nick AM, Thiagarajan P, et al. Lipid profile of platelets and platelet-derived microparticles in ovarian cancer. *BBA Clinical*. 2016;6:76–81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.06.003>
46. de Oliveira Junior GP, Welsh JA, Pinckney B, Palu CC, Lu S, Zimmerman A, et al. Human red blood cells release microvesicles with distinct sizes and protein composition that alter neutrophil phagocytosis. *Journal of Extracellular Biology*. 2023;2(11):e107. DOI: <https://doi.org/10.1002/jex.2.107>
47. Allan D, Thomas P, Limbrick AR. The isolation and characterization of 60 nm vesicles ('nanovesicles') produced during ionophore A23187-induced budding of human erythrocytes. *The Biochemical Journal*. 1980;188(3):881–7. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj1880881>
48. Salzer U, Hinterdorfer P, Hunger U, Borcken C, Prohaska R. Ca(++)-dependent vesicle release from erythrocytes involves

- stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood*. 2002. Vol. 99, №7. P. 2569–2577. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.v99.7.2569>
49. Vorselen D., van Dommelen S.M., Sorkin R., Piontek M.C., Schiller J., Döpp S.T., et al. The fluid membrane determines mechanics of erythrocyte extracellular vesicles and is softened in hereditary spherocytosis. *Nature Communications*. 2018. Vol. 9, № 1. P. 4960. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07445-x>
50. Böttcher A., Gaipl U.S., Fürnrohr B.G., Herrmann M., Girkontaite I., Kalden J.R., et al. Involvement of phosphatidylserine, alphavbeta3, CD14, CD36, and complement C1q in the phagocytosis of primary necrotic lymphocytes by macrophages. *Arthritis and Rheumatism*. 2006. Vol. 54, № 3. P. 927–938. DOI: <https://doi.org/10.1002/art.21660>
51. Paidassi H., Tacnet-Delorme P., Verneret M., Gaboriaud C., Houen G., Duus K., et al. Investigations on the C1q-calreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition. *Journal of Molecular Biology*. 2011. Vol. 408, № 2. P. 277–290. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.029>
52. Pham T.C., Jaysinghe M.K., Pham T.T., Yang Y., Wei L., Usman W.M., et al. Covalent conjugation of extracellular vesicles with peptides and nanobodies for targeted therapeutic delivery. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2021. Vol. 10, № 4. P. e12057. DOI: <https://doi.org/10.1002/jev2.12057>
53. Usman W.M., Pham T.C., Kwok Y.Y., Vu L.T., Ma V., Peng B., et al. Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles. *Nature Communications*. 2018. Vol. 9, № 1. P. 2359. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04791-8>
54. Orrico F., Laurance S., Lopez A.C., Lefevre S.D., Thomson L., Möller M.N., et al. Oxidative stress in healthy and pathological red blood cells. *Biomolecules*. 2023. Vol. 13, № 8. P. 1262. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom13081262>
55. Johnson R.M., Goyette G., Ravindranath Y., Ho Y.S. Hemoglobin autooxidation and regulation of endogenous H2O2 levels in erythrocytes. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005. Vol. 39, № 11. P. 1407–1417. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.07.002>
56. Winterbourn C.C. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods in Enzymology*. 2013. Vol. 528. P. 3–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405881-1.00001-X>
57. Simmonds M.J., Detterich J.A., Connes P. Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell. *Biorheology*. 2014. Vol. 51, № 2–3. P. 121–134. DOI: <https://doi.org/10.3233/BIR-140653>
58. Pacetti D., Gagliardi R., Balzano M., Frega N.G., Ojeda M.L., Borrero M., et al. Changes in the fatty acid profile and phospholipid molecular species composition of human erythrocyte membranes after hybrid palm and extra virgin olive oil supplementation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016. Vol. 64, № 27. P. 5499–5507. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01903>
59. Taylor J.P., Tse H.M. The role of NADPH oxidases in infectious and inflammatory diseases. *Redox Biology*. 2021. Vol. 48. P. 102159. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102159>
60. Yin H., Xu L., Porter N.A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*. 2011. Vol. 111, № 10. P. 5944–5972. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
61. Howie H.L., Hay A.M., de Wolski K., Waterman H., Lebedev J., Fu X., et al. Differences in Steap3 expression are a mechanism of genetic variation of RBC storage and oxidative damage in mice. *Blood Advances*. 2019. Vol. 3, № 15. P. 2272–2285. DOI: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000605>
62. Vinchi F., Sparla R., Passos S.T., Sharma R., Vance S.Z., Zreid H.S., et al. Vasculo-toxic and pro-inflammatory action of unbound haemoglobin, haem and iron in transfusion-dependent patients with haemolytic anaemias. *British Journal of Haematology*. 2021. Vol. 193, № 3. P. 637–658. DOI: <https://doi.org/10.1111/bjh.17361>
63. Möller M.N., Orrico F., Villar S.F., López A.C., Silva N., Donzé M., et al. Oxidants and antioxidants in the redox biochemistry of human red blood cells. *ACS Omega*. 2022. Vol. 8, № 1. P. 147–168. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06768>
64. Orrico F., Möller M.N., Cassina A., Denicola A., Thomson L. Kinetic and stoichiometric constraints determine the pathway of H2O2 consumption by red blood cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 2018. Vol. 121. P. 231–239. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.006>
65. Johnson R.M., Ho Y.S., Yu D.Y., Kuypers F.A., Ravindranath Y., Goyette G.W. The effects of disruption of genes for peroxiredoxin-2, glutathione peroxidase-1, and catalase on erythrocyte oxidative metabolism. *Free Radical Biology & Medicine*. 2010. Vol. 48, № 4. P. 519–525. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.021>
66. Page G.P., Kanas T., Guo Y.J., Lanteri M.C., Zhang X., Mast A.E., et al. Multiple-ancestry genome-wide association study identifies 27 loci associated with measures of hemolysis following blood storage. *The Journal of Clinical Investigation*. 2021. Vol. 131, № 13. P. e146077. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI146077>
67. Welbourn E.M., Wilson M.T., Yusof A., Metodiev M.V., Cooper C.E. The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane. *Blood*. 2002;99(7):2569–77. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.v99.7.2569>
49. Vorselen D., van Dommelen S.M., Sorkin R., Piontek M.C., Schiller J., Döpp S.T., et al. The fluid membrane determines mechanics of erythrocyte extracellular vesicles and is softened in hereditary spherocytosis. *Nature Communications*. 2018;9(1):4960. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07445-x>
50. Böttcher A, Gaipl US, Fürnrohr BG, Herrmann M, Girkontaite I, Kalden JR, et al. Involvement of phosphatidylserine, alphavbeta3, CD14, CD36, and complement C1q in the phagocytosis of primary necrotic lymphocytes by macrophages. *Arthritis and Rheumatism*. 2006;54(3):927–38. DOI: <https://doi.org/10.1002/art.21660>
51. Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Verneret M, Gaboriaud C, Houen G, Duus K, et al. Investigations on the C1q-calreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition. *Journal of Molecular Biology*. 2011;408(2):277–90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.029>
52. Pham TC, Jaysinghe MK, Pham TT, Yang Y, Wei L, Usman WM, et al. Covalent conjugation of extracellular vesicles with peptides and nanobodies for targeted therapeutic delivery. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2021;10(4):e12057. DOI: <https://doi.org/10.1002/jev2.12057>
53. Usman WM, Pham TC, Kwok YY, Vu LT, Ma V, Peng B, et al. Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles. *Nature Communications*. 2018;9(1):2359. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04791-8>
54. Orrico F, Laurance S, Lopez AC, Lefevre SD, Thomson L, Möller MN, et al. Oxidative stress in healthy and pathological red blood cells. *Biomolecules*. 2023;13(8):1262. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom13081262>
55. Johnson RM, Goyette G, Ravindranath Y, Ho YS. Hemoglobin autooxidation and regulation of endogenous H2O2 levels in erythrocytes. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005;39(11):1407–17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.07.002>
56. Winterbourn CC. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods in Enzymology*. 2013;528:3–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405881-1.00001-X>
57. Simmonds MJ, Detterich JA, Connes P. Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell. *Biorheology*. 2014;51(2–3):121–34. DOI: <https://doi.org/10.3233/BIR-140653>
58. Pacetti D, Gagliardi R, Balzano M, Frega NG, Ojeda ML, Borrero M, et al. Changes in the fatty acid profile and phospholipid molecular species composition of human erythrocyte membranes after hybrid palm and extra virgin olive oil supplementation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016;64(27):5499–507. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01903>
59. Taylor JP, Tse HM. The role of NADPH oxidases in infectious and inflammatory diseases. *Redox Biology*. 2021;48:102159. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102159>
60. Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*. 2011;111(10):5944–72. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
61. Howie HL, Hay AM, de Wolski K, Waterman H, Lebedev J, Fu X, et al. Differences in Steap3 expression are a mechanism of genetic variation of RBC storage and oxidative damage in mice. *Blood Advances*. 2019;3(15):2272–85. DOI: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000605>
62. Vinchi F, Sparla R, Passos ST, Sharma R, Vance SZ, Zreid HS, et al. Vasculo-toxic and pro-inflammatory action of unbound haemoglobin, haem and iron in transfusion-dependent patients with haemolytic anaemias. *British Journal of Haematology*. 2021;193(3):637–58. DOI: <https://doi.org/10.1111/bjh.17361>
63. Möller MN, Orrico F, Villar SF, López AC, Silva N, Donzé M, et al. Oxidants and antioxidants in the redox biochemistry of human red blood cells. *ACS Omega*. 2022;8(1):147–68. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06768>
64. Orrico F, Möller MN, Cassina A, Denicola A, Thomson L. Kinetic and stoichiometric constraints determine the pathway of H2O2 consumption by red blood cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 2018;121:231–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.006>
65. Johnson RM, Ho YS, Yu DY, Kuypers FA, Ravindranath Y, Goyette GW. The effects of disruption of genes for peroxiredoxin-2, glutathione peroxidase-1, and catalase on erythrocyte oxidative metabolism. *Free Radical Biology & Medicine*. 2010;48(4):519–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.021>
66. Page GP, Kanas T, Guo YJ, Lanteri MC, Zhang X, Mast AE, et al. Multiple-ancestry genome-wide association study identifies 27 loci associated with measures of hemolysis following blood storage. *The Journal of Clinical Investigation*. 2021;131(13):e146077. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI146077>
67. Welbourn EM, Wilson MT, Yusof A, Metodiev MV, Cooper CE. The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane.

- Free Radical Biology & Medicine*. 2017. Vol. 103. P. 95–106. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.024>
68. Chen G., Zhang D., Fuchs T.A., Manwani D., Wagner D.D., Frenette P.S. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood*. 2014. Vol. 123, № 24. P. 3818–3827. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-529982>
69. Schimmel M., Nur E., Biemond B.J., van Mierlo G.J., Solati S., Brandjes D.P., et al. Nucleosomes and neutrophil activation in sickle cell disease painful crisis. *Haematologica*. 2013. Vol. 98, № 11. P. 1797–1803. DOI: <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.088021>
70. Tharaux P.L. Posttranslational modifications of sickle hemoglobin in microparticles may promote injury. *Kidney International*. 2019. Vol. 95, № 6. P. 1289–1291. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.02.023>
71. Camus S.M., De Moraes J.A., Bonnin P., Abbyad P., Le Jeune S., Lionnet F., et al. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. *Blood*. 2015. Vol. 125, № 24. P. 3805–3814. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-589283>
72. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*. 2007. Vol. 87, № 1. P. 315–424. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>
73. Eleuthero E.C.A., Silva Magalhães R.S., de Araújo Brasil A., Monteiro Neto J.R., de Holanda Paranhos L. SOD1, more than just an antioxidant. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2021. Vol. 697. P. 108701. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108701>
74. Buffolo F., Monticone S., Camussi G., Aikawa E. Role of extracellular vesicles in the pathogenesis of vascular damage. *Hypertension*. 2022. Vol. 79, № 5. P. 863–873. DOI: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17957>
75. Lapping-Carr G., Gemel J., Mao Y., Beyer E.C. Circulating extracellular vesicles and endothelial damage in sickle cell disease. *Frontiers in Physiology*. 2020. Vol. 11. P. 1063. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01063>
76. Rota F., Ferrari L., Hoxha M., Favero C., Antonioli R., Pergoli L., et al. Blood-derived extracellular vesicles isolated from healthy donors exposed to air pollution modulate in vitro endothelial cells behavior. *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10, № 1. P. 20138. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77097-9>
77. Panigrahi S., Ghosh S.K., Ferrari B., Wyrick J.M., Podrez E.A., Weinberg A., et al. Human  $\beta$ -defensin-3 is associated with platelet-derived extracellular vesicles and is a potential contributor to endothelial dysfunction. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022. Vol. 9. P. 824954. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.824954>
78. Suades R., Padró T., Vilahur G., Badimon L. Platelet-released extracellular vesicles: the effects of thrombin activation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022. Vol. 79, № 3. P. 190. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04222-4>
79. Tripisciano C., Weiss R., Karuthedom George S., Fischer M.B., Weber V. Extracellular vesicles derived from platelets, red blood cells, and monocyte-like cells differ regarding their ability to induce factor XII-dependent thrombin generation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020. Vol. 8. P. 298. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00298>
80. Bouvy C., Gheldof D., Chatelain C., Mullier F., Dogné J.M. Contributing role of extracellular vesicles on vascular endothelium haemostatic balance in cancer. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014. Vol. 3. P. 24400. DOI: <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24400>
81. Agouni A., Parray A.S., Akhtar N., Mir F.A., Bourke P.J., Joseph S., et al. There is selective increase in pro-thrombotic circulating extracellular vesicles in acute ischemic stroke and transient ischemic attack: a study of patients from the Middle East and Southeast Asia. *Frontiers in Neurology*. 2019. Vol. 10. P. 251. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00251>
82. Berezin A.E., Berezin A.A. Extracellular endothelial cell-derived vesicles: emerging role in cardiac and vascular remodeling in heart failure. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2020. Vol. 7. P. 47. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00047>
83. Mathiesen A., Hamilton T., Carter N., Brown M., McPheat W., Dobrian A. Endothelial extracellular vesicles: from keepers of health to messengers of disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, № 9. P. 4640. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22094640>
84. Puhm F., Boilard E., Machlus K.R. Platelet extracellular vesicles: beyond the blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2021. Vol. 41, № 1. P. 87–96. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314644>
85. Puhm F., Boilard E., Machlus K.R. Platelet extracellular vesicles: beyond the blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2021. Vol. 41, № 1. P. 87–96. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314644>
86. Ebeyer-Masotta M., Eichhorn T., Fischer M.B., Weber V. Impact of production methods and storage conditions on extracellular vesicles in packed red blood cells and platelet concentrates. *Transfusion and Apheresis Science*. 2024. P. 103891. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2024.103891>
- Free Radical Biology & Medicine*. 2017;103:95–106. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.024>
68. Chen G., Zhang D., Fuchs TA, Manwani D, Wagner DD, Frenette PS. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood*. 2014;123(24):3818–27. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-529982>
69. Schimmel M, Nur E, Biemond BJ, van Mierlo GJ, Solati S, Brandjes DP, et al. Nucleosomes and neutrophil activation in sickle cell disease painful crisis. *Haematologica*. 2013;98(11):1797–803. DOI: <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.088021>
70. Tharaux PL. Posttranslational modifications of sickle hemoglobin in microparticles may promote injury. *Kidney International*. 2019;95(6):1289–91. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.02.023>
71. Camus SM, De Moraes JA, Bonnin P, Abbyad P, Le Jeune S, Lionnet F, et al. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. *Blood*. 2015;125(24):3805–14. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-589283>
72. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*. 2007;87(1):315–424. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>
73. Eleuthero ECA, Silva Magalhães RS, de Araújo Brasil A, Monteiro Neto JR, de Holanda Paranhos L. SOD1, more than just an antioxidant. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2021;697:108701. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108701>
74. Buffolo F, Monticone S, Camussi G, Aikawa E. Role of extracellular vesicles in the pathogenesis of vascular damage. *Hypertension*. 2022;79(5):863–73. DOI: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17957>
75. Lapping-Carr G, Gemel J, Mao Y, Beyer EC. Circulating extracellular vesicles and endothelial damage in sickle cell disease. *Frontiers in Physiology*. 2020;11:1063. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01063>
76. Rota F, Ferrari L, Hoxha M, Favero C, Antonioli R, Pergoli L, et al. Blood-derived extracellular vesicles isolated from healthy donors exposed to air pollution modulate in vitro endothelial cells behavior. *Scientific Reports*. 2020;10(1):20138. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77097-9>
77. Panigrahi S, Ghosh SK, Ferrari B, Wyrick JM, Podrez EA, Weinberg A, et al. Human  $\beta$ -defensin-3 is associated with platelet-derived extracellular vesicles and is a potential contributor to endothelial dysfunction. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022;9:824954. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.824954>
78. Suades R, Padró T, Vilahur G, Badimon L. Platelet-released extracellular vesicles: the effects of thrombin activation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022;79(3):190. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04222-4>
79. Tripisciano C, Weiss R, Karuthedom George S, Fischer MB, Weber V. Extracellular vesicles derived from platelets, red blood cells, and monocyte-like cells differ regarding their ability to induce factor XII-dependent thrombin generation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8:298. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00298>
80. Bouvy C, Gheldof D, Chatelain C, Mullier F, Dogné JM. Contributing role of extracellular vesicles on vascular endothelium haemostatic balance in cancer. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014;3:24400. DOI: <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24400>
81. Agouni A, Parray AS, Akhtar N, Mir FA, Bourke PJ, Joseph S, et al. There is selective increase in pro-thrombotic circulating extracellular vesicles in acute ischemic stroke and transient ischemic attack: a study of patients from the Middle East and Southeast Asia. *Frontiers in Neurology*. 2019;10:251. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00251>
82. Berezin AE, Berezin AA. Extracellular endothelial cell-derived vesicles: emerging role in cardiac and vascular remodeling in heart failure. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2020;7:47. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00047>
83. Mathiesen A, Hamilton T, Carter N, Brown M, McPheat W, Dobrian A. Endothelial extracellular vesicles: from keepers of health to messengers of disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):4640. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22094640>
84. Puhm F, Boilard E, Machlus KR. Platelet extracellular vesicles: beyond the blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2021;41(1):87–96. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314644>
85. Puhm F, Boilard E, Machlus KR. Platelet extracellular vesicles: beyond the blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2021;41(1):87–96. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314644>
86. Ebeyer-Masotta M, Eichhorn T, Fischer MB, Weber V. Impact of production methods and storage conditions on extracellular vesicles in packed red blood cells and platelet concentrates. *Transfusion and Apheresis Science*. 2024;103891. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2024.103891>

87. Danesh A., Inglis H.C., Jackman R.P., Wu S., Deng X., Muench M.O., et al. Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro. *Blood*. 2014. Vol. 123, № 5. P. 687–696. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-530469>
88. Straat M., van Hezel M.E., Böing A., Tuip-De Boer A., Weber N., Nieuwland R., et al. Monocyte-mediated activation of endothelial cells occurs only after binding to extracellular vesicles from red blood cell products, a process mediated by  $\beta$ -integrin. *Transfusion*. 2016. Vol. 56, № 12. P. 3012–3020. DOI: <https://doi.org/10.1111/trf.13851>
89. Fischer D., Büssov J., Meybohm P., Weber C.F., Zacharowski K., Urbschat A., et al. Microparticles from stored red blood cells enhance procoagulant and proinflammatory activity. *Transfusion*. 2017. Vol. 57, № 11. P. 2701–2711. DOI: <https://doi.org/10.1111/trf.14268>
90. Sadallah S., Eken C., Schifferli J.A. Erythrocyte-derived ectosomes have immunosuppressive properties. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008. Vol. 84, № 5. P. 1316–1325. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.0108013>
91. Sadallah S., Eken C., Schifferli J.A. Erythrocyte-derived ectosomes have immunosuppressive properties. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008. Vol. 84, № 5. P. 1316–1325. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.0108013>
92. Nazimek K., Bustos-Morán E., Blas-Rus N., Nowak B., Ptak W., Askenase P.W., et al. Syngeneic red blood cell-induced extracellular vesicles suppress delayed-type hypersensitivity to self-antigens in mice. *Clinical and Experimental Allergy*. 2019. Vol. 49, № 11. P. 1487–1499. DOI: <https://doi.org/10.1111/cea.13475>
93. Zhang Y., Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cellular & Molecular Immunology*. 2020. Vol. 17, № 8. P. 807–821. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0488-6>
94. Nantakomol D., Dondorp A.M., Krudsood S., Udomsangpetch R., Pattanapanyasat K., Combes V., et al. Circulating red cell-derived microparticles in human malaria. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011. Vol. 203, № 5. P. 700–706. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq104>
95. Nantakomol D., Palasuwan A., Chaowanathikhom M., Soogarun S., Imwong M. Red cell and platelet-derived microparticles are increased in G6PD-deficient subjects. *European Journal of Haematology*. 2012. Vol. 89, № 5. P. 423–429. DOI: <https://doi.org/10.1111/ejh.12010>
96. Noulsri E., Lerdwana S., Palasuwan D., Palasuwan A. Cell-derived microparticles in blood products from blood donors deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Laboratory Medicine*. 2021. Vol. 52, № 6. P. 528–535. DOI: <https://doi.org/10.1093/labmed/lmab007>
97. Tang T.T., Wang B., Li Z.L., Wen Y., Feng S.T., Wu M., et al. Kim-1 targeted extracellular vesicles: a new therapeutic platform for RNAi to treat AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2021. Vol. 32, № 10. P. 2467–2483. DOI: <https://doi.org/10.1681/ASN.2020111561>
98. Peng B., Yang Y., Wu Z., Tan R., Pham T.T., Yeo E.Y.M., et al. Red blood cell extracellular vesicles deliver therapeutic siRNAs to skeletal muscles for treatment of cancer cachexia. *Molecular Therapy*. 2023. Vol. 31, № 5. P. 1418–1436. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.03.036>
87. Danesh A, Inglis HC, Jackman RP, Wu S, Deng X, Muench MO, et al. Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro. *Blood*. 2014;123(5):687–96. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-530469>
88. Straat M, van Hezel ME, Böing A, Tuip-De Boer A, Weber N, Nieuwland R, et al. Monocyte-mediated activation of endothelial cells occurs only after binding to extracellular vesicles from red blood cell products, a process mediated by  $\beta$ -integrin. *Transfusion*. 2016;56(12):3012–20. DOI: <https://doi.org/10.1111/trf.13851>
89. Fischer D, Büssov J, Meybohm P, Weber CF, Zacharowski K, Urbschat A, et al. Microparticles from stored red blood cells enhance procoagulant and proinflammatory activity. *Transfusion*. 2017;57(11):2701–11. DOI: <https://doi.org/10.1111/trf.14268>
90. Sadallah S, Eken C, Schifferli JA. Erythrocyte-derived ectosomes have immunosuppressive properties. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008;84(5):1316–25. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.0108013>
91. Sadallah S, Eken C, Schifferli JA. Erythrocyte-derived ectosomes have immunosuppressive properties. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008;84(5):1316–25. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.0108013>
92. Nazimek K, Bustos-Morán E, Blas-Rus N, Nowak B, Ptak W, Askenase PW, et al. Syngeneic red blood cell-induced extracellular vesicles suppress delayed-type hypersensitivity to self-antigens in mice. *Clinical and Experimental Allergy*. 2019;49(11):1487–99. DOI: <https://doi.org/10.1111/cea.13475>
93. Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cellular & Molecular Immunology*. 2020;17(8):807–21. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0488-6>
94. Nantakomol D, Dondorp AM, Krudsood S, Udomsangpetch R, Pattanapanyasat K, Combes V, et al. Circulating red cell-derived microparticles in human malaria. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011;203(5):700–6. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq104>
95. Nantakomol D, Palasuwan A, Chaowanathikhom M, Soogarun S, Imwong M. Red cell and platelet-derived microparticles are increased in G6PD-deficient subjects. *European Journal of Haematology*. 2012;89(5):423–9. DOI: <https://doi.org/10.1111/ejh.12010>
96. Noulsri E, Lerdwana S, Palasuwan D, Palasuwan A. Cell-derived microparticles in blood products from blood donors deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Laboratory Medicine*. 2021;52(6):528–35. DOI: <https://doi.org/10.1093/labmed/lmab007>
97. Tang TT, Wang B, Li ZL, Wen Y, Feng ST, Wu M, et al. Kim-1 targeted extracellular vesicles: a new therapeutic platform for RNAi to treat AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2021;32(10):2467–83. DOI: <https://doi.org/10.1681/ASN.2020111561>
98. Peng B, Yang Y, Wu Z, Tan R, Pham TT, Yeo EYM, et al. Red blood cell extracellular vesicles deliver therapeutic siRNAs to skeletal muscles for treatment of cancer cachexia. *Molecular Therapy*. 2023;31(5):1418–36. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.03.036>

#### Обмеження дослідження

У цьому огляді ми проаналізували клінічні та лабораторні дані щодо мікровезикуляції еритроцитів та ролі вивільнених везикул у захворюваннях імунної та серцево-судинної систем, також було розглянуто особливості везикуляції інших клітин крові. Було проаналізовано молекулярні механізми брунькування та відшарування мікровезикул від еритроцитів, а також охарактеризовано вміст ліпідів та білків у дочірніх частинках порівняно з батьківською клітиною. Ми не зосереджувалися спеціально на конкретних методологіях штучної індукції мікровезикуляції еритроцитів, а лише розглядали перспективи терапевтичного використання утворених еритроцитарних мікровезикул як нанорозмірних переносників ліків та терапевтичних мішеней. Мікровезикуляцію еритроцитів під час тривалого зберігання було проаналізовано, щоб привернути увагу до абсолютно нової галузі досліджень, які мають особливе практичне значення для біобанкінгу та зберігання крові та вже були детально розглянуті в кількох недавніх оглядових публікаціях.

#### Перспективи подальших досліджень

Наші подальші дослідження в цій галузі будуть зосереджені на з'ясуванні механізмів та розробці технологій індукції вивільнення еритроцитами мікровезикул та завантаження мікровезикул

#### Limitations of the study

In the current review, we have analysed clinical and laboratory data on the RBC microvesiculation and the role of released vesicles in immune, cardiovascular, and circulatory conditions. Vesiculation peculiarities of other blood cells were also considered. Molecular mechanisms of microvesicle budding and shedding from RBC were analysed, and lipid and protein content of daughter particles compared to the parent cell were characterized as well. We have not specifically focused on the particular methodologies of artificial induction of RBC microvesiculation, and also just envisaged perspectives of therapeutic use of formed RBC-MVs as drug delivery vehicles and therapeutic targets. Microvesiculation of RBC during long-term storage was analysed to draw attention to the whole new field of such studies, which are of particular practical importance for biobanking and blood storage practice, and were already reviewed in detail in several recent publications.

#### Prospects for further research

Our further research in this field will be focused on elucidating mechanisms and elaborating technologies for inducing RBC-MV release and loading MVs with active pharmaceutical ingredients

активними фармацевтичними інгредієнтами для використання отриманих нанорозмірних везикул як перспективних систем доставки ліків. Також ми плануємо переглянути наявні підходи до виділення еритроцитарних ПВ з препаратів еритромаси та цільної крові при тривалому зберіганні крові для покращення якості та подовження тривалості зберігання компонентів крові.

to be used as prospective drug delivery systems. Also, we plan to revise available approaches of RBCEVs separation under the long-term storage of blood to enhance the quality and duration of stored blood components.

#### Конфлікт інтересів

#### Conflict of interest

Всі автори подали до редакції заповнену Єдину форму розкриття конфлікту інтересів Міжнародного комітету редакторів медичних журналів «ICMJE» (*International Committee of Medical Journal Editors*). Автори рукопису свідомо засвідчують відсутність фактичного або потенційного конфлікту інтересів щодо результатів цієї роботи з фармацевтичними компаніями, виробниками біомедичних пристроїв, іншими організаціями, чиї продукти, послуги, фінансова підтримка можуть бути пов'язані з предметом наданих матеріалів або які спонсорували проведені дослідження.

All authors have submitted to the editorial office a completed ICMJE Unified Disclosure Form for Potential Conflicts of Interest (International Committee of Medical Journal Editors). The authors of the manuscript knowingly confirm the absence of any actual or potential conflicts of interest related to the results of this work with pharmaceutical companies, manufacturers of biomedical devices, or other organizations whose products, services, or financial support may be associated with the subject of the submitted materials or that sponsored the conducted research.

#### Дотримання етичних норм

#### Ethics statement

Автори рукопису свідомо засвідчують, що підготовка рукопису здійснювалась виключно на основі відкрито опублікованих наукових джерел. У роботі не використовувались персоналізовані дані пацієнтів, результати первинних клінічних або доклінічних досліджень. У зв'язку з цим отримання схвалення комісії з питань біоетики не вимагалось. Дослідження виконане з дотриманням принципів належної наукової практики та відповідно до міжнародних етичних стандартів, зокрема рекомендацій Комітету з публікаційної етики «COPE» (*Committee on Publication Ethics*).

The authors of the manuscript knowingly certify that the preparation of the manuscript was carried out exclusively on the basis of openly published scientific sources. The study did not use identifiable patient data or the results of primary clinical or preclinical investigations. Therefore, approval by a bioethics committee was not required. The research was conducted in accordance with the principles of good scientific practice and in compliance with international ethical standards, in particular the recommendations of the Committee on Publication Ethics (COPE).

#### Використання штучного інтелекту

#### Use of Generative Artificial Intelligence

Автори рукопису свідомо засвідчують, що у процесі проведення дослідження та підготовки цього рукопису не використовували жодних інструментів або сервісів генеративного штучного інтелекту для виконання будь-яких завдань, перелічених у Таксономії делегування завдань генеративному штучному інтелекту «GAIDeT» (*Generative Artificial Intelligence Delegation Taxonomy*, 2025 р.). Усі етапи роботи – від концептуалізації до фінального редагування – виконані без залучення генеративного штучного інтелекту, виключно авторами.

The authors of the manuscript knowingly certify that no generative artificial intelligence tools or services were used during the conduct of the study or the preparation of this manuscript to perform any of the tasks listed in the Generative Artificial Intelligence Delegation Taxonomy (GAIDeT, 2025). All stages of the work—from conceptualization to final editing—were carried out exclusively by the authors, without the involvement of generative artificial intelligence.

#### Первинні дані та матеріали

#### Data availability statement

Автори рукопису свідомо засвідчують, що первинна медична документація (історії хвороби, амбулаторні картки, протоколи обстежень, результати лабораторних та інструментальних досліджень конкретних пацієнтів) та статистичні бази даних у роботі не використовувалися. Усі твердження та узагальнення підкріплені посиланнями на першоджерела, доступні у відкритому доступі або через наукові бібліотечні ресурси. Додаткові матеріали, що стосуються процесу відбору джерел чи деталізації методології аналізу, можуть бути надані автором-кореспондентом за обґрунтованим запитом.

The authors of the manuscript knowingly certify that primary medical documentation (including medical records, outpatient charts, examination protocols, and the results of laboratory and instrumental studies of specific patients), as well as statistical databases, were not used in this work. All statements and generalizations are supported by references to original sources available in open access or through scientific library resources. Additional materials related to the source selection process or further details of the analysis methodology may be provided by the corresponding author upon reasonable request.

#### Інформація про фінансування

#### Funding information

Стаття є фрагментом планових науково-дослідних робіт кафедри молекулярної та медичної біофізики факультету радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем «Фізичний дизайн наноплатформ для керування біоактивністю антимікробних пептидів», термін виконання: 2026–2028 рр., керівник – завідувач кафедри молекулярної та медичної біофізики, факультету радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем, доктор фізико-математичних наук, професор Берест В.П. та кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології Харківського національного

This article is a part of the planned research projects of the Department of Molecular and Medical Biophysics, Faculty of Radiophysics, Biomedical Electronics and Computer Systems, entitled «Physical design of nanoplatforms for controlling the bioactivity of antimicrobial peptides», project duration: 2026–2028; project supervisor: Head of the Department of Molecular and Medical Biophysics, Faculty of Radiophysics, Biomedical Electronics and Computer Systems, Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Professor V.P. Berest and of the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology

університету імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України «Вивчення ролі імунних, аутоімунних та метаболічних розладів у патогенезі та наслідках інфекційного процесу, що викликані бактеріями, вірусами, вірусно-бактеріальними асоціаціями при гострому, затяжному та хронічному перебігу хвороби та удосконалення тактики лікування», номер державної реєстрації 0123U105022, термін виконання: 2023–2028 рр., керівник – завідувачка кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології, кандидат медичних наук, доцент О.В. Волобуєва.

of V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, entitled «Investigation of the role of immune, autoimmune, and metabolic disorders in the pathogenesis and outcomes of infectious processes caused by bacteria, viruses, and viral–bacterial associations in acute, prolonged, and chronic courses of disease, and improvement of treatment strategies», state registration No. 0123U105022; project duration: 2023–2028; project supervisor: Head of the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor O.V.Volobueva.

## ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

## INFORMATION ABOUT AUTHORS

**Волобуєв Данило Олексійович** – аспірант кафедри молекулярної та медичної біофізики факультету радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України; майдан Свободи, буд. 4, м. Харків, Україна, 61022;

e-mail: [danalex999@ukr.net](mailto:danalex999@ukr.net)

tel.: +38 (099) 259-82-83

*Author's contribution: концепція та дизайн роботи, формулювання мети, збір даних та інтерпретація отриманих результатів, написання тексту статті, формулювання висновків.*

**Берест Володимир Петрович** – доктор фізико-математичних наук, професор, завідувач кафедри молекулярної та медичної біофізики факультету радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України; майдан Свободи, буд. 4, м. Харків, Україна, 61022;

e-mail: [berest@karazin.ua](mailto:berest@karazin.ua)

mob.: +38 (067) 946-48-15

*Внесок автора: підбір літературних джерел, участь у обговоренні отриманих результатів, редагування тексту статті.*

**Лядов Данііл Артемович** – аспірант кафедри молекулярної та медичної біофізики факультету радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України; майдан Свободи, буд. 4, м. Харків, Україна, 61022 ;

e-mail: [daniil.liadov.work@gmail.com](mailto:daniil.liadov.work@gmail.com)

mob.: +38 (050) 692-56-41

*Внесок автора: підбір літературних джерел, участь у обговоренні отриманих результатів, редагування тексту статті.*

**Гладких Федір Володимирович** – доктор філософії в галузі охорони здоров'я за спеціальністю «Медицина», старший науковий співробітник відділу променевої патології та паліативної медицини Державної установи «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», вул. Григорія Сковороди, буд. 82, м. Харків, Україна, 61024;

e-mail: [fedir.hladykh@gmail.com](mailto:fedir.hladykh@gmail.com)

mob.: +38 (099) 782-78-72

*Внесок автора: підбір літературних джерел, участь у обговоренні отриманих результатів.*

**Volobuev Daniil Oleksiiovych** – Postgraduate student of the Department of Molecular and Medical Biophysics School of Radio Physics, Biomedical Electronics and Computer Systems of the V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine; 4 Svobody Sq., Kharkiv, Ukraine, 61022;

e-mail: [danalex999@ukr.net](mailto:danalex999@ukr.net)

tel.: +38 (099) 259-82-83

*Author's contribution: conceptualisation and design of the work, formulation of the goal, data collection and interpretation of the results obtained, writing the text of the article, formulation of conclusions.*

**Berest Volodymyr Petrovych** – Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Professor, Head of the Department of Molecular and Medical Biophysics, School of Radio Physics, Biomedical Electronics and Computer Systems of the V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine; 4 Svobody Sq., Kharkiv, Ukraine, 61022;

e-mail: [berest@karazin.ua](mailto:berest@karazin.ua)

tel.: +38 (067) 946-48-15

*Author's contribution: selection of literature, participation in the discussion of the results, editing the text of the article.*

**Liadov Daniil Artemovych** – Postgraduate student of the Department of Molecular and Medical Biophysics, School of Radio Physics, Biomedical Electronics and Computer Systems of the V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine; 4 Svobody Sq., Kharkiv, Ukraine, 61022;

e-mail: [daniil.liadov.work@gmail.com](mailto:daniil.liadov.work@gmail.com)

tel.: +38 (050) 692-56-41

*Author's contribution: selection of literature sources, participation in the discussion of the results, editing the text of the article.*

**Hladykh Fedir Volodymyrovych** – Doctor of Philosophy in Health Care in specialty «Medicine», Senior Research fellow Department of Radiation Pathology and Palliative Medicine of the State Organization «Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»; 82 Hryhoriia Skovorody Str., Kharkiv, Ukraine, 61024;

e-mail: [fedir.hladykh@gmail.com](mailto:fedir.hladykh@gmail.com)

tel.: +38 (099) 782-78-72

*Author's contribution: selection of literary sources, participation in the discussion of the obtained results.*

Рукопис надійшов  
*Manuscript was received*  
08.09.2025

Отримано після рецензування  
*Received after review*  
30.10.2025

Прийнято до друку  
*Accepted for printing*  
19.11.2025

Опубліковано  
*Published*  
22.12.2025