

Модуляция ассоциации липопротеидов низкой плотности с помощью плуроников

А. А. Мельниченко^{1,2}, Д. В. Аксенов³, О. М. Панасенко³, А. А. Ярославов⁴, И. А. Собенин^{1,3}

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН, Москва

² Научно-исследовательский институт атеросклероза (Сколково), Москва

³ ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ, Москва

⁴ ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», Москва

Абстракт

Цель. Ключевым фактором в развитии атеросклероза является накопление холестерина в интиме магистральных сосудов человека. Известно, что именно липопротеиды низкой плотности (ЛНП) отвечают за транспорт холестерина в организме. Ранее было показано, что только ассоциаты (агрегаты) ЛНП вызывают накопление липидов в культивируемых клетках, т.е. атерогенны. Цель настоящего исследования состояла в поиске ингибиторов ассоциации ЛНП, выделенных из крови больных атеросклерозом.

Материалы и методы. В работе использованы плуроники® P85, L61 и F68. Общую фракцию ЛНП выделяли сыворотки больных сердечно-сосудистыми заболеваниями. Степень ассоциации ЛНП оценивали методом регистрации флуктуации светопропускания при помощи прибора. Средний размер образовавшихся ассоциатов оценивали методом квазиупругого лазерного рассеивания на приборе Аутосайзер 2-Малверн.

Результаты. Нами были исследованы три группы амфифильных соединений: с гидрофильными, гидрофобными и промежуточными свойствами. Было показано, что плуроники с выраженными гидрофобными свойствами (P85 и L61) в концентрациях близких или больших к критической концентрации мицеллообразования ингибировали процесс ассоциации ЛНП, в то время как «гидрофильный» плуроник F68 в любой концентрации не влиял на ассоциацию ЛНП.

Ключевые слова: липопротеиды, ассоциация липопротеидов, плуроники, атеросклероз.

Modulation of Low Density Lipoprotein Self-association with Pluronic Block Copolymers

A.A. Melnichenko^{1,2}, D.V. Aksenov³, O.M. Panasenko³, A.A. Yaroslavov⁴, I.A. Sobenin^{1,3}

¹ Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

² Research Institute for Atherosclerosis Research (Skolkovo), Moscow, Russia

³ Russian Cardiology Research Complex, Moscow, Russia

⁴ Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract

Aim. A key factor of atherogenesis is the accumulation of cholesterol in the intima of main arteries. It is known that low density lipoproteins (LDL) are responsible for the transport of cholesterol in the body. It was previously shown that only LDL associates (aggregates) causes lipid accumulation in cultured cells, i.e. atherogenic. Aim of this study was to find inhibitors of the association of LDL isolated from the blood of patients with coronary heart disease.

Materials and methods. We used Pluronic block copolymers P85, L61 and F68. The total LDL fraction was isolated from serum of patients with cardiovascular diseases. Degree of association of LDL was measured by recording the fluctuations of light transmission through the device. The average size of the formed associates evaluated by quasi-elastic scattering on the laser device Autosayzer 2 Malvern.

Results. Multivariate predictors and markers of an abdominal aortic calcification included female gender, systolic arterial hypertension, smoking duration, hyperhomocysteinemia, a high serum C-reactive protein level, ischemic heart disease, cerebrovascular disease and osteoporosis.

Keywords: lipoproteins, lipoprotein association, Pluronic, atherosclerosis.

Одним из первых проявлений атеросклероза на клеточном уровне является накопление липидов, в частности эфиров холестерина, в интиме артерий [1–3]. Источником липидов, накапливающихся в интиме сосудов, являются циркулирующие в крови липопротеиды низкой плотности [4, 5]. При этом нативные липопротеиды низкой плотности (ЛНП), циркулирующие в крови, не способны вызывать накопление липидов в культивируемых клетках, то есть не атерогенны [6–8]. С другой стороны, многими исследователями было продемонстрировано, что модифицированные различным образом *in vitro* (ацетилированные, обработанные малоновым диальдегидом, вортексированные, гликозилированные и т. д.) ЛНП атерогенны [8–11].

Ранее было продемонстрировано, что модифицированные любым способом ЛНП образуют ассоциаты, и эти ассоциаты проявляют атерогенные свойства, вызывая накопление внутриклеточных липидов. Была выявлена прямая зависимость между размером ассоциатов ЛНП и их способностью вызывать накопление липидов в клетках, причем нативные ЛНП не образовывали ассоциатов и не обладали атерогенными свойствами, т. е. не вызывали накопление внутриклеточных липидов [12]. Можно сделать предположение, что без модификации ЛНП невозможна их ассоциация, без ассоциации ЛНП не проявляются их атерогенные свойства. Исходя из этого, особый интерес представляет поиск модуляторов процесса ассоциации ЛНП.

Известно несколько эндогенных ингибиторов ассоциации ЛНП [10, 13], такие как липопротеид-дефицитная сыворотка, бычий сывороточный альбумин (БСА), липопротеиды высокой плотности (ЛВП) здоровых доноров и основной аполипопротеид ЛВП – apoA-I. Все они обладают амфифильными свойствами и, по-видимому, взаимодействуя с гидрофобными участками на поверхности ЛНП, предотвращают взаимодействие частиц ЛНП между собой и тем самым ингибируют ассоциацию. Мало известно об экзогенных ингибиторах ассоциации. Между тем поиск и изучение нетоксичных и биодоступных ингибиторов ассоциации ЛНП представляет большой практический интерес, если рассматривать подавление ассоциации ЛНП в качестве терапевтического подхода. Мы предположили, что на эту роль могут претендовать амфифильные сополимеры окиси пропилена (ОП) и окиси этилена (ОЭ), так называемые плуроники. В данной работе изучена способность различных плуроников влиять на ассоциацию ЛНП.

Методика исследования

В работе использованы плуроники® P85, L61 и F68 (BASF (Wyandotte, MI)).

Общую фракцию ЛНП выделяли двухстадийным ультрацентрифугированием в градиенте плотности NaBr из сыворотки больных сердечно-сосудистыми

заболеваниями (мужчины в возрасте 40–74 лет с ранним бессимптомным атеросклерозом сонных артерий) [14]. Концентрация белка в образцах ЛНП определялась с помощью метода Лоури.

Для изучения ассоциации ЛНП суспензию предварительно освобождали от имеющихся в ней спонтанно образующихся ассоциатов путем фильтрования через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (Nalgene, США). Затем ЛНП в концентрации 0,5 мг белка/мл инкубировали при 37°C в изотоническом фосфатном буфере (ИФБ; GIBCO, Paisley, Великобритания; KCl 0,2 г/л, KH₂PO₄ 0,2 г/л, NaCl 8 г/л, Na₂HPO₄ 1,15 г/л, pH 7,2) при постоянном перемешивании – 100 оборотов в минуту. Степень ассоциации ЛНП оценивали методом регистрации флуктуации светопропускания луча лазерного света длиной волны 860 нм при помощи прибора Агрегометр (Aggregation analyzer, Biola, RF) [15]. Метод основан на том, что относительная дисперсия колебаний оптической плотности, вызванных случайными изменениями в количестве частиц, попадающих в оптический путь лазерного луча, отражает отклонения от их среднего размера, т. е. степень их ассоциации. Через определенные промежутки времени регистрировали флуктуацию светопропускания.

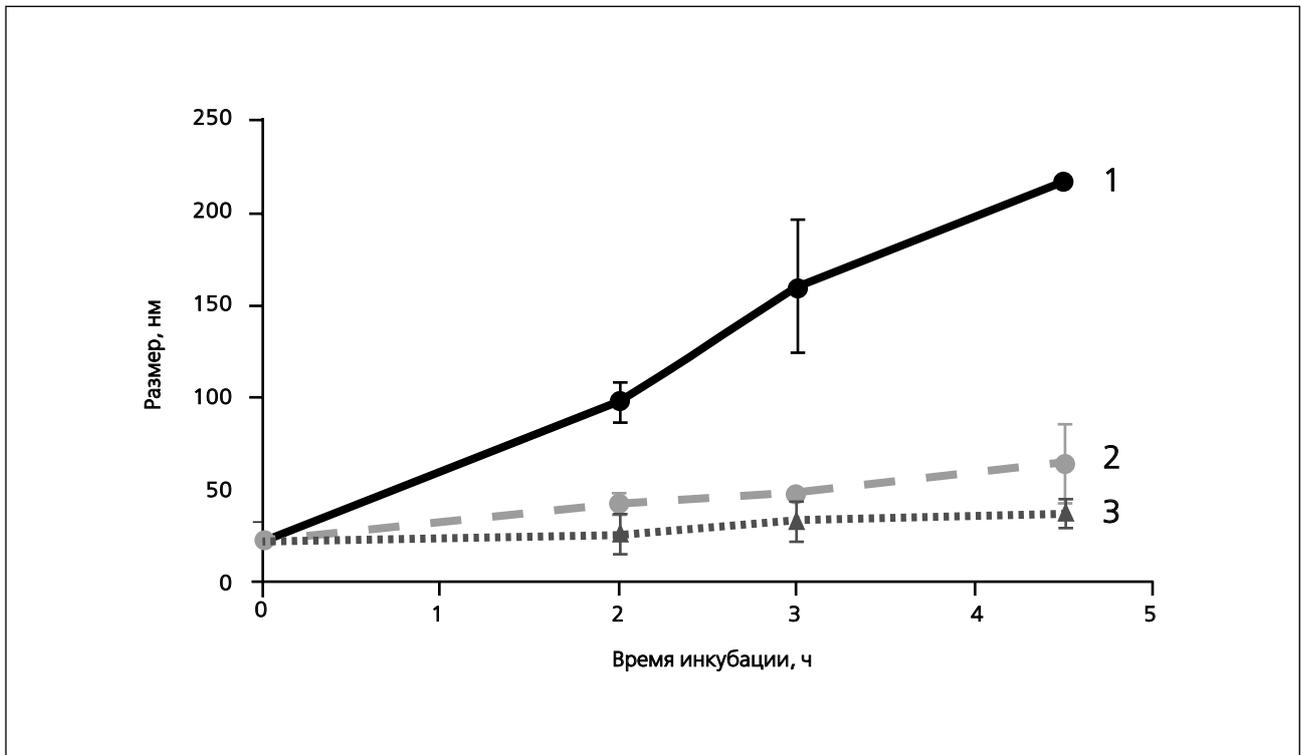
Средний размер образовавшихся ассоциатов оценивали методом квазиупругого лазерного рассеивания на приборе Аутосайзер 2-Малверн (Autosizer 2-Malvern, Malvern Instruments, UK). Для этого образцы ЛНП с концентрацией 2,5 мг белка/мл инкубировали при 37°C в изотоническом фосфатном буфере при постоянном перемешивании – 1000 оборотов в минуту. Через определенные промежутки времени проводили измерение размера частиц.

Результаты исследования

Частицы ЛНП склонны к самопроизвольной ассоциации. В условиях инкубации суспензии частиц ЛНП при 37°C при постоянном перемешивании происходит так называемая спонтанная, не индуцированная внешними факторами ассоциация ЛНП. Для оценки ассоциации ЛНП и влияния плуроников на этот процесс мы использовали два метода – метод флуктуации светопропускания и метод квазиупругого лазерного рассеивания. Во всех случаях результаты, полученные при помощи двух методов оценки ассоциации ЛНП, полностью совпадали (рис. 1 и 2).

В данной работе мы провели сравнительное исследование действия плуроников с различными гидрофильно-липофильными свойствами на процесс ассоциации ЛНП. Так, нами были использованы плуроник F68, обладающий высоким значением гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ) 29 и выраженными гидрофильными свойствами, плуроник L61, характеризующийся значительной гидрофобностью (ГЛБ 3), и плуроник P85

Рисунок 1. Кинетические кривые изменения среднего размера частиц ЛНП под влиянием плюроника P85. Среда инкубации – ИФБ, pH 7,4, концентрация ЛНП 2,5 мг белка /мл, температура инкубации 37 °С, скорость перемешивания 1000 об/мин. Кривая (1) – суспензия ЛНП в отсутствие плюроника P85, кривые (2) и (3) в присутствии, соответственно, 0,1 % и 0,01 % плюроника P85



с умеренными гидрофильными и липофильными свойствами (ГЛБ 16).

На рис. 1 приведены типичные кинетические кривые изменения среднего размера частиц ЛНП в случае спонтанной ассоциации и в присутствии плюроника P85. Видно, что при спонтанной ассоциации происходит увеличение среднего размера частиц в зависимости от времени инкубации (рис. 1). В то же время при добавлении различных концентраций плюроника P85 формирование ассоциатов заметно ингибировалось. Так, добавление к суспензии ЛНП до начала инкубации плюроника P85 в концентрации 0,1 % (в/в %) ингибировало процесс ассоциации после 4,5 часа инкубации на 93 % (рис. 1). Эффект подавления зависел от концентрации плюроника, в концентрации P85 0,01 % наблюдалось подавление ассоциации после 4,5 часа инкубации на 79 % (рис. 1).

Аналогичные данные были получены методом флукутации светопропускания. На рис. 2 представлены типичные кривые изменения флукутации светопропускания суспензии ЛНП в присутствии различных концентраций плюроника в инкубационной среде. Как видно из рисунка 2, наименьшая концентрация плюроника P85 – 0,005 % – не оказывала влияния на процесс ассоциации ЛНП. Таким образом, очевидно, что плюроник P85 является ингибитором ассоциации ЛНП только в концентрации близкой или большей, чем критическая кон-

центрация мицеллообразования (ККМ) (табл. 1), или близкой к ней, которая составляет в его случае 0,03 %.

Когда плюроник P85 добавлялся в суспензию ЛНП в ходе инкубации, т. е. когда процесс ассоциации частиц уже был инициирован и произошло увеличение среднего размера частиц ЛНП, также наблюдалась остановка дальнейшей ассоциации липопротеидов (рис. 3). Плюроник P85 в концентрации 0,1 % добавлялся к суспензии ЛНП после первого и после второго часа инкубации, в обоих случаях не происходило дальнейшего увеличения среднего размера частиц, т.е. ассоциация полностью подавлялась. Необходимо отметить, что добавление плюроника не вызывало уменьшение среднего размера частиц, можно предположить, что под действием плюроника не происходило диссоциации образовавшихся ассоциатов ЛНП. Следовательно, ассоциация имеет необратимый характер и является, скорее всего, слиянием частиц ЛНП.

Помимо плюроника P85, мы изучили способность двух других плюроников ингибировать ассоциацию ЛНП. Было показано, что плюроник F68, характеризующийся выраженными гидрофильными свойствами и высоким значением ГЛБ, не оказывает влияния на процесс ассоциации частиц ЛНП. На рис. 4 приведены типичные кинетические кривые изменения флукутации светопропускания

Рисунок 2. Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания суспензии под влиянием плуроника P85. Среда инкубации – ИФБ, рН 7,4, концентрация ЛНП 0,5 мг белка / мл, температура инкубации 37°C, скорость перемешивания 100 об / мин. Кривая (1) – суспензия ЛНП в отсутствие плуроника P85, кривые (2), (3) и (4) в присутствии, соответственно, 0,005, 0,1 и 0,01 % плуроника P85

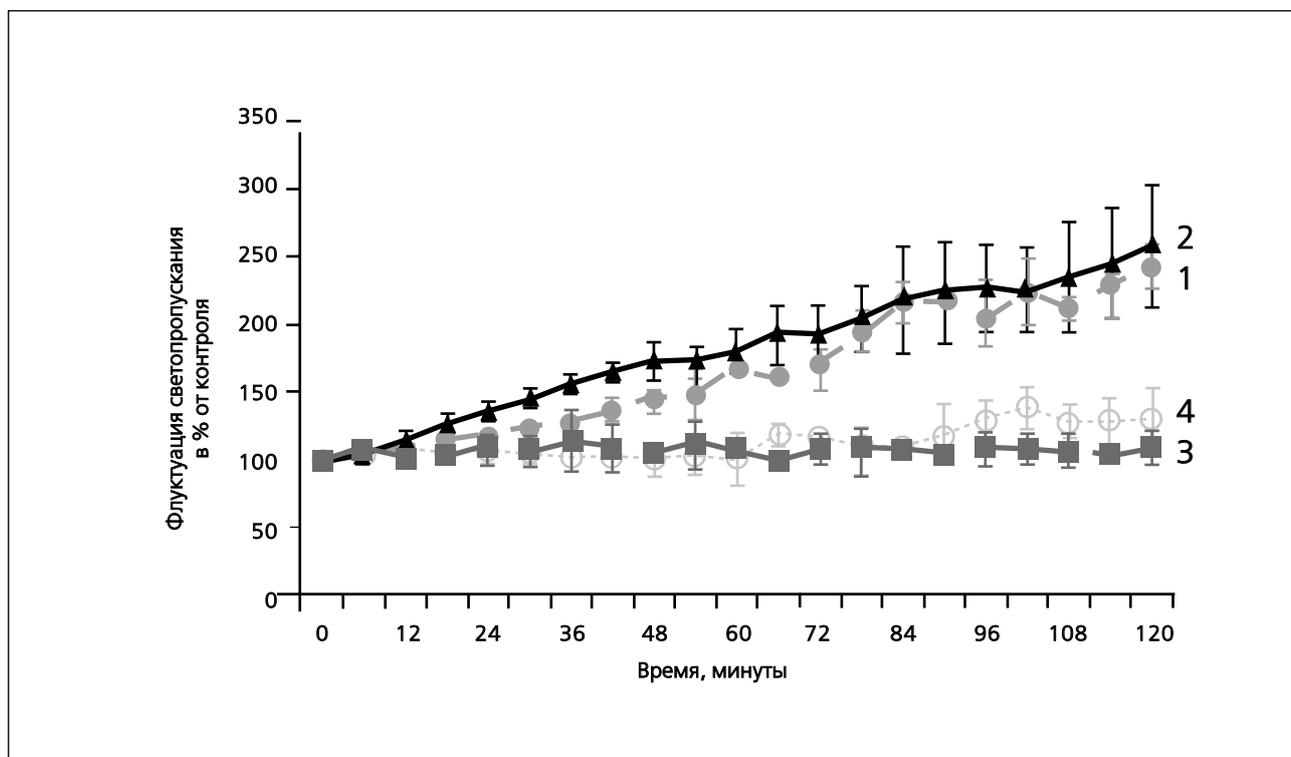


Таблица 1. Характеристики использованных в работе плуроников.

Плуроник	Молекулярная масса, Да	Критическая концентрация мицеллообразования, %	Гидрофильно-липофильный баланс
L61	2000	>0,022	3
P85	4600	0,005–0,05	16
F68	8400	>0,4	29

в присутствии плуроника F68 в концентрации 0,4 % и в отсутствие плуроника (рис. 4). Использование большей концентрации плуроника F68 (4 %) также не приводило к угнетению процесса ассоциации ЛНП (данные не приводятся). С другой стороны, применение обладающего выраженными гидрофобными свойствами и низким значением ГЛБ плуроника L61 приводило к подавлению ассоциации ЛНП. Так, в концентрации 0,022 % плуроник L61 ингибировал рост флуктуации светопропускания суспензии ЛНП после 2 часов инкубации на 78 % (рис. 5). Использование большей концентрации плуроника L61 – 0,22 % приводило к почти полному подавлению процесса ассоциации ЛНП, а применение меньшей концентрации –

0,0022 % не влияло на ассоциацию частиц ЛНП (данные не приводятся).

Таким образом, плуроники с выраженными гидрофобными свойствами (P85 и L61) в концентрациях близких к ККМ или больших ККМ ингибировали процесс ассоциации ЛНП, в то время как «гидрофильный» плуроник F68 в любой концентрации не влиял на ассоциацию ЛНП.

Ассоциация частиц ЛНП может выражаться как в обратимой агрегации частиц, так и в необратимом слиянии модифицированных частиц ЛНП. Механизмы ассоциации частиц ЛНП до сих пор полностью не ясны. Имеются данные, свидетельствующие о том, что при модификации ЛНП происходят изменения поверхностного гидрофильного

Рисунок 3. Кинетические кривые изменения среднего размера частиц ЛНП под влиянием плуроника P85. Среда инкубации – ИФБ, pH 7,4, концентрация ЛНП 2,5 мг белка / мл, температура инкубации 37 °С, скорость перемешивания 1000 об/мин. Кривая (1) – суспензия ЛНП в отсутствие плуроника P85, кривая (2) – в присутствии 0,1 % плуроника P85, добавленного после двух часов инкубации, кривая (3) – в присутствии 0,1 % плуроника P85, добавленного после одного часа инкубации

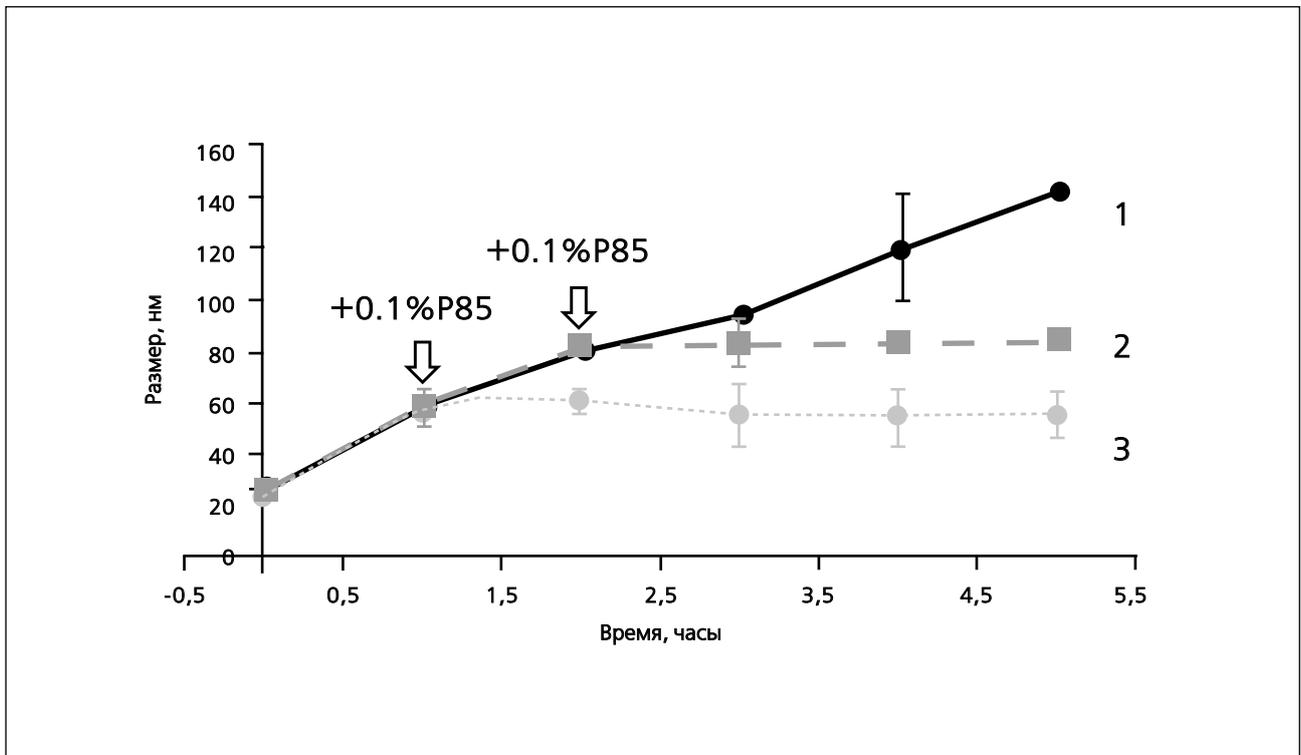


Рисунок 4. Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания суспензии ЛНП под влиянием плуроника F68. Среда инкубации – ИФБ, pH 7,4, концентрация ЛНП 0,5 мг белка / мл, температура инкубации 37 °С, скорость перемешивания 100 об/мин. Кривая (1) – суспензия ЛНП в отсутствие плуроника F68, кривая (2) в присутствии 0,4 % плуроника F68

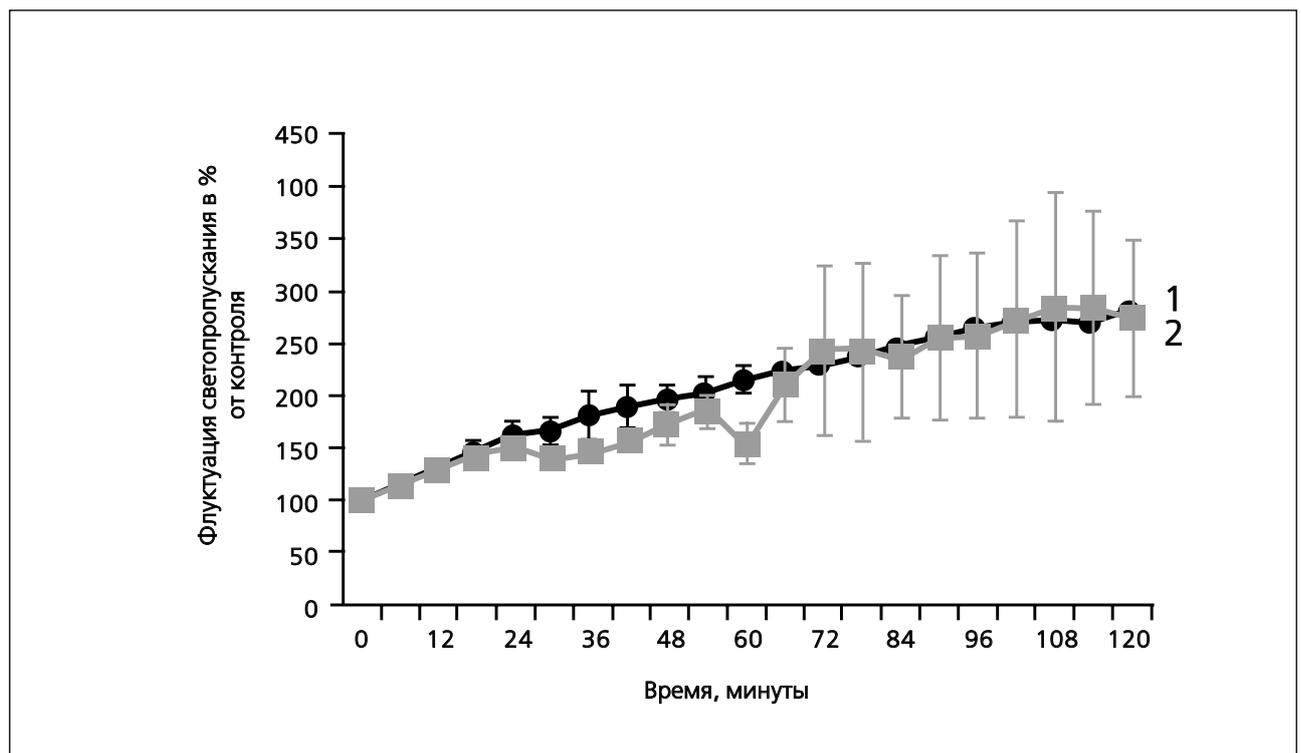
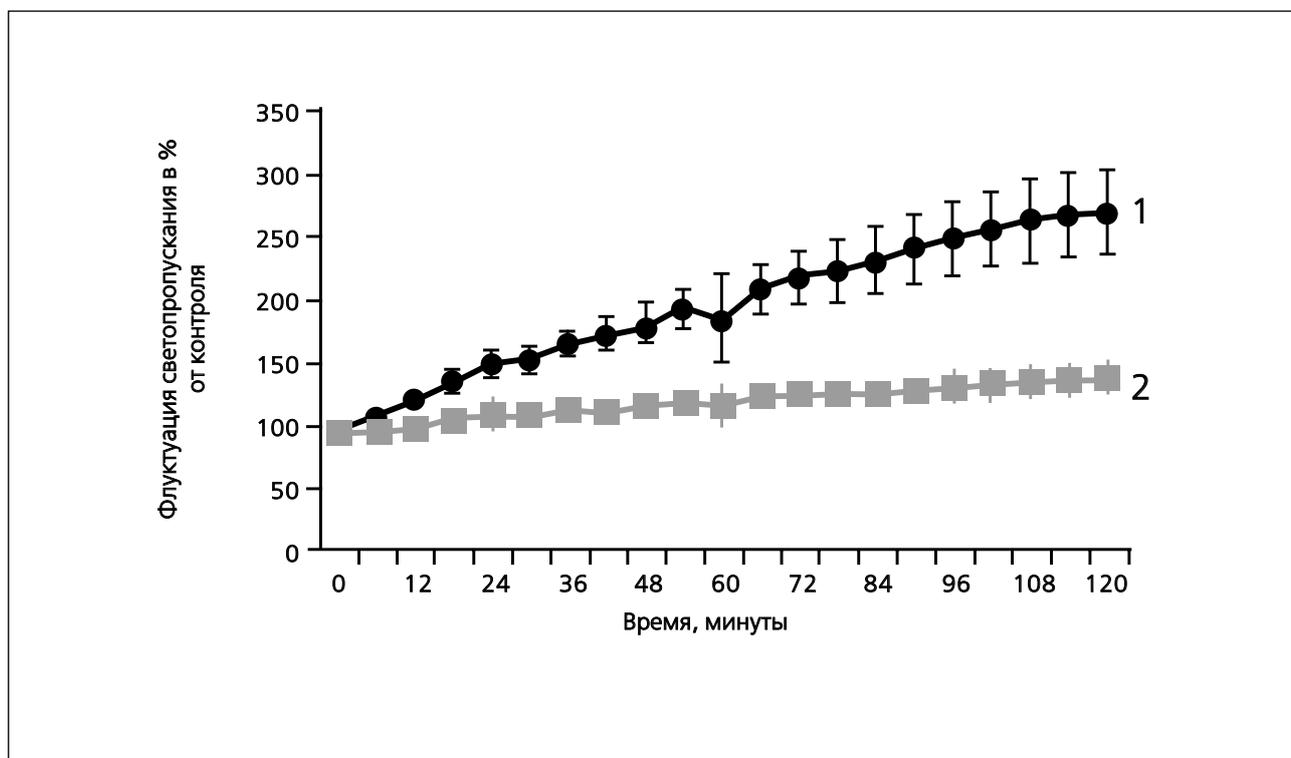


Рисунок 5. Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания суспензии ЛНП под влиянием плуроника L61. Среда инкубации – ИФБ, pH 7,4, концентрация ЛНП 0,5 мг белка / мл, температура инкубации 37 °С, скорость перемешивания 100 об/мин. Кривая (1) – суспензия ЛНП в отсутствие плуроника L61, кривая (2) в присутствии 0,022% плуроника L61.



слоя частицы, нарушения ее гидратно-сольватной оболочки, приводящие к повышению гидрофобности частицы и потере ее стабильности в растворе [10, 13]. На основании этого, предполагается, что ассоциация частиц ЛНП обусловлена гидрофобными взаимодействиями модифицированных частиц ЛНП.

Мы изучили влияние плуроников на процесс ассоциации ЛНП. Плуроники состоят из липофильной части, образованной окисью пропилена, и гидрофильной части, построенной окисью этилена, и имеют следующую структуру: (ОЭ)N-(ОП)M-(ОЭ)N. Такая структура определяет основные свойства плуроников, в том числе способность взаимодействовать с биологическими мембранами и вызывать в них структурные перестройки [16]. Важными характеристиками плуроников являются критическая концентрация мицеллообразования, при превышении которой происходит сборка отдельных сополимеров в мицеллы, а также гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ), отражающий соотношение гидрофильных и гидрофобных свойств вещества. В настоящее время существует большое количество плуроников, отличающихся количеством мономеров ОЭ и ОП и, соответственно, характеризующихся разными гидрофильными и липофильными свойствами, молекулярной массой и ККМ [17]. Так, полимеры,

характеризующиеся значительным количеством остатков ОП и небольшим ОЭ, отличаются высокой липофильностью относительно низкими ККМ и ГЛБ, например, плуроник L61. Напротив, плуроники, в составе которых ОЭ преобладает, гидрофильны и характеризуются высокими значениями ККМ и ГЛБ – плуроник F68. Наконец, существует группа плуроников с промежуточными свойствами, например P85.

Мы исследовали способность плуроников P85, L61 и F68 с различными характеристиками ККМ и ГЛБ, указанными в таб. 1. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что способность амфифильных сополимеров окиси пропилена и окиси этилена ингибировать ассоциацию ЛНП прямо зависит от выраженности гидрофобных свойств плуроника. Плуроники с выраженными и умеренными гидрофобными свойствами L61 и P85 способны значительно ингибировать ассоциацию ЛНП, но происходит это только в концентрации, близкой к критической концентрации мицеллообразования. Из этого можно сделать вывод о том, что именно мицеллярная форма плуроника способна вызывать ингибирование ассоциации частиц ЛНП, а унимеры плуроников ингибирующими свойствами не обладают. Эти данные подтверждают предположение, впервые выдвинутое Khoо и соавторами [10], о роли ги-

дрофобных взаимодействий в процессе ассоциации ЛНП. Предположительно в ходе инкубации при постоянном перемешивании происходят конформационные изменения структуры ЛНП, приводящие к экспозиции гидрофобных участков на поверхности частиц. Далее начинается происходить взаимодействие гидрофобных участков разных частиц, приводящее к ассоциации ЛНП. В случае присутствия в суспензии ЛНП амфифильных веществ липофильная часть амфифильной молекулы может взаимодействовать с гидрофобными доменами на поверхности частицы ЛНП, экранировать их и, таким образом, предотвращать процесс ассоциации ЛНП.

В процессе атерогенеза уровень pH во внеклеточном пространстве атеросклеротических поражений снижается [18]. Snek и соавторы исследовали эффект, который оказывает низкий, но физиологичный уровень pH на ключевой процесс атерогенеза – агрегацию модифицированных ЛНП. Чем ниже был уровень pH, тем более интенсивно происходила агрегация предварительно обработанных сфингомиелиназой частиц. При pH 5,5–6,0 агрегаты были значительно больше (>1 мкм), чем образованные в нейтральной среде (100–200 нм). Обработка сфингомиелиназой приводила к существенному резкому снижению α -спиралей и одновременному увеличению β -листов в структуре апоВ-100. Агрегация частиц была вызвана взаимодействием между вновь экспонированными сегментами апоВ-100. Микроэмульсия, состоящая из ЛНП, обедненных апоВ-100, не была способна образовывать крупные агрегаты. Агрегация ЛНП, вызванная сфингомиелиназой, прекращалась при снижении температуры до 15 °С, при данной также замедляются изменения в конформации апоВ-100, которые вызываются протеолизом деградацией апоВ-100 сфингомиелиназой или взаимодействием с частицами ЛВП. Гидролиз сфингомиелина способствует экспонированию чувствительных к протеазе участков апоВ-100,

взаимодействие которых приводит к последующей агрегации частиц. Агрегаты ЛНП могут приводить к задержке липидов ЛНП в закисленных участках интимы артерий, пораженных атеросклерозом. В другой работе была продемонстрирована связь склонности к ассоциации и накоплению ЛНП, обедненных сфинголипидами, в интимае сосудов у мышей с измененным генотипом [19]. Это в очередной раз подтверждает необходимость предотвращения самоагрегации модифицированных ЛНП.

Плюроники, использованные нами как ингибиторы ассоциации ЛНП, ранее в данном качестве не использовались. Morita и соавторы показали, что некоторые плюроники, например L81, изменяют вторичную структуру апоВ-100, увеличивая локальную гидратацию, таким образом, ингибируя секрецию хиломикроннов за счет модификации конформации апоВ-100 в первичных липопротеидах [20]. С другой стороны, Moghimi и соавторы изучили свойства использованного плюроника F68. К сожалению, внутривенное введение данного плюроника очень редко [21], но вызывает гиперчувствительность у некоторых лиц. Moghimi и соавторы продемонстрировали, что повышенный уровень ЛНП и ЛВП (липопротеидов высокой плотности) в плазме крови подавляет активацию комплемента, вызванную данным плюроником. Это свидетельствует о том, что ЛНП имеют сходство с данным плюроником.

Описанная в работе возможность модуляции ассоциации ЛНП различными плюрониками можно рассматривать как предпосылку к созданию лекарственного средства, которое будет влиять на развитие атеросклероза на самой начальной стадии – стадии накопления липидов в сосудистой стенке.

Конфликт интересов

Работа поддержана Министерством образования и науки России.

Список литературы

1. Anichkov N.N. *Particular pathological anatomy. Issue II. Heart and vessels. Second edition. Moscow – Leningrad: Medgiz; 1947. Russian (Аничков Н. Н. Частная патологическая анатомия. Вып. II. Сердце и сосуды. Второе издание. М. ; Л. : Медгиз, 1947).*
2. Smith E.B. *The relationship between plasma and tissue lipids in human atherosclerosis. Adv Lipid Res. 1974; 12: 1–49.*
3. Mabley R.W., Innerarity T.L., Weisgraber K.H., Oh S.Y. *Altered metabolism (in vivo and in vitro) of plasma lipoproteins after selective modification of lysine residues of apoproteins. J Clin Invest. 1979; 64: 743–50.*
4. Alaupovic P. *Apolipoproteins and lipoproteins. Atherosclerosis, 1971; 13 (2): 141–6.*
5. Cookson F.B. *The origin of foam cells in atherosclerosis. Br J Exp Pathol, Feb 1971; 52 (1): 62–9.*
6. Bates S.R., Wissler R.W. *Effect of hyperlipemic serum on cholesterol accumulation in monkey aortic medial cells. Biochim Biophys Acta. 1976; 450 (1): 78–88.*
7. Ross R., Harker L. *Hyperlipidemia and atherosclerosis. Science. 1976; 193: 1094–100.*

8. Goldstein J. L., Ho Y. K., Basu S. K. et al. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 333-7.
9. Fogelman A. M., Shechter I., Seager J. et al. Malondialdehyde Alteration of Low Density Lipoproteins Leads to Cholesteryl Ester Accumulation in Human Monocyte-Macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980; 77: 2214-18.
10. Khoo J. C., Miller E., McLoughlin P. et al. Prevention of low density lipoprotein aggregation by high density lipoprotein or apolipoprotein A-I. *J. Lipid Res.* 1990; 31: 645.
11. Lopes-Virella M.F., Klein R.L., Lyons T. J. et al. Glycosylation of low-density lipoprotein enhances cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages. *Diabetes*. 1988; 37: 550.
12. Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbasov Z. A. et al. Lipoprotein aggregation as an essential condition of intracellular lipid caused by modified low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 16: 489.
13. Talbot R.M., del Rio J.D., Weinberg P.D. Effect of fluid mechanical stresses and plasma constituents on aggregation of LDL. *Lipid Research*. 2003; 44: 837.
14. Tertov V.V., Kaplun V.V., Orekhov A.A. Low-density lipoprotein modification occurring in human plasma possible mechanism of in vivo lipoprotein desialylation as a primary step of atherogenic modification. *Atherosclerosis*. 1998; 138: 183-95.
15. Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A. et al. Multiple-modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterization. *Laboratory Investigation*. 1992; 67: 665-75.
16. Vinogradov S.V., Batrakova E.V., Li S. et al. Mixed polymer micelles of amphiphilic and cationic copolymers for delivery of antisense oligonucleotides. *J. Drug Target* 2004; 12: 517.
17. Batrakova E.V., Li S., Alakbov V.Y., Miller D.W. et al. Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells. *Farmacol. Exp. Ther.* 2003; 304: 845.
18. Sneek M., Nguyen S.D., Pibljajamaa T. et al. Conformational changes of apoB-100 in SMase-modified LDL mediate formation of large aggregates at acidic pH. *J Lipid Res.* 2012; 53 (9): 1832-9.
19. Deevska G.M., Sunkara M., Morris A.J. et al. Characterization of secretory sphingomyelinase activity, lipoprotein sphingolipid content and LDL aggregation in *ldlr*^{-/-} mice fed on a high-fat diet. *Biosci Rep.* 2012; 32 (5): 479-90.
20. Morita S.Y., Kawabe M., Nakano M. et al. Pluronic L81 affects the lipid particle sizes and apolipoprotein B conformation. *Chem Phys Lipids*. 2003; 126 (1): 39-48.
21. Moghimi S.M., Hunter A.C., Dadswell C.M. et al. Causative factors behind poloxamer 188 (Pluronic F68, Flocor)-induced complement activation in human sera. A protective role against poloxamer-mediated complement activation by elevated serum lipoprotein levels. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1689 (2): 103-13.