

Комплексная морфологическая оценка атеросклеротического повреждения аорт кроликов в эксперименте

Я. А. Гушчин, А. А. Мужикян, А. И. Селезнева, М. Н. Макарова

ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», ГП Кузьмоловский, Ленинградская область

Абстракт

Целью данного исследования было разработать комплексную морфологическую макро- и микроскопическую оценку состояния сосудов на модели атеросклероза у кроликов, выбрать оптимальные методы окраски, а также разработать критерии оценки, позволяющие судить о тяжести развившейся патологии.

Исследование было проведено на кроликах калифорнийской породы. Гиперхолестеринемия у животных вызывали пероральным введением холестерина совместно с инъекциями холекальциферола и адреналина. Для подтверждения развития патологии проводили измерение биохимических маркеров и вычисляли индекс атерогенности. На 60, 90 и 120 день исследования производили эвтаназию животных с извлечением аорты для ее морфологического исследования. Для комплексной оценки повреждения аорты были применены макро-скопический анализ площади поражения и методы гистологической окраски стандартными красителями. Степень повреждения аорты выражалась в баллах по заданным критериям.

Нам удалось добиться модели прогрессирования патологии как по показателям биохимических маркеров, так и по результатам морфологических исследований. Индекс атерогенности увеличился с 1 до 26 в течение 4 месяцев. При макроскопическом анализе обнаружено расширение атеросклеротического повреждения, которое к концу исследования достигало 84% от общей площади аорты. В ходе микроскопического анализа гистологических срезов аорты наблюдали все стадии атерогенеза от долипидной до стадии осложнений.

Таким образом, используемая модель позволила проследить стадии формирования и прогрессирования атеросклероза у экспериментальных кроликов калифорнийской породы. Предложенная нами комплексная система оценки дает возможность наглядно и объективно характеризовать развитие патологии, что обеспечивает достоверность и информативность проведенного исследования.

Ключевые слова: экспериментальный атеросклероз, гиперхолестеринемия, кролики, комплексная оценка.

Integrated morphological assessment of experimental atherosclerotic lesions in the rabbits aortas

J. A. Gushchin, A. A. Muzhikyan, A. I. Selezneva, M. N. Makarova

St. Petersburg institute of pharmacy. Vsevolozhskiy district, settlement Kuzmolovskiy, Russia

Abstract

The aim of this study was to develop integrated morphological macro- and microscopic evaluation of vascular lesions on the rabbits atherosclerosis model, to choose the optimal staining techniques, and to develop assessment criteria for evaluating severity of proceeding pathology.

The study was carried out on Californian rabbits. Hypercholesterolemia in animals was developed by cholesterol gavage, and cholecalciferol and adrenaline injection. Biochemical markers were measured and atherogenic index was calculated to confirm pathology.

Animals were euthanized on the 60, 90 and 120-th day of study. Aortas were extracted for morphological study. For a comprehensive evaluation of aorta injuries we performed macroscopic examination of lesion size and histological staining methods of the standard dyes. The degree of aortic lesions was expressed in points by the specified criteria.

We obtained the progression of disease model, confirmed by biochemical markers, and by results of morphological studies. Atherogenic index increased from 1 to 26 for 4 months.

Macroscopic analysis of aortas revealed atherosclerotic lesions expanded to 84% of the total area at the end of the study. During the microscopic analysis of aortic histological sections we observed all stages of atherogenesis: from pre-lipid phase to the complications stage.

Thus, this model allowed to trace the stages in the formation and progression of Californian rabbits atherosclerosis. The proposed comprehensive evaluation system makes possible to clearly and objectively characterize the pathology and ensures the reliability and informativity of the study.

Keywords: *atherosclerosis, inflammation, dendritic cells, chemokine CCL17.*

Введение

Несмотря на достижения в медицине и фармакологии проблема болезней сердечно-сосудистой системы по-прежнему остается актуальной и лидирующей в списке причин смертности [1]. Основными факторами, влияющими на возникновение и развитие патологии, считают гипертоническую болезнь, и прежде всего поражение эндотелия, обусловленное развитием атеросклероза.

Механизм развития атеросклероза многогранен, но наиболее значимым является гиперхолестеринемия. Впервые связь атерогенеза и нарушения липидного обмена доказали русские ученые Н.Н. Аничков и С.С. Халатов в 1913 году, позднее сформулировавшие комбинационную теорию патогенеза [2]. При последующем изучении многочисленных данных, включающих в себя результаты экспериментальных, эпидемиологических и клинических исследований, была подтверждена связь между развитием атеросклероза, заболеваемостью и смертностью от последствий ишемической болезни сердца и изменением липидного спектра крови [3].

Первые признаки атерогенеза обнаруживаются уже у детей 9–10 лет. К 25 годам эти признаки могут выявляться в виде желтых липидных полосок, захватывающих иногда до 30–50% площади интимы аорты. В 10–15-летнем возрасте липидные полоски можно обнаружить в коронарных артериях, а у большинства 30–40-летних людей они выявляются в сосудах мозга [4]. Атеросклероз характеризуется неуклонно прогрессирующим накоплением во внутренней оболочке (интима) артерий эластического и мышечно-эластического типов липопротеинов и компонентов крови, что сопровождается реактивным окружением их фиброзной тканью. В результате атеросклеротическое поражение приводит к сужению просвета артерий вплоть до полной облитерации их, что нарушает кровоснабжение органов и тканей. В стенке сосуда развиваются местные осложнения, такие как кальциноз, аневризмы, при тяжелом течении вероятны тромбоз и эмболия.

Главным местным выражением атеросклероза является атеросклеротическая бляшка, которая проходит три стадии: жировые полоски, атероматозные бляшки и осложненные поражения в виде изъязвления покрывки, ее разрыва и тромбоза.

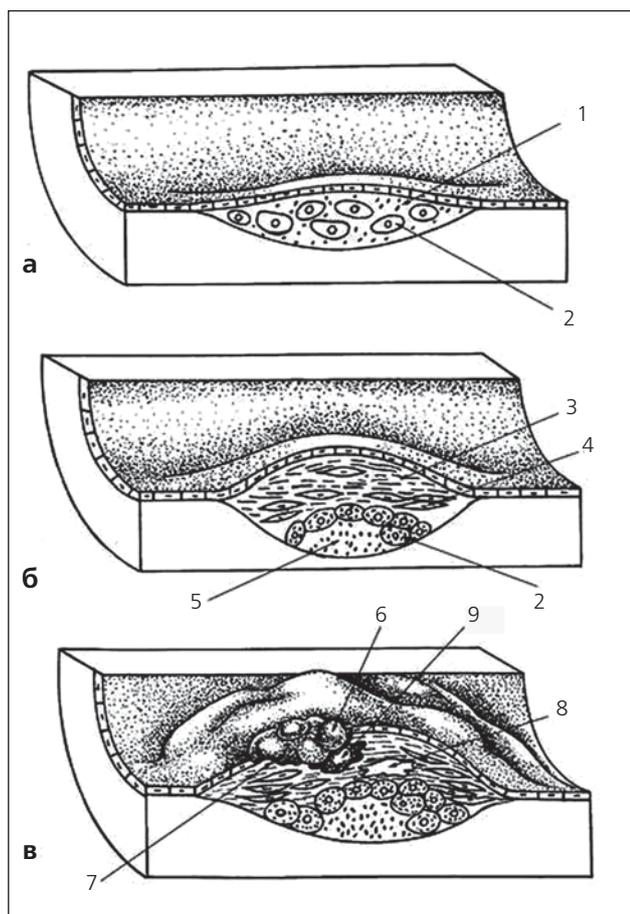
Жировые полоски или пятна считаются наиболее ранними проявлениями атеросклероза, их можно обнаружить у любого человека старше 10 лет. Они расположены неглубоко в стенке сосуда и не распространяются вглубь, таким образом, являясь локальным скоплением небольшого количества гладкомышечных клеток, макрофагов и тучных клеток с отложением липидов в клетках интимы (ксантомные или пенистые клетки) и во внеклеточном пространстве (рис. 1а), они характеризуются необструктивным повреждением интимы сосудов.

С течением времени, при повреждении сосудистой стенки, возникают фиброзные бляшки – возвышающиеся над поверхностью интимы округлые беловатые образования, склонные к слиянию в сплошные поля, в результате чего внутренняя поверхность сосуда приобретает неровный, бугристый вид. Здесь уже можно выявить классические компоненты фиброзной бляшки: гладкомышечные клетки, между которыми разрастаются коллагеновые, эластические волокна и гликозаминогликаны, а также откладываются липиды, как внутри клеток, так и во внеклеточном пространстве (рис. 1б). Комплекс элементов образует куполообразную фиброзную капсулу, покрывающую глубже расположенное ядро – остатки погибших клеток и внеклеточные отложения липидов.

Именно атеросклеротические бляшки являются причиной возникновения стадии осложнений, вследствие усиления клеточного некроза, кальцификации и слущивания покрывающего бляшку эндотелия с образованием пристеночного тромба или разрыва стенки с кровоизлиянием (рис. 1в). Впоследствии это приводит к сужению просвета сосуда – окклюзии, что влечет за собой переход в органную стадию заболевания за счет ухудшения кровоснабжения органов и тканей.

Исходя из важности проблемы атеросклероза, за последние сто лет было предложено множество экспериментальных моделей атерогенеза у лабораторных животных. Наилучшим объектом для моделирования атеросклероза являются кролики, поскольку за долгое время был хорошо изучен их метаболизм, морфологические и функциональные изменения стенки сосудов при развитии атерогенеза, а также их размер в полной мере позволяет визуализировать и оценивать повреждение интимы [5]. В отличие от них крысы менее

Рис. 1. Стадии образования атеросклеротических бляшек [5]



Примечание: 1 – межклеточные липиды; 2 – пенистые клетки; 3 – фиброзная капсула; 4 – гладкомышечные клетки; 5 – липидное ядро; 6 – тромб; 7 – изъязвление; 8 – кальцификация; 9 – кровоизлияние.

предпочтительны, поскольку имеют хорошую защиту от гиперхолестеринемии, одним из важных факторов которой является наличие мурихоловой кислоты, благодаря которой холестерин быстро выводится из организма [6].

Экспериментальные модели охватывают различные механизмы возникновения патологического процесса и позволяют всесторонне их изучить. Среди них можно выделить холестериновую, генетическую и перекисную модели атеросклероза [7]. Большая часть экспериментальных исследований включает в себя изучение изменяющихся биохимических показателей, основным из которых является липидный спектр, при этом отводя морфологической оценке второстепенную роль. Однако данные методы позволяют наглядно и достоверно проанализировать не столько функциональные, сколько тканевые и органые изменения в организме, проследить стадийность процесса.

Целью данного исследования было разработать комплексную морфологическую оценку макро- и микроскопического состояния сосудов на модели атеросклероза у кроликов, выбрать оптимальные

методы окраски и оценки, позволяющие судить о степени тяжести развившейся патологии и впоследствии адекватно и точно сравнить полученные данные.

Материалы и методы

В качестве индуктора патологии была выбрана модель гиперхолестеринемии у кроликов, включающая в себя основные патогенетические факторы атерогенеза.

Гиперхолестеринемия достигалась ежедневным пероральным введением масляного раствора холестерина в дозе 0,3 г/кг веса животного. Животные, кролики-самцы в количестве 24 головы, массой тела 2,5–3 кг, были получены из питомника лабораторных животных ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (16–20 °С и относительная влажность воздуха 50–70%). Кролики получали «Корм для содержания лабораторных животных» ПК-120-1, приготовленный по ГОСТ Р 50258 и воду ad libitum очищенную, нормированную на основании ГОСТ 51232-98.

Кролики были случайным образом распределены на 4 группы, по 6 животных в каждой группе: 1) интактная группа, 2) животные, получавшие холестерин на протяжении 60 дней, 3) животные, получавшие холестерин на протяжении 90 дней, 4) животные, получавшие холестерин на протяжении 120 дней.

Для усиления выраженности атерогенеза животным перорально на протяжении 30 дней вводили витамин D3 (холекальциферол) в дозе 5200 МЕ/кг и каждые 5 дней внутривенно вводили адреналин в дозе 0,04 мг/кг. Это позволило ускорить процесс проникновения липидов в сосудистую стенку [8, 9, 10] и внести фактор психоэмоционального напряжения, провоцируя развитие артериальной гипертензии [11], которая играет одну из ведущих ролей в патогенезе атерогенеза [5].

Для подтверждения развития патологии в ходе исследования производили забор крови животных и измерение биохимических маркеров. Определяли общий холестерин, липопротеины высокой плотности и липопротеины низкой плотности. Все биохимические исследования проведены ферментативными методами, с использованием наборов реагентов BioSystems, Испания. На основании определения ХС, ЛПНП и ЛПВП был вычислен индекс атерогенности согласно формуле: (общий ХС – α -холестерин)/ α -ХС.

Экспериментальные животные были эвтаназирваны на 60, 90 и 120 день исследования, а интактные животные на 120 день. После процедуры выделяли грудную и брюшную части аорты, которые в дальнейшем подвергались морфологическому исследованию. В комплекс оценки повреждения аорты были включены метод макроскопического анализа, при помощи красителя Oil Red O (Bio-Optica, Италия),

которым также окрашивали гистологические кри-осрезы толщиной 7–10 мкм, и методы гистологической обработки тканей с окраской стандартными красителями: гематоксилин-эозин и толуидиновый синий.

Для окраски масляным красным (Oil Red O) выделенные части аорты после фиксации в 10%-ном формалине погружали в краситель на 30 минут, затем промывали 70%-ным спиртом для дифференцировки цвета и 15 минут отмывали водой [12]. Готовые препараты фотографировали. По полученным фотографиям была рассчитана площадь окрашенной «красной области» с помощью компьютерной системы морфометрии «ВидеоТест» Размер 5.0 (Россия).

Для гистологического анализа наиболее измененная часть аорты была зафиксирована в 10%-ном нейтральном забуференном формалине в течение 1 дня, после чего была произведена стандартная гистологическая проводка [13], полученные срезы аорты были окрашены гематоксилином-эозином и толуидиновым синим и исследованы световой микроскопией. Гематоксилин-эозин, являясь базовым красителем, не позволяет в полной мере оценить происходящие патологические изменения в интиме аорты на ранних стадиях атерогенеза. Использование других окрасок, например, толуидинового синего или масляного красного, позволяет детализировать повреждения в интиме сосудов. Так, толуидиновый синий проявляет свойство метахромазии при контакте с кислыми гликозамигликанами, накапливающимися при дезорганизации соединительной ткани в виде мукоидного набухания в интиме сосудов [2], придавая поврежденным структурам сиреневый цвет [2]. Oil Red O, являясь красителем группы суданов, окрашивает жиры в красный цвет, тем самым помогая выявлять жировые включения даже в незначительных количествах [2].

Статистический анализ полученных данных осуществляли при помощи программы Statistica 6.0 (StatSoft, Россия).

Результаты исследования

При анализе биохимических показателей (индекса атерогенности) выявлено прогрессирование патологии с течением времени, что выражалось в увеличении значения индекса атерогенности от 0 дня к 120 дню исследования (табл. 1).

Индекс атерогенности резко возрастал в первые 30 дней исследования, к 60 дню исследования его значения достигали максимальных значений и в последующие дни не изменялись.

Для макроскопической визуализации атеросклеротических бляшек использовали окраску Oil Red O грудной и брюшной частей аорты. При исследовании материала, забранного на разных сроках исследования можно было проследить динамическое развитие патологического процесса.

У животных без патологии внутренняя поверхность аорты гладкая блестящая, цвета слоновой кости, без зон прокрашивания красным красителем (рис. 2). На 60 день исследования можно было наблюдать появление отдельных округлых или вытянутых бляшек, которые выступали над поверхностью аорты и интенсивно окрашивались Oil Red O (рис. 3). В дальнейшем отдельные бляшки сливались вместе, образуя крупные поля (рис. 4). К 120 дню исследования почти вся поверхность аорты была изменена: поверхность бугристая, деформирована, эластичность снижена. Можно было наблюдать атероматоз и кальциноз (рис. 5).

При последующей обработке фотографий было рассчитано отношение пораженной площади аорты ко всей поверхности. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 1. Изменение индекса атерогенности в группах

№ группы	Характеристика группы	N	День исследования				
			0	30	60	90	120
1	Интактная группа	6	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2
2	Животные, получавшие холестерин на протяжении 60 дней	6	1,3 ± 0,2	16,2 ± 3,5*	22,2 ± 2,3*	–	–
3	Животные, получавшие холестерин на протяжении 90 дней	6	1,3 ± 0,3	16,1 ± 2,1*	22,6 ± 2,5*	23,0 ± 3,7*	–
4	Животные, получавшие холестерин на протяжении 120 дней	6	1,3 ± 0,2	17,3 ± 4,2*	25,3 ± 3,5*	23,1 ± 4,1*	26,1 ± 6,2*

Примечание: * Достоверное отличие от интактной группы ($F_{12,80}=3,56, p=0,00029$).

Рис. 2. Грудная часть интактной аорты без признаков атерогенеза. Красным окрашена адвентиция сосуда и парааортальная жировая клетчатка



Рис. 3. Грудная часть аорты животных на 60 день исследования. Немногочисленные атеросклеротические бляшки в интимае (стрелки)

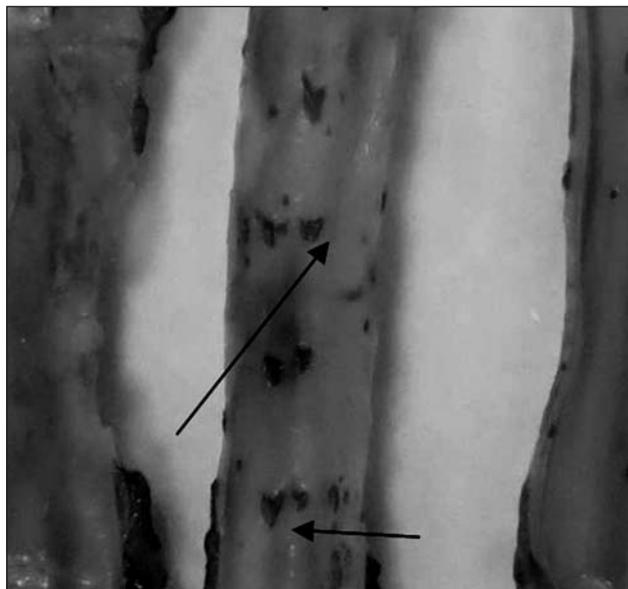
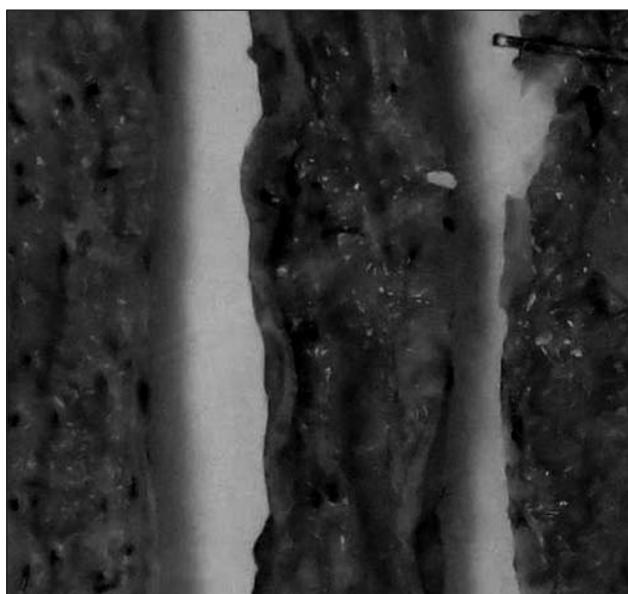


Рис. 4. Грудная и брюшная части аорты животных на 90 день исследования. Атеросклеротические бляшки сливаются вместе



Рис. 5. Грудная и брюшная части аорты животных на 120 день исследования. Деформированная бугристая аорта с участками атероматоза и кальциноза



Полученные данные отражают развитие атерогенного поражения аорты у кроликов на протяжении 120 дней. При микроскопическом исследовании можно было наблюдать стадийность образования атеросклеротических бляшек. При этом на поздних сроках развития патологии все стадии можно было наблюдать одновременно. Поэтому у каждого животного для анализа выбирались участки аорт с наиболее ярко выраженными изменениями.

Для оценки выраженности атерогенеза была предложена балльная система, отражающая стадийность

процесса: долипидная стадия – 1 балл, липоидоз – 2 балла, кальциноз – 3 балла. На основании гистологического исследования максимально измененного участка грудной или брюшной части аорты каждому животному присваивался соответствующий балл, которые затем суммировались. Это упрощало дальнейший анализ и позволило сопоставить полученные данные. В табл. 3 представлены результаты исследования, выраженные в баллах.

Как описывалось выше, при микроскопическом исследовании было использовано 3 типа окраски:

Таблица 2. Процент атеросклеротической бляшки аорты у животных, N = 6, M ± SEM

группы	Характеристика группы	Процент атеросклеротической бляшки от всей площади участка аорты
1	Интактная группа	0
2	Животные, получавшие холестерин на протяжении 60 дней	26 ± 5*
3	Животные, получавшие холестерин на протяжении 90 дней	57 ± 4*
4	Животные, получавшие холестерин на протяжении 120 дней	84 ± 4*

Примечание: * Достоверное отличие от интактной группы ($F_{3,20}=93,76, p<0,0001$).

Таблица 3. Степень выраженности атеросклероза аорты у животных

№ группы	Характеристика группы	N	Степень поражения аорты, сумма баллов
1	Интактная группа	6	0
2	Животные, получавшие холестерин на протяжении 60 дней	6	12
3	Животные, получавшие холестерин на протяжении 90 дней	6	19
4	Животные, получавшие холестерин на протяжении 120 дней	6	27

гематоксилин-эозин (ГЭ), толуидиновый синий и окраска Oil Red O. В результате можно было проследить патологические процессы, протекающие в ходе прогрессирования атеросклероза.

У животных интактной группы (рис. 6) стенка аорты представлена тремя оболочками: внутренней (интимой), средней (медией) и наружной (адвентицией). Интима образована эндотелием и субэндотелиальным слоем из рыхлой соединительной ткани. Ядра эндотелиоцитов уплощенные. В составе средней оболочки видны тонкие тяжи гладких мышечных клеток, разделенных толстыми эластическими мембранами. Адвентиция представлена рыхлой соединительной тканью, в которой проходят сосуды. При окраске толуидиновым синим волокна окрашены равномерно в синий цвет (рис. 7). При применении Oil Red O жировые включения в стенке аорты интактных кроликов не были обнаружены (рис. 8).

При изучении стадий атерогенеза применение различных окрасок позволило наблюдать долипидную стадию, стадию липоидоза, липосклероза и кальциноза.

Долипидная стадия (рис. 9) характеризовалась развитием дезорганизации соединительной ткани в виде мукоидного набухания коллагеновых волокон с накоплением кислых глюкозамингликанов,

в результате при применении толуидинового синего волокна окрашивались в сиреневый цвет. Кроме того, наблюдались отек и повреждение эндотелия с пролиферацией гладкомышечных клеток.

Дальнейшая инфильтрация интимы аорты липидами и липопротеидами приводила к развитию стадии липоидоза (макроскопически стадия жировых (липидных) пятен и полос). Микроскопически в гладкомышечных клетках и макрофагах выявляются липиды. При этом в ходе стандартной проводки через спирты нарастающей концентрации жиры вымываются и макрофаги приобретают пенный вид, а при окраске криосрезом на жиры (Oil Red O) в эндотелии можно наблюдать окрашенные липидные включения и ксантомные клетки (макрофаги, содержащие поглощенные липиды) (рис. 10–12).

Выраженность следующей стадии (липосклероза) не соответствовала естественному течению патологического процесса в клинической практике [2], поскольку введение экзогенного холестерина и витамина D3 приводило к дополнительному повреждению эндотелия и ускорению атерогенеза, однако времени для формирования полноценной соединительной ткани было недостаточно. Поэтому следующим ярким проявлением стало отложение кальция в атеросклеротических бляшках (рис. 13–15). Реактивное разрастание соединительной

Рис. 6. Срез аорты кролика. Без патологии.
Ув. 100. Окраска ГЭ

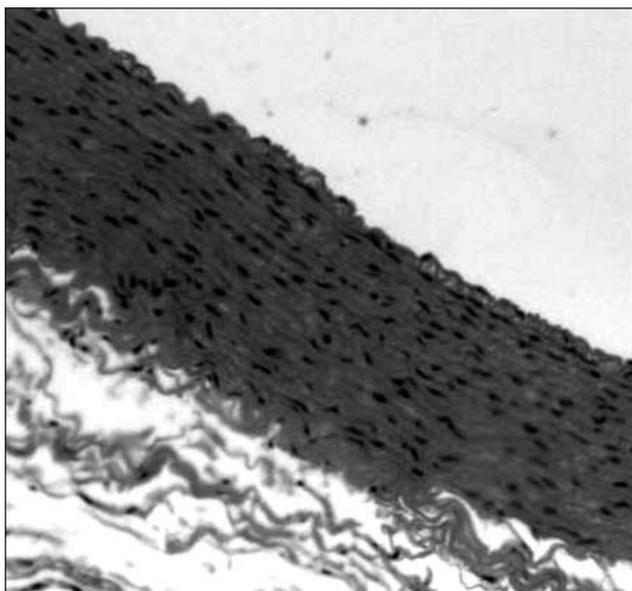


Рис. 7. Срез аорты кролика. Без патологии.
Ув. 100. Окраска толуидиновым синим

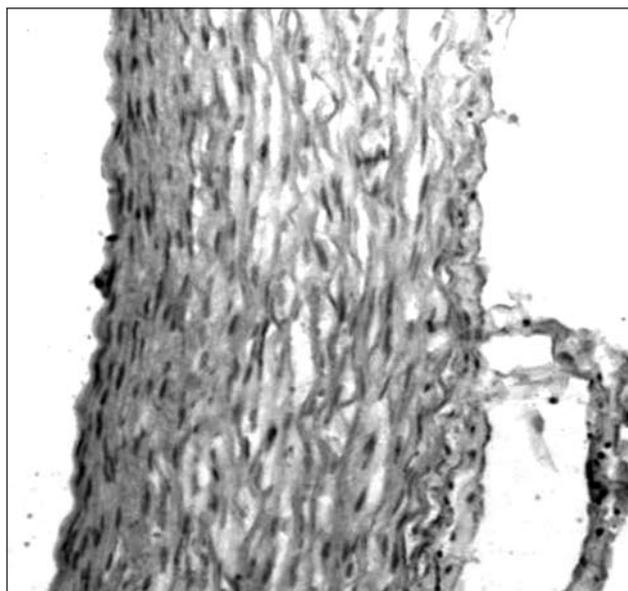


Рис. 8. Срез аорты кролика. Без патологии.
Ув. 200. Окраска Oil Red O

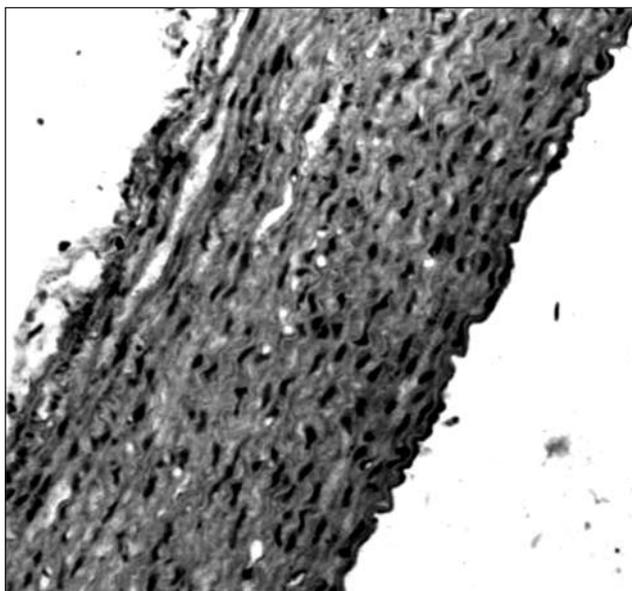
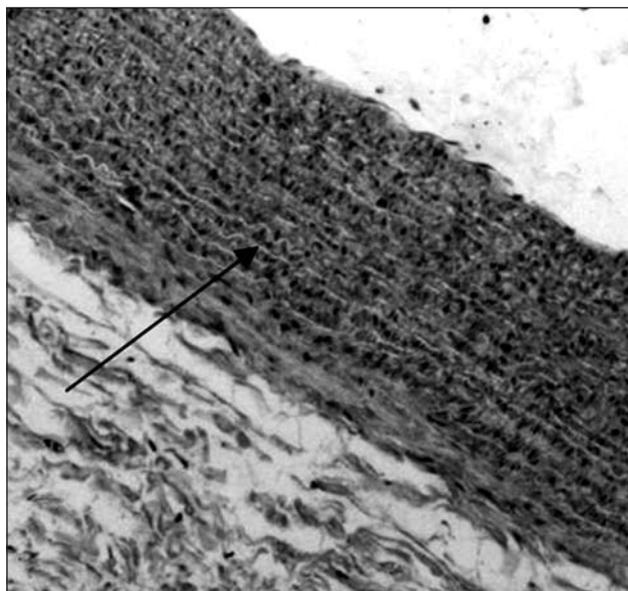


Рис. 9. Срез аорты кролика. Дезорганизованная соединительная ткань (↑) окрашивается сиреневым цветом. Ув. 100 Окраска толуидиновым синим



ткани вокруг очага петрификации формировало покрышку бляшки, в ядре которой выявлены липиды и ксантомные клетки.

По литературным данным, сроки развития атеросклеротических изменений очень вариабельны и зависят от использованных факторов атерогенеза. Также чрезвычайно разнятся сроки наблюдения. Например, при применении только гиперхолестериновой диеты первые признаки поражения интимы можно выявить через 3 недели [14] и наблюдать развитие атерогенеза на протяжении 3 месяцев [15], при этом выраженное формирование бляшки

фиксируется через 1–2 месяца [12, 13]. Введение холекальциферола приводит к развитию кальциноза аорты за 3 месяца [8, 9] и оссификации клапанов аорты за 12 недель [16]. Таким образом, несмотря на разнообразие методик сроки развития экспериментального атеросклероза примерно одинаковы: начальные проявления фиксируются через 3–4 недели от индукции патологии и достигают выраженных проявлений к 3 месяцам. Дополнительное введение повреждающих факторов, таких как витамин Д3 и адреналин, значительно ускоряет процесс.

Рис. 10. Срез аорты кролика. Без патологии.
Ув. 100. Окраска ГЭ

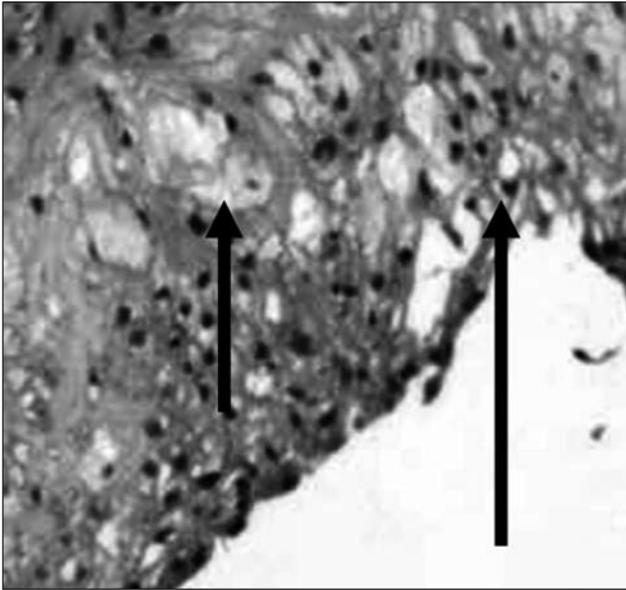


Рис. 11. Срез аорты кролика. Без патологии.
Ув. 100. Окраска толуидиновым синим

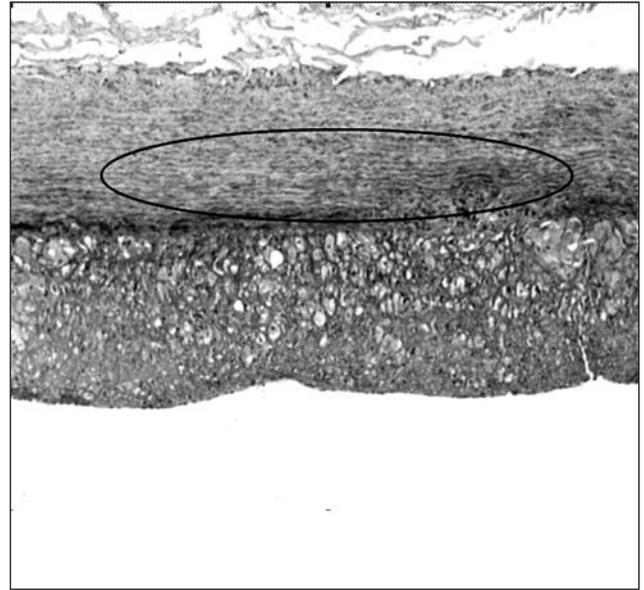


Рис. 12. Срез аорты кролика. Без патологии.
Ув. 200. Окраска Oil Red O

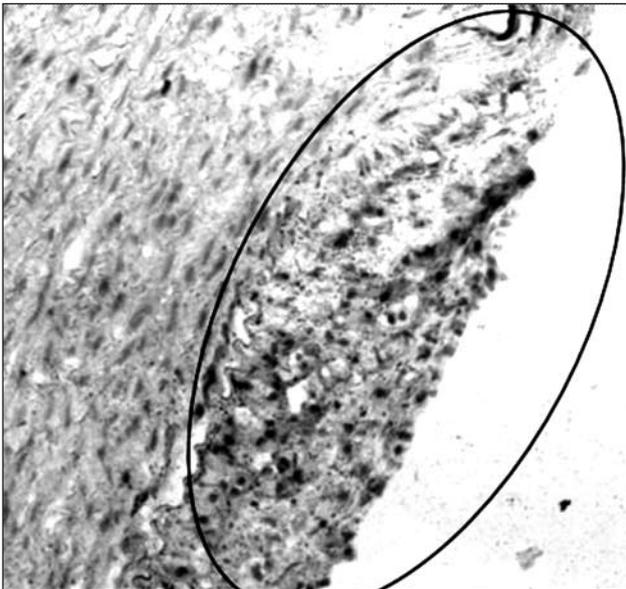
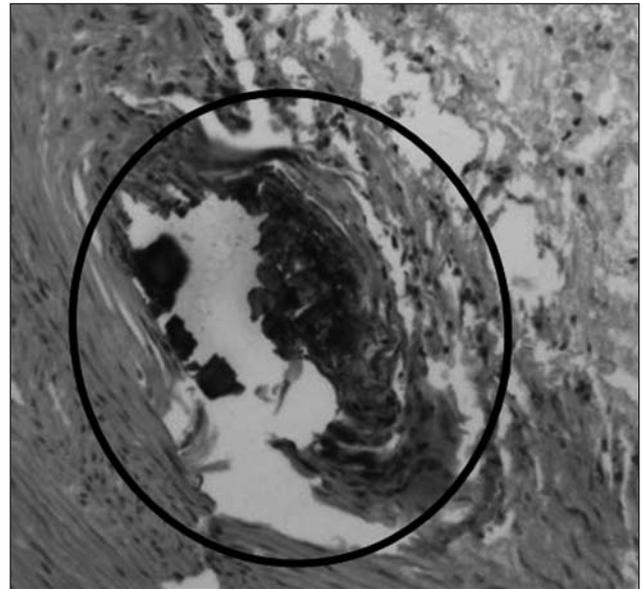


Рис. 13. Срез аорты кролика. Крупная атеросклеротическая бляшка с отложениями солей кальция в ядре (область) и разрастанием соединительной ткани ((↑)) Ув. 100. Окраска ГЭ.



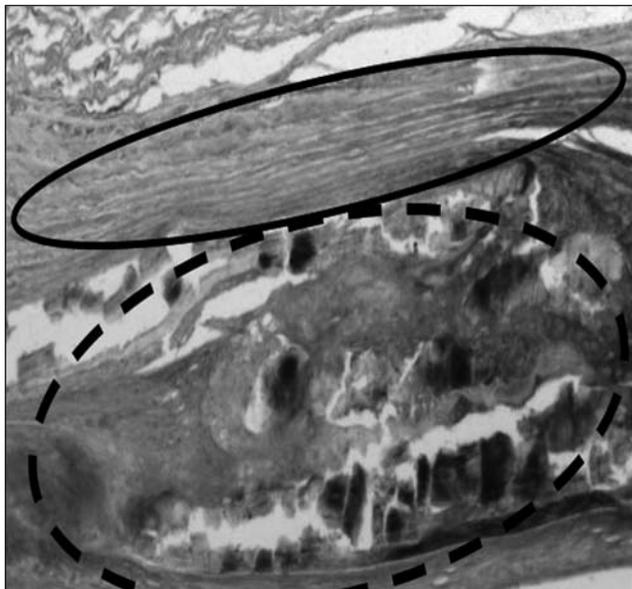
Выводы

Для выявления, изучения и анализа степени атеросклеротического поражения в эксперименте были использованы широко известные методики, объединение которых в единый комплекс позволило не только выявить, но и оценить все стадии патологического процесса в динамике. Редко используемая, но простая в исполнении методика окраски аорт красителем Oil Red показала себя как один из самых информативных способов выявления атеросклеротического поражения уже

на стадии желтых полосок и пятен, а также пригодна для подсчета площади поражения.

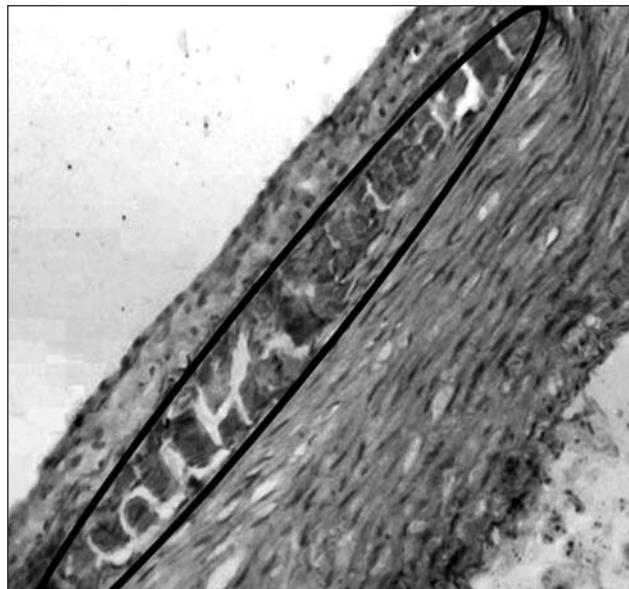
При микроскопическом изучении, помимо стандартной методики окраски гематоксилином-эозином, применялось окрашивание толуидиновым синим, использование которого дает возможность проследить начальные повреждения соединительной ткани. Совместное использование этих окрасок с применением бальной системы дает возможность сравнивать группы животных между собой, что повышает достоверность и информативность проведенного исследования.

Рис. 14. Срез аорты кролика. Кальциноз, дезорганизация соединительной ткани (область) и кальциноз (прерывистая область). Ув. 100. Окраска толуидиновым синим



В результате применения нескольких факторов атерогенеза (холестерин, витамин D3, адреналин) у экспериментальных животных быстро развился патологический процесс, что в ходе исследования подтверждалось изменением биохимических показателей, а также данными макро- и микроскопического исследования аорт, забранных на 60, 90 и 120 день от начала эксперимента. Выбранные временные точки позволили проследить начало формирования и прогрессирование атеросклероза в грудной и брюшной части аорты кроликов.

Рис. 15. Срез аорты кролика. Отложения липидов (окрашиваются красным) и кальциноз ядра (область). Ув. 200. Окраска Oil Red O



Полученные данные могут быть применены при планировании исследования, выборе длительности наблюдения в зависимости от поставленных задач и характеристики применяемых лекарственных веществ.

Конфликт интересов

Работа выполнена на базе ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации». Конфликт интересов отсутствует.

Список литературы

1. *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Policies, strategies and interventions // World Health Organization; World Stroke Organization. 2011:164.*
2. *Anichkov NM, Paltsev MA. Pathological anatomy: a textbook. In two volumes. M.: Medicine. 2001:1944. Russian (Аничков НМ, Пальцев МА. Патологическая анатомия: учебник. В двух томах. М.: Медицина, 2001:1944).*
3. *Aronov DM. Treatment and prevention of atherosclerosis, Moscow: Triada-X; 2000: 411. Russian (Аронов ДМ. Лечение и профилактика атеросклероза. М.: Триада-Х; 2000:411).*
4. *Litvitsky PF. Clinical Pathophysiology: the textbook. M.: Practical Medicine; 2015:776. Russian (Литвицкий ПФ. Клиническая патофизиология: учебник М.: Практическая медицина; 2015:776).*
5. *Karpov RS, Dudko VA. Atherosclerosis: pathogenesis, clinical and functional diagnosis and treatment. Tomsk: STT; 1998:672. Russian (Карпов РС, Дудко ВА. Атеросклероз: патогенез, клиника, функциональная диагностика, лечение. Томск: STT; 1998:672).*
6. *Makarova MN, Rybakova AD, Gushchin YA, Shedko VV, Muzbikyan AA, Makarov VG. Anatomical and physiological characteristics of digestive tract in humans and laboratory animals. International Bulletin of Veterinary Medicine. 2016;1:82-104. Russian (Макарова МН, Рыбакова АВ, Гушчин ЯА, Шедько ВВ, Мужижян АА, Макаров ВГ. Анатомофизиологическая характеристика пищеварительного тракта у человека и лабораторных животных. Международный вестник ветеринарии. 2016;1:82-104.)*



7. Kalinkin MN, Volkov VS, Zavarin VV. *Atherosclerosis: pathophysiology, treatment, primary prevention*. Tver: RIC Tver State Medical Academy; 2009:215. Russian (Калинкин МН, Волков ВС, Заварин ВВ. *Атеросклероз: патофизиология, лечение, первичная профилактика*. Тверь: РИЦТГМА; 2009:215).
 8. Toda T, Ito M, Toda Y, Smith T, Kummerow F. *Angiotoxicity in swine of a moderate excess of dietary vitamin D₃*. *Food Chem Toxicol*. 1985;23:585-92.
 9. Toda T, Leszczynski DE, Kummerow FA. *The role of 25-hydroxyvitamin D₃ in the induction of atherosclerosis in swine and rabbit by hypervitaminosis D*. *Acta Pathol Jpn*. 1983;33:37-44.
 10. Drolet MC, Arsenault M, Couet J. *Experimental aortic valve stenosis in rabbits*. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;41(7):1211-7.
 11. Bübler FR, Bolli P, Hultbén UL, Amann FW, Kiowski W. *Alpha-adrenoceptors, adrenaline, and exaggerated vasoconstrictor response to stress in essential hypertension*. *Chest*. 1983;83(2):304-6.
 12. Numari JJ, Zand T, Joris I, Majno G. *Quantitation of oil red O staining of the aorta in hypercholesterolemic rats*. *Exp Mol Pathol*. 1989; 51(1):1-8.
 13. Muzbikyan AA, Makarova MN, Gushchin YA. *Features histological processing of organs and tissues of laboratory animals*. *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2014;2:103-9. Russian (Мужикян АА, Макарова МН, Гущин ЯА. *Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных*. *Международный вестник ветеринарии*. 2014;2:103-9).
 14. Dornas WC, Oliveira TT, Augusto LE, Nagem TJ. *Experimental atherosclerosis in rabbits*. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2010;95(2):272-8.
 15. Yanni AE. *The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research*. *Lab Anim*. 2004;38:246-56.
 16. Drolet MC, Arsenault M, Couet J. *Experimental aortic valve stenosis in rabbits*. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1211-7.
-