

## РАЗДЕЛ – ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ PART – SCIENTIFIC REVIEWS

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ АТЕРОСКЛЕРОЗА НА КРОЛИКАХ

<sup>1,2</sup>Чаулин А.М., <sup>1</sup>Григорьева Ю.В., <sup>1</sup>Суворова Г.Н., <sup>1,2</sup>Дупляков Д.В.

<sup>1</sup>Самарский государственный медицинский университет, <sup>2</sup>Самарский областной клинический кардиологический диспансер имени В.П. Полякова, Самара, Россия, e-mail: alekseymichailovich22976@gmail.com

### EXPERIMENTAL MODELS OF THE ATHEROSCLEROSIS ON RABBITS

<sup>1,2</sup>Chaulin AM, <sup>1</sup>Grigorieva YuV, <sup>1</sup>Suvorova GN, <sup>1,2</sup>Duplyakov DV

<sup>1</sup>Samara State Medical University, <sup>2</sup>Polyakov Samara Regional Clinical Cardiology Dispensary, Samara, Russia, e-mail: alekseymichailovich22976@gmail.com

#### Для цитирования:

Чаулин А.М., Григорьева Ю.В., Суворова Г.Н., Дупляков Д.В. Экспериментальные модели атеросклероза на кроликах// Морфологические ведомости.- 2020.- Том 28.- № 4.- С. 78-87. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28\(4\):461](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28(4):461)

#### For the citation:

Chaulin AM, Grigorieva YuV, Suvorova GN, Duplyakov DV. Experimental models of the atherosclerosis on rabbits. Morfologicheskie Vedomosti – Morphological Newsletter. 2020;28(4):78-87. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28\(4\):461](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28(4):461)

**Резюме.** Атеросклероз является главной причиной сердечно-сосудистых заболеваний, которые, несмотря на ряд новых достижений в их диагностике и лечении, по-прежнему занимают лидирующие позиции. Важную роль в изучении фундаментальных патофизиологических процессов и патоморфологии атеросклероза играет экспериментальное моделирование атеросклероза на лабораторных животных. Кролики являются одними из наиболее приемлемых животных для моделирования атеросклероза, поскольку широко доступны, недороги в содержании и удобны для проведения манипуляций. Ключевое преимущество кроликов перед остальными животными заключается в том, что метаболизм липидов у них практически сходен с таковым у человека. Цель исследования – анализ данных литературы по экспериментальным моделям атеросклероза на кроликах. В обзоре показано, что история изучения атеросклероза посредством экспериментальных моделей весьма насыщена и берет свое начало с работ известных отечественных врачей-патологов А.И. Игнатовского, Н.Н. Аничкова, С.С. Халатова (1908-1915), которые разработали холестериную модель формирования атеросклероза на кроликах. Принцип данной модели заключается в кормлении лабораторных животных пищей, содержащей повышенные уровни липидов и холестерина. Состав холестериновой (атерогенной) диеты может различаться, определяя существование модификаций данной модели. Чаще всего используют диету с содержанием холестерина 0,3-0,5%, в случаях, когда необходимо ускорить развитие атеросклероза допускается непродолжительное применение диеты с 1%-ным содержанием холестерина. Помимо холестерина в составе атерогенной диеты рекомендуется использовать растительные масла (соевое, кокосовое или кукурузное), поскольку они улучшают абсорбцию холестерина в кишечнике. В 1980 году японский исследователь Y. Watanabe вывел новую модель формирования атеросклероза – на наследственно обусловленных гиперлипидемических кроликах Ватанабэ (WHHL-кролики). WHHL-кролики содержат генетическую мутацию в гене, кодирующем рецепторы липопротеинов низкой плотности, в результате чего эти животные имеют высокий уровень холестерина в плазме крови при обычном рационе питания. Благодаря современным генетическим технологиям были также созданы различные генетические модели атеросклероза на кроликах: трансгенные и «нокаутированные» кролики. Основным методом получения трансгенных кроликов является пронуCLEARная микроинъекция, позволяющая внедрить в их геном трансген (дополнительный фрагмент ДНК). К настоящему времени при помощи этой технологии удалось внедрить более десятка генов, ответственных за метаболизм липидов. Принцип создания «нокаутированных» кроликов заключается в специфической инактивации при помощи технологий редактирования генома (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9) определенного рабочего гена. Экспериментальные модели атеросклероза на кроликах не утратили своего значения и по-прежнему продолжают использоваться для изучения фундаментальных морфологических (патоморфологических) и патологических механизмов, лежащих в основе атеросклероза, поиска новых диагностических биомаркеров и потенциальных мишеней для терапевтического воздействия, а также при проведении доклинических испытаний вновь разработанных препаратов.

**Ключевые слова:** атеросклероз, лабораторные модели, кролики, сердечно-сосудистые заболевания, патология, патофизиология

**Summary.** Atherosclerosis is the main cause of cardiovascular diseases, which, despite a number of new advances in their diagnosis and treatment, still occupy a leading position. Experimental modeling of atherosclerosis in laboratory animals plays an important role in the study of the fundamental pathophysiological processes and pathology of atherosclerosis. Rabbits are among the most suitable animals for simulating atherosclerosis, as they are widely available, inexpensive to maintain, and easy to manipulate. The key advantage of rabbits over other animals is that their lipid metabolism is practically similar to that of humans. The aim of the study was to analyze literature data on experimental

models of atherosclerosis in rabbits. The review shows that the history of the study of atherosclerosis by means of experimental models is very rich and originates from the works of the well-known Russian pathologists A.I. Ignatovsky, N.N. Anichkov, S.S. Khalatov (1908-1915), who developed a cholesterol model of the formation of atherosclerosis in rabbits. The principle of this model is to feed laboratory animals with food containing elevated levels of lipids and cholesterol. The composition of the cholesterol (atherogenic) diet may vary, determining the existence of modifications of this model. Most often, a diet with a cholesterol content of 0.3-0.5% is used, in cases where it is necessary to accelerate the development of atherosclerosis, a short-term use of a diet with a 1% cholesterol content is allowed. In addition to cholesterol, it is recommended to use vegetable oils (soybean, coconut or corn) in the atherogenic diet as they improve the absorption of cholesterol in the intestine. In 1980, Japanese researcher Y. Watanabe deduced a new model of atherosclerosis formation - on hereditarily determined hyperlipidemic rabbits Watanabe (WHHL-rabbits). WHHL rabbits contain a genetic mutation in the gene encoding low-density lipoprotein receptors, which results in these animals having high plasma cholesterol levels with a normal diet. Thanks to modern genetic technologies, various genetic models of atherosclerosis in rabbits have also been created: transgenic and "knocked out" rabbits. The main method for obtaining transgenic rabbits is pronuclear microinjection, which allows the introduction of a transgene (additional DNA fragment) into their genome. To date, using this technology, it has been possible to introduce more than a dozen genes responsible for lipid metabolism. The principle of creating knocked out rabbits consists in specific inactivation using genome editing technologies (ZFN, TALEN, CRISPR / Cas9) of a certain working gene. Experimental models of atherosclerosis in rabbits have not lost their significance and continue to be used to study the fundamental morphological (pathological) and pathological mechanisms underlying atherosclerosis, to search for new diagnostic biomarkers and potential targets for therapeutic effects, as well as to conduct preclinical trials of newly developed drugs.

**Key words:** *atherosclerosis, laboratory models, rabbits, cardiovascular diseases, pathology, pathophysiology*

**Введение.** Атеросклероз является главной причиной сердечно-сосудистых заболеваний - ишемической болезни сердца, цереброваскулярных болезней, заболеваний периферических артерий, которые по-прежнему занимают лидирующие позиции по частоте встречаемости, смертности и инвалидизации населения во всем мире [1-3]. Это создает необходимость дальнейших исследований по изучению патофизиологии и патоморфологии атеросклероза с целью поиска новых диагностических биомаркеров и новых мишеней для создания более эффективных препаратов [2, 4-6]. Ведущую роль в изучении атеросклероза продолжают играть экспериментальные доклинические модели, которые позволяют создавать основные условия для его развития. Одним из таких условий является гиперхолестеринемия.

Холестерин является гидрофобной молекулой, которая в плазме крови присутствует в комплексе с простыми белками (апопротеинами), формируя сложные белки - липопротеины. Лабораторный показатель – общий холестерин (далее - ОХ) в плазме крови – включает в себя суммарную концентрацию холестерина, содержащуюся во всех классах липопротеинов. Среди липопротеинов наиболее важную роль в патофизиологии и патоморфологии атеросклероза играют обладающие атерогенными свойствами липопротеины низкой плотности (далее - ЛПНП) и липопротеины очень низкой плотности (далее - ЛПОНП). В свою очередь, липопротеины высокой плотности (далее - ЛПВП), напротив, имеют противоатерогенные свойства [6-7].

Основными критериями «идеальной» модели атеросклероза на лабораторных животных являются: небольшая стоимость содержания, широкая доступность, размер животного для выполнения необходимых манипуляций. Еще одним важным критерием для подбора экспериментальной животной модели является наличие сходства в обмене липидов с людьми, поскольку данный фактор оказывает значимое влияние на патофизиологию и патоморфологию атеросклероза [8-9]. Идеальной модели атеросклероза, соответствующей всем этим требованиям, не существует, поэтому для изучения различных аспектов атеросклероза было предложено немало различных экспериментальных моделей с использованием различных видов животных [9-10]. Кролики были первыми животными, использованными для моделирования атеросклероза, и до настоящего времени считаются одним из лучших объектов для изучения патофизиологии и патоморфологии атеросклероза, проведения доклинических исследований эффективности и безопасности лекарственных гиполипидемических, противоатеросклеротических препаратов.

Метаболизм липидов у кроликов во многом сходен с метаболизмом липидов у человека, что делает их весьма подходящими животными для экспериментальных исследований. Их типичный ежедневный рацион включает около 15% белка, 40-50%

углеводов, 2% растительных жиров и 15-25% клетчатки от массы тела. Содержание холестерина в обычном рационе кроликов составляет менее 0,01%. На таком рационе концентрация ОХ в плазме крови составляет 30-65 мг/дл, при этом у молодых кроликов (< 3 кг массы тела) уровень ОХ ближе к верхней части данного диапазона [11]. Также, обнаружено, что уровни ОХ у кроликов имеют половые особенности, в плазме крови самок концентрация холестерина выше, чем у самцов. С возрастом у самцов уровень холестерина уменьшается, тогда как у самок он остается неизменным. Кроме того, уровень холестерина у самок обнаруживает более сильную сезонную периодичность, также он ниже у беременных и кормящих животных, чем у небеременных и некормящих [12]. Из-за этих особенностей, которые формируются предположительно под влиянием гормонов эстрогенов, самцы кроликов используются для исследований в области атеросклероза намного чаще. У кроликов, состоящих на обычной диете около половины ОХ плазмы крови находится в составе ЛПВП, при переходе на холестериновую диету более 90% холестерина оказывается в составе атерогенных частиц – ЛПНП и ЛПОНП [12-13].

Обнаружено, что кролики обладают высокой активностью белка-переносчика эфиров холестерина в плазме (далее - СЕТР), который играет важную роль в регуляции метаболизма холестерина – осуществляет перенос эфиров холестерина с неатерогенных частиц (ЛПВП) на атерогенные (ЛПНП и их предшественники). Концентрация СЕТР положительно коррелирует с концентрацией ЛПНП и степенью атеросклероза коронарных артерий и отрицательно с уровнями ЛПВП [13-14]. Мыши и крысы в норме не имеют СЕТР в плазме, что является одним из факторов их повышенной устойчивости к атеросклерозу, но введение им СЕТР путем инъекции или трансгенеза изменяет соотношение атерогенных и неатерогенных липопротеинов, способствуя увеличению риска развития атеросклероза [13, 15].

В состав ЛПНП входит белок апопротеин В (далее - апоВ), выполняющий две основные функции: транспортную, распознавание и связывание с рецепторами липопротеинов низкой плотности (р-ЛПНП), расположенными на поверхности практически всех клеток организма человека. В зависимости от активности редактирования матричной РНК образуется две формы апоВ: апоВ-100 (образуется в печени) и апоВ-48 (образуется в кишечнике). Образование апоВ-48 в клетках кишечника связано в том, что первичный транскрипт матричной РНК изменяется таким образом, что примерно в середине молекулы возникает стоп-кодон, прекращающий трансляцию белка апоВ-100. В результате чего образуется белок, длина которого составляет 48% от длины апоВ-100, в связи с чем ему и было дано название апоВ-48. У кроликов также, как и у человека, активность редактирования матричной РНК апоВ в печени минимальна или отсутствует, поэтому в гепатоцитах образуется только апоВ-100. А у мышей активность редактирования матричной РНК апоВ высокая, поэтому в печени наряду с апоВ-100 также продуцируется апоВ-48. В связи с этим мышинные ЛПОНП и ЛПНП, образующиеся в печени, содержат и апоВ-100, и апоВ-48. Сообщается, что апоВ-48-содержащие частицы катаболизируются быстрее, чем апоВ-100-содержащие частицы [16], что может частично объяснить, почему большинство мышей дикого типа устойчивы к холестериновой диете Аничкова.

**Диетическая (холестериновая) модель атеросклероза.** Диетическая модель формирования атеросклероза у кроликов имеет богатую историю. Впервые она была разработана и предложена отечественными патологами А.И. Игнатовским, Н.Н. Аничковым и С.С. Халатовым для изучения этиопатогенеза атеросклероза [17-21]. Исследователи обнаружили, что в ответ на холестериновую диету у кроликов развиваются выраженные атеросклеротические поражения сосудов, напоминающие таковые у человека, постепенно ведущие к закупорке просвета сосудистого русла и соответствующей клинической картине. В результате экспериментов отечественные исследователи пришли к выводу о том, что избыток холестерина в пище является главной причиной атеросклероза и сформулировали липидную гипотезу его развития [18-21]. Однако, данная липидная гипотеза не была принята другими исследователями, поскольку результаты исследования, полученные на кроликах, не были воспроизводимыми, на некоторых других животных холестериновая

диета не вызвала атеросклероза [21-22]. В последующем, благодаря открытиям в области физиологии и биохимии, были обнаружены значительные межвидовые особенности обмена липидов. Так, например, объяснением повышенной устойчивости мышей к атеросклерозу, служит необычайно высокая концентрация ЛПВП в плазме крови, а также некоторые другие особенности, рассмотренные выше, и, поэтому, холестериновая диета Аничкова не вызвала у них атеросклеротических изменений, подобных тому, которые наблюдалось у кроликов и людей [22]. Позднее, известный американский исследователь Daniel Steinberg, по этому поводу писал: «Если бы истинное значение его находок было своевременно оценено, мы сэкономили бы более 30 лет в длительной борьбе за холестериновую теорию атеросклероза, а сам Аничков мог бы быть удостоен Нобелевской премии» [21-22].

В настоящее время, среди ученых достигнут консенсус в отношении того, что как у людей, так и у экспериментальных животных, избыточное поступление холестерина является одним из главных факторов риска атеросклероза, а исследования на животных предоставили первые экспериментальные доказательства и основу для установления «липидной гипотезы» атеросклероза [23]. Широкое использование моделирования атеросклероза на кроликах помогло установить целый ряд ключевых аспектов патоморфологии и патофизиологии атеросклероза, а также сыграло важную роль в разработке и испытаниях терапевтических средств.

Были предложены различные варианты холестериновой диеты с содержанием холестерина от 0,3-2% и 3-8 % жира (триглицеридов) растительных масел [24-27]. Когда кроликов кормят рационом, содержащим около 2% холестерина, у них происходит быстрое повышение уровня ОХ в сыворотке крови до чрезвычайно высоких и практически несвойственных людям значений – 2000-3000 мг/дл (52,0-78,0 ммоль/л) и выше, поэтому такой вариант диеты не рекомендуется использовать. При содержании кроликов на диете, состоящей из более чем 1% холестерина в течение длительного периода, они также страдают от высокой гиперхолестеринемии (уровень ОХ – 1200 мг/дл) и у них отмечается массивное накопление липидов во многих органах и их дисфункция, что может повлиять на результаты эксперимента. Поэтому данный вариант диеты можно применить для ускоренного развития атеросклероза, однако его не рекомендуется использовать свыше 4 недель. При кормлении кроликов диетой, содержащей 0,3-0,5% холестерина уровень ОХ, как правило, не превышает 1000 мг/дл и дополнительный ущерб здоровью животного незначителен [25-27].

Помимо холестерина, для развития атеросклероза имеет важное значение введение в рацион кроликов масел (соевого, кокосового или кукурузного), в связи с тем, что они помогают абсорбции алиментарного экзогенного холестерина в тонком кишечнике. При содержании кроликов на наиболее оптимальном варианте диеты, включающей 0,3-0,5% холестерина и 3-8% растительного жира, атеросклероз аорты, в среднем, развивается через 12-16 недель от начала эксперимента. Для развития более выраженных поражений (осложнений) продолжительность кормления холестериновой диетой может быть увеличена более на 28 недель [28].

В качестве материала для изучения атеросклероза чаще всего используется аорта, поскольку ее легко выделить и можно произвести как макроскопическую, так и микроскопическую оценку размера и качества атеросклеротического поражения. Помимо стандартных гистологических методов исследования, разработаны иммуногистохимические и молекулярно-генетические методы исследования, которые позволяют провести анализ экспрессии конкретных соединений (белков или матричных РНК, кодирующих информацию о данных белках), участвующих в развитии атеросклероза. Так, например, S. Ylä-Herttuala с коллегами при помощи иммуногистохимических и молекулярно-генетических методов исследования изучили экспрессию моноцитарного хемоаттрактанта-1 (MCP-1) в пораженных атеросклерозом артериях [29].

Первые морфологические признаки атеросклероза, проявляющиеся у кроликов, получающих холестериновую диету, включают адгезию моноцитов к эндотелиальным

клеткам интимы сосудов и миграцию моноцитов в подэндотелиальный слой аорты, что можно наблюдать под микроскопом уже через несколько недель после начала эксперимента. Значительные поражения аорты у кроликов, состоящих на холестериновой диете, развиваются в течение примерно 12-16 недель и могут быть визуализированы посредством окрашивания гистологическим красителем жиров суданом IV. В этом случае зона атеросклеротического поражения, окрашивающаяся суданом IV (суданофильная зона) начинается от дуги аорты, распространяется на грудной отдел и, гораздо реже, на абдоминальный отдел аорты. После 12-и недельного кормления кроликов холестериновой пищей в их аорте встречаются различные типы поражений. Одним из основных изменений является появление в стенке сосуда жирных полос, которые, как и при атеросклерозе человека, состоят из пенистых клеток (макрофагов, перегруженных холестерином), гладких мышечных клеток и элементов внеклеточного матрикса. Нередко, в зависимости от диеты и продолжительности кормления холестерином, наблюдаются так называемые осложненные поражения. При таких поражениях отмечается отложение солей кальция или кальцификация. Также редко встречаются фиброзные поражения, которые почти полностью состоят из гладкомышечных клеток и внеклеточного матрикса с небольшим количеством макрофагов [25-27].

Отдельный интерес представляют собой различия в локализации атеросклеротических поражений у людей и кроликов. У людей абдоминальный отдел аорты является первым и основным местом возникновения атеросклероза, тогда как у кроликов, получающих пищу с повышенным содержанием холестерина, атеросклеротические поражения возникают сначала в дуге аорты, а затем в ее грудной части. Поражение брюшной аорты у кроликов, как правило, развивается при более тяжелом течении атеросклероза, который можно индуцировать более длительной атерогенной (более 0,5% холестерина) диетой. Кроме того, исследователи M. Hirata et al. отмечают, что у кроликов, по сравнению с людьми, реже наблюдается атеросклероз венечных артерий, и помимо этого, он обычно ограничивается левой коронарной артерией [30]. Почти невозможно смоделировать атеросклероз церебральных сосудов у кроликов, если они получают только холестериновую диету. Однако, если наряду с холестериновой диетой у кроликов одновременно индуцировать артериальную гипертензию, можно получить развитие атеросклероза церебральных артерий [31].

**Наследственные гиперлипидемические кролики Ватанабэ (Watanabe heritable hyperlipidemic, WHHL-кролики).** Значительную роль в изучении атеросклероза сыграло получение наследственно обусловленных гиперлипидемических кроликов Ватанабэ (Watanabe heritable hyperlipidemic, WHHL-кролики) – экспериментальной модели атеросклероза, разработанной японским ученым Yoshio Watanabe [32]. Выведение таких животных внесло важный вклад в установление точной причины семейной гиперхолестеринемии – тяжелого наследственного заболевания, резистентного ко всем существующим на данный момент гиполипидемическим препаратам и зачастую приводящее к смерти в детском и молодом возрасте от таких сердечно-сосудистых заболеваний, как острый инфаркт миокарда или инсульт.

В геноме WHHL-кролики обнаружена мутация сдвига рамки считывания (делеция 12 нуклеотидов), которая приводит к отсутствию четырех аминокислот в богатом цистеином лиганд-связывающем домене белка р-ЛПНП [33]. WHHL-кролики поспособствовали новым открытиям в области изучения семейной гиперхолестеринемии. Вскоре Браун и Гольдштейн, обнаружившие несколько генетических мутаций в гене, приводивших к дефициту рЛПНП у людей при семейной гиперхолестеринемии, за свое открытие были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине [34-35].

Важно отметить, развитие гиперхолестеринемии и формирование атеросклероза у WHHL-кролики происходит на их типичном (не содержащем холестерина) рационе [21]. У гомозиготных WHHL-кроликов, находящихся на обычном рационе, наблюдается значительное повышение уровня холестерина и триглицеридов в плазме, начиная с рождения, и животные страдают от атеросклероза и ксантомы сухожилий, которые имеют

значительное сходство с таковыми патологиями, наблюдаемыми при семейной гиперхолестеринемии у человека. У гетерозиготных WHHL-кроликов, состоящих на обычном рационе питания, в отличие от гомозиготных WHHL-кроликов, гиперхолестеринемия и атеросклеротические поражения менее выражены [36].

В экспериментальной работе по изучению атеросклероза преимущества использования WHHL-кроликов по сравнению использованием нелинейных кроликов, получавших холестериновую диету, заключаются в следующем: 1) липидный профиль WHHL-кроликов характеризуется высоким уровнем ЛПНП и чрезвычайно низкой концентрацией ЛПВП, тогда как основными липопротеинами у кроликов, состоящих на холестериновой диете, являются ЛПОНП и ЛПНП, а уровни ЛПВП обычно не изменяются; 2) гиперхолестеринемия постоянно присутствует у всех гомозиготных WHHL-кроликов на обычном рационе и вариации плазменных уровней ОХ и соотношения липопротеинов небольшие, по сравнению с кроликами, находящимися на специальной липидной диете; 3) у WHHL-кроликов развитые очаги поражения имеют картину, сходную с аналогичной стадией атеросклероза у человека, состоят из типичной атеросклеротической бляшки - липидного или некротического ядра, покрытого фиброзным колпачком (клетки гладких миоцитов и внеклеточный матрикс); 4) у WHHL-кроликов нередко наблюдается коронарный атеросклероз и инфаркт миокарда, что соответствует частым клиническим проявлениям у людей; 5) WHHL-кролики особенно удобны для исследований с целью разработки гипохолестеринемических препаратов [37].

**Генетические модели атеросклероза – трансгенные и «нокаутированные» кролики.** За последнее десятилетие, благодаря разработке генно-инженерных технологий, усилением цитогенетиков получены две группы генетически модифицированных, трансгенных и так называемых «нокаутированных» кроликов, успешно применяемых в экспериментальной работе по изучению атеросклероза. Разработка трансгенных животных внесли неоценимый вклад в изучение многих заболеваний человека. Первое сообщение о создании первого трансгенного кролика при помощи пронуклеарной микроинъекции было сделано в 1985 году. Трансгенные животные имеют в своем геноме дополнительную генетическую информацию (участок ДНК), называемую трансген, которая может передаваться по наследству [38-39]. На сегодняшний день удалось внедрить более десятка различных генов, кодирующих такое же количество белков, участвующих в атерогенезе [39]. Поскольку эффективность получения трансгенных кроликов посредством пронуклеарной микроинъекции была довольно низкой, предприняты попытки по разработке других методов. Одним из многообещающих подходов является технология редактирования генома Sleeping Beauty («спящая красавица») или транспозон-опосредованный трансгенез, благодаря которой достигается высокая эффективность создания трансгенных кроликов [40-42].

**«Нокаутированные» кролики.** В 2011 году, используя метод редактирования генома, опосредованный нуклеазой цинкового пальца (англ. - Zinc finger nuclease, ZFN), Flisikowska et al. сообщили о создании первых экспериментальных моделей «нокаутированных» кроликов [43]. ZFN представляют собой сконструированные ДНК-расщепляющие ферменты, введение которых в оплодотворенные ооциты животных могут инактивировать («нокаутировать») определенный, необходимый для конкретного исследования, ген. Благодаря технологии ZFN были разработаны «нокаутированные» кролики с дефицитом апопротеина С-III (апоС-III) для изучения патофизиологии ожирения и атеросклероза. АпоС-III входит в состав ЛПОНП и ЛПВП. Было установлено, что высокий уровень апоС-III является фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний. Повышенный уровень апоС-III в плазме крови ассоциируется с инсулинорезистентностью, ожирением и гиперлипидемией [44].

Другая технология получения «нокаутированных» животных – TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) – инактивация определенного гена при помощи эффекторных нуклеаз, подобных активатору транскрипции. По данным исследователей Song et al. технология TALEN имеет меньшее количество нецелевых и побочных эффектов

по сравнению с технологией ZFN [45]. К настоящему времени была также разработана эффективная технология редактирования генома и создания «нокаутированных» животных CRISPR (CRISPR/Cas9). D. Yang с коллегами сообщили о создании кроликов, нокаутированных по гену, кодирующему р-ЛПНП [46]. Дефицит р-ЛПНП приводит к аккумуляции уровня ОХ и атерогенных частиц ЛПНП, и, как следствие, значительному повышению риска развития атеросклероза [47]. Дальнейшая разработка генетических моделей атеросклероза на кроликах является одним из важных направлений для изучения метаболизма липидов и атеросклероза.

**Заключение.** Таким образом, в настоящее время в арсенале исследователей существует несколько экспериментальных лабораторных моделей атеросклероза на кроликах: диетическая (холестериновая), наследственные гиперлипидемические кролики Ватанабэ, трансгенные и «нокаутированные» кролики. Благодаря использованию экспериментальных моделей атеросклероза на кроликах были получены важные сведения о патоморфологии и патофизиологии атеросклероза, изучены гиполипидемические эффекты терапевтических средств. Экспериментальные лабораторные модели не утратили своей актуальности; их дальнейшее использование, безусловно, будет способствовать не только углублению представлений о фундаментальных (патоморфологических и патофизиологических) процессах, происходящих в процессе развития атеросклероза, но и расширению клинических возможностей.

**Авторы заявляют об отсутствии каких-либо конфликтов интересов при планировании, выполнении, финансировании и использовании результатов настоящего исследования.**

## Литература

## References

1. Aronov DM, Lupanov VP. Atherosclerosis and coronary heart disease: some aspects of pathogenesis. *The Journal of Atherosclerosis and Dyslipidemias (JAD)-Ateroskleroz i dislipidemii*. 2011;1-2:48-56. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=15566121>.
2. Fatenkov OV, Simerzin VV, Panisheva YA, Galkina MA, Sytdykov IKh, Krasovskaya MA, Gagloev AV, Malykhina TV. Innovative treatments for patients with subclinical carotid atherosclerosis. *Bulletin of Medical Institute "REAVIZ": Rehabilitation, Physician and Health*. 2019;2(38):129-137. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=38163180>.
3. Sumin AN, Medvedeva YuD, Shcheglova AV, Barbarash LS. Predictors of unfavorable outcomes in patients with peripheral atherosclerosis. *Russian Journal of Cardiology and Cardiovascular Surgery = Kardiologiya i serdechno-sosudistaya khirurgiya*. 2020;13(1):41-47. DOI: 10.17116/kardio202013011141.
4. Chaulin AM, Karslyan LS, Grigoriyeva EV, Nurbaltaeva DA, Duplyakov DV. Clinical and Diagnostic Value of Cardiac Markers in Human Biological Fluids. *Kardiologiya*. 2019;59(11):66-75. DOI: 10.18087/cardio.2019.11.n414.
5. Chaulin AM, Milyutin IN, Timofeev NV, Duplyakov DV. Non-coronagenic causes of elevated cardiac troponins in clinical practice (literature review). *Bulletin of Medical Institute "REAVIZ": Rehabilitation, Physician and Health*. 2019;5(41):201-214. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=41830941>.
6. Chaulin AM, Duplyakov DV. PCSK-9: modern views about biological role and possibilities of use as a diagnostic marker for cardiovascular diseases. Part 1. *Kardiologiya: novosti, mneniya, obuchenie [Cardiology: News, Opinions, Training]*. 2019;7(2):45-57. DOI: 10.24411/2309-1908-2019-12005.
7. Chaulin AM, Duplyakov DV. PCSK-9: modern views about biological role and possibilities of use as a diagnostic marker for cardiovascular diseases. Part 2. *Kardiologiya: novosti, mneniya, obuchenie [Cardiology: News, Opinions, Training]*. 2019;7(4):24-35. DOI: 10.24411/2309-1908-2019-12005.
8. Vesselinovitch D. Animal models and the study of atherosclerosis. *Arch Pathol Lab Med*. 1988;112(10):1011-1017. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3052351>.
9. Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(5):1104-1115. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.237693.

10. Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci.* 2002;70(8):855-865. DOI: 10.1016/s0024-3205(01)01479-5.
11. Taylor JM, Fan J. Transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. *Front Biosci.* 1997;2:298-308. DOI: 10.2741/a192.
12. Roberts DC, West CE, Redgrave TG, Smith JB. Plasma cholesterol concentration in normal and cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis.* 1974;19(3):369-380. DOI: 10.1016/s0021-9150(74)80002-x.
13. Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res.* 1993;34(8):1255-1274. URL: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?;DOI=10.1.1.335.2888&rep=rep1&type=pdf>.
14. Quinet E, Tall A, Ramakrishnan R, Rudel L. Plasma lipid transfer protein as a determinant of the atherogenicity of monkey plasma lipoproteins. *J Clin Invest.* 1991;87(5):1559-1566. DOI: 10.1172/JCI115169.
15. Agellon LB, Walsh A, Hayek T, Moulin P, Jiang XC, Shelanski SA, Breslow JL, Tall AR. Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *J Biol Chem.* 1991;266(17):10796-10801. URL: <https://www.jbc.org/content/266/17/10796.long>.
16. Li X, Catalina F, Grundy SM, Patel S. Method to measure apolipoprotein B-48 and B-100 secretion rates in an individual mouse: evidence for a very rapid turnover of VLDL and preferential removal of B-48- relative to B-100-containing lipoproteins. *J Lipid Res.* 1996;37(1):210-220. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8820116>.
17. Ignatowski AC. Influence of animal food on the organism of rabbits. *Izvest Imper Voennomed Akad St Petersburg.* 1908;16:154-173.
18. Anichkov NN. *Vestnik Akademii Nauk SSSR.* 1961. 38s.
19. Buja LM, Nikolai N. Anitschkow and the lipid hypothesis of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol.* 2014;23(3):183-184. DOI: 10.1016/j.carpath.2013.12.004.
20. Konstantinov IE, Mejevoi N, Anichkov NM, Nikolai N. Anichkov and his theory of atherosclerosis. *Tex Heart Inst J.* 2006;33(4):417-23. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1764970>.
21. Parfenova NS, Golikov YP, Klimov AN. On the history of the emergence of the cholesterol model of atherosclerosis. *Medical academic journal.* 2016;16(2):7-14. DOI: 10.17816/MAJ1627-14.
22. Steinberg D. Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy: part I. *J Lipid Res.* 2004;45(9):1583-1593. DOI: 10.1194/jlr.R400003-JLR200.
23. Chaulin AM, Duplyakov DV. PCSK-9: modern views about biological role and possibilities of use as a diagnostic marker for cardiovascular diseases. Part 1. *Kardiologiya: novosti, mneniya, obuchenie [Cardiology: News, Opinions, Training].* 2019;7(2):45-57. DOI: 10.24411/2309-1908-2019-12005.
24. Manning P, Ringler D, Newcomer C. *The biology of the laboratory rabbits*, 2nd Ed Academic Press, San Diego, 1994. 483pp. URL: <https://www.elsevier.com/books/the-biology-of-the-laboratory-rabbit/manning/978-0-12-469235-0>.
25. Fan J, Watanabe T. Cholesterol-fed and transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2000;7(1):26-32. DOI: 10.5551/jat1994.7.26.
26. Rouleau JL, Parmley WW, Stevens J, Wikman-Coffelt J, Sievers R, Mahley RW, Havel RJ. Verapamil suppresses atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J Am Coll Cardiol.* 1983;1(6):1453-60. DOI: 10.1016/s0735-1097(83)80049-7.
27. Fan J, Shimoyamada H, Sun H, Marcovina S, Honda K, Watanabe T. Transgenic rabbits expressing human apolipoprotein(a) develop more extensive atherosclerotic lesions in response to a cholesterol-rich diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(1):88-94. DOI: 10.1161/01.atv.21.1.88.
28. Liang J, Liu E, Yu Y, Kitajima S, Koike T, Jin Y, Morimoto M, Hatakeyama K, Asada Y, Watanabe T, Sasaguri Y, Watanabe S, Fan J. Macrophage metalloelastase accelerates the progression of atherosclerosis in transgenic rabbits. *Circulation.* 2006;113(16):1993-2001. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.596031.
29. Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Särkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(12):5252-6. DOI: 10.1073/pnas.88.12.5252.
30. Hirata M, Watanabe T. Regression of atherosclerosis in normotensive and hypertensive rabbits. A quantitative analysis of cholesterol-induced aortic and coronary lesions with an image-processing system. *Acta Pathol Jpn.* 1988;38(5):559-575. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3213507>.

31. Kato H, Tokunaga O, Watanabe T, Sunaga T. Experimental cerebral atherosclerosis in the rabbit. Scanning electron microscopic study of the initial lesion site. *Pathol Res Pract*. 1991;187(7):797-805. DOI: 10.1016/S0344-0338(11)80575-3.
32. Watanabe Y. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis*. 1980;36(2):261-268. DOI: 10.1016/0021-9150(80)90234-8.
33. Yamamoto T, Bishop RW, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW. Deletion in cysteine-rich region of LDL receptor impedes transport to cell surface in WHHL rabbit. *Science*. 1986;232(4755):1230-1237. DOI: 10.1126/science.3010466.
34. Goldstein JL, Kita T, Brown MS. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 1983;309(5):288-296. DOI: 10.1056/NEJM198308043090507.
35. Chaulin AM, Aleksandrov AG, Aleksandrova OS, Duplyakov DV. The role of the proprotein convertase subtilisin / kexin type 9 (pcsk9) in the pathophysiology of atherosclerosis. *Medicine in Kuzbass*. 2019;18(4):5-15. URL: <http://mednauki.ru/index.php/MK/article/view/359/728>.
36. Schröder M, Fricke C, Pilegaard K, Poulsen M, Wester I, Lütjohann D, Mortensen A. Effect of rapeseed oil-derived plant sterol and stanol esters on atherosclerosis parameters in cholesterol-challenged heterozygous Watanabe heritable hyperlipidaemic rabbits. *Br J Nutr*. 2009;102(12):1740-1751. DOI: 10.1017/S0007114509991206.
37. Kobayashi T, Ito T, Shiomi M. Roles of the WHHL rabbit in translational research on hypercholesterolemia and cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol*. 2011;406473. DOI: 10.1155/2011/406473.
38. Tevkin CI, Shishimorova MS. Production of transgenic rabbits producing biologically active recombinant human proteins (a review). *Problems of Biology of Productive Animals*. 2009;4:5-20. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=13001510>.
39. Peng X. Transgenic rabbit models for studying human cardiovascular diseases. *Comp Med*. 2012;62(6):472-479. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23561880>.
40. Mátés L, Chuah MK, Belay E, Jerchow B, Manoj N, Acosta-Sanchez A, Grzela DP, Schmitt A, Becker K, Matrai J, Ma L, Samara-Kuko E, Gysemans C, Pryputniewicz D, Miskey C, Fletcher B, VandenDriessche T, Ivics Z, Izsvák Z. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet*. 2009;41(6):753-761. DOI: 10.1038/ng.343.
41. Ivics Z, Hiripi L, Hoffmann OI, Mátés L, Yau TY, Bashir S, Zidek V, Landa V, Geurts A, Pravenec M, Rüllicke T, Böse Z, Izsvák Z. Germline transgenesis in rabbits by pronuclear microinjection of Sleeping Beauty transposons. *Nat Protoc*. 2014;9(4):794-809. DOI: 10.1038/nprot.2014.009
42. Querques I, Mades A, Zuliani C, Miskey C, Alb M, Grueso E, Machwirth M, Rausch T, Einsele H, Ivics Z, Hudecek M, Barabas O. A highly soluble Sleeping Beauty transposase improves control of gene insertion. *Nat Biotechnol*. 2019;37(12):1502-1512. DOI: 10.1038/s41587-019-0291-z.
43. Flisikowska T, Thorey IS, Offner S, Ros F, Lifke V, Zeitler B, Rottmann O, Vincent A, Zhang L, Jenkins S, Niersbach H, Kind AJ, Gregory PD, Schnieke AE, Platzer J. Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases. *PLoS One*. 2011;6(6):e21045. DOI: 10.1371/journal.pone.0021045.
44. Yang D, Zhang J, Xu J, Zhu T, Fan Y, Fan J, Chen YE. Production of apolipoprotein C-III knockout rabbits using zinc finger nucleases. *J Vis Exp*. 2013;(81):e50957. DOI: 10.3791/50957.
45. Song J, Zhong J, Guo X, Chen Y, Zou Q, Huang J, Li X, Zhang Q, Jiang Z, Tang C, Yang H, Liu T, Li P, Pei D, Lai L. Generation of RAG 1- and 2-deficient rabbits by embryo microinjection of TALENs. *Cell Res*. 2013;23(8):1059-1062. DOI: 10.1038/cr.2013.85.
46. Yang D, Xu J, Zhu T, Fan J, Lai L, Zhang J, Chen YE. Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases. *J Mol Cell Biol*. 2014;6(1):97-99. DOI: 10.1093/jmcb/mjt047.
47. Chaulin AM. The involvement proprotein convertase subtilisin/kexin of type 9 in the pathogenesis of atherosclerosis (literature review). *University proceedings. Volga region. Medical sciences*. 2020;1(53):111-128. DOI: 10.21685/2072-3032-2020-1-13.

## **Авторская справка**

**Чаулин Алексей Михайлович**, аспирант, кафедра гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, врач клинической лабораторной диагностики, клинко-диагностическая лаборатория, Самарский областной клинический кардиологический диспансер имени В.П. Полякова, Самара, Россия; **e-mail: alekseymichailovich22976@gmail.com**

**Григорьева Юлия Владимировна**, кандидат медицинских наук, доцент, кафедра гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия; **e-mail: histology@bk.ru**

**Суворова Галина Николаевна**, доктор биологических наук, профессор, заведующий, кафедра гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия; **e-mail: gsuvmed@yandex.ru**

**Дупляков Дмитрий Викторович**, доктор медицинских наук, профессор, кафедра кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии, Самарский государственный медицинский университет, заместитель главного врача по медицинской части, Самарский областной клинический кардиологический диспансер имени В.П. Полякова, Самара, Россия; **e-mail: duplyakov@yahoo.com**