

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ
ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 616.1-005-076

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2026-11-2-5-17>

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЛИПИДНО-КАЛЬЦИЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА У ГИПЕРЛИПИДЕМИЧЕСКИХ (ApoE-НОКАУТНЫХ) МЫШЕЙ В КОНТЕКСТЕ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

БОГДАНОВ Л.А., КАНОНЫКИНА А.Ю., КОНДРАТЬЕВ Е.А., ТЮРИНА А.Е., ИЗОТОВА Е.С., КУТИХИН А.Г. ✉

*Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
б-р имени академика Л.С. Барбараша, стр. 6, г. Кемерово, 650002, Россия*

Основные положения

У гиперлипидемических ApoE^{-/-} мышей в возрасте 12 месяцев выявляются липидные и кальциевое поражение аортального клапана, локализованные во всех слоях его створок и затрагивающие не менее двух из трех створок клапана. Морфологически липидное поражение представлено множественными липидными каплями различного диаметра и их скопления, тогда как кальциевое поражение отражает наличие гетерогенных микрокальцификатов. Полуколичественный анализ липидного и кальциевого поражения створок аортального клапана требует патоморфологического анализа криосрезов с использованием масляного красного (Oil Red O) и ализаринового красного (Alizarin Red S) в сочетании с флуоресцентной микроскопией и последующей бинаризацией изображений.

Резюме

Цель. Провести патоморфологическую и полуколичественную оценку липидного и кальциевого поражения створок аортального клапана у ApoE^{-/-} мышей для обоснования возможности использования данной животной модели в доклинических исследованиях фармакологических вмешательств для профилактики кальцинирующего аортального стеноза. **Материалы и методы.** В исследование были включены 12-месячные самцы и самки ApoE^{-/-} мышей (n = 20). После эвтаназии выделяли комплексы дуги аорты с фрагментом левого желудочка, содержащим аортальный клапан. Для макроскопической оценки липидного и кальциевого поражения цельные биоптаты и серийные криосрезы створок аортального клапана окрашивали 1% раствором масляного красного (Oil Red O), 2% раствором ализаринового красного (Alizarin Red S) и гематоксилином и эозином. Визуализацию проводили методом световой и флуоресцентной микроскопии. Полуколичественный анализ площади липидного и кальциевого поражения выполняли в программе ImageJ. **Результаты.** Окрашивание цельных биоптатов не позволило выявить липидное и кальциевое поражение створок аортального клапана. При патоморфологическом анализе криосрезов в створках аортального клапана были обнаружены множественные липидные

капли различного диаметра и их скопления, а также гетерогенные микрокальцификаты, локализованные во всех слоях створок. Полуколичественный анализ выявил более высокую распространенность липидного поражения створок аортального клапана у самцов ApoE^{-/-} мышей по сравнению с самками (p = 0,002), однако выраженность кальциевого поражения створок между самцами и самками статистически значимо не различалась (p = 0,91). **Заключение.** У ApoE^{-/-} мышей в возрасте 12 месяцев формируется липидное и кальциевое поражение створок аортального клапана, морфологически сходное с таковым на начальных стадиях кальцинирующего аортального стеноза у человека и детектируемое с использованием липофильных и кальций-специфических красителей в сочетании с флуоресцентной микроскопией. Полученные результаты подтверждают возможность использования ApoE^{-/-} мышей в качестве экспериментальной модели для изучения кальцификации аортального клапана и проведения доклинических исследований эффективности соответствующих фармакологических вмешательств.

Ключевые слова: кальцинирующий аортальный стеноз, кальцификация аортального клапана, ApoE^{-/-} мыши, доклинические испытания, микрокальцификация, липидное поражение

Корреспонденцию адресовать:

Кутихин Антон Геннадьевич, 650002, Россия, Кемеровская область – Кузбасс, г. Кемерово, б-р имени академика Л.С. Барбараша, стр. 6, E-mail: antonkutikhin@gmail.com

© Богданов Л.А. и др.

Соответствие принципам этики

Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (протокол №5 от 10.04.2023).

Конфликт интересов. Богданов Л.А., Канонькина А.Ю., Кондратьев Е.А., Тюрина А.Е., Изотова Е.С. заявляют об отсутствии конфликта интересов. Кутихин А.Г. – член редакционной коллегии журнала «Фундаментальная и клиническая медицина», но в данном случае не имел никакого отношения к решению опубликовать эту статью. Статья прошла принятую в журнале процедуру рецензирования.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2024-0001 «Разработка

новых фармакологических подходов к экспериментальной терапии атеросклероза, технологий серийного производства реактивов и расходных материалов для изучения физиологии и патофизиологии сердечно-сосудистой системы и программного обеспечения на основе искусственного интеллекта для автоматизированной диагностики патологий системы кровообращения и автоматизированного расчета сердечно-сосудистого риска» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках национального проекта «Наука и университеты», <https://gisnauka.ru/nioikt/detail/5090V6DKTDEZ3L37R544GP18>.

Для цитирования:

Богданов Л.А., Канонькина А.Ю., Кондратьев Е.А., Тюрина А.Е., Изотова Е.С., Кутихин А.Г. Моделирование липидно-кальциевого поражения аортального клапана у гиперлипидемических (ApoE-нокаутных) мышей в контексте доклинических испытаний. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2026;11(2):5-17. (In Russ.). <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2026-11-2-5-17>

Поступила:

26.03.2026

Поступила после доработки:

28.04.2026

Принята в печать:

29.05.2026

Дата печати:

25.06.2026

Сокращения

КАС – кальцинирующий аортальный стеноз,

АК – аортальный клапан,

4',6-диамидино-2-фенилиндо́л – DAPI,

МКИ – межквартильный интервал

ORIGINAL RESEARCH
PATHOPHYSIOLOGY

HYPERLIPIDEMIC *ApoE*^{-/-} MICE AS A MODEL FOR STUDYING LIPID AND CALCIUM DEPOSITION IN THE AORTIC VALVE IN PRECLINICAL STUDIES

LEO A. BOGDANOV, ANASTASIA A. KANONYKINA, EGOR A. KONDRATIEV, ARINA E. TYURINA ,
ELIZAVETA S. IZOTOVA, ANTON G. KUTIKHIN

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Barbarash Boulevard, 6, Kemerovo, 650002, Russia

HIGHLIGHTS

In hyperlipidemic *ApoE*^{-/-} mice aged 12 months, lipid and calcific lesions of the aortic valve leaflets are detected, localized both in the superficial and deeper layers of the leaflets and involving at least two of the three valve leaflets regardless of the sex of the animals. Lipid lesions are represented by multiple lipid droplets of various diameters, sometimes forming extended clusters, whereas calcific lesions are characterized by the presence of heterogeneous microcalcifications. Semi-quantitative analysis revealed more pronounced lipid lesions in male *ApoE*^{-/-} mice, whereas leaflet calcification showed a tendency toward higher values in females. Detection of lipid and calcific lesions of the aortic valve leaflets requires pathomorphological analysis of cryosections using Oil Red O and Alizarin Red staining in combination with fluorescence microscopy.

Abstract

Aim. To perform a pathomorphological and semi-quantitative assessment of lipid and calcific lesions of aortic valve leaflets in 12-month-old male and female *ApoE*^{-/-} mice in order to substantiate the feasibility of using this model in preclinical studies of preventive therapy for calcific aortic stenosis. **Materials and Methods.** The study included 12-month-old male and female *ApoE*^{-/-} mice (n = 20). After euthanasia, complexes of the aortic arch with a fragment of the left ventricle containing the aortic valve and the descending aorta were isolated. For macroscopic evaluation of lipid and calcific lesions, whole-mount specimens were stained with 1% Oil Red O and 2% Alizarin Red. For detailed analysis, serial cryosections of aortic valve leaflets were prepared and stained with Oil Red O, Alizarin Red, and hematoxylin and eosin. Visualization was performed using light and fluorescence microscopy. Semi-quantitative analysis of the area of lipid and calcific lesions was carried out using ImageJ software. **Results.** Macroscopic evaluation did not reveal lipid or calcific lesions in aortic valve leaflets. However, pathomorphological

analysis of cryosections demonstrated multiple lipid inclusions of various sizes, sometimes forming extended clusters, as well as heterogeneous microcalcifications located in both superficial and deeper layers of the valve leaflets. Semi-quantitative analysis showed significantly more pronounced lipid lesions in male *ApoE*^{-/-} mice compared with females (p = 0.002), whereas calcification demonstrated comparable values between the groups with a tendency toward higher levels in females. **Conclusion.** In 12-month-old *ApoE*^{-/-} mice, lipid and calcific lesions develop in aortic valve leaflets and morphologically resemble early changes described in the initial stages of calcific aortic stenosis in humans. Detection of these lesions requires pathomorphological analysis of cryosections using lipophilic and calcium-specific dyes in combination with fluorescence microscopy. The obtained results support the use of *ApoE*^{-/-} mice as an experimental model for studying early stages of aortic valve calcification and for conducting preclinical studies of preventive interventions.

Keywords: calcific aortic stenosis, aortic valve calcification, *ApoE*^{-/-} mice, preclinical studies, microcalcification, lipid lesions

Corresponding author:

Dr. Anton G. Kutikhin, Barbarash Boulevard, build. 6, Kemerovo Region (Kuzbass), Kemerovo, 650002, Russia, E-mail: antonkutikhin@gmail.com © Bogdanov L.A., et al.

Ethical Statement. The study was endorsed by the Local Ethical Committee of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (protocol #5 from 10 April 2023).

Conflict of Interest. Leo A. Bogdanov, Anastasia A. Kanonykina, Egor A. Kondratiev, Arina E. Tyurina, Elizaveta S. Izotova declare no conflict of interest. Anton G. Kutikhin is a member of the Journal «Fundamental and Clinical Medicine» Editorial Board, but in this case, she had no involvement in the decision to publish this article. The article has undergone the journal's standard peer review process.

Funding. This study was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (National Project Science and Universities) to fulfill the Research Topic of the Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases No. 0419-2024-0001 «Novel anti-atherosclerotic therapies and machine learning solutions for automated diagnosis and prognostication of cardiovascular disease», <https://gisnauka.ru/nioktr/detail/5090V6DKTDEZ3L37R544GP18>.

For citation: Leo A. Bogdanov, Anastasia A. Kanonykina, Egor A. Kondratiev, Arina E. Tyurina, Elizaveta S. Izotova, Anton G. Kutikhin. Hyperlipidemic *ApoE*^{-/-} mice as a model for studying lipid and calcium deposition in the aortic valve in preclinical studies. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2026;11(2):5-17. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2026-11-2-5-17>

Received:
26.03.2026

Received in revised form:
28.04.2026

Accepted:
29.05.2026

Published:
25.06.2026

Введение

Кальцинирующий аортальный стеноз (КАС) является одним из наиболее распространенных приобретенных пороков клапанов сердца и ассоциирован с высоким риском неблагоприятных сердечно-сосудистых событий [1, 2]. Во всем мире от КАС страдают от 9 до 13 миллионов человек, а ежегодная смертность, связанная с данным заболеванием, составляет от 103 до 127 тысяч случаев [1]. Распространенность КАС резко возрастает с возрастом и достигает приблизительно 3,5 % среди лиц старше 75 лет, при этом значительная часть пациентов имеет клинически выраженные симптомы заболевания, существенно ухудшающие качество жизни [2]. С учетом старения населения, обусловленного текущей тенденцией к увеличению продолжительности жизни, ожидается дальнейший рост распространенности КАС: за последние десятилетия частота этого заболевания увеличилась в несколько раз, с прогнозами к сохранению темпов роста данного показателя [3].

В основе формирования КАС лежат традиционные факторы сердечно-сосудистого риска, включая дислипидемию, сахарный диабет, метаболический синдром и хроническую болезнь почек [4, 5]. На ранних стадиях заболевания в створках аортального клапана (АК) происходит накопление липидов, сопровождающееся воспалительной инфильтрацией и активацией интерстициальных клеток клапана [4–7]. В дальнейшем развиваются фибротическое ремоделирование и кальцификация створок АК, приводящие к их утолщению, повышению жесткости и снижению подвижности [4–7]. В результате створки не способны полностью раскрываться в систолу, что уменьшает площадь клапанного отверстия и создает механическое препятствие изгнанию крови из левого желудочка в аорту. Возникающее при этом повышение сопротивления изгнанию крови сопровождается формированием градиента давления между левым желудочком и аортой и хронической перегрузкой миокарда. В ответ на это развивается концентрическая гипертрофия левого желудочка, которая со временем приводит к нарушению диастолической функции, ухудшению коронарной перфузии и развитию сердечной недостаточности [4]. На сегодняшний день единственным эффективным методом лечения КАС является хирургическая или транскатетерная замена АК [8]. Несмотря на значительный прогресс в лечении КАС, эффективной

фармакотерапии, способной предотвратить развитие заболевания, в настоящее время не существует [8]. Поэтому разработка новых терапевтических подходов, направленных на профилактику липидно-кальциевого поражения АК и на замедление прогрессирования КАС, остается актуальной задачей современной кардиологии.

Разработка таких терапевтических подходов требует проведения доклинических исследований, позволяющих изучить механизмы поражения АК и оценить эффективность соответствующих фармакологических вмешательств. В связи с этим особое значение имеет поиск подходящей экспериментальной модели, способной воспроизводить ключевые патогенетические механизмы развития КАС, включая липидную инфильтрацию, воспаление и кальцификацию створок АК [9]. Одной из широко используемых экспериментальных моделей для изучения заболеваний, связанных с нарушением липидного обмена, являются мыши с нокаутом гена аполипопротеина Е (*ApoE^{-/-}*) [10]. У таких животных с рождения развивается выраженная гиперлипидемия, приводящая к спонтанному формированию атеросклеротических поражений сосудистой стенки, что делает данную модель широко применяемой в исследованиях патогенеза атеросклероза [10]. В то же время данные о липидном и кальциевом поражении створок АК у *ApoE^{-/-}* мышей остаются ограниченными. Целью настоящего исследования стала оценка липидного и кальциевого поражения створок АК у 12-месячных самцов и самок *ApoE^{-/-}* мышей для обоснования возможности использования данной модели в доклинических исследованиях фармакологических вмешательств, направленных на профилактику развития КАС.

Материалы и методы

Исследование было выполнено в соответствии с принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Протокол исследования и получение биоматериала от лабораторных животных были одобрены Локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (протокол заседаний №5 от 10.04.2023). В эксперимент были включены 10 самцов и 10 самок *ApoE^{-/-}* мышей в возрасте 12 месяцев. Выведение животных из эксперимента выполняли путем помещения в камеру с углекислым газом. Забор биоматери-

ала осуществляли путем лапаротомии с последующим вскрытием грудной клетки и извлечением сердца, после чего хирургически отделяли комплекс дуги аорты с фрагментом левого желудочка, содержащим АК.

Для макроскопической оценки липидного и кальциевого поражения комплексы дуги аорты с фрагментом левого желудочка, содержащим АК, окрашивали 1% раствором масляного красного (Oil Red O) и 2% раствором ализаринового красного (Alizarin Red S). Целые образцы обезвоживали в 85 % изопропиловом спирте в течение 5 минут и затем инкубировали в растворе масляного красного (23576, Sisco Research Laboratories) в течение 3 часов в темноте. После окрашивания образцы промывали в 85% изопропиловом спирте и фосфатно-солевом буфере и анализировали с использованием стереомикроскопа (SZ2-ILST, Olympus). Далее образцы инкубировали в 2% растворе ализаринового красного (010043LP, Ленреактив) в течение 70 секунд, промывали в трех сменах фосфатно-солевого буфера и повторно анализировали с использованием того же стереомикроскопа. После макроскопического анализа комплексы тканей замораживали в металлических формах с криогелем Tissue-Tek (4583, Electron Microscopy Sciences) путем погружения в жидкий азот (-195°C). Серийные криосрезы толщиной 7 мкм (по 4 стекла в серии) получали на криотоме CryoStar NX50 (Thermo Scientific). До проведения окрашивания стекла хранили в пластиковых контейнерах при -80°C.

Для микроскопического анализа липидного поражения криосрезы окрашивали 1 % масляным красным. Незафиксированные срезы доводили до комнатной температуры и фиксировали в 4 % параформальдегиде в течение 10 минут. После фиксации срезы промывали в трех сменах фосфатно-солевого буфера по 5 минут, инкубировали в 60 % изопропиловом спирте в течение 5 минут, затем инкубировали в растворе масляного красного в течение 15 минут. После окрашивания срезы промывали в трех сменах 60 % изопропилового спирта и контрастировали гематоксилином Майера (C0303, Diapath) в течение 10 минут с последующим подсинением проточной водой в течение 5 минут. После заключительной промывки в бидистиллированной воде срезы заключали в монтирующую среду на водной основе (ab64230, Abcam). Для анализа кальциевого поражения криосрезы окрашивали 2 % раствором ализариново-

го красного с последующим контрастированием в растворе ализаринового красного в течение 70 секунд. После окрашивания срезы промывали в трех сменах бидистиллированной воды по 10 секунд и инкубировали в растворе DAPI в течение 30 минут в темноте. После заключительной промывки в бидистиллированной воде срезы заключали в монтирующую среду на водной основе. Для оценки общего морфологического состояния створок АК криосрезы после фиксации в 4% параформальдегиде и отмытки в проточной воде в течение 15 минут окрашивали гематоксилином (НК-G0-BL01, ЭргоПродакшн) и эозином (НК-ЕК-A250, ЭргоПродакшн) по оригинальному протоколу [11].

Визуализацию результатов проводили на микроскопе (AxioImager.A1, Carl Zeiss) с использованием светофильтров Fs09 – LP515 и Fs15 – LP590 для визуализации липидного и кальциевого поражения, а также Fs05 – LP470 для детекции DAPI и объективов EC-Plan-NEOFLUAR 10x/0.3 Ph1 (Carl Zeiss) и EC-Plan-NEOFLUAR 20x/0.5 Ph2 (Carl Zeiss). В качестве отрицательного контроля для подтверждения специфичности флюоресцентного свечения ализаринового красного и масляного красного выступили срезы, окрашенные гематоксилином и эозином. Полуколичественный анализ площади липидного и кальциевого поражения был выполнен в программе ImageJ (National Institutes of Health) посредством бинаризации соответствующих флюоресцентных изображений (n = 10 для группы самцов и n = 10 для группы самок, по одному репрезентативному изображению для каждой мыши), полученных с использованием светофильтра Fs09 – LP515, поскольку он позволяет детектировать характерное для окрашивания липидов масляным красным и окрашивания кальциевого поражения ализариновым красным флюоресцентное свечение с высокой чувствительностью и наибольшей среди других светофильтров специфичностью.

Статистический анализ был выполнен в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). Данные были представлены в виде медианы,

межквартильного интервала, минимального и максимального значений. Сравнения между группами (самцами и самками) были проведены при помощи U-критерия Манна-Уитни. Значения вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу p менее 0,05 признавались статистически значимыми.

Результаты

С целью выявления липидного и кальциевого поражения АК у самцов и самок *ApoE^{-/-}* мышей было проведено окрашивание цельных

препаратов дуги аорты с прилежащей частью левого желудочка, содержащей АК, а также цельных препаратов нисходящего отдела аорты масляным красным и ализариновым красным. При применении данной методики липидные включения окрашиваются в светло-красный цвет, а кальциевые – в темно-красный. Макроскопический анализ створок АК не выявил на них ни светло-красного окрашивания (**рисунок 1А**), ни темно-красного окрашивания (**рисунок 1Б**), характерных для липидного и кальциевого поражения, выявляемых в аорте (**рисунок 1В**).

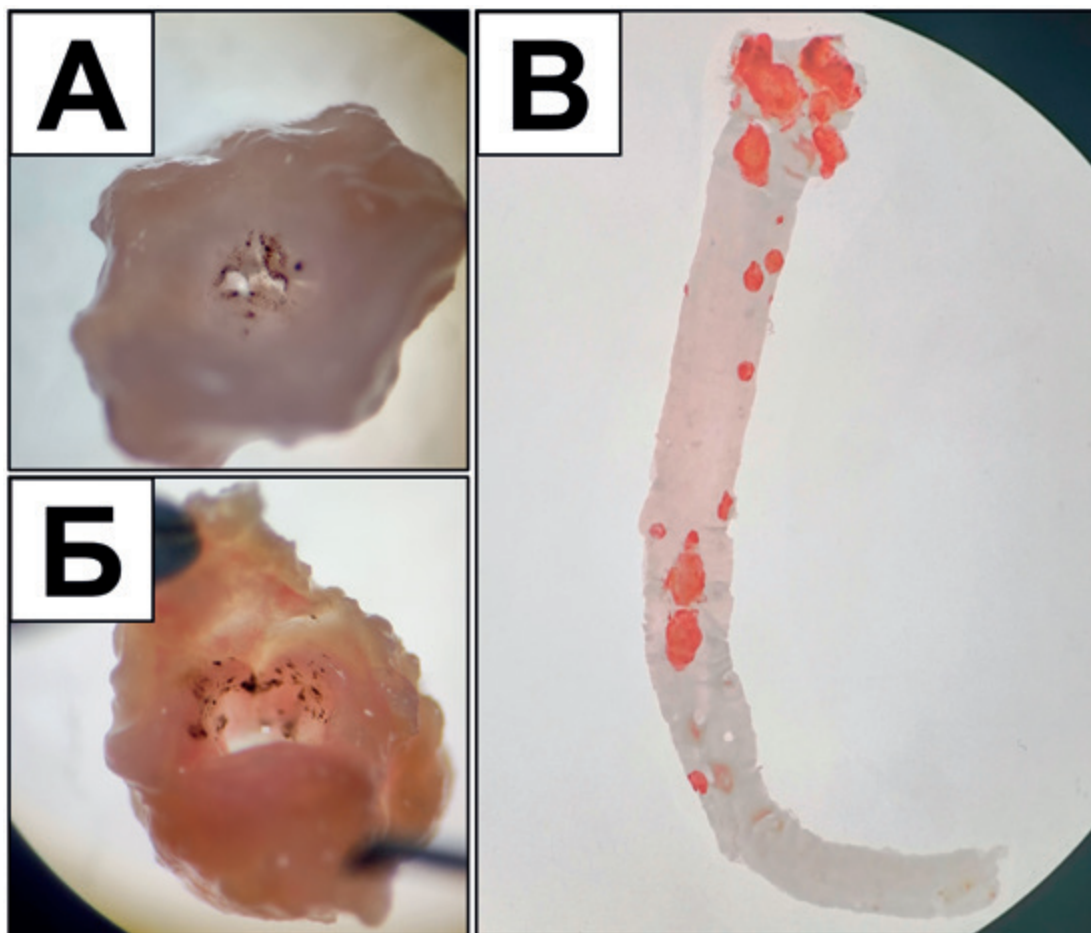


Рисунок 1. Репрезентативные изображения тотальных биоптатов *ApoE^{-/-}* мышей, демонстрирующие ограниченные возможности макроскопической оценки аортального клапана: А – низкая информативность макроскопической оценки аортального клапана при кальциевом поражении; Б – низкая информативность макроскопической оценки аортального клапана при липидном поражении; В – чувствительная и специфичная визуализация липидного и кальциевого поражения аорты.

Figure 1. Representative images of whole-mount specimens from *ApoE^{-/-}* mice demonstrating the limited utility of macroscopic assessment of the aortic valve: A – low informativeness of macroscopic evaluation of the aortic valve in calcific lesions; B – low informativeness of macroscopic evaluation of the aortic valve in lipid lesions; C – clear visualization of lipid and calcific lesions in the aorta.

Далее было проведено окрашивание серийных срезов, содержащих АК, масляным красным и ализариновым красным с целью выявления отдельных липидных капель, их скоплений (жировых пятен и жировых полос) и кальцификатов. Специфичность окрашивания подтверждалась характерным красным окрашиванием липидных капель и отложений гидроксиапатита при световой микроскопии (**рисунок 2**) и их характерным свечением в красном флюоресцентном канале при использовании соответствующих светофильтров (**рисунок 3**). В серийных срезах, окрашенных гематоксилином и эозином без использова-

ния масляного красного или ализаринового красного, данный паттерн окрашивания не наблюдался (**рисунок 4**). Хотя результаты окрашивания масляным красным и ализариновым красным можно оценивать при помощи световой микроскопии, флюоресцентная микроскопия позволяла обнаружить мелкие липидные капли и кальцификаты, неразличимые при световой микроскопии (**рисунок 3**). Поэтому в дальнейшем полуколичественный анализ площади липидного и кальциевого поражения выполняли по флюоресцентным изображениям, полученным с использованием светофильтра Fs09 – LP515.

Рисунок 2. Липидное и кальциевое поражение створок аортального клапана *ApoE*^{-/-} мышей, окрашенных 1 % масляным красным, а также 2 % ализариновым красным. Увеличение ×100 сверху, ×200 снизу.

Figure 2. Lipid and calcific lesions of aortic valve leaflets in *ApoE*^{-/-} mice stained with 1 % Oil Red O and 2 % Alizarin Red. Magnification: ×100 (top) and ×200 (bottom).

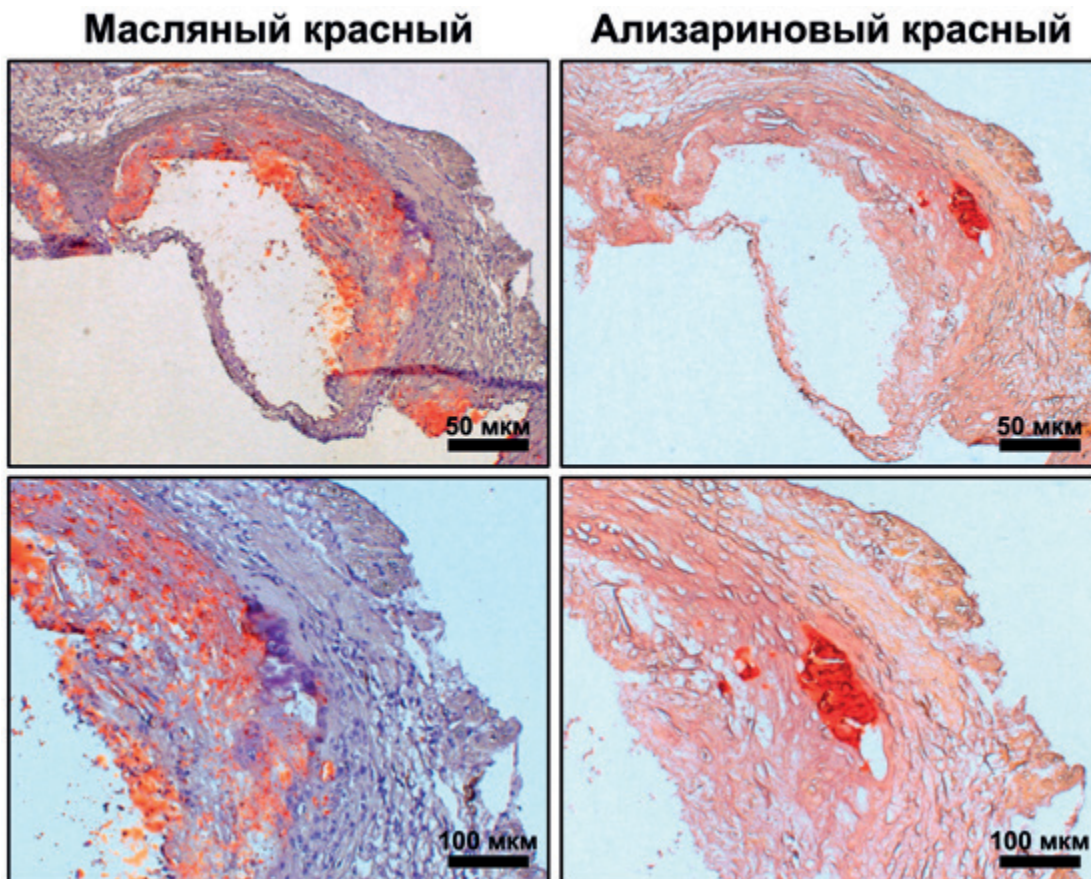
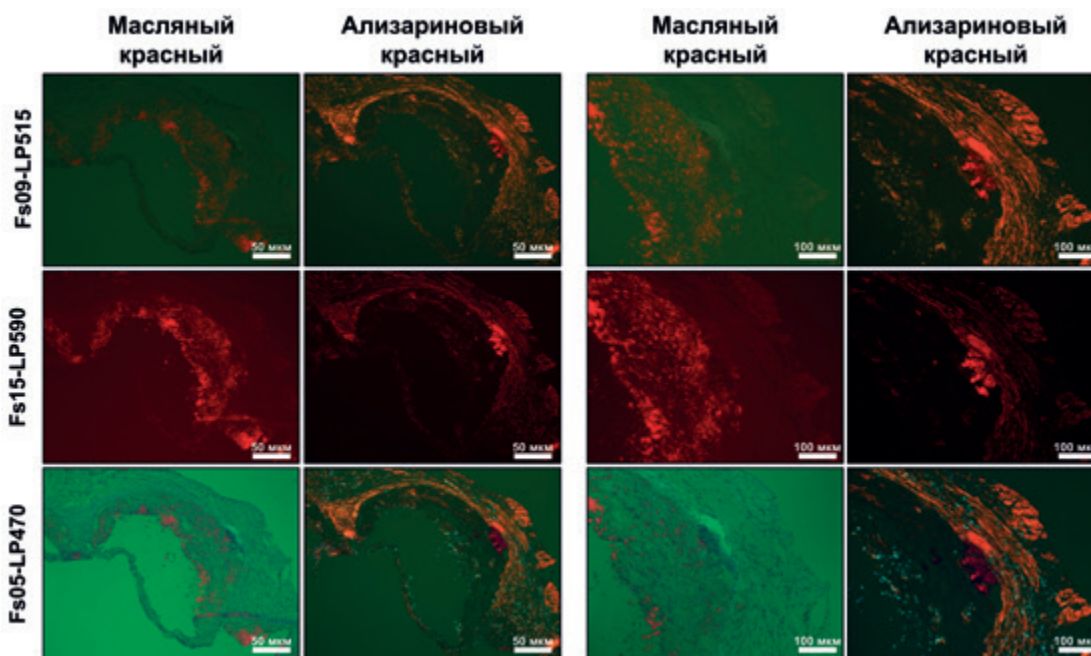


Рисунок 3. Липидное и кальциевое поражение створок аортального клапана *ApoE*^{-/-} мышей, выявленное методом флуоресцентной микроскопии. Увеличение: ×100 слева, ×200 справа; фильтры: Fs09 – LP515 и Fs15 – LP590 для визуализации липидного и кальциевого поражения, а также Fs05 – LP470 для детекции DAPI.

Figure 3. Lipid and calcific lesions of aortic valve leaflets in *ApoE*^{-/-} mice detected by fluorescence microscopy. Magnification: ×100 (left) and ×200 (right); filters: Fs09 – LP515 and Fs15 – LP590 for visualization of lipid and calcific lesions, and Fs05 – LP470 for DAPI detection.



При световой микроскопии створок АК, окрашенных масляным красным, липидное поражение выявлялось в виде очерченных включений различного калибра, неравномерно распределенных по толщине створок (рисунок 5). В отдельных участках отмечалось слияние капель,

приводящее к формированию протяженных липидных скоплений, морфологически напоминающих жировые полосы на внутренней поверхности сосуда при ранних стадиях атерогенеза (рисунок 5). Флуоресцентная микроскопия тех же срезов позволила визуализировать значитель-

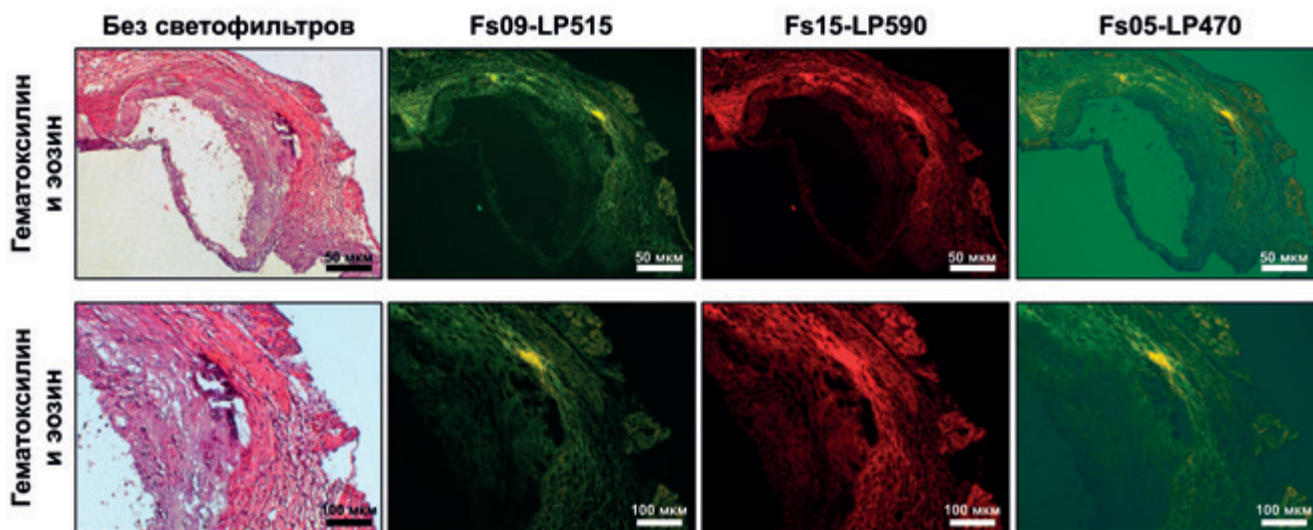


Рисунок 4.

Репрезентативные изображения серийных срезов створки аортального клапана *ApoE*^{-/-} мышей, окрашенных гематоксилином и эозином, демонстрирующие отсутствие специфического флуоресцентного сигнала от липидов и кальция при использовании светофильтров Fs09 – LP515, Fs15 – LP590 и Fs05 – LP470. Увеличение: ×100 сверху, ×200 снизу.

Figure 4.

Representative images of serial sections of aortic valve leaflets from *ApoE*^{-/-} mice stained with hematoxylin and eosin, demonstrating the absence of specific fluorescent signals from lipids and calcium when using the Fs09 – LP515, Fs15 – LP590, and Fs05 – LP470 filters. Magnification: ×100 (top), ×200 (bottom).

но большее число липидных включений, включая мелкие липидные капли, неразличимые при световой микроскопии (**рисунок 5**). При использовании светофильтра Fs09–LP515 липиды де-

монстрировали яркое красное свечение, отчетливо контрастирующее с окружающими тканями и позволяющее более точно оценить их распределение по площади створок (**рисунок 5**).

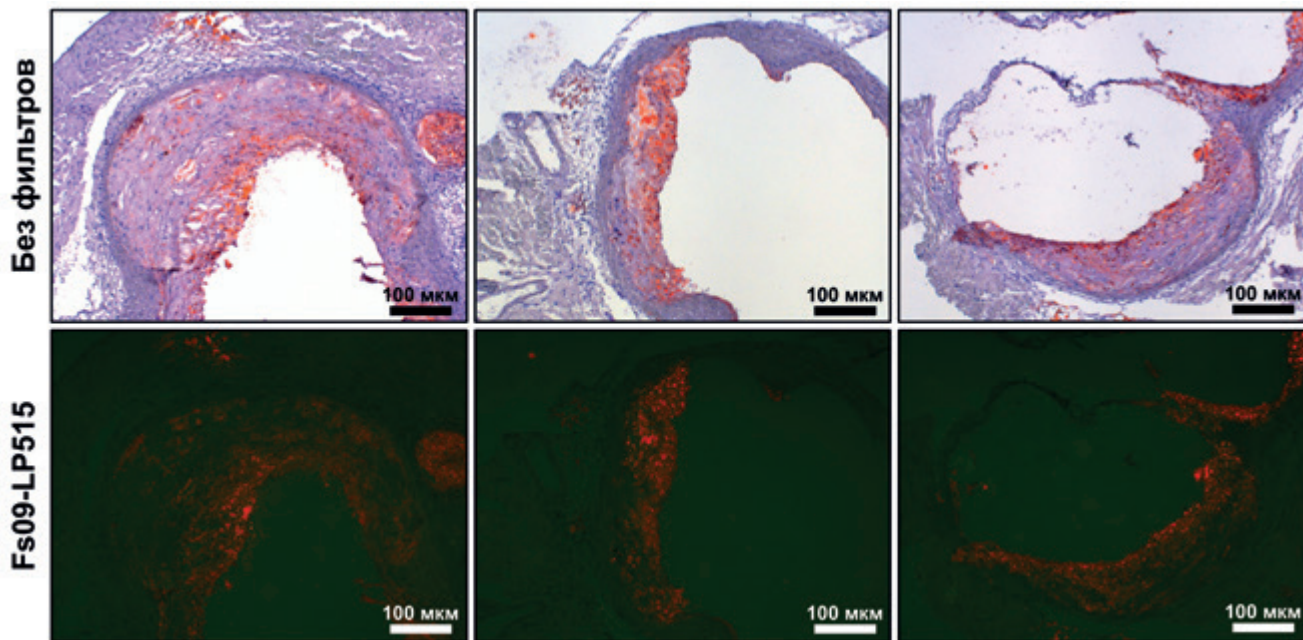


Рисунок 5.

Створки аортального клапана *ApoE*^{-/-} мышей, окрашенные масляным красным с дополнительным контрастированием гематоксилином Майера: верхний ряд – световая микроскопия, на которой видны очерченные липидные включения различного калибра и скопления липидов; нижний ряд – флуоресцентная микроскопия (светофильтр Fs09 – LP515), на которой липиды визуализируются в виде ярко-красного сигнала. Увеличение: ×200.

Figure 5.

Aortic valve leaflets of *ApoE*^{-/-} mice stained with Oil Red O with additional counterstaining with Mayer's hematoxylin. The upper row shows light microscopy images demonstrating lipid inclusions appearing as well-defined round structures of various sizes, sometimes forming elongated clusters. The lower row shows fluorescence microscopy images (Fs09 – LP515 filter), where lipids are visualized as a bright red signal. Magnification: ×200.

При флюоресцентной микроскопии створок АК $ApoE^{-/-}$ мышей выраженные липидное поражение выявлялись как у самцов, так и у самок (рисунок 6). У самцов липидные включения локализовались вдоль свободного края и по толщине створок, формируя множественные очаги разной протяженности (рисунок 6). У самок наблюдалась аналогичная картина распределения липидов, однако у отдельных животных отмеча-

лись протяженные участки липидного поражения, занимающие значительную площадь створок (рисунок 6). Несмотря на общие морфологические паттерны окрашивания, характерные для обеих групп, как у самцов, так и у самок, сохранялась выраженная индивидуальная вариабельность, проявляющаяся в неоднородности плотности и распределения липидного поражения по площади створок АК (рисунок 6).

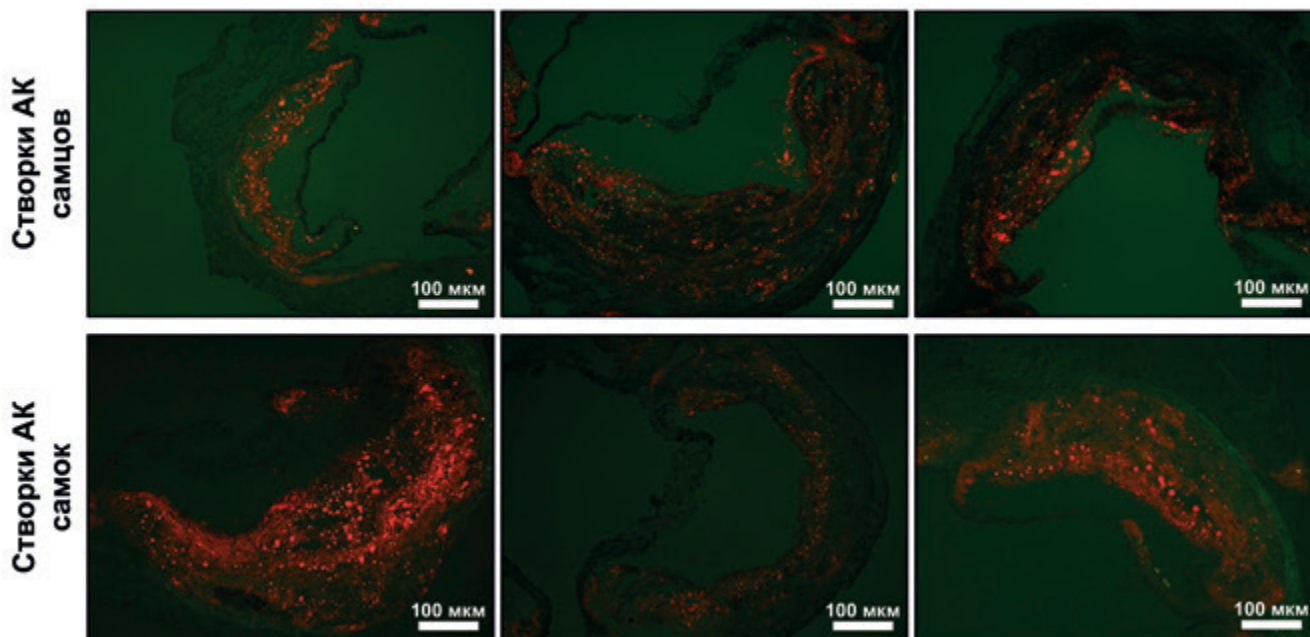


Рисунок 6.

Створки аортального клапана $ApoE^{-/-}$ мышей, окрашенных масляным красным (светофильтр Fs09–LP515). На изображениях визуализируется липидное поражение. Верхний ряд – створки аортального клапана самцов; нижний ряд – створки аортального клапана самок. Увеличение: $\times 200$.

Figure 6.

Aortic valve leaflets of $ApoE^{-/-}$ mice stained with Oil Red O (Fs09–LP515 filter). Lipid lesions are visualized in the images. The upper row shows aortic valve leaflets from males; the lower row shows aortic valve leaflets from females. Magnification: $\times 200$.

Полуколичественный анализ липидного поражения створок АК показал, что у самцов $ApoE^{-/-}$ мышей процент площади, положительно окрашенной масляным красным, был статистически значимо выше по сравнению с самками ($p = 0,002$; рисунок 7). Медиана площади липидного поражения у самцов составляла 15,58% площади створок АК (МКИ: 12,27–21,44%), тогда как у самок – 8,95% (МКИ: 7,52–10,02%). Кроме того, интенсивность окрашивания створок масляным красным была значимо выше у самцов ($p = 0,002$; рисунок 7) и составляла 69,22 (МКИ: 64,61–78,41), в сравнении с самками, где она была равна 47,17 (МКИ: 21,47–57,43).

При окрашивании створок АК ализариновым красным кальциевые включения выявлялись как плотные структуры неправильной формы различного диаметра, локализованные

во всех слоях створок (рисунок 8). В ряде случаев вокруг крупного кальцификата отмечались множественные мелкие очаги минерализации (рисунок 8). Флюоресцентная микроскопия тех же срезов позволяла выявлять как отдельные крупные кальцификаты, так и дисперсные минеральные включения, не выявляемые при световой микроскопии (рисунок 8). Данные включения визуализировались в виде пылевидных ярко-оранжевых структур, что позволяло включить их в полуколичественный анализ наряду с более крупными кальцификатами (рисунок 8).

Флюоресцентная микроскопия створок АК выявила наличие кальцификации как у самцов, так и у самок $ApoE^{-/-}$ мышей (рисунок 9). Во всех исследованных клапанах кальцификация присутствовала системно, затрагивая по крайней мере, две из трех створок, однако характер ее распределения внутри поражен-

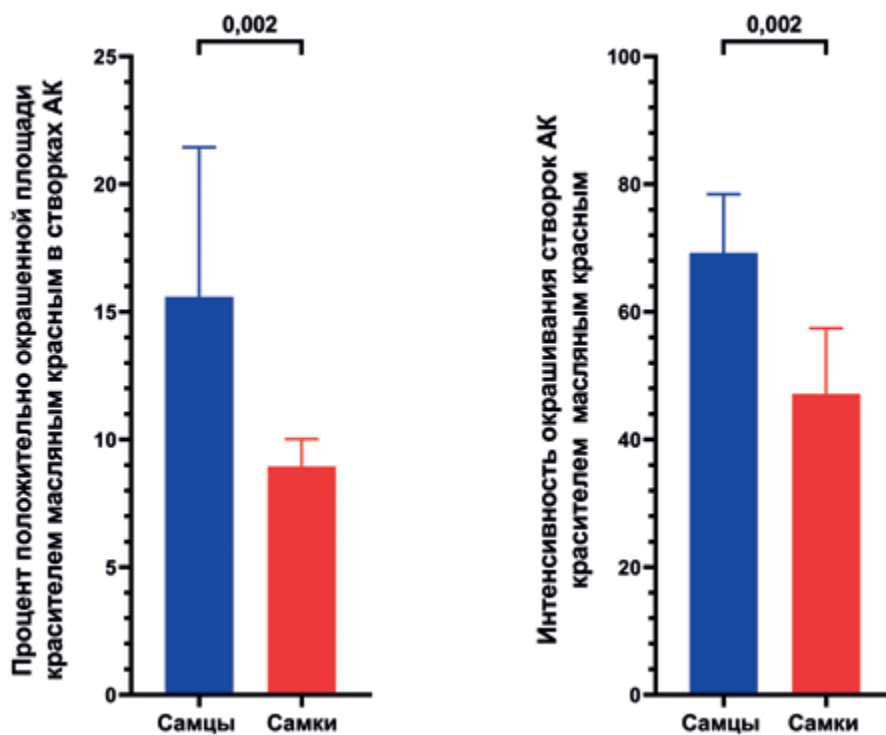


Рисунок 7. Полуколичественный анализ липидного поражения створок аортального клапана у самцов и самок. Критерий Манна-Уитни, столбчатый график, высота столбцов отражает медиану, верхние интервальные линии показывают межквартильный интервал. Значения *p* представлены над соответствующими сравнениями.

Figure 7. Semi-quantitative analysis of lipid lesions in the aortic valve leaflets in males and females. Mann-Whitney test; bar chart, bar height represents the median, and upper error bars indicate the interquartile range. *p* values are shown above the corresponding comparisons.

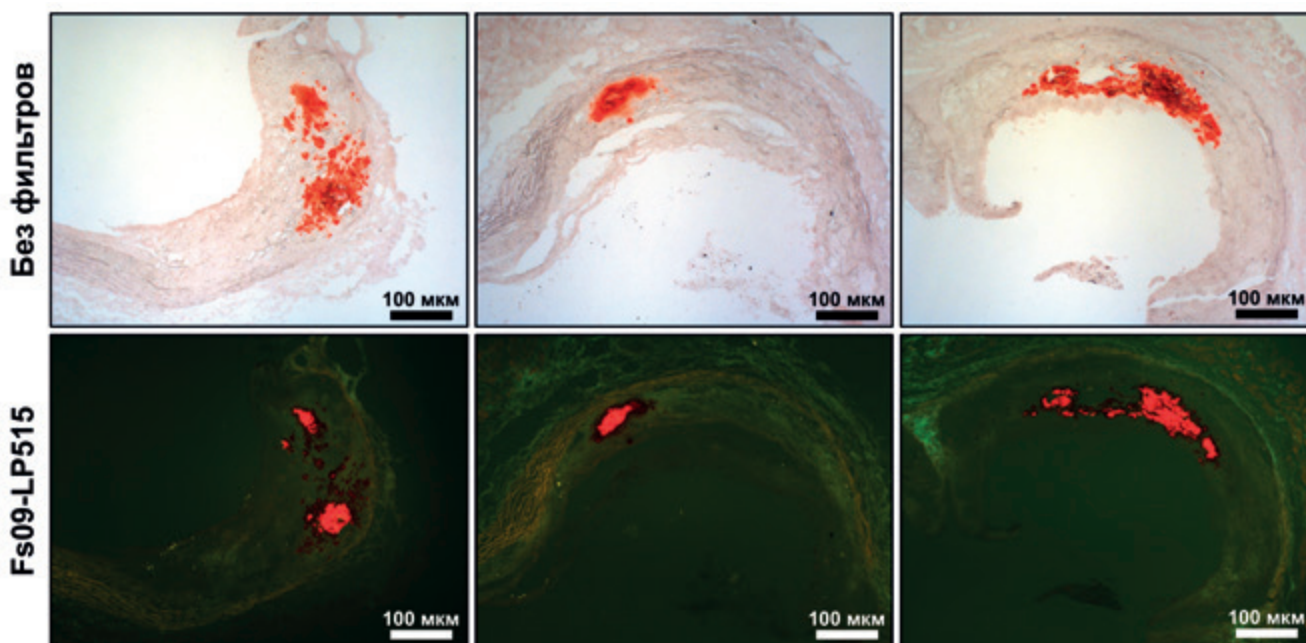


Рисунок 8. Кальцификаты в створках аортального клапана *ApoE^{-/-}* мышей, окрашенные 2% ализариновым красным. Верхний ряд – световая микроскопия, демонстрирующая кальциевые включения различного диаметра, расположенные как в поверхностных слоях створок, так и в их глубине. Нижний ряд – флуоресцентная микроскопия (светофильтр Fs09-LP515), на которой визуализируются как крупные кальцификаты, так и дисперсные минеральные включения. Увеличение: $\times 200$.

Figure 8. Calcifications in the aortic valve leaflets of *ApoE^{-/-}* mice stained with 2% Alizarin Red. The upper row shows light microscopy images demonstrating calcium deposits of different diameters located both in the superficial layers of the leaflets and in their deeper regions. The lower row shows fluorescence microscopy images (Fs09-LP515 filter), where both large calcifications and dispersed mineral deposits are visualized. Magnification: $\times 200$.

ных створок оставался неоднородным: в одних створках визуализировались компактные очаги минеральных отложений, тогда как в других наблюдалось дисперсное расположение мине-

ральных включений (рисунок 9). Кроме того, интенсивность ярко-оранжевого свечения минеральных структур варьировала как между животными, так и между створками одного кла-

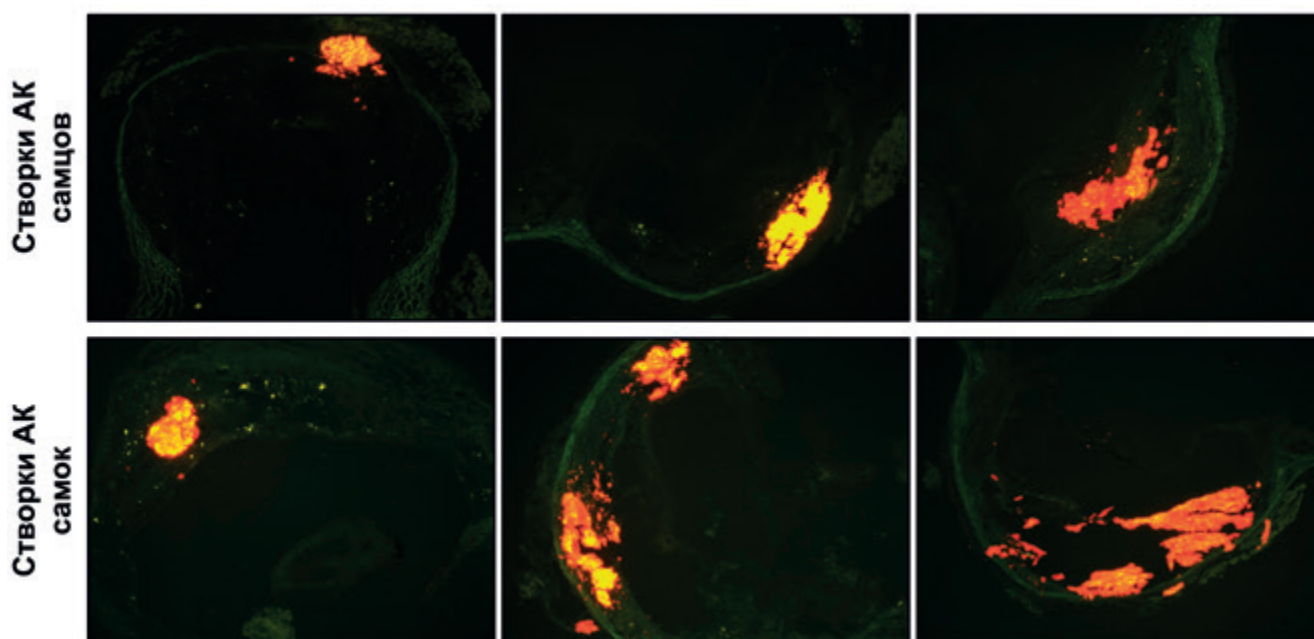


Рисунок 9.

Створки аортального клапана $ApoE^{-/-}$ мышей, окрашенные 2 % раствором ализаринового красного с использованием светофильтра Fs09-LP515. Верхний ряд – створки аортального клапана самцов; нижний ряд – створки аортального клапана самок. Увеличение: $\times 200$.

Figure 9.

Aortic valve leaflets of $ApoE^{-/-}$ mice stained with 2% Alizarin Red using the Fs09-LP515 filter. The upper row shows aortic valve leaflets from males; the lower row shows aortic valve leaflets from females. Magnification: $\times 200$.

пана, отражая различную степень кальцификации (рисунок 9).

Полуколичественная оценка кальцификации створок АК выявила сопоставимые медианные показатели у самцов и самок $ApoE^{-/-}$ мышей (рисунок 10). У самцов кальцификация занимала 4,87 % площади створок (МКИ: 3,27–9,19 %), тогда как у самок – 5,76 % (МКИ: 2,96–9,26 %). Несмотря на отсутствие статистически значимых различий ($p = 0,91$), у самок отмечалась выраженная межиндивидуальная вариабельность: в 6 случаях из 10 площадь кальцификации превышала значения, зафиксированные у 9 из 10 самцов. Эта тенденция согласуется с визуальными наблюдениями, свидетельствующими о более выраженном кальциевом поражении створок АК у части самок. Хотя интенсивность флуоресцентного сигнала также не различалась статистически между группами ($p = 0,10$), более высокие значения наблюдали у самцов (рисунок 10).

Полученные результаты демонстрируют, что у $ApoE^{-/-}$ мышей к 12-месячному возрасту формируются липидные и кальциевое поражение створок АК. При этом липидное поражение створок было более выражено у самцов, тогда как кальцификация демонстрировала тенденцию к более высоким значениям у самок. В ходе исследования выявлено диффузное липидное поражение и мно-

гочисленные гетерогенные отложения кальция, локализованные во всех слоях как минимум двух из трех створок АК у всех включенных в эксперимент животных независимо от их пола. Эти данные подтверждают пригодность как самцов, так и самок $ApoE^{-/-}$ мышей для моделирования кальцификации АК и проведения доклинических исследований фармакологических вмешательств, направленных на предотвращение прогрессирования данного процесса. Полученные различия между самцами и самками $ApoE^{-/-}$ мышей согласуются с литературными данными, указывающими на характерную для этой линии гендерную вариабельность интенсивности атерогенеза, как на стандартной, так и на атерогенной диете.

Обсуждение

В данном исследовании была проведена патоморфологическая и полуколичественная оценка липидного и кальциевого поражения створок АК у 12-месячных гиперлипидемических $ApoE^{-/-}$ мышей. Липидное поражение выявлялось в виде очерченных, интенсивно окрашенных в красный цвет включений различного калибра, неоднородно распределенных по толщине створок, с участками их слияния и формированием более протяженных липидных скоплений. Наряду с этим в створках АК определялись множественные очаги кальциевого пора-

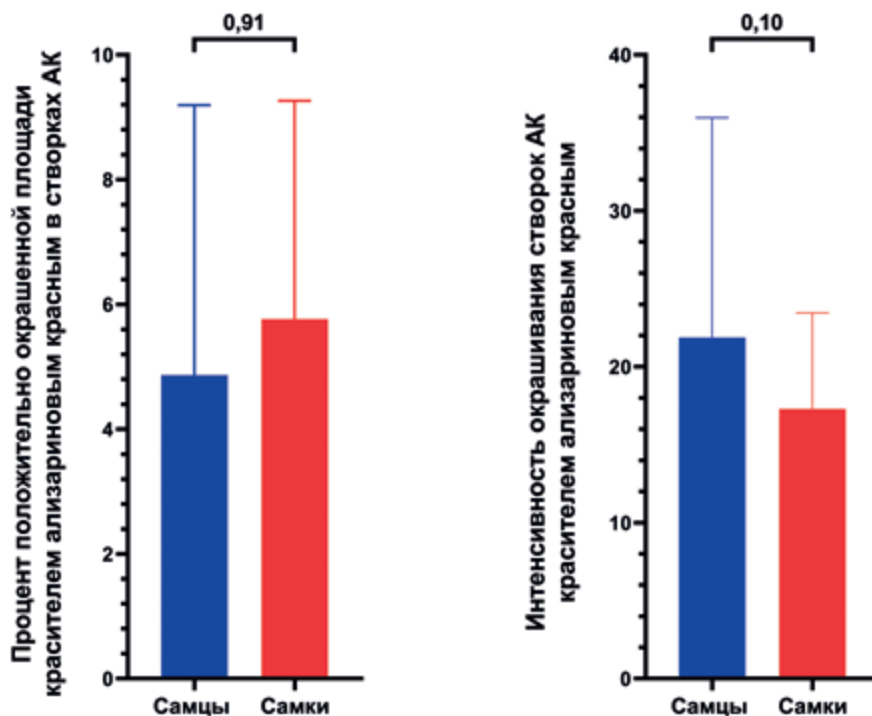


Рисунок 10. Полуколичественный анализ кальциевого поражения створок аортального клапана у самцов и самок. Критерий Манна-Уитни, столбчатый график, высота столбцов отражает медиану, верхние интервальные линии показывают межквартирный интервал. Значения p представлены над соответствующими сравнениями.

Figure 10. Semi-quantitative analysis of calcific lesions in aortic valve leaflets in male and female mice. Mann-Whitney test; bar chart, bar height represents the median, and upper error bars indicate the interquartile range. p values are shown above the corresponding comparisons.

жения, локализованные во всех слоях створок. Выявленный морфологический паттерн поражения АК во многом схож с патоморфологическими изменениями, описанными у человека при начальных стадиях КАС, для которых также характерно сочетание отложения липидов и очагов кальцификации в створках АК [4–7].

Следует отметить, что при использовании $ApoE^{-/-}$ мышей в качестве экспериментальной модели поражения АК необходимо учитывать ряд методических и биологических особенностей. Несмотря на то, что пол не рассматривается в качестве выраженного фактора риска развития КАС [1–3], современные требования к проведению доклинических исследований лекарственных средств и биоактивных веществ предусматривают использование лабораторных животных обоих полов для выявления возможных гендерных различий в эффектах исследуемых вмешательств [13]. Кроме того, различия в динамике развития атеросклеротического поражения аорты у самцов и самок $ApoE^{-/-}$ мышей могут оказывать влияние на возраст животных, включаемых в исследование [12]. С точки зрения изучения поражения АК представляется целесообразным анализировать динамику липидного и кальциевого поражения клапана у $ApoE^{-/-}$ мышей различного пола в различные возрастные периоды, однако проведение исследования в подобном формате требует значительного времени для получения необходимого количества животных. В связи с этим в рамках

настоящего исследования для апробации методики анализ был ограничен использованием 12-месячных самцов и самок $ApoE^{-/-}$ мышей.

К важным методическим аспектам применения данной модели относятся несколько обстоятельств. Во-первых, у 12-месячных самок $ApoE^{-/-}$ мышей липидное и кальциевое поражение АК, как правило, выражено более значительно, по сравнению с самцами, что необходимо учитывать при использовании данной модели в экспериментальных исследованиях [13]. Во-вторых, для корректной оценки липидного и кальциевого поражения АК требуется проведение патоморфологического анализа криосрезов. Поскольку использование стандартной парафиновой проводки не позволяет надежно выявлять липидные отложения, в процессе дегидратации и обработки тканей органическими растворителями липиды экстрагируются, что делает невозможной объективную оценку липидной нагрузки в створках АК. В связи с этим необходима быстрая заморозка выделенных комплексов дуги аорты с фрагментом левого желудочка, содержащим АК, с последующим приготовлением серийных криосрезов и их окрашиванием масляным красным или другим липофильным красителем для выявления липидного поражения и ализариновым красным для оценки кальциевого поражения. В-третьих, макроскопическая оценка окрашенных комплексов дуги аорты с фрагментом левого желудочка, содержащим АК, с последующей ма-

кросъемкой является недостаточной, поскольку не позволяет выявлять липидные и кальциевые отложения вследствие ограниченного объема поражения створок АК. В-четвертых, для повышения специфичности и чувствительности выявления липидных капель и кальциевых отложений существенное значение имеет применение флюоресцентной микроскопии с использованием соответствующих светофильтров.

Принципиальной особенностью использования *ApoE^{-/-}* мышей в возрасте 12–24 месяцев в качестве экспериментальной модели является отсутствие у них сформированного КАС при наличии выраженного липидного поражения и множественных очагов кальциевого поражения створок АК, затрагивающих от двух до трех створок. В связи с этим данная модель представляется перспективной для проведения доклинических исследований, направленных на профилактику кальцификации АК, однако

ее применение для испытаний терапевтических вмешательств, направленных на лечение сформированного КАС, представляется ограниченным.

Заключение

Проведенное исследование показало, что у гиперлипидемических *ApoE^{-/-}* мышей в возрасте 12 месяцев формируются выраженное липидное поражение и множественные гетерогенные микрокальцификаты створок АК, локализованные во всех слоях как минимум двух из трех створок. Указанные изменения выявлялись у всех включенных в исследование животных независимо от пола. Полученные данные свидетельствуют о пригодности самцов и самок *ApoE^{-/-}* мышей в качестве экспериментальной модели для проведения доклинических исследований, направленных на профилактику кальцификации АК и прогрессирования КАС.

Вклад авторов

Л. А. Богданов: написание статьи.

А. Ю. Канонькина: сбор и анализ полученных данных

Е. А. Кондратьев: сбор и анализ полученных данных

А. Е. Тюрина: сбор и анализ полученных данных

Е.С. Изотова: сбор и анализ полученных данных

А.Г. Кутихин: планирование и координация работы, анализ полученных данных, написание статьи.

Все авторы утвердили окончательную версию статьи.

Author contributions

Leo A. Bogdanov: wrote the manuscript.

Anastasia Yu. Kanonykina: collected the data; performed the data analysis

Egor A. Kondratiev: collected the data; performed the data analysis

Arina E. Tyurina: collected the data; performed the data analysis

Elizaveta S. Izotova: collected the data; performed the data analysis

Anton G. Kutikhin: conceived and designed the study; performed the data analysis; wrote the manuscript.

All authors approved the final version of the article.

Литература :

1. Yadgir S., Johnson C.O., Aboyans V., Adebayo O.M., Adedoyin R.A., Afarideh M., et al. Global, regional, and national burden of calcific aortic valve and degenerative mitral valve diseases, 1990–2017. *Circulation*. 2020;141(21):1670–1680. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043391>
2. Coffey S., Roberts-Thomson R., Brown A., Carapetis J., Chen M., Enriquez-Sarano M., et al. Global epidemiology of valvular heart disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 2021;18(12):853–864. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00570-z>
3. Yi B., Zeng W., Lv L., Hua P. Changing epidemiology of calcific aortic valve disease: 30-year trends of incidence, prevalence, and deaths across 204 countries and territories. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(9):12710–12713. <https://doi.org/10.18632/aging.202942>
4. Lindman B.R., Clavel M.A., Mathieu P., Jung B., Lancellotti P., Otto C.M., et al. Calcific aortic stenosis. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2016;2:16006. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.6..>
5. Peeters F.E.C.M., Meex S.J.R., Dweck M.R., Aikawa E., Crijns H.J.G.M., Schurgers L.J., et al. Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart: A biomolecular approach towards diagnosis and treatment. *Eur. Heart J.* 2018;39(28):2618–2624. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx653>
6. Kostyunin AE, Yuzhalin AE, Ovcharenko EA, Kutikhin AG. Development of calcific aortic valve disease: do we know enough for new clinical trials? *J Mol Cell Cardiol.* 2019;132:189–209. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2019.05.016>.
7. Moncla L.M., Briand M., Bossé Y., Mathieu P. Calcific aortic valve disease: mechanisms, prevention and treatment. *Nat. Rev. Cardiol.* 2023;20(8):546–559. <https://doi.org/10.1038/s41569-023-00845-7>
8. Lindman B.R., Sukul D., Dweck M.R., Madhavan M.V., Arsenault B.J., Coylewright M., et al. Evaluating medical therapy for calcific aortic stenosis: JACC state-of-the-art review. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2021;78(23):2354–2376. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.09.1367>
9. Bogdanova M., Zabinnyk A., Malashicheva A., Semenova D., Kvitting J.E., Kaljusto M.L., et al. Models and techniques to study aortic valve calcification in vitro, ex vivo and in vivo: an overview. *Front. Pharmacol.* 2022;13:835825. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.835825>
10. Zhang S.H., Reddick R.L., Piedrahita J.A., Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992;258(5081):468–471. <https://doi.org/10.1126/science.1411543>
11. Богданов Л.А., Шишкова Д.К., Кутихин А.Г. Сравнение различных типов прогрессивных гематоксилинов для окрашивания элементов кровообращения и гепатолиенальной системы. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019;39(6):46–54. <https://doi.org/10.15372/SMMJ20190606>
12. Tanaka K., Sata M., Fukuda D., Suematsu Y., Motomura N., Takamoto S., et al. Age-associated aortic stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005;46(1):134–141. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.03.058>

13. Man J.J., Beckman J.A., Jaffe I.Z. Sex as a Biological Variable in Atherosclerosis. *Circ. Res.* 2020;126(9):1297–319. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.315930>

References:

1. Yadgir S, Johnson CO, Aboyans V, Adebayo OM, Adedoyin RA, Afarideh M, et al. Global, regional, and national burden of calcific aortic valve and degenerative mitral valve diseases, 1990–2017. *Circulation.* 2020;141(21):1670–1680. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043391>
2. Coffey S, Roberts-Thomson R, Brown A, Carapetis J, Chen M, Enriquez-Sarano M, et al. Global epidemiology of valvular heart disease. *Nat Rev Cardiol.* 2021;18(12):853–864. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00570-z>
3. Yi B, Zeng W, Lv L, Hua P. Changing epidemiology of calcific aortic valve disease: 30-year trends of incidence, prevalence, and deaths across 204 countries and territories. *Aging (Albany NY).* 2021;13(9):12710–12713. <https://doi.org/10.18632/aging.202942>
4. Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, Iung B, Lancellotti P, Otto CM, et al. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16006. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.6>
5. Peeters FECM, Meex SJR, Dweck MR, Aikawa E, Crijns HJGM, Schurgers LJ, et al. Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart: A biomolecular approach towards diagnosis and treatment. *Eur Heart J.* 2018;39(28):2618–2624. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx653>
6. Kostyunin AE, Yuzhalin AE, Ovcharenko EA, Kutikhin AG. Development of calcific aortic valve disease: do we know enough for new clinical trials? *J Mol Cell Cardiol.* 2019;132:189–209. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.05.016>
7. Moncla LM, Briend M, Bossé Y, Mathieu P. Calcific aortic valve disease: mechanisms, prevention and treatment. *Nat Rev Cardiol.* 2023;20(8):546–559. <https://doi.org/10.1038/s41569-023-00845-7>
8. Lindman BR, Sukul D, Dweck MR, Madhavan MV, Arsenault BJ, Coylewright M, et al. Evaluating medical therapy for calcific aortic stenosis: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol.* 2021;78(23):2354–2376. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.09.1367>
9. Bogdanova M, Zbirnyk A, Malashicheva A, Semenova D, Kvitting JE, Kaljusto ML, et al. Models and techniques to study aortic valve calcification in vitro, ex vivo and in vivo: an overview. *Front Pharmacol.* 2022;13:835825. (In Russ.). <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.835825>
10. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* 1992;258(5081):468–471. <https://doi.org/10.1126/science.1411543>
11. Bogdanov LA, Shishkova DK, Kutikhin AG. Comparison of different types of progressive hematoxylin for staining elements of the circulatory system and hepatolienal system. *Sibirskii nauchnyi meditsinskii zhurnal.* 2019;39(6):46–54. (In Russ.). <https://doi.org/10.15372/SSMJ20190606>
12. Tanaka K., Sata M., Fukuda D., Suematsu Y., Motomura N., Takamoto S., et al. Age-associated aortic stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(1):134–141. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.03.058>
13. Man JJ, Beckman JA, Jaffe IZ. Sex as a Biological Variable in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2020;126(9):1297–1319. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.315930>

Сведения об авторах

Богданов Лев Александрович, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

ORCID: 0000-0003-4124-2316

Канонькина Анастасия Александровна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

ORCID: 0000-0003-2810-3100

Кондратьев Егор Андреевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

ORCID: 0009-0002-1834-6045

Тюрина Арина Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

ORCID: 0009-0002-6293-6974

Изотова Елизавета Сергеевна, аспирант Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

ORCID: 0009-0008-8676-1789

Кутихин Антон Геннадьевич ✉, доктор медицинских наук, заведующий отделом экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

ORCID: 0000-0001-8679-4857

Authors

Dr. Leo A. Bogdanov, Cand. Sci. (Biology), Researcher, Laboratory for Molecular, Translational and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.

ORCID: 0000-0003-4124-2316

Ms. Anastasia A. Kanonykina, BSc, Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.

ORCID: 0000-0003-2810-3100

Mr. Egor A. Kondratiev, BSc, Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.

ORCID: 0009-0002-1834-6045

Ms. Arina E. Tyurina, BSc, Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.

ORCID: 0009-0002-6293-6974

Ms. Elizaveta S. Izotova, PhD Student, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.

ORCID: 0009-0008-8676-1789

Dr. Anton G. Kutikhin ✉, MD, Dr. Sci. (Medicine), Head of the Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.

ORCID: 0000-0001-8679-4857