

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В АОРТЕ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА И ВОЗМОЖНОСТИ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ КОРРЕКЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

М.П.Рубанова, С.В.Жмайлова, А.Н.Кулик, В.Е.Карев*, И.А.Атаев, Е.Е.Румянцев

EXPERIMENTAL STUDY OF AORTA EXTRACELLULAR MATRIX REMODELING IN DIFFERENT VARIANTS OF CHRONIC STRESS AND ITS MEDICAMENTAL CORRECTION

M.P.Rubanova, S.V.Zhmailova, A.N.Kulik, V.E.Karev*, I.A.Ataev, E.E.Rumiantsev

*Институт медицинского образования НовГУ, kafpdo@mail.ru
НИИ детских инфекций, Санкт-Петербург

Статья посвящена изучению особенностей ремоделирования внеклеточных пространств меди брюшного отдела аорты при моделировании адренергического и холинергического вариантов хронического стресса. Авторами показано, что при обоих вариантах хронического стресса отмечается значительное увеличение объема внеклеточных пространств в стенке брюшного отдела аорты, и оно продолжает сохраняться и в течение месяца по окончании моделирования стресса. Содержание эластина в меди аорты при обоих вариантах хронического стресса уменьшается как через 2 недели введения препаратов, так и через месяц после окончания эксперимента, что сопровождается выраженной дезорганизацией, уменьшением количества слоев эластических мембран, множественной их фрагментацией. Протективного эффекта энапа на ремоделирование внеклеточных пространств в меди аорты при моделировании обоих вариантов хронического стресса не выявлено, кроме того, при хроническом адренергическом стрессе объем ВКП под влиянием энапа даже увеличивается, что можно объяснить снижением АД и колоссальными изменениями эластиновой сети в стенке аорты.

Ключевые слова: *внеклеточные пространства, ремоделирование, эластин, адренергический стресс, холинергический стресс, энап*

In this article we studied the remodeling of extracellular spaces in abdominal aorta media in adrenergic and cholinergic variants of chronic stress. The results have shown that in both variants of chronic stress there was a significant increase of extracellular spaces volume in abdominal aorta wall and it persisted for 1 month after termination of stress simulation. The content of elastin in the aorta media in both variants of chronic stress decreased after 2 weeks of drug administration, and a month after the end of experiment, which is accompanied by severe disorganization, decrease in the number of layers of elastic membranes, and multiple fragmentation. Protective effect of Enap on remodeling of extracellular spaces in the aorta media in both variants of chronic stress hasn't been revealed. After 2 weeks of Enap administration in chronic adrenergic stress model the extracellular spaces volume even increases which can be explained by decrease in blood pressure and severe changes of elastin network in the aortic wall.

Keywords: *extracellular spaces, remodeling, elastin, adrenergic stress, cholinergic stress, Enap*

Аорта является органом-мишенью при стрессо-буловленных заболеваниях, как то: артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, атеросклероз аорты. Известно, что межклеточная (интерстициальная) жидкость играет важнейшую роль промежуточной среды, через которую осуществляется двусторонний обмен веществами (вода, органические и неорганические вещества) между кровью и клетками других тканей [1,2]. Самые ранние проявления ремоделирования в ткани начинаются во внеклеточном матриксе, и самые первоначальные изменения происходят именно в жидкостных пространствах. Представляет интерес исследование изменений внеклеточного матрикса в аорте при различных вариантах стресса.

Цель исследования: изучить изменения внеклеточного матрикса в стенке брюшного отдела аорты при моделировании хронического адренергического и хронического холинергического стресса в эксперименте и возможности медикаментозной коррекции энапом.

Материал и методы

Эксперимент проводился на крысах-самцах линии Вистар, сопоставимых по возрасту и массе

(200±20г). Животные содержались в помещении с температурой воздуха 22°C с 12-часовым циклом свет/темнота и имели свободный доступ к воде и пище.

Экспериментальное исследование проводилось в соответствии с Европейской конвенцией о защите животных, используемых в эксперименте (Директива 86/609/ЕЕС). Протокол эксперимента, содержание животных и выведение их из опыта были составлены в соответствии с принципами биоэтики, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и приказе МЗ РФ №267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики».

В эксперименте создавались модели двух вариантов стресса — хронического адренергического стресса (ХАС) и хронического холинергического стресса (ХХС). Моделирование обоих вариантов стресса производилось путем интраперитонеального введения лекарственных препаратов, дозы которых были максимальными терапевтическими для человека в пересчете на килограмм массы тела. Главным условием было отсутствие при данной дозе препарата некроза кардиомиоцитов.

В I серии эксперимента при моделировании хронического адренергического стресса 20 крысам на протяжении 2 недель три раза в сутки интраперитонеально вводился адреналин из расчета 50 мкг/кг.

Во II серии эксперимента при моделировании хронического холинергического стресса 20 крысам на протяжении 2 недель три раза в сутки интраперитонеально вводился антихолинэстеразный препарат прозерин из расчета 20 мкг/кг.

Кроме того, при экспериментальном исследовании оценивались возможности протективного действия ингибитора ангиотензин-превращающего фермента на структурное ремоделирование стенки брюшной аорты при моделировании ХАС и ХХС. В качестве ингибитора ангиотензин-превращающего фермента нами был выбран препарат энап для внутривенного введения. Фармакодинамика энапа не зависит от способа введения (интраперитонеального или внутривенного), так как энап Р, используемый нами в эксперименте, содержит действующее вещество эналаприлат — метаболит эналаприла, не требующий метаболизма в печени [3].

В III серии эксперимента создавалась модель ХАС с коррекцией энапом: 10 крысам на протяжении 2 недель три раза в сутки одновременно интраперитонеально вводились адреналин в дозе 50 мкг/кг и ингибитор ангиотензин-превращающего фермента для внутривенного введения энап (эналаприлат) в дозе 20 мкг/кг.

В IV серии эксперимента создавалась модель ХХС с коррекцией энапом: 20 крысам на протяжении 2 недель три раза в сутки одновременно интраперитонеально вводились прозерин в дозе 20 мкг/кг и энап (эналаприлат) в дозе 20 мкг/кг.

Через 2 недели введения препаратов под эфирным наркозом проводилась декапитация 10 животных из каждой серии эксперимента, и осуществлялся забор материала на исследование. Оставшиеся 10 крыс I и II серий эксперимента после прекращения двухнедельного введения препаратов в течение месяца содержались в обычных условиях без каких-либо медикаментозных и стрессовых воздействий, после чего под эфирным наркозом также проводилась декапитация животных и забор материала на исследование.

Контрольную серию составили 20 крыс, сопоставимых по возрасту и массе (200 ± 20 г). Крысы контрольной серии содержались в отдельном помещении и не подвергались никаким медикаментозным и стрессовым воздействиям. 10 крыс контрольной серии через 2 недели и 10 крыс контрольной серии через месяц от начала эксперимента под эфирным наркозом декапитировались и производился забор материала на исследование.

Кусочки стенки брюшной аорты фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина, дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике с последующим изготовлением срезов ткани толщиной 4 мкм. Парафиновые срезы, окрашенные по Ван Гизону, исследовались с использованием светоптического бинокулярного микроскопа Axioscope A1 (Carl Zeiss, Германия). В 9 полях зрения ($0,42 \times 0,32$ мм, площадь кадра $0,13$ мм²) при увеличении $\times 400$ у каждой крысы в медиі брюшного отдела аорты во всех сериях экспе-

римента с помощью сетки Г.Г.Автандилова [4] производился подсчет в объемных процентах (об.%) объема внеклеточных пространств (ВКП).

Для исследования изменения эластинового каркаса аорты парафиновые срезы окрашивали орсеином по Шиката. Морфометрия парафиновых срезов, окрашенных орсеином, проводилась планиметрическим методом. Относительный объем структур оценивался по относительной площади, занимаемой ими на фотографиях микропрепаратов. Относительная площадь структур измерялась с подсчетом с помощью сетки Автандилова. Измерения проводились в 11 полях зрения ($1,08 \times 0,81$ мм, площадь кадра $0,87$ мм²) при увеличении $\times 400$ у каждой крысы во всех сериях эксперимента. Производился подсчет в объемных процентах (об.%) объема эластина в средней оболочке брюшной аорты.

При статистической обработке полученных данных из методов непараметрической статистики нами использовался метод сравнения данных по медиане ($M \pm Sd$) — критерий Фридмана с коэффициентом конкордации Кэндалла. Для визуализации полученных результатов исследования нами широко использовался графико-аналитический метод. Весь статистический анализ проводился с использованием программы STATISTICA 99 (с) 1997 by Stat Soft, Inc.

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ полученных результатов исследования по критерию Фридмана с коэффициентом конкордации Кэндалла показал, что при моделировании ХАС объем ВКП в средней оболочке аорты через 2 недели введения адреналина (рис.1,2) увеличился на 1,6 раза по сравнению с объемом ВКП (с $M = 13,06 \pm 6,86$ об.% в контрольной серии до $M = 21,03 \pm 7,06$ об.% через 2 недели; $\chi^2 = 10,939$; $p < 0,0009$).

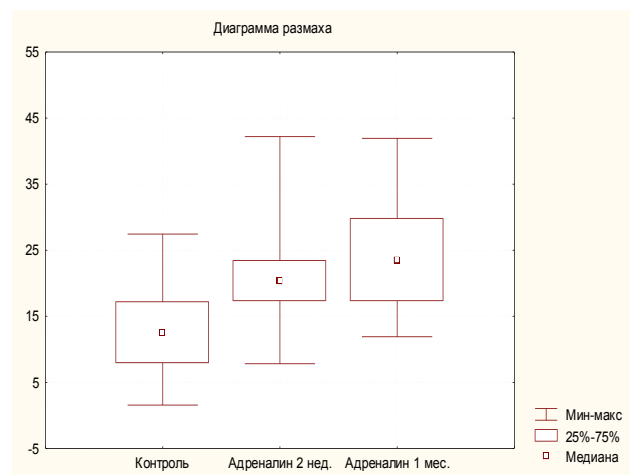


Рис.1. Динамика объема ВКП (в об.%) в медиі брюшного отдела аорты при моделировании хронического адренергического стресса (через 2 недели и 1 месяц) по сравнению с контрольной серией

Через месяц после прекращения введения адреналина (рис.1,3) объем ВКП в медиі аорты оставался высоким ($M = 24,14 \pm 7,55$ об.%), практически таким же, как через 2 недели введения адреналина ($M = 21,03 \pm 7,06$ об.%), $p > 0,05$).

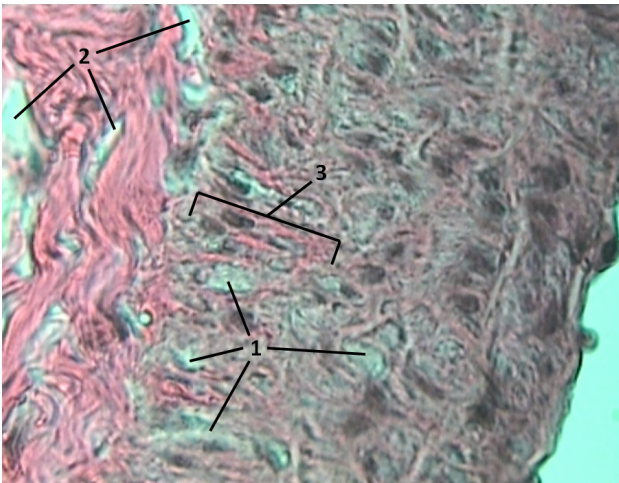


Рис.2. Стенка аорты через 2 недели введения адреналина, ув.×400, окраска по Ван Гизону. Отмечается выраженный отек меди и адвентиции. 1 — отек меди; 2 — отек адвентиции; 3 — фиброзные изменения в наружных слоях меди

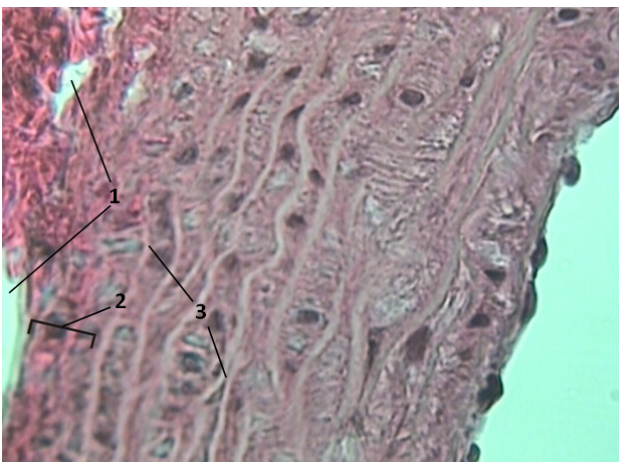


Рис.3. Стенка аорты через месяц после двухнедельного введения адреналина, ув.×400, окраска по Ван Гизону. 1 — отрыв адвентиции; 2 — фиброзные изменения в наружных слоях меди; 3 — расщепленные эластические мембраны меди

Таким образом, в меди аорты через 2 недели введения адреналина по сравнению с контрольной серией объем ВКП значительно увеличился и сохранялся на высоких значениях и через месяц после прекращения введения препарата, т. е. регресса ремоделирования внеклеточных пространств не происходило.

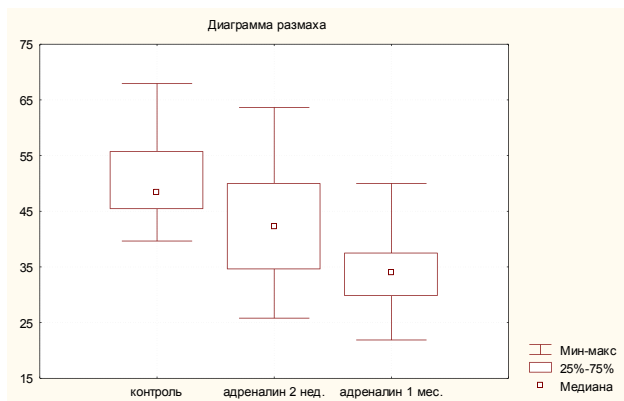


Рис.4. Динамика плотности эластина в меди брюшного отдела аорты через 2 недели введения адреналина и через месяц после прекращения моделирования ХАС по сравнению с контрольной серией

Исследование изменений плотности эластина при моделировании ХАС показало, что через 2 недели введения адреналина (рис.4,6) плотность эластина в стенке брюшной аорты значительно уменьшилась по сравнению с контрольной серией (рис.5) с $M = 49,87 \pm 7,19$ об.% в контрольной серии до $M = 39,12 \pm 10,19$ об.% через 2 недели ($\chi^2 = 8,000$, $p < 0,0047$). Через месяц после прекращения моделирования ХАС (рис.4,7) плотность эластина в меди брюшного отдела аорты продолжала уменьшаться и достигла значений $M = 34,37 \pm 6,55$ об.%, что достоверно меньше, чем в контрольной серии ($\chi^2 = 20,161$; $p < 0,0001$).

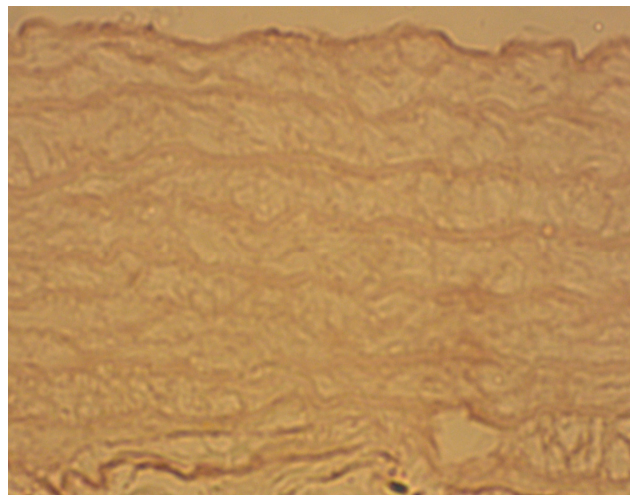


Рис.5. Стенка брюшной аорты крысы контрольной серии, ув.×400 (размеры поля зрения 1,08×0,81 мм, площадь 0,87 мм²), окраска орсеином по Шиката. Эластические волокна в меди организованы в концентрические эластические мембраны, между которыми проходят тонкие эластиновые мостики

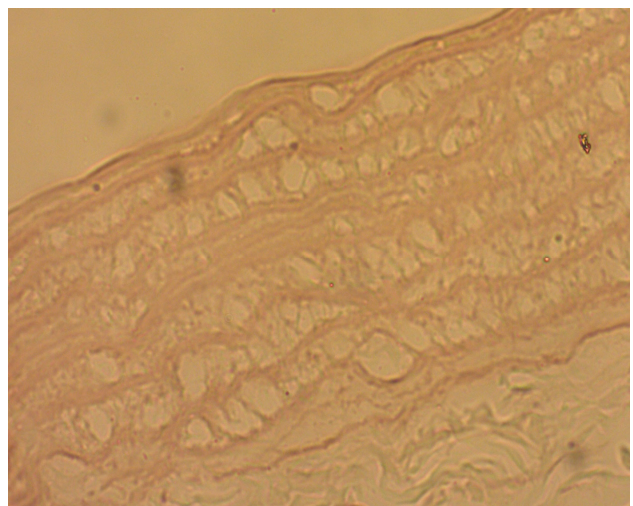


Рис.6. Стенка брюшной аорты крысы после 2 недель введения адреналина, ув. ×400 (размеры поля зрения 1,08×0,81 мм, площадь 0,87 мм²), окраска орсеином по Шиката. Отмечаются утолщение, прерывистость эластических мембран, неравномерность их расположения

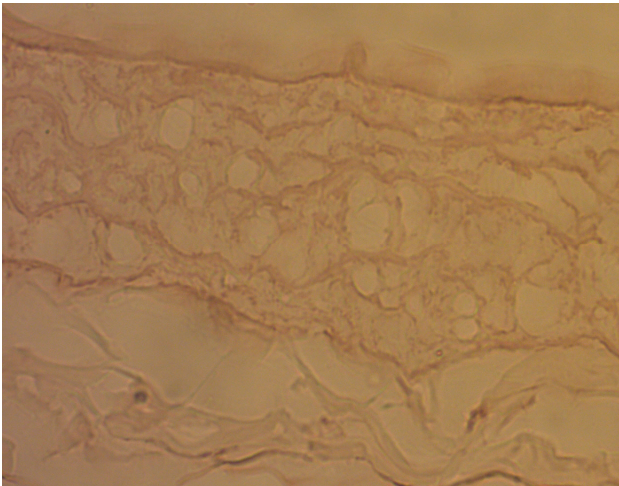


Рис.7. Стенка брюшной аорты крысы через месяц после отмены адреналина, ув. $\times 400$ (размеры поля зрения $1,08 \times 0,81$ мм, площадь $0,87 \text{ мм}^2$), окраска орсеином по Шиката. Отмечаются уменьшение количества слоев эластических мембран, выраженная дезорганизация, деструкция эластических мембран, уменьшение содержания эластина в меди

Число препаратов, в которых плотность эластина достигала значений 40 об.% и более, в контрольной серии крыс составило 96,7%, а через 2 недели введения адреналина — 57,7% ($\chi^2 = 2,5280$; $p > 0,05$). Через месяц после прекращения эксперимента количество эластина продолжало уменьшаться, и число препаратов с плотностью эластина ≥ 40 об.% уменьшилось до 15,2%, что значительно меньше, чем в контрольной серии ($\chi^2 = 26,429$; $p < 0,0001$) и контрольной точки 2 недели ($\chi^2 = 12,028$; $p < 0,0001$).

Другими словами, содержание эластина через месяц после окончания эксперимента продолжало уменьшаться и деструктивные процессы во внеклеточном матриксе продолжали нарастать. Помимо количественных различий при визуализации препаратов через месяц наблюдалась еще более выраженная дезорганизация эластических мембран (ЭМ), множественная их фрагментация, уменьшение количества слоев ЭМ в меди брюшной аорты.

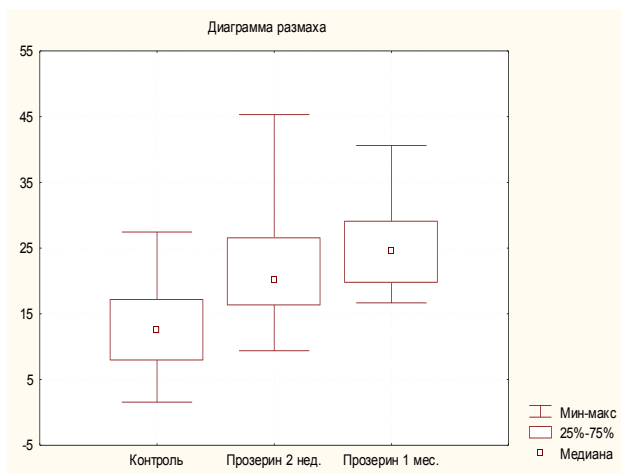


Рис.8. Динамика объема ВКП (в об.%) в меди брюшного отдела аорты при моделировании хронического холинергического стресса (через 2 недели и 1 месяц) по сравнению с контрольной серией

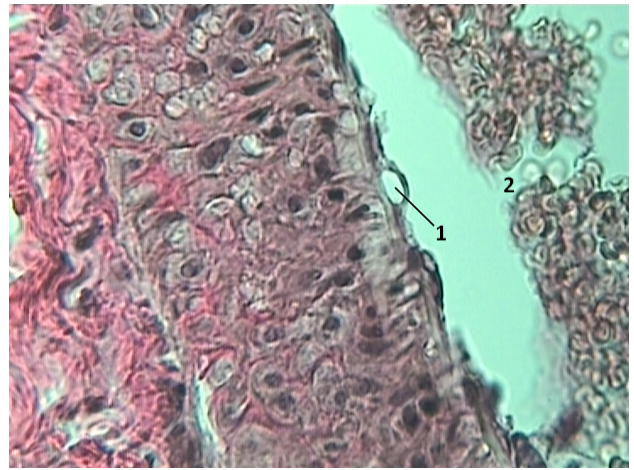


Рис.9. Стенка аорты после двухнедельного введения прозерина, ув. $\times 400$, окраска по Ван Гизону. Отмечается выраженный отек всех слоев стенки аорты. 1 — скопление жидкости под эндотелиоцитом (вероятно, предшествующее десквамации); 2 — эритроциты вблизи интимы

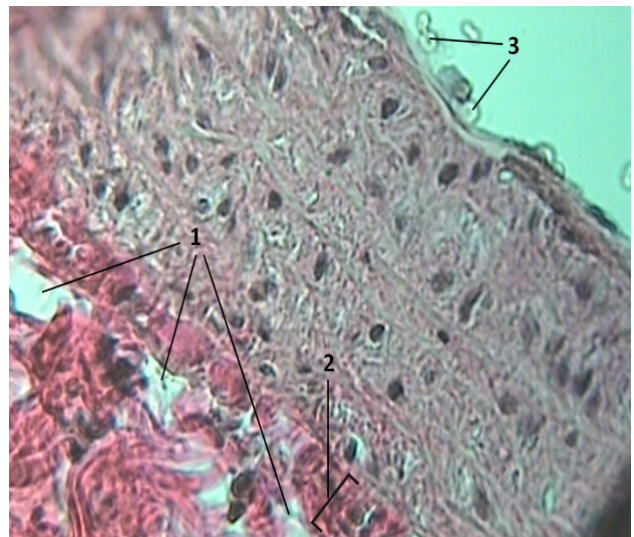


Рис.10. Стенка аорты через месяц после двухнедельного введения прозерина, ув. $\times 400$, окраска по Ван Гизону. Отмечается выраженный отек меди и адвентиции. 1 — отрыв адвентиции; 2 — фиброзные изменения в наружных слоях меди; 3 — эритроциты вблизи поверхности интимы

Такая выраженная деградация эластинового каркаса создает условия для увеличения содержания жидкости в стенке аорты.

При моделировании ХХС через 2 недели введения прозерина (рис.8,9) медиана объема ВКП в меди аорты увеличилась (с $M = 13,06 \pm 6,86$ об.% в контрольной серии до $M = 21,89 \pm 7,73$ об.%, $\chi^2 = 13,364$; $p < 0,0003$), т. е. в 1,7 раза. Через месяц после прекращения моделирования ХХС (рис.8,10) объем ВКП составил $M = 25,60 \pm 6,78$ об.%, что было сопоставимо со значениями объема ВКП через 2 недели, но достоверно выше значений контрольной серии ($M = 13,06 \pm 6,86$ об.%, $\chi^2 = 26,471$; $p < 0,00001$).

Таким образом, в средней оболочке аорты через 2 недели введения прозерина отмечалось увеличение внеклеточных пространств, которое сохранялось и через месяц после прекращения введения препарата. При этом изменения объема ВКП при моделировании хронического холинергического стресса

были сопоставимы с изменениями ВКП при хроническом адренергическом стрессе.

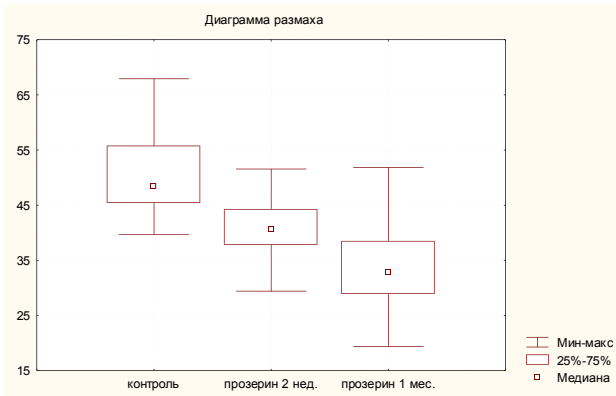


Рис.11. Динамика плотности эластина в медиі брюшного отдела аорты через 2 недели введения прозерина и через месяц после прекращения моделирования ХХС по сравнению с контрольной серией

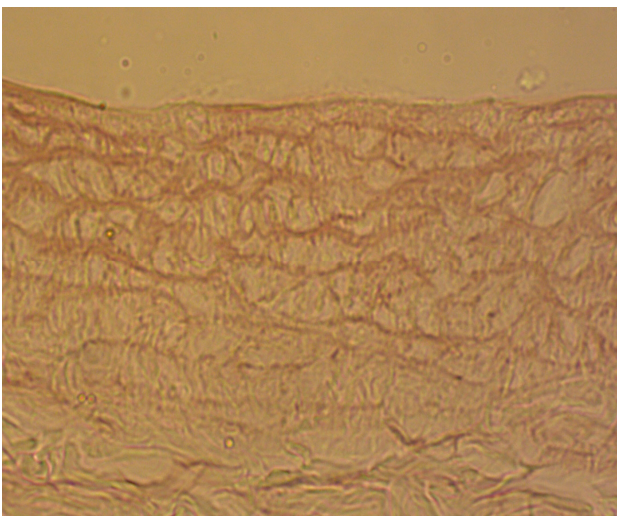


Рис.12. Стенка брюшной аорты крысы после 2 недель введения прозерина, ув. $\times 400$ (размеры поля зрения 1,08 \times 0,81 мм, площадь 0,87 мм²), окраска орсеином по Шиката. Отмечаются истончение медиі, дезорганизация эластических мембран, их фрагментация, уменьшение содержания эластина в медиі

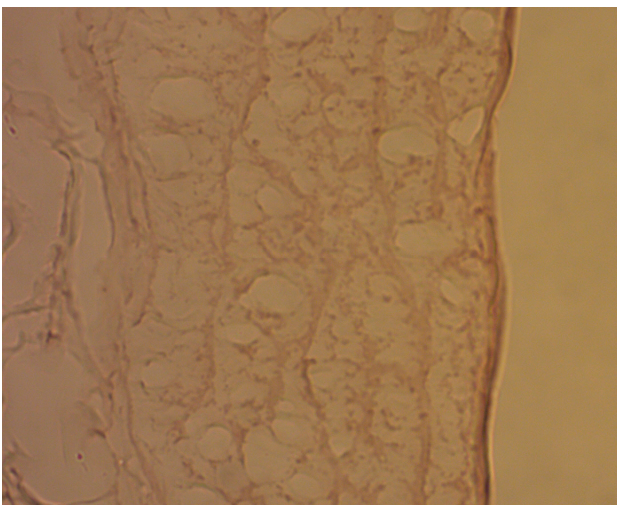


Рис.13. Стенка брюшной аорты крысы через 1 месяц после отмены прозерина, ув. $\times 400$ (размеры поля зрения 1,08 \times 0,81 мм, площадь 0,87 мм²), окраска орсеином по Шиката. Отмечаются уменьшение количества слоев эластических мембран, выраженная дезорганизация, деструкция эластических мембран, уменьшение содержания эластина в медиі

При моделировании ХХС выявлено уменьшение по сравнению с контрольной серией плотности эластина в медиі аорты. Так, через 2 недели введения прозерина (рис.11,12) плотность эластина составила $M = 40,76 \pm 8,23$ об.%, тогда плотность эластина в контрольной серии достигала значений $M = 49,91 \pm 6,68$ об.% ($\chi^2 = 22,349$, $p < 0,0001$).

Через месяц после прекращения моделирования ХХС (рис.11,13) плотность эластина в медиі брюшного отдела аорты продолжала уменьшаться и достигла значений $M = 32,38 \pm 5,99$ об.%, что достоверно меньше по сравнению как с контрольной серией ($\chi^2 = 33,000$; $p < 0,0001$), так и с контрольной точкой 2 недели ($\chi^2 = 18,393$; $p < 0,0001$).

Кроме того, частота встречаемости препаратов с плотностью эластина ≥ 40 об.% при ХХС также уменьшалась — с 96,7% в контрольной серии до 54,5% через 2 недели введения прозерина ($\chi^2 = 3,098$, $p < 0,078$) и до 14,5% через месяц после прекращения моделирования ХХС ($\chi^2 = 50,101$, $p < 0,0001$).

Также стоит отметить значительную дезорганизацию, фрагментацию и деструкцию эластиновых структур медиі при ХХС при морфологическом исследовании.

Прогрессирование деградации эластиновых структур медиі при моделировании ХХС и через месяц после окончания эксперимента (рис.11) создает условия для увеличения объема ВКП в медиі брюшного отдела аорты как через 2 недели прозерина, так и через месяц после окончания эксперимента (рис.8).

Таким образом, при ХХС наблюдалось выраженное ремоделирование средней оболочки брюшной аорты с уменьшением объемной плотности эластина и изменением его структуры, что, способствовало значительному увеличению ВКП. Такое ремоделирование стенки аорты, безусловно, приводит к изменению функциональных свойств аорты.

Немалое число работ посвящено протективному влиянию ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (ИАПФ) в клинике у больных АГ, ИБС [5-7], которые, по сути своей, являются стрессобусловленными заболеваниями.

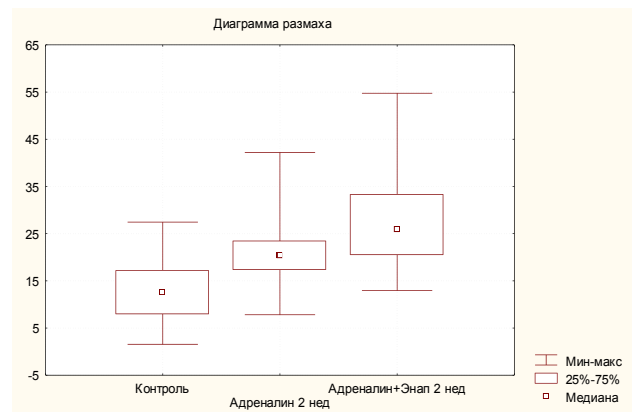


Рис.14. Изменения объема ВКП в медиі аорты через 2 недели при хроническом адренергическом стрессе и при одновременном введении адреналин и энапа по сравнению с контрольной серией

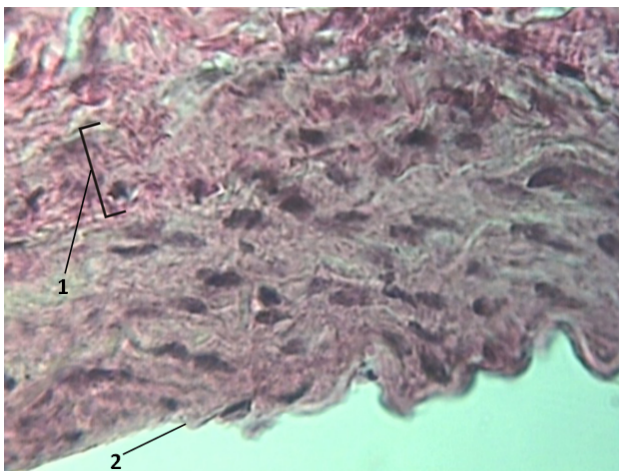


Рис.15. Стенка аорты после двухнедельного одновременного введения адреналина и эпинефрина, ув. $\times 400$, окраска по Ван Гизону. Отмечается умеренный отек адвентиции. 1 — фиброзные изменения в наружных слоях меди; 2 — разрыв эндотелия интимы

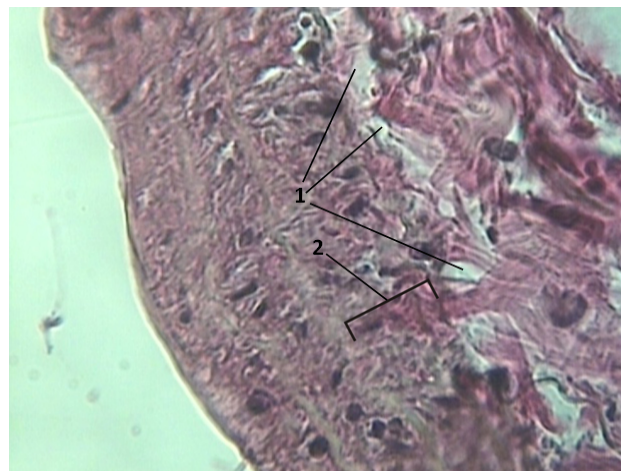


Рис.17. Стенка аорты после двухнедельного одновременного введения прозерина и эпинефрина, ув. $\times 400$, окраска по Ван Гизону. Отмечается выраженный отек адвентиции и наружных слоев меди. 1 — отрыв адвентиции; 2 — фиброзные изменения в наружных слоях меди

Представляется интересным исследовать, как влияют ИАПФ на самые ранние проявления ремоделирования стенки аорты — изменения внеклеточных пространств — в эксперименте.

При анализе динамики объема ВКП в меди аорты после двухнедельного совместного введения адреналина и эпинефрина (рис.14,15) был получен парадоксальный результат — наблюдался достоверный рост объема ВКП ($M = 28,67 \pm 11,05$ об.%) как по сравнению с контрольной серией ($M = 11,66 \pm 6,34$ об.%, $\chi^2 = 23,148$; $p < 0,00001$), так и по сравнению со значениями объема ВКП через 2 недели введения адреналина ($M = 22,53 \pm 6,86$ об.%, $\chi^2 = 6,259$; $p < 0,012$).

При хроническом холинергическом стрессе (рис.16,17) совместное введение прозерина с эпинефрином не привело к значимым изменениям объема ВКП. Так, медиана значений ВКП через 2 недели введения прозерина составила $M = 22,14 \pm 8,51$ об.%, а после совместного введения прозерина и эпинефрина — $M = 27,41 \pm 8,33$ об.%, ($p > 0,05$). В то же время значения объема ВКП при введении прозерина с эпинефрином были значительно больше, чем в контрольной серии ($M = 9,22 \pm 6,37$ об.%, $\chi^2 = 9,000$; $p < 0,0027$).

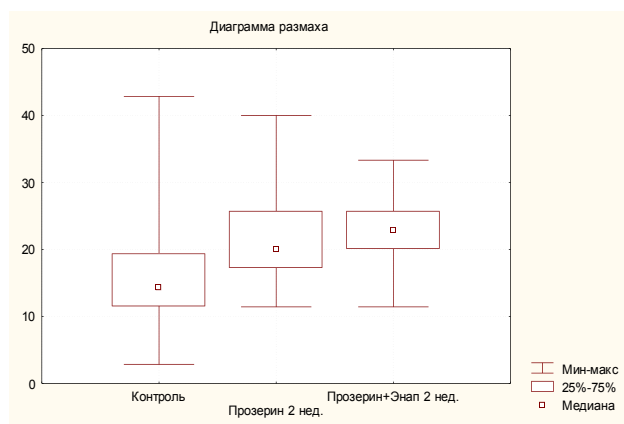


Рис.16. Объемная плотность ВКП (об.%) в средней оболочке бедренной артерии через 2 недели введения прозерина и совместного введения прозерина и эпинефрина по сравнению с контрольной серией

Таким образом, при совместном введении адреналина с эпинефрином в аорте значительно увеличился объем ВКП как по сравнению с контрольной серией (в 1,5 раза), так и по сравнению со значениями ВКП при моделировании хронического адренергического стресса (в 1,3 раза).

Увеличение объема ВКП в стенке аорты на фоне введения эпинефрина при моделировании хронического адренергического и хронического холинергического стресса можно объяснить снижением АД и колоссальными изменениями эластиновой сети в стенке аорты, что создает условия для задержки жидкости: снижение АД, сосудорасширяющий эффект эпинефрина создают дополнительные условия для задержки жидкости.

Заключение

Результаты исследования показали, что при моделировании хронического адренергического и хронического холинергического стресса происходят значительные изменения во внеклеточных пространствах стенки брюшного отдела аорты: при обоих вариантах стресса отмечается значительное увеличение объема ВКП в меди аорты, и оно продолжает сохраняться и в течение 1 месяца по окончании эксперимента.

Содержание эластина в меди аорты при обоих вариантах хронического стресса уменьшается через 2 недели введения препаратов. Через месяц после окончания эксперимента как при ХАС, так и при ХХС плотность эластина в стенке аорты продолжала уменьшаться, и деструктивные процессы во внеклеточном матриксе продолжали нарастать. Помимо количественных различий при визуализации препаратов через месяц наблюдалась еще более выраженная дезорганизация, уменьшение количества слоев эластических мембран, множественная фрагментация их в меди брюшной аорты.

Протективного эффекта эпинефрина на ремоделирование внеклеточных пространств в меди аорты при моделировании обоих вариантов хронического стресса не выявлено, кроме того, при хроническом адренергическом стрессе объем ВКП под влиянием эпинефрина даже увеличивался.

References

1. База знаний по молекулярной и общей биологии человека (HUMBIO) [Электронный ресурс] // <http://humbio.ru/humbio/default.htm> (дата обращения 12.11.2014 г.)
 2. Биология и медицина [Электронный ресурс] // <http://medbiol.ru/medbiol/har/00242553.htm> (дата обращения 12.11.2014 г.)
 3. Инструкция к препарату энап Р [Электронный ресурс] <http://medi.ru/doc/f80024> (дата обращения 12.11.2014 г.)
 4. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина, 1990. С.204-205.
 5. Диагностика и лечение больных острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST ЭКГ (Национальные рекомендации) // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2007. №6(8). С.487-488.
 6. The Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators. Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. *Lancet*, 1993. №342. P.821-828.
 7. Ambrosioni E., Borghi C., Magnani B., Survival of Myocardial Infarction Long-Term Evaluation (SMILE) Study Investigators. The effect of the angiotensin-convertingenzyme inhibitor zofenopril on mortality and morbidity after anterior myocardial infarction // *N. Engl. J. Med.* 1995. №332. P.80-85.
1. Baza znanii po molekuliarnoi i obshchei biologii cheloveka (HUMBIO) [Molecular biology and general human biology knowledge base (HUMBIO)]. Available at: <http://humbio.ru/humbio/default.htm> (accessed 12.11.2014).
 2. Biologiya i meditsina [Biology and medicine]. Available at: <http://medbiol.ru/medbiol/har/00242553.htm> (accessed 12.11.2014)
 3. Instruktsiia k preparatu enap P [Enap P Package Insert and Label Information]. Available at: <http://medi.ru/doc/f80024> (accessed 12.11.2014).
 4. Avtandilov G.G. Meditsinskaia morfometriia. Rukovodstvo [Medical morphometry. Guideline]. Moscow, "Meditsina" Publ., 1990, pp. 204-205.
 5. Diagnostika i lechenie bol'nykh ostrym infarktom miokarda s pod'emom segmenta ST EKG (Natsional'nye rekomendatsii) [National STEMI Guidelines]. *Kardiovaskuliarnaia terapiia i profilaktika – Cardiovascular therapy and prevention*, 2007, vol. 6, no. 8, pp. 487-488.
 6. The Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators. Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. *Lancet*, 1993, no. 342, pp. 821-828.
 7. Ambrosioni E., Borghi C., Magnani B., Survival of Myocardial Infarction Long-Term Evaluation (SMILE) Study Investigators. The effect of the angiotensin-convertingenzyme inhibitor zofenopril on mortality and morbidity after anterior myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 1995, no. 332, pp. 80-85.