

Сравнительный анализ параметров гемостаза карликовых свиней и человека в процессе онтогенеза

К.В. Тютинна*, Н.М. Фаустова, В.А. Березкин, П.В. Сакович

АО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Россия

* E-mail: tyutina.kv@doclinika.ru

Резюме. Карликовые свиньи являются подходящими моделями в доклинических исследованиях, направленных на изучение свойств антитромботических лекарственных препаратов, и в различных изысканиях, связанных с изучением системы гемостаза млекопитающих. Для корректной оценки получаемых результатов необходимо учитывать возрастные изменения основных показателей гемостаза, а также возможное влияние условий забора крови на эти показатели. Также необходимо грамотно экстраполировать получаемые данные о работе системы гемостаза свиней на человека.

Цель работы — во-первых, изучить основные параметры гемостаза и фибринолиза карликовых свиней в ходе их онтогенеза; во-вторых, сравнить изученные параметры гемостаза и фибринолиза карликовых свиней с теми же показателями у человека.

В исследовании использована плазма карликовых свиней обоего пола 5 возрастных групп: 2 мес, 6 мес, 1 год, 1,5–2 года и 3–6 лет.

По результатам проведенного исследования установлено, что место забора крови (яремная или ушная вены) не влияет на параметры гемостаза у карликовых свиней. Установлено, что показатели протромбинового времени и активированного частичного тромбопластинового времени не зависят от возраста и пола этих животных. Референсные интервалы для основных показателей гемостаза составляют 10,8–22,9 с для активированного частичного тромбопластинового времени и 11,4–17,2 с для протромбинового. В целом полученные референсные значения обоих показателей были сравнимы с таковыми у человека. Активность плазминогена у карликовых свиней значительно ниже, чем у человека, и не зависит от возраста и пола. Референсные интервалы для карликовых свиней находятся в диапазоне значений 1,94–7,66%, тогда как для человека нормальный диапазон значений активности плазминогена составляет в среднем 80–130%. Сравнительно низкая активность плазминогена у карликовых свиней может объясняться особенностями их фибринолитической системы: специфической аминокислотной последовательностью плазминогена и высокой активностью ингибиторов плазмина, также у них наблюдается высокая резистентность тромбов к фибринолизу. Таким образом, карликовые свиньи являются неподходящими моделями для исследования тромболитических препаратов.

Ключевые слова: карликовые свиньи, протромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время, активность плазминогена

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Для цитирования: Тютинна К.В., Фаустова Н.М., Березкин В.А., Сакович П.В. Сравнительный анализ параметров гемостаза карликовых свиней и человека в процессе онтогенеза. Лабораторные животные для научных исследований. 2022; 3. 50–59. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2022-03-06>.

Comparative analysis of features of dwarf pig and human hemostasis during ontogenesis

K.V. Tyutina*, N.M. Faustova, V.A. Berezkin, P.V. Sakovich

Research and manufacturing company «Home of Pharmacy», Leningrad oblast, Russia

* E-mail: tyutina.kv@doclinika.ru

Summary. Dwarf pigs are suitable models in preclinical studies aimed at studying the properties of anti-thrombotic drugs and in other studies related to the study of the mammalian hemostasis system. In order to correctly assess the results, it is necessary to take into account age-related changes in the main indicators of hemostasis, as well as the possible influence of blood sampling conditions on these indicators. It is also necessary to extrapolate correctly the obtained data on the process of the pig hemostasis system to humans. Objectives: 1) to study the basic parameters of hemostasis and fibrinolysis in dwarf pigs during their ontogenesis; 2) to compare the studied parameters of hemostasis and fibrinolysis in dwarf pigs with the same parameters for humans.

Plasma of dwarf pigs of both sexes of five age groups was used in the study: 2 months, 6 months, 1 year, 1.5–2 years and 3–6 years.

According to the results of the study, it was found that the place of blood sampling (jugular or ear vein) does not affect the parameters of hemostasis in dwarf pigs. Prothrombin time and activated partially thromboplastin time do not depend on the age and sex of dwarf pigs. The reference intervals for the main indexes of hemostasis are: 10.8–22.9 sec for activated partially thromboplastin time, 11.4–17.2 sec for prothrombin time. In general, the obtained reference values of activated partially thromboplastin time and prothrombin time are comparable with the values of these indicators in humans. Plasminogen activity in dwarf pigs is significantly lower than in humans, independent of age and sex. The reference range for dwarf pigs is 1.94–7.66%, whereas for humans the normal range of plasminogen activity values averages 80–130%. The relatively low plasminogen activity in dwarf pigs can be based on the features of the fibrinolytic system of pigmy pigs: the specific amino acid sequence of plasminogen and the high activity of plasmin inhibitors. There is also a high resistance of clots to fibrinolysis in dwarf pigs. Thus, dwarf pigs are not suitable models for the study of thrombolytic drugs.

Keywords: minipigs, prothrombin time, partially activated thromboplastin time, plasminogen activity

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

For citation: Tyutina K.V., Faustova N.M., Berezkin V.A., Sakovich P.V. Comparative analysis of features of dwarf pig and human hemostasis during ontogenesis. *Laboratory Animals for Science*. 2022; 3. 50–59. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2022-03-06>.

Введение

Исследования системы гемостаза имеют значение не только при исследовании лекарственных средств, непосредственно влияющих на нее, но и в качестве одного из компонентов панели основных тестов для токсикологических исследований [1]. Карликовые свиньи являются подходящими моделями в доклинических исследованиях, направленных на изучение свойств антитромботических лекарственных препаратов, и в различных экспериментах, связанных с изучением системы гемостаза млекопитающих. Это обусловлено схожестью анатомии и физиологии карликовых свиней с организмом человека, возможностью формирования у них различных патологий, а также введения разнообразных форм лекарственных средств при использовании данной тест-системы [2, 3].

Для корректной оценки получаемых результатов в подобных исследованиях необходимо учитывать возможные колебания показателей гемостаза в связи с возрастом карликовых сви-

ней, которые, как указано в литературе [4–6], могут наблюдаться. Кроме того, остается актуальным вопрос об экстраполяции получаемых данных о работе системы гемостаза свиней на человека [7].

Для исследования системы гемостаза человека и животных разработано большое количество тестов, наиболее часто определяют показатели активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) и протромбинового времени (ПВ).

АЧТВ — наиболее чувствительный показатель, отражающий эффективность внутренней пути свертывания и общего каскада свертывающей системы крови человека и животных. Длительность АЧТВ зависит от уровня высокомолекулярного кининогена, прекалликреина и факторов свертывания крови XII, XI, VIII и менее чувствительна при изменении уровня факторов X, V, протромбина и фибриногена. АЧТВ определяют по длительности образования кровяного сгустка после добавления в пробу крови кальция и парциального тром-

бластина. Увеличение длительности АЧТВ связано с повышенным риском кровотечений, уменьшение — с тромбозом [8].

ПВ — время, характеризующее первую и вторую фазу плазменного гемостаза (протромбино- и тромбинообразование соответственно) и отражающее активность протромбинового комплекса (факторов свертывания VII, V, X и II) [9].

Также при оценке системы гемостаза представляет интерес активность плазминогена — параметра, устанавливающего способность плазминогена соединяться с ферментом стрептокиназой, образуя субстрат, необходимый для проведения дальнейшей ферментативной реакции. Плазминоген — белок плазмы крови, профермент, переходящий в определенных условиях в активную форму (плазмин), который является компонентом фибринолитической системы, необходимой для предотвращения чрезмерного образования кровяных сгустков (тромбов) в процессе свертывания крови [10].

Цель данного исследования — изучение основных параметров гемостаза и фибринолиза карликовых свиней в ходе их онтогенеза в сравнении с теми же параметрами у человека. Для выполнения поставленной цели необходимо выполнить следующие задачи: определить наличие и значимость различий между параметрами гемостаза для карликовых свиней разного возраста и пола, оценить влияние места забора пробы крови для анализа показателей гемостаза на получаемые результаты измерений, сравнить данные по основным показателям гемостаза, полученным в ходе эксперимента на свиньях, с таковыми у человека, указанными в различных источниках литературы.

Материал и методы

Для работы была использована кровь карликовых свиней породы Биштрассер Кнаус обоего пола различного возраста (от 2 мес до 6 лет), полученных в АО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». Кровь забирали в ходе лечебно-профилактических мероприятий, после чего карликовых свиней возвращали в стоковую популяцию, в связи с чем оценка со стороны биоэтической комиссии не проводилась. Карликовых свиней содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях [11], в стандартных вольерах на подстиле («древесные пеллеты», производитель ООО Хоум Лаундж), площадь пола на одно животное составляла не менее 2 м². Кормление карликовых свиней проводили гранулированным, полнорационным кормом по утвержденному рациону, составленному на основании пищевых потреб-

ностей лабораторных животных, приготовленному по ГОСТу Р 52255–2004 «Национальный стандарт. Комбикорма для свиней. Номенклатура показателей». Кормление проводили 2 раза в сутки: с 8:00 до 9:30 и с 17:00 до 18:30. Животным давали воду, очищенную и нормированную по органолептическим свойствам, по показателям pH, сухого остатка, восстанавливающих веществ, диоксида углерода, нитратов и нитритов, аммиака, хлоридов, сульфатов, кальция и тяжелых металлов на основании СанПиН 2.13684–21 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества». Воду при помощи кормушек-лотков давали *ad libitum*. Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды (18–27 °С и относительная влажность воздуха 30–70%), NH₃ ≤ 10 мг/м³, CO₂ ≤ 0,15 об.%. Световой режим составлял 12 ч света и 12 ч темноты. Для животных был установлен режим воздухообмена, обеспечивающий смену около 15 объемов помещения в час.

У основной массы карликовых свиней кровь отбирали из яремной вены натошак, после голодания в течение 8 ч, у свиней 3–6 лет дополнительно брали кровь также из ушной вены в пробирки с использованием в качестве антикоагулянта 3,8% цитрата натрия. Количество животных, у которых была отобрана кровь для определения показателей гемостаза, указано в табл. 1.

Кровь, отобранную в пробирки с использованием в качестве антикоагулянта 3,8% цитрата натрия, центрифугировали сразу после получения в течение 15 мин при 1480 g (3000 об/мин). Определение ПВ и АЧТВ в плазме крови свиней выполняли не позднее 1 ч после получения плазмы. Перед определением активности плазминогена плазму крови разбавляли в 3–5 раз водой очищенной.

Для оценки параметров гемостаза (ПВ и АЧТВ) использовали анализатор показателей гемостаза АПГ4-04-П («ЭМКО», Россия), для определения АЧТВ — набор реагентов АПТВ-Эл-тест (№ 649 «Технология Стандарт», Россия), для определения ПВ — набор реагентов Техпластин-тест (№ 131, «Технология Стандарт», Россия), для исследования гемостаза — набор контрольных плазм (№ 717, «Технология Стандарт», Россия).

Для измерения активности плазминогена использовали набор Реахром-плазминоген (№ ФА-2, НПО «Ренам», Россия). Активность плазминогена определяли хромогенным оптическим методом. Метод определения активности плазминогена в образце плазмы основан на его способности образовывать комплекс со стрептокиназой, позволяющий гидролизовать пептидный хромогенный субстрат. Количество высвобождаемого при этом пара-нитроанилина (pNA) прямо пропорционально активности плазминогена в образце плазмы.

Таблица 1.
Количество проанализированных образцов плазмы карликовых свиней для определения ПВ, АЧТВ и активности плазминогена

Пол	Возраст				
	2 мес	6 мес	1 год	1,5–2 года	3–6 лет
Самцы	10	10	10	12	2 (из ушной вены) 2 (из яремной вены)
Самки	10	10	12	8	5 (из ушной вены) 5 (из яремной вены)

Таблица 2.
Результаты измерений АЧТВ в плазме карликовых свиней различного возраста ($n=96$), с

Пол	Возраст				
	2 мес	6 мес	1 год	1,5–2 год	3–6 лет
Самцы	13,7±1,43	13,9±0,86	13,7±3,18	14,9±1,96	15,1±1,85
Самки	14,2±0,73	13,8±0,57	14,4±1,60	14,0±1,89	14,5±2,25

Таблица 3.
Результаты измерений ПВ в плазме карликовых свиней различного возраста ($n=96$), с

Пол	Возраст				
	2 мес	6 мес	1 год	1,5–2 года	3–6 лет
Самцы	15,0±0,33	14,5±0,63	13,5±2,93	15,9±1,29*	15,7±1,77
Самки	13,2±1,61	14,8±0,46	14,0±0,99	13,8±1,60*	15,3±1,04

Примечание. Обнаружено статистически достоверное различие: * $p=0,0042$.

Таблица 4.
Результаты измерения активности плазминогена в плазме карликовых свиней различного возраста ($n=96$), %

Пол	Возраст				
	2 мес	6 мес	1 год	1,5–2 года	3–6 лет
Самцы	3,4±0,78	3,5±1,18	5,8±2,38	3,6±1,56*	3,0±0,45**
Самки	4,2±1,30	3,9±1,57	4,9±2,90	6,3±1,42*	5,0±1,42**

Примечание. Обнаружено статистически достоверное различие: * $p=0,0012$; ** $p=0,0222$.

Оптическую плотность растворов при 405 нм по окончании реакции измеряли на микропланшетном анализаторе «CLARIOstar» (BMG Labtech, Германия).

Для расчета активности плазминогена анализируемых проб строили калибровочную зависимость изменения величины оптической плотности (по оси Y), полученной для каждого разведения плазмы-калибратора, от активности плазминогена в процентах (по оси X) с помощью линейной аппроксимации: $Y=aX+b$. Коэффициент корреляции полученных линейных зависимостей составлял не менее 0,99. Активность плазминогена в плазме крови свиней рассчитывали с учетом коэффициента разведения образца.

Для всех показателей была применена описательная статистика: значения были проверены на соответствие закону нормального распределения. Проверку на соответствие закону

нормального распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро–Уилка.

Полученные данные соответствовали закону нормального распределения, поэтому для их сравнения был использован t -критерий Стьюдента. Различия определяли при уровне значимости $p<0,05$.

Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism, Version 9.1.1.225 (Сан-Диего, США).

Результаты и обсуждение

В табл. 2–4 представлены результаты измерений ПВ, АЧТВ и активности плазминогена в пяти возрастных группах самцов и самок карликовых свиней. Данные, полученные из ушной и яремной вен для свиней в возрасте 3–6 лет, объединены.

Таблица 5.
Результаты измерений гемостаза и фибринолиза в плазме карликовых свиней, полученной из яремной и ушной вен карликовых свиней в возрасте 3–6 лет ($n=7$)

Место забора	АЧТВ, с	ПВ, с	Активность плазминогена, %
Ушная вена	15±2,06	15±1,24	4,3±1,12
Яремная вена	14±2,24	16±1,18	4,5±1,92

Таблица 6.
Сведения о параметрах гемостаза у свиней разного возраста, полученные из различных источников литературы

Возраст	АЧТВ, с	ПВ, с
Источник литературы [5]		
Новорожденные	17,8±2,3	16,3±1,1
Источник литературы [6]		
2 дня	17,8±2,3	16,3±1,1
3 нед	18,6±7,3	13,8±1,0
4 нед	19,8±6,1	12,8±1,2
5 нед	19,9±6,3	14,4±1,2
6 нед	28,7±7,9	12,2±0,9
8 нед (2 мес)	30,5±6,5	15,3±1,8
10 нед	52,5±9,1	14,3±1,0
18 нед	38,5±7,2	13,2±0,5
20 нед	42,8±2,5	13,9±0,8
24 нед (6 мес)	38,6±5,5	14,4±0,8
1 год	34,2±6,1	13,4±1,0
Источник литературы [9]		
0–2 мес	11,2±1,1	12,5±1,1
3–5 мес	11,5±1,1	13,1±0,8
6–8 мес	12,0±1,4	13,1±0,9
9–12 мес	12,1±1,0	13,4±0,7
13–24 мес	11,6±1,6	12,8±0,7
25–34 мес	10,7±1,9	12,2±0,9

Результаты измерений АЧТВ для самцов и самок всех возрастов соответствовали закону нормального распределения, оценка различий была выполнена с использованием *t*-критерия Стьюдента. Статистически значимых различий между значениями измерений АЧТВ самцов и самок всех возрастов не обнаружено.

Установлены статистически достоверные различия в измерениях ПВ и активности плазминогена у карликовых свиней разного возраста и пола, которые не являются клинически значимыми, так как в данном случае полученные *p*-значения не коррелируют с различиями в физиологическом состоянии животных и не будут оказывать влияние на принятие клинических или стратегических решений. Также для подтверждения обнаруженных в этом исследовании статистически значимых различий

может потребоваться более крупное исследование с большим количеством животных.

В соответствии с целями настоящего исследования сравнили результаты измерений АЧТВ, ПВ и активности плазминогена в плазме карликовых свиней, взятой из яремной и ушных вен карликовых свиней в возрасте 3–6 лет. Данные от самцов и самок объединены, поскольку различия между ними не наблюдалось. Статистической разницы между этими двумя способами забора образцов не обнаружено (табл. 5).

В литературе сведения о параметрах гемостаза для карликовых свиней немногочисленны, фрагментарны и достаточно противоречивы (табл. 6).

Расхождения в имеющихся результатах, вероятно, объясняются различными источниками получения массивов первичных данных пара-

Таблица 7.
Сравнение значений АЧТВ и ПВ людей и карликовых свиней в схожих возрастных группах [11]

Люди			Карликовые свиньи		
Возрастная группа, годы	Пол	Показатель (средние значения), с	Пол	Возрастная группа, мес	
АЧТВ					
0–14	Мужчины	27,9	13,7	Самцы	2
			14,2	Самки	
	Женщины	27,4	13,9	Самцы	6
			13,8	Самки	
15–50	Мужчины	25,3	13,7	Самцы	12
			14,4	Самки	
	Женщины	26,3	14,9	Самцы	18–24
			14,0	Самки	
Старше 50	Мужчины	24,6	15,1	Самцы	36–72
	Женщины	23,4	14,5	Самки	
ПВ					
0–14	Мужчины	12,3	15,0	Самцы	2
			13,2	Самки	
	Женщины	12,2	14,5	Самцы	6
			14,8	Самки	
15–50	Мужчины	12,0	13,5	Самцы	12
			14,0	Самки	
	Женщины	11,9	15,9	Самцы	18–24
			13,8	Самки	
Старше 50	Мужчины	12,1	15,7	Самцы	36–72
	Женщины	11,6	15,3	Самки	

метров гемостаза, так как животные поступают из разных питомников, выращиваются в неодинаковых условиях, не говоря уже о различии используемых приборов и реагентов для измерения параметров гемостаза. Поэтому, вероятно, каждому исследовательскому учреждению, работающему с системой гемостаза карликовых свиней, следует выводить свои референсные интервалы и нормы.

Также в литературе встречается информация об изменениях показателей гемостаза в процессе онтогенеза — результаты этих измерений у более молодых животных отличаются от показателей взрослых свиней (см. табл. 6). Учитывая потенциальную востребованность свиней разного возраста в доклинических исследованиях, возможные возрастные изменения параметров гемостаза следует принимать

во внимание при работе с карликовыми свиньями, так как показатели гемостаза, ошибочно интерпретированные как патологические, несмотря на то, что фактически это будет являться нормой, соответствующей определенному возрасту этих животных, могут повлиять на ход всего исследования и его результаты.

Помимо сравнения полученных значений АЧТВ и ПВ с данными литературы [12], также представляет интерес сравнение этих показателей гемостаза для карликовых свиней различного возраста с таковыми для людей разных возрастных групп, которые были установлены в нашем исследовании (табл. 7).

И у людей, и у карликовых свиней, согласно представленным [12] и полученным данным в настоящем исследовании, не наблюдается значительных изменений в продолжительно-

Таблица 8.
Сведения о параметрах гемостаза у людей различного возраста, полученные из источников литературы

Возраст	ПВ, с	АЧТВ, с	Источник литературы
1 день	15,6	38,7	[12]
3 дня	14,9	36,3	[12]
1 мес–1 год	13,1	39,3	[12]
1–6 мес	12,5	41,0	[13]
7–12 мес	12,2	39,0	[13]
1–5 лет	13,3	37,7	[12]
	12,1	36,0	[13]
6–10 лет	13,4	37,3	[12]
	12,6	37,0	[13]
11–16 лет	13,8	39,5	[12]
11–18 лет	12,8	35,0	[13]
0–14 лет	12,3	27,8	[11]
Старше 16 лет	13,0	33,2	[12]
Старше 19 лет	11,7	34,0	[13]
15–50 лет	11,9	26,0	[11]
Старше 50 лет	11,9	24,2	[11]

сти ПВ и АЧТВ с увеличением возраста. В других источниках литературы [13, 14] можно обнаружить отличающиеся результаты АЧТВ, однако тенденция к значительному увеличению или снижению в зависимости от возраста показателей ПВ и АЧТВ у людей отсутствует (табл. 8).

В исследовании были проанализированы основные параметры системы гемостаза (АЧТВ, ПВ и активность плазминогена) карликовых свиней разных возрастных групп, поскольку важно контролировать не только показатели, отражающие эффективность работы гемостаза, но необходимо еще и следить за эффективностью обратного процесса — тромболизиса.

В результате проведенного исследования установлены средние значения АЧТВ, ПВ и активности плазминогена для свиней пяти возрастных групп, самцов и самок, полученные из плазмы крови, взятой из яремных вен и вен ушей.

Достоверных различий между результатами измерений параметров гемостаза животных обоих полов в пяти возрастных группах в боль-

шинстве случаев не обнаружено, а единичная достоверная разница не имеет клинического значения. Таким образом, выводы о различиях в значении параметров гемостаза у животных разного возраста, встречающиеся в некоторых статьях, например, в работе [6], не подтвердились в условиях нашего исследовательского учреждения. В работе [15] возрастных отличий по изучаемым параметрам гемостаза также не найдено.

По результатам проведенного исследования не обнаружено достоверных различий между результатами измерений всех трех параметров гемостаза в плазме крови, полученной из яремной и ушной вен карликовых свиней.

Установленные результаты измерений параметров гемостаза карликовых свиней были использованы для расчета референсных интервалов значений АЧТВ, ПВ и активности плазминогена. Использовали объединенный массив данных по пяти исследованным возрастным группам. Для устранения влияния аномальных значений из массива данных были исключены статистические выбросы, которые определили отдельно для каждого показателя и пола животных по методу Тьюки [16]. Из дальнейшей работы были исключены как «extremes», или жесткие выбросы, так и «outliers», или мягкие выбросы.

Объединенные данные по всем возрастным группам обоего пола карликовых свиней о доле статистических выбросов по каждому показателю представлены в табл. 9.

Таблица 9.
Доли статистических выбросов и отклонений у карликовых свиней (n=96)

Показатель	Статистический выброс, %
АЧТВ	1,1
ПВ	2,2
Активность плазминогена	4,7

Таблица 10.

Референсные интервалы показателей гемостаза и фибринолиза крови у карликовых свиней

Показатель	Способ расчета	РИ
АЧТВ, с (n=95)	$X_{cp} \pm 1,96SD (X_{cp})$	10,8–22,9 (14,1)
ПВ, с (n=93)	2,5–97,5‰ (50‰)	11,4–17,2 (14,8)
Активность плазминогена, % (n=86)	2,5–97,5‰ (50‰)	1,94–7,66 (3,90)

Примечание. Для данных с нормальным распределением в скобках указано среднее значение, для данных, не подчиняющихся нормальному распределению, — медиана.

Референсные интервалы для полученных результатов в зависимости от вида их распределения рассчитывали, как среднее $\pm 1,96 \times$ стандартное отклонение ($X_{cp} \pm 1,96SD$) для нормального распределения и как промежуток 2,5–97,5‰ для ненормального распределения. Вид распределения определяли по критерию Шапиро–Уилка. Дополнительно проводили сравнение между животными разного пола с помощью *U*-критерия Манна–Уитни и *t*-критерия Стьюдента.

Полученные референсные интервалы значений АЧТВ, ПВ и активности плазминогена для карликовых свиней отражены в табл. 10.

Таким образом, установлено отсутствие достоверных клинически значимых различий между результатами измерений показателей АЧТВ, ПВ и активности плазминогена, полученных из плазмы крови, взятой из яремных и ушных вен карликовых свиней в возрасте 3–6 лет. Для установления наличия или отсутствия влияния места забора крови на результаты измерений показателей АЧТВ, ПВ и активности плазминогена для карликовых свиней других возрастов требуется провести дополнительные исследования. Также не обнаружено достоверных клинически значимых различий между результатами измерений показателей АЧТВ, ПВ и активности плазминогена, полученных из плазмы крови животных разного возраста и пола. Установленные значения были использованы для формирования референсных интервалов показателей АЧТВ, ПВ и активности плазминогена для карликовых свиней всех возрастов, которые могут быть использованы как универсальные для карликовых свиней различного возраста и для различных способов забора крови.

Результаты настоящего исследования об активности плазминогена у карликовых свиней аналогичны сведениям, приведенным в работах [17, 18]. Низкая активность плазминогена обнаруживалась и у других млекопитающих, например, у кроликов [19]. В целом значения активности плазминогена широко (в 10 раз и более) варьируют от таковых у грызунов и человека [19]. У людей активность плазминогена составляет в среднем 80–130% [10, 20], снижаясь до 60% от нормы (у детей до 6 мес) и увеличиваясь до 65% от нормы (у беременных в III триместре) [20], что превышает зна-

чения активности плазминогена у карликовых свиней. Причинами низкой активности плазминогена могут быть несколько факторов. Во-первых, использование неспецифичной тест-системы, содержащей в качестве калибратора плазму человека. Этот вариант объяснения также подтверждается межвидовыми различиями в аминокислотной последовательности плазминогена у свиней и человека [21]. Во-вторых, у карликовых свиней наблюдается высокая активность ингибитора плазмина α_2 -антиплазмина, что ведет к снижению активности плазминогена [18, 22]. Вероятно, какой-либо из перечисленных факторов или их комбинация приводят в конечном итоге к низким значениям активности плазминогена. У тромболитической системы свиней есть и другие особенности, например, обнаружено, что тромбы у свиней имеют более высокую плотность сети фибрина, чем у человека, и хуже поддаются тромболитическому воздействию [21, 23, 24]. Также есть сведения о различиях в результатах гистологических исследований между индуцированными тромбином тромбами у свиней *in vitro* и *in vivo*, что может поставить под сомнение результаты исследований тромболитической активности различных лекарственных веществ в моделях тромбов у свиней *in vitro* и *in vivo* [25]. Таким образом, карликовые свиньи являются неудачной моделью для изучения препаратов-тромболитиков.

Выводы

В представленной работе изучены основные параметры гемостаза и фибринолиза карликовых свиней в ходе их онтогенеза в сравнении с теми же параметрами для человека. По результатам проведенного исследования были сформулированы следующие выводы об особенностях системы гемостаза и фибринолиза карликовых свиней.

1. Место забора крови (яремная вена или ушная вена) не влияет на параметры гемостаза у карликовых свиней в возрасте 3–6 лет разного пола.
2. Показатели ПВ и АЧТВ не зависят от возраста и пола карликовых свиней, референсные интервалы для данных показателей составляют 10,8–22,9 с для АЧТВ, 11,4–17,2 с для ПВ, в целом референсные

- параметры ПВ близки к таковым у человека. Референсные значения АЧТВ для свиней оказались ниже, чем средние показатели АЧТВ для людей. Также выявлено, что средние значения АЧТВ у свиней не изменялись с увеличением возраста, тогда как у людей этот показатель укорачивался с возрастом.
3. Активность плазминогена у карликовых свиней значительно ниже, чем у человека (80–140%), не зависит от возраста и пола, референсный интервал составляет 1,94–7,66%. Поэтому в связи с особенностью тромболитической системы карликовые свиньи не могут быть подходящей моделью для исследования веществ-тромболитиков.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Салазникова О.А. Влияние гликлазида на гемореологические параметры крови лабораторных крыс // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. 2008. №4. С. 17–19. [Spasov A.A., Kucheryavenko A.F., Salaznikova O.A. Vliyanie gliklazida na gemoreologicheskie parametry krovi laboratornykh krysv // Byulleten' Volgogradskogo nauchnogo tsentra RAMN. 2008. N. 4. P. 17–19. (In Russ)].
- Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. [Mironov A.N. Ru-kovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya. M.: Grif i K, 2012. 944 p. (In Russ)].
- Рыбакова А.В., Ковалева М.А., Калатанова А.В. и др. Карликовые свиньи как объект доклинических исследований // Международный вестник ветеринарии. 2016. №3. С. 168–176. [Rybakova A.V., Kovaleva M.A., Kalatanova A.V. et al. Karlikovye svin'i kak ob'ekt doklinicheskikh issledovaniy // Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii. 2016. N. 3. P. 168–176. (In Russ)].
- Roussi J., André P., Samama M. et al. Platelet functions and haemostasis parameters in pigs: Absence of side effects of a procedure of general anaesthesia // Thrombosis Research. 1996. Vol. 81. N. 3. P. 297–305. doi: 10.1016/0049-3848(96)00001-1.
- Krapivina E.V., Kryazhev A.L. Physiological parameters of hemostasis in weakened newborn piglets and calves with gamavit injection // BIO Web of Conferences. 2020. doi: 10.1051/bioconf/20201700163.
- Pliszczak-Król A., Rzaşa A., Gemra M. et al. Age-related changes of platelet and plasma coagulation parameters in young pigs // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2016. Vol. 28. N. 5. P. 561–567. doi: 10.1177/1040638716658928.
- Kessler U., Grau T., Gronchi F. et al. Comparison of porcine and human coagulation by thrombelastometry // Thrombosis Research. 2011. Vol. 128. N. 5. P. 477–482. doi: 10.1016/j.thromres.2011.03.013.
- Korte W., Clarke S., Lefkowitz J.B. Short Activated Partial Thromboplastin Times Are Related to Increased Thrombin Generation and an Increased Risk for Thromboembolism // American Journal of Clinical Pathology. 2000. Vol. 113. P. 123–127. doi:10.1309/g98j-ana9-rmnc-xlyu.
- Fritsma G.A., Bernadette R.W.B. «Evaluation of Hemostasis» Hematology: Clinical Principles and Applications. Saunders Company: Philadelphia, 2002. P. 719–753.
- Покровский В.М., Коротко Г.Ф. Физиология человека. М.: Медицина, 1997. Т. 1. 448 с., Т. 2. 368 с. [Pokrovskii V.M., Korot'ko G.F. Fiziologiya cheloveka. M.: Meditsina, 1997. T. 1. 448 p., T. 2. 368 p. (In Russ)].
- Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. 2010. 53 с. [Direktiva 2010/63/EU Evropejskogo parlamenta i soveta Evropejskogo Soyuza ot 22 sentyabrya 2010 goda po okhrane zhivotnykh, ispol'zuemykh v nauchnykh tselyakh. 2010. 53 p. (In Russ)].
- Sivrikaya A., Baran H., Abusoglu S. et al. Effect of gender and age on the prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT) levels and international normalized ratio (INR) // International Journal of Mevlana Medical Sciences. 2013. Vol. 1. N. 2. P. 27–29.
- Monagle P., Barnes C., Ignjatovic V. et al. Developmental haemostasis. Impact for clinical haemostasis laboratories // Thrombosis and Haemostasis. 2006. Vol. 95. N. 02. P. 362–372. doi: 10.1160/TH05-01-0047.
- Appel I.M., Grimminck B., Geerts J. et al. Age dependency of coagulation parameters during childhood and puberty // Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2012. Vol. 10. N. 11. P. 2254–2263. doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04905.x.
- Miura N., Kawaguchi H., Nagasato T. et al. Coagulation activity and white thrombus formation in the micromini-pig // In Vivo. 2013. Vol. 27. N. 3. P. 357–361. PMID: 23606691.
- Kurtz D.M., Travlos G.S. The Clinical Chemistry of Laboratory Animals, 3rd Edition. CRC Press, 2017. 1162 p. doi: 10.1201/9781315155807.
- Alstrup A., Hansen K., Jespersen A. et al. The pig as a model in blood coagulation and fibrinolysis research // Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science. 1999. Vol. 26. P. 214–224.
- Tarandovskiy I.D., Shin H.K., Baek J.H. et al. Interspecies comparison of simultaneous thrombin and plasmin generation // Sci Rep. 2020. Vol. 3. Vol. 10. N. 1. P. 3885. doi: 10.1038/s41598-020-60436-1.
- Tentoni J., Polini N.N., Casanave E.B. Comparative vertebrate fibrinolysis // Comparative Clinical Pathology. London. 2010. Vol. 19. N. 3. P. 225–234. doi: 10.1007/s00580-010-0988-3.
- Морозова В.Т., Авдеева Н.А. Коагулологические синдромы. Лабораторная диагностика. М.: Изд. РМАПО, 2014. 149 с. [Morozova V.T., Avdeeva N.A. Koagulologicheskie sindromy. Laboratornaya diagnostika. M.: Izd. RMAPO, 2014. 149 p. (In Russ)].
- Neto-Neves E.M., Beam D.M., Kline J.A. The resistance of swine blood clots to alteplase-induced thrombolysis *in vitro* is concentration-dependent // Thrombosis Update. 2021. Vol. 2. P. 10–35. doi: 10.1016/j.tru.2021.100035.
- Kaiser E.E., West F.D. Large animal ischemic stroke models: replicating human stroke pathophysiology //

- Neural Regen Res. 2020. Vol. 15. N. 8. P. 1377–1387. doi: 10.4103/1673-5374.274324.
23. Kimberly A.N., Nandi S., Kyu A. et al. Comparison of Neonatal and Adult Fibrin Clot Properties between Porcine and Human Plasma // *Anesthesiology*. 2020. Vol. 132. P. 1091–1101. doi: 10.1097/ALN.0000000000003165.
24. Huang S., Shekhar H., Holland C.K. Comparative lytic efficacy of rt-PA and ultrasound in porcine versus human clots // *PLoS One*. 2017. Vol. 12. N. 5. P. 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0177786.
25. Zenzemi C., Phillips M., Vela D.C. et al. Effect of thrombin and incubation time on porcine whole blood clot elasticity and recombinant tissue plasminogen activator susceptibility // *Ultrasound Med Biol*. 2022. Vol. 48. N. 8. P. 1567–1578. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2022.04.003.

Информация об авторах

К.В. Тютин, младший научный сотрудник лаборатории иммуноферментного анализа, tyutina.kv@doclinika.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6037-204X>

Н.М. Фаустова, кандидат химических наук, руководитель лаборатории иммуноферментного анализа, <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>

В.А. Березкин, ветеринарный врач, <https://orcid.org/0000-0002-5557-1287>

П.В. Сакович, лаборант лаборатории биохимии и гематологии, <https://orcid.org/0000-0002-5064-4723>

АО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, д. 3, к. 245

Information about the authors

K.V. Tyutina, Junior Researcher, Laboratory for Enzyme Immunoassay, tyutina.kv@doclinika.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6037-204X>

N.M. Faustova, PhD of Chemical Sciences, Head of the Laboratory for Enzyme Immunoassay, <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>

V.A. Berezkin, veterinarian, <https://orcid.org/0000-0002-5557-1287>

P.V. Sakovich, Laboratory Assistant, Laboratory of Biochemistry and Hematology, <https://orcid.org/0000-0002-5064-4723>

Research and manufacturing company «Home of Pharmacy», 188663, Russia, Leningrad oblast, Vsevolzhskiy district, Kuzmolovskiy t.s., Zavodskaya st. 3-245

Вклад авторов в написание статьи

К.В. Тютин — анализ научной и методической литературы, сбор и систематизация материала, написание и редактирование текста статьи, статистическая обработка данных.

Н.М. Фаустова — идея исследования, выполнение практической части исследования, сбор и систематизация материала, анализ литературы, редактирование и доработка текста статьи, ответственность за все аспекты работы, связанные с достоверностью данных.

В.А. Березкин — работа с лабораторными животными (карликовыми свиньями), сбор материала.

П.В. Сакович — выполнение анализов по определению параметров гемостаза в плазме крови карликовых свиней.

Authors contribution

K.V. Tyutina — analysis of scientific and methodological literature, collection and systematization of material, writing and editing the text of article, statistical data processing.

N.M. Faustova — idea of the study, the implementation of the practical part of the study, collection and systematization of the material, analysis of the literature, the editing and revision of the text of article, the responsibility for all aspects of the work related to the reliability of data.

V.A. Berezkin — work with laboratory animals (minipigs), collection of material.

P.V. Sakovich — performing tests to determine the parameters of hemostasis in the blood plasma of minipigs.

Сведения о конфликте интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Дата поступления рукописи в редакцию: 30.05.2022

Дата рецензии статьи: 29.08.2022

Дата принятия статьи к публикации: 01.09.2022

Received: 30.05.2022

Reviewed: 29.08.2022

Accepted for publication: 01.09.2022