

DOI: 10.15825/1995-1191-2017-1-22-27

ГЕМОЛИЗНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИМПЛАНТИРУЕМОГО ОСЕВОГО НАСОСА ДЛЯ ДВУХЭТАПНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СЕРДЦА У ДЕТЕЙ

О.Ю. Дмитриева¹, А.С. Бучнев¹, А.А. Дробышев¹, Г.П. Иткин^{1, 2}

¹ ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² Московский физико-технический институт, кафедра физики живых систем, Москва, Российская Федерация

Введение. Одним из основных показателей, характеризующих контактирующие с кровью механические устройства (искусственные клапаны сердца, имплантируемые насосы и др.), является травма форменных элементов крови. Последние годы в клиническую практику для лечения детей с терминальными формами сердечной недостаточности все шире внедряются методы механической поддержки кровообращения. При разработке новых насосов одним из ключевых исследований *in vitro* является оценка гемолиза крови, вызываемой этими насосами. Поэтому на этапах разработки отечественного детского насоса (ДОН) параллельно со снятиями расходно-напорных характеристик нами были проведены исследования по оценке гемолиза. Предварительно был проведен анализ существующих методов и выбран наиболее оптимальный. **Цель.** Разработать стандартизованную методику гемолизных испытаний насосов для крови применительно к отечественному детскому насосу ДОН, на основании которой провести исследования на этапах его разработки. **Материалы и методы.** Для проведения гемолизных испытаний создан гидродинамический стенд, состоящий из резервуара, помещенного в водяную баню, поддерживающую постоянную температуру рабочей жидкости (крови), гидродинамического сопротивления, соединительных трубок, порта для забора крови, системы измерения давления и расхода и исследуемого насоса. Методика испытаний заключается в оценке уровня свободного гемоглобина плазмы рНб, получаемого с помощью забора проб крови в процессе работы насоса в рабочем режиме (для детского насоса: расход 2,5 л/мин, перепад давления 80 мм рт. ст.). На основании полученных данных вычисляются стандартизованные индексы гемолиза НИИ и МИИ, рассчитываемые на основании анализа свободного гемоглобина в плазме проб крови, гематокрита, общего гемоглобина, расхода крови и времени работы насоса. **Результаты.** Разработана и реализована методика гемолизных испытаний, с помощью которой проведена оценка гемолиза, вызываемого ДОН, результаты которой позволили оптимизировать конструкцию насоса. Полученные значения гемолиза последней версии детского насоса ДОН-3 показали, что они соответствуют требованиям минимальной травмы крови и позволяют перейти к следующему этапу исследований детского насоса – экспериментам на животных. **Заключение.** Разработанный метод и средства оценки гемолиза крови позволяют дать объективную информацию об одном из наиболее важных показателей разрабатываемого имплантируемого детского осевого насоса и могут быть рекомендованы для проведения гемолизных исследований других конструкций насосов.

Ключевые слова: гидродинамический стенд, гемолизные испытания, детский осевой насос, терминальная сердечная недостаточность.

Для корреспонденции: Иткин Георгий Пинкусович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (499) 190-60-34. E-mail: georgeitkin@mail.ru.

For correspondence: Itkin Georgy Pinkusovich. Address: 1, Shchukinskaya st., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. (499) 190-60-34. E-mail: georgeitkin@mail.ru

HEMOLYSIS RESEARCH OF IMPLANTABLE AXIAL FLOW PUMP FOR TWO-STEP HEART TRANSPLANTATION IN CHILDREN

O.Yu. Dmitrieva¹, A.S. Buchnev¹, A.A. Drobyshch¹, G.P. Itkin^{1, 2}

¹ V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

² Moscow Institute of Physics and Technology, Department of physics of living systems, Moscow, Russian Federation

Introduction. One of the main indicators characterizing mechanical circulatory support devices (artificial valve, implantable pumps, etc.) is trauma of blood cells. Therefore, while developing new pumps, one of the key studies *in vitro* is to evaluate blood hemolysis. For an objective hemolysis analysis of pump it is required to create a standardized methodology of hemolysis studies. The object of the study in this paper is implantable axial pump DON for two-step heart transplantation in children. **The aim of study** is to develop a standardized methodology of hemolysis studies of blood pumps and to conduct research of pediatric axial pump DON. **Materials and methods.** To conduct hemolysis research we created a mock circulatory system consisting of a reservoir placed in water bath maintaining a constant working fluid (blood) temperature, hydrodynamic resistance, connecting tubes, ports for blood sampling and pressure and flow measurement systems, and research pump. Test method is to estimate levels of free hemoglobin pHb obtained by blood samples during pump working in operating mode (for pediatric pump: blood flow 2.5 l/min, pressure difference 80 mmHg). Using the data obtained the standardized indices of hemolysis NIH and MIH are calculated based on pHb values, hematocrit, total hemoglobin, blood flow and working pump time. **Results.** We developed and realized a standardized methodology of hemolysis research by which we evaluated hemolysis of pediatric axial pump. The results of hemolysis tests allowed us to optimize the design of DON. Obtained values of hemolysis of the latest version of pediatric pump DON-3 have shown that they do conform to the requirements of minimum blood injury and it allows us to proceed to the next step of pediatric pump research – animal experiments. **Conclusion.** Developed methods and evaluation tools of hemolysis allow us to provide objective information on one of the most important indicators of developing implantable pediatric axial pump and they could be recommended for hemolysis research of others pumps.

Key words: hydrodynamic mock circulatory system, hemolysis research, pediatric axial pump, end-stage heart failure.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие для лечения детей с врожденной и приобретенной терминальной сердечной недостаточностью (ТСН) в клинической практике широко применяются методы механической поддержки кровообращения (МПК), основанные на использовании экстракорпоральной мембранной оксигенации (ЭКМО) и насосов левожелудочкового обхода (ЛЖО) [1, 2].

МПК за счет обеспечения необходимого уровня перфузии жизненно важных органов оказывает положительное влияние на их состояние и тем самым способствует повышению выживаемости детей с ТСН [3]. Все больше появляется работ, в которых наряду с кратковременной поддержкой используются системы длительной МПК (например, паракорпоральная система Berlin Heart Excor [3, 4]). Успешное применение этих систем связывают с относительно высокой выживаемостью детей за счет восстановления сократительной функции собственного миокарда [5, 6].

Одним из важнейших условий при разработке новых насосов для внедрения их в клиническую практику является минимальная травма форменных элементов крови, которую косвенно можно оценить на основании оценки гемолиза крови, вызываемого

работой насоса [7]. Поэтому до проведения экспериментальных и клинических испытаний в дополнение к гидродинамическим исследованиям эти насосы должны пройти испытания *in vitro* для оценки механической травмы форменных элементов крови.

При этом одним из основных методов этих испытаний является определение динамики уровня свободного гемоглобина в плазме крови pHb, полученного при работе насоса в типовом рабочем режиме на гидродинамическом стенде (ГС), заполненном свежей кровью [8].

Основные понятия механической травмы форменных элементов крови

Понятие гемолиза (греч. haima – кровь и lysis – разрушение) определяется как процесс разрушения эритроцитов и выход гемоглобина в плазму. В живом организме постоянно присутствует так называемый физиологический гемолиз вследствие естественного старения эритроцитов. В результате гемолиза происходит освобождение гемоглобина, который связывается белками плазмы крови в комплекс «гемоглобин–гаптоглобин», и затем под воздействием ферментов осуществляется окисление и отщепление гема от молекулы глобина, разрушение гема и образование билирубина.

Продолжительность жизни эритроцитов в среднем колеблется от 100 до 130 дней, но при наличии дефектов или в результате воздействия различных патологических факторов их жизненный цикл может значительно уменьшиться.

Одними из основных факторов, которые вызывают травму крови, являются повышенное осмотическое давление, химические реакции и физические механизмы. К классу «физических механизмов» относят влияние чужеродной поверхности и гидродинамических сил, которые развиваются при течении крови в проточных частях механических устройств. Одновременно данный процесс связан с энергетическими потерями в жидкости, минимизация которых достигается снижением вихревых зон в этих устройствах, уменьшением площади обтекаемых поверхностей и градиентов скоростей [9]. Причем основное внимание уделяется минимизации сдвиговых напряжений, действующих на мембрану эритроцитов и являющихся основной причиной гемолиза [10]. И если сдвиговые напряжения превышают определенную величину порядка 150 мПа, мембрана эритроцита разрушается, и гемоглобин выходит в плазму. При этом гемолиз определяется не только величиной напряжения сдвига, но и временем экспозиции этого напряжения в критических областях устройств.

Существует большое количество исследований критических значений напряжений сдвига и времени экспозиции для гемолиза [11–14].

В работе К. Affeld с соавт. [15] с помощью регрессионного анализа кумулятивные данные приведены к уравнению, которое описывает зависимость между критическим значением напряжения сдвига и времени экспозиции

$$\tau_{\text{crit}} = 88,905 \cdot t^{-0,3372} \text{ [Pa]},$$

где τ_{crit} – напряжение сдвига; t – время экспозиции.

Данная зависимость использовалась нами на этапе разработки насоса ДОН в 3-мерной математической модели для оптимизации полей скоростей насоса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЙ

В настоящее время отсутствует унифицированная методика проведения гемолизных испытаний, хотя многие исследовательские центры придерживаются рекомендаций, предложенных U.S. Food and Drug Administration (FDA) [16]. Однако до сих пор различные аспекты этих испытаний обсуждаются, поскольку практика применения насосов вспомогательного кровообращения (ВК) достаточно разнообразна.

Для оценки уровня гемолиза, вызываемого насосами ВК, используются гидродинамические стенды, позволяющие имитировать условия работы

исследуемых насосов в живом организме, которые в основном определяются перепадом давления на входе и выходе насоса ΔP и расходом крови Q .

Разные исследователи предлагают различные методики проведения и оценки результатов таких испытаний.

В большинстве работ [17–22] гемолиз оценивался по нормализованному индексу гемолиза NIH.

$$\text{NIH } g/100l = \text{pHb} \times V \times \frac{100 - \text{Ht}}{100} \times \frac{100}{Q \times T},$$

где pHb – увеличение свободного гемоглобина плазмы (г/л) в течение интервала времени выборки; V – объем контура (л); Q – расход крови (л/мин); Ht – гематокрит (%); T – время работы насоса (мин).

Для объективной оценки гемолизных характеристик насосов используется также модифицированный индекс гемолиза MIH [23].

$$\text{MIH} = \text{pHb} \times V \times \frac{100 - \text{Ht}}{100} \times \frac{10^6}{Q \times T \times \text{Hb}},$$

где Hb – общий гемоглобин в начальный момент времени (мг/л); pHb – увеличение свободного гемоглобина плазмы (г/л) в течение интервала времени выборки; V – объем контура (л); Q – расход крови (л/мин); Ht – гематокрит (%); T – время работы насоса (мин).

Типовая схема гидравлического стенда для гемолизных испытаний представляет собой замкнутый контур, состоящий из венозного резервуара, системы трубок и гидродинамического сопротивления (ГДС), предназначенного для установки перепада давления при заданном расходе насоса. Ранее полагали, что гемолиз дополнительно может быть вызван зажимом для создания ГДС, поэтому в некоторых работах вместо него использовали длинные трубки относительно небольшого диаметра. Однако в работе Heinrich Schima с соавт. [24] показано незначительное влияние на гемолиз крови, оказываемое разными видами ГДС.

При исследовании гемолиза крови, вызванного работой насоса ВК, используют, как правило, свежую кровь, взятую в день проведения эксперимента (донорская кровь человека, свежая кровь животных – телянок, свиная, овца). Однако травмируемость эритроцитов значительно отличается как от вида субъекта, так и от конкретного донора. Поэтому в ряде работ предлагают для сравнения проводить оценку гемолиза параллельно на двух контурах. В одном устанавливают исследуемый насос, в другом – коммерческий насос Biopump (Medtronic inc., США), который является «золотым стандартом» при проведении гемолизных испытаний [25–27]. При этом типовой режим работы насосов ВК в большинстве исследований: 5 л/мин при перепаде давления 100 мм рт. ст.

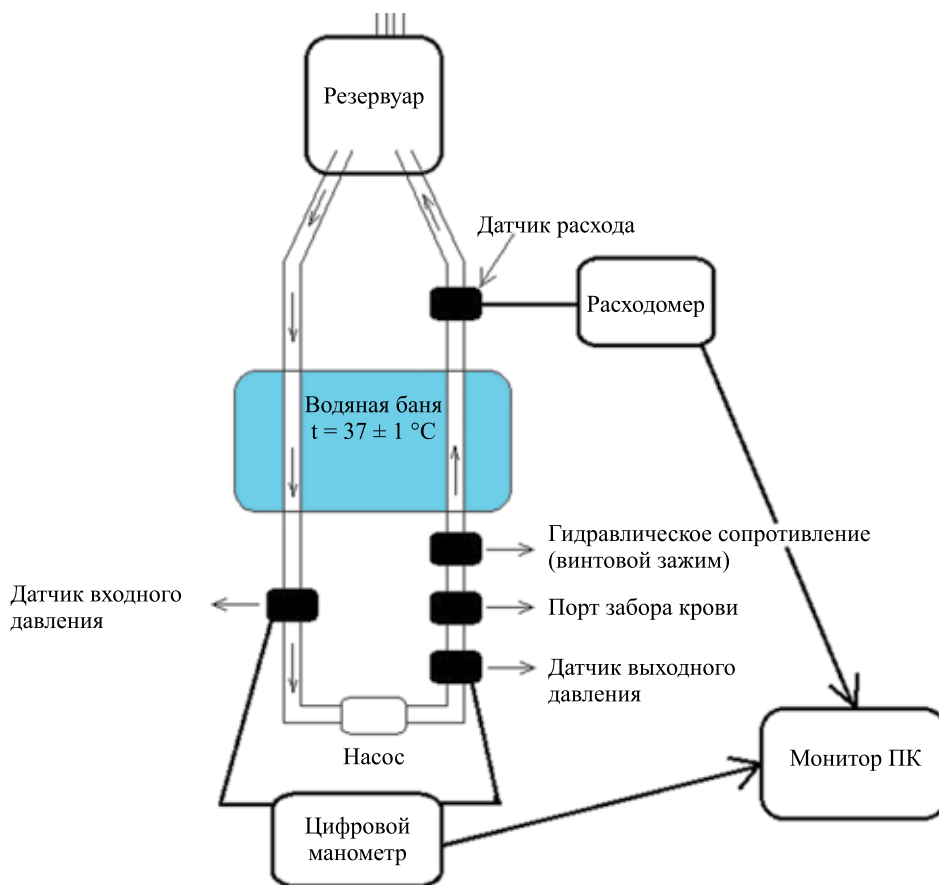


Рис. 1. Гидродинамический стенд для снятия гемолитических характеристик осевого насоса

Fig. 1. Mock circulation system for estimation of the hemolytic characteristics of the axial pump

На основании анализа литературных данных и с учетом особенностей условий работы детского насоса нами были разработаны и реализованы методика и принципиальная схема гидродинамического стенда гемолитических испытаний (рис. 1).

Гидродинамический стенд представляет собой замкнутый контур, состоящий из резервуара, соединительных трубок, водяной бани, поддерживающей постоянную температуру рабочей жидкости (крови) 37 ± 1 °C, системы измерения давления и расхода жидкости, гидравлического сопротивления, который представлен в виде винтового зажима, катетера для забора проб крови и испытуемого насоса.

Для удобства перемещения стенд выполнен на тележке с ванной из нержавеющей стали (рис. 2).

В ванной располагается стойка, к которой крепится контур с исследуемым насосом, датчиками давления, терморезистором, расходомером и венозным резервуаром. Для нагрева и поддержания заданной температуры жидкости в ванной используется термостат с системой циркуляции нагретой жидкости.

Для измерения величины расхода жидкости используется ультразвуковой расходомер Transonic (Transonic System inc., США) с накладными датчиками расхода TS410.



Рис. 2. Внешний вид стенда

Fig. 2. Shopfront of the mock circulation system

Система измерения давлений включает в себя датчики давления Tru Wave (Edwards, США) и универсальный модуль измерения давления «Ангиотон» (Биософт-М, Россия).

Методика исследования

Забор крови у донора производится в день проведения эксперимента (450 мл цельной крови + 50 мл цитрата).

Перед заполнением контура берется проба крови для анализа значения показателей: гемоглобина (Hb), гематокрита (Hct) и уровня свободного гемоглобина в плазме (pHb) (анализатор Abacus Junior 30 VET – Diatron, Австрия).

Перед заполнением донорской кровью ГС с испытуемым насосом промывается физиологическим раствором в рабочем режиме детского насоса (расход Q = 2,5 ± 0,2 л/мин и перепад давления на входе и выходе ΔP = 80 ± 5 мм рт. ст.).

После промывки физиологический раствор сливают, и ГС заполняется донорской кровью с добавлением 2500 МЕ гепарина в качестве антикоагулянта. Далее тщательно удаляется из контура воздух. Все эксперименты проводят при постоянной температуре (37 ± 1 °C). После заполнения контура кровью насос запускается на минимальных скоростях вращения ротора (10 000 ± 50 об/мин), и после тщательного перемешивания крови берется исходная проба.

Затем устанавливается рабочий режим детского насоса (расход Q = 2,5 ± 0,2 л/мин и перепад дав-

ления на входе и выходе ΔP = 80 ± 5 мм рт. ст.), и каждые 0,5 часа из контура берут пробу крови (общее время циркуляции составляет 3–6 часов). С помощью лабораторной центрифуги ОПН-8 из пробы выделяют плазму, и на спектрофотометре (HemoCue Plasma Low/Hb, Швеция) оценивается рНb. На основании полученных данных строят графические зависимости изменения значений рНb от времени. Математическая оценка гемолиза проводится на основании расчета нормализованного индекса гемолиза НИИ и модифицированного индекса гемолиза МИИ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предварительные гемолизные испытания моделей детского насоса ДОН-1 и ДОН-2 показали значительный гемолиз, превышающий допустимый уровень до 0,4 г/л.

В дальнейшем была проведена модернизация насоса, реализованная в конструкции ДОН-3, которая показала удовлетворительные результаты гемолизных испытаний. При расходе 2,5 л/мин и перепаде давления 80 мм рт. ст. значение свободного гемоглобина в плазме крови составило 0,1–0,2 г/л по прошествии 3 часов от начала эксперимента (рис. 3). Было проведено 6 испытаний насоса.

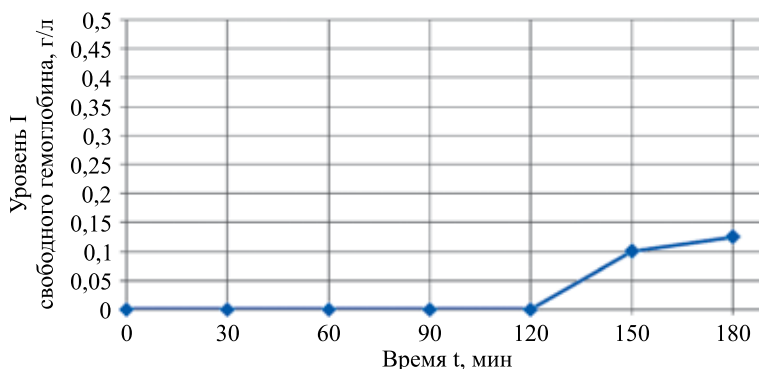


Рис. 3. График зависимости уровня свободного гемоглобина от времени испытаний

Fig. 3. Dependent of free hemoglobin – time

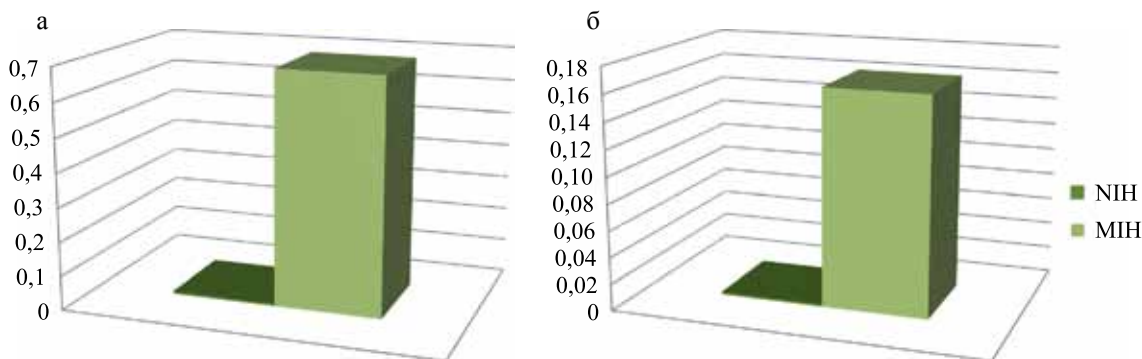


Рис. 4. Средние значения (а) и стандартные отклонения (б) индексов гемолиза

Fig. 4. Mean values (a) and the standard deviations (б) of hemolysis indexes

Рассчитанные значения индексов гемолиза: $NIH = 0,005738$; $MIH = 0,573773$

Средние значения и стандартные отклонения индексов гемолиза (NIH , MIH) представлены на рис. 4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании стандартизированной методики гемолизных испытаний проведены исследования детского осевого насоса ДОН на всех этапах разработки. Последняя модификация детского насоса ДОН-3 соответствует требованиям минимальной травмы крови, что позволяет перейти к дальнейшим исследованиям насоса в экспериментах на животных (овцы).

Работа выполнена с привлечением средств гранта Российского научного фонда (проект 16-15-00283).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Throckmorton AL, Chopski SG. Pediatric Circulatory Support: Current Strategies and Future Directions. Biventricular and Univentricular Mechanical Assistance. *ASAIO Journal*. 2008; 54: 491–497.
2. Rosenthal DN, Almond CS, Jaquiss RD, Peyton CE, Auerbach SR et al. Adverse events in children implanted with ventricular assist devices in the United States: Data from the pediatric interagency registry for mechanical circulatory support (PediMACS). *J. Heart Lung Transplant*. 2016; 35 (5): 569–577.
3. Zafar F, Jefferies JL, Tjossem CJ, Bryant R, Jaquiss RD, Wearden PD et al. Biventricular Berlin Heart EXCOR pediatric use across the United States. *Ann. Thorac. Surg*. 2015; 99 (4): 1328–1334.
4. Potapov EV, Hetzer R. Pediatric Berlin Heart Excor. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 2006; 12 (2): 15.
5. Baldwin JT, Duncan BW. Ventricular assist devices for children. *Progress in Pediatric Cardiol*. 2006; 21: 173–184.
6. Fraser CD, Jaquiss RDB, MD, Rosenthal DN et al. Prospective trial of a pediatric ventricle assist device. *New England J. of Medicine*. 2012; 367 (6): P532–541.
7. Itkin GP, Matveev YG, Romanov OV. Comparative hemolysis tests of rotary blood pump. *Artificial Organs*. 1995; 19 (7): 616–619.
8. Wurzinger LJ, Opitz R, Eckstein H. Mechanical blood trauma: an overview. *Angeiologie*. 1986; 38: P81–97.
9. Leverett LB, Hellums JD, Alfrey CP, Lynch EC. Red blood cell damage by shear stress. *Biophys. J*. 1972; 12: 257–272.
10. Throckmorton AL, Untaroiu A, Allaire PE, Houston G, Wood HG et al. Computational analysis of an axial flow pediatric ventricular assist. *Artificial Organs*. 2007; 28 (10): 881–891.
11. Paul R, Schügner F, Reul H, Rau G. Recent findings on flow induced blood damage: critical shear stresses and exposure times obtained with a high shear stress Couette system. *Artif. Organs*. 1999; 23: 680.
12. Yeleswarapu KK, Antaki JF, Kameneva MV, Rajagopal KR. A mathematical model for shear induced hemolysis. *Artif. Organs*. 1995; 19: 576–582.
13. Apel J, Paul R, Klaus S, Siess Th, Reul H. Assessment of hemolysis related quantities in a microaxial blood pump by computational fluid dynamics. *Artif. Organs*. 2001; 25: 341–347.
14. Huang CR, Fabisiak W. A rheological equation characterizing both the time dependent and steady state viscosity of human blood. *AIChE Symp. Series*. 1978; whole: 19–21.
15. Affeld K, Goubergrits L, Holberndt O. Novel cardiac assist valve with a purge flow in the valve sinus. *ASAIO J*. 1998; 44: M642–647.
16. ASTM F1841-97: Standard Practice for Assessment of Hemolysis in Continuous Flow Blood Pumps. 2005.
17. Kawahito K, Nosé Y. Hemolysis in different centrifugal pumps. *Artif. Organs*. 1997; 21: 323–326.
18. Nakazawa T, Takami Y, Benkowski R, Ohtsubo S, Yukio O et al. Development and Initial Testing of a Permanently Implantable Centrifugal Pump. *Artificial Organs*. 1997; 17: 597–601.
19. Araki K, Anai T, Oshikawa M, Nakamura K, Onitsuka T. In vitro Performance of a Centrifugal, a Mixed Flow, and an Axial Flow Blood Pump. *Artificial Organs*. 1998; 22 (5): 366–370.
20. Kawahito K, Nose Y. Hemolysis in Different Centrifugal Pumps. *Artificial Organs*. 1997; 21 (4): 323–326.
21. Kobayashi K, Nitta S, Yambe T, Sonobe T, Naganuma S et al. Hemolysis test of disposable type vibrating flow pump. *Artificial Organs*. 1997; 21 (7): 691–693.
22. Gobel C, Eilers R, Reul H, Schwindke P, Jorger M, Rau G. A New Blood Pump for Cardiopulmonary Bypass: The HiFlow centrifugal pump. *Artificial Organs*. 1997; 21 (7): 841–845.
23. Mueller MR, Schima H, Engelhardt H et al. In vitro hematological testing of rotary blood pumps; remarks on standardization and data interpretation. *Artif. Organs*. 1993; 17: 103–110.
24. Schima H, Müller MR, Tsangaris S et al. Mechanical blood traumatization by tubing and throttles in in vitro pump tests: experimental results and implications for hemolysis theory. *Artif. Organs*. 1993; 17: 164–170.
25. Tamari Y, Lee-Sensiba K, Leonard EF, Parnell V, Tortolani AJ. The effects of pressure and flow on hemolysis caused by Bio-Medicus centrifugal pumps and roller pumps. Guidelines for choosing a blood pump. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 1993; 106: 997–1007.
26. Naito K, Suenaga E, Cao Z-L, Suda H, Ueno T et al. Comparative hemolysis study of clinically available centrifugal pumps. *Artif. Organ*. 1996; 20 (6): 560–563.
27. Maruyama O, Yamaguchi K, Nishida M, Onoguchi T, Tsutsui T. Hemolytic evaluation using polyurethane microcapsule suspensions in circulatory support devices: normalized index of hemolysis comparisons of commercial centrifugal blood pumps. *Artificial Organs*. 2007; 32 (2): 146–156.

Статья поступила в редакцию 27.01.2017 г.
The article was submitted to the journal on 27.01.2017