

ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЭРИТРОЦИТОВ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КОНСЕРВИРОВАННОЙ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ХРАНЕНИЯ

В. В. Мороз¹, А. М. Голубев¹, Е. К. Козлова¹, А. В. Афанасьев¹, О. Е. Гудкова¹,
И. С. Новодержкина¹, Ю. В. Марченков^{1,2}, А. Н. Кузовлев¹,
Ю. В. Заржецкий¹, А. И. Костин², Д. П. Волков¹, В. Н. Яковлев²,

¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского РАМН, Москва

² Городская клиническая больница им. С. П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы

Time Course of Morphological Changes in Red Blood Cells and Stored Whole Blood Biochemical Parameters in Different Storage Periods

V. V. Moroz¹, A. M. Golubev¹, E. K. Kozlova¹, A. V. Afanasyev¹, O. E. Gudkova¹, I. S. Novoderzhkina¹,
Yu. V. Marchenkov^{1,2}, A. N. Kuzovlev¹, Yu. V. Zarzhetsky¹, A. I. Kostin², D. P. Volkov¹, V. N. Yakovlev²

¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

² S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow Healthcare Department

Цель работы: изучение закономерностей биохимических изменений крови, динамики пойкилоцитоза и нарушений ультраструктуры мембран эритроцитов цельной крови, консервированной в ЦФДА-1 (CPDA-1), в процессе длительного хранения. **Материал и методы.** Исследовалась цельная кровь, полученная от 5 доноров в возрасте 25±3 лет разного пола, хранившаяся при +2...+4°C. На 1-е, 7-е, 14-е, 21-е и 30-е сутки хранения оценивали морфологический состав популяции эритроцитов в монослойных мазках крови — 1000 клеток на мазок при использовании микроскопа Olympus BX-500, компьютера и программы ImageScopeM. Поверхность мембран эритроцитов анализировали с помощью атомного силового микроскопа (АСМ): «IntegraPrima» NT — MDT. Биохимический состав крови исследовали с помощью анализатора: «i-stat 1® analyzer M: 300». Статистическую обработку производили с использованием программы STATISTICA 7. **Результаты.** Выявлено изменение биохимического состава цельной крови уже в первые сутки хранения, а именно: достоверно уменьшается гематокрит, содержание гемоглобина, ионов натрия и кальция, существенно увеличивается концентрация глюкозы (до 700 мг/дл). Морфологические изменения эритроцитов наблюдаются через 3-е суток. К 21 суткам число дискоцитов в крови составляет 31,3±3,27% ($p<0,0001$) относительно контроля (первых суток). Через 30 суток хранения обнаруживается более 80% измененных эритроцитов, среди которых преобладают эхиноциты (79,6±2,74%, $p<0,0001$). Исследования с использованием АСМ проиллюстрировали, что по мере хранения наноструктура мембран эритроцитов существенно изменяется: появляются локальные повреждения (выросты различных размеров), трансформируемые в крупные спиккулы. **Заключение.** Проведенные исследования биохимических показателей крови, морфологических характеристик эритроцитов и их мембран свидетельствуют о развитии изменений, начиная с первых суток хранения крови. Полученные данные представляют существенными для разработки новых способов консервации крови и ее компонентов. **Ключевые слова:** кровь, эритроциты, ЦФДА-1.

Objective: to reveal the patterns of blood biochemical changes, a trend in poikilocytosis, and impairment in the ultrastructure of red blood cells of the whole blood stored in citrate-phosphate-dextrose-adenine-1 during long-term storage. **Material and methods.** The whole blood that had been obtained from 5 donors aged 25±3 years of different sexes and stored at +2 to +4°C was examined. On storage days 1, 7, 14, 21, and 30, the morphological composition of a red blood cell population was assessed in monolayer blood smears (1000 cells per smear), by using an Olympus BX-500 microscope, computer, and ImageScopeM program. The surface of the red blood cell membranes was analyzed using an IntegraPrima NT-MDT atomic force microscope (AFM). Blood biochemical composition was examined using an i-stat 1® analyzer M: 300. Statistical processing was made with a STATISTICA 7 program. **Results.** A change in the biochemical composition of the whole blood was revealed within just the first 24 hours of storage. Morphological changes were observed in the red blood cells 3 days later. At 21 days, discocytes were 31.3±3.27% as compared to the control (in the first 24 hours) ($p<0.0001$). After 30 days of storage, altered red blood cells amounted to more than 80%, among them echinocytes prevailed as compared to the control (79.6±2.74%; $p<0.0001$). The examinations using AFM illustrated that the nanostructure of the red blood cell membranes tangibly changed with storage, they showed local lesions (excrescences of different sizes) growing into large spicules. **Conclusion.** The performed studies of the biochemical parameters of the blood, the morphological characteristics of the red blood cells and their membranes suggest that their changes evolved in just the first 24 hours of blood storage. The findings are essential for the development of new methods for storing blood and its components. **Key words:** blood, red blood cells, citrate-phosphate-dextrose-adenine-1.

Адрес для корреспонденции (Correspondence to):

Голубев Аркадий Михайлович (Golubev A. M.)
E-mail: arkadygolubev@mail.ru

В настоящее время при лечении больных используются донорская кровь и компоненты донорской крови, которые помогают восполнить утраченные при кровопотере форменные элементы и объем циркулирующей крови (ОЦК). Чаще пользуются различными эритроцитсодержащими компонентами донорской крови и свежезамороженной плазмой. В рекомендациях ВОЗ от 2001 года переливание цельной крови рекомендовано в случаях острой кровопотери при отсутствии эритроцитной массы и других кровезаменителей [1]. Применение консервированной донорской крови отражено в последних обновлениях российского законодательства и постановлениях правительства: «донорская кровь — кровь, взятая от донора и предназначенная для клинического использования, производства компонентов крови, лекарственных средств и медицинских изделий, а также для использования в научно-исследовательских и образовательных целях» [2, 3].

Цельная кровь является неперенным элементом в последних изданиях руководств по службе крови за рубежом (табл. 1) [4].

За последние 10–12 лет имеются лишь единичные исследования консервированной донорской и ауто-крови при ее длительном хранении [5–7].

Гемотрансфузия цельной крови в 2010 году составила 0,07% от общего объема донорской крови, что составило 1:181 трансфузий цельной крови к трансфузии эритроцитной массы и другим компонентам [8]. Прямое переливание крови, или так называемое переливание свежей донорской крови (FWB), часто используется в армии США и в армиях стран НАТО [9].

Хранение консервированной цельной донорской крови сопровождается морфофункциональными изменениями форменных элементов крови. Ключевая роль в формировании реологических параметров крови принадлежит эритроцитам, поскольку они составляют 98% от общего объема клеточной популяции [10, 11]. От состояния мембран эритроцитов и от возможности коррекции ее состояния, зависит уровень микроциркуляции в органах и тканях [12–13]. Значительные изменения, которые впоследствии прогрессируют, регистрируются на 14-е сутки хранения [15], нарушается функциональное состояние мембран клеток [16, 17].

При внедрении новых полимерных материалов и консервантов, должно проводиться расширенное изучение их влияния на приготовление и/или хранение эритроцитсодержащих компонентов крови. Полезно рассмотрение следующих параметров:

- глюкоза, рН, гематокрит, гемолиз, АТФ, лактат, внеклеточный калий и 2,3-бисфосфоглицерат [4].

Материал и методы

Исследовалась цельная кровь, полученная от пяти доноров в возрасте $25 \pm 3,5$ лет, консервированная в ЦФДА-1 (СРДА-1). В 100 мл раствора ЦФДА-1 содержится: лимонной кислоты моногидрата 0,327 г, натрия цитрата дигидрата 2,63 г, натрия фосфата одноосновного моногидрата 0,222 г, декстрозы моногидрата 3,19 г и аденина 0,0275 г. [18]. Соотношение раствора гемоконсерванта ЦФДА-1 составляет 14 мл на 100 мл цельной крови. Допустимая длительность хранения крови и ее компонентов в данном консерванте составляет 35 дней [4].

Монослойные мазки крови, взятые на 1, 7, 14, 21 и 30 сутки хранения, были изготовлены с помощью «V-sampler, Vision Microscopy». Оценивалась морфология эритроцитов [19, 20]. Проводился подсчет по 12 полям зрения (не менее 1000 клеток на каждый мазок). При проведении микроскопии использовалась система анализа изображений, включающая в себя: микроскоп Olympus BX-500, компьютер Intel Pentium-2 и программу ImadgeScopeM. Кровь хранилась при температуре $+2...+4^\circ\text{C}$. Перед изготовлением мазков пробы крови в течение часа согревали при комнатной температуре [21]. Биохимический состав крови исследовался с помощью портативного клинического анализатора «i-stat 1® Analyzer M: 300» со сменными картриджами. Статистическая обработка данных проводилась стандартными статистическими методами с использованием компьютерной программы STATISTICA 7.

Мембрана эритроцитов была исследована с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) «IntegraPrima» фирмы NT — MDT(РФ). Сканирование проводили в поле 100×100 мкм, размер фрагмента — 1500×1500 нм. Сканирование осуществляли в полуконтактном режиме (1024 точек сканирования, кантилевером NSG 01 с радиусом зонда 10 нм).

Результаты и обсуждение

В мазках крови, приготовленных через сутки после взятия крови, число дискоцитов составило $96,43 \pm 0,53\%$, эхиноцитов — $2,91 \pm 0,40\%$, эллиптоцитов (овалоцитов) — $0,41 \pm 0,19\%$, сфероцитов — $0,01 \pm 0,22\%$, дакриоцитов $-0,19 \pm 0,11\%$ и пузырчатых эритроцитов — $0,05 \pm 0,04\%$ (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о незначительно выраженном пойкилоцитозе в первые сутки хранения.

Через 7 сут. хранения цельной крови усиливается пойкилоцитоз, содержание эхиноцитов возрастает до $28,4 \pm 2,52\%$ ($p < 0,0001$), овалоцитов $-0,8 \pm 0,31\%$ ($p < 0,05$) и сфероцитов — до $2,8 \pm 0,55\%$ ($p < 0,0001$) относительно 1-х суток. Число эритроцитов с признаками пойкило-

Таблица 1

Критерии качества для некоторых трансфузионных сред [4]

Параметр	Консервированная кровь	Эритроцитная масса	Эритроцитная масса с удаленным ЛТС
Гематокрит	—	0,65–0,75	0,65–0,75
Остаточные лейкоциты в дозе	—	—	$< 1,2 \times 10^9$
Гемоглобин	Минимум 45 г/доза	Минимум 45 г/доза	Минимум 43 г/доза
Гемолиз эритроцитов в конце хранения	$< 0,8\%$	$< 0,8\%$	$< 0,8\%$
Объем	450 ± 50 мл объем без антикоагулянта	280 ± 50 мл	250 ± 50 мл

Примечание. ЛТС — лейкотромбоцитарный слой.

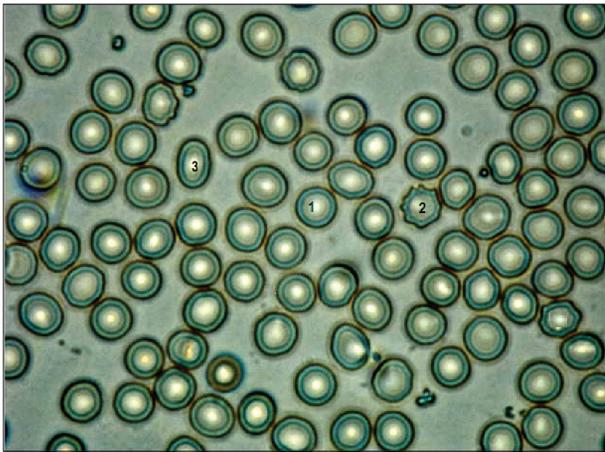


Рис. 1. 1-е сутки хранения крови. Неокрашенный мазок цельной крови. $\times 1000$.
1 — дискоцит; 2 — эхиноцит; 3 — эллиптоцит (овалоцит).

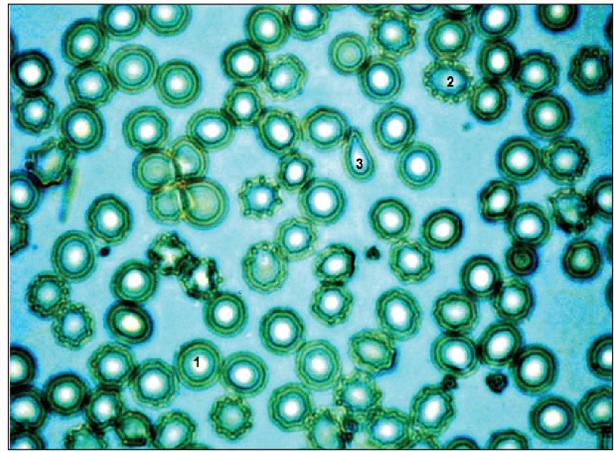


Рис. 3. 14-е сутки хранения крови. Неокрашенный мазок цельной крови. $\times 1000$.
1 — дискоцит; 2 — эхиноцит; 3 — дакриоцит.

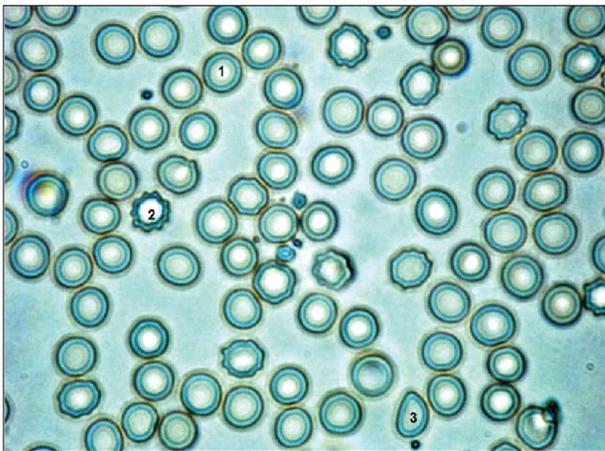


Рис. 2. 7-е сутки хранения крови. Неокрашенный мазок цельной крови. $\times 1000$.
1 — дискоцит; 2 — эхиноцит; 3 — дакриоцит.

цитоза составляет $32,6 \pm 5,22\%$ ($p < 0,0001$) относительно контроля (рис. 2).

По сравнению с первыми сутками, на 14-15 сут. хранения количество дискоцитов уменьшилось и составило $58,40 \pm 0,32\%$ ($p < 0,0001$), возросло число эхиноцитов — $34,1 \pm 1,07\%$ ($p < 0,0001$), сфероцитов — $5,2 \pm 1,02\%$ ($p < 0,0001$), дакриоцитов — $0,4 \pm 0,15\%$ ($p < 0,0001$) и пузырьчатых эритроцитов — $0,1 \pm 0,02\%$, $p < 0,0001$ (рис. 3).

АСМ проиллюстрировала, что на 15 день хранения крови количество дискоцитов уменьшилось, клетки стали приобретать форму сфероцитов, на поверхности их мембран начинают формироваться

выросты различных размеров. Эти выросты показаны на рис. 4.

В мазках крови на 21 сутки хранения наблюдается ярко выраженный эхиноцитоз ($59,7 \pm 3,83\%$, $p < 0,0001$). Сфероциты составили $6,6 \pm 0,59\%$, ($p < 0,0001$) по сравнению с 1-ми сутками. Число дискоцитов в крови менее 50%: $31,3 \pm 3,27\%$ ($p < 0,0001$), общее число морфологически измененных эритроцитов составляет $68,8 \pm 3,27\%$ ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем (табл. 2, рис. 5). На этом сроке хранения крови АСМ показывает, что изменения на поверхности мембран эритроцитов возрастают. Развитие этого процесса приводит к формированию эхиноцитов.

На 30 сутки хранения в крови большая часть эритроцитов представлена эхиноцитами ($79,6 \pm 2,74\%$, $p < 0,0001$) и сфероцитами $7,6 \pm 2,24\%$, ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем. Дискоциты составляют

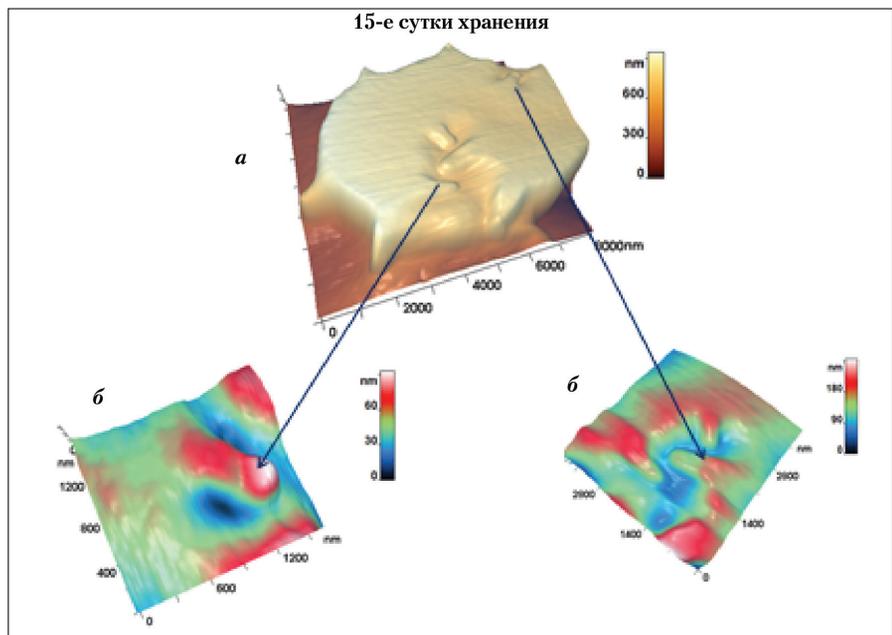


Рис. 4. 15-е сутки хранения крови, АСМ: эхиноцит (а) и его фрагменты (б). Стрелки указывают места локализации измененных фрагментов клетки. Примечание. Здесь и на рис. 6, 8: АСМ — атомно-силовая микроскопия.

Морфологическая характеристика эритроцитов (пойкилоцитоз) на разных сроках хранения крови ($M \pm m$)

Морфологические формы эритроцитов (<i>n</i>)	Процент эритроцитов на разных сроках хранения, сутки				
	1-е	7-е	14-е	21-е	30-е
Дискоциты (%)	96,4±0,53	67,5±2,33*	58,4±0,32*	31,3±3,27*	11,9±1,50*
Эхиноциты (%)	2,9±0,40	28,4±2,52*	34,1±1,07*	59,8±3,83*	79,6±2,74*
Овалоциты (эллиптоциты) (%)	0,4±0,19	0,8±0,31**	1,8±0,85#	1,6±0,41#	0,5±0,20**
Сфероциты (%)	0,01±0,22	2,8±0,55*	5,2±1,02*	6,6±0,59*	7,6±2,24*
Дакриоциты (%)	0,2±0,11	0,6±0,24*	0,4±0,15*	0,7±0,20*	0,4±0,28*
Пузырчатые (%)	0,05±0,04	0,01	0,06±0,02*	—	0,01
Стоматоциты (%)	—	—	—	—	—
Дегмациты (надкусан.) (%)	—	—	0,01	—	0,01
Дрепаноциты (серп.) в %	—	0,03	0,02	—	—
Шистоциты (%)	—	0,01	—	—	0,01
Морфологически измененных клеток (всего), в %	3,6±0,53	32,6±5,22*	41,6±0,32*	68,8±3,27*	88,1±1,50*

Примечание. * — $p < 0,0001$ относительно 1-х суток; ** — $p < 0,05$ относительно 1-х суток; # — $p > 0,05$ относительно 1-х суток.

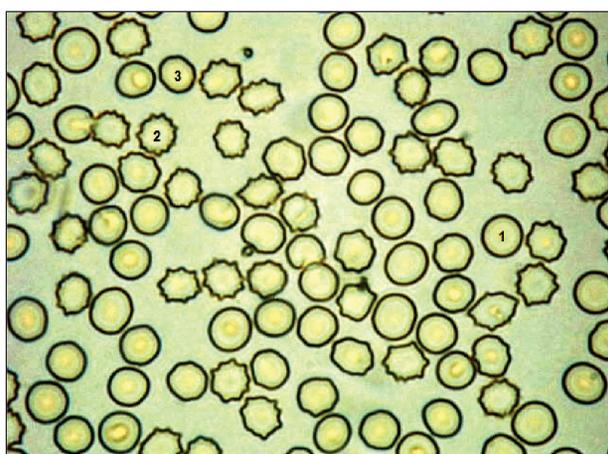


Рис. 5. 21-е сутки хранения крови. Неокрашенный мазок цельной крови. $\times 1000$.

1 — дискоцит; 2 — эхиноцит; 3 — сфероцит.

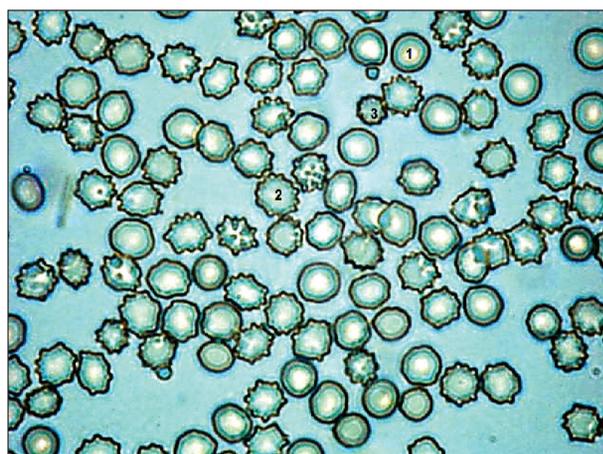


Рис. 7. 30-е сутки хранения, неокрашенный мазок цельной крови $\times 1000$.

1 — дискоцит; 2 — эхиноцит; 3 — сфероцит.

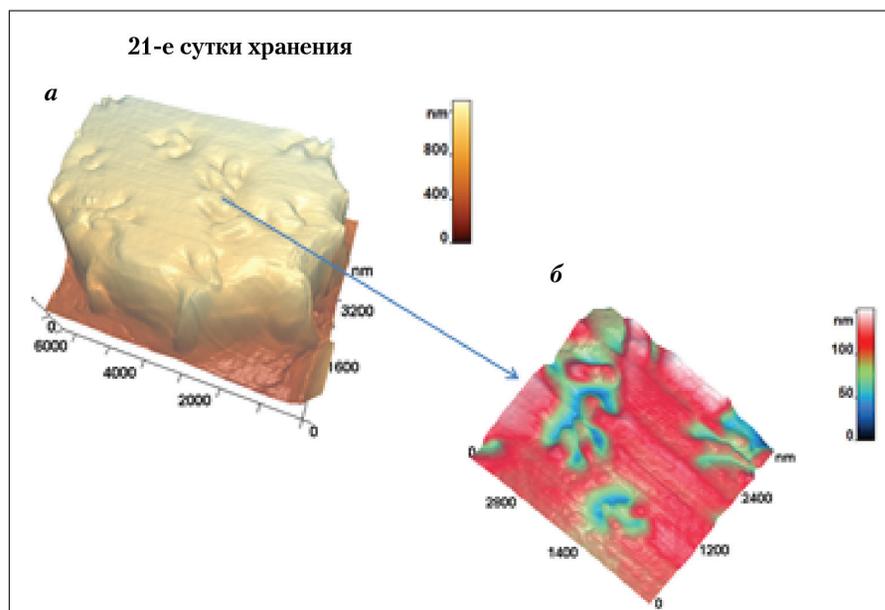


Рис. 6. 21-е сутки хранения, АСМ: эхиноцит (а) и его увеличенный фрагмент (б).

Стрелка указывает локализацию фрагмента на клетке.

11,9±1,50%, ($p < 0,0001$), содержание измененных клеток 88,1±1,50%, ($p < 0,0001$) по сравнению с показателями крови в 1 сутки хранения (рис. 7). К 30 дню хранения цельной крови большая часть эритроцитов представлена сфероэхиноцитами (рис. 7).

Биохимические показатели. рН крови при ее хранении снижается. На 7-е сутки наблюдения рН составил $6,7 \pm 0,05$ ($p < 0,05$), через 14 суток — $6,6 \pm 0,05$ ($p < 0,05$) и на 21 сутки — $6,5 \pm 0,01$ ($p < 0,05$), соответственно. К 30 суткам рН равен $6,4 \pm 0,01$ ($p < 0,05$) (табл. 3).

В крови уже в первые сутки имело отрицательное значение $-27,3 \pm 1,000$ ммоль/л ($p < 0,05$). И в дальнейшем снизилось до $-30,0$ ($p < 0,05$).

Показатели, ед. измерения	Значение показателей на этапах хранения крови, сутки					
	физиологические константы крови (собств. данные)	1-е	7–10-е	12–14-е	19–21-е	30–33-е
pH	7,35–7,45	6,605–6,871*	6,602–6,833*	6,500–6,759*	6,500–6,577*	6,459–6,500*
Ве (кислотное основание), ммоль/л	1–2,0	-27–(-30)*	-25–(30)*	-30*	-30*	-30*
Ht (гематокрит), %	36–48	18–27*	17–27*	12–22*	10–25*	10–21*
Hb (гемоглобин), г/дл	13–18	6,1–9,5*	5,8–8,5*	6,8–8,8*	4,1–7,8*	5,1–6,8*
Glu (глюкоза), мг/дл	65–164	672–700*	398–700*	323–700*	352–619*	392–483*
Na, ммоль/л	143–163	133–140*	107–140*	125–128*	124–130*	116–128*
K, ммоль/л	3,2–5,77	3,0–3,60**	4,7–6,3**	5,7–8,4**	7,2–9,0*	9,0*
Ca, ммоль/л	2,15–2,25	<0,25*	<0,25*	<0,25*	<0,25*	<0,25*

Примечание. * – $p < 0,05$ относительно физиологических констант крови (собств. данные); ** – разница недостоверна.

Содержание глюкозы в первые сутки составило $690,7 \pm 9,33$ мг/дл ($p < 0,05$), что в 5 раз больше верхней физиологической границы (65–164 мг/дл). В течение всего периода хранения крови содержание глюкозы снижалось: через 7 суток – $565,6 \pm 59,74$ мг/дл ($p < 0,05$), после 14 суток – $527,0 \pm 63,60$ мг/дл ($p < 0,05$), 21 сутки – $495,4 \pm 46,54$ мг/дл ($p < 0,05$) и к 30-м суткам содержание глюкозы составило $446,7 \pm 27,82$ мг/дл ($p < 0,05$).

Количество ионов натрия в первые сутки составило $135,7 \pm 2,19$ ммоль/л, $p < 0,05$ и в течение 30 суток неуклонно снижалось. После 7 суток хранения крови содержание ионов натрия составило $127,6 \pm 5,91$ ммоль/л ($p < 0,05$), на 14 сутки – $126,3 \pm 0,88$ ммоль/л ($p < 0,05$), к

21 суткам – $126,7 \pm 1,76$ ммоль/л ($p < 0,05$). В конце периода наблюдения концентрация ионов натрия составила $122,0 \pm 1,98$ ммоль/л ($p < 0,05$).

Содержание ионов калия в первые сутки составило $3,4 \pm 0,19$ ммоль/л ($p < 0,05$). В течение всего периода наблюдения его уровень продолжал возрастать. К 7 суткам содержание K^+ достигло $5,7 \pm 0,284$ ммоль/л ($p < 0,05$), на 14 сутки – $6,9 \pm 0,55$ ммоль/л ($p < 0,05$). После 21 суток хранения цельной крови его содержание было равно $8,3 \pm 0,34$ ммоль/л ($p < 0,05$), а к 30 суткам $> 9,00$ ммоль/л ($p < 0,05$), соответственно. Повышение содержания уровня калия в цельной крови свидетельствует о том, что калий покидает поврежденные клетки и поступает в плазму, где регистрируется его повышенное содержание. Этот процесс свидетельствует о нарушении функционирования натрий-калиевого насоса и приводит к деполяризации мембраны эритроцитов.

Снизилось содержание общего белка. Через сутки хранения крови содержание общего белка составило $5,9 \pm 0,36$ г/дл, на 14 сутки – $4,9 \pm 0,27$ г/дл, на 30 сутки – $3,9 \pm 0,37$ г/дл.

Подходы к защите эритроцитов. Используемые при заготовке крови растворы антикоагулянтов были разработаны для предотвращения ее свертывания и хранения эритроцитов в течение определенного периода. На-

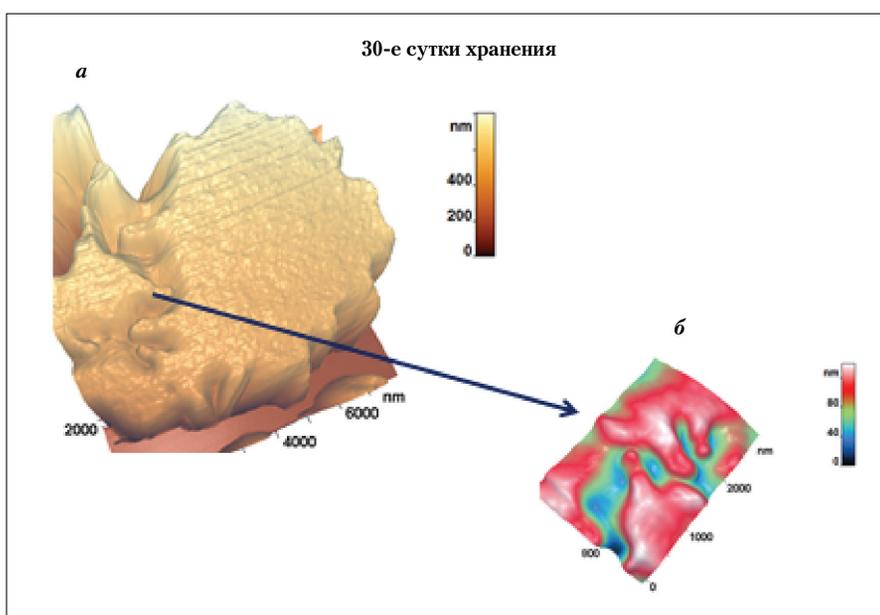


Рис. 8. 30-е сутки хранения цельной крови. АСМ: сфероэритроцит (а), его фрагмент (б). Стрелка указывает локализацию фрагмента на клетке.

ряду с первоначальным назначением данных растворов — для хранения цельной крови, они также используются и для крови, из которой готовят компоненты. Все растворы содержат цитрат натрия, лимонную кислоту и глюкозу, некоторые из них могут также содержать аденин, гуанозин и фосфат. Цитрат связывает кальций, предотвращая свертывание крови. Глюкоза необходима эритроцитам для поддержания их жизнеспособности в процессе хранения. Каждая молекула глюкозы дает две молекулы аденозинтрифосфата (АТФ), путем фосфорилирования аденозиндифосфата (АДФ). Высокоэнергетичные молекулы АТФ используются для поддержания энергоемких функций эритроцитов, таких как эластичность мембран и ряд мембрано-транспортных функций. В ходе потребляющих энергию действий АТФ вновь превращается в АДФ. Лимонная кислота добавляется к антикоагулянту для обеспечения требуемой концентрации ионов водорода, которая должна быть высока в начале хранения при +4°C. Без добавления лимонной кислоты кровь при температуре хранения стала бы чрезмерно щелочной. Во время хранения происходит увеличение кислотности, что уменьшает процесс гликолиза. Содержание аденозиновых нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ) во время хранения уменьшается. При добавлении аденина — главного компонента аденозиновых нуклеотидов — эритроциты могут синтезировать новые АМФ, АДФ и АТФ и компенсировать (или уменьшать) их потерю. При приготовлении концентратов эритроцитов вместе с плазмой удаляется значительная часть глюкозы и аденина. Если их потерю не компенсировать другими способами (например, добавлением избытка аденина и глюкозы к антикоагулянту или с помощью отдельной добавки к среде «взвесь/консервант»), достаточная жизнеспособность эритроцитов может поддерживаться только при условии, если они не сверх концентрированы. Нормальный эритроцитный концентрат с ЦФД-аденином должен иметь среднюю величину гематокрита (Hct) не выше 0,70. Это обеспечивает вязкость достаточно низкую для переливания и не требует предварительного разведения концентрата (*Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Recommendation N.R (95) 15, 16th edition. // Council of Europe, 2010*).

Согласно классификации Bessis M. (1974) O'Conner B. H. (1984). [19, 20], выделяют следующие варианты изменений эритроцитов: анизоцитоз (состояние, при котором наблюдаются различия в диаметре эритроцитов), анизохромия (изменение окраски эритроцита), наличие включений в эритроцитах (тельца Жолли-Хауэлла, Сидеросомы, кольца Кебота) и пойкилоцитоз (изменение формы эритроцитов). Пойкилоцитоз характеризуется появлением различных форм эритроцитов: эхиноцитов, сфероцитов, овалоцитов (эллиптоцитов), дакриоцитов, шизоцитов (шистоцитов), акантоцитов, дрепаноцитов, дегмацитов, стоматоцитов, пузырьчатых клеток.

В крови здорового человека в незначительном количестве постоянно присутствуют эритроциты с теми или иными признаками пойкилоцитоза, которые впоследствии разрушаются, их заменяют нормоциты, вырабатываемые в организме при эритропоэзе.

Количество морфологически измененных эритроцитов (стоматоциты, эхиноциты, шизоциты) увеличивается при физической нагрузке, в условиях гипоксемии [21]. Морфологические изменения эритроцитов с нарушением структуры мембраны эритроцитов обусловлены гипоксией, кровопотерей при травмах и операционных вмешательствах [12, 15].

Эхиноциты образуются при воздействии (*in vivo* и *in vitro*) токсических веществ (в том числе и бактериальных), радиации, а также в донорской крови при длительном хранении [23]. Различают эхиноциты I, II, III классов и сфероэхиноциты I и II класса трансформации. При «старении» эритроцит последовательно проходит этапы преобразования в эхиноцит III класса трансформации, теряет способность изменять и восстанавливать свою форму, превращается в сфероэхиноцит (I, II класс) и разрушается [24]. Эхиноциты увеличивают скорость и частоту образования агрегатов. Эти агрегаты имеют более прочную структуру, чем агрегаты, образованные из дискоцитов [25]. Наличие агрегатов в капиллярах приводит к ухудшению оксигенации тканей, приводит к нарушению гемодинамики органов и тканей [26].

При осуществлении трансфузии крови, которая содержит значительное количество измененных эритроцитов, не наблюдается положительного эффекта и развиваются различные осложнения. Расчеты Schmid-Schonbien H. (1982) показали, что жесткие, ригидные эритроциты — сфероциты неспособны проникать через капилляры и не участвуют в газообмене [27]. Эксперименты на животных с острой умеренной нормоволемической гемодилюцией свидетельствовали об уменьшении плотности функционирующих капилляров и снижении уровня тканевого кислорода (pO₂) в группе, где проводилась трансфузия «жестких» эритроцитов [28].

Выявлено, что обменное переливание цельной крови положительно сказывается на состоянии больных серповидной анемией. В частности, непосредственно после переливания крови у больных происходит улучшение микроциркуляции крови в конъюнктиве глаз, в то время как у больных серповидной клеточной анемией, не прошедших гемотрансфузионную терапию, наблюдаются серьезные нарушения микроциркуляции [29]. Переливание свежей эритроцитной массы (консервированной в ЦФДА-1), повышает выживаемость крыс с острым инфарктом миокарда, вызванным перевязкой левой нисходящей коронарной артерии [30].

В то же время трансфузия цельной крови и ее компонентов длительно хранившихся, содержащих значительное число морфологически измененных эритроцитов, способствует возникновению микроциркуляци-

онных нарушений, уменьшению кровоснабжения органов и тканей и усилению гипоксии тканей.

Изменение биохимических показателей обусловлено в определенной степени консервантом. Снижение уровня содержания глюкозы вызывает снижение уровня АТФ в клетке, которая синтезируется в клетке из глюкозы путем гликолиза, что приводит к нарушению метаболизма, нарушаются механизмы транспорта ионов через клеточные мембраны [31], повреждается натрий-калиевый насос. Однако роль АТФ в процессе изменения структуры мембраны клетки до конца не изучена. Исследования Wong P. (2011) доказывают, что изменения структуры клеточной мембраны эритроцита начинаются при нарушении соотношений между белками Band 3 (o) и Band 3 (I) и минимальном влиянии на процесс морфологических изменений снижения концентрации АТФ в клетке [32]. При длительном хранении консервированной цельной крови происходит изменение соотношения Na/K в клетке и межклеточном веществе. Однако при температуре +2...+4°C, при которой хранят кровь, уменьшается выход ионов K и поступление ионов Na в клетку [33].

Снижение уровня кальция может свидетельствовать о его проникновении из плазмы в клетки. Однако полученные данные требуют дополнительной проверки. Следствием нарушения ионного обмена, а именно, усиления поступления ионов натрия и кальция в клетку и увеличения внеклеточной концентрации ионов калия является стойкая продолжительная деполяризация мембраны клетки, в результате чего запускаются механизмы, ведущие к гибели клетки [34].

Наиболее вероятными причинами снижения гемоглобина и количества эритроцитов в нашем исследовании могло быть образование большого количества микросгустков и частичный гемолиз эритроцитов.

Такое снижение P_n закономерно при хранении цельной крови и возможно усиливается параллельно протекающим метаболизмом и разрушением тромбоцитов в трансфузионной среде.

Литература

1. The clinical use of blood: handbook. Geneva: World Health Organization, Blood transfusion safety; 2001: 219.
2. Об утверждении технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии. Постановление Правительства РФ №29 от 26 января 2010 г.
3. О донорстве крови и ее компонентов. Федеральный закон Российской Федерации №125-ФЗ от 20 июля 2012 г.
4. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Recommendation N.R (95) 15. 16th edition. Council of Europe, 2010.
5. Краснокутский Ю. А., Копченко Т. Г. Аутогемотрансфузия как альтернатива донорской крови в плановой хирургии. *Мед. вестн. Северо-Кавказа*. 2007; 8 (4): 14–17.
6. Лантев В. В., Селиванов Е. А. Значение микроагрегатов донорской крови и ее компонентов в развитии посттрансфузионных осложнений и возможные способы их профилактики. *Вестн. службы крови России*. 2010; 1: 47–54.
7. Фирсов Н. Н., Сирко И. В., Приезжев А. В. Современные проблемы агрегатометрии цельной крови. *Тромбоз, гемостаз, реология*. 2000; 2 (2): 9–11.
8. Селиванов Е. А., Бессмельцев С. С., Дуткевич И. Г., Данилова И. Г., Лаврова В. А., Четкин А. В., Красняков В. К., Щелкунова Л. В., Дегтерева И. Н., Григорьян М. Ш. Современные проблемы донорства в Российской Федерации. *Вестн. службы крови России*. 2011; 1: 5–14.

- При хранении цельной крови в среде ЦФДА-1 при температуре +4°C в течении 30 дней происходят прогрессирующие изменения, которые проявляются увеличением числа морфологически измененных эритроцитов и изменением биохимического состава крови.

- В первые сутки хранения цельной консервированной крови морфологические изменения незначительны.

- Начиная с седьмых суток увеличивается число морфологически измененных эритроцитов, в первую очередь — эхиноцитов. К 14-м суткам возрастает число сфероцитов. Атомно-силовая микроскопия подтверждает усиление сфероцитоза на 21 сутки. В крови большая часть эритроцитов (около 70%) преобразуется в эхиноциты и сфероциты, на долю прочих морфологически измененных эритроцитов приходится около 3% клеток. На фоне прогрессирования морфологических изменений изменяется биохимический состав — нарушается баланс натрия и калия, снижается содержание глюкозы, увеличивается содержания ионов калия в цельной крови.

- Через 30 суток хранения цельной консервированной крови в мазках более 80% измененных эритроцитов — эхиноциты. Обнаруживается большое число ($7,6 \pm 2,24\%$) сфероцитов. АСМ выявляет изменения мембран эритроцитов цельной крови на 30 суток хранения цельной крови. В цельной крови значительно уменьшается содержание глюкозы, содержание ионов натрия; снижается гематокрит и резко возрастает содержание ионов калия.

Выявленные изменения диктуют необходимость дальнейших исследований по усовершенствованию способов консервации эритроцитсодержащих компонентов крови для сохранения структуры и функциональных свойств эритроцитов.

9. Spinella P. C., Strandenes G., Rein E. B., Seghatchian J., Hertzig T. Symposium on fresh whole blood for severe hemorrhagic shock: from in-hospital to far forward resuscitations. *Transfus. Apher. Sci.* 2012; 46 (1): 113–117.
10. Зинчук В. В. Кислородсвязывающие свойства крови: фундаментальные и прикладные успехи. *Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология*. 2010; 17 (16): 7–15.
11. Мороз В. В., Голубев А. М., Афанасьев А. В., Кузовлев А. Н., Сергунова В. А., Пудкова О. Е., Черныш А. М. Структура и функция эритроцита в норме и при критических состояниях (обзор). *Общая реаниматология*. 2012; 8 (1): 53–61.
12. Мороз В. В., Кирсанова А. К., Новодержкина И. С., Александрин В. В., Назарова Г. А. Мембранопротекторное действие перфторана на эритроциты при острой кровопотере. *Общая реаниматология*. 2011; 7 (1): 5–10.
13. Герасимов Л. В., Карпун Н. А., Пирожкова О. С. Избранные вопросы патогенеза и интенсивного лечения тяжелой сочетанной травмы. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (4): 111–117.
14. Герасимов Л. В., Саморуков В. Ю., Мороз В. В., Иванова Г. П. Применение эритропоэтина у больных с травмой и кровопотерей. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (5): 11–18.
15. Berezina T. L., Zaets S. B., Morgan C., Spillert C. R., Kamiyama M., Spolarics Z., Deitch E. A., Machiedo G. W. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J. Surg. Res.* 2002; 102 (1): 6–12.
16. Мороз В. В., Черныш А. М., Козлова Е. К., Сергунова В. А., Пудкова О. Е., Федорова М. С., Кирсанова А. К., Новодержкина И. С. Нарушение на-

- ноструктуры мембран эритроцитов при острой кровопотере и их коррекция перфторуглеродной эмульсией. *Общая реаниматология*. 2011; 7 (2): 5–9.
17. Мороз В. В., Голубев А. М., Черныш А. М., Козлова Е. К., Васильев В. Ю., Гудкова О. Е., Сергунова В. А., Федорова М. С. Изменения структуры поверхности мембран эритроцитов при длительном хранении донорской крови. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (1): 5–12.
 18. Коденев А. Т., Ващенко Г. А., Капустов В. И., Жибурт Е. Б. Качество эритроцитов, криоконсервированных при умеренно низких температурах. *Вестн. службы крови России*. 2010; 1: 23–27.
 19. Bessis M. Atlas of red blood cell Shapes. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 1974: 21–101.
 20. O'Coner B. H. A color atlas and instruction manual of peripheral blood cell morphology. Baltimore, USA; 1984: 316.
 21. Рагимов А. А., Соловьева И. Н. Экстракорпоральные методы в трансфузиологии. *Клин. медицина*. 2005; 83 (4): 4–8.
 22. Connes P., Boucher J. H. Echinocytosis in athletes with exercise-induced hypoxemia. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2010; 44 (2): 107–114.
 23. Кидалов В. Н., Сясин Н. И., Хадартцев А. А. К вопросу о физиологической значимости измененной формы, ультраструктуры и флуоресценции эритроцитоферической крови, трансформирующихся в эхиноциты. *Вестн. новых мед. технологий*. 2005; 12 (2): 6–9.
 24. Козинец Г. И., Шлишканова З. Г., Сарычева Т. Г. Клетки крови и костного мозга: атлас. М.: Медицинское информационное агентство; 2004: 203.
 25. Berling C., Lacombe C., Lelièvre J. C., Allary M., Saint-Blancard J. The RBC morphological dependence of the RBC disaggregability. *Biorheology*. 1988; 25 (5): 791–798.
 26. Meiselman H. J. In vivo circulatory correlates of altered RBC aggregation. *Biorheology*. 2002; 39 (5): 636.
 27. Schmid-Schonbien H. Blood rheology and oxygen transport to tissues. *Adv. Physiol. Sci.* 1982; 25: 279–289.
 28. Cabrales P. Effects of erythrocyte flexibility on microvascular perfusion and oxygenation during acute anemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 293 (2): H1206–H1215.
 29. Cheung A. T., Miller J. W., Miguelino M. G., To W. J., Li J., Lin X., Chen P. C., Samarron S. L., Wun T., Zwerdling T., Green R. Exchange transfusion therapy and its effects on real-time microcirculation in pediatric sickle cell anemia patients: an intravital microscopy study. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2012; 34 (3): 169–174.
 30. Hu H., Xenocostas A., Chin-Yee N., Lu X., Chin-Yee I., Feng Q. Transfusion of fresh but not old stored blood reduces infarct size and improves cardiac function after acute myocardial infarction in anemic rats. *Crit. Care Med.* 2012; 40 (3): 740–746.
 31. Вуклов А. Д., Осетров И. А., Мельников А. А. Активность Na, K-АТФазы эритроцитов у физически активных лиц. *Физиология человека*. 2001; 27 (3): 129–132.
 32. Wong P. The basis of echinocytosis of the erythrocyte by glucose depletion. *Cell Biochem. Funct.* 2011; 29 (8): 708–711.
 33. Bennett-Guerrero E., Veldman T. H., Doctor A., Telen M. J., Ortel T. L., Reid T. S., Mulherin M. A., Zhu H., Buck R. D., Califf R. M., McMahon T. J. Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104 (43): 17063–17068.
 34. Атауллаханов Ф. И., Витвицкий В. М., Княткин А. Б. Регуляция объема эритроцитов человека. Роль кальциевых каналов, активируемых кальцием. *Биофизика*. 1998; 38 (5): 809–822.
- ### References
1. The clinical use of blood: handbook. Geneva: World Health Organization, Blood transfusion safety; 2001: 219.
 2. Об утверждении технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии. Постановление Правительства РФ №29 от 26 января 2010 г. [On approval of the technical specification for the safety of blood, its products, blood substituting solutions and technical facilities used in transfusion-infusion therapy. RF Government Resolution No. 29 dated 26 January 2010]. [In Russ.]
 3. О донорстве крови и ее компонентом. Федеральный закон Российской Федерации №125-ФЗ от 20 июля 2012 г. [On donation of blood and its components. Russian Federal Law No. 125-FZ dated 20 July 2012]. [In Russ.]
 4. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Recommendation N. R(95)15. 16th ed. Council of Europe; 2010.
 5. Krasnokutsky Yu. A., Kopchenko T. G. Autogemotransfuziya kak alternativa dонорской крови в плановой хирургии. [Autohemotransfusion as an alternative to donor blood in elective surgery]. *Meditsinsky Vestnik Severnogo Kavkaza*. 2007; 8 (4): 14–17. [In Russ.]
 6. Laptev V. V., Selivanov E. A. Zначение микроагрегатов донорской крови и ее компонентом в развитии посттрансфузионных осложнений и возможных способах их профилактики. [Significance of the microaggregates of donor blood and its components in the development of posttransfusion complications and possible ways of its prevention]. *Vestnik Sluzhby Krovi Rossii*. 2010; 1: 47–54. [In Russ.]
 7. Firsov N. N., Sirko I. V., Priezhev A. V. Sovremennye problemy agregometrii tselnoi krovi. [Current problems in the aggregometry of whole blood]. *Tromboz, gemostaz, reologiya*. 2000; 2 (2): 9–11. [In Russ.]
 8. Selivanov E. A., Bessmeltsev S. S., Dutkevich I. G., Danilova I. G., Lavrova V. A., Chechetkin A. V., Krasnyakov V. K., Shchelkunova L. V., Degteva I. N., Grigoryan M. Sh. Sovremennye problemy donorstva v Rossiiskoi Federatsii. [Current problems of blood donation in the Russian Federation]. *Vestnik Sluzhby Krovi Rossii*. 2011; 1: 5–14. [In Russ.]
 9. Spinella P. C., Strandenes G., Rein E. B., Seghatchian J., Hervig T. Symposium on fresh whole blood for severe hemorrhagic shock: from in-hospital to far forward resuscitations. *Transfus. Apher. Sci.* 2012; 46 (1): 113–117.
 10. Zinchuk V. V. Kislородовызывающие свойства крови: фундаментальные и прикладные успехи. *Vestnik Tverskogo Gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya i ekologiya*. [Oxygen-binding properties of blood: basic and applied successes. *Bulletin of Tver State University. Biology and Ecology Series*]. 2010; 17 (16): 7–15. [In Russ.]
 11. Moroz V. V., Golubev A. M., Afanasyev A. V., Kuzovlev A. N., Sergunova V. A., Gudkova O. E., Chernysh A. M. Stroenie i funktsiya eritrotsita v norme i pri kriticheskikh sostoyaniyakh (obzor). [The structure and function of a red blood cell in health and critical conditions (a review)]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2012; 8 (1): 53–61. [In Russ.]
 12. Moroz V. V., Kirsanova A. K., Novoderzhkina I. S., Aleksandr V. V., Nazarova G. A. Membranoprotektoornoe deistvie perforana na eritrotsity pri ostroi krovopote. [Membrane-protecting effects of perfluorane on red blood cells in acute blood loss]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2011; 7 (1): 5–10. [In Russ.]
 13. Gerasimov L. V., Karpun N. A., Pirozhkova O. S. Izbrannye voprosy patogeneza i intensivnogo lecheniya tyazheloi sochetannoi travmy. [Selected issues of the pathogenesis and intensive treatment of severe contaminant injury]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2012; 8 (4): 111–117. [In Russ.]
 14. Gerasimov L. V., Samorukov V. Yu., Moroz V. V., Ivanova G. P. Primenenie eritropoetina u bolnykh s travmoy i krovopotere. [Use of erythropoietin in patients with injury and blood loss]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2012; 8 (5): 11–18. [In Russ.]
 15. Berezina T. L., Zaets S. B., Morgan C., Spillert C. R., Kamiyama M., Spolarics Z., Deitch E. A., Machiedo G. W. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J. Surg. Res.* 2002; 102 (1): 6–12.
 16. Moroz V. V., Chernysh A. M., Kozlova E. K., Sergunova V. A., Gudkova O. E., Fedorova M. S., Kirsanova A. K., Novoderzhkina I. S. Narushenie nanostruktur membran eritrotsitov pri ostroi krovopote i ikh korrektsiya perfortuglerodnoi emulsiei. [Impairments in the nanostructure of red blood cell membranes in acute blood loss and their correction with perfluorocarbon emulsion]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2011; 7 (2): 5–9. [In Russ.]
 17. Moroz V. V., Golubev A. M., Chernysh A. M., Kozlova E. K., Vasilyev V. Yu., Gudkova O. E., Sergunova V. A., Fedorova M. S. Izmneniya struktury poverkhnosti membran eritrotsitov pri dлитelnom khranении донорской крови. [Structural changes in the surface of red blood cell membranes during long-term donor blood storage]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2012; 8 (1): 5–12. [In Russ.]
 18. Kodenev A. Y., Vashchenko G. A., Kapustov V. I., Zhiburt E. B. Kachestvo eritrotsitov, kriokonservirovannykh pri umerenno nizkikh temperaturakh. [Quality of red blood cells cryopreserved at moderately low temperatures]. *Vestnik Sluzhby Krovi Rossii*. 2010; 1: 23–27. [In Russ.]
 19. Bessis M. Atlas of red blood cell Shapes. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 1974: 21–101.
 20. O'Coner B. H. A color atlas and instruction manual of peripheral blood cell morphology. Baltimore, USA; 1984: 316.
 21. Ragimov A. A., Solovyeva I. N. Ekstrakorporalnye metody v transfuziologii. [Extracorporeal methods in transfusiology]. *Klinicheskaya Meditsina*. 2005; 83 (4): 4–8. [In Russ.]
 22. Connes P., Boucher J. H. Echinocytosis in athletes with exercise-induced hypoxemia. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2010; 44 (2): 107–114.
 23. Kidalov V. N., Syasin N. I., Khadartsev A. A. K вопросу о физиологической значимости измененной формы, ультраструктуры и флуоресценции эритроцитов периферической крови, трансформирующихся в эхиноциты. [On the physiological significance of changes in the shape, ultrastructure, and fluorescence of peripheral red blood cells transforming into echinocytes]. *Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologii*. 2005; 12 (2): 6–9. [In Russ.]
 24. Kozinets G. I., Shishkanova Z. G., Sarlycheva T. G. Kлетки крови и костного мозга: атлас. [The cells of blood and bone marrow: An atlas]. Moscow: Medical Information Agency; 2004: 203. [In Russ.]

25. *Berling C., Lacombe C., Lelièvre J. C., Allary M., Saint-Blancard J.* The RBC morphological dependence of the RBC disaggregability. *Biorheology*. 1988; 25 (5): 791–798.
26. *Meiselman H. J.* In vivo circulatory correlates of altered RBC aggregation. *Biorheology*. 2002; 39 (5): 636.
27. *Schmid-Schonbien H.* Blood rheology and oxygen transport to tissues. *Adv. Physiol. Sci.* 1982; 25: 279–289.
28. *Cabrales P.* Effects of erythrocyte flexibility on microvascular perfusion and oxygenation during acute anemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 293 (2): H1206–H1215.
29. *Cheung A. T., Miller J. W., Miguelino M. G., To W. J., Li J., Lin X., Chen P. C., Samarron S. L., Wun T., Zwerdling T., Green R.* Exchange transfusion therapy and its effects on real-time microcirculation in pediatric sickle cell anemia patients: an intravital microscopy study. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2012; 34 (3): 169–174.
30. *Hu H., Xenocostas A., Chin-Yee N., Lu X., Chin-Yee I., Feng Q.* Transfusion of fresh but not old stored blood reduces infarct size and improves cardiac function after acute myocardial infarction in anemic rats. *Crit. Care Med.* 2012; 40 (3): 740–746.
31. *Vikulov A. D., Osetrov I. A., Melnikov A. A.* Aktivnost Na, K-ATFazy eritrotsitov u fizicheski aktivnykh lits. [Activity of red blood cell Na, K-ATPase in physically active persons]. *Fiziologiya Cheloveka*. 2001; 27 (3): 129–132. [In Russ.]
32. *Wong P.* The basis of echinocytosis of the erythrocyte by glucose depletion. *Cell Biochem. Funct.* 2011; 29 (8): 708–711.
33. *Bennett-Guerrero E., Veldman T. H., Doctor A., Telen M. J., Ortel T. L., Reid T. S., Mulherin M. A., Zhu H., Buck R. D., Califf R. M., McMahon T. J.* Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104 (43): 17063–17068.
34. *Ataullakhanov F. I., Vitvitsky V. M., Knyatkin A. B.* Regulyatsiya obyema eritrotsitov cheloveka. Rol kalievykh kanalov, aktiviruemykh kaltsiem. [Role of potassium channels activated by calcium]. *Biofizika*. 1998; 38 (5): 809–822. [In Russ.]

Поступила 25.05.12

КАЛЕНДАРЬ НАУЧНЫХ КОНГРЕССОВ, КОНФЕРЕНЦИЙ, СИМПОЗИУМОВ, ШКОЛ, СЕМИНАРОВ В 2013 гг.

1–3 февраля, Vienna, Austria

5 международный симпозиум по женскому здоровью в рамках Гемостаза (5th International Symposium on Women's Health Issues in Thrombosis and Haemostasis)

3–7 февраля, Сидней, Австралия

3-й мировой конгресс региональной анестезии и лечения боли

14–17 марта, Las Vegas, USA

Общество анестезиологов педиатрии

19–22 марта, Brussel, Belgium

33rd International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine (ISICEM)
www.intensive.org

март, Москва, Россия

IX Международная Пироговская Студенческая Научная Медицинская Конференция
www.pirogovka.rsmu.ru

март, Голицыно, Московская область, Россия
Ежегодная сессия Московского научного общества анестезиологов-реаниматологов (МНОАР)
E-mail: vmmzku@gmail.com

15–19 апреля, Москва, Россия

XX Российский национальный конгресс
«Человек и лекарство»
www.medlife.ru

11–14 апреля, Regensburg, Germany

ESCVS (International Congress of European Society for Cardiovascular Surgery) International Congress

18–19 апреля, Vienna, Austria

4th Annual Symposium Network for Advancement of Transfusion Alternatives (NATA)
www.nataonline.com

23–27 апреля, Bangkok, Thailand

IV World Anesthesia Convention 2013 – NWAC 2013

2–3 мая, Ghent, Belgium

Первый европейский конгресс по реанимации и экстренной медицины в педиатрии (The First European Pediatric Resuscitation & Emergency Medicine Congress)
www.prem2013.be