

А.А. Гайдаш<sup>1</sup>, Е.В. Ивченко<sup>1</sup>, В.В. Левичев<sup>2</sup>,  
И.С. Мухин<sup>2</sup>, В.В. Лесничий<sup>1</sup>

## Атомно-силовая и сканирующая электронная микроскопия эритроцитов в острой фазе травмы головы огнестрельным оружием ограниченного поражения

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург

**Резюме.** С помощью атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии, а также морфометрии изучены эритроциты в острой фазе травмы головы, вызванной огнестрельным оружием ограниченного поражения. Эксперименты выполнены на баранах путём нанесения черепно-мозговой травмы однократным выстрелом в теменно-затылочную область из пистолета «Макарыч». Установлено, что в острой фазе травматического стресса (через 10 мин после ранения) возбуждаются фликкерные колебания эритроцитов, амплитуда и частота которых выше исходных. Увеличение частоты осциллирующих колебаний за счёт нагрева усиливает плавление липидов, увеличивает текучесть мембран и повышает поверхностное натяжение. Изменяются геометрические параметры эритроцитов: диски вытягиваются и истончаются, центральные ямки углубляются и уменьшается шероховатость. Преобразуются и пористые структуры: увеличиваются диаметры, глубина и объём пор, сглаживается рельеф стенок и уменьшается площадь поверхности ультратонких каналов, увеличивается количество конусовидных пор. В эритроцитах возрастают весовые индексы натрия, кальция, магния, хлора, но уменьшается содержание калия. Вследствие разнонаправленного действия деформирующих сил мембраны расправляются неравномерно: появляются очаги уплотнений с гидрофобной поверхностью и впадины с гидрофильными дном и краями. Это увеличивает неоднородность скоростей и структуры гидродинамических потоков. В расширенных порах с гладкими стенками потоки ламинизируются и ускоряются. Во впадинах – замедляются и турбулируют. В результате во впадинах растёт давление на дно и стенки, растворяются края, застаивается высоко адгезивная жидкость и накапливаются частицы липкого детрита. Этот эффект (названный «ползучим» эрозиванием) и сопровождающие его агрегационные риски определяют повреждающее действие ударных волн в острой фазе травматического стресса.

**Ключевые слова:** атомно-силовой микроскоп, сканирующий электронный микроскоп, эритроциты, травма головы, огнестрельное оружие ограниченного поражения, фликкерные колебания, эритроциты, мембраны, шероховатость, микроэрозии, апоптоз.

**Введение.** Черепно-мозговая травма (ЧМТ) любого происхождения – это стресс, который не может не повлиять на структуру, химический состав и физико-механические свойства эритроцитов. При этом имеются значительные трудности в понимании краткосрочных (10–30 минут) эффектов, высокая скорость развития которых создаёт структурные и функциональные предпосылки для рисков во многом неясной природы. Ещё большая неопределённость возникает в понимании механизмов действия травматических факторов малой интенсивности и, в частности, нелетального кинетического оружия, которое в соответствии с поправкой к 1 Статье Федерального закона от 06.12.2011 № 409-ФЗ определено, как огнестрельное оружие ограниченного поражения (ОООП). Ранее нами показано [1, 2], что при действии низко энергетичных травмирующих факторов (в том числе и ОООП) как локально, так и системно развиваются малые структурные сдвиги (МСС). Размерный диапазон МСС близок к амплитуде колеблющихся наноструктур. Для изучения данных эффектов наиболее подходящими являются методики атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии (АСМ, СЭМ), визуализирующие структурные основы исследуемых событий в микро- и наноразмерном масштабах [7, 8].

**Цель исследования.** Изучить ультраструктурные и физико-механические свойства мембран эритроцитов в острой фазе стресса при травме головы огнестрельным оружием ограниченного поражения.

**Материалы и методы.** Эксперименты выполняли на баранах (*Ovis aries*) породы «Меринос» массой тела 35–40 кг на основании разрешения локального этического комитета Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова. ЧМТ моделировали с помощью однократного выстрела в теменно-затылочную область резиновой пулей из пистолета «Макарыч» (MP-79-9 TM) 9 мм калибра с дистанции 1,5 метра. Животных распределили в следующие группы: 1-я группа (контрольная); 2-я группа – моделирование ЧМТ. В каждой группе по 5 особей. Стендовые испытания, включая эвтаназию, выполняли на животных, погруженных в залетильный наркоз. Образцы крови брали из яремной вены через 10 мин с момента нанесения ЧМТ. Эритроциты исследовали в мазках, нанесённых на покровные стекла и фиксированных на воздухе при комнатной температуре. Эритроцитометрию проводили на неокрашенных мазках с построением гистограмм распределения максимальных диаметров эритроцитов. Зондовую микроскопию проводили на

позднее следующего дня после приготовления мазков. Это позволило свести к минимуму артефакты, обусловленные пересушиванием препаратов. АСМ, включая адгезиометрию, осуществляли на воздухе в контактном режиме на платформе зондовой нанолaborатории «NTEGRA Prima» фирмы «NT-MDT», (Россия) с применением кремниевых кантилеверов «CSG10» радиусом закругления 10 нм. АСМ-изображения анализировали в редакторе Imaging [3]. Элементный состав эритроцитов определяли, используя рентген-флуоресцентный микроанализ на сканирующем электронном микроскопе «Inspect FEI» с анализатором «EDAX» при ускоряющем напряжении 10 кВ. Мазки предварительно покрывали слоем золота толщиной до 10 нм на установке магнетронного распыления «SPI» (Великобритания). Выборки значений, полученных при всех видах измерений, имели нормальное распределение. Это позволило применить t-критерий Стьюдента при сравнении межгрупповых различий. Значимыми считались различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Линейные размеры эритроцитов баранов с ЧМТ характеризуются малыми, но системными сдвигами. В частности, при ЧМТ максимальные размеры эритроцитов различаются только в виде тенденций к увеличению диаметров. Но по коротким осям наблюдаются более значимые и статистически достоверные различия (табл.).

Прежде всего регистрируется истончение (в пределах 50–75 нм) дисков. Столь малый структурный сдвиг может быть обусловлен уменьшением толщины белково-глобулярного слоя стенки эритроцитов. Центральные ямки дисков углублены. Это может иметь адаптивное значение, так как расширяет пластические возможности эритроцитов при прохождении через капиллярный сегмент микроциркуляторного кровеносного русла. Как следует из таблицы, отклонения каждого из параметров малые (в пределах 5–7%), но они накапливаются и принимают системный характер. Это делает данные сдвиги функционально значимыми.

Выявлено, что у баранов контрольной группы эритроцитогамма имеет вид нормального распределения (рис. 1). У баранов с ЧМТ эритроцитогамма ассиметрична за счёт увеличения числа варьирующих классов мало размерного (левого) крыла (рис. 2).

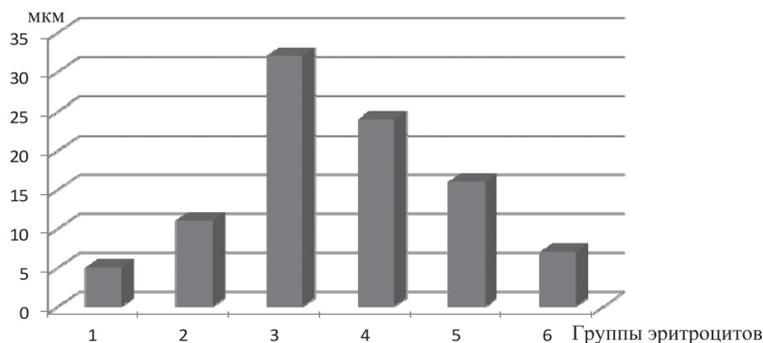


Рис. 1. Распределение эритроцитов баранов контрольной группы по максимальным диаметрам. Параметры: медиана  $6,4 \pm 0,3$  мкм, мода  $6,2 \pm 0,3$  мкм, дисперсия 0,5, эксцесс 2,2, интервал 4,5 мкм

Таблица  
**Морфометрические и адгезиометрические показатели эритроцитов баранов через 10 мин после нанесения ЧМТ огнестрельным оружием ограниченного поражения,  $M \pm m$**

Параметр	Группа	
	1-я	2-я
$D_{max}$ – диаметр дисков, мкм	$6,5 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,1$
H – высота дисков, нм	$378,8 \pm 9,4$	$327,4 \pm 9,7^*$
h – глубина центральных ямок, нм	$425,4 \pm 8,2$	$311,8 \pm 11,8^*$
Форм-фактор – отношение $D_{max}/D_{min}$ , отн. ед.	$1,01 \pm 0,01$	$1,12 \pm 0,01^*$
Диаметр пор, нм	$122,5 \pm 6,9$	$183,9 \pm 21,7^*$
Глубина пор, нм	$62,3 \pm 5,3$	$79,7 \pm 12,8^*$
Уд. площадь поверхности пор, $мкм^2/мкм^3$	$82,4 \pm 0,7$	$73,4 \pm 1,7^*$
Относительный объем пор, %	$5,9 \pm 0,5$	$15,3 \pm 0,6^*$
Шероховатость, нм	$601,1 \pm 14,6$	$482,7 \pm 13,9^*$
Ср. арифметическая шероховатость, отн. ед.	$7,3 \pm 0,6$	$3,8 \pm 0,3^*$
Адгезионные силы по всей поверхности, нН	$5,3 \pm 0,1$	$13,1 \pm 0,5^{**}$
Адгезионные силы на поверхности уплотнений, нН	$3,2 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,2$
Адгезионные силы в дне впадин, нН	$4,8 \pm 0,1$	$18,2 \pm 2,7^{**}$
Натрий/калий #	$14,5 \pm 0,05$	$22,9 \pm 0,05^{**}$
Магний/калий	$4,3 \pm 0,3$	$6,5 \pm 0,2^*$
Хлор/калий	$1,4 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2^*$
Кальций/калий	$3,2 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,2^*$
Калий, Ат/%	$1,4 \pm 0,2$	$0,85 \pm 0,1^*$

**Примечание:** \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; # – весовые индексы химических элементов приведены как отношение атомных процентов.

В контроле объем размерных классов в левом крыле составляет 20%, у баранов с ЧМТ – около 70%. Рост объема вариант левого крыла сопровождается достоверным увеличением значений медианы и моды. Указанные особенности гистограммы означают, что в ответ на ударное воздействие реагируют прежде всего эритроциты малых размеров, что характерно для краткосрочных, быстро развивающихся откликов. Очевидно, что в порядке «первого эшелона» в кровоток выводятся клетки из резервного пула.

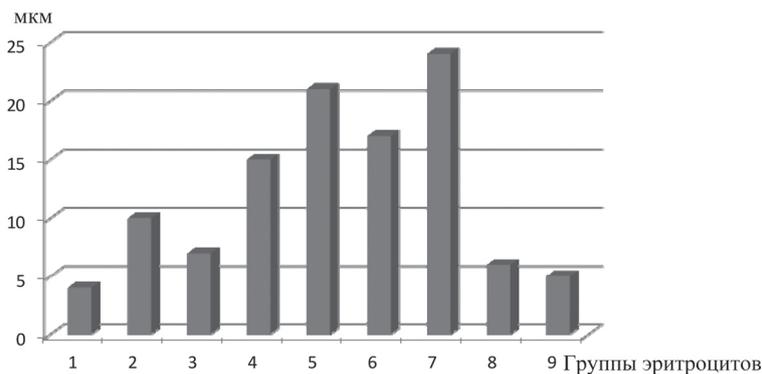


Рис. 2. Распределение эритроцитов баранов с ЧМТ по максимальным диаметрам. Параметры: медиана  $7,1 \pm 0,3$  мкм, мода  $7,4 \pm 0,3$  мкм, дисперсия 0,3, эксцесс 0,4, интервал 3,1 мкм

Распределение эритроцитов при ЧМТ становится более экстремальным: увеличивается количество интервалов, объёмы отдельных классов варьируют путём скачков, достижение значений центральных параметров происходит волнообразно (в контроле по монотонно восходящему тренду). Волнообразная форма гистограмм, по-видимому, отражает колебательное состояние эритроцитов, в периоде нахождения в организме.

При действии возмущающих факторов система переходит в детерминированное состояние, хаотичность флюктуаций уменьшается и колебания принимают регулярный, упорядоченный характер. Статистически этот эффект выявляется в виде уменьшения показателей дисперсии и эксцесса. Эритроцит как бы «сжимается» и переходит к более мономорфному, мономодальному состоянию. Уменьшаются численные значения ширины интервалов, что указывает на укорочение суммарной длины волны флюктуирующих колебаний. Если интерполировать эти соотношения на индивидуальные клетки, то можно предположить, что под воздействием ударных волн, вызванных ООП, возбуждаются фликкерные (шумовые) колебания эритроцитов [4, 5, 10].

При этом сами эритроциты подвергаются упругой деформации. А колебания, исходя из формы размерных гистограмм, по амплитуде и частоте становятся выше исходных. Увеличение частоты осциллирующих колебаний неизбежно ведёт к нагреву, а это, в свою очередь усилит плавление липидов и повысит текучесть мембран. Эритроциты начнут вытягиваться, что соответствует более высоким значениям форм-фактора. Изменения физического состояния мембранных липидов сопровождается уменьшением показателей шероховатости и удельной площади поверхности мембран. Это означает, что в мембранах эритроцитов растёт поверхностное натяжение и, соответственно, уменьшается поверхностная энергия. Увеличению поверхностного натяжения способствует и уплотнение эритроцитов, что наблюдается в виде увеличения весовых индексов натрия, кальция, магния и хлора, но снижается концентрация калия, склонного покидать клетки при действии механических сил [9]. Вследствие действия сил поверхностного натяжения мембраны расправляются, количество очагов, концентрирующих напряжение

уменьшается, и мембраны становятся более прочными на разрыв. Одновременно с этим в поверхностных слоях стенок эритроцитов появляются очаги уплотнений. Морфологически эти очаги имеют вид дегранулированных площадок, выступающих на 50–80 нм над поверхностью. По данным измерений, снятых с этих площадок, показатели шероховатости и адгезивности существенно меньше относительно остальной поверхности дисков. Это значит, что данные участки более гидрофобны и менее смачиваемы. В норме удельная площадь таких площадок не превышает 5%, и их появление, по-видимому, обусловлено подсыханием образцов. Однако при ЧМТ площадь очагов уплотнения увеличивается практически в два раза и колеблется в пределах 10%. Механизмы формирования подобных участков не известны, но одним из них может быть стресс-обусловленное усиление золь-гель переходов в липопротеиновых комплексах цитоплазматических мембран. На фоне усиления колебательных движений эритроцитов и увеличения сил поверхностного натяжения, безусловно, усилятся и процессы образования капиллярных волн в трансмембранной жидкости. Скорость движения волн по мере роста поверхностного натяжения будет увеличиваться, а длина, в связи с истончением дисков, – уменьшаться [6]. Указанные фундаментальные соотношения создают структурные и физико-механические предпосылки для высокочастотного сдвига осциллирующих колебаний внутриклеточной жидкости и мембранных структур эритроцитов.

Интенсивность трансмембранного массообмена и, в частности скорость гидродинамических потоков, в значительной мере определяются структурой и формой пор. В мембранах эритроцитов баранов с ЧМТ диаметр входа, глубина и относительный объём пор существенно выше контрольных значений, т.е. мембраны эритроцитов становятся более пористыми, и, соответственно, более проницаемыми. Учитывая многократное превышение относительного объёма, происходит это скачкообразно. И не только за счёт расширения, но и путём образования пор de novo.

Расширенные поры имеют приподнятые края, которые выполнены разнокалиберными зёрнами с субгранулярной организацией (рис. 3).

Многие поры имеют воронкообразную форму с удлинённым остроконечным «горлом». В норме воронкообразные поры встречаются реже, а их диаметр не превышает 150 нм. В эритроцитах баранов с ЧМТ воронкообразные поры более крупные (диаметром до 250 нм), дно покрыто тонким слоем липкой жидкости и вымощено упорядоченно расположенными гранулами. Пространство между гранулами расширено и образует масштабную сеть сообщающихся ультратонких каналов. Горловины глубоко проникают в многослойные стенки эритроцитов (рис. 4).

Вследствие разнонаправленного действия деформирующих сил мембраны расправляются неравномерно, появляются обширные (диаметром до 300 нм), но неглубокие (15–25 нм) впадины. «Берега» впадин характеризуются значимыми перепадами высот, изрезаны излучинами и склонами. В местах подъёма «берега» как бы выворачиваются и могут приподняться до 100 нм. В функциональном отношении это означает ориентацию эритроцитов на преимущественное выведение вещества. А в патоморфологическом понимании это расценивается как подготовка к пироптозу – разновидности апоптоза, в ходе которого клетки выбрасывают (выплёскивают) цитоплазматический материал [11]. Излучины (меандры) – это петлеобразные вторжения дна протяжённостью до 50–100 нм, расчленяющие стенки

впадин. Появление подобных структур свидетельствует о замедлении потоков трансмембранной жидкости. Склоны в основном выпуклые и осложнены террасами в 2–3 яруса, ступеньки которых обнажают слоистую структуру стенок эритроцитов. При АСМ-сканировании дна впадин в режиме Local Equilization позволяющего тонко детализировать текстуру поверхности, выявляются наноканалы и частицы детрита различной степени дисперсности. Наноканалы образуют густую разветвлённую сеть, а детрит откладывается преимущественно в «прибрежных» участках в виде полиморфных агглютинатов.

Поверхность впадин, особенно в области дна, отличается высокой адгезивностью, что свидетельствует о накоплении в губчатом дне вязкой жидкости. Вышеперечисленные морфологические особенности усложняют текстуру поверхности эритроцитарных дисков. Это и предопределяет неоднородность скоростей и структуры внутри- и трансмембранных гидродинамических потоков. При прохождении жидкости через расширенные поры с относительно гладким рельефом стенок скорость потоков увеличивается и они ламинизируются. В мелких впадинах с разветвлёнными берегами скорость гидродинамических потоков замедляется и они начинают турбулироваться. При уменьшении кинетической энергии (скорости) гидродинамических потоков давление (и, соответственно, трение),

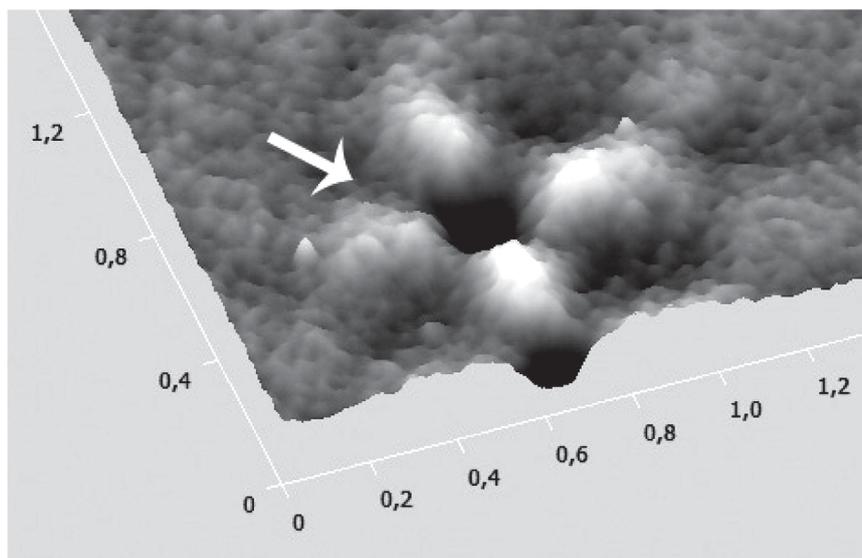


Рис. 3. АСМ-изображение эритроцита барана с ЧМТ в 3D формате. Демонстрируются неоднородность текстуры поверхности мембраны и глубокая пора с приподнятыми краями. Размер масштабной линии 2 мкм

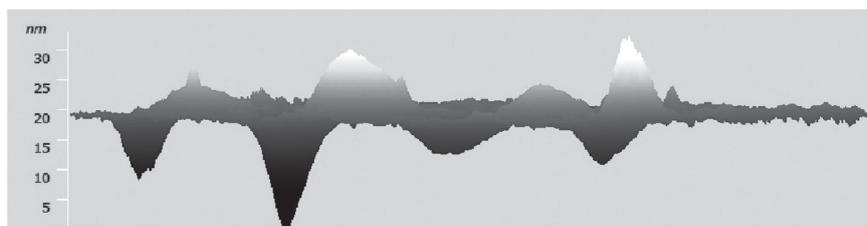


Рис. 4. АСМ-изображение эритроцита барана с ЧМТ в 3D формате. Видны пористые конусовидные структуры в стенке эритроцитов. Размер масштабной линии (скана) 2 мкм

оказываемое на стенки и дно впадин, увеличивается. Циркулирующая трансмембранная жидкость начинает застаиваться, «заиливаться», превращается в вязкий флюид, растворяющий дно и стенки. В итоге впадины преобразуются в мембранные дефекты, развивающиеся по механизму «ползучих» эрозий.

**Заключение.** В острой фазе стресса, вызванного травмой головы огнестрельным оружием ограниченного поражения, эритроциты подвергаются структурно-функциональным преобразованиям, патогенетической основой которых является фликкер – резонансное увеличение амплитуды и частоты осциллирующих колебаний жидкости, мембран и клеток в целом. Высоко-частотный сдвиг за счёт нагрева усиливает плавление липидов, увеличивает текучесть мембран и повышает поверхностное натяжение. В результате диски вытягиваются и истончаются, центральные ямки углубляются и уменьшается шероховатость. Увеличиваются объем и количество конусовидных пор, а также плотность эритроцитов. Вследствие разнонаправленного действия деформирующих сил мембраны расправляются неравномерно: появляются очаги уплотнений с гидрофобной поверхностью и впадины с гидрофильными дном и краями. Это увеличивает неоднородность скоростей и структуры гидродинамических потоков. В расширенных порах с гладкими стенками потоки ламинизируются и ускоряются. Во впадинах – замедляются и турбулируют. В результате во впадинах растёт давление, растворяются края, застаивается высокоадгезивная жидкость и накапливаются частицы липкого детрита. Изменения структуры и физико-механических свойств инициируют апоптоз и усиливают агрегационные взаимодействия.

В целом, в острой фазе травматического стресса, вызванного огнестрельным оружием ограниченного по-

ражения, возникают системные риски, обусловленные деструкцией поверхностей клеточных мембран, усилением агрегационных взаимодействий и активацией апоптоза.

#### Литература

1. Белоусова, О.Д. Структура цитоплазматических мембран и химический состав эритроцитов в ранний период раневых повреждений по данным сканирующей зондовой микроскопии / О.Д. Белоусова, [и др.] // Воен.-мед. журн. – 2013. – № 1. – Т. 334. – С. 19–24.
2. Гайдаш, А.А. Механизмы повреждения лабиринтных капсул внутреннего уха при ранении головы не летальным кинетическим оружием / А.А. Гайдаш, [и др.] // Воен.-мед. журн. – 2012. – № 6. – Т. 333. – С. 22–27.
3. Скоркина, М.Ю. Методика оценки морфометрических параметров нативных клеток крови с использованием атомно-силовой микроскопии / М.Ю. Скоркина, [и др.] // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2010. – №8. – Т. 150. – С. 238–240.
4. Кононенко, В.Л. Фликкер эритроцитов. 1. Теоретические модели и методы регистрации / В.Л. Кононенко // Биологические мембраны. – 2009. – № 5 (26). – С. 352–369.
5. Кроль А.А. Быстрые локальные колебания поверхности эритроцита человека / А.А. Кроль, [и др.] // Цитология. – 1989. – № 5. – Т. 31. – С. 563–567.
6. Лайтхилл, Дж. Волны в жидкостях / Дж. Лайтхилл: пер. с англ. – М.: Наука, 1981. – 345 с.
7. Миронов, В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии / В.Л. Миронов. – М.: Техносфера, 2004. – 144 с.
8. Ebner, A. Normal and pathological erythrocytes studied by atomic force microscopy / A. Ebner, H. Schillers, P. Hinterdorfer // Methods mol. biol. – 2011. – № 736. – P. 223–241.
9. Krueger, M. Deformability and stability of erythrocytes in high-frequency electric fields down to subzero temperatures / M. Krueger, F. Thom // Biophysical j. – 1997. – Vol. 73. – № 5. – P. 2653–2666.
10. Peterson, M.A. Theoretical and phase contrast microscopic eigenmode analysis of erythrocyte flicker: amplitudes / M.A. Peterson, H. Strey, E. Sackmann // Journal de physique II France. – 1992. – Vol. 2. – № 5. – P. 1273.
11. Susan, L.F. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells / L.F. Susan, B.T. Cookson // Infect. and Immunity. – 2005. – Vol. 73. – № 4. – P. 1907–1916.

A.A. Gaidash, E.V. Ivchenko, V.V. Levichev, I.S. Mukhin, V.V. Lesnichiy

#### **Erythrocytes atomic force and electron scanning microscopy in acute phase of less-lethal impact firearms head trauma**

**Abstract.** Erythrocytes in the acute phase of less-lethal impact firearms head trauma have been studied by the methods of atomic force and electron scanning microscopy, as well as erythrocyte morphometry. The experiments have been performed on sheep by inflicting the craniocerebral trauma at the parieto-occipital area using «Makarych» pistol single shot. On the basis of erythrocyte diameters statistical analysis we have come to the conclusion that at the acute phase of the traumatic stress (10 minutes after injury) the erythrocyte flickering fluctuations have been excited. The amplitude and frequency of these fluctuations were higher than at the initial phase. The increase of the fluctuation frequency occurred at the expense of heating augmenting lipid melting, membranes fluidity and surface tension. There have been observed some changes in erythrocytes geometrical parameters, notably, disks pulling and shrinking, central pits deepen, membrane roughness diminishing. The porous structures are transformed as well. It has been observed the pores diameter, depth and volume increase, membrane relief smoothing, ultra thin channels surface square decrease, cone-shaped pores amount increase. Erythrocyte weigh indexes of sodium, calcium, magnesium and chlorine are increased, but potassium content is decreased. Because of deforming forces differently directed action the erythrocytes membranes are getting smoothed out unevenly making centers of compactions with hydrophobic surface and depressions with hydrophilic borders. This increases heterogeneity of hydrodynamic flows velocity and structure. In the expanded pores with smooth walls the flows become laminated and accelerated. In the depressions they are slowed down and become turbulent. As a result, in the depressions the pressure on the bottom and walls has been increasing, the borders have been dissolving, the highly adhesive liquid has been congesting, and the detritus sticky particles have been accumulating. This effect (called «creeping» erosion) and accompanying aggregation risks determine the damaging affect of shock waves at the acute phase of the trauma.

**Key words:** atomic force microscope, scanning electron microscope, erythrocytes, head trauma, less-lethal impact firearms, flicker fluctuations, erythrocyte membranes, surface roughness, micro erosion, apoptosis.

Контактный телефон: 8-911-706-65-12; e-mail: jack200@ngs.ru