

Н.Г. Колосова, П.А. Лебедев, А.Ж. Фурсова, Т.С. Мороскова, О.Г. Гусаревич

ПРЕЖДЕВРЕМЕННО СТАРЕЮЩИЕ КРЫСЫ OXYS КАК МОДЕЛЬ СЕНИЛЬНОЙ КАТАРАКТЫ ЧЕЛОВЕКА

Институт цитологии и генетики СО РАН (kolosova@bionet.nsc.ru),
Новосибирский филиал МНТК «Микрохирургия глаза», Государственная Новосибирская областная клиническая больница,
Новосибирская государственная медицинская академия

Снижение остроты зрения — типичный спутник старения, основной причиной которого является катаракта, нередко приводящая к слепоте. На сегодня нет эффективных способов профилактики этого заболевания, а лечение сводится к хирургическому вмешательству. Выявление патогенеза заболевания, разработка способов его профилактики и лечения невозможны без фундаментальных исследований, для которых необходимы биологические модели. В качестве первой отечественной модели предлагается использовать линию преждевременно стареющих крыс OXYS, полученную 30 лет назад селекцией и инбридингом крыс Вистар, чувствительных к катарактогенному эффекту галактозы (ИЦиГ СО РАН). Проведенный авторами на протяжении 13 поколений углубленный отбор по признаку ранней катаракты привел к тому, что на сегодня изменения хрусталиков появляются у крыс OXYS к 2 мес, в 6 мес обнаруживаются у 100% животных (у крыс Вистар — 5%), в 12 мес катарактой поражаются оба глаза. По данным офтальмоскопических и биомикроскопических исследований, катаракта у крыс OXYS развивается на фоне прогрессирующей макулодистрофии, а изменения хрусталиков по характеру соответствуют сенильной катаракте у человека.

Ключевые слова: преждевременное старение, крысы OXYS, модель сенильной катаракты.

Снижение остроты зрения — типичный спутник старения, одной из основных причин которого, а в ряде случаев и потери зрения у пожилых людей, становится катаракта — помутнение хрусталика. Это заболевание настолько распространено, что помутнение хрусталика нередко рассматривают как неизбежное проявление старения, непосредственная причина которого остается до конца невыясненной [2; 3]. Во многих случаях (до 70%) катаракта у пожилых людей развивается параллельно с макулодистрофией. Из насчитывающихся в мире, по данным ВОЗ, 47 миллионов слепых людей 20 миллионов потеряли зрение в результате развития катаракты. В последние годы наблюдается устойчивая тенденция «омоложения» этого заболевания. Единственным способом лечения остаётся оперативное удаление катаракт, эффективных средств предупреждения катаракты нет. Проблема осложняется тем, что наличие видимых изменений в хрусталике соответствует, как правило, уже необратимой стадии заболевания.

Для исследования патогенеза катаракты, её генетических и биохимических основ, разработки способов эффективной терапии и профилактики необходимо проведение фундаментальных исследований, для которых необходимы адекватные биологические модели. В отличие от отечественной медицины, за рубежом осознана необходимость развития биологического направления в офтальмологии. Ведущие офтальмологические учреждения Англии, США, Японии уже около половины своего научного потенциала выделяют на фундаментальные разработки [3]. В течение многих лет ведётся работа над созданием моделей катаракты, однако, большинство из них не могут рассматриваться как истинно сенильные — зачастую развитие катаракты провоцируется химическими или лучевыми воздействиями [23]. Получили признание и активно используются для исследования этиологии и патогенеза возрастной катаракты несколько моделей: линия мышей Emory [17], сублиния SAM-R/3 преждевременно стареющих мышей SAM [16], а также крысы — UPL Sprague-Dawley [22] и SCR (Shumiya Cataract Rat) [21]. В России собственных моделей нет. Между тем в Институте цитологии и генетики СО РАН ещё в 70-е годы под руководством Р.И.Салганика в результате селекции и инбридинга крыс Вистар, чувствительных к катарактогенному эффекту галактозы, была создана линия преждевременно стареющих крыс OXYS [8]. Сначала она была зарегистрирована как W/SSM [7], а после выявления в их тканях высокого уровня генерации кислородных радикалов [20] линию её зарегистрировали как OXYS, и наследственно повышенное радикалообразование стало её ключевой характеристикой [19]. Предполагается, что генетически обусловленный дефект метаболизма, выражающийся в повышенной чувствительности к окислительному стрессу, приводит к таким изменениям в их организме, которые могут рассматриваться как синдром ускоренного старения. От исходной линии крыс Вистар их отличают снижение продолжительности жизни (максимальная снижена на 28%, по сравнению с крысами Вистар, и составляет

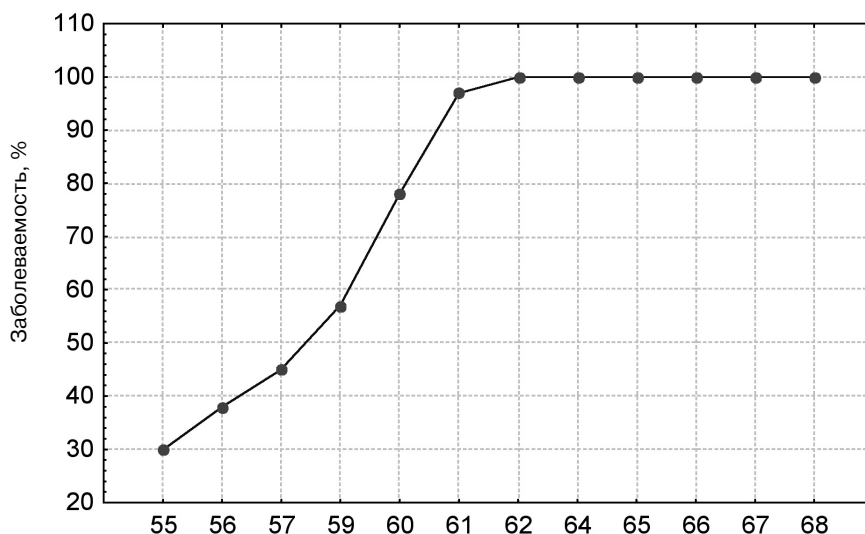


Рис. 1. Зависимость заболеваемости крыс OXYS катарактой в возрасте 6 мес. По оси абсцисс — поколения животных.

24,6±4 мес, $p < 0,001$) [4], повышенная частота возникновения злокачественных опухолей, ранние инволютивные изменения внутренних органов, в том числе тимуса, печени, костной ткани, а также гипертрофические кардиомиопатии [5, 7]. Уже в 3–4 мес у крыс OXYS наблюдаются изменения в когнитивной и эмоциональной сферах, характерные для стареющих людей и животных: снижено моторно-исследовательское поведение, повышена тревожность, нарушены ассоциативное обучение и латентное торможение [6, 12]. Предполагается, что ведущую роль в патогенезе преждевременного старения крыс OXYS играют нарастающие с возрастом нарушения структуры и функций митохондрий — изменение соотношения цитохромов внутренней мембраны, снижение активности F_1F_0 -АТФ-синтетазы, дыхательного контроля и скорости фосфорилирования, снижение объёмной и поверхностной плотности митохондрий, появление митохондрий с лизисом матрикса и деструкцией крист [4, 9].

Ключевым признаком, по которому контролируется состояние линии крыс OXYS, остается ранняя катаракта, однако характер изменений хрусталика до сих пор специально не исследовался. Целью настоящего исследования явилось выяснение возможности использовать крыс OXYS в качестве модели сенильной катаракты, в связи с чем в работе решались следующие задачи: 1) углубление отбора крыс по признаку ранней катаракты; 2) анализ заболеваемости катарактой находившихся под нашим наблюдением крыс OXYS 55–68 поколений с оценкой характера изменений хрусталика на офтальмоскопическом и биомикроскопическом уровне; 4) оценка состояния глазного дна. Контролем служили крысы исходной аутобредной линии Вистар.

Методика исследования

Заболеваемость крыс OXYS и Вистар катарактой оценивали непосредственно в лаборатории разведения экспериментальных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Под наблюдением находились крысы OXYS 55–68 поколений, было осмотрено 1122 животных обоего пола, контролем служили 389 крыс Вистар. Перед обследованием для расширения зрачков животным закапывали 1% раствор гидробромистого гоматропина. Характер помутнений и их локализацию в хрусталике оценивали методом прямой офтальмоскопии в отражённом свете ручным электрическим офтальмоскопом «Carl Zeiss» HO-110, биомикроскопией ручной щелевой лампой «Carl Zeiss» HSO-10, а также биомикроскопией щелевой лампой «Opton» SL 30 с использованием системы автоматической регистрации изображения. Офтальмоскопическое исследование (осмотрено 86 крыс OXYS и 27 Вистар) проводили с помощью прямого офтальмоскопа «Vetta» (Германия). У части животных под фторановым наркозом (1–1,5 мин) фотографировали глазное дно и проводили флуоресцентную ангиографию с помощью Фундус-камеры «Opton». Статистическую обработку результатов проводили с помощью факторного дисперсионного анализа ANOVA/MANOVA с post hoc сравнением групповых средних (тест Newman-Keul), рассматривая как независимые факторы генотип, возраст, пол и поколение животного (Statistica, 6).

Результаты исследования

Проведенный нами отбор в 55–68 поколениях крыс OXYS привел к значительному «омоложению» катаракты. На рис. 1 приведены результаты анализа заболеваемости животных в возрасте 6 мес, которая существенно различалась между поколениями ($F_{12,388}=10,6$; $p=0,000$) и если в 55 достигала 30%,

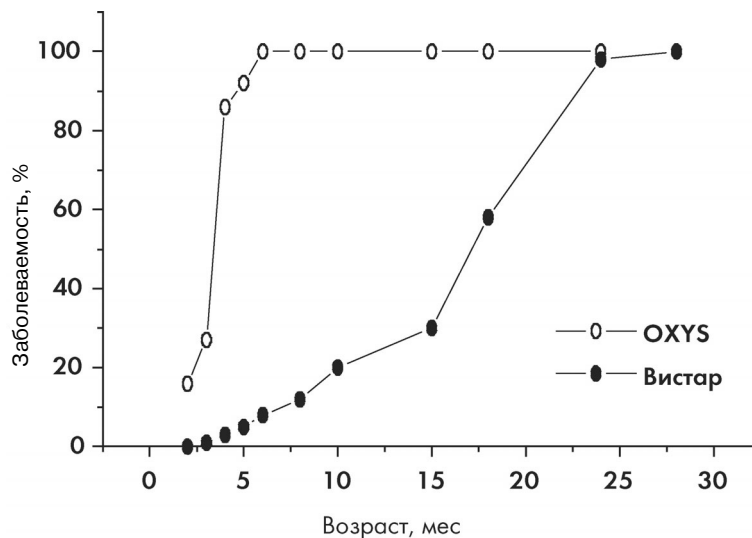


Рис. 2. Зависимость заболеваемости катарактой крыс Вистар и OXYS (65–68 поколения) от возраста.

то, начиная с 61-го поколения, изменения хрусталиков регистрировались у 100% крыс OXYS. Как показал факторный анализ, пол не влияет на заболеваемость катарактой, в то же время она существенно растет с возрастом ($F_{10,897}=9,6$; $p=0,001$). У крыс OXYS 65–68 поколений уже в возрасте 2 мес при биомикроскопическом обследовании наблюдались значительное уплотнение заднего коркового слоя хрусталиков, по сравнению с передним корковым слоем, в отдельных случаях — уплотнение заднего полюса, которые развивались затем как заднекорковые и заднеполярные катаракты. К 4 мес помутнения хрусталика регистрировались уже у 86% животных, причем у 41% из них катарактой были поражены оба глаза. В то же время у крыс Вистар в 4 мес небольшие изменения хрусталиков встречались, но не более чем у 5% животных. К 12 мес у крыс OXYS изменены, как правило, оба хрусталика, в то время как у годовалых крыс Вистар катаракта выявляется у 20 — 28% животных (рис. 1). Только к 28 мес изменения хрусталиков глаз наблюдались практически у всех крыс Вистар, однако и в этой возрастной группе встречались животные с поражением одного глаза. Таким образом, заболеваемость катарактой у крыс OXYS достигает 100% в 4,7 раз раньше, чем у крыс Вистар (рис. 2).

Как показал биомикроскопический анализ биомикроскопической картины хрусталиков, у крыс OXYS встречаются зонулярные, точечные и веретеновидные формы катаракты (рис. 3). Наиболее распространена зонулярная катаракта, при которой помутнение хрусталика начинается с заднего коркового слоя и распространяется в направлении ядра. При точечной форме изменения локализуются в переднем субкортикальном слое, при веретенообразной катаракте — в ядре хру-

сталика. С возрастом помутнение усиливается, однако, только в единичных случаях мы наблюдали так называемую полную катаракту с тотальным помутнением всех слоев хрусталика. Очевидно, это и есть типичная для крыс сенильная катаракта — именно такие изменения хрусталиков развиваются и у крыс Вистар, в том числе у старых, 2–3-летних животных. В этом убеждает соответствие наших результатов описанным ранее изменениям хрусталиков при естественном старении грызунов — мышей линий C5BL/6, (C57BL6iDBA/2)F1 и (C57BL/6iC3H)F1 [10], а также крыс — норвежской бурой и Фишер 344 [24].

Ультраструктурные исследования [Бюлл. эксперим. биол., в печати] показали, что в основе патогенеза катаракты у крыс OXYS могут лежать дистрофически-атрофические изменения эпителия хрусталика, несостоятельность его дренажной и пластической функции. В пользу этого свидетельствует преобладание зонулярной формы катаракты, которую связывают с такими изменениями эпителия [23]. Однако распространенность у крыс OXYS точечной и веретеновидной катаракты не позволяет исключить и возможность очаговых изменений эпителия, в патогенез которых могут быть вовлечены и другие механизмы. В частности, задняя субкапсулярная катаракта — частое осложнение дегенеративных заболеваний сетчатки.

Действительно, осмотр глазного дна выявил у 92% крыс OXYS дистрофические изменения в макулярной области сетчатки, в том числе — у молодых, 4-месячных животных (рис. 4, а–г). Практически у всех крыс OXYS (98%) процесс был двусторонним, изменения прогрессировали с возрастом. Аналогичные изменения наблюдались и у отдельных крыс Вистар (7%), однако, все эти животные были старше 12 мес. По тяжести

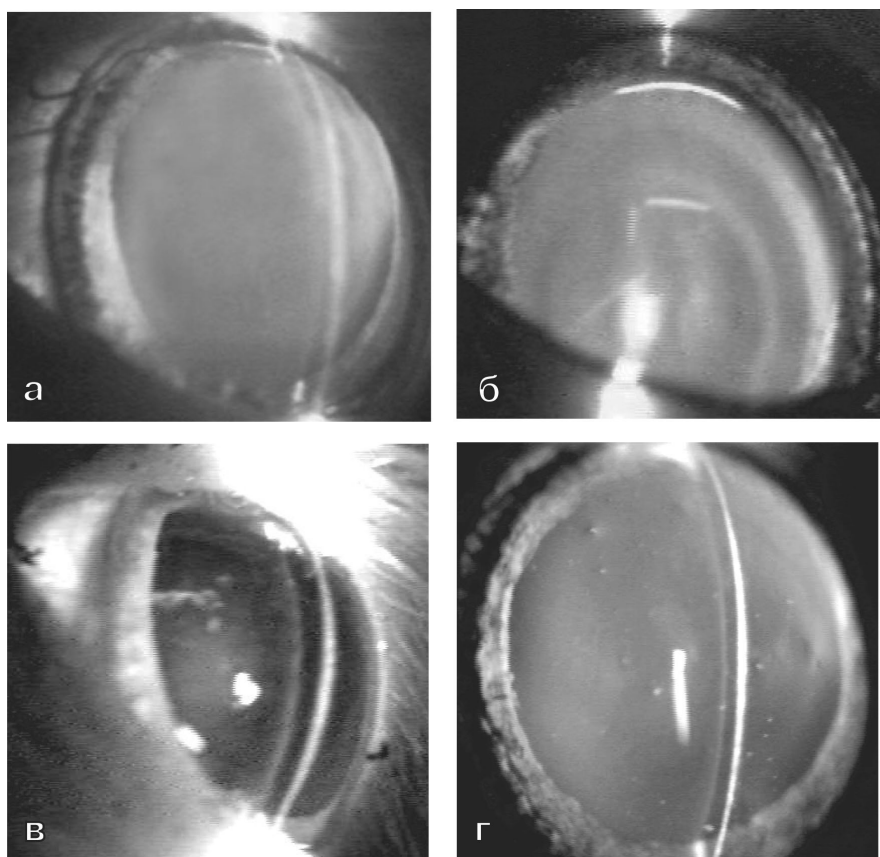


Рис. 3. Примеры биомикроскопической картины хрусталиков глаз крыс Вистар и OXYS: хрусталик крысы Вистар без изменений (а), хрусталики крыс OXYS с зонулярной (б), ядерной веретеновидной (в) и точечной катарактой (г). Изображение получено с помощью целевой лампы «Opton» SL 30 с использованием системы автоматической регистрации.

поражений глазного дна можно выделить три стадии заболевания. I-я стадия регистрировалась у 42 % крыс OXYS и офтальмоскопически характеризовалась друзами различной формы и размеров в заднем полюсе глаза. II стадия (51 % случаев) — в макуле и парамаккулярно определялся проминирующий очаг жёлтого цвета с чёткими контурами размером до 0,5–1 диаметра диска, при этом у 11 % крыс в заднем полюсе глаза обнаруживались точечные кровоизлияния. III стадия выявлялась в 7 % и характеризовалась обширными кровоизлияниями в макулярную область с признаками организации. Сравнение артериальных и венозных сосудов сетчатой оболочки глаза при различных клинических формах дистрофии позволило выявить изменения их калибра, как правило, уменьшения, и нарастающие с возрастом животных признаки ангиосклероза. Таким образом, у подавляющего большинства крыс OXYS катаракты развивались параллельно с макулодистрофией, что типично и для старения глаза человека.

Подтверждением соответствия выявленных нами изменений структурным проявлениям катаракты у че-

ловека явились результаты проведенного группой коллег из университетов Северной Каролины и Окленда (США) Фурье-анализа электронограмм хрусталиков [15]. По их данным, цитоплазма волокон переданных нами для исследования хрусталиков крыс OXYS характеризуется существенными изменениями гомогенности и плотности, полностью соответствующими регистрируемым в оперативно удалённых хрусталиках глаз людей, страдающих сенильной катарактой. Появление таких неоднородностей обусловлено изменением химических свойств и/или перераспределением цитоплазматических компонентов волокон хрусталиков, определяющим нарушение светорассеяния и формирование катаракты.

Известно, что в основе патогенеза возрастной катаракты лежит накопление окислительных повреждённых макромолекул хрусталика [1, 13]. Можно полагать, развитие ранней катаракты у крыс OXYS связано с их повышенной чувствительностью к окислительному стрессу. В этом убеждает продемонстрированная нами ранее возможность существенно снижать заболеваемость с помощью антиоксидантов — витамина E и экс-

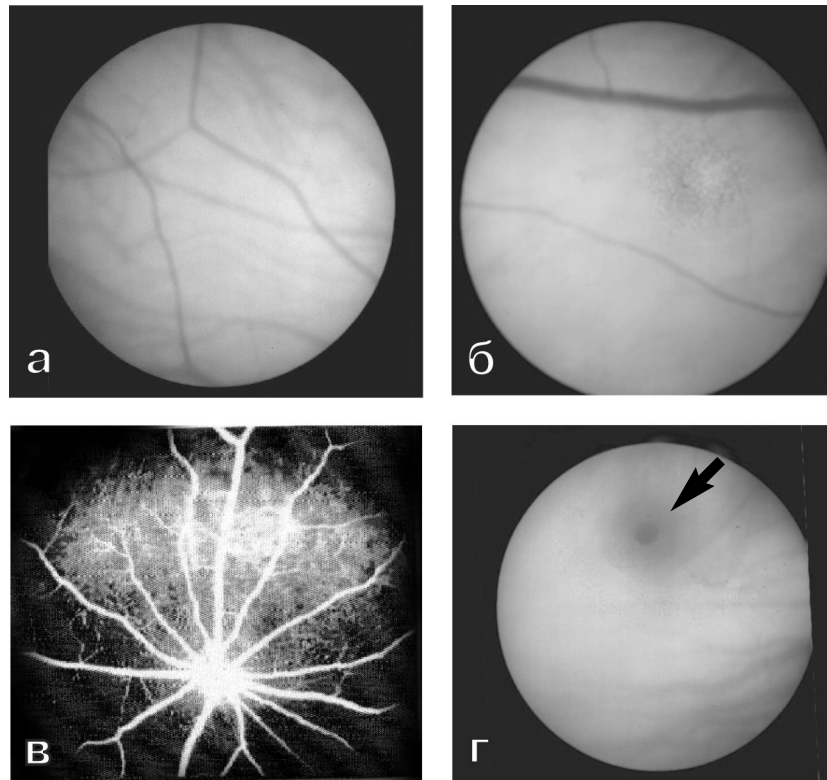


Рис. 4. Картина глазного дна животных, полученная с помощью Фундус-камеры «Opton».
 а — глазное дно крысы Вистар без изменений; б — глазное дно крысы OXYS — макулодистрофия II стадии с проминирующим очагом желтого цвета в макулярной области и точечными кровоизлияниями; в — глазное дно крысы OXYS с обширными кровоизлияниями и признаками пролиферации; г — флуоресцентная ангиограмма глазного дна крысы OXYS (I стадия заболевания) — стрелкой обозначена область экстравазального выхода флуоресцеина.

тракта черники, предотвращающих также нарушения структуры и функций митохондрий — предполагаемую причину преждевременного старения крыс OXYS [10, 11]. Таким образом, результаты исследований позволяют заключить, что развивающаяся у крыс OXYS ранняя катаракта по своему характеру соответствует сенильной катаракте человека и эти животные могут служить моделью для исследования патогенеза заболевания, для разработки способов его профилактики и лечения. В то же время обнаруженные нами изменения сетчатки позволяют рассматривать линию крыс OXYS как универсальную модель для исследования процесса старения глаза.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 02-04-48317).

Литература

1. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. Свободные радикалы в живых системах. Итоги науки и техники. Биофизика.—1991.—ВИНИТИ АН СССР.—Т. 29.—С.132–168.
2. Деев А.И., Бабижаев М.А. Мембранные аспекты патогенеза катаракты //Биол. мембраны.—2002.—Т. 19, № 5.—С. 435–448.
3. Деев А.И., Бабижаев М.А., Владимиров Ю.А. Остановить катаракту! //Знание-сила.—2001.—№ 5.—С. 15–19.
4. Колосова Н.Г., Айдагулова С.В., Непомнящих Г.И. и др. Динамика структурно-функциональных изменений митохондрий гепатоцитов преждевременно стареющих крыс линии OXYS // Бюл. exper. биол.—2001.—Т. 132, № 8.—С. 235–240.
5. Колосова Н.Г., Кутаргин Г.Д., Сафина А.Ф. Особенности минерализации костной ткани преждевременно стареющих крыс OXYS //Бюл. exper. биол.—2002.—Т. 133, № 2.—С. 171–174.
6. Лоскутова Л.В., Колосова Н.Г. Эмоциональный статус и способность к однократному обучению у крыс линии OXYS с наследственно повышенной способностью к радикалообразованию // Бюл. exper. биол.—2000.—№ 12.
7. Непомнящих Л.М., Семёнов Д.Е., Соловьёва Н.А., Салганик Р.И. Клеточные механизмы генетически детерминированной гипертрофической кардиомиопатии у крыс линии W/SSM // Бюл. exper. биол.—1994.—Т. 118, № 11.—С. 547–551.
8. Соловьёва Н.А., Морозкова Т.С., Салганик Р.И. Получение сублинии крыс с признаками наследственной галактоземии и исследование их биохимических особенностей // Генетика.—1975.—№ 5.—С. 63–71.
9. Шабалина И.Г., Колосова Н.Г., Гришанова А.Ю. и др. Активность окислительного фосфорилирования, F_0F_1 -АТФ-

азы и содержание цитохромов митохондрий печени крыс с врожденным повышением способности радикалообразования // Биохимия.—1995.—Т. 60, № 12.—С. 2045–2052.

10. Шабалина И.Г., Шалбуева Н.И., Дикалова А.Э. и др. Применение Миртилена Форте и Адрузена Цинко для фармакокоррекции нарушений функций митохондрий печени крыс ОХYS с врожденной повышенной способностью к радикалообразованию // Экспер. и клин. фармакол.—2001.—Т. 64, № 4.—С. 34–36.

11. Шабалина И.Г., Шалбуева Н.Н., Дикалова А.Э. и др. Повышение эффективности окислительного фосфорилирования митохондрий и снижение частоты возникновения катаракт у крыс линии ОХYS с врожденно повышенным радикалообразованием под влиянием экстракта черники // Тез. конф. «Биологически-активные добавки к питанию и натуральные лекарственные препараты в профилактике, лечении и реабилитации. Российский национальный регистр лечебно-профилактических средств на натуральной основе».—М., 27–28 января 2000.—С. 59–62.

12. Щеглова Т.В., Амстиславская Т.Г., Колосова Н.Г. Особенности метаболизма серотонина в структурах мозга преждевременно стареющих крыс ОХYS// Нейрохимия.—2003.—Т. 20, № 1.—С. 261–265.

13. Babizhayev M.A., Deyev A.I., Lindberg L.F. Lipid peroxidation as a possible cause of cataract // Mech. Ageing Develop.—1988.—Vol. 44.—P. 69–89.

14. Boyle D.L., Blunt D.S., Takemoto L.J. Confocal microscopy of cataracts from animal model systems: relevance to human nuclear cataract // Exp. Eye Res.—1997.—Vol. 64, № 4.—P. 565–572.

15. Freel C.D., Gilliland K.O., Wesley L. C. et al. Fourier analysis of cytoplasmic texture in nuclear fiber cells from trans-

parent and cataractous human and animal lenses // Exp. Eye Res.—2002.—Vol. 74, № 6.—P. 689–702.

16. Hosokawa M., Ashida Y., Tsuboyama T. et al. Cataract in senescence accelerated mouse (SAM). 2. Development of a new strain of mouse with late-appearing cataract // Exp. Eye Res.—1988.—Vol. 47, № 4.—P. 629–640.

17. Kuck J.F. Late onset hereditary cataract of the emory mouse. A model for human senile cataract // Exp. Eye Res.—1990.—Vol. 50, № 6.—P. 659–664.

18. Okano T., Uga S., Ishikawa S., Shumiya S. Histopathological study of hereditary cataractous lenses in SCR strain rat // Exp. Eye Res.—1993.—Vol. 57.—P. 567–576.

19. Rat genome.—1996.—Vol. 2, № 2.—P. 52–54.

20. Salganik R.I., Solovyova N.A., Dikalov S.I. et al. Inherited enhancement of hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in the S strain rats results in DNA rearrangements, degenerative diseases, and premature aging // Bioch. Bioph. Res. Com.—1994.—Vol. 199, № 2.—P. 726–733.

21. Shumiya S. Establishment of the hereditary cataract rat strain (SCR) and genetic analysis // Lab. Anim. Sci.—1995.—Vol. 45, № 6.—P. 671–673.

22. Tripathi B.J., Tripathi R.C., Borisuth N.S. et al. Rodent models of congenital and hereditary cataract in man // Lens Eye Toxic. Res.—1991.—Vol. 8, № 4.—P. 373–413.

23. Uga S., Ihara N. Morphological study of a hereditary rat cataract // Exp. Eye Res.—1990.—Vol. 50, № 6.—P. 665–670.

24. Wolf N.S., Li Y., Pendergrass W. et al. Normal mouse and rat strains as models for age-related cataract and the effect of caloric restriction on its development // Exp. Eye Res.—2000.—Vol. 70.—P. 683–692.

Adv. Gerontol.—2003.—Vol. 12.—P. 143–148.

N.G. Kolosova, P.A. Lebedev, A.Zh. Fursova, T.S. Moroskova, O.G. Gusarevich

SENESCENCE-ACCELERATED OXYS RAT AS AN ANIMAL MODEL OF SENILE CATARACT IN MAN

Institute of Cytology and Genetics (kolosova@bionet.nsc.ru), Novosibirsk Branch of MNTK «Microsurgery of the Eye», State Novosibirsk Regional Clinical Hospital, Novosibirsk State Medical Academy, Novosibirsk, Russia

Cataracts remain the major cause of blindness and acuity of vision deterioration in the elderly. To date there are no effective methods of preventive measures of this disease and surgical removal of cataract-damaged lenses remains the only way to restore vision. To explore cataract pathogenesis and development methods of its prophylaxis are necessary fundamental investigation, which is impossible without biological models. As the first Russian her senile cataract model it is suggested to use the senescence-accelerated OXYS rat strain which was developed 30 years ago by selection and inbreeding of rats Wistar susceptible to cataractogenic effect of galactose (Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk). We conducted strong selection by the early cataract during 13 generations of OXYS rats. As the result at present time changes of OXYS rat lens appear by the 2 month, at 6 months these changes appear in 100 % of animals (in rats Wistar — 5 %), at 12 month cataract affects both eyes. The data suggest that the cataract in rats OXYS develops simultaneously with progressive macular degeneration while changes of the eye lenses morphologically correspond to senile cataract in man.

Key words: premature aging, rats OXYS, the model of senile cataract.