

© А.В.Смирнов, В.А.Добронравов, А.И. Неворотин, С.Е.Хохлов, В.Г.Сиповский, В.В.Барабанова, С.Г.Чефу, А.А.Жлоба, Э.Л.Блашко, 2005
УДК 611.61:616.633.478.5.001.5

*А.В.Смирнов, В.А.Добронравов, А.И. Неворотин, С.Е.Хохлов,
В.Г.Сиповский, В.В.Барабанова, С.Г.Чефу, А.А.Жлоба, Э.Л.Блашко*

ГОМОЦИСТЕИН ВЫЗЫВАЕТ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕ ТОЛЬКО КЛУБОЧКОВОГО, НО И КАНАЛЬЦЕВОГО ОТДЕЛА НЕФРОНА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

*A.V.Smirnov, V.A.Dobronravov, A.I.Nevorotin, S.E.Khokhlov, V.G.Sipovsky,
V.V.Barabanova, S.G.Chefu, A.A.Zhloba, E.L.Blashko*

HOMOCYSTEIN CAUSES LESIONS OF NOT ONLY GLOMERULAR BUT ALSO TUBULAR PART OF THE NEPHRON (EXPERIMENTAL STUDY)

Научно-исследовательский институт нефрологии, Научно-исследовательский центр, кафедра патологической физиологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени акад. И.П. Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬЮ ИССЛЕДОВАНИЯ было выявление функциональных и структурных последствий экспериментальной гипергомоцистеинемии в почках крыс. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Взрослым белым крысам линии Вистар в течение 3 недель парентерально вводили гомоцистеин (ГЦ; -13.4 мг/кг) для оценки влияния экспериментальной гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на мочевую экскрецию альбумина (МЭА), клиренс креатинина (C_{cr}), а также на структуры клубочков и проксимальных канальцев (ПК) на светооптическом и электронномикроскопическом уровнях. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Развитие умеренной ГГЦ у экспериментальных животных приводило к достоверному увеличению МЭА без достоверного изменения C_{cr} , что сопровождалось умеренной мезангиальной пролиферацией, гиперплазией гломерулярной базальной мембраны, заметным увеличением числа больших апикальных вакуолей и вторичных лизосом, а также очаговой утратой щеточной каймы в отдельных клетках ПК. Кроме того, в ПК было отмечено увеличение количества аутофагосом, наряду с наличием эпителиальных клеток с дезорганизованными участками базальной цитоплазмы. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Полученные данные следует рассматривать как прямое доказательство повреждающего действия ГГЦ на клубочки и клетки ПК.

Ключевые слова: гомоцистеин, почки, повреждения.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to find out the functional and structural consequences of experimental hyperhomocysteinemia (hHcy) in the rats' kidneys. **MATERIAL AND METHODS.** Adult albino Wistar rats were exposed to daily parenteral homocysteine for three weeks in order to evaluate the influence of experimental hHcy on urinary albumine excretion (UAE), plasma creatinine concentration and creatinine clearance (C_{cr}) as well as on the alterations of the glomerular and proximal tubular (PT) structures at the light and electron microscopy levels. **RESULTS.** The development of mild hHcy in experimental animals resulted in significantly increased UAE without a significant C_{cr} change that was accompanied by moderate focal mesangial and endothelial cell proliferation, glomerular basement membrane hyperplasia, appreciably increased number of large apical vacuoles and secondary lysosomes, and focal loss of the brush border in certain PT cells. In addition, an increased number of autophagic vacuoles along with the epithelial cells with disorganized loci of the basal cytoplasm was noted. **CONCLUSION.** The data obtained are considered to be a direct evidence of the impairing effect of hHcy on the glomeruli and PT cells.

Key words: homocysteine, kidneys, lesions.

ВВЕДЕНИЕ

Установлено, что гипергомоцистеинемия (ГГЦ) вызывает как функциональные, так и отчетливые структурные повреждения клубочка. Так, при моделировании на крысах ГГЦ приводит к повышению экскреции белка с мочой [1, 2], снижению почечного плазмотока и скорости клубочковой фильтрации [3,4]; при светооптическом анализе выявлено увеличение объема мезангиального матрикса, некоторое увеличение количества мезангиальных клеток и умеренный гломерулосклероз [1,

2, 4]. Отмечен также и незначительный склероз в корковом отделе почки. При этом, однако, ни в одном из опубликованных исследований даже не упоминается о возможном изменении канальцевого отдела нефрона. Между тем при различных экспериментальных воздействиях и клинических ситуациях, сопровождающихся повышенной фильтрацией белка в клубочке, имеет место его усиленная реабсорбция с выраженными структурными изменениями эпителиальных клеток [5–10]. Именно эти данные послужили стимулом к выполнению насто-

ящей работы, целью которой являлся анализ вызванных ГГЦ изменений не только в клубочковых, но и в канальцевых элементах с применением методов как световой, так и электронной микроскопии в сочетании с оценкой функционального состояния почки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали крыс-самцов линии Вистар (возраст 12 недель, масса тела 180-220 г), содержащихся в стандартных лабораторных условиях. Животные экспериментальной группы в течение 3 недель получали DL-гомоцистеин (ГЦ) (13,4 мг/кг, 1 раз в сутки, внутримышечно). Животные контрольной группы (n=12) получали внутримышечно физиологический раствор по 1 мл ежедневно в течение этого же периода времени.

За сутки до взятия материала у подопытных животных собирали суточную мочу в метаболической камере. Утром натощак под эфирным наркозом у крыс брали кровь из яремной вены в объеме 5 мл, которую помещали на 30 мин в охлажденные пластиковые пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА). В отделенной центрифугированием плазме (3000 об/мин в течение 7 мин) определяли концентрацию общего ГЦ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в модификации А.А.Жлобы и Э.Л.Блашко, одним из преимуществ которой является существенное снижение потери окисленной фракции ГЦ [11].

Помимо этого для исследования мочи определяли: суточный диурез, экскрецию альбумина и креатинина с последующим расчетом соотношения альбумин/креатинин мочи (ACR), концентрационный индекс и клиренс креатинина, концентрацию альбумина иммунохимическим методом с нефелометрической детекцией на автоматическом анализаторе Argra-360 (фирма Beckmann, США), а в плазме крови – концентрацию креатинина и мочевины по стандартной методике на биохимическом автоанализаторе (COBAS MIRA).

Для светоптического исследования образцы почки фиксировали в 10% нейтральном формалине, заливали в парафин и окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизон с докраской на эластик, нитратом серебра по Джонсу–Моури, реактивом Шиффа (PAS реакция) и хромотропом (трихромальная окраска). Для электронной микроскопии применяли глутаральдегид-паральдегидную фиксацию по Карновскому, с после-

дующим осмированием, контрастированием, обезвоживанием и заливкой в смесь Эпона и Аралдита. Препараты исследовали в светоптическом микроскопе MICROS 200A (Австрия) и электронном микроскопе JEM -7a (Япония).

Различия в группах определяли с использованием стандартных непараметрических тестов сравнения в лицензионном пакете статистических программ SPSS 11.0. Достоверными считали различия при значении $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Парентеральное введение ГЦ приводило к умеренному, но достоверному увеличению концентрации ГЦ в плазме крови (таблица). На этом фоне у экспериментальных животных произошло достоверное увеличение мочевого экскреции альбумина. Содержание креатинина и мочевины существенно не отличалось в опытной и в контрольной группе. Вместе с тем у крыс с ГГЦ отмечали достоверное снижение концентрации креатинина в моче, его концентрационного индекса. СCr также был несколько ниже в экспериментальной группе, однако различия не были достоверными (см. таблицу).

Светоптическое исследование. При ГГЦ отмечено некоторое увеличение размеров клубочков, очаговые спайки капиллярных петель с капсулой клубочка без расширения мочевого пространства. В капиллярных петлях выявлялась умеренная сегментарная пролиферация мезангиоцитов (рис.1). Эпителий проксимальных канальцев (ПК) был заметно гипертрофирован, цитоплазма эпителиальных клеток характеризовалась набуханием и просветлением. В некоторых канальцах отмечено локальное расхождение межклеточных контактов и утрата щеточной каемки. В цитоплазме клеток ПК выявлялись эозинофильные включения с отчетливой PAS-положительной реакцией (рис. 2).

Субмикроскопическое исследование. При ГГЦ отмечена пролиферация мезангиоцитов, эндотелиоцитов, а также гиперплазия базальных мембран капилляров (рис. 3). В апикальном отделе

Уровень ГЦ в плазме крови и показатели состояния почек у экспериментальных животных

Показатель	Группа контроля n=12	Группа ГГЦ n=10	p
ГЦ, мкмоль/л	5,1 ± 1,1	6,9 ± 2,5	0,033
Диурез, мл/сут	4,5 ± 1,9	8,5 ± 6,0	0,041
Мочевина плазмы крови, ммоль/л	6,44 ± 0,82	7,20 ± 1,06	0,067
Креатинин плазмы крови, мкмоль/л	45 ± 8	49 ± 4	0,287
Креатинин мочи, мкмоль/л	12968 ± 5314	6336 ± 2203	0,001
U_{cr}/P_{cr}	304 ± 162	137 ± 49	0,002
S_{cr} , мл/мин	0,79 ± 0,18	0,64 ± 0,22	0,094
ACR, мг/г	10,6 ± 11,1	44,7 ± 59,1	0,006

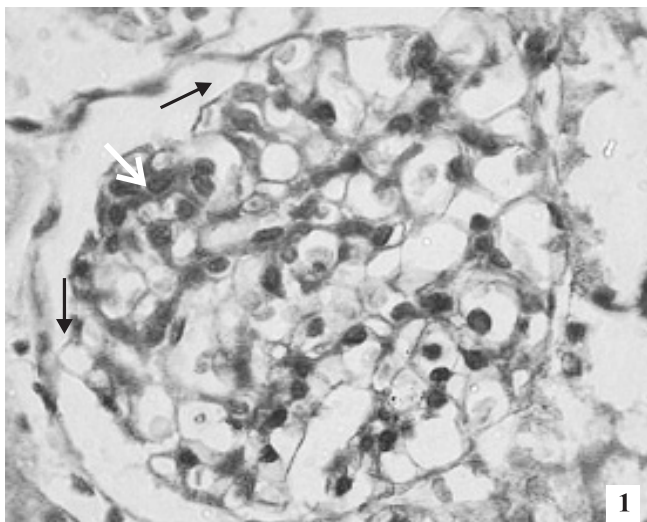


Рис. 1. Очаговые спайки капиллярных петель с капсулой клубочка (черные стрелки) и сегментарная гиперклеточность мезангия (белая стрелка). PAS –реакция с докраской гематоксилином. x 120.

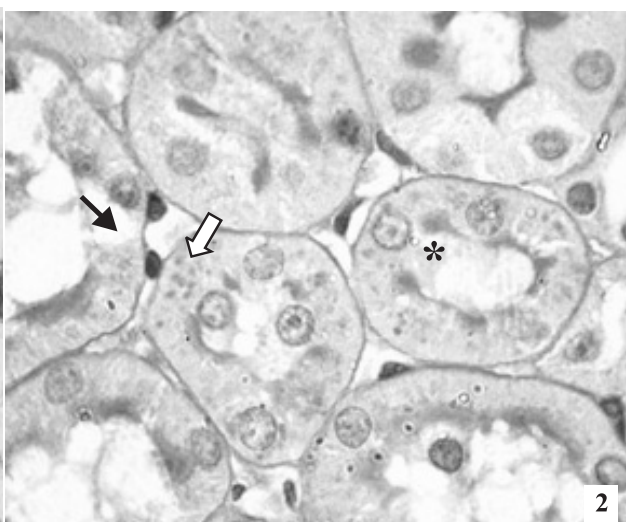


Рис. 2. Просветление цитоплазмы (черная стрелка), скопление PAS-позитивных гранул (белая стрелка) и участок утраты щеточной каемки (звездочка). PAS –реакция с докраской гематоксилином. x 160.

клеток ПК, помимо типичных для них эндоцитозных пузырьков, апикальных вакуолей и лизосом, отмечены аутофагические вакуоли с плотным аморфным содержимым (рис. 4). В базальном отделе цитоплазмы выявлено более значительное, чем в апикальном, количество аутофосом, вторичных лизосом, нередко – с липидными включениями, а в отдельных клетках обнаружены весьма крупные полиморфные участки неструктурированной цитоплазмы, местами отграниченные щелевидными промежутками от остальной ее части (рис. 5). Отсутствие замкнутой границы, характерной для аутофагических вакуолей, свидетельствует, по-ви-

димому, о локальном цитонекрозе, т.е. о более глубоком повреждении клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

ГГЦ считают важным фактором риска при сердечно-сосудистой патологии [12–14]. Так, показано, что повышение концентрации ГЦ в крови человека и экспериментальных животных вызывает выраженные нарушения функции эндотелия [15–18]. Среди ключевых факторов отмечают прямое токсическое действие ГЦ на эндотелиальную выстилку [18], ингибирование синтеза оксида азота [19], усиленный синтез асимметричного диметиларгинина [20–22], содержание которого, подобно ГЦ, возрастает на ранних стадиях хронической болезни почек (ХБП) [23].

Структурные изменения при экспериментальной ГГЦ выявляли в артериях любого калибра, причем не только в эндотелии, но и в других компонентах сосудистой стенки [24–26]. В частности, к таковым относится и развитие гиперплазии гладкомышечных клеток [27], обусловленную, вероятно, первичным поражением эндотелия, а также нарушением продукции оксида азота [28–30].

Морфологические и функциональные последствия ГГЦ наиболее детально изучены на аорте и сосудах головного мозга. Намного меньше известно о влиянии ГГЦ на сосудистые и другие структуры почки, причем эти исследования ограничены описанием отдельных нарушений на светооптическом уровне. Так, при моделировании ГГЦ в течение 6–12 недель были обнаружены отчетливые клинические и морфологические признаки поражения клубочков у нормо- и гипертензивных линий крыс в виде развития протеинурии, расширения ме-

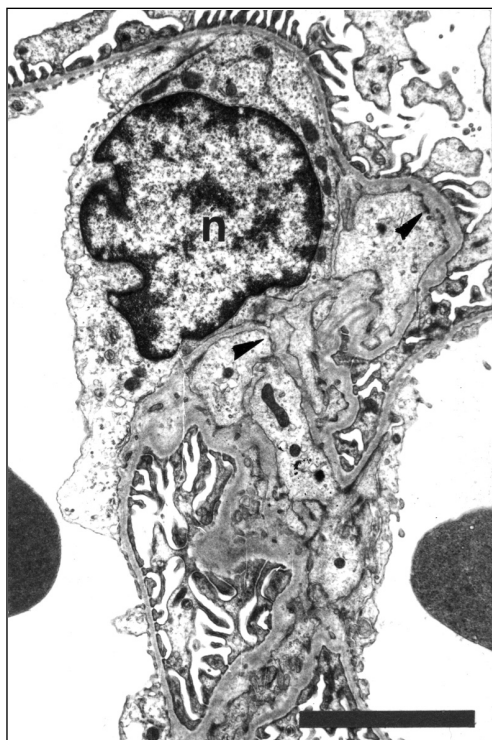


Рис. 3. Участок гиперплазии и базальных мембран клубочка. Увеличение 7160. Масштабная метка – 3 мкм.

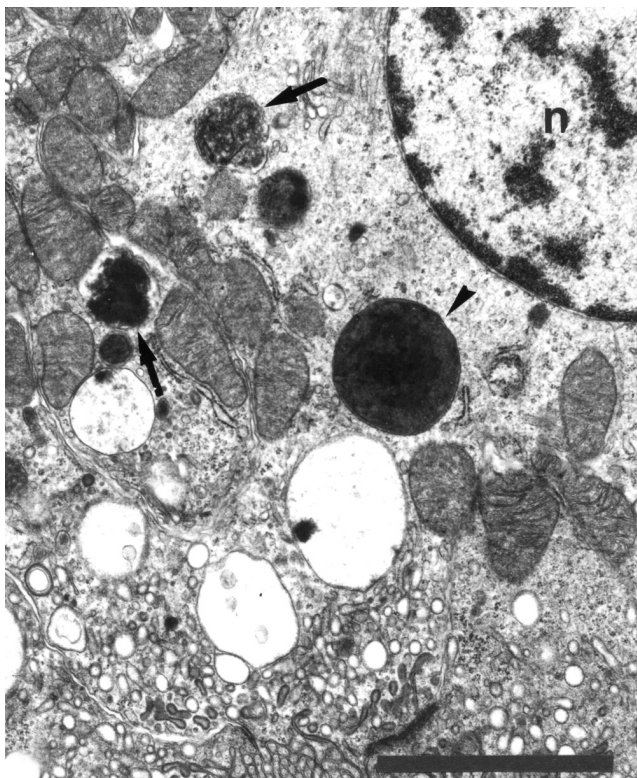


Рис. 4. В апикальном отделе клетки ПК видны многочисленные эндоцитозные пузырьки, большие апикальные вакуоли, вторичные лизосомы (наконечник стрелки) и аутофагосомы с гетерогенным по плотности аморфным содержимым (стрелки) Увеличение 10350. Масштабная метка – 3 мкм.

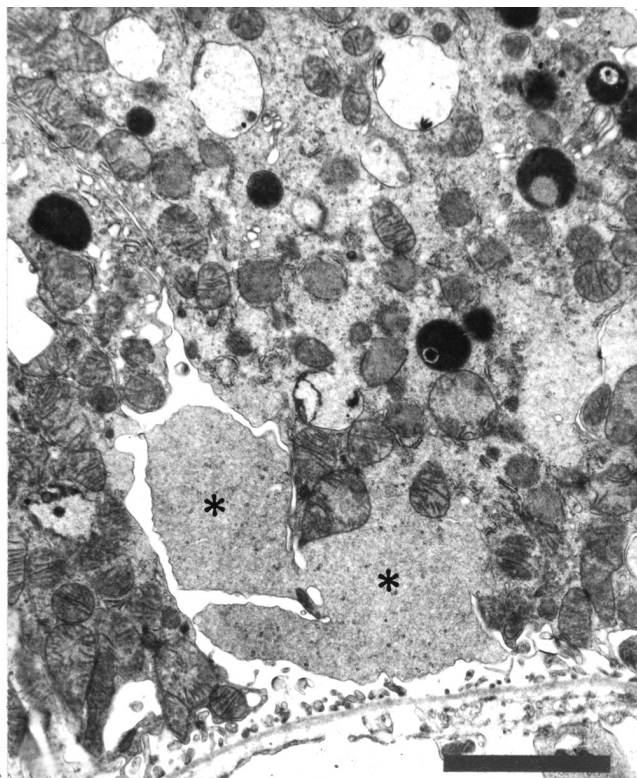


Рис. 5. В базальном отделе клетки ПК видны лизосомы, причем некоторые из них – с липидными включениями. Два связанных узким перешейком друг с другом участка цитоплазмы лишены видимых структур и, по-видимому, представляют собой начальную стадию локального некроза (звездочки). Увеличение 7160. Масштабная метка – 3 мкм.

зангия, его гиперцеллюлярности, коллапса капиллярных петель и склеротических изменений [1,2]. С другой стороны, на нормотензивных крысах зарегистрировано лишь очаговое увеличение мезангиального матрикса, без явных склеротических изменений клубочков, интерстиция и сосудов на фоне существенных гемодинамических изменений, таких, как снижение почечного плазмотока и СКФ при умеренной ГЦ [3]. Различия можно объяснить не только разницей в артериальном давлении, но и тем, что в последней работе вместо ГЦ вводили его дериват (тиолактон ГЦ), который обладает значительно более высоким мочевым клиренсом [30], предположительно за счет уменьшенной канальцевой реабсорбции, что, скорее всего, и объясняет отсутствие существенных светооптических изменений почечных структур.

Длительность проведения эксперимента в настоящем исследовании была значительно короче, чем в цитированных выше исследованиях, что и позволило зарегистрировать изменения в структуре и функции ключевых отделов нефрона на ранних сроках моделирования ГЦ. Именно кратковременным воздействием ГЦ следует объяснять отсутствие заметного снижения C_{Cr} и каких-либо склеротических изменений в клубоч-

ках, сосудах и интерстиции. Вместе с тем, даже при этих условиях светооптически зарегистрирована очаговая пролиферация клеток мезангия, а ультраструктурно – пролиферация эндотелиальных клеток и гиперплазия базальных мембран в зоне мезангиального контакта, что, по-видимому, отражает развитие умеренной альбуминурии при относительно сохранном C_{Cr} . Идентичные изменения отмечены и при других видах клинической и экспериментальной патологии почек [31], однако в настоящей работе они впервые документированы при введении ГЦ, причем на беспрецедентно коротких сроках воздействия препарата. Что касается возможных механизмов выявленных изменений, то таковые могут быть связаны с увеличением содержания ГЦ в цитоплазме, сопровождающимся усиленным синтезом S-аденозилметионина с последующим его транспортом в митохондрии, приводящим к повышению метилирования нуклеиновых кислот и белков [32]. Экспериментальные данные указывают и на ряд иных механизмов, способствующих пролиферации мезангиоцитов при ГЦ. Среди них – экспрессия VEGF [33], увеличение образования тканевого ингибитора металлопротеиназ (TIMP-1) на фоне стимуляции NADH-оксидантной активности [34], усиленный синтез ДНК, по

крайней мере отчасти опосредуемый увеличением активности митогенактивируемой протеинкиназы (МАРК) [35], и экспрессия нуклеарного фактора NF-κB [36,37]. Последнее касается также и клеток эндотелия [38].

В других исследованиях, выполненных на отлученных от кормления крысах линии Фишер, напротив, продемонстрировано утолщение стенок артерий/артериол и развитие фокальных склеротических изменений интерстиция, при увеличении эндотелиального фактора роста – индикатора гипоксии, что позволило предположить основную роль сосудистых изменений в развитии интерстициального фиброза [39]. В этом исследовании уровни протеинурии не отличались в группах ГГЦ и контроле. Представляет интерес и тот факт, что при назначении фолатов выраженность ГГЦ и ТИИ была достоверно более низкой [39]. Известно, что добавление фолатов в культуру раковых клеток толстой кишки линии Сасо-2 существенно снижает их пролиферативную активность [40], поэтому в качестве одного из вероятных механизмов наблюдаемых изменений может рассматриваться и снижение транспорта фолатов в клетки [41].

Структурные изменения клеток ПК могут быть четко подразделены на две категории. К первой следует отнести обусловленные фильтрацией белка признаки его усиленной реабсорбции. Это проявляется увеличением количества структур лизосомально-вакуолярного аппарата, а именно больших апикальных вакуолей и вторичных лизосом, выявляемых по PAS-позитивной реакции светооптически, а субмикроскопически – без специального маркирования. И те и другие неоднократно демонстрировались в клетках ПК в ситуациях с повышенной альбуминурией и неизменно ассоциировались именно с форсированной реабсорбцией в ответ на повышение концентрации белка в просвете проксимальных канальцев [5,6–9]. Поскольку указанные структуры представлены в умеренном количестве и в интактных клетках ПК, а при введении ГЦ отмечено лишь незначительное увеличение их числа, данный факт не может служить показателем повреждения клеток и отражает, по-видимому, лишь физиологически обусловленную активацию реабсорбции в ответ на повреждение клубочкового фильтра. Не исключено, что отмеченная под световым микроскопом гипертрофия клеток ПК объясняется вкладом возросшего числа вакуолей и лизосом. увеличением общего объема цитоплазмы без ее гидратации. С другой стороны, значительное увеличение количества аутофагосом, особенно в базальной цитоплазме клеток ПК, при введении ГЦ может быть

интерпретировано только как показатель существенного нарушения клеточного метаболизма. Свидетельством этому служат многочисленные работы с использованием самых разнообразных типов клеток и вредоносных воздействий, при которых неизменно отмечали увеличение количества аутофагосом. Последние изредка встречаются и в интактных клетках и предназначены для утилизации закончивших жизненный цикл органелл, однако показано, что именно повреждение стимулирует интенсивную аутофагию [42–45]. К еще более определенному выводу о повреждении клеток ПК приводят и светооптические данные о частичной утрате щеточной каемки в некоторых клетках ПК и зарегистрированное субмикроскопически свидетельство о дезорганизации участков цитоплазмы отдельных клеток, что не имеет иной интерпретации, кроме тяжелого, возможно, преднекротического повреждения клетки [46].

Следует также учитывать, что эпителий ПК, как и некоторые другие клеточные линии, имеет систему трансмембранного транспорта ГЦ, причем показано, что увеличение его внеклеточной концентрации усиливает поток ГЦ в цитоплазму [47–50]. Поэтому не исключено, что именно накопление ГЦ в клетках ПК, обусловленное увеличением его концентрации в первичной моче, является важным фактором развития обнаруженных в настоящей работе цитотоксических эффектов, что согласуется с данными, полученными ранее на культуре клеток ПК [51]. Что касается молекулярных механизмов повреждающего действия ГЦ, то таковые связывают со снижением концентрации глутатиона [51], активацией транссульфурирования ГЦ в цистатионин и цистеин [52], конъюгированием ГЦ с двухвалентными катионами [49], а, возможно, с образованием дисульфидов ГЦ и гоцистеинилированием внутриклеточных белков и альбумина [53]. Уточнение вклада этих факторов в процессы повреждения нефрона на уровне как клубочковых, так и канальцевых структур требует специального исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в подтверждение предыдущих исследований в настоящей работе физиологически и морфологическими методами установлено, что ГГЦ вызывает существенные функциональные и структурные изменения начального отдела нефрона, причем на столь ранних сроках, которые ранее экспериментально не испытывались. Некоторые из этих изменений, а именно – умеренная пролиферация мезангиальных и эндотелиальных клеток клубочка, а также выраженная аутофагия и единичные

случаи дезорганизации цитоплазмы клеток ПК относятся к категории повреждения по аналогии с многочисленными идентичными находками при самых разнообразных воздействиях заведомо патологического характера. Таким образом, полученные данные определенно указывают на то, что ГГЦ, вызывая повреждение и клубочков, и ПК, может рассматриваться как новый потенциальный фактор развития и прогрессирования почечной патологии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Miller A, Mujumdar V, Shek E et al. Hyperhomocyst(e)inemia induces multiorgan damage. *Heart Vessels* 2000; 15(3):135-143
2. Li N, Chen YF, Zou AP. Implications of hyperhomocysteinemia in glomerular sclerosis in hypertension. *Hypertension* 2002; 39(2 Pt 2): 443-448
3. Ossani GP, Fischer PA, Caram SG et al. Mild hyperhomocysteinemia promotes renal hemodynamic dysfunction without histopathologic changes in adult rats. *Kidney Int* 2004; 66(5): 1866-1872
4. Chen YF, Li PL, Zou AP. Effect of hyperhomocysteinemia on plasma or tissue adenosine levels and renal function. *Circulation* 2002; 106:1275-1281
5. Nielsen S. Endocytosis in renal proximal tubules. Experimental electron microscopical studies of protein absorption and membrane traffic in isolated, in vitro perfused proximal tubules. *Dan Med Bull* 1994; 41(3):243-263
6. Maunsbach AB. Cellular mechanisms of tubular protein transport. *Int Rev Physiol* 1976; 11:145-167
7. Murer H, Forster I, Hernando N, et al. Posttranscriptional regulation of the proximal tubule NaPi-II transporter in response to PTH and dietary P(i). *Am J Physiol* 1999; 277(5 Pt 2):F676-684
8. Ryabov SI, Plotkin VY, Freici IJ, Nevorotin AJ. Possible role of the proximal convoluted tubules of human kidney in chronic glomerulonephritis. A quantitative electron-microscopic study. *Nephron* 1978; 21(1):42-47
9. Ryabov SI, Plotkin VYa, Nevorotin AJ. Intracellular routes of a lysosome marker enzyme, acid phosphatase, in proximal convoluted tubule cells of human kidney in glomerulonephritis as studied by electron cytochemistry. *Nephron* 1981; 29(1-2): 68-72
10. Hryciw DH, Pollock CA, Poronnik P. PKC{alpha} mediated remodeling of the actin cytoskeleton is involved in constitutive albumin uptake by proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: 1227-1235
11. Zhloba AA, Blashko EL. Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 800 (1-2): 275-280
12. Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr et al. Homocyst(e)ine, and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999; 131: 363-375
13. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG et al. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med* 1995; 332: 286-291
14. Eikelboom JW, Hankey GJ, Anand SS et al. Association between high homocyst(e)ine and ischemic stroke due to large- and small-artery disease but not other etiologic subtypes of ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31: 1069-1075
15. Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ et al. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996; 98:24-29
16. Celermajer DS, Sorensen K, Ryallis M et al. Impaired endothelial function occurs in the systemic arteries of children with homozygous homocystinuria but not in their heterozygous parents. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22:854-858
17. Tawakol A, Omland T, Gerhard M et al. Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 1997; 95:1119-1121
18. de Groot PG, Willems C, Boers GHJ et al. Endothelial cell dysfunction in homocystinuria. *Eur J Clin Invest* 1983; 13: 405-410
19. Stamler JS, Osborn JA, Jaraji O, et al. Adverse effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993; 91: 308-318
20. Вугер RH, Bode-Вугер SM, Sydow K et al. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2000; 20:1557-1564
21. Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2003; 108(8): 933 - 938
22. Stuhlinger MC, Tsao PS, Her J-H et al. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001; 104: 2569-2575
23. Kielstein JT, Boger R H, Bode-Boger SM et al. Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(1): 170 - 176
24. Cook JW, Taylor LM, Orloff SL et al. Homocysteine and arterial disease. Experimental mechanisms. *Vascul Pharmacol* 2002; 38(5): 293-300
25. Kim JM, Lee H, Chang N. Hyperhomocysteinemia due to short-term folate deprivation is related to electron microscopic changes in the rat brain. *J Nut* 2002; 132(11):3418-3421
26. Baumbach GL, Sigmund CD, Bottiglieri T, Lentz SR. Structure of cerebral arterioles in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circ Res* 2002; 91(10): 931-937
27. Rolland PH, Friggi A, Barlatier A et al. Hyperhomocysteinemia-induced vascular damage in the minipig: captopril-hydrochlorothiazide combination prevents elastic alterations. *Circulation* 1995; 91: 1161-1174
28. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1774-1777;
29. Chillon JM, Ghoneim S, Baumbach GL. Effects of chronic nitric oxide synthase inhibition on cerebral arterioles in rats. *Hypertension* 1997; 30: 1097-1104
30. Chwatko G, Jakubowski H. Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans. *Clin Chem* 2005; 51(2):408-415
31. Tisher CC, Brenner BM eds. *Renal pathology with clinical and functional correlation*, 2nd ed. Lippincott, Philadelphia, 1994; 1007
32. Agrimi G, Di Noia MA, Marobio CM et al. Identification of the human mitochondrial S-adenosylmethionine transporter: bacterial expression, reconstitution, functional characterization and tissue distribution. *Biochem* 2004; 379(Pt 1): 183-190
33. Roybal CN, Yang S, Sun CW et al. Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J Biol Chem* 2004; 279(15):14844-14852
34. Yang ZZ, Zou AP. Homocysteine enhances TIMP-1 expression and cell proliferation associated with NADH oxidase in rat mesangial cells. *Kidney Int* 2003; 63(3):1012-1020
35. Ingram AJ, Krepinsky JC, James L et al. Activation of mesangial cell MAPK in response to homocysteine. *Kidney Int* 2004; 66(2): 733-745
36. Zhang F, Siow YL, O K. Hyperhomocysteinemia activates NF-kappaB and inducible nitric oxide synthase in the kidney. *Kidney Int* 2004; 65(4): 1327-1338
37. Wang, G, Siow YL, Oh K. Homocysteine stimulates nuclear factor kappa B activity and monocyte chemoattractant protein-1 expression in vascular smooth-muscle cells: a

possible role for protein kinase C. *Biochem J* 2000; 352: 817-826

38. Mercie P, Belloc F, Bihlou-Nabera C et al. Comparative methodologic study of NFkappaB activation in cultured endothelial cells. *J Lab Clin Med* 2000; 136(5): 402-411

39. Kumagai H, Katoh S, Hirosawa K et al. Renal tubulointerstitial injury in weanling rats with hyperhomocysteinemia. *Kidney Int* 2002;62(4):1219-1228

40. Akoglu B, Milovic V, Caspary WF, Faust D. Hyperproliferation of homocysteine-treated colon cancer cells is reversed by folate and 5-methyltetrahydrofolate. *Eur J Nutr* 2004; 43(2):93-99

41. Naggar H, Fei YJ, Ganapathy V, Smith SB. Regulation of reduced-folate transporter-1 (RFT-1) by homocysteine and identity of transport systems for homocysteine uptake in retinal pigment epithelial (RPE) cells. *Exp Eye Res* 2003;77(6):687-697

42. N. Garg BD, Olson MJ, Li LC, Roy AK. Phagolysosomal alterations induced by unleaded gasoline in epithelial cells of the proximal convoluted tubules of male rats: effect of dose and treatment duration. *J Toxicol Environ Health* 1989; 26(1): 101-118

43. N. Okubo A, Sameshima M, Unoki K et al. Ultrastructural changes associated with accumulation of inclusion bodies in rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(13): 4305-4312

44. Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(12): 2445-2462

45. Yoshimori T. Autophagy: a regulated bulk degradation

process inside cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313(2): 453-458

46. Oulmi Y, Negele RD, Braunbeck T. Segment specificity of the cytological response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) renal tubules following prolonged exposure to sublethal concentrations of atrazine. *Ecotoxicol Environ Saf* 1995; 32(1): 39-50

47. Foreman JW, Wald H, Blumberg G et al. Homocystine uptake in isolated rat renal cortical tubules. *Metabolism* 1982; 31:613-619

48. Silbernagl S. The renal handling of amino acids and oligopeptides. *Physiol Rev* 1988; 68:911-1007

49. Bridges CC, Zalups RK. Homocysteine, system b₀,+ and the renal epithelial transport and toxicity of inorganic mercury. *Am J Pathol* 2004; 165(4):1385-1394

50. Hultberg B. Extracellular concentration of homocysteine in human cell lines is influenced by specific inhibitors of cyst(e)ine transport. *Clin Chem Lab Med* 2004;42(4):378-383

51. Nakanishi T, Akabane ER, Nanami M et al. Comparison of cytotoxicity of cysteine and homocysteine for renal epithelial cells. *Nephron Exp Nephrol* 2005;100(1): e11-20

52. Persa C, Pierce A, Ma Z et al. The presence of a transsulfuration pathway in the lens: a new oxidative stress defense system. *Exp Eye Res* 2004; 79(6): 875-886

53. Jakubowski H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocystein level. *FASEB J* 1999; 13: 2277-2283

Поступила в редакцию 17.05.2005 г.