

## Nefroprotekcjna aktywność ekstraktów i związków pochodzenia roślinnego. Część 1

### Nephroprotective activity of extracts and compounds of medicinal plants origin. Part 1

<sup>1</sup>Badacz niezależny, Łódź

<sup>2</sup>Badacz niezależny, Poznań

---

#### SUMMARY

The paper presents results supporting evidence of the nephroprotective effect of selected plant raw materials and their active compounds co-responsible for the action. The effect was characterized by green tea leaf extract (*Camellia sinensis* L.) and their active ingredients such as: epigallocatechin gallate, a mixture of polyphenolic compounds obtained from the raw material, as well as green tea extract in combination with royal jelly. Nephroprotective activity has been proven for vine seed extracts, grape juice and stilbenoids: resveratrol and polydatin, important compounds for their pharmacological activity, in addition, for turmeric rhizome extracts (*Curcuma longa* L. and *Curcuma caesia* Roxb.) and tetrahydrocurcumin, and also for different ginseng root extracts (*Panax ginseng* C. A. Mey.) and several ginsenosides obtained from extracts. In this respect, protective effect has been demonstrated for the licorice root extract and glycyrrhetic acid. Cisplatin, cyclophosphamide, methotrexate and acetaminophen were used as nephrotoxic agents. Activity assessment was carried out in vitro analyses and using a model laboratory animals.

Authors of experiments have shown an impact of the extracts and their active substances on the activity of antioxidant enzymes and endogenous antioxidants, biomarkers of kidney damage, pro-inflammatory factors, as well as signalling pathways and expression of proteins involved in apoptosis and ferroptosis, and the possibility of regenerating damage supported by a histopathological assessment. It was concluded that the mechanism of nephroprotective action of the tested extracts and their active compounds depend on antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic activity.

---

**Keywords:** nephroprotection, extracts, active compounds of medicinal plants

---

#### STRESZCZENIE

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań opisanych w dostępnym piśmiennictwie, w których uzyskano dowody na działanie zmniejszające uszkodzenia nerek przez wybrane surowce roślinne oraz obecne w nich współodpowiedzialne za działanie analizowanych gatunków aktywne związki. Efekt nefroprotekcyny charakteryzował wyciąg z zielonej herbaty (*Camellia sinensis* L.) oraz jego główne aktywne składniki: galusan epigallokatechiny, mieszaninę związków polifenolowych otrzymaną z surowca, a także wyciąg z zielonej herbaty w połączeniu z mleczkiem pszczelim. Aktywność protekcijną wobec nerek udowodniono dla ekstraktów z nasion winorośli, soku z owoców winorośli oraz dla stilbenoidów: resweratrolu i polidatyny – związków, które wpływają na efekt farmakologiczny tych surowców, ponadto dla wyciągów z kłączy kurkumy (*Curcuma longa* L. i *Curcuma caesia* Roxb.) i tetrahydrokurkuminy, a także dla różnych wyciągów z korzenia żeń-szenia (*Panax ginseng* C. A. Mey.) oraz kilku ginsenozydów wyodrębnionych z ekstraktów. Potencjał ochronny w tym zakresie wykazano dla ekstraktu z korzenia lukrecji i kwasu glicyretynowego.

W doświadczeniach jako czynniki nefrotoksyczne wykorzystano: cisplatynę, cyklofosfamid, metotreksat i acetaminofen. Ocena aktywności prowadzono w analizach in vitro oraz na zwierzętach laboratoryjnych.

Autorzy eksperymentów wykazali wpływ badanych ekstraktów i ich substancji czynnych na: aktywność enzymów antyoksydacyjnych i endogennych antyoksydantów, poziom markerów uszkodzenia nerek, czynniki prozapalne, a także na szlaki sygnalizacyjne i ekspresję białek uczestniczących w apoptozie i ferroptozie, możliwość regeneracji uszkodzeń popartą oceną histopatologiczną. Wnioskowano, że mechanizm działania nefroprotekcynnego badanych wyciągów i ich substancji aktywnych zależy od aktywności antyoksydacyjnej, przeciwzapalnej i antiapoptotycznej.

---

**Słowa kluczowe:** nefroprotekcja, wyciągi, związki aktywne z surowców roślinnych

---

## Wstęp

Nerki są narządem szczególnie podatnym na działanie różnych substancji, charakteryzującym się wysokim przepływem krwi, aktywnością metaboliczną oraz występowaniem w przesączu zwiększonych stężeń substancji toksycznych wynikających z ich zdolności do zagęszczania moczu. Niekorzystne zmiany nasilają się, gdy nerki są niedokrwione lub uszkodzone. Miejscami o dużej wrażliwości są przede wszystkim: tkanka śródmiąższowa, komórki nabłonka cewek nerkowych i kanalika proksymalnego, gdzie zachodzi metabolizm leków oraz powstają toksyczne metabolity pośrednie.

Wiele leków może przyczynić się do wystąpienia ostrej lub przewlekłej niewydolności nerek. Ostre uszkodzenie nerek AKI (ang. *acute kidney injury*) wiąże się z niedokrwieniem, niedotlenieniem narządu lub nefrotoksycznością wywołaną bezpośrednim działaniem leku. Upośledzony dopływ tlenu i składników odżywczych do nefronów nasila zapotrzebowanie na energię z powodu stresu oksydacyjnego i przyczynia się do rozwoju stanu zapalnego w odpowiedzi na zaburzoną równowagę redoks. W przewlekłej niewydolności nerek CKD (ang. *chronic kidney disease*) obserwuje się zmiany narządowe: nacieki, zwłóknienia, zanik cewek nerkowych, martwicę brodawek nerkowych i odczynny zapalne.

Uszkodzenie lub pogorszenie czynności nerek zależy od wielu czynników, m.in. od: potencjału nefrotoksycznego leku, połączenia z innymi lekami, stosowania zbyt wysokich dawek, czasu ekspozycji na substancję leczniczą lub nadużywania preparatu przez pacjenta. Istotny jest także stan chorego i możliwość zmiany sytuacji nefrologicznej w trakcie leczenia, na którą najczęściej nakładają się niewydolność krążenia sprzyjająca retencji sodu, odwodnienie czy zmiana klirensu kreatyniny. Zwraca się również uwagę na zachowywanie odstępów czasowych lub unikanie łącznego stosowania leków o znanym potencjalnie nefrotoksycznym działaniu, takich jak: antybiotyki aminoglikozydowe, niesteroidowe leki przeciwzapalne, inhibitory konwertazy angiotensynowej, środki kontrastujące, diuretyki pętlowe, cyklosporyna, metotreksat, cisplatyna, metale ciężkie i inne.

Roślinne surowce lecznicze stanowią źródło substancji nefroprotekcyjnych i mogą wywierać korzystny efekt leczniczy w ostrym i przewlekłym uszkodzeniu nerek, m.in. ze względu na działanie antyoksydacyjne, diuretyczne i przeciwzapalne. Liczne badania wyciągów roślinnych i związków aktywnych wyodrębnionych z surowców roślinnych prowadzone były w modelach *in vitro* na komórkach nabłonka cewek nerkowych HK-2 i *in vivo* na zwierzętach, u których stan toksyczny

wywoływano: cisplatyną, cyklosporyną, metotreksatem i acetaminofenem.

Ze względu na znaczny udział stresu oksydacyjnego w patogenezie uszkodzenia nerek przedmiotem przedstawionych badań była ocena właściwości antyoksydacyjnych związana ze zdolnością do wychwytywania wolnych rodników, stopniem peroksydacji lipidów błon komórkowych i poziomem aldehydu malonowego, ilością endogennych antyoksydantów w homogenatach nerkowych: glutationu i enzymów antyoksydacyjnych (peroksydazy glutationowej, dysmutazy nadtlenkowej, katalazy), jak również z aktywnością enzymów błony rąbka szczoteczki (fosfatazy alkalicznej). Autorzy przedstawionych prac pokazali także wpływ badanych surowców na przebieg cyklu komórkowego: apoptozę, nekrozę i ferroptozę, a także na ekspresję białek uczestniczących w procesach komórkowych przyczyniających się do rozwoju i/lub podtrzymywania stanu zapalnego: czynnika martwicy nowotworów TNF- $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ), jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (ang. *nuclear factor kappa B*) i cyklooksygenazy 2 – COX-2 (ang. *cyclooxygenase-2*). W tkankach zmienionych chorobowo pod wpływem cytokin prozapalnych, m.in. TNF- $\alpha$ , powstaje COX-2, który za pośrednictwem prostaglandyn nasila przepuszczalność naczyń i odczuwanie bólu. Proces jest kontrolowany przez szlak NF- $\kappa$ B, uczestniczący w przekaznictwie sygnałów prowadzących do syntezy białek zaangażowanych w proces zapalny, regulowanie ekspresji genów, hamowanie apoptozy oraz nasilanie procesu proliferacji i angiogenezy. Ponadto w badaniach obserwowano, czy i w jakim stopniu nastąpiła u zwierząt poprawa filtracji kłębuszkowej, parametrów osocza (poziomu kreatyniny i stężenie mocznika), jakie zmiany narządowe zaszły w obrębie nerek i czy jest możliwość regeneracji uszkodzeń histopatologicznych spowodowanych toksycznością zastosowanych w doświadczeniach substancji.

W naszej pracy przedstawiono wyniki licznych badań opisanych w dostępnym piśmiennictwie dotyczących nefroprotekcyjnej aktywności substancji pochodzenia roślinnego. W aktualnej, pierwszej części opisano nefroprotekcjne działanie wyciągów uzyskanych z tych surowców roślinnych, w przypadku których badano też związki wyizolowane z surowca uzasadniające jego aktywność. W drugiej części pracy przedstawione zostaną dane piśmiennictwa z prac, w których badano nefroprotekcjne działanie wyłączenie wyciągów z wybranych gatunków roślin, natomiast trzecia część dotyczy będzie nefroprotekcyjnej aktywności pojedynczych związków wyodrębnionych z roślin leczniczych.

## Nefroprotecyjne działanie ekstraktów z liścia zielonej herbaty, galusanu epigallokatechiny oraz mieszaniny katechin z liścia herbaty

Liść zielonej herbaty (*Camellia sinensis folium* L.) tradycyjnie stosowany jest w różnych dolegliwościach wynikających z nasilenia stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego w organizmie. Działanie farmakologiczne zawdzięcza pochodnym flawanu, takim jak: katechyna, epikatechyna, galusan epikatechiny, epigallokatechyna i galusan epigallokatechiny (EGCG). Badanie na samcach szczura pokazało ochronny wpływ wyciągu z liścia zielonej herbaty na nefrotoksyczne działanie cisplatyny podawanej co 5. dzień w ciągu 25 dni. Ekstrakt zwiększał aktywność enzymów związanych z przemianą węglowodanową (glukoza-6-fosfataza, dehydrogenaza jabłczanowa), błoną rąbka szczoteczki i stresem oksydacyjnym (dysmutaza nadtlenkowa i katalaza). Nastąpiła także poprawa parametrów osocza: kreatyniny i stężenia mocznika (1). Wykazano, że związkami aktywnymi zielonej herbaty, wpływającym ochronnie na uszkodzenia nerek myszy z wszczepionym wodobrzuszem nowotworowym Ehrlicha, które miały podwyższone wartości CRP (białko ostrej fazy), aldehydu malonowego i leukocytów, był galusan epigallokatechiny EGCG, który w dawkach 20 i 40 mg/kg znacznie zmniejszał rozmiar nowotworu (odpowiednio o 48 i 92%), redukował poziom leukocytów, białka CRP i aldehydu malonowego. W kolejnym eksperymencie szczury traktowane EGCG w dawce 50 mg/kg uniknęły działań nefrotoksycznych po cisplatynie (10 mg/kg), której podawanie osłabiało filtrację kłębuszkową i zwiększało poziom kreatyniny. Homogenaty zawierały mniej aldehydu malonowego i prozapalnego TNF- $\alpha$  oraz więcej glutationu. Mechanizm działania nefroprotecyjnego zielonej herbaty zależał nie tylko od właściwości antyoksydacyjnych, ale także od wpływu na stan zapalny i leukocytozę (2). Eksperymenty El-Mowafy i wsp. (3) oraz Khan i wsp. (4) przeprowadzone na szczurach potwierdziły, że zarówno galusan epigallokatechiny, jak i wyciąg z liścia zielonej herbaty powodowały zmniejszenie działań niepożądanych oraz poprawiały pracę nerek upośledzonych podaniem cisplatyny.

Badanie Ahna i wsp. (5) pokazało jednocześnie, jak ważny jest schemat dawkowania preparatu roślinnego. Szczurom dostarczano Polyphenon 60 (Sigma Aldrich), zawierający mieszaninę związków polifenolowych z liścia zielonej herbaty, w tym minimum 60% katechin. Aplikowanie specyfiku 2 dni przed zakończeniem podawania i 4 dni po zastosowaniu cisplatyny w iniekcji dootrzewnowej (7 mg/kg) było

skuteczniejsze w redukowaniu zmian parametrów i dysfunkcji narządowej niż stosowanie preparatu tylko przez 4 dni po iniekcji. W porównaniu z grupą kontrolną, preparat powodował znaczne zmniejszenie podwyższonych wartości kreatyniny i azotu mocznika w surowicy oraz zwiększenie aktywności gamma-glutamylotranspeptydazy i fosfatazy alkalicznej w nerkach. W badaniu histopatologicznym nie zaobserwowano zmian narządowych pod postacią martwicy kanalików nerkowych.

Zastosowanie wyciągu z liści zielonej herbaty (100 mg/kg m.c.) łącznie z mleczkiem pszczelim (100 mg/kg m.c.) powodowało zmniejszenie stężenia azotu mocznika i kreatyniny w surowicy oraz przywrócenie poziomu glutationu i aldehydu malonowego w nerkach myszy, u których zmiany pojawiły się po zastosowaniu cisplatyny (7 mg/kg m.c.) (6).

## Nefroprotecyjne działanie ekstraktów z owoców, nasion winorośli właściwej oraz resweratrolu i polidatyny

Owoce winorośli właściwej (*Vitis vinifera* L.) zawierają znaczne ilości antyoksydantów o charakterze polifenoli, takich jak: flawonoidy, proantocyjanidyny, katechiny oraz stilbenoidy (m.in. resweratrol i polidatynę). Stosowane są też same nasiona lub skórka owoców winorośli. Mogą one chronić komórki różnych narządów przed toksycznym działaniem leków i innych związków chemicznych. Mając na uwadze rolę stresu oksydacyjnego w mechanizmie toksycznego działania cisplatyny, podjęto badanie dotyczące działania ochronnego na nerki i żołądek soku z owoców winorośli, otrzymanego z całych owoców łącznie z nasionami i skórką. Analizy przeprowadzono na 21 samcach szczurów Wistar, wśród których wyróżniono grupę kontrolną (1) i dwie grupy badane (2 i 3) przyjmujące sok przez zgłębnik w dawce 10  $\mu$ l/g m.c. Siódmego dnia eksperymentu wszystkie szczury otrzymały dootrzewnowo pojedynczą dawkę cisplatyny (15 mg/kg m.c.). W grupie 3 otrzymującej sok, podawano go dodatkowo przez następne 2 dni. W porównaniu z grupą kontrolną badany preparat nieznacznie wpłynął na zmiany w nerkach. Nie zaobserwowano poprawy markerów ostrego uszkodzenia nerek, takich jak: poziom kreatyniny i mocznika w osoczu, TBARS (ang. *thiobarbituric acid reactive substances*) określającego poziom utlenienia lipidów w osoczu, nerkach i żołądku oraz aktywności katalazy i reduktazy glutationu. Sok łagodził jedynie zmiany na poziomie tkankowym w zakresie wakuolizacji komórek kanalika nerkowego i tworzenia wałeczków w cewkach nerkowych, a także rozszerzenia kanalików



nerkowych. Sok z całych owoców winorośli, ze względu na obecność flawonoidów oraz wpływ na ekspresję informacyjnego RNA mRNA (ang. *messenger RNA*) greliny w żołądku, przyniósł natomiast poprawę w zakresie dolegliwości dyspeptycznych wywołanych działaniem cisplatyny, takich jak opóźnione opróżnianie żołądka oraz wiążące się z nim uczucie sytości, brak apetytu i spadek masy ciała (7).

Wyciąg z nasion winorośli – GSPE (ang. *grape seed proanthocyanidin extract*) – charakteryzujący się wysoką biodostępnością i działaniem antyoksydacyjnym *in vitro* i *in vivo*, wykazywał lepszą zdolność wychwytywania wolnych rodników niż witaminy C, E i beta-karoten oraz znaczną cytotoksyczność wobec komórek raka piersi, płuc i gruczolakoraka żołądka, jednocześnie zwiększając wzrost i żywotność zdrowych komórek. Chronił także ludzkie keratynocyty jamy ustnej przed apoptozą wywołaną tytoniem i hepatocyty przed toksycznym działaniem leków przeciwnowotworowych, modulując geny uczestniczące w cyklu komórkowym (apoptozie), takie jak: *bcl-2*, *p53* i *c-myc*. Efekt ochronny wyciągu GSPE na komórki zaobserwowano w różnych wariantach toksyczności wywołanych u myszy: w nefro- i hepatotoksyczności (acetaminofen), pulmotoksyczności (amiodaron), kardiotoxyczności (doksorubicyna), immunotoksyczności (dimetylonitrozoamina) i neurotoksyczności MOCAP (ester 0-etylo-S,S-dipropylowy kwasu fosforoditiowego). Korzystne działanie wiązało się z wpływem hamującym wyciągu na jeden z enzymów metabolizujących leki CYP 2E1. Wstępna aplikacja ekstraktu chroniła myszy przed zmianami w składzie chemicznym surowicy i uszkodzeniami DNA oraz zmniejszała apoptozę i nekrozę komórek, potwierdzoną z kolei w badaniu histopatologicznym. Ponadto zastosowanie ekstraktu GSPE znacznie zmniejszało indukowane przez TNF- $\alpha$  przyleganie limfocytów T do śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC (ang. *human umbilical vein endothelial cell*), wynikające z hamowania ekspresji cząstki adhezyjnej 1 komórek naczyńniczych VCAM-1 (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*) uczestniczącej w inicjowaniu procesu zapalnego (8). W innym doświadczeniu przeprowadzonym na myszach C57/BL6 podany dożołądkowo wyciąg GSPE (500 mg/kg) 30 minut przed cisplatyną (20 mg/kg) i ponownie po 72 godzinach, w porównaniu z grupą kontrolną, znacznie zmniejszał stężenie mocznika i kreatyninę, zmiany tkankowe w nerkach oraz ekspresję: białka 78 kDa regulowanego glukozą GRP78 (ang. *glucose-regulated protein 78 kDa*), kinazy białkowej retikulum endoplazmatycznego p-ERK (ang. *protein kinase RNA-like ER kinase*) i kaspazy-12, białek uczestniczących w apoptozie wywołanej stresem siateczki śródplazmatycznej (9).

Wykazano, że właściwości antyoksydacyjne przejawiające się zmniejszeniem ilości aldehydu malonowego oraz zwiększeniem poziomu glutationu i dysmutazy nadtlenkowej w nerkach u myszy zależały od dawki proantocyjanidyn. Obserwowano ponadto obniżenie podwyższonego stężenia mocznika, kreatyniny i IL-6 (interleukiny 6) (10).

Nefrotoksyczne działanie cisplatyny może minimalizować spożywanie wyciągu z nasion winorośli, a także oleju rybiego bogatego w kwasy omega-3. Efektywność wyciągu z nasion winorośli GSPE w dawce dziennej 100 mg/kg m.c. lub 5 ml/kg m.c. oleju rybiego FO (ang. *fish oil*), stosowanych u szczurów przez 6 tygodni, wynikała ze zmian w cyklu komórkowym: osłabienia apoptozy manifestującej się zmniejszeniem ekspresji kaspazy-3 i zwiększeniem ekspresji *bcl-2* oraz regeneracją uszkodzeń histopatologicznych w nerkach spowodowanych intoksykacją cisplatyną w dawce 7 mg/kg m.c. (11).

Przedmiotem badań nad właściwościami nefroprotekcijnymi związków aktywnych obecnych w winorośli były stilbenoidy: resweratrol (3,5,4'-trihydroksy-trans-stilben) i polidatyna (3- $\beta$ -mono-D-glukozyd 3,4',5-trihydroksystilbenu). Stilbenoidy te są rozpowszechnione w świecie roślin. Oprócz owoców winorośli występują w korzeniach rdestowca ostrokończystego, owocach jagodowych, morwie, malinach, truskawkach, żurawinie, orzeszkach ziemnych i czekoladzie. Resweratrol w badaniu *in vitro* zmniejszał cytotoksyczność cisplatyny i stres oksydacyjny. Trzydziestominutowa preinkubacja komórek pozyskanych ze szczurzych wycinków części rdzeniowej nerek z resweratrolem (30  $\mu$ g/ml) zmniejszała nadmierny wpływ dehydrogenazy mleczanowej, będącej wskaźnikiem integralności błony komórkowej, który pojawił się po 120-minutowej inkubacji z cisplatyną (75, 150  $\mu$ g/ml). Resweratrol ograniczał peroksydację lipidów, spadek aktywności peroksydazy glutationu i dysmutazy nadtlenkowej. Nie przywracał natomiast poziomu glutationu ani nie zmieniał ilości cytokiny prozapalnej TNF- $\alpha$ . Trzydziestominutowa inkubacja z resweratrolem zmniejszyła także rozmiary stresu oksydacyjnego, przejawiające się redukcją jego wskaźników, takich jak: karbonylacja białek i powstawanie adduktów z 4-hydroksynoonenalem. Ponadto ustalono, że zdolności nefroprotekcjne resweratrolu nie wynikają z pozakomórkowego tworzenia kompleksu z cisplatyną (12). Resweratrol łagodził zmiany strukturalne i funkcjonalne nerek, wychwytyjąc wolne rodniki i hamując rozwój procesu zapalnego. Po profilaktycznie podanym resweratrolem (25 mg/kg m.c.; i.p.) szczurom Male Wistar zmiany wywołane cisplatyną (5 mg/kg m.c.; i.p.), m.in. ostrą martwicą kanalików nerkowych,

wzrost makrofagów/monocytów i T-limfocytów w warstwie korowej i rdzennej nerki, były mniejsze w porównaniu z grupą kontrolną. Wskaźniki uszkodzenia nerek, poziom kreatyniny i białkomocz zostały zredukowane, a wzrost peroksydacji lipidów i zubożenie glutationu w tkankach uległy osłabieniu (13).

Polidatyna – glukozyd resweratrolu (3-β-glukozyd 3,4',5-trihydroksystilbenu) – jest m.in. składnikiem aktywnym ekstraktu otrzymanego z wysuszonych korzeni rdestowca ostrokończystego *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc., stosowanego w dolegliwościach nerkowych, takich jak: ostre uszkodzenie nerek, nefropatia cukrzycowa, nefropatia toczeniowa i hiperurykemia. Uczonych zainteresował fakt, że obie substancje: polidatyna i resweratrol mogą hamować proces ferroptozy przyczyniającej się do śmierci komórki, co może mieć kluczowe znaczenie w uszkodzeniach niedokrwiennych różnych narządów, w tym nerek. W jednym z doświadczeń wykazano nefroprotektoryjny wpływ polidatyny w ostrym uszkodzeniu nerek wywołanym przez cisplatynę, którego przebieg związany był ze stresem oksydacyjnym, ferroptozą, regulowaniem systemu Xc, wytwarzaniem glutationu i oddziaływaniem na metabolizm żelaza. Wpływ hamujący polidatyny na ferroptozę widoczny był zarówno w komórkach nerek HK-2 traktowanych cisplatyną (20 μM), jak i u myszy, u których ostre uszkodzenie narządu wywołano dootrzewnowym wstrzyknięciem cisplatyny (20 mg/kg). Korzystne działanie polidatyny charakteryzowało się powstrzymaniem intensywnej akumulacji wolnego żelaza w komórce i generowania wolnych rodników, zmniejszeniem zawartości aldehydu malonowego i utraty glutationu oraz wzrostem aktywności peroksydazy glutationowej. Zaobserwowany efekt korelował z dawką polidatyny, która redukowała śmierć komórek na drodze ferroptozy prowokowanej przez erastynę (10 μM). W przypadku dawki 40 μM efekt nefroprotektoryjny był bardziej widoczny niż dla typowych inhibitorów ferroptozy: ferostatyny-1 (1 μM) i deferoksaminy (100 μM) (14).

Nefroprotektoryjne działanie polidatyny zademonstrowano także w modelu nefropatii moczanowej, w której istotną rolę odgrywały: stres oksydacyjny, aktywacja czynnika NF-κB i proces zapalny. Polidatyna hamowała w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* aktywność oksydazy ksantynowej uczestniczącej w powstawaniu kwasu moczowego i zmniejszała jego poziom w osoczu. Ponadto zwrócono uwagę na znaczną poprawę czynności nerek u myszy w nefropatii moczanowej wywołanej fruktozą oraz na nieznaczące działanie toksyczne badanej substancji. Korzystny wpływ polidatyny na nerki wiązał się z istotnym łagodzeniem stresu oksydacyjnego i stanu

zapalnego w odpowiedzi na zaburzoną równowagę redoks. Dochodziło do zmniejszenia ekspresji NF-κB p65, COX-2 i iNOS oraz do zahamowania produkcji TNF-α, PGE2 i IL-1β (15).

Polidatyna wykazuje także działanie nefroprotektoryjne, regulując szlak sygnałowy *Sonic Hedgehog* (SHH). W zespole poreperfuzyjnym nerek dochodzi do nasilenia sekrecji białka SHH, białek transbłonowych *Patched* i *Smoothened*, zwiększenia translokacji czynników transkrypcyjnych do jądra komórkowego, a następnie do transkrypcji genów gładki wielopostaciowego. Zastosowanie polidatyny podtrzymuje aktywację ścieżki SHH, która przejawia się efektem nefroprotektoryjnym wynikającym z działania antyoksydacyjnego i antyapoptotycznego. Ponadto w doświadczeniu pokazano, że zarówno cyklopamina, specyficzny inhibitor białka *Smoothened*, jak również związek 5E1, przeciwciała dla białka SHH, znacznie hamowały aktywację ścieżki sygnalizacyjnej *Sonic Hedgehog* oraz wyraźnie zmniejszały potencjał nefroprotektoryjny polidatyny (16).

### Nefroprotektoryjne działanie ekstraktów z kłącza ostryżu długiego, ostryżu czarnego oraz tetrahydrokurkuminy

Kłącze ostryżu długiego – kurkuma (*Curcuma longa rhizoma* L.) – jest tradycyjnie stosowany w leczeniu różnych dolegliwości i zaburzeń metabolicznych. Składnikami aktywnymi kłącza ostryżu długiego są kurkumina i tetrahydrokurkumina, która jest aktywnym metabolitem kurkuminy powstającym w przewodzie pokarmowym o silniejszym działaniu antyoksydacyjnym. Tetrahydrokurkumina wyraźnie przeciwdziałała *in vitro* uszkodzeniom komórek (żywność) kanalików nerkowych LLC-PK1 wywołanym doświadczalnie cisplatyną. Działanie ochronne zaobserwowano także w badaniu na zwierzętach, u których cisplatyną indukowano oksydacyjne zmiany w nerkach. Tetrahydrokurkuminy podawano szczurom doustnie codziennie przez 10 dni w dawce 80 mg/kg m.c., a jedyną dawkę cisplatyny zaaplikowano dootrzewnowo (7,5 mg/kg m.c.) w 4. dniu badania. U zwierząt, którym dawano antyoksydant, wskaźnik zaburzenia czynności nerek (klirens kreatyniny) uległ znacznej poprawie. Mechanizm działania ochronnego tetrahydrokurkuminy wynikał z hamowania aktywności cyklooksygenazy-2 i kaspazy-3, uczestniczących w rozwoju stanu zapalnego i apoptozie. Obecnie rozważa się zastosowanie tetrahydrokurkuminy w roli protektora nerkowego zarówno podczas, jak i po chemioterapii (17).

Wyciąg metanolowy z kłącza ostryżu czarnego *Curcuma caesia* Roxb. (MECC) (*methanolic extract of*

*the rhizome of Curcuma caesia* Roxb.) charakteryzuje się potencjałem antyoksydacyjnym i antygenotoksycznym. Wychwytuje wolne rodniki: ABTS (+) i anion ponadtlenkowy O<sub>2</sub>(-) oraz zmniejsza uszkodzenia chromosomalne, takie jak powstawanie mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych. Działanie hepatoprotekcyjne wyciągu zaobserwowano w 7-dniowym badaniu, w którym myszom wstrzykiwano dootrzewnowo cyklofosfamid w dawce 50 mg/kg m.c. oraz 2 godziny wcześniej wyciąg MECC w stężeniach: 100, 250 i 500 mg/kg m.c. (dootrzewnowo). W porównaniu z grupami kontrolnymi ekstrakt zmniejszał podwyższone poziomy aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej w surowicy, stopień peroksydacji (poziom aldehydu malonowego) lipidów błon hepatocytów i nefrocytów, a także zwiększał poziom endogennych antyoksydantów: glutationu i reduktazy glutationowej w wątrobie i nerkach (18).

### Nefroprotekcjne działanie ekstraktów z korzenia żeń-szenia i wybranych ginsenozydów

Korzeń żeń-szenia (*Panax ginseng radix* C. A. Mey.) jest jednym z lepiej poznanych surowców roślinnych na świecie, kojarzonym przede wszystkim z działaniem adaptogennym (wspomagającym homeostazę organizmu), wzmacniającym i immunostymulującym. W różnych rejonach świata stosowany jest także w chorobach nerek. Działanie nefroprotekcjne zależy od obecności związków aktywnych, głównie fenolokwasów i flawonoidów wpływających na przepływ nerkowy i usuwanie wolnych rodników (19, 20). W odniesieniu do działania ochronnego zapobiegającego skutkom ubocznym działania cisplatyny badane były wyciągi z korzenia żeń-szenia i jego związki czynne – ginsenozydy.

Efekt ochronny korzenia żeń-szenia (100 mg/kg m.c.) polegał na zmniejszeniu stresu oksydacyjnego i łagodzeniu spadku aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy nadtlenkowej, peroksydazy glutationowej, transferazy glutationu, katalazy oraz poziomu glutationu. U szczurów zaobserwowano także poprawę parametrów biochemicznych i zmian histologicznych oraz zmniejszenie uszkodzeń DNA, ekspresji TNF- $\alpha$ , IL-6 i białka p53 (21). Zastosowany 72 godziny przed cisplatyną (6 mg/kg) pseudoginsenozyd F11 (10 mg/kg/dobę przez 9 dni) zmniejszał podwyższony poziom mocznika i kreatyniny, uszkodzenia histopatologiczne oraz aktywację p53, poziom wolnych rodników i związaną z tym apoptozę komórek kanalików nerkowych, a także wpływał na proporcję Bax/Bcl-2. Pseudoginsenozyd F11, łagodząc nefrotoksyczny profil cisplatyny, nie zmniejszał jej działania

przeciwnowotworowego na wszczepionych myszom komórkach czerniaka i nowotworu płuc Lewisa (22).

Znana jest rola kinaz białkowych MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*) w inicjowaniu ostrych i przewlekłych chorób nerek w warunkach stanu zapalnego lub apoptozy komórek spowodowanej uszkodzeniami DNA i stresem oksydacyjnym. Cisplatyna podwyższała poziom: ufosforylowanej kinazy JNK, białka p53 i rozszczepionej kaspazy-3. Fermentowany wyciąg z korzenia żeń-szenia FBG (ang. *fermented black ginseng*) i jeden ze związków czynnych ginsenozyd 20(S)-Rg3 łagodziły działanie toksyczne cisplatyny w komórkach nabłonka nerek świni LLC-PK1 przez hamowanie ścieżki sygnalizacyjnej JNK-p53-kaspaza-3. Wyciąg FBG (500  $\mu$ g/ml) i ginsenozyd 20(S)-Rg3 (250  $\mu$ g/ml) w znaczny sposób przywracały zredukowaną w 60% przez cisplatynę żywotność komórek w sposób zależny od dawki. Ekstrakt FBG zawierał ginsenozydy: Rg2 (2,86  $\mu$ g/ml), Rg3 (24,52  $\mu$ g/ml), Rh1 (12,62  $\mu$ g/ml), Rh2 (0,63  $\mu$ g/ml) i Rf (1,32  $\mu$ g/ml), które powstały w wyniku konwersji pierwotnych saponozydów podczas obróbki termicznej (19).

Uszkodzenia komórek nabłonkowych nerki LLC-PK1 przez cisplatynę znacznie zmniejszał otrzymany przez ekstrakcję wspomaganą mikrofalami wyciąg z korzenia żeń-szenia MG (ang. *microwave-processed ginseng*). Podczas przetwarzania powstały aktywne ginsenozydy: Rg3, Rg5 i Rk1, które przywróciły zmniejszoną przez cisplatynę ekspresję białek: p53 i kinazy JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinase*) w komórkach LLC-PK1 i znacznie redukowały (najbardziej Rg3) nasiloną ekspresję rozszczepionej kaspazy-3. Ekstrakt MG wykazywał również działanie nefroprotekcjne u myszy. Ginsenozydy Rg3, Rg5 i Rk1 wpływały na uszkodzenia nerek, uczestnicząc w regulacji stanu zapalnego i apoptozy. Działanie nefroprotekcjne wyciągu MG i jego czynnych ginsenozydów zaobserwowane *in vitro* i *in vivo* zależało od ich właściwości przeciwzapalnych i antyapoptycznych (23).

Autorzy kolejnego badania zaobserwowali na modelach *in vitro* i *in vivo* nefroprotekcjne działanie przetworzonego korzenia żeń-szeń, nazwanego żeń-szeniem słonecznym SG (ang. *Sun ginseng*), o wyższej zawartości ginsenozydów. Surowiec wykazywał silniejszą aktywność biologiczną od żeń-szenia białego, który zmiażdżał wolne rodniki generowane w izolowanych neutrofilach stymulowanych przez cisplatynę, natomiast u szczurów podany profilaktycznie przed dawką cisplatyny zmniejszał poziom stężenia mocznika i kreatyniny w surowicy, utratę masy ciała i poprawiał żywotność zwierząt. Badaniom poddano też ginsenozydy żeń-szenia słonecznego, wyizolowane



z frakcji chlorku metylu wyciągu metanolowego: Rh4 i Rk3, będące izomerami różniącymi się położeniem wiązania podwójnego (C20=C21 i C20=C22), które znacznie i w sposób zależny od dawki zmniejszały nefrotoksyczność w komórkach LLC-PK1. Działanie nefroprotektoryjne korelowało w teście MMT ze wzrostem żywotności komórek przy stężeniach ginsenozydów od 5-20  $\mu\text{g/ml}$  i ze zmniejszeniem przepuszczalności błony komórkowej w badaniu z dehydrogenazą mleczanową, w stężeniach 5 i 5-20  $\mu\text{g/ml}$  odpowiednio dla Rh4 i Rk3 (24).

### Nefroprotektoryjne działanie ekstraktów z korzenia lukrecji i kwasu glicyretynowego

Wyciąg z korzenia lukrecji szeroko stosowany w tradycyjnej medycynie chińskiej otrzymywany jest z wysuszonych surowców niektórych gatunków, jak: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., *G. glabra* L., *G. inflata* Batalin z rodziny bobowatych (*Leguminosae*). Korzeń lukrecji zawdzięcza aktywność saponinom triterpenowym, najważniejszej glicyryzynie i jej aglikonowi kwasowi glicyretynowemu, licznym i specyficznym dla rodzajów flawonoidom i innym związkom aktywnym (25). Lukrecja jest szeroko stosowana w tradycyjnej medycynie, m.in.: w różnych stanach zapalnych, chorobie wrzodowej, hiperlipidemii, chorobach wirusowych, hepatotoksyczności i w kaszlu. Stanowi środek słodzący w produktach spożywczych. Działanie nefroprotektoryjne surowca i jego przetworów zależy od właściwości antyoksydacyjnych związanych z występowaniem flawonoidów.

Wyciąg z korzenia lukrecji znacznie hamował wzrost nowotworu u myszy BALB/C z wszczepionymi komórkami raka jelita grubego CT-26. U myszy leczonych przez 15 dni cisplatyną ekstrakt z lukrecji istotnie zmniejszał nasilony stres oksydacyjny i uszkodzenia narządowe nerek i wątroby, łącznie z poziomem azotu mocznika i kreatyniny w surowicy, aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej. Zastosowanie wyciągu z korzenia lukrecji hamowało skutki uboczne po cisplatynie oraz przywróciło zaburzone funkcje nerek i wątroby do poziomów notowanych w grupie kontrolnej. Badanie pokazało jednak, że pomimo działania nefro- i hepatoprotektoryjnego, wyciąg nie powinien być stosowany u pacjentów leczonych cisplatyną z uwagi na jednoczesny wpływ zmniejszający efektywność terapeutyczną cisplatyny. Badany ekstrakt można postrzegać jako odrębny środek w profilaktyce i leczeniu nowotworów oraz w łagodzeniu działań niepożądanych cytostatyków (26).

W badaniach *in vivo* i *in vitro* wykazano efekt ochronny na nerki jednego z aktywnych składników korzenia

lukrecji gładkiej, kwasu glicyretynowego (18 $\beta$ GA), głównego metabolitu kwasu glicyryzynowego o wielokierunkowej aktywności biologicznej, m.in. nefroprotektoryjnej i przeciwzapalnej. Kwas glicyretynowy w dawkach: 25, 50 i 100 mg/kg zmniejszał uszkodzenia kanalików nerkowych wywołane cisplatyną u myszy BALB/c przez zwiększenie ekspresji Nrf2 i zmniejszenie poziomu NF- $\kappa$ B w nerkach. W ocenie jego wpływu na linie komórkowe HK-2 (komórki nabłonkowe kanalików proksymalnych) i mTEC (komórki nabłonkowe rdzenia grasicy) kwas glicyretynowy (2,5; 5,0; 10,0; 20,0 i 30,0  $\mu\text{M}$ ) redukował podwyższone poziomy KIM-1. Zastosowany w dawkach: 50, 100 i 200 mg/kg u myszy C57BL/6 z ostrym uszkodzeniem nerek wywołanym także cisplatyną zmniejszał apoptozę komórek epitelialnych cewek nerkowych w wyniku zwiększania poziomu białka morfogenetycznego kości BMP-7 i deacetylazy histonowej HDAC2. U szczurów, którym przez 7 dni podawano dożołądkowo kwas glicyretynowy (50 i 100 mg/kg) w celu zmniejszenia nefrotoksycznych objawów po metotreksacie, nastąpiła poprawa wskaźników pracy nerek, peroksydacji lipidów oraz regeneracja systemu antyoksydacyjnego. Suplementacja 18 $\beta$ GA nasilała ekspresję Nrf2 i oksygenazy hemowej-1 mRNA oraz poziom endogennych antyoksydantów w nerkach poddanych działaniu metotreksatu (27).

### Podsumowanie

W pracy przedstawiono wyniki badań opisanych w dostępnym piśmiennictwie wskazujących na działanie nefroprotektoryjne wybranych surowców roślinnych oraz ich głównych aktywnych związków, współodpowiedzialnych za działanie.

W większości prac ocenę działania ochronnego prowadzono na ludzkich komórkach nabłonkowych nerek (HK-2) i komórkach kanalików proksymalnych nerki świni (LLC-PK1) oraz na zwierzętach (szczurach i myszach), stosując jako czynnik nefrotoksyczny najczęściej: cisplatynę, cyklofosfamid, metotreksat i acetaminofen – substancje, których efektem ubocznym jest uszkodzenie nerek.

Efekt nefroprotektoryjny charakteryzował wyciąg z liści zielonej herbaty oraz jego główne aktywne składniki: galusan epigallokatechiny, mieszaninę związków polifenolowych otrzymaną z surowca, a także wyciąg z liści zielonej herbaty w połączeniu z mleczkiem pszczelim. Aktywność protektoryjną wobec nerek udowodniono dla ekstraktów z nasion winorośli, a także soku z owoców oraz dla stilbenoidów: resweratrolu i polidatyny – związków, które są współodpowiedzialne za efekt farmakologiczny tych surowców. Właściwości nefroprotektoryjne wyciągów z kłącza

kurkumy długiej i kurkumy czarnej skorelowane są z działaniem tetrahydrokurkuminy jako metabolitu kurkuminy. Właściwości zapobiegające uszkodzeniom były także domeną różnych wyciągów z korzenia żeń-szenia oraz kilku wyodrębnionych z ekstraktów ginsenozydów. Potencjał ochronny w tym zakresie wykazano także dla ekstraktu z korzenia lukrecji i kwasu glicyretynowego, głównego metabolitu kwasu glicyryzynowego.

Autorzy eksperymentów zwracali uwagę na wpływ badanych ekstraktów i ich substancji czynnych na aktywność

enzymów antyoksydacyjnych i endogennych antyoksydantów, poziom markerów uszkodzenia nerek, czynniki prozapalne, a także na szlaki sygnalizacyjne i ekspresję białek uczestniczących w apoptozie i ferroptozie. Ponadto wykonywano badania histopatologiczne wskazujące na stopień uszkodzenia nerek. Na podstawie analizy dotychczasowych doświadczeń opisanych w cytowanych pracach można wnioskować, że mechanizm działania nefroprotekcijnego badanych wyciągów i ich substancji aktywnych zależy od aktywności antyoksydacyjnej, przeciwzapalnej i antyapoptotycznej.

### Piśmiennictwo

1. Khan SA, Priyamvada S, Khan W i wsp. Studies on the protective effect of green tea against cisplatin induced nephrotoxicity. *Pharmacol Res* 2009; 60(5):382-91.
2. El-Mowafy AM, Al-Gayyar MM, Salem HA i wsp. Novel chemotherapeutic and renal protective effects for the green tea (EGCG): role of oxidative stress and inflammatory-cytokine signaling. *Phytomed* 2010; 17(14):1067-75.
3. El-Mowafy AM, Salem HA, Al-Gayyar MM i wsp. Evaluation of renal protective effects of the green-tea (EGCG) and red grape resveratrol: role of oxidative stress and inflammatory cytokines. *Nat Prod Res* 2011; 25(8):850-6.
4. Khan SA, Priyamvada S, Khan W i wsp. Studies on the protective effect of green tea against cisplatin induced nephrotoxicity. *Pharmacol Res* 2009; 60(5):382-91.
5. Ahn TG, Kim HK, Park SW i wsp. Protective effects of green tea polyphenol against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Obstet Gynecol Sci* 2014; 57(6):464-70.
6. Yapar K, Cavuşoğlu K, Oruç E i wsp. Protective effect of royal jelly and green tea extracts effect against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice: a comparative study. *J Med Food* 2009; 12(5):1136-42.
7. Ko JL, Tsai CH, Liu TC i wsp. Differential effects of grape juice on gastric emptying and renal function from cisplatin-induced acute adverse toxicity. *Hum Exp Toxicol* 2016; 35(8):808-17.
8. Bagchi D, Bagchi M, Stohs S i wsp. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 957:260-70.
9. Gao Z, Liu G, Hu Z i wsp. Grape seed proanthocyanidin extract protects from cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Mol Med Rep* 2014; 9(3):801-7.
10. Sayed AA. Proanthocyanidin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Phytother Res* 2009; 23(12):1738-41.
11. Hassan HA, Edrees GM, El-Gamel EM i wsp. Proanthocyanidin and fish oil potent activity against cisplatin-induced renal cell cycle arrest and apoptosis in rats. *Ren Fail* 2015; 37(8):1356-62.
12. Valentovic MA, Ball JG, Brown JM i wsp. Resveratrol attenuates cisplatin renal cortical cytotoxicity by modifying oxidative stress. *Toxicol In Vitro* 2014; 28(2):248-57.
13. Do Amaral CL, Francescato HD, Coimbra TM i wsp. Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Arch Toxicol* 2008; 82(6):363-70.
14. Zhou L, Yu P, Wang TT i wsp. Polydatin attenuates cisplatin-induced acute kidney injury by inhibiting ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev* 2022; 2022:9947191.
15. Chen L, Lan Z, Lin Q i wsp. Polydatin ameliorates renal injury by attenuating oxidative stress-related inflammatory responses in fructose-induced urate nephropathic mice. *Food Chem Toxicol* 2013:28-35.
16. Meng QH, Liu HB, Wang JB. Polydatin ameliorates renal ischemia/reperfusion injury by decreasing apoptosis and oxidative stress through activating sonic hedgehog signaling pathway. *Food Chem Toxicol* 2016; 96:215-25.
17. Song KI, Park JY, Lee S i wsp. Protective effect of tetrahydrocurcumin against cisplatin-induced renal damage: *in vitro* and *in vivo* studies. *Planta Med* 2015; 81(4):286-91.
18. Devi HP, Mazumder PB. Methanolic extract of *Curcuma caesia* Roxb. Prevents the toxicity caused by cyclophosphamide to bone marrow cells, liver and kidney of mice. *Pharmacognosy Res* 2016; 8(1):43-9.
19. Han MS, Han IH, Lee D i wsp. Beneficial effects of fermented black ginseng and its ginsenoside 20(S)-Rg3 against cisplatin-induced nephrotoxicity in LLC-PK1 cells. *J Ginseng Res* 2016; 40(2):135-40.
20. Qadir MI, Tahir M, Lone KP i wsp. Protective role of ginseng against gentamicin induced changes in kidney of albino mice. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2011; 23:53-7.
21. Yousef MI, Hussien HM. Cisplatin-induced renal toxicity via tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 6, tumor suppressor P53, DNA damage, xanthine oxidase, histological changes, oxidative stress and nitric oxide in rats: protective effect of ginseng. *Food Chem Toxicol* 2015; 78:17-25.
22. Wang H, Kong L, Zhang J i wsp. The pseudoginsenoside F11 ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising its anti-tumor activity *in vivo*. *Sci Rep* 2014; 4:986:4.
23. Park JY, Choi P, Kim T i wsp. Protective effects of processed Ginseng and its active ginsenosides on cisplatin-induced nephrotoxicity: *In vitro* and *in vivo* studies. *J Agric Food Chem* 2015; 63(25):5964-9.
24. Baek SH, Piao XL, Lee UJ i wsp. Reduction of Cisplatin-induced nephrotoxicity by ginsenosides isolated from processed ginseng in cultured renal tubular cells. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(10):2051-5.
25. Antoniuk K, Dudek Makuch M, Bylka W. Lukrecja – czy tylko słodka? Związki chemiczne, aktywność biologiczna. *Post Fitoter* 2020; 3:154-60.



26. Lee CK, Park KK, Lim SS i wsp. Effects of the licorice extract against tumor growth and cisplatin-induced toxicity in a mouse xenograft model of colon cancer. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(11):2191-5.
27. Shinu P, Gupta GL, Sharma M i wsp. Pharmacological features of 18 $\beta$ -Glycyrrhetic acid: A pentacyclic triterpenoid of therapeutic potential. *Plants (Basel)* 2023; 12(5):1086.

**Konflikt interesów**

**Conflict of interest**

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 20.10.2022

zaakceptowano/accepted: 09.11.2022

Adres/address:

\*Katarzyna Antoniak

e-mail: antoniakkatarzyna@wp.pl