

---

TEZĂ DE DOCTORAT

# Aspecte imunologice în patologia aparatului reno-urinar

---

Doctorand **Anamaria Magdalena Tomșa**

---

Conducător de doctorat Prof. dr. **Lia Monica Junie**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

---

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	15
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Injuria renală acută</b>	21
<b>2. Gentamicina și efectul nefrototoxic al acesteia</b>	25
2.1. Proprietăți farmacologice	26
2.1.1. Proprietăți farmacodinamice	26
2.1.2. Proprietăți farmacocinetice	26
2.2. Nefrotoxicitatea gentamicinei	27
<b>3. Stresul oxidativ</b>	29
3.1. Rolul stresului oxidativ în homeostazia renală	30
3.2. Specii reactive implicate în injuria renală acută	30
3.3. Rolul stresului oxidativ în nefrotoxicitatea indusă de gentamicină	32
<b>4. Contracararea stresului oxidativ la nivel renal</b>	33
4.1. Sistemul antioxidant endogen	33
4.2. Substanțe antioxidante exogene	34
4.2.1. Ginkgo biloba	34
4.2.1.1. Proprietăți farmacodinamice	35
4.2.1.2. Proprietăți farmacocinetice	35
4.2.1.3. Studii privind efectul nefroprotector	35
4.2.1.4. Studii privind efectele toxice	36
4.2.2. Curcumina	36
4.2.2.1. Absorbție	37
4.2.2.2. Distribuție	37
4.2.2.3. Metabolizare	38
4.2.2.4. Eliminare	38
4.2.2.5. Toxicitate	38
4.2.2.6. Efect antioxidant	38
4.2.3. Vitamina C	39
4.2.3.1. Proprietăți farmacodinamice	39
4.2.3.2. Proprietăți farmacocinetice	40
4.2.4. N-acetil-L-cisteina	40
4.2.4.1. Proprietăți farmacodinamice	41

4.2.4.2. Proprietăți farmacocinetice	41
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru</b>	47
<b>2. Metodologie generală</b>	49
2.1. Material și metodă	49
2.1.1. Animale de laborator	49
2.1.2. Protocol experimental	49
2.1.3. Evaluarea funcției renale	50
2.1.4. Evaluarea stresului oxidativ	51
2.1.5. Evaluarea statusului antioxidant și antiinflamator	52
2.1.6. Evaluarea inflamației	53
2.1.7. Analiza histologică	54
2.1.8. Analiza statistică	55
2.2. Considerente etice	55
2.3. Finanțare	55
<b>3. Studiul 1 - Curcumina și vitamina C atenuază nefrotoxicitatea indusă de gentamicină prin modularea stresului oxidativ</b>	57
3.1. Introducere	57
3.2. Ipoteza de lucru	58
3.3. Material și metodă	58
3.4. Rezultate	59
3.5. Discuții	73
3.6. Concluzii	77
<b>4. Studiul 2 - Ginkgo biloba în doză mică ameliorează stresul oxidativ la șobolanii cu nefrotoxicitate indusă de gentamicină</b>	79
4.1. Introducere	79
4.2. Ipoteza de lucru	79
4.3. Material și metodă	80
4.4. Rezultate	80
4.5. Discuții	89
4.6. Concluzii	91
<b>5. Studiul 3 - Modularea stresului oxidativ de către N-acetilcisteină într-un model experimental de nefrotoxicitate indusă de gentamicină</b>	93
5.1. Introducere	93
5.2. Ipoteza de lucru	93
5.3. Material și metodă	94

5.4. Rezultate	94
5.5. Discuții	103
5.6. Concluzii	105
<b>6. Studiul 4 - Peroxidarea lipidelor într-un model de nefrotoxicitate indusă de gentamicină la șobolani de laborator</b>	107
6.1. Introducere	107
6.2. Ipoteza de lucru	107
6.3. Material și metodă	108
6.4. Rezultate	108
6.5. Discuții	111
6.6. Concluzii	114
<b>7. Concluzii generale</b>	115
<b>8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	117
<b>REFERINȚE</b>	119

**Cuvinte cheie:** injurie renală acută, gentamicină, nefrotoxicitate, stres oxidativ, peroxidare lipidică, curcumină, vitamina C, N-acetilcisteină, Ginkgo biloba

## INTRODUCERE

Injuria renală acută (IRA) reprezintă un sindrom clinic întâlnit relativ frecvent în practica clinică, pentru depistarea căruia e nevoie de determinarea în dinamică a valorilor creatininei serice, ceea ce adeseori întârzie stabilirea diagnosticului. Instalarea IRA este asociată cu creșterea morbidității și mortalității, inclusiv cu dezvoltarea bolii renale cronice (BRC), ceea ce impune descoperirea și implementarea unor noi biomarkeri care să detecteze cât mai precoce suferința renală pentru ca aceasta să poată fi contracarată.

Printre cauzele care stau la baza apariției IRA se numără și utilizarea medicamentelor cu potențial nefrototoxic, cum ar fi gentamicina. Astfel, ne-am propus să cercetăm mecanismul prin care apare nefrotoxicitatea indusă de gentamicină, să studiem rolul stresului oxidativ în apariția acestui efect advers, să căutăm anumiți compuși rezultați din procesele de oxidare care ar putea juca rolul de biomarkeri ai injuriei renale precoce. În plus, am dorit să evaluăm dacă suplimentarea orală cu anumiți compuși (vitamina C, N-acetilcisteina, curcumina, Ginkgo biloba) ar putea proteja țesutul renal împotriva efectului nefrototoxic al gentamicinei.

Lucrarea de față cuprinde cele patru studii experimentale efectuate cu ajutorul șobolanilor de laborator cărora le-am injectat gentamicină pentru a induce injurie renală și cărora le-am administrat pe cale orală compușii menționați anterior, iar

ulterior le-am determinat funcția renală, statusul oxidant, antioxidant și antiinflamator. Rezultatele determinărilor serologice au fost corelate cu aspectul histopatologic al țesutului renal prelevat post-mortem.

Prin investigarea efectului acestor compuși asupra markerilor de stres oxidativ și funcției renale, am dorit să validăm potențialul lor de a proteja rinichii de leziuni încă din stadiile inițiale ale injuriei. Astfel, cercetarea noastră nu doar că aduce contribuții valoroase în înțelegerea mecanismelor din spatele injuriei renale, dar oferă și soluții practice și accesibile pentru prevenirea acestora în contextul clinic.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

În acest capitol am prezentat cele patru studii efectuate. Toate studiile au fost realizate în conformitate cu Declarația de la Helsinki și a fost aprobat de către Comitetul de Etică al Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca (autorizație 193/18.05.2020) și de către Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor (autorizare 225/22.06.2020), în conformitate cu legislația națională în vigoare.

Lucrarea de față a dus la publicarea a trei articole ISI cu FI.

### **Studiu 1. Curcumina și vitamina C atenuază nefrotoxicitatea indusă de gentamicină prin modularea stresului oxidativ**

**Obiective:** Ne-am propus să determinăm dacă curcumina și vitamina C au efecte nefroprotectoare și dacă anumite specii reactive ar putea fi utilizate ca markeri ai nefrotoxicității timpurii a gentamicinei.

**Material și metodă:** Șobolanii masculi adulți Wistar au fost distribuiți uniform în patru loturi: control, gentamicină, curcumină și gentamicină, vitamina C și gentamicină (gentamicină: 60 mg/kg/zi, intraperitoneal, 7 zile). Am determinat funcția renală (uree, creatinină), markerii de stres oxidativ (malondialdehidă, oxid nitric, 3-nitrotirozină, stres oxidativ total) și statusul antioxidant și antiinflamator (tioli, capacitate antioxidantă totală, interleukină-10). Am efectuat examinarea histologică a țesutului renal prelevat post-mortem.

**Rezultate:** Nefrotoxicitatea a fost indusă cu succes, după cum au arătat nivelurile crescute ale creatininei în lotul gentamicină. Suplimentarea cu curcumină și vitamina C a prevenit creșterea nivelului seric de uree în timp ce a scăzut nivelul total de stres oxidativ în comparație cu lotul gentamicină. În plus, vitamina C și curcumina au acționat în mod diferit asupra oxidului nitric și a malondialdehidei. Analiza histologică a țesutului

renal a arătat leziuni mai discrete la șobolanii care au primit vitamina C în comparație cu lotul curcumină.

**Concluzii:** Atât curcumina, cât și vitamina C posedă proprietăți nefroprotectoare, prin combaterea stresului oxidativ. Malondialdehida și oxidul nitric ar putea fi utilizați ca markeri ai injuriei renale precoce.

## **Studiu 2. Ginkgo biloba în doză mică ameliorează stresul oxidativ la șobolanii cu nefrotoxicitate indusă de gentamicină**

**Obiective:** Ne-am propus să determinăm în mod experimental dacă Ginkgo biloba posedă efecte nefroprotectoare prin analizarea inter-relației dintre stresul oxidativ sistemic și statusul antioxidant și antiinflamator utilizând un model experimental de nefrotoxicitate indusă de gentamicină la șobolani de laborator.

**Material și metodă:** Șobolanii masculi adulți Wistar au fost distribuiți uniform în trei loturi: control, gentamicină, Ginkgo biloba și gentamicină (gentamicină 60 mg/kg/zi, intraperitoneal; Ginkgo biloba 20 mg/kg/zi, oral). Am determinat funcția renală (uree, creatinină), markerii de stres oxidativ (malondialdehidă, oxid nitric, 3-nitrotirozină, stres oxidativ total) și statusul antioxidant și antiinflamator (tioli, capacitate antioxidantă totală, interleukină-10). Am efectuat examinarea histologică a țesutului renal prelevat post-mortem.

**Rezultate:** Administrarea gentamicinei a dus la creșterea markerilor de retenție azotată. Lotul Ginkgo biloba a înregistrat o creștere semnificativ mai mică a ureei și malondialdehidei comparativ cu lotul gentamicină. Stresul oxidativ total a fost semnificativ mai mic comparativ cu lotul gentamicină. Scorul histologic total al leziunilor renale a fost semnificativ redus comparativ cu lotul gentamicină.

**Concluzii:** Ginkgo biloba a atenuat nefrotoxicitatea indusă de gentamicină prin reducerea stresului oxidativ total și neutralizarea malondialdehidei.

## **Studiu 3. Modularea stresului oxidativ de către N-acetilcisteină într-un model experimental de nefrotoxicitate indusă de gentamicină**

**Obiective:** Ne-am propus să evaluăm efectele N-acetilcisteinei (NAC) prin prisma administrării acesteia ca tratament adjuvant la animale de laborator expuse la gentamicină prin evaluarea funcției renale, a markerilor de stres oxidativ și a nivelului seric de antioxidanți, precum și a markerilor de inflamație și nivelului seric al interleukinelor antiinflamatorii.

**Material și metodă:** Șobolanii masculi adulți Wistar au fost distribuiți uniform în trei loturi: control, gentamicină, N-acetilcisteină și gentamicină (gentamicină 60 mg/kg/zi,

intraperitoneal; NAC 150 mg/kg/zi, oral). Am determinat funcția renală (uree, creatinină), markerii de stres oxidativ (malondialdehidă, oxid nitric, 3-nitrotirozină, stres oxidativ total) și statusul antioxidant și antiinflamator (tioli, capacitate antioxidantă totală, interleukină-10). Am efectuat examinarea histologică a rinichilor prelevați post-mortem.

**Rezultate:** Administrarea gentamicinei a dus la deteriorarea funcției renale, dar suplimentarea cu NAC a ameliorat impactul asupra funcției renale așa cum arată valoarea ureei serice. În plus, NAC a menținut valorile serice ale oxidului nitric, malondialdehidei și a capacității antioxidante totale la valori similare cu cele ale lotului control. Stresul oxidativ total a fost semnificativ mai mic în lotul NAC comparativ cu lotul gentamicină. Nu s-au observat diferențe semnificative statistic între scorurile histologice ale leziunilor renale.

**Concluzii:** Suplimentarea orală cu N-acetilcisteină a prevenit creșterea marcată a nivelului seric de produși de retenție azotată și a menținut nivelul seric de stres oxidativ total la valori similare cu ale lotului control. Mai mult decât atât, a contracarat stresul oxidativ acționând asupra oxidului nitric și malondialdehidei. Rezultatele noastre sugerează că atât oxidul nitric, cât și malondialdehida ar putea fi utile în detecția precoce a nefrotoxicității induse de gentamicină.

#### **Studiu 4. Peroxidarea lipidelor într-un model de nefrotoxicitate indusă de gentamicină la șobolani de laborator**

**Obiective:** Ne-am propus să definim în mod experimental relația dintre afectarea renală incipientă, stresul oxidativ sistemic și statusul antioxidant, dar și să identificăm markeri ai stresului oxidativ care ar putea fi utilizați ulterior pentru a descoperi cât mai precoce leziunile renale.

**Material și metodă:** Șobolanii masculi adulți Wistar au fost distribuiți uniform în două loturi: control, gentamicină (gentamicină: 60 mg/kg/zi, intraperitoneal, 7 zile). Am determinat funcția renală (uree, creatinină), markerii de stres oxidativ (malondialdehidă, oxid nitric, 3-nitrotirozină, stres oxidativ total) și statusul antioxidant și antiinflamator (tioli, capacitate antioxidantă totală, interleukină-10).

**Rezultate:** Inducerea nefrotoxicității a fost confirmată de creșterea ureei și creatininei serice, precum și de scăderea diurezei. Animalele expuse la gentamicină au avut valori semnificativ mai crescute ale oxidului nitric, malondialdehidei, stresului oxidativ total și indicelui de stres oxidativ, precum și valori semnificativ mai reduse ale capacității antioxidante totale.

**Concluzii:** Echilibrul oxidanți-antioxidanți este afectat în favoarea stresului oxidativ în injuria renală indusă de gentamicină, în care un rol crucial îl joacă peroxidarea lipidelor. Astfel, malondialdehida, dar și oxidul nitric ar putea fi utilizate ca markeri precoce ai

afectării renale atunci când modificările creatininei serice nu sunt încă pe deplin relevante.

## Concluzii generale

Coroborând rezultatele obținute în urma acestor studii, putem formula următoarele concluzii:

1. Stresul oxidativ joacă un rol important în patogeneza nefrotoxicității induse de gentamicină, iar afectarea renală ar putea fi depistată mult mai precoce comparativ cu metodele actuale prin monitorizarea variațiilor serice ale malondialdehidei și oxidului nitric.
2. Vitamina C și curcumina au demonstrat efect antioxidant, evidențiat prin modularea unor specii reactive diferite. Ambii compuși au avut rezultate favorabile în ceea ce privește ameliorarea funcției renale, ceea ce le demonstrează efectul nefroprotector.
3. Ginkgo biloba s-a dovedit a fi eficientă în protejarea rinichilor de efectul nefrotoxic al gentamicinei prin reducerea stresului oxidativ total, neutralizarea malondialdehidei și păstrarea diurezei.
4. N-acetilcisteina administrată pe cale orală a protejat funcția renală la animalele expuse la gentamicină prin combaterea stresului oxidativ.
5. Efectul nefrotoxic al gentamicinei ar putea fi prevenit cu ajutorul unor terapii adjuvante bazate pe suplimentarea orală cu anumiți produși derivați din compuși naturali, accesibili și ieftini: curcumina, vitamina C, Ginkgo biloba, N-acetilcisteina.

## Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

În pofida redutabilelor efecte adverse precum ototoxicitatea și nefrotoxicitatea, gentamicina rămâne un antibiotic frecvent utilizat mai ales în tratamentul infecțiilor severe cu bacterii Gram-negative, încă din primele zile de viață. Practica clinică standard continuă să se bazeze pe determinarea valorilor creatininei serice și a diurezei, în pofida numeroaselor cercetări desfășurate pentru definirea unor noi biomarkeri de injurie renală.

Unul dintre obiectivele principale ale acestei cercetări a fost evaluarea stresului oxidativ în nefrotoxicitatea indusă de gentamicină, alături de evaluarea statusului antioxidant și antiinflamator în acest context. Astfel, câștigând o mai bună înțelegere a



mecanismelor patogenice, am putut demonstra că există variații semnificative în ceea ce privește stresul oxidativ, cu precădere a oxidului nitric și malondialdehidei. Detecția acestor markeri în serul animalelor de laborator și nu în omogenatul obținut din țesutul renal reprezintă un punct forte al studiului nostru, spre deosebire de alte studii similare. Comparativ cu alte studii similare, am utilizat o doză mică de gentamicină și am cauzat o suferință renală ușoară, fără a induce injurie renală acută stadiul I, evitând astfel reacțiile sistemice care ar putea influența rezultatele. Astfel, rezultatele obținute sugerează că oxidul nitric și malondialdehida ar putea reprezenta biomarkeri pentru diagnosticul precoce al suferinței renale.

Originalitatea studiului constă în corelarea markerilor de stres oxidativ și de inflamație cu statusul antioxidant și antiinflamator în contextul nefrotoxicității induse de gentamicină concomitent cu administrarea diferitelor terapii adjuvante. Astfel, am reușit nu doar să demonstrăm că vitamina C, curcumina, Ginkgo biloba și N-acetilcisteina au efect nefroprotector, ci am demonstrat și că acesta se obține prin modularea stresului oxidativ și a speciilor reactive. Din cunoștințele noastre, acesta este primul studiu care compară modurile de acțiune ale acestor compuși în contextul evaluării efectului nefroprotector.

---

PhD THESIS

# Immunological aspects in the pathology of the reno-urinary system

---

PhD Student **Anamaria Magdalena Tomşa**

---

Scientific Supervisor Prof. dr. **Lia Monica Junie**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	15
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Acute kidney injury</b>	21
<b>2. Gentamicin and its nephrotoxic effect</b>	25
2.1. Pharmacological properties	26
2.1.1. Pharmacodynamic properties	26
2.1.2. Pharmacokinetic properties	26
2.2. Gentamicin nephrotoxicity	27
<b>3. Oxidative stress</b>	29
3.1. The role of oxidative stress in renal homeostasis	30
3.2. Reactive species involved in acute kidney injury	30
3.3. Role of oxidative stress in gentamicin-induced nephrotoxicity	32
<b>4. Counteracting oxidative stress at the renal level</b>	33
4.1. Endogenous antioxidant system	33
4.2. Exogenous antioxidant substances	34
4.2.1. Ginkgo biloba	34
4.2.1.1. Pharmacodynamic properties	35
4.2.1.2. Pharmacokinetic properties	35
4.2.1.3. Studies on the nephroprotective effect	35
4.2.1.4. Studies on the toxic effects	36
4.2.2. Curcumin	36
4.2.2.1. Absorption	37
4.2.2.2. Distribution	37
4.2.2.3. Metabolization	38
4.2.2.4. Elimination	38
4.2.2.5. Toxicity	38
4.2.2.6. Antioxidant effect	38
4.2.3. Vitamin C	39
4.2.3.1. Pharmacodynamic properties	39
4.2.3.2. Pharmacokinetic properties	40
4.2.4. N-acetyl-L-cysteine	40

4.2.4.1. Pharmacodynamic properties	41
4.2.4.2. Pharmacokinetic properties	41
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Working hypothesis</b>	47
<b>2. General methodology</b>	49
2.1. Material and method	49
2.1.1. Laboratory animals	49
2.1.2. Experimental protocol	49
2.1.3. Assessment of renal function	50
2.1.4. Assessment of oxidative stress	51
2.1.5. Assessment of antioxidant and anti-inflammatory status	52
2.1.6. Assessment of inflammation	53
2.1.7. Histological analysis	54
2.1.8. Statistical analysis	55
2.2. Ethical considerations	55
2.3. Financing	55
<b>3. Study 1 - Curcumin and vitamin C attenuate gentamicin-induced nephrotoxicity by modulating oxidative stress</b>	57
3.1. Introduction	57
3.2. Working hypothesis	58
3.3. Material and method	58
3.4. Results	59
3.5. Discussions	73
3.6. Conclusions	77
<b>4. Study 2 - Low-dose Ginkgo biloba ameliorates oxidative stress in rats with gentamicin-induced nephrotoxicity</b>	79
4.1. Introduction	79
4.2. Working hypothesis	79
4.3. Material and method	80
4.4. Results	80
4.5. Discussions	89
4.6. Conclusions	91
<b>5. Study 3 - Modulation of oxidative stress by N-acetylcysteine in an experimental model of gentamicin-induced nephrotoxicity</b>	93
5.1. Introduction	93
5.2. Working hypothesis	93
5.3. Material and method	94
5.4. Results	94

5.5. Discussions	103
5.6. Conclusions	105
<b>6. Study 4 - Lipid peroxidation in a rat model of gentamicin-induced nephrotoxicity</b>	107
6.1. Introduction	107
6.2. Working hypothesis	107
6.3. Material and method	108
6.4. Results	108
6.5. Discussions	111
6.6. Conclusions	114
<b>7. General conclusions</b>	115
<b>8. The originality and innovative contributions of the thesis</b>	117
<b>REFERENCES</b>	119

**Key words:** acute kidney injury, gentamicin, nephrotoxicity, oxidative stress, lipid peroxidation, curcumin, vitamin C, N-acetylcysteine, Ginkgo biloba

## INTRODUCTION

Acute kidney injury (AKI) is a clinical syndrome encountered relatively frequently in clinical practice, for the detection of which dynamic determination of serum creatinine values is needed, which often delays the establishment of the diagnosis. The installation of AKI is associated with increased morbidity and mortality, including the development of chronic kidney disease, therefore, the discovery and implementation of new biomarkers to detect renal distress as early as possible so that it can be counteracted is essential.

Among the underlying causes of AKI is the use of drugs with nephrotoxic potential, such as gentamicin. Thus, we aimed to investigate the mechanism by which gentamicin-induced nephrotoxicity occurs, to study the role of oxidative stress in the occurrence of this adverse effect, to look for certain compounds resulting from oxidation processes that could play the role of biomarkers of early renal injury. In addition, we wanted to evaluate whether oral supplementation with certain compounds (vitamin C, N-acetylcysteine, curcumin, Ginkgo biloba) could protect renal tissue against the nephrotoxic effect of gentamicin.

The present paper comprises the four experimental studies carried out with the help of laboratory rats to which we injected gentamicin to induce renal injury and to which we administered orally the previously mentioned compounds, and subsequently we determined their renal function, oxidant status, antioxidant and anti-inflammatory.

The results of serological determinations were correlated with the histopathological aspect of the renal tissue taken post-mortem.

By investigating the effect of these compounds on markers of oxidative stress and renal function, we wanted to validate their potential to protect the kidney from injury. Thus, our research not only makes valuable contributions to understanding the mechanisms behind renal injury, but also provides practical and affordable solutions for its prevention in the clinical context.

## PERSONAL CONTRIBUTION

In this chapter, we presented the four studies conducted. All studies were carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca (authorization 193/18.05.2020) and by the National Veterinary Sanitary Authority and for Food Safety (authorization 225/22.06.2020), in accordance with current national legislation.

The present research resulted in the publication of three ISI articles.

### **Study 1. Curcumin and vitamin C attenuate gentamicin-induced nephrotoxicity by modulating oxidative stress**

**Objectives:** We aimed to determine if curcumin and vitamin C have nephroprotective effects and if certain reactive species could be used as markers of early gentamicin nephrotoxicity.

**Material and method:** Adult male Wistar rats were evenly distributed into four groups: control, gentamicin, curcumin and gentamicin, vitamin C and gentamicin (gentamicin: 60 mg/kg/day, intraperitoneal, 7 days). We determined renal function (urea, creatinine), markers of oxidative stress (malondialdehyde, nitric oxide, 3-nitrotyrosine, total oxidative stress) and antioxidant and anti-inflammatory status (thiols, total antioxidant capacity, interleukin-10). We performed the histological examination of the renal tissue taken post-mortem.

**Results:** Nephrotoxicity was successfully induced as shown by elevated creatinine levels in the gentamicin group. Curcumin and vitamin C supplementation prevented the increase in serum urea levels while decreasing total oxidative stress levels compared to the gentamicin group. In addition, vitamin C and curcumin acted differently on nitric oxide and malondialdehyde. Histological analysis of kidney tissue showed more discrete lesions in the rats that received vitamin C compared to the curcumin group.

**Conclusions:** Both curcumin and vitamin C possess nephroprotective properties by combating oxidative stress. Malondialdehyde and nitric oxide could be used as markers of early renal injury.

## **Study 2. Low-dose Ginkgo biloba ameliorates oxidative stress in rats with gentamicin-induced nephrotoxicity**

**Objectives:** We aimed to experimentally determine whether Ginkgo biloba possesses nephroprotective effects by analyzing the interrelationship between systemic oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory status using an experimental model of gentamicin-induced nephrotoxicity in laboratory rats.

**Material and method:** Adult male Wistar rats were evenly distributed into three groups: control, gentamicin, Ginkgo biloba and gentamicin (gentamicin 60 mg/kg/day, intraperitoneal; Ginkgo biloba 20 mg/kg/day, oral). We determined renal function (urea, creatinine), markers of oxidative stress (malondialdehyde, nitric oxide, 3-nitrotyrosine, total oxidative stress) and antioxidant and anti-inflammatory status (thiols, total antioxidant capacity, interleukin-10). We performed the histological examination of the renal tissue taken post-mortem.

**Results:** The administration of gentamicin led to an increase in serum levels of urea and creatinine. The Ginkgo biloba group had a significantly lower increase in urea and malondialdehyde compared to the gentamicin group. Total oxidative stress was significantly lower compared to the gentamicin group. The total histological score of renal lesions was significantly reduced compared to the gentamicin group.

**Conclusions:** Ginkgo biloba attenuated gentamicin-induced nephrotoxicity by reducing total oxidative stress and neutralizing malondialdehyde.

## **Studiu 3. Modulation of oxidative stress by N-acetylcysteine in an experimental model of gentamicin-induced nephrotoxicity**

**Objectives:** We aimed to evaluate the effects of N-acetylcysteine (NAC) as an adjunctive treatment in laboratory animals exposed to gentamicin by evaluating renal function, markers of oxidative stress and serum levels of antioxidants, as well as markers of inflammation and serum levels of anti-inflammatory interleukins.

**Material and method:** Adult male Wistar rats were equally distributed into three groups: control, gentamicin, N-acetylcysteine and gentamicin (gentamicin 60 mg/kg/day, intraperitoneal; NAC 150 mg/kg/day, oral). We determined renal function (urea, creatinine), markers of oxidative stress (malondialdehyde, nitric oxide, 3-nitrotyrosine, total oxidative stress) and antioxidant and anti-inflammatory status

(thiols, total antioxidant capacity, interleukin-10). We performed the histological examination of the kidneys taken post-mortem.

**Results:** Administration of gentamicin led to the deterioration of renal function, but supplementation with NAC improved the impact on renal function as shown by the value of serum urea. In addition, NAC maintained the serum levels of nitric oxide, malondialdehyde and total antioxidant capacity to values similar to those of the control group. Total oxidative stress was significantly lower in the NAC group compared to the gentamicin group. No statistically significant differences were observed between histological scores of renal lesions.

**Conclusions:** Oral N-acetylcysteine supplementation prevented marked deterioration of renal function and maintained serum total oxidative stress levels similar to controls. Moreover, it counteracted oxidative stress by acting on nitric oxide and malondialdehyde. Our results suggest that both nitric oxide and malondialdehyde could be useful in the early detection of gentamicin-induced nephrotoxicity.

#### **Studiu 4. Lipid peroxidation in a rat model of gentamicin-induced nephrotoxicity**

**Objectives:** We aimed to experimentally define the relationship between early kidney injury, systemic oxidative stress and antioxidant status, but also to identify markers of oxidative stress that could be used to detect kidney damage as early as possible.

**Material and method:** Adult male Wistar rats were equally divided into two groups: control, gentamicin (gentamicin: 60 mg/kg/day, intraperitoneal, 7 days). We determined renal function (urea, creatinine), markers of oxidative stress (malondialdehyde, nitric oxide, 3-nitrotyrosine, total oxidative stress) and antioxidant and anti-inflammatory status (thiols, total antioxidant capacity, interleukin-10).

**Results:** The induction of nephrotoxicity was confirmed by the increase in serum urea and creatinine, as well as the decrease in diuresis. Animals exposed to gentamicin had significantly higher values of nitric oxide, malondialdehyde, total oxidative stress and oxidative stress index, as well as significantly lower values of total antioxidant capacity.

**Conclusions:** The oxidant-antioxidant balance is impaired in favor of oxidative stress in gentamicin-induced renal injury, in which lipid peroxidation plays a crucial role. Thus, malondialdehyde but also nitric oxide could be used as early markers of renal damage when changes in serum creatinine are not yet fully relevant.



## **General conclusions**

Corroborating the results obtained from these studies, we can formulate the following conclusions:

1. Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of gentamicin-induced nephrotoxicity, and renal damage could be detected much earlier compared to current methods by monitoring serum malondialdehyde and nitric oxide variations.
2. Vitamin C and curcumin have demonstrated antioxidant effect, evidenced by the modulation of different reactive species. Both compounds had favorable results in improving renal function, which demonstrates their nephroprotective effect.
3. Ginkgo biloba has been shown to be effective in protecting the kidney from the nephrotoxic effect of gentamicin by reducing total oxidative stress, neutralizing malondialdehyde and preserving diuresis.
4. Orally administered N-acetylcysteine protected renal function in gentamicin-exposed animals by combating oxidative stress.
5. The nephrotoxic effect of gentamicin could be prevented with the help of adjuvant therapies based on oral supplementation with certain products derived from natural compounds, accessible and inexpensive: curcumin, vitamin C, Ginkgo biloba, N-acetylcysteine.

## **The originality and innovative contributions of the thesis**

Despite adverse effects such as ototoxicity and nephrotoxicity, gentamicin remains a frequently used antibiotic especially in the treatment of severe infections with Gram-negative bacteria. Standard clinical practice continues to rely on determination of serum creatinine and urine output, despite extensive research to define new biomarkers of renal injury.

One of the main objectives of this research was to evaluate oxidative stress in gentamicin-induced nephrotoxicity, along with the evaluation of antioxidant and anti-inflammatory status in this context. Thus, we were able to demonstrate that there are significant variations in terms of oxidative stress, especially the reactive species nitric oxide and malondialdehyde, gaining a better understanding of the pathogenetic mechanisms involved. The detection of these markers in the serum of laboratory animals and not in the homogenate obtained from the kidney tissue represents a strength of our study, in contrast to other similar studies. Compared with other similar

studies, we used a low dose of gentamicin and caused mild renal distress without inducing stage I acute kidney injury, thus avoiding systemic reactions that could influence the results. Thus, the results of the studies suggest that nitric oxide and malondialdehyde could represent biomarkers for the early diagnosis of renal distress.

The originality of the study lies in the correlation of markers of oxidative stress and inflammation with antioxidant and anti-inflammatory status in the context of gentamicin-induced nephrotoxicity simultaneously with the administration of various adjuvant therapies. Thus, we managed not only to demonstrate that vitamin C, curcumin, Ginkgo biloba and N-acetylcysteine have a nephroprotective effect, but we also demonstrated that it is obtained by modulating oxidative stress and reactive species. To our knowledge, this is the first study to compare the modes of action of these compounds in the context of evaluating the nephroprotective effect.