
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Efectele curcuminei în infarctul miocardic indus experimental

Doctorand: **Paul-Mihai Boarescu**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Sorana D. Bolboacă**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINSUL TEZEI

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
1. Infarctul miocardic	5
1.1. Definiție și clasificare	5
1.2. Epidemiologie	6
1.3. Factori de risc	7
1.3.1. Vârsta	7
1.3.2. Sexul	7
1.3.3. Ereditatea	7
1.3.4. Dislipidemia	7
1.3.5. Hipertensiunea arterială	7
1.3.6. Diabetul zaharat	8
1.3.7. Obezitatea	8
1.3.8. Fumatul	8
1.3.9. Sedentarismul	8
1.3.10. Factori psihosociali	8
1.4. Fiziopatologie	8
1.4.1. Rolul stresului oxidativ în patogeneza infarctului miocardic	9
1.4.2. Rolul inflamației în patogeneza infarctului miocardic	10
1.5. Diagnostic	11
1.6. Tratament	13
1.7. Prevenție primară și secundară	14
2. Modele experimentale de infarct miocardic	15
2.2. Infarctul miocardic indus medicamentos	15
2.3. Infarctul miocardic indus chirurgical	16
2.4. Infarctul miocardic indus intervențional	17
3. Modele experimentale de diabet zaharat asociate infarctului miocardic	19
4. Curcumina și efectele acesteia în infarctul miocardic și diabetul zaharat	21
4.1. Activitatea antioxidantă a curcuminei	22
4.2. Activitatea antiinflamatoare a curcuminei	23
4.3. Nanoparticulele de curcumină	25
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	27
1. Scop și obiective	29
2. Metodologie generală	31
2.1. Considerente etice	31
2.2. Condiții de laborator	31
2.3. Substanțe chimice și reactivi	31
2.4. Monitorizarea electrocardiografică	31
2.5. Analize biochimice	32
2.6. Analiza statistică	32
3. Studiu 1. Infarctul miocardic acut: stabilirea parametrilor designului experimental	33
3.1. Introducere	33
3.2. Obiectiv	34
3.3. Material și metodă	34
3.3.1. Modelul experimental	34
3.3.2. Monitorizarea electrocardiografică	34
3.3.3. Recoltarea probelor de sânge și determinări biochimice	34
3.3.4. Examinarea histopatologică	35
3.4. Rezultate	35
3.5. Discuții	37
3.6. Concluzii	38
4. Studiu 2. Efectele curcuminei asupra modificărilor electrocardiografice, tisulare și histopatologie în infarctul miocardic indus experimental	39
4.1. Introducere	39
4.2. Scop și obiective	40
4.3. Material și metodă	40
4.3.1. Gruparea animalelor	40

4.3.2. <i>Inducerea infarctului miocardic acut</i>	41
4.3.3. <i>Monitorizarea electrocardiografică</i>	42
4.3.4. <i>Măsurarea tensiunilor arteriale</i>	42
4.3.5. <i>Probele de sânge și analiza serului</i>	42
4.3.6. <i>Examenul histopatologic</i>	43
4.3.7. <i>Pregătirea omogenatului tisular și evaluarea stresului oxidativ miocardic</i>	43
4.3.8. <i>Analiza statistică</i>	43
4.4. <i>Rezultate</i>	44
4.4.1. <i>Tensiunea arterială sistolică și distolică</i>	44
4.4.2. <i>Monitorizarea electrocardiografică</i>	44
4.4.3. <i>Evaluarea nivelurilor serice ale enzimelor de necroză miocardică</i>	49
4.4.4. <i>Evaluarea parametrilor de stres oxidativ din țesutul miocardic</i>	52
4.4.5. <i>Eficacitatea nanoparticulelor de curcumină și a curcuminei convenționale</i>	56
4.4.6. <i>Modificări histopatologice ale miocardului</i>	58
4.5. <i>Discuții</i>	59
4.5.1. <i>Limite ale studiului și cercetări viitoare</i>	64
4.6. <i>Concluzii</i>	64
5. <i>Studiu 3. Efectele curcuminei asupra modificărilor biologice în infarctul miocardic indus experimental</i>	65
5.1. <i>Introducere</i>	65
5.2. <i>Scop și obiective</i>	66
5.3. <i>Material și metodă</i>	66
5.3.1. <i>Modelul experimental</i>	66
5.3.2. <i>Recoltarea probelor de sânge și analize biochimice</i>	67
5.3.3. <i>Analiza statistică</i>	68
5.4. <i>Rezultate</i>	68
5.4.1. <i>Analize biologice din ser</i>	68
5.4.2. <i>Evaluarea parametrilor serici ai stresului oxidativ</i>	71
5.4.3. <i>Evaluarea nivelurilor serice ale citokinelor pro-inflamatorii</i>	75
5.4.4. <i>Evaluarea nivelurilor serice ale metaloproteinazelor matriceale</i>	80
5.5. <i>Discuții</i>	82
5.6. <i>Concluzii</i>	86
6. <i>Studiu 4. Efectele curcuminei în infarctul miocardic indus experimental la șobolani cu diabet zaharat</i>	89
6.1. <i>Introducere</i>	89
6.2. <i>Scop și obiective</i>	91
6.3. <i>Material și metodă</i>	91
6.3.1. <i>Inducerea diabetului zaharat</i>	91
6.3.2. <i>Inducerea infarctului miocardic acut</i>	91
6.3.3. <i>Administrarea de curcumină și nanoparticule de curcumină</i>	92
6.3.4. <i>Loturile de studiu</i>	92
6.3.5. <i>Monitorizarea electrocardiografică</i>	93
6.3.6. <i>Analize biochimice</i>	94
6.3.7. <i>Analiza statistică</i>	94
6.4. <i>Rezultate</i>	94
6.4.1. <i>Monitorizarea electrocardiografică</i>	95
6.4.2. <i>Nivelurile serice ale glicemiei și ale peptidului C</i>	97
6.4.3. <i>Nivelurile serice ale enzimelor de necroză miocardică</i>	99
6.4.4. <i>Nivelurile serice ale parametrilor stresului oxidativ</i>	102
6.4.5. <i>Nivelurile serice ale citokinei pro-inflamatorii</i>	105
6.5. <i>Discuții</i>	108
6.6. <i>Concluzii</i>	114
7. <i>Concluzii generale</i>	117
8. <i>Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</i>	119
REFERINȚE	121

Cuvinte cheie: infarct miocardic acut, diabet zaharat, curcumină, nanoparticule, stres oxidativ, inflamație.

Lista publicațiilor rezultate în urma tezei de doctorat:

1. Boarescu P-M, Boarescu I, Bocșan IC, Pop RM, Gheban D, Bulboacă AE, Dogaru G, Bolboacă SD. Experimental model of acute myocardial infarction for evaluation of prevention and rehabilitation strategies in cardiovascular diseases – a pilot study. *Balneo Research Journal* 2019;10(3):288-293. ISI fără factor de impact, <http://bioclima.ro/Balneo270.pdf>
2. Boarescu P-M, Boarescu I, Bocșan IC, Pop RM, Gheban D, Bulboacă AE, Nicula C, Râjnoveanu RM, Bolboacă SD. Curcumin Nanoparticles Protect against Isoproterenol Induced Myocardial Infarction by Alleviating Myocardial Tissue Oxidative Stress, Electrocardiogram, and Biological Changes. *Molecules* 2019;24(15):2802. ISI factor de impact-3,060, <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/15/2802>
3. Boarescu P-M, Chirilă I, Bulboacă AE, Bocșan IC, Pop RM, Gheban D, Bolboacă SD. Effects of Curcumin Nanoparticles in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019;2019:Article ID 7847142. ISI cu factor de impact-4,863, <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/7847142/abs/>
4. Boarescu P-M, Boarescu I, Bocșan IC, Gheban D, Bulboacă AE, Nicula C, Pop RM, Râjnoveanu RM, Bolboacă SD. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Curcumin Nanoparticles on Drug-Induced Acute Myocardial Infarction in Diabetic Rats. *Antioxidants* 2019;8(10):504. ISI cu factor de impact-4,52, <https://www.mdpi.com/2076-3921/8/10/504>

INTRODUCERE

Bolile cardiovasculare reprezintă una dintre cele mai importante probleme de sănătate publică. Infarctul miocardic acut (IMA) este o cauză importantă de morbiditate și principala cauză de deces în țările dezvoltate, în ciuda progreselor înregistrate în strategiile de tratament ale bolilor cardiace ischemice. IMA reprezintă necroza cardiomiocitelor datorată ischemiei miocardice acute prelungite, cu declanșarea unui răspuns inflamator, eliberarea de radicali liberi, de enzime proteolitice și alterarea matricei extracelulare, cu evoluție spre remodelare miocardică și în final, insuficiență cardiacă.

Studii publicate în literatura de specialitate au demonstrat efectele antiinflamatoare, antioxidante, anti-cancerigene, antitrombotice și de protecție cardiovasculară ale curcuminei. Curcumina este un compus polifenolic natural obținut din *Curcuma longa*. Administrată pe cale orală, absorbția curcuminei este foarte slabă datorită caracteristicilor hidrofobe, ceea ce poate constitui un impediment în realizarea efectelor acesteia. Identificarea unor modalități de creștere a biodisponibilității curcuminei este astfel de mare interes. O soluție ar putea fi încapsularea curcuminei în nanoparticule, care pot avea o absorbție crescută la nivelul tractului gastro-intestinal și o distribuție mai eficientă la nivel tisular.

Cercetarea de față a vizat identificarea efectelor curcuminei convenționale (CC) în comparație cu nanoparticulele de curcumină (NPC) în IMA indus experimental. Modelul experimental de IMA utilizat a fost cel medicamentos, prin administrarea de izoproterenol (IZO).

Diabetul zaharat (DZ) este un important factor de risc cardiovascular, iar pacienții cu diabet zaharat și infarct miocardic acut prezintă o mortalitate și morbiditate mai mare comparativ cu pacienții fără diabet zaharat. În plus, DZ crește de două până la patru ori riscul de boală coronariană ischemică, de accident vascular cerebral și de două până la opt ori riscul de insuficiență cardiacă.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Partea de contribuție personală cuprinde patru studii experimentale. Protocoalele experimentale au fost întocmite în conformitate cu ghidurile naționale și internaționale pentru îngrijirea și utilizarea animalelor de laborator. Acestea au fost aprobate de Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca (53/22.01.2018) și de Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor Cluj (99/21.02.2018) și respectă Declarația de la Helsinki privind studiile pe animale.

Din contribuțiile personale au fost publicate patru articole: trei articole cotate ISI (*Molecules*, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *Antioxidants*) și un articol BDI (*Balneo Research Journal*, revistă indexată ESCI).

Studiu 1. Infarctul miocardic acut: stabilirea parametrilor designului experimental

Obiectivul acestui studiu a fost de a identifica doza optimă de IZO care produce modificările electrocardiografice, reacția enzimatică și modificările histopatologice caracteristice IMA la șobolani.

Material și metodă: Patru șobolani masculi albi rasa Wistar-Bratislava, au fost folosiți pentru acest studiu. Pentru inducerea IMA, s-au administrat trei doze diferite de IZO (85 mg/Kgc, 100 mg/Kgc și 150 mg/Kgc) subcutanat timp de două zile, la un interval de 24 de ore între doze. Șobolani au fost randomizați și numerotați cu numere de la 1 la 4. Șobolanul nr. 2 a primit doza de 85 mg/Kgc, șobolanul nr. 3 a primit 100 mg/Kgc, iar șobolanul nr. 4 a primit 150 mg/Kgc de IZO. Șobolanul nr. 1 a primit ser fiziologic (SF) administrat subcutanat după schema șobolanilor care au primit IZO.

La 24 de ore după administrarea ultimei doze de IZO sau ser fiziologic au fost monitorizați electrocardiografic și ulterior au fost prelevate probe de sânge de la fiecare șobolan pentru determinarea nivelurilor serice ale creatin kinazei (CK) și fracțiunii de creatin kinază MB (CK-MB).

Inimile au fost excizate și fixate în soluție de formaldehidă 10%, ulterior în parafină. Pentru examinare au fost secționate și colorate în hematoxină-eozină și analizate cu ajutorul unui microscop optic.

Rezultate: Modificările electrocardiogramei (ECG) produse de IZO în doze de 100 mg/Kgc și 150mg/Kgc au fost: scăderea duratei intervalelor de RR, creșterea secundară a frecvenței cardiace (FC), creșterea duratei intervalelor QT și QTc și subdenivelarea segmentului ST asociată cu inversarea undelor T. IZO în doză de 100 mg/Kgc și 150 mg/Kgc au prelungit și complexul QRS. Cea mai mare sudenivelare a segmentului ST a fost obținută la doza de 150 mg/Kgc. Doza de 85 mg/Kgc de IZO a redus intervalul RR și, prin urmare, a crescut FC, a prelungit durata intervalelor QT și QTc, dar nu a afectat durata QRS și nici nu a influențat segmentul ST.

IZO în toate dozele a determinat o creștere a nivelurilor serice de CK și CK-MB. Examinarea histopatologică a pus în evidență o arhitectură normală a țesutului miocardic la șobolanul nr. 1, miocitoliză subendocardică localizată cu infiltrat inflamator la șobolanul nr. 2, miocitoliză subendocardică difuză cu infiltrat inflamator la șobolanul nr. 3 și necroză subendocardică extinsă asociată cu infiltrare difuză cu leucocite la șobolanul nr. 4.

Concluzii: Izoproterenolul în dozele de 100 mg/Kgc și 150 mg/Kgc induce modificări electrocardiografice caracteristice infarctului miocardic acut indus experimental și anume: subdenivelarea segmentului ST asociată cu inversarea undei T, prelungirea duratei complexului QRS și creșterea intervalelor QT și QTc.

Izoproterenolul în dozele de 85, mg/Kgc, 100 mg/Kgc și 150 mg/Kgc produce creșteri ale nivelurilor serice ale enzimelor de necroză miocardică și modificări histopatologice caracteristice infarctului miocardic acut. Modificările histopatologice variază de la miocitoliză localizată cu infiltrarea țesutului inflamator la doza de 85 mg/Kgc până la necroza miocardică difuză asociată cu infiltrarea difuză cu leucocite, la doza de 150 mg/Kgc.

Studiu 2. Efectele curcuminei asupra modificărilor electrocardiografice, tisulare și histopatologie în infarctul miocardic indus experimental

Obiectivele acestui studiu au fost de a investiga efectele pretratamentului cu curcumină convențională comparativ cu nanoparticule de curcumină asupra: tensiunii arteriale (sistolice (TAS) și distolice (TAD)), a modificărilor ECG, a nivelurilor serice ale enzimelor de necroză miocardică (CK și CK-MB), a markerilor de stres oxidativ tisular miocardic (malondialdehida (MDA), oxidul nitric (NO), statusul oxidativ total (SOT), tiolul și capacitatea antioxidantă totală (CAT)) și histopatologie în IMA indus experimental cu IZO, la șobolani.

Material și metodă: S-a realizat un studiu experimental care a inclus 56 șobolani albi, femele Wistar-Bratislava, împărțiți aleatoriu în opt loturi de câte șapte șobolani în fiecare lot și au fost tratați astfel: Lotul 1 (C), lotul control, șobolani au fost pretratați cu SF; Lotul 2 (IMA-C), lotul control cu IMA, șobolani au fost pretratați cu SF și li s-a indus IMA; Lotul 3 (CC100), Lotul 4 (CC150), Lotul 5 (CC200), șobolani au fost pretratați cu curcumină convențională într-o doze de 100 mg/Kgc, 150 mg/Kgc și 200 mg/Kgc și li s-a indus IMA; Lotul 6 (NPC100), Lotul 7 (NPC150), Lotul 8 (NPC200), șobolani au fost pretratați cu nanoparticule de curcumină în doză de 100 mg/Kgc, 150 mg/Kgc, 200 mg/Kgc și li s-a indus IMA. IMA a fost indus în zilele 13 și 14 loturilor 2-8 prin administrarea de IZO subcutanat în doză

de 100 mg/Kgc la un interval de 24 de ore. Primul lot a primit SF subcutanat după programul loturilor cu IMA.

Pretratamentul cu CC și NPC s-a efectuat pe o durată de 15 zile. Înregistrarea ECG și monitorizarea valorilor TAS și TAD au fost efectuate în ziua 0 (la începutul experimentului), în ziua 12 (cu 24 de ore înainte de administrarea de IZO) și în ziua 15 (la 24 ore după ultima doză de IZO).

În ziua 15 au fost recoltate probe biologice pentru determinarea nivelurilor serice ale CK și CK-MB, ulterior șobolanii au fost sacrificați și inimile au fost excizate, apexul a fost prelevat și omogenizat pentru măsurarea parametrilor stresului oxidativ (MDA, NO, SOT, tiolul și CAT) iar restul de țesut a fost fixat în soluție de formaldehidă, pentru examinarea histopatologică.

Rezultate: Nu au fost identificate diferențe semnificative statistic între loturi, în ceea ce privește TAS sau TAD în ziua 0, ziua 12 sau ziua 15 ($p > 0,05$). Nu s-au identificat diferențe semnificative statistic între loturile de studiu la începutul experimentului, respectiv în ziua 0 la monitorizarea ECG ($p > 0,05$). CC în doze de 150 mg/Kgc și 200 mg/Kgc și NPC în toate dozele au crescut intervalul RR și au redus frecvența cardiacă înainte de administrarea de IZO, cu rezultate semnificativ mai bune pentru NPC comparativ cu CC ($p = 0,0017$). După administrarea de IZO aceleași doze au scăzut FC, au prevenit prelungirea complexului QRS, cu rezultate semnificativ mai bune pentru NPC ($p = 0,0017$). Pretratamentul cu CC în doza de 200 mg/Kgc și toate dozele de NPC au redus subdenivelarea de segment ST și au prevenit inversarea undelor T ($p \leq 0,0106$). Cel mai eficient efect, obținut pentru CC, în reducerea nivelurilor serice ale CK-MB după inducerea IMA, a fost obținut cu doza de 200 mg/Kgc. Creșterea dozelor de nanoparticule de curcumină a fost asociată cu o reducere mai eficientă a nivelurilor serice de CK-MB ($p < 0,03$).

Pretratamentul cu NPC în toate dozele a avut un efect mai bun în comparație cu CC în aceleași doze atât pentru CK cât și pentru CK-MB ($p < 0,03$).

Inducerea IMA a determinat o creștere a MDA, NO, SOT și o scădere a tiolului și CAT din țesutul miocardic. Creșterea dozei de CC a potențat efectele curcuminei în prevenirea creșterii MDA. Toate dozele de CC au avut același efect asupra nivelului tisular miocardic al NO, însă rezultate mai bune s-au obținut pentru NPC comparativ cu CC ($p \leq 0,0029$). Cele mai mari doze de CC au avut efecte asemănătoare asupra nivelului tisular miocardic al SOT ($p > 0,05$).

Cele mai bune rezultate antioxidante au fost obținute pentru doza de 200 mg/Kgc de NPC ($p \leq 0,0474$). Pretratamentul cu toate dozele de CC a prevenit reducerea nivelurilor tisulare de tiol și CAT. Creșterea dozei de CC și NPC s-a dovedit a fi mai eficientă în prevenirea scăderii nivelului miocardic de CAT ($p \leq 0,0250$). Atât pentru tiol, cât și pentru CAT, s-au obținut rezultate mai bune pentru NPC comparativ cu CC ($p \leq 0,0017$).

Pretratamentul cu nanoparticule de curcumină în doză de 200 mg/Kgc a redus cel mai eficient modificările histopatologie induse de izoproterenol, reducând acumulara de celule inflamatorii și limitând degenerarea miofibrilară.

Concluzii: Curcumina convențională și nanoparticulele de curcumină scad frecvența cardiacă având un efect bradicardizant. Doza de 200 mg/Kgc atât de curcumină convențională cât și de nanoparticulele de curcumină previn cel mai eficient subdenivelarea de segment ST asociată cu inversarea undei T, alungirea complexului QRS, a intervalelor QT și QTc, care sunt modificări ECG caracteristice infarctului miocardic acut indus de izoproterenol.

Pretratamentul cu nanoparticulele de curcumină și curcumină convențională oferă o stabilizare a membranei cardiomiocitelor, reducând eliberarea în ser a enzimelor creatin kinază și creatin kinaza-MB în caz de infarct miocardic acut.

Nanoparticulele de curcumină exercită efecte antioxidante superioare curcuminei convenționale prin reducerea mai accentuată a malondialdehidei, oxidului nitric și statusului oxidativ total din țesutul miocardic, în caz de infarct miocardic acut. În plus, nanoparticulele de curcumină potențează mai eficient activitatea antioxidantă tisulară miocardică prin creșterea tiolului și capacității antioxidante totale.

Pretratamentul cu nanoparticule de curcumină reduce modificările histopatologie în caz de IMA indus de izoproterenol, prin reducerea acumulării de celule inflamatorii și limitarea degenerării miofibrilare. Nanoparticulele de curcumină pot face parte din strategiile de protecție cardiovasculară, fiind utile în limitarea extinderii leziunilor miocardice în caz de infarct miocardic acut.

Studiu 3. Efectele curcuminei asupra modificărilor biologice în infarctul miocardic indus experimental

Obiectivele acestui studiu au fost de a investiga efectele pretratamentului cu curcumină convențională comparativ cu nanoparticule de curcumină asupra: modificărilor serice ale enzimelor intracelulare (lactat dehidrogenaza (LDH), aspartataminotransferaza (AST), alaninaminotransferaza (ALT)), glicemiei, parametrilor stresului oxidativ (MDA, NO, SOT, tiolul și CAT), a citokinelor pro-inflamatorii (factorul de necroză tumorală alfa (TNF- α), interleukina (IL) -1 α , IL-1 β și IL-6, proteina-1 chemoattractantă monocitară (MCP-1), reglarea activării celulelor T normale exprimate și secretate (RANTES)) și a metaloproteinazelor matriceale 2 și 9 (MMP-2 și MMP-9) în IMA indus experimental cu IZO la șobolani.

Material și metodă: Protocolul experimental este asemănător cu cel descris în studiul 2. În ziua 15 au fost recoltate probe biologice pentru determinarea nivelurilor serice ale LDH, AST, ALT, ale glicemiei, a cinci parametri de stres oxidativ (MDA, NO, SOT, tiolul și CAT), a șase citokine pro-inflamatorii (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β și IL-6, MCP-1 și RANTES) și a două metaloproteinaze matriceale (MMP-2 și MMP-9).

Rezultate: Pretratamentul cu CC și NPC în toate dozele a determinat o reducere a nivelurilor serice ale LDH, AST, ALT și a glicemiei, cu rezultate mai bune pentru NPC în comparație cu CC ($p \leq 0,0088$). Dozele mai mari de CC s-au dovedit a fi mai eficiente în prevenirea creșterii nivelurilor serice a MDA și SOT ($p \leq 0,0152$). Nu s-au constatat diferențe între dozele de NPC de 100 mg/Kgc și 150 mg/Kgc în prevenirea creșterii NO ($p > 0,05$). Dozele de NPC de 150 și 200 mg/Kg au avut un efect similar asupra nivelurilor MDA, SOT și NO ($p > 0,05$). Pretratamentul cu CC dar și cu NPC în toate dozele a prevenit scăderea nivelurilor de tiol. Nivelurile tiolului seric au fost mai mari după administrarea de NPC decât după tratamentul prealabil cu CC ($p \leq 0,0152$). CAT a crescut semnificativ după utilizarea celor mai mari doze de CC și NPC, cu niveluri mai ridicate în loturile pretratate cu NPC ($p \leq 0,0152$).

Toate dozele de CC și NPC administrate au prevenit creșterea TNF- α , IL-1 α , IL-1 β și RANTES observându-se rezultate mai bune pentru NPC în comparație cu CC ($p \leq 0,0409$). Curcumina convențională într-o doză de 100 mg/Kgc nu a redus semnificativ nivelul seric al IL-6 ($p = 0,7983$). Toate dozele de NPC au avut un efect similar în ceea ce privește prevenirea creșterii IL-6 ($p > 0,05$), cu un efect semnificativ statistic mai bun decât CC ($p \leq 0,0409$). Nivelurile serice ale citokinei MCP-1 au fost reduse după pretratamentul cu NPC (fără diferențe semnificative între doze $p > 0,05$) și nu au fost influențate de CC.

Toate dozele de CC și NPC au prevenit creșterea MMP-2 cu un efect semnificativ mai bun al NPC comparativ cu CC ($p \leq 0,0027$). Cea mai eficientă doză de CC care a prevenit creșterea MMP-2 și MMP-9 este de 200 mg/Kgc. Un rezultat similar a fost identificat și pentru NPC. NPC au avut rezultate mai bune decât CC în prevenirea creșterii MMP-9 în doze de 100 mg/Kg și 200 mg/Kg ($p \leq 0,0127$).

Concluzii: Administrarea prealabilă de curcumină convențională și a nanoparticulelor de curcumină reduce considerabil creșterea serică a glicemiei și a enzimelor intracelulare precum lactat dehidrogenaza, aspartataminotransferaza, alaninaminotransferaza, induse de administrarea de izoproterenol.

Pretratamentul cu curcumină convențională și respectiv cu nanoparticule de curcumină prezintă efecte importante de protecție cardiovasculară în infarctul miocardic acut, datorită capacității curcuminei de a reduce nivelurile serice de malondialdehidă, oxid nitric și status oxidativ total și creșterea nivelurilor serice ale markerilor cu funcție antioxidantă, respectiv tiolul și capacitatea antioxidantă totală.

Pretratamentul cu nanoparticule de curcumină are ca rezultat un nivel seric semnificativ mai scăzut de factor de necroză tumorală α , interleukină-6, interleukină-1 α , interleukină-1 β și RANTES decât curcumina convențională în infarctul miocardic acut. Spre deosebire de curcumina convențională, administrarea prealabilă de nanoparticule de curcumină determină o reducere a nivelului proteinei-1 chemoattractante monocitare în infarctul miocardic acut.

Nanoparticulele de curcumină exercită efecte antioxidante și antiinflamatoare mai eficiente decât curcumina convențională, ceea ce poate duce la îmbunătățirea funcției contractile a miocardului în caz de infarct miocardic acut.

Nanoparticulele de curcumină prezintă efecte de protecție cardiovasculară superioare curcuminei convenționale, datorită capacității mai eficiente de a reduce expresia metaloproteinazelor matriceale 2 și 9, favorizând repararea cardiacă cu ameliorarea funcției sistolice a cordului după infarctul miocardic acut.

Studiu 4. Efectele curcuminei în infarctul miocardic indus experimental la șobolani cu diabet zaharat

Obiectivele acestui studiu au fost de a investiga efectele pretratamentului cu curcumină convențională comparativ cu nanoparticule de curcumină asupra nivelurilor serice ale enzimelor de necroză miocardică (CK, CK-MB și LDH), nivelurile serice ale peptidului C și ale glicemiei, modificărilor ECG, parametrilor stresului oxidativ: (MDA, NO, SOT, tiol și CAT) și citokinelor pro-inflamatorii (TNF- α , IL-1 β și IL-6) în IMA indus experimental cu IZO, la șobolani la șobolani cu DZ indus cu STZ.

Material și metodă: Opt loturi a câte șapte șobolani Wister Bratislava au fost incluse în studiu. Șobolani au fost împărțiți în opt loturi. Loturile C - lotul de control, IMA-C - lotul cu IMA, DZ-C - lotul cu DZ și DZ-IMA-C - lotul cu DZ și IMA au primit SF pe durata întregului experiment. Loturile SF-DZ-CC-IMA și SF-DZ-NPC-IMA au primit SF înainte de inducerea DZ și ulterior lotul SF-DZ-CC-IMA a primit curcumină convențională (200 mg / Kgc) iar lotul SF-DZ-NPC-IMA a primit nanoparticule de curcumină (200 mg / Kgc) până la inducerea IMA. Lotul CC-DZ-CC-IMA a primit curcumină convențională (200 mg / Kgc) iar lotul NPC-DZ-NPC-IMA nanoparticule de curcumină (200 mg / Kgc) pe toată durata experimentului. Diabetul zaharat a fost indus în ziua 7 prin administrarea intraperitoneală a unei singure doze de STZ (65 mg/Kgc). IMA a fost indus cu IZO în ziua 22, injectat subcutanat în doză de 45 mg/Kgc. La 24 de ore după administrarea ultimei doze de IZO sau SF toți șobolani au fost monitorizați ECG și apoi s-au prelevat probe de sânge pentru determinarea nivelurilor serice ale CK, CK-MB, LDH, glicemiei, MDA, NO, SOT, CAT, tiolului, TNF- α , IL-6 și IL-1 β .

Rezultate: CC și NPC au crescut intervalul RR și au redus FC la toate loturile, cu rezultate semnificativ mai bune pentru NPC comparativ cu CC ($p=0,0021$). NPC au fost mai eficiente decât CC în prevenirea alungirii complexului QRS și a intervalelor QT și QTc ($p\leq 0,0057$). Reducerea în amplitudine a undei R a fost prevenită cel mai eficient de administrarea de NPC anterior inducerii DZ ($p\leq 0,0048$). Nanoparticulele de curcumină au redus eficient supradenivelarea de segment ST ($p\leq 0,0021$). Cel mai bun efect în ceea ce privește reducerea modificărilor segmentului ST a fost obținut pentru NPC administrate înaintea inducerii DZ ($p\leq 0,0066$).

Ambele loturi de șobolani care au primit CC au avut un nivel seric mai redus al glicemiei comparativ cu loturile DZ-C și DZ-IMA-C ($p\leq 0,0022$). Loturile care au primit nanoparticule de curcumină au avut valori ale glicemiei serice mai scăzute comparativ cu loturile cărora s-a administrat curcumină convențională ($p\leq 0,0040$). Cele mai bune rezultate au fost obținute pentru lotul pretratată cu NPC înainte de inducerea DZ. Administrarea de CC anterior inducerii DZ a oferit o creștere a nivelului peptidului C comparativ cu lotul pretratată cu SF și ulterior CC ($p=0,0106$). Aceeași tendință, dar cu rezultate semnificativ mai bune, s-a observat și pentru loturile care au primit NPC ($p\leq 0,0409$).

Loturile care au primit CC și NPC au prezentat niveluri serice mai mici ale CK, CK-MB și LDH comparativ cu lotul DZ-IMA-C ($p\leq 0,0049$). Cele mai bune rezultate în prevenirea creșterii CK, CK-MB și LDH au fost obținute pentru loturile cărora li s-a administrat NPC ($p\leq 0,022$). Administrarea de CC și NPC au prevenit creșterea MDA, NO și SOT comparativ cu lotul DZ-IMA-C, cele mai bune rezultate fiind obținute pentru NPC administrate înainte de inducerea DZ ($p\leq 0,0407$). Pretratamentul cu CC înainte de administrarea STZ nu a oferit o îmbunătățire a rezultatelor a parametriilor antioxidanți ($p\geq 0,05$), în timp ce administrarea de NPC înainte de inducerea DZ a dus la o creștere a valorilor serice ale CAT și ale tiolului ($p\leq 0,0104$).

Administrarea CC și NPC s-a dovedit eficientă în prevenirea creșterii valorilor serice ale TNF- α , IL-6 și IL-1 β în comparație cu lotul DZ-IMA-C, cu un efect semnificativ mai bun pentru NPC, administrate de la începutul experimentului ($p\leq 0,0046$).

Concluzii: Nanoparticulele de curcumină administrate anterior inducerii diabetului zaharat sunt mai eficiente decât curcumina convențională în menținerea funcției și structurii cardiomiocitelor în caz de infarct miocardic acut, prevenind mai eficient alungirea complexului QRS, a intervalelor QT, QTc, supradenivelarea de segment ST și creșterea nivelurilor serice ale enzimelor intracelulare precum creatin kinaza, creatin kinaza-MB și lactat dehidrogenaza.

Efectele antiinflamatoare ale curcuminei și potențarea efectelor pozitive ale acestui compus natural prin administrarea de nanoparticule de curcumină permit reducerea edemului în țesutul miocardic și previn reducerea amplitudinii undei R.

Administrarea de curcumină convențională dar și de nanoparticule de curcumină anterior inducerii diabetului zaharat oferă o reducere mai eficientă a glicemiei și o creștere mai mare a nivelului peptidului C, cu rezultate mai bune în cazul nanoparticulelor de curcumină.

Pretratamentul cu nanoparticule de curcumină și curcumină convențională are efecte antioxidante în infarctul miocardic acut indus de izoproterenol la șobolani diabetici întrucât previne creșterea valorilor serice ale malondialdehidei, statusului oxidativ total și oxidul nitric și crește markerii anti-oxidanți respectiv capacitatea antioxidantă totală și tiolul, cu rezultate mai bune în cazul administrării de nanoparticule de curcumină.

Administrarea prealabilă de curcumină convențională și nanoparticule de curcumină are un efect benefic în reducerea nivelurilor serice ale citokinelor proinflamatorii respectiv, factorul de necroză tumorală α , interleukina 6 și interleukina 1 β , în caz de infarct miocardic acut la șobolani diabetici, cu un efect antiinflamator superior al nanoparticulelor de curcumină.

Nanoparticulele de curcumină și curcumina convențională ar putea fi utilizate pentru diminuarea leziunilor miocardice în infarctul miocardic acut la subiecții cu diabet zaharat.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Această lucrare este prima din literatura de specialitate care evaluează capacitatea nanoparticulelor de curcumină de a reduce nivelul RANTES în infarctul miocardic acut. Mai mult, efectele superioare ale pretratamentului cu nanoparticule de curcumină în comparație cu curcumina convențională asupra stresului oxidativ din țesutul miocardic în infarctul miocardic acut, nu au mai fost până în prezent raportate în literatura de specialitate. O contribuție la stadiul actual al cunoașterii a acestei lucrări o reprezintă studierea efectelor pretratamentului cu nanoparticule de curcumină asupra expresiei MMP-2 și MMP-9 în infarctul miocardic acut. Până la momentul scrierii tezei, nici un studiu nu a evaluat efectele antioxidante ale nanoparticulelor de curcumină în comparație cu curcumina convențională în infarctul miocardic acut indus la șobolani cu diabet zaharat. Originalitatea acestei lucrări este astfel oferită și de evaluarea efectelor nanoparticulelor de curcumină și a curcuminei convenționale asupra nivelului plasmatic de TNF- α , IL-6 și IL-1 β în infarctul miocardic acut la șobolani diabetici. Contribuția inovativă a tezei derivă din faptul că aceasta aduce dovezi experimentale care susțin utilizarea nanoparticulelor de curcumină și a curcuminei convenționale în terapiile de prevenție pentru bolile cardiovasculare, cu efecte semnificativ mai mari ale nanoparticulelor de curcumină.

PhD THESIS SUMMARY

The effects of curcumin in experimental induced myocardial infarction

PhD student: **Paul-Mihai Boarescu**

PhD supervisor: **Prof. Dr. Sorana D. Bolboacă**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

THESIS CONTENTS

INTRODUCTION	1
CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE	3
1. Myocardial infarction	5
1.1. Definition and classification	5
1.2. Epidemiology	6
1.3. Risk factors	7
1.3.1. Age	7
1.3.2. Sex	7
1.3.3. Heredity	7
1.3.4. Dyslipidemia	7
1.3.5. Hypertension	7
1.3.6. Diabetes mellitus	8
1.3.7. Obesity	8
1.3.8. Smoking	8
1.3.9. Physical inactivity	8
1.3.10. Psychosocial factors	8
1.4. Pathophysiology	8
1.4.1. <i>The role of oxidative stress in the pathogenesis of myocardial infarction</i>	9
1.4.2. <i>The role of inflammation in the pathogenesis of myocardial infarction</i>	10
1.5. Diagnosis	11
1.6. Treatment	13
1.7. Primary and secondary prevention	14
2. Experimental models of myocardial infarction	15
2.2. Drug-induced myocardial infarction	15
2.3. Surgically-induced myocardial infarction	16
2.4. Interventional-induced myocardial infarction	17
3. Experimental models of diabetes mellitus associated with myocardial infarction	19
4. Curcumin and its effects in myocardial infarction and diabetes mellitus	21
4.1. Curcumin antioxidant activity	22
4.2. Curcumin anti-inflammatory activity	23
4.3. Curcumin nanoparticles	25
PERSONAL CONTRIBUTION	27
1. Purpose and objectives	29
2. General methodology	31
2.1. Ethical considerations	31
2.2. Laboratory conditions	31
2.3. Chemicals and reagents	31
2.4. Electrocardiographic monitoring	31
2.5. Biochemical analysis	32
2.6. Statistical analysis	32
3. Study 1. Acute myocardial infarction: establishing the parameters of the experimental design	33
3.1. Introduction	33
3.2. Objective	34
3.3. Material and method	34
3.3.1. <i>The experimental model</i>	34
3.3.2. <i>Electrocardiographic monitoring</i>	34
3.3.3. <i>Blood sampling for biochemical analysis</i>	34
3.3.4. <i>Histopathological examination</i>	35
3.4. Results	35
3.5. Discussions	37
3.6. Conclusion	38
4. Study 2. Effects of curcumin on electrocardiographic, tissue and histopathological changes in experimental myocardial infarction	39
4.1. Introduction	39

4.2. Purpose and objectives	40
4.3. Material and method	40
4.3.1. Study groups	40
4.3.2. Acute myocardial infarction induction	41
4.3.3. Electrocardiographic monitoring	42
4.3.4. Blood pressure measurement	42
4.3.5. Blood sampling for biochemical analysis	42
4.3.6. Histopathological examination	43
4.3.7. Preparation of tissue homogenate and evaluation of myocardial oxidative stress	43
4.3.8. Statistical analysis	43
4.4. Results	44
4.4.1. Blood pressure measurement	44
4.4.2. Electrocardiographic monitoring	44
4.4.3. Evaluation of serum levels of myocardial necrosis enzymes	49
4.4.4. Assessment of oxidative stress parameters in myocardial tissue	52
4.4.5. Effectiveness of curcumin nanoparticles and conventional curcumin	56
4.4.6. Histopathological changes of the myocardium	58
4.5. Discussions	59
4.5.1. Limitations of the study and future research	64
4.6. Conclusions	64
5. Study 3. Effects of curcumin on biological changes in experimental myocardial infarction	65
5.1. Introduction	65
5.2. Purpose and objectives	66
5.3. Material and method	66
5.3.1. Experimental model	66
5.3.2. Blood sampling for biochemical analysis	67
5.3.3. Statistical analysis	68
5.4. Results	68
5.4.1. Biochemical analysis	68
5.4.2. Evaluation of serum parameters of oxidative stress	71
5.4.3. Evaluation of serum levels of pro-inflammatory cytokines	75
5.4.4. Evaluation of serum levels of matrix metalloproteinases	80
5.5. Discussions	82
5.6. Conclusions	86
6. Study 4. The effects of curcumin in experimental myocardial infarction in rats with diabetes mellitus	89
6.1. Introduction	89
6.2. Purpose and objectives	91
6.3. Material and method	91
6.3.1. Induction of diabetes mellitus	91
6.3.2. Induction of acute myocardial infarction	91
6.3.3. Administration of curcumin and curcumin nanoparticles	92
6.3.4. The experimental model	92
6.3.5. Electrocardiographic monitoring	93
6.3.6. Biochemical analysis	94
6.3.7. Statistical analysis	94
6.4. Results	94
6.4.1. Electrocardiographic monitoring	95
6.4.2. Serum levels of glucose and C	97
6.4.3. Serum levels of myocardial necrosis enzymes	99
6.4.4. Serum levels of oxidative stress parameters	102
6.4.5. Serum levels of the pro-inflammatory cytokines	105
6.5. Discussions	108
6.6. Conclusions	114
7. General conclusions	117
8. Originality and innovative contributions of the thesis	119

REFERENCES

121

Keywords: acute myocardial infarction, diabetes, curcumin, nanoparticles, oxidative stress, inflammation.

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases represent one of the most important public health problems. Acute myocardial infarction (AMI) is an important cause of morbidity and the leading cause of death in developed countries, despite advances made in treatment strategies for ischemic heart disease. AMI represents cardiomyocytes necrosis due to prolonged acute myocardial ischemia, triggering an inflammatory response, release of free radicals, proteolytic enzymes, and alteration of the extracellular matrix, with myocardial remodelling and progression to heart failure.

Several studies have shown the anti-inflammatory, antioxidant, anti-carcinogenic, antithrombotic and cardiovascular protective effects of curcumin. Curcumin is a natural polyphenolic compound obtained from *Curcuma longa*. Administered orally, the absorption of curcumin is very low due to its hydrophobic characteristics, which may represent an impediment in its proper usage. Identifying ways to increase curcumin bioavailability is of great interest. One solution could be the encapsulation of curcumin in nanoparticles, as they may have an increased absorption in the gastrointestinal tract and a more efficient tissular distribution.

The present study was aimed to identify the effects of conventional curcumin (CC) as compared to curcumin nanoparticles (NPC) in experimental induced AMI. The experimental model of AMI used was the drug-induced model, by the administration of isoproterenol (ISO).

Diabetes Mellitus (DM) is an important cardiovascular risk factor as diabetic patients with acute myocardial infarction have higher mortality and morbidity compared non-diabetic patients. Besides, DM increases the risk of ischemic coronary heart disease and stroke from two to eight times and the risk of heart failure from two to four times.

PERSONAL CONTRIBUTION

The personal contribution part consists of four experimental studies. Experimental protocols have been prepared following national and international guidelines for the care and use of laboratory animals. The studies were approved by the Ethics Committee of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca (53/22.01.2018), by the National Authority for Veterinary and Food Safety Cluj (99/21.02.2018) and they follow the Declaration of in Helsinki on animal studies.

Four articles were published from the personal contributions part: three ISI articles in *Molecules*, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *Antioxidants*, and one article in *Balneo Research Journal*, an ESCI indexed journal.

Study 1. Acute myocardial infarction: establishing the parameters of the experimental design

The objective of this study was to identify the optimal dose of ISO that induces the electrocardiographic changes, the enzymatic reaction and the histopathological changes characteristic of AMI in rats.

Material and method: Four Wistar-Bratislava white male rats were used in this study. For AMI induction was used ISO in three different doses (85 mg/Kg bw, 100 mg/Kg bw and 150 mg/Kg bw). ISO was administered subcutaneously for two days, at a 24-hour interval between doses. The rats were randomized and numbered with numbers from 1 to 4. Rat no. 2 received a dose of 85 mg/Kg bw, rat no. 3 received 100 mg/Kg bw, and rat no. 4 received 150 mg/Kg bw of ISO. Rat no. 1 received saline solution (S) administered subcutaneously following the program of rats that received ISO. 24 hours after the last dose of ISO or saline was administered, electrocardiographic monitoring was performed and blood samples were collected from each rat to determine serum creatine kinase (CK) and creatine kinase MB (CK-MB) levels. The hearts were excised and fixed in 10% formaldehyde solution and later in

paraffin. For histopathological examination, they were sectioned, stained in hematoxylin-eosin and analyzed with an optical microscope.

Results: The electrocardiogram (ECG) changes produced by ISO in doses of 100 mg/Kg bw and 150 mg/Kg bw were: decreased RR intervals, increased heart rate (HR), increased QT and QTc intervals, and depression of ST-segment associated with inversion of the T waves. ISO at the doses of 100 mg/Kg bw and 150 mg/Kg bw induced a prolongation of the QRS complex. The most important ST-segment depression was obtained at the dose of 150 mg/Kg bw. The dose of 85 mg/Kg bw reduced the RR interval and, consequently increased HR, prolonged the QT and QTc intervals, but did not affect the QRS duration or the ST segment.

ISO in all doses induced AMI and increased the serum levels of CK and CK-MB. Histopathological examination revealed a normal architecture of myocardial tissue in rat no. 1, localized subendocardial myocytolysis with inflammatory infiltrate in rat no. 2, diffuse subendocardial myocytolysis with inflammatory infiltrate in rat no. 3 and extended subendocardial necrosis associated with diffuse infiltration with leukocytes in rat no. 4.

Conclusions: Isoproterenol in doses of 100 mg/Kg bw and 150 mg/Kg bw induces electrocardiographic changes characteristic of isoproterenol-induced acute myocardial infarction, namely: depression of the ST segment associated with T-wave inversion, prolongation of QRS complex duration and increase of QT and QTc intervals duration.

Isoproterenol in doses of 85 mg/Kg bw, 100 mg/Kg bw and 150 mg/Kg bw increases the serum levels of myocardial necrosis enzymes and produces histopathological changes characteristic of acute myocardial infarction. Histopathologic changes range from localized myocytolysis with inflammatory tissue infiltration at the dose of 85 mg/Kg bw to diffuse myocardial necrosis associated with diffuse leukocyte infiltration at the dose of 150 mg/Kg bw.

Study 2. Effects of curcumin on electrocardiographic, tissue and histopathological changes in experimental myocardial infarction

The objectives of this study were to investigate the effects of pretreatment with conventional curcumin compared to curcumin nanoparticles on blood pressure (systolic (SBP) and diastolic (DBP)), ECG changes, serum levels of myocardial necrosis enzymes (CK and CK -MB), of the markers of myocardial tissue oxidative stress (malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), total oxidative status (TOS), thiol and total antioxidant capacity (TAC)) and histopathological changes in the ISO-induced AMI in rats.

Material and method: An experimental study that included 56 females Wistar-Bratislava rats, was performed. Animals were randomly divided into eight groups of seven rats in each group and treated as follows: Group 1 (C), control group, rats were pretreated with S; Group 2 (AMI-C), control group with AMI, rats were pretreated with S and AMI was induced; Group 3 (CC100), Group 4 (CC150), Group 5 (CC200), rats were pretreated with conventional curcumin in doses of 100 mg/Kg bw, 150 mg/Kg bw and 200 mg/Kg bw and AMI was induced; Group 6 (NPC100), Group 7 (NPC150), Group 8 (NPC200), rats were pretreated with curcumin nanoparticles in the dose of 100 mg/Kg bw, 150 mg/Kg bw, 200 mg/Kg bw and AMI was induced.

AMI was induced on days 13 and 14 to rats from groups 2-8 by the administration of subcutaneous ISO in a dose of 100 mg/Kg bw at 24 hours interval. Group 1 received subcutaneous S after the schedule of groups with AMI.

Pretreatment with CC and NPC was performed for 15 days. ECG monitoring and BP measurement were performed on day 0 (at the beginning of the experiment), on day 12 (24 hours before ISO administration) and on day 15 (24 hours after the last dose of ISO).

On day 15, biological samples were collected to determine the serum levels of CK and CK-MB. After that all rats were sacrificed, their hearts were excised, the apex was taken and homogenized for the measurement of oxidative stress parameters (MDA, NO, TOS, thiol and TAC) and the rest of the tissue was fixed in formaldehyde solution for histopathological examination.

Results: No significant differences were found between groups, regarding SBP or DBP on day 0, day 12 or day 15 ($p > 0.05$). No significant differences were found between study groups at the beginning of the experiment (day 0) during ECG monitoring ($p > 0.05$). CC in doses of 150 mg/Kg bw and 200 mg/Kg bw and NPC in all doses increased the RR interval and reduced the heart rate before ISO administration, with better results for NPC compared to CC ($p=0.0017$). The same doses decreased HR,

prevented the prolongation of the QRS complex, after ISO administration, with significantly better results for NPC ($p=0.0017$). Pretreatment with CC at the dose of 200 mg/Kg bw and all doses of NPC reduced ST-segment depression and prevented T-wave inversion ($p\leq 0.0106$).

The most effective effect of CC in reducing serum CK-MB levels after AMI induction was obtained at the dose of 200 mg/Kg bw. Highest doses of curcumin nanoparticles were associated with a more effective reduction in serum CK-MB levels ($p < 0.03$). Pretreatment with NPC at all doses had better effects compared to the same doses of CC for both CK and CK-MB ($p < 0.03$).

Induction of AMI increased MDA, NO, TOS and a decreased thiol and TAC in myocardial tissue. Increasing the dose of CC potentiated the effects of curcumin in preventing MDA elevation. All doses of CC had the same effect on myocardial tissue level of NO, but better results were obtained for NPC compared to CC ($p\leq 0.0029$). The highest doses of CC had similar effects on myocardial tissue level of TOS ($p > 0.05$). The best antioxidant results were obtained for the dose of 200 mg/Kg bw of NPC ($p\leq 0.0474$). Pretreatment with all doses of CC prevented the reduction of myocardial tissue levels of thiol and TAC. Increasing the dose of CC and NPC is more effective in preventing the reduction of myocardial TAC level ($p\leq 0.0250$). For both thiol and TAC, better results were obtained after NPC administration compared to CC ($p\leq 0.0017$).

Pretreatment with curcumin nanoparticles in dose of 200 mg/Kg bw has prevented most efficiently isoproterenol-induced histopathological changes, by reducing inflammatory cell accumulation and limiting myofibrillary degeneration.

Conclusions: Conventional curcumin and curcumin nanoparticles decrease heart rate offering a bradycardic effect. The dose of 200 mg/Kg bw of both conventional curcumin and curcumin nanoparticles, prevented most efficiently the ST-depression associated with T-wave inversion, enlargement of the QRS complex, QT and QTc intervals, which are ECG changes characteristic of acute myocardial infarction induced by isoproterenol.

Pretreatment with conventional curcumin and curcumin nanoparticles provides stabilization of the cardiomyocyte membrane, reducing serum creatine kinase and creatine kinase-MB enzyme release in acute myocardial infarction. Curcumin nanoparticles exert superior antioxidant effects compared to conventional curcumin as they better reduce malondialdehyde, nitric oxide and total oxidative status in myocardial tissue, in case of acute myocardial infarction. Besides, curcumin nanoparticles enhance myocardial tissue antioxidant activity more efficiently by increasing thiol and total antioxidant capacity.

Pretreatment with curcumin nanoparticles reduces histopathological changes in isoproterenol-induced acute myocardial infarction by reducing inflammatory cell accumulation and limiting myofibrillary degeneration.

Curcumin nanoparticles may be part of cardiovascular protection strategies, being useful in limiting the extent of myocardial injury in acute myocardial infarction.

Study 3. Effects of curcumin on biological changes in experimental myocardial infarction

The objectives of this study were to investigate the effects of pretreatment with conventional curcumin compared to curcumin nanoparticles on serum changes of intracellular enzymes (lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), glucose, NO, TOS, thiol, and TAC), pro-inflammatory cytokines (tumour necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin (IL) -1 α , IL-1 β and IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES) and of matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) in ISO-induced AMI in rats.

Material and method: The experimental protocol is similar to the one described in study 2. On day 15, biological samples were collected to determine the serum levels of LDH, AST, ALT, glucose, five parameters of oxidative stress (MDA, NO, TOS, thiol, and TAC), six pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β and IL-6, MCP-1 and RANTES) and two matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9).

Results: Pretreatment with CC and NPC at all doses resulted in a reduction in serum LDH, AST, ALT and blood glucose levels, with better results obtained for NPC compared to CC ($p\leq 0.0088$). The highest doses of CC were more effective in preventing the increase in serum levels of MDA and TOS ($p\leq 0.0152$). No differences were found between NPC in doses of 100 mg/Kg bw and 150 mg/Kg bw in the prevention of NO elevation ($p > 0.05$). NPC doses of 150 and 200 mg/Kg bw had a similar effect on MDA, TOS and NO levels ($p > 0.05$). Pretreatment with CC and NPC at all doses prevented thiol levels from decreasing. Serum thiol levels were higher after the administration of NPC than after CC

($p \leq 0.0152$). TAC increased significantly after administration of the highest doses of CC and NPC, with higher levels in groups pretreated with NPC ($p \leq 0.0152$).

All doses of CC and NPC prevented the increase of TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , and RANTES, with better results for NPC compared to CC ($p \leq 0.0409$). Conventional curcumin at a dose of 100 mg/Kg bw did not significantly reduce serum levels of IL-6 ($p = 0.7983$). All doses of NPC had a similar effect in preventing IL-6 elevation ($p > 0.05$), with a statistically significant better effect than CC ($p \leq 0.0409$). Serum levels of MCP-1 cytokine were reduced after pretreatment with NPC (no significant differences between $p > 0.05$ doses) but were not influenced by CC.

All doses of CC and NPC prevented the elevation of MMP-2 with a better effect of NPC compared to CC ($p \leq 0.0027$). The most effective dose of CC that prevented MMP-2 and MMP-9 elevation was 200 mg/Kg bw. A similar result was observed for the NPC. NPC in doses of 100 mg/Kg and 200 mg/Kg bw had better results than CC in preventing MMP-9 elevation ($p \leq 0.0127$).

Conclusions: Pretreatment with conventional curcumin and curcumin nanoparticles reduces serum glycemia and intracellular enzymes such as lactate dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, induced by isoproterenol administration.

Pretreatment with conventional curcumin and curcumin nanoparticles has important cardiovascular protective effects in acute myocardial infarction, due to the ability of curcumin to reduce serum levels of malondialdehyde, nitric oxide, and total oxidative status and increase serum levels of antioxidant function markers such as thiol and total antioxidant capacity.

Pretreatment with curcumin nanoparticles reduces serum levels of tumour necrosis factor α , interleukin-6, interleukin-1 α , interleukin-1 β , and RANTES in acute myocardial infarction, with better results than conventional curcumin. Unlike conventional curcumin, pretreatment with curcumin nanoparticles results in a reduction of monocyte chemoattractant protein-1 serum level in acute myocardial infarction.

Curcumin nanoparticles exert more important antioxidant and anti-inflammatory effects than conventional curcumin, which can improve the contractile function of the myocardium in acute myocardial infarction.

Curcumin nanoparticles exhibit superior cardioprotective effects compared to conventional curcumin, due to their more efficient ability to reduce the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9, favouring cardiac repair and improvement of the systolic function of the heart after acute myocardial infarction.

Study 4. The effects of curcumin in experimental myocardial infarction in rats with diabetes mellitus

The objectives of this study were to investigate the effects of conventional curcumin pretreatment compared to curcumin nanoparticles on serum levels of myocardial necrosis enzymes (CK, CK-MB and LDH), serum levels of C-peptide and glycemia, ECG changes, oxidative stress parameters (MDA, NO, TOS, thiol and TAC) and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-6) in isoproterenol-induced AMI in rats with STZ-induced DM.

Material and method: Eight groups of seven Wister Bratislava rats were included in the study. The rats were divided into eight groups. C - control group, AMI-C - group with AMI, DM-C - group with DM and DM-AMI-C - group with DM and AMI received S during the whole experiment. The S-DM-CC-AMI and S-DM-NPC-AMI groups received S before DM induction and the S-DM-CC-AMI group received conventional curcumin (200 mg/Kg bw) while the S-DM-NPC-AMI group received curcumin nanoparticles (200 mg/Kg bw) until AMI induction. The CC-DM-CC-AMI group received conventional curcumin (200 mg/Kg bw) while NPC-DM-NPC-AMI received curcumin nanoparticles (200 mg/Kg bw) during the whole experiment. DM was induced on day 7 by intraperitoneal administration of a single dose of STZ (65 mg/Kg bw). AMI was induced with ISO on day 22, injected subcutaneously at a dose of 45 mg/Kg bw. At 24 hours after ISO or S administration, all rats were ECG monitored and then blood samples were taken to determine serum levels of CK, CK-MB, LDH, blood glucose, MDA, NO, TOS, TAC, thiol, TNF- α , IL-6, and IL-1 β .

Results: CC and NPC increased RR interval and reduced HR in all groups, with significantly better results for NPC compared to CC ($p = 0.0021$). NPC were more effective than CC in preventing the QRS complex prolongation and QT and QTc intervals enlargement ($P \leq 0.0057$). The reduction in amplitude of the R wave was prevented most efficiently by the administration of NPC before the induction of DM

($p \leq 0.0048$). Curcumin nanoparticles reduced ST-segment elevation ($p \leq 0.0021$). The best effect on reducing ST-segment changes was obtained for NPC administered before DM induction ($p \leq 0.0066$).

Both groups of rats that received CC had a lower glucose level compared to groups DM-C and DM-AMI-C ($P \leq 0.0022$). The groups that received curcumin nanoparticles had lower glucose levels compared to the groups that received conventional curcumin ($P \leq 0.0040$). The best results were obtained for the group pretreated with NPC before DM induction. Administration of CC before DM induction had a higher level of C-peptide compared to the group pretreated with S followed by CC ($p = 0.0106$). The same trend was observed for the groups that received NPC ($P \leq 0.0409$).

Groups receiving CC and NPC showed lower serum levels of CK, CK-MB, and LDH compared to group DM-AMI-C ($P \leq 0.0049$). The best results were obtained for the groups that received NPC ($P \leq 0.022$).

The administration of CC and NPC prevented the serum increase of MDA, NO and TOS compared to the DM-AMI-C group, with the best results being obtained for the NPC administered before induction of DM ($p \leq 0.0407$). Pretreatment with CC before the STZ administration did not provide an improvement in antioxidant parameters ($p \geq 0.05$), whereas administration of NPC before DM induction led to an increase in serum TAC and thiol values ($p \leq 0.0104$). The administration of CC and NPC was effective in preventing the increase in serum levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β compared to the DM-AMI-C group, with significantly better effects obtained for NPC administered from the beginning of the experiment ($p \leq 0.0046$).

Conclusions: Curcumin nanoparticles administered before the induction of diabetes mellitus are more effective than conventional curcumin in maintaining cardiomyocyte function and structure in acute myocardial infarction, as they prevent the prolongation of the QRS complex, enlargement of QT and QTc intervals, ST-segment elevation and the release of intracellular enzymes such as creatine kinase, creatine kinase-MB, and lactate dehydrogenase.

The anti-inflammatory effects of curcumin, potentiated by encapsulation in nanoparticles, reduce oedema in myocardial tissue and prevent the reduction of the wave amplitude R in case of acute myocardial infarction.

Administration of curcumin nanoparticles but also of conventional curcumin before the induction of diabetes mellitus protects the beta cells and reduces serum levels of glucose and offers a higher level of peptide C, with better results obtained for curcumin nanoparticles.

Pretreatment with conventional curcumin and curcumin nanoparticles has antioxidant effects in acute myocardial infarction induced by isoproterenol in diabetic rats, as it prevents the elevation of serum malondialdehyde values, total oxidative status, and nitric oxide, and increases antioxidant markers, with best results obtained for curcumin nanoparticles.

Pretreatment with conventional curcumin and curcumin nanoparticles has a beneficial effect in reducing serum levels of the proinflammatory cytokines, namely: tumour necrosis factor α , interleukin 6 and interleukin 1 β , in case of acute myocardial infarction in diabetic rats, with a higher anti-inflammatory effect offered by curcumin nanoparticles.

Curcumin nanoparticles and conventional curcumin could be used to reduce myocardial injury in acute myocardial infarction in subjects with diabetes mellitus.

Originality and innovative contributions of the thesis

This thesis is the first paper in the literature that evaluates the ability of curcumin nanoparticles to reduce RANTES levels in acute myocardial infarction. It reports for the first time the superior effects of pretreatment with curcumin nanoparticles compared to conventional curcumin on oxidative stress in myocardial tissue in acute myocardial infarction. A real contribution to the current state of knowledge of this work is the first evaluation of the effects of pre-treatment with curcumin nanoparticles on the expression of MMP-2 and MMP-9 in acute myocardial infarction. No other study evaluated the antioxidant effects of curcumin nanoparticles compared to conventional curcumin in acute myocardial infarction in rats with diabetes. The originality of this work is also offered by the fact that it evaluated the effects of curcumin nanoparticles and conventional curcumin on the serum levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in acute myocardial infarction in diabetic rats. The innovative contribution of the thesis consists of the fact that it provides experimental evidence supporting the use of curcumin nanoparticles and conventional curcumin in preventive strategies for cardiovascular disease, with significantly greater effects of curcumin nanoparticles.