
TEZĂ DE DOCTORAT

Studiul efectelor nutraceutice bioactive ale lactoserului Zonar într-un model de obezitate indusă experimental la șobolani Sprague- Dawley

Doctorand **Amalia-Marina NEAGU**

Conducător de doctorat **Prof.univ. Dr. Ioan MARCUS**



STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Țesutul adipos joacă un rol central în reglarea energiei întregului organism și a homeostaziei glucozei prin funcțiile sale subtile atât la nivel de organ cât și la nivel sistemic. Țesutul adipos este clasificat în trei subtipuri: țesut adipos alb (WAT), țesut adipos brun (BAT) și țesut adipos bej. Țesutul adipos stochează energie sub formă de lipide și controlează mobilizarea și distribuția acestora în organism și este implicat direct în reglarea metabolică. Depozitarea și stocarea trigliceridelor (TG) în adipocite pe o perioadă lungă de timp duce la mărirea în dimensiune (Tan & Vidal-Puig 2008). Trigliceridele din adipocite sunt desfăcute în glicerol și acizii grași pe cale lipolitică, fenomen care apare consecutiv restricție calorice.

În ultimii ani obezitatea înregistrează un procent tot mai ridicat în rândul populației în țările dezvoltate sau în curs de dezvoltare. Studiile au arătat că excesul de țesut adipos (excesul de grăsime) poate produce anomalii metabolice cum ar fi dislipidemiile și rezistența la insulină. De asemenea poate crește riscul complicațiilor cardiovasculare, cum ar fi afecțiunile coronariene și hipertensiunea arterială (Rosini și colab., 2012; Ezzati și colab., 2006). În mod normal țesutul adipos reprezintă între 10 și 25% din greutatea corporală iar când acest indice de masă corporală (IMC) depășește 30 kg/m² reprezintă un risc major pentru sănătate (Kanasaki și colab., 2011).

Creșterea stresului oxidativ asociat obezității se datorează prezenței țesutului adipos excesiv, deoarece adipocitele și preadipocitele au fost identificate ca fiind o sursă de citokine proinflamatorii, obezitatea fiind considerată o inflamație cronică. Aceste citokine sunt stimulatori puternici pentru producerea de oxigen și azot reactiv de către macrofage și monocite; prin urmare o creștere a concentrației de citokine ar putea fi responsabilă pentru nivelul crescut de stres oxidativ. Obezitatea crește sarcina mecanică și metabolismul miocardic; prin urmare, consumul de oxigen este crescut.

Laptele oferă o gamă largă de componente biologice active cum ar fi proteinele și peptidele bioactive, oligozaharidele, imunoglobulinele și grăsimile/lipidele care capacitatea de a proteja împotriva agenților patogeni, dacă este consumat regulat. Proprietățile biologice ale proteinelor din lactoser sunt recunoscute pe scară largă și au fost din ce în ce mai exploatate în studiile de cercetare științifică și în aplicațiile alimentare de către diverse industrii. β-lactoglobulinele contribuie la 50% din proteina din lactoser, aceasta ajută la legarea mineralelor precum zincul și calciul. Alfa-Lactalbumina pe de altă parte este recomandată să fie adăugată în formulele pentru sugari sau în diferite alimente pentru un aport crescut de proteine. Albumina serică poate lega acizii grași și imunoglobulinele precum IgA, IgM, IgG1 și IgG2 ceea ce ajută la dezvoltarea imunității pasive la consumatori. După ingerare lactoserul este hidrolizat în peptide bioactive și aminoacizi care sunt detectate de către sistemul nervos la diferite nivele ale tractului gastrointestinal și a sistemului nervos central. Aceste sisteme de detectare acționează prin semnale de sațietate prin reducerea cantității de alimente consumate (Malekian și colab., 2015). Alimentele nutraceutice sau medicale sunt concepute pentru a oferi sprijin nutrițional complet sau suplimentat persoanelor care nu pot digera cantități adecvate de alimente într-o formă convențională. Aceste alimente sunt de asemenea utilizate pentru a oferi sprijin nutrițional specializat pacienților care au nevoi fiziologice și nutriționale speciale. Proteinele din lactoser sunt prezente în mod normal într-o dietă ca proteine intacte și au avantajul nutrițional de a putea fi folosite în dietele medicale, deoarece sunt proteine complete din punct de vedere nutrițional.

Marea similitudine dintre genomul rozătoarelor și al oamenilor fac din aceste modele animale un instrument major pentru studierea obezității. Animalele ne permit să obținem răspunsuri într-un timp scurt, întrucât 10 zile din viața unui șobolan sunt de aproximativ 1 an la om atunci când comparăm modificările greutateii corporale. Unele modele de inducere a obezității la șobolani se găsesc în literatură internațională, principalele modele experimentale de inducere a obezității sunt: prin leziunea nucleului hipotalamic ventromedial (VMH) care poate fi realizată în principal în două moduri (administrarea de glutamat monosodic sau leziune electrică directă); ovariectomie, administrarea de diete hipercalorice și manipulare genetică pentru obezitate (Diemen și colab., 2006).

CERCETĂRI PROPRII

IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Ipoteza de lucru se bazează pe supoziția că proteinele bioactive din lactoser reduc creșterea greutateii corporale și a grăsimii, crește masa musculară, fără să modifice consumul de energie. Conținutul caloric redus și proteine ușor digerabile plasează lactoserul în topul alimentelor care pot diminua sindromul metabolic și obezitatea.

Scopul cercetării a fost de a evalua efectului nutraceutic bioactiv al lactoserului Zonar utilizat ca supliment alimentar în obezitatea indusă experimental prin dietă hiperlipidică la șobolani Sprague-Dawley.

Obiectivele specifice ale cercetării au fost:

Obiectivul 1. Evaluarea efectelor preventive și paliative a consumului de lactoser Zonar prin determinarea indicilor morfometrici.

Obiectivul 2. Evaluarea efectelor antiadipoase a consumului de lactoser Zonar prin determinarea profilului biochimic și hematologic seric la loturile experimentale.

Obiectivul 3. Evaluarea efectelor antioxidante a consumului de lactoser Zonar prin dozarea markerilor de stress oxidativ din plasmă și din organe (ficat și rinichi) la loturile de șobolani normoponderali și cu obezitate indusă experimental.

Obiectivul 4. Evaluarea histologică morfometrică și calitativă a țesutului adipos și a unor organe interne la șobolani normoponderali și obezi.

MATERIALE ȘI METODE

Studiul a fost efectuat pe un număr de 30 de șobolani adulți sănătoși din rasa Sprague-Dawley, masculi, în vârstă de 3 luni, cântărind în medie 450 ± 35 g. Animalele au fost crescute în Biobaza Facultății de Medicină Veterinară, USAMV Cluj-Napoca, cu respectarea condițiilor condiții standard, respectiv temperatura 22-23°C, umiditatea 55% și o fotoperioadă de 12h lumină/12h întuneric. Animalele au fost hrănite cu furaj standard granulat pentru rozătoare (furnizat de Institutul Cantacuzino, București, România) și apă ad libitum. Protocolul experimental a fost aprobat de Comisia de Etică Cercetării din Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca și a fost autorizat de către DSVSA Cluj, prin (Decizia nr. 48/29.03.2017).

Loturile de animale utilizate în experiment au fost structurate după cum urmează: lot martor sănătos-MS (n=5); lot martor obez-MO (n=5); lot hrană standard și zonar-HSZN (n=5); lot

hrană hiperlipidică și lactoser Zonar-HHZN (n=5); Lot obezitate1-OB1 (n=5) și lot obezitate 2-OB 2 (n=5). În cazul loturilor OB 1 și OB 2 protocolul experimental a fost divizat în două etape, respectiv în etapa 1 s-a indus obezitatea la ambele loturi pe o perioadă de 7 săptămâni, iar în etapa 2, lotul OB 1 a fost trecut pe o dietă standard și lactoser Zonar, iar lotul OB 2 a rămas în continuare pe hrană hiperlipidică și s-a introdus lactoserul Zonar. Animalele au primit două tipuri de alimente granulate combinate, furnizate de Institutul Cantacuzino, București, structura rației alimentare standard (nutreț combinat) fiind formată din: 18% proteine, 1,5% grăsimi, 5% fibre, iar compoziția alimentară hiperlipidică este de 21% proteine, 16% grăsimi, 3,5% fibre.

Pe parcursul experimentului a fost administrat în hrana animalelor o formulă comercială de lactoser dulce, produs și comercializat sub denumirea de lactoserum Zonar de către SC EmbrionSRL, Satu Mare, România (www.Zonar.ro). Lactoserul Zonar a fost caracterizat din punct de vedere al compoziției fizico-chimice.

Hemoleucograma a fost realizată cu ajutorul analizatorului automat Abacus Junior Vet 5 Diff. Determinările biochimice a fost efectuate cu ajutorul spectrofotometrului Touch UV-VIZ Screen (Diagnostics Hospitex, Firenze, Italia), care permite măsurarea următorilor parametrii biochimici serici: glucoză, trigliceride, colesterol total, LDL. Insulina (Mercodia ultrasensitive Rat Insulin ELISA, 10-1252-01/lot 27126) sa dozat prin metoda ELIZA cu aparatul Microplate Photometer, tip MPP-96. Indicele HOMA2-IR a fost obținut prin programul HOMA Calculator v2.2.3. Parametrii stresului oxidativ determinați pentru acest experiment au fost: reactivitatea sau capacitatea antioxidantă totală (TAC), starea oxidantului total (TOS), indicele de stres oxidativ (OSI) și Malondialdehida (MDA). Toți parametrii au fost măsurati cu ajutorul analizorului de spectrofotometrie UV-Vis Jasco (Jasco V-630, Tokyo, Japonia). Extractele de proteine din ficat și rinichi s-au obținut folosind tampon fosfat de potasiu (pH = 7; 35). Activitățile TAC și peroxidarea lipidelor și oxidarea proteinelor au fost estimate în acest extract proteic folosind metode fotometrice. Activitatea enzimelor antioxidante a fost determinată în țesuturile hepatice și renale la toate loturile experimentale, folosind kituri comerciale (de la Randox). Materialul de studiu a fost reprezentat de probe de țesut adipos abdominal, ficat, rinichi și pancreas. Probele recoltate au fost imersate imediat după recoltare în soluție de formaldehidă 10%, la temperatura laboratorului pentru fixare, apoi au fost procesate în vederea includerii la parafină sa folosind colorația standard Hematoxilina-Eozină. Colectarea și prelucrarea datelor s-a realizat folosind programele Microsoft Office 2010, iar prelucrarea graficelor a fost realizată în programul SPSS varianta 21.

STUDIUL 1 - Determinarea indicilor antropometrici la șobolanii care au consumat lactoserul ZONAR

Obiectivul studiului a fost evaluarea efectelor preventive și paliative ale consumului de lactoser Zonar prin efectuarea măsurătorilor morfometrice la șobolani. Indicele de masă corporală (IMC) reprezintă estimarea grăsimii corporale pe baza înălțimii și greutateii. Nu măsoară direct grăsimea corporală ci folosește o ecuație pentru a face o aproximare. Indicele de obezitate (IO) este utilizat pentru aprecierea gradului de obezitate la animale pe baza măsurătorilor de lungime corporală, circumferință abdominală și greutate corporală.

Lotul martor obez (MO) a avut cea mai mare masă corporală din punct de vedere statistic față de lotul martor sănătos (MS) după perioada de 11 săptămâni a experimentului. Loturile care

au primit lactoser Zonar sub formă preventivă pe întreaga perioadă experimentală, doar lotul HSZN a avut o greutate corporală mai scăzută din punct de vedere statistic față de lotul MO.

În ceea ce privește loturile obeze care au primit lactoser Zonar paliativ pe o perioadă de 4 săptămâni, atât lotul OB1 cât și lotul OB2 au avut o masă corporală mai redusă în comparație cu lotul MO.

Valoriile obținute a IMC-ul au fost mai crescute din punct de vedere statistic la lotul MO față de lotul MS.

În ceea ce privește loturile care au fost primit lactoser Zonar sub formă preventivă IMC-ul a fost mai scăzut statistic doar lotul HSZN față de lotul MO, lotul HSZN fiind mai mic și decât lotul HHZN care de asemenea a primit lactoser Zonar pe toată perioada experimentală doar că acesta a fost pe o hrană hiperlipidică.

Loturile obeze OB1 și OB2 au avut IMC-ul mai mic din punct de vedere statistic față de lotul MO. Novelli și colab., 2006 au obținut rezultate similare în ce privește indici antropometrici la loturile care au primit hrană hiperlipidică în dietă, asemănător cu lotul nostru obez, loturile lor care au fost pe o hrană hipercalorică au luat în greutate și au avut un IMC crescut.

CONCLUZII

1. Prin utilizarea dietei hiperlipidice s-a reușit inducerea obezității prin creșterea excesivă a masei corporale (g), respectiv a IMC-ului la loturile experimentale.
2. S-a demonstrat efectul antiadipos al lactoserului Zonar prin reducerea masei corporale (g) și a IMC-ului la toate loturile experimentale suplimentate cu acesta.

STUDIUL 2 - Determinarea profilul hematologic, biochimic și evaluarea indexului HOMA-IR la șobolani

Obiectivul studiului a fost de a evalua efectele antiadipoase a lactoserului Zonar prin determinarea profilul biochimic și hematologic seric și determinarea indexului HOMA-IR la șobolani normoponderali și obezi.

În ce privește determinarea hemoleucogramei șobolanii din lotul MO nu au prezentat modificări semnificativ statistice în comparație cu lotul MS. Datele obținute au arătat că nu există diferență semnificativă în tabloul sanguin la șobolanii hrăniți cu o dietă hiperlipidică în comparație cu șobolani hrăniți cu o dietă standard, acest lucru se poate datora unei expuneri insuficiente la hrana hiperlipidică, fiind necesară o expunere mai de lungă durată pentru a avea modifică hematologice. Din punct de vedere medical creșterea numărului de leucocite în mod normal indică o infecție sau o inflamație, iar faptul că în acest studiu nu a apărut la nici un lot aceste modificări putem afirma că nu a apărut inflamație sau infecție de-a lungul întregului experiment. Efectele proteinelor din lactoser sunt destul de benefice pentru sănătatea animalelor asupra sistemului sanguin.

Sindromul metabolic este definit prin prezența a 3 din următoarele criterii: obezitate, în special obezitate abdominală, colesterol total și LDL crescute, HDL colesterol scăzut, hipertensiune arterială, creșterea trigliceridelor și a glucozei, printre alte condiții dismetabolice, care reflectă rezistența la insulină subiacentă. Evaluarea parametrilor biochimici a relevat o creștere semnificativ statistică la șobolani din lotul MO față de lotul MS. În ceea ce privește glucoza serică s-a observat o creștere semnificativ statistică a valorii concentrației acesteia la lotul MO în

comparație cu loturile MS, HSZN și HHZN. La fel ca și în cazul glucozei serice avem o creștere semnificativ statistică a nivelului de insulină la lotul MO în comparație cu loturile MS, HSZN, HHZN și OB1. În cazul trigliceridelor avem o creștere semnificativ statistică la lotul MO în comparație cu loturile MS, HSZN, HHZN, OB1 și OB2. Valorile trigliceridelor de la loturile HSZN și OB1 sunt scăzute din punct de vedere statistic în comparație inclusiv cu lotul MS. Aceste rezultate au fost în conformitate cu rezultatele raportate de Sung-Moon și colab. (2015) unde parametrii biochimici au fost semnificativ scăzuți la șobolani care au avut în dietă zer fermentat lichid (FWB).

Evaluarea modelului homeostatic (HOMA) este o metodă validată pentru a măsura rezistența la insulină cu ajutorul valorilor obținute la glucoză și insulină a jeun. În ceea ce privește indexul HOMA-IR din studiul nostru au fost următoarele modificări, lotul MO a avut cel mai mare index Homa-IR în comparație cu lotul MS, iar loturile HSZN, OB1 și OB2 care au avut în dietă lactoser Zonar au avut un nivel optim de HOMA-IR (sensibilitate la insulină <1) în comparație cu lotul MO. Sensibilitatea insulinei a avut următoarele modificări statistice, lotul MO având cea mai scăzută valoare a sensibilității în comparație cu lotul MS și OB1. De asemenea, lotul OB2 a avut valori mai mici din punct de vedere statistic decât lotul MS și OB1. Sensibilitatea la insulină este exprimată ca HOMA%-S, cu cât valoarea este mai mare cu atât este mai mare sensibilitatea la insulină a subiectului. În ceea ce privește indexul Homa- $\beta\%$ nu a prezentat modificări din punct de vedere statistic între nici unul din loturile experimentale. Cu toate acestea animalele hrănite cu hrană hiperlipidică nu au dezvoltat niciodată diabet, acest lucru este în concordanță cu constatările anterioare la șobolanii Sprague-Dawley și este atribuit creșterilor compensatorii atât a masei celulelor β pancreatice cât și a secreției de insulină glucosestimulată.

CONCLUZII

1. Prin administrarea de hrană hiperlipidică s-a reușit inducerea rezistenței timpurii la insulină (HOMA-IR >1.9) la lotul MO față de lotul MS care a avut un indice HOMA-IR optim.
2. Administrarea de lactoser Zonar a prevenit apariția rezistenței insulinei la toate loturile care au fost suplimentate cu lactoser Zonar atât sub formă preventivă cât și sub formă paliativ.
3. Administrarea de lactoser Zonar a avut un efect hipoglicemiant, hipoinsulinemiant și a redus nivelul de trigliceride serice la toate loturile experimentale care au fost suplimentate cu lactoser.

STUDIUL 3 - Evaluarea efectelor antioxidante a lactoserului Zonar prin dozarea markerilor de stress oxidativ din plasmă și din țesuturi

Obiectivul studiului a fost de a evalua efectele antioxidante a lactoserului Zonar prin dozarea markerilor de stress oxidativ din plasmă și din țesut (ficat, rinichi) și determinarea greutății relative a organelor prelevate.

Inducerea obezității la șobolanii Sprague Dawley masculi din cadrul studiului nostru care au consumat o dietă bogată în grăsimi a dus la o creștere semnificativă a concentrației de TOS la lotul MO în comparație cu lotul MS. Aceleași rezultate se observă și la indexul OSI unde lotul MO are un indice statistic crescut în comparație cu lotul MS. Markerii MDA și TAC la aceste 2 loturi nu

au prezentat modificări statistice. Rezultatele studiului nostru sunt asemănătoare cu studiul efectuat de Omnia și colab. 2020.

Animalele care au fost suplimentate cu lactoser Zonar pe perioada de 11 săptămâni, respectiv 4 săptămâni au avut o reducere semnificativă a nivelului de TOS în comparație cu lotul MO. În aceeași măsură indicele OSI (<0.01) a fost mai redus din punct de vedere statistic la loturile suplimentate cu lactoser Zonar pe ambele perioade experimentale în comparație cu lotul MO. În ceea ce privește MDA plasmatic cantitatea mai redusă din punct de vedere statistic a fost observat doar la lotul HSZN. Valoriile TAC din plasmă nu au fost modificate statistic la nici unul din loturile experimentale. Aceste rezultate se corelează destul de bine cu Prigon și colab., 2013 care au sugerat că nivelurile TOS și OSI erau mai mari la copiii obezi cu boală hepatică decât la copiii non-obezi. De asemenea, Kilic și colab., 2016, au arătat că markerii stresului oxidativ TOS și TAC au fost semnificativ mai mari în grupurile obeze comparativ cu grupurile martor sănătoși și au concluzionat că nivelul crescut de TAC a fost rezultatul creșterii TOS în încercarea de a echilibra oxidarea deoarece tinerii au sisteme anti-oxidante mai active.

Probele tisulare examinate în studiu nostru au fost rinichi și ficatul, pentru determinarea markerilor de stres oxidativ și acțiunea antioxidantă unde după determinarea inițială a încărcături proteice au fost determinate malondialdehida (MDA) care ne arată gradul de peroxidare lipidică, respectiv inflamația și necroza celulară și capacitatea totală antioxidantă tisulară (TAC). Efectele antioxidante ale lactoserului Zonar se pot datora diferiților tipuri de compuși antioxidanți naturali precum beta-lactaglobulina, alfa-lactalbumina, imunoglobulinelor, albumina serică bovină, lactaferrina și/sau lactoperoxidaza etc. Considerând rezultatele obținute, se poate afirma că lactoserul Zonar nu este hepatotoxic și nici nefrotoxic având chiar o ușoară acțiune antioxidantă la nivel renal. În ceea ce privește greutatea organelor, lotul HSZN a prezentat greutatea ficatului semnificativ statistic mai mică comparativ cu grupul MO dar fără nici o modificare în ceea ce privește indicele organo-somatic a ficatului. Cu toate acestea nu s-a observat nicio creștere a rinichiului în greutate care să fie semnificativ statistic și nici a indicelui organo-somatic la nici unul din loturile experimentale.

CONCLUZII

1. S-au demonstrat efectele antioxidante ale lactoserului Zonar prin valori reduse ale markerilor de stres oxidativ (TOS, indice OSI) la loturile suplimentate cu lactoser în comparație cu lotul martor obez.
2. Considerând rezultatele obținute se poate afirma că lactoserul Zonar nu este hepatotoxic și nici nefrotoxic având chiar o ușoară acțiune antioxidantă la nivel renal.
3. Lactoserul Zonar ar putea diminua creșterea greutății organelor la șobolani obezi hrăniți cu o dietă bogată în grăsimi.

STUDIUL 4 - Determinarea histomorfometrică și calitativă a țesutului adipos și a unor organe interne

Obiectivul studiului a fost evaluarea histopatologică calitativă a țesutului adipos, ficat, rinichi și pancreas. Și realizarea unei analize morfometrice a adipocitelor urmărind modificările morfologice (dimensiunea) și numerice ale acestora.

Prin analiza histomorfometrică a adipocitelor recoltate din regiunea abdominală de la indivizii din cadrul studiului nostru, s-a observat că lotul MO a avut un număr de adipocite semnificativ statistic mai redus comparativ cu loturile MS. În ceea ce privește diametrul adipocitelor au fost observate următoarele modificări statistice: lotul MO a avut cele mai mari dimensiuni adipocitare în comparație cu lotul MS. Aceste rezultate se datorează hiperplaziei adipocitare consecutiv acumulării cu trigliceride la lotul martor obez.

Loturile experimentale HSZN și HHZN, care au primit lactoser Zonar preventiv au avut numărul de adipocite mai crescut și diametrul adipocitar mai redus comparativ cu lotul MO.

Loturile obeze care au primit lactoser Zonar sub formă paliativă (OB1 și OB2) au avut un număr de adipocite semnificativ statistic mai mic decât lotul MS și fără nici o modificare statistică comparativ cu lotul MO, iar diametrul adipocitar a fost redus statistic la lotul OB1. Rezultatele obținute de noi sunt în concordanță cu rezultatele obținute de Ulrike și colab. 2016 unde șoareci suplimentați cu o dietă hiperproteică obținută din cazeină au avut diametrul adipocitar mai mic la toate loturile experimentale care au primit cazină în comparație cu lotul martor. Astfel se poate afirma că lactoserul are efecte paliative și asupra dimensiunii și a numărului de adipocite deoarece în cazul tuturor loturilor experimentale care au primit lactoser Zonar, diametrul adipocitar a fost semnificativ mai mic raportat la lotul martor obez.

Ulrike și colab. 2016 au obținut rezultate asemănătoare cu studiul nostru în ceea ce privește aspectul histopatologic calitativ la șoarecii care au fost suplimentați cu o dietă hipercalorică în comparație cu loturile care au avut administrată și cazeină. Deși este bine documentat că administrarea hranei hipercalorice la șobolani duce la inflamație în depozitele de grăsime albă, nu au existat diferențe de infiltrat celular inflamator din țesuturile adipoase între loturile experimentale, aceste rezultate fiind concordante cu rezultatele lui Rojas și colab. 2018.

Examinarea microscopică a ficatului a relevat, la lotul martor obez, care a primit doar hrană hiperlipidică, ca leziune predominantă, steatoza hepatică microvacuolară moderată, în special cu localizare centrolobulară (Fig 18). Se poate identifica prezența a multiple vacuole de lipide (trigliceride), de dimensiuni variabile, în citoplasma hepatocitelor, acestea având nucleul deplasat la periferie și aflat în diferite stadii de necroză. Deși steatoza hepatică nu a fost evaluată cantitativ, la loturile care au primit pe lângă hrană și lactoserul Zonar, această leziune este absentă. Excepție face lotul OB1, unde a fost indentificată o steatoză hepatică incipientă. Rojas și colab. în 2018, au obținut rezultate asemănătoare cu cele obținute de noi la examinarea microscopică a ficatului, aceștia identificând o vacuolizare hepatocelulară minimă până la moderată, prezentă la ambele sexe, la loturile care au primit hrană hipercalorică. La acești indivizi nu s-a observat afectarea epiteliului căilor biliare și nici prezența infiltratului inflamator. Din aceasta rezultă că administrarea de lactoser Zonar are efect protector asupra hepatocitelor, împiedicând acumularea de trigliceride în citoplasma acestora și prin urmare, apariția leziunilor patologice de la nivelul ficatului.

În ceea ce privește pancreasul, imaginea histologică este una normală, fără modificări, la toate loturile luate în studiu. Nu au fost observate leziuni nici ale celulelor epiteliale acinare, nici la nivelul insulelor Langerhans. Rezultatele obținute sunt contradictorii cu cele obținute de Rojas și colab., aceștia identificând la șobolani Sprague-Dawley hrăniți cu o hrană hipercalorică o incidență mai mare a hemoragiei și a acumulării de pigmenți la periferia insulelor pancreatice, spre deosebire de loturile control, hrănite cu o hrană standard.

Examinarea țesutului renal nu a dezvăluit prezența infiltratului inflamator sau leziuni ale celulelor epiteliale renale (Fig 22). Aceste aspecte microscopice sunt contradictorii cu rezultatele obținute de Rojas și colab. 2018, unde ambele sexe, din lotul care a primit hrană hipercalorică, au prezentat modificări tubulare renale minime spre moderate (bazofilie tubulară și/sau dilatare tubulară cu prezența de cilindrii hialini).

Leziunile prezente în diferite organe și asociate obezității sunt leziuni cronice, care apar după administrarea îndelungată de hrană hiperlipidică. Este posibil ca timpul relativ scurt (11 săptămâni) în care a fost realizat acest studiu experimental să nu fie suficient pentru a permite apariția unor leziuni vizibile la nivelul pancreasului sau a rinichilor.

CONCLUZII

1. Administrarea de lactoser Zonar previne acumularea de trigliceride în adipocite, efect observat la toate loturile suplimentate atât sub formă preventivă, cât și sub formă paliativ.
2. Aceleași rezultate preventive a lactoserului Zonar se confirmă și prin analiza histomorfometrică a adipocitelor unde s-a constatat micșorarea diametrului respectiv un număr crescut ale acestora în comparație cu lotul MO unde diametru adipocitelor a fost semnificativ crescut. Cele mai bune rezultate s-au observat la loturile care au primit lactoser pe toată perioada experimentală, urmată de loturile care au primit lactoser doar 4 săptămâni.
3. În urma examenului histopatologic al ficatului, la toate loturile experimentale s-a remarcat absența leziunilor patologice prin urmare putem afirma că lactoserul împiedică acumularea de trigliceride în citoplasma hepatocitelor.

CONCLUZII GENERALE

1. Efectele antiadipoase ale lactoserului Zonar au fost observate prin reducerea masei corporale (g) și a IMC-ului la toate loturile experimentale suplimentate cu lactoser.
2. Lactoserul Zonar a avut capacitatea de a reduce nivelul de glicemie și trigliceride serice la toate loturile experimentale.
3. Lactoserul Zonar a avut capacitatea de a preveni apariția rezistenței la insulină.
4. Lactoserul Zonar a avut acțiune antioxidantă care a fost demonstrată prin nivelul scăzut de markeri de stres oxidativ la loturile experimentale care au fost suplimentate cu acesta.
5. Lactoserul Zonar a avut capacitatea de a împiedica acumularea de trigliceride la nivelul adipocitelor, rezultate fiind observate prin analiza calitativă histologică.
6. Administrarea lactoserului Zonar a avut un efect protector asupra hepatocitelor, împiedicând acumularea de trigliceride în citoplasma.
7. Datorită rezultatelor obținute cu privire la greutatea relativă a organelor, stresului oxidativ sistemic și examenul histopatologic efectuat din probe de țesut hepatic și renal atestă faptul că administrarea de lungă durată a lactoserului Zonar la animale de laborator (șobolani) nu produce toxicitate sistemică sau de organ.

RECOMANDĂRI

1. Recomandăm utilizarea lactoserului Zonar ca și supliment alimentar în datorită potențialului antioxidant al acestuia.
2. Se poate utiliza lactoserul Zonar ca și terapie complementară la subiecți obezi aflați în procesul de slăbire prin restricție calorică.
3. Recomandăm utilizarea măsurătorilor morfometrice la șobolanii utilizați în protocoalele de obezitate experimentală, acestea fiind eficiente în supravegherea acumulării sau pierderii masei corporale (g).

ORIGINALITATE ȘI CONTRIBUȚII INOVATIVE

Studiile efectuate aduc un prim element inovativ prin crearea unei hrane personalizate hiperlipidice în vederea utilizării acesteia într-un protocol de inducere experimentală a obezității la șobolanii de laborator.

Un alt element inovativ îl reprezintă studiul efectelor și proprietăților bioactive nutraceutice ale unui produs natural (lactoserul Zonar) obținut printr-o tehnologie ecoinovatoare, în monitorizarea și controlul obezității experimentale la șobolani. Datorită puținelor informații despre utilizarea măsurătorilor morfometrice pe șobolani Sprague-Dawley în studiile de obezitate, prin cercetarea efectuată s-a reușit obținerea unor valori referință cu privire la IMC și IO la șobolani Sprague-Dawley, masculi

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. DIEMEN VON VINICIUS, EDUARDO NEUBARTH TRINDADE, MANOEL ROBERTO MACIEL TRINDADE. 2006. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. Vol 21 (6): 425-429.
2. EZZATI M, MARTIN H, SKJOLD S, SV, MURRAY CJL. 2006. Trends in national and state-level obesity in the USA after correction for self-report bias: Analysis of health surveys. *J. R. Soc. Med.* (99): 250-257.
3. KANASAKI KEIZO AND DAISUKE KOYA. 2011. Biology of Obesity: Lessons from Animal Models of Obesity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1-11
4. KILIC E., ÖMER F.Ö., AYBALA T.E., HAYRIYE E., EMEL T., SIDDIKA K.A., HIFA G.C., SAHBETTIN S., ABDURRAHIM K. 2016. Oxidative Stress Status in Childhood Obesity: A Potential Risk Predictor. *Med Sci Monit*, 22:73-3679.
5. MALEKIAN FATEMEH, SEBHATU GEBRELUL, JAMES F. HENSON, KASUNDRA D. CYRUS, MFAMARA GOITA, DE'SHOIN Y. FRIENDSHIP, AND BETTY M. KENNEDY. 2015. The effects of whey protein, resistant starch and nutrition education on body weight. *Functional Foods in Health and Disease*. 5 (8): 275-291.
6. NOVELLI E.L.B., Y.S. DINIZ, C.M. GALHARDI, G.M.X. EBAID, H.G. RODRIGUES, F. MANI, A.A.H. FERNANDES, A.C. CICOGNA AND J.L.V.B. NOVELLI FILHO. 2007. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals Ltd. Laboratory Animals* 41, 111-119.

-
7. OMNIA E. KILANY, HEBA M.A. ABDELRAZEK, TAHANY SALEH ALDAYEL, SHIMAA ABDO, MANAL M.A. MAHMOUDE. 2020. Anti-obesity potential of *Moringa olifera* seed extract and lycopene on high fat diet induced obesity in male Sprague Dawely rats. *Saudi Journal of Biological Sciences* 27: 2733–2746.
 8. PIRGON O., BILGIN H., CEKMEZ F., KURKU H., DUNDAR B.N. 2013. Association between insulin resistance and oxidative stress parameters in obese adolescents with non-alcoholic fatty liver disease. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*; 5(1):33-39.
 9. ROJAS JENNIFER M., FLORIAN BOLZE, INGER THORUP, JETTE NOWAK, CHARLOTTE M. DALSGAARD, MIKALA SKYDSGAARD, LINE O. BERTHELSEN, KEVIN A. KEANE, HENRIK SØEBORG, INGRID SJOˆGREN, JES T. JENSEN, JOHANNES J. FELS, HANNE K. OFFENBERG, LÆRKE W. ANDERSEN, AND MAJKEN DALGAARD. 2018. The Effect of Diet-induced Obesity on Toxicological Parameters in the Polygenic Sprague-Dawley Rat Model. *Toxicologic Pathology*, Vol. 46(7) 777-798.
 10. ROSINI TIAGO CAMPOS, ADELINO SANCHEZ RAMOS DA SILVA, CAMILA DE MORAES. 2012. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Rev Assoc Med Bras.* 58 (3):383-387.
 11. SUNG-MOON HONG, EUI-CHUN CHUNG, AND CHEOL-HYUN KIM. 2015. Anti-obesity Effect of Fermented Whey Beverage using Lactic Acid Bacteria in Diet-induced Obese Rats. *Korean J. Food Sci. An.* Vol. 35, No. 5, pp. 653~659.
 12. TAN CHONG YEW & VIDAL-PUIG A. 2008. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. *Biochemical Society Transactions* (36) 935–940.
 13. ULRIKE LIISBERG, LENE SECHER MYRMEL, EVEN FJÆRE, ALEXANDER K. RØNNEVIK, SUSANNE BJELLAND, KRISTIN RØEN FAUSKE, JACOB BAK HOLM, ASTRID LINDE BASSE, JACOB B. HANSEN, BJØRN LIASET, KARSTEN KRISTIANSEN & LISE MADSEN. 2015. The protein source determines the potential of high protein diets to attenuate obesity development in C57BL/6J mice. *ADIPOCYTE* VOL. 5, NO. 2, 196–211.