

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
CAROL DAVILA BUCUREȘTI**

**TEZĂ DE DOCTORAT  
REZUMAT**

**STUDII PRIVIND ACȚIUNEA ANTIINFLAMATOARE ȘI ANTIOXIDANTĂ A  
UNOR COMPUȘI NATURALI, ÎN OBEZITATEA INDUSĂ EXPERIMENTAL**

**Conducător de doctorat:**

**Prof. Univ. Dr. biochim. Daniela Grădinaru**

**Doctorand:**

**Farm. sp. Maria-Zinaida Constantinescu**

**BUCUREȘTI**

**2017**

## CUPRINS

INTRODUCERE.....	1
PARTEA I – ASPECTE TEORETICE .....	Error! Bookmark not defined.
CAPITOLUL 1.....	Error! Bookmark not defined.
1. INTERRELAȚII STRES OXIDATIV – INFLAMAȚIE ÎN OBEZITATE..	Error! Bookmark not defined.
1.1 Prevalența obezității.....	Error! Bookmark not defined.
1.2 Etiologia obezității.....	Error! Bookmark not defined.
1.3 Riscul obezității: genele și dezvoltarea intrauterină .....	Error! Bookmark not defined.
1.4 Mecanisme patogenice în obezitate. Inflamația.....	Error! Bookmark not defined.
1.4.1 Rolul TNF-alfa și IL-6.....	Error! Bookmark not defined.
1.4.2 Acizii grași liberi și dislipidemia.....	Error! Bookmark not defined.
1.5 Sindromul metabolic și stresul oxidativ.....	Error! Bookmark not defined.
1.6 Disfuncțiile endocrine în obezitate.....	Error! Bookmark not defined.
1.7 Obezitatea și riscul de cancer.....	Error! Bookmark not defined.
1.8 Grăsimea ectopică și rezistența la insulină .....	Error! Bookmark not defined.
1.8.1 Caracteristici histologice ale depozitelor de grăsime ectopică....	Error! Bookmark not defined.
CAPITOLUL 2.....	Error! Bookmark not defined.
2. ADIPOCITOKINELE - MOLECULE SEMNAL ADIPOCITARE	Error! Bookmark not defined.
2.1 Țesutul adipos și homeostazia energetică. Interrelațiile cu insulina.....	Error! Bookmark not defined.
2.2 Leptina .....	Error! Bookmark not defined.
2.3 Adiponectina .....	Error! Bookmark not defined.
2.4 Rezistina.....	Error! Bookmark not defined.
2.5 Ometina și alte adipocitokine .....	Error! Bookmark not defined.
CAPITOLUL 3.....	Error! Bookmark not defined.
3. COMPUȘI NATURALI CU ROL ÎN MODULAREA INFLAMAȚIEI ȘI STRESULUI OXIDATIV LA NIVEL ADIPOCITAR ȘI SISTEMIC .....	Error! Bookmark not defined.
3.1 Uleiul de pește Omega 3 .....	Error! Bookmark not defined.
3.2 Uleiul de chimen.....	Error! Bookmark not defined.
3.3 Fructul de cătină .....	Error! Bookmark not defined.

<b>MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI .....</b>	<b>7</b>
<b>PARTEA A II-A – CONTRIBUȚII ORIGINALE .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>CAPITOLUL 4.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4. MATERIALE ȘI METODE.....</b>	<b>10</b>
<b>4.1. Animale de experiență. Schema studiului experimental.....</b>	<b>10</b>
<b>4.2. Determinări biochimice .....</b>	<b>11</b>
<b>4.2.1. Markerii de stres oxidativ evaluați la nivel tisular.....</b>	<b>11</b>
<b>4.2.1.1. Determinarea MDA (malonildialdehidei) în omogenatele tisulare .....</b>	<b>11</b>
<b>4.2.1.2. Determinarea tiolilor totali în omogenatele tisulare.....</b>	<b>11</b>
<b>4.2.1.3. Determinarea glutationului total în omogenatele tisulare.....</b>	<b>11</b>
<b>4.2.2. Markerii de stres oxidativ evaluați la nivel sistemic .....</b>	<b>11</b>
<b>4.2.2.1. Determinarea superoxid dismutazei (SOD) în eritrocite.....</b>	<b>12</b>
<b>4.2.2.2. Determinarea glutation peroxidazei (GPx) în eritrocite .....</b>	<b>12</b>
<b>4.2.2.3. Determinarea glutationului total (GSH+GSSG) în sânge .....</b>	<b>12</b>
<b>4.2.3. Markerii ai funcției adipocitare evaluați la nivel sistemic .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4.2.3.1. Determinarea adiponectinei serice.....</b>	<b>12</b>
<b>4.2.3.2. Determinarea rezistinei serice.....</b>	<b>12</b>
<b>4.2.4. Evaluarea parametrilor de biochimie clinică .....</b>	<b>12</b>
<b>4.3. Examenul histopatologic.....</b>	<b>13</b>
<b>4.3.1. Evaluarea grăsimii ectopice prin colorație Sudan.....</b>	<b>15</b>
<b>4.3.2. Evaluarea imunohistochimică a proteinei Akt fosforilate (pAkt).....</b>	<b>15</b>
<b>4.4. Analiza statistică .....</b>	<b>16</b>
<b>CAPITOLUL 5.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>5. EFECTUL DIETEI HIPERCALORICĂ/ HIPERLIPIDICĂ ȘI A TRATAMENTULUI CU SUPLEMENTE ALIMENTARE ASUPRA DINAMICII PARAMETRILOR DE BIOCHIMIE CLINICĂ LA ȘOBOLANI CU OBEZITATE INDUSĂ EXPERIMENTAL.....</b>	<b>16</b>
<b>5.1. Evoluția parametrilor de biochimie clinică la șobolanii femele.....</b>	<b>16</b>
<b>5.2. Evoluția parametrilor de biochimie clinică la descendenții șobolanilor femele cu obezitate indusă experimental.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>CAPITOLUL 6.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>6. EFECTUL DIETEI HIPERCALORICĂ/ HIPERLIPIDICĂ ȘI A TRATAMENTULUI CU SUPLEMENTE ALIMENTARE ASUPRA BIOMARKERILOR DE STRES OXIDATIV EXPRESAȚI LA NIVEL SISTEMIC: SOD, GPX, GLUTATION TOTAL.....</b>	<b>19</b>
<b>CAPITOLUL 7.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

<b>7. EFECTUL DIETEI HIPERCALORICĂ/ HIPERLIPIDICĂ ȘI A TRATAMENTULUI CU SUPLIMENTE ALIMENTARE ASUPRA BIOMARKERILOR DE STRES OXIDATIV EXPRIMAȚI LA NIVEL TISULAR, LA ȘOBOLANI CU OBEZITATE INDUSĂ EXPERIMENTAL .....</b>	<b>21</b>
<b>CAPITOLUL 8.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>8. EFECTUL DIETEI HIPERCALORICĂ/ HIPERLIPIDICĂ ȘI A TRATAMENTULUI CU SUPLIMENTE ALIMENTARE ASUPRA BIOMARKERILOR ADIPOCITARI: ADIPONECTINA ȘI REZISTINA .....</b>	<b>22</b>
<b>CAPITOLUL 9.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9. ANALIZA MODIFICĂRILOR HISTOPATOLOGICE INDUSE DE DIETA HIPERCALORICĂ/ HIPERLIPIDICĂ ȘI DE TRATAMENTUL CU SUPLIMENTE ALIMENTARE .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.1. Analiza histopatologică a grupului 1 de studiu- șobolani femele cu obezitate indusă experimental (sau grup „gras”).....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.1.1. Analiza histopatologică a modificărilor hepatice .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.1.2. Analiza histopatologică a modificărilor renale.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.1.3. Analiza histopatologică a modificărilor cerebrale.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.1.4. Analiza histopatologică a modificărilor pancreatice .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.1.5. Analiza histopatologică a modificărilor miocardice.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.2. Analiza histopatologică a grupului 2 de studiu- șobolani femele cu dietă normocalorică și normolipidică pe perioada creșterii și alăptării (grup „standard”) ....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.2.1. Analiza histopatologică a modificărilor hepatice .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.2.2. Analiza histopatologică a modificărilor renale.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.2.3. Analiza histopatologică a modificărilor cerebrale.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.2.4. Analiza histopatologică a modificărilor pancreatice .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.2.5. Analiza histopatologică a modificărilor miocardice.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.3. Analiza modificărilor histopatologice induse de tratamentul cu suplimente alimentare la descendenții femelelor din grupul 1 .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.3.1. Analiza histopatologică a modificărilor hepatice .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.3.2. Analiza histopatologică a modificărilor renale.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.3.3 Analiza histopatologică a modificărilor cerebrale.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.3.4 Analiza histopatologică a modificărilor pancreatice.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.3.5 Analiza histopatologică a modificărilor miocardice.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.4. Analiza modificărilor histopatologice induse de tratamentul cu suplimente alimentare la descendenții femelelor din grupul 2 .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>9.4.1 Analiza histopatologică a modificărilor hepatice .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

9.4.2 Analiza histopatologică a modificărilor renale.....	Error! Bookmark not defined.
9.4.3 Analiza histopatologică a modificărilor cerebrale.....	Error! Bookmark not defined.
9.4.4 Analiza histopatologică a modificărilor pancreatice.....	Error! Bookmark not defined.
9.4.5 Analiza histopatologică a modificărilor miocardice.....	Error! Bookmark not defined.
9.5. Interpretarea rezultatelor histopatologice .....	Error! Bookmark not defined.
CAPITOLUL 10.....	Error! Bookmark not defined.
<b>10. ANALIZA INTERRELAȚIEI ADIPOZITATE ECTOPICĂ – REZISTENȚĂ LA INSULINĂ ÎN MODELUL DE OBEZITATE INDUSĂ EXPERIMENTAL LA ȘOBOLAN</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
10.1. Analiza histopatologică a țesutului adipos perivisceral. Efectul dietei și tratamentului cu suplimente alimentare .....	Error! Bookmark not defined.
10.1.1. Examenul macroscopic al adipozității periviscerale .....	Error! Bookmark not defined.
10.1.2. Examenul histopatologic al adipozității periviscerale .....	30
10.2. Analiza histopatologică a țesutului muscular în funcție de tratament .....	30
10.2.1. Efectele tratamentului cu ulei de pește Omega-3 .....	Error! Bookmark not defined.
10.2.2. Efectele tratamentului cu ulei de chimen.....	Error! Bookmark not defined.
10.2.3. Efectele tratamentului cu fruct de cătină .....	Error! Bookmark not defined.
10.3. Efectul dietei și tratamentului cu suplimente alimentare asupra expresiei proteinei pAkt fosforilate la nivelul țesutului muscular .....	31
10.3.1. Efectele tratamentului cu ulei de pește Omega-3 .....	Error! Bookmark not defined.
10.3.2. Efectele tratamentului cu ulei de chimen.....	Error! Bookmark not defined.
10.3.3. Efectele tratamentului cu fruct de cătină .....	Error! Bookmark not defined.
10.4. Efectul tratamentului cu suplimente alimentare asupra expresiei proteinei Akt fosforilate - pAkt în țesutul cardiac, hepatic și renal.....	31
10.4.1. Efectele dietei și tratamentului cu suplimente alimentare în țesutul cardiac .....	Error! Bookmark not defined.
10.4.2. Efectele dietei și suplimentelor în țesutul hepatic.....	Error! Bookmark not defined.
10.4.3. Efectele dietei și suplimentelor în țesutul hepatic.....	Error! Bookmark not defined.
CONCLUZII .....	34
BIBLIOGRAFIE .....	Error! Bookmark not defined.
LISTĂ DE LUCRĂRI PUBLICATE.....	Error! Bookmark not defined.

## INTRODUCERE

Prevalența obezității a crescut dramatic în ultimele decenii. Creșterea masei corporale se corelează cu o disponibilitate sporită a alimentelor cu costuri reduse și cu aport caloric crescut. Există totuși diferențe interindividuale în susceptibilitatea la obezitate în raport cu expunerea la același mediu obezogen. Este probabil ca această variabilitate a metabolismului, a stocării energiei sau a neurohormonilor care afectează comportamentul alimentar să aibă componente genetice sau epigenetice (Arabin și Baschat, 2017).

De ce apare obezitatea? Organismul nostru nu dispune de mecanisme fiziologice de „prevenție” a obezității, el este în mod natural mai puternic orientat înspre prevenirea deficienței energetice decât spre o stocare a rezervelor metabolice în exces. Organismul nostru posedă mecanisme fiziologice de prevenire a inaniției și asigură cantitatea adecvată de energie necesară satisfacerii cerințelor energetice ale metabolismului bazal, activității fizice, creșterii și reproducerii (Klaassen și colab, 2013).

Este important de subliniat faptul că bolile generate de obezitate includ diabetul zaharat, afecțiunile cardiace, hipertensiunea, accidentul vascular cerebral și osteoartrita, iar dezvoltarea obezității la femeile care rămân gravide determină complicații grave legate de sarcină cu impact atât asupra mamelor, cât și a descendenților acestora (diabetul gestațional, hipertensiunea, preeclampsia, afectarea fetală precum defectul de tub neural, *spina bifida*, sau afectarea inimii fătului (Stupin și Arabin, 2014)).

Pe lângă tratamentul medicamentos și cel chirurgical, pentru tratarea obezității, o alternativă tot mai des recomandată și care a câștigat rapid popularitate este reprezentată de suplimentele alimentare. În momentul de față se cunoaște foarte puțin despre efectele tratamentului cu suplimente alimentare pe termen lung și despre efectele acestora în obezitatea gestațională, iar mecanismele lor de acțiune sunt insuficient studiate.

În acest context, considerăm necesară o evaluare experimentală detaliată a influenței exercitată de principii active naturale din compoziția acestor suplimente, pentru elucidarea și înțelegerea mecanismelor care stau la baza modulării homeostaziei redox celulară și a statusului inflamator de la nivel adipocitar. Astfel, studiul de față își propune să investigheze efectele produse de uleiul de pește, uleiul de chimen și fructul de cătină, cu scopul principal de a obține

noi dovezi experimentale privind efectele antioxidante și antiinflamatoare ale acestor suplimente, într-un model de obezitate maternă indusă prin dietă.

Prezenta teza de doctorat și-a propus să aducă noi contribuții în acest domeniu al obezității indusă experimental, prin evaluarea efectelor negative ale unei diete hipercalorice/hiperlipidice asupra statusului metabolic matern și cel al descendenților. De asemenea, au fost urmărite efectele administrării a trei suplimente cu acțiune antioxidantă și antiinflamatoare asupra homeostaziei redox - evaluată la nivel tisular și sistemic, asupra markerilor adipocitari și a rezistenței la insulină, și corelarea acestora cu examenul histopatologic al principalelor organe care pot fi afectate de obezitate (ficat, pancreas, inimă, creier, rinichi). Întrucât expunerea organismului matern la o dietă obezogenă poate afecta și descendenții, influențând procesele metabolice, creșterea și dezvoltarea acestora, investigarea efectelor unor compuși naturali utilizați sub forma de suplimente alimentare pe o perioadă mai extinsă de timp a devenit un alt obiectiv de soluționat. Studiul deschide noi perspective pentru gestionarea obezității și a sarcinii în obezitate și vine în sprijinul găsirii unor noi remedii cu mai puține efecte secundare decât medicamentele obținute prin sinteză chimică, pentru tratamentul și prevenirea comorbidităților asociate obezității.

Lucrarea de față s-a axat pe studiul obezității în cursul sarcinii deoarece sarcina oferă organismului oportunitatea de a modula mediul intrauterin: „*Pregnancy as a window for future health*”. Deci studiul unor intervenții farmacologice și nutriționale realizate în cursul gestației ne pot da un indiciu real privind beneficiile asupra stării de sănătate a descendenților.

Plecând de la conceptul că mecanismele epigenetice și antagonismul dintre viața pre- și post-natală au creat termenul de „origine fetală” pentru numeroase maladii, această teză și-a propus obținerea de noi date referitoare la o serie de aspecte neelucidate privind influența obezității maternale asupra fenotipului și profilului metabolic al descendenților, și a efectului administrării în cursul gestației a unor suplimente alimentare pe bază de compuși naturali.

## CONTRIBUȚII ORIGINALE

### MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

Scopul acestei lucrări de doctorat este de a compara printr-un set de studii experimentale realizate pe modele animale de obezitate, efectul a trei suplimente alimentare asupra unor comorbidități asociate obezității. Din multitudinea de efecte benefice descrise în literatura biomedicală pentru numeroși compuși naturali au fost selectate pentru acest studiu următoarele surse naturale de micronutrienți: uleiul de pește, uleiul de chimen și fructul de cătină.

Unul din criteriile pentru alegerea acestor suplimente o reprezintă efectele lor comune – antioxidant și antiinflamator, bine documentate în literatură. Pornind de la cele două calități ale acestor suplimente alimentare, studiul și-a propus optimizarea tratamentului unor comorbidități asociate obezității precum ficatul gras non-alcoolic (NAFLD), dislipidemia, pancreasul gras non-alcoolic (NAFPD), etc.

De asemenea, cele trei suplimente alimentare utilizate în acest studiu au fost selectate ținând cont de popularitatea lor în rândul pacienților și de accesibilitatea lor pe piața farmaceutică. În prezent există și sunt utilizate de publicul larg numeroase suplimente cu efect antiinflamator și antioxidant recunoscut, dintre care studiul de față a inclus: uleiul de pește (Lysi), uleiul de chimen (Imunoprotect) și fructul de cătină.

Plecând de la premisa că fiecare din compușii activi prezenți în aceste surse naturale își pot exercita efectul protector asupra unui anumit „țesut țintă” (adipos, pancreatic, hepatic, etc) prin acest studiu ne-am propus identificarea suplimentului farmaceutic „ideal” care să exercite în mod optim aceste efecte protectoare antioxidante și antiinflamatoare.

Aceste cunoștințe ar putea deschide noi posibilități clinicienilor de a aplica un management personalizat în obezitate prin utilizarea unor terapii naturale.

Studiul de față este de tip experimental, și a fost realizat pe șobolani Wistar femele la care obezitatea a fost indusă experimental, prin dietă, fiind evaluat efectul acestor suplimente alimentare asupra unor biomarkeri de stres oxidativ și de inflamație, la nivel sistemic și tisular – prin metode biochimice și histopatologice. Efectul antioxidant și antiinflamator al tratamentului cu suplimente alimentare a fost urmărit și la descendenții animalelor cu obezitate indusă experimental.

Cu ajutorul acestei abordări de studiu, lucrarea își propune să aducă noi dovezi experimentale pentru a răspunde mai multor întrebări:

- Asocierea acestor suplimente alimentare unei diete hipercalorică și hiperlipidică este suficientă pentru a contracara perturbările metabolice din obezitate?

- Administrarea acestor suplimente ar putea preveni modificările la nivel tisular generate de dieta hipercalorică și hiperlipidică tipică obezității?

- În cazul unui răspuns afirmativ, există o afinitate a fiecărui supliment alimentar pentru un anumit tip de țesut? Dacă mai multe suplimente au afinitate pentru un anumit țesut, atunci care din ele are o capacitate protectoare mai mare?

- Luând în considerare principalele mecanisme patogenice din obezitate: stresul oxidativ, inflamația și rezistența la insulină, care dintre suplimente ar putea acționa țintit asupra unuia dintre mecanisme?

- Afectarea maternă și a descendenților dată de o dietă hipercalorică și hiperlipidică asociată obezității poate fi ameliorată de aceste suplimente? Care este cel mai recomandat?

Mai mult, am dorit ca prin efectuarea unui **studiu comparativ a trei suplimente alimentare cu efecte antiinflamatoare și antioxidante**, să identific o variantă optimă de tratament, care **să nu implice administrarea de medicamente obținute prin sinteză chimică**, adeseori **cu contraindicații în timpul sarcinii și cu potențiale efecte adverse asupra oricărui tip de pacient**, indiferent de **vârstă** sau de alte **stări fiziologice sau patologice speciale**, în care s-a putea afla.

Primul obiectiv al acestui studiu a fost acela de a evalua impactul expunerii animalelor de experiență – șobolani femele și descendenții lor- la o dietă obezogenă pe toată durata creșterii, dezvoltării, sarcinii și alăptării puilor. Astfel, au fost induse experimental două modele de obezitate: 1) printr-o expunere continuă a animalelor la o dietă hipercalorică/hiperlipidică, pe tot parcursul creșterii, gestației și alăptării, și 2) printr-o expunere limitată la dietă hipercalorică/hiperlipidică doar în cursul gestației, deci pentru inducerea unei obezități post-gestaționale. În acest context, s-a evaluat la nivel sistemic și tisular efectului proinflamator și citotoxic al acestei diete prin evaluarea dinamicii unor parametri biochimici de status metabolic global, status adipocitar (adiponectina, rezistina) și homeostazie redox.

Cel de-al doilea obiectiv al acestui studiu a fost evaluarea potențialul farmacologic – antiinflamator, antioxidant, hipolipemiant și hipoglicemiant, al celor trei suplimente alimentare-

uleiul de pește, uleiul de chimen și fructul de cătină, administrate concomitent cu dieta obezogenă la animale cu cele două tipuri de obezitate indusă experimental, atât la șobolanii femelă cât și la descendenții acestora.

Modelele experimentale de tratament utilizate în acest studiu au avut ca finalitate evaluarea efectului de ameliorare a inflamației, stresului oxidativ și rezistenței la insulină induse de dieta obezogenă, deci pentru a evidenția în măsură aceste tratamente cu suplimente naturale pot reversa complicațiile obezității.

Cel de-al treilea obiectiv a fost reprezentat analiza modificărilor histopatologice induse de dieta hiperlipidică/hipercalorică și de administrarea celor trei suplimente alimentare, prin descrierea particularităților patologice, citologice și histologice evidențiate în țesutul hepatic, renal, cerebral, pancreatic și cardiac.

Cel din urmă obiectiv al acestui studiu a avut în vedere evaluarea interrelației adipozitate ectopică – rezistență la insulină. Țesutului adipos cu localizare ectopică a fost analizat atât din punct de vedere macroscopic cât și din punct de vedere histopatologic iar rezistența la insulină a fost estimată prin analizarea imunohistochimică a expresiei proteinei fosforilate pAkt, implicată în translocarea transportorului de glucoză 4 (GLUT4) stimulat de insulină.

## MATERIALE ȘI METODE

### Animale de experiență. Schema studiului experimental

S-au utilizat 60 șobolani rasa Wistar, femele, în vârstă de 3 săptămâni, provenite de la Biobaza Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila". Șobolani au fost selectați astfel încât să se încadreze cu greutatea inițială în intervalul 50-60 g. Animalele au avut acces nelimitat la hrană și apă într-un mediu ambiental cu temperatură constantă,  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  și umiditate ( $50\pm 10\%$ ), cu ciclul zi-noapte de 12 ore. Procedurile experimentale au respectat reglementările Directivei 86/609/EEC, din 24 noiembrie 1986, privind protecția animalelor folosite în scop experimental sau științific. Studiul a fost aprobat de Comisia de Etică a UMF „Carol Davila”.

Animalele au fost împărțite în mai multe grupuri și loturi de studiu, în funcție de dietă și de tratamentul cu suplimente alimentare.

Animalele au fost împărțite în două grupuri în funcție de dieta urmată până la maturitate, timp de 10 săptămâni, din momentul înțărării.

Astfel, grupul 1 (n=30 șobolani) cu obezitate indusă experimental (sau grup „gras”), a primit o dietă hipercalorică și hiperlipidică, în timp ce grupul 2 (n=30 șobolani), a primit o dietă normocalorică și normolipidică pe toată perioada creșterii (grup „standard”).

Dieta normocalorică și normolipidică a constat în nutreț combinat granulat, fabricat la Stațiunea Băneasa (nutreț cu nr. de identificare ROB 0001) și apă la discreție.

Dieta hipercalorică/hiperlipidică a constat în grăsimi saturate (30% din aportul caloric) sub formă de unt 80% și glucide sub formă de ciocolată albă. Scopul administrării acestui tip de dietă a fost inducerea experimentală a obezității.

Ambele grupuri – grupul „gras” și grupul „standard” - au fost puse la montă și au fost subîmpărțite egal (n=6 șobolani), fiecare în câte 5 loturi de tratament organizate în paralel, care au primit pe toată perioada gestației, adică de la montă până la nașterea puilor, timp de 3 săptămâni, următoarele suplimente alimentare:

- Lot cu dietă hipercalorică/hiperlipidică și ulei de cod Lysi, 0.1 g/kg corp;
- Lot cu dietă hipercalorică/hiperlipidică și Imunoprotect®, 0.1 g/kg corp;
- Lot cu dietă hipercalorică/hiperlipidică și fructe de cătină, 1 g/kg corp;
- Lot cu dietă hipercalorică/hiperlipidică, fără supliment alimentar asociat (lot de control fără tratament);

- Lot cu dietă normocalorică și normolipidică pe perioada alăptării, fără supliment alimentar asociat (lot de control cu dietă standard, fără tratament).

De remarcat faptul că toate cele 10 loturi de tip „gras” și „standard” din ambele grupuri au avut o dietă hipercalorică/hiperlipidică pe timpul gestației, diferențierea dintre loturi făcându-se pe baza dietei din perioada de creștere și din perioada alăptării.

Mai exact, grupul 1 - „gras” a fost crescut pe dietă grasă și a continuat cu dieta grasă pe perioada alăptării, în timp ce grupul 2 – „standard” a fost crescut pe dietă standard, iar pe perioada alăptării a revenit pe dietă standard. Subliniem că pe perioada gestației, femelele din ambele grupuri, indiferent de lot au avut dietă hipercalorică/hiperlipidică.

După perioada de gestație, femelele împreună cu puii lor au fost monitorizate până la înțarcarea puilor, adică timp de încă 3 săptămâni, deci până la 19 săptămâni-vârsta mamelor, moment în care atât mamele cât și puii au fost sacrificați.

## **Determinări biochimice**

### **Markeri de stres oxidativ evaluați la nivel tisular**

#### **Determinarea MDA (malondialdehidei) în omogenatele tisulare**

Nivelul malondialdehidei (MDA) a fost măsurat ca marker al peroxidării lipidice conform metodei descrise de Esterbauer (Esterbauer și colab., 1990).

#### **Determinarea tiolilor totali în omogenatele tisulare**

Metoda are ca principiu formarea unui compus colorat intens în galben cu reactivul Ellman (acidul 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic, DTNB), reprezentat de acidul 2-nitro-5-mercaptobenzoic, având maxim de absorbție la lungimea de undă de 412 nm. (Beutler și colab., 1963).

#### **Determinarea glutatationului total în omogenatele tisulare**

Metoda are ca principiu formarea unui compus colorat în galben, reprezentat de acidul 2-nitro-5-mercaptobenzoic ( $pK=4$ ), având maxim de absorbție la lungimea de undă de 412 nm. Complexul se formează în mediu bazic, asigurat de soluția tampon TRIS EDTA, pH 8.9, având ca etapă precursoră precipitarea proteinelor cu TCA 20% (Beutler și colab., 1963).

### **Markeri de stres oxidativ evaluați la nivel sistemic**

### **Determinarea superoxid dismutazei (SOD) în eritrocite**

Metoda determinării este enzimatică, cu ajutorul sistemului generator de anion superoxid xantină-xantin-oxidază, în prezența unei sări de tetrazoliu 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)- 2H tetrazolium (INT).

### **Determinarea glutation peroxidazei (GPx) în eritrocite**

Metoda are ca principiu scăderea absorbanței NADPH la 340 de nm, în urma oxidării NADPH la NADP sub acțiunea glutation reductazei (GR).

### **Determinarea glutationului total (GSH+GSSG) în sânge**

Metoda are ca principiu formarea unui compus colorat în galben, reprezentat de acidul 2-nitro-5-mercaptobenzoic ( $pK=4$ ), având maxim de absorbție la lungimea de undă de 412 nm. Se lucrează pe sânge total, iar eritrocitele sunt hemolizate.

### **Markeri ai funcției adipocitare evaluați la nivel sistemic**

#### **Determinarea adiponectinei serice**

Adiponectina serică s-a evaluat printr-o metodă imunoenzimatică de tip ELISA (kitul EIA 4172, DRG International Inc. USA) ce utilizează o tehnică de tip ”sandwich”.

#### **Determinarea rezistinei serice**

Determinarea rezistinei serice s-a făcut prin metodă imunoenzimatică (ELISA), cu ajutorul kitul EIA 4283, DRG International Inc. USA.

## **2.4. Evaluarea parametrilor de biochimie clinică**

Parametrii de biochimie clinică s-au efectuat prin metode standardizate cu ajutorul unor kituri enzimatică produse de firma Hospitex Diagnostics.

#### **Determinarea glucozei serice**

Determinarea glicemiei are la bază o metodă enzimatică spectrofotometrică. Glucoza este oxidată în prezența glucoz-oxidazei, iar apa oxigenată eliberată formează chinonimina, în reacție cu fenolul și 4-aminofenazona, sub acțiunea catalitică a peroxidazei.

#### **Determinarea trigliceridelor serice**

Metoda de determinare începe cu hidroliza enzimatică a trigliceridelor la glicerol și acizi grași.

#### **Determinarea acidului uric seric**

Metoda de determinare are la bază metoda enzimatică, spectrofotometrică. Enzima uricaza oxidează acidul uric din probă la alantoină, dioxid de carbon și apă oxigenată.

### **Determinarea albuminei serice**

Metoda de determinare a albuminemia este spectrofotometrică, albumina formând cu verde de bromcrezol în tampon citrat cu pH 4.2 un complex cu maxim de absorbție la 546 nm.

### **Determinarea colesterolului seric**

Principiul metodei se bazează pe o metodă enzimatică ce presupune hidroliza colesterolului esterificat și apoi oxidarea cu formare de apă oxigenată, care determină o reacție de culoare cu 4-aminofenazona și cu fenolul, formându-se chinonimina cu maxim de absorbție la 500 nm.

### **Determinarea proteinelor totale**

Reactivul biuret format din sulfat de cupru, tartrat dublu de sodiu și potasiu, iodură de potasiu și hidroxid de sodiu formează un compus colorat în violet, cu proteinele plasmatică cu maxim de absorbție la 546 nm.

### **Determinarea alanin amino transferazei (ALT)**

Principiul metodei este spectrofotometric indirect, bazat pe diferența de absorbție în ultraviolet (340 nm) a coenzimei reduse  $\text{NADH} + \text{H}^+$  față de coenzima oxidată  $\text{NAD}^+$ .

### **Determinarea aspartat aminotransferazei (AST)**

Principiul metodei este spectrofotometric indirect, bazat pe diferența de absorbție în ultraviolet (340 nm) a coenzimei reduse  $\text{NADH} + \text{H}^+$  față de coenzima oxidată  $\text{NAD}^+$ .

### **Determinarea ureei serice**

Principiul determinării se bazează pe hidroliza enzimatică a ureei sub acțiunea ureazei.

**Determinarea HDL-colesterolului** are loc printr-o metodă indirectă care presupune precipitarea lipoproteinelor care conțin ApoB și separarea HDL-C în supernatant.

### **Determinarea gamma-glutamil transferazei**

Determinarea se face folosind ca substrat L-gamma-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida.

### **Examenul histopatologic**

Examenul histopatologic s-a efectuat la animalele de experiență din toate loturile studiate pe următoarele organe prelevate: ficat, rinichi, creier, pancreas și inimă și țesut muscular.

Prima etapă de lucru a constat în fixarea probelor recoltate în soluție tamponată de formol 10%, timp de 24 h, urmată de spălare, deshidratarea în băi succesive de alcool 70%, 96% și absolut și apoi procesarea lor folosind tehnica la parafină. Procesarea și includerea la parafină s-au făcut

automat în procesorul de țesuturi Thermo Scientific STP 120-3, iar includerea în parafină s-a realizat cu ajutorul stației Thermo Scientific Microm EC 350-1.

După includerea fragmentelor de organe, blocurile au fost secționare la 3-4 μm și etalate pe lame histologice cu ajutorul microtomului Leica RM 125RTS. Aparatul Thermo Scientific Microm HMS 70 a fost folosit pentru colorarea lamelor, și s-a folosit colorația hematoxilină-eozină (H&E) pentru țesuturile studiate.

Microscopul Olympus BX 41, dotat cu sistem de achiziție Olympus SP350, a fost folosit la examinarea preparatelor histologice, iar pentru analiza imaginilor obținute s-a folosit programul semiautomat de analiză imagine Olympus Cell^B.

Pentru interpretarea cât mai exactă a hepatopatiilor s-a recurs la acordarea unui scor lezional histopatologic, care să permită gruparea acestora în hepatopatie minoră, medie sau gravă (Militaru și colab., 2008). Indicatorii integrității morfologice hepatice au fost:

- Aspectul hepatocitelor: tip de leziune, grad de extindere, grad de exprimare lezională;
- Reacția celulelor Kupffer: absente (neevidențiate), prezente (cu sau fără semne de activare);
- Capilarele sinusoidale: neevidențiate (fără lumen), evidențiate, extaziate cu definirea cauzei (hiperemie/staza, leucocitoza);
- Spațiul Disse: neevidențiat, evidențiat cu definirea cauzei;
- Spațiul portal: fără modificări (reducere infiltrat celular), afectat cu definirea tipului de modificare;
- Alte leziuni observate (afectarea canaliculelor/canalelor biliare, microfocare de necroză, micronoduli leucocitari, infiltrate celulare, granuloame etc.).

S-a utilizat o cheie de interpretare a încadrării fiecărui caz într-o anumită categorie de hepatopatii. Punctajul s-a acordat în funcție de gradul de alterare al elementelor examinate, astfel:

#### Hepatopatia minoră (4-5 puncte):

- Aspectul hepatocitelor: modificări degenerative minore cu afectarea hepatocitelor izolate – 1 punct
- Reacția celulelor Kupffer: prezente dar fără semne de activare – 1 punct
- Capilarele sinusoidale: hiperemie activă focală sau difuză – 1 punct sau stază discretă, fără leucocitoză – 1 punct sau staza focală – 2 puncte
- Spațiul Disse: neevidențiat – 0 puncte
- Spațiul portal: hiperemie, edem – 1 punct sau reacție leucocitară redusă – 1 punct
- Aspectul general al ficatului și alte aspecte surprinse: fără modificări, arhitectura conservată – 0 puncte.

#### Hepatopatia medie (6-10 puncte)\*:

- Aspectul hepatocitelor: modificări degenerative (hidroprotidice, protidice și lipidice) uniform repartizate, difuze, fără afectarea viabilității celulare – 2 puncte
- Reacția celulelor Kupffer: numeroase și active – 2 puncte
- Capilarele sinusoidale: stază difuză cu ectazie vasculară evidentă – 2 puncte sau neevidențiate (fără lumen) datorită tumefierii hepatocitare – 2 puncte
- Spațiul Disse: evidențiat – edem – 1 punct sau evidențiat – acumulare de metaboliți – 2 puncte
- Spațiul portal: hiperplazia canalelor biliare – 2 puncte
- Aspectul general al ficatului și alte aspecte surprinse: fără modificări, arhitectura conservată – 0 puncte.

#### Hepatopatie gravă (11-18 puncte)\*:

- Aspectul hepatocitelor: modificări degenerative grave, extinse, cariomegalie, cu fenomene de moarte celulară – 3 puncte
- Reacția celulelor Kupffer: numeroase și active – 2 puncte
- Capilarele sinusoidale: leucocitoză – 3 puncte
- Spațiul Disse: evidențiat – fibrozare – 3 puncte
- Spațiul portal: puternic infiltrat celular, cu tendința de extindere interlobulară; fibroza – 3 puncte
- Aspectul general al ficatului și alte aspecte surprinse: microfocare de necroză celulară areactivă – 1 punct sau evidențierea canaliculelor biliare, rare microfocare de infiltrat leucocitar – 2 puncte sau focare purulente, granulomatoase, infiltrat eozinofilic sau alt tip de reacție inflamatorie clar exprimată – 3 puncte sau ciroza sau aspect de hepatită fibroasă interstițială – 4 puncte.

#### **Evaluarea grăsimii ectopice prin colorație Sudan**

Microscopic, lipidele au fost evidențiate pe preparate la gheață, secționate la criotom, cu colorația histochimică Sudan III (portocaliu) (colaborare cu Spitalul Fundeni București).

#### **Evaluarea imunohistochimică a proteinei Akt fosforilate (pAkt)**

Evaluarea imunohistochimică a fost efectuată pe țesut muscular, inimă, rinichi și ficat. P-Akt (Thr 308)-R este un anticorp obținut pe iepuri ca răspuns la o secvență aminoacidică care conține proteina Akt de origine umană Thr 308. Anticorpul este folosit pentru evidențierea celor 3 izoforme de p-Akt (proteina fosforilată) la diverse specii (șoarece, șobolan, om, cal și păsări). Aplicarea anticorpului s-a făcut pe secțiunile obținute din blocurile de parafină ale țesuturilor studiate. Pe mai multe secțiuni obținute din porțiuni diferite ale aceluiași țesut, pe câmpuri microscopice, s-a făcut numărătoarea nucleilor colorați în violet (care corespund proteinei Akt

nefosforilate) comparativ cu cei colorați în maro (care corespund proteinei Akt fosforilate-pAkt). Evaluarea s-a efectuat de către doi observatori, în mod independent. În cazul nucleilor care aveau o combinație între cele două culori, intensitatea colorației predominante a fost considerată pentru numărătoare. Media valorilor pentru fiecare dintre cele două variante (nuclei violeți și nuclei maro) a fost calculată și trecută în tabelul cu rezultate.

### **Analiza statistică**

Toate rezultatele au fost calculate ca valori medii  $\pm$  deviația standard (SD) a cel puțin trei experimente independente (n=3). Datele au fost reprezentate relativ la control și au fost analizate pentru semnificația statistică utilizând testul Student (*t*-test). O valoare  $p < 0,05$  a fost considerată semnificativă. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  și \*\*\* $p < 0,001$  față de control.

## **EFFECTUL DIETEI HIPERCALORICĂ/ HIPERLIPIDICĂ ȘI A TRATAMENTULUI CU SUPLEMENTE ALIMENTARE ASUPRA DINAMICII PARAMETRIILOR DE BIOCHIMIE CLINICĂ LA ȘOBOLANI CU OBEZITATE INDUSĂ EXPERIMENTAL**

### **Evoluția parametrilor de biochimie clinică la șobolani femele**

În cadrul fiecărui grup de studiu, valorile medii ale parametrilor biochimici de la loturile de animale tratate cu suplimente alimentare s-au comparat cu valorile obținute la Lotul gras 1, considerat ca lot de control cu dietă hipercalorică/hiperlipidică, la care nu s-a administrat tratament.

Lotul standard grup 2 a fost considerat ca lot de control „absolut” (dietă standard pe durata creșterii și alăptării, fără tratament), fiind utilizat pentru a verifica efectul dietei hipercalorică/hiperlipidică asupra animalelor, deci pentru a verifica modelul de obezitate indusă experimental, prin dietă.

În studiul nostru, șobolani femele din loturile „gras”, fără tratament cu suplimente alimentare, din ambele grupuri au avut valorile cele mai mari pentru parametrii biochimici de status metabolic: glicemie, trigliceridemie, colesterolemie, uree și acid uric. Deci creșterea în greutate a fost însoțită de hiperglicemie, hipertrigliceridemie, hipercolesterolemie, hiperuremie, hiperuricemie și valori scăzute ale fracțiunii HDL- colesterol.

Aceste valori confirmă inducerea experimentală prin dietă hipercalorică/hiperlipidică, a obezității asociată cu perturbări ale metabolismului glucidic și lipidic. Se remarcă faptul că

ambele modele de obezitate indusă experimental - în care șobolanii femele au primit, fie o dietă hipercalorică/hiperlipidică în cursul creșterii, gestației și alăptării (Grupul 1), fie doar în cursul gestației (Grupul 2) - au fost exprimate fenotipic în mod specific, atât la nivelul greutateii corporale, cât și a parametrilor biochimici metabolici. Perturbările metabolice determinate de dieta hipercalorică sunt exprimate în mod similar în cele două grupuri de studiu.

În urma administrării celor trei suplimente alimentare – ulei de pește, ulei de chimen și fruct de cătină - se observă ca prim efect o normalizare semnificativă a valorilor parametrilor biochimici metabolici, în funcție de lotul de tratament.

Trigliceridele serice au scăzut semnificativ la toate loturile de tratament din cele două grupuri de studiu. Glicemia a fost semnificativ îmbunătățită după administrarea celor 3 suplimente alimentare în grupul 2, iar în grupul 1 s-au remarcat efecte benefice numai în cazul loturilor tratate cu cătină și ulei de chimen. Colesterolemia a fost moderat diminuată numai la loturile tratate cu ulei de pește. HDL-colesterolul a crescut semnificativ la grupul 1, la toate loturile de tratament. Ca o remarcă, efectele benefice asupra parametrilor de biochimie clinică sunt mult mai evidente la grupul 1 de studiu, cu dietă hipercalorică/hiperlipidică în cursul creșterii, gestației și alăptării.

Cele trei suplimente alimentare utilizate în acest studiu au fost selectate ținând cont de popularitatea lor în rândul pacienților și de accesibilitatea lor pe piața farmaceutică. În prezent există și sunt utilizate de publicul larg numeroase suplimente cu efect antiinflamator și antioxidant recunoscut, dintre care studiul de față a inclus: uleiul de pește (Lysi), uleiul de chimen (Imunoprotect) și fructul de cătină.

La animalele din Grupul 1 „gras” (cu dietă hipercalorică/hiperlipidică în cursul creșterii, gestației și alăptării), uleiul de pește a avut cele mai numeroase efecte benefice asupra metabolismului lipidic și glucidic: a normalizat valorile colesterolului, trigliceridelor și glicemiei, și a crescut semnificativ valorile HDL-colesterol. Efectul benefic s-ar putea datora proprietății acizilor grași Omega-3 de a crește beta-oxidarea acizilor grași, prevenind acumularea lor sub forma de trigliceride.

Uleiul de chimen a avut un efect hipolipemiant numai asupra trigliceridelor și a îmbunătățit semnificativ valorile HDL-colesterol.

Fructul de cătină a corectat cel mai semnificativ ( $p < 0,001$ ) valorile mari ale glicemiei și a trigliceridelor, probabil prin efectul antioxidant datorat concentrației mari de flavonoide (Wang,

2011, Gao, 2014) și a conținutului crescut în acid palmitoleic semnalat în unele studii (Gao, 2017, Shi, 2016)

Toate cele trei suplimente utilizate ca tratament au avut și un efect hepatoprotector, scăzând activitatea transaminazelor (AST ȘI ALT). În plus, uleiul de pește a acționat cel mai semnificativ și asupra activității GGT și acidului uric, ca markeri de toxicitate, inflamație, risc metabolic și cardiovascular.

Studiul nostru subliniază și aduce ca noutate faptul că efectul hipolipemiant, deși prezent la toate cele trei suplimente, este puternic semnificativ în cazul uleiului de pește, pentru ambele grupuri de studiu. Mai mult, acizii grași polinesaturați Omega 3 din uleiul de pește au crescut valorile HDL colesterolului.

De asemenea, toate suplimentele au scăzut glicemia, dar cățina s-a dovedit a fi cel mai eficient produs natural pentru corectarea hiperglicemiei cronice indusă de dieta hipercalorică.

La animalele din Grupul 2 – cu obezitate post-gestațională (cu dietă hipercalorică/hiperlipidică doar în cursul gestației), uleiul de pește a avut un efect net hipolipemiant și de detoxifiere, spre deosebire de uleiul de chimen și fructul de cătină care au acționat numai la nivelul metabolismului trigliceridelor și al glicemiei. Ușoare creșteri, semnificative ( $p < 0.05$ ) ale HDL-colesterolului au fost semnalate numai la lotul tratat cu ulei de chimen.

### **Evoluția parametrilor de biochimie clinică la descendenții șobolanilor femele cu obezitate indusă experimental**

Se remarcă faptul că puii femelelor din grupul 1 care au primit o dietă hipercalorică/hiperlipidică pe toată durata vieții, au prezentat dereglări ale metabolismului lipidic manifestate prin hipercolesterolemie și hipertrigliceridemie, fără să fie asociate cu hiperglicemie.

În cazul descendenților ce provin de la șobolanii femele din grupul 2 care au primit o dietă hipercalorică/hiperlipidică numai în cursul gestației, au prezentat dereglări ale metabolismului lipidic manifestate prin hiperglicemie asociată cu hipercolesterolemie și hipertrigliceridemie.

Se remarcă faptul că, spre deosebire de femelele din Grupul 1, în cazul descendenților acestora, tratamentul cu cele trei suplimente administrat în cursul dezvoltării foetale a avut o

eficacitate semnificativă în scăderea colesterolului. Iar tratamentul cu cele trei suplimente a îmbunătățit semnificativ valoarea trigliceridelor, la fel ca în cazul femelelor.

În cazul Grupului 2, tratamentul mamelor în cursul gestației nu avut efect hipolipemiant asupra colesterolului dar toate cele 3 suplimente au acționat prin reducerea semnificativă a nivelului trigliceridelor. Numai tratamentul cu cătină a avut un efect semnificativ, dar slab, de reducere a glicemiei.

Din evaluarea parametrilor de biochimie clinică reiese faptul că descendenții femelelor din cele două grupuri de studiu au prezentat perturbări ale metabolismul glucidic și lipidic exprimate diferit și au reacționat diferențiat la tratamentul cu suplimente alimentare.

### **EFFECTUL DIETEI HIPERCALORICĂ/ HIPERLIPIDICĂ ȘI A TRATAMENTULUI CU SUPLEMENTE ALIMENTARE ASUPRA BIOMARKERILOR DE STRES OXIDATIV EXPRIMAȚI LA NIVEL SISTEMIC: SOD, GPX, GLUTATION TOTAL**

La șobolanii femelă dieta hipercalorică/ hiperlipidică administrată pe toată durata vieții (Grup 1) sau numai pe perioada gestației (Grup 2) a indus schimbări semnificative și în valorile biomarkerilor de stres oxidativ evaluați la nivel sistemic.

Se semnaleză faptul că toți cei trei biomarkeri evaluați la nivel eritocitar la femelele din grupul 1, au crescut semnificativ la toate loturile tratate cu suplimente alimentare. La grupul 2 activitatea SOD a scăzut semnificativ la loturile tratate cu fruct de cătină și ulei de chimen, în timp ce activitatea GPx a crescut semnificativ la toate loturile tratate, iar glutatiunul total sanguin a crescut semnificativ la loturile tratate cu fruct de cătină și ulei de chimen.

La descendenții din grupul 1, glutatiunul total sanguin a crescut semnificativ loturile tratate cu fruct de cătină și ulei de pește. La descendenții din grupul 2, glutatiunul total sanguin a crescut semnificativ doar la lotul tratat cu fruct de cătină.

În studiul nostru, femelele din lotul gras grup 1 au avut valoarea SOD cea mai mică, și consideram ca enzima SOD s-a “epuizat” în condițiile unui stres oxidativ crescut. Pe de altă parte, activitatea SOD eritocitară la femelele din lotul gras grup 2 a fost cea mai crescută, probabil ca mecanism compensator la stresul oxidativ blând indus de dieta grasă pe perioada celor 3 săptămâni de gestație. Diferențele activităților enzimei SOD dintre cele două grupuri,

sunt datorate severității diferite a stresului oxidativ sistemic, acesta fiind mai intens la grupul cu dietă grasă administrată timp îndelungat.

Spre deosebire de SOD, GPx-ul a avut valori asemănătoare, mici, în ambele grupuri de femele la loturile gras 1 și gras 2.

Fructul de cătină s-a dovedit a fi remediul care a îmbunătățit cel mai mult valorile SOD din ambele grupuri.

În studiul de față, uleiul de pește a modulată activitatea enzimelor SOD și GPx, dar nu semnificativ. Mecanismul de modulare a activității acestor enzime poate fi și indirect, uleiul de pește reducând stresul oxidativ sistemic, astfel activitatea SOD nu mai trebuie să fie mărită compensator.

În plus, GSH total evaluat la nivel sanguin a fost semnificativ scăzut la loturile gras grup 1 și gras grup 2, iar fructul de cătină a fost suplimentul care a crescut semnificativ concentrația acestuia.

Se observă că Grupul 1 al descendenților este cel mai afectat de stresul oxidativ, înregistrând valorile cele mai scăzute ale glutatationului total. Astfel, chiar dacă acești descendenți nu au primit decât lapte matern, fără suplimente alimentare, dar și fără dietă hipercalorică, obezitatea maternă a compromis echilibrul redox, indicând un stres oxidativ accentuat. Mai mult, și Grupul 2 al descendenților a fost afectat de stres oxidativ, deși într-o mai mică măsură, sugerând astfel că durata administrării unei diete grase la mame poate influența statusul antioxidant al descendenților acestora, crescând stresul oxidativ, fapt dovedit de valorile glutatationului total din aceste două grupuri.

Corelând rezultatele SOD, GPx și glutatation total între Grupul 1 și Grupul 2 al mamelor, se observă că stresul oxidativ în grupul 1 a fost mai accentuat decât în grupul 2.

Fructul de cătină s-a dovedit a fi cel mai eficient supliment privind corectarea valorilor glutatationului total și a superoxid dismutazei, iar uleiul de chimen a crescut cel mai mult valorile GPx.

În concluzie, obezitatea crește stresul oxidativ atât la mame, cât și la descendenții acestora, astfel fiind indicată administrarea unui supliment antioxidant pe perioada sarcinii, care să aducă un aport adițional de nutrienți și care să îmbunătățească capacitatea nou-născuților de a rezista față de stresul oxidativ.

## **EFACTUL DIETEI HIPERCALORICĂ/ HIPERLIPIDICĂ ȘI A TRATAMENTULUI CU SUPLEMENTE ALIMENTARE ASUPRA BIOMARKERILOR DE STRES OXIDATIV EXPRIMAȚI LA NIVEL TISULAR, LA ȘOBOLANI CU OBEZITATE INDUSĂ EXPERIMENTAL**

La șobolanii femelă dieta hipercalorică/ hiperlipidică administrată pe toată durata vieții (Grup 1) sau numai pe perioada gestației (Grup 2) a indus schimbări semnificative și în valorile biomarkerilor de stres oxidativ evaluați la nivel tisular, evaluat în ficat, rinichi, creier, pancreas, inimă și splină.

În studiul nostru, se observă că uleiul de pește Omega-3 și uleiul de chimen au redus semnificativ peroxidarea lipidică în ficat. De asemenea, fructul de cătină a redus peroxidarea lipidică în pancreas, rinichi și inimă, iar la nivelul creierului, acizii grași Omega 3 au avut efect neuroprotector. În tandem cu reducerea peroxidării lipidice hepatice, se observă că uleiul de chimen a crescut apărarea antioxidantă în ficat prin creșterea glutatationului total. De asemenea, uleiul de chimen a avut efect antioxidant hepatic prin creșterea tiolilor totali proteici în ficat. Fructul de cătină a determinat creșterea tiolilor totali pe rinichi și a glutatationului total în pancreas și inimă.

Subliniem faptul că rezultatele benefice ale suplimentelor alimentare se suprapun la cele două modele de obezitate indusă prin dietă: grup 1 și grup 2.

Din analiza integrată a rezultatelor privind dinamica markerilor tisulari de stres oxidativ, ce caracterizează atât gradul de lezare al lipidelor (MDA), cât și sistemele antioxidante (grupări tiol -SH, glutatation, GSH), studiul demonstrează că toate cele trei suplimente au redus stresul oxidativ tisular printr-un posibil mecanism dual: printr-o scădere a peroxidării lipidice și o creștere a apărării antioxidante. Astfel:

- uleiul de pește bogat în Omega-3 a redus peroxidarea lipidică în ficat și creier;
- uleiul de chimen a redus peroxidarea lipidică, dar a crescut și apărarea antioxidantă în ficat;
- fructul de cătină a redus peroxidarea lipidică și a crescut apărarea antioxidantă în două țesuturi, rinichi și pancreas.

Utilizarea celor trei suplimente a avut beneficii prin limitarea stresului oxidativ tisular, cu efecte diferite în funcție de țesut după cum urmează:

- uleiul de pește bogat în Omega 3 a redus peroxidarea lipidică în ficat și creier;
- uleiul de chimen a redus peroxidarea lipidică, dar a crescut și apărarea antioxidantă în ficat;

-fructul de cătină a redus peroxidarea lipidică și a crescut apărarea antioxidantă în două țesuturi: rinichi și pancreas.

Expunerea descendenților la obezitatea maternă a determinat apariția stresului oxidativ, fapt marcat prin alterarea valorilor markerilor specifici de peroxidare lipidică (MDA), tioli și glutation. Prin administrarea unui supliment alimentar pe perioada sarcinii și alăptării, aceste valori au putut fi corectate, scăzând astfel riscul descendenților de a dezvolta obezitate sau rezistență la insulină pe parcursul dezvoltării ulterioare.

Reducerea stresului oxidativ la nivel tisular se corelează cu aspectul îmbunătățit al imaginilor histopatologice din grupurile de femele tratate cu suplimente alimentare, față de lotul netratat (lot gras grup 1 și respectiv lot gras grup 2).

## **EFFECTUL DIETEI HIPERCALORICĂ/ HIPERLIPIDICĂ ȘI A TRATAMENTULUI CU SUPLEMENTE ALIMENTARE ASUPRA BIOMARKERILOR ADIPOCITARI: ADIPONECTINA ȘI REZISTINA**

În studiul nostru, adiponectina serică a avut valorile cele mai mici la loturile gras grup 1 și grup 2 iar asocierea suplimentelor la dieta hiperlipidică/hipercalorică a îmbunătățit valorile acestei adipocitokine.

Uleiul de pește și fructul de cătină au crescut semnificativ valorile adiponectinei comparativ cu concentrația adipocitokinei în lotul gras grup 1 (fără tratament). Cu alte cuvinte, aceste două suplimente au avut efectul cel mai benefic asupra scăderii rezistenței la insulină, ținând cont de faptul că adipocitokina îmbunătățește mult sensibilitatea la insulină.

În studiul prezent, rezistina, a avut variații în oglindă față de adiponectină. Astfel, cele mai mari valori ale rezistinei au fost înregistrate la loturile gras din grupul 1 și grupul 2 de femele, iar uleiul de pește a reversat către normal concentrațiile acestei adipocitokine.

În acest studiu, determinarea concomitentă a expresiei celor două adipocitokine, adiponectina și rezistina, implicate în controlul rezistenței la insulină din cadrul obezității, a permis pentru prima oară o comparație între cele trei suplimente, a eficienței acestora, corelată, în același timp cu durata administrării unei diete hipercalorice/hiperlipidice. Uleiul de pește și fructul de cătină au dovedit a fi cele mai eficiente remedii în corectarea valorilor celor două adipocitokine.

## **ANALIZA MODIFICĂRILOR HISTOPATOLOGICE INDUSE DE DIETA HIPERCALORICĂ/ HIPERLIPIDICĂ ȘI DE TRATAMENTUL CU SUPLIMENTE ALIMENTARE**

Efectul tratamentului cu suplimente alimentare exprimat la nivel tisular prin modificări de natură histopatologică este ilustrat prin imagini reprezentative de microscopie optică. Acestea sunt însoțite de descrierea particularităților patologice, citologice și histologice evidențiate în țesutul hepatic, renal, cerebral, pancreatic și cardiac.

În studiul nostru, dieta hipercalorică/hiperlipidică a determinat modificări histopatologice pe toate țesuturile studiate: ficat, rinichi, creier, pancreas, inimă, splină.

Femelele din grupul 1, cu excepția grupului standard au urmat dietă grasă timp de 16 săptămâni (10 săptămâni pe perioada de creștere, de la înțarcare, până la atingerea maturității, 3 săptămâni pe perioada sarcinii și 3 săptămâni pe perioada alăptării). Femelele din grupul 2, cu excepția lotului standard, au urmat dietă grasă timp de 6 săptămâni (3 săptămâni pe perioada sarcinii și 3 săptămâni pe perioada alăptării). Durata dietei grase a avut un impact pronunțat negativ tisular, dovadă fiind modificările histopatologice severe din grupul 1, în timp ce, în grupul 2, unele modificări histopatologice, induse de dieta grasă, au putut fi reversate.

### **Discuții asupra rezultatelor histopatologice hepatice**

Femelele din lotul gras grup 1 au dezvoltat hepatopatie medie asociată cu sindrom inflamator evident. Administrarea suplimentelor pe timpul sarcinii și alăptării a ameliorat aspectul histopatologic al ficatului, observându-se o reversie de la hepatopatie medie la hepatopatie minoră. Dintre cele trei remedii, uleiul de pește a avut efectul antiinflamator histopatologic cel mai pronunțat, până la dispariția totală a inflamației.

Femelele din lotul gras grup 2, după șase săptămâni de dietă grasă au dezvoltat hepatopatie minoră asociată cu inflamație. În loturile cu suplimentele ulei pește și ulei chimen din grupul 2, s-a observat o reversie totală a modificărilor histopatologice hepatice, obținându-se un aspect tisular normal. Administrarea fructului de cătină a menținut aspectul de hepatopatie minoră, dar a redus sindromul inflamator local tisular, astfel, la examenul histopatologic s-a descris doar leucocitoză discretă.

Loturile standard de la ambele grupuri de femele se diferențiază de cele care au luat suplimente prin menținerea inflamației, ceea ce subliniază încă o dată efectul antiinflamator al celor trei remedii.

De menționat că atât uleiul de chimen, cât și uleiul de pește, conțin vitamina E, care este un bun antioxidant și ajută exportul trigliceridelor din ficat. În studiul nostru, efectele hepatoprotectoare ale acestor uleiuri, sunt potențate de prezența vitaminei E.

Ca o concluzie, toate cele 3 suplimente au avut efect hepatoprotector, dar uleiul de pește a cumulat cele mai multe rezultate benefice, având cel mai pronunțat efect antiinflamator.

### **Discuții asupra rezultatelor histopatologice renale**

Femelele din lotul gras grup 1 au avut tubulonefroză granulo-vacuolară asociată cu inflamația. Suplimentele au îmbunătățit aspectul histopatologic renal, protejând celula renală, împiedicând apariția vacuolizărilor și reducând inflamația. Dintre cele trei remedii, efectul antiinflamator renal cel mai pronunțat s-a observat la grupul la care s-a administrat fruct de cătină.

La grupul standard fără remediu infiltratul inflamator a persistat, alături de distrofia granulară.

Femelele din lotul gras grup 2 au dezvoltat tubulonefroză și tubulonecroză asociate cu inflamația. Două dintre remedii, adică uleiul de chimen și fructul de cătină, au reversat la normal aspectul histopatologic renal. Uleiul de pește a îmbunătățit aspectul renal histopatologic, dar focal s-au păstrat imagini de distrofie granulară. La lotul standard din grupul 2 a persistat aspectul de tubulonefroză asociată cu inflamația. În concluzie, toate cele trei remedii s-au dovedit a fi renoprotectoare, dar fructul de cătină a fost cel mai eficient dintre ele.

### **Discuții asupra rezultatelor histopatologice cerebrale**

Femelele din lotul gras grup 1 au avut modificări severe cerebrale caracterizate prin necroza neuronilor Purkinje, hemoragii și edem în cerebel. De asemenea, s-au descris celule cerebrale cu citoplasmă bazofilă, ceea ce corespunde unui metabolism modificat. La lotul standard s-au observat vacuolizări nespecifice cerebrale. La loturile cu remedii, uleiul de pește și uleiul de chimen au protejat cortexul de efectele lezante ale dietei grase, menținând cortexul normal. Fructul de cătină a avut efecte protectoare cerebrale mai reduse, astfel, la lotul cu cătină s-au păstrat zone de necroză focală a neuronilor Purkinje.

La femelele din lotul gras grup 2, dieta grasă, fără remediu, a determinat modificări cerebrale caracterizate prin cariopicnoză și celule cu metabolism alterat (celule cu citoplasmă intens bazofilă). La lotul cu dietă standard s-a observat același aspect de cariopicnoză și de celule cu citoplasmă intens bazofilă. Două remedii, uleiul de chimen și fructul de cătină au protejat

parțial țesutul cerebral, dovadă fiind persistența unor zone de necroză focală a neuronilor Purkinje. În schimb, uleiul de pește s-a dovedit cel mai bun remediu, menținând aspectul normal al creierului în condițiile unei diete grase.

### **Discuții asupra rezultatelor histopatologice pancreatice**

La femelele din lotul gras grup 1 dieta grasă a determinat modificări histopatologice multiple: edem periacinar discret, vacuolizări citoplasmatică în insulele Langerhans și inflamație. Două dintre remedii, uleiul de pește și uleiul de chimen, au protejat parțial pancreasul de leziunile dietei hipercalorice/hiperlipidice, la aceste loturi fiind încă prezente izolate vacuolizări citoplasmatică în insulele Langerhans și inflamație peripancreatică. Interesant este că la lotul standard, vacuolizările nu sunt prezente, dar inflamația deși este discretă, este prezentă perilobular. Aceste aspecte histopatologice subliniază efectul antiinflamator al remediilor și, în plus, atrag atenția asupra vulnerabilității pancreasului la agresiunea unei diete hipercalorice/hiperlipidice.

Fructul de cătină a protejat pancreasul, conservând aspectul normal al insulelor Langerhans și diminuând inflamația periacinară.

La femelele din lotul gras grup 2, dieta grasă pe timp de șase săptămâni a determinat doar izolat vacuolizări citoplasmatică ale celulelor din insulele Langerhans, iar toate cele trei remedii au menținut aspectul normal al celulelor pancreatice și au contracarat inflamația. Lotul standard din grupul 2 a prezentat izolat vacuolizări citoplasmatică în insulele Langerhans.

### **Discuții asupra rezultatelor histopatologice cardiace**

La femelele din lotul gras grup 1, dieta grasă timp îndelungat a determinat dilacerarea celulelor miocardice, edem și inflamație. La loturile cu suplimente, infiltratul inflamator a fost discret și edemul a fost prezent izolat. Inimile șobolanilor din lotul standard grup 1 a avut un aspect histopatologic similar cu cel al inimilor șobolanilor din loturile tratate cu suplimente.

La femelele din lotul gras grup 2 au fost prezente: edemul interfibrilar, degenerescența hialină multiplă și infiltratul inflamator. La lotul standard din grupul 2, degenerescența hialină a fost de asemenea prezentă, iar pe arii focale a persistat inflamația. La loturile cu remedii, inflamația a fost mai discretă, dar degenerescența hialină focală s-a menținut. În concluzie, efectul cardioprotector al remediilor a fost modest și similar.

În studiul nostru, descendenții din femele cu dietă grasă timp îndelungat<sup>\*</sup>, fără remediu au avut modificări histopatologice hepatice, pancreatice, renale, cardiace și cerebrale severe, comparativ cu modificările minore ale descendenților din femele cu dietă grasă timp scurt<sup>\*\*</sup>.

Comparând cele 2 loturi, s-au observat: hepatopatie medie vs. hepatopatie minoră, vacuolizări citoplasmice pancreatice vs. celule pancreatice integre, modificări degenerative renale vs. celule renale integre, mici hemoragii cerebrale vs. țesut cerebral fără hemoragii și dilacerări ale celulelor cardiace vs. celule cardiace integre. De asemenea, toate țesuturile analizate ale descendenților din femele cu dietă grasă timp lung au avut un grad de inflamație mai sever față de inflamația modestă a descendenților din femele cu dietă grasă timp scurt.

Comparând descendenții, în funcție de suplimentul asociat dietei mamei, cei proveniți din femele care au luat acizi grași din uleiul de pește și din chimen au avut cele mai bune rezultate histopatologice și biochimice hepatice și cerebrale. Pancreasul și rinichiul au avut un aspect histopatologic îmbunătățit și valori tisulare de stres oxidativ mai mici la lotul descendenților din femele tratate cu fruct de cătină.

La descendenți, cu toate că ei nu au primit suplimente alimentare în mod direct direct, fiind doar alăptați, există variații ale valorilor parametrilor stresului oxidativ tisular și sanguin, care sunt în concordanță cu rezultatele histopatologice. Considerăm că imaginile histopatologice ale tuturor țesuturilor puilor din femele gras grup 1 sunt impresionante, existând vacuolizări celulare, modificări degenerative, edem, inflamație. Suplimentele alimentare au avut efect dovedit antiinflamator în toate țesuturile. Comparând descendenții din femele grup 1 cu omologii lor din femele grup 2, primii au avut afectare tisulară hepatică și pancreatică mai severă, precum și un profil metabolic mai deteriorat. De exemplu, descendenții din femele grup 1 au avut hepatopatie medie și inflamație periacinară pancreatică, în timp ce descendenții din femele grup 2 au avut hepatopatie minoră și respectiv inflamație peripancreatică. Diferențele pot fi puse doar pe seama dietei mamelor dinainte de a deveni gestante. Menționăm încă o dată că diferențele dintre grupul 1 și grupul 2 sunt legate de dieta grasă respectiv standard a femelelor până la vârsta maturității, când devin gestante. Pe timpul sarcinii și alăptării există identitate în ceea ce privește dieta și suplimentul celor două grupuri. În concluzie, extrapolând la om, dieta și stilul de viață

---

\* Dieta grasă timp de 10 săptămâni înainte de sarcină și apoi și pe parcursul sarcinii și alăptării.

\*\* Dieta standard timp de 10 săptămâni înainte de sarcină și apoi și pe parcursul sarcinii și alăptării.

până la perioada gestației poate avea influență pe descendenți. Obezitatea de dinainte de sarcină și pe timpul sarcinii lasă o „amprentă” pe dezvoltarea ulterioară a fătului. Asocierea unui supliment cu efect antioxidant și antiinflamator, ca cele din studiul nostru, ameliorează și poate preveni efectele negative ale unei diete hipercalorice/hiperlipidice de pe timpul sarcinii și a alăptării.

Compoziția laptelui matern afectează clar dezvoltarea și stresul oxidativ sistemic și tisular al puilor. Descendenții mamelor aflate pe dietă grasă timp îndelungat fără supliment alimentar au avut valorile cele mai mari ale peroxidării lipidice tisulare și, în general, valorile cele mai mici ale apărării antioxidante tisulare. Remediile asociate dietei hipercalorice/hiperlipidice, la mame, au prevenit efectele severe lezante ale acestei diete.

Prezența unui supliment, oricare dintre ele (ulei de pește sau ulei de chimen sau fruct de cătină) pe perioada sarcinii și alăptării, a avut efecte benefice la descendenți proveniți din ambele loturi de femele. Mamele puilor care pe perioada sarcinii au fost pe dietă grasă și ulterior, pe perioada alăptării au fost pe dietă standard, au dat naștere la descendenți care au avut un aspect histopatologic al țesuturilor studiate caracterizat prin inflamație evidentă. Cele care au continuat cu un supliment alimentar pe timpul alăptării, în ciuda dietei grase pe toată perioada până la înțarcare, au dat naștere la descendenți la care modificările inflamatorii tisulare sunt discrete sau absente. Rezultatul histopatologic tisular subliniază efectul antiinflamator al celor trei remedii.

Tabelele de mai jos cuprind o sinteză a interpretării rezultatelor histopatologice pe loturile și grupurile studiate (Tab. 9.1- 9.4).

**Tabel 9.1. Aspect histopatologic – lot femele grup 1**

Organ	Femele grup 1				
	Lot gras+ulei pește	Lot gras+ulei chimen	Lot gras+fruct cătină	Lot gras grup 1	Lot standard grup 1
<b>Ficat</b>	Hepatopatie minoră, fără inflamație	Hepatopatie minoră, leucocitoză discretă	Hepatopatie minoră	Hepatopatie medie	Hepatopatie minoră
<b>Rinichi</b>	Tubulonefroză granulară, fără inflamație	Focal, tubulonefroză granulară, cu inflamație	Tubulonefroză granulară, fără inflamație	Tubulonefroză granulo-vacuolară, cu infiltrat inflamator evident	Distrofie glanulară cu infiltrate inflamator discret
<b>Creier</b>	Cortex normal	Vacuolizări nespecifice și focal neuronii Purkinje citoplasmă bazofilă.	Necroză focală a neuronilor Purkinje. Cortex normal	Necroza neuronilor Purkinje, edem, hemoragii la nivelul cerebelului; citoplasmă bazofilă	Vacuolizări nespecifice
<b>Pancreas</b>	Inflamație discretă, peripancreatit, izolat vacuolizări citoplasmatic	Inflamație peripancreatică, vacuolizări citoplasmatic	Inflamație discretă	Vacuolizări citoplasmatic, edem discret periacinar;	Inflamație discretă perilobular; Nu sunt descrise vacuolizări
<b>Inimă</b>	Ușoară inflamație, edem discret	Ușoară inflamație, edem discret	Infiltrat inflamator discret	Inflamație; edem cu dilacerare celule	Izolată edem; Infiltrat inflamator minim

**Tabel 9.2. Aspect histopatologic – lot femele grup 2**

Organ	Femele grup 2				
	Lot gras+ulei pește	Lot gras+ulei chimen	Lot gras+fruct cătină	Lot gras grup 2	Lot standard grup 2
<b>Ficat</b>	Aspect normal	Aspect normal	Leucocitoză discretă; Hepatopatie minoră	Hepatopatie minoră; Inflamație	Hepatopatie minoră; Inflamație minimă
<b>Rinichi</b>	Focal distrofie granulară și tubulonefroză	Aspect normal	Aspect normal	Tubulonefroză Tubulonecroză granulară și infiltrat inflamator	Discret inflamație cu tubulonefroză
<b>Creier</b>	Aspect normal	Necroză focală a neuronilor Purkinje.	Necroză focală a neuronilor Purkinje. Edem perineuronal.	Cariopinoză; citoplasmă intens bazofilă	Cariopinoză; citoplasmă intens bazofilă
<b>Pancreas</b>	Aspect normal	Aspect normal	Aspect normal Rar, inflamație discretă	Inflamație, vacuolizări	Izolată vacuolizări
<b>Inimă</b>	Degenerescență hialină focală	Izolată fibre dilacerate și inflamație discretă	Ușoară dilatare, discret inflamație	Edem interfibrilar, degenerescență hialină multiplă, infiltrat inflamator	Leucocitoză discretă, degenerescență hialină focală

**Tabel 9.3. Aspect histopatologic – lot descendenți grup 1**

Organ	Pui grup 1				
	Lot gras+ulei pește	Lot gras+ulei chimen	Lot gras+fruct cătină	Lot gras grup 1	Lot standard grup 1
<b>Ficat</b>	Aspect normal	Hepatopatie minoră	Leucocitoză discretă; Hepatopatie minoră	Hepatopatie medie; Inflamație	Hepatopatie medie; Inflamație minimă
<b>Rinichi</b>	Aspect normal	Aspect normal; Izolată tubulonefroză granulară	Aspect normal	Tubulonefroză granulo-vacuolară; inflamație	Discret inflamație cu degenerescență granulară
<b>Creier</b>	Aspect normal	Necroză focală a neuronilor Purkinje.	Necroză focală a neuronilor Purkinje. Vacuolizări nespecifice.	Hemoragii mici. Cariopinoză; citoplasmă intens bazofilă	Cariopinoză; citoplasmă intens bazofilă
<b>Pancreas</b>	Aspect normal; Inflamație peripancreatică	Izolată cu infiltratie lipidică stromala	Aspect normal; inflamație discretă peripancreatică	Inflamație periacinară, vacuolizări celule Langerhans	Izolată vacuolizări; Inflamație peripancreatică
<b>Inimă</b>	Dilatare moderată a cardiomiocitelor și inflamație	Sarcoplasmă oxifilă; dilatare izolată	Sarcoplasmă oxifilă, izolat celule fragmentate și inflamație discretă	Cardiomiocite dilacerate Inflamație; vasele coronare trombozate.	Cardiomiocite dilacerate izolat și inflamație discretă.

**Tabel 9.4. Aspect histopatologic – lot descendenți grup 2**

Organ	Pui grup 2				
	Lot gras+ulei pește	Lot gras+ulei chimen	Lot gras+fruct cătină	Lot gras grup 2	Lot standard grup 2

<b>Ficat</b>	Aspect normal	Aspect normal	Aspect normal	Hepatopatie minora; Inflamație	Hepatopatie minoră, inflamație
<b>Rinichi</b>	Aspect normal	Aspect normal; tubulonefroză granulara	Aspect normal	Tubulonefroză, granulo-vacuolară; inflamație	Tubulonefroza granulară, inflamație
<b>Creier</b>	Aspect normal	Aspect normal	Aspect normal	Multifocal necroză neuroni Purkinje, vacuolizări nespecifice	Focal necroză neuronală
<b>Pancreas</b>	Aspect normal;	Aspect normal	Aspect normal	Vacuolizari celule insule Langerhans și inflamație peripancreatică.	Edem periacinar si perilobular inflamație discretă
<b>Inimă</b>	Dilacerare cardiomiocite moderat	Aspect normal și edem	Aspect normal	Fragmentare miofibrilară și inflamație	Cardiomiocite dilacerate focal

## **ANALIZA INTERRELAȚIEI ADIPOZITATE ECTOPICĂ – REZISTENȚĂ LA INSULINĂ ÎN MODELUL DE OBEZITATE INDUSĂ EXPERIMENTAL LA ȘOBOLAN**

### **Analiza histopatologică a țesutului adipos perivisceral. Efectul dietei și tratamentului cu suplimente alimentare**

Particularitățile evidențiate de efectul dietei hipercalorice/ hiperlipidice și tratamentului cu suplimente alimentare, au fost studiate la nivelul țesutului adipos cu localizare ectopică, acesta fiind analizat din punct de vedere macroscopic cât și din punct de vedere histopatologic la femelele din cele două grupuri de studiu.

#### **Interpretarea încărcării grase tisulare și peritissulare**

Grăsimea ectopică este prezentă intervisceral abdominal, perihepatic, pericardiac și peripancreatic, ulterior cu „invazie” interstițială. De asemenea, grăsimea ectopică poate fi evidențiată la nivel muscular. În mod normal, excesul de grăsime trebuie depozitat în țesutul adipos subcutanat. Excesul caloric favorizează formarea grăsimii ectopice.

Grăsimea viscerală este mult mai ușor mobilizabilă decât grăsimea periferică subcutanată și se asociază cu valori mari ale acizilor grași liberi, precum și cu valori mai mari ale citokinelor proinflamatorii.

În studiul nostru, aspectul macroscopic și evaluarea greutateii grăsimii interviscerale abdominale evidențiază o cantitate mai redusă de țesut adipos intraabdominală la lotul care a primit fruct de cătină din grupul 1 și la lotul cu ulei de pește din grupul 2.

Făcând o comparație între loturile grup 1 și grup 2 se observă o diferență semnificativă asupra cantității de grăsime interviscerală iar în loturile grup 2 asocierea suplimentelor a contracarat mai eficient acumularea de grăsime abdominală.

La nivelul rinichiului, se poate observa grăsimea perirenală care este în cea mai mare cantitate la lotul gras grup 1. De asemenea, comparând cele două grupuri, femelele din grupul 2 au avut mai puțină grăsime perirenală în toate loturile, comparativ cu grupul 1. Pe lângă examenul macroscopic, acest fapt a fost confirmat și în urma cântăririi rinichilor împreună cu grăsimea perirenală. Valorile determinate în grupul 1 au evidențiat greutăți superioare celor din grupul 2.

În urma analizei macroscopice a ficatului, s-a putut observa încărcătura lipidică cea mai mare în lotul gras grup 1.

Grăsimea peripancreatică este cea mai abundentă la loturile gras din ambele grupuri. Prin contrast cu aceste imagini, aspectul pancreasului este îmbunătățit la loturile cu supliment fruct de cătină, volumul pancreatic fiind mai mare, iar grăsimea peripancreatică fiind discretă. Rezultatul este susținut și de greutățile mai mari ale pancreasului din loturile cu fruct de cătină.

La nivelul inimii nu s-au observat diferențe macroscopice în ceea ce privește grăsimea pericardiacă.

### **Examenul histopatologic al adipozității periviscerale**

În studiul nostru, încărcarea lipidică a organelor studiate: ficat, rinichi, inimă și pancreas a fost estimată prin colorație Sudan, iar rezistența la insulină a fost estimată prin metoda imunohistochimică folosind anticorpi pAkt pentru a evidenția prezența proteinei fosforilate în țesuturi. În studiul nostru, la lotul gras grup 1, colorația Sudan pe organele studiate evidențiază prezența lipomatozei cardiace și pancreatice și o încărcare grasă perirenală și intramusculară. Încărcarea lipidică tisulară și procentul de proteină pAkt s-au corelat pe loturile studiate.

### **Analiza histopatologică a țesutului muscular în funcție de tratament**

**Interpretarea rezultatelor histopatologice cu colorație hematoxină-eozină pe țesutul muscular scheletic**

În studiul nostru, în urma comparării rezultatelor histopatologice pe mușchi, șobolanii cu dietă grasă din ambele grupuri au deja afectare musculară. De exemplu, mușchii șobolanilor din loturile gras grup 1 și grup 2 prezintă hialinoză musculară, fibre musculare dilacerate, edem, hiperemie, iar metabolismul celulei musculare este alterat. Modificările sunt mai severe pe lotul gras grup 1 față de lotul gras grup 2, ceea ce demonstrează importanța duratei dietei grase. Oricare dintre loturile cu remedii au prezentat mușchi cu aspect histopatologic îmbunătățit, față de lotul gras din fiecare grup. Cu alte cuvinte, tratamentul cu suplimentele alimentare a adus un beneficiu asupra mușchilor, întârziind evoluția spre hialinoză, reducând edemul și hiperemia. Spre exemplu, pe probele gras grup 1 cu ulei de chimen și ulei de pește, se văd fibre oxifile cu tendință spre hialinoză și dilacerări izolate. Fructul de cătină a fost cel mai eficient în protecția musculară, dovadă fiind conservarea strițiilor musculare la examenul histopatologic și hiperemia izolată.

#### **Efectul dietei și tratamentului cu suplimente alimentare asupra expresiei proteinei pAkt fosforilate la nivelul țesutului muscular**

Studii recente sugerează faptul că proteinkinaza B serin/treonin kinazică (PKB sau pAkt) este implicată în translocarea transportorului de glucoză 4 (GLUT4) stimulat de insulină, deci în captarea intracelulară a glucozei în țesuturile periferice. În studiul de față fost analizată expresia imunohistochimică a proteinei Akt fosforilate- pAKT la nivelul țesutului muscular, la șobolanii femele din cele două grupuri de studiu, folosind anticorpul anti-Akt.

#### **Efectul tratamentului cu suplimente alimentare asupra expresiei proteinei Akt fosforilate - pAkt în țesutul cardiac, hepatic și renal**

A fost analizată expresia imunohistochimică a proteinei Akt fosforilate- pAKT la nivelul țesutului cardiac, hepatic și renal, la șobolanii cu obezitate indusă experimental (grupul 1).

În studiul nostru, încărcarea lipidică a organelor studiate: ficat, rinichi, inimă și pancreas a fost estimată prin colorație Sudan, iar rezistența la insulină a fost estimată prin metoda imunohistochimică folosind anticorpi pAkt pentru a evidenția prezența proteinei fosforilate în țesuturi. La lotul gras grup 1, colorația Sudan pe organele studiate evidențiază prezența lipomatozei cardiace și pancreatice și o încărcare grasă perirenală și intramusculară. Încărcarea lipidică tisulară și procentul de proteină pAkt s-au corelat pe loturile studiate.

Proteina Akt este implicată în supraviețuirea celulară, în proliferarea și creșterea celulară, în metabolismul glicogenului și în sensibilitatea la insulină. Această proteină se găsește atât în

țesuturi neoplazice cât și în cele non neoplazice (Robey și colab., 2009). Pentru a evalua activitatea acestei kinaze au fost luate în considerație intensitatea colorației și numărul de celule colorate în maro (evidențiază prezența proteinei Akt fosforilate) versus cele în albastru (evidențiază prezența proteinei Akt nefosforilate), după aplicarea anticorpului.

### **Interpretarea rezultatelor imunohistochimice ale expresiei proteinei pAkt**

Proteina Akt poate fi fosforilată la mai multe resturi hidroxil, de exemplu la treonina 308, sau treonina 405 precum și la serina 473. Anticorpii pAkt sunt folosiți pentru a evidenția prezența proteinei fosforilate în țesuturi. În studiul nostru, am folosit anticorpi pAkt (Thr 308) 1/2/3 și am urmărit prezența izoformei 2 în mușchiul scheletic, la șobolani femele Wistar grup 1 și grup 2.

Observând rezultatele, se putem spune că în ambele grupuri, loturile de femele Wistar gras grup 1 și gras grup 2 au procentul cel mai mic de proteine pAkt, iar loturile la care s-a asociat un supliment la dieta hipercalorică/hiperlipidică, au avut proteina pAkt prezentă în cantități mai mari. Fructul de cătină și uleiul de pește asociate dietei grase au influențat cel mai mult creșterea cantității de pAkt. Comparând grupul 1 cu grupul 2, se observă valoarea impresionant de mică a pAkt la femelele din lotul gras grup 1, ceea ce ar concorda cu o rezistență crescută la insulină.

Aspectul imunohistopatologic al inimii la femelele grup 1 concordă cu imaginea mușchilor scheletici tratați cu anticorpi pAkt, în sensul că procentul cel mai mic de proteină pAkt a fost prezent la lotul gras fără remediu. Suplimentele asociate dietei grase au crescut procentul de proteină pAkt din cord cu valori similare.

La femelele din grupul 1, atât pe ficat cât și pe rinichi, procentul de proteină Akt fosforilată este cel mai scăzut la lotul gras grup 1, fără remediu. Pe ficat, suplimentul cu ulei de pește a crescut semnificativ concentrația proteinei pAkt, iar pe rinichi, fructul de cătină a îmbunătățit rezultatul imunohistochimic bazat pe evaluarea raportului dintre proteina Akt fosforilată și nefosforilată.

Observând rezultatele pe loturile grase și făcând o paralelă între valorile procentuale scăzute ale pAkt din mușchiul scheletic și din inimă, cu dezechilibrul adipocitokinelor serice (adiponectină scăzută și rezistină crescută) și cu cantitatea grăsimii ectopice, se poate spune că toate converg către rezistența la insulină. Totodată, rezultatele imunohistopatologice pe rinichi și pe ficat

concordă cu aspectele histopatologice cu colorație hematoxilină-eozină și ne ajută să conchidem pentru fiecare remediu care este țesutul țintă.

Studiul nostru a demonstrat că uleiul de pește a crescut semnificativ proteina Akt fosforilată la nivelul ficatului, în timp ce fructul de cătină a acționat semnificativ la nivel renal. De asemenea, corelând aceste rezultate și cu aspectul histopatologic, aceste suplimente ar putea inhiba depozitarea lipidelor ectopice, prin reglarea metabolismului lipidic și prin creșterea sensibilității la insulină pe calea proteinei Akt. Comparând cele două loturi, se observă că femelele Gras Grup 1 au avut proteina Akt fosforilată mult mai puțin față de lotul Gras Grup 2, ceea ce ar putea fi corelat cu rezistență crescută la insulină.

Dintre cele trei suplimente alimentare, s-au remarcat uleiul de pește Omega 3 cu eficacitate crescută la nivel hepatic și fructul de cătină cu afinitate pentru rinichi. La nivelul mușchiului și al inimii, atât uleiul de pește, fructul de cătină, dar și uleiul de chimen și-au demonstrat potențialul efect protector.

## CONCLUZII

**Primul obiectiv** al acestui studiu a fost acela de a evalua impactul expunerii animalelor de experiență – șobolani femele și descendenții lor- la o dietă obezogenă pe toată durata creșterii, dezvoltării, sarcinii și alăptării puilor. Astfel, au fost induse experimental două modele de obezitate:

1) printr-o expunere continuă a animalelor la o dietă hipercalorică/hiperlipidică, pe tot parcursul creșterii, gestației și alăptării, și

2) printr-o expunere limitată la dietă hipercalorică/hiperlipidică doar în cursul gestației, deci pentru inducerea unei obezități post-gestaționale.

În acest context, s-a evaluat la nivel sistemic și tisular efectului proinflamator și citotoxic al acestei diete prin evaluarea dinamicii unor parametri biochimici de status metabolic global, status redox, și adipocitar.

**Cel de-al doilea obiectiv** al acestui studiu a fost evaluarea potențialului farmacologic al celor trei suplimente alimentare- uleiul de pește, uleiul de chimen și fructul de cătină, administrate concomitent cu dieta obezogenă, atât la șobolani femelă cât și la descendenții acestora.

În studiul nostru, **șobolani femele din loturile „gras”, fără tratament cu suplimente alimentare, din ambele grupuri au prezentat valorile cele mai mari pentru parametrii biochimici de status metabolic: glicemie, trigliceridemie, colesterolemie, uree și acid uric.** Deci creșterea în greutate a fost însoțită de hiperglicemie, hipertrigliceridemie, hipercolesterolemie, hiperuremie, hiperuricemie și valori scăzute ale fracțiunii HDL- colesterol.

Aceste valori **confirmă inducerea experimentală prin dietă hipercalorică/hiperlipidică, a obezității asociată cu perturbări ale metabolismului glucidic și lipidic.** Se remarcă faptul că ambele modele de obezitate indusă experimental - în care șobolani femele au primit, fie o **dietă hipercalorică/hiperlipidică în cursul creșterii, gestației și alăptării (Grupul 1)**, fie doar în cursul **gestației (Grupul 2)** - au fost exprimate fenotipic în mod specific, atât la nivelul greutății corporale, cât și a parametrilor biochimici metabolici. Perturbările metabolice determinate de dieta hipercalorică sunt exprimate în mod similar în cele două grupuri de studiu.

**În urma administrării celor trei suplimente alimentare – ulei de pește, ulei de chimen și fruct de cătină - se observă ca prim efect o normalizare semnificativă a valorilor parametrilor biochimici metabolici, în funcție de lotul de tratament.**

**Trigliceridele serice au scăzut semnificativ la toate loturile de tratament din cele două grupuri de studiu. Glicemia a fost semnificativ îmbunătățită după administrarea celor 3 suplimente alimentare în grupul 2, iar în grupul 1 s-au remarcat efecte benefice numai în cazul loturilor tratate cu cătină și ulei de chimen. Colesterolemia a fost moderat diminuată numai la loturile tratate cu ulei de pește. HDL-colesterolul a crescut semnificativ la grupul 1, la toate loturile de tratament. Ca o remarcă, efectele benefice asupra parametrilor de biochimie clinică sunt mult mai evidente la grupul 1 de studiu, cu dietă hipercalorică/hiperlipidică în cursul creșterii, gestației și alăptării.**

Rezultatele semnalate pentru cele două grupuri de studiu cu obezitate indusă experimental prin dietă, sunt în acord cu numeroase cercetări descrise în literatură biomedicală.

La animalele din **Grupul 1 „gras”** (cu dietă hipercalorică/hiperlipidică în cursul creșterii, gestației și alăptării), **uleiul de pește a avut cele mai numeroase efecte benefice asupra metabolismului lipidic și glucidic: a normalizat valorile colesterolului, trigliceridelor și glicemiei, și a crescut semnificativ valorile HDL-colesterol.**

**Uleiul de chimen a avut un efect hipolipemiant numai asupra trigliceridelor și a îmbunătățit semnificativ valorile HDL-colesterol.**

**Fructul de cătină a corectat cel mai semnificativ valorile mari ale glicemiei și a trigliceridelor**, probabil prin efectul antioxidant datorat concentrației mari de flavonoide și a conținutului crescut în acid palmitoleic semnalat în unele studii.

Se remarcă faptul că **toate cele trei suplimente utilizate ca tratament au avut și un efect hepatoprotector**, scăzând activitatea transaminazelor. În plus, **uleiul de pește a acționat cel mai semnificativ și asupra activității GGT și acidului uric, ca markeri de toxicitate, inflamație, risc metabolic și cardiovascular.**

**Studiul nostru subliniază și aduce ca noutate faptul că efectul hipolipemiant, deși prezent la toate cele trei suplimente, este puternic semnificativ în cazul uleiului de pește, pentru ambele grupuri de studiu. Mai mult, acizii grași polinesaturați Omega 3 din uleiul de pește au crescut valorile HDL colesterolului.**

De asemenea, toate suplimentele au scăzut glicemia, dar **cătina s-a dovedit a fi cel mai eficient produs natural pentru corectarea hiperglicemiei cronice indusă de dieta hipercalorică.**

La animalele din **Grupul 2 – cu obezitate post-gestațională** (cu dietă hipercalorică/hiperlipidică doar în cursul gestației), **uleiul de pește** a avut un **efect net hipolipemiant și de detoxifiere**, spre deosebire de uleiul de chimen și fructul de cătină care au acționat numai la **nivelul metabolismului trigliceridelor și al glicemiei**. Ușoare creșteri, semnificative ale HDL-colesterolului au fost semnalate numai la lotul tratat cu ulei de chimen.

În ceea ce privește **evoluția parametrilor de biochimie clinică la descendenții șobolanilor femele cu obezitate indusă experimental**, se remarcă faptul că **puii femelelor din grupul 1** care au primit o dietă **hipercalorică/ hiperlipidică pe toată durata vieții**, au prezentat dereglări ale metabolismului lipidic manifestate prin hipercolesterolemie și hipertrigliceridemie, fără să fie asociate cu hiperglicemie. În cazul descendenților ce provin de la șobolanii **femele din grupul 2** care au primit o dietă **hipercalorică/ hiperlipidică numai în cursul gestației**, aceștia au prezentat dereglări ale metabolismului lipidic manifestate prin hiperglicemie asociată cu hipercolesterolemie și hipertrigliceridemie.

Spre deosebire de femelele din Grupul 1, în cazul descendenților acestora, **tratamentul cu cele trei suplimente administrate în cursul dezvoltării foetale a avut o eficacitate semnificativă în scăderea colesterolului**, și a îmbunătățit semnificativ valoarea trigliceridelor, la fel ca în cazul femelelor.

În cazul Grupului 2, tratamentul mamelor în cursul gestației nu avut efect hipolipemiant asupra colesterolului dar toate cele 3 suplimente au acționat prin reducerea semnificativă a nivelului trigliceridelor. Numai tratamentul cu cătină a avut un efect semnificativ, dar slab, de reducere a glicemiei.

Deci, descendenții femelelor din cele două grupuri de studiu au prezentat perturbări ale metabolismul glucidic și lipidic exprimate diferit și au reacționat diferențiat la tratamentul cu suplimente alimentare.

În ceea ce privește efectul dietei și a tratamentului asupra biomarkerilor de stres oxidativ exprimați la nivel sistemic, se observă că la Grupul 1 al descendenților homeostazia redox este cel mai semnificativ afectată, deoarece se înregistrează valorile cele mai scăzute ale glutatationului total. Astfel, chiar dacă acești descendenți nu au primit decât lapte matern, fără suplimente

alimentare, dar și fără dietă hipercalorică, obezitatea maternă a compromis echilibrul redox. Grupul 2 al descendenților a fost afectat într-o măsură mai mică, sugerând astfel că durata administrării unei diete grase la mame poate influența statusul antioxidant al descendenților acestora, fapt dovedit de valorile glutatationului total din aceste două grupuri.

Prin compararea nivelurilor de activități enzimatică SOD, GPx între cele două grupuri de studiu femele, se observă că dezechilibrele redox au fost mai accentuate la grupul 1 față de grupul 2. Dintre suplimentele alimentare, fructul de cătină s-a dovedit a fi cel mai eficient privind corectarea valorilor glutatationului total și a superoxid dismutazei, iar uleiul de chimen a crescut cel mai mult valorile GPx.

**Rezultatele arată că obezitatea este asociată cu o supraexprimare a stresului oxidativ atât la mame, cât și la descendenții acestora, fiind astfel indicată administrarea unui supliment cu antioxidanți pe perioada sarcinii, care să aducă un aport adițional de nutrienți și care să îmbunătățească capacitatea nou-născuților de contracara dezechilibrele redox.**

Utilizarea celor trei suplimente a avut beneficii prin limitarea stresului oxidativ tisular, cu efecte diferite în funcție de țesut după cum urmează:

- uleiul de pește bogat în Omega 3 a redus peroxidarea lipidică în ficat și creier;
- uleiul de chimen a redus peroxidarea lipidică, dar a crescut și apărarea antioxidantă în ficat;
- fructul de cătină a redus peroxidarea lipidică și a crescut apărarea antioxidantă în două țesuturi: rinichi și pancreas.

În ceea ce privește descendenții, asocierea uleiurilor de pește și respectiv de chimen la dieta grasă a femelelor a corectat nivelurile crescute de peroxizi lipidici observate la lotul supus continuu unei diete obezogene, fără tratament cu suplimente alimentare. La pui, apărarea antioxidantă, exprimată de valorile mai mari ale glutatationului și ale tiolilor totali a fost crescută în pancreas și în inimă, la indivizii rezultați din mame care au consumat fruct de cătină. Uleiul de chimen în dieta mamelor a determinat o creștere a tiolilor totali în ficatul descendenților. Astfel, uleiul de pește a avut efect hepato, neuro și pancreato-protector, în timp ce uleiul de chimen a avut efect reno și cardio-protector. Deci prin administrarea unui supliment alimentar pe perioada sarcinii și alăptării, aceste valori au putut fi corectate, scăzând astfel riscul descendenților de a dezvolta obezitate sau rezistență la insulină pe parcursul dezvoltării ulterioare.

În acest studiu, **determinarea concomitentă a expresiei celor două adipocitokine, adiponectina și rezistina**, implicate în controlul rezistenței la insulină din cadrul obezității, a permis pentru prima oară o comparație între cele trei suplimente, a eficienței acestora, corelată, în același timp cu durata administrării unei diete hipercalorice/hiperlipidice. Uleiul de pește și fructul de cătină au dovedit a fi cele mai eficiente remedii naturale în corectarea valorilor celor două adipocitokine.

Cel de-al treilea obiectiv a fost reprezentat analiza modificărilor histopatologice induse de dieta hiperlipidică/hipercalorică și de administrarea celor trei suplimente alimentare.

În studiul nostru, dieta hipercalorică/hiperlipidică a determinat modificări histopatologice în toate țesuturile studiate: ficat, rinichi, creier, pancreas, inimă, splină. Durata dietei grase a avut un impact pronunțat negativ la nivel tisular, dovadă fiind modificările histopatologice severe din grupul 1, în timp ce, în grupul 2, unele modificări histopatologice, induse de dieta grasă, au putut fi reversate. Spre exemplu, administrarea suplimentelor pe timpul sarcinii și alăptării a ameliorat aspectul histopatologic al ficatului, observându-se o reversie de la hepatopatie medie la hepatopatie minoră. Dintre cele trei remedii, uleiul de pește a avut efectul antiinflamator histopatologic cel mai pronunțat, până la dispariția totală a inflamației. În loturile cu suplimentele ulei pește și ulei chimen din grupul 2, s-a observat o reversie totală a modificărilor histopatologice hepatice, obținându-se un aspect tisular normal. Administrarea fructului de cătină a menținut aspectul de hepatopatie minoră, dar a redus sindromul inflamator local tisular, astfel, la examenul histopatologic s-a descris doar leucocitoză discretă.

În studiul nostru, descendenții din femele cu dietă grasă timp îndelungat<sup>\*</sup>, fără remediu au avut modificări histopatologice hepatice, pancreatice, renale, cardiace și cerebrale severe, comparativ cu modificările minore ale descendenților din femele cu dietă grasă timp scurt<sup>\*\*</sup>. Comparând cele 2 loturi, s-au observat: hepatopatie medie vs. hepatopatie minoră, vacuolizări citoplasmice pancreatice vs. celule pancreatice întregi, modificări degenerative renale vs. celule renale întregi, mici hemoragii cerebrale vs. țesut cerebral fără hemoragii și dilacerări ale celulelor cardiace vs. celule cardiace întregi. De asemenea, toate țesuturile analizate ale

---

\* Dieta grasă timp de 10 săptămâni înainte de sarcină și apoi și pe parcursul sarcinii și alăptării.

\*\* Dieta standard timp de 10 săptămâni înainte de sarcină și apoi și pe parcursul sarcinii și alăptării.

descendenților din femele cu dietă grasă timp lung au avut un grad de inflamație mai sever față de inflamația modestă a descendenților din femele cu dietă grasă timp scurt.

Comparând descendenții, în funcție de suplimentul asociat dietei mamei, cei proveniți din femele care au luat acizi grași din uleiul de pește și din chimen au avut cele mai bune rezultate histopatologice și biochimice hepatice și cerebrale. Pancreasul și rinichiul au avut un aspect histopatologic îmbunătățit și valori tisulare de stres oxidativ mai mici la lotul descendenților din femele tratate cu fruct de cătină.

La descendenți, cu toate că ei nu au primit suplimente alimentare în mod direct direct, fiind doar alăptați, există variații ale valorilor parametrilor stresului oxidativ tisular și sanguin, care sunt în concordanță cu rezultatele histopatologice. Asocierea unui supliment cu efect antioxidant și antiinflamator, ca cele din studiul nostru, ameliorează și poate preveni efectele negative ale unei diete hipercalorice/hiperlipidice de pe timpul sarcinii și a alăptării.

Cel din urmă obiectiv al acestui studiu a avut în vedere evaluarea interrelației adipozitate ectopice – rezistență la insulină.

Grăsimea ectopică este prezentă intervisceral abdominal, perihepatic, pericardiac și peripancreatic, ulterior cu „invazie” interstițială. De asemenea, grăsimea ectopică poate fi evidențiată la nivel muscular. În mod normal, excesul de grăsime trebuie depozitat în țesutul adipos subcutanat. Excesul caloric favorizează formarea grăsimii ectopice.

În studiul nostru, aspectul macroscopic și evaluarea greutateii grăsimii interviscerale abdominale evidențiază o cantitate mai redusă de țesut adipos intraabdominală la lotul care a primit fruct de cătină din grupul 1 și la lotul cu ulei de pește din grupul 2.

Grăsimea peripancreatică este cea mai abundentă la loturile gras din ambele grupuri. Aspectul pancreasului este îmbunătățit la loturile cu supliment fruct de cătină, volumul pancreatic fiind mai mare, iar grăsimea peripancreatică fiind discretă. Fructul de cătină a fost cel mai eficient în protecția musculară, dovadă fiind conservarea strițiilor musculare la examenul histopatologic și hiperemia izolată.

Evaluarea comparativă a exprimării proteinei Akt în loturile studiate sugerează faptul că administrarea acestor suplimente alimentare au avut efecte benefice asupra îmbunătățirii raportului dintre proteina Akt fosforilată și cea nefosforilată. Studiul nostru a demonstrat că uleiul de pește a crescut semnificativ proteina Akt fosforilată la nivelul ficatului, în timp ce fructul de cătină a acționat semnificativ la nivel renal. De asemenea, corelând aceste rezultate și

cu aspectul histopatologic, aceste suplimente ar putea inhiba depozitarea lipidelor ectopice, prin reglarea metabolismului lipidic și prin creșterea sensibilității la insulină pe calea proteinei Akt.

### **Bibliografie citată în rezumat:**

- Arabin, B., & Baschat, A. A. (2017). Pregnancy: An Underutilized Window of Opportunity to Improve Long-term Maternal and Infant Health—An Appeal for Continuous Family Care and Interdisciplinary Communication. *Frontiers in Pediatrics*, 5.
- Beutler, E., Duron, O., & Kelly, B. M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882-888.
- Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology*, 186, 407-421.
- Gao, Z., Zhang, C., Jin, L., & Yao, W. (2014). Efficacy of Sea Buckthorn Therapy in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Chinese Medicine*, 5(4), 223.
- Klaassen, C. D., & Amdur, M. O. (Eds.). (2013). *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. New York: McGraw-Hill.
- Militaru M., Ciobotaru E., Soare T., Știrbu-Teofănescu B., Nicolaescu M., Dinescu G., Militaru D., Serdaru M., Constantinescu C., Savu C. (2008) - Microleziuni hepatice și musculare în contextul modificărilor de profil metabolic la suinele abatorizate. *Revista Română de Medicină Veterinară*, vol. 18 (1), ISSN 1220- 3173, pp 51-70.
- Robey, R. B., & Hay, N. (2009, February). Is Akt the “Warburg kinase”?—Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 19, No. 1, pp. 25-31). Academic Press.
- Shi, J., Wang, L., Lu, Y., Ji, Y., Wang, Y., Dong, K., & Sun, W. (2016). Protective effects of seabuckthorn pulp and seed oils against radiation-induced acute intestinal injury. *Journal of Radiation Research*.
- Stupin, J. H., & Arabin, B. (2014). Overweight and Obesity before, during and after Pregnancy. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 74(07), 639-645.
- Wang, J., Zhang, W., Zhu, D., Zhu, X., Pang, X., & Qu, W. (2011). Hypolipidaemic and hypoglycaemic effects of total flavonoids from seed residues of *Hippophae rhamnoides* L. in mice fed a high fat diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(8), 1446-1451.