



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2023 00513**

(22) Data de depozit: **19/09/2023**

(41) Data publicării cererii:
29/03/2024 BOPI nr. **3/2024**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE MEDICO-
MILITARĂ "CANTACUZINO",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.103,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **COMAN CRISTIN, STR.PANTAZICA
GABRIEL NR.13A, POPEȘTI- LEORDENI,
IF, RO;**

• **VLASE ENE, ȘOS.GHEORGHE IONESCU
SISEȘTI, NR.14A, SECTOR 1, BUCUREȘTI,
B, RO;**

• **LUPU ANDREEA-ROXANA,
ALEEA OTEȘANI, NR.3, BL.OD 52-54, SC.B,
ET.4, AP.64, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;**

• **ANCUȚA DIANA LARISA, STR. SOLDAT
GHIȚĂ ȘERBAN, NR.10, BL.8A, SC.1,
AP.57, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **IONIȚĂ FABIOLA, STR.JEAN ALEXANDRU
STERIADI, NR.10-14, BL.117, SC.D, ET.1,
AP.49, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **DINU ANGELICA, STR.BROSCARI NR.11,
SAT BALOTEȘTI, COMUNA BALOTEȘTI, IF,
RO**

(54) **DIETE PURIFICATE CE INDUC SINDROAME METABOLICE
(ATEROSCLEROZĂ, OBEZITATE SAU DIABET DE TIP II)
LA ROZĂTOARELE DE LABORATOR (ȘOARECE ȘI
ȘOBOLAN), PROCEDEU DE OBȚINERE ȘI METODĂ
DE UTILIZARE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de producere a unor modele animale experimentale pentru studiul mecanismelor intime și tratamentul unor tulburări metabolice. Metoda, conform invenției, constă în inducerea sindroamelor metabolice de ateroscleroză, obezitate și diabet de tip II la șoareci și șobolani de laborator prin administrarea unei diete purificate având un conținut de 17,36...27,4% proteină, 2,53...4, 47% celuloză, 3,16...34,62% grăsime, 92,79...96,36% substanță uscată, în cantități de 3...4 g/zi la șoarece și 20...22 g/zi

la șobolan, timp de 6 zile, urmate de 1 zi de administrarea furaje naturale uzuale, care induc în organismul animal modificările biochimice ale tulburărilor metabolice în perioada de 60 zile, cu monitorizarea parametrilor cu relevanță biologică crescută privind instalarea sindroamelor metabolice pentru efectuarea cercetării de bază.

Revendicări: 3
Figuri: 11

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cercetare de brevet de invenție
Nr. a 2023 0513
Data de depunere 19-09-2023

1

RO 137996 A0

ANEXĂ
Nr. A-6563 din 18 SEP. 2023

81

Diete purificate ce induc sindroame metabolice (ateroscleroză, obezitate sau diabet de tip II) la rozătoarele de laborator (șoarece și șobolan), procedeu de obținere și metodă de utilizare

Invenția se referă la diete purificate ce induc sindroame metabolice (ateroscleroză, obezitate sau diabet de tip II) la rozătoarele de laborator (șoarece și șobolan), procedeu de obținere și metodă de utilizare, destinate creării de modele animale experimentale necesare aflării mecanismelor intime ale unor maladii și de experimentare a unor tratamente.

Cercetarea mecanismelor de producere și evoluție a diferitelor entități morbide pe bază de modele experimentale ia o amploare din ce în ce mai mare în domeniu. Se caută și se stabilesc modele experimentale pentru înțelegerea și tratamentul unor boli de metabolism, boli oncologice, toxicologie etc. Studiul mecanismelor de producere și evoluție a unor entități patologice cum ar fi diabetul zaharat sau ateroscleroza preocupă categorii largi de cercetători, de la fiziopatologi și fiziologi la nutriționiști, morfopatologi, bio chimiști etc [1,2,3,4]. Totodată, cheltuielile pe care omenirea și le asumă pentru înțelegerea, prevenirea și combaterea acestor entități morbide este pe măsură. Actualele modele experimentale pentru sindroamele metabolice au mai multe neajunsuri datorate mecanismului de inducere (chimic, genetic sau chirurgical), iar administrarea de diete naturale comerciale nu a dus la rezultate satisfăcătoare în apariția sindroamelor metabolice la animalele la care s-a administrat, din cauza insuficienței caracterizării atât a dietelor cât și a loturilor de animale [5,6,7].

Dietele naturale, care conțin în compoziție ingrediente de natură vegetală (grâu, orz, ovăz, soia etc.) sau animală (făină de carne, de pește etc.) sunt cele mai utilizate. Dietele naturale sunt foarte apreciate de animale, având palatabilitate mare, au o mare disponibilitate pe piață și sunt foarte ieftine [8].

Procedeele de obținere constau în crearea de amestecuri de cereale și alte ingrediente naturale a căror componență fizico-chimică nu este pe deplin cunoscută, iar unele dintre ingrediente pot fi chiar modificate genetic.

Dezavantajul dietelor naturale constă în existența unor variații semnificative între loturile succesive de furaje datorita numărului mare de ingrediente utilizate și lipsa unei uniformități în ceea ce privește valoarea nutritivă a fiecărui ingredient în parte, care fac ca dietele naturale să nu permită o cunoaștere foarte precisă și standardizată a concentrației fiecărui principiu nutritiv [9].

Această variabilitate se poate evidenția prin lipsa de repetabilitate a rezultatelor unei testări făcută în condiții similare [10,11].

Studiile privind inducerea unor tulburări metabolice pot să nu aibă rezultatele scontate datorită tipului de dietă administrat. Astfel efectul hipertensiv al excesului de NaCl din dietă a fost estompat de prezența genisteinei (subclasă de fitoestrogeni din soia) la șobolanii la care se încerca inducerea hipertensiunii arteriale [12]. Izoflavonele din soia s-au dovedit, de asemenea, că pot reduce colesterolul și trigliceride serice [7,13] și pot preveni

dezvoltarea hepatosteatozei [15]. Efectele isoflavonelor asupra proceselor de învățare și memorare, interacțiunii sociale, anxietății, activităților locomotorii, durerii și sensibilității au fost documentate în caz de exces de fitoestrogeni [16] și în studii despre aparatul reproducător [17, 18]. În studiile privind inducerea obezității s-a observat că șobolanii hrăniți cu diete bogate în grăsime, dar care folosesc soia ca sursă de proteine, greutatea dobândită este mai mică și țesutul adipos din organism mai puțin comparativ cu șobolanii hrăniți cu diete bogate în grăsime, dar care folosesc cazeina ca sursă de proteine [19]. Studiile privind inducerea diabetului pot fi compromise de prezența boabelor de soia în dietă prin reducerea insulinoresistenței [20]. La fel și studiile privind carcinogeneza [21,22,23].

Cu certitudine poate fi susținut că nu există o dietă perfectă în domeniul cercetării pe animale de laborator, dar cel puțin, pentru a efectua experimente care să aibă un sens, ar trebui să ne străduim să eliminăm sursele de variabilitate induse de diete, în special cele cunoscute pentru a obține răspunsuri biologice repetabile și reproductibile. Acestui deziderat îi răspund dietele purificate.

Dietele purificate au apărut la începutul anilor 1970 când Institutul American de Nutriție (AIN) a creat un comitet care a conceput o dietă constând din ingrediente purificate (AIN-76A). Comitetul a recunoscut necesitatea standardizării dietelor din punct de vedere nutrițional pentru șoarecii și șobolanii de laborator, dar și necesitatea eliminării tuturor factorilor nutritivi care pot interfera cu rezultatele unui studiu. De atunci, AIN a schimbat rețetele pentru diete, în prezent diete purificate standard pentru coloniile de șoareci și șobolani de laborator fiind AIN-93 M și AIN-93 G [24]. Iar în literatura științifică sunt publicate articole cu rețete de diete purificate [25, 26].

Cercetarea în bazele de date ale brevetelor naționale și internaționale [27, 28] a evidențiat faptul că nu există brevete în acest domeniu. Există însă firme din străinătate care în portofoliul lor de produse au spre comercializare diverse tipuri de diete purificate (Envigo, Alltromin).

Utilizarea dietelor purificate prezintă un avantaj și din punct de vedere etic în implementarea conceptului 3R (replacemenet, reduction, refinement) prin reducerea numărului de animale utilizate în experimente, deoarece dietele purificate standardizate vor duce la rezultate cu semnificație statistică folosind loturi cu animale mai puține și evitând repetările studiilor.

Utilizarea dietelor purificate permite obținerea unor rezultate cu relevanță biologică crescută, asigurând reproductibilitatea condițiilor experimentale și a datelor obținute.

Prin utilizarea dietelor purificate pot fi induse în organismul animal toate modificările biochimice complexe ce stau la baza unei anumite disfuncții metabolice și/sau proces patologic, realizându-se astfel modele experimentale cu relevanță crescută.

În scopul eliminării dezavantajelor menționate, procedeul de obținere a dietelor purificate conform invenției, asigură în aceste diete purificate, necesarul de proteine de către

cazeină împreună cu metionina adăugată (pentru a satisface cerințele de aminoacizi cu sulf). Glucidele sunt furnizate de amidon de porumb și zaharoză, uleiul de porumb satisface necesarul de grăsime iar celuloza pură satisface necesarul de fibre. Vitaminele și mineralele sunt adăugate sub forma amestecurilor specifice pentru rozătoare.

Deoarece aceste ingrediente sunt rafinate și purificate, (spre deosebire de cerealele ce intră în compoziția dietelor naturale) ele permit cercetătorilor nutriționiști să poată defini mai ușor cerințele nutriționale ale animalelor dar și prin eliminarea selectivă sau modificarea cantitativă la un moment dat a unui factor nutrițional din dietă se poate evalua cu precizie efectul produs. Acesta înseamnă că sunt practic nelimitate posibilitățile de amestecuri ce se pot face la o dietă purificată, făcând din acestea un instrument puternic de cercetare.

Principalul avantaj al procedurii de obținere a dietelor purificate propus de noi față de cele utilizate în prezent constă în aceea că există posibilitatea de a produce cantități mici, pornind de la 500 grame, în funcție de cerințele utilizatorului ceea ce duce la reducerea pierderilor și a costurilor de producție și creșterea productivității.

Un alt avantaj al procedurii de obținere a dietelor purificate conform invenției este acela că toate ingredientele solide mixate se transformă în pastă prin adăugarea de apă bi-distilată în raport de 10%, față de fabricarea dietelor naturale, unde pasta este obținută prin umectarea cu abur industrial. Avantajul este că apa bi-distilată este microbiologic pură, are temperatura de 15-18⁰ C, și nu influențează factorii nutritivi din diete față de abur care are o temperatură de peste 100⁰ C, modificând prin temperatura înaltă compoziția dietelor naturale și reducând cantitatea de ingrediente vitamino-minerale. În plus aburul fiind industrial se poate crea condens ceea ce poate influența negativ și calitatea microbiologică a produsului finit – dietele naturale.

Alt avantaj al procedurii de obținere a dietelor purificate conform invenției este acela că după granulare dietele purificate se deshidratează și se usucă prin menținerea timp de 3 zile într-o cameră termostat la temperatura de 37⁰ C, în timp ce deshidratarea dietelor naturale se face mecanic. Deshidratarea prin menținerea la temperatura de 37⁰ C este o deshidratare naturală care nu afectează compoziția și ingredientele din dietele purificate, în timp ce deshidratarea mecanică se face prin transportul dietelor naturale pe o coloană înaltă de unde un ventilator ce folosește aer nepurificat realizează deshidratarea.

Alte avantaje ale procedurii de obținere a dietelor purificate conform invenției, sunt:

- se cunoaște exact cantitatea pentru fiecare ingredient,
- este anticipată exact formula parametrilor fizico-chimici,
- durata de utilizare a furajelor este mai lungă în condițiile păstrării corespunzătoare (peste 6 luni de zile).

Metoda de utilizare conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- induc sindroamele metabolice prin administrarea furajelor în cantități limitate de 3-4 grame pe zi/șoarece și 20-22 grame pe zi/șobolan timp de 6 zile, urmate de o zi de administrare a unor furaje naturale.
- induc sindroamele metabolice într-un timp scurt (60 de zile) urmând apoi a se administra tratamentul de cercetat sau a se face cercetarea de bază.
- este facil de implementat, cu costuri relativ scăzute și efecte majore în privința inducerii sindroamelor metabolice obținute prin aplicarea lor.

În continuare se dau câte un exemplu de realizare pentru diete purificate care administrate la rozătoarele de laborator induc sindroame metabolice (ateroscleroză, obezitate, diabet de tip II) și diete de control (reproducție și menținere colonii de rozătoare), procedeu de obținere și procedeu de utilizare.

Rețetele dietelor purificate ce induc sindroame metabolice sunt prezentate în continuare. Acestea au fost concepute pe bază de ingrediente purificate, folosind un program EXCEL Microsoft pentru a atinge parametrii analitici ai dietelor purificate, bazându-ne pe componentele analitice ale fiecărui ingredient, componentă declarată de fiecare producător.

Tabel nr.1. Dieta purificată pentru șoareci și șobolani – dietă aterogenică – cod DPA/ICA

Nr.crt	Ingrediente	Cantitatea (g)	Parametri analitici	
			Nutrient	%
1	Cazeină	188	Proteină	16 - 19%
2	Metionină	4	Grăsime	18-22 %
3	Amidon de porumb	150	Celuloză	3-6 %
4	Sucroză	340	Substanță uscată	92 – 95%
5	Carbonat de calciu	3		
6	Celuloză	50		
7	Grasime anhidra din lapte	200		
8	Antioxidant	1		
9	Premix mineral	35		
10	Premix vitaminic	10		
11	Acid colic	5		
12	Colesterol	14		
	TOTAL	1000		

Tabel nr 2. Dieta purificată pentru șoareci și șobolani – dietă de inducere obezitate – cod DPO/ICO

Nr.crt	Ingrediente	Cantitatea (g)	Parametri analitici	
			Nutrient	%
1	Cazeină	250	Proteină	20 - 25%
2	Cistină	4	Grăsime	33-35 %
3	Maltodextrină	170	Celuloză	4-8 %
4	Sucroză	80	Substanță uscată	92 – 95%

5	Fosfat de calciu	4
6	Celuloză	70
7	Untură	313
8	Antioxidant	1
9	Premix mineral	50
10	Premix vitaminic	20
11	Ulei de soia	35
12	Colină	3
	TOTAL	1000

Tabel nr. 3. Dieta purificată pentru șoareci și șobolani – dietă de inducere diabet tip II – cod DPD/ICD

Nr.crt	Ingrediente	Cantitatea (g)	Parametri analitici	
			Nutrient	%
1	Cazeină	200	Proteină	15 - 20%
2	Metionină	4	Grăsimi	3-6 %
3	Fructoză	605	Celuloză	1-3 %
4	Carbonat de zinc	1	Substanță uscată	95 – 97%
5	Premix vitaminic	10		
6	Celuloză	80		
7	Untură	50		
8	Premix mineral	50		
	TOTAL	1000		

Tabel nr. 4. Dieta purificată pentru șoareci și șobolani – dietă menținere colonii cod DPM/ICM

Nr.crt	Ingrediente	Cantitatea (g)	Parametri analitici	
			Nutrient	%
1	Cazeină	140	Proteină	11-14 %
2	L- cistină	1.8	Grăsimi	3-5 %
3	Amidon de porumb	465	Celuloză	3-6 %
4	Sucroză	100	Substanță uscată	95 – 97%
5	Maltodextrina	155		
6	Celuloză	50		
7	Ulei de soia	40		
8	Antioxidant	0.2		
9	Premix mineral	35		
10	Premix vitaminic	10		
11	Colină bitartrat	3		
	TOTAL	1000		

Tabel nr. 5. Dieta purificată pentru șoareci și șobolani – dietă reproducție colonii – cod DPC/ICC

Nr.crt	Ingrediente	Cantitatea (g)	Parametri analitici	
			Nutrient	%
1	Cazeină	200	Proteină	17 - 20%
2	L-cistină	3	Grăsime	6-9 %
3	Amidon de porumb	397	Celuloză	3-6 %
4	Sucroză	100	Substanță uscată	93 – 95%
5	Maltodextrina	132		
6	Celuloză	50		
7	Ulei de soia	70		
8	Antioxidant	0.5		
9	Premix mineral	35		
10	Premix vitaminic	10		
11	Colină	2.5		
	TOTAL	1000		

Parametrii analitici au fost verificați prin analize de laborator efectuate la un laborator autorizat, iar rezultatele obținute sunt evidențiate în tabelul de mai jos:

Tabel nr.6. Parametrii analitici corespunzatori dietelor purificate care fac obiectul invenției.

Parametru analizat	Substanța uscată %	Grăsime%	Proteina %	Celuloza %
Metoda de analiză	Metodă gravimetrică	Metoda de extracție cu solvenți organici	Mineralizarea în bloc și metoda de distilare cu abur	Metoda cu filtrare intermediară
Cod dietă	Regulamentul (EC) no. 152/2009 SR ISO 6496: 2001	Regulament (EC) no. 152/2009 SR ISO 6492: 2001	Regulamentul (EC) no. 152/2009 SR EN ISO 5983-2: 2009 /AOAC 2001.11	Regulament (EC) no. 152/2009 SR EN ISO 6865: 2002
DPA	93.47	19.18	17.36	4.47
DPO	92.79	34.62	24.7	3.92
DPD	96.36	3.16	19.85	2.53
DPM	95.77	4.11	13.25	3.80
DPC	93.78	7.42	19.13	4.84

Toate dietele s-au încadrat în parametrii stabiliți și nu au existat deviații sau neconformități. Rezultatele reprezintă media analizelor la 3 loturi succesive de diete.

Dietele purificate au fost administrate la șoareci și șobolani, timp de 60 de zile pentru inducerea de sindroame metabolice (ateroscleroză, diabet tip II și obezitate).

Animalele au fost monitorizate pe timpul administrării dietelor la intervale regulate prin controlul greutateii corporale, a consumului de hrană și apă și analize de sânge pentru parametri metabolici de ateroscleroză, iar post-mortem s-au efectuat evaluări histopatologice.

Pe baza rezultatelor obținute s-a observat apariția sindroamelor metabolice la toate loturile la care s-a administrat dieta produsă (în funcție de dieta administrată) indiferent de specie și sex.

Datele prezentate mai jos sunt doar pentru șoareci, pentru șobolani fiind asemănătoare, dar cu concluzii similare.

Analiza statistică a datelor

Datele au fost organizate în Excel (Microsoft Office) iar analiza statistică și vizualizările au fost realizate utilizând software-urile GraphPad Prism 5 și Python 3. Pentru datele obținute prin măsurători biochimice plasmatice realizate pe colecții de la 10 șoareci, fiecărui animal i-a fost atribuită valoarea medie a colecției. Măsurătorile plasmatice au fost analizate ca "FoldChange" (raportul dintre valoarea finală a parametrului și cea inițială, înainte de inițierea dietei). Analiza statistică între grupuri a fost făcută prin ANOVA atunci când au fost comparate 3 sau mai multe grupuri și prin teste *t Student* la compararea a 2 grupe (de exemplu comparații între sexe). Pachetele Python utilizate au fost: pandas (extragerea datelor) statsmodels (pentru ANOVA și Tukey post-test), scipy (teste *t Student*), sklearn (analiza componentelor principale, PCA), seaborn și matplotlib (pentru vizualizări).

Rezultate

Creșterea în greutate și raportul eficienței hranei

Așa cum era de așteptat, șoarecii masculi hrăniți cu dieta martor, de menținere, au prezentat pe durata studiului greutate relativ constantă, în ultima săptămână a studiului având o greutate medie crescută cu doar 0.8% comparativ cu prima săptămână. În contrast, șoarecii din grupurile de inducere a patologiei, au prezentat la finalul studiului greutate mai mari cu 8,4% - DPD, 11,7% - DPA, 15,6% - DPC, 20,3% - DPO comparativ cu inițierea studiului. Astfel, dieta DPO de inducere a obezității a indus creșteri în greutate semnificativ mai mari decât DPM ($p < 0.001^{***}$), DPA ($p < 0.01^{**}$), DPD ($p < 0.001^{***}$, ANOVA, Bonferroni post-test) și mai mari decât DPC, deși ne semnificativ statistic (vezi **Figura 1**).

De asemenea, femelele hrănite cu dieta de menținere au avut greutate constantă pe durata studiului, măsurând o creștere în greutate de doar 1,2% pe durata celor 4 săptămâni de studiu. În cazul femelelor, dieta de creștere (DPC) a dus la creșteri similare, dar ușor mai mari ale greutății comparativ cu dieta DPO (19.1% față de 16.4%, ne-semnificativ, ANOVA, Bonferroni post-test). De asemenea, dietele DPA și DPD au indus creșteri ale greutății (10,4% și, respectiv, 11,9%) semnificativ mai mari decât DPM ($p < 0.01^{**}$ și, respectiv, $p < 0.001^{***}$) și semnificativ mai mici decât dieta de creștere ($p < 0.01^{**}$ și, respectiv, $p < 0.05^*$, ANOVA, Bonferroni post-test, **Figura 2**).

Creșterea în greutate a animalelor s-a asociat cu modificări moderate ale cantității de hrană ingerată: animalele din grupul DPA au consumat cu aproximativ 10% mai multă hrană decât cele din grupul de menținere, iar cele din grupul DPO, cu aproximativ 18%, în timp ce animalele din grupul de creștere au consumat cantități similare cu cele din grupul de

menținere (vezi **Figura 3**). În schimb, diferențele de creștere în greutate au fost asociate cu rapoarte ale eficienței hranei (FER, procentul din cantitatea de alimente convertit în creștere a greutateii) diferite pentru tipurile de diete: DPM, unde animalele și-au menținut greutatea constantă, FER a fost aproximativ 0, în schimb, pentru dietele DPA și DPD FER a fost aproximativ 0.9 g/100g dietă, pentru DPO: 1,4 g/100g de dietă iar pentru DPC: 1,6 g/100g de dietă (fiecare grup vs. DPM: $p \leq 0.001$ ***, ANOVA, Tukey post test).

Modificările parametrilor plasmatici

Glicemia a prezentat creșteri moderate semnificative la șoarecii din grupurile de inducere a ateromatozei și obezității (cu până la 70%). Totuși, modificările cele mai marcate au fost înregistrate, nesurprinzător, în grupul de inducere a diabetului unde valorile medii ale glicemiei în ultima zi a studiului au fost crescute de până la 3 ori comparativ cu valorile de la inițierea dietei (creșterea a fost semnificativ mai mare decât în toate celelalte grupurile cu $p < 0.001$ ***, ANOVA, Bonferroni).

Dacă la subiecții umani obezitatea este corelată cu niveluri scăzute ale amilazei serice [29], studiile au arătat că șoarecii au răspunsuri diferite la inducerea obezității iar amilaza serică crescută ar putea servi chiar ca un biomarker al obezității [30]. Experimentele prezentate aici au arătat creșteri semnificative ale amilazei serice la șoarecii din grupul de inducere a obezității indiferent de sex și la masculii, dar nu la femelele din grupul de creștere (**Figura 4**).

În toate grupurile experimentale au fost observate creșteri moderate ale bilirubinei totale, dar creșteri mai accentuate, cu aproximativ 50%, au fost observate pentru grupurile de tratament DPD și DPO, cât și la masculii din grupul DPC (datele nu sunt prezentate).

Colesterolul total a crescut marcant în grupurile de inducere a aterosclerozei și a obezității, cu valori de aproximativ 5 ori mai mari în săptămâna finală a studiului comparativ cu prima săptămână. Suplimentar, șoarecii din grupul de inducere a diabetului au prezentat creșteri de aproximativ 3.4 ori ale colesterolului. În contrast, șoarecii hrăniți cu dietă de menținere sau cu dietă de creștere nu au prezentat creșteri ale colesterolului (vezi **Figura 5**).

Creșterea globulinelor și a proteinelor totale s-a corelat foarte bine cu creșterea colesterolului total și, astfel, au fost observate creșteri în grupurile DPA, DPD și DPO, dar nu și în grupurile DPM și DPC (vezi **Figura 5**).

Dieta diabetică induce modificări serice sugestive pentru afectarea ficatului și rinichilor

La subiecții umani sănătoși valori serice crescute ale ALT și ALKP sunt factori de predicție pentru dezvoltarea ulterioară a diabetului [31], iar la pacienții diabetici nivelul ALKP este cunoscut a se corela cu valori mai crescute ale glucozei plasmatice *a jeun*.

Rezultatele obținute utilizând dietele care fac obiectul invenției au arătat valori semnificativ crescute ale ALT și ALKP la șoarecii din grupul DPD (ALT a crescut mai mult

de 2 ori față de momentul inițial, iar ALKP de aproape două ori) comparativ cu toate celelalte grupuri unde au fost observate creșteri minore sau păstrarea nivelului anterior dietei.

Dietele de creștere și de inducere a aterosclerozei și obezității au dus la creșteri ușoare ale ureei și creatininei, în timp ce șoarecii din grupul DPD au prezentat creșteri de aproximativ 2 ori ale creatininei și ureei (creșteri semnificativ mai mari decât cele observate în toate celelalte grupuri) ceea ce ar putea indica dezvoltarea nefropatiei diabetice la șoarecii hrăniți cu dietă de inducere a diabetului (**Figura 6**). În plus, șoarecii masculi din grupul DPC au prezentat valori crescute semnificativ ale ureei iar femelele din același grup valori crescute semnificativ ale creatininei, ceea ce sugerează un posibil efect nefrototoxic al acestei diete.

Calciul și fosforul seric sunt crescute la animalele din grupul de inducere a aterosclerozei.

Calciul și fosforul serice, doi factori de risc independenți pentru dezvoltarea placilor aterosclerotice [32, 33], au fost semnificativ crescute la șoarecii din grupul DPA comparativ cu cei din grupul de menținere cât și comparativ cu cei din grupurile de inducere a diabetului și obezității, fără diferențe semnificative între sexe. De asemenea, dieta de creștere a dus la creșterea nivelurilor calciului seric la șoarecii masculi, dar nu și la femele (**figura 7**).

Analiza corelațiilor evidențiază faptul că globulinele și proteinele totale s-au corelat foarte bine cu colesterolul total (Pearson r de 0,696 și, respectiv 0.788, $p < 0.001^{***}$, **Figura 8**) și, astfel, au fost observate creșteri de până la 60% în grupurile DPA, DPD și DPO.

Dietele induc modificări caracteristice ale parametrilor plasmatici și greutateilor.

Deoarece dietele conform invenției au urmărit inducerea obezității, diabetului de tip II și aterosclerozei, au fost luați în considerare un număr restrâns de parametri modificați caracteristic în aceste afecțiuni: creșterea în greutate, glicemia, colesterolul și amilaza serică. Așa cum se observă în **Figura 9**, șoarecii din grupul de inducere a diabetului pot fi ușor deosebiți de toți ceilalți șoareci prin valorile glicemiei crescute consistent de mai mult de 2,5-3 ori. Șoarecii din grupul DPA au avut, similar cu cei din grupul DPO valori crescute ale colesterolului total, totuși, au prezentat comparativ cu aceștia valori reduse ale amilazei serice. De asemenea, șoarecii din dieta de inducere a obezității au prezentat valori ale greutateii finale cu cele pentru șoarecii din grupul de creștere dar pot fi deosebiți de aceștia prin valori mai crescute ale colesterolului, amilazelor și colesterolului.

În concluzie, cei patru parametri: creștere în greutate, glucoză, amilază și colesterol sunt suficienți pentru a diferenția între ele toate grupele cu un interval de încredere mai mare de 95% (cu singura excepție a unei ușoare suprapunerii între DPC și DPM).

Evaluări histopatologice

Tabel nr. 7. Date histopatologice asociate administrării dietei ce induce ateroscleroză - DPA

Organ	Leziuni așteptate și identificate	(%)
-------	-----------------------------------	-----

Cord	Infarct	25%
Aorta proximala ascendenta	Fibroză perivasculară	60%
	Infiltrație lipidică	60%
	Ateroame	30%
Artera carotida comuna stanga	Fibroză perivasculară	55%
	Infiltrație lipidică	50%
	Ateroame	25%
Ficat	Steatoza	60%
	Congestie	80%
Rinichi	Fibroza interstitiala perivasculara	75%
	Distrofie granulo-vacuolara	65%
Pancreas	Congestie	80%

Tabel nr. 8. Date histopatologice asociate administrării dietei ce induce obezitate - DPO

Organ	Leziuni așteptate și identificate	(%)
Ficat	Steatoza	60%
	Fibroză sau inflamație	40%
	Vacuolizari micro sau macroveziculare	65%
Rinichi	Congestie	43%
	Afectarea tubilor contorti proximali si distali	75%
	Afectarea glomerulilor	45%
Pancreas	Vacuolizări ale insulelor pancreatice	50%
	Fibroză	85%

Tabel nr. 9. Date histopatologice asociate administrării dietei ce induce diabet de tip II - ICD

Organ	Leziuni așteptate și identificate	(%)
Ficat	Steatoza	80%
	Fibroză sau inflamație	80%
Rinichi	Nefropatie sau neuropatie	75%
	Afectarea tubilor contorti proximali si distali	85%
	Glomerulofibroza	45%
Pancreas	Atrofie	60%
	Fibroză	65%

Procedeul de fabricație conform invenției, conține etape menite să asigure parametrii fizico-chimici, astfel încât administrate la șoareci să inducă sindroamele metabolice așteptate (ateroscleroză, obezitate sau diabet tip II). Procedeul de fabricație (**Figura 10**) este asociat cu etape de control finale, astfel încât loturile neconforme să fie identificate și eliminate, ceea ce duce la eficientizarea procesului de producție și scăderea costurilor asociate acestuia.

- În faza 1 se cântăresc toate ingredientele, conform rețetelor prezentate mai sus.
- În faza 2 toate ingredientele se așează împreună într-un vas. Majoritatea ingredientelor sunt pulberi mixabile, însă există și ingrediente sub formă de blocuri solide (grăsimi, colesterolul etc). Acestea se topesc pe baie de apă și se adaugă în același vas.
- În faza 3 după ce au fost adăugate toate ingredientele, se omogenizează timp de 45 de minute cu ajutorul unui utilaj de amestecare și se transformă în pastă prin adăugarea de apă bi-distilată în raport de 10%. Comparativ cu fabricarea dietelor naturale, pasta de diete purificate se face prin adăugarea de apă, dar nu abur ca la diete naturale.
- În faza 4 pasta se granulează într-un granulator cu capacitatea de 5 kg/oră printr-o sită de 8 mm.
- În faza 5 dietele se deshidratează și se usucă prin mentinerea timp de 3 zile la un termostat de camera la temperatura de 37⁰ C, în timp ce deshidratarea dietelor naturale se face mecanic.
- În faza 6, după deshidratare dietele se pastrează la frigider/cameră frigorifică la +2 - +8⁰ C pentru a minimiza oxidarea.
- În faza 7 se recoltează probele medii și se fac analizele fizico-chimice prin metodele cunoscute [34] și arătate în tabelul de mai sus
- În faza 8 după primirea buletinelor de analiză, dietele purificate se pun în pungi de aluminiu de 500 grame, pungi ce se videază și se depozitează la temperatura de +5°C ± 3°C . Valorile acceptate sunt cele menționate la rubrica parametrilor analitici de la fiecare rețetă și analizate cu rezultatele din tabelul de sub rețete. Dacă nu se încadrează, se consideră lot neconform și se aplică o procedură de neconformitate – rebut și eliminare. Dar asta e foarte rar, doar dacă se greșește o cântărire sau parametrii unui ingredient sunt declarați fals de către furnizori, deoarece rețetele sunt exacte, iar ingredientele fiind purificate vin cu buletine de analiză.

Avantajele soluțiilor propuse de brevet au în vedere următoarele:

- creșterea stabilității produsului finit din punct de vedere al ingredientelor purificate,
- obținerea unor diete purificate stabile și standardizate,
- procedeu de fabricație ieftin și facil comparativ cu metodele de fabricație a dietelor naturale,
- mod de utilizare care asigură crearea de modele experimentale prin inducerea sindroamelor metabolice (ateroscleroză, obezitate sau diabet de tip II) la șoareci prin administrarea de diete purificate.

În **Figura 10** sunt prezentate etapele principale ale procedurii de fabricație ale dietelor purificate.

În **Figura 11** sunt reprezentate dietele naturale vs cele purificate, ca aspect.

Referințe bibliografice

1. Barnes, S., Effects of genistein on *in vitro* and *in vivo* models of cancer. *Journal of Nutrition*, 1995, 125, 777S-783S.
2. Bollheimer L.C., 2006, Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types, *Journal of Molecular Endocrinology*, 36: 485–501.
3. Buettner R., Scholmerich J., Bollheimer L.C., 2007, High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 15: 798-808.
4. Slavin B.G., Zarow C., Warden C.H., Fisler J.S., 2010, Histological, Immunocytochemical, and Morphometrical Analyses of Pancreatic Islets in the BSB Mouse Model of Obesity, *The Anatomical Record*, 293:108–116.
5. Hristov A.N., Mertens D., Zaman S., Vander Pol M., Price W.J., 2010. Variability in feed and total mixed ration neutral detergent fiber and crude protein analyses among commercial laboratories. *J. Dairy Sci.* 93:5348–5362.
6. Rossmeisl M., Rim J.S., Koza R.A., Kozak L.P., 2003, Variation in Type 2 Diabetes Related Traits in Mouse Strains Susceptible to Diet-Induced Obesity, *Diabetes*, 52:1968-1966.
7. Xiangdong Li, Yuanwu Liu, Hua Zhang, Liming Ren, Qiuyan Li, Ning Li, 2011, Animal models for the atherosclerosis research: a review, *Protein Cell*, 2(3):189–201.
8. Savenije B., Strubbe, J., & Ritskes-Hoitinga, M. (2010). Nutrition, Feeding and Animal Welfare. In Hubrecht R., Kirkwood J. (Eds.), *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*, Eighth Edition, Wheathampstead, Hertfordshire AL4 8AN, UK. 183-193.
9. Coman C, Vlase E - Diets – critic points for *in vivo* tests, a comparative analysis between natural and purified diets. *Lucrări științifice medicină veterinară* vol. XLIII (2), 2010 Timișoara, 235-24, 2010.
10. Bielohuby M, Bodendorf K, Brandstetter H, Bidlingmaier M, Kienzle E. Predicting metabolisable energy in commercial rat diets: physiological fuel values may be misleading. *Br J Nutr.* 2010 May;103(10):1525-33. 2010.
11. King A.J.F - The use of animal models in diabetes research, 2012, *British Journal of Pharmacology*, 166: 877–894.
12. Cho, T.M., Peng, N., Clark, J.T., Novak, L., Roysommuti, S., Prasain, J., Wyss, J.M., Genistein attenuates the hypertensive effects of dietary NaCl in hypertensive male, rats. *Endocrinology*, 2007, 148(11), 5396-5402.
13. Carroll, K.K., Kurowska E.M., Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. *Journal of Nutrition*, 1995, 125, 594S-597S.
14. Bakhit, R.M., Klein, B.P., Essex-Sorlie, D., Ham, J.O., Erdman, J.W., Potter, S.M. - Intake of 25 g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations, *Journal of Nutrition*, 1994, 124, 213-222.
15. Ascencio, C., Torres, N., Isoard-Acosta, F., Gomez-Perez, F.J., Hernandez-Pando, R., Tovar, A.R.,- Soy affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *Journal of Nutrition*, 2004, 134, 522-529.
16. Lephart, E.D., Setchell, K.D., Handa, R.J., Lund, T.D., Behavioral effects of endocrine-disrupting substances: phytoestrogens, *ILAR Journal*, 2004, 45, 443-454.
17. Weber, K.S., Setchell, K.D.R., Stocco, D.M., Lephart, E.D., Dietary soyphytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5 alpha-reductase or

- testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *Journal of Endocrinology*, 2001, 170, 591-599.
18. Wisniewski, A.B., Klein, S.L., Lakshmanan, Y., Gearhart, J.P., Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats, *Journal-of-Urology*, 2003, 169, 1582-1586.
 19. Torre-Villalvazo, I., Tovar, A.R., Ramos-Barragan, V.E., CerbonCervantes, M.A, Torres, N., Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet. *Journal of Nutrition*, 2008, 138, 462-468.
 20. Cederroth, C.R., Vinciguerra, M., Gjinovci, A., Kuhne, F., Klein, M., Cederroth, M., Caille, D., Suter, M., Newmann, D., James, R.W., Doerge, D.R., Wallimann, T., Meda, P., Foti, M., Rohner-Jeanrenaud, F., Vassalli, J., Nef, S., - Dietary phytoestrogens activate AMP-activated protein kinase with improvement in lipid and glucose metabolism. *Diabetes*, 2008, 57:1176-1185.
 21. Barnes, S., Peterson, T.G., Grubbs, C., Setchell, K.D.R., Potential role of dietary isoflavones in the prevention of cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1994, 354, 135-147.
 22. Barnes, S., Grubbs, C., Setchell, K.D.R., Carlson, J., Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. *Prog. Clinical Biology Research*, 1990, 347, 239-253.
 23. Fitzsimmons, J.T.R., Orson, N.V., El-Aaaser, Effects of soybeans and ascorbic acid on experimental carcinogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1989, 93A, 285-290.
 24. Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey, G.C.Jr., AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, *J. Nutr.* 1993, 123(11):1939-51.
 25. Getz G.S., Reardon C.A., 2006, Diet and Murine Atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(2):242-9.
 26. Nishina P.M., Verstuyft J., Paigen B., 1990, Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse, *Journal of Lipid Research* Volume 31 : 859-969.
 27. <https://inregistrare-marci.ro/verificare-marca-inregistrata-OSIM-EUIPO-WIPO-BOIP.php>
 28. <https://patents.google.com/advanced>
 29. Nakajima, K., Low serum amylase and obesity, diabetes and metabolic syndrome: A novel interpretation. *World J Diabetes*, 2016. 7(6): p. 112-21.
 30. Afsartala, Z., et al., Expression of liver alpha-amylase in obese mouse hepatocytes. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2016. 9(4): p. 278-285.
 31. Chen, S.C., et al., Liver Fat, Hepatic Enzymes, Alkaline Phosphatase and the Risk of Incident Type 2 Diabetes: A Prospective Study of 132,377 Adults. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 4649.
 32. Foley, R.N., et al., Serum phosphorus levels associate with coronary atherosclerosis in young adults. *J Am Soc Nephrol*, 2009. 20(2): p. 397-404.
 33. Rubin, M.R., et al., Carotid artery plaque thickness is associated with increased serum calcium levels: the Northern Manhattan study. *Atherosclerosis*, 2007. 194(2): p. 426-32.
 34. FAO. 2011., Quality assurance for animal feed analysis laboratories. *FAO Animal Production and Health Manual No. 14*. Rome, 81-144.

Revendicari

1. Cinci tipuri de diete chimic purificate ce conțin ingrediente chimic pure care prin administrarea la șoarecii și șobolanii de laborator induc sindroame metabolice - ateroscleroză, obezitate și diabet de tip II (3 tipuri), iar două tipuri sunt diete de control pentru celelalte trei:
 - Dieta A, conținând cazeină, metionină, amidon de porumb, sucroză, carbonat de calciu, celuloză, grăsime anhidră din lapte, antioxidant, premix mineral, premix vitaminic, acid colic, colesterol. Această compoziție permite utilizarea dietei A pentru inducerea sindromului metabolic de ateroscleroză la șoarecii și șobolanii de laborator.
 - Dieta B, conținând cazeină, cistină, maltodextrină, sucroză, fosfat de calciu, celuloză, untură, antioxidant, premix mineral, premix vitaminic, ulei de soia, colină. Această compoziție permite utilizarea dietei B pentru inducerea sindromului metabolic de obezitate la șoarecii și șobolanii de laborator.
 - Dieta C, conținând cazeină, metionină, fructoză, carbonat de zinc, celuloză, untură, antioxidant, premix mineral, premix vitaminic. Această compoziție permite utilizarea dietei C pentru inducerea sindromului metabolic de diabet de tip II la șoarecii și șobolanii de laborator.
 - Dieta K, conținând cazeină, L-cistină, amidon de porumb, sucroză, maltodextrină, celuloză, ulei de soia, colină bitartrat, antioxidant, premix mineral, premix vitaminic. Această compoziție permite utilizarea dietei K pentru menținerea fără inducerea de sindroame patologice a coloniilor la șoarecii și șobolanii de laborator.
 - Dieta T, conținând cazeină, L-cistină, amidon de porumb, sucroză, maltodextrină, celuloză, ulei de soia, colină, antioxidant, premix mineral, premix vitaminic. Această compoziție permite utilizarea dietei T pentru utilizarea la reproducție fără inducerea de sindroame patologice a coloniilor la șoarecii și șobolanii de laborator.
2. Procedeu de fabricație al dietelor purificate definit prin revendicarea 1, caracterizat prin aceea ca se parcurg următoarele faze:
 - faza 1 cântărire ingrediente conform rețetar.
 - faza 2 comasare ingrediente.
 - faza 3 amestec ingrediente
 - faza 4 granulare ingrediente.
 - faza 5 deshidratare și uscare diete.
 - faza 6 păstrare la frigider/cameră frigorifică.
 - faza 7 recoltare probe medii și efectuare analize fizico-chimice.
 - faza 8 ambalarea și depozitarea dietelor purificate la temperatura de $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

3. *Metoda de utilizare a dietelor purificate A, B, C definite prin revendicarea 1, constând în inducerea sindroamelor metabolice într-un timp scurt (60 zile) înainte de a se administra tratamentul de cercetare sau a se face cercetarea de bază. Inducerea sindroamelor metabolice se face prin administrarea furajelor în cantități limitate de 3-4 grame pe zi/șoarece și 20-22 grame pe zi/șobolan timp de 6 zile, urmate de o zi de administrare de furaje naturale, urmând apoi a se administra tratamentul de cercetat sau a se face cercetarea de bază. Metoda de utilizare a dietelor K și T care reprezintă controale pentru dietele A, B și C este identică cu metoda de utilizare a dietelor A, B și C.*

Desene explicative

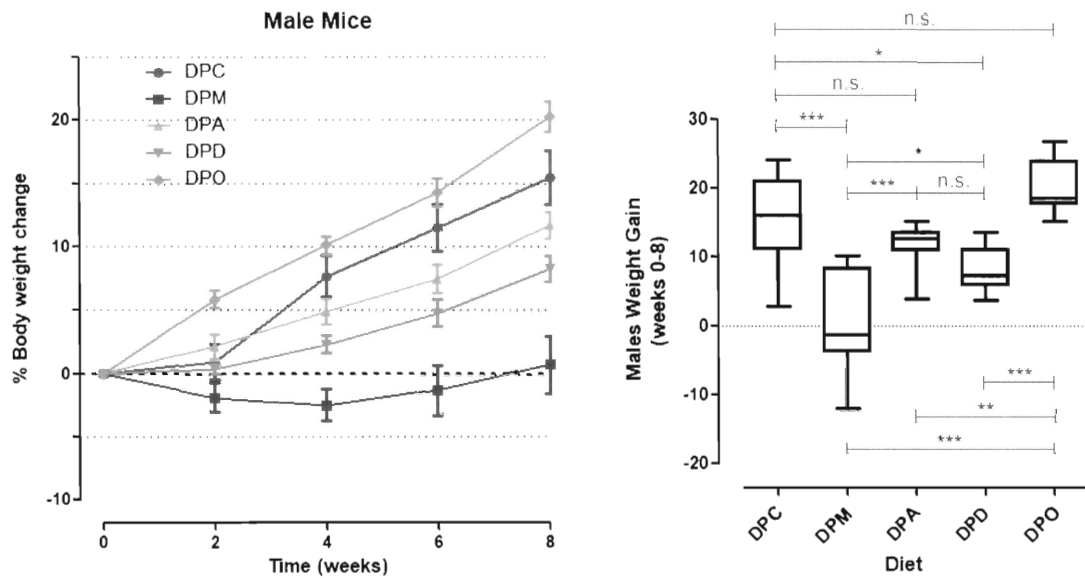


Figura 1. Stânga: Curbe de creștere ale șoarecilor masculi hrăniți cu diferitele diete (medie \pm eroare standard a mediei); Dreapta: Grafic "box-and-whisker" care compară creșterea în greutate la finalul studiului pentru diferitele grupuri (blocul indică mediana și cele două quartile adiacente iar barele de eroare indică cele două quartile extreme). Stelele indică semnificația statistică obținută prin analiza ANOVA cu testul Bonferroni pentru comparații multiple (n.s – ne semnificativ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) Analiza statistică și vizualizările au fost făcute în GraphPad Prism 5.

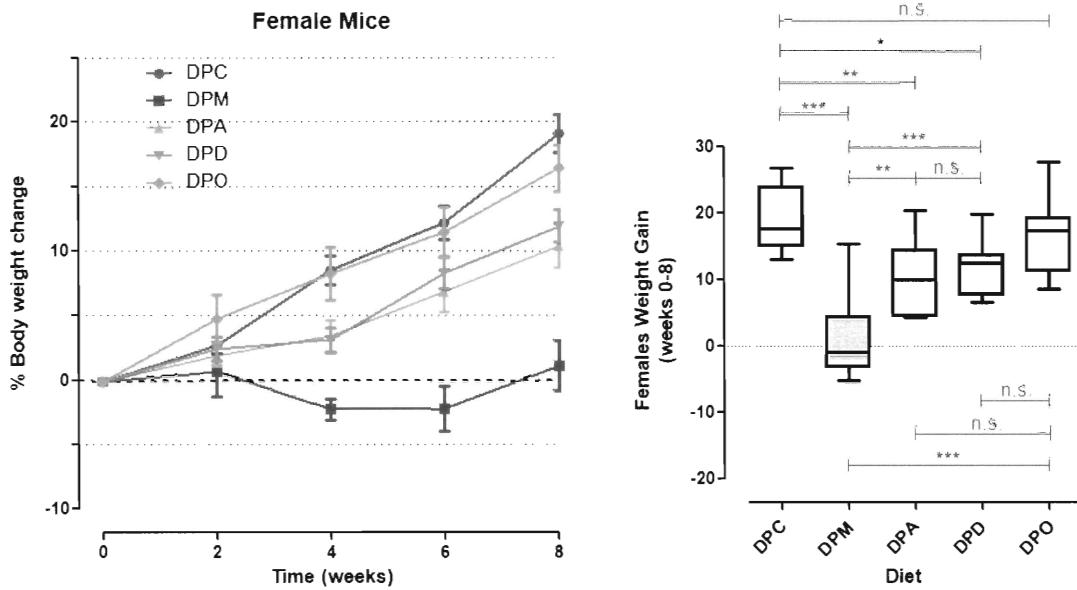


Figura 2. Stânga: Curbe de creștere ale șoarecilor femele hrăniți cu diferitele diete (medie \pm eroare standard a mediei); Dreapta: Grafic "box-and-whisker" care compară creșterea în greutate la finalul studiului pentru diferitele grupuri. Este indicată semnificația statistică obținută prin analiza ANOVA cu testul Bonferroni pentru comparații multiple (n.s – nesemnificativ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Analiza statistică și vizualizările au fost făcute în GraphPad Prism 5.

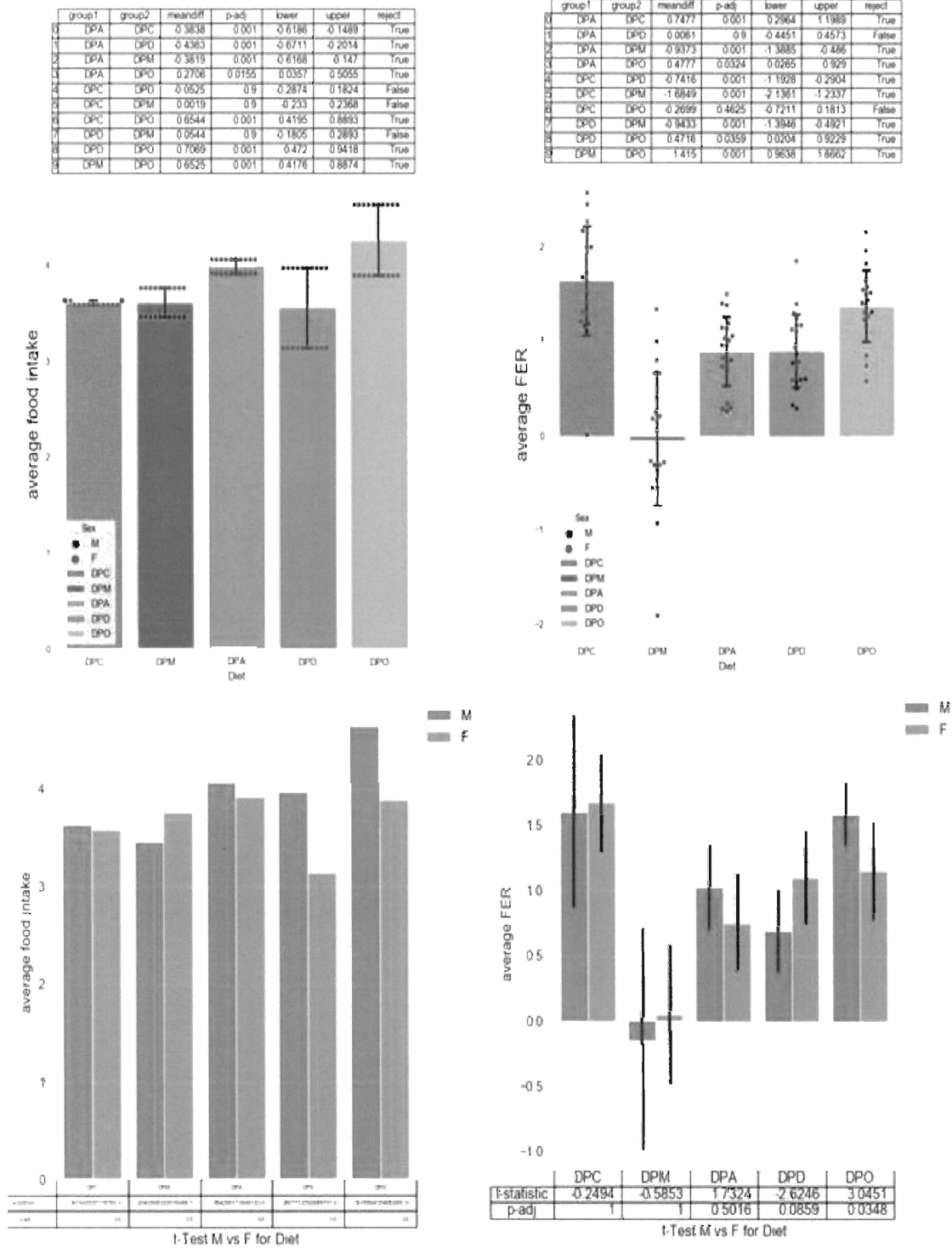


Figura 3. Grafice prin bare ale cantității de hrană medie zilnică (stânga) și ale rapoartelor de eficiență a hranei (dreapta). Sunt prezentate comparațiile dintre grupurile de dietă (rândul de sus, ANOVA, testul pentru comparații multiple Tukey) și între masculii și femelele din fiecare dietă (rândul de jos, teste t Student). Analiza statistică și vizualizările au fost făcute în Python 3.

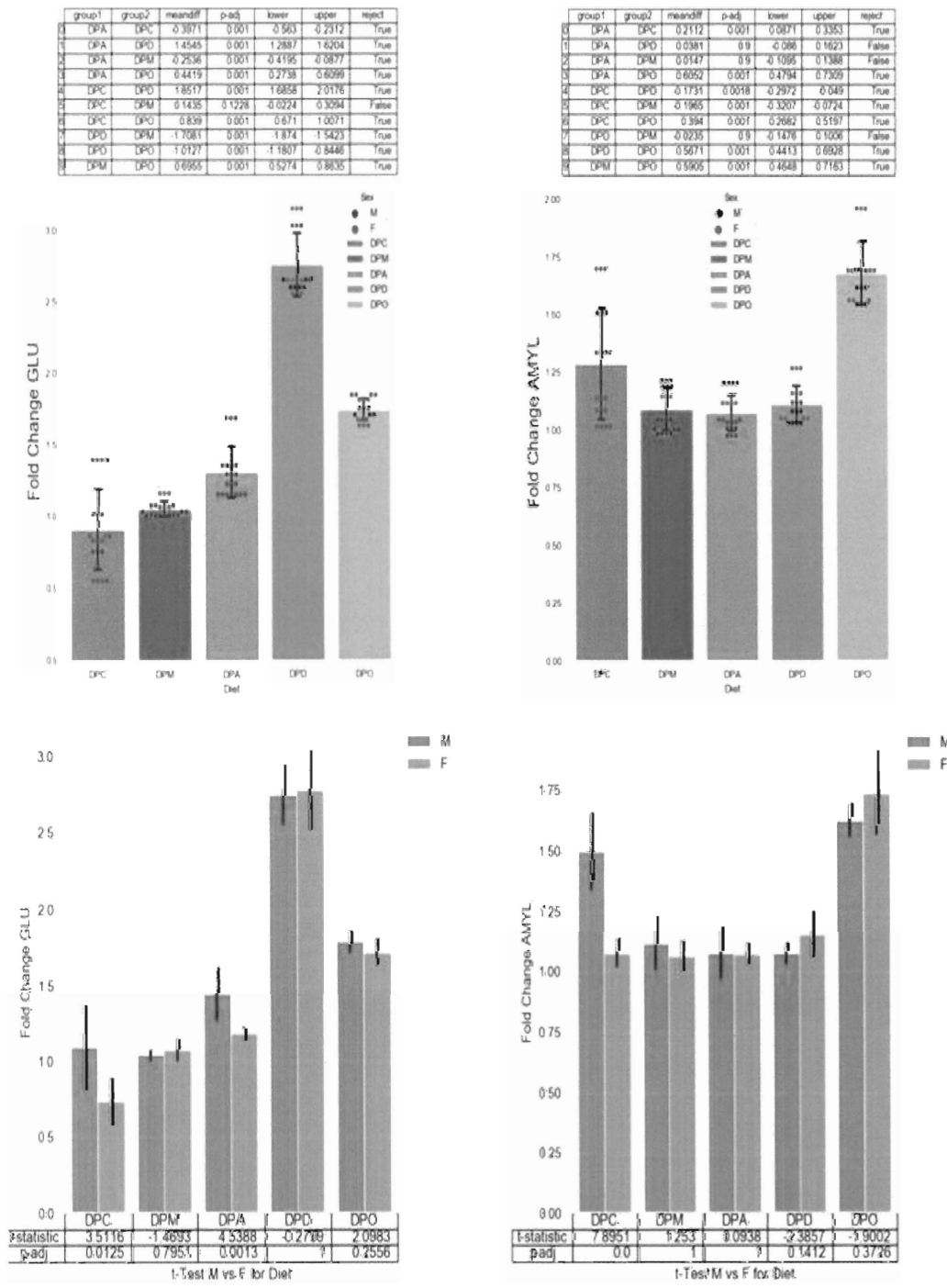


Figura 4 Grafice prin bare ale modificărilor glicemiei și amidazelor serice. Sunt prezentate comparațiile dintre grupurile de dietă (rândul de sus, ANOVA, testul pentru comparații multiple Tukey) și între masculii și femelele din fiecare dietă (rândul de jos, teste t Student). Analiza statistică și vizualizările au fost făcute în Python 3.

group1	group2	meandiff	p-adj	lower	upper	reject
DPA	DPC	-0.1428	0.001	-0.2321	-0.0536	True
DPA	DPM	0.098	0.593	-0.1172	0.0413	False
DPA	DPO	0.2452	0.001	0.3344	0.1559	True
DPA	DPC	0.375	0.167	0.0469	0.7031	False
DPC	DPM	0.2849	0.0314	0.0956	0.4741	True
DPC	DPO	0.3023	0.0962	0.1916	0.4131	True
DPM	DPC	0.2163	0.001	0.1259	0.3067	True
DPM	DPO	0.1972	0.001	-0.2664	-0.106	True
DPO	DPC	0.1215	0.0029	0.0511	0.2118	True
DPO	DPM	0.3186	0.001	0.2283	0.409	True

group1	group2	meandiff	p-adj	lower	upper	reject
DPA	DPC	0.4858	0.001	0.5255	0.2862	True
DPA	DPM	0.2263	0.001	0.3459	0.1066	True
DPA	DPO	0.4187	0.001	0.5383	0.299	True
DPA	DPC	0.1866	0.0025	0.3433	0.2858	True
DPC	DPM	0.1796	0.001	0.5589	0.2992	True
DPC	DPO	0.0128	0.9	-0.1325	0.1068	False
DPM	DPC	0.5704	0.001	0.4492	0.6916	True
DPM	DPO	-0.1924	0.001	0.3121	0.0727	True
DPO	DPC	0.3908	0.001	0.2696	0.512	True
DPO	DPM	0.5832	0.001	0.462	0.7045	True

group1	group2	meandiff	p-adj	lower	upper	reject
DPA	DPC	3.2494	0.001	3.7538	2.7449	True
DPA	DPM	1.4057	0.001	1.9101	0.9013	True
DPA	DPO	3.628	0.001	4.1325	3.1236	True
DPA	DPC	0.1356	0.9	-0.3754	0.6446	False
DPC	DPM	1.8437	0.001	2.393	2.3481	True
DPC	DPO	0.3787	0.2339	0.8831	0.1257	False
DPM	DPC	3.3849	0.001	2.8735	3.8993	True
DPM	DPO	2.2224	0.001	2.7268	1.718	True
DPO	DPC	1.5412	0.001	1.0302	2.0522	True
DPO	DPM	3.7636	0.001	3.2524	4.2746	True

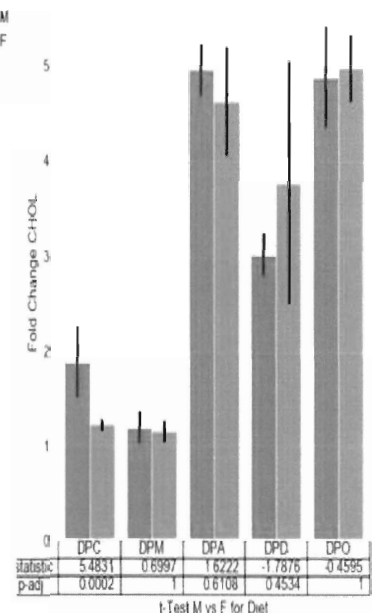
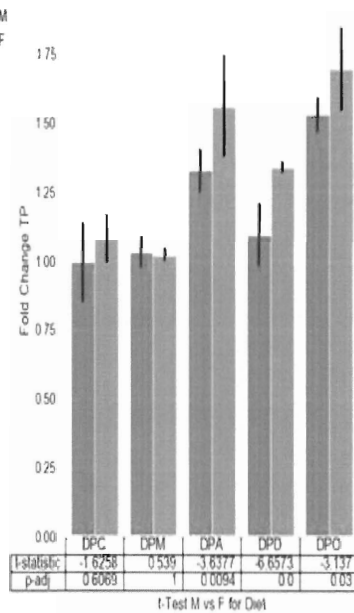
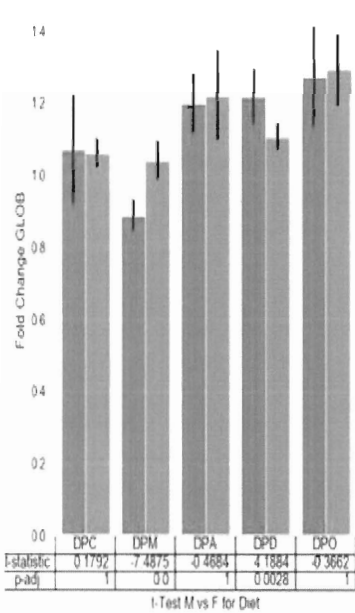
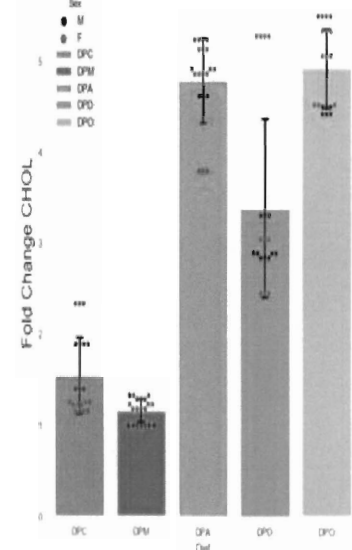
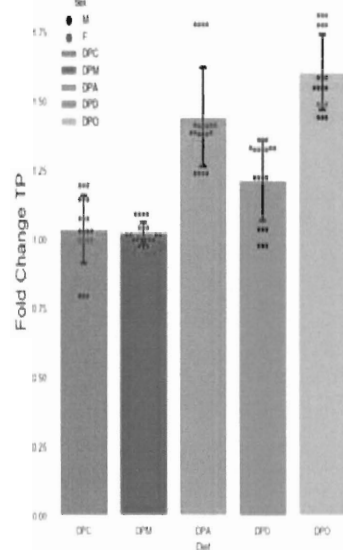
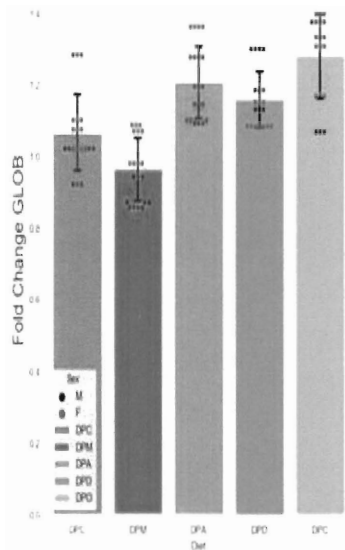


Figura 5 Grafice prin bare ale modificărilor globulinelor, proteinelor totale și colesterolului. Sunt prezentate comparațiile dintre grupurile de dietă (rândul de sus, ANOVA, testul pentru comparații multiple Tukey) și între masculii și femelele din fiecare dietă (rândul de jos, teste t Student). Analiza statistică și vizualizările au fost făcute în Python 3.

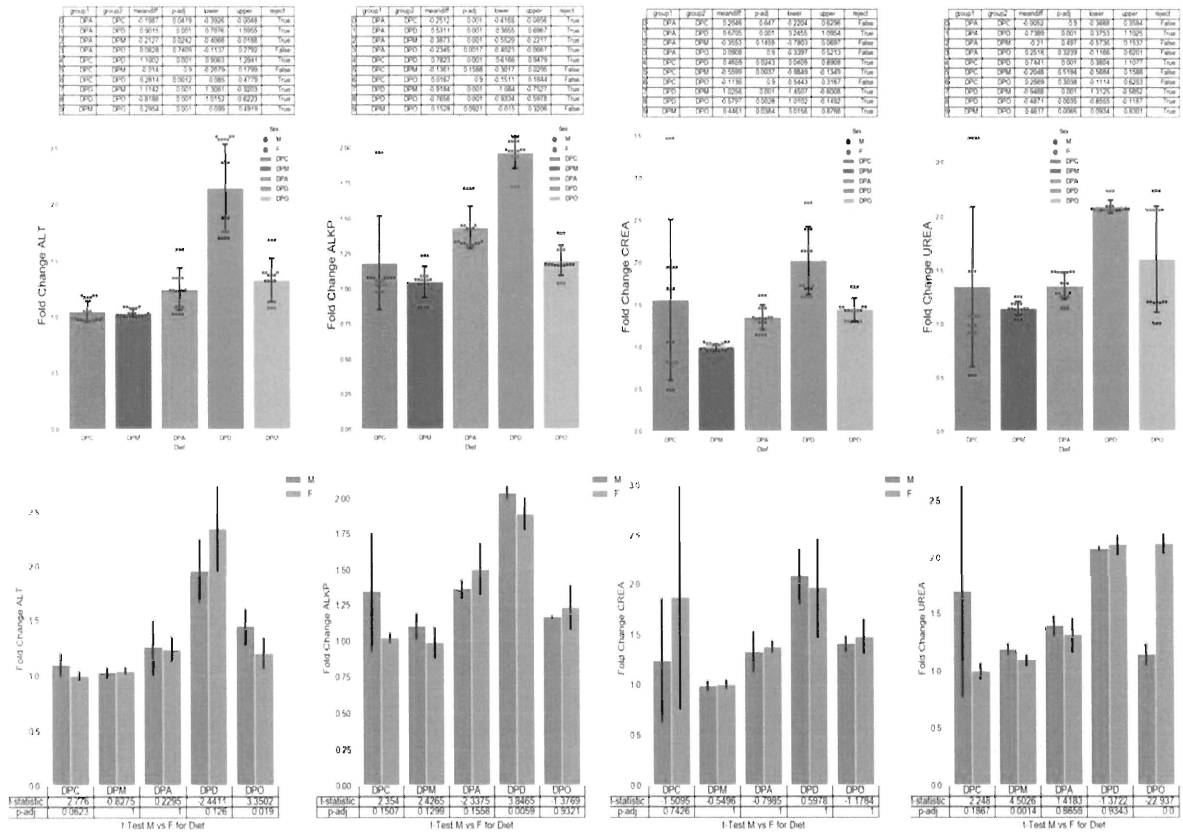


Figura 6 Grafice prin bare ale modificărilor enzimelor hepatice, creatininei și ureei. Sunt prezentate comparațiile dintre grupurile de dietă (rândul de sus, ANOVA, testul pentru comparații multiple Tukey) și între masculii și femelele din fiecare dietă (rândul de jos, teste t Student). Analiza statistică și vizualizările au fost făcute în Python 3.

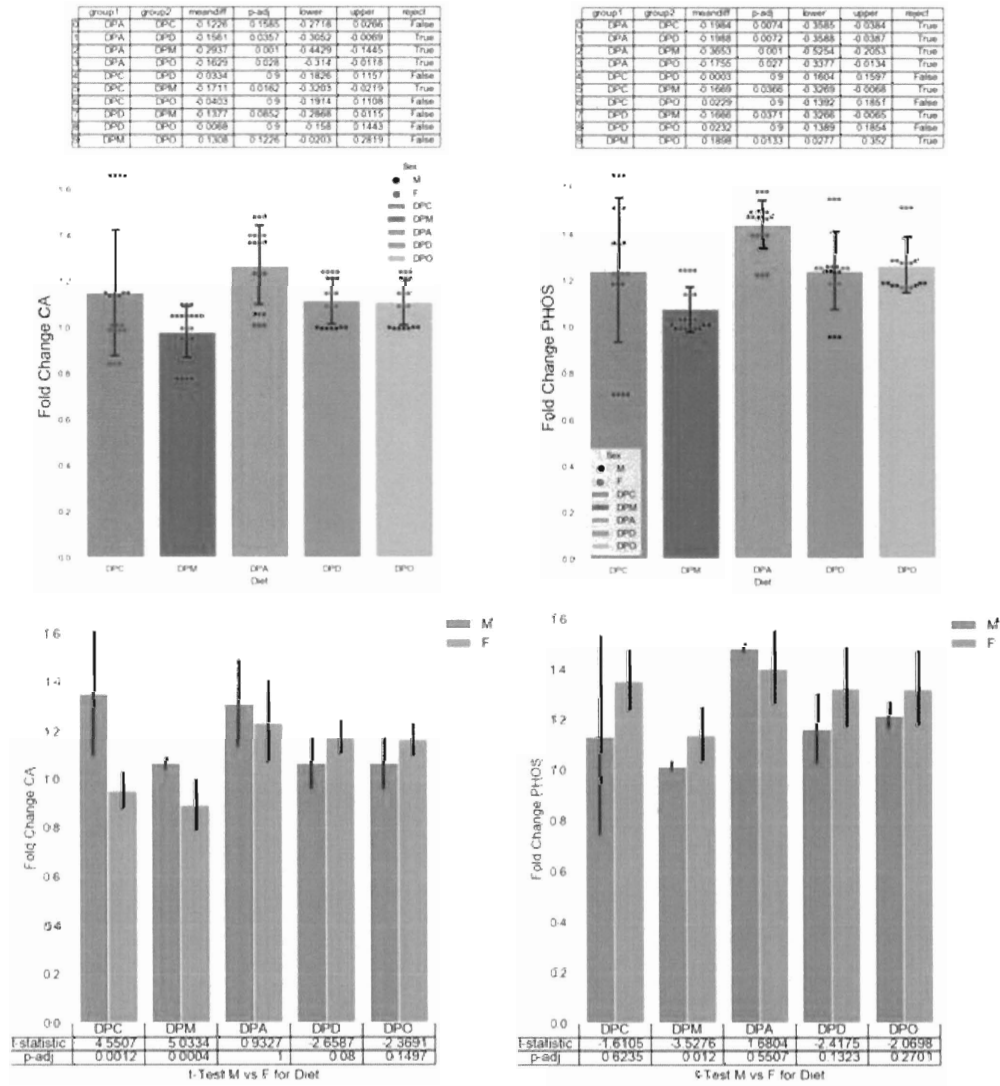


Figura 7 Grafice prin bare ale modificărilor calciului și fosforului seric. Sunt prezentate comparațiile dintre grupurile de dietă (rândul de sus, ANOVA, testul pentru comparații multiple Tukey) și între masculii și femelele din fiecare dietă (rândul de jos, teste t Student). Analiza statistică și vizualizările au fost făcute în Python 3.

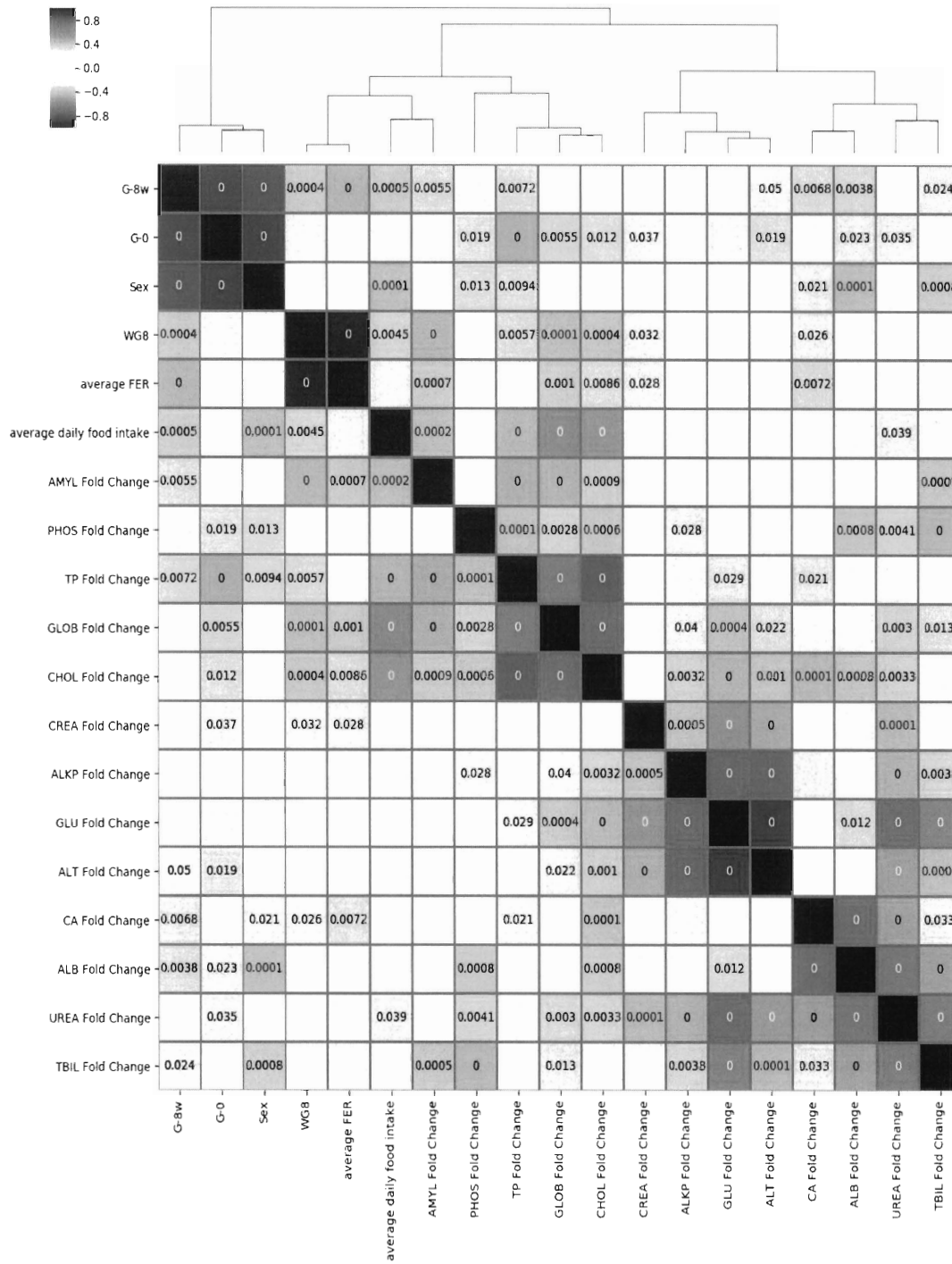


Figura 8. Corelații dintre parametrii plasmatici, consumul de hrană și creșterea în greutate. Culoarea celulelor indică valoarea coeficientului Pearson r (albastru: corelații pozitive, roșu: corelații negative) atunci când corelația a fost semnificativă, valoarea p a fost indicată în celula corespunzătoare. Parametrii au fost grupați utilizând algoritmul Ward de minimizare a varianței și vizualizarea a fost făcută în Python 3, cu pachetul seaborn.

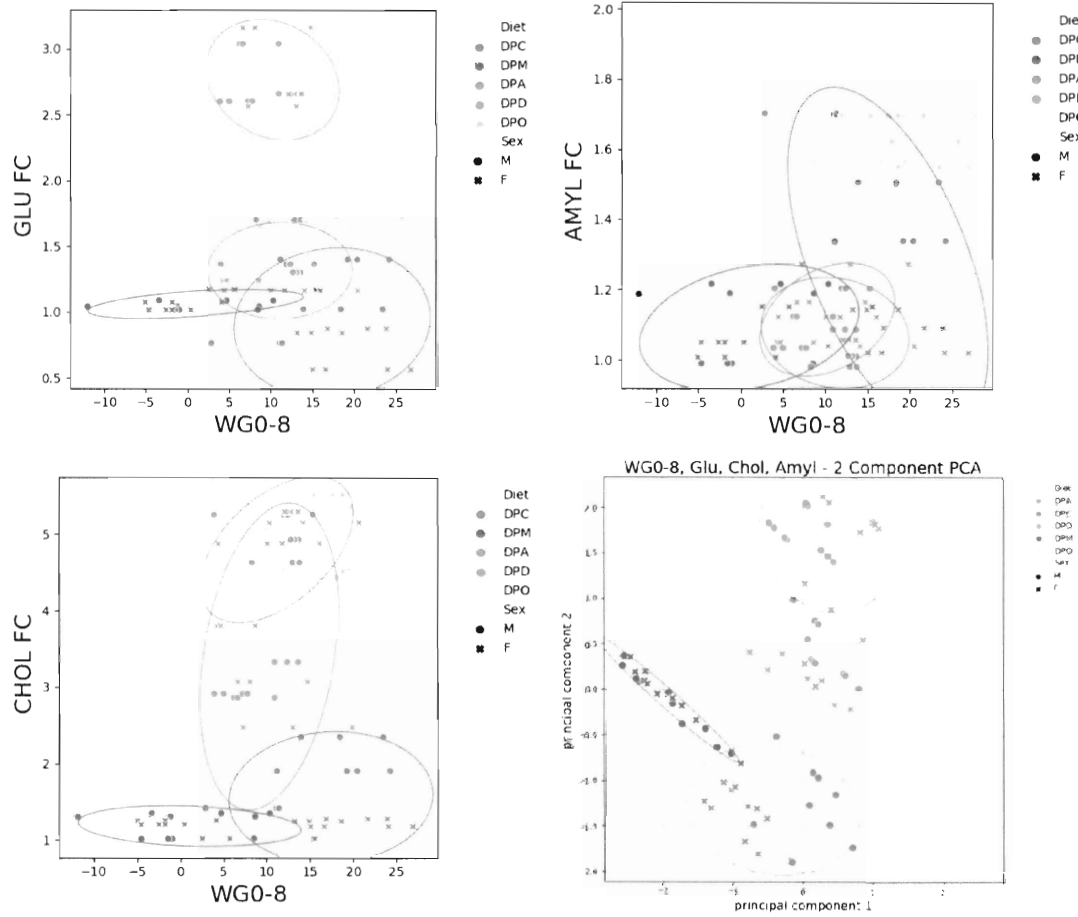


Figura 9. Diagrame prin puncte arătând separarea populațiilor pe baza creșterii în greutate, glicemiei, colesterolului și amilazei serice. Diagrama din dreapta jos prezintă rezultatul analizei de reducere a dimensionalității prin PCA (Analiza Componentelor Principale) arătând o bună separare a efectelor dietelor din punctul de vedere al celor 4 parametri studiați.

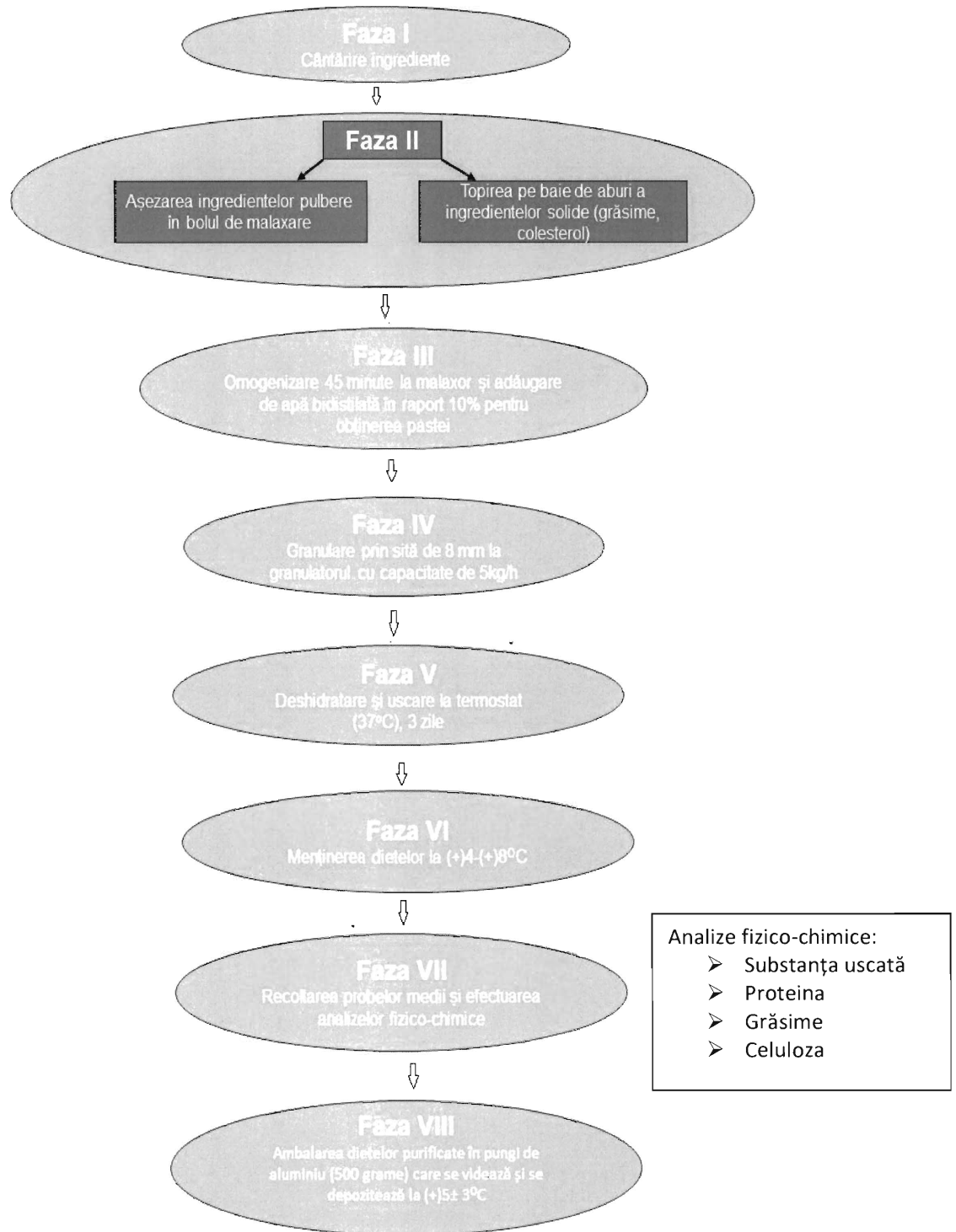
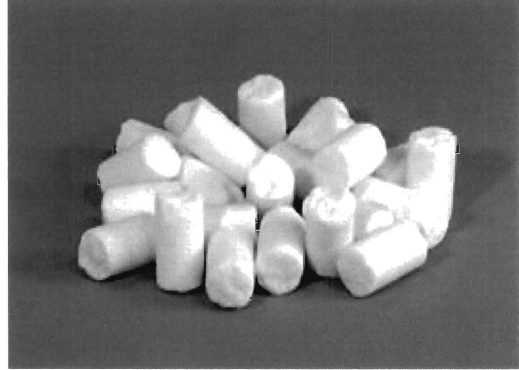


Fig. 10. Etapele principale ale procedurii de fabricație ale dietelor purificate



Dietă naturală



Dietă purificată

Figura 11. Diferențe de aspect între cele două tipuri de diete – naturale și purificate.