

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
“TULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ**

**Rezumatul  
TEZEI DE DOCTORAT**

**Balanța oxidanți/antioxidanți în condiții de stres**

**Conducător științific  
Prof. Dr. Simona Tache**

**Doctorand  
Alexandra –Cristina Berghian**

**CLUJ-NAPOCA  
2012**

# CUPRINS

<b>ABREVIERI</b>	15
<b>INTRODUCERE</b>	
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Considerații generale asupra stresului</b>	19
1.1. Clasificarea agenților stresori	19
1.2. Clasificarea stresului	20
1.3. Eustresul	21
1.4. Distresul	22
1.5. Stresul experimental	22
<b>2. Balanța oxidanți/antioxidanți</b>	23
2.1. Considerații generale	23
2.2. Speciile reactive de oxigen și azot	23
2.3. Clasificarea antioxidantilor	24
2.4. Reglarea balanței oxidanți/antioxidanți	25
<b>3. Carnitina</b>	26
3.1. Considerații generale	26
3.2. Biosinteza	26
3.3. Circuitul în organism	27
3.4. Metabolismul carnitinei	28
3.5. Rolurile carnitinei	29
3.6. Implicațiile terapeutice	30
<b>4. Stresul anakinetic</b>	31
4.1. Considerații generale	31
4.2. Efectele stresului anakinetic asupra organismului	31
<b>5. Stresul hipotermic</b>	32
5.1. Considerații generale	32
5.2. Efectele stresului hipotermic asupra organismului	33
5.3. Hipotermia terapeutică	34
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	37
<b>1. Obiective</b>	39
<b>2. Metodologie generală</b>	41
2.1. Metode de inducere a stresului	41
2.2. Metode biochimice	41
2.3. Metode de determinare a motilității și emotivității	43
2.4. Suplimentarea cu carnitină	43
2.5. Analiza statistică	43

<b>3. Studiul 1 - Influența stresului anakinetic cronic asupra balanței serice oxidanți/antioxidanți la șobolanii suplimentați cu carnitină</b>	45
3.1. Introducere	45
3.2. Obiective	45
3.3. Material și metodă	45
3.4. Rezultate	46
3.5. Discuții	49
3.6. Concluzii	50
<b>4. Studiul 2 – Influența stresului anakinetic cronic asupra balanței tisulare oxidanți/antioxidanți la șobolanii suplimentați cu carnitină</b>	51
4.1. Introducere	51
4.2. Obiective	51
4.3. Material și metodă	51
4.4. Rezultate	52
4.5. Discuții	56
4.6. Concluzii	57
<b>5. Studiul 3 – Influența stresului hipotermic cronic asupra balanței serice oxidanți/antioxidanți la șobolanii suplimentați cu carnitină</b>	59
5.1. Introducere	59
5.2. Obiective	59
5.3. Material și metodă	59
5.4. Rezultate	59
5.5. Discuții	63
5.6. Concluzii	64
<b>6. Studiul 4 – Influența stresului hipotermic cronic asupra balanței tisulare oxidanți/antioxidanți la șobolanii suplimentați cu carnitină</b>	65
6.1. Introducere	65
6.2. Obiective	65
6.3. Material și metodă	65
6.4. Rezultate	66
6.5. Discuții	70
6.6. Concluzii	71
<b>7. Studiul 5 – Influența stresului combinat cronic asupra balanței serice oxidanți/antioxidanți la șobolanii suplimentați cu carnitină</b>	73
7.1. Introducere	73
7.2. Obiective	73
7.3. Material și metodă	73
7.4. Rezultate	73

7.5. Discuții	77
7.6. Concluzii	78
<b>8. Studiul 6 – Influența stresului combinat cronic asupra balanței tisulare oxidanți/antioxidanți la șobolanii suplimentați cu carnitină</b>	81
8.1. Introducere	81
8.2. Obiective	81
8.3. Material și metodă	81
8.4. Rezultate	82
8.5. Discuții	86
8.6. Concluzii	87
<b>9. Studiul 7 – Influența stresului anakinetic acut asupra motilității și emotivității la șobolanii suplimentați cu carnitină</b>	89
9.1. Introducere	89
9.2. Obiective	89
9.3. Material și metodă	89
9.4. Rezultate	89
9.5. Discuții	91
9.6. Concluzii	92
<b>10. Studiul 8 – Influența stresului hipotermic acut asupra motilității și emotivității la șobolanii suplimentați cu carnitină</b>	93
10.1. Introducere	93
10.2. Obiective	93
10.3. Material și metodă	93
10.4. Rezultate	93
10.5. Discuții	95
10.6. Concluzii	96
<b>11. Studiul 9 – Influența stresului combinat acut asupra motilității și emotivității la șobolanii suplimentați cu carnitină</b>	97
11.1. Introducere	97
11.2. Obiective	97
11.3. Material și metodă	97
11.4. Rezultate	98
11.5. Discuții	99
11.6. Concluzii	100
<b>12. Discuții generale</b>	101
<b>13. Concluzii generale</b>	103
<b>14. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	105
14.1. Originalitatea lucrării	105
14.2. Contribuțiile inovative	105
<b>REFERINȚE</b>	107

**Cuvinte cheie:** stres anakinetic, hipotermic, combinat acut/cronic, stres oxidativ, antioxidanți, carnitină

## 1.Obiective

Stresul este unul dintre conceptele științifice cele mai dezbătute începând cu definițiile, terminologia, teoriile, tipurile și formele, manifestările asupra organismului, resursele adaptative, metodele de prevenire și combatere. Clasificările tipurilor de stres se bazează pe durata de acțiune, continuitatea acțiunii agentului stresor, numărul, natura și intensitatea agenților, răspunsul la nivelul organismului, modul de producere și semnificația răspunsului. Formele de stres sunt multiple: fizic, ambiental, psihosocial, profesional, metabolic, psihosomatic, somatopsihic, psihoemoțional, prenatal, postnatal, cultural etc.

În lucrarea de față ne-am propus să studiem experimental:

1. efectul stresului anakinetic, hipotermic și complex cronic asupra balanței serice, tisulare oxidanți/antioxidanți la șobolani;
2. implicațiile suplimentării cronice cu carnitină asupra balanței serice, tisulare oxidanți/antioxidanți la șobolani;
3. efectul stresului anakinetic, hipotermic și complex acut asupra motilității și emotivității la șobolani;
4. implicațiile suplimentării acute cu carnitină asupra motilității și emotivității la șobolani;

## 2. Metodologie generală

### Protocol general al cercetării

*Obiective:* implicația suplimentării cu carnitină asupra balanței O/AO la nivel seric și tisular, în stresul anakinetic prin imobilizare și stresul hipotermic; influențele carnitinei asupra comportamentului motor spontan și emoțional în condiții de stres acut anakinetic, hipotermic și combinat.

*Locul desfășurării studiului:* Laboratorului de Fiziologie Experimentală, din cadrul Catedrei de Fiziologie a UMF "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca.

### Loturile de animale

- A. 8 loturi de șobolani masculi, adulți, rasa Wistar, menținuți în condiții de vivarium adecvate, (n=10 animale/lot)

I: Lot martor

II-VIII: Loturi supuse stresului experimental cronic

- II-supus stresului hipotermic
- III-supus stresului anakinetic
- IV-supus stresului combinat (imobilizare și hipotermie)
- V-suplimentat cu carnitina .
- VI-supus stresului hipotermic și suplimentat cu carnitina
- VII-supus stresului anakinetic și suplimentat cu carnitina
- VIII-supus stresului anakinetic, hipotermic și suplimentat cu carnitină

B. 8 loturi de șobolani masculi, adulți, rasa Wistar, menținuți în condiții de vivarium adecvate, (n=10 animale/lot)

I: Lot martor

II-VIII: Loturi supuse stresului experimental acut

- II-supus stresului hipotermic
- III-supus stresului anakinetic
- IV-supus stresului combinat (imobilizare și hipotermie)
- V-suplimentat cu carnitina .
- VI-supus stresului hipotermic și suplimentat cu carnitina
- VII-supus stresului anakinetic și suplimentat cu carnitina
- VIII-supus stresului anakinetic, hipotermic și suplimentat cu carnitina

#### *Metodele de inducere a stresului*

Stresul anakinetic a fost provocat prin imobilizarea zilnică a șobolanilor, 3 ore pe zi, într-un cilindru închis, cu orificii pentru ventilație.

Stresul hipotermic a fost indus prin menținerea pentru 3 ore zilnic, la temperatura de 5°C într-o cameră frigorifică. Expunerea animalelor la stresul experimental acut a avut o durată de 3 zile, iar cel cronic 15 zile.

#### *Suplimentarea cu carnitină*

Animalele fost suplimentate zilnic, preexpunere la stres, timp de 3 zile pentru administrare acută și timp de 15 zile pentru cea cronică, prin gavaj oral cu L-Carnitină (Carnil 100 mg/ml, în doză de 100 mg/kg c).

#### *Metodele de evaluare:*

##### *a. Metodele biochimice*

Indicatorii bilanței O/AO au fost evaluați prin metode biochimice de dozare din ser, ficat și mușchiul gastrocnemian. Indicatorii pentru SO sunt: malondialdehida (MDA), proteinele carbonilate (PC). Indicatorii pentru apărarea AO sunt: determinarea capacității de donator de hidrogen (DH), determinarea conținutului de grupări tiol totale (SH), determinarea glutatationului .

##### *b. Evaluare comportamentală*

Determinarea emotivității (suma micțiunilor și defecațiilor) și motilității (deplasările și cabrările) s-a făcut pe baza testului Open.

*Analiza statistică:* aplicațiile Statistica 8.0, GraphPad și Microsoft EXCEL.

## **3. Studiul 1. Influența stresului anakinetic cronic asupra bilanței serice oxidanți/antioxidanți la șobolanii suplimentați cu carnitină**

### **Rezultate**

1. Stresul anakinetic cronic determină modificări serice ale indicatorilor pentru SO cu creșterea semnificativă a MDA și PC și scăderi semnificative ale DH și SH, față de lotul martor.

2. Suplimentarea cu carnitină modifică ne semnificativ statistic indicatorii bilanței serice redox față de lotul martor. Suplimentarea cu carnitină și stresul anakinetic determină creșteri semnificative MDA și PC, și scăderi semnificative ale DH și SH, față de lotul martor.

3. Suplimentarea cu carnitină și stresul anakinetic cronic determină creșteri semnificative ale MDA și PC și scăderi semnificative ale SH față de lotul suplimentat.

4. Suplimentarea cu carnitină și stresul anakinetic cronic determină modificări serice semnificative statistic cu diminuarea MDA și PC și creșterea SH, față de lotul supus stresului anakinetic cronic.

## **4.Studiul 2. Influența stresului anakinetic cronic asupra balanței tisulare oxidanți/antioxidanți la șobolanii suplimentați cu carnitină**

### **Rezultate**

1. Stresul anakinetic cronic determină creșteri semnificative statistic ale MDA și PC în ficat și mușchi și scăderi semnificative ale DH, SH și GSH în aceleași țesuturi, față de lotul martor.

2. Suplimentarea cu carnitină modifică ne semnificativ statistic indicatorii balanței tisulare redox, față de lotul martor.

3. Suplimentarea cu carnitină și stresul anakinetic cronic determină creșteri semnificative ale MDA și PC în ficat, creșteri semnificative ale PC în mușchi și scăderi semnificative ale DH în ficat și ale GSH în ficat și mușchi, față de lotul martor.

4. Suplimentarea cu carnitină și stresul anakinetic cronic induce modificări semnificative ale MDA și PC în ficat, PC în mușchi și scăderi semnificative ale GSH în mușchi și ale DH și GSH în ficat, față de lotul suplimentat.

5. Suplimentarea cu carnitină și stresul anakinetic cronic produce scăderi semnificative statistic ale MDA în mușchi și PC în ficat și creșterea DH și SH în ficat și mușchi, față de stresul anakinetic cronic.

## **5.Studiul 3. Influența stresului hipotermic cronic asupra balanței serice oxidanți/antioxidanți la șobolanii suplimentați cu carnitină**

### **Rezultate**

1. Stresul hipotermic cronic determină, față de lotul martor, creșteri semnificative statistic ale MDA și PC și scăderi semnificative statistic ale DH, SH și GSH la nivel seric.

2. Suplimentarea cu carnitină determină, față de lotul martor, modificări ne semnificative statistic ale indicatorilor balanței redox serice.

3. Suplimentarea cu carnitină și stresul hipotermic cronic determină, față de lotul martor, creșteri semnificative statistic ale MDA serice.

4. Suplimentarea cu carnitină și stresul hipotermic cronic, determină față de lotul suplimentat cu carnitină, creșteri semnificative statistic ale MDA serice.

5. Suplimentarea cu carnitină și stresul hipotermic cronic determină scăderi semnificative statistic ale MDA și PC, și creșteri semnificative statistic ale DH, SH și GSH, la nivel seric, față de stresul hipotermic cronic.

## **6.Studiul 4. Influența stresului hipotermic cronic asupra balanței tisulare oxidanți/antioxidanți la șobolanii suplimentați cu carnitină**

### **Rezultate**

1. Stresul hipotermic cronic determină, față de lotul martor, creșteri semnificative statistic ale MDA și PC și scăderi semnificative ale DH și GSH în ficat, și creșteri semnificative statistic ale MDA și PC, și scăderi semnificative ale DH, SH și GSH în mușchi.

2. Lotul suplimentat cu carnitină determină, față de lotul martor, modificări ne semnificative ale indicatorilor redox, în ficat și mușchi.

3. Suplimentarea cu carnitină și stresul hipotermic cronic determină, față de lotul martor, creșteri semnificative ale MDA și PC, și scăderi semnificative ale DH și GSH în ficat, și creșteri semnificative ale PC, cu scăderi semnificative ale GSH în mușchi.

4. Suplimentarea cu carnitină și stresul hipotermic cronic determină, față de lotul suplimentat cu carnitină, creșteri semnificative ale PC și scăderi semnificative ale DH și GSH în ficat, scăderi semnificative ale MDA și GSH și creșteri semnificative ale PC în mușchi.

5. Suplimentarea cu carnitină și stresul hipotermic cronic determină diminuarea semnificativă statistic a MDA din ficat și mușchi și a PC din ficat, și creșterea semnificativă statistic a DH în ficat și mușchi și, a SH și GSH în mușchi.

## **7.Studiul 5. Influența stresului combinat cronic asupra balanței serice oxidanți/antioxidanți la șobolanii suplimentați cu carnitină**

### **Rezultate**

1. Stresul combinat cronic determină, față de stresul hipotermic cronic, în ser, creșteri semnificative statistic ale MDA și PC, scăderi semnificative statistic ale DH și SH.

2. Stresul combinat cronic determină față de stresul anakinetic cronic, în ser, creșteri semnificative ale MDA și PC, și scăderi semnificative ale DH, SH și GSH.

3. Suplimentarea cu carnitină și stresul combinat cronic determină, față de stresul hipotermic cronic, creșteri semnificative ale MDA și PC și creșteri semnificative ale SH și GSH, în ser.

4. Suplimentarea cu carnitină și stresul combinat cronic determină, față de stresul combinat cronic, scăderi semnificative ale MDA și creșteri semnificative statistic ale SH și GSH, în ser.

5. Suplimentarea cu carnitină și stresul combinat cronic determină, față de stresul anakinetic cronic, creșteri semnificative ale MDA, PC și SH.

## **8.Studiul 6. Influența stresului combinat cronic asupra balanței tisulare oxidanți/antioxidanți la șobolanii suplimentați cu carnitină**

### **Rezultate**

1. Stresul combinat cronic determină, față de stresul hipotermic cronic, creșteri semnificative statistic ale MDA și scăderi semnificative statistic ale SH în ficat, creșteri semnificative statistic ale MDA și scăderi semnificative statistic ale GSH în mușchi.

2. Stresul combinat cronic determină, față de stresul anakinetic cronic, creșteri semnificative statistic ale MDA și scăderi semnificative statistic ale GSH în ficat și mușchi.

3. Suplimentarea cu carnitină și stresul combinat cronic determină, față de stresul hipotermic cronic, scăderi semnificative statistic ale PC în ficat, scăderi semnificative statistic ale MDA și creșteri semnificative statistic ale DH, SH și GSH în mușchi.

4. Suplimentarea cu carnitină și stresul combinat cronic determină, față de stresul anakinetic cronic, scăderi semnificative statistic ale PC, creșteri semnificative statistic ale DH, SH în ficat și creșteri semnificative statistic ale DH, SH în mușchi.

5. Suplimentarea cu carnitină și stresul combinat cronic determină, față de stresul combinat cronic, scăderi semnificative statistic ale MDA în ficat și mușchi, ale PC în ficat, și creșteri semnificative statistic ale DH și SH în ficat și mușchi și GSH în mușchi.



## **9.Studiul 7. Influența stresului anakinetic acut asupra motilității și emotivității la șobolanii suplimentați cu carnitină**

### **Rezultate**

1. Stresul anakinetic acut determină modificări semnificative statistic asupra comportamentului, cu scăderea motilității și creșterea emotivității comparativ cu lotul martor și lotul suplimentat cu carnitină.
2. Suplimentarea cu carnitină nu produce modificări semnificative statistic ale motilității spontane și emotivității, față de martori.
3. Suplimentarea cu carnitină și stresul anakinetic acut determină scăderi semnificative statistic ale motilității și creșteri semnificative statistic ale emotivității, comparativ cu lotul martor și lotul suplimentat.
4. Suplimentarea cu carnitină și stresul anakinetic acut, determină creșteri ne semnificative ale motilității și scăderi ne semnificative ale emotivității, față de stresul anakinetic acut.

## **10.Studiul 8. Influența stresului hipotermic acut asupra motilității și emotivității la șobolanii suplimentați cu carnitină**

### **Rezultate**

1. Stresul hipotermic acut reduce semnificativ statistic comportamentul motor și produce creșteri semnificative statistic ale emotivității, comparativ cu lotul martor și lotul suplimentat cu carnitină.
2. Suplimentarea cu carnitină produce modificări ne semnificative ale motilității spontane și emotivității față de animalele martor.
3. Suplimentarea cu carnitină și stresul acut hipotermic determină scăderi semnificative statistic ale motilității spontane și creșteri ne semnificative ale emotivității, față de lotul martor.
4. Suplimentarea cu carnitină și stresul hipotermic acut nu are efect protector asupra motilității și emotivității, față de stresul hipotermic acut.

## **11.Studiul 9. Influența stresului combinat acut asupra motilității și emotivității la șobolanii suplimentați cu carnitină**

### **Rezultate**

1. Stresul combinat acut determină, față de hipotermic acut și stresul anakinetic acut ,scăderi semnificative ale motilității și creșteri ne semnificative ale emotivității.
2. Suplimentarea cu carnitină și stresul combinat acut determină față de stresul hipotermic acut, scăderi semnificative ale motilității.
3. Suplimentarea cu carnitină și stresul combinat acut determină față de stresul anakinetic acut scăderi ne semnificative ale motilității.
4. Suplimentarea cu carnitină și stresul combinat acut determină față de stresul combinat acut creșteri ne semnificative ale motilității și emotivității.

## **13. Concluzii generale**

1. Stresul intermitent anakinetic cronic și hipotermic cronic determină creșteri semnificative ale SO și scăderi semnificative ale apărării AO la nivel seric, în ficat și în mușchi, față de lotul martor.

2. Stresul cronic combinat – anakinetic și hipotermic – determină creșteri semnificative ale SO și scăderi semnificative ale apărării AO, față de stresul cronic anakinetic și stresul cronic hipotermic, la nivel seric. La nivel tisular, indicatorii SO și ai apărării AO au urmat o modificare asemănătoare.

3. Suplimentarea cu carnitină, la loturile supuse stresului anakinetic, hipotermic și combinat cronic, a avut efecte protectoare, manifestate prin scăderea SO și creșterea indicatorilor AO în ser. Efectul cel mai evident a fost în cazul modelului de stres hipotermic.

4. Suplimentarea cu carnitină în condiții de stres anakinetic, hipotermic și combinat cronic, a avut efecte protectoare prin scăderea SO și creșterea apărării AO la nivel tisular. Efectul cel mai evident a fost în cazul stresului hipotermic și combinat cronic, în țesutul hepatic și muscular.

5. Suplimentarea cronică cu carnitină la sedentari determină modificări ne semnificative ale balanței redox în ser, ficat și mușchi. Suplimentarea acută cu carnitină produce modificări ne semnificative ale comportamentului motor involuntar și emoțional.

6. Stresul anakinetic, hipotermic și stresul combinat acut determină scăderi semnificative ale motilității involuntare și creșteri semnificative ale emotivității. Suplimentarea acută cu carnitină nu influențează comportamentul motor involuntar și emoțional, față de stresul anakinetic, hipotermic și combinat acut.

7. Imobilizarea și hipotermia pot fi considerate ca agenți stresori pentru inducerea distresului în laborator în studiul efectelor acestora aplicabile în terapia prin imobilizare și crioterapie.

8. Administrarea cronică a carnitinei în condiții de stres poate contribui la scăderea stresului oxidativ și îmbunătățirea protecției AO. Combaterea SO cauzat de imobilizare și hipotermie, ca și factor potențial de risc pentru organism, recomandă suplimentare de AO.

## **14. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

### **14.1. Originalitatea lucrării**

Lucrarea abordează două direcții noi, puțin investigate – stresul anakinetic și stresul hipotermic, prezente în activitatea medicală:

- imobilizarea este o tehnică kinetoterapeutică statică, anakinetică, cu scop de punere în repaus, de contenție și de corecție, cu durată variabilă a unor segmente corporale sau a corpului în întregime, utilizată în tratamentul și recuperarea afecțiunilor aparatului locomotor, în ortopedie;

- crioterapia se utilizează pentru reducerea fenomenelor inflamatorii locale și a durerii în stadiile acute în medicina sportivă și fizioterapie. În condiții naturale, ambientale, în expedițiile în zonele polare și la mari altitudini, stresul hipotermic poate fi de asemenea prezent, asociat cu alți factori fizici ca presiunea, umiditatea, radiațiile chiar și cu stresul posttraumatic accidental.

Sunt studiate:

- efectele expunerii cronice la stres anakinetic, hipotermic și combinat și ale suplimentării cronice cu carnitină asupra homeostaziei redox la nivel seric și tisular în ficat și mușchi gastrocnemian

- efectele expunerii acute la stres anakinetic, hipotermic și combinat și ale suplimentării acute cu carnitină asupra comportamentului motor și emotivității.

## **14.2.Contribuțiile inovative**

Teza are valoare aplicativă privind:

- efectele biochimice nefavorabile ale stresului anakinetic și hipotermic asupra homeostaziei redox, ca factori potențiali de risc pentru organism;
- stresul cronic combinat – anakinetic și hipotermic – determină creșteri semnificative ale SO și scăderi semnificative ale apărării AO, față de stresul cronic anakinetic și stresul cronic hipotermic, la nivel seric. La nivel tisular, indicatorii SO și ai apărării AO au urmat o modificare asemănătoare.
- rolul protector al carnitinei ca agent antioxidant direct și indirect, recomandă asocierea terapiei antioxidante în practica medicală kinetoterapeutică și recuperatorie, pentru reducerea efectelor nefavorabile ale SRON și a SON și menținerea homeostaziei redox, în limite normale.

## REFERINȚE SELECTIVE

1. Nayanatara AK, Tripathi Y, Nagaraja HS et al. Effect of cronic immobilization stress on some selected physiological, biochemical and lipid parameters in Wistar Albino rats. *Res J Pharm Biol Che Sci.* 2012; 3(1): 34-42.
2. Chung IM, Kim YM, Yoo MH, et al. Immobilization stress induces endothelial dysfunction by oxidative stress via the activation of the angiotensin II/its type I receptor pathway. *Atherosclerosis.* 2010;213(1):109-114.
3. Erdem M, Taner Guneş, Şen C, Bostan B, et al. Joint immobilization increases reactive oxygen species: an experimental study. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2009;43(5):436-443.
4. Dalla Libera L, Ravara B, Gobbo V, Tarricone E, Vitadello M, Biolo G, Vescovo G, Gorza L. A transient antioxidant stress response accompanies the onset of disuse atrophy in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2009;107(2):549-557.
5. Berghian AC, Moldovan R, Decea N, Tache S. Oxidant/antioxidant balance in carnitine supplemented rats exposed to chronic immobilization stress. *Studia UBB EDUCATIO ARTIS GYMNI.* 2012; LVII, (3): 91-100.
6. Chowdhury P, Soulsby M, Kim K. L-carnitine influence on oxidative stress induced by hind limb unloading in adult rats. *Aviat Space Environ Med.* 2007;78(6):554-556.
7. Chaturvedi P. Bitter melon protects against lipid peroxidation caused by immobilization stress in albino rats. *Int J Vitam Nutr Res.* 2009;79(1):48-56.
8. Kolodziejczyk J, Saluk-Juszczak J, Wachowicz B. L-Carnitine protects plasma components against oxidative alterations. *Nutrition.* 2011;27(6):693-699.
9. Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S. Oxidative stress in cold-induced hyperthyroid state. *J. Exp Biol.* 2010; 213:2899-2911.
10. Berghian AC, Moldovan R, Decea N, Tache S. Oxidant/antioxidant balance in carnitine supplemented rats exposed to chronic hypothermic stress. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine.* 2012; 69(1-2):67-73.
11. Venditti P, Pamplona R, Ayla V, et al. Differential effects of experimental and cold induced hyperthyroidism on factors inducing rat liver oxidative damage. *J Exp Biol.* 2006;209:817-825.
12. Bodea F, Bocea A, Decea N. L-carnitine decreases oxidative stress induced by experimental hypobaric hypoxia. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 2010;16(2):78-81.
13. Zafir A, Banu N. Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress.* 2009;12(2):167-177.
14. Buciolli SA, de Abreu LC, Valenti VE, Vannucchi H. Carnitine supplementation effects on non-enzymatic antioxidants in young rats submitted to exhaustive exercise stress. *J Strength Cond Res.* 2012;26(6):1695-1700.
15. Jones P, Stenfer KB. Service users and staff from secure intellectual disability settings: view on three physical restraint procedures. *J Intellect Disabl.* 2008, 12 (3): 229-237.
16. Berghian AC, Raus C, Tache S, Moldovan R, Boroş-Balint I. Influența stresului anakinetic acut asupra motilității și emotivității la șobolanii suplimentați cu carnitină. *Palestrica Mileniului III – Civilizație și Sport,* 2011; 12(3):221–225
17. Berghian AC, Tache S, Moldovan R. Influența stresului acut hipotermic și prin imobilizare asupra motilității și emotivității la șobolanii suplimentați cu carnitină. *Palestrica Mileniului III – Civilizație și Sport,* 2011; 12( 4): 323–326.
18. Berghian AC, Tache S, Moldovan R. The influence of acute hypothermic stress on the motility and emotivity in carnitine supplemented rats. *Studia UBB Educatio Artis Gymn,* 2011; LVI (3): 21-30.
19. Imamura T, Ishizuka O, Aizawa N, Zhong C, Ogawa T, Nakayama T, Tanabe T, Nishizawa O. Cold environmental stress induces detrusor overactivity via resiniferatoxin-sensitive nerves in conscious rats. *NeuroUrol Urodyn.* 2008; 27(4):348-252.
20. Klenerová V, Sída P, Krejčí I et al. Effects of two types of restraint stress on spontaneous behavior of Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Physiol Pharmacol.* 2007; 58(1):83-94.

**“TULIU HAȚIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE  
AND PHARMACY CLUJ-NAPOCA  
FACULTY OF MEDICINE**

**Abstract of the  
DOCTORAL THESIS**

**Oxidants/antioxidants balance in stress conditions**

**Scientific advisor  
Prof. Dr. Simona Tache**

**PhD Student  
Alexandra –Cristina Berghian**

**CLUJ-NAPOCA  
2012**

# CONTENT

<b>ABBREVIATIONS</b>	15
<b>INTRODUCTION</b>	
<b>ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Stress general considerations</b>	19
1.1. Classification of stress agents	19
1.2. Stress classification	20
1.3. Eustress	21
1.4. Distress	22
1.5. Experimental stress	22
<b>2. Oxidants/antioxidants balance</b>	23
2.1. General considerations	23
2.2. Oxygen and nitrogen reactive species	23
2.3. Classification of antioxidants	24
2.4. Regulation of oxidant/antioxidants balance	25
<b>3. Carnitine</b>	26
3.1. General consideration	26
3.2. Biosynthesis	26
3.3. Circuit in the organism	27
3.4. Carnitine metabolism	28
3.5. Carnitine functions	29
3.6. Therapeutic implications	30
<b>4. Anakinetic stress</b>	31
4.1. General consideration	31
4.2. Anakinetic stress effects on organism	31
<b>5. Hypothermic stress</b>	32
5.1. General consideration	32
5.2. Hypothermic stress effects on organism	33
5.3. Therapeutic hypothermia	34
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	37
<b>1. Objectives</b>	39
<b>2. General methodology</b>	41
2.1. Methods for experimental stress	41
2.2. Biochemistry methods	41
2.3. Methods for measuring motility and emotivity	43
2.4. Carnitine supplementation	43
2.5. Statistical analysis	43
<b>3. Study 1. The influence of chronic immobilization stress on the</b>	45

<b>oxidant/antioxidant balance in carnitine supplemented rats</b>	
3.1. Introduction	45
3.2. objectives	45
3.3. Material and methods	45
3.4. Results	46
3.5. Discussions	49
3.6. Conclusions	50
<b>4. Study 2. The influence of anakinetic chronic stress on the tissue oxidant/antioxidant balance in carnitine supplemented rats</b>	51
4.1. Introduction	51
4.2. Objectives	51
4.3. Material and methods	51
4.4. Results	52
4.5. Discussions	56
4.6. Conclusions	57
<b>5. Study 3. The influence of chronic hypothermic stress on the serum oxidant/antioxidant balance in carnitine supplemented rats</b>	59
5.1. Introduction	59
5.2. Objectives	59
5.3. Material and methods	59
5.4. Results	59
5.5. Discussions	63
5.6. Conclusions	64
<b>6. Study 4. The influence of chronic hypothermic stress on the tissue oxidant/antioxidant balance in carnitine supplemented rats</b>	65
6.1. Introduction	65
6.2. Objectives	65
6.3. Material and methods	65
6.4. Results	66
6.5. Discussions	70
6.6. Conclusions	71
<b>7. Studiul 5. The influence of chronic combined stress on the serum oxidant/antioxidant balance in carnitine supplemented rats</b>	73
7.1. Introduction	73
7.2. Objectives	73
7.3. Material and methods	73
7.4. Results	73
7.5. Discussions	77
7.6. Conclusions	78

<b>8. Study 6. The influence of chronic combined stress on the tissue oxidant/antioxidant balance in carnitine supplemented rats</b>	81
8.1. Introduction	81
8.2. Objectives	81
8.3. Material and methods	81
8.4. Results	82
8.5. Discussions	86
8.6. Conclusions	87
<b>9. Study 7. The influence of acute anakinetic stress on motility and emotivity in carnitine supplemented rats</b>	89
9.1. Introduction	89
9.2. Objectives	89
9.3. Material and methods	89
9.4. Results	89
9.5. Discussions	91
9.6. Conclusions	92
<b>10. Study 8. –The influence of acute hypothermic stress on motility and emotivity in carnitine supplemented rats</b>	93
10.1. Introduction	93
10.2. Objectives	93
10.3. Material and methods	93
10.4. Results	93
10.5. Discussions	95
10.6. Conclusions	96
<b>11. Study 9. The influence of acute combined stress on motility and emotivity in carnitine supplemented rats</b>	97
11.1. Introduction	97
11.2. Objectives	97
11.3. Material and methods	97
11.4. Results	98
11.5. Discussions	99
11.6. Conclusions	100
<b>12. General discussions</b>	101
<b>13. General conclusions</b>	103
<b>14. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	105
14.1. Originality of the thesis	105
14.2 Innovative contributions pf the thesis	105
<b>REFERENCES</b>	107

**Key words:** anakinetic, hypothermic stress, combined acute/chronic, oxidative stress, antioxidants, carnitine



## 1. Objectives

Stress is one of the most debated scientific concepts in terms of definitions, terminology, theories, types and forms, body's response, adaptive resources, methods of prevention and control. Stress classification is based on action time span, mechanism of the stress factor, number, type and intensity of agents, the body's response. There are several types of stress: physical, environmental, psychosocial, professional, metabolic, psychosomatic, somato-psychic, psycho-emotional, prenatal, postnatal, cultural.

The aim of the present study was to evaluate:

5. the effect of chronic anakinetic, hypothermic and combined stress conditions on serum and tissues oxidant/antioxidant balance, (liver and muscle);
6. effects of chronic carnitine supplementation on serum and tissues oxidants / antioxidants balance in rats, subject of chronic anakinetic, hypothermic and combined stress conditions;
7. the effect of acute anakinetic, hypothermic and combined stress conditions, on motility and emotivity, in rats;
8. effects of acute carnitine supplementation, on motility and emotivity, in acute anakinetic, hypothermic and combined stress conditions;

## 2. General methodology

### General research protocol

*Objectives:* carnitine supplementation role on the O/AO balance, in serum and tissue, in two forms of chronic stress – immobilization stress and hypothermic stress; carnitine influences on spontaneous locomotor and emotional behavior in acute anakinetic, hypothermic and combined stress conditions.

*Site of the study:* The Department of Physiology from UMF "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, in the Laboratory of Experimental Physiology.

### Animal groups:

- C. 8 Wistar male rat groups (n=10 animals/lot)
  - I: control group
  - II-VIII: experimental groups subjected to chronic stress
    - II- hypothermic stress
    - III- immobilization stress
    - IV- combined stress (immobilization and hypothermic stress)
    - V- carnitine supplementation
    - VI- hypothermic stress and carnitine supplementation
    - VII- immobilization stress and carnitine supplementation
    - VIII- immobilization stress, hypothermic stress and carnitine supplementation
- D. 8 Wistar male rat groups (n=10 animals/lot)
  - I: control group
  - II-VIII: experimental groups subjected to acute stress
    - II- hypothermic stress
    - III- immobilization stress
    - IV- combined stress (immobilization and hypothermic stress)
    - V- carnitine supplementation
    - VI- hypothermic stress and carnitine supplementation
    - VII- immobilization stress and carnitine supplementation

- VIII- immobilization stress, hypothermic stress and carnitine supplementation

*Methods of inducing stress*

Immobilization stress was applied to the animals for 3 hours, daily, by using cylindrical tubes, containing numerous perforations which served as breathing holes.

Hypothermic stress was induced to the rats, by placing them in a cold room (ambient temperature 5°C), for 3 hours long, daily. Acute stress was applied to the animals for 3 days long and chronic stress for 15 days long.

*Carnitine supplementation*

The animals were daily supplemented with L-Carnitine by oropharyngeal gavage, before exposure to stress, (Carnil 100 mg/ml, 100 mg/kgc) (3 days long for acute and 15 days long for chronic administration)

*Assessment methods*

*a. Biochemical methods:*

O/AO balance indicators were investigated in serum, liver and gastrocnemius muscle. The oxidative stress (OS) indicators are: – MDA and PC. The antioxidant (AO) system indicators are:– DH, SH and GSH.

*b. Behavioral test*

Open Field Test was used to assess the behavioral responses, based on the following indicators: spontaneous motility (rearings and movements) and emotivity (micturitions and defecations).

*Statistical analysis.* Statistical values were obtained using GraphPad Prism 5.0 software, Microsoft EXCEL.

### **3. Study 1. The influence of chronic immobilization stress on the oxidant/antioxidant balance in carnitine supplemented rats**

#### **Results**

1. Anakinetic chronic stress induces changes in serum OS indicators with a significant increase in MDA and PC, and significant decreases in DH and SH, as compared to the control group.

2. Carnitine supplementation induces statistically insignificant changes in serum redox balance indicators as compared to control group. Carnitine supplementation and anakinetic stress determines a significant increase of MDA and PC, and a significant decrease of DH and SH, as compared to the control group.

3. Carnitine supplementation and anakinetic chronic stress induces significant increases in MDA and PC and significant decreases in SH, as compared to supplemented group.

4. Supplementation with carnitine and anakinetic chronic stress induces statistically significant decreases in serum for MDA and PC and increases the SH, as compared to group exposed to anakinetic chronic stress .

#### **4. Study 2. The influence of anakinetic chronic stress on the tissue oxidant/antioxidant balance, carnitine supplemented rats**

##### **Results**

1. Anakinetic chronic stress induces statistically significant increases in MDA and PC in the liver and muscles and significant decreases DH, SH and GSH in the same tissues as compared to the control group.

2. Carnitine supplementation changes insignificantly the tissue redox indicators, as compared to the control group.

3. Carnitine supplementation and anakinetic chronic stress induces significant increases in MDA and PC in the liver, significant increases of PC in muscle and DH significant decreases in liver and GSH in liver and muscle, as compared to the control group.

4. Carnitine supplementation and anakinetic chronic stress induce significant changes in liver MDA and PC, in the muscle PC and significant decreases in muscle GSH and GSH and DH in liver, as compared to supplemented group.

5. Carnitine supplementation and anakinetic chronic stress induces statistically significant decreases in muscle MDA and liver PC and DH and SH increases in liver and muscle, as compared to chronic anakinetic stress.

#### **5. Study 3. The influence of chronic hypothermic stress on the serum oxidant/antioxidant balance in carnitine supplemented rats**

##### **Results**

1.. Chronic hypothermic stress induces statistically significant increases in MDA and PC, and statistically significant decreases in DH, SH and GSH levels in serum, as compared to control group.

2.. Carnitine supplementation determines insignificant changes in serum redox balance indicators, as compared to the control group.

3. Carnitine supplementation and chronic hypothermic stress induces statistically significant increases in serum MDA levels, as compared to the control group,

4.. Carnitine supplementation and chronic hypothermic stress induces statistically significant increases in serum MDA levels, as compared to the supplemented group.

5. Carnitine supplementation and chronic hypothermic stress induces statistically significant decreases of MDA and PC, and statistically significant increases of DH, SH and GSH levels in serum, as compared chronic hypothermic stress.

## **6. Study 4. The influence of chronic hypothermic stress on the tissue oxidant/antioxidant balance in carnitine supplemented rats**

### **Results**

1. Chronic hypothermic stress induces statistically significant increases in MDA and CP, and significant decreases in liver DH and GSH, and statistically significant increases in MDA and PC, and significant decreases of DH, SH and GSH in muscle.

2. Carnitine supplemented group induces, insignificant changes in redox indicators in the liver and muscles, as compared to the control group.

3. Supplementation with carnitine and chronic stress causes hypothermia compared with the control group, significant increases in MDA and PC, and a significant decrease in GSH DH and liver, with significant increases in PC, with significant decreases in muscle GSH.

4. Carnitine supplementation and chronic hypothermic stress determines significant increases in PC and a significant decreases in liver GSH and DH, significant decreases of MDA and GSH and significant increases of CP in muscle, as compared to the carnitine supplemented group.

5. Carnitine supplementation and chronic hypothermic stress induces statistically significant decreases of MDA in liver and muscle, of CP in liver, and DH statistically increases in liver and muscle and SH and GSH only in muscle.

## **7. Study 5. The influence of chronic combined stress on the serum oxidant/antioxidant balance in carnitine supplemented rats**

### **Results**

1. Chronic combined stress induces statistically significant increases in serum MDA and PC, significant decreases in DH and SH, as compared to hypothermic stress group.

2. Chronic combined stress leads to significant serum increases in MDA and PC, and significant decreases DH, SH and GSH, as compared to chronic anakinetic stress.

3.. Carnitine supplementation and chronic combined stress determines significant increases in MDA, PC, SH and GSH in serum.

4.. Carnitine supplementation and chronic combined stress leads to significant decreases in MDA and statistically significant increase in SH and GSH in serum, as compared to chronic combined stress.

5. Carnitine supplementation and chronic combined stress induces significant increases in MDA, PC and SH, as compared to chronic combined stress.

## **8. Study 6. The influence of chronic combined stress on the tissue oxidant/antioxidant balance in carnitine supplemented rats**

### **Results**

1. Chronic stress combined causes versus hypothermic chronic stress, induces statistically significant increases in MDA and SH statistically significant decreases in liver, statistically significant increases in MDA and GSH statistically significant decreases in muscle, as compared to chronic hypothermic stress.

2. Chronic combined stress induces statistically significant increases in MDA and GSH statistically significant decreases in liver and muscle, as compared to anakinetic chronic stress.

3. Carnitine supplementation and chronic combined stress leads to statistically significant decreases in liver PC, statistically significant decreases in MDA and statistically significant increases of DH, SH and GSH in muscle, as compared to chronic hypothermic stress.

4. Carnitine supplementation and chronic combined stress determines, statistically significant CP decreases, statistically significant DH, SH increases and statistically significant liver DH, muscle SH increases, as compared to chronic anakinetic stress.

5. Carnitine supplementation and chronic combined stress induces statistically significant decreases in liver and muscle MDA, liver CP, and statistically significant increases in liver and muscle DH and SH and in muscle GSH, as compared to chronic combined stress.

## **9. Study 7. The influence of acute anakinetic stress on motility and emotivity in carnitine supplemented rats**

### **Results**

1. Anakinetic acute stress induces significant changes on behavior with high emotional arousal and decreased motility, as compared to the control group and to the carnitine supplemented group.

2. Carnitine supplementation does not produce significant changes in spontaneous motility and emotivity, as compared to controls.

3. Carnitine supplementation and acute anakinetic stress induces statistically significant decreases in motility and statistically significant increases in emotivity, as compared to the control group and supplemented group.

4. Carnitine supplementation and acute anakinetic stress, increases insignificantly the motility and decreases insignificantly the emotivity, as compared to acute anakinetic stress.

## **10. Study 8. The influence of acute hypothermic stress on motility and emotivity in carnitine supplemented rats**

### **Results**

1. Acute hypothermic stress significantly reduces motor behavior and induces statistically significant emotional arousal, as compared to the control group and the carnitine supplemented group.
2. Carnitine supplementation produces insignificant changes in spontaneous motility and emotivity to control animals.
3. Carnitine supplementation and acute hypothermic stress induces statistically significant reductions in spontaneous motility and insignificant increases in emotivity, as compared to control group.
4. Carnitine supplementation and acute hypothermic stress has no protective effect on motility and emotivity, as compared to acute hypothermic stress.

## **11. Study 9. The influence of acute combined stress on motility and emotivity in carnitine supplemented rats**

### **Results**

1. Acute combined stress significantly decreases the motility and insignificantly increases the emotional arousal, as compared to acute hypothermic and anakinetic stress.
2. Carnitine supplementation and acute combined stress significantly decreases the motility, as compared to acute hypothermic stress.
3. Carnitine supplementation and acute combined stress insignificantly decreases the motility, as compared to acute anakinetic stress.
4. Carnitine supplementation and acute combined stress leads to insignificant increase in motility and emotivity, as compared to acute combined stress.

## **13. General conclusions**

1Chronic anakinetic intermittent stress and chronic hypothermic stress induces a significant increase in OS and a significant decrease in serum of AO defense level, in liver and muscle, as compared to the control group.

2.. Chronic combined stress - anakinetic and hypothermic – leads to significant serum increases in OS and significant serum decreases in AO defense, as compared to chronic anakinetic and chronic hypothermic stress. In tissues, OS and AO defense indicators followed similar changes.

3. Carnitine supplementation in anakinetic, hypothermic and combined stress conditions had protective effects, expressed by decreased OS and increased AO indicators in serum. The most obvious modification was in the hypothermic stress model.

4. Carnitine supplementation in chronic anakinetic, hypothermia and combined stress, had protective effects by decreasing the OS and increasing the AO defense indicators in the tissue. The most obvious result was in liver and muscle in chronic hypothermic and combined stress conditions.

5. Chronic carnitine supplementation in non stressed animals induces serum, liver and muscle insignificant changes in redox balance. Acute carnitine supplementation determines insignificant changes in involuntary motor and emotional behavior.

6. Anakinetic stress, hypothermia and acute combined stress causes a significant decrease in involuntary motility significant increase in emotional arousal. Carnitine acute supplementation does not affect involuntary motor behavior and emotional stress to anakinetic, hypothermia and acute combined.

7. Immobilization and hypothermia can be considered as distress factors useful to study the stress effects.

8. Chronic administration of carnitine in stress conditions may contribute to decrease oxidative stress and improve AO protection. AO supplementation can be used in order to decrease the anakinetic and hypothermic induced OS.

## **14.. Originality and innovative contributions of the thesis**

### **14.1. Originality of the work**

This paper evaluates two directions, poorly investigated - anakinetic and hypothermic stress, which can be found in medical practice.

- immobilization is a kinetotherapeutic technique, which has as purpose to leave at rest, to provide contention and correction for different body segments or for the whole body, in locomotor diseases in orthopedics;

- cryotherapy is used to reduce acute local inflammation and pain in sports medicine and physiotherapy. In natural conditions, in polar areas expeditions and high altitude, hypothermic stress may also be present, associated with other physical factors like pressure, humidity, radiation even with accidental traumatic stress

The thesis studies:

- the effects of chronic exposure to chronic anakinetic, hypothermic and combined stress serum, liver and tissues redox balance, in carnitine supplemented rats.

- effects of acute exposure to anakinetic, hypothermic and combined stress on motor behavior and emotional arousal, in carnitine supplemented rats.

### **14.2. Innovative contributions of the thesis**

The thesis has applicative value for:

- adverse biochemical effects of stress and hypothermia anakinetic on redox homeostasis as potential risk factors for the body;

- combined chronic stress - anakinetic and hypothermic -induces significant serum increases in OS and significant decreases in AO defense, as compared to chronic anakinetic and hypothermic stress. At the tissue level, OS indicators and AO defense system followed a similar change.

- the protective role of carnitine, as a direct and indirect antioxidant agent, antioxidant therapy in medical practice and rehabilitation, in order to reduce the adverse effects of SRON and SON and to maintain redox homeostasis.

## REFERENCES

1. Nayanatara AK, Tripathi Y, Nagaraja HS et al. Effect of cronic immobilization stress on some selected physiological, biochemical and lipidparameters in Wistar Albino rats. *Res J Pharm Biol Che Sci.* 2012; 3(1): 34-42.
2. Chung IM, Kim YM, Yoo MH, et al. Immobilization stress induces endothelial dysfunction by oxidative stress via the activation of the angiotensin II/its type I receptor pathway. *Atherosclerosis.* 2010;213(1):109-114.
3. Erdem M, Taner Guneş, Şen C, Bostan B, et al. Joint immobilization increases reactive oxygen species: an experimental study. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2009;43(5):436-443.
4. Dalla Libera L, Ravara B, Gobbo V, Tarricone E, Vitadello M, Biolo G, Vescovo G, Gorza L. A transient antioxidant stress response accompanies the onset of disuse atrophy in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2009;107(2):549-557.
5. Berghian AC, Moldovan R, Decea N, Tache S. Oxidant/antioxidant balance in carnitine supplemented rats exposed to chronic immobilization stress. *Studia UBB EDUCATIO ARTIS GYMN.* 2012; LVII, (3): 91-100.
6. Chowdhury P, Soulsby M, Kim K. L-carnitine influence on oxidative stress induced by hind limb unloading in adult rats. *Aviat Space Environ Med.* 2007;78(6):554-556.
7. Chaturvedi P. Bitter melon protects against lipid peroxidation caused by immobilization stress in albino rats. *Int J Vitam Nutr Res.* 2009;79(1):48-56.
8. Kolodziejczyk J, Saluk-Juszczak J, Wachowicz B. L-Carnitine protects plasma components against oxidative alterations. *Nutrition.* 2011;27(6):693-699.
9. Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S. Oxidative stress in cold-induced hyperthyroid state. *J. Exp Biol.* 2010; 213:2899-2911.
10. Berghian AC, Remus Moldovan, Decea N, Tache S. Oxidant/antioxidant balance in carnitine supplemented rasts exposed to chronic hypothermic stress. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine.* 2012; 69(1-2):67-73.
11. Venditti P, Pamplona R, Ayla V, et al. Differential effects of experimental and cold induced hyperthyroidism on factors inducing rat liver oxidative damage. *J Exp Biol.* 2006;209:817-825.
12. Bodea F, Bocea A, Decea N. L-carnitine decreases oxidative stress induced by experimental hypobaric hypoxia. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 2010;16(2):78-81.
13. Zafir A, Banu N. Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress.* 2009;12(2):167-177.
14. Buciolli SA, de Abreu LC, Valenti VE, Vannucchi H. Carnitine supplementation effects on non-enzymatic antioxidants in young rats submitted to exhaustive exercise stress. *J Strength Cond Res.* 2012;26(6):1695-1700.
15. Jones P, Stenfer KB. Service users and staff from secure intellectual disability settings: view on three physical restraint procedures. *J Intellect Disabl.* 2008, 12 (3): 229-237.
16. Berghian AC, Raus C, Tache S, Moldovan R, Boroş-Balint I. Influenţa stresului anakinetic acut asupra motilităţii şi emotivităţii la şobolanii suplimentaţi cu carnitină. *Palestrica Mileniului III – Civilizaţie şi Sport,* 2011; 12(3):221–225
17. Berghian AC, Tache S, Moldovan R. Influenţa stresului acut hipotermic şi prin imobilizare asupra motilităţii şi emotivităţii la şobolanii suplimentaţi cu carnitină. *Palestrica Mileniului III – Civilizaţie şi Sport,* 2011; 12(4): 323–326.
18. Berghian AC, Tache S, Moldovan R. The influence of acute hypothermic stress on the motility and emotivity in carnitine supplemented rats. *Studia UBB Educatio Artis Gymn,* 2011; LVI (3): 21-30.
19. Imamura T, Ishizuka O, Aizawa N, Zhong C, Ogawa T, Nakayama T, Tanabe T, Nishizawa O. Cold environmental stress induces detrusor overactivity via resiniferatoxin-sensitive nerves in conscious rats. *NeuroUrol Urodyn.* 2008; 27(4):348-252.
20. Klenerová V, Sída P, Krejčí I et al. Effects of two types of restraint stress on spontaneous behavior of Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Physiol Pharmacol.* 2007; 58(1):83-94.