

Paradoxul balanței oxidanți/antioxidanți în efortul fizic

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

Doctorand:
Codruța Florina Bulduș

Cluj-Napoca 2012

CUPRINS

ABREVIERI	12
INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Stresul oxinitrozativ	17
1.1. Oxidanții	17
1.2. Antioxidanții	17
1.3. Balanța O/AO și mecanismele de control ale homeostaziei redox	18
2. Stresul oxinitrozativ în efortul fizic	19
2.1. Sursele endogene de SRON în efortul fizic	19
2.2. Sursele exogene de SRON	20
3. Apărarea antioxidantă în efortul fizic	20
3.1. Apărarea antioxidantă endogenă în efortul fizic cronic	20
3.2. Nutriția și activitatea fizică	22
3.2.1. Considerații generale	22
3.2.2. Strategii nutritive în efortul fizic	25
3.2.3. Antioxidanții naturali nutriționali	26
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	27
1. Obiective	29
2. Metodologie generală	31
2.1. Explorarea capacității aerobe de efort la animale	31
2.2. Administrarea antioxidantului natural nutrițional	31
2.3. Explorarea balanței O/AO în sânge și țesuturi	32
2.4. Determinarea trigliceridelor și colesterolului în sânge	33
2.5. Examenul histopatologic al țesuturilor	34
2.6. Prelucrarea statistică a rezultatelor	34
3. Studiul 1 - Influența suplimentării dietei cu ulei de cânepă asupra capacității aerobe de efort la șobolani antrenați la efort fizic cu intensitate liniară	37
3.1. Introducere	37
3.2. Obiective	37
3.3. Material și metodă	37
3.4. Rezultate	38

3.5. Discuții	40
3.6. Concluzii	41
4. Studiul 2 - Influența suplimentării dietei cu ulei de cânepă asupra capacității aerobe de efort la șobolani antrenați la efort fizic cu intensitate progresivă	43
4.1. Introducere	43
4.2. Obiective	43
4.3. Material și metodă	43
4.4. Rezultate	44
4.5. Discuții	46
4.6. Concluzii	47
5. Studiul 3 - Efectul uleiului din semințe de cânepă asupra balanței serice oxidanți/antioxidanți la șobolani antrenați la efort fizic cu intensitate liniară	49
5.1. Introducere	49
5.2. Obiective	49
5.3. Material și metodă	49
5.4. Rezultate	50
5.5. Discuții	54
5.6. Concluzii	55
6. Studiul 4 - Efectul uleiului din semințe de cânepă asupra balanței serice oxidanți/antioxidanți la șobolani antrenați la efort fizic cu intensitate progresivă	57
6.1. Introducere	57
6.2. Obiective	57
6.3. Material și metodă	57
6.4. Rezultate	58
6.5. Discuții	61
6.6. Concluzii	62
7. Studiul 5 - Efectul uleiului din semințe de cânepă asupra balanței tisulare oxidanți/antioxidanți în efortul fizic cu intensitate liniară la șobolani	63
7.1. Introducere	63
7.2. Obiective	63
7.3. Material și metodă	63
7.4. Rezultate	64
7.5. Discuții	74
7.6. Concluzii	75
8. Studiul 6 - Efectul uleiului din semințe de cânepă asupra balanței tisulare oxidanți/antioxidanți în efortul fizic cu intensitate progresivă la șobolani	77
8.1. Introducere	77
8.2. Obiective	77
8.3. Material și metodă	77
8.4. Rezultate	78

8.5. Discuții	84
8.6. Concluzii	84
9. Studiul 7 - Influența suplimentării dietei cu ulei de cânepă asupra metabolismului lipidic la șobolani antrenați la efort fizic	85
9.1. Introducere	85
9.2. Obiective	85
9.3. Material și metodă	85
9.4. Rezultate	86
9.5. Discuții	93
9.6. Concluzii	94
10. Studiul 8 - Modificările histopatologice la nivelul miocardului și encefalului la animale antrenate la efort și suplimentate cu ulei de cânepă	95
10.1. Introducere	95
10.2. Obiective	95
10.3. Material și metodă	95
10.4. Rezultate	96
10.5. Discuții	100
10.6. Concluzii	101
11. Discuții generale	103
11.1. Acizii grași polinesaturați	103
11.2. Uleiul de cânepă ca nutriment	104
12. Concluzii generale	107
13. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	109
REFERINȚE	111

Cuvinte cheie: stres oxidativ, efort fizic, capacitate aerobă de efort, balanța oxidanți/antioxidanți, ulei de cânepă, metabolism lipidic.

INTRODUCERE

Efortul fizic este un stres complex: neuromuscular, prin activarea sistemului muscular striat scheletic și a sistemului nervos somatic; endocrinometabolic, prin activarea axului hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenalian și a sistemului simpato-adrenal; sistemic, prin activarea cardiovasculară și respiratorie; biochimic, prin dereglarea homeostaziei redox și psihoemoțional, prin activarea emotivității și comportamentului.

Efectul paradoxal al efortului fizic este o temă de mare actualitate și interes, conform datelor din literatură privind efectul prooxidant al efortului fizic intens, consecințele acestuia și importanța combaterii stresului oxinitrozativ prin administrare de antioxidanți exogeni nutriționali sau nenutriționali, naturali sau sintetici și efectul antioxidant al efortului fizic moderat. Acestui efect i se adaugă și influența nutriției, ca prooxidant și antioxidant.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studii experimentale

Obiective

Cercetările experimentale au urmărit:

- efectul paradoxal oxidant/antioxidant al efortului fizic în funcție de intensitate: liniară, standard și progresivă, în trepte;

- influența administrării uleiului de cânepă, obținut prin presare la rece, asupra capacității aerobe de efort cu diferite intensități;
- influența uleiului de cânepă asupra homeostaziei redox serice și tisulare în efortul fizic și efectele uleiului de cânepă ca posibil agent antioxidant nutrițional;
- efectele suplimentării dietei cu ulei de cânepă asupra metabolismului lipidic în condiții de efort fizic.
- modificările histopatologice la nivelul encefalului și miocardului în condiții de efort, fără și cu administrare de ulei de cânepă.

Metodologie generală

Studiile experimentale s-au efectuat pe șobolani de gen masculin, rasa Wistar proveniți din Biobaza Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca. Greutatea medie a șobolanilor a fost 200-300 grame, vârsta de 16 săptămâni.

Cercetările experimentale au fost studii pilot, analitice, longitudinale, prospective, cu durată de 28 de zile și s-au desfășurat în perioada noiembrie 2011- martie 2012.

Capacitatea aerobă de efort (CAE) s-a determinat prin proba de înot, care s-a efectuat într-un bazin din mase plastice, cu apă termostată la 20°C.

Administrarea uleiului de cânepă s-a făcut prin gavaj oral, în cantitate de 0,1 ml pe șobolan, doză calculată în raport cu doza zilnică de ulei recomandată la om.

Determinările biochimice s-au efectuat în Laboratorul pentru Studiul Stresului Oxidativ al Disciplinei Fiziologie din cadrul UMF, "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca.

Pentru determinarea indicatorilor balanței oxidanți/antioxidanți (O/AO) în sânge s-au recoltat probe de sânge venos din sinusul retroorbital. Pentru determinarea indicatorilor balanței O/AO în țesuturi s-au recoltat probe de țesut miocardic și encefal după eutanasierea animalelor. S-au determinat următorii indicatori serici și tisulari: malondialdehidă (MDA), proteinele carbonilate (PC), capacitatea de donori de hidrogen (DH), grupările sulfhidril totale (SH) și glutatiunea (GSH).

Determinarea trigliceridelor (TG) și colesterolului (COL) în sânge s-a făcut din probe de sânge periferic recoltat din capilarele de la nivelul cozii șobolanilor și aplicate instantaneu pe teste strip care au fost prelucrate cu un aparat Accutrend Plus GCT (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Pentru examenul histologic, probele s-au recoltat proaspăt de la animalele eutanasiate, sacrificate la terminarea experimentului.

Analiza statistică a utilizat următoarele metode: testul t (Student), analiza variantei one-way ANOVA, analiza post-hoc de comparație multiplă (testul Scheffe/testul Bonferroni/testul LSD), testul Levene pentru variație, testul Kolmogorov-Smirnov; testele neparametrice Kruskal-Wallis, testul Mann-Whitney (U) pentru două probe neperechi, testul Wilcoxon, în cazul a două probe perechi. S-a utilizat coeficientul de corelație Pearson (r) și coeficientul de corelație al rangurilor Spearman (ρ). Pentru prezentarea datelor au fost folosite tabele și grafice de tipul box plot.

Studiul 1. Influența suplimentării dietei cu ulei de cânepă asupra capacității aerobe de efort la șobolani antrenați la efort fizic cu intensitate liniară

Rezultate

Antrenamentul la efort fizic cu încărcare liniară, fără și cu suplimentare cu ulei de cânepă, determină creșterea capacității aerobe de efort (CAE), în funcție de intensitatea efortului: creșterea intensității efortului determină diminuarea capacității aerobe de efort. Antrenamentul cu intensitate maximă, prin încărcare de 20%, fără și cu suplimentare cu ulei, determină diminuarea CAE, ceea ce s-ar putea explica prin efectul hormesis al efortului. Creșterea CAE este maximă în cazul efortului cu încărcare de 10 % și suplimentare cu ulei, față de loturile cu încărcare de 15 % și 20 %, fără și cu suplimentare.

Administrarea uleiului de cânepă și încărcarea liniară determină creșteri semnificative ale CAE la 28 de zile, față de loturile fără suplimentare cu ulei, efect care ar putea fi atribuit rolului energogen al acizilor grași polinesaturați (AGPN) din uleiul de cânepă.

Studiul 2. Influența suplimentării dietei cu ulei de cânepă asupra capacității aerobe de efort la șobolani antrenați la efort fizic cu intensitate progresivă

Rezultate

Antrenamentul cu încărcare progresivă, în trepte determină creșterea semnificativă a CAE. Administrarea uleiului de cânepă și încărcarea progresivă determină creșteri semnificative ale CAE la 28 de zile și contribuie la susținerea efortului fizic de anduranță.

Studiul 3. Efectul uleiului din semințe de cânepă asupra balanței serice oxidanți/antioxidanți la șobolani antrenați la efort fizic cu intensitate liniară

Rezultate

Antrenamentul cu intensitate liniară cu încărcare moderată determină creșteri semnificative ale MDA, scăderi semnificative ale GSH la încărcarea de 10% și creșteri semnificative ale DH și grupărilor SH pentru încărcarea de 15%, față de martori.

Suplimentarea cu ulei de cânepă și antrenamentul determină creșteri semnificative ale MDA (la încărcare de 10%) și PC (la încărcare de 15 și 20%) și creșteri semnificative ale DH, grupărilor SH și GSH (la încărcare de 10, 15 și 20%), față de lotul martor.

Suplimentarea cu ulei de cânepă și antrenamentul cu încărcare moderată de 10% determină creșteri semnificative ale PC, DH și GSH, iar la încărcarea de 20%, creșteri semnificative ale PC, grupărilor SH și GSH și scăderi semnificative ale DH, față de loturile nesuplimentate corespunzătoare.

Studiul 4. Efectul uleiului din semințe de cânepă asupra balanței serice oxidanți/antioxidanți la șobolani antrenați la efort fizic cu intensitate progresivă

Rezultate

Suplimentarea cu ulei de cânepă și antrenamentul cu încărcare progresivă determină modificări semnificative ale balanței serice O/AO: creșteri semnificative ale stresului oxidativ (SO) pe seama MDA și PC și creșteri semnificative ale apărării antioxidante (AO) pe seama GSH.

Studiul 5. Efectul uleiului din semințe de cânepă asupra balanței tisulare oxidanți/antioxidanți în efortul fizic cu intensitate liniară la șobolani

Rezultate

Efortul fizic cu încărcare liniară de 15% și 20% determină modificări semnificative ale balanței tisulare O/AO în miocard, față de lotul cu încărcare de 10%. În encefal, determină modificări semnificative ale balanței tisulare O/AO, cu scăderi ale MDA și creșteri ale DH pentru încărcarea de 15% și cu scăderi ale PC, grupărilor SH și GSH pentru încărcarea de 20%, față de lotul cu încărcare de 10%.

Suplimentarea cu ulei de cânepă și efortul fizic cu încărcare liniară influențează balanța tisulară O/AO în funcție de intensitatea efortului. În miocard determină creșteri semnificative ale SO pe seama MDA pentru încărcarea de 20% și pe seama PC pentru încărcarea de 10% și creșteri semnificative ale apărării AO pe seama DH, pentru toate loturile suplimentate, față de cele nesuplimentate. În encefal determină creșteri semnificative ale SO pe seama PC, pentru încărcarea de 15% și creșteri semnificative ale apărării AO pe seama DH, pentru lotul cu încărcare de 10% și pe seama GSH, pentru încărcarea de 20%, față de loturile nesuplimentate.

Modificările balanței tisulare O/AO sunt semnificative la toate loturile cu suplimentare și încărcare în miocard, unde crește capacitatea de apărare AO pe seama DH și pentru loturile cu suplimentare și încărcare de 15 și 20% în creier unde scade semnificativ capacitatea de apărare AO pe seama DH, față de loturile nesuplimentate.

Studiul 6. Efectul uleiului din semințe de cânepă asupra balanței tisulare oxidanți/antioxidanți în efortul fizic cu intensitate progresivă la șobolani

Rezultate

Suplimentarea cu ulei de cânepă și efortul fizic cu încărcare progresivă influențează balanța O/AO la nivel tisular: determină creșteri semnificative ale SO, pe seama MDA în miocard

și pe seama PC în creier și determină creșteri semnificative ale apărării AO, pe seama DH în miocard și pe seama grupărilor SH și GSH în creier.

Studiul 7. Influența suplimentării dietei cu ulei de cânepă asupra metabolismului lipidic la șobolani antrenați la efort fizic

Rezultate

Antrenamentul la efort cu încărcare liniară de 20% determină scăderi semnificative ale TG plasmatic. Antrenamentul la efort cu încărcare progresivă determină scăderi semnificative ale TG plasmatic și creșteri semnificative ale COL plasmatic.

Suplimentarea cu ulei de cânepă și antrenamentul la efort cu încărcare liniară determină scăderi semnificative ale TG plasmatic și scăderi semnificative ale COL plasmatic.

Suplimentarea cu ulei de cânepă și antrenamentul la efort cu încărcare progresivă determină scăderi semnificative ale COL plasmatic.

Modificările plasmatică ale TG și COL apar după 14 zile și se mențin la 28 de zile.

Studiul 8. Modificările histopatologice la nivelul miocardului și encefalului la animale antrenate la efort și suplimentate cu ulei de cânepă

Rezultate

Antrenamentul la efort fizic cu încărcare liniară determină modificări histopatologice de necroză/apoptoză la nivelul encefalului și nu determină modificări histopatologice la nivelul miocardului pe durata studiată. Administrarea uleiului de cânepă are efect neuroprotector redus la animalele antrenate la efort.

Modificările neuronale de necroză/apoptoză postefort la nivelul encefalului susțin experimental ipoteza neurogenezei și plasticității în sistemul nervos central.

Concluzii generale

1. Antrenamentul cu intensitate liniară, standard, determină la 28 de zile, față de lotul martor, creșteri semnificative ale CAE; creșteri semnificative serice ale DH și grupărilor SH; la nivel tisular, în encefal, se constată scăderi semnificative ale MDA și creșteri semnificative ale DH; în plasmă au loc scăderi semnificative ale TG; în encefal au loc modificări histopatologice de necroză/apoptoză.
2. Antrenamentul cu intensitate progresivă, determină la 28 de zile, față de lotul martor, creșteri semnificative ale CAE; modificări serice cu creșteri semnificative ale MDA, PC și GSH; în plasmă au loc scăderi semnificative ale TG și creșteri semnificative ale COL.
3. Suplimentarea cu ulei de cânepă și antrenamentul cu intensitate liniară, standard, determină la 28 de zile, față de lotul martor, creșteri semnificative ale CAE; modificări serice cu creșteri semnificative ale MDA, PC, DH, grupărilor SH și GSH. La nivel tisular, în miocard, se constată creșteri semnificative ale MDA, PC și DH, față de loturile nesuplimentate; în encefal au loc creșteri semnificative ale PC, DH și GSH, față de loturile nesuplimentate; în plasmă au loc scăderi semnificative ale TG și COL; în encefal au loc modificări histopatologice de necroză/apoptoză.
4. Suplimentarea cu ulei de cânepă și antrenamentul cu intensitate progresivă, determină la 28 de zile, creșteri semnificative ale CAE față de lotul martor; modificări serice cu creșteri semnificative ale MDA, PC, GSH. La nivel tisular, în miocard, au loc creșteri semnificative ale MDA și DH; în encefal au loc creșteri semnificative ale PC, grupărilor SH și GSH, față de loturile nesuplimentate; în plasmă au loc scăderi semnificative ale COL.
5. Creșterea CAE poate fi atribuită efectului energogen al AGPN. Reducerea creșterilor CAE pe măsura creșterii intensității liniare a efortului susține teoria hormesis în efortul fizic.
6. Efortul fizic este un agent stresor, care sub raport biochimic, are efect prooxidant (PO) la intensități crescute, cu creșterea SO și scăderea apărării AO și efect AO în

efortul moderat, ceea ce susține ipoteza rolului paradoxal al efortului asupra balanței O/AO. Efortul fizic determină leziuni tisulare plastice în encefal, ceea ce ar pleda pentru ipoteza neurogenezei și plasticității în sistemul nervos central.

7. Uleiul de cânepă este un agent nutrițional cu efect energogen asupra CAE, antioxidant în efortul fizic cu încărcare liniară moderată și progresivă, prin creșterea capacității de apărare AO, hipotrigliceridemiant, pentru încărcarea liniară și hipocolesterolemiant, pentru încărcarea liniară și progresivă.
8. Cercetările noastre arată că efectele paradoxale ale efortului fizic sunt dependente de intensitatea efortului, modificată prin încărcare și sunt influențate de efectele PO și AO ale uleiului de cânepă ca agent nutrițional.

Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei

Originalitatea lucrării constă în faptul că este :

- un studiu experimental complex privind antrenamentul la efort fizic de diferite intensități și influența acestuia asupra capacității de efort, balanței serice și tisulare oxidanți/antioxidanți și asupra modificărilor histopatologice;
- un studiu experimental bazat pe două modele de efort cu intensitate liniară, prin încărcare standard și cu intensitate progresivă, prin încărcare în trepte, modele utilizate în practica pregătirii sportivilor;
- o cercetare care urmărește și demonstrează efectele suplimentării dietei cu ulei de cânepă asupra capacității aerobe de efort, homeostaziei redox serice și tisulare, modificărilor sangvine ale metabolismului lipidic și modificărilor histopatologice din miocard și encefal apărute în timpul efortului fizic;
- o cercetare care demonstrează rolul uleiului de cânepă ca agent nutrițional cu efecte multiple: energogen, antioxidant, hipotriglicemiant și neuroprotector, în condiții de efort cu diferite intensități.

Contribuțiile inovatoare ale tezei sunt:

- semnificația și valoarea aplicativă a rezultatelor, având în vedere administrarea antioxidantilor prin nutriție adecvată, efectul energogen și antioxidant în condiții de efort, în vederea creșterii capacității aerobe de efort și a apărării antioxidante, pentru creșterea performanțelor;
- relevă necesitatea elaborării împreună cu medicii specialiști în domeniul medicinei sportive și cu medicii nutriționiști a unor recomandări privind nutriția adecvată, strategiile nutritive referitoare la aportul de agenți nutriționali în dietă, pentru susținerea capacității de efort și refacerea postefort;
- susținerea teoriilor privind efectul hormesis; rolul paradoxal al efortului fizic asupra homeostaziei redox și rolul paradoxal al nutriției în efort; susținerea ipotezei neurogenezei și plasticității în sistemul nervos central.

Bibliografie selectivă

1. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(9-10):1865-1879.
2. Tache S. Oxidanții și antioxidanții; În Mureșan A, Tache S, Orăsan R (sub red.) *Stresul oxidativ în procese fiziologice și patologice*, Ed. Tedesco, Cluj-Napoca 2006;1-27.
3. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med*. 2009;8:1.
4. Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise, *Free Radic Biol Med*. 2008;44(2):153-159.
5. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem*. 2001; 8(7):829-838.

6. Liu J, Yeo HC, Overvik-Douki E, et al. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol.* 2000; 89(1):21-28.
7. Kiens B, Alsted TJ, Jeppesen J. Factors regulating fat oxidation in human skeletal muscle. *Obes Rev.* 2011; 12(10):852-858.
8. Margaritis I, Rousseau AS. Does physical exercise modify antioxidant requirements? *Nutr Res Rev.* 2008;21(1):3-12.
9. Atalay M, Lappalainen J, Sen CK. Dietary antioxidants for the athlete. *Curr Sports Med Rep.* 2006;5(4):182-186.
10. Dejica D. Antioxidanții exogeni naturali. În Dejica D (sub red) - Antioxidanți și terapie antioxidantă. Ed Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca, 2001;105-124.
11. Ayre KJ, Hulbert AJ. Dietary fatty acid profile affects endurance in rats. *Lipids.* 1997;32 (12):1265-1270.
12. Bulduș C, Tache S, Moldovan R. The influence of hemp oil dietary supplementation on aerobic capacity in rats. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai Educatio Artis Gymnasticae*, 2012;(1):15-21.
13. Bulduș C, Tache S, Moldovan R. The influence of hemp oil dietary supplementation on aerobic capacity in rats trained with progressive loading, *Studia Universitatis Babes-Bolyai Educatio Artis Gymnasticae*, 2012;(2):17-27.
14. Bulduș C, Tache S, Moldovan R. The effect of hemp seed oil on oxidant/antioxidant balance in exercise-trained rats during exercise with different intensity, *Studia Universitatis Babes-Bolyai Educatio Artis Gymnasticae*, 2012;(3):17-27.
15. Ukropec J, Reseland JE, Gasperikova D, et al. The hypotriglyceridemic effect of dietary n-3 FA is associated with increased beta-oxidation and reduced leptin expression. *Lipids.* 2003;38(10):1023-1029.
16. Callaway JC. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica.* 2004;140: 65-72
17. van Praag H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromolecular Med.* 2008;10(2):128-140.
18. Bulduș C, Bolfa P, Borza G, Moldovan R, Tache S. Histopathological changes in the brain and myocardium of trained animals supplemented with hemp oil, *Palestrica of the third millennium Civilization and Sport*, 2012;13(2): 86-90.
19. Gomez-Cabrera MC, Ristow M, Viña J. Antioxidant supplements in exercise: worse than useless? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;302(4):476-477.

Summary of PhD thesis

The paradox of oxidant/antioxidant balance in exercise

Scientific Director:

Prof. Dr. **Simona Tache**

Doctoral candidate:

Codruța Florina Bulduș

Cluj-Napoca

2012

CONTENTS

ABBREVIATIONS	12
INTRODUCTION	13
CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE	15
1. Oxidative stress	17
1.1. Oxidants	17
1.2. Antioxidants	17
1.3. O/AO balance and control mechanisms of redox homeostasis	18
2. Oxidative stress in exercise	19
2.1. SRON endogenous sources in exercise	19
2.2. SRON exogenous sources	20
3. The antioxidant defense in exercise	20
3.1. Endogenous antioxidant defense in chronic physical exertion	20
3.2. Nutrition and physical activity	22
3.2.1. General considerations	22
3.2.2. Nutritional strategies in physical exertion	25
3.2.3. Dietary Antioxidants	26
PERSONAL CONTRIBUTION	27
1. Objectives	29
2. General methodology	31
2.1. Exploration of aerobic exercise capacity in animals	31
2.2. Dietary antioxidant administration	31
2.3. O/AO balance exploration in blood and tissues	32
2.4. Triglycerides and cholesterol blood levels determination	33
2.5. Histopathological examination of tissues	34
2.6. Statistical processing of results	34
3. Study 1 - The influence of hemp oil diet supplementation on aerobic exercise capacity in rats trained to exercise with linear intensity	37
3.1. Introduction	37
3.2. Objectives	37
3.3. Materials and methods	37
3.4. Results	38
3.5. Discussion	40

3.6. Conclusions	41
4. Study 2 - The influence of hemp oil diet supplementation on aerobic exercise capacity in rats trained to exercise with progressive intensity	43
4.1. Introduction	43
4.2. Objectives	43
4.3. Materials and methods	43
4.4. Results	44
4.5. Discussion	46
4.6. Conclusions	47
5. Study 3 - The effect of hemp seed oil on serum oxidants/antioxidants balance in rats trained to exercise with linear intensity	49
5.1. Introduction	49
5.2. Objectives	49
5.3. Materials and methods	49
5.4. Results	50
5.5. Discussion	54
5.6. Conclusions	55
6. Study 4 - The effect of hemp seed oil on serum oxidants/antioxidants balance in rats trained to exercise with progressive intensity	57
6.1. Introduction	57
6.2. Objectives	57
6.3. Materials and methods	57
6.4. Results	58
6.5. Discussion	61
6.6. Conclusions	62
7. Study 5 - The effect of hemp seed oil on tissular oxidants/antioxidants balance during exercise with linear intensity in rats	63
7.1. Introduction	63
7.2. Objectives	63
7.3. Materials and methods	63
7.4. Results	64
7.5. Discussion	74
7.6. Conclusions	75
8. Study 6 - The effect of hemp seed oil on tissular oxidants/antioxidants balance during exercise with progressive intensity in rats	77
8.1. Introduction	77
8.2. Objectives	77
8.3. Materials and methods	77
8.4. Results	78
8.5. Discussion	84

8.6. Conclusions	84
9. Study 7 - The influence of hemp oil diet supplementation on lipid metabolism in rats trained to exercise	85
9.1. Introduction	85
9.2. Objectives	85
9.3. Materials and methods	85
9.4. Results	86
9.5. Discussion	93
9.6. Conclusions	94
10. Study 8 - The histopathological changes in the myocardium and brain of animals trained to exercise and supplemented with Hemp Oil	95
10.1. Introduction	95
10.2. Objectives	95
10.3. Materials and methods	95
10.4. Results	96
10.5. Discussion	100
10.6. Conclusions	101
11. General discussion	103
11.1. Polyunsaturated fatty acids	103
11.2. Hemp oil as nutriment	104
12. General conclusions	107
13. Originality and innovative contributions of the thesis	109
REFERENCES	111

Keywords: oxidative stress, exercise, aerobic exercise capacity, oxidants/antioxidants balance, hemp oil, lipid metabolism.

INTRODUCTION

Physical exertion is a complex stress: neuromuscular, by activating the skeletal muscular system and somatic nervous system; endocrinomethabolic by activating the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the simpato-adrenal system; systemic, by cardiovascular and respiratory activation; biochemical, by redox homeostasis disturbance and psycho-emotional, by emotional and behavioral activation.

The paradoxical effect of exercise is a subject of topical interest, according to the literature, regarding the prooxidant effect of intense exercise, its consequences and the importance of combating oxinitrozative stress by exogenous administration of nutritional, natural or synthetic antioxidants and the antioxidant effect of moderate physical effort. This effect is compounded by the influence of nutrition, as prooxidant and antioxidant.

PERSONAL CONTRIBUTION

Experimental studies

Objectives

Experimental investigations aimed the:

- paradoxical oxidant/antioxidant effect of exercise depending on intensity: linear, standard and progressive, in steps;
- influence of hemp oil obtained by cold pressing on aerobic capacity during exercise with different intensities;

- hemp oil influence on serum and tissue redox homeostasis in exercise and effects of hemp oil as possible nutritional antioxidant agent;
- effect of dietary hemp oil supplementation on lipid metabolism in exercise conditions.
- histopathological changes in the brain and myocardium in physical effort, with or without hemp oil administration.

General Methodology

Experimental studies were performed on male Wistar rats, obtained from the University of Medicine and Pharmacy "Julius Hațieganu" Cluj-Napoca Biobase. Average weight of rats was 200-300 g, age of 16 weeks.

Experimental investigations were analytical pilot studies, longitudinal, prospective, lasting 28 days and were conducted in the November 2011 - March 2012 time interval. Aerobic exercise capacity (AEC) was determined by the swimming test, which was made into a plastic basin with water thermostated at 20° C.

Hemp oil administration was made by oropharyngeal gavage in amount of 0.1 ml per rat, dose calculated in relation to oil ratio recommended to human daily intake.

In order to determine the serum indicators of O/AO balance, venous blood samples were collected from retro bulbar sinus. Biochemical determinations were performed in the Laboratory for Oxidative Stress Study in the Physiology Department of "Iuliu Hațieganu" University, Cluj-Napoca. In order to determine the tissular oxidative stress (OS) indicators, tissue samples were collected from myocardium and encephalon after euthanizing the animals. We determined serum and tissue following indicators: malondialdehyde (MDA), protein carbonyls (PC), hydrogen donor capacity (DH), total sulfhydryl groups (SH) and glutathione (GSH).

Triglycerides (TG) and cholesterol (COL) in blood were determined in samples collected from peripheral blood capillaries of the rat tail and applied instantly on strip tests that have been processed by an Accutrend Plus GCT (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) device.

For the histological examination, samples were collected freshly, from euthanized animals at the end of the experiment.

The analyzed moment of time was day 28.

Statistical analysis used the following methods: t test (Student), one-way analysis of variance ANOVA, post-hoc analysis of multiple comparison test (Scheff / Bonferroni test / test LSD), Levene test for variance, Kolmogorov-Smirnov test, nonparametric tests Kruskal-Wallis, Mann-Whitney (U) for two unpaired samples, Wilcoxon test, for two samples pairs. We used Pearson correlation coefficient (r) and Spearman rank correlation coefficient of (ρ). Tables and graphs such as box plot were used for displaying data.

Study 1 - The influence of hemp oil diet supplementation on aerobic exercise capacity in rats trained to exercise with linear intensity

Results

Training to exercise with linear loading, with or without hemp oil supplementation, increases aerobic capacity, depending on the intensity of effort: increasing exercise intensity resulted in decreased aerobic capacity. Training with maximum intensity, by loading with 20% with or without hemp oil supplementation, resulted in decreased aerobic capacity, which might explain the hormesis effect of exercise. The maximum increase of aerobic capacity is in the group that the loading was 10% and oil supplementation compared to groups with load of 15% and 20% with or without oil supplementation.

Hemp oil administration and training with linear loading causes significant increases of aerobic capacity after 28 days, compared to groups without additional oil, an effect that could be attributed to the energogen role of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the hemp oil.

Study 2 - The influence of hemp oil diet supplementation on aerobic exercise capacity in rats trained to exercise with progressive intensity

Results

Training to exercise with progressive loading, significant increases aerobic capacity. Hemp oil administration and progressive loading cause significant increases in aerobic capacity at 28 days and help support endurance exercise.

Study 3 - The effect of hemp seed oil on serum oxidants/antioxidants balance in rats trained to exercise with linear intensity

Results

Training to exercise with linear loading at moderate intensity causes significant increases in MDA, GSH significant decreases at loading of 10% and significant increases in DH and SH groups for loading of 15%, compared with controls.

Hemp oil supplementation and training cause significant increases in MDA (at 10% load) and PC (loading of 15 and 20%) and significant increases in DH, SH groups and GSH (loading of 10, 15 and 20%) compared to the control group.

Hemp oil supplementation and exercise with moderate intensity causes significant increases in PC, DH and GSH at loading of 10%, a significant increase in PC, SH groups and GSH and a significant decrease DH, at loading of 20%, compared to non supplemented groups.

Study 4 - The effect of hemp seed oil on serum oxidants/antioxidants balance in rats trained to exercise with progressive intensity

Results

Hemp oil supplementation and exercise with progressive loading cause significant changes in serum O/AO balance: significant increases in oxidative stress indicators MDA and PC, and significant increases in AO defense indicators on behalf of GSH.

Study 5 - The effect of hemp seed oil on tissular oxidants/antioxidants balance during exercise with linear intensity in rats

Results

Exercise with linear loading of 15% and 20% induces significant changes in tissular O/AO balance in myocardium, compared to the group with 10% loading; in the encephalon, cause significant changes in tissular O/AO balance, with decreases in MDA and increases in DH at 15% loading and decreases in PC, SH groups and GSH at 20% loading, compared to the group with 10% loading.

Hemp oil supplementation and exercise with linear loading influences tissular O/AO balance depending on exercise intensity. In the myocardium causes a significant increases of MDA at 20% loading and increases of PC for the 10% loading and significant increases AO defense due to DH for all supplemented groups compared to non supplemented groups. In the encephalon causes significant increases of PC at loading of 15% and significant increases in AO defense due to DH for groups with 10% loading and due to GSH at loading of 20% compared to non supplemented groups.

Study 6 - The effect of hemp seed oil on tissular oxidants/antioxidants balance during exercise with progressive intensity in rats

Results

Hemp oil supplementation and exercise with progressive loading influences the O/AO balance at the tissue level: causes a significant increase of oxidative stress indicators on account of MDA in the myocardium and on behalf of PC in the brain and causes a significant increase in antioxidant defense on account of DH in the myocardium and on behalf of SH groups and GSH in the brain.

Study 7 - The influence of hemp oil diet supplementation on lipid metabolism in rats trained to exercise

Results

Training to exercise with 20% linear load causes significant decreases in plasma TG. Progressive loading exercise training leads to significant decreases in plasma TG and significant increases in plasma COL.

Exercise training with linear loading and hemp oil dietary supplementation cause significant decreases in plasma TG and significant decreases in plasma COL. Exercise training

with progressive loading and hemp oil supplementation cause significant decreases in plasma COL.

Changes in plasma TG and COL appear after 14 days and are maintained at 28 days.

Study 8 - The histopathological changes in the myocardium and brain of animals trained to exercise and supplemented with Hemp Oil

Results

Training to exercise with linear loading causes histopathological changes of necrosis/apoptosis in the brain and causes no histological changes in the myocardium during the study. Hemp oil administration has a reduced neuroprotective effect in trained animals.

Neuronal changes of necrosis/apoptosis induced by exertion support the experimental hypothesis of brain neurogenesis and plasticity in the central nervous system.

General conclusions

1. Training to exercise with linear loading determined at 28 days, compared to the control group, significant increases in aerobic capacity, significant increases in serum SH groups and DH, significant decrease in tissular MDA and significant increases in tissular DH in encephalon, significant decreases in plasma TG, histopathological changes of necrosis/apoptosis in the encephalon.
2. Training with progressive intensity, determined at 28 days, compared to the control group, significant increases in aerobic capacity, with significant changes in serum MDA, PC and GSH, significant decreases in plasma TG and significant increases in plasma COL.
3. Hemp oil supplementation and exercise with linear intensity determined at 28 days compared with the control group, significant increases in aerobic capacity, with significant changes in serum MDA, PC, DH, SH groups and GSH. In the myocardium, there is significant increases in MDA, PC and HD, in the encephalon were significant increases in PC, DH and GSH, compared to non supplemented groups. Significant decreases in plasma TG and COL and histopathological changes of necrosis/apoptosis in the encephalon occurred.
4. Hemp oil supplementation and exercise with progressive intensity, determined at 28 days, significant increases in aerobic capacity compared to control group with significant changes in serum MDA, PC, GSH. In the myocardium, there are significant increases in MDA and DH, in the encephalon were significant increases in PC, SH groups and GSH and significant decreases in plasma COL, compared to non supplemented groups.
5. Aerobic capacity increases can be attributed to the energogen effect of PUFA. Reduction of increases in aerobic capacity with increasing linear intensity confirms the theory of hormesis effect of exercise.
6. Exercise is a stressor agent, which biochemically has a prooxidant effect (PO) at high intensity with increasing oxidative stress and decreasing antioxidant defense and an antioxidant effect in moderate effort, which supports the hypothesis of the paradoxical role of exercise on the O/A balance. Exercise causes plastic tissue damage in the encephalon, which would argue for the hypothesis of neurogenesis and plasticity in the central nervous system.
7. Hemp oil is a nutritional agent with energogen effect upon the aerobic capacity, antioxidant effect in exercise with moderate linear and progressive loading, by increasing antioxidant defense capacity, hipotrigliceridemiant effect for linear intensity and hipocholesterolemiant for progressive loading.
8. Our research shows that the paradoxical effect of exercise is dependent on exercise intensity, modified by charge and is influenced by prooxidant and antioxidant effect of hemp oil as a nutritional agent.

Originality and innovative contributions of the thesis

The originality of this work consists in the fact that it is:

- a comprehensive experimental study concerning on physical training at different intensities and its influence upon the exercise capacity, the serum and tissular oxidant/antioxidant balance and the histopathological changes;
- an experimental study based on two models of loading: linear intensity exercise, with standard loading and progressive intensity exercise with loading in steps, training models that are used in sports practice;
- a research that demonstrates the effects of hemp oil dietary supplementation on aerobic capacity, serum and tissue redox homeostasis, blood lipid metabolism changes and histopathological changes in the myocardium and encephalon occurring during exercise;
- a research that demonstrates the role of hemp oil nutritional agent with multiple effects: energogen, antioxidant and neuroprotective, hipotriglicemiant in terms of effort with different intensities.

Innovative contributions of the thesis are:

- the significance and value of the results, given the use of antioxidants through proper nutrition, energogen and antioxidant effect in terms of effort, to increase aerobic capacity and antioxidant defense, to improve performance;
- emphasize the need to develop together with medical specialists in sports medicine and nutritional doctors the recommendations on adequate nutrition, nutritional strategies on the nutritional intake of dietary agents for supporting and restoring exercise capacity after effort;
- support the theories of hormesis effect, paradoxical role of exercise on redox homeostasis and paradoxical role of nutrition in exercise, support the hypothesis neurogenesis and plasticity in the central nervous system.

Selected references

1. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(9-10):1865-1879.
2. Tache S. Oxidanții și antioxidanții; În Mureșan A, Tache S, Orășan R (sub red.) *Stresul oxidativ în procese fiziologice și patologice*, Ed. Tedesco, Cluj-Napoca 2006;1-27.
3. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med*. 2009;8:1.
4. Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise, *Free Radic Biol Med*. 2008;44(2):153-159.
5. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem*. 2001; 8(7):829-838.
6. Liu J, Yeo HC, Overvik-Douki E, et al. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol*. 2000; 89(1):21-28.
7. Kiens B, Alsted TJ, Jeppesen J. Factors regulating fat oxidation in human skeletal muscle. *Obes Rev*. 2011; 12(10):852-858.
8. Margaritis I, Rousseau AS. Does physical exercise modify antioxidant requirements? *Nutr Res Rev*. 2008;21(1):3-12.
9. Atalay M, Lappalainen J, Sen CK. Dietary antioxidants for the athlete. *Curr Sports Med Rep*. 2006;5(4):182-186.
10. Dejica D. Antioxidanții exogeni naturali. În Dejica D (sub red) - *Antioxidanți și terapie antioxidantă*. Ed Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca, 2001;105-124.
11. Ayre KJ, Hulbert AJ. Dietary fatty acid profile affects endurance in rats. *Lipids*. 1997;32 (12):1265-1270.

12. Bulduş C, Tache S, Moldovan R. The influence of hemp oil dietary supplementation on aerobic capacity in rats. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Educatio Artis Gymnasticae*, 2012;(1):15-21.
13. Bulduş C, Tache S, Moldovan R. The influence of hemp oil dietary supplementation on aerobic capacity in rats trained with progressive loading, *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Educatio Artis Gymnasticae*, 2012;(2):17-27.
14. Bulduş C, Tache S, Moldovan R. The effect of hemp seed oil on oxidant/antioxidant balance in exercise-trained rats during exercise with different intensity, *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Educatio Artis Gymnasticae*, 2012;(3):17-27.
15. Ukropec J, Reseland JE, Gasperikova D, et al. The hypotriglyceridemic effect of dietary n-3 FA is associated with increased beta-oxidation and reduced leptin expression. *Lipids*. 2003;38(10):1023-1029.
16. Callaway JC. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*. 2004;140: 65-72
17. van Praag H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromolecular Med*. 2008;10(2):128-140.
18. Bulduş C, Bolfa P, Borza G, Moldovan R, Tache S. Histopathological changes in the brain and myocardium of trained animals supplemented with hemp oil, *Palestrica of the third millennium Civilization and Sport*, 2012;13(2): 86-90.
19. Gomez-Cabrera MC, Ristow M, Viña J. Antioxidant supplements in exercise: worse than useless? *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;302(4):476-477.