



UNIVERZITET U NOVOM SADU



ФАКУЛТЕТ СПОРТА И ФИЗИЧКОГ
ВАСПИТАЊА

**EFEKTI RAZLIČITIH FORMULACIJA
KREATINA NA MOTORIČKO-
FUNKCIONALNE SPOSOBNOSTI,
BIOHEMIJSKE MARKERE I ENERGETIKU
MIŠIĆA I MOZGA REKREATIVNIH
SPORTISTA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Sergej M. Ostojić

Kandidat:

Saša Semeredi

Novi Sad, 2023. godine

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Doktorska disertacija
Име и презиме аутора:	Saša Semeredi
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Prof. dr Sergej Ostojić, redovan profesor, Fakultet sporta i fizičkog vaspitanja Novi Sad
Наслов рада:	Efekti različitih formulacija kreatina na motoričko-funkcionalne sposobnosti, biohemijske markere i energetiku mišića i mozga rekreativnih sportista
Језик публикације (писмо):	Srpski, latinično pismo
Физички опис рада:	Унети број: Страница 71 Поглавља 8 Референци 148 Табела 3 Слика 5 Графикона 0 Прилога 0
Научна област:	Biomedicinske nauke u sportu i fizičkom vaspitanju
Ужа научна област (научна дисциплина):	Nauke o ishrani
Кључне речи / предметна одредница:	Guanidinosirćetna kiselina, kreatin, suplementacija

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

Резиме на језику
рада:

Uvod: Kreatin predstavlja intenzivno istraživano, efikasno ergogeno sredstvo koje dovodi do povećanja ćelijskih rezervi kreatina. Poslednjih decenija suplementacija guanidinosirćetnom kiselinom (GAA) predstavljena je kao superiorno sredstvo za unapređenje ćelijske bioenergetike u odnosu na kreatin i alternativno rešenje kojim bi se uspešno otklonili eventualni nedostaci suplementacije kreatinom. Cilj ovog istraživanja jeste utvrđivanje efekata kombinovanog unosa kreatina i GAA na antropometrijski status, apsolutnu (maksimalnu), eksplozivnu i repetitivnu snagu, kardiorespiratornu izdržljivost, kao i biohemijske i indikatore tkivno-ćelijske bioenergetike kod zdravih muškaraca koji se rekreativno bave sportom.

Materijali i metode: U istraživanju je učestvovalo 14 muškaraca starosti između 18 i 30 godina (telesna visina $176,49 \pm 7,25$ cm; telesna masa $79,86 \pm 13,86$ kg), koji se bave sportom 5 i više sati nedeljno i poseduju višegodišnje trenajno iskustvo u različitim tipovima aktivnosti. Studija je organizovana kao randomizirana, dvostruko slepa, *cross-over* studija kontrolisana kreatinom. Eksperimentalna grupa unosila je kombinaciju kreatina i GAA (3 g Cr + 1 g GAA) tokom 4 nedelje, dok je kontrolna grupa konzumirala ekvimolarnu količinu kreatina (4 g Cr). Nakon završetka tretmana i *wash out* perioda (4 nedelje), grupe su zamenile tretmane. Dnevna doza suplementacije podrazumevala je unos praha rastvorenog u 250 ml mlake vode nakon noćnog gladovanja, pre doručka. Inicijalno, te nakon završetka svake faze, sprovedena su antropometrijska merenja, biohemijske analize, testovi motoričko-funkcionalnih sposobnosti i magnetna spektroskopija četvoroglavog mišića natkolenice i sive i bele moždane mase.

Rezultati: Tretman kreatinom doveo je do statistički značajnog povećanja telesne mase u odnosu na inicijalno merenje ($79,86 \pm 13,86$ kg vs $81,48 \pm 13,22$ kg; $p=0,01$), dok ove razlike nisu utvrđene nakon tretmana Cr+GAA ($80,6 \pm 13,68$ kg; $p>0,05$). Značajno povećanje vrednosti Cr u serumu uočeno je u obe grupe (inicijalno $20,87 \pm 5,3$ $\mu\text{M/L}$ vs Cr $44,45 \pm 16,53$ $\mu\text{M/L}$; $p=0,001$, i Cr+GAA $39,83 \pm 12,37$ $\mu\text{M/L}$; $p=0,001$), pri čemu nisu uočene značajne razlike između tretmana ($p>0,05$). Povećanje vrednosti Crn u serumu nakon tretmana nije statistički potvrđeno ($p>0,05$). Vrednosti Crn bile su niže pre unosa suplementacije u odnosu na Cr+GAA grupu (84 ± 89 $\mu\text{M/L}$ vs $88,45 \pm 6,44$ $\mu\text{M/L}$), dok je unos kreatina doveo do dodatnog povećanja ($90,51 \pm 12,56$ $\mu\text{M/L}$). Vrednosti GAA i tHcy u serumu nisu se značajno razlikovale nakon oba nutritivna tretmana u odnosu na inicijalno merenje ($p>0,05$). Unos suplementacije doveo je do statistički značajnog povećanja vrednosti snage. U testu potisak sa ravne klupe sa slobodnim tegovima (BP) vrednosti su porasle nakon unosa kreatina ($97,08 \pm 23,67$ kg vs $101,67 \pm 22,7$ kg; $p=0,003$), te dodatno nakon kombinacije Cr+GAA ($102,92 \pm 25,71$ kg; $p=0,004$). U testu prednji čučanj statistički značajno povećanje vrednosti snage utvrđeno je nakon oba tretmana (inicijalno $107,5 \pm 15,3$ kg vs Cr $122,5 \pm 10,55$ kg; $p<0,00$ i Cr+GAA $121,25 \pm 8,29$ kg; $p<0,001$), dok razlike između grupa nisu statistički potvrđene ($p>0,05$). U testu skok iz stojećeg stava sa zamahom rukama (VJ) uočeno je statistički značajno smanjenje visine skoka nakon

	<p>tretmana kreatinom ($57,06 \pm 6,02$ cm vs $53,88 \pm 5,17$ cm; $p > 0,001$) i tretmana Cr+GAA ($54,86 \pm 4,88$ cm; $p = 0,006$) u odnosu na inicijalno merenje. Kombinacija Cr i GAA dovela je do statistički značajnog porasta kreatina u interesnoj regiji sive moždane mase ($Z = -2,02$; $p = 0,043$), ali ne i tretman kreatinom zasebno ($p > 0,05$). Tretman Cr+GAA doveo je do povećanja vrednosti kreatina za dodatnih 4,0% u odnosu na kreatin (inicijalno $8,94 \pm 0,77$ mM vs Cr $9,09 \pm 0,93$ mM; Cr+GAA $9,45 \pm 0,7$ mM). Povećanje vrednosti kreatina u interesnoj regiji bele moždane mase nakon unosa suplementacije nije statistički potvrđeno ($p > 0,05$), ipak unos kreatina doveo je do povećanja od 7,0% u odnosu na inicijalno merenje ($7,60 \pm 0,63$ mM vs $8,22 \pm 0,52$ mM), a tretman Cr+GAA je ostvario dodatno povećanje od 6,3% u odnosu na tretman kreatinom ($8,74 \pm 1,13$ mM). Kombinacija Cr i GAA ostvarila je dodatno povećanje vrednosti Cr u četvoroglavom mišiću natkolenice od 13,1% u odnosu na unos kreatina zasebno (inicijalno $35,53 \pm 5,86$ mM vs Cr $36,03 \pm 4,91$ mM; Cr+GAA $40,74 \pm 3,45$ mM).</p> <p>Zaključak: Kombinacija kreatina i GAA u odnosu 3:1 potvrdila se kao superioran tretman za unapređenje ćelijskih rezervi kreatina u mišićnom i moždanom tkivu u odnosu na kreatin. Nova formulacija kreatina dovela je do značajnog povećanja snage gornjih i donjih ekstremiteta, praćenog značajno manjim povećanjem telesne mase u odnosu na kreatin, nakon 4-nedeljnog tretmana kod zdravih, fizički aktivnih muškaraca. Istraživani tretman značajno je umanjio rizik od hiperhomocisteinemije u odnosu na unos GAA zasebno.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	<p>Председник: Prof. dr Patrik Drid, redovan profesor</p> <p>Члан: Prof. dr Milan Vraneš, redovan profesor</p> <p>Члан: Prof. dr Valdemar Štajer, docent</p>
Напомена:	

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OF SPORT AND PHYSICAL EDUCATION

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Saša Semeredi
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Professor Sergej M. Ostojić, MD, PhD
Thesis title:	Effects of different creatine formulations on exercise performance, biochemistry and muscle and brain tissue bioenergetics in recreational athletes
Language of text (script):	Serbian language, latin script
Physical description:	Number of: Pages 71 Chapters 8 References 148 Tables 3 Illustrations 5 Graphs 0 Appendices 0
Scientific field:	Biomedicine in Sport and Physical Education
Scientific subfield (scientific discipline):	Nutritional Science
Subject, Key words:	Guanidinoacetic acid, creatine, supplementation
Abstract in English language:	Introduction: Creatine is a well-recognized, effective ergogenic agent that leads to an increase in cellular creatine reserves. In recent years, guanidinoacetic acid (GAA) supplementation has been presented as a superior treatment for tackling cellular bioenergetic compared to creatine, and an alternative solution that could eliminate potential

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

shortcomings of creatine. The aim of this study is to determine the effects of the combined intake of creatine and GAA on anthropometric status, maximal, explosive, and repetitive strength, aerobic endurance, as well as biochemical and indicators of tissue bioenergetics in healthy, well-trained men.

Methods: 14 men between ages 18 and 30 (height 176.49 ± 7.25 cm; body mass 79.86 ± 13.86 kg) engaged in different physical activities for 5 or more hours per week participated in this research. In this randomized, double-blind, creatine-controlled cross-over study, the experimental group ingested a combination of creatine and GAA (3 g Cr + 1 g GAA) for 4 weeks. The control group consumed an equimolar dose of creatine (4 g Cr) per day. Upon the end of the first phase and wash-out period (4 weeks), the groups switched treatments to ensure between-subjects comparison. The daily dose included the intake of the powder dissolved in 250 ml of lukewarm water immediately after night fasting. Anthropometric measurements, biochemical analyses, functional ability tests, and magnetic spectroscopy of muscle and brain tissue were conducted initially, as well as after the completion of each research phase.

Results: Creatine treatment led to a statistically significant increase in body weight compared to the initial measurement (79.86 ± 13.86 kg vs 81.48 ± 13.22 kg; $p=0.01$), while these differences were not determined after Cr+GAA treatment (80.6 ± 13.68 kg; $p>0.05$). A significant increase in Cr serum levels was observed in both groups (initial 20.87 ± 5.3 $\mu\text{M/L}$ vs Cr 44.45 ± 16.53 $\mu\text{M/L}$; $p=0.001$, and Cr+GAA 39.83 ± 12.37 $\mu\text{M/L}$; $p=0.001$), and no significant differences were observed between treatments ($p>0.05$). The increase in Crn serum levels was not statistically confirmed after treatments ($p>0.05$). Crn values were lower before supplementation compared to the Cr+GAA group (84 ± 89 $\mu\text{M/L}$ vs 88.45 ± 6.44 $\mu\text{M/L}$), while creatine intake led to an additional increase (90.51 ± 12.56 $\mu\text{M/L}$). Additionally, GAA and tHcy serum values did not differ significantly after both nutritional treatments compared to the initial measurement ($p>0.05$). Supplementation led to a statistically significant increase in strength. In the bench press, the values increased after creatine intake (97.08 ± 23.67 kg vs 101.67 ± 22.7 kg; $p=0.003$), and additionally after the Cr+GAA combination (102.92 ± 25.71 kg; $p=0.004$). In the front squat, a statistically significant increase in strength was observed after both treatments (initial 107.5 ± 15.3 kg vs Cr 122.5 ± 10.55 kg; $p<0.00$ and Cr+GAA 121.25 ± 8.29 kg; $p<0.001$), while the differences between treatments were not statistically confirmed ($p>0.05$). In the vertical jump, a statistically significant decrease in jump height was observed after creatine treatment (57.06 ± 6.02 cm vs 53.88 ± 5.17 cm; $p>0.001$), and Cr+GAA treatment (54.86 ± 4.88 cm; $p=0.006$) compared to initial values. Furthermore, the combination of Cr and GAA led to a statistically significant increase in gray matter creatine levels ($Z=-2.02$; $p=0.043$), but not creatine treatment alone ($p>0.05$) compared to initial values. Cr+GAA led to an increase in creatine levels by an additional 4.0% compared to creatine (initial 8.94 ± 0.77 mM vs Cr 9.09 ± 0.93 mM; Cr+GAA 9.45 ± 0.7 mM). The increase in white matter

	<p>creatine levels was not statistically confirmed after the supplementation intake ($p>0,05$), however, the creatine intake led to an increase of 7,0% compared to the initial measurement ($7,60\pm 0,63$ mM vs $8,22\pm 0,52$ mM), and the Cr+GAA treatment led to an additional increase of 6,3% compared to creatine alone ($8,74\pm 1,13$ mM). The Cr+GAA combination achieved an additional 13,1% increase in creatine levels in m. vastus medialis compared to creatine intake alone (initial $35,53\pm 5,86$ mM vs Cr $36,03\pm 4,91$ mM; Cr+GAA $40,74\pm 3,45$ mM).</p> <p>Conclusion: The combination of creatine and GAA in a 3:1 ratio proved to be a superior treatment for improving the cellular creatine reserves in muscle and brain tissue compared to creatine alone. A new creatine formulation produced significant increases in upper and lower body strength, accompanied by significantly less weight gain compared to creatine after 4-weeks treatment in healthy, physically active men. The investigated treatment significantly reduced the risk of hyperhomocysteinemia compared to GAA intake alone.</p>
Accepted on Scientific Board on:	
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: Prof. Patrik Drid, PhD</p> <p>Member: Prof. Milan Vraneš, PhD</p> <p>Member: Prof. Valdemar Štajer, PhD</p>
Note:	

¹ The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

Prikaz naučnih radova kandidata iz doktorske disertacije:

Semeredi, S., Stajer, V., Ostojic, J., Vranes, M., & Ostojic, S. M. (2019). Guanidinoacetic acid with creatine compared with creatine alone for tissue creatine content, hyperhomocysteinemia, and exercise performance: A randomized, double-blind superiority trial. *Nutrition*, 57, 162-166.

Semeredi, S., Stajer, V., Ostojic, J., Vranes, M., & Ostojic, S. M. (2018). Creatine and guanidinoacetic acid affects brain and skeletal muscle bioenergetics. *Clinical Nutrition*, 37, S163-S164.

SAŽETAK

Uvod: Kreatin predstavlja intenzivno istraživano, efikasno ergogeno sredstvo koje dovodi do povećanja ćelijskih rezervi kreatina. Poslednjih decenija suplementacija guanidinosirćetnom kiselinom (GAA) predstavljena je kao superiorno sredstvo za unapređenje ćelijske bioenergetike u odnosu na kreatin i alternativno rešenje kojim bi se uspešno otklonili eventualni nedostaci suplementacije kreatinom. Cilj ovog istraživanja jeste utvrđivanje efekata kombinovanog unosa kreatina i GAA na antropometrijski status, apsolutnu (maksimalnu), eksplozivnu i repetitivnu snagu, kardiorespiratornu izdržljivost, kao i biohemijske i indikatore tkivno-ćelijske bioenergetike kod zdravih muškaraca koji se rekreativno bave sportom.

Materijali i metode: U istraživanju je učestvovalo 14 muškaraca starosti između 18 i 30 godina (telesna visina $176,49 \pm 7,25$ cm; telesna masa $79,86 \pm 13,86$ kg), koji se bace sportom 5 i više sati nedeljno i poseduju višegodišnje trenažno iskustvo u različitim tipovima aktivnosti. Studija je organizovana kao randomizirana, dvostruko slepa, *cross-over* studija kontrolisana kreatinom. Eksperimentalna grupa unosila je kombinaciju kreatina i GAA (3 g Cr + 1 g GAA) tokom 4 nedelje, dok je kontrolna grupa konzumirala ekvimolarnu količinu kreatina (4 g Cr). Nakon završetka tretmana i *wash out* perioda (4 nedelje), grupe su zamenile tretmane. Dnevna doza suplementacije podrazumevala je unos praha rastvorenog u 250 ml mlake vode nakon noćnog gladovanja, pre doručka. Inicijalno, te nakon završetka svake faze, sprovedena su antropometrijska merenja, biohemijske analize, testovi motoričko-funkcionalnih sposobnosti i magnetna spektroskopija četvoroglavog mišića natkolenice i sive i bele moždane mase.

Rezultati: Tretman kreatinom doveo je do statistički značajnog povećanja telesne mase u odnosu na inicijalno merenje ($79,86 \pm 13,86$ kg vs $81,48 \pm 13,22$ kg; $p=0,01$), dok ove razlike nisu utvrđene nakon tretmana Cr+GAA ($80,6 \pm 13,68$ kg; $p>0,05$). Značajno povećanje vrednosti Cr u serumu uočeno je u obe grupe (inicijalno $20,87 \pm 5,3$ $\mu\text{M/L}$ vs Cr $44,45 \pm 16,53$ $\mu\text{M/L}$; $p=0,001$, i Cr+GAA $39,83 \pm 12,37$ $\mu\text{M/L}$; $p=0,001$), pri čemu nisu uočene značajne razlike između tretmana ($p>0,05$). Povećanje vrednosti Crn u serumu nakon tretmana nije statistički potvrđeno ($p>0,05$). Vrednosti Crn bile su niže pre unosa suplementacije u odnosu na Cr+GAA grupu (84 ± 89 $\mu\text{M/L}$ vs $88,45 \pm 6,44$ $\mu\text{M/L}$), dok je unos kreatina doveo do dodatnog povećanja ($90,51 \pm 12,56$ $\mu\text{M/L}$). Vrednosti GAA i tHcy u serumu nisu se značajno razlikovale nakon oba nutritivna tretmana u

odnosu na inicijalno merenje ($p > 0,05$). Unos suplementacije doveo je do statistički značajnog povećanja vrednosti snage. U testu potisak sa ravne klupe sa slobodnim tegovima (BP) vrednosti su porasle nakon unosa kreatina ($97,08 \pm 23,67$ kg vs $101,67 \pm 22,7$ kg; $p = 0,003$), te dodatno nakon kombinacije Cr+GAA ($102,92 \pm 25,71$ kg; $p = 0,004$). U testu prednji čučanj statistički značajno povećanje vrednosti snage utvrđeno je nakon oba tretmana (inicijalno $107,5 \pm 15,3$ kg vs Cr $122,5 \pm 10,55$ kg; $p < 0,00$ i Cr+GAA $121,25 \pm 8,29$ kg; $p < 0,001$), dok razlike između grupa nisu statistički potvrđene ($p > 0,05$). U testu skok iz stojećeg stava sa zamahom rukama (VJ) uočeno je statistički značajno smanjenje visine skoka nakon tretmana kreatinom ($57,06 \pm 6,02$ cm vs $53,88 \pm 5,17$ cm; $p > 0,001$) i tretmana Cr+GAA ($54,86 \pm 4,88$ cm; $p = 0,006$) u odnosu na inicijalno merenje. Kombinacija Cr i GAA dovela je do statistički značajnog porasta kreatina u interesnoj regiji sive moždane mase ($Z = -2,02$; $p = 0,043$), ali ne i tretman kreatinom zasebno ($p > 0,05$). Tretman Cr+GAA doveo je do povećanja vrednosti kreatina za dodatnih 4,0% u odnosu na kreatin (inicijalno $8,94 \pm 0,77$ mM vs Cr $9,09 \pm 0,93$ mM; Cr+GAA $9,45 \pm 0,7$ mM). Povećanje vrednosti kreatina u interesnoj regiji bele moždane mase nakon unosa suplementacije nije statistički potvrđeno ($p > 0,05$), ipak unos kreatina doveo je do povećanja od 7,0% u odnosu na inicijalno merenje ($7,60 \pm 0,63$ mM vs $8,22 \pm 0,52$ mM), a tretman Cr+GAA je ostvario dodatno povećanje od 6,3% u odnosu na tretman kreatinom ($8,74 \pm 1,13$ mM). Kombinacija Cr i GAA ostvarila je dodatno povećanje vrednosti Cr u četvoroglavom mišiću natkolenice od 13,1% u odnosu na unos kreatina zasebno (inicijalno $35,53 \pm 5,86$ mM vs Cr $36,03 \pm 4,91$ mM; Cr+GAA $40,74 \pm 3,45$ mM).

Zaključak: Kombinacija kreatina i GAA u odnosu 3:1 potvrdila se kao superioran tretman za unapređenje ćelijskih rezervi kreatina u mišićnom i moždanom tkivu u odnosu na kreatin. Nova formulacija kreatina dovela je do značajnog povećanja snage gornjih i donjih ekstremiteta, praćenog značajno manjim povećanjem telesne mase u odnosu na kreatin, nakon 4-nedeljnog tretmana kod zdravih, fizički aktivnih muškaraca. Istraživani tretman značajno je umanjio rizik od hiperhomocisteinemije u odnosu na unos GAA zasebno.

ABSTRACT

Introduction: Creatine is a well-recognized, effective ergogenic agent that leads to an increase in cellular creatine reserves. In recent years, guanidinoacetic acid (GAA) supplementation has been presented as a superior treatment for tackling cellular bioenergetic compared to creatine, and an alternative solution that could eliminate potential shortcomings of creatine. The aim of this study is to determine the effects of combined intake of creatine and GAA on anthropometric status, maximal, explosive and repetitive strength, aerobic endurance, as well as biochemical and indicators of tissue bioenergetics in healthy, well-trained men.

Methods: 14 men between ages 18 and 30 (height 176.49 ± 7.25 cm; body mass 79.86 ± 13.86 kg) engaged in different physical activities for 5 or more hours per week participated in this research. In this randomized, double-blind, creatine-controlled cross-over study, the experimental group ingested a combination of creatine and GAA (3 g Cr + 1g GAA) for 4 weeks. The control group consumed an equimolar dose of creatine (4 g Cr) per day. Upon the end of the first phase and wash-out period (4 weeks), the groups switched treatments to ensure between-subjects comparison. The daily dose included the intake of the powder dissolved in 250 ml of lukewarm water immediately after night fasting. Anthropometric measurements, biochemical analyses, functional ability tests, and magnetic spectroscopy of muscle and brain tissue were conducted initially, as well as after the completion of each research phase.

Results: Creatine treatment led to a statistically significant increase in body weight compared to the initial measurement ($79,86 \pm 13,86$ kg vs $81,48 \pm 13,22$ kg; $p=0,01$), while these differences were not determined after Cr+GAA treatment ($80,6 \pm 13,68$ kg; $p>0,05$). A significant increase in Cr serum levels was observed in both groups (initial $20,87 \pm 5,3$ $\mu\text{M/L}$ vs Cr $44,45 \pm 16,53$ $\mu\text{M/L}$; $p=0,001$, and Cr+GAA $39,83 \pm 12,37$ $\mu\text{M/L}$; $p=0,001$), and no significant differences were observed between treatments ($p>0,05$). The increase in Crn serum levels was not statistically confirmed after treatments ($p>0,05$). Crn values were lower before supplementation compared to the Cr+GAA group (84 ± 89 $\mu\text{M/L}$ vs $88,45 \pm 6,44$ $\mu\text{M/L}$), while creatine intake led to an additional increase ($90,51 \pm 12,56$ $\mu\text{M/L}$). Additionally, GAA and tHcy serum values did not differ significantly after both nutritional treatments compared to the initial measurement ($p>0,05$). Supplementation led to a statistically significant increase in strength. In the bench press, the values increased after creatine

intake ($97,08 \pm 23,67$ kg vs $101,67 \pm 22,7$ kg; $p=0,003$), and additionally after the Cr+GAA combination ($102,92 \pm 25,71$ kg; $p=0,004$). In the front squat, a statistically significant increase in strength was observed after both treatments (initial $107,5 \pm 15,3$ kg vs Cr $122,5 \pm 10,55$ kg; $p < 0,00$ and Cr+GAA $121,25 \pm 8,29$ kg; $p < 0,001$), while the differences between treatments were not statistically confirmed ($p > 0,05$). In the vertical jump, a statistically significant decrease in jump height was observed after creatine treatment ($57,06 \pm 6,02$ cm vs $53,88 \pm 5,17$ cm; $p > 0,001$), and Cr+GAA treatment ($54,86 \pm 4,88$ cm; $p=0,006$) compared to initial values. Furthermore, the combination of Cr and GAA led to a statistically significant increase in gray matter creatine levels ($Z=-2,02$; $p=0,043$), but not creatine treatment alone ($p > 0,05$) compared to initial values. Cr+GAA led to an increase in creatine levels by an additional 4,0% compared to creatine (initial $8,94 \pm 0,77$ mM vs Cr $9,09 \pm 0,93$ mM; Cr+GAA $9,45 \pm 0,7$ mM). The increase in white matter creatine levels was not statistically confirmed after the supplementation intake ($p > 0,05$), however, the creatine intake led to an increase of 7,0% compared to the initial measurement ($7,60 \pm 0,63$ mM vs $8,22 \pm 0,52$ mM), and the Cr+GAA treatment led to an additional increase of 6,3% compared to creatine alone ($8,74 \pm 1,13$ mM). The Cr+GAA combination achieved an additional 13,1% increase in creatine levels in m. vastus medialis compared to creatine intake alone (initial $35,53 \pm 5,86$ mM vs Cr $36,03 \pm 4,91$ mM; Cr+GAA $40,74 \pm 3,45$ mM).

Conclusion: The combination of creatine and GAA in a 3:1 ratio proved to be a superior treatment for improving the cellular creatine reserves in muscle and brain tissue compared to creatine alone. A new creatine formulation produced significant increases in upper and lower body strength, accompanied by significantly less weight gain compared to creatine after 4-weeks treatment in healthy, physically active men. The investigated treatment significantly reduced the risk of hyperhomocysteinemia compared to GAA intake alone.

SADRŽAJ

1. UVOD	2
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	4
2.1. OSNOVE ĆELIJSKE BIOENERGETIKE.....	4
2.1.1. Fosfokreatinski energetska sistem	5
2.2. VISOKO-ENERGETSKI FOSFATI	7
2.2.1. Kreatin u ljudskom organizmu.....	7
2.2.2. Kreatin u ljudskoj ishrani.....	8
2.2.3. Endogena sinteza kreatina.....	9
2.2.4. Apsorpcija, transport i ekskrecija kreatina.....	10
2.2.5. Metabolička uloga kreatina.....	12
2.2.6. Deficit kreatina.....	14
2.3. SUPLEMENTACIJA KREATINOM.....	16
2.3.1. Doziranje.....	16
2.3.2. Kreatin i fizičke performanse.....	17
2.3.3. Kreatin, zdravlje i patološka stanja	19
2.4. GUANIDINOSIRĆETNA KISELINA (GAA) KAO ALTERNATIVA KREATINU	21
2.4.1. GAA u ljudskom organizmu	21
2.4.2. Suplementacija GAA	22
2.4.3. Metabolička uloga i potencijalni mehanizmi delovanja.....	23
2.4.4. Nedostaci i rizici suplementacije GAA.....	27
2.4.5. Otvorena pitanja.....	30
3. PROBLEM, PREDMET I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	31
3.1. OSNOVNE HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	32
4. METODOLOGIJA RADA	33
4.1. EKSPERIMENTALNI DIZAJN I USLOVI IZVOĐENJA	33
4.2. UZORAK ISPITANIKA	36
4.3. MERNI INSTRUMENTI I TEST-PROTOKOLI.....	37
4.3.1. Antropometrijske mere i parametri	37
4.3.2. Biohemijski markeri.....	37
4.3.3. Motoričko-funkcionalne mere i parametri	38
4.3.4. Magnetna spektroskopija	41
4.4. METODE OBRADE PODATAKA	43
5. REZULTATI.....	44
6. DISKUSIJA.....	49
7. ZAKLJUČAK	55
8. LITERATURA.....	57

1. UVOD

Kontinuirana potraga za najefikasnijim tretmanom kojim bi se očuvao i unapredio zdravstveni status i fizičke performanse dovela je do toga da se svake godine na tržištu pojavi gotovo 2000 novih dijetetskih proizvoda, čija je primena u većoj ili manjoj meri naučno opravdana. Nakon što je prva studija pokazala pozitivne efekte na ćelijske rezerve kreatina (Harris et al., 1992), već 1993. na tržištu su se pojavili prvi komercijalni proizvodi na bazi kreatina, klasifikovani kao nutritivna ergogena sredstva. Tri decenije i oko 10 000 naučnih studija kasnije, kreatin je prepoznat kao najčešće istraživano i najefikasnije ergogeno sredstvo u fiziologiji vežbanja (Kreider et al., 2017), pri čemu se procenjuje da će globalno tržište kreatina dostići vrednost od 520 miliona dolara do 2024. godine (360 Research Reports, 2019). Decenije istraživanja definisale su suplementaciju kreatinom kao bezbedan i efikasan nutritivni tretman, koji karakteriše odsustvo bilo kakvih neželjenih efekata i zdravstvenih rizika kod ljudi (Kreider et al., 2017). Najčešće korišćeni oblik kreatina je kreatin monohidrat (CrM) (Jager et al., 2011), dok na tržištu postoje i drugi oblici kao što su kreatin citrat, malat, etil ester, nitrat i drugi. Ipak, ne postoje dokazi da je neki od oblika superiorniji od ostalih u svrhu povećanja ćelijskih rezervi kreatina (Fazio et al., 2021). Inicijalno, najveći broj naučnih studija bavio se efektima CrM na fizičke performanse sportista, i utreniranih i neutreniranih rekreativaca, te je posebna pažnja naučne javnosti bila usmerena ka efektima u aktivnostima tipa snage. Pored snažno dokazanih ergogenih efekata u različitim tipovima aktivnosti (Wax et al., 2021), oralni unos kreatina se aktivno istražuje i kao terapijsko sredstvo kod različitih patoloških stanja kao što su diabetes, sarkopenija, neurodegenerativni poremećaji, kardiovaskularne bolesti, osteoartritis, fibromijalgija, depresija i sindrom hroničnog zamora (Kreider & Stout, 2021). Pored toga, prethodne studije su se bavile i efektima kreatina u prevenciji i rehabilitaciji povreda, termoregulaciji, te neuroprotektivnim efektima kod trauma i ishemičnih stanja (Kreider et al., 2017). Imajući u vidu snažnu naučnu osnovu i veoma široku primenu, ne čudi podatak da se godišnje proizvede više od 2,5 miliona kilograma kreatina samo za oralnu upotrebu (Momaya et al., 2015) U tom smislu, naučna javnost kontinuirano traga za novim formulacijama, kojima bi se dodatno unapredila ćelijska bioenergetika i otklonili eventualni nedostaci suplementacije kreatinom.

Poslednja decenija donela je veliko naučno interesovanje za efekte oralnog unosa guanidinosirćetne kiseline (GAA), koja predstavlja prirodan prekursor kreatina. GAA je u ljudskom organizmu identifikovana pre gotovo 90 godina (Weber, 1934) izolovanjem iz urina, dok su Davenport i saradnici (1938) prvi opisali proces endogene sinteze GAA i njen dalji metabolički put u kreatin. Rane studije koje su se bavile efektima različitih aminokiselina i njihovih derivata na metabolizam kreatina predstavile su GAA kao ključnu supstancu u endogenoj sintezi kreatina, pri čemu se GAA pokazala kao superiorno sredstvo za povećanje ćelijskih rezervi kreatina, čak i u odnosu na kreatin. Nakon studija iz 1950-ih godina, koje su istraživale terapijske efekte GAA na različitim kliničkim populacijama (Borsook & Borsook, 1951), naučno interesovanje za GAA kao dodatak ljudskoj ishrani je opalo. Međutim, poslednjih godina veliki broj naučnih istraživanja bavio se efektima GAA na fizičke performanse i unapređenje zdravlja opšte i kliničke populacije. Novije studije potvrdile su pozitivne efekte suplementacije GAA na ćelijske rezerve kreatina u različitim tkivima domaćih životinja (McBreairty et al., 2015) i ljudi (Ostojić et al., 2016; Ostojić et al., 2017). Iz tog razloga, GAA se intenzivno istražuje kao novi nutritivni dodatak ljudskoj ishrani i alternativni izvor kreatina. Pronalaženje nove formulacije kreatina, kojom bi se efikasnije uticalo na ćelijsku bioenergetiku mišićnog i moždanog tkiva ljudi nalazi se u osnovi ovog naučno-istraživačkog rada.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. OSNOVE ĆELIJSKE BIOENERGETIKE

Bioenergetika predstavlja tok i razmenu energije unutar i među živim sistemima, a njena transformacija nalazi se u osnovi svih ćelijskih dešavanja. Uz uvažavanje zakonitosti termodinamike, u ljudskom organizmu prisutni su različiti oblici energije, među kojima hemijska energija zauzima centralnu ulogu. Stoga, bioenergetika ima za cilj da ustanovi principe i zakone koji pokreću transformaciju energije i prelazak materijalnog sistema iz jednog stanja u drugo (Kovačević, 2006). Skup svih hemijskih reakcija u organizmu, koje mogu biti anaboličkog i kataboličkog karaktera, čini metabolizam (Ostojić, 2007), pri čemu se razlikuju egzergone reakcije u kojima se oslobađa energija i endergone reakcije u kojima se oslobođena energija koristi. Ove reakcije funkcionalno su uparene i njihovim skladnim delovanjem obezbeđuju se uslovi za normalno funkcionisanje bioloških sistema. Najvažnije jedinjenje za bioenergetiku živih sistema jeste adenzin trifosfat (ATP), koji predstavlja jedini neposredni izvor energije za sve životne procese. ATP u ćeliji služi za obavljanje osnovnih ćelijskih funkcija među kojima su: (1) transport materija kroz ćelijske membrane, (2) sinteza hemijskih supstanci i (3) obavljanje mehaničkog rada, odnosno mišićne kontrakcije (Bjelica & Fratrić, 2011). Najveći udeo hemijskih procesa u kojima se oslobađa energija koristi se za resintezu ATP u ćeliji, čime se obezbeđuje njegova stalna raspoloživost. Makronutrijenti, koji se unose ishranom, u svojim hemijskim vezama sadrže potencijalnu hemijsku energiju, koja se oslobađa njihovim raskidanjem. Međutim, ugljeni hidrati, masti i proteini se ne mogu direktno koristiti za pokretanje bioloških procesa, već se metaboličkim putevima transformišu i deponuju unutar i izvan ćelije, za trenutnu ili odloženu resintezu ATP (Ostojić, 2007).

Adenzin trifosfat se sastoji od nukleotida adenina, šećera riboze i tri fosfatne grupe, međusobno lančano povezane visoko-energetskim, fosfoanhidričkim vezama. Raskidanjem ovih veza, u procesu hidrolize obezbeđuje se energija za vršenje svih bioloških funkcija, te ATP popularno predstavlja „energetsku monetu“ ljudskog organizma. Hidroliza ATP katalizovana je enzimom adenzin trifosfatazom (ATPazom) i zahteva prisustvo jednog molekula vode (H_2O), pri čemu nastaju adenzin difosfat (ADP), neorganski fosfor (P_i) i jedan jon vodonika (H^+). Daljom hidrolizom, u reakciji adenilat kinaze, od ADP odvaja se još jedna fosfatna grupa, a

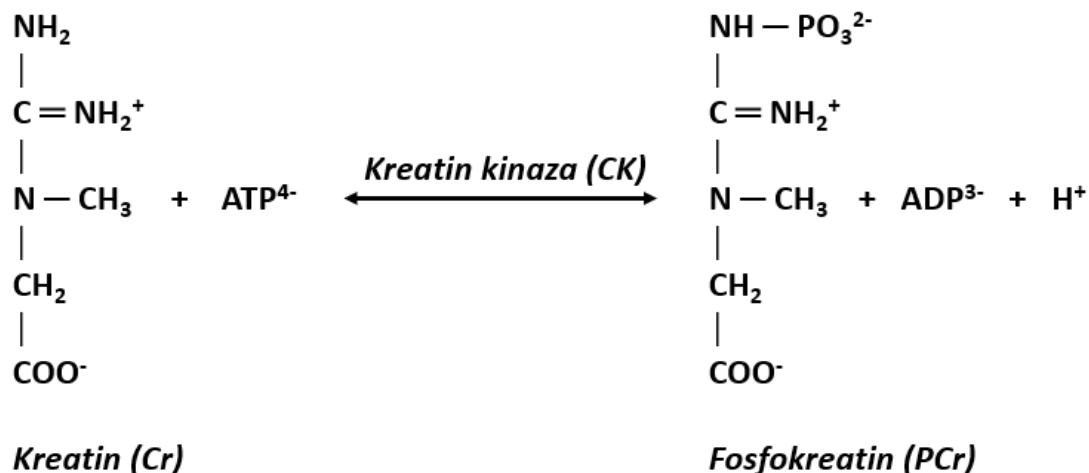
novonastalo jedinjenje naziva se adenzin monofosfat (AMP). Pomenute reakcije reverzibilnog su karaktera, te se uz utrošak energije resintetišu ADP, odnosno ATP.

U energetske zahtevnim tkivima, kakva su mišićno i moždano tkivo, postoji velika potreba za stalnom resintezom ATP. Tokom fizičke aktivnosti energetske zahtevi skeletne muskulature višestruko rastu, te je hidroliza ATP permanentna i veoma obilna. Čelije mogu da uskladište veoma ograničenu količinu ATP, pri čemu se u ljudskom organizmu u svakom trenutku nalazi oko 80 do 100g ATP, što ne predstavlja značajne energetske rezerve pri vežbanju (McArdle, Katch & Katch, 2007). Pored toga, rezerve ATP se nikad ne mogu u potpunosti isprazniti, međutim visoka stopa hidrolize može dovesti do značajnog smanjenja ćelijske koncentracije ATP, koja pri eksperimentalno indukovanom mišićnom zamoru iznosi 40 do 50% vrednosti u mirovanju (Greenhaff et al., 1994). Uzrok tome jeste uska povezanost sinteze ATP sa njegovom hidrolizom, čime se koncentracija ATP u mišićnoj ćeliji održava relativno postojanom (Bjelica & Fratrić, 2011). Kako bi se održala neophodna stopa resinteze ATP tokom fizičkog vežbanja, neophodna je hemijska energija iz različitih izvora i dobijena različitim metaboličkim putevima. Ukoliko metabolički putevi podrazumevaju prisustvo kiseonika onda je reč o aerobnim energetske procesima, dok za anaerobne energetske procese prisustvo kiseonika nije neophodno. Metabolički aparat ovu količinu energije obezbeđuje kroz različite energetske sisteme, među kojima su: (1) fosfokreatinski sistem, (2) anaerobna glikoliza i (3) aerobna proizvodnja energije (Herda i Cramer, 2017).

2.1.1. Fosfokreatinski energetske sistem

Kako je ukupan energetske potencijal ATP veoma nizak, a energetske zahtevi u različitim tkivima mogu postati izuzetno visoki, neophodni su mehanizmi kojima bi se brzo i efikasno obezbedila energija za resintezu ATP. Tri različita, ali usko povezana energetske sistema, zajedničkim delovanjem zadovoljavaju energetske potrebe mišićnog tkiva. Anaerobna proizvodnja energije, koja obuhvata fosfokreatinski sistem i anaerobnu glikolizu, podrazumeva razgradnju visoko-energetskih fosfata i ugljenih hidrata bez prisustva kiseonika, dok treći energetske sistem podrazumeva aerobno razlaganje primarno ugljenih hidrata i masti (Gastin, 2001).

Za gotovo trenutno snabdevanje energijom, od velikog značaja je fosfokreatinski energetski sistem. Fosfokreatin (PCr) predstavlja visoko-energetsko jedinjenje koje se nalazi u ćeliji i obezbeđuje energiju za resintezu ATP (Ostojić, 2007). U reakciji koja je katalizovana enzimom kreatin kinazom (CK), jedna fosfatna grupa se transferuje sa PCr na ADP, pri čemu nastaje ATP i slobodan kreatin (Cr). Reakcija CK (Dijagram 1) predstavlja primarni izvor resinteze ATP u kratkotrajnim, visoko-intenzivnim aktivnostima, a takođe je veoma aktivna na početku svake aktivnosti bez obzira na njen intenzitet (Gastin, 2001; Grassi, 2005). Velika stopa resinteze ATP moguća je zahvaljujući prisustvu samo jedne hemijske reakcije u fosfokreatinskom sistemu, odnosno jednog enzima koji ovu reakciju katalizuje. Na taj način se ćelijske rezerve ATP veoma efikasno održavaju u fiziološki prihvatljivom okviru. Ukupan energetski kapacitet svakog energetskog sistema obrnuto je proporcionalan njegovoj maksimalnoj stopi proizvodnje ATP, te su rezerve PCr u mišiću takođe veoma ograničene. Mišićna ćelija prosečno sadrži 4 do 6 puta veću koncentraciju PCr u odnosu na ATP, što je teoretski dovoljno za 5 do 8 sekundi trčanja maksimalnim intenzitetom (Herda i Cramer, 2017). Ukoliko se rad nastavi, energija se mora obezbediti iz drugog, sporijeg energetskog izvora, čime se intenzitet aktivnosti smanjuje. Hidroliza PCr, poput hidrolize ATP, dvosmernog je tipa i deluje prema zakonu o dejstvu masa, prema kojem pravac hemijske reakcije zavisi od koncentracije reaktanata i produkata reakcije u ćeliji. Odvajanje fosfatne grupe od ATP dovodi do porasta koncentracije ADP, što posledično povećava stopu reakcije CK, kako bi se rezerve ATP obnovile. Uključivanje drugih energetskih sistema kao primarnih izvora energije ili prestanak aktivnosti, dovodi do povećanja koncentracije ATP, čime se usporava ili menja smer reakcije CK (McArdle, Katch i Katch, 2007). U uslovima visokih energetskih potreba, u reakciji adenilat kinaze (AK) iz dva molekula ADP, transferom jedne fosfatne grupe, nastaju ATP i AMP. Pored resinteze ATP, reakcija AK i posledični porast koncentracije AMP podstiču aktivaciju drugih metaboličkih puteva kojima se obezbeđuje energija, kao što su anaerobna glikoliza i oksidacija masti (Hardie, 2004).



Dijagram 1. Reakcija kreatin kinaze (CK)

2.2. VISOKO-ENERGETSKI FOSFATI

Transfer hemijske energije u ljudskom organizmu odvija se zahvaljujući potencijalu za prenos određenih atomskih grupa sa jednog jedinjenja na drugo, pri čemu se za jedinjenja koja poseduju grupe sa visokim potencijalom prenosa često kaže da poseduju „veze bogate energijom“ (Kovačević, 2006). Pored ATP, koji predstavlja najvažnije visoko-energetsko fosfatno jedinjenje, od izuzetnog značaja za ćelijski metabolizam jeste fosfokreatin (PCr) i njegova guanidin-fosfatna hemijska veza.

2.2.1. Kreatin u ljudskom organizmu

Kreatin (α -metil guanidinosirćetna kiselina, hemijske formule: $\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$) je derivat amino kiselina koji se u ljudskom organizmu sintetiše prirodnim putem i predstavlja sastavni deo uobičajene ljudske ishrane. Za njegovo otkriće zaslužan je francuski hemičar Ševrel (fra. *Chevreul*) još davne 1832. godine. Oko 95% ukupne količine kreatina u organizmu uskladišteno je u skeletnim mišićima, dok se manja količina nalazi u mozgu, srcu i testisima (Buford et al., 2007). Približno dve trećine mišićnog kreatina nalazi se u obliku fosfokreatina (PCr), dok je ostatak u obliku slobodnog kreatina (Cr) (Balsom, Soderlund & Ekblom, 1994). Normalna koncentracija ukupnog kreatina (PCr+Cr) u mišićima iznosi oko 120 mmol/kg suve mišićne

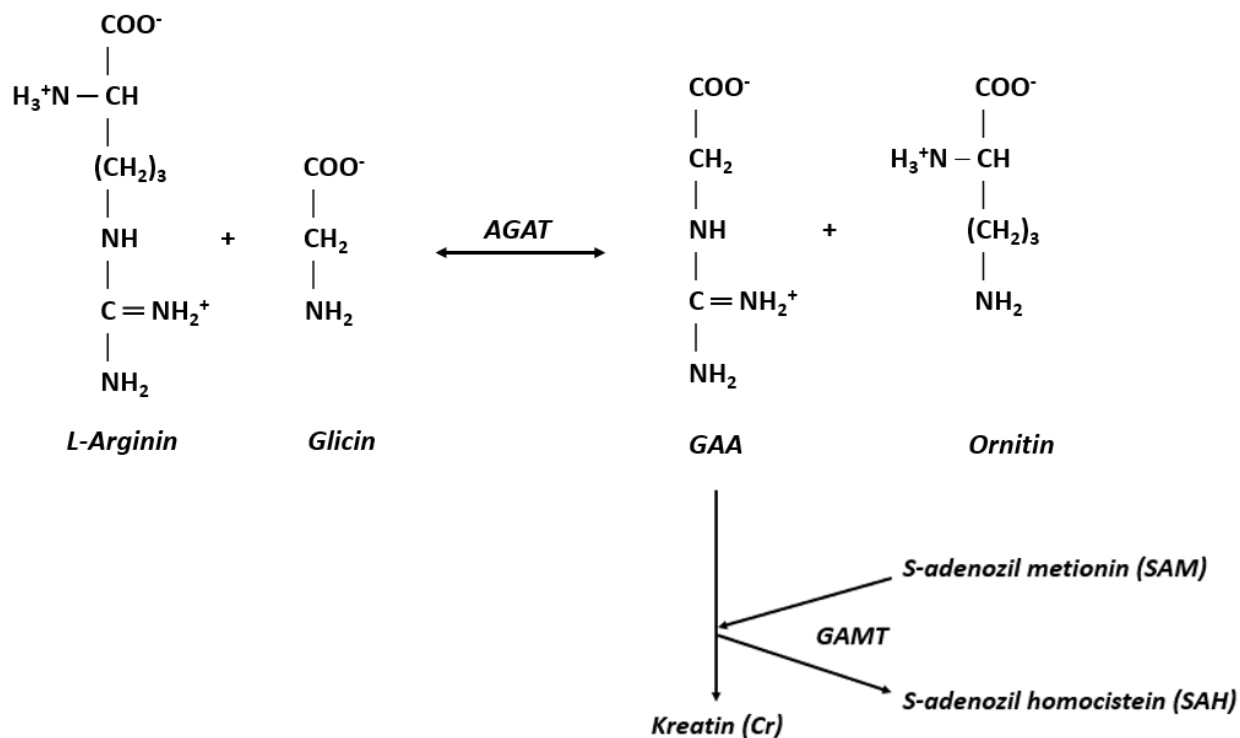
mase (Hultman et al., 1996), dok gornja granica iznosi približno 160 mmol/kg. U ljudskom organizmu, kreatin se sintetizuje iz aminokiselina arginina, glicina i metionina, primarno u jetri, a potom i u bubrezima i pankreasu (Greenhaff, 1997), pri čemu stopa sinteze iznosi 1-2 g na dnevnom nivou (Walker, 1979). Dnevno, oko 2 g mišićnog kreatina se razgrađuje na kreatinin i izlučuje putem urina iz organizma, te je ishranom i endogenom sintezom neophodno nadoknaditi 1 do 3 g kreatina na dnevnom nivou kako bi se održale normalne vrednosti koncentracije kreatina u mišiću. Potrebe za dnevnim unosom mogu biti i veće, posebno kod sportista veće telesne mase, uključenih u intenzivne fizičke aktivnosti, kao i kod različitih patoloških stanja povezanih sa ćelijskom bioenergetikom.

2.2.2. Kreatin u ljudskoj ishrani

Približno polovina dnevnih potreba za kreatinom ostvaruje se ishranom, dok se ostatak obezbeđuje endogenom sintezom. Glavni izvori su namirnice životinjskog porekla, odnosno mišićno tkivo životinja, kao i riba. Jedan kilogram sveže ribe i crvenog mesa sadrži 3 do 5 g kreatina (Balsom, 1994), međutim termička obrada hrane može negativno uticati na koncentraciju usled razlaganja kreatina na kreatinin. Ishrana siromašna namirnicama životinjskog porekla dovodi do veoma niskog unosa kreatina ili njegovog potpunog izostanka iz ishrane (Solis et al., 2014). Posledično, vegetarijanci ili vegani imaju prosečno 20-30% manje vrednosti koncentracije mišićnog kreatina (90-110 mmol/kg suve mišićne mase) (Hultman et al., 1996). Takođe, novorođenčad koja se hrane majčinim mlekom imaju veoma nizak unos kreatina (Edison et al., 2013). Rezerve kreatina kod ovih grupa zavise isključivo od endogene sinteze koja obezbeđuje 90-100% dnevnih potreba. Kako rezerve kreatina u ćeliji nisu potpuno zasićene uobičajenom ishranom i vegetarijanskom ili veganskom dijetom, Wallimann i sar. (2011) predlažu unos 2-4 g kreatina dnevno u cilju ostvarivanja generalnih zdravstvenih benefita. Usled značajne uloge u normalnom rastu, razvoju i opštem zdravlju, a imajući u vidu da endogena sinteza ne obezbeđuje količine kojima bi se u potpunosti ostvarili ovi benefiti, jedan broj autora nominuje kreatin kao uslovno esencijalni nutrijent u ljudskoj ishrani (Ostojić & Forbes, 2022). Kako je konvencionalnom ishranom izuzetno teško uneti 3 do 4 g kreatina na dnevnom nivou, komercijalni dodaci ishrani kojima bi se uticalo na metabolizam kreatina mogu predstavljati efikasno i ekonomično rešenje kod opšte i kliničke populacije.

2.2.3. Endogena sinteza kreatina

Sinteza kreatina u ljudskom organizmu se odvija u dva koraka (Dijagram 2). Prvi korak podrazumeva kondenzaciju molekula arginina i glicina, koja je regulisana enzimom arginin:glicin amidinotransferazom (AGAT). Amidinska grupa arginina se, u dvosmernoj reakciji, transferuje na molekul glicina, pri čemu nastaju guanidinosirćetna kiselina ili guanidinoacetat (GAA) i ornitin. Drugi korak predstavlja nereverzibilni transfer metil grupe sa S-adenozilmetionina (SAM) na GAA, čime se dobija kreatin i S-adenozilhomocistein u reakciji koju katalizuje enzim guanidinoacetat metiltransferaza (GAMT). Najveća aktivnost AGAT je prisutna u bubrezima i pankreasu (Guthmiller et al., 1994), dok je aktivnost GAMT najveća u jetri, te u manjoj meri u mozgu i testisima. Poznato je da endogena sinteza kreatina predstavlja proces u koji je uključeno više organa, te se u najvećoj meri odvija u jetri, gde od GAA sintetisane u bubrezima nastaje kreatin (Edison et al., 2007). Pored toga, moždano tkivo poseduje sposobnost autonomne sinteze kreatina, usled slabe propustljivosti kreatina kroz krvno-moždanu barijeru (Andres et al., 2008). Endogena sinteza kreatina zavisi od više faktora. Aktivnost AGAT ushodno je regulisana prisustvom hormona rasta i smanjenom koncentracijom kreatina u plazmi, dok povećan unos kreatina i nedovoljna raspoloživost supstrata, primarno arginina, može uticati na smanjanje aktivnosti AGAT, i posledično smanjene sinteze GAA (Derave et al., 2004). Sa druge strane, aktivnost GAMT primarno zavisi od fiziološke koncentracije GAA, te prvi korak u sintezi, odnosno reakcija AGAT, determiniše stopu sinteze kreatina i potencijalno predstavlja limitirajući faktor u procesu endogene proizvodnje kreatina (Brosnan & Brosnan, 2016).



Dijagram 2. Endogena sinteza kreatina (Cr) (Reakcije AGAT i GAMT)

2.2.4. Apsorpcija, transport i ekskrecija kreatina

Kreatin iz hrane ima veoma visok stepen apsorpcije u crevima, uprkos izuzetno kiseloj sredini u gastrointestinalnom traktu i prisustvu intestinalnih bakterija (Clark, 1996). Istraživanja ukazuju da je konverzija kreatina u kreatinin u gastrointestinalnom traktu minimalna, te da je apsorpcija u krvotok skoro 100% (Deldicque et al. 2008; Jager et al., 2011). Po ulasku u krvotok, kreatin se transportuje do različitih telesnih tkiva kao što su srce, glatki mišići, mozak i testisi, pri čemu se najveći deo skladišti u skeletnim mišićima. Tkiva sa najvećom koncentracijom kreatina, kao što su skeletni mišići i srce, imaju ograničenu sposobnost njegove potpune sinteze u svojim ćelijama (Clark, 1998), te koncentracija u ovim tkivima zavisi od sposobnosti ćelija da preuzimaju kreatin iz krvotoka. Transport kreatina iz krvotoka u ćeliju moguć je zahvaljujući membranskom, natrijum-zavisnom transporteru (SLC6A8) koji je visoko specifičan za kreatin, te ne može transportovati fosfokreatin ili kreatinin. Razlog visoke specifičnosti leži u karboksilnoj i amidinskoj grupi kreatina, koje nisu udaljene više od dva do tri atoma ugljenika. Transport

kreatina dovodi do promene električnog potencijala ćelije, jer za svaki molekul kreatina u ćeliju ulazi najmanje dva jona natrijuma (Na^+) i jedan jon kalijuma (K^+). Čitav proces se odvija nasuprot gradijentu koncentracije; normalne vrednosti koncentracije kreatina iznose 50-100 μM u plazmi, odnosno 5-10 mM u mišićnoj ćeliji. Ovo predstavlja primer sekundarnog aktivnog transporta, kojeg pokreće gradijent natrijuma uspostavljen pomoću aktivnosti natrijum-kalijum ATPaze ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPaze}$) (Dai et al., 1999). Smatra se da prisustvo insulina može dodatno unaprediti transport kreatina u ćeliju kroz povećanu aktivnost $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPaze}$ (Snow & Murphy, 2001). Istraživanje Green-a i saradnika (1996) pokazalo je da unos velike količine ugljenih hidrata (93 g) 30 minuta nakon unosa kreatina dovodi do povećanog transporta kreatina u ćeliju, u odnosu na grupu koja je unosila samo kreatin. Poznato je da postoji inverzna povezanost između transporta kreatina u ćeliju i unutarćelijske koncentracije kreatina: povećana ekstracelularna koncentracija kreatina dovodi do povećanog transporta. Koncentracija kreatina u ćeliji je relativno stabilna. Kada kreatin uđe u ćeliju dolazi do brze fosforilacije posredstvom kreatin kinaze (CK), pri čemu se veći deo deponuje u obliku fosfokreatina. U svom fosforilisanom obliku (PCr) kreatin ne može da se transportuje kroz membranu zbog svoje polarizovane prirode koja sprečava povratak u cirkulaciju, te ostaje „zarobljen“ u ćeliji (Greenhaff, 1997).

Kreatin i fosfokreatin se u tkivima spontano razlažu na kreatinin i izlučuju urinom uz vreme poluraspada oko 40 dana, pri fiziološkim vrednostima pH (Mccall & Persky, 2007). Na ovaj način gubi se oko 1.6% ukupnih rezervi kreatina na dnevnom nivou (Balsom et al., 1995). Kako se više od 90% kreatina nalazi uskladišteno u mišićima, gubitak kreatina u obliku kreatinina varira zavisno od starosti i pola. Najveća ekskrecija kreatinina prisutna je kod muškaraca starosti 18 do 29 godina i linearno opada sa godinama. Prosečne vrednosti ekskrecije kod žena iznose oko 80% vrednosti kod muškaraca, i prate linearnost opadanja tokom života (Cockcroft & Gault, 1976). Podaci o ekskreciji kreatinina omogućavaju razumevanje dnevnih potreba za kreatinom koje je neophodno nadoknaditi kroz ishranu i endogenom sintezom.

2.2.5. Metabolička uloga kreatina

Kreatin ima esencijalnu ulogu u ćelijskom energetsom metabolizmu, primarno u mišićima i mozgu. Dvosmernom reakcijom CK, PCr se koristi za obnavljanje rezervi ATP ili se energija oslobođena u ćeliji kondenzuje i čuva u obliku PCr. Rezerve energije uskladištene u ovom obliku mogu biti i do 10 puta veće, u odnosu na količinu energije uskladištenu u obliku ATP (Wallimann, Tokarska-Schlattner & Schlattner, 2011). Reakcija CK kontinuirano stabilizuje ćelijsku koncentraciju ATP na račun PCr i održava odnos između ATP i ADP na veoma visokom nivou, više od 100:1 u korist ATP. Zahvaljujući ovom odnosu obezbeđuje se velika stopa promene slobodne energije (ΔG) hidrolizom ATP. Tokom aktivnosti maksimalnog intenziteta, razgradnja PCr omogućava da se sva energija uskladištena u obliku ATP obnovi i iznova iskoristi nekoliko desetina puta. Unutar ćelije, reakcija može istovremeno teći u različitom smeru. Na mestima gde je neophodno oslobađanje energije za različite ćelijske procese, kao što je mišićna kontrakcija, reakcija teče u smeru razlaganja PCr. S druge strane, na mestima gde se energija generiše, kao što je slučaj u mitohondriji, reakcija teče u smeru sinteze PCr (Walker, 1979).

U ljudskom organizmu CK se nalazi u različitim izoformnim oblicima, koji funkcionišu istovremeno kako bi se obezbedila brza konverzija supstrata u oba smera reakcije. CK se sastoji iz dve subjedinice, mišićne (M) i moždane (B), pomoću kojih se mogu formirati tri izoforma: (1) MM-CK, (2) MB-CK i (3) BB-CK, lokalizovanih u različitim tkivima. MM-CK nalazi se gotovo isključivo u skeletnim mišićima; MM-, MB- i BB-CK u srcu i BB-CK u mozgu i drugim organima. Pored toga, četvrti CK izoform (4) mtCK nalazi se na spoljašnjoj strani unutrašnje membrane mitohondrije (Clark, 1997). Ovi izoformi su različito lokalizovani unutar ćelije, što predstavlja ključnu ulogu u funkcionisanju mreže CK i CK/PCr sistema u celini (Wallimann, Tokarska-Schlattner & Schlattner, 2011). MM-CK ili miofibrilarna CK vezana je za miofibrile i prostire se celom dužinom filamenata, te katalizuje sintezu ATP iz ADP na mestu gde je neophodna energija za mišićnu kontrakciju. Sa druge strane, mtCK ili mitohondrijalna CK funkcionalno je povezana sa aerobnom glikolizom i oksidativnom fosforilacijom, pri čemu katalizuje fosforilaciju Cr na mestu aerobne proizvodnje ATP (Ma et al., 1996). Ova dva procesa dešavaju se istovremeno, funkcionalno su uparena i zajednički čine kreatinski energetski transportni mehanizam, koji spaja mesta proizvodnje ATP u mitohondriji sa unutarćelijskim

mestima razgradnje ATP (Wallimann et al., 2007). Nakon transporta Cr u ćeliju pomoću CRT, pridoli molekul može da se fosforilizuje posredstvom odgovarajućeg izoforma CK u citosolu ili transportuje u mitohondriju. U mitohondriji, ATP sintetisan oksidativnim putevima ulazi u međumembranski prostor pomoću adenin nukleotid translokatora (ANT), gde se posredstvom mtCK koristi za resintezu PCr. Novonastali ADP se potom transportuje nazad u mitohondrijalni matriks u zamenu za novi molekul ATP koji ponovo dolazi u međumembranski prostor. Sintetisani PCr se transportuje u citoplazmu i difunduje do miofibrila, sarkoplazmatskog retikuluma, ćelijske membrane i drugih mesta u ćeliji na kojima se zahteva energija (Schlattner et al., 2006).

Kreatin je uključen u kontrolu metaboličkih puteva na nekoliko načina. Zahvaljujući reakciji: $\text{PCr}^{2-} + \text{ADP}^{3-} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{ATP}^{4+} + \text{Cr}$, kreatin ima pufersku ulogu u ćeliji. Smatra se da primarna uloga kreatina nije samo da resintetiše ATP, već da smanjuje koncentraciju ADP u citoplazmi. Usled velike stope hidrolize ATP, dolazi do akumulacije ADP, Pi i H^+ , čime se narušava ćelijska ravnoteža (Ma et al., 1996). Velika koncentracija ADP stimuliše reakciju miokinaze pri čemu nastaje AMP, čijom se deaminacijom smanjuju rezerve adenin nukleotida u ćeliji. Nagomilavanje krajnjih produkata hidrolize ATP ima inhibitorski efekat na sve ćelijske izoforme ATPaze, te posledično usporava i mehanizam mišićne kontrakcije. Reakcija kreatin kinaze sprečava naglo povećanje koncentracije ADP i AMP u ćeliji veoma brзом refosforilacijom ADP, čime se sprečava produkcija AMP i gubitak adenin nukleotida u ćeliji (van Deursen et al., 1993). Pored toga, sintezom ATP iz PCr vezuju se slobodni joni vodonika, te utiče na očuvanje kiselosti sredine.

Kreatin ima značajnu ulogu u regulaciji oksidativnog stresa i predstavlja direktni i indirektni antioksidans. Jedan od najvećih izvora reaktivnih kiseoničkih vrsta u ćeliji (eng. *reactive oxygen species*, skr. ROS) jeste elektron transportni lanac mitohondrija (ETC), u kojem ROS nastaju u reakcijama oksidacije i redukcije (redoks reakcije) (Clarke et al., 2021). ROS su povezane sa apoptozom, poremećajima u ćelijskoj energetici i različitim vaskularnim i drugim patološkim stanjima. Adekvatna raspoloživost kreatina i funkcionalnost mtCK imaju značajnu ulogu u održavanju ADP/ATP odnosa, koji se smatra najvažnijim faktorom u smanjenju proizvodnje ROS u mitohondriji (Meyer et al., 2006). U ovom procesu kreatin ima ulogu indirektnog antioksidansa. Takođe, Sestili i saradnici (2006) su potvrdili sposobnost kreatina da uklanja ROS

iz citoplazme u kontrolisanim, acelularnim uslovima, delujući pritom kao direktan ćelijski antioksidans.

2.2.6. Deficit kreatina

Sindromi deficita kreatina (eng. *creatine deficiency syndromes*, skr. CDS) podrazumevaju grupu urođenih metaboličkih poremećaja sinteze i transporta kreatina u ljudskom organizmu. Mozak predstavlja organ koji je u najvećoj meri zahvaćen negativnim efektima ovih stanja, što ukazuje na značaj brze resinteze ATP u održavanju svih funkcija nervnih ćelija. Kod ovih osoba prisutno je značajno smanjenje koncentracije ili potpuno odsustvo kreatina u nervnom tkivu. CDS obuhvataju tri patološka stanja: (1) deficit arginin:glicin amidinotransveraze (AGAT), (2) deficit guanidinoacetat metiltransveraze (GAMT), i (3) deficit kreatinskog transportera (CRT). Ova tri patološka stanja zajedno mogu predstavljati najčešće metaboličke poremećaje sa primarno neurološkim fenotipom, sa prevalencom od 0.3 do 2.7% svih mentalnih retardacija (Arias et al., 2007). Pacijenti sa CDS imaju sporiji opšti razvoj, te mogu ispoljavajati mentalnu retardaciju, poremećaj govora i motoričkih funkcija, epileptične napade, autizam i niz drugih patoloških stanja (Schulze, 2003). Razumevanje metabolizma kreatina u mozgu ima ključnu ulogu u razumevanju i tretiranju ovih stanja.

Mozak čini svega oko 2% ukupne telesne mase, a u ukupnom utrošku energije učestvuje sa udelom od oko 20% (Shulman et al., 2004). Transport periferno sintetisanog kreatina iz krvi u mozak je ograničen usled slabe propustljivosti krvno-moždane barijere, te se mozak u većoj meri oslanja na sopstvenu sposobnost sinteze kreatina, što potvrđuje prisustvo oba enzima, AGAT i GAMT, u moždanim strukturama (Braissant et al., 2001). Ipak, najveći broj nervnih ćelija ne vrši ko-ekspresiju AGAT i GAMT, već samo jednog od enzima, te ne mogu pojedinačno u potpunosti sintetisati kreatin. Ovo znači da moždane strukture moraju transportovati GAA iz ćelija gde se vrši njegova sinteza, do ćelija u kojima se može izvršiti metilacija i sintetisati kreatin, pomoću kreatinskog transportera SLC6A8 (Braissant et al., 2010), analogno transportu GAA između perifernih tkiva. Stoga, nemogućnost sinteze kreatina u mozgu ili njegovog transporta do svih moždanih struktura predstavlja uzrok različitih neuroloških i neuromišićnih oboljenja. Svako od tri navedena patoloških stanja ispoljava karakterističan biohemijski profil. Deficit GAMT karakterišu povećane koncentracije GAA i smanjene koncentracije Cr u

biološkim tečnostima i tkivima, što sugeriše nesposobnost metilacije GAA nakon njegove sinteze i transporta. Sa druge strane, kod deficita AGAT primetne su niske vrednosti GAA i Cr, sugerišući tako na nemogućnost sinteze GAA iz arginina i glicina. Kod deficita CRT, koncentracije GAA su u okviru fizioloških vrednosti, dok su koncentracije Cr u plazmi i urinu povišene, što ukazuje na nesposobnost transporta kreatina do ciljnih tkiva nakon njegove sinteze (Fons & Campistol, 2016).

Tretman kreatinom može doneti benefite kod AGAT i GAMT deficita. Povećan oralni unos kreatina u velikim dozama može imati pozitivne efekte na neurološki status i razvoj centralnog nervnog sistema, pri čemu se ostvaruje delimično obnavljanje rezervi Cr u nervnom tkivu (Stöckler-Ipsiroglu et al., 2001). Ukoliko se ovi deficiti uoče u najranijem detinjstvu, presimptomatskim tretiranjem moguće je sprečiti većinu negativnih efekata na razvoj nervnog sistema (Schulze & Battini, 2007). Sa druge strane, tretiranje deficita transportera SLC6A8 povećanim oralnim unosom kreatina ne dovodi do pozitivnih efekata na rezerve Cr i kliničku sliku pacijenata (Póo-Argüelles et al., 2006). Stoga, alternativna sredstva koja mogu efikasnije uticati na povećanje ćelijskih rezervi kreatina i/ili koristiti druge mehanizme transporta, mogu predstavljati potencijalno adekvatniji tretman u tretiranju CDS, posebno deficita CRT, kao i u svim stanjima narušene ćelijske bioenergetike.

2.3. SUPLEMENTACIJA KREATINOM

2.3.1. Doziranje

U istraživanjima, kao i u praktičnoj primeni, postoji nekoliko strategija oralnog unosa kreatina. Harris i sar. (1992) su prvobitno predložili inicijalnu fazu povećanog unosa kreatina (eng. *loading phase*), koja podrazumeva unos 20 g CrM dnevno, u 4 razdvojene doze po 5 g tokom prvih 5 dana, odnosno oko 0,3 g/kg telesne mase dnevno. Predloženi protokol je potom prihvaćen u najvećem broju narednih istraživanja. Inicijalna faza praćena je fazom održavanja u dozama 2 do 5 g, odnosno 0,03 g/kg telesne mase dnevno (Hultman et al., 1996), koja je dovoljna za očuvanje povećanih vrednosti Cr i PCr u ćeliji. Inicijalno većim dozama obezbeđuje se brza saturacija ćelijskih rezervi tokom prvih 2 do 3 dana, posebno ukoliko se CrM unosi sa ugljenim hidratima (oko 100 g) i/ili proteinom, koji utiču na povećano lučenje insulina (Green et al., 1996). Takođe, suplementacija kreatinom u kombinaciji sa treningom snage dovodi do većeg porasta koncentracija mišićnog Cr i PCr u odnosu na suplementaciju bez trenažnog stimulusa (Harris et al., 1992). Law i sar. (2009) su uočili pozitivne efekte na fizičke performanse nakon 5 dana suplementacije kreatinom u kombinaciji sa treningom snage, dok benefiti nisu primećeni nakon 2 dana povećanog oralnog unosa, što sugeriše da je neophodno više od 2 dana kako bi se uočili prvi ergogeni efekti. Hultman i sar. (1996) predložili su alternativnu strategiju koja podrazumeva unos 3 g CrM jednom dnevno tokom 28 dana. Manje doze obezbeđuju jednako efikasno, gradativno povećanje mišićnih rezervi kreatina tokom dužeg vremenskog perioda, te se smatra da inicijalna faza povećanog unosa nije neophodna kako bi se ostvarili svi benefiti suplementacije kreatinom. U smislu opšteg zdravlja, smatra se da većina opšte populacije može ostvariti zdravstvene benefite unosom 3 g CrM dnevno tokom dužeg vremenskog perioda, te da je ova strategija posebno efikasna kod osoba trećeg životnog doba (Wallimann et al., 2011). Nakon prestanka suplementacije kreatinom, rezerve kreatina se vraćaju na početne vrednosti tokom perioda od 4 do 6 nedelja (Greenhaf et al., 1993; Hultman et al., 1996), te ne postoje dokazi o dugoročnoj supresiji endogene sinteze kreatina nakon povećanog oralnog unosa (Kreider et al., 2003).

2.3.2. Kreatin i fizičke performanse

Najveći udeo ergogenih efekata suplementacije kreatinom pripisuje se povećanju mišićnih rezervi kreatina (Kreider et al., 2017), pri čemu veličina efekta u velikoj meri zavisi od inicijalnih rezervi. Kod osoba sa niskim dijetetskim unosom kreatina, očekivano povećanje ćelijske koncentracije Cr i PCr iznosi 20-40% (Harris et al., 1992; Hultman et al., 1996), dok kod osoba sa relativno visokim inicijalnim rezervama kreatina ovo povećanje iznosi 10-20% (Bufford et al., 2007). Oko 70% istraživanja koja se bave efektima suplementacije kreatinom potvrđuje ergogene efekte u nekom od tipova fizičke aktivnosti, pri čemu su očekivana poboljšanja od 5 do 15% u anaerobnom kapacitetu, sposobnosti ponavljajućih sprinteva i različitim tipovima mišićne snage, dok se u pojedinačnim epizodama trčanja maksimalnim intenzitetom očekuju poboljšanja od 1 do 5% (Kreider, 2003; Buford et al., 2007). Meta analiza Branch-a i sar. (2003) koja je obuhvatila 96 studija koje se bave efektima CrM ukazala je na značajne ergogene efekte kreatina u visoko-intenzivnim aktivnostima trajanja do 30 sekundi, pri čemu efekti suplementacije opadaju sa dužinom aktivnosti i potpuno se gube pri kontinuiranim aktivnostima dužim od 150 sekundi. Veliki broj istraživanja bavio se efektima kreatina na trening snage. Rawson i Volek (2003) su sumirali zaključke 22 istraživanja i uočili prosečno poboljšanje relativne mišićne snage od 8% pri intenzitetu od 1, 3 i 10 RM, kao i 14% u aktivnostima mišićne izdržljivosti, kod ispitanika koji su unosili kreatin i učestvovali u treningu snage, u odnosu na trening snage bez suplementacije kreatinom. Meta analiza koja je obuhvatila 60 randomiziranih, dvostruko-slepih, placebo-kontrolisanih studija utvrdila je ukupnu veličinu efekta od 0,336 na povećanje snage pri vežbi zadnji čučanj, odnosno 0,297 pri vežbi nožni potisak (Lanhers et al., 2015). Ista grupa autora sprovela je meta analizu koja se bavila efektima kreatina na snagu gornjih ekstremiteta. 53 studije su zadovoljile kriterijume, a izračunata veličina efekta na povećanje snage iznosila je 0,265 za vežbu potisak sa klupe, odnosno 0,677 za potisak na trenažeru (Lanhers et al., 2016). Obe studije utvrdile su generalne pozitivne efekte suplementacije kreatinom na snagu gornjih i donjih ekstremiteta, bez obzira na eksperimentalnu populaciju, trajanje i dinamiku tretmana, kao i trenažnu istoriju ispitanika.

Pored akutnih efekata suplementacije kreatinom na vežbanje visokim intenzitetom kratkog trajanja, kreatin ispoljava snažne dugoročne benefite usled povećanja trenažnog intenziteta i obima rada na povećanom intenzitetu tokom dužeg vremenskog perioda, što dovodi do većih

trenažnih adaptacija (Wax et al., 2021). Studije koje obuhvataju eksperimentalne tretmane u trajanju od 4 do 12 nedelja pokazale su pozitivne efekte kreatina na maksimalnu, repetitivnu i eksplozivnu snagu i telesnu kompoziciju kod profesionalnih sportista i utreniranih i neutreniranih rekreativaca (Kelly & Jenkins, 1998; Peeters et al., 1999; Antonio & Ciccone, 2013). Ipak, u istraživanju u kojem je trenažni protokol strogo kontrolisan, te ispitanicima nije dozvoljeno povećanje intenziteta i obima rada, suplementacija kreatinom nije pokazala veće benefite u odnosu na placebo grupu, što ukazuje na to da su dugoročni ergogeni efekti kreatina u velikoj meri posledica povećanog intenziteta i obima rada tokom trajanja trenažnog programa (Syrotuik et al., 2000).

Pri isprekidanim, visoko-intenzivnim aktivnostima, veća stopa resinteze ATP i veća raspoloživost PCr obezbeđuju brži oporavak tokom kratkih perioda mirovanja ili vežbanja nižim intenzitetom, što omogućava uspešnije izvođenje narednih intenzivnih epizoda i odlaže pojavu zamora (Kreider et al., 2017). Pored toga, unos ugljenih hidrata (UH) zajedno sa kreatinom može dovesti do značajnijeg povećanja rezervi šećera u mišiću, u odnosu na unos UH bez kreatina (Nelson, 2001). Pojedine studije ističu potencijalne efekte kreatina na smanjenje mišićnog oštećenja nakon intenzivnog vežbanja, usled smanjenja koncentracije CK i inflamatornih markera, i povećanja sposobnosti ispoljavanja mišićne sile u oporavku (Volek et al., 2004; Cooke et al., 2006), što ukazuje na sposobnost kreatina da ubrzava oporavak između intenzivnih aktivnosti. Kreatin predstavlja osmotski aktivnu supstancu, te povećanje ćelijskih koncentracija Cr i PCr dovodi do zadržavanja tečnosti u ćeliji. Veliki broj studija navodi povećanje telesne mase za 1 do 2 kg tokom prve faze inicijalno povećanog unosa kreatina (Kreider et al., 2017), što može predstavljati ergolitički efekat u aktivnostima gde sportista konstantno savladava sopstvenu telesnu masu. Ipak, sposobnost kreatina da poveća stepen hidriranosti organizma ispoljava benefite pri vežbanju u toplom i vlažnom ambijentu, te dokazano smanjuje rizik od patoloških stanja uzrokovanih vežbanjem na visokim temperaturama (Volek et al., 2001; Kilduff et al., 2004; Watson et al., 2006). Konačno, pojedine studije koje su se bavile efektima kreatina u procesu rehabilitacije od povreda ukazuju na smanjenje atrofije mišića tokom imobilizacije donjih ekstremiteta, te brže povećanje vrednosti snage tokom perioda oporavka (Hespel et al., 2001; Eijnde et al., 2001).

2.3.3. Kreatin, zdravlje i patološka stanja

Zahvljajući ulozi kreatina u ćelijskom metabolizmu, nakon inicijalnog fokusa na fizičke performanse, veliki broj istraživanja poslednjih godina usmeren je ka potencijalnim terapeutskim benefitima suplementacije kreatinom kod različitih kliničkih populacija (Kreider et al., 2017). Istraživanja koja su se bavila CDS pokazala su da tretiranje ovih patoloških stanja relativno velikim dozama CrM (21-56 g/dan) dovodi do povećanja koncentracije Cr u mozgu i poboljšanja kliničke slike pacijenata sa AGAT i GAMT deficitom, dok su efekti značajno manji ili potpuno odsutni kod osoba sa CRT deficitom (Stockler-Ipsiroglu & van Karnebeek, 2014). Pored toga, uočavanje AGAT i GAMT deficita u najranijem detinjstvu i pravovremeno tretiranje CrM-om može dovesti do normalnog ili gotovo normalnog mentalnog i fizičkog razvoja kod dece (Battini et al., 2006; Stockler-Ipsiroglu et al., 2014). Postojeća naučna literatura ukazuje na snažne efekte suplementacije CrM u tretiranju CDS, kao i bezbednost dugoročne upotrebe velikih doza kreatina kod odraslih, dece i novorođenčadi sa ovim patološkim stanjima (Evangelidou et al., 2009). Zbog velikog značaja kreatina za bioenergetiku moždanog tkiva, suplementacija CrM-om predstavlja potencijalni tretman kod različitih neurodegenerativnih poremećaja kao što su mišićna distrofija, Hantingtonova bolest, bolesti povezane sa radom mitohondrija i druga patološka stanja (Kreider & Stout, 2021). Veliko istraživanje Bender-a i Klopstock-a (2016) koje je uključilo 1687 pacijenata pokazalo je da suplementacija kreatinom (9.5 g/dan tokom 5 godina) može usporiti atrofiju moždanog tkiva kod pacijenata sa Hantingtonovom bolešću, dok značajni benefiti nisu primećeni kod Parkinsonove i Lu Gerigove bolesti. Jedan od razloga ovakvih rezultata može biti i kasna detekcija, s obzirom da kod ljudi simptomi nisu uočljivi u ranoj fazi bolesti, te se obično ne može pristupiti ranom tretiranju. Alternativna rešenja, kojima bi se obezbedio efikasniji uticaj na bioenergetiku mozga, mogla bi ispoljiti veći potencijal u tretiranju ovih patoloških stanja.

Kreatin ispoljava i neuroprotektivne karakteristike, te preventivni unos može smanjiti oštećenje moždanog tkiva usled ishemije (Adcock et al., 2002; Zhu et al., 2004). Stoga se suplementacija kreatinom smatra relativno efikasnim preventivnim tretmanom kod pacijenata sa povećanim rizikom od moždanog udara, kao i kod sportista sa povećanim rizikom od traumatskih povreda glave i kičmene moždine. Kako je mišićno tkivo primarna meta suplementacije kreatinom, značajni benefiti su uočljivi kod pacijenata sa mišićnom distrofijom i

idiopatskom inflamatornom miopatijom, pri čemu tretman dovodi do značajnog povećanja mišićne snage i poboljšanja motoričkih funkcija (Kley & Tarnopolsky, 2013). Cr i PCr takođe imaju značajnu ulogu u bioenergetici ćelija miokarda tokom ishemičnih epizoda, te se unos PCr u vidu dodatka kardioplegičnom rastvoru koristi u tretiranju srčane ishemije i prevenciji aritmija uzrokovanih ishemijom (Balestrino et al., 2016). Stoga, suplementacija kreatinom može predstavljati potencijalni tretman i u prevenciji bolesti kod pacijenata sa povećanim rizikom od srčane ishemije i srčanog udara. Zajednički cilj u prevenciji i tretiranju ovih stanja ogleda se u potpunoj saturaciji rezervi kreatina u navedenim tkivima, te potencijalno efikasan tretman treba da obezbedi maksimalne vrednosti ćelijskih rezervi Cr/PCr.

Suplementacija kreatinom može biti od posebnog značaja za osobe trećeg doba (Kreider et al., 2017). Meta analiza koja je obuhvatila 357 osoba prosečne starosti 64 godine, koje su učestvovala u treningu snage prosečnog trajanja 12,6 nedelja, pokazala je da suplementacija kreatinom dovodi do povećanja mišićne mase, snage i funkcionalnih kapaciteta (Devries & Philips, 2014). Candow i sar. (2008) su utvrdili da unos kreatina (0.1 g/kg/dan) u kombinaciji sa proteinom (0.3 g/kg/dan) dovodi do povećanja bezmasne telesne mase, snage gornjih ekstremiteta, te smanjuje razgradnju mišića i pozitivno utiče na gustinu kostiju kod muškaraca starosti od 59 do 77 godina, dok su Chilibeck i sar. (2015) potvrdili pozitivne efekte na snagu i gustinu kostiju kod žena u menopauzi. Ova saznanja ukazuju na značaj suplementacije kreatinom u prevenciji sarkopenije i gubitka koštane mase u starosti. Pored pozitivnih efekata na telesnu kompoziciju i motoričke sposobnosti, kreatin ispoljava pozitivne efekte na kognitivne funkcije (Rae et al., 2003) i mentalni zamor (Watanabe et al., 2002), što može biti od posebnog značaja u kasnijem životnom dobu. Ipak, kako je transport kreatina u moždano tkivo ograničen, autori kontinuirano tragaju za novim formulacijama kreatina koje bi obezbedile bolji transport kreatina kroz krvno-moždano barijeru.

2.4. GUANIDINOSIRĆETNA KISELINA (GAA) KAO ALTERNATIVA KREATINU

2.4.1. GAA u ljudskom organizmu

Guanidinosirćetna kiselina (GAA; poznata i kao guanidinoacetat, glikociamin ili betaciamin; hemijske formule: $C_3H_7N_3O_2$), pripada klasi organskih jedinjenja poznatih kao alfa aminokiseline i derivati, i predstavlja direktan prirodni prekursor kreatina. U prethodno opisanom metaboličkom procesu (Dijagram 2.), GAA nastaje iz neesencijalnih aminokiselina glicina i arginina u reakciji koju katalizuje enzim L-arginin:glicin amidinotransferaza (AGAT). Transferom amidinske grupe arginina na molekul glicina sintetiše se GAA, pri čemu nastaje ornitin kao nusprodukt reakcije AGAT. Endogena sinteza GAA odigrava se primarno u bubrezima i pankreasu, međutim istraživanje Edison-a i saradnika (2007) pokazalo je da bubrezi učestvuju u ukupnoj sintezi GAA sa svega oko 20%, što ukazuje na to da se sinteza odvija i u drugim tkivima. Reakcija AGAT je povratno inhibirana koncentracijom kreatina, te ovaj metabolički korak predstavlja limitirajući faktor endogene sinteze kreatina. Sintetisana GAA, u reakciji guanidinoacetat N-metiltransferaze (GAMT), preuzima metil grupu sa S-adenozilmetionina (SAM), pri čemu nastaju kreatin i S-adenozilhomocistein (SAH). Ovaj proces odvija se primarno u jetri i nije povratno inhibiran koncentracijom kreatina (Walker, 1979). GAMT je prisutna i u ostalim tkivima, te aktivnost ovog enzima u skeletnim mišića ima potencijal da sintetiše sav kreatin neophodan mišićnom tkivu (Daly, 1985). SAH, kao završni produkt sinteze kreatina, u dvosmernoj reakciji se hidrolizuje na homocistein (Hcy) i adenzin (Walker, 1979), nakon čega Hcy može biti razgrađen do cisteina, remetilizovan u metionin ili transportovan u krvotok (Edison, 2007). Na ovaj način GAA ispunjava svoju osnovnu fiziološku ulogu kao glavni supstrat u sintezi kreatina. Kako je unos GAA ishranom gotovo zanemarljiv i iznosi svega oko 10 mg dnevno pri uobičajenoj dijeti koja uključuje namirnice životinjskog porekla (Ostojić et al., 2022), balans GAA u ljudskom organizmu definisan je odnosom između endogene sinteze sa jedne, te njene utilizacije i urinarne ekskrecije sa druge strane. Referentne vrednosti koncentracije GAA iznose $2,3 \pm 0,8 \mu\text{mol/L}$ u krvi, odnosno $31,2 \pm 21,7 \text{ mmol/mol}$ kreatinina u urinu (Curt et al., 2013). Ipak, u prisustvu patoloških stanja, ravnotežne vrednosti mogu biti značajno narušene, usled naslednih metaboličkih poremećaja, trauma, neuroloških oboljenja i bolesti bubrega (Ostojić et al, 2020).

2.4.2. Suplementacija GAA

Razumevanje mehanizama delovanja oralnog unosa kreatina uticalo je na povećanje svesti o njegovom značaju u ljudskom organizmu i predstavilo ga kao uslovno esencijalni nutrijent u ljudskoj ishrani (Ostojić & Forbes, 2022). Usled toga, potraga za efikasnijim tretmanima predstavlja predmet interesovanja velikog broja istraživača. Rane studije koje su se bavile efektima različitih aminokiselina i njihovih derivata na metabolizam kreatina predstavile su GAA kao ključnu supstancu u endogenoj sintezi kreatina. U jednom od prvih istraživanja, unos 1 g GAA doveo je do prosečnog povećanja mišićnih rezervi kreatina za 48,5%, 17-24h nakon pojedinačne doze kod pacova (Beard & Barnes, 1931), pri čemu se GAA pokazala kao superiorno sredstvo za povećanje ćelijskih koncentracija kreatina čak i u odnosu na kreatin. Ohrabrujući rezultati ubrzo su doveli do upotrebe GAA u ishrani domaćih životinja, gde je pokazano da GAA dovodi do ubrzanog rasta, boljih performansi i većeg prinosa mesa za ljudsku ishranu. Novije studije bavile su se efektima oralnog unosa GAA kod ljudi, usmerenim ka lečenju i poboljšanju simptoma u kliničkim populacijama, poboljšanju opšteg zdravlja, te kao ergogeno sredstvo u fiziologiji vežbanja.

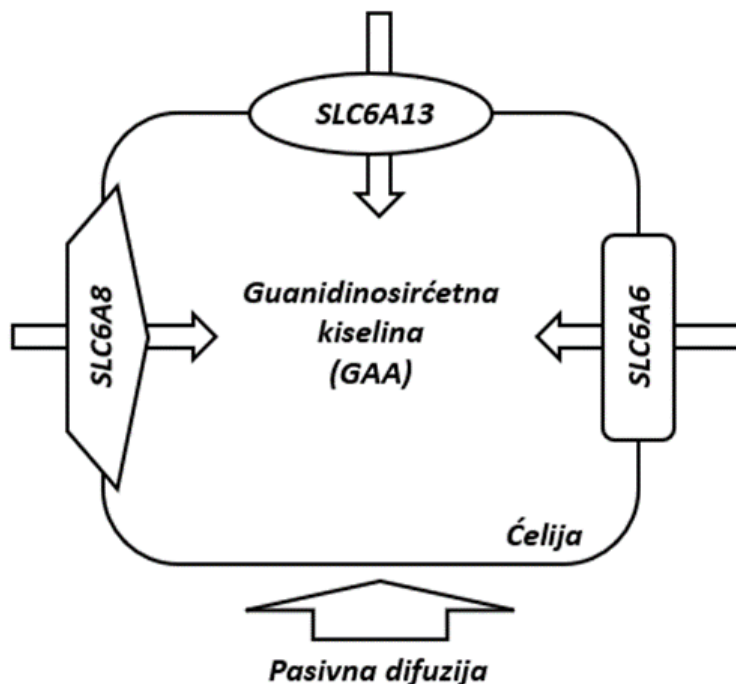
Prva istraživanja efekata oralnog unosa GAA na fizičke performanse datiraju iz 1950-ih godina i rađena su na kliničkim populacijama. Borsook i Borsook (1951a) uočili su pozitivne efekte na zamor i mišićnu snagu i izdržljivost kod srčanih bolesnika koji su unosili GAA u kombinaciji sa betainom. Na istoj populaciji, unos 5 g/dan GAA tokom 8 nedelja doveo je značajno boljih rezultata na Harvard step testu (Graybiel & Patterson, 1951). Kod pacijenata sa akutnim poliomielitisom uočeno je značajno povećanje aktivnosti motornih jedinica i mišićne snage tokom tretmana GAA u trajanju od 3 do 11 meseci, pri čemu su benefiti uočeni već tokom prve nedelje tretmana (Borsook et al., 1962). U svim navedenim studijama, povećana sinteza kreatina predstavljena je kao glavni mehanizam delovanja, te je unos GAA i betaina prihvaćen kao superioran ergogeni tretman u odnosu na kreatin. Decenijama posle, pojavilo se interesovanje za efekte oralnog unosa GAA na fizičke performanse i opšte zdravlje. U istraživanju koje je obuhvatilo 48 muškaraca i žena starosti od 20 do 25 godina, podeljenih u 4 grupe (1,2, 2,4 ili 4,8 g/dan GAA ili placebo) u trajanju od 6 nedelja, pokazani su pozitivni efekti oralnog unosa GAA na snagu stiska šake (prosečno povećanje 6 kg) i mišićnu izdržljivost gornjih ekstremiteta, merenu potiskom sa klupe (prosečno povećanje 8,9 ponavljanja), u odnosu

na placebo grupu (Ostojčić et al., 2015a). Autori nisu otkrili značajne efekte na telesnu kompoziciju, aerobnu i anaerobnu izdržljivost, te nisu uočene razlike između grupa koje su unosile različite doze GAA. Rezultati studije ukazuju na to da se najveći primitak snage može očekivati kod mišićnih grupa sa niskim inicijalnim vrednostima snage. Ovi rezultati mogu imati veliki značaj za kliničku populaciju koju karakteriše mišićna slabost, kao i zdravu populaciju sa niskim nivoom fizičke forme i početnike koji nisu ranije učestvovali u treningu sa opterećenjem. U prilog ovoj teoriji idu i rezultati Ostojčića i sar. (2015c) koji su uočili statistički značajno povećanje vrednosti izometrijske snage četvoroglavog mišića natkolenice (4,2%) kod pacijenata sa sindromom hroničnog zamora, koji su unosili 2,4 g GAA/dan tokom 4 nedelje. U istraživanju koje je uključilo 21 ženu sa sindromom hroničnog zamora, podeljenih u 2 grupe (2,4 g/dan GAA ili placebo, tokom 3 meseca) pokazani su pozitivni efekti oralnog unosa GAA na ćelijske vrednosti kreatina, mišićnu snagu i aerobne sposobnosti, u odnosu na placebo grupu. Ipak, nisu uočene značajne razlike u osećaju opšteg zamora i bola u mišićima (Ostojčić et al., 2016c). Ovi rezultati potvrđuju pretpostavku o značajnim efektima suplementacije GAA kod pojedinaca sa inicijalno niskim vrednostima kreatina uzrokovanim patološkim stanjima i ishranom siromašnom namirnicama životinjskog porekla, kao i niskim trenažnim iskustvom

2.4.3. Metabolička uloga i potencijalni mehanizmi delovanja

Transport kreatina u ljudskom organizmu vrši se pomoću kreatin-specifičnog transportera SLC6A8 (Curt et al., 2015), koji može predstavljati limitirajući faktor u povećanju ćelijskih koncentracija kreatina, te se nameće potreba za pronalaskom alternativnog rešenja. McBreaity i sar. (2015) su pokazali da oralni unos GAA može dovesti do superiornijeg povećanja mišićnih vrednosti kreatina u odnosu na suplementaciju kreatinom kod jukatanskih minijaturnih svinja, te je sličan trend primećen u moždanom i srčanom tkivu. Autori naglašavaju da je ovaj efekat još izraženiji ukoliko se koriste ekvimolarne doze CrM i GAA. Ostojčić i sar. (2016b) su potvrdili prethodne zaključke na mišićnom tkivu zdravih muškarca koji su unosili 3 g GAA tokom 4 nedelje, u poređenju sa ekvivalentnim istraživanjima efekata CrM (11% nasuprot 5%). Smatra se da povećana stopa endogene sinteze kreatina i njegova akumulacija u skeletnim mišićima objašnjavaju najveći udeo ergogenih efekata suplementacije GAA (Ostojčić et al., 2015a). Pozitivni efekti oralnog unosa GAA na koncentracije kreatina potvrđeni su i na moždanom tkivu

(Ostojić et al., 2017). U ovom istraživanju 5 zdravih muškaraca unosilo je 36 mg GAA/kg telesne mase tokom 4 nedelje, nakon čega je unos povećan na 60 mg GAA/kg tokom naredne 4 nedelje. Slično povećanje vrednosti kreatina primećeno je u cerebelumu i beloj i sivoj moždanoj masi, i iznosilo je prosečno 10,7% nakon inicijalne 4 nedelje, odnosno dodatnih 7,7% u odnosu na inicijalne vrednosti, nakon osme nedelje tretmana ($p < 0,05$). Jedan od mehanizama kojim se objašnjava veća efikasnost suplementacije GAA u odnosu na kreatin, jeste poboljšan transport GAA kroz ćelijsku membranu, čime se povećava raspoloživost supstrata unutar ćelije i posledično sintetiše veća količina Cr/PCr u tkivima. Smatra se da GAA, pored kreatinskog transportera SLC6A8, može da koristi i druge mehanizme transporta (Dijagram 3) kao što su transporter taurina (SLC6A6), transporter GABA (SLC6A13), kao i pasivnu difuziju (Tachikawa et al., 2009). Kako je aktivnost GAMT u mozgu, skeletnim mišićima, srcu i reproduktivnim organima sposobna da sintetiše sav neophodan kreatin (Curt et al., 2015), transport supstrata GAMT reakcije i unutarćelijska sinteza kreatina može predstavljati superioran mehanizam povećanja rezervi, u odnosu na transport molekula kreatina kroz ćelijske membrane u različitim tkivima. Pored toga, potencijal GAA da aktivira transportere SLC6A6 i SLC6A13 može imati i druge pozitivne efekte koji nisu direktno povezani sa sintezom kreatina. Aktivacija transportera SLC6A6 može izazvati metaboličke efekte taurina kao što je povećanje puferskog kapaciteta i održavanje ravnoteže redoks reakcija u mitohondrijalnom matriksu, dok aktivacija transportera GABA SLC6A13 inhibira $\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{ATPazu}$ i time štedi rezerve ATP u ćeliji (Ostojić, 2017). Ipak, posledice aktivacije transportera taurina i GABA posredstvom GAA nisu potpuno poznate, te su dalja istraživanja na ovom polju neophodna.



Dijagram 3. Potencijalni transportni mehanizmi GAA u ćeliju.

Naučna literatura ukazuje na još nekoliko alternativnih fizioloških uloga egzogene GAA, koje nisu vezane za izgradnju kreatina (Ostojić, 2015b). Istraživanja pokazuju da oralni unos GAA dovodi do trenutnog povećanja vrednosti insulina u krvi u trajanju od oko 20 minuta (Aynsley-Green & Alberti, 1973), pri čemu je insulinski odgovor značajno veći nego nakon unosa arginina ili kreatina (Alsever et al., 1970). Kako insulin predstavlja snažno ergogeno sredstvo, ovaj mehanizam može pozitivno uticati na fizičke performanse. Pojačan insulinski odgovor takođe dovodi do smanjenja glukoze u krvi i pozitivno utiče na stanje hiperglikemije, te nominuje oralni unos GAA kao potencijalni tretman u tretiranju diabetesa. Takođe, smatra se da GAA može imati ulogu neuromodulatora (De Deyn & Macdonald, 1990) i uticati na ekscitabilnost nervnih ćelija, mišićni tonus i različite moždane funkcije, zbog svoje strukturalne sličnosti sa γ -aminobutiričnom kiselinom (GABA). Neuromodulatorna uloga GAA može biti jedan od potencijalnih uzroka neuroloških disfunkcija (Neu et al., 2002). Ipak, ova pretpostavka polazi od patoloških stanja koje karakteriše izrazito velika koncentracija GAA u mozgu, kao što je deficit GAMT. Vezivanje GAA za GABA_A receptore može dovesti do promene u utilizaciji

GABA, što može rezultovati pojačanim lučenjem hormona rasta (GH) (Powers, 2012). Kako GH ima snažan efekat na poboljšanje fizičkih performansi (Stacy et al., 2004), njegova pojačana ekskrecija predstavlja još jedan od potencijalnih ergogenih mehanizama GAA.

Prilikom endogene sinteze GAA, neophodno je prisustvo supstrata arginina i glicina. Transferom amidinske grupe u reakciji AGAT, troše se rezerve arginina u ljudskom organizmu. Oralni unos GAA može imati značajnu ulogu u štednji supstrata, što posledično može dovesti do veće raspoloživosti arginina za druge fiziološke funkcije kao što su izgradnja proteina, ćelijska signalizacija ili ekskrecija hormona. Istraživanja na domaćim životinjama su pokazala da suplementacija GAA dovodi do ubrzanog rasta, pri čemu veća raspoloživost arginina može imati ulogu u povećanoj sintezi proteina (Michiels et al., 2012; Dilger et al., 2013), te GAA može delimično zameniti arginin u životinjskoj ishrani (Portocarero & Braun, 2021). Takođe, štednja arginina može imati uticaj na povećanu proizvodnju azot oksida (NO) (Tong & Barbul, 2004), koji predstavlja vazodilaciono sredstvo, te povećava protok krvi usled smanjenja vaskularnog otpora. Ipak, indirektni pozitivni efekti oralnog unosa GAA, uzrokovani ergogenim efektima arginina na ljudskoj populaciji zahtevaju dodatna istraživanja.

Poznato je da reakcija CK predstavlja jedinu hemijsku reakciju u kojoj Cr i PCr učestvuju kao supstrati. Međutim, GAA takođe može predstavljati direktan supstrat u reakciji CK, vršeći tako ulogu kompenzatornog visoko-energetskog fosfata (James & Morrison, 1966). Fosforilisana GAA na taj način može služiti kao zamena za PCr i obezbediti energiju za resintezu ATP, u uslovima smanjene raspoloživosti kreatina. U uslovima normalnih fizioloških vrednosti kreatina u tkivima, protok GAA kroz reakciju CK je oko 100 puta manji u odnosu na kreatin (Rowley et al., 1971), te je potencijal GAA da vrši ulogu direktnog supstrata praktično zanemarljiv. Ipak, u stanjima deficita kreatina, GAA može imati značajnu ulogu u ćelijskoj energetici. Istraživanje na miševima sa GAMT deficitom je pokazalo prisustvo fosforilizovane GAA u tkivima, sugerišući tako na značajnu ulogu GAA u reakciji CK (Lygate et al., 2013), premda njena sposobnost obnavljanja energije deluje potpuno inferiorno u odnosu na kreatin.

GAA može da ispoljava prooksidativne i antioksidativne karakteristike, pri čemu se ova dva fenomena ispoljavaju u distinktivno različitim fiziološkim stanjima. U uslovima patoloških stanja koja dovode do akumulacije velike količine u mozgu (oko 100 μ mol/L), GAA ispoljava prooksidativne karakteristike (Mori et al., 1996), dok su antioksidativne karakteristike primetne nakon oralnog unosa GAA koji dovodi do umerenog povećanja GAA u krvi (oko 5 μ mol/L).

Doniranjem elektrona sa svoje konjugovane baze, GAA stvara veoma snažan slobodni radikal – superoksid (Hiramatsu, 2003), te predstavlja direktan prooksidans. Međutim, štednja arginina i povećana sinteza kreatina nakon oralnog unosa GAA, ima indirektan antioksidativni efekat (Wang et al., 2012). Kako je akumulacija velikih količina GAA prisutna samo kod određenih patoloških stanja, smatra se da oralni unos kod osoba sa normalnim metabolizmom GAA ima neutralan ili antioksidativan ukupan efekat, posredstvom arginina i kreatina.

2.4.4. Nedostaci i rizici suplementacije GAA

Reakcija GAMT, u kojoj se sintetiše kreatin, zahteva transfer metil grupe (-CH₃) sa S-adenozilmetionina (SAM) na GAA, što hipotetički može dovesti do deplecije metil grupa u ljudskom organizmu. Prvobitna studija koja se bavila metaboličkim putevima egzogene GAA uočila je potencijalne rizike od smanjenja rezervi metil donora (Borsook & Borsook, 1951b), među kojima su metionin, holin, folna kiselina i kompleks vitamina B. Nedostatak metil donora može imati negativan uticaj na različite ćelijske funkcije, te dovesti do poremećaja u metilaciji DNK, neurotransmisiji, antioksidativnim sposobnostima ćelije i sintezi proteina (Obeid, 2013). U istraživanju Ostojića i sar. (2014) u kojem su istraživani efekti GAA na 48 zdravih muškaraca, oralni unos do 4.8 g GAA/dan nije uticao na vrednosti B vitamina u serumu. Autori su zaključili da doze korišćene u studiji ne utiču značajno na rezerve B vitamina, neophodne za metilaciju GAA, kao i remetilaciju homocisteina. U narednoj studiji u kojoj je 14 zdravih muškaraca i žena, prosečne starosti 22,3 ± 2,3 godina, unosilo 3 g GAA/dan tokom 12 nedelja nisu primećeni negativni efekti na metilaciju DNK (Ostojić et al., 2018a). Rezultati ukazuju na to da povećani zahtevi metilacije nakon oralnog unosa GAA, nemaju negativan uticaj na ostale metaboličke procese u kojima se zahteva transfer metil grupe, usled potencijalnog smanjenja ukupnih rezervi metil donora u organizmu.

Kao nusprodukt reakcije GAMT nastaje S-adenozilhomocistein (SAH), čijom hidrolizom nastaje homocistein u reakciji koju katalizuje enzim adenzilhomocisteinaza. Stanje u kojem koncentracija homocisteina u serumu prevazilazi gornju granicu fiziološkog raspona vrednosti (>15,0 μmol/L) naziva se hiperhomocisteinemia i smatra se nezavisnim rizikofaktorom kod različitih metaboličkih oboljenja (Ganguly & Alam, 2015), te neželjenim efektom oralnog unosa GAA. Oralni unos 2,4 g GAA/dan tokom 6 nedelja je doveo do značajnog povećanja vrednosti

homocisteina u serumu kod 58% zdravih muškaraca i žena (Ostojić et al., 2013a). U istraživanju u kojem su ispitanici bili podeljeni u tri eksperimentalne grupe (unos 1,2 g, 2,4 g i 4,8 g GAA/dan) primećene su razlike u koncentraciji homocisteina između grupa nakon 6 nedelja oralnog unosa GAA. Prosečna povećanja su iznosila 1,4 $\mu\text{mol/L}$, 2,6 $\mu\text{mol/L}$ i 6,6 $\mu\text{mol/L}$ kod grupa sa niskom, srednjom i visokom dozom GAA, redom. Iako različit uticaj različitih doza na vrednosti tHcy nije statistički potvrđen, autori ukazuju na primetan progresivan trend povećanja vrednosti u plazmi od grupe sa niskom ka grupi sa visokom dozom GAA. I pored povećanja vrednosti od 15% u grupi sa niskom, odnosno 30% u grupi sa srednjom dozom, vrednosti tHcy svih ispitanika u ove dve grupe bile su ispod klinički značajnih vrednosti tokom čitavog trajanja tretmana. Sa druge strane, kod grupe sa visokim unosom GAA (4,8 g) primećeno je prosečno povećanje od 78%, pri čemu su 3 od 12 ispitanika zabeležila vrednosti $>15,0 \mu\text{mol/L}$ po završetku 6-nedeljnog tretmana. Rezultati ukazuju da veći oralni unos GAA dovodi do veće proizvodnje homocisteina koji potom prelazi u krvotok, te da veličina doze GAA može direktno uticati na pojavu odnosno odsustvo hiperhomocisteinemije. U studiji koja se bavila efektima oralnog unosa GAA, 20 zdravih volontera (10 muškaraca i 10 žena, starosti $22,0 \pm 2,3$ godine) unosilo je 3 g GAA/dan tokom 10 nedelja (Ostojić et al., 2018b). Prosečno povećanje vrednosti homocisteina u serumu iznosilo je 73,5%, odnosno 5,0 $\mu\text{mol/L}$, pri čemu su 4 od 20 ispitanika ispoljili kliničku homocisteinemiю nakon završetka tretmana. Takođe, rezultati su ukazali da oralni unos GAA nema uticaja na biomarkere rizika od kardiometaboličkih oboljenja i inflamatornih procesa, sugerišući da kratkoročni i srednjeročni tretman GAA ne dovodi do kardiometaboličkog opterećenja kod zdravih ljudi. Prethodno navedena istraživanja dokazuju porast vrednosti homocisteina i pojavu kliničke homocisteinemije kod značajnog broja ispitanika, te predstavljaju ovaj efekat kao glavni nedostatak oralnog tretmana GAA. Jedna od strategija prevencije homocisteinemije jeste zajednički unos GAA i sredstava koja imaju sposobnost snižavanja vrednosti tHcy. Oralni unos metil donora u vidu betain HCl, vitamina B6 i B12 i folne kiseline, zajedno sa 2,4 g GAA/dan tokom 8 nedelja doveo je do potpunog odsustva kliničke homocisteinemije kod zdravih ljudi, uz zadržavanje pozitivnih efekata na ćelijske koncentracije kreatina (Ostojić et al., 2013b). U ovom istraživanju unos iste doze GAA bez metil donora doveo je do homocisteinemije kod 55,6% ispitanika, ukazujući na to da kombinacija GAA i metil donora predstavlja efikasnu strategiju upravljanja metabolizmom kreatina uz istovremenu supresiju vrednosti tHcy.

Nekoliko studija na eksperimentalnim životinjama ukazalo je na potencijalne neurotoksične efekte egzogene GAA. Eksperimentalno indukovane visoke koncentracije GAA u mozgu pacova dovele su do smanjenja aktivnosti enzima $N^{+}K^{+}$ -ATPaze (Zugno et al., 2003) i transporta glutamata u ćelije (Zugno et al., 2007), poremećaja u antioksidativnom odbrambenom sistemu (Zugno et al., 2008) i smanjenja stope prirodne apoptoze, odnosno povećanog odumiranja ćelija koje nije uzrokovano apoptozom (Hanna-El-Daher et al., 2015). Autori studija navode ove patomehanizme kao potencijalne uzroke neuroloških poremećaja kod pacijenata sa deficitom GAMT, kojeg karakteriše akumulacija velike količine GAA u mozgu. Pored toga, kako GABA predstavlja glavni inhibitorni neurotransmiter u ljudskom mozgu i perifernim tkivima, interakcija GAA sa $GABA_A$ receptorima takođe može predstavljati mehanizam kojim se objašnjava neurološka disfunkcija kod pacijenata sa GAMT deficitom (Neu et al., 2002). Ipak, smatra se da GAA ispoljava neurotoksične efekte samo u slučajevima izuzetno visokih koncentracija GAA u mozgu i krvi (10-30 μ M) uzrokovanih metaboličkim poremećajima. U većini studija u kojima se neurološka disfunkcija pripisuje GAA, vrednosti GAA u telesnim tečnostima su 60-1000 puta veće od normalnih fizioloških vrednosti, dok su rezerve kreatina potpuno ispražnjene. U istraživanju koje se bavilo akumulacijom GAA u mozgu, pet zdravih muškaraca oralno je unosilo GAA tokom 8 nedelja (Ostojić & Ostojić, 2018). Sprovedena je spektroskopija magnetnom rezonancom na 12 lokacija u sivoj i beloju moždanoj masi, a rezultati su pokazali da je koncentracija statistički jednaka u poređenju sa inicijalnim merenjem, te su autori zaključili da oralni unos GAA ne dovodi do akumulacije GAA u mozgu odraslih ljudi. Neurotoksični efekti GAA bi u velikoj meri mogli biti zavisni od stepena izloženosti GAA, pri čemu doze korišćene u istraživanjima ne mogu dovesti do vrednosti GAA prisutnih kod urođenih deficita kreatina. Pored toga, deplecija kreatina ispoljava neurotoksične karakteristike i u stanjima u kojima nema akumulacije GAA (Schulze, 2003), te je kod određenih patoloških stanja teško zaključiti u kojoj meri su neurološki poremećaji posledica akumulacije GAA, deficita kreatina ili kombinacije oba faktora.

Ostale studije koje su istraživale bezbednost oralnog unosa GAA kod ljudi utvrdile su da GAA ne utiče na enzimske profile mišića i jetre (Ostojić et al., 2013a) i ukupnu aktivnost antioksidanasa u serumu (Ostojić et al., 2015d) kod zdravih muškaraca i žena. Usled povećane sinteze kreatina i posledično njegove razgradnje, oralni unos GAA dovodi do povećanih vrednosti kreatinina u serumu. Iako povećane vrednosti kreatinina mogu ukazivati na patološka

stanja bubrega, oralni unos 2,4 g GAA/dan nije pokazao uticaj na ostale biomarkere oštećenja bubrega nakon 6 nedelja tretmana (Ostojić et al., 2013a). Autori navode da unos GAA može dovesti do blagih neželjenih efekata na gastrointestinalni trakt, kao što su stomachni grčevi, nadimanje i bol, najčešće u vidu pojedinačnih epizoda u početnim fazama tretmana, međutim incidenca neželjenih efekata nije se statistički značajno razlikovala između GAA i placebo grupe. Iz svega navedenog, smatra se da tretman GAA ima prihvatljiv profil neželjenih efekata, te nisku incidencu biohemijskih poremećaja u ljudskom organizmu, pri čemu je potrebno posebnu pažnju usmeriti ka kontroli i supresiji serumskih vrednosti homocisteina.

2.4.5. Otvorena pitanja

Oralni unos GAA se pokazao kao superioran tretman za povećanje ćelijskih koncentracija kreatina u različitim telesnim tkivima, u odnosu na kreatin (McBreairty et al., 2015; Ostojić et al., 2016a). Razlog tome može biti poboljšani transport GAA kroz ćelijske membrane, koja može koristiti alternativne transportne puteve, nedostupne kreatinu. U slučaju velike raspoloživosti kreatina, potencijal GAA da koristi kreatinski transporter je veoma nizak, usled 10 puta većeg afiniteta CRT prema kreatinu (Tachikawa et al., 2008). Međutim, kada je CRT zasićen kreatinom, egzogena GAA bi mogla istovremeno koristiti transportere taurina (SLC6A6) i GABA (SLC6A12), kao i pasivnu difuziju, i time dodatno povećati ćelijske koncentracije kreatina (Tachikawa et al., 2012). Ovo može biti od velikog značaja u uslovima velikih energetske potrebe, smanjene gustine CRT u određenim tkivima ili stanja u kojima su efekti egzogenog kreatina ograničeni (kao što je urođeni deficit CRT). Sa druge strane, povećanu proizvodnju homocisteina nakon oralnog unosa GAA neophodno je preduprediti nekom od strategija. Pored zajedničkog unosa GAA i metil donora (Ostojić et al., 2013b), jedno od alternativnih i potencijalno efikasnijih rešenja može biti prilagođavanje oralnih doza GAA i njeno kombinovanje sa drugim supstancama. U tom smislu, kombinovani unos kreatina i GAA u odgovarajućem odnosu, može predstavljati superioran tretman za unapređenje ćelijske bioenergetike u odnosu na unos kreatina ili GAA zasebno, uz istovremenu prevenciju neželjenih efekata suplementacije GAA.

3. PROBLEM, PREDMET I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Problem istraživanja predstavlja analiza efekata nove formulacije kreatina na motoričko-funkcionalne sposobnosti, biohemijske markere i energetiku mišića i mozga rekreativnih sportista.

Predmet istraživanja su motoričko-funkcionalne sposobnosti, biohemijski markeri i energetika mišića i mozga rekreativnih sportista.

Generalni cilj istraživanja jeste utvrđivanje efekata kombinovanog unosa kreatina i guanidinosirćetne kiseline (GAA) na motoričko-funkcionalne sposobnosti, biohemijske markere i energetiku mišića i mozga rekreativnih sportista.

Parcijalni ciljevi:

- (1) Utvrđivanje efekata kombinovanog unosa kreatina i GAA na motoričko-funkcionalne sposobnosti rekreativnih sportista.
- (2) Utvrđivanje efekata kombinovanog unosa kreatina i GAA na biohemijske markere rekreativnih sportista.
- (3) Utvrđivanje efekata kombinovanog unosa kreatina i GAA na energetiku mišića i mozga rekreativnih sportista.

3.1. OSNOVNE HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Osnovne hipoteze ovog istraživanja su:

H₀ – Ne postoje značajni efekti primene nove formulacije kreatina na funkcionalne sposobnosti, biohemijske markere i energetiku mišića i mozga rekreativnih sportista u odnosu na suplementaciju kreatinom.

H₁ – Postoje značajni efekti primene nove formulacije kreatina na motoričko-funkcionalne sposobnosti, biohemijske markere i energetiku mišića i mozga rekreativnih sportista u odnosu na suplementaciju kreatinom.

H₂ – Postoje značajni efekti primene nove formulacije kreatina na funkcionalne sposobnosti rekreativnih sportista u odnosu na suplementaciju kreatinom.

H₃ – Postoje značajni efekti primene nove formulacije kreatina na biohemijske markere rekreativnih sportista u odnosu na suplementaciju kreatinom.

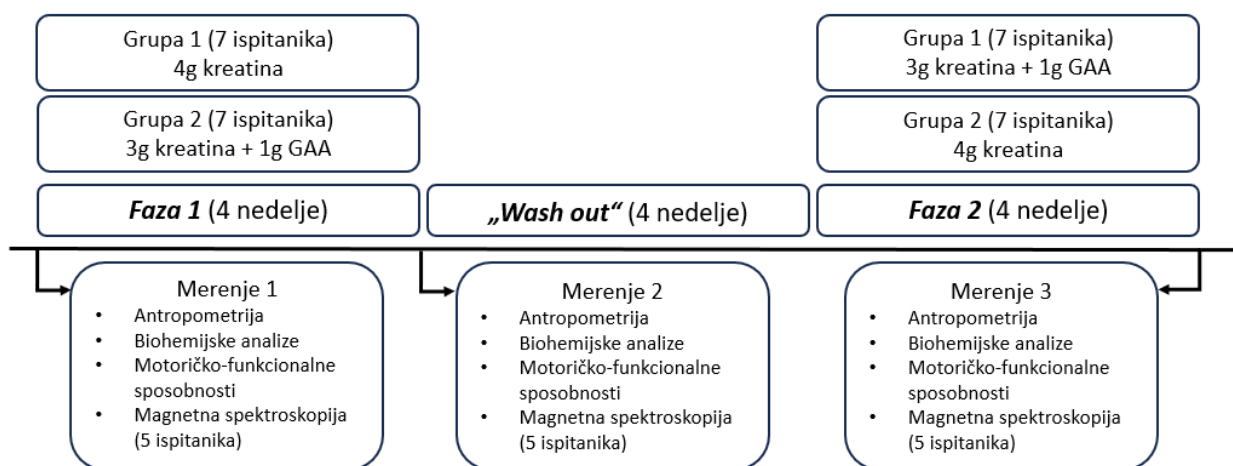
H₄ – Postoje značajni efekti primene nove formulacije kreatina na energetiku mišića i mozga rekreativnih sportista u odnosu na suplementaciju kreatinom.

4. METODOLOGIJA RADA

Prema prirodi naučnih istraživanja, ovo istraživanje pripada kategoriji empirijskih, dok prema cilju preduzimanja predstavlja aplikativno istraživanje. Prema vremenskoj određenosti, istraživanje je longitudinalnog karaktera, a prema dizajnu eksperimentalnog tretmana predstavlja dvostruko-slepu, randomiziranu, *cross-over* studiju kontrolisanu kreatinom. U odnosu na stepen kontrole, ovo istraživanje pripada kategoriji laboratorijskih istraživanja. Eksperimentalni tretman realizovane studije u skladu je sa etičkim standardima Helsinške deklaracije.

4.1. EKSPERIMENTALNI DIZAJN I USLOVI IZVOĐENJA

Istraživanje je realizovano u dve faze. Usled *cross-over* dizajna eksperimentalnog tretmana, dve četvoronedeljne faze razdvojene su periodom od četiri nedelje (eng. *wash out period*), čime su sprečeni rezidualni efekti prvog tretmana u drugoj fazi istraživanja. Stoga, ukupno trajanje studije iznosilo je 12 nedelja. Sedam dana pre početka studije, ispitanici su okupljeni i upoznati sa tokom, zahtevima i trajanjem studije. Istraživanje je obuhvatilo tri merenja realizovana u sledećim vremenskim tačkama: (1) pre prve faze, (2) nakon prve faze, i (3) nakon druge faze istraživanja. U skladu sa dvostruko slepim dizajnom, ispitanicima je nasumično dodeljen jedan od dva tretmana, formirajući tako dve grupe od po 7 ispitanika. Prvoj grupi ispitanika dodeljen je tretman oralnog unosa kombinacije kreatina i guanidinosirćetne kiseline (GAA) u odgovarajućem odnosu (3 g kreatina + 1 g GAA), dok je drugoj grupi dodeljen unos ekvimolarne doze kreatina (4 g) na dnevnom nivou. Doze kreatina u obe grupe, kao i trajanje svake faze istraživanja, odabrani su u skladu sa preporukama postojeće naučne literature, kojom se sugeriše unos 3 do 5 g kreatina dnevno, tokom približno 30 dana, u svrhu efikasnog povećanja ćelijskih rezervi kreatina (Cooper et al., 2012). Za potrebe istraživanja, kreatin je dobavljen od „Twinlab Corporation“ (*Hauppauge, NY, USA*), a GAA od „Axenic Lab“ (*Oak Park, Australia*). Nakon uspešne realizacije prve faze i „wash out“ perioda, grupe su zamenile tretmane (Dijagram 4). Ispitanicima koji su oralno unosili kombinaciju kreatina i GAA u prvoj fazi dodeljen je unos kreatina, i obrnuto. Na ovaj način obezbeđeno je poređenje efekata tretmana za svakog pojedinačnog ispitanika. Dodatno, pre početka studije nasumično je odabrano 5 ispitanika kojima je urađena magnetna spektroskopija na dan merenja, u popodnevnim ili večernjim časovima.



Dijagram 4. Prikaz eksperimentalnog dizajna studije.

Pre početka studije, suplementacija u vidu praha za oralni unos izmerena je, pripremljena i upakovana u plastične kesice, tako da jedno pakovanje predstavlja jednu dnevnu dozu. 24 časa pre početka svake od dve faze, u Laboratoriji za primenjenu bioenergetiku Fakulteta sporta i fizičkog vaspitanja, Univerziteta u Novom Sadu, ispitanicima je uručeno 28 dnevnih doza, neophodnih za dnevno konzumiranje tokom čitavog trajanja odgovarajuće faze istraživanja. Ovakva priprema i distribucija suplementacije imala je za cilj efikasniju kontrolu dnevnog unosa i komplijanse tretmana koja je bila visoka i slična u obe grupe (Cr+GAA $91,8 \pm 17,2\%$ vs Cr $88,8 \pm 20,1\%$). Ispitanicima su date jasne instrukcije da sadržaj jedne kesice rastvore u 250 ml mlake vode i odmah konzumiraju, 15 minuta pre prvog obroka, tokom 28 uzastopnih dana. U slučaju da u čaši preostane nerastvorenog praha, ispitanicima je sugerisano da dodaju vode, promešaju i uspešno unesu ostatak praha. Prilikom inicijalnog sastanka, kao i prilikom uručivanja suplementacije, ispitanicima je predloženo da ne konzumiraju hranu i napitke, osim vode, nakon 20:00 časova u danu koji je prethodio danu merenja. Pored toga, od ispitanika je zahtevano da se suzdrže od visoko-intenzivnih trenažnih aktivnosti 24 časa pre svakog merenja. Takođe, ispitanicima je predloženo da ne konzumiraju bilo kakve medikamente i dodatke ishrani, te da zadrže uobičajene nutritivne i trenažne navike tokom čitavog trajanja studije.

Inicijalno merenje realizovano je 24 časa pre početka prve faze istraživanja, dok su preostala dva merenja realizovana 24 časa nakon unosa poslednje doze suplementacije, odnosno 29. dana od početka svake od faza. Na dan merenja, ispitanici su dolazili u laboratoriju u 8 časova, nakon

čega se pristupalo uzimanju uzoraka venske krvi natašte i antropometrijskim merenjima. Potom je ispitanicima dozvoljeno konzumiranje obroka koji se sastojao iz 0,5 L vode i dva komada prehrambenog proizvoda na bazi žitarica (BonŽita, nutritivna vrednost u 100g proizvoda: energetska vrednost 423 kcal, masti 13 g, ugljeni hidrati 70,93 g, proteini 4,06 g, vlakna 3,09 g, so 0,14 g). Nakon konzumiranja hrane, pristupalo se testiranju motoričko-funkcionalnih sposobnosti. Sva merenja realizovana su uvek istim redosledom i u istim uslovima.

Analiza seruma realizovana je u laboratoriji Odseka za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Magnetna spektroskopija je realizovana u specijalističkoj radiološkoj ordinaciji za magnetnu rezonancu „MagMedica“ u Novom Sadu. Sva preostala merenja i okupljanja realizovana su u Laboratoriji za primenjenu bioenergetiku na Fakultetu sporta i fizičkog vaspitanja, Univerziteta u Novom Sadu.

4.2. UZORAK ISPITANIKA

Za potrebe istraživanja, veličina uzorka ispitanika izračunata je pomoću „G Power“ softvera (*G-Power 3, Heinrich Heine University Dusseldorf, Germany*). Ukupna veličina uzorka (N) izračunata je kao funkcija nivoa snage studije ($1-\beta$) od 0,80, nivoa značajnosti od 5% ($\alpha = 0,05$) i veličine efekta (q) od 0,5 za primarno istraživani fenomen, promena vrednosti koncentracije kreatina u mozgu izazvana oralnim unosom kombinacije kreatina i GAA, nasuprot unosu kreatina zasebno. Nakon uvrštavanja vrednosti u softver, dobijena vrednost za minimalnu veličinu uzorka u ovom istraživanju iznosila je 12 (N=12). Nakon uzimanja u obzir očekivanog isključivanja ili odustajanja ispitanika u studiji od 20%, konačna veličina uzorka korigovana je na 14 ispitanika (N=14).

Svi ispitanici u studiji su bili volonteri, starosti između 18 i 30 godina, koji se aktivno bave sportom na rekreativnom nivou (5 i više sati nedeljno), te poseduju višegodišnje trenažno iskustvo u različitim tipovima aktivnosti. Ispitanici su prvobitno informisani o rizicima učešća u studiji, kao i obavezama, zahtevima i mogućnosti isključivanja i odustajanja tokom trajanja studije. Pored toga, na inicijalnom okupljanju, ispitanici su upoznati sa efektima suplementacije kreatinom i svoj pristanak za učešće su potvrdili u vidu pismene saglasnosti. Kako bi pristupili istraživanju u svojstvu ispitanika, bilo je neophodno da ispune sledeće opšte kriterijume:

1. Osobe bez akutnih i hroničnih kardio-metaboličkih bolesti
2. Osobe bez prethodne istorije upotrebe dijetetskih suplemenata u periodu od 4 nedelje pre početka studije
3. Osobe bez prethodne istorije upotrebe medikamenata u periodu od 4 nedelje pre početka studije
4. Osobe bez prisutnih smetnji na koštano-mišićnom sistemu koje mogu uticati na realizaciju test-protokola ili ih isključiti iz uobičajenih trenažnih aktivnosti tokom trajanja studije
5. Osobe koje se ne pridržavaju vegetarijanske ili veganske dijetete, karakterisane smanjenim unosom namirnica životinjskog porekla

4.3. MERNI INSTRUMENTI I TEST-PROTOKOLI

Za potrebe ovog istraživanja, u skladu sa postavljenim generalnim i parcijalnim ciljevima studije, sledeći merni instrumenti, antropometrijske mere, analize i testovi korišteni su za procenu efekata nove formulacije kreatina na motoričko-funkcionalne sposobnosti, biohemijske markere i energetiku mišića i mozga rekreativnih sportista.

4.3.1. Antropometrijske mere i parametri

a. Telesna visina (TV)

Rekviziti i merni instrumentariji:

- Visinometar SECA-213 (*Germany*), sa tačnošću od 0,1 cm.

b. Telesna masa (TM)

Rekviziti i merni instrumentariji:

- Digitalna vaga OMRON BF508 (*Tokyo, Japan*), sa preciznošću od 0,1 kg

4.3.2. Biohemijski markeri

Biohemijski markeri su analizirani iz krvne plazme. Uzimanje uzoraka venske krvi vršeno je u jutarnjim časovima, po dolasku u laboratoriju, natašte. Uzorci venske krvi su uzimani iz prednje kubitalne vene i centrifugirani u roku od 20 minuta. Dobijeni uzorci, pripremljeni za analizu, čuvani su na temperaturi između -20 i -80 °C do analize. Sve analize uzoraka izvršene su na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Serum je analiziran na sledeće biohemijske markere:

(1) Guanidinosirćetnu kiselinu (GAA),

$$GAA_0 / GAA_{Cr+GAA} / GAA_{Cr}$$

(2) Kreatin (Cr)

$$Cr_0 / Cr_{Cr+GAA} / Cr_{Cr}$$

(3) Kreatinin (Crn)

$$Crn_0 / Crn_{Cr+GAA} / Crn_{Cr}$$

(4) Ukupan homocistein (tHcy)

$$tHcy_0 / tHcy_{Cr+GAA} / tHcy_{Cr}$$

Analiza seruma na GAA, kreatin i kreatinin izvršena je upotrebom modifikovanog „LC-MS/MS“ sistema, dok je analiza na ukupan homocistein realizovana upotrebom standardne metode fluorescentne polarizacije imunoeseja.

Rekviziti i merni instrumentariji:

- Analizator Agilent 1200 Series LC (*Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA*)

4.3.3. Motoričko-funkcionalne mere i parametri

4.3.3.1. Manuelna dinamometrija

Procena izometrijske snage stiska šake izvršena je manuelnim dinamometrom, a dobijeni rezultati su izraženi u kilogramima (kg). Test-protokol je podrazumevao realizaciju testa u tri pokušaja maksimalnog stiska levom i desnom šakom naizmenično. Za rezultat testa uzimana je vrednost:

(1) Zbir dva najveća ostvarena rezultata za svaku šaku

$$SS_0 / SS_{Cr+GAA} / SS_{Cr}$$

Rekviziti i merni instrumentariji:

- Manuelni dinamometar Jamar J00105 (*Lafayette Instrument Company, Lafayette, IN*)

4.3.3.2. Testovi apsolutne (maksimalne) snage

Procena apsolutne (maksimalne) snage gornjih i donjih ekstremiteta realizovana je direktnim merenjem jednog repetitivnog maksimuma (1RM) u sledećim testovima:

(1) Potisak sa ravne klupe slobodnim tegovima (eng. *bench press*)

$$BP_0 / BP_{Cr+GAA} / BP_{Cr}$$

(2) Prednji čučanj (eng. *front squat*)

$$FS_0 / FS_{Cr+GAA} / FS_{Cr}$$

Test-protokoli su započinjali sa 3 pripremne serije, a inicijalna opterećenja su individualizovana u skladu sa preporukama Američkog koledža za sportsku medicinu (Swain, Brawner & ACSM, 2014) za odgovarajuću uzrasnu kategoriju (vrednosti na 50. percentilu za uzrast 20-29 godina). Parametri obim i intenzitet, kao i trajanje pauze u pripremnim serijama definisani su na sledeći način:

- I serija – 8 ponavljanja na 50% od 1RM, pauza 1’
- II serija – 4 ponavljanja na 70% od 1RM, pauza 1’
- III serija – 1 ponavljanje na 90% od 1RM, pauza 3’

Nakon pripremnih serija, test-protokol je podrazumevao do tri pokušaja u okviru kojih je bilo neophodno savladati najveće moguće opterećenje. Svaki naredni pokušaj je pratilo progresivno povećanje opterećenja, kako bi se ostvarile realne vrednosti 1RM. Između pokušaja, ispitanici su imali adekvatan oporavak u trajanju od 3 do 5 minuta. Za rezultat svakog test-protokola, uziman je najveći ostvaren rezultat, odnosno vrednosti ostvarene u poslednjem uspešnom pokušaju izražene u kilogramima (kg). Pre početka, ispitanici su upoznati sa testom i adekvatnom tehnikom izvođenja pokreta.

Rekviziti i merni instrumentariji:

- Olimpijska šipka težine 20kg (*Eleiko, Sweden*)
- Slobodni tegovi težine od 1,25 do 20kg (*Eleiko, Sweden*)
- Stalak za čučanj (*Eleiko, Sweden*)
- Ravna klupa (*GYM 80, Germany*)

4.3.3.3. Testovi skočnosti

Test-protokoli za procenu skočnosti (eksplozivne snage donjih ekstremiteta i anaerobne moći) obuhvatali su pojedinačne i serijske vertikalne skokove. Baterija skakačkih testova na kontaktnoj ploči sadržala je sledeće testove:

(1) Skok iz čučnja sa rukama na kukovima (eng. *squat jump*)

$$SJ_0 / SJ_{Cr+GAA} / SJ_{Cr}$$

(2) Skok iz stojećeg stava sa rukama na kukovima (eng. *countermovement jump*)

$$CMJ_0 / CMJ_{Cr+GAA} / CMJ_{Cr}$$

(3) Skok iz stojećeg stava sa zamahom rukama (eng. *vertical jump*)

$$VJ_0 / VJ_{Cr+GAA} / VJ_{Cr}$$

(4) Serija 60 uzastopnih maksimalnih skokova sa rukama na kukovima

$$RepJ60_0 / RepJ60_{Cr+GAA} / RepJ60_{Cr}$$

Nakon upoznavanja sa baterijom testova i adekvatne pripreme, ispitanici su realizovali po dva pokušaja u svakom od testova pojedinačnih skokova, dok je test 60 serijskih skokova, zbog prirode testa i energetske zahteve, realizovan u jednom pokušaju. Između pokušaja ispitanicima je omogućen adekvatan oporavak u trajanju od 1 minuta. U testovima pojedinačnih vertikalnih skokova, za rezultat testa uziman je bolji rezultat iz dva pokušaja, definisan kao visina skoka izražena u centimetrima (cm) sa preciznošću od 0,1 cm. U testu 60 serijskih skokova za rezultat su uzimane prosečne vrednosti anaerobne moći izražene u vatima po kilogramu telesne mase (W/kgTM).

Rekviziti i merni instrumentariji:

- Kontaktna ploča (*Just Jump System; Probiotics, Huntsville, AL*)

4.3.3.4. Test kardiorespiratorne izdržljivosti

Kardiorespiratorna izdržljivost procenjujeva se pomoću testa progresivnog maksimalnog opterećenja do voljnog otkaza na pokretnoj traci. Podaci o razmeni gasova tokom testa prikupljani su upotrebom „izdah po izdah“ (eng. *breath-by-breath*) metaboličkog sistema. Test-protokol je podrazumevao zagrevanje koje je obuhvatalo 3 minuta brzog hodanja ili trčanja

intenzitetom 6 km/h. Odmah nakon zagrevanja, test-protokol se nastavljao trčanjem intenzitetom 8 km/h, pri čemu se intenzitet progresivno povećavao za 1,5 km/h nakon svakog minuta testa. Inklinacija pokretne trake je bila konstantna tokom testa i iznosila je 1%. Tokom testa, ispitanicima je pružana verbalna podrška kako bi izvršili maksimalan napor. Uspešna realizacija test-protokola podrazumevala je ispunjavanje sledećih kriterijuma:

- Dostizanje vrednosti respiratornog količnika (RR) $\geq 1,2$
- Dostizanje platoa potrošnje kiseonika (VO_2) bez obzira na dalje povećanje opterećenja tokom testa

Nakon realizacije test-protokola, pristupalo se pregledanju sirovih podataka i njihovoj obradi. Analizom podataka, za rezultate testa uzimane su sledeće vrednosti:

(1) Brzina trčanja na anaerobnom pragu izražena u kilometrima na čas (km/h), izračunata pomoću vrednosti respiratornog količnika

$$V_{ANT\ 0} / V_{ANT\ Cr+GAA} / V_{ANT\ Cr}$$

(2) Vrednost maksimalne potrošnje kiseonika izražena u mililitrima po kilogramu telesne mase u minuti (ml/kg/min), definisana pregledanjem grafika potrošnje kiseonika tokom testa

$$VO_{2max\ 0} / VO_{2max\ Cr+GAA} / VO_{2max\ Cr}$$

Rekviziti i merni instrumentariji:

- Pokretna traka T170 (*Cosmed, Rome, Italy*)
- „Breath-by-breath“ metabolički sistem (*Quark CPET, Cosmed, Rome, Italy*)

4.3.4. Magnetna spektroskopija

Magnetna spektroskopija, realizovana na 5 nasumično odabranih ispitanika, koristila se za analizu metabolita kreatina u specifičnim regijama mozga i mišića:

- beloju moždanoj masi (*left centrum semioval white matter*)
- sivoju moždanoj masi (*midline occipital gray matter*)
- četvoroglavom mišiću natkolenice desne noge (*right m. vastus medialis*)

Magnetna spektroskopija realizovana je na uređaju indukcije magnetnog polja 1,5 T sa vremenom odjeka od 135 milisekundi. Izvršena je spektroskopija pojedinačnog voksel (eng. single voxel spectroscopy), pri čemu se voksel dimenzija 10x10x10 mm postavljao u regiju interesa u mozgu i mišiću (Slika 1). Pozicioniranje mernog voksel je realizovano u skladu sa merenjem na bazi molekula vodonika. Ova tehnika je podobna imajući u vidu građu moždanog i mišićnog tkiva, te u cilju izbegavanja artefakata uzrokovanim lipidima i kretanjem krvi. Pre spektroskopije realizovana su tri merenja u sve tri ravni, kako bi se obezbedilo optimalno pozicioniranje mernog voksel. Takođe, pre spektroskopije ručno je izvršen procedura homogenizacije polja (eng. *shimming*). Dobijeni rezultati izraženi su u milimolima (mM). Za rezultate merenja, uzimane su vrednosti sledećih parametara:

(1) Vrednost kreatina u interesnoj regiji bele moždane mase

$$Cr_{WM0} / Cr_{WM Cr+GAA} / Cr_{WM Cr}$$

(2) Vrednosti kreatina u interesnoj regiji sive moždane mase

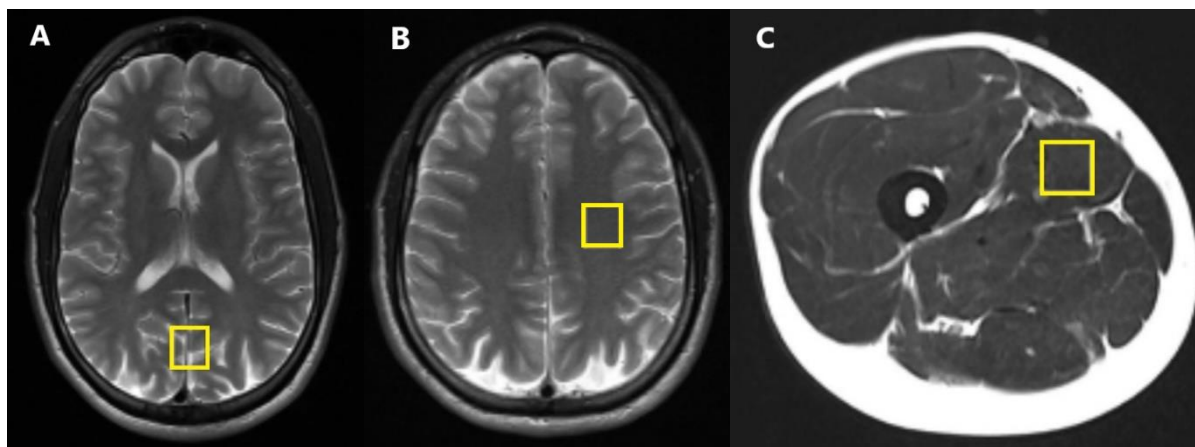
$$Cr_{GM0} / Cr_{GM Cr+GAA} / Cr_{GM Cr}$$

(3) Vrednost kreatina u interesnoj regiji četvoroglavog mišića desne natkolenice

$$Cr_{VM0} / Cr_{VM Cr+GAA} / Cr_{VM Cr}$$

Rekviziti i merni instrumentariji:

- Uređaj za magnetnu rezonancu Siemens Avanto (*Siemens, Erlangen, Germany*)



Slika 1. Interesne regije obuhvaćene analizom u sivoj (A) i beloju (B) moždanoj masi, i četvoroglavom mišiću desne natkolenice (C).

4.4. METODE OBRADJE PODATAKA

Podaci prikupljeni merenjem su pregledani u sirovom obliku, uređeni, a potom statistički obrađeni u softveru IBM SPSS Statistics 26 (*SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, 2019*). Za navedene parametre izvedene su varijable, nakon čega su izračunati deskriptivni statistici (aritmetička sredina i standardna devijacija). Za utvrđivanje normalnosti distribucije prikupljenih podataka realizovan je Kolmogorov-Smirnov test.

Na sve definisane varijable primenjena je statistička metoda jednofaktorska analiza varijanse za ponovljena merenja (eng. *GLM One-way ANOVA for Repeated measures*), sa *within-subjects* faktorom – tretman, pri čemu su u analizu uvrštene vrednosti dobijene u tri vremenske tačke (inicijalno, Cr, Cr+GAA). U slučaju izostanka nekog od ispitanika, rezultati u tri vremenske tačke za dati test nisu ulazili u analizu. Minimalan uslov za postojanje statistički značajne razlike između merenja (nivo značajnosti) unapred je definisan i iznosio je 5% ($\alpha \leq 0,05$). Testiranje sferičnosti distribucije, kao jedne od pretpostavki za realizaciju ove analize, izvršeno je Moklijevim testom sferičnosti (eng. *Mauchly's Test of Sphericity*). U slučaju narušavanja sferičnosti distribucije, u analizi je korištena *Greenhouse-Geisser*-ova korekcija. Nakon dobijanja statistički značajnih vrednosti analize varijanse, *post-hoc* testovima izvršena je analiza između parova varijabli u modelu, prilikom čega je utvrđen novi nivo značajnosti upotrebom *Bonferonni*-jeve korekcije. U ovom slučaju, nivo značajnosti $\alpha=0.05$ podeljen je sa brojem sprovedenih testova (3), a nova p vrednosti korigovana je na 0.017. U slučaju statistički značajnog narušavanja normalnosti distribucije, za analizu podataka korišćena je neparametrijska tehnika Fridmanova ANOVA, a razlike između parova utvrđene su upotrebom *Wilcoxon Signed Rank* testa.

5. REZULTATI

Tabele 1 do 3 prikazuju osnovne deskriptivne statistike i karakteristike distribucije antropometrijskih mera, biohemijskih markera, motoričko-funkcionalnih mera i parametara, te varijabli dobijenih magnetnom spektroskopijom. Prikazani su aritmetička sredina (AS) i standardna devijacija (SD) po grupama.

Tabela 1. Antropometrijske mere i biohemijski markeri pre i nakon suplementacije

	Nakon tretmana			
	Inicijalno	Cr+GAA	Cr	
<i>Antropometrijske mere</i>				
TV (cm)	176,49±7,25	176,49±7,19	176,46±7,01	
TM (kg)	79,86±13,86	80,6±13,68	81,48±14,22	*
<i>Biohemijski markeri</i>				
Cr (μM/L)	20,87±5,3	39,83±12,37	44,45±16,53	*
GAA (μM/L)	1,95±0,36	1,91±0,45	1,99±0,83	
Crn (μM/L)	84,85±8,74	88,45±6,44	90,51±12,56	
tHcy (μM/L)	11,45±3,09	11,65±2,7	11,39±2,83	

Legenda: TV – telesna visina; TM – telesna masa; Cr – vrednosti kreatina u serumu; GAA – vrednosti GAA u serumu; Crn – vrednosti kreatinina u serumu; tHcy – ukupne vrednosti homocisteina u serumu; Inicijalno – pre suplementacije; * - statistički značajne razlike pod uticajem faktora tretman

Faktor tretman statistički je značajno uticao na promene u vrednostima telesne mase ($F(2,26)=4,91$; $p=0,015$; Part $\eta^2=0,27$). Nakon Boferoni korekcije, potvrđeno je značajno povećanje telesne mase u odnosu na inicijalno merenje nakon suplementacije kreatinom ($79,86\pm 13,86 \mu\text{M/L}$ vs $81,48\pm 13,22 \mu\text{M/L}$; $p=0,01$), ali ne i nakon kombinacije Cr+GAA ($80,6\pm 13,68 \mu\text{M/L}$; $p>0,05$). Razlike između tretmana Cr i Cr+GAA nisu statistički potvrđene ($p>0,05$).

Unos suplementacije uticao je na vrednosti pojedinih biohemijskih markera. Vrednosti Cr u serumu značajno su se razlikovale nakon unosa suplementacije ($F(2,22)=13,04$; $p<0,01$; Part $\eta^2=0,54$). Nakon unosa kreatina utvrđeno je značajno povećanje vrednosti Cr (inicijalno $20,87\pm 5,3 \mu\text{M/L}$ vs Cr $44,45\pm 16,53 \mu\text{M/L}$; $p=0,001$), kao i nakon unosa kombinacije kreatina i GAA ($39,83\pm 12,37 \mu\text{M/L}$; $p=0,001$), pri čemu nisu primećene značajne razlike između tretmana ($p>0,05$).

Analiza varijanse nije pokazala statistički značajno povećanje kreatinina (Crn) u serumu nakon tretmana ($p > 0.05$). Vrednosti Crn bile su niže pre uzimanja suplementacije u odnosu na Cr+GAA grupu ($84 \pm 89 \mu\text{M/L}$ vs $88,45 \pm 6,44 \mu\text{M/L}$), dok je unos kreatina doveo do dodatnog povećanja ($90,51 \pm 12,56 \mu\text{M/L}$). Inspekcijom sirovih rezultata utvrđeno je da nijedan ispitanik nije ostvario vrednosti van referentnog okvira ($> 110 \mu\text{M/L}$).

Nisu utvrđene značajne razlike u vrednostima ukupnog homocisteina pre i nakon suplementacije Cr+GAA, kao i kreatinom zasebno ($p > 0.05$). Kod dva ispitanika uočene su blago povišene vrednosti homocisteina van referentnog okvira ($> 15,0 \mu\text{M/L}$) nakon suplementacije kreatinom, te po jednog na inicijalnom merenju i nakon unosa Cr+GAA.

Vrednosti GAA u serumu nisu se značajno menjale nakon unosa kombinacije Cr+GAA i kreatina zasebno ($p > 0,05$).

Tabela 2. Motoričko-funkcionalne mere i parametri pre i nakon suplementacije

	Inicijalno	Nakon tretmana		
		Cr+GAA	Cr	
<i>Dinamometrija</i>				
SS (kg)	112,71±15,82	116±16,88	116,29±18,22	
<i>Testovi snage</i>				
BP (kg)	97,08±23,67	102,92±25,71	101,67±22,7	*
FS (kg)	107,5±15,3	121,25±8,29	122,5±10,55	*
<i>Testovi skočnosti</i>				
SJ (cm)	44,27±4,33	43,63±3,69	43,71±4,54	
CMJ (cm)	48,69±3,91	46,9±3,71	46,26±5,45	*
VJ (cm)	57,06±6,02	54,86±4,88	53,88±5,17	*
RepJ60 (W/kg)	8,12±0,49	8,13±0,57	8,09±0,72	
<i>Kardiorespiratorna izdržljivost</i>				
V _{ANT} (km/h)	12,65±1,93	12,54±1,63	12,73±1,35	
VO ₂ max (ml/kg/min)	45,89±5,52	45,01±6,61	44,18±5,22	

Legenda: SS – zbir stiska šake leve i desne ruke; BP – potisak sa ravne klupe slobodnim tegovima; FS – prednji čučanj; SJ – skok iz čučnja sa rukama na kukovima; CMJ – skok iz stojećeg stava sa rukama na kukovima; VJ – skok iz stojećeg stava sa zamahom rukama; RepJ60 – serija 60 uzastopnih maksimalnih skokova sa rukama na kukovima; V_{ANT} – brzina trčanja na anerobnom pragu; VO₂max – vrednost maksimalne potrošnje kiseonika; Inicijalno – pre suplementacije; * - statistički značajne razlike pod uticajem faktora tretman

Faktor tretman imao je statistički značajan uticaj u testovima snage. Vrednosti u testu potisak sa ravne klupe sa slobodnim tegovima (BP) značajno su se povećale nakon unosa suplementacije ($F(2,22)=8,58$; $p=0,002$; Part $\eta^2=0,44$). U odnosu na inicijalno merenje, vrednosti su porasle nakon unosa kreatina ($97,08\pm 23,67$ kg vs $101,67\pm 22,7$ kg; $p=0,003$), te dodatno nakon kombinacije Cr+GAA ($102,92\pm 25,71$ kg; $p=0,004$).

Značajne razlike pre i nakon unosa suplementacije utvrđene su u testu prednji čučanj (FS) ($F(2,22)=18,52$; $p>0,001$; Part $\eta^2=0,63$). Nakon Bonferoni korekcije, značajno povećanje u odnosu na inicijalno merenje uočeno je nakon unosa kreatina ($107,5\pm 15,3$ kg vs $122,5\pm 10,55$ kg; $p<0,001$) i unosa Cr+GAA ($121,25\pm 8,29$ kg; $p<0,001$). Značajne razlike nisu primećene između dva nutritivna tretmana ($p>0,05$).

Analiza varijanse utvrdila je razlike u testu skok iz stojećeg stava sa rukama na kukovima (CMJ) ($F(2,26)=3,68$; $p=0,039$; Part $\eta^2=0,22$). Nakon Bonferoni korekcije, u *post-hoc* analizi parova varijabli uočene razlike nisu pokazale statističku značajnost (inicijalno $48,69\pm 3,91$ cm vs Cr $46,27\pm 5,45$ cm, Cr+GAA $46,9\pm 3,91$ cm). Potvrđene su i razlike između rezultata u testu skok iz stojećeg stava sa zamahom rukama (VJ) ($F(2,26)=5,03$; $p=0,014$; Part $\eta^2=0,22$). Uočeno je smanjenje visine skoka u odnosu na inicijalno merenje nakon tretmana kreatinom ($57,06\pm 6,02$ cm vs $53,88\pm 5,17$ cm; $p>0,001$) i tretmana Cr+GAA ($54,86\pm 4,88$ cm; $p=0,006$). Razlike u visini skoka nakon dva nutritivna tretmana nisu potvrđene ($p>0,05$).

Faktor tretman nije statistički značajno uticao na vrednosti snage stiska šake, visinu skoka u testu skok iz čučnja sa rukama na kukovima (SJ), kao i vrednosti anaerobne moći u testu 60 uzastopnih maksimalnih skokova sa rukama na kukovima (RepJ60) ($p>0,05$).

Tabela 3. Mere dobijene magnetnom spektroskopijom pre i nakon suplementacije

	Inicijalno	Nakon tretmana		
		Cr+GAA	Cr	
<i>Magnetna spektroskopija</i>				
CrWM (mM)	7,69±0,63	8,74±1,13	8,22±0,52	
CrGM (mM)	8,94±0,77	9,45±0,7	9,09±0,93	*
CrVM (mM)	35,53±5,86	40,74±3,45	36,03±4,91	*

Legenda: CrWM – vrednost kreatina u interesnoj regiji bele moždane mase; CrGM – vrednost kreatina u interesnoj regiji sive moždane mase; CrVM – vrednost kreatina u interesnoj regiji četvoroglavog mišića natkolenice desne noge; Inicijalno – pre suplementacije; * - statistički značajne razlike pod uticajem faktora tretman;

Koncentracija kreatina u sivoj moždanoj masi značajno je porasla pod uticajem suplementacije u odnosu na inicijalne vrednosti ($\chi^2(2)=6,4$; $p=0,041$). Tretman Cr+GAA doveo je do statistički značajnog porasta kreatina u interesnoj regiji ($Z=-2,02$; $p=0,043$), ali ne i tretman kreatinom zasebno ($p>0,05$). U odnosu na kreatin, unos kombinacije Cr+GAA doveo je do povećanja vrednosti kreatina za dodatnih 4,0% (inicijalno 8,94±0,77 mM vs Cr 9,09±0,93 mM; Cr+GAA 9,45±0,7 mM).

Analiza varijanse nije potvrdila statistički značajne promene u vrednostima kreatina u interesnoj regiji bele moždane mase nakon unosa suplementacije ($p>0,05$). Ipak, unos kreatina doveo je do povećanja od 7,0% u odnosu na inicijalno merenje (7,60±0,63 mM vs 8,22±0,52 mM), a kombinacija kreatina i GAA ostvarila je dodatno povećanje od 6,3% u odnosu na tretman kreatinom (8,74±1,13 mM).

Unos suplementacije doveo je do značajnog povećanja vrednosti kreatina u interesnoj regiji četvoroglavog mišića natkolenice ($\chi^2(2)=7,6$; $p=0,022$). *Post-hoc* analiza prvobitno je utvrdila razlike između inicijalnog merenja i nakon unosa kombinacije Cr i GAA ($Z=-2,02$; $p=0,04$), kao između tretmana ($Z=-2,02$; $p=0,04$), ali ne između inicijalnog merenja i nakon unosa Cr ($p>0,05$). Nakon Bonferoni korekcije ove razlike nisu pokazale statističku značajnost na malom broju ispitanika. Kombinacija Cr i GAA ostvarila je dodatno povećanje vrednosti Cr u mišiću od 13,1% u odnosu na unos kreatina zasebno (36,03±4,91 mM vs 40,74±3,45 mM).

6. DISKUSIJA

U fokusu ovog istraživanja nalazi se ćelijski energetska metabolizam u kojem kreatin zauzima centralnu ulogu. Pored obnavljanja ćelijskih rezervi ATP, naučna literatura prepoznaje ulogu kreatina u ćelijskom energetskom transportu (Wallimann et al., 2007), puferskom kapacitetu (Ma et al., 1996) i regulaciji oksidativnog stresa (Meyer et al., 2006). Razumevanjem metaboličke uloge kreatina raslo je interesovanje naučne javnosti za magičnim tretmanom kojim bi se dodatno uticalo na energetska kapacitet ćelije. Kako se endogenom sintezom ne mogu obezbediti optimalne količine kreatina, komercijalni dodaci ishrani prepoznati su kao ekonomično i efikasno rešenje. Decenije istraživanja profilisale su suplementaciju kreatinom kao najefikasnije ergogeno sredstvo i bezbedan nutritivni tretman kod ljudi (Kreider et al., 2017). Zbog pozitivnih efekata na normalan rast i razvoj, opšte zdravlje, i u tretiranju različitih patoloških stanja, kreatin je predstavljen kao uslovno esencijalni nutrijent u ljudskoj ishrani (Ostojić & Forbes, 2022). Kod posebnih grupa kao što su vegetarijanci i vegani (Solis et al., 2014), novorođenčad (Edison et al., 2013), osobe trećeg doba (Devries & Philips, 2014), kao i kod različitih patoloških stanja (Kreider & Stout, 2021), oralni unos kreatina može biti od ključnog značaja za očuvanje ćelijski rezervi kreatina. Imajući u vidu navedene benefite, ovo istraživanje bavilo se pronalaskom alternativnog rešenja kojim bi se ostvarili dodatni pozitivni efekti, te zaobišla prepoznata ograničenja suplementacije kreatinom i GAA zasebno.

Radna hipoteza ovog istraživanja podrazumevala je značajan uticaj kombinacije kreatina i GAA na motoričko-funkcionalne sposobnosti, biohemijske markere i energetiku mišića i mozga kod zdravih muškaraca koji se rekreativno bave sportom. Značajni efekti novog tretmana, posmatrani kroz postojanje razlika, ili njihovo odsustvo, u odnosu na inicijalno stanje i kreatinom kontrolisanu grupu, potvrđeni su za telesnu masu, koncentraciju kreatina u serumu, vrednosti snage u testovima potisak sa ravne klupe slobodnim tegovima (BP) i prednji čučanj (FS), kao i na nivo kreatina u moždanom i mišićnom tkivu. Prethodne studije predstavile su kreatin kao osmotski aktivnu supstancu koja dovodi do zadržavanja tečnosti u ćeliji usled povećanja ćelijskih rezervi Cr i PCr. Očekivano povećanje telesne mase od 1 do 2 kg nakon inicijalnih 7-14 dana ranije je opisano (Kreider et al., 2017) i predstavlja potencijalno ergolitički efekat suplementacije kreatinom. Slično tome, ovo istraživanje potvrdilo je prethodno opisane efekte nakon tretmana kreatinom zasebno, dok razlike između inicijalnog merenja i nakon unosa

Cr+GAA nisu statistički potvrđene. Unos kreatina doveo je do prosečnog povećanja telesne mase za 1,6 kg, dok je povećanje nakon Cr+GAA iznosilo svega 0,7 kg u odnosu na inicijalno merenje. Ovakvi rezultati posebno su interesantni imajući u vidu male razlike u dnevnoj dozi kreatina u tretmanima (Cr 4 g vs Cr+GAA 3 g). Stoga kombinacija Cr+GAA može predstavljati potencijalno superioran tretman u odnosu na kreatin u uslovima gde je neophodna stroga kontrola telesne mase, kao što je slučaj u sportovima gde sportista konstantno savladava sopstvenu težinu ili u slučaju sportova koji uključuju težinske kategorije.

Analizom biohemijskih markera utvrđena su očekivana značajna povećanja vrednosti kreatina u serumu, međutim razlike između dva tretmana nisu uočene. Porast ćelijskih rezervi kreatina, uzrokovan oralnim unosom kreatina i endogenom sintezom, dovodi do veće stope njegove razgradnje na kreatinin, koji je povezan sa patološkim stanjima bubrega. U jednom od prethodnih istraživanja oralni unos GAA doveo je do povećanja vrednosti kreatinina (Crn) u serumu (Ostojić et al., 2013a), pri čemu su korišćene doze bile veće u odnosu na trenutno istraživanje. Ova studija nije uočila promene u vrednostima Crn u serumu nakon oba tretmana u odnosu na inicijalno merenje, pri čemu niko do ispitanika nije ostvario vrednosti Crn van referentnog okvira ($>110 \mu\text{M/L}$). Može se zaključiti da kombinovana doza 3 g kreatina i 1 g GAA ne dovodi do povećanja serumskih vrednosti Crn. U procesu endogene sinteze kreatina kao konačni nusprodukt metilacije nastaje homocistein koji se smatra nezavisnim rizikofaktorom kod različitih metaboličkih oboljenja (Ganguly & Alam, 2015) i predstavlja ključni nedostatak oralnog unosa GAA. Prethodna studija je pokazala da suplementacija GAA u dozama 2,4 g i 4,8 g/dan tokom 6 nedelja dovodi do značajnog povećanja ukupnog homocisteina (tHcy) u serumu (Ostojić et al., 2013a), pri čemu veličina doze direktno utiče na vrednosti tHcy. Takođe, kod značajnog broja ispitanika utvrđena je klinička homocisteinemija ($>15,0 \mu\text{M/L}$). Prilikom definisanja doza eksperimentalnog tretmana ovog istraživanja jedan od ciljeva bio je kreiranje odnosa Cr-GAA kojim bi se ostvarili svi benefiti na ćelijske rezerve Cr uz istovremenu supresiju serumskih vrednosti tHcy. Statistički značajne razlike nisu primećene između tretmana i inicijalnog merenja, pri čemu se zaključuje da kombinacija 3 g kreatina i 1g GAA na dan tokom 4 nedelje predstavljaju bezbedan nutritivni tretman u svrhu unapređenja ćelijske energetike. Istraživanje nije utvrdilo značajno promene u serumskim vrednostima GAA nakon oba tretmana u odnosu na inicijalne vrednosti.

Približno 70% prethodnih studija utvrdilo je ergogene efekte kreatina u nekom od tipova fizičke aktivnosti (Buford et al., 2007), pri čemu se najveći udeo pripisuje direktnom povećanju ćelijskih rezervi kreatina (Kreider et al., 2017). Značajna poboljšanja očekivana su u aktivnostima gde ćelijski energetska kapacitet ima ključnu ulogu, pa se tako najveći uticaj očekuje na anaerobni kapacitet, sposobnost ponavljajućih sprinteva i različite tipove ispoljavanja snage. Rezultati ovog istraživanja podudaraju se sa velikom meta-analizom koja je utvrdila prosečno povećanje vrednosti snage od 8% u testovima maksimalne (apsolutne) i repetitivne snage (Rawson i Volek, 2003). Značajno povećanje snage nakon unosa suplementacije uočeno je u testovima 1RM BP i FS. Unos kreatina doveo je do prosečnog povećanja od 4,7% i 14% u BP i FS redom, dok je tretman Cr+GAA ostvario povećanje od 6% i 12,8% u odnosu na inicijalno merenje. Statistički značajne razlike između tretmana nisu potvrđene. Prethodna istraživanja na različitim populacijama utvrdila su očekivano veći porast u snazi gornjih ekstremiteta, međutim obrazloženje za ovakve efekte leži u očekivano većem uticaju kreatina i GAA na snagu mišićnih grupa sa inicijalno manjim vrednostima snage. Mehanizmi ovog efekta nisu potpuno poznati, međutim moguće je da tkiva sa inicijalno manjim vrednostima kreatina lakše preuzimaju GAA, verovatno pasivnom difuzijom. Suprotno tome, ispitanici u ovom istraživanju bili su dobro utrenirani rekreativci sa velikim trenažnim iskustvom u treningu snage gornjih ekstremiteta. U testovima SJ i CMJ nisu primećene statistički značajne razlike nakon unosa oba tretmana u odnosu na inicijalno merenje. Prethodna istraživanja sugerišu da je na vrednosti eksplozivne snage moguće uticati indirektno, povećanjem trenažnog intenziteta i obima rada u dužem vremenskom intervalu (Wax et al., 2021). Povećani energetska kapacitet omogućava unapređenje trenažnih aktivnosti, te ovaj fenomen objašnjava jedan udeo ergogenih efekata kreatina u uslovima kontrolisanog trenažnog procesa (Syrotuik et al., 2000), što je u ovom istraživanju izostalo. Pored toga, značajne razlike u korist inicijalnog merenja primećene su u testu VJ, u odnosu na oba nutritivna tretmana. Ovakvi rezultati ukazuju da ispoljavanje eksplozivne snage u velikoj meri zavisi od drugih faktora koji nisu povezani sa ćelijskim rezervama kreatina. Jedno od obrazloženja može ponuditi motivaciju ispitanika da ispolje maksimalan intenzitet u laboratorijskom okruženju, a neophodno je razmotriti i uticaj povećanja telesne mase na rezultate merenja. Suprotno očekivanom uticaju povećanja ćelijskih rezervi na sposobnost ponavljajućih skokova (Cooper et al., 2012), ovo istraživanje nije utvrdilo značajne razlike u testu 60 uzastopnih maksimalnih skokova (RepJ60) nakon unosa suplementacije.

Pozitivni efekti suplementacije na kardiorespiratornu izdržljivost ispitanika nisu primećeni. U skladu sa očekivanjima, značajne razlike u brzini trčanja na anaerobnom pragu (V_{ANT}) i maksimalnoj potrošnji kiseonika (VO_2max) u testu progresivnog trčanja na pokretnoj traci do otkaza izostale su u oba tretmana u odnosu na inicijalno merenje. Prethodna istraživanja ukazuju na značajne ergogene efekte kreatina u kratkim i intenzivnim aktivnostima koji opadaju sa trajanjem aktivnosti (Branch et al., 2003). Za razliku od visoko-intenzivnih isprekidanih aktivnosti, efekti suplementacije kreatinom potpuno se gube u kontinuiranim aktivnostima dužim od 150 sekundi, što je i potvrđeno u ovom istraživanju.

Kombinovani unos Cr i GAA ispoljio je značajne efekte na energetiku četvoroglavog mišića natkolenice i mozga. Prethodna istraživanja navode povećanu stopu endogene sinteze i akumulacije Cr u skeletnim mišićima kao osnovni mehanizam kojim se objašnjavaju ergogeni efekti suplementacije GAA (Ostojić et al., 2015a). Analiza varijanse prvobitno je utvrdila značajne razlike između merenja, koji ipak nisu statistički potvrđeni poštovanjem strožijih kriterijuma upotrebom Bonferoni korekcije. Ipak, kombinovani unos Cr+GAA doveo je do dodatnog povećanja rezervi Cr u mišiću od 13,1% u odnosu na unos Cr. Ovi rezultati potvrđuju superiornost novog tretmana u odnosu na Cr u svrhu povećanja rezervi kreatina u mišićnom tkivu. Potencijalni mehanizmi kojima bi se objasnio potvrđeni fenomen podrazumevaju unapređen transport GAA kroz ćelijsku membranu u odnosu na kreatin (Dijagram 3). Osim kreatinskog transportera, smatra se da GAA može koristiti transporter taurina (SLC6A6), transporter GABA (SLC6A12), kao i pasivnu difuziju (Tachikawa et al., 2012). Kako je aktivnost GAMT u skeletnim mišićima dovoljna za sintezu značajnih količina kreatina (Curt et al., 2015), transport GAA kao esencijalnog supstrata GAMT reakcije može predstavljati superioran mehanizam u odnosu na transport molekula Cr kroz ćelijske membrane u ovim tkivima. Sličan trend potvrđen je i u moždanom tkivu ispitanika. Kombinovani unos Cr+GAA prikazao je statistički značajno povećanje koncentracije Cr u sivoj moždanoj masi, dok su ovakvi rezultati izostali nakon unosa Cr. Novi tretman doveo je do prosečnog povećanja od 4% u odnosu na kontrolni tretman. Pored toga, sličan trend potvrđen je i u beloj moždanoj masi. Iako statistička značajnost nije potvrđena na malom broju ispitanika (5), tretman Cr+GAA doveo je do dodatnog porasta Cr od 6,3% u odnosu na kreatin. Ovi rezultati u skladu su sa prethodnim istraživanjima koja potvrđuju pozitivne efekte GAA na koncentracije Cr u mozgu (Ostojić et al., 2017). U navedenoj studiji, autori su utvrdili slične efekte GAA na sivu i belu moždanu masu,

pri čemu je prosečno povećanje iznosilo 10,7% u odnosu na inicijalne vrednosti. Slično tome, trenutno studija potvrdila je povećanja Cr od 13,7% i 5,7% u odnosu na inicijalne vrednosti u beloj i sivoj moždanoj masi, redom. Pored toga, prethodne studije uključivale su značajno veće doze GAA pri čemu su ispoljeni i negativni efekti oralnog unosa većih doza GAA, dok je ovo istraživanje utvrdilo slične efekte aplikovanjem novog tretmana karakterisanog bezbednim dozama GAA. Poznato je da krvno-moždana barijera otežava transport Cr u moždano tkivo, pri čemu se mozak u najvećoj meri oslanja na sopstvenu sposobnosti sinteze Cr (Braissant et al., 2001), što može biti glavni razlog slabih efekata suplementacije Cr. Pored toga, moždane ćelije vrše koekspresiju AGAT i GAMT pri čemu je neophodan transport supstrata između ćelija. Stoga predloženi mehanizmi transporta GAA kroz ćelijsku membranu mogu imati poseban značaj u moždanom tkivu. Ovo otkriće može imati poseban značaj kod sindroma deficita kreatina (CDS). Suprotno deficitima AGAT i GAMT, u slučajevima deficita kreatinskog transportera (CRT) suplementacija kreatinom ne dovodi do željenih efekata (Stockler-Ipsiroglu & van Karnebeek, 2014). Stoga poboljšani transport GAA može predstavljati superioran mehanizam kojim se efikasno utiče na energetiku moždanog tkiva.

Dvostruko slepi, *cross-over* dizajn ovog istraživanja u kojem je obezbeđena kontrola kreatinom zasebno, umesto placebo grupe, predstavlja novinu u odnosu na prethodne studije. Potencijalni limiti ogledaju se u broju ispitanika, trajanju studije, kao i eksperimentalnoj populaciji. Studija je izvršena na 14 ispitanika, dok je magnetna spektroskopija uključivala svega 5 ispitanika, koji su fizički aktivni, zdravi mladi muškarci. Ostaje nepoznato kako nova formulacija kreatina utiče na populaciju drugog uzrasta, pola i nivoa fizičke aktivnosti, kao i u slučaju različitih patoloških stanja. Naredna istraživanja bi trebala uključiti populaciju ženskog pola, usled snažnog uticaja hormona na biosintezu kreatina iz GAA (Bera et al., 2008). Potencijalno veći efekti novog tretmana očekivani su na populacijama koje karakterišu niže ćelijske rezerve kreatina, te buduća istraživanja treba da utvrde uticaj nove formulacije na osobe nižeg nivoa treniranosti, kao i osobe trećeg doba. Trenutna studija utvrdila je potencijalne benefite kombinacije Cr i GAA kod pojedinih patoloških stanja kao što je deficit CRT, koje je neophodno utvrditi narednim istraživanjima. Takođe, dalje studije su neophodne kako bi se potvrdila bezbednost novog tretmana, uz upotrebu većeg broja kliničkih testova za praćenje enzimskih aktivnosti i toksičnosti, kao i nuspojava prijavljenih od strane ispitanika. Ovo istraživanje nije uključivalo kontrolu ishrane i trenažnih aktivnosti, što u značajnoj meri može

uticati na efekte suplementacije. Iako je ispitanicima sugerisano da ne menjaju nutritivne i trenažne navike, ostaje nepoznato koliko kreatina su ispitanici unosili uobičajenom ishranom, dok je unos GAA ishranom očekivan kao minimalan (European Food Safety Authority, 2009). Naredne studije, u trajanju dužem od 4 nedelje treba da uključe praćenje nutritivnih navika i kontrolu dnevnog unosa Cr čime bi se preciznije utvrdili efekti i bezbednost tretmana. Kako povećanje ćelijskih rezervi Cr utiče na unapređenje trenažnog procesa, naredne studije dužeg trajanja treba da uključe kontrolu fizičke aktivnosti i utvrde dugoročne efekte unapređenja mišićne energetike na različite tipove fizičke aktivnosti u odnosu na dobro ispitane efekte suplementacije Cr. Pored toga, druge mišićne grupe mogu biti analizirane magnetnom spektroskopijom, čime bi se dobio jasniji uvid u unapređenje ćelijskih rezervi Cr u gornjim i donjim ekstremitetima zasebno, u svrhu boljeg razumevanja efekata tretmana u mišićima sa inicijalno nižim vrednostima Cr. Konačno, buduće studije treba da istraže kombinovani unos GAA i Cr u drugačijem odnosu od 1:3, kao i da utvrde razlike u odnosu na unos GAA zasebno, čime bi se utvrdio najefikasniji i najbezbedniji tretman.

Iz svega navedenog, kombinacija kreatina i GAA u odnosu 3:1 potvrdila se kao superioran tretman za unapređenje ćelijskih rezervi kreatina u mišićnom i moždanom tkivu u odnosu na kreatin, te dovela do značajnog povećanja snage gornjih i donjih ekstremiteta, praćenih značajno manjim povećanjem telesne mase tokom 4-nedeljnog tretmana kod zdravih, fizički aktivnih muškaraca. Pored toga, predloženi tretman je potpuno umanjio rizik od hiperhomocisteinemije u odnosu na unos GAA zasebno, te predstavlja bezbedniju nutritivnu intervenciju na istraživanoj populaciji.

7. ZAKLJUČAK

Uzimajući u obzir sve prethodno navedeno u ovom radu vezano za kombinovani unos kreatina i GAA, dolazi se do sledećih zaključaka:

- Tretman Cr+GAA doveo je do značajno manjeg povećanja telesne mase u odnosu na suplementaciju kreatinom zasebno. Manja osmotska aktivnosti novog tretmana može biti značajna u uslovima gde je stroga kontrola telesne mase neophodna.
- Tretman Cr+GAA doveo je do značajnog povećanja vrednosti Cr u serumu u odnosu na inicijalne vrednosti, a slični rezultati potvrđeni su i nakon unosa Cr, čime se potvrđuje povećana stopa energetskeg metabolizma u oba tretmana.
- Tretman Cr+GAA nije doveo do značajnog povećanja kreatinina u serumu koji je bio primećen u ranijim istraživanjima unosa GAA zasebno.
- Tretman Cr+GAA nije doveo do značajnog povećanja ukupnog homocisteina u serumu, čime je uspešno uklonjen glavni nedostatak suplementacije GAA, a novi tretman predstavljen kao superioran u svrhu smanjenja zdravstvenih rizika utvrđenih ranijim istraživanjima GAA.
- Tretman Cr+GAA potvrdio je statistički značajne efekte na snagu gornjih i donjih ekstremiteta. Statistički značajne razlike u testovima potisak sa ravne klupe slobodnim tegovima i prednji čučanj potvrđene su u odnosu na inicijalne vrednosti u oba tretmana. Statistički značajne razlike između tretmana nisu potvrđene ovim istraživanjem.
- Tretman Cr+GAA nije potvrdio značajne efekte na snagu stiska šake, sposobnost pojedinačnih i repetitivnih skokova, kao i parametre kardiorespiratorne izdržljivosti.
- Tretman Cr+GAA potvrdio je superiorne efekte na povećanje vrednosti kreatina u sivoj moždanoj masi u odnosu na tretman kreatinom zasebno. Novi tretman doveo je do dodatnog prosečnog povećanja od 4% u odnosu na kontrolni tretman. Ovi rezultati mogu biti o posebnog značaja u uslovima narušene ćelijske energetike moždanog tkiva.

- Tretman Cr+GAA nije statistički potvrdio značajne razlike u odnosu na unos Cr u beloj moždanoj masi. Ipak, novi tretman doveo je do dodatnog prosečnog povećanja vrednosti kreatina u beloj moždanoj masi od 6,3% u odnosu na kontrolni tretman.
- Tretman Cr+GAA potvrdio je statistički značajno povećanje vrednosti Cr u četvoroglavom mišiću natkolenice u odnosu na inicijalno merenje, te doveo do dodatnog prosečnog povećanja od 13,1% u odnosu na kontrolni tretman. Poštovanjem strožijih kriterijuma, uz upotrebu Bonferoni korekcije, značajne razlike nisu statistički potvrđene. Ovi rezultati predstavljaju Cr+GAA kao potencijalno superiorno ergogeno sredstvo u različitim fizičkim aktivnostima, kao i patološkim stanjima.

8. LITERATURA

1. 360 Research Reports. (2019). Global Creatine Market 2019 by Manufacturers, Regions, Type and Application, Forecast to 2024. Available at: <https://www.360researchreports.com/global-creatine-market-13813514> Assessed at March 8, 2022.
2. Adcock, K. H., Nedelcu, J., Loenneker, T., Martin, E., Wallimann, T., & Wagner, B. P. (2002). Neuroprotection of creatine supplementation in neonatal rats with transient cerebral hypoxia-ischemia. *Developmental neuroscience*, 24(5), 382-388.
3. Alsever, R. N., Georg, R. H., & Sussman, K. E. (1970). Stimulation of insulin secretion by guanidinoacetic acid and other guanidine derivatives. *Endocrinology*, 86(2), 332-336.
4. Andres, R. H., Ducray, A. D., Schlattner, U., Wallimann, T., & Widmer, H. R. (2008). Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain research bulletin*, 76(4), 329-343.
5. Antonio, J., & Ciccone, V. (2013). The effects of pre versus post workout supplementation of creatine monohydrate on body composition and strength. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 10(1), 1-8.
6. Arias, A., Corbella, M., Fons, C., Sempere, A., García-Villoria, J., Ormazabal, A., Poo, P., Pineda, M., Vilaseca, M. A., Campistol, J., Briones, P., Pampols, T., Salomons, G. S., Ribes, A., & Artuch, R. (2007). Creatine transporter deficiency: prevalence among patients with mental retardation and pitfalls in metabolite screening. *Clinical biochemistry*, 40(16-17), 1328-1331.
7. Aynsley-Green, A., & Alberti, K. G. M. M. (1974). In vivo stimulation of insulin secretion by guanidine derivatives in the rat. *Hormone and Metabolic Research*, 6(02), 115-120.
8. Balestrino, M., Sarocchi, M., Adriano, E., & Spallarossa, P. (2016). Potential of creatine or phosphocreatine supplementation in cerebrovascular disease and in ischemic heart disease. *Amino Acids*, 48(8), 1955-1967.
9. Balsom, P. D., Söderlund, K., Sjödin, B., & Ekblom, B. (1995). Skeletal muscle metabolism during short duration high-intensity exercise: influence of creatine supplementation. *Acta Physiologica Scandinavica*, 154(3), 303-310.

10. Balsom, P.D., Soderlund, K., & Ekblom, B. (1994). Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. *Sports medicine*, 18(4), 268-280.
11. Battini, R., Alessandrì, M. G., Leuzzi, V., Moro, F., Tosetti, M., Bianchi, M. C., & Cioni, G. (2006). Arginine: glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency in a newborn: early treatment can prevent phenotypic expression of the disease. *The Journal of pediatrics*, 148(6), 828-830.
12. Beard, H. H., & Barnes, B. O. (1931). The influence of feeding proteins, amino acids, and related substances upon creatine–creatinine metabolism. *J Biol Chem*, 94(1), 49-69.
13. Bender, A., & Klopstock, T. (2016). Creatine for neuroprotection in neurodegenerative disease: end of story?. *Amino Acids*, 48(8), 1929-1940.
14. Bera, S., Wallimann, T., Ray, S., & Ray, M. (2008). Enzymes of creatine biosynthesis, arginine and methionine metabolism in normal and malignant cells. *The FEBS journal*, 275(23), 5899-5909.
15. Bjelica, D., & Fratrić, F. (2011). *Sportski Trening : teorija, metodika i dijagnostika*. Podgorica: Fakultet za sport i fizičko vaspitanje iz Nikšića; Crnogorska sportska akademija iz Podgorice.
16. Borsook, H., & Borsook, M. E. (1951b). The biochemical basis of betaine-glycocyamine therapy. *Annals of western medicine and surgery*, 5(10), 825-829.
17. Borsook, M. E., & Borsook, H. (1951a). Treatment of cardiac decompensation with betaine and glycocyamine. *Annals of western medicine and surgery*, 5(10), 830-855.
18. Borsook, M. E., Billig, H. K., & Golseth, J. G. (1962). Betaine and glycocyamine in the treatment of disability resulting from acute anterior poliomyelitis. *Annals of Western Medicine and Surgery*, 6(7), 423-427.
19. Braissant, O., Béard, E., Torrent, C., & Henry, H. (2010). Dissociation of AGAT, GAMT and SLC6A8 in CNS: relevance to creatine deficiency syndromes. *Neurobiology of disease*, 37(2), 423-433.
20. Braissant, O., Henry, H., Loup, M., Eilers, B., & Bachmann, C. (2001). Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. *Molecular brain research*, 86(1-2), 193-201.

21. Branch, J. D. (2003). Effect of creatine supplementation on body composition and performance: a meta-analysis. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 13(2), 198-226.
22. Brosnan, M. E., & Brosnan, J.T. (2016). The role of dietary creatine. *Amino acids*, 48(8), 1785-1791.
23. Buford, T. W., Kreider, R. B., Stout, J. R., Greenwood, M., Campbell, B., Spano, M., Ziegenfuss, T., Lopez, H., Landis, J., & Antonio, J. (2007). International Society of Sports Nutrition position stand: creatine supplementation and exercise. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 4(1), 1-8.
24. Candow, D. G., Little, J. P., Chilibeck, P. D., Abeysekara, S., Zello, G. A., Kazachkov, M., Cornish, S. M., & Yu, P. H. (2008). Low-dose creatine combined with protein during resistance training in older men. *Med Sci Sports Exerc*, 40(9), 1645-52.
25. Chilibeck, P. D., Candow, D. G., Landeryou, T., Kaviani, M., & Paus-Jenssen, L. (2015). Effects of creatine and resistance training on bone health in postmenopausal women. *Med Sci Sports Exerc*, 47(8), 1587-1595.
26. Clark, J. F. (1996). Uses of creatine phosphate and creatine supplementation for the athlete. In M. A. Conway & J. F. Clark (Eds.), *Creatine and creatine phosphate: scientific and clinical perspectives* (pp. 217-226). San Diego: Academic Press.
27. Clark, J. F. (1997). Creatine and phosphocreatine: a review of their use in exercise and sport. *Journal of athletic training*, 32(1), 45.
28. Clark, J. F. (1998). Creatine: a review of its nutritional applications in sport. *Nutrition*, 14(3), 322-324.
29. Clarke, H., Hickner, R. C., & Ormsbee, M. J. (2021). The Potential Role of Creatine in Vascular Health. *Nutrients*, 13(3), 857.
30. Cockcroft, D. W., & Gault, H. (1976). Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*, 16(1), 31-41.
31. Cooke, M. B., Rybalka, E., Williams, A. D., Cribb, P. J., & Hayes, A. (2009). Creatine supplementation enhances muscle force recovery after eccentrically-induced muscle damage in healthy individuals. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 6(1), 1-11.

32. Cooper, R., Naclerio, F., Allgrove, J., & Jimenez, A. (2012). Creatine supplementation with specific view to exercise/sports performance: an update. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 9(1), 33.
33. Cooper, R., Naclerio, F., Allgrove, J., & Jimenez, A. (2012). Creatine supplementation with specific view to exercise/sports performance: an update. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 9(1), 1-11.
34. Curt, M. J. C., Cheillan, D., Briand, G., Salomons, G. S., Mention-Mulliez, K., Dobbelaere, D., Cuisset, J., Lion-Francois, L., Des Portes, V., Chabli, A., Valayannopoulos V., Benoist, J., Pinard, J., Simard, G., Douay, O., Deiva, K., Tardieu, M., Afenjar, A., & Vamecq, J. (2013). Creatine and guanidinoacetate reference values in a French population. *Molecular genetics and metabolism*, 110(3), 263-267.
35. Curt, M. J. C., Voicu, P. M., Fontaine, M., Dessein, A. F., Porchet, N., Mention-Mulliez, K., Dobbelaere, D., Soto-Ares, G., Cheillan, D., & Vamecq, J. (2015). Creatine biosynthesis and transport in health and disease. *Biochimie*, 119, 146-165.
36. Dai, W., Vinnakota, S., Qian, X., Kunze, D. L., & Sarkar, H. K. (1999). Molecular Characterization of the Human CRT-1 Creatine Transporter Expressed in *Xenopus* Oocytes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 361(1), 75-84.
37. Daly, M. M. (1985). Guanidinoacetate methyltransferase activity in tissues and cultured cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 236(2), 576-584.
38. Davenport, H. W., Fisher, R. B., & Wilhelmi, A. E. (1938). The metabolism of creatine: the role of glycoyamine in creatine synthesis. *Biochemical Journal*, 32(2), 262.
39. De Deyn, P. P., & Macdonald, R. L. (1990). Guanidino compounds that are increased in cerebrospinal fluid and brain of uremic patients inhibit GABA and glycine responses on mouse neurons in cell culture. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 28(5), 627-633.
40. Deldicque, L., Décombaz, J., Zbinden Foncea, H., Vuichoud, J., Poortmans, J. R., & Francaux, M. (2008). Kinetics of creatine ingested as a food ingredient. *European journal of applied physiology*, 102(2), 133-143.
41. Derave, W., Marescau, B., Eede, E. V., Eijnde, B. O., De Deyn, P. P., & Hespel, P. (2004). Plasma guanidino compounds are altered by oral creatine supplementation in healthy humans. *Journal of Applied Physiology*, 97(3), 852-857.

42. Devries, M. C., & Phillips, S. M. (2014). Creatine supplementation during resistance training in older adults-a meta-analysis. *Med Sci Sports Exerc*, 46(6), 1194-203.
43. Dilger, R. N., Bryant-Angeloni, K., Payne, R. L., Lemme, A., & Parsons, C. M. (2013). Dietary guanidino acetic acid is an efficacious replacement for arginine for young chicks. *Poultry science*, 92(1), 171-177.
44. Edison, E. E., Brosnan, M. E., Aziz, K., & Brosnan, J. T. (2013). Creatine and guanidinoacetate content of human milk and infant formulas: implications for creatine deficiency syndromes and amino acid metabolism. *British journal of nutrition*, 110(6), 1075-1078.
45. Edison, E. E., Brosnan, M. E., Meyer, C., & Brosnan, J. T. (2007). Creatine synthesis: production of guanidinoacetate by the rat and human kidney in vivo. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 293(6), 1799-1804.
46. Eijnde, B. O. T., Ursø, B., Richter, E. A., Greenhaff, P. L., & Hespel, P. (2001). Effect of oral creatine supplementation on human muscle GLUT4 protein content after immobilization. *Diabetes*, 50(1), 18-23.
47. European Food Safety Authority (EFSA). (2009). Safety and efficacy of guanidinoacetic acid as feed additive for chickens for fattening. *Efsa Journal*, 7(3), 988.
48. Evangelidou, A., Vasilaki, K., Karagianni, P., & Nikolaidis, N. (2009). Clinical applications of creatine supplementation on paediatrics. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(7), 683-690.
49. Fazio, C., Elder, C. L., & Harris, M. M. (2021). Efficacy of alternative forms of creatine supplementation on improving performance and body composition in healthy subjects: A systematic review. *The Journal of Strength & Conditioning Research*. Doi: 10.1519/JSC.0000000000003873
50. Ganguly, P., & Alam, S. F. (2015). Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutrition journal*, 14(1), 1-10.
51. Gastin, P. B. (2001). Energy system interaction and relative contribution during maximal exercise. *Sports medicine*, 31(10), 725-741.
52. Grassi, B. (2005). Delayed metabolic activation of oxidative phosphorylation in skeletal muscle at exercise onset. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 37(9), 1567.

53. Graybiel, A., & Patterson, C. A. (1951). Use of betaine and glycocholine in the treatment of patients with heart disease: preliminary report. *Annals of Western Medicine and Surgery*, 5(10), 863-875.
54. Green, A. L., Hultman, E., Macdonald, I. A., Sewell, D. A., & Greenhaff, P. L. (1996). Carbohydrate ingestion augments skeletal muscle creatine accumulation during creatine supplementation in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 271(5), 821-826.
55. Greenhaff, P. L. (1997). The nutritional biochemistry of creatine. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 8(11), 610-618.
56. Greenhaff, P. L., Casey, A., Short, A. H., Harris, R., Soderlund, K., & Hultman, E. (1993). Influence of oral creatine supplementation of muscle torque during repeated bouts of maximal voluntary exercise in man. *Clinical Science*, 84(5), 565-571.
57. Greenhaff, P. L., Nevill, M. E., Soderlund, K., Bodin, K., Boobis, L. H., Williams, C., & Hultman, E. (1994). The metabolic responses of human type I and II muscle fibres during maximal treadmill sprinting. *The Journal of physiology*, 478(1), 149-155.
58. Grujić, N. (2004). *Fiziologija sporta*. Novi Sad: Futura.
59. Guthmiller, P., Van Pilsum, J. F., Boen, J. R., & McGuire, D. M. (1994). Cloning and sequencing of rat kidney L-arginine: glycine amidinotransferase. Studies on the mechanism of regulation by growth hormone and creatine. *Journal of Biological Chemistry*, 269(26), 17556-17560.
60. Hanna-El-Daher, L., Béard, E., Henry, H., Tenenbaum, L., & Braissant, O. (2015). Mild guanidinoacetate increase under partial guanidinoacetate methyltransferase deficiency strongly affects brain cell development. *Neurobiology of disease*, 79, 14-27.
61. Hardie, D. G. (2004). AMP-activated protein kinase: a key system mediating metabolic responses to exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 36(1), 28-34.
62. Harris, R. C., Söderlund, K., & Hultman, E. (1992). Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clinical science*, 83(3), 367-374.
63. Herda, T. G., & Cramer, J. T. (2017). Bioenergetika vežbanja i treninga. In G.G. Haff & N. T. Triplett (Eds.), *Osnove treninga snage i kondicionog treninga* (pp. 43-64). Beograd: DATA STATUS.

64. Hespel, P., Op't Eijnde, B., Leemputte, M. V., Ursø, B., Greenhaff, P. L., Labarque, V., Dymarkowski, S., Van Hecke, P., & Richter, E. A. (2001). Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. *The Journal of physiology*, 536(2), 625-633.
65. Hiramatsu, M. (2003). A role for guanidino compounds in the brain. *Molecular and cellular biochemistry*, 244(1), 57-62.
66. Hultman, E., Soderlund, K., Timmons, J. A., Cederblad, G., & Greenhaff, P. L. (1996). Muscle creatine loading in men. *Journal of applied physiology*, 81(1), 232-237.
67. Jäger, R., Purpura, M., Shao, A., Inoue, T., & Kreider, R. B. (2011). Analysis of the efficacy, safety, and regulatory status of novel forms of creatine. *Amino acids*, 40(5), 1369-1383.
68. James, E., & Morrison, J. F. (1966). The reaction of phosphages with ATP: Creatine phosphotransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation*, 128(2), 327-336.
69. Kelly, V. G., & Jenkins, D. G. (1998). Effect of oral creatine supplementation on near-maximal strength and repeated sets of high-intensity bench press exercise. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 12(2), 109-115.
70. Kilduff, L. P., Georgiades, E., James, N., Minnion, R. H., Mitchell, M., Kingsmore, D., Hadjicharalambous, M., & Pitsiladis, Y. P. (2004). The effects of creatine supplementation on cardiovascular, metabolic, and thermoregulatory responses during exercise in the heat in endurance-trained humans. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 14(4), 443-460.
71. Kley, R. A., Tarnopolsky, M. A., & Vorgerd, M. (2013). Creatine for treating muscle disorders. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (6).
72. Kovačević, Z. L. (2006). *Biohemija i molekularna biologija*. Novi Sad: Medicinski fakultet iz Novog Sada.
73. Kreider, R. B. (2003). Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations. *Molecular and cellular biochemistry*, 244(1), 89-94.
74. Kreider, R. B., & Stout, J. R. (2021). Creatine in health and disease. *Nutrients*, 13(2), 447.
75. Kreider, R. B., Kalman, D. S., Antonio, J., Ziegenfuss, T. N., Wildman, R., Collins, R., Candow, D. G., Kleiner, S. M., Almada, A. L., & Lopez, H. L. (2017). International Society of Sports Nutrition position stand: safety and efficacy of creatine supplementation in

- exercise, sport, and medicine. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 14(1), 1-18.
76. Kreider, R. B., Melton, C., Rasmussen, C. J., Greenwood, M., Lancaster, S., Cantler, E. C., Milnor, P., & Almada, A. L. (2003). Long-term creatine supplementation does not significantly affect clinical markers of health in athletes. *Molecular and cellular biochemistry*, 244(1), 95-104.
77. Lanhers, C., Pereira, B., Naughton, G., Trousselard, M., Lesage, F. X., & Dutheil, F. (2015). Creatine supplementation and lower limb strength performance: a systematic review and meta-analyses. *Sports Medicine*, 45(9), 1285-1294.
78. Lanhers, C., Pereira, B., Naughton, G., Trousselard, M., Lesage, F. X., & Dutheil, F. (2017). Creatine supplementation and upper limb strength performance: A systematic review and meta-analysis. *Sports medicine*, 47(1), 163-173.
79. Law, Y. L. L., Ong, W. S., GillianYap, T. L., Lim, S. C. J., & Von Chia, E. (2009). Effects of two and five days of creatine loading on muscular strength and anaerobic power in trained athletes. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 23(3), 906-914.
80. Lygate, C. A., Aksentijevic, D., Dawson, D., Ten Hove, M., Phillips, D., de Bono, J. P., Medway, D. J., Sebag-Montefiore, L., Hunyor, I., Chanon, K. M., Clarke, K., Zervou, S., Watkins, H., Balaban, R. S., & Neubauer, S. (2013). Living without creatine: unchanged exercise capacity and response to chronic myocardial infarction in creatine-deficient mice. *Circulation research*, 112(6), 945-955.
81. Ma, T. M., Friedman, D. L., & Roberts, R. (1996). Creatine phosphate shuttle pathway in tissues with dynamic energy demand. In M.A. Conway & J.F. Clark (Eds.) *Creatine and Creatine Phosphate: Scientific and Clinical Perspectives* (pp. 17-32). San Diego: Academic press.
82. MacNeil, L., Hill, L., MacDonald, D., Keefe, L., Cormier, J. F., Burke, D. G., & Smith-Palmer, T. (2005). Analysis of creatine, creatinine, creatine-d3 and creatinine-d3 in urine, plasma, and red blood cells by HPLC and GC-MS to follow the fate of ingested creatine-d3. *Journal of Chromatography B*. 827(2), 210–215.
83. McArdle, W. D., Katch F. I., & Katch, V. L. (2007). *Exercise physiology: nutrition, energy, and human performance*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

84. McBreaity, L. E., Robinson, J. L., Furlong, K. R., Brunton, J. A., & Bertolo, R. F. (2015). Guanidinoacetate is more effective than creatine at enhancing tissue creatine stores while consequently limiting methionine availability in Yucatan miniature pigs. *PLoS One*, 10(6), e0131563.
85. Mccall W., Persky A.M. (2007) Pharmacokinetics of Creatine. In Salomons G.S., Wyss M. (Eds.) *Creatine and Creatine Kinase in Health and Disease*. Subcellular Biochemistry, vol 46. (pp. 261-274) Dodrecht: Springer.
86. Meyer, L. E., Machado, L. B., Santiago, A. P. S. A., da-Silva, W. S., De Felice, F. G., Holub, O., Oliveira, M. F., & Galina, A. (2006). Mitochondrial Creatine Kinase Activity Prevents Reactive Oxygen Species Generation. *The journal of biological chemistry*, 281(49), 37361-37371.
87. Michiels, J., Maertens, L., Buyse, J., Lemme, A., Rademacher, M., Dierick, N. A., & De Smet, S. (2012). Supplementation of guanidinoacetic acid to broiler diets: effects on performance, carcass characteristics, meat quality, and energy metabolism. *Poultry science*, 91(2), 402-412.
88. Momaya, A., Fawal, M., & Estes, R. (2015). Performance-enhancing substances in sports: a review of the literature. *Sports Medicine*, 45(4), 517-531.
89. Mori, A., Kohno, M., Masumizu, T., Noda, Y., & Packer, L. (1996). Guanidino compounds generate reactive oxygen species. *IUBMB Life*, 40(1), 135-143.
90. Neu, A., Neuhoff, H., Trube, G., Fehr, S., Ullrich, K., Roeper, J., & Isbrandt, D. (2002). Activation of GABAA receptors by guanidinoacetate: a novel pathophysiological mechanism. *Neurobiology of disease*, 11(2), 298-307.
91. Obeid, R. (2013). The metabolic burden of methyl donor deficiency with focus on the betaine homocysteine methyltransferase pathway. *Nutrients*, 5(9), 3481-3495.
92. Ostojic, S. M. (2015b). Advanced physiological roles of guanidinoacetic acid. *European journal of nutrition*, 54(8), 1211-1215.
93. Ostojic, S. M. (2017). Tackling guanidinoacetic acid for advanced cellular bioenergetics. *Nutrition*, 34, 55-57.
94. Ostojic, S. M., & Forbes, S. C. (2022). Perspective: Creatine, a conditionally essential nutrient: Building the case. *Advances in Nutrition*, 13(1), 34-37.

95. Ostojic, S. M., & Ostojic, J. (2018). Dietary guanidinoacetic acid does not accumulate in the brain of healthy men. *European journal of nutrition*, 57(8), 3003-3005.
96. Ostojic, S. M., Drid, P., & Ostojic, J. (2016b). Guanidinoacetic acid increases skeletal muscle creatine stores in healthy men. *Nutrition*, 32(6), 723.
97. Ostojic, S. M., Hoffman, J. R., Stojanovic, M., & Drid, P. (2015c). 28-day GAA supplementation improves clinical outcomes in patients with chronic fatigue syndrome. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 48(5), S47.
98. Ostojic, S. M., Mojsin, M., Drid, P., & Vranes, M. (2018a). Does dietary provision of guanidinoacetic acid induce global DNA hypomethylation in healthy men and women?. *Lifestyle Genomics*, 11(1), 16-18.
99. Ostojic, S. M., Niess, B., Stojanovic, M., & Obrenovic, M. (2013a). Creatine metabolism and safety profiles after six-week oral guanidinoacetic acid administration in healthy humans. *International journal of medical sciences*, 10(2), 141.
100. Ostojic, S. M., Niess, B., Stojanovic, M., & Obrenovic, M. (2013b). Co-administration of methyl donors along with guanidinoacetic acid reduces the incidence of hyperhomocysteinaemia compared with guanidinoacetic acid administration alone. *British journal of nutrition*, 110(5), 865-870.
101. Ostojic, S. M., Ostojic, J., Drid, P., & Vranes, M. (2016a). Guanidinoacetic acid versus creatine for improved brain and muscle creatine levels: a superiority pilot trial in healthy men. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 41(9), 1005-1007.
102. Ostojic, S. M., Ostojic, J., Drid, P., Vranes, M., & Jovanov, P. (2017). Dietary guanidinoacetic acid increases brain creatine levels in healthy men. *Nutrition*, 33, 149-156.
103. Ostojic, S. M., Ratgeber, L., Olah, A., Betlehem, J., & Acs, P. (2020). Guanidinoacetic acid deficiency: a new entity in clinical medicine?. *International Journal of Medical Sciences*, 17(16), 2544.
104. Ostojic, S. M., Stajer, V., Ratgeber, L., Betlehem, J., & Acs, P. (2022). Guanidinoacetic Acid Consumption via Regular Diet in Adults. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 78(1), 46-47.
105. Ostojic, S. M., Stojanovic, M. D., & Hoffman, J. R. (2015a). Six-week oral guanidinoacetic acid administration improves muscular performance in healthy volunteers. *Journal of Investigative Medicine*, 63(8), 942-946.

106. Ostojic, S. M., Stojanovic, M. D., & Olcina, G. (2015d). Oxidant-antioxidant capacity of dietary guanidinoacetic acid. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 67(4), 243-246.
107. Ostojic, S. M., Stojanovic, M., Drid, P., & Hoffman, J. R. (2014). Dose–response effects of oral guanidinoacetic acid on serum creatine, homocysteine and B vitamins levels. *European journal of nutrition*, 53(8), 1637-1643.
108. Ostojic, S. M., Stojanovic, M., Drid, P., Hoffman, J. R., Sekulic, D., & Zenic, N. (2016c). Supplementation with guanidinoacetic acid in women with chronic fatigue syndrome. *Nutrients*, 8(2), 72.
109. Ostojic, S. M., Trivic, T., Drid, P., Stajer, V., & Vranes, M. (2018b). Effects of guanidinoacetic acid loading on biomarkers of cardiometabolic risk and inflammation. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 72(1), 18-20.
110. Ostojić, S. M. (2007). *Osnovi fiziologije sporta: odabrana poglavlja*. Novi Sad: TIMS Fakultet za sport i turizam.
111. Peeters, B. M., Lantz, C. D., & Mayhew, J. L. (1999). Effect of oral creatine monohydrate and creatine phosphate supplementation on maximal strength indices, body composition, and blood pressure. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 13(1), 3-9.
112. Póo-Argüelles, P., Arias, A., Vilaseca, M. A., Ribes, A., Artuch, R., Sans-Fito, A., Moreno, A., Jakobs, C., & Salomons, G. (2006). X-Linked creatine transporter deficiency in two patients with severe mental retardation and autism. *Journal of inherited metabolic disease*, 29(1), 220-223.
113. Portocarero, N., & Braun, U. (2021). The physiological role of guanidinoacetic acid and its relationship with arginine in broiler chickens. *Poultry Science*, 100(7), 101203.
114. Powers, M. (2012). GABA supplementation and growth hormone response. *Acute Topics in Sport Nutrition*, 59, 36-46.
115. Rae, C., Digney, A. L., McEwan, S. R., & Bates, T. C. (2003). Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double–blind, placebo–controlled, cross–over trial. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1529), 2147-2150.

116. Rawson, E. S., & Volek, J. S. (2003). Effects of creatine supplementation and resistance training on muscle strength and weightlifting performance. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 17(4), 822-831.
117. Rowley, G. L., Greenleaf, A. L., & Kenyon, G. L. (1971). Specificity of creatine kinase. New glycoamines and glycoamine analogs related to creatine. *Journal of the American Chemical Society*, 93(21), 5542-5551.
118. Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M., & Wallimann, T. (2006). Molecular structure and function of mitochondrial creatine kinases. In V.N. Uversky VN (Ed.), *Creatine kinase—biochemistry, physiology, structure and function* (pp. 123-170). New York: Nova Science Publishers.
119. Schulze, A. (2003) Creatine deficiency syndromes. In J.F. Clark (Ed.), *Guanidino Compounds in Biology and Medicine. Molecular and Cellular Biochemistry*, (Vol. 40, pp. 143-150). Boston: Springer.
120. Sestili, P., Martinelli, C., Bravi, G., Piccoli, G., Curci, R., Battistelli, M., Falcieri, E., Agostini, D., Gioacchini, A. M., & Stocchi, V. (2006). Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(5), 837-849.
121. Shulman, R. G., Rothman, D. L., Behar, K. L., & Hyder, F. (2004). Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends in neurosciences*, 27(8), 489-495.
122. Snow, R. J., & Murphy, R. M. (2001). Creatine and the creatine transporter: a review. *Molecular and cellular biochemistry*, 224(1), 169-181.
123. Solis, M. Y., de Salles Painelli, V., Artioli, G. G., Roschel, H., Otaduy, M. C., & Gualano, B. (2014). Brain creatine depletion in vegetarians? A cross-sectional 1H-magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS) study. *British journal of nutrition*, 111(7), 1272-1274.
124. Stacy, J. J., Terrell, T. R., & Armsey, T. D. (2004). Ergogenic aids: human growth hormone. *Current Sports Medicine Reports*, 3(4), 229-233.
125. Stockler-Ipsiroglu, S., & van Karnebeek, C. D. (2014). Cerebral creatine deficiencies: a group of treatable intellectual developmental disorders. *Seminars in neurology* 34(3),350-356.
126. Stockler-Ipsiroglu, S., Stromberger, C., Mühl, A., Alessandrì, M. G., Bianchi, M. C., Tosetti, M., Fornai, F., & Cioni, G. (2001). Arginine: glycine amidinotransferase deficiency:

- the third inborn error of creatine metabolism in humans. *The American Journal of Human Genetics*, 69(5), 1127-1133.
127. Stockler-Ipsiroglu, S., van Karnebeek, C., Longo, N., Korenke, G. C., Mercimek-Mahmutoglu, S., Marquart, I., Barshop, B., Grolik, C., Schlune, A., Angle, B., Araujo, H. C., Coskun, T., Diogo, L., Geraghty, M., Haliloglu, G., Konstantopoulou, V., Leuzzi, V., Levtova, A., & Schulze, A. (2014). Guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency: outcomes in 48 individuals and recommendations for diagnosis, treatment and monitoring. *Molecular Genetics and Metabolism*, 111(1), 16-25.
128. Swain, D. P., Brawner, C. A., & American College of Sports Medicine. (2014). *ACSM's resource manual for guidelines for exercise testing and prescription*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
129. Syrotuik, D. G., Bell, G. J., Burnham, R., Sim, L. L., Calvert, R. A., & Maclean, I. M. (2000). Absolute and relative strength performance following creatine monohydrate supplementation combined with periodized resistance training. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 14(2), 182-190.
130. Tachikawa, M., Fujinawa, J., Takahashi, M., Kasai, Y., Fukaya, M., Sakai, K., Yamazaki, M., Tomi, M., Watanabe, M., Sakimura, K., Terasaki, T., & Hosoya, K. I. (2008). Expression and possible role of creatine transporter in the brain and at the blood-cerebrospinal fluid barrier as a transporting protein of guanidinoacetate, an endogenous convulsant. *Journal of neurochemistry*, 107(3), 768-778.
131. Tachikawa, M., Ikeda, S., Fujinawa, J., Hirose, S., Akanuma, S. I., & Hosoya, K. I. (2012). γ -Aminobutyric acid transporter 2 mediates the hepatic uptake of guanidinoacetate, the creatine biosynthetic precursor, in rats. *PLoS one*, 7(2), e32557.
132. Tachikawa, M., Kasai, Y., Yokoyama, R., Fujinawa, J., Ganapathy, V., Terasaki, T., & Hosoya, K. I. (2009). The blood-brain barrier transport and cerebral distribution of guanidinoacetate in rats: involvement of creatine and taurine transporters. *Journal of neurochemistry*, 111(2), 499-509.
133. Tong, B. C., & Barbul, A. (2004). Cellular and physiological effects of arginine. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 4(8), 823-832.

134. van Deursen, J., Heerschap, A., Oerlemans, F., Rultenbeek, W., Jap, P., ter Laak, H., & Wieringa, B. (1993). Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity. *Cell*, 74(4), 621-631.
135. Volek, J. S., Mazzetti, S. A., Farquhar, W. B., Barnes, B. R., Gómez, A. L., & Kraemer, W. J. (2001). Physiological responses to short-term exercise in the heat after creatine loading. *Medicine and science in sports and exercise*, 33(7), 1101-1108.
136. Volek, J. S., Ratamess, N. A., Rubin, M. R., Gomez, A. L., French, D. N., McGuigan, M. M., Scheett, T. P., Sharman, M. J., Hakkinen, K., & Kraemer, W. J. (2004). The effects of creatine supplementation on muscular performance and body composition responses to short-term resistance training overreaching. *European journal of applied physiology*, 91(5), 628-637.
137. Walker, J. B. (1979). Creatine: biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 50(177), 2.
138. Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M., & Schlattner, U. (2011). The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino acids*, 40(5), 1271-1296.
139. Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M., Neumann, D., Epanand, R. M., Epanand, R. F., Andres, R. H., Widmer, H. R., Hornemann, T., Saks, V., Agarkova, I., & Schlattner, U. (2007). The phosphocreatine circuit: molecular and cellular physiology of creatine kinases, sensitivity to free radicals, and enhancement by creatine supplementation. In V. Saks (Ed.), *Molecular system bioenergetics: Energy for life* (pp. 195-264). Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
140. Wang, L. S., Shi, B. M., Shan, A. S., & Zhang, Y. Y. (2012). Effects of guanidinoacetic acid on growth performance, meat quality and antioxidation in growing-finishing pigs. *Journal of animal and veterinary advances*, 11(5), 63-68.
141. Watanabe, A., Kato, N., & Kato, T. (2002). Effects of creatine on mental fatigue and cerebral hemoglobin oxygenation. *Neuroscience research*, 42(4), 279-285.
142. Watson, G., Casa, D. J., Fiala, K. A., Hile, A., Roti, M. W., Healey, J. C., Armstrong, L. E., & Maresh, C. M. (2006). Creatine use and exercise heat tolerance in dehydrated men. *Journal of athletic Training*, 41(1), 18.

143. Wax, B., Kerksick, C. M., Jagim, A. R., Mayo, J. J., Lyons, B. C., & Kreider, R. B. (2021). Creatine for exercise and sports performance, with recovery considerations for healthy populations. *Nutrients*, 13(6), 1915.
144. Weber, C. J. (1934). Isolation of glycocholine from urine. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 32(1), 172-174.
145. Zhu, S., Li, M., Figueroa, B. E., Liu, A., Stavrovskaya, I. G., Pasinelli, P., Flint Beal, M., Brown Jr, R. H., Kristal, B. S., Ferrante, R. J., & Friedlander, R. M. (2004). Prophylactic creatine administration mediates neuroprotection in cerebral ischemia in mice. *Journal of Neuroscience*, 24(26), 5909-5912.
146. Zugno, A. I., Oliveira, D. L., Scherer, E., Wajner, M., Wofchuk, S., & Wyse, A. T. (2007). Guanidinoacetate inhibits glutamate uptake in rat striatum of rats at different ages. *Neurochemical research*, 32(6), 959-964.
147. Zugno, A. I., Stefanello, F. M., Scherer, E., Mattos, C., Pederzoli, C. D., Andrade, V. M., Wannmacher, C. M. D., Wajner, M., Dutra-Filho, C. S., & Wyse, A. T. (2008). Guanidinoacetate decreases antioxidant defenses and total protein sulfhydryl content in striatum of rats. *Neurochemical Research*, 33(9), 1804-1810.
148. Zugno, A. I., Stefanello, F. M., Streck, E. L., Calcagnotto, T., Wannmacher, C. M., Wajner, M., & Wyse, A. T. (2003). Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity in rat striatum by guanidinoacetate. *International journal of developmental neuroscience*, 21(4), 183-189.