



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Вељко З. Прокић

**Ефекти модулације метаболизма креатина
на функцију срца пацова изложених
интервалном тренингу високог интензитета**

докторска дисертација

Крагујевац, 2024. године



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Veljko Z. Prokić

**Efekti modulacije metabolizma kreatina na
funkciju srca pacova izloženih intervalnom
treningu visokog intenziteta**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2024.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Veljko Z. Prokić

**The effects of modulation of creatine
metabolism on heart function of rats exposed
to high-intensity interval training**

doctoral dissertation

Kragujevac, 2024.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор
Име и презиме: Вељко Прокић
Датум и место рођења: 18.04.1989. године, Ћуприја, Република Србија
Садашње запослење:
Докторска дисертација
Наслов: Ефекти модулације метаболизма креатина на функцију срца пацова изложених интервалном тренингу високог интензитета
Број страница: 101
Број слика: 9 слика, 23 табела, 18 графика
Број библиографских података: 180
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): медицина
Ментор: Проф. др Сузана Пантовић
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 17.10.2019.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: бр. IV-03-209/9 од 11.03.2020.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. Проф. др Владимир Живковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник; 2. Доц. др Јована Јоксимовић Јовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан; 3. Проф. др Драган Радовановић, редовни професор Факултета физичке културе и спорта Универзитета у Нишу за ужу научну област Физиологија, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: 1. Проф. др Владимир Живковић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник; 2. Доц. др Јована Јоксимовић Јовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан; 3. Проф. др Драган Радовановић, редовни професор Факултета физичке културе и спорта Универзитета у Нишу за ужу научну област Физиологија, члан
Датум одбране дисертације:

IDENTIFIKACIONA STRANICA DOKTORSKE DISERTACIJE

Autor
Ime i prezime: Veljko Prokić
Datum i mesto rođenja: 18.04.1989. godine, Čuprija Republika Srbija
Sadašnje zaposlenje:
Doktorska disertacija
Naslov: Efekti modulacije metabolizma kreatina na funkciju srca pacova izloženih intervalnom treningu visokog intenziteta
Broj stranica: 101
Broj slika: 9 slika, 23 tabela, 18 grafika
Broj bibliografskih podataka: 180
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac
Naučna oblast (UDK): medicina
Mentor: Prof. dr Suzana Pantović
Ocena i odbrana
Datum prijave teme: 17.10.2019.
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske/umetničke disertacije: бр. IV-03-209/9 од 11.03.2020.
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: 1. Prof. dr Vladimir Živković, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, predsednik; 2. Doc. dr Jovana Joksimović Jović, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, član; 3. Prof. dr Dragan Radovanović, redovni profesor Fakulteta fizičke kulture i sporta Univerziteta u Nišu za užu naučnu oblast Fiziologija, član.
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije: 1. Prof. dr Vladimir Živković, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, predsednik; 2. Doc. dr Jovana Joksimović Jović, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, član; 3. Prof. dr Dragan Radovanović, redovni profesor Fakulteta fizičke kulture i sporta Univerziteta u Nišu za užu naučnu oblast Fiziologija, član.
Datum odbrane disertacije:

DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

Author
Name and surname: Veljko Prokic
Date and place of birth: 18.04.1989. godine, Cuprija , Republic of Serbia
Current employment:
Doctoral Dissertation
Title: The effects of modulation of creatine metabolism on heart function of rats exposed to high-intensity interval training
No. of pages: 101
No. of images: 9 image, 23 tables, 18 graphs
No. of bibliographic data: 180
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac
Scientific area (UDK): medicine
Mentor: Assoc. prof. Suzana Pantovic
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 17.10.2019.
Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic: no. IV-03-209/9 од 11.03.2020.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: 1. Prof. Vladimir Zivkovic, Associate professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Physiology, president; 2. Prof. dr Jovana Joksimovic Jovic, Assistant Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Physiology, member; 3. Prof. dr Dragan Radovanovic, Full professor at the Faculty of physical culture and sport, University of Nis, Physiology, member.
Commission for evaluation and defense of the doctoral dissertation: 1. Prof. Vladimir Zivkovic, Full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Physiology, president; 2. Prof. dr Jovana Joksimovic Jovic, Assistant Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Physiology, member; 3. Prof. dr Dragan Radovanovic, Full professor at the Faculty of physical culture and sport, University of Nis, Physiology, member.
Date of Dissertation Defense:

Сажетак

Увод: Последњих година, интервални тренинг високог интензитета у комбинацији са различитим ергогеним средствима постао је веома популаран модалитет тренинга међу спортистима.

Циљ: Циљ ове студије је да се испитају ефекти самосталне и удружене суплементације креатином, бетаином, гванидиноацетатом код тренираних пацова на функцију срца, оксидациони стрес и на морфолошку грађу срца.

Методе: У студију је укључено 72 пацова (Wistar albino соја, мушког пола, старости 8 недеља) разврстани у 9 група: 1. КОН- контрола, 2. Т- тренинг, 3. Т+Б – тренинг и бетаин, 4. Т+К – тренинг и креатин, 5. Т+Б+К – тренинг и бетаин и креатин 6. Т+Г – тренинг и гванидиноацетат, 7. Т+Г+К – тренинг и гванидиноацетат и креатин, 8. Т+Г+Б – тренинг и гванидиноацетат и бетаин, и 9. Т+Г+К+Б – тренинг и гванидиноацетат, креатин и бетаин. Изоловано срце пацова је перфундовано методом ретроградне перфузије по Langendorff-у и праћени су следећи параметри: $dp/dt \max$, $dp/dt \min$, SLVP, DLVP и HR. У узорцима коронарног венског ефлуента и у крви пацова одређивани су параметри оксидационог стреса. Изолована срца, квадрицепс, јетра и бубрези су ритински припремљени за хистолошку анализу.

Резултати: Суплементација креатином, бетаином и гванидиноацетатом побољшава функцију миокарда, снижава вредности прооксиданаса а повећава вредности антиоксиданаса. Највећи степен хипертрофије кардиомицита, највеће повећање депоа SERCA пумпе у срцу, као и највеће смањење садржаја колагена у срцу било је у групи животиња које су тренирале и биле на суплементацији гванидиноацетатом.

Закључак: Суплементација ергогеним средствима код тренираних пацова побољшава кардиодинамске параметре и оксидациони стрес изолованог срца пацова.

Кључне речи: трчање, кардиодинамика, креатин, гванидиноацетат, оксидациони стрес

Abstract

Introduction: In recent years, high-intensity interval training combined with various ergogenic means has become a very popular training modality among athletes.

Objective: The aim of the study is to examine the effects of independent and combined supplementation with creatine, betaine, guanidinoacetate in trained rats on cardiac function, oxidative stress and morphological structure of the heart.

Methods: The study included 72 rats (Wistar albino, male, 8 weeks old) divided into 9 groups: 1. KON- control, 2. T- training, 3. T+B- training and betaine, 4. T+K- training and creatine, 5. T+B+K- training and betaine and creatine 6. T+G- training and guanidinoacetate, 7. T+G+K- training and guanidinoacetate and creatine, 8. T+G+B- training and guanidinoacetate and betaine, and 9. T+G+K+B- training and guanidinoacetate, creatine and betaine. The isolated rat heart was perfused using the Langendorff retrograde perfusion method and the following parameters were monitored: dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP and HR. Oxidative stress parameters were determined in the samples of coronary venous effluent and in the blood of rats. Isolated hearts, quadriceps, livers and kidneys were routinely prepared for histological analysis.

Results: Supplementation with creatine, betaine and guanidinoacetate improves myocardial function, lowers prooxidant values and increases antioxidant values. The highest degree of cardiomyocyte hypertrophy, the highest increase in the SERCA pump depot in the heart, as well as the highest decrease in collagen content in the heart was in the group of animals that trained and were supplemented with guanidinoacetate.

Conclusion: Supplementation with erogenous agents in trained rats improves cardiodynamic parameters and oxidative stress in the isolated rat heart.

Key words: running, cardiodynamics, creatine, guanidinoacetate, oxidative stress

САДРЖАЈ

1. УВОД	2
1.1. Физичка активност.....	2
1.1.2. Ефекти физичке активности на кардиоваскуларни систем.....	3
1.2. Креатин као ергогено средство.....	4
1.2.1. Метаболичка улога креатина	4
1.2.2. Суплементација креатином.....	5
1.3. Бетаин као ергогено средство	7
1.3.1. Суплементација бетаином	8
1.4. Гванидиноацетат као ергогено средство	8
1.4.1. Механизам деловања гванидиноацетата.....	9
1.5. Удružена супламентација и тренинг.....	10
1.6. Редокс статус	12
1.6.1. Ефекат тренинга на редокс статус	12
1.6.2. Креатин као антиоксиданс	13
1.6.3. Бетаин као антиоксиданс	14
1.6.4. Гванидиноацетат као антиоксиданс.....	14
2. Циљеви и хипотезе.....	17
2.1 Циљеви студије	17
2.2. Хипотезе студије.....	17
3. Материјал и методе.....	19
3.1. Експериментални протокол	19
3.2. Протокол интервалног тренинга високог интензитета	19
3.3. Суплементација ергогеним средствима	22
3.4. Ex vivo протокол на изолованом срцу	22
3.5. Биохемијске анализе	22
3.5.1. Одређивање концентрације ензима СК , СК-МВ и СК-ММ	23
3.6. Одређивање параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту и плазми	23
3.6.1. Одређивање супероксид анјон радикала - O ₂ ⁻	23
3.6.2. Одређивање водоник пероксида - H ₂ O ₂	23

3.6.3. Одређивање вредности индекса липидне пероксидације - TBARS.....	24
3.6.4. Одређивање вредности нитрита - NO ₂ -	24
3.6.5. Одређивање активности каталазе - CAT	24
3.6.6. Одређивање активности супероксид дисмутаза - SOD	25
3.6.7. Одређивање вредности редукованог глутатиона - GSH	25
3.7. Методологија хистолошког бојења	25
3.7.1. Морфометријска анализа срчаног и скелетног мишића	26
3.7.2. Имунохемијско обележавање колагених влакана у срцу - Picro-sirius red бојење	26
3.7.3. Имунихистохемијско обележавање Heat shock протеина 70 и SERCA пумпе у срцу	26
3.8. Статистичка анализа резултата.....	27
4. РЕЗУЛТАТИ	28
4.1. Кардиодинамски параметри изолованог срца пацова	29
4.1.1. Максимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt max)	29
4.1.2. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt min)	31
4.1.3. Систолни притисак леве коморе изолованог срца пацова (SLVP)	33
4.1.4. Дијастолни притисак леве коморе изолованог срца пацова (DLVP)	35
4.1.5. Срчана фреквенца изолованог срца пацова (HR)	37
4.1.6. Коронарни проток изолованог срца пацова (CF)	39
4.2. Редокс статус у коронарном венском ефлуенту	41
4.2.1. Супероксид анјон радикал (O ₂ -)	41
4.2.2. Водоник пероксид (H ₂ O ₂)	43
4.2.3. Индекс липидне пероксидације (TBARS)	45
4.2.4. Нитрити (NO ₂ -)	47
4.3. Системски редокс статус	49
4.3.1.Прооксидативни маркери	49
4.3.1.1. Супероксид анјон радикал	49
4.3.1.2.Водоник пероксид	50
4.3.1.3. Нитрити	51

4.3.1.4. Индекс липидне пероксидације	52
4.3.2. Маркери антиоксидативне заштите	53
4.3.2.1. Каталаза (CAT)	53
4.3.2.2. Супероксид дисмутаза (SOD)	54
4.3.2.3. Редуковани глутатион (GSH)	55
4.4. Биохемијске анализе	56
4.4.1. Креатин киназа (СК)	56
4.4.2. Креатин киназа (СК-ММ)	57
4.4.3. Креатин киназа (СК-МВ)	58
4.5. Морфометријска анализа срца	59
4.5.1. Дебљина зида леве коморе срца	59
4.5.2. Дијаметар срчаних мишићних ћелија (кардиомиоцита)	60
4.5.3. Површине срчаних мишићних ћелија (кардиомиоцита)	61
4.5.4. Морфометријска анализа колагених влакана у срцу	64
4.5.5. HSP 70 у срцу	66
4.5.6. SERCA пумпа у срцу	68
4.6. Морфометријска анализа скелетног мишића	70
4.6.1. Површина скелетне мишићне ћелије	70
4.6.2. Дијаметар скелетне мишићне ћелије	71
4.7. Морфолошка анализа јетре	72
4.8. Морфолошка анализа бубрега	73
5. Дискусија	76
5.1. Ефекти самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на кардиодинамске параметре срца	77
5.2. Ефекти самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на редок статус	79
5.3. Ефекти самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на морфометријске параметре срца	80
5.4. Ефекти самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на морфометријске параметре скелетног мишића.....	81

5.5. Ефекти самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на садржај колагена, HSP 70 и SERCA пумпу у срца	82
5.6. Ефекти самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на серумске вредности СК, СК-МВ и СК-ММ	83
5.7. Безбедност супламентације ергогеним средствима	84
6. ЗАКЉУЧЦИ	86
7. ЛИТЕРАТУРА	89

1.

Увод

1. Увод

1.1. Физичка активност

Физичка активност представља контролисано и планирано вежбање које има за циљ да одржи, односно побољша једну или више компоненти физичке спремности, моторичких способности и здравља. Редовна физичка активност сматра се незаобилазним фактором правилног начина живота, а постоји и велики број доказа који сведоче о томе да има благотворне ефекте на поједина хронична обољења (1).

У слободно време, тренинг трчање представља веома популаран и погодан облик физичке активности (2,3). Добро је познато да физичка активност има значајне здравствене бенефите на различите органске системе. Према смерницама за физичку активност, које су објавиле Светска здравствена организација и влада САД, препоручује се тренинг умереног интензитета у трајању од најмање 150 минута недељно или аеробан тренинг снажног интензитета у трајању од 75 минута недељно, или пак комбинацију оба облика тренинга (2,4) .

Узимајући у обзир да је највећа препрека за редовну физичку активност недостатак времена, интервални тренинг високог интензитета (енгл. High Intensity Interval Training - HIIT), последњих неколико година је све више распрострањен модалитет физичке активности, јер у просеку траје 25 минута. HIIT се састоји од поновљених интервала вежбања високог интензитета испрекиданих периодима опоравка који подразумевају пасивни одмор или вежбе ниског интензитета (5,6). Овај модалитет вежбања базира се на серијама вежби и/или трчања током којих се енергија, неопходна за поновну синтезу АТФ-а, добија анаеробним метаболизмом (7). Током интензивне физичке активности, фосфокреатин игра важну улогу у надокнади АТФ-а, услед чега долази до његове повећане потрошње која резултира смањењем јачине контракције скелетних мишића, али и исцрпљености читавог организма (8, 9).

Овакав облик тренинга је одржива и временски ефикасна алтернатива за изазивање физиолошких и кардиореспираторних адаптација (10-13). Специфичне физиолошке адаптације изазване оваквим начином тренинга одређује параметре као што су интензитет и трајање тренинга, број изведених интервала (серија), трајање и активност током опоравка између серија као и начин вежбања (10,14,15) и исхрана спотисте. Код нетренираних особа али и код рекреативаца, краткорочни интервални тренинг високог интензитета, у трајању од само 2 недеље, представља снажан стимуланс за изазивање кардиореспираторних и физиолошких промена сличних традиционалном тренингу издржљивости, упркос мањем укупном обиму вежбања и посвећености тренингу (10,16).

1.1.2. Ефекти физичке активности на кардиоваскуларни систем

Већ је раније речено да је деценијама уназад физичко вежбање признато као здрава навика и као корисна стратегија за смањење фактора ризика за настанак кардиоваскуларних болести, чиме се чува здравље кардиоваскуларног система (17). Редовно бављење физичком активношћу има бројне бенефите, посебно на кардиоваскуларни систем, као што је побољшање липидног статуса, снижавање вредности гликемије, смањење инфламације и снижавање вредности крвног притиска (18). Међутим, иако постоје снажни научни докази о физичкој активности као третману, физичка неактивност и даље преовлађује широм света (17). Према подацима Светске Здравствене Организација (СЗО) процењује се да се на годишњем нивоу изгуби од 4 до 5 милиона људских живота због последица физичке неактивности (Светска Здравствена Организација 2021) (19).

Тренинг умереног интензитета (МИТ) је један од најпопуларнијих програма вежбања која се препоручује од стране здравствених радника као златни стандард, а односи се на дуже сесије вежби средњег интензитета, континуирано, у трајању око 60 минута без периода одмора (20). За разлику од ове традиционалне методе, интервални тренинг високог интензитета представља новији вид тренинга о којој се нашироко расправља као о модалитету који је осмишљен тако да се скрати укупно време проведено на бављење физичком активношћу, док истовремено производи исти ефекат и пружа боље перформанце. НИТ протоколе карактерише период вежби високог интензитета (са 80-100% вредностима максималне срчане фреквенце) у комбинацији са периодима кратких одмора или вежбама ниског интензитета (10,20). Овакав вид тренинга, предложен је као један од алтернативних модела тренингу умереног интензитета који ће побољшати кардиоваскуларно здравље болесника са различитим кардиоваскуларним болестима. Бројни су подаци у литератури који подржавају супериорнији ефекат НИТ-а тренинга у односу на МИТ због побољшања митохондријске биогенезе, максималног аеробног капацитета ($VO_2 \max$) и периферне васкуларне структуре, смањује се производња лактата и штеди залиха гликогена у организму (21-23). У складу са овим подацима, чињеница је да НИТ побољшава опоравак фосфокреатина у скелетним мишићима (24). С друге стране, НИТ је такође показао да побољшава кардиоваскуларну функцију смањењем пулса у мировању, систолног крвног притиска и процента телесних масти (25). Новији подаци из литературе препоручују физичку активности у терапији хипертензије али се за овакав вид лечења препоручује тренинг умереног интензитета а саветује се избегавање интервалног тренинга високог интензитета (20).

1.2. Креатин као ергогено средство

Креатин је први описао Ежен Шеврел, француски хемичар давних 1830-их година (26). Сама реч води порекло од грчке речи «креас» што значи месо (26). Данас је супламентација креатином широко распрострањена и једно је од најпопуларнијих нутритивних ергогених средстава међу професионалним спортистима али и међу рекреативцима. Подаци који датирају још од почетка 1990-их година, указују на чињеницу да се само у Сједињеним Америчким Државама, на годишњем нивоу потроши око 2,5 милиона килограма креатина (27). Из тих разлога, последњих 20 година, креатин и представља једно од највише испитиваних ергогених средстава у области спорта (28). Ефекти супламентације креатина у бодибилдингу су добро познати и објашњавају се повећаним интрацелуларним задржавањем воде, без значајног утицаја на повећање мишићне масе тела. Сматра се да се ово дешава због осмолитних својстава креатина (29).

Креатин, представља веома важан међупроизвод у метаболизму мишића, мозга али и других ткива које захтевају високе енергетске потребе (30). Ово једињење има круцијалну улогу у пуферовању и преласку енергије преко фосфокреатин система креатин киназе. Уколико постоји функционално оштећење овог енергетског система узроковаће погоршања енергетског метаболизма, што је карактеристично за многе неуродегенеративне али и старосне поремећаје.

Литературни подацију показују да суплементација креатином повећава интрамускуларну концентрацију креатина што може побољшати физичке перформансе, боље прилагођавање тренингу, опоравак после вежбања, превенцију повреда и рехабилитацију. Са друге стране, позната је његова клиничка примена у различитим студијама које су испитивале неуродегенеративне болести (као што су Паркинсонова болест, мишићна дистрофија, Хантингтонова болест), исхемија мозга и срца, фибромиалгија, остеоартритис, дијабетес мелитус, старење (31).

1.2.1. Метаболичка улога креатина

Креатин припада породици гванидин фосфагена, природног непротеинског аминокиселинског једињења које се налази у црвеном месу и морским плодовима (31-33). Највећи део креатина се налази у скелетним мишићима и то приближно 95%, док се мале количине налазе у мозгу и тестисима са укупном заступљеношћу од 5% (31,34). Највећа количина креатина која се налази у мишићима је у облику фосфокреатина (чак две трећине) а остатак се налази у слободном облику. Укупна количина креатина у мишићима, код особа просечне телесне масе од 70 kg износи око 120 mmol/kg мишићне масе (31,35) али горња граница за складиштења креатина је око 160 mmol/kg суве мишићне масе (31,35,36). Приближно 1 до 2% интрамускуларног креатина се разграђује у облику креатинина, који представља метаболички нуспродукт који се излучује урином (31,35,37,38). Да би наше тело могло да одржи нормалне залихе креатина, требало би дневно да допуни око 1-3 g креатина. Путем исхране, ми уносимо приближно половину дневних потреба (31,39), док се преостала количина креатина синтетише првенствено у

јетри и бубрезима из аргинина и глицина помоћу ензима аргинин глицин амидинотрансферазе (AGAT) при чему прво настаје гванидиноацетат. Гванидиноацетат се даље метилује гванидиноацетат N-метилтрансферазом (GAMT) користећи S-аденозил да би се формирао креатин (31,40).

Примарна метаболичка улога креатина је да се комбинује са фосфорилном групом да би се формирао фосфокреатин кроз ензимску реакцију креатин киназе. Литературни подаци (31,41,42) сугеришу да су плејотропни ефекти креатина углавном повезани са функцијама креатин киназе и фосфокреатинског система. Поменути систем има важну улогу у пребацивању интрацелуларне енергије из митохондрија у цитосол. Овај енергетски шатл има улогу у повезивању места производње АТР-а (добијене процесима гликолизе и митохондријске оксидативне фосфорилације) са субцелуларним местима коришћења АТР-а (АТРазе) (31,41,43). Креатин улази у цитосол помоћу транспортера за креатин (31,44), где се повезује са цитосолним и гликолитичким изоформама креатин киназе и помажу у одржавању нивоа гликолитичког АТР-а као и цитосолног АТР/ADP односа. (31,42). Креатин даље дифундује у митохондрије где се везује са АТР-ом који је произведен процесом оксидативне фосфорилације (31).

Креатин има две кључне физиолошке улоге које се односе на развој мишићне масе и на уклањање креатинина преко урина. Постоје два начина одржавања креатина у телу а то су: адекватан нутритивни унос и ендогена синтеза (29,45). Ендогена синтеза креатина одвија се највећим делом у јетри и бубрезима, а мањим делом у панкреасу. На овај начин, ендогеним путем настаје приближно 1g креатина дневно. Остатак креатина се уноси исхраном или се синтетише из две есенцијалне аминокиселине аргинина и метионина и једне неесенцијалне аминокиселине глицина (45,46). У ендогеној синтези креатина учествују три ензима. Први је L-аргинин глицин амидинотрансфераза (AGAT), који се углавном налази у бубрегу и има улогу да преноси амидино групу са аргинина на глицин да би се добио L-орнитин и гванидиноацетатна киселина. Следећи ензим је метионин аденозилтрансфераза (MAT) која претвара метионин у S-аденозилметионин (SAM). S-аденозилметионин ће деловати као дозор метил групе за гванидиноацетатну киселину на оригиналном глицин азоту. Дејством трећег ензима, N-гванидиноацетат метилтрансферазе (GAMT), настаје креатин и S-аденозилхомоцистеин (45).

1.2.2. Суплементација креатином

Деценијама уназад је познато да спортисти, било да се ради о професионалним или рекреативним, користе суплементацију креатином. Један од најчешће испитиваних облика креатина јесте и креатин монохидрат. Након уноса креатина у организам, долази до његове апсорпције у крв, а затим се путем крви транспортује до циљних ткива (31,47). Након оралне администрације креатин монохидрата, максимална концентрација креатина у плазми се јавља након 60 минута од момента узимања (31,48,49). Подаци из доступне литературе показују да суплементација креатином у комбинацији са тренингом отпора повећава мишићну масу и перформансе више од самостално примењеног тренинга отпора. Разлози за овакав резултат су утицај креатина на метаболизам фосфата, статус ћелијске хидратације, кинетику калцијума и

протеина, садржај гликогена, сателитске ћелије, факторе раста, инфламација али и на оксидациони стрес (47). Предходне студије су показале да конзумирање креатина непосредно након сваке серије тренинга отпора доводи до повећања уласка креатина у скелетне мишиће, и последично доводи до повећања мишићне масе и перформанси (47).

Табела 1. Ефекти суплементације креатином на различите спортске дисциплине (31).

<i>Повећање фосфокреатина</i>	• Пливање на 50м • Спринт на стази 60-200м • Бициклизам
<i>Повећање ресинтезе фосфокреатина</i>	• Одбојка • Кошарка • Амерички фудбал • Хокеј на трави • Хокеј на леду
<i>Смањење мишићне ацидозе</i>	• Пливање на 100м и 200м • Водени спортови (веслање, кајак) • Борилачки спортови (бокс, рвање, ММА) • Скијање низбрдо • Трчање на 400 и 800м
<i>Оксидациони метаболизам</i>	• Фудбал • Рукомет • Одбојка • Кошарка • Тенис • Интервални тренинг код спортова издржљивости
<i>Повећање односа телесна маса/ мишићна маса</i>	• Амерички фудбал • Бодибилдинг • Борилачки спортови (бокс, рвање ММА) • Поверлифтинг • Рагби • Атлетика (бацање кугле; копље; диск; бацање кладива) • Олимпијско дизање тегова

Суплементација креатином се препоручује као ергогена помоћ спортистима који тренирају спортове снаге како би им се помогло да се прилагоде тренингу али и спортистима који су повремено изложени спринту и морају да се опораве током такмичења (као што су фудбал, амерички фудбал, тенис, кошарка). Конзумирање креатина може повећавати за 10–20% перформансе тренинга високог интензитета у зависности од величине повећања мишићног фосфокреатина (31,50). Према подацима

Међународног друштва за спортску исхрану (ISSN), креатин монохидрат је тренутно најефикаснији ергогени додаток исхрани који је доступан спортистима, који доводи до повећања капацитета вежбања високог интензитета и немасне телесне масе током тренинга (31,51,52). У научној заједници постоји консензус да суплементација креатином може послужити као ефикасна ергогена помоћ у исхрани спортиста у различитим спортовима. Употребу креатина у спорту није забранила ниједна спортска организација (31,48,51,52) а такође нису пријављени нежељени или ерголитички ефекти краткорочне или дуготрајне суплементације креатином. Бројни подаци из литературе пријављују различите здравствене предности конзумације креатина код спортиста и појединаца са различитим болестима (31), што нам показује да је ова супстанца прилично безбедна за употребу.

Поред тога што креатин служи као ергогена помоћ спортистима, новија истраживања показују бројне бенефите суплементације креатином. Ти бенефити се односе на побољшање прилагођавању тренингу, побољшања опоравка након тренинга, смањење ризика од повреда али и помоћ да се брже опораве од повреда. Такође је показано да суплементација креатином може помоћи спортистима да повећају оптерећење гликогеном, осете мању упалу и истицање мишићних ензима изазване интензивним тренингом и да толеришу већи обим али и веће оптерећење током тренинга (31).

1.3. Бетаин као ергогено средство

Бетаин је природно једињење које је први пут откривено у *Beta vulgaris*-у у 19. веку (53,54). Присутан је у микроорганизмима, биљкама и животињама (53,55), при чему високе нивое овог једињења садрже пшеница, шкољке, спанаћ и цвекла (53,56). Ово једињење се комерцијално добија из шећерне репе (53,57). Бетаин (триметилглицин) је дериват аминокиселине глицина, може се синтетисати ендогено путем метаболизма холина, или егзогено конзумирањем хране богате бетаином (58). Холин, који је прекурсор бетаина, може се оксидовати у бетаин алдехид помоћу ензима холин дехидрогеназе (53,54), док се бетаин алдехид може оксидовати у бетаин помоћу ензима бетаин алдехид дехидрогеназе у присуству NAD^+ (53,59).

Бетаин има две кључне физиолошке улоге и то као донор метил-групе у трансметилација хомоцистеина и као осмолит који има улогу у одржавању равнотеже течности (45). Бетаин има три метил групе, које могу послужити као реагенси за реакције трансметилације (58). У митохондријама бубрега и јетре одиграва се катаболизам бетаина. Овај процес укључује неколико реакција које резултирају трансметилацијом хомоцистеина у метионин, катализован бетаин хомоцистеином S-метилтрансфераза (BHMT), а затим формирање диметилглицина (DMG). На овај начин бетаин чува метил групу за синтезу протеина, детоксификује хомоцистеин и снабдева универзалним донором метила S-аденозилметионин (SAM) (45). Метаболизам бетаина обезбеђује метил групе за конверзију хомоцистеина у метионин (58,60) и помаже у синтези кључних метаболичких протеина као што су креатин (58,61) и карнитин (58,62), што је посебно изражено током периода хиперосмолалности (58, 63).

Друга кључна улога бетаина је улога осмолита. Осмолити су органски молекули који се користе у регулацији концентрације интрацелуларне течности и волумена ћелије (58,64). Дејством спољашњег хипертоничног стреса, ћелија одговара тренутно на тај начин што смањује запремину ћелије (вода из ћелије излази у ванћелијски простор) и повећава концентрацију неорганских растворених материја (односно електролита) у циљу да се одржи хомеостаза (58,64). Да би се очувала ћелијска функција на дугорочном нивоу, ћелије настоје да ублаже овај проблем разменом потенцијално штетних неорганских раствора за одговарајуће, компатибилне, органске осмолите, а један од тих осмолита је бетаин (58,64). Као осмолит, бетаин делује на задржавање интрацелуларне течности и очување осмотске равнотеже током хипертоничног стреса, што има утицај на јачање интегритета мембране, и може бити посебно важно за ентероците који су изложени топлотном стресу (58).

1.3.1. Суплементација бетаином

У последње време, суплементација бетаином је добила посебну пажњу због великог броја студија које повезују суплементацију бетаином са кардиопротекцијом, физиологијом вежбања, побољшаном когницијом и неуропротекцијом (45,65). Говорећи о утицају бетаина на нервни систем, различите студије су истраживале потенцијалну неуропротекцију бетаином (45,66). Студија спроведена на пацијентима са акутним коронарним синдромом (акутни инфаркт миокарда, срчана слабост) испитивала је везу између недостатка бетаина и секундарних догађаја код ових пацијената. Резултати студије су показали да недостатак бетаина представља повећан ризик за настанак другог инфаркта миокарда и срчане инсуфицијенције. Очигледно је да је ниво хомоцистеина у плазми повезан са недостатком бетаина, и особе које имају висок ниво хомоцистеина и недостатка бетаина имају већи ризик од настанка секундарних догађаја, посебно срчане инсуфицијенције. Са друге стране, повећан ниво бетаина у плазми може бити повезан са метаболичким синдромом и дијабетесом (45,67).

1.4. Гванидиноацетат као ергогено средство

Гванидиноацетатна киселина, позната и као гликоцијамин или гванидиноацетат, је природни члан породице органских једињења познатих као алфа-амино киселине (68). Ово једињење је изграђено од N-амидино деривата глицина и L-аргинина али и садржи гванидино део који може имати значајну улогу у интеракцији са различитим ензимима или рецепторима (68,69). Може да се синтетише у људском телу, али се може и уносити у организам храном животињског и биљног порекла, или као додатак исхрани. Ово једињење делује као директни прекурсор креатина, примарног високоенергетског молекула за складиштење фосфата (68).

Гванидиноацетат се углавном синтетише у бубрезима и панкреасу (68) из глицина и L-аргинина. Поред тога, може да се синтетише и у мозгу, јетри, ендокриним

органима и кожи. Реакцију трансаминације између глицина и L-аргинина катализује ензим L-аргинин глицин амидинотрансфераза (AGAT). Након овог корака, гванидиноацетат се транспортује у јетру, где се метил група преноси са S-аденозил-L-метионина (SAdMet) на гванидиноацетат дејством ензима гванидиноацетат N-метилтрансферазе (GAMT) да би се произвео креатин (68).

Поред тога што делује као директан прекурсор креатина, суплементација гванидиноацетатом се предлаже и у циљу смањења концентрације глукозе у крви, чувања аргинина (и из исхране и произведеног интерно) за друге метаболичке потребе, и може да утиче на укус и/или унос хране. Одређена стања која захтевају контролу хипергликемије у исхрани или повећање захтева за аргинином, као што су стрес, зрастање рана, убрзан раст, могу имати користи од додавања гванидиноацетата исхрани (68).

Суплементација гванидиноацетатом може бити веома корисна у ситуацијама када је биосинтеза гванидиноацетата ограничена као што су недовољна исхрана, отказивање бубрега, бубрежна инсуфицијенција, исцрпљивање резерви гванидиноацетата које је повезано са вежбањем (45,70). Бројне су предности суплементације гванидином и оне се односе на већу растворљивост у води, бољу биорасположивост, стабилност и исплативост у поређењу са креатином (45,71). У данашње време, орална суплементација гванидиноацетата представља нови концепт и стратегију за повећање нивоа ћелијског креатина у различитим условима (45).

1.4.1. Механизам деловања гванидиноацетата

Осим биосинтезе креатина, гванидиноацетат може имати и друге физиолошке улоге укључујући могућу стимулацију ослобађања хормона и неуромодулацију, промену метаболичке употребе аргинина и прилагођавање статуса оксиданса-антиоксиданса. Претходна истраживања су показала да гванидиноацетат стимулише лучење инсулина код пацова, при чему долази до тренутног повећање инсулина у плазми који је трајао око 20 минута (72,73), смањује глукозу у плазми (72,74) уз побољшање осетљивости на инсулин што представља један од механизма којим гванидиноацетат делује на инсулин. Овакав ефекат настаје као последица потенцирања протеин киназа од стране гванидиноацетата, које врше модулацију активности инсулинских рецептора на циљним ћелијама (72).

Суплементација гванидином се може користити као замена за аргинин у исхрани животиња (72,75). Гванидиноацетат делује тако што штеди аргинин и на тај начин може олакшати употребу више аргинина за друге физиолошке функције као што су анаболизам протеина, ћелијска сигнализација и ослобађање хормона. Са друге стране, гванидиноацетат делује као могући активатор рецептора гама аминокиселине (GABA) у мозгу и у периферним ткивима (72,76). С обзиром да је GABA главни инхибиторни неуротрансмитер у нервном систему, суплементација гванидином може деловати као неуромодулатор и утицати на екситабилност неурона, мишићни тонус и/или развој мозга (72,77).

1.5. Удružена супламентација и тренинг

Студија која је поредила ефекте удружене примене креатина и гванидиноацета и самосталног креатина потврдила је супериорнији ефекат њихове удружене примене у односу на самосталну примену креатина. Наиме, након четворонедељне супламентације код физички активних спортиста, удружена супламентација је побољшала нивое креатина у мозгу и мишићима, повећала је мишићну снагу горњег дела тела али је примећен и мањи пораст телесне тежине. Однос дозе која је примењивана у поменутој студији било је 1:3 (гванидиноацетат:креатин), што се сматра безбедном дозом у вези са ризиком од настанка хиперхомоцистеинемије или исцрпљивања холина у мозгу (78). Са друге стране, анхидровани бетаин (триметилгликол) је метаболит холина, за који се сматра да делује синергистички са гликоцијамином у циљу повећавања синтезе креатина (79).

Поменута ергогена средства (креатин, бетаин и гванидиноацетат) у пракси се често користе код професионалних спортиста и рекреативаца али још увек нема довољно података какве ефекте изазива њихова самостална али и удружена супламентација на функцију миокарда, морфометријске и морфолошке карактеристике срца и квадрицепса, морфологије јетре и бубрега али и на редокс статус.

Удружена нутритивна суплементација са интервалним тренингом високог интензитета добија све више на популарности јер се сматра да суплементација повећава адаптацију на овакав облик тренинга. Једна од најчешће коришћених ергогених супстанци у комбинацији са интервалним тренингом високог интензитета јесте креатин монохидрат. Најчешће се примењује ујутру или непосредно након тренинга да би се попуниле његове резерве (31). Бројне претклиничке студије су истакле кардиоваскуларне предности суплементације креатина због његове суштинске улоге у енергетском метаболизму ћелија (45). Ово се посебно односи на побољшање исхемијско-реперфузионе (I/R) повреде миокарда кроз повећање фосфокреатина, резерве енергије и успоравање отварања пора митохондријске пермеабилности током I/R повреде (80). Са друге стране, суплементација креатином повећава премештање високоенергетских фосфатних метаболита између цитосола и митохондрија, што доводи до повећаног опоравка од оксидационог стреса (10,81). Такође, креатин повећава поновни унос калцијума у саркоплазматски ретикулум, што може повећати циклус попречних мостова миофибрила током вежбања (10,82).

Табела 2. Ефекти удружене суплементације креатином и интервалног тренинга високог интензитета (10).

<i>Супламнетација Креатином</i>	
<i>Могући механизам(и) деловања</i>	• Повећање фосфокреатина • Повећање гликогена • Антиоксидациона улога • Смањена разградња мишићних протеина • Смањење инфламације
<i>Потенцијалне акутне користи</i>	• Повећање капацитета за тренинг високог интензитета • Повећање опоравка између мечева
<i>Потенцијалне хроничне користи</i>	• Повећање обима тренинга

Анхидровани бетаин (триметилгликол) је метаболит холина, за који се сматра да делује синергистички са гликоцијамином у циљу повећавања синтезе креатина (83). Када је у питању суплементација бетаином, доступни резултати у литератури су контрадикторни и зависе од дужине третмана (84). Показано је да суплементација бетаином може побољшати опоравак од напорног вежбања јер повећава експресију инсулину сличном фактору раста-1 (IGF-1) као и рецептора за IGF-1 (84,85). С обзиром да је бетаин органски осмолит („компензаторна“ растворена супстанца) који стабилизује протеине супротстављајући се денатуришућем ефекту растворених супстанци (84,86), може да доведе до побољшања синтезе протеина. Подаци из литературе показују да суплементације бетаином у периоду од две недеље, смањују ниво базалног кортизола код здравих младих мушкараца (84,85), док код спортиста побољшава способност понављања спринта и њихове снаге током поновљених спринтова (87). Такође је показано да суплементација бетаином у трајању од 14 недеља изазива промену односа тестостерона и кортизола (88) као и смањење концентрације проинфламаторних цитокина (TNF- α , IL1 β , IL6), и број леукоцита код младих професионалних фудбалера (89).

Ефекти суплементације гванидиноацетатом мало су познати, а поготову за његову удружену примену са тренингом. С обзиром да гванидиноацетат делује тако што стимулише синтезу креатина, његова егзогена примена може повећати концентрацију креатина и последично повећати мишићну снагу и јачину (90). Показано је да је шестонедељна суплементација гванидиноацетата код мушкараца и жена који нису били изложени тренингу повећала снагу хвата и издржљивост мишића горњег дела тела (90).

1.6. Редокс статус

Оксидациони стрес, у новије време назван и „поремећај редокс сигнала и равнотеже“ представља неравнотежу између производње реактивних кисеоничних врста (ROS) и способности антиоксидационог ензимског система заштите да их елиминише и да се поправи настала штета (91). Реактивни кисеоничне врсте (ROS) као и реактивне врсте азота (RNS), су производи нормалног ћелијског метаболизма. ROS и RNS су добро препознати по томе што играју двоструку улогу као и штетне и корисне врсте, јер могу бити или штетна или корисна за живе системе (92,93). Благотворан ефекти ROS се јављају при ниским/умереним концентрацијама и укључују физиолошке улоге у ћелијским одговорима на штетне утицаје, као на пример у одбрани од инфективних агенаса и у функција бројних ћелијских сигналних система. Још један користан пример ROS при ниским/умереним концентрацијама је индукција митогеног одговора (92).

Реактивне кисеоничне врсте нормално су укључене у функционисање основних физиолошких процеса у ћелији (91), међутим, уколико се нађу у високим концентрацијама могу оштетити основне ћелијске структуре (угљене хидрате, липиде, протеине, нуклеинске киселине) и последично нарушити њихово функционисање (91). Познато је да је оксидациони стрес укључени у многа физиолошка стања (између осталог у процесе старења и вежбања) али и у настанак болести (кардиоваскуларне болести, неуродегенеративне болести, карцином и различите упалне процесе) (91).

Велики број физиолошких функција се контролише сигналним путем који реагују на поремећај редокс равнотеже. Ове функције укључују редокс регулисану производњу NO, производњу ROS фагоцитном NAD(P)H оксидазом (оксидативни удар), производњу ROS-а помоћу NAD(P)H оксидазе у нефагоцитним ћелијама, регулација васкуларног тонуса и других регулаторних функција NO, производња ROS као сензора за промене концентрације кисеоника, редокс регулација имунолошких одговора, ROS-индукована апоптоза али и други механизми. (92).

Изложеност слободним радикалима из различитих извора навела је организме да развију низ одбрамбених механизма (92) против оксидационог стреса. Ти механизми укључују превентивне механизме, механизме поправке, физичке одбране али и антиоксидационе одбране. Антиоксидациона одбрана подразумева ензимски и неензимски део. Ензимска антиоксидациона одбрана укључује супероксид дисмутазу (SOD), глутатион пероксидазу (GPx), каталазу (CAT) док неензимска антиоксидациона одбрана укључује витамин С, витамин Е, глутатион (GSH), каротеноиде, флавоноиде и др. У физиолошким условима постоји равнотежа између активности и интрацелуларног нивоа ових антиоксиданаса. Ова равнотежа је неопходна за опстанак организама и њихово здравље (92).

1.6.1. Ефекат тренинга на редокс статус

Ефекат вежбања на редокс равнотежу је изузетно сложен процес и зависи од старости, пола и нивоа утренираности, као и од интензитета и трајања вежбања. Док се појављује редовна умерена обука благотворно за оксидациони стрес и здравље, акутне и напорне нападе аеробних и анаеробних вежбање може изазвати прекомерну

производњу ROS. Ипак, док вежбање доводи до повећане оксидације стреса, чини се да је овај исти стимуланс вежбањем неопходан да би се омогућила регулација ендогених антиоксидациона одбрана према теорији хормезе (91).

Још увек нема довољно података о утицају интервалног тренинга високог интензитета на редокс статус (17). Постоје докази да интервални тренинг високог интензитета може побољшати антиоксидациони капацитет путем повећање супероксид дисмутазе и глутатиона пероксидазе (17,94). Међутим, продужени ефекти интервалног тренинга високог интензитета могу бити везани за нарушавање редокс равнотеже код људи, и сходно томе изазивати упалу (17,95,96). Литературни подаци потврђују да десето недељним интервални тренинг високог интензитета повећава вредности SOD и GPx у скелетном мишићу. Повећањем вредности GPx побољшава се антиоксидациона способност мишића а смањује се оксидативно оштећење мишића. Студија спроведена на пацовима, показује да овакав облик тренинга повећава активност GPx у мишићима (94,97) али да механизам који доводи до оваквог резултат није у потпуности схваћени. Предпоставља се да овакав тренинг може да изазове активацију сигналних путева протеина који су осетљиви на поремећај редокс равнотеже (94,98) преко повећане производње реактивних кисеоничних врста у мишићима. Обзиром да је производња реактивних кисеоничних врста у мишићима повезана са интензитетом вежбања (94,99), током оваквог тренинга, свака нова сесија интензивних вежби може да изазове значајно повећање производње H_2O_2 , чиме се надмашује антиоксидациона заштита мишића (94).

1.6.2. Креатин као антиоксиданс

Своју антиоксидациону активност, креатин испољава кроз директну интеракцију са реактивним оксидационим врстама или кроз метаболичко деловање које пружа антиоксидациону заштиту (29,100). Оксидационе врсте које уклања креатин укључују супероксид анјон радикал (O_2^-) и пероксинитрит ($ONOO^-$) (29,101). Подаци из литературе показују да је ефикасност антиоксидационе активности креатина у ацелуларним системима, нижа од ефикасности редукованог глутатиона [62] Због своје широке распрострањености у саркоплазми, креатин који се налази у мишићима, лако је доступан слободним радикалима који настају током физичког вежбања. (29)

Обзиром да је креатин супстрат за стварање креатин киназе, између осталог и за митохондријску креатин киназу, његова доступност у митохондријским киназама омогућава да се одржи однос ADP/ATP у оптималним условима повољним за митохондријски респираторни ланац. На овај начин, спречава се застој у ланцу преноса електрона. Креатин киназе које су у митохондријама смањују локално стварање реактивних кисеоничних врста кроз митохондријску креатин киназну зависну активност рециклирања ADP-а (29,102). Истраживања која су спроведена на мишићим моделима показала су да креатин, слично као и физичке вежбе, може смањити оксидациони стрес у ткивима и телесним течностима (29).

Литературни подаци указују на чињеницу да креатин може имати заштитну улогу у многим експериментима модели у којима се дешава поремећај редокс равнотеже као што су излагање митохондријским или нуклеарним DNK мутагенима (29,103,104), UV зрачење (29,103), водоник пероксида (29,104,105), пероксинитрити (29,105), различита стања која оштећују RNK (29,106), гванидиноацетат (29,107), акутна физичка активност

(29,108), исхемијско/реперфузиона повреда (29,109) али и седентарни начин живота. Претходна истраживања спореведена на здравим спортистима су показала да креатин, поред његове способности да повећа мишићне перформансе спортисте, може подстицати оксидациони стрес и смањити антиоксидациони статус. Са друге стране, истраживање спроведено на хипертензивним пацовима показало је да суплементација креатином може бити без ефекта на редокс равнотежу. (29).

1.6.3. Бетаин као антиоксиданс

За сада није познат механизам којим суплементација бетаином испољава антиоксидационе способности. Литературни подаци су контрадикторни. Претходна истраживања су навела да су антиоксидациона својства бетаина последица његове способности да уклони слободне радикале (110,111) али још увек нема довољно података који потврђују ово. Са друге стране, истраживања су показала да бетаин испољава своја антиоксидациона својства повећањем активности антиоксидационих ензима (110,112) док пак, одређене студије показују да није примећена промена у активности антиоксидационих ензима након третмана бетаином (110). С обзиром да је бетаин прекурсор S-аденозилметионина, који доприноси повећању снабдевања супстратом потребним за синтезу GSH, литературни подаци сугеришу да суплементација бетаином може повећати ниво GSH путем регулације метаболизма аминокиселина које садрже сумпор (110,113).

Позитивни ефекти суплементације бетаина на оксидациони стрес потврђени су у више студија. Наиме, примећено је да администрација бетаина смањује стварање реактивних кисеоничних и азотних врста и да побољшава антиоксидациону одбрану јетре повећавајући активност антиоксидационих ензима GSH, CAT, SOD и GPx (114). Са друге стране, потврђено је да бетаин повећава активност GSH и снижава вредности MDA у ткиву тестиса (115). Претходна истраживања су, такође, показала да бетаин смањује оксидациони стрес смањивањем ткивних вредности MDA и повећањем SOD у мозгу пацова (116). Поред тога, литературни подаци показује да суплементација бетаином повећава активности супероксид-дисмутазе, каталазе, глутатион пероксидазе и параоксоназе. Претходне студије су показале да бетаин може ефикасно ублажити апоптозу и побољшати антиоксидациону одбрану (53). Антиапоптотски ефекти суплементације бетаином испољени су у епителним ћелијама рожњаче човека (115,117) док су антиоксидациони ефекти овог суплемента у борби против оксидационог стреса испољени у јетри пацова (115,118).

1.6.4. Гванидиноацетат као антиоксиданс

Претходна истраживања на животињама су показале да суплементација гванидиноацетатом може имати и прооксиданте и антиоксидационе ефекте. Наиме, гванидиноацетат може индукувати оксидациони стрес након интрастријалне инфузије (72,119), или услед прекомерне акумулације у различитим патолошким стањима (72,120). Са друге стране, гванидиноацетат у исхрани побољшава антиоксидациони статус подизањем укупног антиоксидационог капацитета и активности неколико

антиоксидационих ензима (72,77). Као прокосиданс, гванидоацетат може формирати реактивне кисеоничне врсте тако што донира електрон из своје коњуговане базе и генерише супероксид анјон радикал (72,121). С друге стране, метаболити који су повезани са гванидиноацетатом, као што су креатин и аргинин, могу деловати тако што ће угасити слободне радикале (72,77).

2.

**Циљеви и
хипотезе**

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

2.1 ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

1. Испитивање ефеката ергогених средстава (кретаин монохидрата, анхидрованог бетаина и гванидиноацетата) и интервалног тренинга високог интензитета на функцију и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
2. Компарација ефеката комбиноване примене интервалног тренинга високог интензитета и суплементације једним или више од испитиваних ергогених средстава на миокард и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
3. Одређивање различитих биомаркера оксидационог оштећења у коронарном венском ефлуенту изолованих срца пацова који су били подвргнути интервалном тренингу високог интензитета у комбинацији са суплементацијом једним или више од испитиваних ергогених средстава.
4. Одређивање и упоређивање вредности системских антиоксидационих и прооксидационих параметара код испитиваних група пацова.
5. Стандардним хистолошким методама утврдити и упоредити оштећења квадрицепса, срца, јетре и бубрега настала након хроничног експерименталног протокола.

2.2. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. Испитивана ергогена средства (кретаин монохидрата, анхидровани бетаин и гванидиноацетата) у комбинацији са интервалним тренингом високим интензитетом побољшаће функцију и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
2. Комбинацијом више ергогених средстава ефекти на функцију и коронарну циркулацију изолованог срца пацова биће повољнији.
3. Комбинација физичке активности са споменутим суплементима имаће позитиван ефекат на редокс статус пацова.
4. Комбинација физичке активности са споменутим суплементима биће повезана са мањим променама на органима од интереса (срце, јетра, бубрези, квадрицепс).

3.

Материјал и методе

3. Материјал и методе

3.1. Експериментални протокол

Све експерименталне процедуре, биохемијске анализе и хистолошка анализа органа од интереса за ову студију изведене су у Институту за физиологију, у лабораторији за кардиоваскуларну физиологију „Факултета Медицинских наука“ Универзитета у Крагујевцу. Истраживање је спроведено у складу са Директивама Савета Европе (European Council Directive, 86/609/EEC) и принципима Добре лабораторијске праксе (2004/9/EC, 2004/10/EC) и одобрено од стране Етичког комитета за добробит експерименталних животиња, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу (No: 01-11876/2 број 01-11626 од 9.10.2019.године.).

У нашем истраживању користили смо мужјачке пацове *Wistar albino* соја, као најоптималнији модел за испитивању проблематику. Истраживање је обухватило 72 пацова старости 6 недеља, просечне телесне масе 200-220g. Пацови су чувани у одговарајућим групама у плексиглас-транспарентним кавезима (4 животиње по кавезу) са дном обложеним шушком и са слободним приступом храни и води (*ad libitum*) и константним амбијенталним условима (температура 21 ± 2 °C; влажност 55 ± 5 %; циклус светло-тама на 12 h са почетком светлог периода у 8:00 h). Животиње су биле разврстане у 9 група, једну контролну и осам експерименталних група (8 животиња у свакој испитиваној групи) и то:

1. КОН- контролна група – седантерни пацови
2. Т- пацови који тренирају
3. Т+К - пацови који тренирају уз супламентацију креатинин монохидратом
4. Т+Б- пацови који тренирају уз супламентацију анхидрованим бетаином
5. Т+К+Б- пацови који тренирају уз супламентацију креатинин монохидратом и анхидрованим бетаином
6. Т+Г- пацови који тренирају уз супламентацију гванидиноацетатом
7. Т+Г+Б- пацови који тренирају уз супламентацију анхидрованим бетаином и гванидиноацетатом
8. Т+Г+К- пацови који тренирају уз супламентацију креатинин монохидратом и гванидиноацетатом
9. Т+Г+К+Б- пацови који тренирају уз супламентацију креатинин монохидратом, анхидрованим бетаином и гванидиноацетатом

3.2. Протокол интервалног тренинга високог интензитета

За тренажни протокол, коришћен је модел трчања на тредмил траци за пацове (ELUNIT MedicalEquipment), специјално дизајниран за мале животиње, са напајањем од 220 V, 50 Hz, са четири стазе за трчање, опсегом брзине од 2 до 50 метара у минути и убрзањем од 0.1 метара у минути (Слика 1). Протокол интервалног тренинга високог интензитета састојао се од периода адаптације животиња на тренинг и експерименталног периода. Првих седам дана животиње су се прилагођавале тренингу на тредмил траци (30 минута/дан при брзини од 8 m/min). Друге недеље животиње су трчале интензитетом од 45 m/min током 30 секунди, при чему се након одмора од 3 минута овај поступак понављао у још четири циклуса. Током наредне три недеље се постепено повећавала и брзина и дужина трајања трчања. Током последње недеље треажажног протокола пацови су трчали брзином од 55 m/min у трајању од 90 секунди у пет циклуса (122). Пацови су тренирали 5 дана у недељи са периодима одмора током викенда (Слика 2, Табела 1).

Слика 1. На слици је приказан тредмил на коме се спроводи тренажни протокол за мале животиње.



Слика 2. На слици су приказани пацови током тренинга.



Табела 3. Протокол интервалног тренинга високог интензитета за пацове (НИТ)

<i>Недеље/дани</i>	<i>Понедељак</i>	<i>Уторак</i>	<i>Среда</i>	<i>Четвртак</i>	<i>Петак</i>
1	<i>8m/min током 30 min</i>				
2	<i>5 спринта x 45m/min током 30sec</i>	<i>5 спринта x 46m/min током 30sec</i>	<i>5 спринта x 47m/min током 30sec</i>	<i>5 спринта x 48m/min током 30sec</i>	<i>5 спринта x 49m/min током 30sec</i>
3	<i>5 спринта x 50m/min током 30sec</i>	<i>5 спринта x 50m/min током 40sec</i>	<i>5спринта x 50m/min током 45sec</i>	<i>5 спринта x 50m/min током 55sec</i>	<i>5 спринта x 50m/min током 60sec</i>
4	<i>5 спринта x 51m/min током 60sec</i>	<i>5 спринта x 52m/min током 60sec</i>	<i>5спринта x 53m/min током 60sec</i>	<i>5 спринта x 54m/min током 60sec</i>	<i>5 спринта x 55m/min током 60sec</i>
5	<i>5 спринта x 55m/min током 65sec</i>	<i>5 спринта x 55m/min током 70sec</i>	<i>5 спринта x 55m/min током 75sec</i>	<i>5 спринта x 55m/min током 80sec</i>	<i>5 спринта x 55m/min током 90sec</i>
<i>*2 min одмора након сваког спринта</i>					
<i>**5 min загревање на 8m/min пре сваке тренинг сесије</i>					

3.3. Суплементација ергогеним средствима

Непосредно након завршеног тренинга на трендмилу, све животиње из експерименталних група, добијале су суплементацију одговарајућим ергогеним супстанцама, *per os* начином примене током 4 недеље. Суплементација креатином подразумевала је администрацију креатин монохидрата у дози од 300 mg/kg (123,124) бетаина у дози 280 mg/kg (125) и гванидиноацетата у дози од 300 mg/kg (124).

3.4. *Ex vivo* протокол на изолованом срцу

Након завршеног експерименталног протокола, животиње су жртвоване методом цервикалне дислокације у кетамин-ксилазин интраперитонеалној анестезији. Изолована срца пацова су причвршћена на Langendorff апарат и перфундована методом ретроградне перфузије по Langendorff-у (Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary) коришћењем Krebs–Henseleit-овог раствора. Након успостављања стабилног срчаног рада, уклањањем леве преткоморе и прокидањем митралне валвуле, изолована срца су подвргнута протоколу ауторегулације, који подразумевао постепено излагање срца различитим вредностима коронарног перфузионог притиска (од 60 до 120 cmH₂O, па затим 40 cmH₂O), а потом поновним излагањем срца растућим вредностима коронарног перфузионог притиска (од 40 до 120 cmH₂O). Користећи сензор (transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary) постављен у леву комору изолованог срца пацова, регистровали смо и континуирано бележили следеће параметре функције миокарда (кардиодинамске параметре):

1. dp/dt max - максимална стопа промене притиска у левој комори
2. dp/dt min - минимална стопа промене притиска у левој комори
3. SLVP - систолни притисак леве коморе
4. DLVP - дијастолни притисак леве коморе
5. HR - срчана фреквенција
6. CF - коронарни проток

Коронарни венски ефлуент је прикупљан у на сваком коронарном перфузионом притиску, а у наведеним интервалима бележили смо претходно наведене кардиодинамске параметре.

3.5. Биохемијске анализе

Биохемијске анализе одређиване су из узорака коронарног венског ефлуента, серума, плазме и еритроцита.

Узорци крви који су прикупљани у епруветама без цитрата су коришћени за издвајање серума. Узорци су одстојали 30 мин на собној температури, а затим су центрифугирани 15 мин на 3000 обртаја у минути (rpm). Узорци крви која је скупљана у епрувете са цитратом су коришћени за издвајање плазме и еритроцита. Узорци крви су центрифугирани 10 минута на 3000 rpm при чему су се извојили плазма и еритроцити.

Исталожени еритроцити су ресуспендовани и три пута испрани физиолошким раствором уз центрифугирање 10 min на 3000 rpm, а затим замрзнути на -20°C до анализе. Из узорака серума одређивали смо СК, СК-МВ, СК-ММ. Из узорака плазме и коронарног венског ефлуената су одређиване вредности маркера оксидативног стреса – прооксиданса (NO_2^- , O_2^- , TBARS, H_2O_2) док су из лизата еритроцита одређиване вредности антиоксидативних ензима (CAT, SOD, GSH).

3.5.1. Одређивање концентрације ензима СК, СК-МВ и СК-ММ

У узорцима серума, одређиване су концентрације срчаних ензима СК, СК-МВ и СК-ММ коришћењем стандардних, комерцијално доступних ELISA комплета (Cobas, Roche Diagnostics, Switzerland), на анализатору Cobas Mira Plus (Roche Diagnostics, Switzerland), према упутству произвођача.

3.6. Одређивање параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту и плазми

Протоколи за евалуацију ових биомаркера у ефлуенту донекле су различити од оних које смо користили за њихово одређивање у узорцима плазме.

3.6.1. Одређивање супероксид анјон радикала O_2^-

Одређивање концентрације супероксид анјон радикала (O_2^-) заснива се на реакцији O_2^- са нитро тетразолијум плавим (NBT) до нитроформаза плавог (126). Есејна смеша (“assay mixture”) садржи: 50 mM TRIS-HCl пуфера ($\text{pH} = 8.6$), 0.1 mM EDTA, 0.1 mg/ml желатина и 0.1 mM NBT. У епрувете се пипетира 50 μl плазме/коронарног венског ефлуента и 950 μl есејне смеше, чиме реакција отпочиње. Као слепа проба уместо узорка плазме/коронарног венског ефлуента користи се адекватна количина дестиловане воде/Krebs-Henseleit-овог раствора. Мерење смо вршили на таласној дужини од $\lambda=550\text{ nm}$.

3.6.2. Одређивање водоник пероксида - H_2O_2

Одређивање концентрације водоник пероксида заснива се на оксидацији фенол-црвеног помоћу водоник пероксида, реакцијом која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (Horse Radish Peroxidase – HRPO) (127).

У епрувету се пипетира 200 μl плазме/ефлуента и 800 μl свеже направљеног раствора фенол црвеног (Phenol Red Solution – PRS). Затим се узорцима дода 10 μl (1:20) HRPO, који је припремљен *ex tempore*. За слепоу пробу уместо узорка плазме/ефлуента

користили смо адекватну количину дестиловане воде. Након инкубације узорак на собној температури у трајању од десет минута уследило је мерење на таласној дужини од $\lambda=610\text{ nm}$.

3.6.3. Одређивање вредности индекса липидне пероксидације - TBARS

Индекс липидне пероксидације, одређује се индиректно преко продукта реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином (Thiobarbituric Acid Reactive Substances – TBARS). Метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА). За одређивање концентрације TBARS у плазми врши се специфична екстракција по следећем протоколу. У *Eppendorf* епрувете пиретира се 0.4 ml 28 % ТСА и 0.4 ml плазме. Добијене узорке смо инкубирали у леденом куртилу на температури од $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ у трајању од 10 минута. Након инкубације, узорке смо центрифугирали 4 минута на 15000 rpm. Након центрифугирања, добијена је одређена количина супернатанта (128). У епрувете се пипетира 400 μl супернатанта плазме и 100 μl 1% ТВА у 0.05 M NaOH. За одређивање концентрације TBARS у узорку ефлуента, у епрувете смо додавали ефлуент у запремини од 800 μl и 200 μl 1% ТВА у 0,05 M NaOH. Као слепа проба уместо екстракта плазме или ефлуента, користили смо еквивалентну количину дестиловане воде. Након пипетирања, узорке смо инкубирали у воденом куртилу 15 минута на температури од $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Након инкубације, узорци се прилагоде собној температури, па се приступа мерењу концентрације TBARS-а спектрофотометријском методом на таласној дужини од $\lambda=530\text{ nm}$.

3.6.4. Одређивање вредности нитрита - NO_2^-

Одређивање концентрације нитрита (NO_2^-) у плазми врши се према следећем протоколу. У *Eppendorf* епрувете пипетира се 0.1 ml 3 M PCA, 0.4 ml 20 mM EDTA и 0.2 ml плазме. Добијени узорци се инкубирају у леденом куртилу на температури од $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ у трајању од 10 минута. Након периода инкубације, узорци су центрифугирани 10 минута на 15000 rpm, након чега је уследило одливање супернатанта, а добијени преципитат се ресуспендује у 2 M K_2CO_3 до pH=7.4. У епрувете се пипетира 100 μl екстракта плазме, а затим се додаје 250 μl свеже направљеног Griess-ов реагенса и 125 μl амонијачног пуфера. За одређивање концентрације нитрита из узорка ефлуента, у епрувету се дода 1 ml ефлуента, 250 μl Griess-ов реагенса и 125 μl амонијачног пуфера. Након стабилизације боје на собној температури у периоду од 10 минута, приступа се одређивању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријском методом на таласној дужини од $\lambda=550\text{ nm}$ (129).

3.6.5. Одређивање активности каталазе - CAT

Активност каталазе је одређена методом по Aebi-у (130). Хемолизат еритроцита се разблажи дестилованом водом у односу 1:7. Узорак разблажених еритроцита у запремини од 100 μl се помеша са једнаком количином етанола, 50 μl пуфера за CAT и

1000 μl 10 mM H_2O_2 . Активност каталазе смо одредили спектофотометријски. Мерења су вршена у секстету на таласној дужини од $\lambda = 230 \text{ nm}$, коришћењем кварчне кивете.

3.6.6. Одређивање активности супероксид дисмутазе - SOD

Активност супероксид дисмутазе је одређена епинефринском методом по Beutler-у (131). У епрувету смо пипетирали 100 μl лизата еритроцита и 1 ml карбонтног пуфера. Затим смо узорак вортексирали и додали 100 μl адреналина. Мерење је вршено у дупликату на таласној дужини $\lambda = 470 \text{ nm}$.

3.6.7. Одређивање вредности редукованог глутатиона - GSH

Ниво редукованог глутатиона у лизату еритроцита одређен је спектрофотометријски методом по Beutler-а (132,133). Метода се заснива на оксидацији глутатиона GSH помоћу 5,5-дитио-бис-6,2-нитробензевом киселином (DTNB). Екстракција GSH се врши тако што се *Eppendorf* епрувете пипетира 100 μl 0.1 %EDTA, 400 μl плазме и 750 μl раствора за преципитацију. Добијени узорци се инкубирају у леденом куратилу на температури од -4°C у трајању од 10 минута. Након инкубације, узорци се центрифугирају 10 минута на 4000 rpm. За слепу пробу користи се дестилована вода. За конструкцију стандардне криве користи се стандардни раствор редукованог глутатиона концентрације 1.5 mmol/l. У 4 епрувете се пипетира (уместо лизата еритроцита) 15, 30, 45 и 60 μl 1 mM раствора GSH. Мерење активности врши се на таласној дужини од $\lambda = 420 \text{ nm}$.

3.7. Методологија хистолошког бојења

Иzolована срца, скелетни мишићи, јетра и бубрези пацова прво су измерени а након тога је уследила обрада узетих органа по специјалним протоколима за хистолошку анализу. Изоловани органи су фиксирани у 4% формалину на собној температури током 24h. По завршеној фиксацији, узорци ткива су дехидратисани спровођењем кроз серију алкохола растуће концентрације (50%, 70%, 96% и 100%), просветљавани у ксилолу и калупљени у парапласту. Попречни пресеци ткива дебљине 5 μm сечени су на ротационом микротому. Добијени пресеци сушили су се на собној температури неколико дана, након тога су депарафинисани у ксилолу и рехидрирани у опадајућим концентрацијама алкохола (100%, 96% и 70%), испирани у води, а потом бојени Haematoxylin-ом по Mayer-у, и 2% раствором еозина. Ткивни пресеци су након бојења дехидратисати, просветљени у ксилолу и монтирани на плочице са DPX-ом према стандардном протоколу. Пресеци ткива анализирани су на светлосном микроскопу (Olympus BX51) на увећању 100x и 400x у циљу визуелизације структуре ткива као и морфометријске анализе.

3.7.1. Морфометријска анализа срчаног и скелетног мишића

За морфометријску анализу срчаног и скелетног мишића (квадрицепса) користили смо стандардно хистолошко бојење Х/Е. Добијени пресеци сликани су на микроскопу Olympus BX51 на увећању 100x и 400x. Добијене слике анализирале су у софтверском програму за калибрацију слике Axiovision (Zeiss, USA). Калибрисани софтвер је затим измерио површине слика које одговарају сваком специфичном морфолошком ентитету. Мерење срчаних мишићних ћелија и скелетних мишићних ћелија квадрицепса вршена је на попречном пресеку (површина ћелије) и уздужном пресеку (дијаметар). Оба мерења изведена су на најмање 100 мишићних ћелија у сваком ткивном узорку, а просечне вредности су приказане у микрометрима или микрометрима на квадрат (134,135).

3.7.2. Имунохемијско обележавање колагених влакана у срцу - Picro-sirius red бојење

Picro-sirius red је метода коју користимо за обележавање колагених влакана. Поступак укључује депарафинизацију и рехидрацију ткива (100% -70% етанол), испирање у дестилованој води у трајању од 10 минута и инкубацији у Picro-sirius red реагенсу у трајању од сат времена. Након тога уследило је испирање у 2% сирћетној киселини у трајању од 2 минута и испирање у дестилованој води. Уследила је дехидратација кроз алкоhole (96%-100%), просветљивање у ксилолу и монтирање са DPX-ом (Sigma-Aldrich, Co., USA). Резултат бојења је црвена боја колагених влакана. Добијени пресеци сликани су на микроскопу Olympus BX51 на увећању 200x. Добијене слике анализирале су у софтверском програму Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA).

3.7.3. Имунохистохемијско обележавање Heat shock протеина 70 и SERCA пумпе у срцу

За визуелизацију Heat shock протеина 70 (HSP 70) као и SERCA пумпе користили смо специфично имунохистохемијско бојење. Пресеци срчаног ткива дебљине 5 μ m прво су депарифинисани и рехидрирани кроз опадајуће концентрације етанола (100% -70%) а затим испирани у дестилованој води. Након тога ткивни пресеци су кувани у цитратном пуферу на pH=6 на температури од 95°C у трајању од 20 минута. Након хлађења узорака на собној температури у тајању од 15 минута, уследило је блокирање ендogene пероксидазе током 10 минута и испирање узорака у PBS-у (фосфатни пуфер) током 5 минута. Ткивни пресеци су инкубирани са протеин блоком (Ultravision Protein Block, Thermo Scientific, USA) током 5 минута, а затим примарним антителом HSP 70 (abcam®,USA) и/или SERCA (abcam®,USA) током 30 минута. Ткивни пресеци срца испирани су у PBS-у (3x5 минута), инкубирани секундарним антителом (Pirimary antibody amplifier Qvanto, Thermo Scientific, USA) у трајању од 10 минута, након чега је уследило испирање у PBS-у 5 минута, додавање HRP (HRP Polymer Quanto) у трајању

од 10 минута и поновно испираниће у PBS-у 5 минута. Везујућа места на пресецима визуелизована су са 0,05% диаминобензидина (DAB; Serva, Heidelberg, Germany), након чега су ткивни пресеци контрастирани хематокилином, рехидрирани у растућим концентрацијама алкохола (70%-100%), просветљени у ксилолу и монтирани са DPX-ом (Sigma-Aldrich, Co., USA). Мерење имунопозитивности HSP 70 и SERCA у срцу вршено је у програму Image Pro Plus (Media Cybernetics, USA) на увећању 200x (136).

3.8. Статистичка обрада података

Статистичка анализа резултата је спроведена коришћењем статистичког програма SPSS 22.0 за Windows. Параметри од значаја су у зависности од њихове природе изражавани као: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења. У циљу процене нормалности расподеле користио се Kolmogorov Smirnov и Shapir Wilk тест, и графици: хистограм и normal QQ plot. За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, применио се Студентов т-тест, Mann-Whitney тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Приликом тестирања разлика између параметара, у случају постојања више подгрупа, примењивао се Bonferroni тест.

4.

Результати

4.1. Кардиодинамски параметри изолованог срца пацова

Испитивање кардиодинамских параметара обављено је како би се проценио ефекат самосталне и удружене примене гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на параметре контрактилности, релаксације, систолног и дијастолног притиска леве коморе као и срчане фреквенције. У нашој студији праћено је пет кардиодинамских параметара ($dp/dt \max$, $dp/dt \min$, SLVP, DLVP, HR) као и коронарни проток (CF).

4.1.1. Максимална стопа промене притиска у левој комори ($dp/dt \max$)

Ефекти самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на вредности максималне стопе промене притиска у левој комори изолованог срца пацова (параметар срчане контрактилности) по групама приказани су у Табели 4. Статистичке разлике у вредностима $dp/dt \max$ поређене између група од интереса приказане су у Табели бр.5.

Табела 4. Максимална стопа промене притиска у левој комори изолованог срца ($dp/dt \max$). Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (SD).

Групе	$dp/dt \max$				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
КОН	898.87 $\pm$ 101.11	1149.81 $\pm$ 146.27	1527.55 $\pm$ 163.60	1647.83 $\pm$ 179.47	1843.55 $\pm$ 194.27
T	1542.67 $\pm$ 122.33	1850.38 $\pm$ 200.56	2299.43 $\pm$ 272.05	2570.53 $\pm$ 282.80	2691.41 $\pm$ 295.22
T+B	1395.16 $\pm$ 171.77	1768.62 $\pm$ 186.01	2187.83 $\pm$ 279.27	2577.32 $\pm$ 288.52	2954.65 $\pm$ 335.35
T+K	1420.25 $\pm$ 131.03	1744.66 $\pm$ 178.45	2183.75 $\pm$ 243.24	2426.71 $\pm$ 304.83	2616.07 $\pm$ 272.81
T+B+K	1644.65 $\pm$ 224.18	1948.00 $\pm$ 239.67	2278.71 $\pm$ 179.70	2616.57 $\pm$ 285.79	2834.19 $\pm$ 226.74
T+Г	1221.39 $\pm$ 147.14	1464.94 $\pm$ 164.68	1812.96 $\pm$ 189.96	2090.11 $\pm$ 289.10	2367.69 $\pm$ 259.73
T+Г+K	1015.52 $\pm$ 215.21	1351.09 $\pm$ 165.62	1677.42 $\pm$ 189.29	1902.39 $\pm$ 215.24	2052.58 $\pm$ 262.46
T+Г+B	1332.02 $\pm$ 224.28	1655.98 $\pm$ 300.29	1966.75 $\pm$ 244.92	2182.78 $\pm$ 261.91	2403.54 $\pm$ 320.61
T+Г+K+B	981.69 $\pm$ 40.95	1629.16 $\pm$ 208.69	1806.33 $\pm$ 217.30	1990.56 $\pm$ 156.73	2217.42 $\pm$ 192.41

Сви експериментални протоколи повећали су вредности параметра срчане контрактилности на свим коронарним перфузионим притисцима (КПП) у поређењу са контролом. Супламентација гванидиноацетатом није значајано утицала на промену $dp/dt \max$ у односу на самосталан тренинг. Међутим, комбинована примена Г и К значајно је смањила вредност овог параметра на свим притисцима у поређењу са самосталним тренингом као и његовом удруженом применом са гванидиноацетатом.

Табела 5. Статистичке разлике у вредностима $dp/dt \max$ на различитим коронарним перфузионим притисцима (КПП) поређеним између група од интереса (између контролне групе -КОН; између самосталног тренинга –Т и удружене супламентације гванидиноцетата и тренинга трчања - Т+Г)

Групе	$dp/dt \max$				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
<i>КПП</i>					
<i>T vs KOH</i>	p=0,000	p=0,001	p=0,008	p=0,005	p=0,033
<i>T+B vs KOH</i>	p=0,002	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+K vs KOH</i>	p=0,001	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,003
<i>T+B+K vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г vs KOH</i>	p=0,032	p>0,05	p>0,05	p=0,017	p=0,024
<i>T+Г+K vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs KOH</i>	p=0,005	p=0,008	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs KOH</i>	p>0,05	p=0,023	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p=0,026
<i>T+K vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B+K vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г vs T</i>	p=0,024	p=0,032	p=0,031	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K vs T</i>	p=0,000	p=0,001	p=0,000	p=0,000	p=0,020
<i>T+Г+B vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs T</i>	p=0,000	p>0,05	p>0,05	p=0,042	p>0,05
<i>T+B vs T+Г</i>	p>0,05	p=0,009	p=0,003	p=0,001	p=0,001
<i>T+K vs T+Г</i>	p>0,05	p=0,010	p=0,002	p=0,005	p=0,018
<i>T+B+K vs T+Г</i>	p=0,004	p=0,000	p=0,001	p=0,000	p=0,002
<i>T+Г+K vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

4.1.2. Минимална стопа промене притиска у левој комори (dp/dt min)

Ефекти самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на вредности минималне стопе промене притиска у левој комори изолованог срца пацова (параметар релаксације срца) по групама приказани су у Табели 6.

Табела 6. Минимална стопа промене притиска у левој комори изолованог срца (dp/dt min). Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (SD).

Групе	dp/dt min				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
KOH	-588,50 $\pm 37,53$	-701,73 $\pm 85,42$	-951,50 $\pm 117,80$	-1067,13 $\pm 145,55$	-1225,50 $\pm 125,15$
T	-966.66 ± 119.74	-1202.12 ± 182.28	-1521.67 ± 132.02	-1519.17 ± 183.37	-1514.94 ± 218.03
T+B	-1078.73 ± 186.64	-1471.99 $\pm$ 195.82	-1804.54 $\pm$ 220.71	-1990.48 $\pm$ 229.26	-2283.92 ± 254.41
T+K	-859.00 ± 104.36	-1225.81 ± 207.58	-1552.94 ± 197.62	-1693.86 ± 190.18	-1759.55 ± 203.84
T+B+K	-1184.33 ± 151.48	-1394,74 $\pm 198,88$	-1679.56 ± 197.00	-1901.03 ± 204.25	-1991.90 ± 160.74
T+Г	-750.17 ± 101.90	-938.75 ± 108.89	-1247.19 ± 196.12	-1439.78 ± 199.08	-1602.50 ± 209.45
T+Г+K	-722.43 ± 98.36	-981.13 ± 100.54	-1251.21 ± 173.14	-1365.28 ± 169.39	-1542.89 ± 185.41
T+Г+B	-845.63 ± 111.26	-1104.84 ± 186.78	-1361.04 ± 186.26	-1502.73 ± 140.19	-1759.67 ± 205.19
T+Г+K+B	-498.96 ± 69.56	-1200.26 ± 137.09	-1300.81 ± 102.42	-1506.25 ± 100.71	-1786.50 ± 127.75

Параметар срчане релаксације смањен је у сви експерименталним групама на свим перфузионим притисцима у поређењу са контролом. Статистички значајна разлика вредностима dp/dt min примећена је у свим експерименталним групама на перфузионим притисцима од 60 – 120 cmH₂O у односу на самосталан тренинг. Статистички значајна разлика у вредностима dp/dt min на свим КПП примећане је у Т+К и Т+Б+К групи у односу на Т+Г групу.

Табела 7. Статистичке разлике у вредностима $dp/dt \text{ min}$ на различитим коронарним перфузионим притисцима (КПП) поређеним између група од интереса (између контролне групе -КОН; између самосталног тренинга –Т и удружене супламентације гванидиноацетат и тренинга трчања - Т+Г)

<i>Групе</i>	<i>$dp/dt \text{ min}$</i>				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
<i>T vs KOH</i>	p=0,007	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B vs KOH</i>	p=0,001	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+K vs KOH</i>	p=0,040	p=0,000	p=0,000	p=0,001	p=0,007
<i>T+B+K vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs KOH</i>	p=0,046	p=0,041	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs KOH</i>	p>0,05	p=0,008	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B vs T</i>	p>0,05	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+K vs T</i>	p>0,05	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B+K vs T</i>	p>0,05	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г vs T</i>	p>0,05	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+K vs T</i>	p=0,048	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+B vs T</i>	p>0,05	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+K+B vs T</i>	p=0,001	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B vs T+Г</i>	p=0,012	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+K vs T+Г</i>	p>0,05	p=0,011	p=0,008	p=0,029	p>0,05
<i>T+B+K vs T+Г</i>	p=0,001	p=0,000	p=0,001	p=0,002	p=0,006
<i>T+Г+K vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

4.1.3. Систолни притисак леве коморе изолованог срца пацова (SLVP)

У табели 8 и 9 су приказани ефекти самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на вредности систолног притиска у левој комори изолованог срца пацова.

Табела 8. Систолни притисак леве коморе изолованог срца пацова (SLVP). Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (SD).

Групе	SLVP				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
КПП					
КОН	29.62 $\pm$ 1.77	35.44 $\pm$ 3.30	41.42 $\pm$ 3.62	40.74 $\pm$ 4.45	48.53 $\pm$ 4.09
Т	33.48 $\pm$ 3.80	41.47 $\pm$ 4.58	50.32 $\pm$ 5.46	52.26 $\pm$ 5.56	52.05 $\pm$ 5.69
Т+Б	32.72 $\pm$ 4.15	44.69 $\pm$ 5.31	55.56 $\pm$ 6.26	62.73 $\pm$ 7.13	72.54 $\pm$ 7.43
Т+К	36.45 $\pm$ 3.86	44.26 $\pm$ 3.50	53.67 $\pm$ 5.36	58.12 $\pm$ 5.23	60.08 $\pm$ 6.19
Т+Б+К	38.99 $\pm$ 3.65	47.05 $\pm$ 4.27	56.77 $\pm$ 5.13	62.84 $\pm$ 6.45	67.71 $\pm$ 6.10
Т+Г	27.42 $\pm$ 3.69	34.60 $\pm$ 3.74	44.72 $\pm$ 4.56	48.34 $\pm$ 5.24	52.64 $\pm$ 5.50
Т+Г+К	29.38 $\pm$ 3.11	33.39 $\pm$ 3.80	37.38 $\pm$ 4.11	39.21 $\pm$ 4.44	44.76 $\pm$ 4.34
Т+Г+Б	33.21 $\pm$ 3.90	39.55 $\pm$ 3.93	44.42 $\pm$ 4.64	47.44 $\pm$ 4.33	52.82 $\pm$ 5.44
Т+Г+К+Б	31.77 $\pm$ 2.02	36.34 $\pm$ 2.27	38.83 $\pm$ 2.60	41.55 $\pm$ 3.67	45.57 $\pm$ 4.40

Статистички значајно повећања систолног притиска у левој комори на КПП од 60-120 cmH₂O уочено је у групама Т+К, Т+Б и Т+Б+К у поређењу са контролном групом и групом која је била подвргнута тренингу и групом која је била на супламентацији гванидиноацетата и тренингу. У осталим експерименталним групама није примећена значајна промена SLVP у поређењу групама од интереса (КОН; Т; Т+Г групама).

Табела 9. Статистичке разлике у вредностима SLVP на различитим коронарним перфузионим притисцима (КПП) поређеним између група од интереса (између контролне групе -КОН; између самосталног тренинга –Т и удружене супламентације ванидина и тренинга трчања - Т+Г)

<i>Групе</i> <i>КПП</i>	<i>SLVP</i>				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
<i>T vs KOH</i>	p=0,007	p=0,013	p=0,001	p=0,001	p>0,05
<i>T+B vs KOH</i>	p>0,05	p=0,029	p=0,006	p=0,001	p=0,000
<i>T+K vs KOH</i>	p>0,05	p=0,031	p=0,013	p=0,000	p=0,038
<i>T+B+K vs KOH</i>	p=0,013	p=0,007	p=0,003	p=0,001	p=0,002
<i>T+Г vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B vs T</i>	p>0,05	p=0,017	p=0,006	p=0,001	p=0,000
<i>T+K vs T</i>	p>0,05	p=0,017	p=0,012	p=0,0012	p=0,015
<i>T+B+K vs T</i>	p>0,05	p=0,004	p=0,003	p=0,001	p=0,000
<i>T+Г vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B vs T+Г</i>	p>0,05	p=0,016	p=0,006	p=0,004	p=0,000
<i>T+K vs T+Г</i>	p=0,010	p=0,017	p=0,013	p=0,023	p>0,05
<i>T+B+K vs T+Г</i>	p=0,002	p=0,003	p=0,003	p=0,003	p=0,003
<i>T+Г+K vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p=0,029	p>0,05
<i>T+Г+B vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

4.1.4. Дијастолни притисак леве коморе изолованог срца пацова (DLVP)

У табели 10 и 11 су приказани ефекти самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова по групама, на вредности дијастолног притиска у левој комори изолованог срца пацова.

Табела 10. Дијастолни притисак леве коморе изолованог срца пацова (DLVP). Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (SD).

Групе	DLVP				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
КПП					
КОН	7.85 $\pm$ 1.34	8.00 $\pm$ 1.03	6.91 $\pm$ 1.11	7.18 $\pm$ 1.21	9.41 $\pm$ 1.29
T	5.23 $\pm$ 0.59	4.59 $\pm$ 0.63	4.76 $\pm$ 0.59	5.02 $\pm$ 0.54	5.02 $\pm$ 0.80
T+B	4.64 $\pm$ 0.64	4.71 $\pm$ 0.41	5.48 $\pm$ 0.54	5.75 $\pm$ 0.63	6.52 $\pm$ 0.93
T+K	4.18 $\pm$ 0.54	4.03 $\pm$ 0.60	3.76 $\pm$ 0.49	4.30 $\pm$ 0.57	4.54 $\pm$ 0.57
T+B+K	3.65 $\pm$ 0.44	4.12 $\pm$ 0.49	4.21 $\pm$ 0.52	4.65 $\pm$ 0.65	4.63 $\pm$ 0.59
T+Г	4.83 $\pm$ 0.39	5.45 $\pm$ 0.23	5.41 $\pm$ 0.59	5.37 $\pm$ 0.69	5.60 $\pm$ 0.72
T+Г+K	5.06 $\pm$ 0.78	5.03 $\pm$ 0.63	4.52 $\pm$ 0.46	4.08 $\pm$ 0.48	4.26 $\pm$ 0.69
T+Г+B	4.85 $\pm$ 0.63	5.39 $\pm$ 0.67	5.36 $\pm$ 0.73	5.40 $\pm$ 0.94	6.11 $\pm$ 0.59
T+Г+K+B	5.22 $\pm$ 0.56	5.14 $\pm$ 0.98	5.04 $\pm$ 0.77	5.16 $\pm$ 0.85	5.85 $\pm$ 0.55

Сви експериментални протоколи значајно су снизили вредности дијастолоног притиска у левој комори на свим коронарним перфузионим притисцима (КПП) у поређењу са контролом. Супламентација креатином самостално и у комбинацији са бетаином код тренираних пацова значајно је смањила вредности DLVP на КПП од 40-80 cmH₂O у поређењу са самосталним тренингом и у комбинацији са гванидиноацетатом.

Табела 11. Статистичке разлике у вредностима DLVP на различитим коронарним перфузионим притисцима (КПП) поређеним између група од интереса (између контролне групе -КОН; између самосталног тренинга –Т и удружене супламентације гванидиноацетатом и тренинга трчања - Т+Г).

Групе	DLVP				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
КПП					
<i>T vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,037	p=0,022	p=0,000
<i>T+B vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,031	p>0,05	p=0,000
<i>T+K vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B+K vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,002	p=0,000
<i>T+Г vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,034	p=0,017	p=0,000
<i>T+Г+K vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,003	p=0,002	p=0,000
<i>T+Г+B vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,018	p=0,027	p=0,000
<i>T+Г+K+B vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,013	p>0,05	p=0,000
<i>T+B vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p=0,016
<i>T+K vs T</i>	p=0,016	p=0,006	p=0,004	p>0,05	p>0,05
<i>T+B+K vs T</i>	p=0,001	p=0,013	p=0,033	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+K vs T+Г</i>	p>0,05	p=0,010	p=0,004	p>0,05	p>0,05
<i>T+B+K vs T+Г</i>	p=0,010	p=0,020	p=0,036	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

4.1.5. Срчана фреквенца изолованог срца пацова (HR)

Ефекти самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на вредности срчане фреквенције изолованог срца пацова приказани су у Табели 12 и 13.

Табела 12. Срчана фреквенца изолованог срца пацова (HR). Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (SD).

Групе	HR				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
КПП					
КОН	257.18 $\pm$ 17.34	280.76 $\pm$ 22.37	285.98 $\pm$ 20.63	286.01 $\pm$ 19.26	284.42 $\pm$ 13.54
T	328.92 $\pm$ 37.64	331.85 $\pm$ 39.36	325.15 $\pm$ 35.13	335.28 $\pm$ 19.79	337.56 $\pm$ 16.81
T+B	306.45 $\pm$ 2.24	314.68 $\pm$ 17.17	328.11 $\pm$ 15.62	326.11 $\pm$ 14.97	321.48 $\pm$ 14.98
T+K	285.02 $\pm$ 37.19	284.03 $\pm$ 29.66	287.65 $\pm$ 32.51	280.35 $\pm$ 35.61	290.22 $\pm$ 31.58
T+B+K	300.42 $\pm$ 33.39	317.12 $\pm$ 36.36	328.32 $\pm$ 27.22	328.23 $\pm$ 22.41	327.81 $\pm$ 22.69
T+Г	305.76 $\pm$ 32.50	305.23 $\pm$ 19.90	309.50 $\pm$ 12.05	304.90 $\pm$ 29.46	300.13 $\pm$ 24.77
T+Г+K	318.64 $\pm$ 30.44	315.12 $\pm$ 28.93	320.69 $\pm$ 26.31	312.51 $\pm$ 29.08	312.74 $\pm$ 30.13
T+Г+B	271.05 $\pm$ 15.03	304.05 $\pm$ 23.06	321.39 $\pm$ 18.55	333.63 $\pm$ 27.73	325.62 $\pm$ 19.68
T+Г+K+B	302.93 $\pm$ 32.49	314.64 $\pm$ 34.75	304.36 $\pm$ 38.17	308.01 $\pm$ 23.13	305.23 $\pm$ 32.97

Вредности срчане фреквенце повећане су у свим експерименталним групама у поређењу са контролом. Самостална суплементација креатином као и самостална суплементација гванидиноацетатом код тренираних пацова значајно снижава срчану фреквенцу на свим КПП у поређењу са самосталним тренингом. С друге стране, срчана фреквенца је значајно промењена у свим експерименталним групама на перфузионим притисцима од 40-100 cmH₂O у односу на примену гванидиноацетатом и тренига.

Табела 13. Статистичке разлике у вредностима HR на различитим коронарним перфузионим притисцима (КПП) поређеним између група од интереса (између контролне групе -КОН; између самосталног тренинга –Т и удружене супламентације гванидиноацетата и тренинга трчања - Т+Г).

Групе	HR				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
КПП					
<i>T vs KOH</i>	p=0,002	p>0,05	p=0,003	p=0,013	p=0,008
<i>T+B vs KOH</i>	p=0,026	p>0,05	p=0,046	p=0,047	p=0,047
<i>T+K vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B+K vs KOH</i>	p=0,048	p>0,05	p=0,045	p=0,037	p=0,021
<i>T+Г vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p>0,05
<i>T+Г+K vs KOH</i>	p=0,005	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p=0,046
<i>T+Г+B vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p=0,038	p=0,034	p=0,036
<i>T+Г+K+B vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+K vs T</i>	p=0,027	p>0,05	p=0,002	p=0,013	p=0,009
<i>T+B+K vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,029
<i>T+Г+K vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs T</i>	p=0,026	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p>0,05
<i>T+K vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p>0,05
<i>T+B+K vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p>0,05
<i>T+Г+K vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p>0,05
<i>T+Г+B vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p>0,05

4.1.6. Коронарни проток изолованог срца пацова (CF)

У табели 14 и 15 су приказани ефекти самосталне и удружене суплементације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова по групама, на вредности коронарног протока у левој комори изолованог срца пацова.

Табела 14. Коронарни проток изолованог срца пацова (CF). Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (SD).

<i>Групе</i>	<i>CF</i>				
	40 cmH₂O	60 cmH₂O	80 cmH₂O	100 cmH₂O	120 cmH₂O
<i>КПП</i>					
<i>КОН</i>	8.10 $\pm$ 0.84	10.10 $\pm$ 1.00	11.85 $\pm$ 1.84	12.90 $\pm$ 1.37	15.50 $\pm$ 1.68
<i>T</i>	10.40 $\pm$ 1.95	12.80 $\pm$ 2.20	12.60 $\pm$ 1.44	12.88 $\pm$ 2.14	14.72 $\pm$ 2.52
<i>T+B</i>	9.56 $\pm$ 1.98	12.36 $\pm$ 2.70	14.40 $\pm$ 2.17	16.40 $\pm$ 2.30	18.56 $\pm$ 2.10
<i>T+K</i>	8.63 $\pm$ 1.36	10.60 $\pm$ 1.88	12.00 $\pm$ 1.94	12.03 $\pm$ 2.08	13.07 $\pm$ 1.47
<i>T+B+K</i>	11.76 $\pm$ 2.87	14.88 $\pm$ 2.47	17.04 $\pm$ 2.67	15.04 $\pm$ 2.61	16.00 $\pm$ 2.41
<i>T+Г</i>	7.56 $\pm$ 1.17	11.76 $\pm$ 1.85	12.28 $\pm$ 2.03	13.36 $\pm$ 2.26	14.32 $\pm$ 1.88
<i>T+Г+K</i>	10.43 $\pm$ 1.80	12.17 $\pm$ 1.73	13.73 $\pm$ 1.73	14.83 $\pm$ 2.05	15.93 $\pm$ 2.13
<i>T+Г+B</i>	8.44 $\pm$ 0.94	11.68 $\pm$ 2.02	15.04 $\pm$ 1.81	17.28 $\pm$ 2.05	20.80 $\pm$ 3.01
<i>T+Г+K+B</i>	8.70 $\pm$ 0.90	10.75 $\pm$ 1.37	12.65 $\pm$ 0.38	14.50 $\pm$ 1.40	17.10 $\pm$ 1.86

Вредности коронарног протока нису значајно промењене су у свим експерименталним групама у поређењу са контролом. Сличан тренд је уочен и приликом поређења експерименталних група са самосталним тренингом као и са симултаном применом гванидиноацетата и тренинга.

Табела 15. Статистичке разлике у вредностима CF на различитим коронарним перфузионим притисцима (КПП) поређеним између група од интереса (између контролне групе -КОН; између самосталног тренинга –Т и удружене супламентације гванидиноацетата и тренинга трчања - Т+Г).

Групе	CF				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
<i>КПП</i>					
<i>T vs KOH</i>	p>0,05	p=0,040	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B vs KOH</i>	p>0,05	p=0,007	p=0,015	p=0,008	p>0,05
<i>T+K vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B+K vs KOH</i>	p>0,05	p=0,003	p=0,006	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs KOH</i>	p=0,010	p>0,05	p>0,05	p=0,003	p=0,023
<i>T+B vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p=0,038	p>0,05
<i>T+K vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B+K vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г vs T</i>	p=0,031	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p=0,042
<i>T+Г+K+B vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p=0,015	p=0,004
<i>T+B vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p=0,046	p>0,05
<i>T+K vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B+K vs T+Г</i>	p=0,002	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K vs T+Г</i>	p=0,023	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p=0,019	p=0,029

4.2. Редокс статус у коронарном венском ефлуенту

4.2.1. Супероксид анјон радикал (O_2^-)

Ефекти самосталне и удружене суплементације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на вредности супероксид анјон радикала (O_2^-) у коронарном венском ефлуенту приказани су у Табели 16 и 17.

Табела 16. Супероксид анјон радикал у коронарном ефлуенту изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (SD).

<i>Групе</i>	<i>O_2^- (nmol/ml)</i>				
<i>КПП</i>	40 cmH₂O	60 cmH₂O	80 cmH₂O	100 cmH₂O	120 cmH₂O
<i>КОН</i>	5.10 $\pm$ 0.77	6.13 $\pm$ 0.97	7.49 $\pm$ 0.99	9.51 $\pm$ 0.93	13.11 $\pm$ 1.37
<i>T</i>	6.95 $\pm$ 0.81	8.54 $\pm$ 0.89	9.66 $\pm$ 0.97	12.29 $\pm$ 1.25	14.50 $\pm$ 1.23
<i>T+B</i>	3.69 $\pm$ 0.93	5.16 $\pm$ 0.65	6.51 $\pm$ 0.92	7.99 $\pm$ 0.89	8.46 $\pm$ 0.89
<i>T+K</i>	14.19 $\pm$ 1.96	18.20 $\pm$ 1.90	20.48 $\pm$ 1.39	23.52 $\pm$ 1.26	24.34 $\pm$ 2.14
<i>T+B+K</i>	6.55 $\pm$ 0.75	11.87 $\pm$ 1.09	15.82 $\pm$ 1.74	17.81 $\pm$ 0.62	19.16 $\pm$ 0.88
<i>T+Г</i>	3.97 $\pm$ 1.25	7.59 $\pm$ 0.87	9.53 $\pm$ 0.80	11.53 $\pm$ 1.36	13.43 $\pm$ 1.81
<i>T+Г+K</i>	10.67 $\pm$ 1.49	12.68 $\pm$ 1.61	16.38 $\pm$ 1.12	22.30 $\pm$ 1.73	25.09 $\pm$ 0.80
<i>T+Г+B</i>	12.70 $\pm$ 1.61	17.40 $\pm$ 1.59	20.70 $\pm$ 1.00	22.16 $\pm$ 1.65	25.39 $\pm$ 0.56
<i>T+Г+K+B</i>	7.11 $\pm$ 0.82	12.78 $\pm$ 0.91	14.34 $\pm$ 1.58	16.29 $\pm$ 0.76	21.83 $\pm$ 1.23

Вредности супероксид анјон радикала значајно су повишене у свим групама готово на свим перфузионим притисцима у поређењу са групама од интереса (КОН-контола; Т- тренинг; Т+Г- суплементација гванидиноацетатом и тренингом).

Табела 17. Статистичке разлике у вредностима O_2 - на различитим коронарним перфузионим притисцима (КПП) поређеним између група од интереса (између контролне групе -КОН; између самосталног тренинга –Т и удружене супламентације гванидиноцеататом и тренинга трчања - Т+Г).

Групе	O_2 -				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
<i>КПП</i>					
<i>T vs KOH</i>	p=0,013	p=0,014	p=0,006	p>0,05	p=0,023
<i>T+B vs KOH</i>	p>0,05	p=0,020	p=0,002	p>0,05	p=0,000
<i>T+K vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B+K vs KOH</i>	p=0,039	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г vs KOH</i>	p>0,05	p=0,041	p=0,005	p=0,007	p>0,05
<i>T+Г+K vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+B vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+K+B vs KOH</i>	p=0,007	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,007	p>0,05
<i>T+K vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B+K vs T</i>	p>0,05	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г vs T</i>	p=0,000	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p=0,009
<i>T+Г+K vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+B vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+K+B vs T</i>	p>0,05	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B vs T+Г</i>	p>0,05	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+K vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B+K vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+K vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+B vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+K+B vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000

4.2.2. Водоник пероксид (H_2O_2)

Ефекти самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на вредности водоник пероксида (H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту приказани су у Табели 18 и 19.

Табела 18. Водоник пероксид у коронарном ефлуенту изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (SD).

<i>Групе</i>	<i>H_2O_2 (nmol/ml)</i>				
<i>КПП</i>	40 cmH₂O	60 cmH₂O	80 cmH₂O	100 cmH₂O	120 cmH₂O
<i>КОН</i>	34.19 $\pm$ 3.66	46.59 $\pm$ 4.95	56.66 $\pm$ 5.99	69.99 $\pm$ 7.17	68.60 $\pm$ 5.77
<i>T</i>	48.31 $\pm$ 4.11	63.68 $\pm$ 7.76	68.64 $\pm$ 8.38	74.78 $\pm$ 7.55	81.29 $\pm$ 8.50
<i>T+B</i>	16.96 $\pm$ 4.24	22.25 $\pm$ 1.52	24.65 $\pm$ 2.45	28.46 $\pm$ 3.61	31.26 $\pm$ 3.54
<i>T+K</i>	18.73 $\pm$ 1.60	23.36 $\pm$ 3.38	29.37 $\pm$ 4.18	32.15 $\pm$ 4.44	34.46 $\pm$ 4.75
<i>T+B+K</i>	14.59 $\pm$ 2.42	24.89 $\pm$ 3.21	29.46 $\pm$ 2.89	29.13 $\pm$ 3.60	30.40 $\pm$ 1.97
<i>T+Г</i>	13.88 $\pm$ 2.08	21.10 $\pm$ 2.33	25.50 $\pm$ 2.58	29.87 $\pm$ 3.11	31.79 $\pm$ 4.02
<i>T+Г+K</i>	36.82 $\pm$ 4.68	40.36 $\pm$ 2.54	40.01 $\pm$ 5.61	53.88 $\pm$ 5.63	56.06 $\pm$ 5.26
<i>T+Г+B</i>	21.03 $\pm$ 2.66	27.54 $\pm$ 3.82	34.48 $\pm$ 3.87	39.14 $\pm$ 5.28	45.40 $\pm$ 6.72
<i>T+Г+K+B</i>	23.74 $\pm$ 3.45	32.30 $\pm$ 4.91	36.18 $\pm$ 5.95	40.96 $\pm$ 4.73	47.56 $\pm$ 3.73

Сви експериментални протоколи значајно су утицали на промену вредности водоник пероксида (било да се ради о порасту или пак смањењу вредности) у односу на групе од интереса (контроле, тренинга или супламентације гванидиноацетата и тренинга).

Табела 19. Статистичке разлике у вредностима H_2O_2 на различитим коронарним перфузионим притисцима (КПП) поређеним између група од интереса (између контролне групе -КОН; између самосталног тренинга –Т и удружене супламентације гванидиноацетата и тренинга трчања - Т+Г).

Групе	H_2O_2				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
КПП					
<i>T vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+K vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B+K vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+K vs KOH</i>	p>0,05	p=0,012	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+B vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+K+B vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+K vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B+K vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+K vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+B vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+K+B vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+K vs T+Г</i>	p=0,007	p=0,007	p>0,05	p>0,05	p=0,007
<i>T+B+K vs T+Г</i>	p>0,05	p=0,041	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+B vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,003	p=0,004	p=0,000
<i>T+Г+K+B vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,014	p=0,001	p=0,000	p=0,000

4.2.3. Индекс липидне пероксидације (TBARS)

У табели 20 и 21 су приказани ефекти самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) у коронарном венском ефлуенту.

Табела 20. Индекс липидне пероксидације у коронарном ефлуенту изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (SD).

Групе	TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
КПП					
КОН	8.46 $\pm$ 0.70	11.51 $\pm$ 0.93	13.84 $\pm$ 1.28	15.25 $\pm$ 1.63	17.30 $\pm$ 1.57
Т	12.27 $\pm$ 1.54	13.60 $\pm$ 1.38	14.60 $\pm$ 1.89	15.08 $\pm$ 1.84	16.16 $\pm$ 1.75
Т+Б	11.27 $\pm$ 1.30	13.99 $\pm$ 1.97	16.19 $\pm$ 1.50	16.93 $\pm$ 1.74	17.59 $\pm$ 1.84
Т+К	17.62 $\pm$ 1.86	23.95 $\pm$ 2.81	26.13 $\pm$ 2.38	27.47 $\pm$ 3.42	31.13 $\pm$ 4.18
Т+Б+К	12.76 $\pm$ 1.13	16.58 $\pm$ 2.61	20.40 $\pm$ 1.66	22.20 $\pm$ 2.78	24.10 $\pm$ 2.01
Т+Г	9.75 $\pm$ 1.37	13.66 $\pm$ 1.54	15.91 $\pm$ 1.42	17.60 $\pm$ 1.30	19.61 $\pm$ 1.79
Т+Г+К	12.48 $\pm$ 2.40	13.81 $\pm$ 2.77	15.55 $\pm$ 2.46	16.99 $\pm$ 3.59	19.86 $\pm$ 4.37
Т+Г+Б	6.66 $\pm$ 1.87	10.39 $\pm$ 1.93	13.31 $\pm$ 2.35	16.71 $\pm$ 1.33	17.20 $\pm$ 1.53
Т+Г+К+Б	15.58 $\pm$ 1.36	22.98 $\pm$ 2.15	29.77 $\pm$ 3.26	32.70 $\pm$ 4.24	33.09 $\pm$ 4.17

Индекс липидне пероксидације значајно је промењен на свим коронарним перфузионим притисцима у групама Т+К и Т+Г+К+Б у поређењу са групама од интереса (К-контолом, Т- тренингом и Т+Г – тренинг и гванидиноацетат).

Табела 21. Статистичке разлике у вредностима TBARS на различитим коронарним перфузионим притисцима (КПП) поређеним између група од интереса (између контролне групе -КОН; између самосталног тренинга –Т и удружене супламентације гванидиноацетатом и тренинга трчања - Т+Г).

Групе	TBARS				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
<i>КПП</i>					
<i>T vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B vs KOH</i>	p=0,001	p=0,000	p=0,040	p>0,05	p>0,05
<i>T+K vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B+K vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p=0,007	p=0,019	p>0,05
<i>T+Г vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p=0,041	p=0,023	p>0,05
<i>T+Г+K vs KOH</i>	p=0,000	p=0,040	p>0,05	p>0,05	p=0,047
<i>T+Г+B vs KOH</i>	p=0,024	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+K vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B+K vs T</i>	p=0,003	p>0,05	p>0,05	p=0,038	p>0,05
<i>T+Г vs T</i>	p=0,003	p>0,05	p>0,05	p=0,044	p>0,05
<i>T+Г+K vs T</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs T</i>	p=0,000	p=0,007	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+K vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B+K vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K vs T+Г</i>	p=0,001	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,009	p=0,019	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K+B vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000

4.2.4. Нитрити (NO₂-)

Табела 22 и 23 приказује ефекте самосталне и удружене суплементације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на вредности нитрита у коронарном венском ефлуенту.

Табела 22. Азот моноксид (нитрити) у коронарном ефлуенту изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (SD).

<i>Групе</i>	<i>NO₂- (nmol/ml)</i>				
<i>КПП</i>	40 cmH₂O	60 cmH₂O	80 cmH₂O	100 cmH₂O	120 cmH₂O
<i>КОН</i>	83.34 $\pm$ 8.85	102.45 $\pm$ 6.26	135.46 $\pm$ 9.58	149.71 $\pm$ 15.68	166.31 $\pm$ 16.61
<i>T</i>	141.88 $\pm$ 10.34	162.33 $\pm$ 11.61	168.56 $\pm$ 21.69	183.15 $\pm$ 8.27	198.26 $\pm$ 16.86
<i>T+B</i>	65.67 $\pm$ 6.14	76.02 $\pm$ 8.29	90.11 $\pm$ 9.57	115.63 $\pm$ 11.57	140.11 $\pm$ 9.70
<i>T+K</i>	89.73 $\pm$ 9.38	102.08 $\pm$ 14.22	134.05 $\pm$ 16.96	163.62 $\pm$ 11.31	175.66 $\pm$ 14.55
<i>T+B+K</i>	122.41 $\pm$ 17.15	179.25 $\pm$ 20.62	224.01 $\pm$ 18.11	239.39 $\pm$ 28.36	273.66 $\pm$ 27.39
<i>T+Г</i>	83.52 $\pm$ 9.79	129.70 $\pm$ 13.29	154.37 $\pm$ 10.69	163.92 $\pm$ 16.70	175.82 $\pm$ 19.07
<i>T+Г+K</i>	108.17 $\pm$ 9.25	133.69 $\pm$ 10.70	144.28 $\pm$ 15.82	156.10 $\pm$ 18.53	168.24 $\pm$ 12.30
<i>T+Г+B</i>	90.21 $\pm$ 8.33	137.18 $\pm$ 14.21	166.71 $\pm$ 15.04	179.97 $\pm$ 13.68	239.48 $\pm$ 27.93
<i>T+Г+K+B</i>	77.94 $\pm$ 7.47	92.22 $\pm$ 8.83	101.58 $\pm$ 6.78	115.92 $\pm$ 14.19	135.72 $\pm$ 14.90

Нитрити су значајно повишени у групама које су подвргнуте тренингу самостално или у комбинацији са бетаином и креатином на свим КПП док је у групи Т+Б вредност значајно смањена у поређењу са контролом. Самостална суплементација бетаином као и његова комбинована примена са креатином и гванидиноацетатом код тренираних пацова значајно је промењена на свим КПП у поређењу са самосталним тренингом. Самостална примена бетаина (Т+Б) и у комбинацији са креатином (Т+Б+К) и у комбинацији са гванидиноацетатом (Т+Г+К+Б) промењене су на свим КПП у поређењу са Т+Г групом.

Табела 23. Статистичке разлике у вредностима NO_2^- на различитим коронарним перфузионим притисцима (КПП) поређеним између група од интереса (између контролне групе -КОН; између самосталног тренинга –Т и удружене супламентације гванидиноацетатом и тренинга трчања - Т+Г).

<i>Групе</i>	<i>NO_2^-</i>				
	40 cmH ₂ O	60 cmH ₂ O	80 cmH ₂ O	100 cmH ₂ O	120 cmH ₂ O
<i>КПП</i>					
<i>T vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,001	p=0,017	p>0,05
<i>T+B vs KOH</i>	p=0,004	p=0,041	p=0,009	p=0,004	p=0,002
<i>T+K vs KOH</i>	p>0,05	p=0,004	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B+K vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г vs KOH</i>	p>0,05	p=0,000	p=0,012	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K vs KOH</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs KOH</i>	p>0,05	p=0,000	p>0,05	p=0,003	p=0,000
<i>T+Г+K+B vs KOH</i>	p>0,05	p>0,05	p=0,000	p=0,001	p=0,004
<i>T+B vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+K vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B+K vs T</i>	p=0,002	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г vs T</i>	p=0,000	p=0,003	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+K vs T</i>	p=0,000	p=0,013	p=0,020	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs T</i>	p=0,000	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p=0,000
<i>T+Г+K+B vs T</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+B vs T+Г</i>	p=0,004	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+K vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+B+K vs T+Г</i>	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
<i>T+Г+K vs T+Г</i>	p=0,000	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<i>T+Г+B vs T+Г</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p=0,000
<i>T+Г+K+B vs T+Г</i>	p>0,05	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000

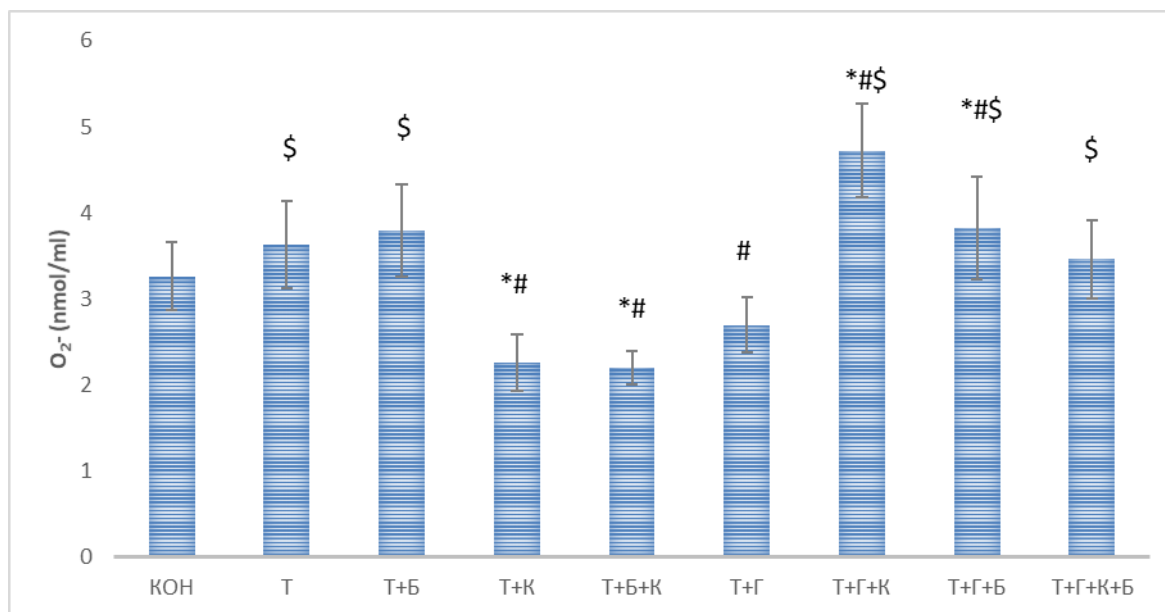
4.3. Системски редокс статус

4.3.1. Прооксидативни маркери

Промене прооксидативних маркера (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- , TBARS) након самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова приказани су на графиконима бр.1-4.

4.3.1.1. Супероксид анјон радикал

Промене вредности супероксид анјон радикала након завршеног експерименталног периода приказане су на графикону бр.1.

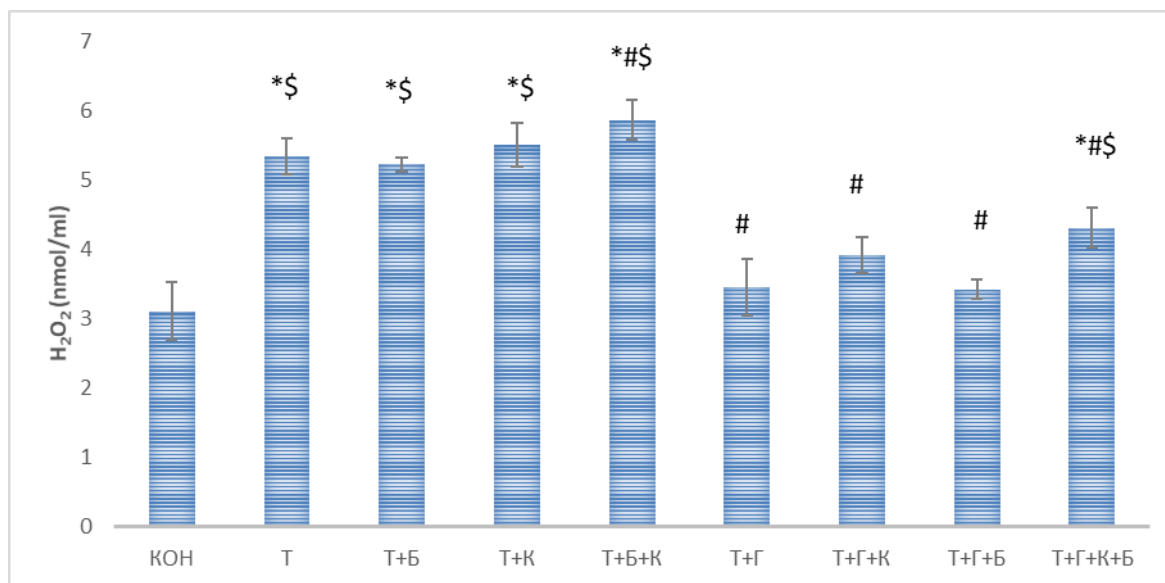


Графикон бр. 1. Просечне вредности O_2^- након завршеног експерименталног протокола. Вредности су представљене као средње $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене супламентације гванидиноацетатом и тренинга трчања - Т+Г (\$).

Вредности супероксид анјон радикала значајно су снижене у Т+К, Т+Б+К и Т+Г групи у односу на групе КОН и Т. Највеће повећање вредности O_2^- уочене су у групи која је била на удруженој супламентацији гванидиноацетатом и креатином у односу на групе КОН, Т и Т+Г (Графикон 1).

4.3.1.2. Водоник пероксид

Промене вредности H_2O_2 након завршеног експерименталног протокола приказан је на графикону бр 2.

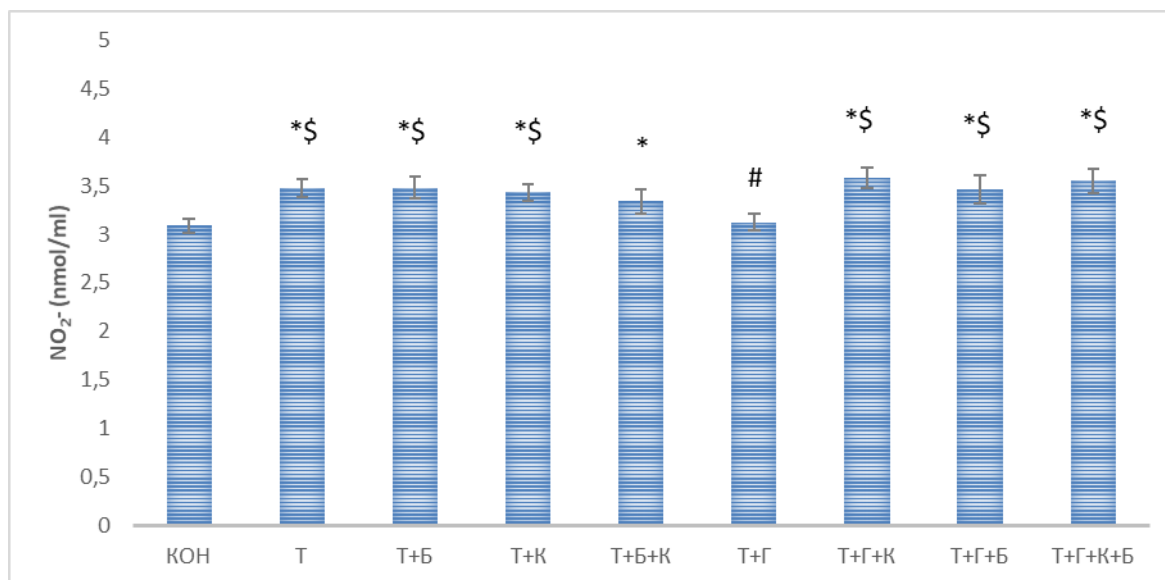


Графикон бр. 2. Просечне вредности H_2O_2 након завршеног експерименталног протокола. Вредности су представљене као средње $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене суплементације гванидиноацетатом и тренинга трчања - Т+Г (\$).

Самосталан тренинг као и његова удружена суплементација са бетаином и креатином значајно повећава вредности водоник пероксида у односу на контролну групу. С друге стране, самостална и удружена суплементација гванидиноацетатом и креатина и бетаина значајно смањује вредности H_2O_2 у односу на групу која је била потвргнута само тренингу (Графикон 2).

4.3.1.3. Нитрити

Промене вредности нитрити након супламентације гванидиноацетатом, креатином и бетаином након експерименталног периода приказане су на графикону бр.3.

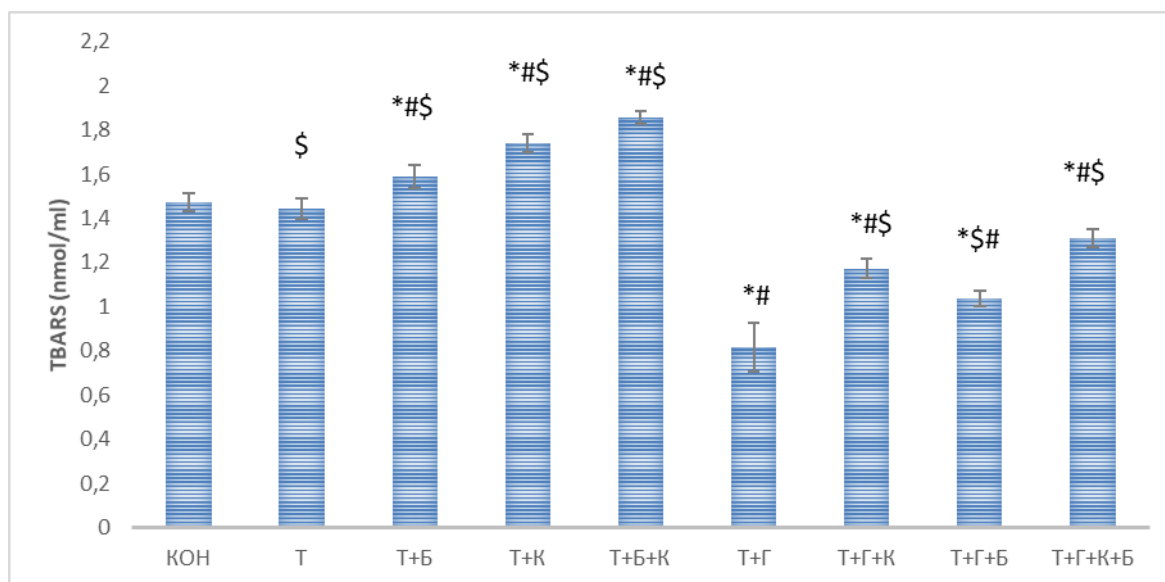


Графикон бр. 3. Просечне вредности NO₂⁻ након завршеног експерименталног протокола. Вредности су представљене као средње $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене супламентације гванидиноацетатом и тренинга трчања - Т+Г (\$).

Вредности нитрита, повећане су у свим експерименталним групама, изузев у Т+Г групи, у поређењу са контролним вредностима. Удужена суплементација гванидиноацетатом и тренинга смањила је вредности нитрита у односу на сам тренинг (Графикон 3).

4.3.1.4. Индекс липидне пероксидације

Промене вредности индекса липидне пероксидације, мереном као TBARS приказан је на графикону бр.4.



Графикон бр. 4. Просечне вредности TBARS након завршеног експерименталног протокола. Вредности су представљене као средње $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене суплементације гванидиноацетатом и тренинга трчања - Т+Г (\$).

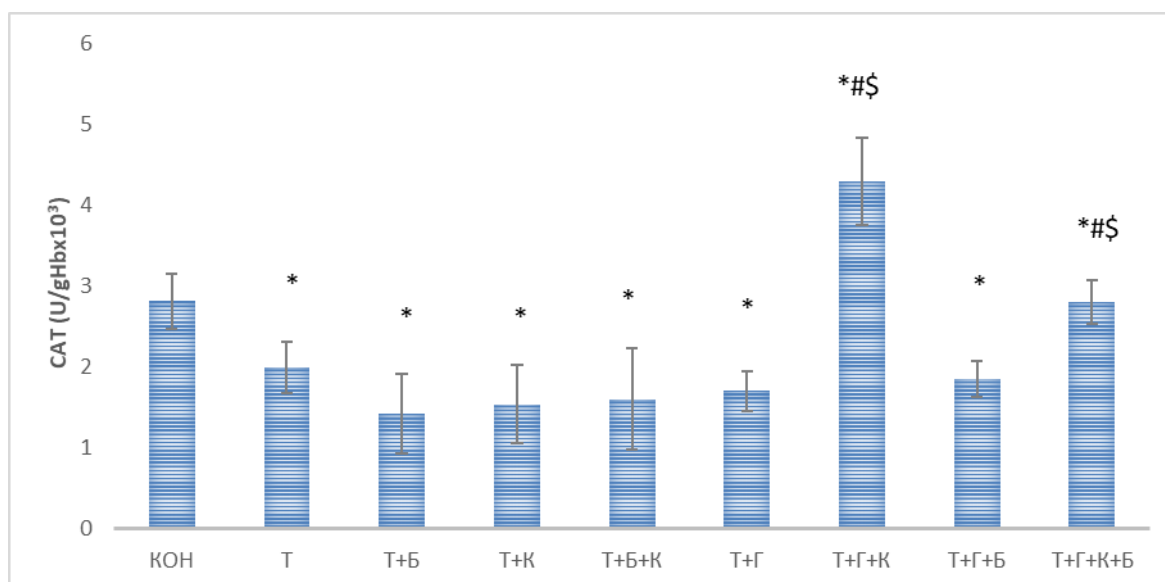
Самостална и удружена примена бетаина и креатина са тренингом значајно повећава вредности индекса липидне пероксидације у односу на контролне вредности. С друге стране, суплементација гванидиноацетатом самостално или у комбинацији са бетаином и креатином код тренираних пацова значајно самњује нивое TBARS-а у односу на контролне вредности као и самосталан тренинг (Графикон 4)

4.3.2. Маркери антиоксидативне заштите

Промене маркера антиоксидативне заштите након самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова приказани су на графиконима бр. 5-7.

4.3.2.1. Каталаза (CAT)

Промене вредности каталазе након завршеног експеримента приказан је на графикону бр. 5.

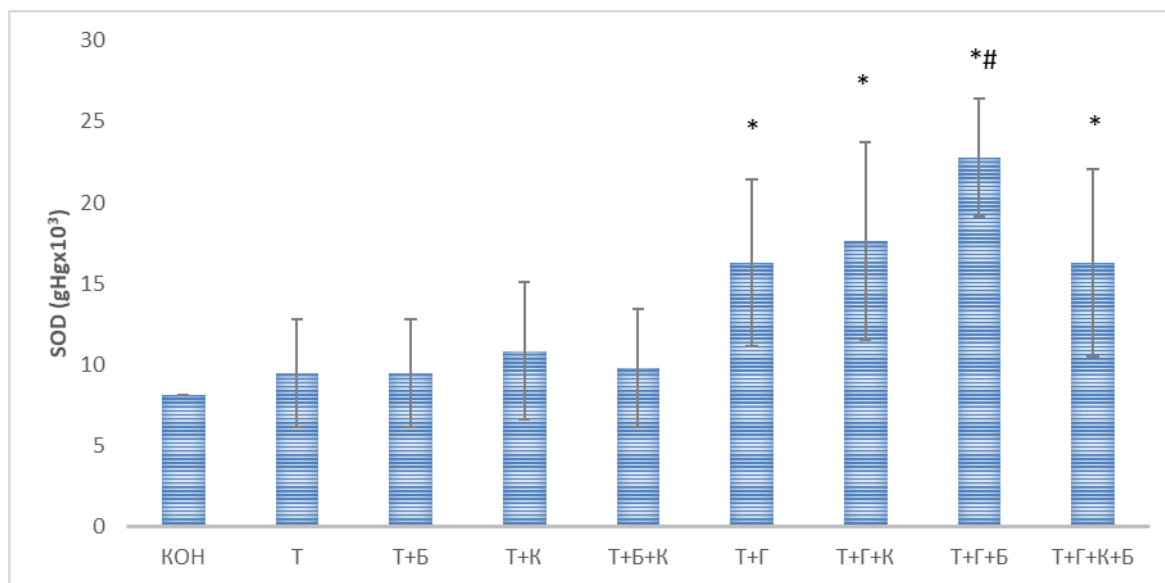


Графикон бр. 5. Просечне вредности САТ након завршеног експерименталног протокола. Вредности су представљене као средње $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене супламентације гванидиноацетатом и тренинга трчања - Т+Г (\$).

Вредности каталазе снижене су у свим експерименталним групама, осим у Т+Г+К групи у односу на контролу. Значајно повећање вредности каталазе уочено је у Т+Г+К групи у односу на контролу. Вредности каталазе значајно су повећане у групама Т+Г+К и Т+Г+К+Б у односу на Т и Т+Г групе (Графикон 5).

4.3.2.2. Супероксид дисмутаза (SOD)

Промене вредности супероксид дисмутаза након завршеног експерименталног протокола приказане су на графику бр.6.

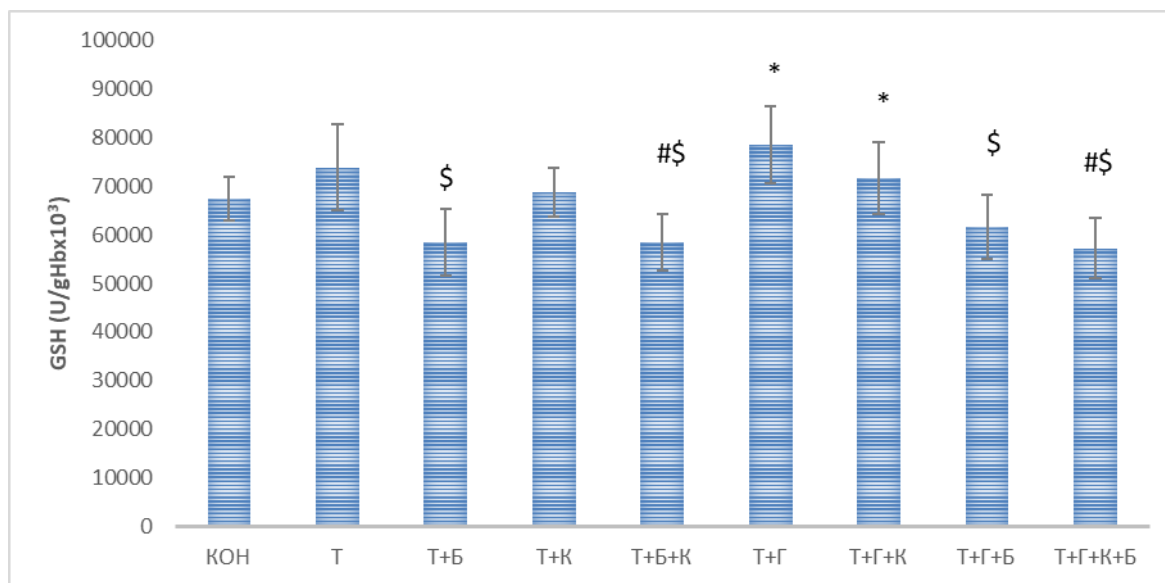


Графикон бр. 6. Просечне вредности SOD након завршеног експерименталног протокола. Вредности су представљене као средње $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене супламентације гванидиноацетатом и тренинга трчања - Т+Г (\$).

Супероксид дисмутаза значајно је повећана у групама животиња које су биле третиране самостално гванидиноацетатом као и у његовој комбинацији са креатинином и бетаином (групе Т+Г, Т+Г+К, Т+Г+Б и Т+Г+К+Б) у поређењу са контролним вредностима. Значајно повећање вредности SOD уочено је Т+Г+К групи у односу на Т групу (Графикон 6).

4.3.2.3. Редуковани глутатион (GSH)

Вредности редукованог глутатиона након завршеног експерименталног протокола приказане су на Графикону бр. 7.



Графикон бр. 7. Просечне вредности GSH након завршеног експерименталног протокола. Вредности су представљене као средње $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене супламентације гванидиноацетата и тренинга трчања - Т+Г (\$).

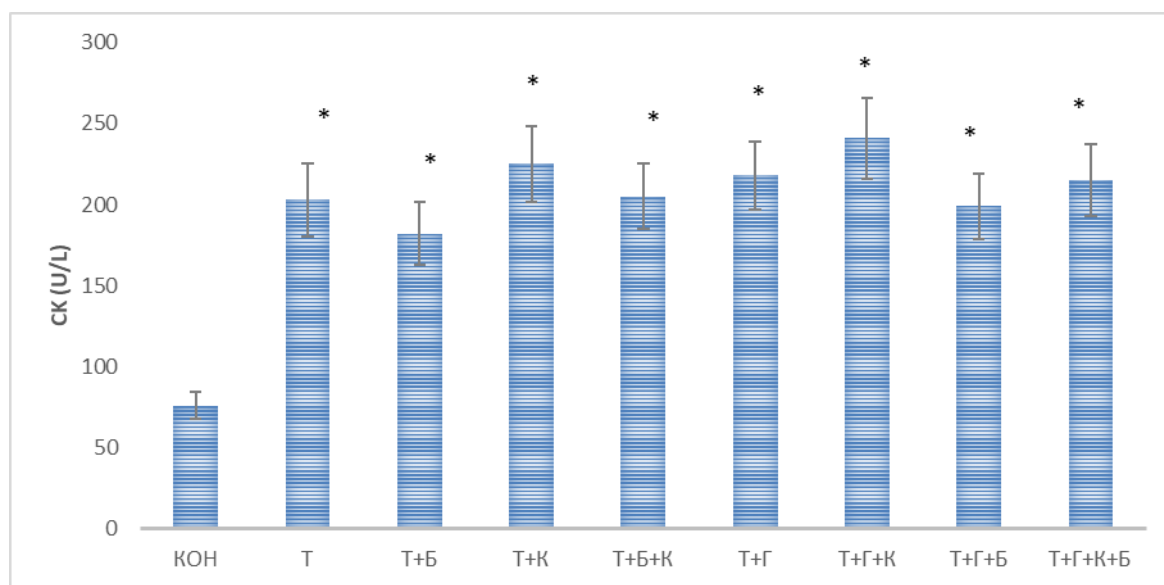
Вредности GSH повећање су у група Т и Т+Г у односу на контролу. С друге стране, смањење вредности редукованог глутатиона уочено је у групама које су биле на самосталној супламентацији бетаином као и удуженој супламентацији са креатином и гванидиноацетатом (групе Т+Б; Т+Б+К; Т+Г+Б; Т+Г+К+Б) у поређењу са контролним вредностима и самосталном супламентацијом гванидиноацетатом (Графикон 7).

4.4. Биохемијске анализе

Промене серумских вредности СК, СК-ММ и СК-МВ након самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова приказани су на графиконима бр. 8-10.

4.4.1. Креатин киназа (СК)

Промене вредности СК након завршеног експеримента приказан је на графикону бр.8.

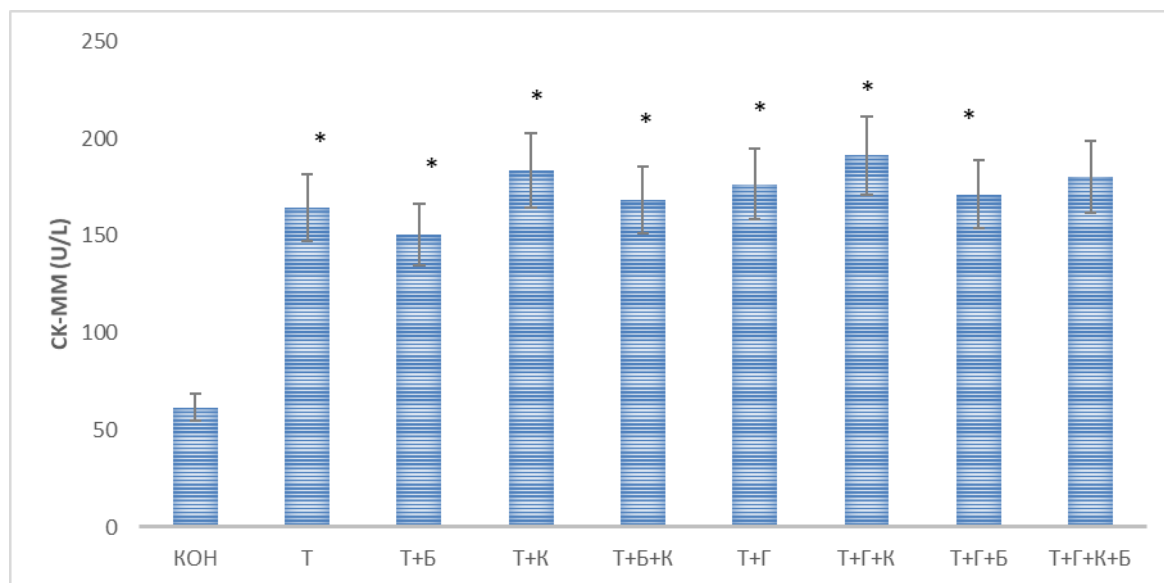


Графикон бр. 8. Просечне вредности креатин киназе (СК) након завршеног експерименталног протокола. Вредности су представљене као средње $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене супламентације гванидиноацетата и тренинга трчања - Т+Г (\$)).

Сви експериментални протоколи су значајно повећали вредности креатин киназе у односу на контролне вредности. Повећање СК у Т групи повећање је било 167%, у Т+Б групи је било 139%, у Т+К групи је било 196%, у Т+Б+К групи је било 170%, у Т+Г групи је било 186%, у Т+Г+К групи је било 217%, у Т+Г+Б групи је било 162%, у Т+Г+К+Б групи је било 183% у поређењу са контролном групом (Графикон 8).

4.4.2. Креатин киназа (СК-ММ)

Вредности СК-ММ након завршеног експерименталног протокола приказане су на Графикону бр. 9.

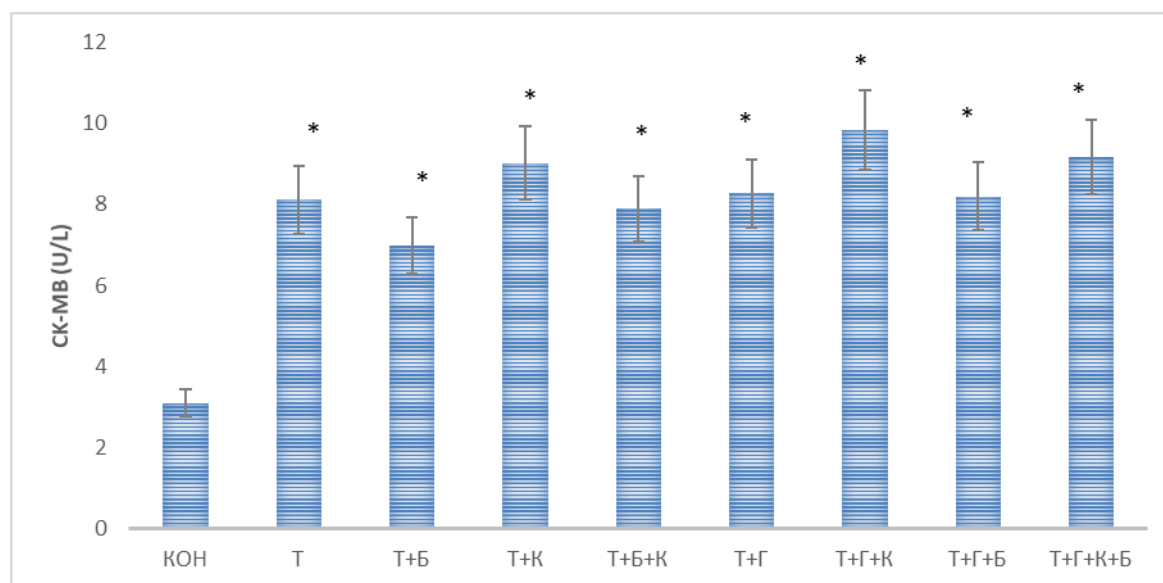


Графикон бр. 9. Просечне вредности креатин киназе (СК-ММ) након завршеног експерименталног протокола. Вредности су представљене као средње $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене супламентације гванидиноацетата и тренинга трчања - Т+Г (\$)).

Повећање вредности СК-ММ у Т групи је било 167%, у Т+Б групи је било 144%, у Т+К групи је било 198%, у Т+Б+К групи је било 173%, у Т+Г групи је било 187%, у Т+Г+К групи је било 211%, у Т+Г+Б групи је било 178%, у Т+Г+К+Б групи је било 193% у поређењу са КОН групом (Графикон 9).

4.4.3. Креатин киназа (СК-МВ)

Промене вредности СК-МВ након завршеног експерименталног протокола приказан је на графикону бр. 10.



Графикон бр. 10. Просечне вредности креатин киназе (СК-ММ) након завршеног експерименталног протокола. Вредности су представљене као средње $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене супламентације гванидиноацетата и тренинга трчања – Т+Г (\$)).

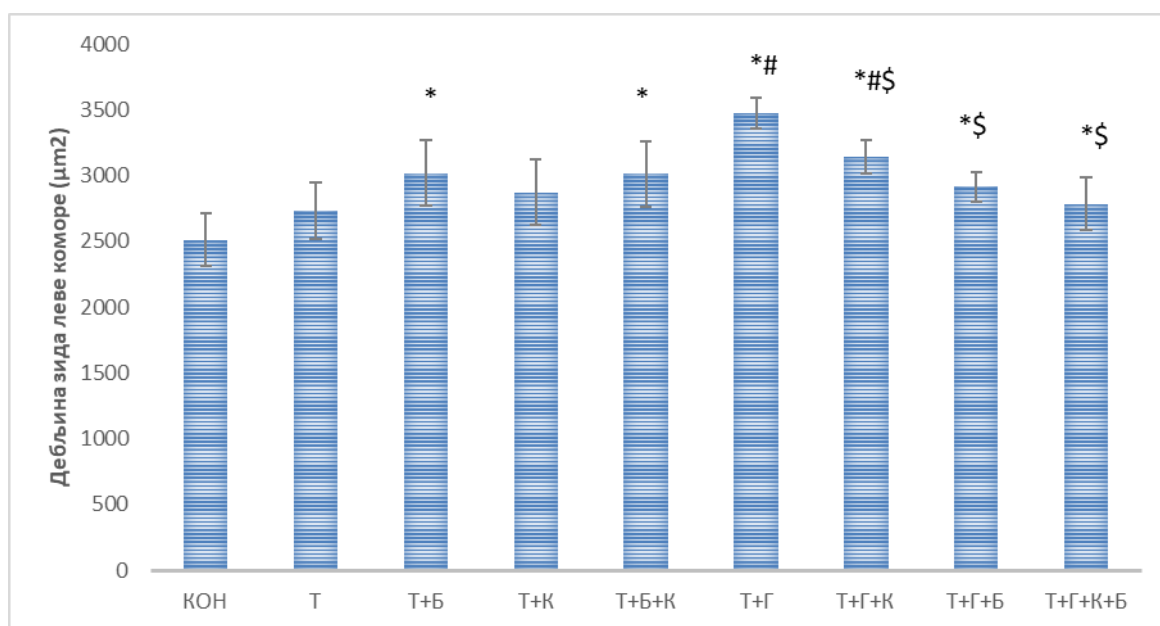
Серумске вредности СК-МВ повећане су у свим експерименталним групама у поређењу са контролним вредностима. Повећање вредности СК-МВ у Т групи је 162%, у Т+Б групи је 125%, у Т+К групи је 191%, у Т+Б+К групи је 154%, у Т+Г групи је 167%, у Т+Г+К групи је 217%, у Т+Г+Б групи је 164%, у Т+Г+К+Б групи је 195% (Графикон 10).

4.5. Морфометријска анализа срца

Морфометријска анализа срца, обављена је како би се проценио ефекат самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на дебљину зида леве коморе срца, димензије срчаних мишићних ћелија (површину и дијаметар), садржај колагена у срцу и имунопозитивност на HSP 70 и SERCA пумпу.

4.5.1. Дебљина зида леве коморе срца

Морфометријском анализом, одредили смо промене дебљине зида леве коморе након примењеног експерименталног протокола. Резултати су приказани на графикону бр. 11.

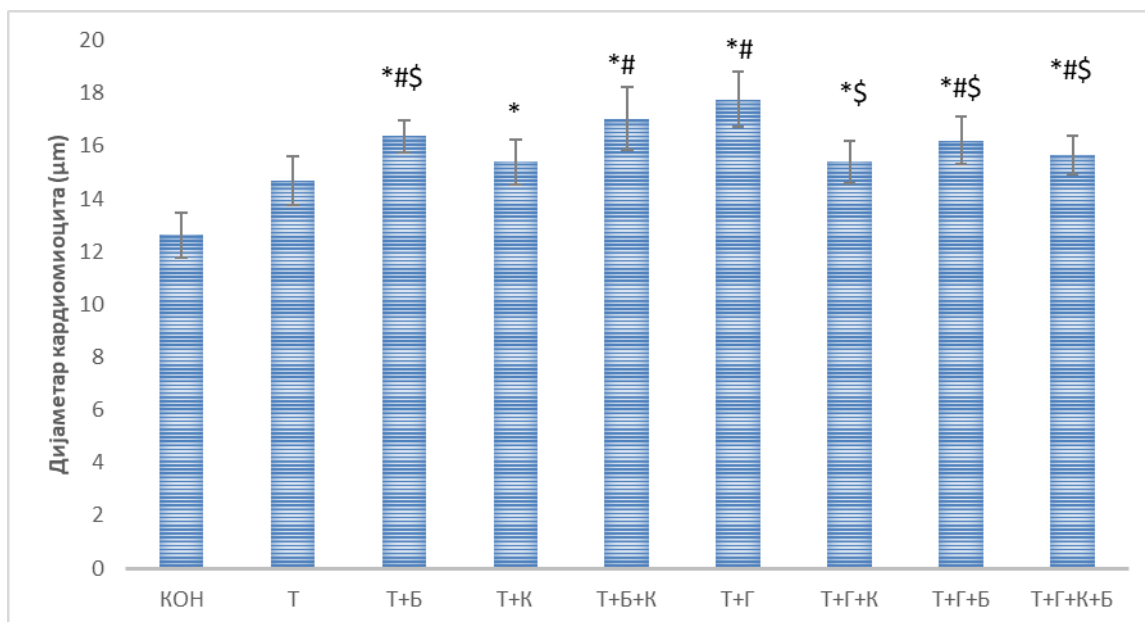


Графикон бр. 11. Средње вредности дебљине зида леве коморе срца пацова након завршеног експерименталног протокола. Вредности су представљене као средње $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене супламентације гванидиноацетата и тренинга трчања – Т+Г (\$).

Повећање дебљине зида леве коморе у Т групи било је 9%, у Т+Б групи било је 20%, у Т+К групи било је 14%, у Т+Б+К групи било је 20%, у Т+Г групи било је 38%, у Т+Г+К групи било је 25%, у Т+Г+Б групи било је 16% и у Т+Г+К+Б групи било је 11% у односу на контролу. Поређењем између експерименталних група, примећено је повећање дебљине зида у Т+Б групи за 10.5%, у Т+К групи за 5%, у Т+Б+К групи за 10%, у Т+Г групи за 27%, у Т+Г+К групи за 25%, у Т+Г+Б групи за 16% и у Т+Г+К+Б групи за 2% у односу на Т групу. Смањење дебљине зида у Т+Б групи било је 13%, у Т+К групи било је 17%, у Т+Б+К групи било је 13%, у Т+Г+К групи било је 10%, у Т+Г+Б групи било је 16% а у Т+Г+К+Б групи било је 20% у поређењу са истовременом супламентацијом гванидиноацетатом и тренинга (Графикон 11).

4.5.2. Дијаметар срчаних мишићних ћелија (кардиомиоцита)

На графикону број 12 су приказане промене вредности дијаметра кардиомиоцита након завршеног експерименталног протокола.

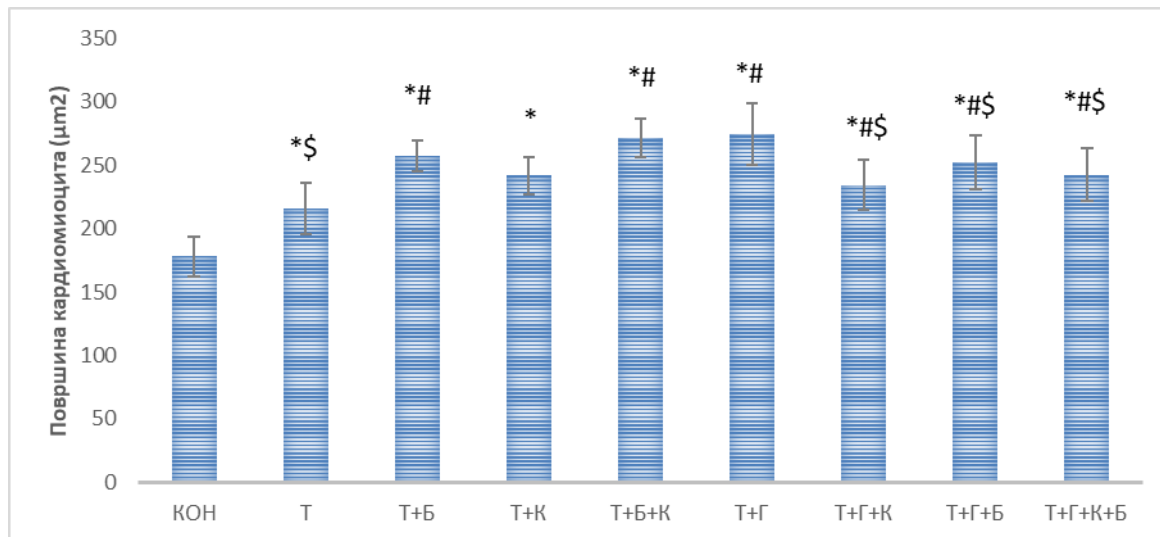


Графикон бр. 12. Средње вредности дијаметра кардиомиоцита пацова након завршеног експерименталног протокола. Вредности су представљене као средње $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене супламентације гванидиноацетата и тренинга трчања – Т+Г (\$).

Сви експериментални протоколи значајно су повећали дијаметар кардиомиоцита у односу на контролну групу. Повећање дијаметра у Т групи је 16%, у Т+Б групи је 29%, у Т+К групи је 22%, у Т+Б+К групи је 35%, у Т+Г групи је 41%, у Т+Г+К групи је 22%, у Т+Г+Б групи је 28% и у Т+Г+К+Б групи је 24% у односу на контролне вредности. Поређењем унутар експерименталних група, дијаметар кардиомиоцита повећан је за 11% у Т+Б групи, за 16% у Т+Б+К групи, за 21% у Т+Г групи, за 11% у Т+Г+Б групи, за 7% у Т+Г+К+Б групи у односу на Т групу. Дијаметар кардиомиоцита је смањен у Т+Б за 8%, у Т+К групи за 13%, у Т+Б+К групи за 4%, у Т+Г+К групи за 13%, у Т+Г+Б групи за 9% и у Т+Г+К+Б за 12% у поређењу са Т+Г групом (Графикон 12).

4.5.3. Површине срчаних мишићних ћелија (кардиомиоцита)

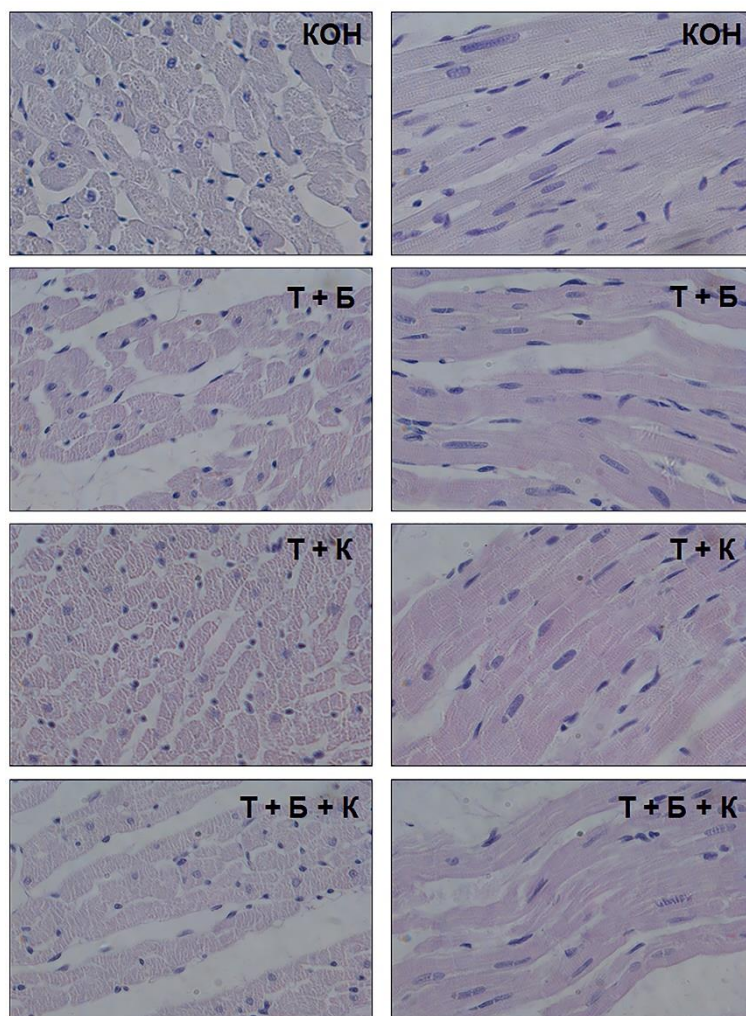
Промену површине кардиомиоцита одредили смо морфометрисјком методом. Резултати су представљени на графикону бр. 13.



Графикон бр. 13. Средње вредности површине кардиомиоцита пацова након завршеног експерименталног протокола. Вредности су представљене као средње $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене супламентације гванидиноацетата и тренинга трчања - Т+Г (\$).

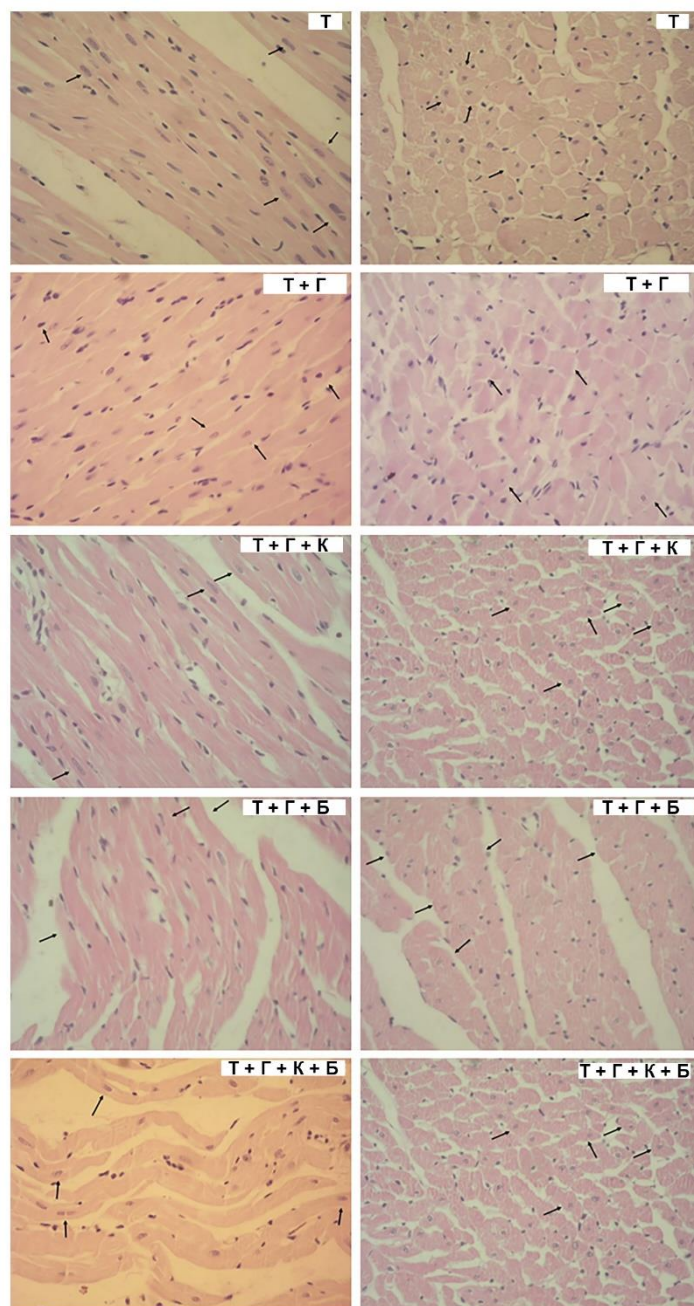
Након завршеног експерименталног протокола, повећање површине кардиомиоцита у Т групи је 21%, у Т+Б групи је 44%, у Т+К групи је 36%, у Т+Б+К групи је 53%, у Т+Г групи је 54%, у Т+Г+К групи је 32%, у Т+Г+Б групи је 42% и у Т+Г+К+Б групи је 36% у односу на контролу. Поређењем између експерименталних група, примећено је повећање површине кардиомиоцита у Т+Б групи за 19%, у Т+К групи за 12%, у Т+Б+К групи за 26%, у Т+Г групи за 27%, у Т+Г+К групи за 13%, у Т+Г+Б групи за 17% и у Т+Г+К+Б групи за 8% у односу на Т групу. Смањење површине кардиомиоцита у Т+Б групи је 5%, у Т+К групи је 12%, у Т+Г+К је 13%, у Т+Г+Б 9% и у Т+Г+К+Б 12% у поређењу са истовременом супламентацијом гванидиноацетата и тренинга (Графикон 13).

Слика 3. Микрофотографије срчаног ткива обојене Хематоксилин/Еозин методом (увеличање 400х).



На фотографијама срчаног ткива, у контролној групи животиња уочава се регуларна морфолошка грађа без присуства морфолошких промена. Уочава се регуларан распоред мишићних влакана, без присуства хипертрофије ћелија са еухроматичним једрима. У Т+Б групи уочава се хипертрофија мишићних ћелија са израженом хипертрофијом појединачних мишићних ћелија и једара и проширеним интерстицијумским простором. У Т+К групи уочава се хипертрофија мишићних ћелија са дискретним проширењем интерстицијумског простора. У Т+Б+К групи уочава се хипертрофија мишићних ћелија са хипертрофијом појединачних мишићних ћелија и хипертрофијом појединачних једара и проширеним интерстицијумским простором (Слика 3).

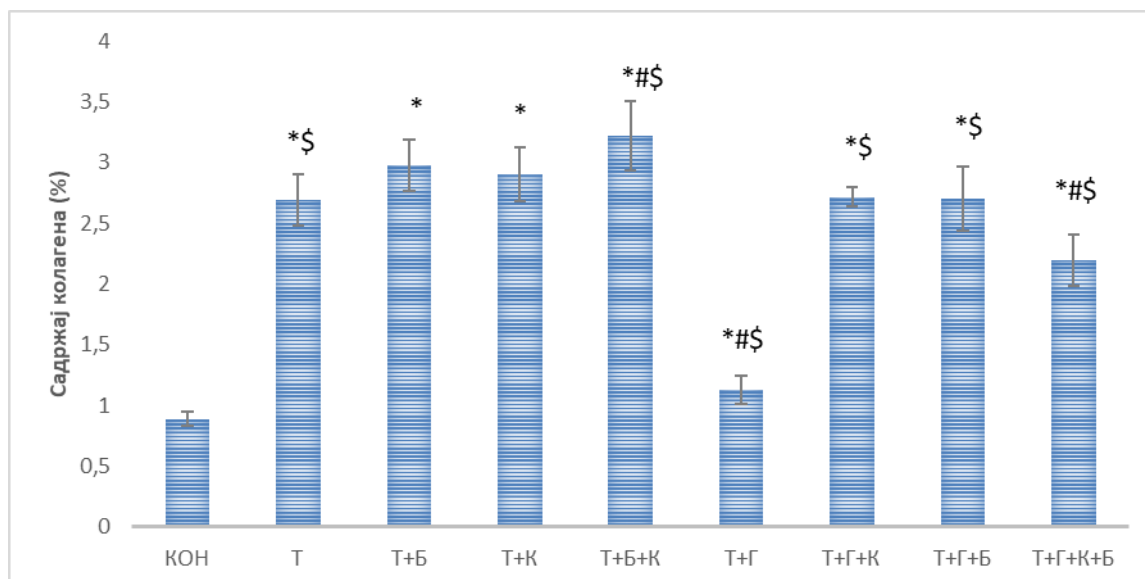
Слика 4. Микрофотографије срчаног ткива обојене Х/Е методом (увеличање 400х).



На сликама срчаног ткива у Т групи уочавамо регуларан распоред мишићних влакана и хипертрофију кардиомиоцита са еухроматским језгром без проширења интерстицијумског простора. У Т+Г групи уочава се већи степен хипертрофије кардиомиоцита, са појавом хипертрофије појединачних једара и присуством проширеног интерстицијумског простора. У Т+Г+К групи уочава се хипертрофија кардиомиоцита, са хипертрофијом појединачних једара и проширеним интерстицијумским простором као и присуство таласастих влакана. У Т+Г+Б групи присутна је хипертрофија кардиомиоцита, издужена (елонгирана) једра и проширени интерстицијумски простор. Хипертрофија кардиомиоцита са хипертрофијом појединачних једара и присуством издужених једара, проширеним интерстицијумским простором и таласастим влакнима су верификовани у Т+Г+К+Б групи (Слика 4).

4.5.4. Морфометријска анализа колагених влакана у срцу

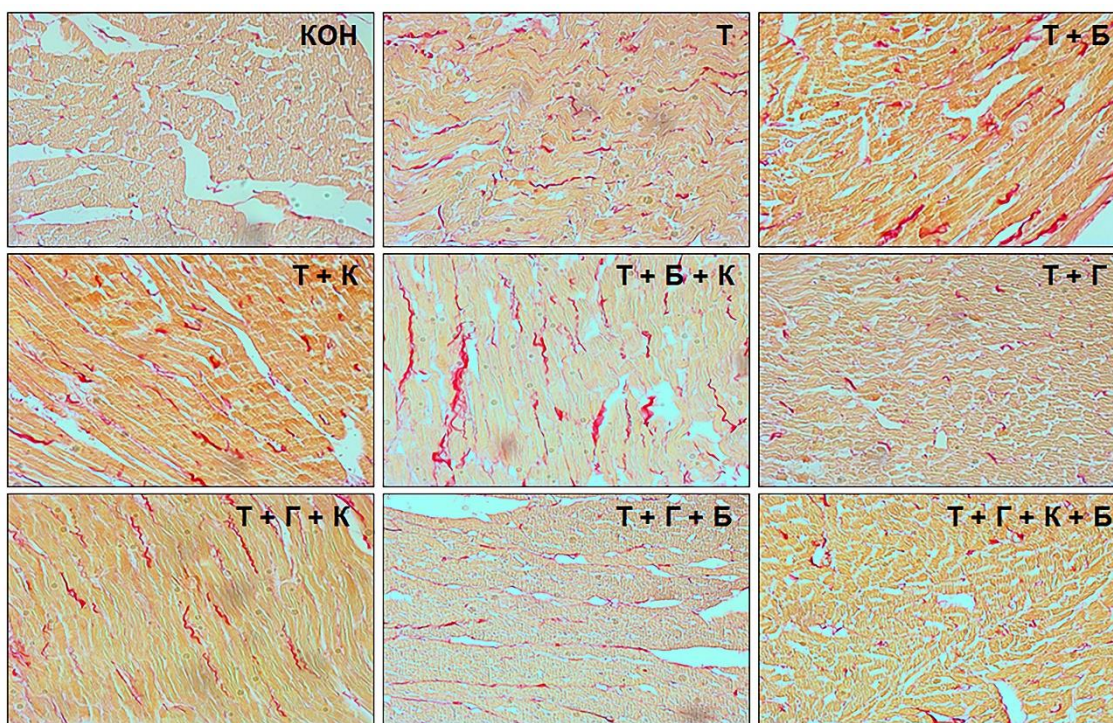
Промену количине колагених влакана у срчаним мишићним ћелијама, код третираних пацова, квантификовали смо након завршетка експерименталног протокола. Резултати су приказани на графикану бр. 14. и на слици бр. 5.



Графикон бр 14. Процентуална заступљеност колагених влакана у срцу пацова. Вредности су представљене као средње процентуалне вредности $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе – КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене супламентације гванидиноацетата и тренинга трчања - Т+Г (\$).

Повећање садржаја колагених влакана у срцу примећено је у свим експерименталним групама у односу на контролу. Повећање колагена у Т групи је 202%, у Т+Б групи је 235%, у Т+К групи је 226%, у Т+Б+К групи је 262%, у Т+Г групи је 27%, у Т+Г+К групи је 204%, у Т+Г+Б групи је 203%, у Т+Г+К+Б групи је 146% у поређењу са контролним вредностима. Садржај колагених влакана у срцу је смањен у Т+Г групи за 58% ($p < 0,05$) и у Т+Г+К+Б групи за 19% ($p < 0,05$) у поређењу са групом животиња подвргнутих самосталном тренингу. Супротно овоме, примећено је повећање колагених влакана у Т+Б групи за 11%, у Т+К групи за 8%, у Т+Б+К групи за 20% у односу на самосталан тренинг. Није примећена значајна разлика у садржају колагена у групама Т+Г+К и Т+Г+Б групи у односу на Т групу. Повећање садржаја колагена у Т+Б групи је било 164%, у Т+К групи је било 157%, у Т+Б+К групи је било 185%, Т+Г+К је било 139%, у Т+Г+Б је био 140%, а у Т+Г+К+Б било је 94% у поређењу са истовременом применом гванидиноацетата и тренинга (Графикон 14).

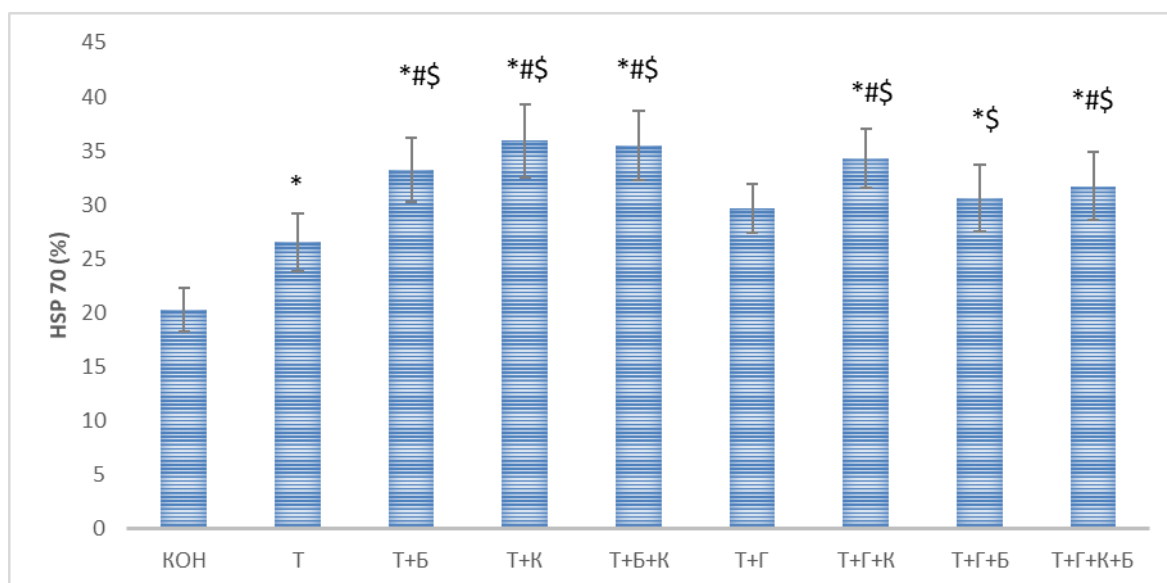
Слика 5. Хистохемијски обележени депозити колагених влакана у срцу Sirius-Red методом (увеличање 200х).



На сликама хистохемијски обележених депозита колегена (црвено обележени) у срцу пацова примећује се повећан садржај колагених влакана у свим експерименталним групама. Интересанто запажење је смањење садржаја колагених влакана у срцу пацова које су биле на самосталној суплементацији гванидиноацетата и интервалног тренинга високог интензитета. Са друге стране, највећи депозити колагених влакана уочавају се у групи животиња које су биле на удруженој суплементацији бетаином и креатином и интервалном тренингу високог интензитета (Слика 5).

4.5.5. HSP 70 у срцу

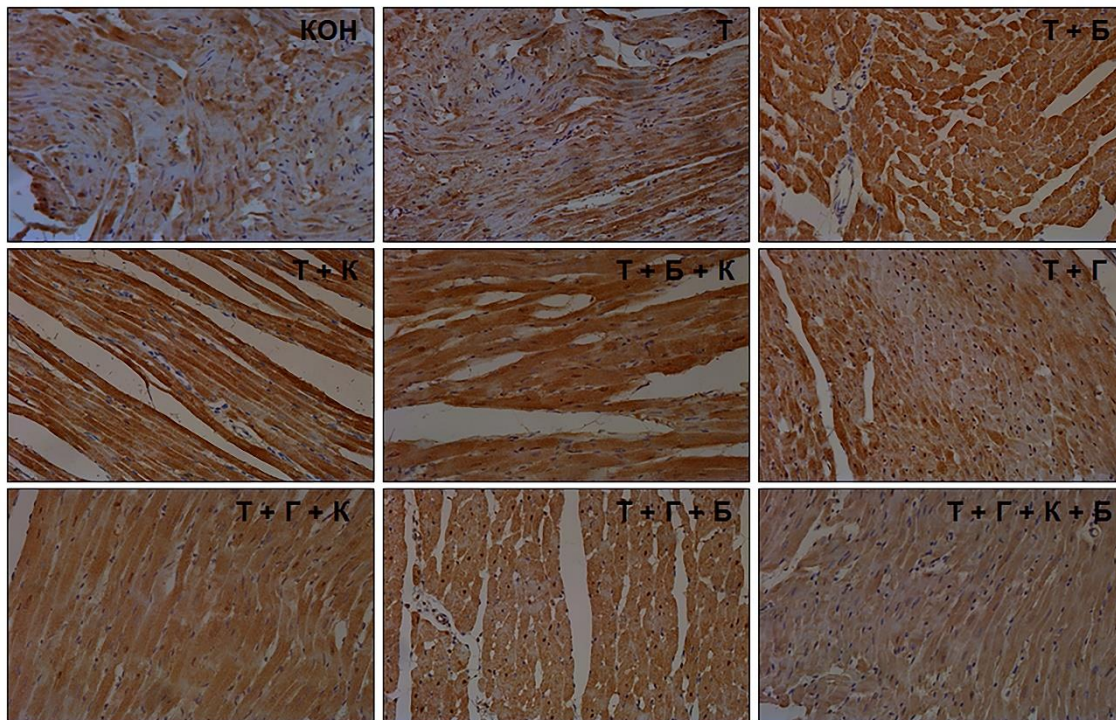
Heat shock протеин 70, одредили смо у срчаним мишићним ћелијама након завшеног експерименталног протокола. Морфометријском методом, квантификовали смо промене количине HSP 70 депоа у срцу. Резултати су представљени на графикону бр. 15 и на слици бр. 6.



Графикон бр 15. Вредности депоа HSP 70 у срцу пацова. Вредности су представљене као средње процентуалне вредности $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене супламентације гванидиноацетата и тренинга трчања - Т+Г (\$).

Имунопозитивност на HSP 70 је значајно повећана свим експерименталним групама. Повећање позитивности у Т групи је било 30%, у Т+Б групи је било 77%, у Т+К групи је било 63%, у Т+Б+К групи је било 74%, у Т+Г групи је било 46%, у Т+Г+К групи је било 69%, у Т+Г+Б групи је било 51% и у Т+Г+К+Б групи је било 56% у односу на К групу. У поређењу са самосталним тренингом уочено је повећање имунопозитивности у Т+Б групи за 34%, у Т+К групи за 25%, у Т+Б+К групи за 35%, у Т+Г групи за 12%, у Т+Г+К групи за 29%, у Т+Г+Б групи за 15% и у Т+Г+К+Б групи за 20%. Имунореактивност на HSP 70 повећана је за 20% у Т+Б групи, за 12% у Т+К групи, за 21% у Т+Б+К групи, за 16% у Т+Г+К групи, за 3% у Т+Г+Б групи, за 7% у Т+Г+К+Б групи у поређењу са Т+Г групом (Графикон 15).

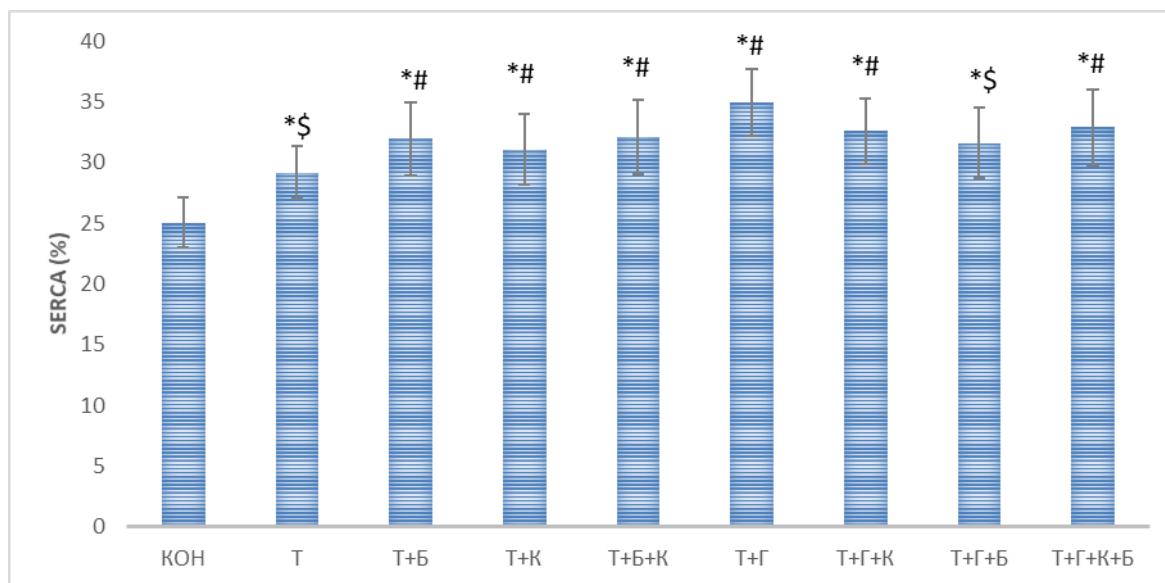
Слика 6. Имунохистохемијски обележени депозити HSP 70 у срцу (увеличање 200х)



На фотографијама имунообележеног HSP 70 у срцу пацова приметили смо већу имунопозитивност у групама које су биле самостално на суплементацији бетаином, креатином или у комбинацији са бетаином и гванидиноацетатом (Т+Б, Т+К, Т+Б+К, Т+Г+К групе). У овим групама је примећено да су готово сви кардиомиоцити били имунопозитивни на HSP 70 и да је позитивност била јачег интензитета, што се не може рећи за остале групе (Слика 6).

4.5.6. SERCA пумпа у срцу

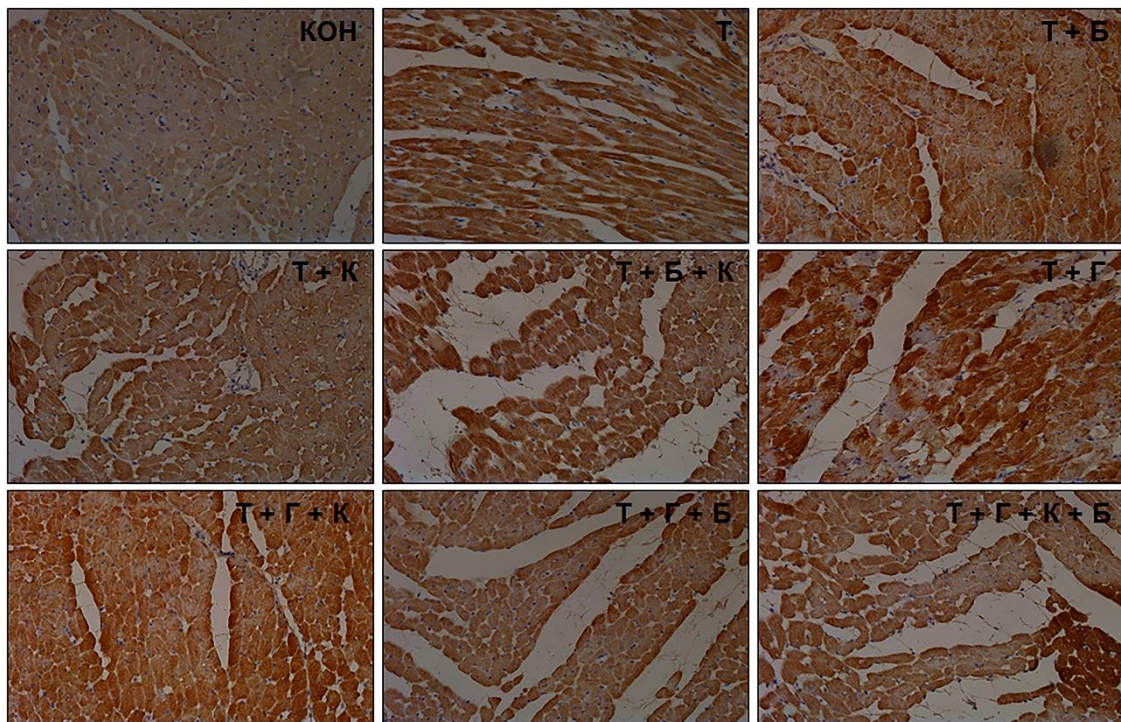
Квантификацију SERCA пумпе у срцу одредили смо након самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова. Промене количине SERCA пумпе у срцу приказане су на графикону бр. 16 и на слици бр. 7.



Графикон бр. 16. Вредности депоа SERCA пумпе у срцу пацова. Вредности су представљене као средње процентуалне вредности $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене супламентације гванидиноацетата и тренинга трчања - Т+Г (\$).

Сви експериментални протоколи значајно су повећали имунопозитивност на SERCA пумпу у односу на контролну групу. Повећање имунопозитивности у Т групи је 16%, у Т+Б групи је 27%, у Т+К групи је 24%, у Т+Б+К групи је 28%, у Т+Г групи је 39%, у Т+Г+К групи је 30%, у Т+Г+Б групи је 26% и у Т+Г+К+Б групи је 31% у односу на контролне вредности. Поређењем унутар експерименталних група, депо SERCA пумпе повећан је за 9.5% у Т+Б групи, за 6.5% у Т+К групи, за 10% у Т+Б+К групи, за 20% у Т+Г групи, за 11.5% у Т+Г+К групи, за 8% у Т+Г+Б групи, за 13% у Т+Г+К+Б групи у односу на Т групу. У поређењу са истовременом супламентацијом гванидиноацетата и тренинга уочено је смањење имунопозитивности на SERCA пумпу у Т+Б групи за 9%, у Т+К групи за 15.5% , у Т+Б+К групи за 9%, у Т+Г+К групи за 7%, у Т+Г+Б групи за 10.5% и у Т+Г+К+Б за 6% (Графикон 16).

Слика 6. Имунохистохемијски обележени депозити SERCA пумпе у срцу (увеличање 200х).



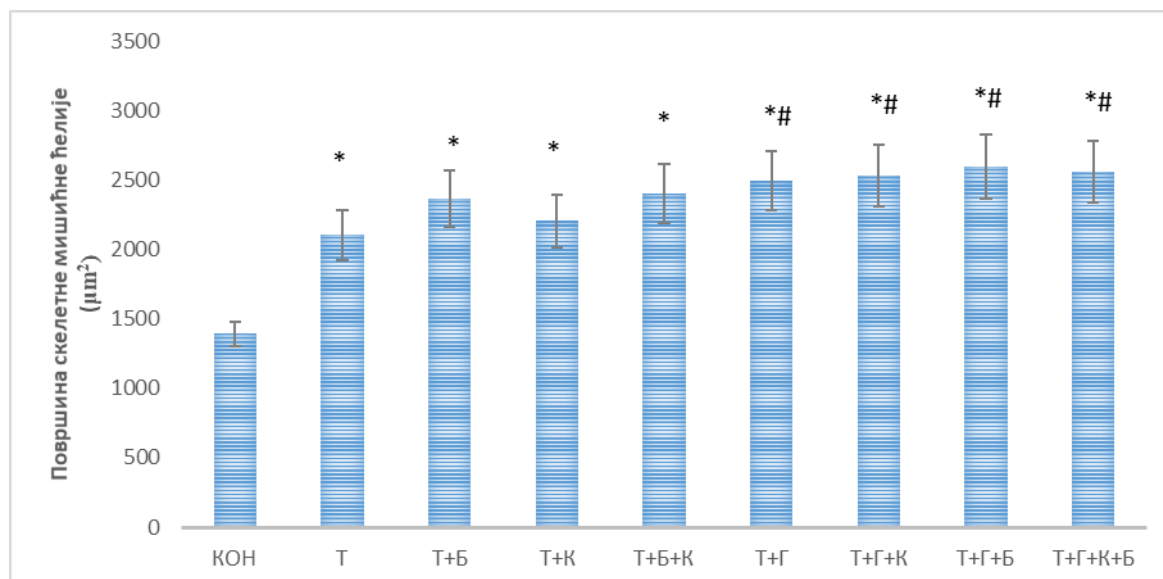
На фотографијама имунообележене SERCA пумпе у срцу пацова, уочавамо повећану имунопозитивност у свим експерименталним групама у поређењу са контролом. Са друге стране, суплементација гванидиноацетатом код тренираних пацова показала је највеће депое SERCA пумпе у срцу али је уочена смањена имунопозитивност појединачних кардиомиоцитима (Слика 7).

4.6. Морфометријска анализа скелетног мишића

Морфометријска анализа скелетног мишића, обављена је како би се проценио ефекат самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на површину и дијаметар скелетних мишићних ћелија. У нашем истраживању, скелетни мишић од интереса био је m.quadriceps.

4.6.1. Површина скелетне мишићне ћелије

Промену површине мишићне ћелије m.quadriceps-а одредили смо морфометрисјком методом. Резултати су представљени на графикону бр. 17.

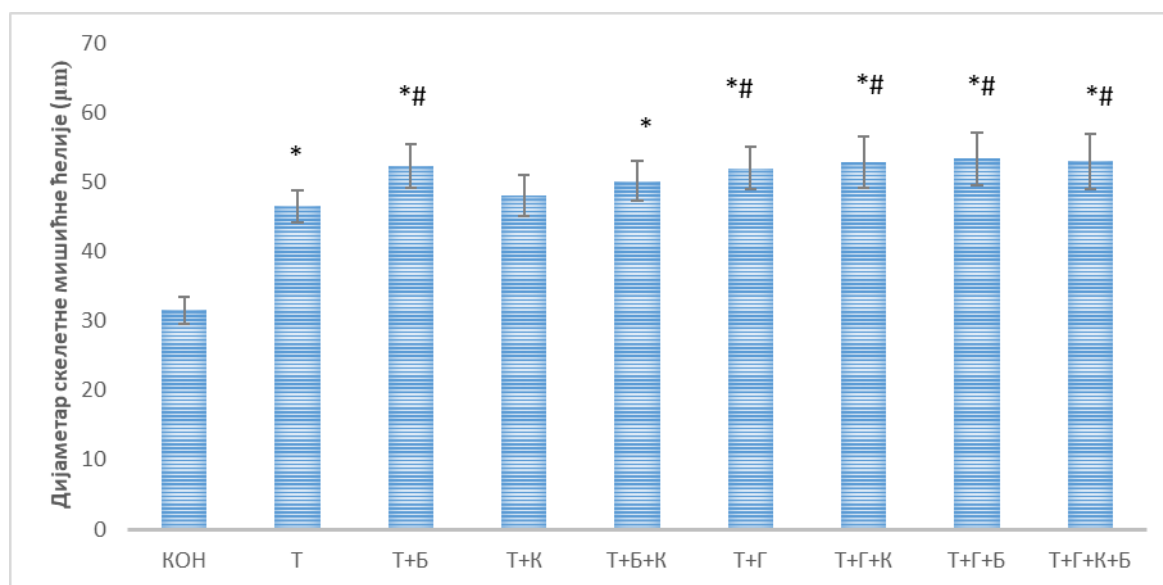


Графикон бр. 17. Средње вредности површине мишићне ћелије m.quadriceps-а пацова након завршеног експерименталног протокола. Вредности су представљене као средње $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене супламентације гванидиноацетата и тренинга трчања - Т+Г (\$).

Повећање површине мишићне ћелије m.quadriceps-а у Т групи је 51%, у Т+Б групи је 70%, у Т+К групи је 59%, у Т+Б+К групи је 73%, у Т+Г групи је 79%, у Т+Г+К групи је 82%, у Т+Г+Б групи је 86% и у Т+Г+К+Б групи је 84% у односу на контролне вредности. Поређењем између експерименталних група, примећено је повећање површине скелетне мишићне ћелије у Т+Б групи за 12%, у Т+К групи за 5%, у Т+Б+К групи за 14%, у Т+Г групи за 18%, у Т+Г+К групи за 20%, у Т+Г+Б групи за 23% и у Т+Г+К+Б групи за 22% у односу на Т групу (Графикон 17).

4.6.2. Дијаметар скелетне мишићне ћелије

Промену дијаметра мишићне ћелије m.quadriceps-а одредили смо морфометрисјком методом. Резултати су представљени на графикану бр. 18.

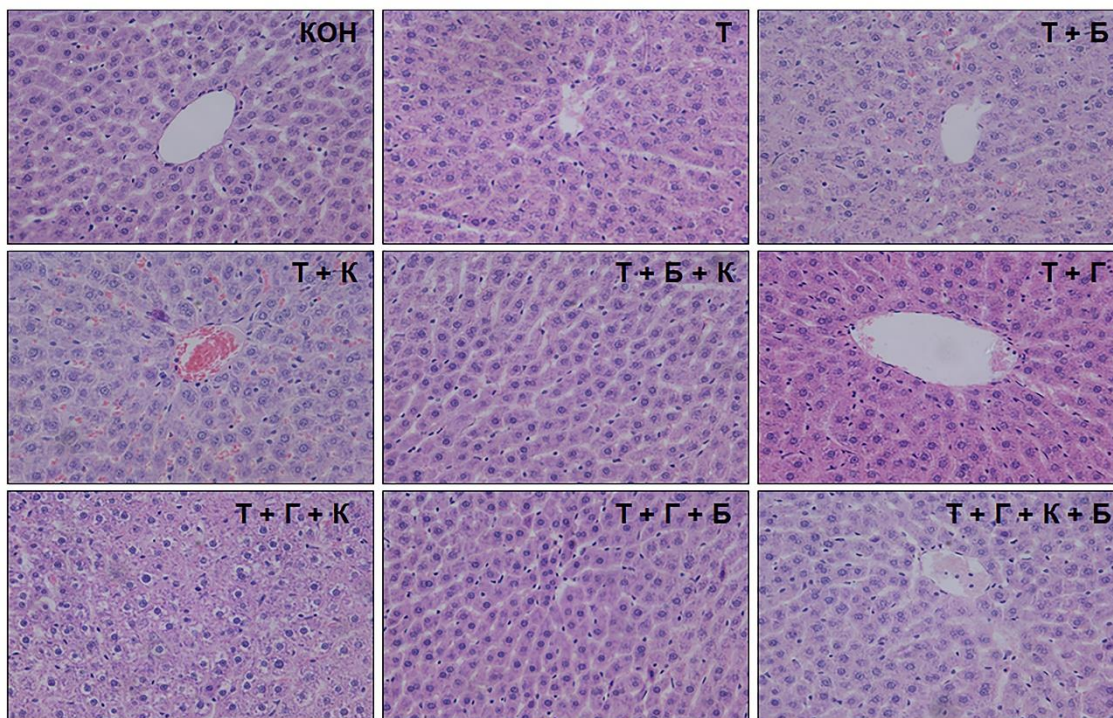


Графикон бр. 18. Средње вредности дијаметра мишићне ћелије m.quadriceps-а пацова након завршеног експерименталног протокола. Вредности су представљене као средње $\pm$ SD. Статистички значајне разлике ($p < 0,05$) поређене између група од интереса (између контролне групе –КОН (*); између самосталног тренинга –Т (#) и удружене супламентације гванидиноацетата и тренинга трчања - Т+Г (\$)).

Дијаметар мишићне ћелије m.quadriceps-а повећан је у свим експерименталним групама у односу на контролне вредности. Повећање дијаметра у Т групи је 47%, у Т+Б групи је 66%, у Т+К групи је 52%, у Т+Б+К групи је 59%, у Т+Г групи је 65%, у Т+Г+К групи је 67%, у Т+Г+Б групи је 69% и у Т+Г+К+Б групи је 68% у односу на контролне вредности. Поређењем између експерименталних група, дијаметар скелетних мишићних ћелија повећан је за 12% у Т+Б групи, за 3% у Т+К групи, за 8% у Т+Б+К групи, за 12% у Т+Г групи, за 14% у Т+Г+К групи, за 15% у Т+Г+Б групи, за 14% у Т+Г+К+Б групи у односу на Т групу (Графикон 18).

4.7. Морфолошка анализа јетре

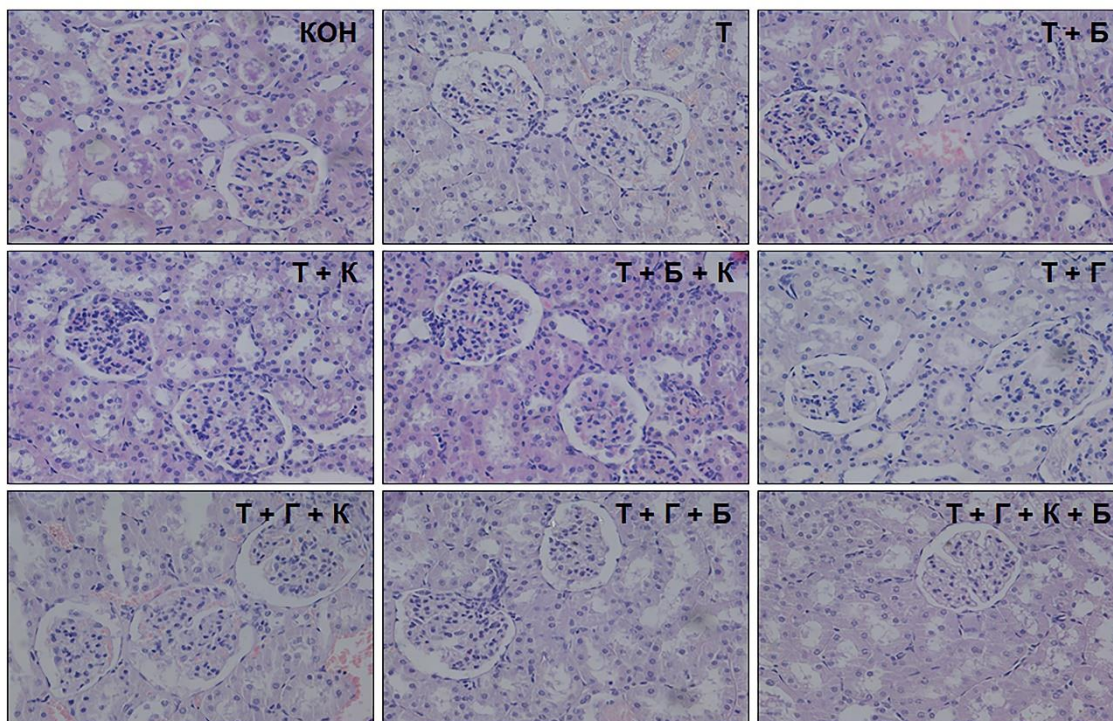
Слика 8. Попречни пресек ткива јетре обојене Х/Е методом (увеличање 200х).



У контролној групи пацова уочава се регуларна морфолошка грађа јетре, хепатоцити су регуларне грађе са присутним садржајем гликогена и еухроматичним једрима, без присуства едема хепатоцита и крварења. У групи животиња подвргнутих самосталном тренингу као и групи која је била на самосталној суплементацији гванидиноацетатом уочава се нормална грађа јетре без брисуства морфолошких промена. У Т+Б групи уочава се едем појединачних хепатоцита са знацима крварења. У групи животиња које су биле на самосталној суплементацији креатином код тренираних пацова уочавају се хепатоцити регуларне грађе са садржајем гликогена али се уочава знаци крварења. У групи животиња које су биле на удруженој суплементацији гванидиноацетатом и креатином уочава се едем и дифузна вакуолизација хепатоцита, ткз. балонирани хепатоцити. У групама Т+Г+Б и Т+Г+К+Б не уочавају се морфолошке промене у грађи јетре (слика 8).

4.8. Морфолошка анализа бубрега

Слика 9. Попречни пресек ткива бубрега обојене Х/Е методом (увеличање 200х).



У контролној групи пацова, уочава се очувана морфолошка грађа бубрега, без присуства морфолошких промена, гломерули су очуване грађе без присуства атрофије и без проширених уринарних простора, док се у епителу тубула бубрега не уочавају видљиве промена, ни десквamacија епитела. У групи животиња подвгнуте интервалном тренингу високог интензитета уочава се дискретна атрофија гломерула са благо проширеним уринарним простором. Тубули нефрона су очуване грађе, али је у сабирним тубулима присутна дискретна десквamacија епитела. У групи животиња које су биле на суплементацији бетаином и тренингу, уочавају се сличне промене као код самосталног тренинга, ретки атрофични гломерули са благо проширеним уринарним простором и дискретном десквamacијом епитела тубула. У групи животиња које су биле на супламентацији креатином подвргнуте тренингу гломерули су очуване грађе али се у тубулима уочава ретка десквamacија епитела. У групи животиња које су биле на удруженој суплементацији бетаином и креатином подвргнутих тренингу, уочава се очувана грађа гломерула са дискретно проширеним уринарним простором као и десквamacија епитела тубула. У групи животиња на суплементацији гванидиноацетатом подвргнутих тренингу уочава се атрофија појединачних гломерула са проширеним уринарним простором и десквamacијом епитела. У групи животиња које су биле на удруженој суплементацији гванидиноацетата и креатина код тренираних пацова уочава се атрофија појединачних гломерула (ретка), проширен уринарни простор, десквamacија епитела тубула као и крварење. У групи животиња које су биле на удруженој суплементацијом гванидиноацетата и бетаина код тренираних пацова, уочава се атрофија појединачних гломерула, уринарни простори нису проширени али је присутна

дискретна десквамација епитела тубула. У групи животиња које су биле на удруженој суплементацији гванидиноацетатом, креатином и бетаином гломерули су очуване грађе са благо проширеним уринарним просторима и присутном десквамацијом епитела тубула (слика 9).

5.

Дискусија

5. Дискусија

Гванидиноацетат је ендогени дериват аминокиселине који служи као директан прекурсор креатина, кључног једињења у енергетском метаболизму мишићног ткива, укључујући срце. Велики број студија подржава чињеницу да гванидиноацетат може стимулирати ћелијску биоенергетику кроз повећање биосинтезе креатина и повећану биорасположивост креатина, која је посебно изражена у скелетним мишићима (137). Са друге стране, модеран начин живота, између осталог, подразумева и редовно бављење физичком активношћу. Један од новијих видова тренинга, за који се показало да има позитивне ефекте на кардиоваскуларни систем јесте интервални тренинг високог интензитета. Познавајући позитивне ефекте тренинга, али и повољне ефекте суплементације гванидиноацетата и креатина на скелетни мишић, претпоставили смо да би комбиновање ових врста ергогених супстанци са све популарнијим модалитетом вежбања, у виду интервалног тренинга високог интензитета, обезбедило благотворне ефекте на срчану функцију, морфологију, морфометрију али и на локални и системски редокс статус (45). Оваквим дизајном студије желели смо да истакнемо супериорна кардиопротективна својства гванидиноацетата када се примењује заједно са интервалним тренингом високог интензитета у поређењу са његовом комбинацијом са бетаином и/или креатином. Колико је нама познато, ово је прва студија која испитује ефекте интензивног тренинга трчања у комбинацији са суплементацијом гванидиноацетата и/или креатина или бетаина на срчану функцију, морфометрију срца и редокс статус. Ово је такође једна од ретких студија која истражује кардиопротективне ефекте изазваних поменутих ергогених супстанцама код пацова који су подвргнути интервалном тренингу високог интензитета. Наиме, утврдили смо да је суплементација гванидиноацетата у комбинацији са овим протоколом тренинга издвојена као најефикаснији режим лечења јер позитивно утиче како на системски и срчани оксидативни стрес, тако и на параметре контрактилности срца.

Сматра се да је примена вежбања као физичке активности ефикасна стратегија за лечење кардиоваскуларних болести и за побољшање кардиоваскуларне функције. Недавно је интервални тренинг високог интензитета привукао велику пажњу због своје супериорне способности да појача метаболички и срчани одговор. Са физиолошке тачке гледишта, адаптација срчане функције на овакав вид тренинга укључује структурно, али и метаболичко ремоделирање које се огледа у непромењеној контрактилности срца и нижем вредностима срчане фреквенце у мировању. Овакав налаз указује да интервални тренинг високог интензитета вероватно пружа корисне ефекте на срчану функцију кроз васкуларну адаптацију која доводи до смањења накнадног оптерећења (138,139).

5.1. Ефекти самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на кардиодинамске параметре срца

За процену контрактилности миокарда, пратили смо параметар $dp/dt \max$ који је индикатор инотропних особина срца, док смо за процену релаксације срца пратили параметар $dp/dt \min$. Када је у питању параметар срчане контрактилности, $dp/dt \max$, сви експериментални протоколи су довели до повећање контрактилности у односу на контролне вредности. Највеће повећање $dp/dt \max$ уочено у групи пацова која била изложена интервалном тренингу високог интензитета, што је у супротности са резултатима из студије *Jakovljevic B.* и сарадника (122) који су показали да овакав тренинг смањује контрактилност срца. Интересантно је да је највеће повећање контрактилности миокарда уочено у групи која је била истовремено на супламентацији креатином и бетаином. Међутим, уколико поредимо резултате добијене студије у односу на самостални интервални тренинг високог интензитета добијамо другачије резултате. Показано је да суплементација гванидиноацетатом нема ефекта на контрактилност срца, тј. вредности ових параметара након хроничне примене поменутог суплемента су остале непромењене. С друге стране, комбинација ове ергогене супстанце са креатином је ослабила контрактилну снагу срца на свим коронарним перфузионим притисцима.

Праћењем срчане релаксације, приметили смо да су сви примењени експериментални протоколи довели до повећања негативности $dp/dt \min$ у односу на контролне вредности и то на свим коронарним перфузионим притисцима. Самостални тренинг повећао је вредност овог параметра у односу на контролне вредности, што је у супротности са резултатима студије *Jakovljevic B.* и сарадника. Резултати њихове студије показали су негативне ефекте ове врсте тренинга и на срчану контракцију и на релаксацију, указујући да овакав вид тренинга може довести до нарушене дијастолне функције (122), што није потврђено у нашој студији. У нашој студији, највеће повећање степена релаксације срца уочено је у групама које су биле на супламентацији бетаином самостално или у комбинацији са креатином. Очигледно, да бетаин има позитивне ефекте на релаксацију срца. Имајући у виду да су највеће вредности $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ добијене у групи која је истовремено била на супламентацији бетаином и креатином можемо закључити да њихова синергистичка суплементација значајно побољшава контракцију и релаксацију срца. Поређењем вредности $dp/dt \min$ између експерименталних група и самосталног тренинга, имамо другачије резултате. Поред тога што је утицала на смањење снаге срчане контракције, истовремена примена гванидиноацетата са креатином такође умањује и релаксацију миокарда која се огледа кроз најнижу вредност $dp/dt \min$ код пацова третираних овим супстанцама. Поређењем вредности $dp/dt \min$ између експерименталних група и групе пацова која је упражњавала само тренинг, имамо другачије резултате. Поред тога што је утицала на смањење снаге срчане контракције, истовремена примена гванидиноацетата са креатином такође је умањила и релаксацију миокарда која се огледа кроз најнижу вредност $dp/dt \min$ код пацова третираних овим супстанцама. С обзиром да је креатин молекул који обезбеђује енергију за кардиомиоците када се узима преко креатин транспортера (CrT) и затим се конвертује у PCr кога каталише креатин киназа (СК), недостатак креатина може бити повезан са срчаном инсуфицијенцијом због измењеног PCr/СК система који је неопходан за функционисање миофибрила. Постоје докази да дуготрајни недостатак креатина и акумулација гванидиноацетата код GAMT-/- мишева доводе до пада хемодинамских параметара што је вероватно последица смањене густине митохондрија

у ћелијама. Доказано је да су фреквенција срца и постигнути притисак нижи код старијих GAMT-/- мишева у поређењу са контролном групом мишева одговарајућег узраста, али без поремећаја митохондријског дисања и без корелације са оксидативним стресом јер нивои SOD нису промењени. Дакле, хемодинамске промене без доказа о срчаној инсуфицијенцији могу представљати прихватљив функционални компромис у замену за смањену потрошњу енергије код старијих мишева. Због чињенице да се код GAMT-/- мишева гванидиноацетат не трансформише у креатин катализован GAMT ензимом, креатин се можда не користи на адекватан начин као енергетски молекул за срце (140). Насупрот томе, у нашој студији, срчана фреквенција код пацова са додатком гванидиноацетата била је слична као у групи животиња подвргнутим само тренингу, јер је гванидиноацетат могао да се трансформише у креатин, због доступног GAMT ензима код наших пацова.

Систолни притисак у левој комори повећан је, у нашој студији, у готово свим експерименталним групама изузев у групама које су биле на самосталној супламентацији гванидиноацетатом и његовој удруженој примени са креатином (али то повећање није било значајно). Највеће повећање SLVP било је у групи која је била подвргнута интервалном тренингу високог интензитета. Сличан резултат је потврђен и у студији аутора *Jakovljevic B.* и сарадника (122) који су показали да овај облик тренинга повећава систолни капацитет срца. Са друге стране, примећено је да је супламентација креатином самостално и у комбинацији са бетаином највише утицала на повећање вредности SLVP и у односу на контролне вредности али и у односу на тренинг високог интензитета. Очигледно је да обе ергогене супстанце значајно утичу на повећање систолног капацитета срца што се није десило након супламентације гванидиноацетатом.

Дијастолни притисак у левој комори снижен је у свим експерименталним групама у односу на контролне вредности. Интервални тренинг високог интензитета смањио је дијастолни притисак у левој комори што је у супротини са литературним подацима. *Jakovljevic B.* и сарадници су показали да интервални тренинг високог интензитета повећава DLVP и код нормотензивних и код хипертензивних пацова. Овакав резултат показује да овакав вид тренинга побољшава дијастолну функцију што сугерише да је можда пуњење леве коморе боље (122), што није потврђено у нашој студији. Самостална али и удружена суплементација гванидиноацетата, бетаина и креатина снижава вредности DLVP на свим коронарним перфузионим притисцима што указује на снижену дијастолну функцију у односу на контролу.

Сви експериментални протоколи су утицали на промену срчане фреквенце, али је највеће повећање уочено у групи која је била изложена интервалном тренингу високог интензитета. Супротан резултат од нашег потврђен је у студији *Jakovljevic B.* и сарадника који су показали да овакав облик тренинга не утиче на промену срчане фреквенце ни код нормотензивних ни код хипертензивних пацова (122). Очекивано би било да овакав протокол тренинга изазове брадикардију као последицу физичке издржљивости. Међутим, и у нашој студији као и у студији *Jakovljevic B.* и сарадника није изазвана физиолошка брадикардија, тако да можемо да закључимо да овакав протокол тренинга треба спровести у дужем временском периоду. Са друге стране, самостална супламентација гванидиноацетатом смањила је вредности срчане фреквенце у односу на самостални тренинг високог интензитета.

5.2. Ефекти самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на редокс статус

Овај део студије се односио на испитивање ефеката суплементираних супстанци и интервалног тренинга високог интензитета на срчани и системски редокс статус. Одређивањем вредности прооксидативних маркера као што су индекс липидне пероксидације (који је мерен као TBARS), нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикала (O_2^-), водоник пероксида (H_2O_2), као и антиоксидативних маркера супероксид дисмутаза (SOD), каталазе (CAT) и редукованог глутатиона (GSH) желели смо да сазнамо да ли самостална или удружена супламентација гванидиноацетата, бетаина и креатина изазива позитивне или пак штетне ефекте на срчани и системски редокс статус.

У литератури је већ описано да креатин може деловати као антиоксиданс на различите начине. Прво, може бити директан чистач реактивних кисеоничних врста, друго, ови ефекти могу бити последица појачане регулације експресије антиоксидативних ензима (141,142). Иако су литературни подаци о ефектима гванидиноацетата на редокс стање ограничени и контроверзни, сугерише се да гванидиноацетат, као непосредни прекурсор креатина, поседује способност да повећа његове нивое. Међутим, још увек остаје непознато да ли и како гванидиноацетат може да побољша оксидативни стрес. Наиме, сугерише се да гванидиноацетат може деловати и као анти- и као прооксидантни молекул. С обзиром на чињеницу да гванидиноацетат има гванидинијум јон коњугатне базе, може послужити као реактивна оксидативна врста за стварање донора електрона, посебно у неуронима. С друге стране, гванидиноацетат би могао да побољша оксидативни статус директно или индиректно кроз повећање нивоа креатина (141). Постоји мало доказа о антиоксидативним ефектима гванидиноацетата који су испитивани на различитим животињским врстама, укључујући рибе или свиње. *Aziza* и сарадници су имплицирали повећање антиоксидативних параметара у зависности од дозе, укључујући SOD и GSH изазвано применом гванидиноацетата (143). Штавише, капацитет повећања SOD је такође потврђен код здравих људи након две недеље третмана гванидиноацетатом (137). Наши резултати су у корелацији са горе наведеним студијама, пошто смо такође приметили побољшање нивоа SOD и GSH након суплементације гванидиноацетатом. Поред тога, открили смо да гванидиноацетат у комбинацији са интервалним тренингом високог интензитета значајно смањује ниво индекса липидне пероксидације (TBARS) што је такође у складу са претходним истраживањима спроведеним на животињским врстама (143,144). Ипак, клиничка студија није показала значајне промене малониалдехида (MDA), као индиректног маркера пероксидације липида, након примене гванидиноацетата (141). Студије на животињама показале су да бетаин има способност да смањи оксидативни стрес (145), док су оне спроведене на здравим мушкарцима подвргнутим исцрпним вежбама издржљивости показале да нема утицаја на ниво TBARS након две недеље примене бетаина (53). У нашој студији, истовремена примена гванидиноацетат и бетаина у комбинацији са интервалним тренингом високог интензитета довела је до смањења нивоа TBARS вероватно због синергистичког дејства ове две супстанце. Што се тиче NO, у нашем истраживању уочено је мање незнатно смањење NO у T+Г групи, што је у супротности са налазима *Azize* који тврди да је ниво NO у рибама повећан (143). Ове разлике се могу објаснити хетерогеношћу врста које су коришћене у студијама, али и повезаним ефектом са протоколом обуке. Међутим, суплементација бетаином и гванидиноацетатом довела је до вишег нивоа NO у поређењу са самостално примењеним гванидиноацетатом. Овај налаз би се могао разјаснити кроз његову способност да

регулише експресију гена NO синтазе чиме се повећава доступност NO. Штавише, суплементација бетаином може повећати ниво нитрата у циркулацији кроз нитритни NO-пут (146).

5.3. Ефекти самосталне и удружене супламентације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на морфометријске параметре срца

Сви експериментални протоколи довели су до промена испитиваних морфометријских параметара срца (дијаметар и површина кардиомиоцита, дебљина зида леве коморе) у односу на контролне вредности. Највеће повећање дијаметра и површине кардиомиоцита примећено је у групи животиња третираних гванидиноацетатом и интервалним тренингом трчања високог интензитета. Међутим, примећено је да комбинована супламентација гванидиноацетата са креатином или бетаином није изазвала додатни степен хипертрофије кардиомиоцита, чак је значајно смањила дијаметар и површину попречног пресека кардиомиоцита. Занимљиво је да је самостална супламентација бетаином али и његова комбинована супламентација са гванидиноацетатом као и комбинована супламентација са креатином код животиња изложених интервалном тренингу високог интензитета довела до повећања дијаметра и површине кардиомиоцита више него комбинована супламентација гванидиноацетата и креатина. Подаци из литературе указују на чињеницу да интрацелуларна акумулација бетаина доводи до задржавања воде у ћелијама, спречавајући на тај начин њихову дехидратацију (147,148). Резултати добијени у овом истраживању су у складу са овим запажањем, узимајући у обзир чињеницу да је морфолошка анализа срца показала значајну хипертрофију појединачних срчаних мишићних ћелија, што је и приказано на хистолошким сликама.

С друге стране, самостална супламентација креатина као и његова комбинована супламентација са гванидиноацетатом али и са гванидиноацетатом и бетаином повећала је дијаметар и површину кардиомиоцита у поређењу са групом животиња које су биле потвргнуте тренингу трчања. Истовремено, њихова супламентација довела до смањена и дијаметра и површине кардиомиоцита у поређењу са групом животиња самостално третираним гванидиноацетатом и тренингом трчања. Штавише, познато је да суплементација креатина доводи до повећања вредности креатина у серуму, али не утиче на његове вредности у срцу (147, 149). Наиме, сматра се да је нижи ниво креатина у срчаном ткиву настао као последица смањене синтезе (downregulation) креатинског транспортера (24). На основу овог сазнања можемо објаснити смањену површину и дијаметар кардиомиоцита који су уочени у групи животиња које су биле на удруженој супламентацији гванидиноацетатом и креатином и подвргнуте тренингу трчања. Нажалост, у доступној литератури готово да нема студија које су испитивале ефекте продуженог третмана гванидиноацетатом, бетаином или креатином које би могле бити погодне за поређење са резултатима добијеним у овој студији.

Највећи део зида срца чине срчане мишићне ћелије, а повећање дебљине зида леве коморе настало је као последица увећања самих мишићних ћелија, што је и показано у овој студији. Дебљина зида леве коморе повећана је у свим експерименталним групама. Самосталан тренинг трчања повећао је дебљину зида леве коморе, што је у складу са литературним подацима (135,150). Највеће повећање дебљине

зида леве комере примећено је у групи која је била на самосталној суплементацији гванидиноацетатом, што је последица хипертрофије кардиомиоцита, која је показана као најизраженија у овој групи (мерењем дијаметра и површине кардиомиоцита).

5.4. Ефекти самосталне и удружене суплементације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на морфометријске параметре скелетног мишића

Скелетни мишић има изузетну способност да се прилагоди вежбању, чак толико да је довољна и једна вежба да изазове активација различитих фактора транскрипције укључених у регулацију метаболичког профила (151). Молекуларне адаптације на вежбање код скелетних мишића независне су од самог интензитета вежбања. У нашој студији, слично као и код срчаних мишићних ћелија, и дијаметар и површина скелетних мишићних ћелија је повећана у свим експерименталним групама у поређењу са контролним вредностима. Интервални тренинг високог интензитета индуковао је значајно повећање дијаметра и површине скелетне мишићне ћелије што је у складу са литературним подацима (151, 152). Предходно истраживање Luginbuhl-а и сарадника је показало да оваква врста тренинга повећава проценат мишићних влакана типа I и типа IIA (152). Са друге стране, постоје и подаци у литератури који показују да вежбање може изазвати конверзију мишићних влакана типа II у тип I мишићних влакана у пацовским и у хуманим моделима истраживања (152) и да је за узорак ове конверзије одговорна врста тренинга која је примењена. Изгледа да оваква врста тренинга захтева ангажовање брзих трзаја моторних јединица у одређеним мишићима задњих удова код пацова. На овај начин се мењају образци активности релативно великог броја ових влакана (152). Највеће повећање површине скелетне мишићне ћелије било је у групи животиња које су биле на суплементацији бетаином и тренингу. Овакав резултат је последица задржавања воде у ћелији која је последица примене бетаина (због осмолитних својстава бетаина) (147,149). Суплементација креатином је такође изазвала значајан степен хипертрофије скелетне мишићне ћелије. Још увек није познат тачан механизам којим креатин индукује хипертрофију скелетне мишићне ћелије али се сугерише на постојање више потенцијалних механизма. Познато је да креатин има осмотски ефекат и да његова суплементација може да послужи као стресор који ће деловати као анаболички стимуланс на сигналне путеве за синтезу протеина. Са друге стране, постоје подаци да креатин директно утиче на синтезу мишићних протеина преко модулације компоненти mTOR сигналног пута. Такође је показано да креатин може директно да утиче на процес формирања мишићног ткива, мењајући секрецију различитих миокина, као што су миоистатин и инсулину сличан фактор раста-1, али и експресије миоених регулаторних фактора, што ће повећати митотичку активности сателитских ћелија и диференцијације у миофибриле (153). У нашој студији удружена суплементација креатином и бетаином изазвала је већи степен хипертрофије ћелије од њихове самосталне суплементације. Знајући да и креатин има осмотски ефекат на ћелије а бетаин изазива задржавање воде у ћелији, отуда и њихов синергистички ефекат на хипертрофију скелетних мишићних ћелија. Самостална примена гванидиноацетата али и његова удружена примена са креатином и бетаином изазивала је сличан степен хипертрофије као и самостална и удружена примена креатина и бетаина. Литературни подаци показују да суплементација гванидиноацетатом изазива развој скелетних мишића кроз промену експресије миоених гена и карактеристика миофибрила (154).

5.5. Ефекти самосталне и удружене суплементације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на садржај колагена, HSP 70 и SERCA пумпу у срца

Морфометријском анализом садржаја колагених влакана пратили смо у којој мери оваква врста тренинга самостално али и у комбинацији са одговарајућом суплементацијом утиче на настанак фиброзе у срцу. Познато је да у зависности од врсте спорта која је примењена за испитивање зависи и садржај колагена у срцу. Литературни подаци показују да тренинг пливања доводи до смањења садржаја колагена у срцу (135,150,155). Супротно овоме, трчање у облику интервалног тренинга високог интензитета повећава интерстицијалну фиброзу у срцу (156), што је потврђено у нашој студији. Иако је повећан садржај колагена у срцу, на основу добијених резултата кардиодинамских параметара, није значајно утицало на срчану функцију. Занимљиво је да је самостална суплементација гванидиноацетатом код пацова подвргнутих тренингу трчања имала највећи ефекат на смањење садржаја колагена у поређењу са осталим експерименталним групама као и контролном групом. Значајно повећање садржаја колагена примећено је у групама пацова који су била на самосталној али и удруженој суплементацији креатина и гванидиноацетата. *Chang* и сарадници су истраживали ефекте суплементације различитих доза креатина на садржај колагена (хидроксипролина) у мишићима шкампа. Њихово истраживање је показало да суплементација креатином у зависности од примењене дозе креатина може и повећати али и смањити количину хидроксипролин у мишићима шкампа. Као објашњење за повећање хидроксипролина у мишићима навели су да је последица повећања алкално нерастворљивог колагена (157). Очигледно је суплементација креатином поништила позитиван ефекат примене гванидиноацетата на смањење срчане фиброзе.

HSP протеин 70 представља један од важних протеина који су укључени у заштиту ћелија од оксидативног стреса (158,159), али и у редукцији апоптозе изазване исхемијско/реперфизацијом (I/R) повредом у кардиомиоцитима (159,160). Познато је да вежбање представља моћно средство у заштити миокарда од различитих стресора (161, 162), а један од механизма укључених у кардиопротекцију јесте и повећана акумулација HSP 70 у кардиомиоцитима (162,163). Повећање акумулације HSP 70 у срцу у групи животиња које су самостално тренирале трчање потврђено је и у нашој студији, што је у складу са литературним подацима. У свом истраживању, *Paroo* и сарадници су испитивали ефекте вежбања на садржај HSP 70 у срцу пацова код мужјака и женки. Резултати њихове студије су показали да постоји полни дизморфизам и да је садржај HSP 70 у срцу израженији код мужјака (чак 2 пута више) него код женки. За овакав снижен садржај HSP 70 код женки одговоран је естроген док је за повишене вредности код мужјака одговоран тестостерон (163). Имајући у виду да су животиње у нашем истраживању биле потвргнуте интензивном тренингу за који је познато да повећава вредности тестостерона, претпостављамо да је ово један од механизма који је довео до повећане акумулације HSP 70 у срцу пацова. Са друге стране, самостална али и удружена суплементација гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова додатно је повећала акумулацију HSP 70 у срцу у односу на самосталан тренинг. Самостална суплементација гванидиноацетата или његова комбинацији са бетаином и креатином код тренираних пацова снажно је повећала акумулацију HSP 70 у кардиомиоцитима, што показује заштитни ефекат примењених супстанци. Чини се да је суплементација гванидиноацетата важна за производњу креатина како би се смањила оксидативна оштећења, што је потврђено у овој студији.

Саркоендоплазматски ретикулум (СР) транспортна АТФ-аза калцијума (SERCA) је пумпа која транспортује јоне калцијума из цитоплазме у саркоендоплазматски ретикулум. SERCA пумпа игра важну улогу у контракцији мишића, транспортујући јоне Ca_2^+ из цитоплазме ћелије у саркоендоплазматски ретикулум (164). Интервални тренинг високог интензитета повећао је имунопозитивност на SERCA пумпу у срцу пацова, што је у складу са подацима из литературе (165). Ово је потврђено у нашој студији где су скоро сви кардиомиоцити показали повећану имунореактивност на SERCA код пацова изложених тренингу трчања. Претходна истраживања су показала да интервални тренинг трчања високог интензитета (165,166) као и тренинг пливања повећава активност SERCA (165). Супротно овоме, тренинг трчања умереног интензитета не мења вредности SERCA протеина у срцу (166). Литературни подаци указују на чињеницу да мушки полни хормон тестостерон има значајан ефекат у активацији SERCA пумпе у срцу и тиме утиче на контрактилност срца (166). С обзиром да су наши резултати показали повећање имунопозитивности на SERCA пумпу као и повећану контрактилност срца (повећане вредности dp/dt max) код животиња изложених интензивном тренингу трчања, претпостављамо да је и у нашој студији дошло до повећања вредности тестостерона и да је то један од механизма којим можемо објаснити наше резултате. Са друге стране, иако је суплементација гванидиноацетатом, бетаином и креатином показала повећану имунопозитивност SERCA у поређењу са интервалним тренингом високог интензитета, приметили смо да суплементација гванидиноацетатом смањује активност SERCA у појединачним ћелијама, што бар делимично може да објасни смањење dp/dt max у овој групи.

5.6. Ефекти самосталне и удружене суплементације гванидиноацетата, бетаина и креатина код тренираних пацова на серумске вредности СК, СК-МВ и СК-ММ

Познато је да различити облици тренинга трчања на тредмилу доводе до промена у обрасцима активације мишићних влакана и на тај начин, вероватно подстичу различите физиолошке одговоре, као што су метаболички одговор и ензими који су повезани са оштећењем ткива. Један од таквих ензима јесте и креатин киназа СК. (167, 168). У нашој студији креатин киназа је повећана у Т групи што је у сагласности са литературним подацима. СК се сматра индикатором мишићног оштећења а његове високе концентрације могу да се нађу након 3 сата и након 24 сата након завршеног тренинга (167). Предходно истраживање је показало да овакав облик тренинга повећава вредности овог ензима 24h након завршеног тренинга а да 48h након завршеног тренинга, његове вредности почињу полако да опадају (167). Истраживања су показала да на промену вредности креатин киназе утичу индивидуална варијабилност, интензитет, обим сесије, врста вежбе и ниво спортске активности (167,169) Са друге стране, литературни подаци сугеришу да серумски нивои креатин киназе зависе од различитих фактора као што су старост, пол, мишићна маса и физичка активност (170,171).

СК-МВ је један од три изоензима креатин киназе који се првенствено налази у ћелијама срчаног мишића. Последњих деценија, користи се као биомаркер за откривање повреда миокарда (172). У нашој студији, овај параметар је повећан у свим експерименталним групама у поређењу са контролним вредностима. Сам интервални тренинг високог интензитета је значајно повећао овај параметар што је у складу са

предходним истраживањима (173). Повишени нивои СК-МВ могу се наћи након продужених или напорних вежби издржљивости, а могући механизми могу укључивати повећану пермеабилност мембране и некрозу ћелија миокарда (174).

СК-ММ је још једна форма изоензима креатин киназе који се налази у срцу и скелетним мишићима. Сва три ензима, СК, СК-МВ, СК-ММ, имају повећане вредности у свим експерименталним групама у нашој студији. Поред тога што сам тренинг повећава вредност ових ензима, такође су и сва ергогена средства примењена у овој студији изазвала повећање ових ензима. Нажалост, у литератури нема довољно података на основу којих би могли да објаснимо механизме који доводе до повећања ових ензима након суплементације. Претпостављамо да ниво утренираности, мишићна маса као и повећана пермеабилност ћелија имају утицај на резултате добијене у овој студији.

5.7. Безбедност суплементације ергогеним средствима

Безбедност суплементације гванидиноацетатом у клиничком окружењу процењена је у историјским студијама из 1950-их година, а накнадна клиничка испитивања су такође показала да нема значајних штетних ефеката. Недавни извештаји су указали на само благу до умерену хиперхомоцистеинемију након примене гванидиноацетатом код здравих добровољаца са минималним субјективним нежељеним ефектима (137). Уопштено гледано, гванидиноацетат се сматра нетоксичном и високо подношљивом супстанцом (175), али је мало доказа доступно о ефектима егзогене суплементације гванидиноацетатом на физички активну популацију. Међутим, у двоструко слепој, плацебом контролисаној пилот студији, орална примена гванидиноацетатом током 2 недеље значајно је повећала ниво SOD у плазми код здравих мушкараца што указује на антиоксидативну моћ гванидиноацетата (137). Међутим, до данас, ниједна студија на људима није проценила ефекте суплементације гванидиноацетатом на оксидантно-антиоксидативни систем, као и на срчане параметре код здравих субјеката изложених интервалном тренингу високог интензитета. Резултати нашег истраживања могли би да имају клиничку применљивост јер показују значајан антиоксидативни капацитет гванидиноацетата у интервалном тренингу високог интензитета и његову способност детоксикације H_2O_2 и O_2^- , као јаких прооксидативних маркера, у узорцима плазме пацова. Чини се да је истраживање ових промена изазваних егзогеном суплементацијом гванидиноацетатом важан корак у истраживању значаја употребе и безбедности гванидиноацетатом у условима интензивног тренинга.

Недавна студија је испитала ефикасност и безбедност гванидиноацетата датог здравим мушкарцима и женама изложеним редовном вежбању (четири сесије недељно по 60 минута по сесији) и није пронашла никакав утицај на пол у истраживаним исходима (176). У складу са овим резултатима су налази из претклиничке студије који указују да нема ефекта интеракције између суплементације гванидиноацетатом и пола животиња (177). Међутим, наша студија је испитивала ефекте егзогеног гванидиноацетата само на мужјаке пацова и нека ограничења овог рада су повезана са недостатком података о утицају пола на главне исходе студије. Штавише, слично претходно спроведеној студији која је процењивала ефекте орално примењеног гванидиноацетата на младе физички активне волонтере, наше истраживање је такође укључило младе пацове од 6 недеља. Поред тога, постоје докази да је у моделу вежбања по типу интервалног тренинга високог интензитета, метаболичка контрола и промена и

PCr кинетика код одраслих слична оној код деце од 13 година (178). Једна студија имплицира да једна исцрпна сесија вежбања може значајно смањити ниво гванидиноацетата у циркулацији после вежбања и код здравих мушкараца и код жена (176). Утврђено је да је ефекат додавања креатина на побољшање перформанси вежбања код жена мањи него код мушкараца, што је доказано у студијама које су спровели *Mihic* и сарадници (179) као и *Parise* и сарадници (179,180). Међутим, дубљи увид у полно зависне разлике у метаболизму PCr после примене креатина и супстанци сличних креатину у интервалном тренингу високог интензитета је неопходан, пошто готово и да не постоје студије које би разматрале утицај полних хормона и менструалног циклуса у условима интервалног тренинга високох интензитета.

Даља истраживања суплементације гванидиноацетата би могла бити усмерена на старију популацију јер им је потребно више гванидиноацета и креатина због саркопеније и смањене бубрежне функције до којих долази током старења (175).

Налази наше студије су показали да је суплементација гванидиноацетата у комбинацији са интервалним тренингом високог интензитета повезана са смањеном производњом прооксиданса и колагена и побољшаним антиоксидативним одговором у изолованом срцу пацова. Поред тога, гванидиноацетат је имао бољи ефекат на редокс статус у поређењу са његовим комбинацијама са бетаином и/или креатином. Такође, ниједан од примењених третмана у истраживању није променио функцију срца што указује на његову безбедну употребу у примењеним дозама. Стога, садашњи резултати могу бити од интереса за расветљавање утицаја ових суплемената током физичке активности високог интензитета на редокс хомеостазу. Пошто је гванидиноацетат показао неке обећавајуће резултате, наше истраживање може бити основа за будуће студије које ће разјаснити тачне механизме гванидиноацетатом индуковане кардиопротекције у интервалном тренингу високог интензитета.

6.

Закључци

6. Закључци

1. Самостална и удружена суплементација гванидиноацетата, креатина и/или бетаина није негативно утицала на срчану функцију, што показује да су дозе суплемената, примењене у овој студији релативно безбедне за примену.
2. Самостална и удружена суплементација поменутим ергогеним средствима има позитивне ефекте на срчану контрактилност и релаксацију.
3. Самостална суплементација гванидиноацетатом смањује вредности прооксиданаса, у изолованом срцу, у већој мери у односу на удружену примену са креатином и бетаином код тренираних пацова
4. Гванидиноацетат има позитиван ефекат на системски редокс статус у односу на самосталну или удружену примену са бетаином и креатином. Самостална и удружена суплементација гванидиноацетата, креатина и бетаина смањује вредности прооксиданаса (TBARS и H_2O_2) а повећава вредности антиоксиданаса (SOD и CAT)
5. Самостална суплементација гванидиноацетатом изазива већи степен хипертрофије кардиомиоцита (површине и дијаметра ћелије) у односу на самосталну али и на његову удружену примену са креатином и бетаином. Са друге стране, хипертрофија појединачних мишићних ћелија као и хипертрофија једара највише је примећена у групама које су биле на самосталној или удруженој суплементацији бетаином.
6. Смањење срчане фиброзе у срцу уочено је једино након самосталне суплементације гванидиноацетатом, што није случај код његове удружене примене са креатином и/или бетаином као ни код самог тренинга, где је уочен супротан ефекат (повећање фиброзе).
7. Највеће повећање имунопозитивности на HSP 70 уочено је након самосталне и удружене суплементације бетаина и креатина где су готово све ћелије показале имунопозитивност.
8. Повећање депоа SERCA пумпе у срцу, уочено је након самосталне суплементације гванидиноацетатом, што није примећено код његове удружене примене са креатином и/или бетаином
9. Удружена суплементација гванидиноацетата и бетаина изазива највећи степен хипертрофије скелетне мишићне ћелије (дијаметра и површине ћелија).
10. Самостална и удружена суплементација креатином повећава вредности креатин киназе док самостална и удружена суплементација бетаином снижава вредности овог ензима у односу на самосталан тренинг.
11. Самостална суплементација бетаина али и његова удружена примена са креатином и гванидиноацетатом изазвала је атрофију појединачних гломерула бубрега.

7.

Литература

7. Литература

1. Guthold R, Stevens GA, Riley LM, Bull FC. Worldwide trends in insufficient physical activity from 2001 to 2016: a pooled analysis of 358 population-based surveys with 1·9 million participants. *The Lancet Global Health*. 2018;6:e1077-e1086.
2. Lee DC, Pate RR, Lavie CJ, Sui X, Church TS, Blair SN. Leisure-time running reduces all-cause and cardiovascular mortality risk. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Aug 5;64(5):472-81.
3. Williams PT. Reductions in incident coronary heart disease risk above guideline physical activity levels in men. *Atherosclerosis*. 2010 Apr;209(2):524-7.
4. World Health Organization Global Recommendations on Physical Activity for Health. 2010 http://www.who.int/dietphysicalactivity/factsheet_recommendations/en/index.html.
5. Clemente-Suárez VJ, Arroyo-Toledo JJ. The Use of Autonomic Modulation Device to Control Training Performance after High-Intensity Interval Training Program. *J Med Syst*. 2018;42:47.
6. Karlsen T, Aamot IL, Haykowsky M, Rognmo Ø. High intensity interval training for maximizing health outcomes. *Progress in cardiovascular diseases*. 2017;60(1):67-77.
7. Buchheit M, Laursen PB. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: Part II: Anaerobic energy, neuromuscular load and practical applications. *Sport Med* 2013;43:927–954.
8. Forbes SC, Sletten N, Durrer C, Myette-Côté É, Candow D, Little JP. Creatine Monohydrate Supplementation Does Not Augment Fitness, Performance, or Body Composition Adaptations in Response to Four Weeks of High-Intensity Interval Training in Young Females. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2017;27:285-292.
9. da Silva Azevedo AP, Acquesta FM, et al. Creatine supplementation can improve impact control in high-intensity interval training. *Nutrition*. 2019;61:99-104.
10. Forbes SC, Candow DG, Smith-Ryan AE, Hirsch KR, Roberts MD, VanDusseldorp TA, Stratton MT, Kaviani M, Little JP. Supplements and Nutritional Interventions to Augment High-Intensity Interval Training Physiological and Performance Adaptations- A Narrative Review. *Nutrients*. 2020 Jan 31;12(2):390.
11. Gibala M.J., Little J.P., van Essen M., Wilkin G.P., Burgomaster K.A., Safdar A., Raha S., Tarnopolsky M.A. Short-term sprint interval versus traditional endurance training: Similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J. Physiol*. 2006;575:901–911.
12. Little J.P., Safdar A., Wilkin G.P., Tarnopolsky M.A., Gibala M.J. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: Potential mechanisms. *J. Physiol*. 2010;588:1011–1022.
13. Little J.P., Safdar A., Bishop D., Tarnopolsky M.A., Gibala M.J. An acute bout of high-intensity interval training increases the nuclear abundance of PGC-1alpha and activates mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2011;300:1303. doi: 10.1152/ajpregu.00538.2010.
14. Gibala M.J., Hawley J.A. Sprinting Toward Fitness. *Cell. Metab*. 2017;25:988–990.
15. MacInnis M.J., Gibala M.J. Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. *J. Physiol*. 2017;595:2915–2930. doi: 10.1113/JP273196.

16. Burgomaster K.A., Howarth K.R., Phillips S.M., Rakobowchuk M., Macdonald M.J., McGee S.L., Gibala M.J. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *J. Physiol.* 2008;586:151–160.
17. Prokic VZ, Rankovic MR, Draginic ND, Andjic MM, Sretenovic JZ, Zivkovic VI, Jeremic JN, Milinkovic MV, Bolevich S, Jakovljevic VLJ, Pantovic SB. Guanidinoacetic acid provides superior cardioprotection to its combined use with betaine and (or) creatine in HIIT-trained rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2022 Aug 1;100(8):772-786.
18. Fiuza-Luces, C., Santos-Lozano, A., Joyner, M., Carrera-Bastos, P., Picazo, O. Zugaza, J.L., et al. 2018. Exercise benefits in cardiovascular disease: beyond attenuation of traditional risk factors. *Nat. Rev. Cardiol.* 15:731–743.
19. World Health Organization (WHO). Physical inactivity. Available from <https://www.who.int/health-topics/physical-activity> [accessed 2
20. Costa EC, Hay JL, Kehler DS, Boreskie KF, Arora RC, Umpierre D, Szwajcer A, Duhamel TA. Effects of High-Intensity Interval Training Versus Moderate-Intensity Continuous Training On Blood Pressure in Adults with Pre- to Established Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials. *Sports Med.* 2018 Sep;48(9):2127-2142.
21. Tweedie, C., Romestaing, C., Burelle, Y., Safdar, A., Tarnopolsky, M.A. Seadon, S., et al. 2011. Lower oxidative DNA damage despite greater ROS production in muscles from rats selectively bred for high running capacity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300: R544–R553
22. Ramos, J.S., Dalleck, L.C., Tjonna, A.E., Beetham, K.S., and Coombes, J.S. 2015. The impact of high-intensity interval training versus moderate intensity continuous training on vascular function: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med.* 45: 679–692.
23. Macinnis, M.J., and Gibala, M.J. 2017. Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. *J Physiol.* 595: 2915–2930.
24. Forbes SC, Slade JM, Meyer RA. Short-term high-intensity interval training improves phosphocreatine recovery kinetics following moderate-intensity exercise in humans. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008 Dec;33(6):1124-31.
25. Batacan, R.B., Jr., Duncan, M.J., Dalbo, V.J., Tucker, P.S., and Fenning, A.S. 2017. Effects of high-intensity interval training on cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of intervention studies. *Br. J. Sports Med.* 51: 494–503
26. Joncquel-Chevalier Curt M, Voicu PM, Fontaine M, Dessein AF, Porchet N, Mention-Mulliez K, Dobbelaere D, Soto-Ares G, Cheillan D, Vamecq J. Creatine biosynthesis and transport in health and disease. *Biochimie.* 2015 Dec;119:146-65
27. Terjung RL, Clarkson P, Eichner ER, Greenhaff PL, Hespel PJ, Israel RG, Kraemer WJ, Meyer RA, Spriet LL, Tarnopolsky MA, Wagenmakers AJ, Williams MH. American College of Sports Medicine roundtable. The physiological and health effects of oral creatine supplementation. *Med Sci Sports Exerc.* 2000 Mar;32(3):706-17.
28. Harris RC, Söderlund K, Hultman E. Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clin Sci (Lond).* 1992 Sep;83(3):367-74. doi: 10.1042/cs0830367.
29. Joncquel-Chevalier Curt M, Voicu PM, Fontaine M, Dessein AF, Porchet N, Mention-Mulliez K, Dobbelaere D, Soto-Ares G, Cheillan D, Vamecq J. Creatine biosynthesis

- and transport in health and disease. *Biochimie*. 2015 Dec;119:146-65. doi: 10.1016/j.biochi.2015.10.022.
30. Brosnan JT, Brosnan ME. Creatine: endogenous metabolite, dietary, and therapeutic supplement. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:241-61.
31. Kreider RB, Kalman DS, Antonio J, Ziegenfuss TN, Wildman R, Collins R, Candow DG, Kleiner SM, Almada AL, Lopez HL. International Society of Sports Nutrition position stand: safety and efficacy of creatine supplementation in exercise, sport, and medicine. *J Int Soc Sports Nutr*. 2017 Jun 13;14:18
32. Bertin M, Pomponi SM, Kokuhuta C, Iwasaki N, Suzuki T, Ellington WR. Origin of the genes for the isoforms of creatine kinase. *Gene*. 2007 May 1;392(1-2):273-82.
33. Sahlin K, Harris RC. The creatine kinase reaction: a simple reaction with functional complexity. *Amino Acids*. 2011 May;40(5):1363-7.
34. Buford TW, Kreider RB, Stout JR, Greenwood M, Campbell B, Spano M, Ziegenfuss T, Lopez H, Landis J, Antonio J. International Society of Sports Nutrition position stand: creatine supplementation and exercise. *J Int Soc Sports Nutr*. 2007 Aug 30;4:6.
35. Hultman E, Söderlund K, Timmons JA, Cederblad G, Greenhaff PL. Muscle creatine loading in men. *J Appl Physiol* (1985). 1996 Jul;81(1):232-7.
36. Green AL, Hultman E, Macdonald IA, Sewell DA, Greenhaff PL. Carbohydrate ingestion augments skeletal muscle creatine accumulation during creatine supplementation in humans. *Am J Physiol*. 1996 Nov;271(5 Pt 1):E821-6
37. Balsom PD, Söderlund K, Ekblom B. Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. *Sports Med*. 1994 Oct;18(4):268-80.
38. Harris RC, Söderlund K, Hultman E. Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clin Sci (Lond)*. 1992 Sep;83(3):367-74
39. Brosnan ME, Brosnan JT. The role of dietary creatine. *Amino Acids*. 2016 Aug;48(8):1785-91.
40. Paddon-Jones D, Børsheim E, Wolfe RR. Potential ergogenic effects of arginine and creatine supplementation. *J Nutr*. 2004 Oct;134(10 Suppl):2888S-2894S; discussion 2895S.
41. Wallimann T, Schlösser T, Eppenberger HM. Function of M-line-bound creatine kinase as intramyofibrillar ATP regenerator at the receiving end of the phosphorylcreatine shuttle in muscle. *J Biol Chem*. 1984 Apr 25;259(8):5238-46.
42. Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*. 2011 May;40(5):1271-96
43. Schlattner U, Klaus A, Ramirez Rios S, Guzun R, Kay L, Tokarska-Schlattner M. Cellular compartmentation of energy metabolism: creatine kinase microcompartments and recruitment of B-type creatine kinase to specific subcellular sites. *Amino Acids*. 2016 Aug;48(8):1751-74.
44. Béard E, Braissant O. Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. *J Neurochem*. 2010 Oct;115(2):297-313.
45. Draginic, N., Prokic, V., Andjic, M., Vranic, A., and Pantovic, S. The effects of creatine and related compounds on cardiovascular system. *Ser. J. Exp. Clin. Res*. 2020. doi:10.2478/sjecr-2019-0066.
46. Butts J, Jacobs B, Silvis M. Creatine Use in Sports. *Sports Health*. 2018 Jan/Feb;10(1):31-34.

47. Mills S, Candow DG, Forbes SC, Neary JP, Ormsbee MJ, Antonio J. Effects of Creatine Supplementation during Resistance Training Sessions in Physically Active Young Adults. *Nutrients*. 2020 Jun 24;12(6):1880.
48. Jäger R, Purpura M, Shao A, Inoue T, Kreider RB. Analysis of the efficacy, safety, and regulatory status of novel forms of creatine. *Amino Acids*. 2011 May;40(5):1369-83
49. Hultman E, Söderlund K, Timmons JA, Cederblad G, Greenhaff PL. Muscle creatine loading in men. *J Appl Physiol* (1985). 1996 Jul;81(1):232-7.
50. Kreider RB. Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations. *Mol Cell Biochem*. 2003 Feb;244(1-2):89-94.
51. Buford TW, Kreider RB, Stout JR, Greenwood M, Campbell B, Spano M, Ziegenfuss T, Lopez H, Landis J, Antonio J. International Society of Sports Nutrition position stand: creatine supplementation and exercise. *J Int Soc Sports Nutr*. 2007 Aug 30;4:6.
52. Kreider RB, Wilborn CD, Taylor L, Campbell B, Almada AL, Collins R, Cooke M, Earnest CP, Greenwood M, Kalman DS, Kerksick CM, Kleiner SM, Leutholtz B, Lopez H, Lowery LM, Mendel R, Smith A, Spano M, Wildman R, Willoughby DS, Ziegenfuss TN, Antonio J. ISSN exercise & sport nutrition review: research & recommendations. *J Int Soc Sports Nutr*. 2010;7:7.
53. Yang MT, Lee XX, Huang BH, Chien LH, Wang CC, Chan KH. Effects of Two-Week Betaine Supplementation on Apoptosis, Oxidative Stress, and Aerobic Capacity after Exhaustive Endurance Exercise. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Nov 27;9(12):1189
54. Craig SA. Betaine in human nutrition. *Am J Clin Nutr*. 2004 Sep;80(3):539-49.
55. Zhao G, He F, Wu C, Li P, Li N, Deng J, Zhu G, Ren W, Peng Y. Betaine in Inflammation: Mechanistic Aspects and Applications. *Front Immunol*. 2018 May 24;9:1070
56. Huang F, Chen X, Jiang X, Niu J, Cui C, Chen Z, Sun J. Betaine ameliorates prenatal valproic-acid-induced autism-like behavioral abnormalities in mice by promoting homocysteine metabolism. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2019 Jun;73(6):317-322.
57. Shakeri M, Cottrell JJ, Wilkinson S, Le HH, Suleria HAR, Warner RD, Dunshea FR. Growth Performance and Characterization of Meat Quality of Broiler Chickens Supplemented with Betaine and Antioxidants under Cyclic Heat Stress. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Aug 22;8(9):336.
58. Willingham BD, Ragland TJ, Ormsbee MJ. Betaine Supplementation May Improve Heat Tolerance: Potential Mechanisms in Humans. *Nutrients*. 2020 Sep 25;12(10):2939.
59. Dragolovich J. Dealing with salt stress in animal cells: The role and regulation of glycine betaine concentrations. *J. Exp. Zool*. 1994;268:139–144.
60. Finkelstein JD, Harris BJ, Kyle WE. Methionine metabolism in mammals: kinetic study of betaine-homocysteine methyltransferase. *Arch Biochem Biophys*. 1972 Nov;153(1):320-4.
61. BORSOOK H, BORSOOK ME. The biochemical basis of betaine-glycocyamine therapy. *Ann West Med Surg*. 1951 Oct;5(10):825-9.
62. Pekkinen J, Olli K, Huotari A, Tiitonen K, Keski-Rahkonen P, Lehtonen M, Auriola S, Kolehmainen M, Mykkänen H, Poutanen K, Hanhineva K. Betaine supplementation causes increase in carnitine metabolites in the muscle and liver of mice fed a high-fat diet as studied by nontargeted LC-MS metabolomics approach. *Mol Nutr Food Res*. 2013 Nov;57(11):1959-68.

63. Carnicelli D, Arfilli V, Onofrillo C, Alfieri RR, Petronini PG, Montanaro L, Brigotti M. Cap-independent protein synthesis is enhanced by betaine under hypertonic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Feb 12;483(3):936-940.
64. Burg MB. Molecular basis of osmotic regulation. *Am J Physiol*. 1995 Jun;268(6 Pt 2):F983-96.
65. Lee EC, Maresh CM, Kraemer WJ, Yamamoto LM, Hatfield DL, Bailey BL, Armstrong LE, Volek JS, McDermott BP, Craig SA. Ergogenic effects of betaine supplementation on strength and power performance. *J Int Soc Sports Nutr*. 2010 Jul 19;7:27
66. Knight LS, Piibe Q, Lambie I, Perkins C, Yancey PH. Betaine in the Brain: Characterization of Betaine Uptake, its Influence on Other Osmolytes and its Potential Role in Neuroprotection from Osmotic Stress. *Neurochem Res*. 2017 Dec;42(12):3490-3503.
67. Lever M, George PM, Elmslie JL, Atkinson W, Slow S, Molyneux SL, Troughton RW, Richards AM, Frampton CM, Chambers ST. Betaine and secondary events in an acute coronary syndrome cohort. *PLoS One*. 2012;7(5):e37883.
68. Ostojic SM, Jorga J. Guanidinoacetic acid in human nutrition: Beyond creatine synthesis. *Food Sci Nutr*. 2023. 11;11(4):1606-1611
69. Kubik, S. , & Mungalpara, D. (2017). Amino acid-based receptors. In Atwood J. L. (Ed.), *Comprehensive supramolecular chemistry II* (pp. 293–310).
70. Walker JB. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1979;50:177-242.
71. Ostojic SM, Vojvodic-Ostojic A. Single-dose oral guanidinoacetic acid exhibits dose-dependent pharmacokinetics in healthy volunteers. *Nutr Res*. 2015 Mar;35(3):198-205.
72. Ostojic SM. Advanced physiological roles of guanidinoacetic acid. *Eur J Nutr*. 2015 Dec;54(8):1211-5
73. Aynsley-Green A, Alberti KG. In vivo stimulation of insulin secretion by guanidine derivatives in the rat. *Horm Metab Res* 1974. 6(2):115–120
74. Meglasson MD, Wilson JM, Yu JH, Robinson DD, Wyse BM, de Souza CJ (1993) Antihyperglycemic action of guanidinoalkanoic acids: 3-guanidinopropionic acid ameliorates hyperglycemia in diabetic KKAy and C57BL6Job/ob mice and increases glucose disappearance in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 266(3):1454–1462
75. Baker DH (2009) Advances in protein-amino acid nutrition of poultry. *Amino Acids* 37(1):29–41
76. De Deyn PP, Macdonald RL (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. *Ann Neurol* 28(5):627–633
77. Wang LS, Shi BM, Shan AS, Zhang YY (2012) Effects of guanidinoacetic acid on growth performance, meat quality and antioxidation in growing-finishing pigs. *J Anim Vet Adv* 11(5):631–636.
78. Semeredi S, Stajer V, Ostojic J, Vranes M, Ostojic SM. Guanidinoacetic acid with creatine compared with creatine alone for tissue creatine content, hyperhomocysteinemia, and exercise performance: A randomized, double-blind superiority trial. *Nutrition*. 2019 Jan;57:162-166

79. Haichao Wang, Sisi Li, Shenglin Fang, Xiaojing Yang. Betaine Improves Intestinal Functions by Enhancing Digestive Enzymes, Ameliorating Intestinal Morphology, and Enriching Intestinal Microbiota in High-salt stressed Rats. *Nutrients*. 2018;10:907.
80. Lygate CA, Bohl S, ten Hove M, Faller KM, Ostrowski PJ, Zervou S, Medway DJ, Aksentijevic D, Sebag-Montefiore L, Wallis J, Clarke K, Watkins H, Schneider JE, Neubauer S. Moderate elevation of intracellular creatine by targeting the creatine transporter protects mice from acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2012 Dec 1;96(3):466-75.
81. Deminice R, Jordao AA. Creatine supplementation reduces oxidative stress biomarkers after acute exercise in rats. *Amino Acids*. 2012 Aug;43(2):709-15.
82. Cooper R, Naclerio F, Allgrove J, Jimenez A. Creatine supplementation with specific view to exercise/sports performance: an update. *J Int Soc Sports Nutr*. 2012 Jul 20;9(1):33
83. Haichao Wang, Sisi Li, Shenglin Fang, Xiaojing Yang. Betaine Improves Intestinal Functions by Enhancing Digestive Enzymes, Ameliorating Intestinal Morphology, and Enriching Intestinal Microbiota in High-salt stressed Rats. *Nutrients*. 2018;10:907.
84. Nobari H, Cholewa JM, Castillo-Rodríguez A, Kargarfard M, Pérez-Gómez J. Effects of chronic betaine supplementation on performance in professional young soccer players during a competitive season: a double blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr*. 2021 Oct 18;18(1):67.
85. Apicella JM, Lee EC, Bailey BL, Saenz C, Anderson JM, Craig SA, Kraemer WJ, Volek JS, Maresh CM. Betaine supplementation enhances anabolic endocrine and Akt signaling in response to acute bouts of exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2013;113(3):793–802
86. Huang QC, Xu ZR, Han XY, Li WF. Effect of betaine on growth hormone pulsatile secretion and serum metabolites in finishing pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2007 Apr;91(3-4):85-90.
87. Pryor JL, Craig SA, Swensen T. Effect of betaine supplementation on cycling sprint performance. *J Int Soc Sports Nutr*. 2012;9(1):12
88. Nobari H, Kargarfard M, Minasian V, Cholewa JM, Pérez-Gómez J. The effects of 14-week betaine supplementation on endocrine markers, body composition and anthropometrics in professional youth soccer players: a double blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr*. 2021;18(1):20.
89. Nobari H, Cholewa JM, Pérez-Gómez J, Castillo-Rodríguez A. Effects of 14-weeks betaine supplementation on pro-inflammatory cytokines and hematology status in professional youth soccer players during a competition season: a double blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr*. 2021;18(1):42.
90. Ostojic SM, Stojanovic MD, Hoffman JR. Six-Week Oral Guanidinoacetic Acid Administration Improves Muscular Performance in Healthy Volunteers. *J Investig Med*. 2015 Dec;63(8):942-6.
91. Pingitore A, Lima GP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*. 2015 Jul-Aug;31(7-8):916-22

92. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84
93. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006 Mar 10;160(1):1-40.
94. Groussard, C., Maillard, F., Vazeille, E., Barnich, N., Sirvent, P., and Otero, Y.F. 2019. Tissue-specific oxidative stress modulation by exercise: a comparison between MICT and HIIT in an obese rat model. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019: 1965364.
95. Fritzen, A.M., Lundsgaard, A.M., and Kiens, B. 2009. Dietary fuels in athletic performance. *Annu. Rev. Nutr.* 39: 45–73.
96. Magherini, F., Fiaschi, T., Marzocchi, R., Mannelli, M., Gamberi, T. Modesti, P.A., et al. 2019. Oxidative stress in exercise training: the involvement of inflammation and peripheral signals. *Free Radic. Res.* 53:1155–1165
97. Criswell D, Powers S, Dodd S, Lawler J, Edwards W, Renshler K, Grinton S. High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med Sci Sports Exerc.* 1993 Oct;25(10):1135-40.
98. Gomez-Cabrera MC, Viña J, Ji LL. Role of Redox Signaling and Inflammation in Skeletal Muscle Adaptations to Training. *Antioxidants (Basel).* 2016 Dec 13;5(4):48.
99. Powers SK, Radak Z, Ji LL. Exercise-induced oxidative stress: past, present and future. *J Physiol.* 2016 Sep 15;594(18):5081-92.
100. Sestili P, Martinelli C, Colombo E, Barbieri E, Potenza L, Sartini S, Fimognari C. Creatine as an antioxidant. *Amino Acids.* 2011 May;40(5):1385-96.
101. Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jan 11;290(1):47-52.
102. Meyer LE, Machado LB, Santiago AP, da-Silva WS, De Felice FG, Holub O, Oliveira MF, Galina A. Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity. *J Biol Chem.* 2006 Dec 8;281(49):37361-71.
103. Berneburg M, Gremmel T, Kürten V, Schroeder P, Hertel I, von Mikecz A, Wild S, Chen M, Declercq L, Matsui M, Ruzicka T, Krutmann J. Creatine supplementation normalizes mutagenesis of mitochondrial DNA as well as functional consequences. *J Invest Dermatol.* 2005 Aug;125(2):213-20.
104. Guidi C, Potenza L, Sestili P, Martinelli C, Guescini M, Stocchi L, Zeppa S, Polidori E, Annibalini G, Stocchi V. Differential effect of creatine on oxidatively-injured mitochondrial and nuclear DNA. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Jan;1780(1):16-26.
105. Sestili P, Martinelli C, Bravi G, Piccoli G, Curci R, Battistelli M, Falcieri E, Agostini D, Gioacchini AM, Stocchi V. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med.* 2006 Mar 1;40(5):837-49.
106. Fimognari C, Sestili P, Lenzi M, Bucchini A, Cantelli-Forti G, Hrelia P. RNA as a new target for toxic and protective agents. *Mutat Res.* 2008 Dec 15;648(1-2):15-22.

107. Kolling J, Wyse AT. Creatine prevents the inhibition of energy metabolism and lipid peroxidation in rats subjected to GAA administration. *Metab Brain Dis.* 2010 Sep;25(3):331-8.
108. Deminice R, Jordao AA. Creatine supplementation reduces oxidative stress biomarkers after acute exercise in rats. *Amino Acids.* 2012 Aug;43(2):709-15.
109. Orsenigo MN, Porta C, Sironi C, Laforenza U, Meyer G, Tosco M. Effects of creatine in a rat intestinal model of ischemia/reperfusion injury. *Eur J Nutr.* 2012 Apr;51(3):375-84.
110. Zhang M, Zhang H, Li H, Lai F, Li X, Tang Y, Min T, Wu H. Antioxidant Mechanism of Betaine without Free Radical Scavenging Ability. *J Agric Food Chem.* 2016 Oct 26;64(42):7921-7930.
111. Alirezaei M, Reza Gheisari H, Reza Ranjbar V, Hajibemani A. Betaine: a promising antioxidant agent for enhancement of broiler meat quality. *Br Poult Sci.* 2012;53(5):699-707.
112. Alirezaei M, Khoshdel Z, Dezfoulan O, Rashidipour M, Taghadosi V. Beneficial antioxidant properties of betaine against oxidative stress mediated by levodopa/benserazide in the brain of rats. *J Physiol Sci.* 2015 May;65(3):243-52.
113. Jung YS, Kim SJ, Kwon DY, Ahn CW, Kim YS, Choi DW, Kim YC. Alleviation of alcoholic liver injury by betaine involves an enhancement of antioxidant defense via regulation of sulfur amino acid metabolism. *Food Chem Toxicol.* 2013 Dec;62:292-8.
114. Veskovc M, Mladenovic D, Milenkovic M, Tosic J, Borozan S, Gopcevic K, Labudovic-Borovic M, Dragutinovic V, Vucevic D, Jorgacevic B, Isakovic A, Trajkovic V, Radosavljevic T. Betaine modulates oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and Akt/mTOR signaling in methionine-choline deficiency-induced fatty liver disease. *Eur J Pharmacol.* 2019 Apr 5;848:39-48.
115. Meng X, Peng L, Xu J, Guo D, Cao W, Xu Y, Li S. Betaine attenuate chronic restraint stress-induced changes in testicular damage and oxidative stress in male mice. *Reprod Biol Endocrinol.* 2022 May 21;20(1):80.
116. Nie C, Nie H, Zhao Y, Wu J, Zhang X. Betaine reverses the memory impairments in a chronic cerebral hypoperfusion rat model. *Neurosci Lett.* 2016;615:9–14.
117. Garrett Q, Khandekar N, Shih S, Flanagan JL, Simmons P, Vehige J, Willcox MD. Betaine stabilizes cell volume and protects against apoptosis in human corneal epithelial cells under hyperosmotic stress. *Exp Eye Res.* 2013 Mar;108:33-41.
118. Giriş M, Doğru-Abbasoğlu S, Soluk-Tekkeşin M, Olgaç V, Uysal M. Effect of betaine treatment on the regression of existing hepatic triglyceride accumulation and oxidative stress in rats fed on high fructose diet. *Gen Physiol Biophys.* 2018 Sep;37(5):563-570.
119. Zugno AI, Stefanello FM, Scherer EB, Mattos C, Pederzolli CD, Andrade VM, Wannmacher CM, Wajner M, Dutra-Filho CS, Wyse AT. Guanidinoacetate decreases antioxidant defenses and total protein sulfhydryl content in striatum of rats. *Neurochem Res.* 2008 Sep;33(9):1804-10.
120. Mori A, Kohno M, Masumizu T, Noda Y, Packer L. Guanidino compounds generate reactive oxygen species. *Biochem Mol Biol Int.* 1996 Sep;40(1):135-43.

121. Hiramatsu M. A role for guanidino compounds in the brain. *Mol Cell Biochem.* 2003 Feb;244(1-2):57-62.
122. Jakovljevic B, Nikolic Turnic T, Jeremic N, Savic M, Jeremic J, Srejovic I, Belic B, Ponorac N, Jakovljevic V, Zivkovic V. The impact of high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training regimes on cardiodynamic parameters in isolated heart of normotensive and hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019 Jul;97(7):631-637.
123. Murai IH, Roschel H, Pabis LVS, et al. Exercise training, creatine supplementation, and bone health in ovariectomized rats. *Osteoporosis International.* 2015;26:1395-1404.
124. Stead LM, Au KP, Jacobs RL, Brosnan ME, Brosnan JT. Methylation demand and homocysteine metabolism: effects of dietary provision of creatine and guanidinoacetate. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism.* 2001;281: E1095-E1100.
125. Cholewa JM, Hudson A, Cicholski T, et al. The effects of chronic betaine supplementation on body composition and performance in collegiate females: a double-blind, randomized, placebo controlled trial. *Journal of the International Society of Sports Nutrition.* 2018;15:37.
126. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA (ed): *Handbook of methods for oxygen radical research*, CRC Press, Inc, Boca Raton, pp. 123-132, 1999.
127. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38(1-2): 161-70, 1980.
128. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358, 1979.
129. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982 Oct;126(1):131-138, 1982
130. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology.* 1984;105:121-6.
131. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247: 3170-3175, 1972
132. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood. Glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963;61:882-888
133. Beutler, E. 1975. Reduced glutathione (GSH). In *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Edited by Beutler, E. Grune and Stratton, New York. pp. 112-114
134. Sretenovic J, Ajdzanovic V, Zivkovic V, Srejovic I, Corbic M, Milosevic V, Jakovljevic V, Milosavljevic Z. Nandrolone decanoate and physical activity affect quadriceps in peripubertal rats. *Acta Histochem.* 2018 Jul;120(5):429-437.
135. Sretenovic J, Zivkovic V, Srejovic I, Pantovic S, Jovic JJ, Nikolic M, Turnic TN, Savic M, Jevdjevic M, Milosavljevic Z, Bolevich S, Jakovljevic V. Nandrolone Decanoate and Swimming Affects Cardiodynamic and Morphometric Parameters in the Isolated Rat Heart. *Life (Basel).* 2022 Aug 16;12(8):1242.

136. Sretenovic J, Joksimovic Jovic J, Srejovic I, Zivkovic V, Mihajlovic K, Labudovic-Borovic M, Trifunovic S, Milosevic V, Lazic D, Bolevich S, Jakovljevic V, Milosavljevic Z. Morphometric analysis and redox state of the testicles in nandrolone decanoate and swimming treated adult male rats. *Basic Clin Androl.* 2021 Jul 15;31(1):17.
137. Ostojic, S.M., Stojanovic, M.D., and Olcina, G. 2015. Oxidant–antioxidant capacity of dietary guanidinoacetic acid. *Ann. Nutr. Metab.* 67: 243–246
138. Verboven, M., Cuypers, A., Deluyker, D., Lambrichts, I., Eijnde, B.O.Hansen, D., et al. 2019. High intensity training improves cardiac function in healthy rats. *Sci. Rep.* 9: 5612.
139. Rankovic M, Jakovljevic V, Bradic J, Jakovljevic B, Zivkovic V, Srejovic I, Bolevich S, Milosavljevic I, Jeremic J, Ravic M, Mijanovic O, Turnic TN, Jeremic N. Effects of High Intensity Interval vs. Endurance Training on Cardiac Parameters in Ischemia/Reperfusion of Male Rats: Focus on Oxidative Stress. *Front Physiol.* 2021 Feb 22;12:534127.
140. Aksentijević D, Zervou S, Eykyn TR, McAndrew DJ, Wallis J, Schneider JE, Neubauer S, Lygate CA. Age-Dependent Decline in Cardiac Function in Guanidinoacetate-N-Methyltransferase Knockout Mice. *Front Physiol.* 2020 Jan 21;10:1535.
141. Lawler, J.M., Barnes, W.S., Wu, G., Song, W., and Demaree, S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. 290: 47–52
142. Guimarães-Ferreira L, Pinheiro CH, Gerlinger-Romero F, Vitzel KF, Nachbar RT, Curi R, Nunes MT. Short-term creatine supplementation decreases reactive oxygen species content with no changes in expression and activity of antioxidant enzymes in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.* 2012 Nov;112(11):3905-11
143. Aziza, A., Mahmoud, R., Zahran, E., Gadalla, H. Dietary supplementation of guanidinoacetic acid improves growth, biochemical parameters, antioxidant capacity and cytokine responses in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish. Shellfish. Immunol.* 2020. 97: 367–374.
144. Wang, L., Shi, B., Shan, A., Zhang, Z. Effects of guanidinoacetic acid on growth performance, meat quality and antioxidation in growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 2018. 96: 3264–3273
145. Hagar, H., Medany, A.E., Salam, R., Medany, G.E., Nayal, O.A. Betaine supplementation mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative /nitrosative stress and suppression of inflammation and apoptosis in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2015. 67: 133–141.
146. Pryor JL, Wolf ST, Sforzo G, Swensen T. The Effect of Betaine on Nitrate and Cardiovascular Response to Exercise. *Int J Exerc Sci.* 2017 Jul 1;10(4):550-559.
147. Lang, F., Busch, G.L., and Volkl, H. 1998. The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell. Physiol. Biochem.* 8: 1–45.
148. Ueland, P.M., Holm, P.I., Hustad, S. Betaine: a key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2005. 43: 1069–1075.
149. Boehm, E., Chan, S., Monfare, D.M., Walliman N, T., Clarke, K., Neubauer, S. Creatine transporter activity and content in the rat heart supplemented by and depleted of creatine. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003. 284: E399–E406.

150. Sretenovic J, Zivkovic V, Srejovic I, Milosavljevic Z. The effects of high doses of nandrolone decanoate on cardiac muscle tissue. *Ser J of Exp Clin Res.* 2016; 17(4):303-308
151. Holloway TM, Bloemberg D, da Silva ML, Quadrilatero J, Spriet LL. High-intensity interval and endurance training are associated with divergent skeletal muscle adaptations in a rodent model of hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015 Jun 1;308(11):R927-34.
152. Luginbuhl AJ, Dudley GA, Staron RS. Fiber type changes in rat skeletal muscle after intense interval training. *Histochemistry.* 1984;81(1):55-8.
153. Farshidfar F, Pinder MA, Myrie SB. Creatine Supplementation and Skeletal Muscle Metabolism for Building Muscle Mass- Review of the Potential Mechanisms of Action. *Curr Protein Pept Sci.* 2017;18(12):1273-1287.
154. Lu Y, Zou T, Wang Z, Yang J, Li L, Guo X, He Q, Chen L, You J. Dietary guanidinoacetic acid improves the growth performance and skeletal muscle development of finishing pigs through changing myogenic gene expression and myofibre characteristics. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2020 Nov;104(6):1875-1883
155. Locatelli J, Paiva NCN, Carvalho SHR, Lavorato VN, Gomes LHLS, Castro QJT, Grabe-Guimarães A, Carneiro CM, Natali AJ, Isoldi MC. Swim training attenuates the adverse remodeling of LV structural and mechanical properties in the early compensated phase of hypertension. *Life Sci.* 2017 Oct 15;187:42-49.
156. Carvalho MR, Mendonça MLM, Oliveira JML, Romanenghi RB, Morais CS, Ota GE, Lima ARR, Oliveira RJ, Filiú WFO, Okoshi K, Okoshi MP, Oliveira-Junior SA, Martinez PF. Influence of high-intensity interval training and intermittent fasting on myocardium apoptosis pathway and cardiac morphology of healthy rats. *Life Sci.* 2021 Jan 1;264:118697.
157. Cheng X, Li M, Leng X, Wen H, Wu F, Yu L, Jiang M, Lu X, Gao W, Zhang W, Tian J. Creatine improves the flesh quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared in freshwater. *Food Chem.* 2021 Aug 30;354:129498.
158. Peng W, Zhang Y, Zheng M, Cheng H, Zhu W, Cao CM, Xiao RP. Cardioprotection by CaMKII- δ is mediated by phosphorylation of heat shock factor 1 and subsequent expression of inducible heat shock protein 70. *Circ Res.* 2010 Jan 8;106(1):102-10.
159. Song N, Ma J, Meng XW, Liu H, Wang H, Song SY, Chen QC, Liu HY, Zhang J, Peng K, Ji FH. Heat Shock Protein 70 Protects the Heart from Ischemia/Reperfusion Injury through Inhibition of p38 MAPK Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 Apr 7;2020:3908641.
160. Zhang C, Liu X, Miao J, Wang S, Wu L, Yan D, Li J, Guo W, Wu X, Shen A. Heat shock protein 70 protects cardiomyocytes through suppressing SUMOylation and nucleus translocation of phosphorylated eukaryotic elongation factor 2 during myocardial ischemia and reperfusion. *Apoptosis.* 2017 May;22(5):608-625.
161. Starnes, J.W., and Taylor, R.P. Exercise-induced cardioprotection: endogenous mechanisms. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2007. 39(9): 1537–1543
162. Milne, K.J., Wolff, S., Noble, E.G. Myocardial accumulation and localization of the inducible 70-kDa heat shock protein, hsp70, following exercise. *J Appl. Physiol.* (1985). 2012. 113(6): 853–860

163. Paroo, Z., Haist, J.V., Karmazyn, M., and Noble, E.G. 2002. Exercise improves postischemic cardiac function in males but not females: consequences of a novel sex-specific heat shock protein 70 response. *Circ.Res.* 90(8): 911–917.
164. Periasamy, M., and Kalyanasundaram, A. 2007. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve*, 35(4): 430–442.
165. Vutthasathien, P., Wattanapermpool, J. Regular exercise improves cardiac contractile activation by modulating MHC isoforms and SERCA activity in orchidectomized rats. *J. Appl. Physiol.* (1985). 2015. 119(7): 831–839.
166. Kemi OJ, Ceci M, Condorelli G, Smith GL, Wisloff U. Myocardial sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase function is increased by aerobic interval training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2008. 15: 145–148.
167. Brandão LHA, Chagas TPN, Vasconcelos ABS, de Oliveira VC, Fortes LS, de Almeida MB, Mendes Netto RS, Del-Vecchio FB, Neto EP, Chaves LMS, Jimenez-Pavón D, Da Silva-Grigoletto ME. Physiological and Performance Impacts After Field Supramaximal High-Intensity Interval Training With Different Work-Recovery Duration. *Front Physiol.* 2020 Oct 8;11:1075
168. Miller JR, Van Hooren B, Bishop C, Buckley JD, Willy RW, Fuller JT. A Systematic Review and Meta-Analysis of Crossover Studies Comparing Physiological, Perceptual and Performance Measures Between Treadmill and Overground Running. *Sports Med.* 2019 May;49(5):763-782
169. Baird MF, Graham SM, Baker JS, Bickerstaff GF. Creatine-kinase- and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery. *J Nutr Metab.* 2012;2012:960363.
170. Soleimani E, Ardekani AM, Fayyazishishavan E, Farhangi MA. The interactive relationship of dietary choline and betaine with physical activity on circulating creatine kinase (CK), metabolic and glycemic markers, and anthropometric characteristics in physically active young individuals. *BMC Endocr Disord.* 2023 Jul 25;23(1):158.
171. Kim EJ, Wierzbicki AS. Investigating raised creatine kinase. *BMJ.* 2021 Jun 23;373:n1486.
172. Wu YW, Ho SK, Tseng WK, Yeh HI, Leu HB, Yin WH, Lin TH, Chang KC, Wang JH, Wu CC, Chen JW. Potential impacts of high-sensitivity creatine kinase-MB on long-term clinical outcomes in patients with stable coronary heart disease. *Sci Rep.* 2020 Mar 27;10(1):5638.
173. Zheng M, Liu C, Lv Y, Mi J, Qiu D, He L, Zhao L. Comparisons of High Intensity Interval Training and Continuous Training on Metabolomic Alteration and Cardiac Function in Male Adolescent Rats. *Front Physiol.* 2022 Jun 28;13:900661.
174. Shave R, Baggish A, George K, Wood M, Scharhag J, Whyte G, Gaze D, Thompson PD. Exercise-induced cardiac troponin elevation: evidence, mechanisms, and implications. *J Am Coll Cardiol.* 2010 Jul 13;56(3):169-76.
175. Ostojic, S.M., Niess, B., Stojanovic, M., Obrenovic, M. Creatine metabolism and safety profiles after six-week oral guanidinoacetic acid administration in healthy humans. *Int. J. Med. Sci.* 2013. 10(2): 141–147
176. Stajer, V., Trivic, T., Drid, P., Vranes, M., Ostojic, S.M. A single session of exhaustive exercise markedly decreases circulating levels of guanidinoacetic acid in healthy men and women. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2016. 41(10): 1100–1103.

177. Jayaraman B, La KV, La H, Doan V, Carpena EM, Rademacher M, Channarayapatna G. Supplementation of guanidinoacetic acid to pig diets: effects on performance, carcass characteristics, and meat quality. *J Anim Sci.* 2018 Jun 4;96(6):2332-2341.
178. Willcocks, R.J., Williams, C.A., Barker, A.R., Fulford, J., Armstrong, N. Age- and sex-related differences in muscle phosphocreatine and oxygenation kinetics during high-intensity exercise in adolescents and adults. *NMR Biomed.* 2010. 23(6):569–577.
179. Mihic, S., Macdonald, J.R., McKenzie, S., Tarnopolsky, M.A. Acute creatine loading increases fat-free mass, but does not affect blood pressure, plasma creatinine, or CK activity in men and women. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2000. 32: 291–296.
180. Parise G, Mihic S, MacLennan D, Yarasheski KE, Tarnopolsky MA. Effects of acute creatine monohydrate supplementation on leucine kinetics and mixed-muscle protein synthesis. *J Appl Physiol* (1985). 2001 Sep;91(3):1041-7.

Биографија

Др Вељко Прокић је рођен 18.04.1989. године у Ћуприји. Завршио је основну школу „Момчило Поповић Озрен“ у Параћину. Средњу школу „Гимназију“ завршио је у Параћину са одличним успехом. Медицински факултет је уписао 2008. године а завршио га 2016. год. у Крагујевцу на Факултету медицинских наука са просечном 7,71. Приправнички стаж је обавио у Дому здравља Врачар и Клиничком центру Србије. Био је сарадник у настави у Високој спортској и здравственој школи у Београду у периоду од 2016 до 2017. године, а потом и асистент на предмету „Анатомија“ до 2018 године у оквиру исте установе. Докторске Академске студије у Крагујевцу је уписао 2016. године, смер Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Специјализацију из области радиологије је уписао 2017. године на Медицинском факултету у Београду. Специјалистички стаж је обавио у Универзитетском Клиничком центру Србије у Београду и делом на Институту за онкологију и радиологију Србије. Специјалистички испит је положио 2022. године у октобру одличном оценом. Учесник је бројних скупова, семинара и конгреса, како домаћих тако и иностраних. У априлу 2023. године је завршио додатну едукацију из области радиологије дојке где је овладао вештинама читања мамографије са мамотомосинтезом и ултразвучно вођене биопсије дојке широком иглом.

Тренутно је запослен у Општој болници у Ћуприји као специјалиста радиологије где ради у одсеку за рендген, ултразвучну, СТ и MR дијагностику.

Члан је породичне поликлинике Алба Прокић у Параћину.

Ожењен, отац једног дечака.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

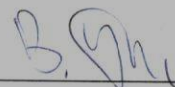
Ефекти модулације метаболизма креатина на функцију срца пацова изложених интервалном тренингу високог интензитета

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 10.10.2023. године,



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

Ефекти модулације метаболизма креатина на функцију срца пацова изложених
интервалном тренингу високог интензитета

истоветне.

У Крагујевцу, 10.10.2023 године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Вељко Прокић,

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Ефекти модулације метаболизма креатина на функцију срца пацова изложених интервалном тренингу високог интензитета

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам¹

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- ⑥ Ауторство - некомерцијално - без прерада²**

У Крагујевцу, 10.10.2023 године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>