

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Pavel Zaccpálek

Vliv podávání kreatinu a aminokyselin s rozvětveným řetězcem na svalovou fyziologii a jejich možné klinické využití

The role of creatine and branched chain amino acids supplementation in muscle physiology and its possible clinical use

Vedoucí práce: RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci sepsal samostatně pod vedením školitelky RNDr. Jitky Žurmanové, Ph.D., a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Zároveň prohlašuji, že předložená práce je literární rešerší a v ní uvedené vědecké poznatky nejsou mé původní a ani je takto neprezentuji.

V Praze dne 15. srpna 2018

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Jitce Žurmanové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a velkou vstřícnost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování práce věnovala.

Klíčová slova

kosterní sval, metabolismus, kreatin, adenosin trifosfát, ATP, větvené aminokyseliny, BCAA

Key words

skeletal muscle, metabolism, creatine, adenosine triphosphate, ATP, branch chained amino acids, BCAA

Abstrakt (v českém jazyce)

Kreatinkinázový systém by se dal považovat za první linii v energetickém metabolismu buňky. Vytváří a udržuje zásobu buněčné energie a zároveň umožňuje nejrychlejší možnou odpověď na zvýšenou potřebu energie. Cílem této práce bylo podrobně popsat kreatinkinázový systém, jeho roli v energetickém metabolismu a taky metabolismus samotné molekuly kreatinu. Významná část práce byla zaměřena na zvýšený příjem kreatinu a jeho vliv na fyziologii kosterního svalstva. Kromě toho byly také popsány některé poruchy spojené s kreatinem a výzkum jejich léčby. Na závěr byla prozkoumána možná společná působení kreatinu s aminokyselinami s rozvětveným řetězcem, přičemž určitá spojitost mezi nimi byla nalezena přes signální dráhu mTOR.

Abstract (in English)

Creatine kinase system could be considered the energetic frontline of a cell. It creates and maintains a cellular energy storage and at the same time enables the very fastest response to a high energy demand. Aims of this thesis were to thoroughly describe the creatine kinase system, its role in the energy metabolism and metabolism of creatine molecule itself. As a popular nutritional supplement, there was an emphasis on creatine's impact on the physiology of skeletal muscle and also its higher intake. Furthermore some of the creatine-related disorders were described, as well as research of their treatment. Lastly, the branch-chained amino acids were researched for possible synergic effect with creatine, connection between these two was found through the mTOR signalling pathway.

Obsah

1	Úvod a cíle práce	8
2	Kosterní sval	9
2.1	Nervosvalová ploténka	9
2.2	Mikroskopická a molekulární stavba kosterního svalu	10
2.3	Fenotypy kosterního svalu	11
2.4	Mechanismus kontrakce svalu	12
3	Kreatin	13
3.1	Izoformy kreatinkinázy	14
3.2	Kreatinkinázový systém v kosterním svalu	16
3.3	Změna fenotypu kosterního svalu	17
3.4	Syntéza kreatinu	18
3.5	Kreatinový transportér	20
3.6	Přirozený příjem a suplementace kreatinu	21
3.7	Suplementace kreatinu	22
3.8	Primární poruchy nedostatku kreatinu	23
3.9	Další vlastnosti kreatinu	24
4	BCAA	25
4.1	Metabolismus BCAA	25
4.2	mTOR	27
5	Diskuze a závěr	28
6	Seznam použité literatury	29

Seznam zkratek

ADP	adenozindifosfát (adenosinediphosphate)
AGAT	arginin-glycin aminotransferáza (arginine:glycine aminotransferase)
AMK	aminokyseliny
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkináza (AMP-activated protein kinase)
ATP	adenozintrifosfát (adenosinetriphosphate)
BCAA	aminokyseliny s větveným řetězcem (branch-chained amino acids)
BCAT	transferáza kyslin s rozvětveným řetězcem (branch-chained aminotransferase)
BCKA	α -keto kyseliny (branch-chained α -keto acids)
BCKDH	dehydrogenáza α -keto kyselin (branch-chained α -keto acid dehydrogenase)
CK	kreatinkináza (creatin kinase)
CKB	mozková cytosolická kreatinkináza (cytosolic brain creatine kinase)
CKM	svalová cytosolická kreatinkináza (cytosolic muscle creatine kinase)
CNS	centrální nervový systém
Cr	kreatin (creatine)
CrT	kreatinový přenašeč (creatine transporter)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GAA	guanidoacetát (guanidoacetate)
GAMT	guanidoacetát metyl transferáza (guanidoacetate methyltransferase)
H-MRS	protonová magnetická rezonanční spektrometrie (proton magnetic resonance spectrometry)
KO	Knock-out organismy
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MyHC	těžké řetězce myozinu (myosine heavy chains)
PCr	kreatinfosfát (phosphocreatine)
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SAH	S-adenosylhomocystein
SAM	S-adenosylmethionin
sMtCK	sarkomerická mitochondriální kreatinkináza (sarkomeric mitochondrial creatinekinase)
uMtCK	ubiquitinová mitochondriální kreatinkináza (ubiquitinous mitochondrial creatinekinase)
TMG	trimethylglycin
SLC6A8	solute carrier family 6, member 8

1 Úvod a cíle práce

Kreatin je v současné době jeden z nejpoužívanějších a také nejvíce testovaných výživových doplňků. Jak na českém, tak na zahraničním trhu je velmi dobře dostupný a v nemálo sportovních odvětvích si za svou dobu existence získal velkou oblibu. Právě z toho důvodu jsem si vybral toto téma. Je mi blízké, jelikož jsem sám již několik let uživatelem kreatinu ve formě suplementu s cílem dlouhodobého posílení mého sportovního výkonu.

V této práci se budu zabývat fyziologickými účinky látky kreatinu na svalovou tkáň. Cílem práce je v rozsáhlém měřítku popsat a popsat, jaké všechny úlohy tato relativně malá a jednoduchá molekula v lidském těle plní, jak vitálně důležitou roli zastupuje celý kreatinkinázový systém. Detailně rozeberu metabolismus kreatinu, jeho přenašeč a transport přes buněčnou membránu. Dále se budu zabývat tím, čeho lze či nelze dosáhnout nadměrným příjmem a jaký příjem je ideální.

V úvodní části nejdříve obecně představím příčně pruhovanou svalovou tkáň a mechanismus svalové kontrakce. V další kapitole rozeberu hlavní význam kreatinu a jeho mnohočetnou úlohu v energetickém bilancování na úrovni jednotlivých buněčných struktur jakožto kreatinkinázový systém. Dále bude vysvětlena syntéza vlastní zásoby kreatinu v těle, jeho transport a regulace. Dalším tématem budou externí zdroje, ať už přirozené nebo formou suplementace. Následovat bude velká kapitola o poruchách spojených s chybami v syntéze kreatinu a jejich projevech u malých dětí. V poslední části zmíním též další podobně známý suplement – větvené aminokyseliny a jejich možný synergický účinek s kreatinem.

2 Kosterní sval

Kosterní svalovina tvoří přibližně 40 % hmotnosti lidského těla. Její hlavní funkcí je pohyb, přičemž dochází k přeměně energie uložené v chemických vazbách na energii mechanickou. Na svém povrchu jsou svaly kryty obalem z kolagenního vaziva zvaným fascie (povázka). Základní stavební jednotkou kosterního svalu je svalové vlákno. Ta se dále organizují do snopců, které – zavzaty do fascie – tvoří sval. Svalová vlákna vznikají během nitroděložního vývoje splýváním prekurzorových kmenových buněk – myoblastů. Vzniká tak poměrně jedinečná struktura zvaná syncytium (česky soubuní), která v rámci jedné cytoplasmy může obsahovat až několik set jader.

Řízení pohybu svalových vláken se děje prostřednictvím motorické jednotky. Jedná se o soubor svalových vláken, která jsou ovládána jedním neuronem. Jeden motoneuron prostřednictvím svého axonu (odstředivého výběžku) řídí 10-20 svalových vláken. Na konci každého axonu se nacházejí terminální výběžky, z nichž každý vede právě k jednomu svalovému vláknu. Rozhraní terminálního výběžku a svalového vlákna se nazývá nervosvalová ploténka. ⁽¹⁾⁽²⁾

2.1 Nervosvalová (motorická) ploténka

Motorická ploténka je z jedné strany tvořena cytoplazmatickou membránou nervového zakončení (presynaptická membrána) a na straně druhé buněčnou membránou svalového vlákna (postsynaptická membrána). Mezi nimi se nachází synaptická štěrbina. Dojde-li k depolarizaci na membráně nervového vlákna a ta dorazí až k presynaptické membráně, uvolní se do synaptické štěrby neurotransmiter acetylcholin, který se naváže na své receptory na postsynaptické membráně. Ta je taktéž depolarizována, vzruch se pomocí výběžků cytoplasmatické membrány šíří až do nitra svalového vlákna, kde přeskočí na membránu cytoplasmatického retikula, z nějž se uvolní kalciové ionty a dochází ke spuštění mechanismu svalové kontrakce. ⁽¹⁾⁽²⁾

2.2 Mikroskopická a molekulární stavba kosterního svalu

Svalové vlákno je základní svatební jednotkou kosterního svalu. Délka vlákna se pohybuje od 1mm až po několik centimetrů a jeho průřez může být 10 až 100 μm . Mimo samotného funkčního aparátu tvořeného molekulárními motory obsahuje také buněčné jádro a organely zajišťující syntetické a metabolické funkce. Jádro je ve svalovém vlákně uloženo periferně, jelikož centrálně se nachází kontraktilní aparát. Sarkoplasmatické retikulum – svalová varianta cytoplasmatického retikula – mimo proteosyntézy slouží také jako zásobárna vápenatých iontů, které jsou nezbytné pro fungování svalové kontrakce. Obal vlákna tvořený plazmatickou membránou, bazální laminou a sítí retikulárních vláken se nazývá sarkolema.

Sarkolema vysílá centrálně výběžky nazývané T-tubuly, které se napojují na systém kanálků uvnitř vlákna. Tyto výběžky slouží k rychlému převodu akčního potenciálu na cisterny sarkoplasmatického retikula, což má za následek rychlé a rovnoměrné vylití kalciových kationtů do sarkoplasmy a rovnoměrnou kontrakci celého aparátu.

Mimo kontraktilního aparátu a organel obsahuje sarkoplasma další významné složky. Myoglobin je bílkovina strukturou i funkcí podobná krevnímu hemoglobinu. Ve svalu funguje jako krátkodobý zdroj kyslíku a podmiňuje jeho červenou barvu. Dále zde nalezneme molekuly významné pro energetický metabolismus svalu: shluky glykogenu jako krátkodobý zdroj energie a kapénky triglyceridů pro oxidativní fosforylaci. Okamžitě využitelnou energii ve formě makroergních vazeb poskytují ATP a kreatinfosfát.

Kontraktilní aparát je tvořen myofilamenty. Ta, seřazená vedle sebe, se skládají do větších celků válcovitého tvaru – sarkomer a v řadě za sebou zapojené sarkomery tvoří myofibrily, které vyplňují většinu sarkoplasmy. Polymery proteinů aktinu a myozinu jsou hlavní stavební složkou myofilament.

Aktinové filamentum se skládá z F-aktinu, troponinu a tropomyozinu. F-aktin je polymer globulárního G-aktinu ve tvaru pravotočivé šroubovice. Tu ovíjí (taktéž fibrilární) tropomyozin, který na sebe váže troponin. Troponin má 3 podjednotky: TnT se přímo váže na tropomyozin, TnC váže vápenaté ionty a TnI zakrývá vazebné místo pro myozin na F-aktinu, pokud není na troponinu navázán iont vápníku.

Myozin je fibrilární protein s globulárními hlavičkami. Ty mohou měnit svou konformaci, potřebují k tomu však energii z makroergní vazby molekuly ATP, kterou štěpí na ADP a

fosfát. Hlavička myozinu se váže na vazebné místo na F-aktinu, není-li překryto TnI podjednotkou troponinu. ⁽¹⁾⁽²⁾

2.3 Fenotypy kosterního svalu

Rozlišujeme 3 typy vláken kosterní svaloviny:

Typ I – pomalé oxidativní vlákno je označováno také jako červené svalové vlákno pro svůj vysoký obsah myoglobinu, husté zásobení krevními kapilárami a velký počet mitochondrií. Nalezneme v nich také lipidové částice jakožto zdroj energie. Sarkoplasmatické retikulum je však méně vyvinuté. Tento typ vláken má vysokou oxidační kapacitu, díky čemuž se uplatňuje zejména při méně intenzivních vytrvalostních výkonech.

Typ II B – rychlé glykolytické vlákno, neboli bílé svalové vlákno na rozdíl od předešlého obsahuje málo myoglobinu i mitochondrií a také síť kapilár není tak četná. Oxidační kapacita je malá, naopak glykolytická aktivita je vysoká. Charakteristickou vlastností tohoto vlákna je tedy rychlá a silná kontrakce maximální intenzity za cenu rychlé únavy svalu. Převažuje anaerobní metabolismus.

Typ II A – oxidativně-glykolytické vlákno je kombinací předešlých fenotypů. Obsah myoglobinu je nízký, avšak počet mitochondrií je vysoký a kapilární zásobení bohaté. Disponuje vysokou glykolytickou a střední oxidační kapacitou. Tato metabolická výbava svalu umožňuje rychlou kontrakci se středně dlouhou dobou do vyčerpání a vlákno je schopno využít energii získanou aerobním i anaerobním způsobem. ⁽¹⁾⁽²⁾

2.4 Mechanismus kontrakce svalu

Jde o vzájemné posouvání aktinových a myozinových filament mezi sebou. V místě motorické ploténky dojde k přenosu akčního potenciálu na buněčnou membránu svalového vlákna a dojde k depolarizaci. Vzruch se šíří pomocí T-tubulů k cisternám sarkoplasmatického retikula, dojde k otevření napěťově řízených vápníkových kanálů a influxu vápenatých kationtů do sarkoplasmy. Uvolněné ionty Ca^{2+} se naváží na TnC podjednotku troponinu, čímž dojde ke změně jeho konformace a TnI odhaluje vazebné místo pro myozin. Hlavička myozinu se naváže. V klidovém stavu hlavička vůči zbytku proteinu zaujímá kolmou pozici. Po navázání na aktin se však změní její konformace a úhel mezi globulární a fibrilární složkou myozinu se zmenší na 45 stupňů, současně za rozštěpení molekuly ATP na ADP a fosfát, čímž myozin spotřebuje její energii. Aktin se tím posune o 8nm vpřed. ADP se vyváže z hlavičky myozinu a naváže se nová molekula ATP. Tím se myozin odpojí z vazby na aktin a hlavička zaujme opět svou původní kolmou konformaci. Kontrakce končí opětovným odčerpáním molekul Ca^{2+} ze sarkoplasmy zpět do sarkoplasmatického retikula aktivním transportem za spotřeby ATP. Ionť vápníku se vyváže z troponinu, ten zaujímá klidovou konformaci a vazebné místo pro myozin na F-aktinu se zakrývá. ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

3 Kreatin

Kreatin (z řeckého „kreas“ – maso) je molekula (N-methylguanidinoctová kyselina) vyskytující se v těle živočichů přirozeně a je také přirozeně syntetizována. Je to dusíkatá organická kyselina, která dokáže vázat zásobní fosfát a poskytnout jej buňkám v případě potřeby. Nachází se v určitém množství ve většině buněk obratlovců, zdaleka největší koncentrace je však v kosterním svalstvu, ve svalu srdečním a v centrální nervové soustavě. Kreatin je v těle ukládán ve dvou formách – volný kreatin – *Obr. 1* (Cr – creatine) a kreatinfosfát – *Obr. 3* (PCr – phosphocreatine) s navázanou fosfátovou skupinou. Přechod mezi těmito formami v obou směrech reguluje enzym kreatin kináza (CK – creatine kinase), jejíž izoformy vytváří ve svalových buňkách vysoce účinný energetický pufr, dále jen CK systém. ⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾

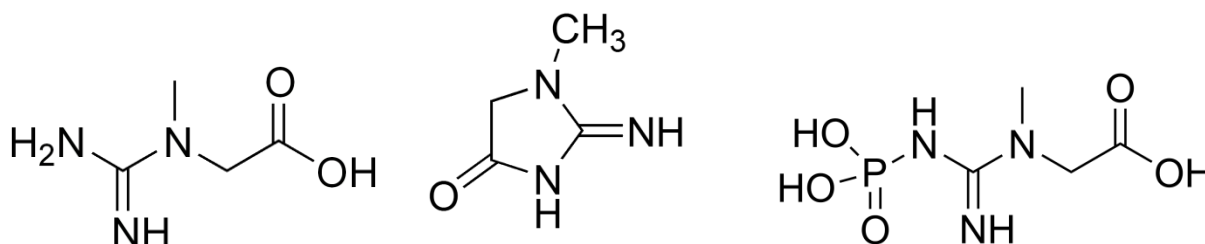
Sacharidy poskytují tělu rychle dostupnou energii v anaerobním prostředí (tedy za nedostatku kyslíku) pracujících rychlých svalů při vysoké tělesné aktivitě, tuky naopak dodávají trvalejší formu energie při dostatečném přísunu kyslíku (nízká tělesná aktivita). Sacharidy, tuky (a ketony) jsou katabolizovány primárně k produkci ATP (adenosintrifosfát). Hydrolýza molekuly ATP uvolňuje energii z její makroergní vazby, odštěpí se jí fosfát a vzniká tak ADP (adenosindifosfát) a vodíkový proton, který lokálně okyseluje prostředí. Kreatinfosfát následně nastupuje jako donor fosfátové skupiny a současně spotřebovává vodíkové protony, tím lokálně regeneruje ATP a udržuje pH na fyziologických hodnotách v následující enzymatické reakci:



K tomuto jevu dochází při akutní i dlouhodobě zvýšené potřebě energie v buňkách a jedná se o nejrychlejší proces doplňování buněčné energie, proto se CK systém nazývá časovým energetickým pufrem.

Kreatin kináza, jakožto základní enzym tohoto systému, katalyzuje přechod mezi kreatinem a kreatinfosfátem oboustranně. Záleží tedy na konkrétní potřebě, energetickém stavu buňky, izoformě a převážně její lokalizaci. Během klidového, anabolického stavu CK doplňuje zásobní pool PCr. Vysoký poměr PCr/Cr na počátku intenzivní svalové zátěže udržuje vysoký poměr ATP/ADP ve svalu, tím zvyšuje kontraktilitu svalu a udržuje vysoký potenciální silový výkon do okamžiku, než se plně aktivuje glykolýza a případně oxidativní fosforylace.

Samozřejmě kosterní sval není jediná excitabilní tkáň, ve které CK systém operuje. Všechny systémy, ve kterých dochází k velké fluktuaci energetických potřeb CK systém využívají – dále zejména srdeční sval a mozek. Předpokládá se, že suplementací kreatinu dochází ke zvýšení jeho hladiny ve všech těchto buňkách, avšak 95% ze zásoby kreatinu v těle najdeme ve svalech. ⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽¹⁰⁾⁽⁷⁰⁾



Obr. 1: Molekula kreatinu⁽⁵¹⁾ Obr. 2: Molekula kreatininu⁽⁵²⁾ Obr. 3: Molekula fosfokreatinu⁽⁵³⁾

3.1 Izoformy kreatinkinázy

Kreatinkináza (EC 2.7.3.2) se v těle vyskytuje ve čtyřech izoformách, odvozených od jejich lokalizace v buňce – dvě mitochondriální a dvě cytosolické:

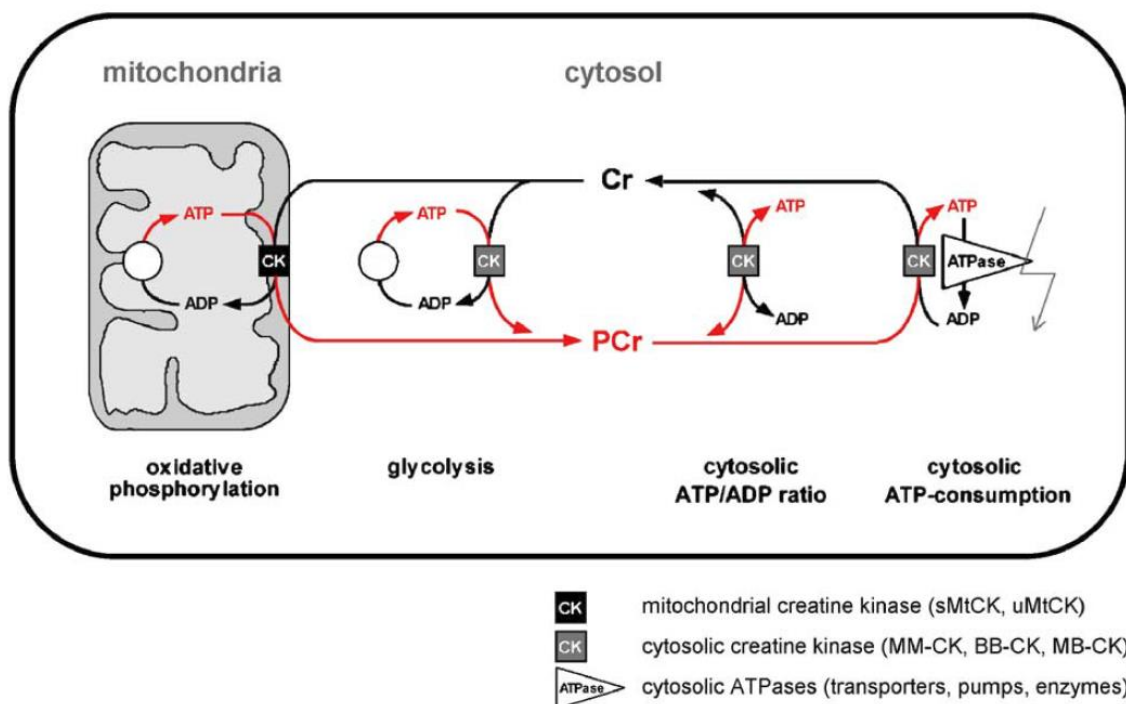
sMtCK (sarcomeric mitochondrial creatine kinase) se nachází v příčně pruhované svalovině buď ve formě dimeru (mezimembránový prostor a krysty mitochondrií) nebo oktameru (kontaktní místa s vnější či vnitřní mitochondriální membránou). Je produkována genem CKMT2, který je 37 kb dlouhý, obsahuje 11 exonů a nachází se v 5q14.1. ⁽⁶⁾

uMtCK (ubiquitous mitochondrial creatine kinase) má stejné rozložení dimerů a oktamerů v mitochondriích, vyskytuje se však i v ostatních buňkách mimo svaly, například v mozku či ledvinách. Gen s názvem CKMT1B o velikosti 5,5 kb s 9 exony je lokalizován v 15q15.3. ⁽⁷⁾

CKM (cytosolic muscle creatine kinase) je obsažen v cytoplasmě svalových buněk jako homodimer CKMM. Genem je stejnojmenný CKM – 22 kb, má 8 exonů a je umístěn v 19q13.32. ⁽⁸⁾

CKB (cytosolic brain creatine kinase) opět obdobně tvoří dimery CKBB, avšak výhradně v neuronech. Je produktem genu CKB, dlouhým 22 kb s 8 exony a pozicí v 14q32.32. ⁽⁹⁾

Cytosolické a mitochondriální CK spolu v energetickém metabolismu úzce spolupracují, jejich kompartmentalizace však má své opodstatnění. V základu se oba tyto izoenzymy mohou podílet na tvorbě zásobního poolu PCr v buňce, který brání rychlému poklesu celkové koncentrace ATP. Nicméně tvoří s různými buněčnými strukturami tzv. mikrokompartmenty, kde dochází k jejich přímému spřažení s lokálním poměrem ADP/ATP. Mohou být spjaty buď s procesy získávání ATP - oxidativní fosforylace v mitochondriích a glykolýza v cytosolu, kde tedy cíleně poměr ATP/ADP snižují, aby došlo ke stimulaci těchto procesů. Naopak asociace CK s ATPasou má za následek lokální zvýšení ATP/ADP poměru a tím pádem i zvýšení aktivity dané ATPasy. Některé CK se také mohou vyskytovat v cytosolu v solubilní formě, nezávislé na dalších buněčných strukturách, přičemž upravují ATP/ADP poměr globálně. Důležitým faktorem je také to, že molekula PCr snáze a rychleji difunduje buňkou než větší molekula ATP. Na základě tohoto propojení míst tvořících energii a míst, které energii vyžadují, hovoříme o tzv. „energy shuttle“ nebo „energy circuit“.⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽¹⁰⁾



Obr. 4: Kompartmentalizace CK systému (převzato z cit.⁽⁴⁾)

3.2 Kreatinkinázový systém v kosterním svalu

Rozvoj a organizace kreatinkinázového systému je úzce spjat s dozráváním svalových vláken, které je doprovázeno vytvářením složité ultrastruktury a souvisí s fenotypem kosterního svalu.

Aktivita CK v kosterním svalu potkana je v prenatálním období až o jeden řád vyšší než v srdci a začíná se zvyšovat již před narozením. V prenatálním období se zhruba ve 13. dni (u myši) objevuje CKB izoforma v dimeru CKMB, který dosahuje maxima v době narození. V postnatálním období dochází k poklesu exprese CKB a nárůstu exprese CKM. Ve zralém svalu nebyla CKB po dvou týdnech postnatálního vývoje již detekována a dominantní cytosolickou izoformou se stává CKM. S nárůstem exprese CKM koreluje nárůst kreatinu ve svalu, avšak bylo zjištěno, že tyto dva procesy jsou nezávislé. Zajímavé je, že kreatin byl prokázán jako regulátor exprese MyHC (myosin heavy chain) a tedy přímo koreluje s fenotypem kosterního svalu. ⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽¹¹⁾⁽¹³⁾

Uvedené nálezy ukazují na určitou synchronizaci exprese MyHC, organizace myofibril a ustavení kreatinkinázového systému. Později tato hypotéza nachází oporu v časově synchronizované aktivaci transkripčních faktorů pro MyHC a CKM, a navíc se ukázalo, že některé transkripční faktory jsou společné.

Fenotyp kosterních svalů se formuje po narození, kdy se poly-neurální inervace svalových vláken mění na mono-neurální, a následně se diferencují základní dva typy nervové stimulace, tonická a fázická. U tonické stimulace probíhá soustavná aktivace svalu s nízkou frekvencí akčních potenciálů a následkem toho je hladina Ca^{2+} iontů v cytoplazmě stabilně mírně zvýšena. Vytváří se pomalé motorické jednotky, které dávají vznik pomalému fenotypu svalu, který je odolný k únavě (slow, fatigue resistant). U fázické stimulace se střídají periody vysoké frekvence akčních potenciálů s klidovou fází, což vede k výrazným výkyvům v koncentraci intracelulárního Ca^{2+} iontů (ke střídání fází s vysokou a klidovou koncentrací Ca^{2+} iontů). A zde se později rozlišují dva typy motorických jednotek na rychlé a střední, v závislosti na době trvání svalové zátěže. Rychlé motorické jednotky mají časově velmi omezenou aktivitu s velmi vysokou frekvencí a dávají vznik rychlému fenotypu svalu, který se snadno unaví (fast fatiguable). Střední motorické jednotky mají vzruchovou aktivitu poněkud nižší, avšak s delším trváním, a dávají vznik rychlému fenotypu svalu, který je odolný k únavě (fast, fatigue resistant). ⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽⁶⁹⁾

Podstata odlišného fenotypu svalu je v expresi odlišných izoform těžkých řetězců myozinu (MyHC; gen Myh) a dalších proteinů určujících časový průběh excitace, kontrakce a relaxace inervovaného svalového vlákna. Isoformy MyHC se liší v ATPázové aktivitě, která určuje rychlost kontrakce a tomuto požadavku je přizpůsoben energetický metabolismus svalového vlákna. ⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽⁶⁹⁾⁽⁷⁰⁾

3.3 Změna fenotypu svalu

Existuje více vnějších i vnitřních podnětů, které mohou ovlivnit fenotyp svalu v rozsahu, který umožňuje jeho genetické vybavení. Základní funkce svalu je pohyb a jeho fenotyp můžeme měnit mírou a kvalitou zátěže. Naproti tomu zcela jiným způsobem sval ovlivníme, pokud zátěž poklesne na minimum, anebo ji zcela vyloučíme. Ke studiu těchto stavů se používá model nezátíženého svalu, v anglické literatuře popsáný jako „unload muscle“ či „bed rest“. Jedná se o nezátížený, či denervovaný sval, který se posouvá do rychlého (glykolytického) fenotypu. Mohou probíhat i atrofické změny také směrem k rychlému fenotypu zralého svalu, které se následně prohlubují až do embryonálních izoform MyHC. Jak bylo ukázáno u výrazné atrofie tj. u poklesu svalové hmoty o 50% během 2 týdnů, s následným zpomalením, kde došlo ke vzrůstu exprese u fetálních izoform. Současně došlo též k dezorganizaci ultrastruktury a snížení efektivity přenosu Ca^{2+} iontů i vysokoenergetického fosfátu, což je podobné obrazu svalu ve vývoji. ⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾

Fenotyp svalu lze měnit, vedle nervové stimulace, i elektrickou stimulací. Chronická elektrická stimulace s nízkou frekvencí podpořila rozvoj pomalého fenotypu v průběhu působení po dobu 1-3 měsíců. Pomalá nervová i elektrická stimulace aktivuje transkripci pomalých izoform MyHC přes kalcineurinovou dráhu.

Neméně významnými faktory, ovlivňujícími fenotyp svalu, jsou změny hladin hormonů, které se výrazně mění po narození, ale i v průběhu života za fyziologických a patologických stavů. Ke změně ve směru k pomalému fenotypu dochází v hypothyroidních stavech. Naproti tomu hypertyroidní stav, či zvýšená beta-adrenergní stimulace (oxidativní, glykolytická, hypertrofie) vedou k posunutí fenotypu svalu do rychlých izoform. Je podstatné zmínit, že posun je vždy realizován k nejbližší isoformě MyHC dle ATPázové aktivity. Naproti tomu androgeny zvyšují syntézu svalových proteinů a potlačují tvorbu tukových buněk, a tím podporují spíše hypertrofii vláken. ⁽²¹⁾⁽²²⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾

Neopomenutelnými faktory je dostatečná dostupnost kyslíku a substrátu, které spolu se svalovou zátěží aktivují metabolické senzory jako je AMPK, mTOR a MAPK, které spíše než fenotyp vlákna ovlivňují jeho průměr. Velmi zajímavé jsou nálezy, které ukazují, že sval má paměť a výživa v období růstu předurčuje jeho kondici v dospělosti. Preferovaný substrát pomalých oxidativních vláken je laktát, mastné kyseliny, naproti tomu rychlá vlákna jsou více závislá na zásobách PCr a preferují glukózu jako substrát, laktát naopak produkují. To vytváří jistou výhodu v udržení dlouhodobého výkonu smíšeného svalu, kde produkovaný laktát může být okamžitě utilizován oxidativními vlákny aniž by se dostával dále do krevního oběhu. V anabolickém účinku testosteronu se podílejí obdobné signální dráhy (mTOR Akt) a jejich aktivace zabraňuje atrofii myoblastů. Kreatin, v kombinaci se silovým tréninkem také mimo jiné hraje roli v aktivaci satelitních buněk a zvýšení jejich počtu v kosterním svalu. (25)(26)(27)(28)(29)(69)(70)

3.4 Syntéza kreatinu

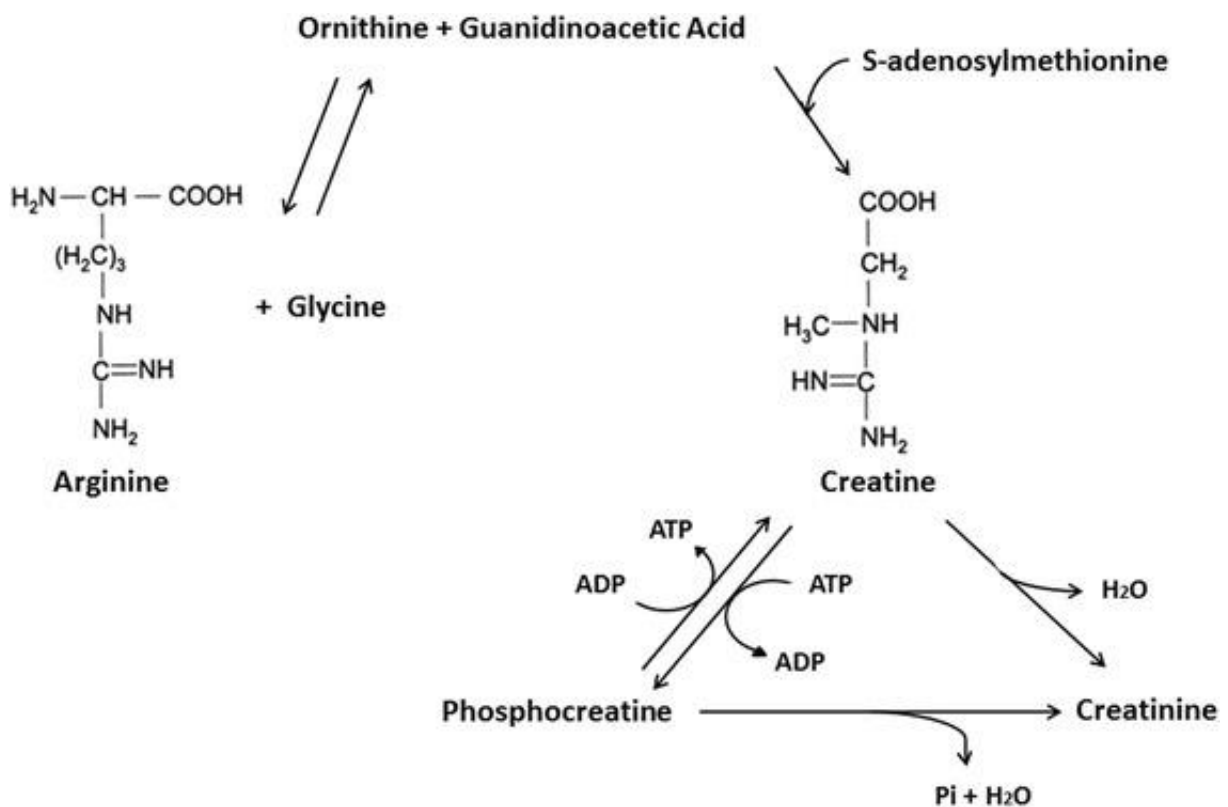
Kreatin tělo získává přímou syntézou, anebo ze stravy bohaté kreatinem.

Syntéza kreatinu v těle probíhá následovně: v prvním kroku dvě aminokyseliny – glycin a arginin za pomoci enzymu AGAT (Arginine:Glycine amidinotransferase) společně vytvoří ornithin a guanidoacetát (GAA). Druhého kroku se účastní enzym GAMT (Guanidoacetate methyltransferase) – guanidoacetát přijímá methylovou skupinu od S-adenosylmethioninu (SAM) a vzniká S-adenosylhomocystein (SAH) a kreatin. Tato reakce spotřebovává velkou část methylových skupin, které jsou tělu k dispozici (SAM je primární methylový donor v lidském těle) – uvádí se, že v závislosti na více faktorech to může činit i více než polovinu. První reakce je zpětně regulována nadbytkem kreatinu přijímaným v potravě. Čili při zvýšeném příjmu kreatinu dochází k jevu, kdy jeho vlastní biosyntéza je potlačena (dochází k poklesu hladin obou prekurzorů o 30-50%), tím pádem nejsou tak velké nároky na methylové skupiny a ty mohou místo toho být využity ve větší míře v jiných procesech zahrnujících metylaci (syntéza fosfatidylcholinu, adrenalinu, noradrenalinu, DNA či RNA). Nepřímo a v menší míře jsou tímto také evokovány další benefity zvýšené hladiny SAM, např. snížení hladiny homocysteinu. Jako případný další donor methylových skupin a samostatný suplement se používá trimethylglycin (TMG), též známý jako betain. U myši bylo navíc s příjmem kreatinu v tomto smyslu zjištěno snížení rizika ukládání tuku v játrech, zatím se však nepodařilo reprodukovat podobné signifikantní výsledky i u lidí. (46)(10)(30)(31)(32)

AGAT (EC 2.1.4.1) je lokalizována nejvíce v ledvinách. Vyskytuje se dvou lehce odlišných izoformách, konkrétně v mezimembránovém prostoru mitochondrií (monomer 386 amk), a v menším množství v cytoplasmě (monomer 391 amk). Obě izoformy jsou produkovány genem GATM, výsledné molekuly vznikají alternativním sestřihem. GATM gen má velikost 17 kb, obsahuje 9 exonů a jeho chromozomové umístění je 15q21.1. ⁽³³⁾

Enzym GAMT (EC 2.1.1.2) se vyskytuje v největší míře v játrech, kde tedy hlavně probíhá syntéza kreatinu v těle. Jedná se opět o monomer (236 amk), tentokrát pouze v cytoplasmě. Jeho stejnojmenný gen čítá 5 kb, 6 exonů a nachází se v 19p13.3. ⁽³⁴⁾

Oba enzymy byly v menším množství izolovány i ze slinivky břišní a vyskytují se rovněž v centrální nervové soustavě. ⁽¹⁰⁾⁽³⁰⁾⁽³¹⁾⁽³²⁾



Obr. 5: Syntéza kreatinu ⁽⁵⁴⁾

3.5 Kreatin transportér

Přenos kreatinu z krve do buněk umožňuje membránový přenašeč CrT (CRTR, CreaT, CT1). Patří do rodiny Na⁺/Cl⁻ dependentních neurotransmitterových přenašečů – SLC6A8 (solute carrier family 6, member 8). Je kódován genem v lokusu Xq28 na lidském X chromozomu, a exprimován je krom kosterního svalstva a srdečního svalu hojně také v mozku, ledvinách a varlatech. Obdobná varianta přenašeče (98% homologie) byla zjištěna v regionu 16p11.1, ten je exprimován výhradně ve varlatech. Elektroforézou byly zjištěny dva proužky, čili dva proteiny o rozdílných molekulových hmotnostech 55 kDa a 75 kDa, později bylo prokázáno, že se jedná pouze o nematurovanou formu a maturovanou formu, která prošla glykosylací. Ve svalových buňkách se přenašeč nachází na sarkolemě, v ostatních buňkách na cytoplasmatické membráně. ⁽⁴¹⁾⁽³⁶⁾⁽³⁹⁾

Regulace přenašeče CrT probíhá na několika frontách. Obecně jakýkoli buněčný stres pozitivně reguluje CrT skrze sérum-glukokortikoidní kinázy (SGK1 a SGK3). Tyto kinázy jsou stimulovány mnoha faktory – aktivitou Ca²⁺ iontů v buňce, glukokortikoidy, mineralokortikoidy, nedostatkem kyslíku nebo růstovým faktorem TGF-β. Vzhledem k tomu, že jsou stimulovány také ischemií, je spekulováno o efektu zvýšení aktivity CrT při svalové kontrakci (společně taky se stimulací ROS). Dále tyto kinázy stimuluje mTOR, a sice konkrétně přes další kaskádu dějů: mTOR stimuluje SGK1, ta fosforyluje další kinázu PIKfyve (phosphatidylinositol-3-phosphate-5-kinase + FYVE zinc finger) k produkci PI(3,5)P2 (phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate), který již přímo působí na CrT. Růstový hormon též pozitivně reguluje CrT, ale jinou dráhou – fosforylací tyrosinové kinasy c-Src. Jako velmi dobrý stimulant CrT se jeví cvičení samotné – byly pozorovány velké rozdíly absorpce kreatinu v porovnání mezi cvičící (64%) a necvičící (14%) končetinou. Důležitým inhibítorem CrT je AMPK (AMP-activated protein kinase) – kináza dohlížející na energetický stav buňky. Aktivuje se při sníženém poměru ATP/AMP, kdy příjem dalšího kreatinu z krve by byl zbytečný a tak aktivovaná signální dráha mTOR inhibuje aktivitu CrT a omezuje přenos kreatinu do nitra buňky. ⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾

Běžná hladina kreatinu v krevním séru u lidí se pohybuje v rozmezí 100-200 μM, po požití kreatinu se zvyšuje již během první hodiny na 600 μM (5g cr) až 2000 μM (20g cr). Ideální množství přijatého kreatinu bylo stanoveno na cca 5g v jedné dávce vzhledem k omezené rychlosti vstřebávání do svalových buněk a jejich saturaci. Svalová koncentrace se po konzumaci zvyšuje o 15-20%. Zde ovšem nutno poznamenat, že určitá část lidí se řadí mezi

tzv. creatine non-responders, kdy jejich hladina kreatinu ve svalech po suplementaci vzrůstá jen o 10mM a méně. Nárůst o 20 mM a více už se považuje za creatine response. Běžný celkový obsah kreatinu v těle u průměrného 70 kg dospělého muže činí přibližně 120 g. Zásoba kreatinu v těle je striktně omezena, její maximum je možné zvětšit pouze s narůstající svalovou hmotou. Tělo je schopno uložit mnohem více energie ve formě glykogenu (játra, svaly, mozek) a ještě více formě tuku. ⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾

3.6 Přirozený příjem kreatinu

Ve stravě se kreatin nachází zejména v potravinách vyrobených zpracováním svalové tkáně – konkrétně nejvyšší hladinu kreatinu obsahuje libové hovězí maso (4,5-5,5 g/kg), kuřecí maso (3,4 g/kg) a králičí maso (3,4 g/kg). Dále se kreatin vyskytuje samozřejmě v dalších masitých produktech, v játrech, ledvinách a vejcích, a v malém množství i v mléku. Běžné průměrné hodnoty kreatinu přijatého v potravě (u člověka bez jakýchkoli dietních omezení jako vegetariánství a podobně) činí cca 1 g za den a lidské tělo bez suplementace nasyntetizuje denně přibližně 2 g. ⁽⁴²⁾⁽⁴³⁾

U vegetariánů a veganů s minimálním (nebo žádným) příjmem kreatinu v potravě je příjem ve formě doplňků doporučován, aby se předešlo případným potížím plynoucím z jeho nedostatku. Masitá potrava je také jediným přirozeným zdrojem další látky – L-Carnitinu, který hraje roli v energetickém metabolismu mitochondrií. Situace je podobná jako s kreatinem, L-Carnitin je též do určité míry v těle syntetizován, není to však dostatečné množství.

Byla zjištěna jistá korelace mezi veganstvím a vegetariánstvím a četnějším výskytem různých úzkostných poruch a depresí. Do jaké míry tyto statistiky souvisí s hladinou kreatinu, není zcela jasné, je však bez debat, že jeho dostatečná hladina je důležitá pro správnou funkci svalů, srdce i CNS. Z výsledků různých studií vyplývá, že hladina kreatinu má jistý význam u duševních onemocnění. ⁽⁴²⁾⁽⁴³⁾⁽⁴⁴⁾

3.7 Suplementace kreatinu

Základní a nejběžnější forma kreatinu v suplementech je kreatin monohydrát (88% hmotnosti tvoří čistý kreatin, 12% je voda). Existuje mnoho dalších běžně dostupných forem kreatinu, mezi kterými se často výrobci a distributoři předhánějí v lepších vlastnostech, lepší stravitelnosti a větší efektivitě, tyto tvrzení však vesměs postrádají seriózní výzkum a studie. Jsou to např. kreatin hydrochlorid (navázaná skupina HCl), kreatin ethyl-ester, magnesium kreatin chelát, kreatin nitrát, kreatin citrát, kreatin malát, kreatin pyruvát, kreatin α -ketoglutarát a další. Většinou je jediný hmatatelný rozdíl v rozpustnosti různých forem, což pro požadovaný efekt (i pro metabolismus jako takový) nemá žádnou hodnotu, protože rozpustnost i absorpce obyčejného monohydrátu je vysoká. Některé z forem jsou dokonce náchylnější k degradaci, podobně jako kreatin distribuovaný jako vodní roztok, místo prášku. Ve vodním prostředí má kreatin omezenou stabilitu – již během několika dní dochází k degradaci na nerozpustný a odpadní produkt kreatinin. Cca 1,7% celkového obsahu kreatinu a kreatinfosfátu v těle je každý den degradováno (dochází k neenzymatické dehydrataci a cyklizaci molekuly) na kreatinin a vyloučeno močí. Kreatinin v moči je často používán jako marker při různých testech správné funkce ledvin. ⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁵⁾⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾

V práci je tedy jako suplementovaný kreatin vždy míněn kreatin monohydrát, z důvodu drtivé většiny studií používající právě monohydrát. Běžná dávka suplementu činí 5-10 g, využitelnost bývá pak 80-100%. U větších dávek byla zjištěna obtížnější vstřebatelnost. Malá část může být degradována pepsinem nebo pankreatickými enzymy – při simulovaném trávení se v pepsinu netvořil typický kreatinin, ale jiné rozpadové produkty, s pankreatickými enzymy byla pozorována zvýšená hladina kreatininu. ⁽⁴⁵⁾

Často se suplementace rozděluje na dvě fáze. První je fáze nasycovací (loading phase), kdy je příjem na 5 - 7 dní zvýšen na cca 0,3 g / kg váhy / den, rozdělen do několika dávek kvůli lepší absorpci. Při této fázi byla prokázána rychlejší saturace svalových buněk kreatinem. Fáze udržovací (maintenance phase) s příjmem cca 0,03 g / kg váhy / den je takové dostatečné množství, aby se zvýšená hladina svalového kreatinu nesnižovala. Ustálení původní hladiny po vysazení kreatinu trvá asi 30 dní. ⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾

3.8 Primární poruchy nedostatku kreatinu

Jedná se o poruchy jednoho ze dvou kroků syntézy kreatinu (respektive mutace v genech jejich enzymů) a nebo kreatinového přenašeče, načež všechny mají za následek sníženou hladinu kreatinu v kosterním svalstvu, srdci a mozku. Většina klinických projevů zahrnuje neurologické problémy – určité stupně mentální retardace, opoždění řeči, poruchy svalů nebo epilepsie. Tento fakt implikuje velmi důležitou roli kreatinu v mozku vyvíjejícího se dítěte. Krom jeho základní energetické funkce mozek přichází i o jeho antioxidační a antiapoptotické ochranné účinky. Četnost není zcela známa, odhaduje se na cca 2,7% psychomotorických retardací s neznámým původem. ⁽⁵⁵⁾⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁸⁾

Nedostatek enzymu AGAT je autozomálně recesivní dědičné onemocnění. Jeho gen, GATM je lokalizován na 15q21.1. Jde o poruchu v první reakce syntézy, tím pádem se krom nízké hladiny kreatinu v krevním řečišti (a kreatininu v moči) také objevuje nízká hladina meziprojektu GAA. Proto pouze nízká hladina kreatinu nestačí jako definitivní diagnostický marker (podobně jako i v následujících případech).

Nedostatek enzymu GAMT je také děděn autosomálně recesivně. GAMT je i název genu a nachází se na 19p13.3. Vzhledem k narušené druhé části reakce sice opět nedochází k tvorbě kreatinu, je však naopak zvýšená hladina intermediátu GAA, který je vysoce toxický pro CNS. ⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁸⁾⁽⁵⁹⁾

Diagnóza těchto poruch má několik možností, základem je určení hladiny požadovaných markerů v krvi a moči. Více vypovídající, avšak více finančně náročnou a v praxi složitější metodou je H-MRS (proton magnetic resonance spectrometry), kterou lze neinvazivně měřit konkrétní zastoupení molekul metabolismu v mozku. Dále se lze zaměřit na konkrétní podezřelý gen, a provést cytogenetické vyšetření. Je zde také možnost prenatální diagnostiky prostřednictvím amniocentézy (odběr plodové vody) nebo biopsie choriových klků.

Obě tyto poruchy vázané na syntézu se dají léčit vhodnou suplementací kreatinu, ovšem v druhém případě je léčba složitější, vzhledem k tomu že je také nutné odstranit excesivní množství toxického GAA. Toho se docílí omezením argininu a vyšším příjmem ornithinu. Z několika klinických případů vyplývá, že pokud dojde k diagnóze a nasazení relevantní léčby dostatečně brzy, dají se neurologické projevy takřka úplně odstranit. ⁽⁵⁵⁾⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁸⁾⁽⁵⁹⁾

Další možnou poruchou je nedostatek kreatinového přenašeče CrT. Tentokrát jde o pohlavně vázanou dědičnost, konkrétní lokus Xq28. Zde není narušena syntéza, tudíž nejsou nijak neobvyklé hladiny GAA, dochází však k jevu, kdy nasyntetizovaný kreatin se z krevního nemá jak dostat do cílových buněk. Výsledkem je nezvykle velký poměr kreatinu ku kreatininu v moči. Problémem zůstává léčba, kdy běžná forma kreatinu není schopná hladinu ve svalech a v CNS zvýšit.

U KO myši byly pozorovány poruchy učení a paměti. Nicméně podávání kreatinu dětem po dobu 7 dní neprokázalo významné zvýšení koncentrací v mozku ani posun kognitivních schopností. Nabízí se tedy hypotéza, že CNS je zcela závislé na vlastní syntéze kreatinu. Toto tvrzení potvrzuje i zjištění, že CrT se sice nachází na membráně kapilár v CNS, avšak astrocytům tyto receptory chybí, tudíž je prostup exogenního kreatinu do CNS minimální. Překvapivě se podařilo zmírnit symptomy nedostatku kreatinu tzv. cyklokreatinem, speciální formou, která je schopna obcházet SLC6A8 a dostat se do buňky jiným způsobem. (55)(56)(57)(58)(59)(66)(67)(68)

3.8 Další vlastnosti kreatinu

Vedle primární bioenergetické funkce má zvýšený obsah kreatinu v buňkách řadu dalších výhod. Za zmínku stojí například antioxidační účinky – kreatin přímo reaguje s některými ROS (reactive oxidant species). Jmenovitě superoxid $O_2^{\bullet-}$ (z dýchacího řetězce), peroxyinitrit $ONOO^-$ (toxický produkt oxidu dusnatého) a taky 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ABTS⁺ (chemická sloučenina používající se při měření antioxidačních vlastností nebo měření reakční kinetiky různých enzymů).⁽⁶⁰⁾

4 BCAA

Valin (Val), leucin (Leu) a izoleucin (Ile) jsou tzv. větvené aminokyseliny (branched chain amino acids), jejich postranní skupina obsahuje rozvětvený řetězec. Všechny tři se řadí mezi esenciální proteinogenní aminokyseliny, čili ty aminokyseliny, které si tělo nemůže samo vyrobit a musí je přijmout v potravě (nebo suplementu). Společně s Val, Leu a Ile se mezi esenciální řadí dále fenylalanin (Phe), lysin (Lys), tryptofan (Trp), methionin (Met) a threonin (Thr). Podíl větvených aminokyselin tvoří cca 35 – 40% z esenciálních AMK, které v těle vyskytují. Aminokyseliny se v těle vyskytují hlavně ve dvou formách – volné, rozpuštěné v krevním řečišti, tvořící tzv. aminokyselinový pool – a vázané v molekulách bílkovin. Obsah BCAA ve volném AMK poolu je relativně malý ve srovnání s obsahem v bílkovinách svalů. Svalová hmota lidí tvoří přibližně 40% celkové tělesné váhy, a 14 – 18% z toho jsou větvené aminokyseliny. ⁽³⁾⁽⁶¹⁾

4.1 Metabolismus BCAA

Pokud jsou aminokyseliny přijaty ve formě bílkovin, musí být metabolismem nejdříve uvolněny. Degradace proteinů na jednotlivé volné aminokyseliny se nazývá proteolýza a jejími hlavními enzymy jsou exopeptidázy (amino- či karboxypeptidázy, štěpící molekuly na koncích jejich řetězců) a endopeptidázy (štěpící uvnitř řetězců – trypsin, chymotrypsin a pepsin)

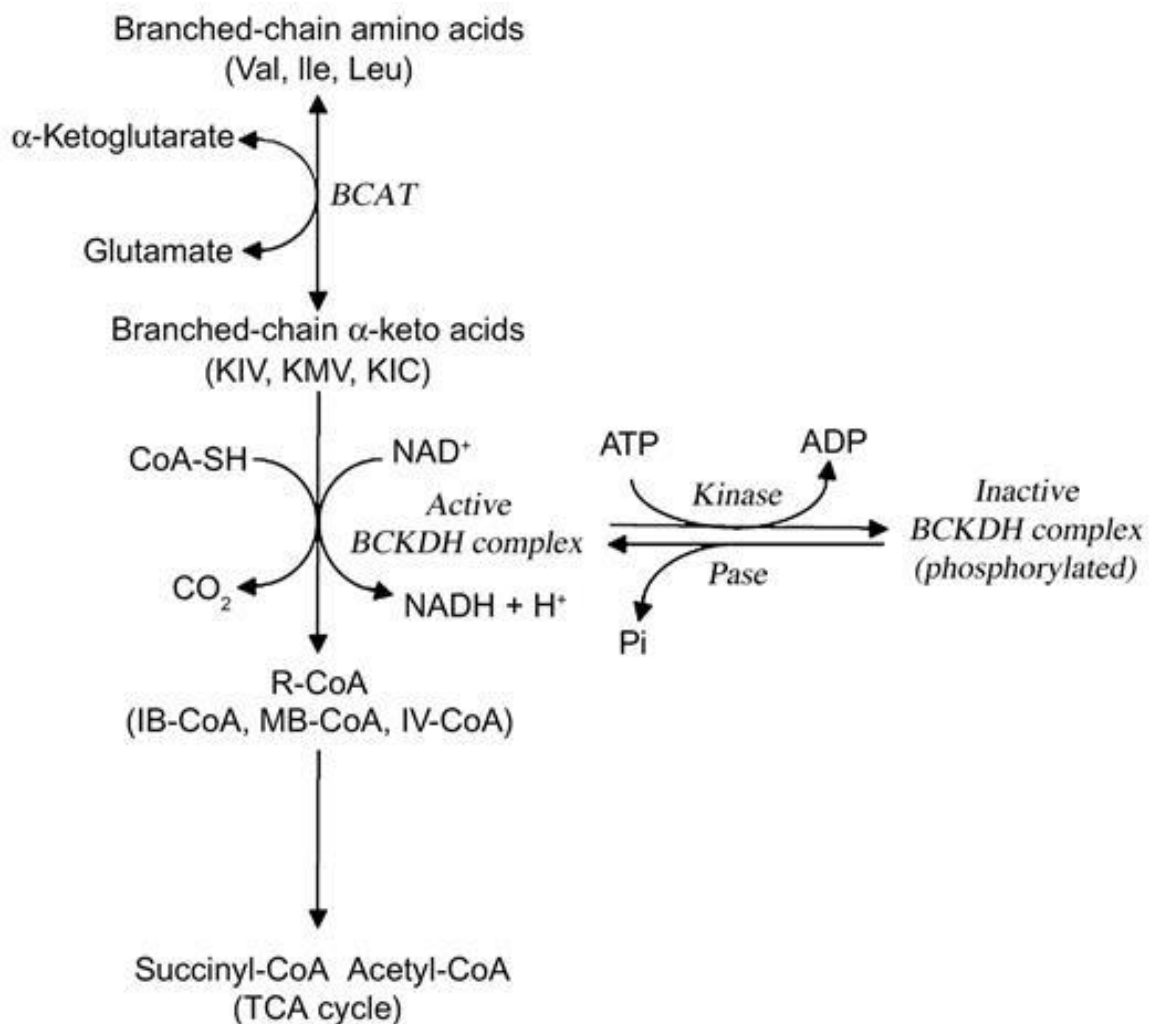
Katabolismus volných BCAA je soustředěn do mitochondrií. Vzhledem k jejich obdobné struktuře sdílí všechny tři podobný osud v jejich metabolických drahách

V prvním kroku jejich metabolismu dochází k reverzibilní transaminaci za vzniku větvených α -keto kyselin (branched chain α -keto acids – BCKA). Tuto reakci katalyzuje enzym BCAT (branched chain aminotransferase), navíc do reakce jako kofaktor vstupuje α -ketoglutarát a opouští jako glutamát.

Druhým krokem je ireverzibilní oxidativní dekarboxylace katalyzována enzymem BCKDH (branched chain α -keto acid dehydrogenase). Tento enzymový komplex se skládá ze tří podjednotek: E1 - specifická dehydrogenasa (12 heterotetramerů $\alpha_2\beta_2$), E2 - specifická transacylasa (jádro komplexu, 24-oligomer) a E3 - dihydrolipamid dehydrogenasa (6

homodimerů α 2). Tato druhá část je tzv. rate-limiting reakcí celého katabolismu BCAA – je nejvíce regulována. BCKDH kinasa inhibuje komplex fosforylací subjednotky E1 α a BCKDH fosfatasa naopak defosforylací komplex aktivuje. Oba tyto enzymy se nachází ve vysoké koncentraci v kosterním svalstvu, tudíž víme, že katabolismus BCAA probíhá výhradně zde (na rozdíl od většiny ostatních esenciálních AMK, jež jsou metabolizovány hlavně v játrech).
(61)(62)(63)

Valin	-> α -ketoisovalerát (KIV)	-> isobutyryl-CoA (IB-CoA)
Isoleucin	-> α -keto- β -methylvalerát (KMV)	-> methylbutyryl-CoA (MB-CoA)
Leucin	-> α -ketoisokaproát (KIC)	-> isovaleryl-CoA (IV-CoA)



Obr. 6: Syntéza větvených aminokyselin (převzato z cit. ⁽⁶²⁾)

4.2 mTOR

Hlavní aminokyselinou z BCAA, co se týče funkce, je leucin, díky jeho schopnosti aktivovat protein mTOR (mammalian Target of Rapamycin) a tím stimulovat proteosyntézu. mTOR se řadí do rodiny kinas (konkrétně serin/threonin kinasa) a společně s dalšími proteiny tvoří dva velké komplexy - mTORC1 a mTORC2, které oba hrají roli v proteosyntéze buněk. mTOR je krom leucinu aktivován také svalovou kontrakcí (s cca 1-2 hodinovou odezvou), inzulinem nebo obecně přebytkem kalorií. Detailní popis velkého množství signálních kaskád a metabolických drah, kterých se tento protein účastní, je nad rámec této práce - mTOR je zde zmíněn hlavně jako spojka mezi kreatinem a BCAA, čili regulací kreatinového transportéru CrT (tím pádem řízení absorpce kreatinu do buňky) a leucinovou aktivací (proteosyntéza).
(64)(65)

5 Diskuze a závěr

Kreatin bývá ve sportovní komunitě často vnímán negativně jako něco „nepřirozeného“ a špatného pro organismus. Tato látka se však nachází přesně na opačném pólu tohoto spektra – je přirozená, neboť si ji tělo každodenně vytváří dostatečnou hladinu, a problém právě nastává, když kreatin chybí. Nachází se takřka ve všech buňkách s vysokými energetickými nároky a jakožto kreatinkinázový systém (energetický pufr) plní nenahraditelnou roli ve vyrovnávání energetických bilancí. Podle konkrétních potřeb v dílčích kompartmentech buněk buď energii skladuje (PCr) anebo tuto zásobu uvolňuje (Cr + ATP), přičemž taky udržuje optimální pH v těchto místech.

Právě ve sportovním výkonu je zvýšená hladina kreatinu velmi znát, jelikož všechny typy svalů mají větší energetický potenciál, co se intenzity i výdrže týče. Zároveň se oddaluje nástup glykolýzy a i zvýšení hladiny laktátu ve svalových buňkách. V neposlední řadě také dochází ke stimulaci lepší regenerace po náročném výkonu díky působení kreatinu na satelitní buňky kosterní svaloviny. K regeneraci svalů přispívají též právě větvené aminokyseliny, které v první řadě tělu dodávají aminokyselinovému poolu důležité stavební kameny pro proteosyntézu, v druhé řadě ji pak přímo stimulují (Leu).

Závěrem rešerše v bakalářské práci lze konstatovat, že co se týče klinického využití, zůstávají kreatin i BCAA nadále spíše výživovými doplňky v oblasti zvýšení sportovního výkonu, než významným klinickým faktorem. Zároveň prozatím nelze uvažovat o kreatinu jako nootropiku – tedy léku zvyšující koncentraci a paměť. Téma jejich potenciálu zajisté bude potřebovat rozsáhlejší výzkum, zejména v oblasti poruch metabolismu kreatinu. Vzhledem k vzácnosti výskytu těchto genetických vad, a relativně obecným klinickým projevům je zatím obtížné tento defekt identifikovat a správným způsobem léčit.

6 Seznam použité literatury

- (1) Balko, J., Tonar, Z., Varga, I. (2017). *Memorix histologie*. 2. vydání. Praha: Triton. ISBN 978-80-7553-249-7.
- (2) Lüllmann-Rauch, R., (2012). *Histologie*. Praha: Grada. ISBN 9788024737294.
- (3) Ganong, W., (2005). *Přehled lékařské fyziologie: dvacáté vydání*. Praha: Galén. ISBN 80-7262-311-7.
- (4) Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M., & Wallimann, T. (2006). Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1762(2), 164–180.
- (5) Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M., & Schlattner, U. (2011). The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*, 40(5), 1271–1296.
- (6) CKMT2 Gene. *GeneCards Human Gene Database* [online]. [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CKMT2&keywords=CKMT2>
- (7) CKMT1B Gene. *GeneCards Human Gene Database* [online]. [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CKMT1B&keywords=CKMT1B>
- (8) CKM Gene. *GeneCards Human Gene Database* [online]. [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CKM&keywords=CKM>
- (9) CKB Gene. *GeneCards Human Gene Database* [online]. [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CKB&keywords=CKB>
- (10) Wyss, M., & Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiological Reviews*, 80(3), 1107–1213.
- (11) Blaauw, B., Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2013). Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Comprehensive Physiology*, 3(4), 1645–1687.
- (12) Fischer, A., Ten Hove, M., Sebag-Montefiore, L., Wagner, H., Clarke, K., Watkins, H., ... Neubauer, S. (2010). Changes in creatine transporter function during cardiac maturation in the rat. *BMC Developmental Biology*, 10.
- (13) Ingwall, J. S., Weiner, C. D., Morales, M. F., Davis, E., & Stockdale, F. E. (1974). Specificity of creatine in the control of muscle protein synthesis. *The Journal of Cell Biology*, 63, 145–151.
- (14) Matsushita, H., Yamada, S., Adachi, M., Satoh, T., Kato, K., & Haimoto, H. (1987). Fetal-type creatine kinase in rat fast and slow muscles during denervation and reinnervation. *Experimental Neurology*, 97(1), 128–134.
- (15) Pette, D., & Staron, R. S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique*, 50(6), 500–509.
- (16) Delling, U., Tureckova, J., Lim, H. W., De Windt, L. J., Rotwein, P., & Molkenin, J. D. (2000). A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression. *Molecular and Cellular Biology*, 20(17), 6600–6611.
- (17) Olsen, S., Aagaard, P., Kadi, F., Tufekovic, G., Verney, J., Olesen, J. L., ... Kjær, M. (2006). Creatine supplementation augments the increase in satellite cell and myonuclei number in human skeletal muscle induced by strength training. *Journal of Physiology*, 573(2), 525–534.

- (18) Op 't Eijnde, B., Ursø, B., Richter, E. A., Greenhaff, P. L., & Hespel, P. (2001). Effect of oral creatine supplementation on human muscle GLUT4 protein content after immobilization. *Diabetes*, *50*(1), 18–23.
- (19) Nuhr, M., Crevenna, R., Gohlsch, B., Bittner, C., Pleiner, J., Wiesinger, G., ... Pette, D. (2003). Functional and biochemical properties of chronically stimulated human skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, *89*(2), 202–208.
- (20) Allen, P. J., Debold, J. F., Rios, M., & Kanarek, R. B. (2015). Chronic high-dose creatine has opposing effects on depression-related gene expression and behavior in intact and sex hormone-treated gonadectomized male and female rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *130*, 22–33.
- (21) Blaauw, B., Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2013). Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Comprehensive Physiology*, *3*(4), 1645–1687.
- (22) Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B., & Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS Journal*, *280*(17), 4294–4314.
- (23) Hespel, P., Eijnde, B. O. T., Van Leemputte, M., Ursø, B., Greenhaff, P. L., Labarque, V., ... Richter, E. A. (2001). Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in human. *Journal of Physiology*, *536*(2), 625–633.
- (24) Pallafacchina, G., Blaauw, B., & Schiaffino, S. (2013). Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *23*(SUPPL1), 1–7.
- (25) Sharples, A. P., Polydorou, I., Hughes, D. C., Owens, D. J., Hughes, T. M., & Stewart, C. E. (2016). Skeletal muscle cells possess a ‘memory’ of acute early life TNF- α exposure: role of epigenetic adaptation. *Biogerontology*, *17*(3), 603–617.
- (26) Hughes, D. C., Stewart, C. E., Sculthorpe, N., Dugdale, H. F., Yousefian, F., Lewis, M. P., & Sharples, A. P. (2016). Testosterone enables growth and hypertrophy in fusion impaired myoblasts that display myotube atrophy: deciphering the role of androgen and IGF-I receptors. *Biogerontology*, *17*(3), 619–639.
- (27) Basualto-Alarcón, C., Jorquera, G., Altamirano, F., Jaimovich, E., & Estrada, M. (2013). Testosterone signals through mTOR and androgen receptor to induce muscle hypertrophy. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *45*(9), 1712–1720.
- (28) Van Der Merwe, J., Brooks, N. E., & Myburgh, K. H. (2009). Three Weeks of Creatine Monohydrate Supplementation Affects Dihydrotestosterone to Testosterone Ratio in College-Aged Rugby Players. *Clinical Journal of Sport Medicine*, *19*(5), 399–404.
- (29) Simonides, W. S., & van Hardeveld, C. (2008). Thyroid hormone as a determinant of metabolic and contractile phenotype of skeletal muscle. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, *18*(2), 205–216.
- (30) Deminice, R., da Silva, R. P., Lamarre, S. G., Brown, C., Furey, G. N., McCarter, S. A., ... Brosnan, J. T. (2011). Creatine Supplementation Prevents the Accumulation of Fat in the Livers of Rats Fed a High-Fat Diet. *Journal of Nutrition*, *141*(10), 1799–1804.
- (31) Deminice, R., Portari, G. V., Vannucchi, H., & Jordao, A. A. (2009). Effects of creatine supplementation on homocysteine levels and lipid peroxidation in rats. *British Journal of Nutrition*, *102*(1), 110–116.
- (32) Stead, L. M., Brosnan, J. T., Brosnan, M. E., Vance, D. E., & Jacobs, R. L. (2006). Is it time to reevaluate methyl balance in humans? *American Journal of Clinical Nutrition*, *83*(1), 5–10.
- (33) GATM Gene. *GeneCards Human Gene Database* [online]. [cit. 2018-05-08]. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GATM&keywords=GATM>
- (34) GAMT Gene. *GeneCards Human Gene Database* [online]. [cit. 2018-05-08]. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GAMT&keywords=GAMT>
- (35) Wang, W., Jobst, M. a, Bell, B., Zhao, C.-R., Shang, L.-H., & Jacobs, D. O. (2002). Cr supplementation decreases tyrosine phosphorylation of the CreaT in skeletal muscle during

- sepsis. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 282(5), E1046–E1054.
- (36) Murphy, R., McConell, G., Cameron-Smith, D., Watt, K., Ackland, L., Walzel, B., ... Snow, R. (2001). Creatine transporter protein content, localization, and gene expression in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 280, C415–C422.
- (37) Cockram, M. S., & Hughes, B. (2011). Health and Disease. *Animal Welfare*, 418(2), 120–137.
- (38) Zarogoulidis, P., Lampaki, S., Francis Turner, J., Huang, H., Kakolyris, S., Syrigos, K., & Zarogoulidis, K. (2014). mTOR pathway: A current, up-to-date mini-review. *Oncology Letters*, 8(6), 2367–2370.
- (39) Hong, F., Larrea, M. D., Doughty, C., Kwiatkowski, D. J., Squillace, R., & Slingerland, J. M. (2008). mTOR-Raptor Binds and Activates SGK1 to Regulate p27 Phosphorylation. *Molecular Cell*, 30(6), 701–711.
- (40) Alesutan, I. S., Ureche, O. N., Laufer, J., Zürn, A., Lindner, R., Strutz-seebohm, N., ... Lang, F. (2010). PIKfyve in the SGK1 Mediated Regulation of the Creatine Transporter SLC6A8, 187–194.
- (41) SLC6A8 Gene. *GeneCards Human Gene Database* [online]. [cit. 2018-05-11]. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC6A8&keywords=CRTR>
- (42) Fitch, C. D., Lucy, D. D., Bornhofen, J. H., & Dalrymple, G. V. (1968). Creatine metabolism in skeletal muscle. II. creatine kinetics in man. *Neurology*, 18(1 Pt 1), 32–42.
- (43) Harris, R. C., Lowe, J. A., Warnes, K., & Orme, C. E. (1997). The concentration of creatine in meat, offal and commercial dog food. *Research in Veterinary Science*, 62(1), 58–62.
- (44) Michalak, J., Zhang, X., & Jacobi, F. (2012). Vegetarian diet and mental disorders: results from a representative community survey. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, 9(1), 67.
- (45) Jäger, R., Harris, R. C., Purpura, M., & Francaux, M. (2007). Comparison of new forms of creatine in raising plasma creatine levels. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 4(1), 17.
- (46) Cholewa, J. M., Wyszczelska-Rokiel, M., Glowacki, R., Jakubowski, H., Matthews, T., Wood, R., ... Paolone, V. (2013). Effects of betaine on body composition, performance, and homocysteine thiolactone. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 10, 1–12.
- (47) Saremi, A., Gharakhanloo, R., Sharghi, S., Gharaati, M. R., Larijani, B., & Omidfar, K. (2010). Effects of oral creatine and resistance training on serum myostatin and GASP-1. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 317(1–2), 25–30.
- (48) Harris, R. C., Söderlund, K., & Hultman, E. (1992). Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clinical Science*, 83(3), 367–374.
- (49) Hultman, E., Soderlund, K., Timmons, J. A., Cederblad, G., & Greenhaff, P. L. (1996). Muscle creatine loading in men. *Journal of Applied Physiology*, 81(1), 232–237.
- (50) Robinson, T. M., Sewell, D. a, Hultman, E., & Greenhaff, P. L. (1999). Role of submaximal exercise in promoting creatine and glycogen accumulation in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 87(2), 598–604.
- (51) Creatine. *Wikipedia the Free Encyclopedia* [online]. [cit. 2018-08-13]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Creatine#/media/File:Creatine_neutral.png
- (52) Creatinine. *Wikipedia the Free Encyclopedia* [online]. [cit. 2018-08-13]. Dostupné z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0c/Creatinine.png>
- (53) Phosphocreatine. *Wikipedia the Free Encyclopedia* [online]. [cit. 2018-08-13]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Phosphocreatine#/media/File:Phosphocreatine.svg>

- (54) Kreider, R. B., Kalman, D. S., Antonio, J., Ziegenfuss, T. N., Wildman, R., Collins, R., ... Lopez, H. L. (2017). International Society of Sports Nutrition position stand: Safety and efficacy of creatine supplementation in exercise, sport, and medicine. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 14(1).
- (55) Joncquel-Chevalier Curt, M., Voicu, P. M., Fontaine, M., Dessein, A. F., Porchet, N., Mention-Mulliez, K., ... Vamecq, J. (2015). Creatine biosynthesis and transport in health and disease. *Biochimie*, 119, 146–165.
- (56) Kley RA, Tarnopolsky MA, V. M. (2013). Creatine for treating muscle disorders. *Cochrane Database Syst Rev*, (6), 5;6.
- (57) Rackayova, V., Cudalbu, C., Pouwels, P. J. W., & Braissant, O. (2017). Creatine in the central nervous system: From magnetic resonance spectroscopy to creatine deficiencies. *Analytical Biochemistry*, 529, 144–157.
- (58) Ardon, O., Procter, M., Mao, R., Longo, N., Landau, Y. E., Shilon-Hadass, A., ... Anikster, Y. (2016). Creatine transporter deficiency: Novel mutations and functional studies. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 8, 20–23.
- (59) Kurosawa, Y., DeGrauw, T. J., Lindquist, D. M., Blanco, V. M., Pyne-Geithman, G. J., Daikoku, T., ... Clark, J. F. (2012). Cyclocreatine treatment improves cognition in mice with creatine transporter deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, 122(8), 2837–2846.
- (60) Derave, W., Straumann, N., Olek, R. A., & Hespel, P. (2006). Electrolysis stimulates creatine transport and transporter cell surface expression in incubated mouse skeletal muscle: potential role of ROS. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 291(6), E1250–E1257.
- (61) Suryawan, A., Hawes, J. W., Harris, R. A., Shimomura, Y., Jenkins, A. E., & Hutson, S. M. (1998). A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68(1), 72–81.
- (62) Blomstrand, E., & Blomstrand, E. (2006). Branched-Chain Amino Acids in Exercise. *Brain*, (1), 544–547.
- (63) Shimomura, Y., Murakami, T., Nakai, N., Nagasaki, M., & Harris, R. a. (2004). Exercise promotes branched-chain amino acids catabolism: Effects of branched-chain amino acids supplementation on skeletal muscle during exercise. *Journal of Nutrition*, 134(6), 1583S–1587.
- (64) Drummond, M. J., Fry, C. S., Glynn, E. L., Dreyer, H. C., Dhanani, S., Timmerman, K. L., ... Rasmussen, B. B. (2009). Rapamycin administration in humans blocks the contraction-induced increase in skeletal muscle protein synthesis. *Journal of Physiology*, 587(7), 1535–1546.
- (65) Wang, X., & Proud, C. G. (2006). The mTOR Pathway in the Control of Protein Synthesis.
- (66) Udobi, K. C., Kokenge, A. N., Hautman, E. R., Ullio, G., Coene, J., Williams, M. T., ... Skelton, M. R. (2018). Cognitive deficits and increases in creatine precursors in a brain-specific knockout of the creatine transporter gene *Slc6a8*. *Genes, Brain and Behavior*, 17(6), 1–8.
- (67) Merege-Filho, C. A. A., Otaduy, M. C. G., de Sa-Pinto, A. L., de Oliveira, M. O., de Souza Goncalves, L., Hayashi, A. P. T., ... Gualano, B. (2017). Does brain creatine content rely on exogenous creatine in healthy youth? A proof-of-principle study. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition et Metabolisme*, 42(2), 128–134.
- (68) Hanna-El-Daher, L., & Braissant, O. (2016). Creatine synthesis and exchanges between brain cells: What can be learned from human creatine deficiencies and various experimental models? *Amino Acids*, 48(8), 1877–1895.
- (69) Žurmanová, J. (n.d.). Myofibrilární organizace PCr / CK systému v kosterním svalu, 1–52.
- (70) Žurmanová, J. (2018). Kreatinkináza a hexokináza v kosterním a srdečním svalu. Homeostáza a protekce