

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát dizertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**Možnosti ovlivnění markerů kardiovaskulárního rizika stravou obohacenou  
amarantovou moukou**

**PharmDr. Zdeněk Chmelík**

**Praha 2022**

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor: Preventivní medicína

Předseda oborové rady: Doc. MUDr. Jan Polák, Ph.D.

Školící pracoviště: III. interní klinika 1. LF a VFN v Praze

Školitel: Prof. MUDr. Michal Vrablík, Ph.D.

Oponenti: prof. MUDr. Jan Piřha, CSc., doc. MUDr. Branislav Vohnout, Ph.D.

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne:

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky děkanátu 1. lékařské fakulty.

# OBSAH

<b>ABSTRAKT (CZ)</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT (EN)</b> .....	<b>5</b>
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>2. PŘEHLED AKTUÁLNÍHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>6</b>
2.1. Vliv na TC, LDL a HDL cholesterol .....	7
2.2. Účinné látky .....	8
2.3. Antidiabetický a antioxidační efekt .....	10
2.4. Antihypertenzní efekt .....	11
<b>3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	<b>12</b>
<b>4. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>13</b>
4.1. Zvířata.....	13
4.2. Prostředí.....	13
4.3. Krmivo .....	13
4.4. Použité látky .....	14
4.5. Laboratorní metody .....	15
4.6. Statistická analýza.....	15
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>16</b>
5.1. Efekt jednotlivých diet na hmotnost experimentálních zvířat.....	16
5.2. Efekt vysokoenergetické diety na hladinu cholesterolu .....	17
5.3. Efekt amarantové mouky na experimentálně indukovanou dyslipidemii .....	17

5.4.	Efekt simvastatinu a skvalenu na experimentálně indukovanou dyslipidemii .....	19
<b>6.</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>19</b>
6.1.	Efekt amarantové mouky na hmotnost .....	19
6.2.	Efekt vysokoenergetické diety na TC LDL a HDL cholesterol .....	19
6.3.	Efekt amarantové mouky na TC, LDL a HDL cholesterol.....	19
6.4.	Efekt simvastatinu a skvalenu na TC, LDL a HDL cholesterol .....	20
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚRY.....</b>	<b>21</b>
<b>8.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>22</b>
<b>9.</b>	<b>SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ.....</b>	<b>26</b>
9.1.	Publikace se vztahem k tématu dizertace.....	26
9.2.	Publikace bez vztahu k tématu dizertace .....	26
9.3.	Prezentace na kongresech a sympoziích .....	27

## ABSTRAKT (CZ)

**Úvod:** Dieta vhodná u poruch metabolismu lipidů by neměla zvyšovat celkový (TC) a LDL cholesterol a ideálně by měla napomáhat k jeho snižování. Analýza literárních zdrojů naznačuje, že amarant může tyto vlastnosti splňovat.

**Cíle práce:** Provedení literárního šetření dané problematiky a experimentální ověření literaturou avizovaného hypolipidemického působení amarantu v laboratorních podmínkách.

**Metodika:** 50 (Pokus 1) respektive 40 (Pokus 2) myši bylo rozděleno do pěti (Pokus 1) respektive čtyř (Pokus 2) skupin krměných kontrolní směsí (C), vysokoenergetickou dietou (HED), vysokoenergetickou dietou s amarantem (HED+A) a v Pokusu 1 dále vysokoenergetickou dietou s amarantovou moukou a simvastatinem (HED+A+S) či pouze se simvastatinem (HED+S) a v Pokusu 2 vysokoenergetickou dietou se skvalenem (HED+S). Myším byly měřeny hmotnostní přírůstky a stanoven TC, LDL a HDL cholesterol.

**Výsledky:** Zkrmování HED diety vedlo ke statisticky významnému zvýšení TC cholesterolu o 81 % (Pokus 1) respektive o 125 % (Pokus 2), LDL cholesterolu o 612 % (Pokus 1) respektive 304 % (Pokus 2) a poklesu HDL cholesterolu o 8,4 % (Pokus 1) respektive 58 % (Pokus 2). Zkrmování diety HED+A vedlo ke statisticky významnému snížení TC cholesterolu o 37 % (Pokus 1) respektive 33 %, (Pokus 2), LDL cholesterolu o 46 % (Pokus 1) respektive 37 % (Pokus 2) a poklesu HDL cholesterolu o 27 % (Pokus 1) respektive k nárůstu o 47 % (Pokus 2). Dieta HED+A+S v Pokusu 1 vedla ke statisticky významnému snížení TC cholesterolu o 46 %, LDL cholesterolu o 53 % a HDL cholesterolu o 27 %. Dieta HED+S v Pokusu 1 nezaznamenala pozitivní efekt na hladinu TC a LDL ale ani negativní na HDL cholesterol. Dieta HED+S v Pokusu 2 ovlivnila pozitivně pouze HDL cholesterolu o 60 %.

**Závěr:** Výsledky potvrzují schopnost amarantové mouky snížit TC a LDL cholesterol. Efekt na HDL cholesterol je nejasný. Taktéž se zdá, že je v amarantové mouce přítomno více látek, které se podílí společně na jeho výsledném hypolipidemickém efektu.

## ABSTRACT (EN)

**Introduction:** Diet suitable for lipid metabolism disorders should not increase the total and LDL cholesterol, and ideally should assist in its lowering. Analysis of literary sources suggest that amaranth can meet these properties.

**Aim:** The execution of literary investigation of the issue and experimental verification of lipid-lowering effect of amaranth flour in laboratory conditions.

**Methods:** 50 (Experiment 1) or 40 (Experiment 2) The mice were divided into five (Experiment 1) or four (Experiment 2) groups fed by control mixture (C), high-energy diet (HED), high-energy diet with amaranth (HED+A) and in Experiment 1, by high-energy diet with amaranth flour and simvastatin (HED+A+S) or only with simvastatin (HED+S), and in Experiment 2 a by high-energy diet with squalene (HED+S). Weight gains were measured and TC, LDL and HDL cholesterol determined.

**Results:** Feeding of HED diets resulted in a statistically significant increase in the TC cholesterol by 81% (Experiment 1) or 125% (Experiment 2), LDL cholesterol of 612% (Experiment 1) or 304% (Experiment 2) and a decrease in HDL cholesterol by 8.4% (Experiment 1) or 58% (Experiment 2). Feeding of HED+A diet resulted in a statistically significant reduction in the TC cholesterol by 37% (Experiment 1) or 33% (Experiment 2), LDL cholesterol by 46% (Experiment 1) or 37% (Experiment 2) and a decrease in HDL cholesterol by 27% (Experiment 1) or an increase of 47% (Experiment 2). Diet HED+A+S in Experiment 1 resulted in a statistically significant reduction in the TC cholesterol by 46%, LDL cholesterol by 53% and HDL cholesterol by 27%. HED+S diet in Experiment 1 showed neither a positive effect on the level of the TC and LDL nor negative on HDL cholesterol. Diet HED+S in Experiment 2 positively influenced only HDL cholesterol by 60%.

**Conclusion:** The results confirm the ability of amaranth flour to reduce TC and LDL cholesterol. The effect on HDL cholesterol is unclear. Also, it seems that the amaranth flour presents numerous substances which participate jointly in its final hypolipidemic effect.

# 1. ÚVOD

Vztah mezi koncentrací LDL cholesterolu a výskytem kardiovaskulárních onemocnění v populaci byl potvrzen v řadě intervenčních i epidemiologických studií, např. AMORIS či INTERHEART (Walldius, et al., 2001) (Yusuf, et al., 2004), což z hladiny LDL cholesterolu učinilo nejzásadnější ovlivnitelný rizikový faktor a cíl terapie. Snahou léčebně preventivních opatření je tedy dosáhnout hodnot LDL cholesterolu odpovídající úrovni rizika stanoveného pro daného jedince např. pomocí algoritmu SCORE. K tomu slouží nástroje jak farmakologické, tak nefarmakologické. V oblasti nefarmakologické léčby pak zauímají významnou roli vhodná dietní opatření. Jejich hlavní výhodou je, že jsou levná, univerzálně použitelná a zároveň nemají žádné vedlejší účinky ve smyslu klasických nežádoucích polékových reakcí. Zároveň jsou i synonymem zdravého životního stylu, který napomáhá pozitivně ovlivnit průběh a rozvoj nejen dyslipidemie ale i dalších chorob

V současné době jsou proto odborníky na výživu studovány produkty, které by jak z dietetického hlediska, tak i z hlediska aktivního pozitivního ovlivnění hladin jednotlivých lipidových frakcí, mohly být nápomocny ve výše zmiňované nefarmakologické léčbě dyslipidemie. Jedním z potenciálně velmi nadějných se zdá být amarant, starověká obilnina hojně pěstována především v kulturách Inků a Mayů (Kalač & Moudrý, 2000). Amarant se původně dostal do popředí zájmu vědců při pátrání po vhodné dietetické náhradě za masokostní moučku. V průběhu tohoto zkoumání byl vyšetřován i potenciál produktů z amarantu (olej, zrno, proteinová frakce atd.) pozitivně ovlivňovat patologicky změněné hladiny některých lipidových frakcí, především pak celkový (TC) a LDL cholesterol (Grajeta, 1999) (Plate & Areas, 2002). Amarantová mouka patří mezi klasické produkty z amarantu. Je snadno zařaditelná do diety lidí i zvířat. Z hlediska potenciálního hypolipidemického působení nebyla doposud významněji testována.

## 2. PŘEHLED AKTUÁLNÍHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Významným biologickým účinkem produktů z amarantu potenciálně využitelným v rámci nefarmakologické léčby některých metabolických onemocnění je schopnost jejich obsahových látek ovlivňovat patologicky změněné hladiny jednotlivých lipoproteinových frakcí. Toto působení se týká jak celkového, tak i LDL a HDL cholesterolu. V současné době však panují v dostupné literatuře diskrepance ohledně tohoto efektu. Pozitivní výsledky byly

pozorovány převážně v experimentech na zvířecích modelech, zatímco studie na lidech byly přesvědčivé méně. Taktéž nebylo dosaženo konsenzu v otázce efektu amarantu na HDL cholesterol. Na druhou stranu autoři několika experimentů shodně poukázali na antidiabetické a antioxidační působení amarantu, přičemž v obou případech jde o biologické účinky, které dále mohou přispívat k redukci celkového kardiovaskulárního rizika.

## **2.1. Vliv na TC, LDL a HDL cholesterol**

### **▪ *Shrnutí prací na zvířatech***

Pozitivní efekt extraktu z amarantu na celkového, LDL, a také na VLDL cholesterol a triglyceridy potvrdil ve své práci na hypercholesterolemických králících Andrea (Andrea, et al., 2002). V pokusu na stejné živočišné species dosáhl i další autoři velmi zajímavých výsledků (Kabiri, et al., 2010). U králíků krmených vysoce cholesterolovou dietou a lihovým extraktem z amarantu došlo k poklesu celkového, LDL cholesterolu, triglyceridů, oxidovaného LDL, apo-B, C-reaktivního proteinu (CRP), aterogenního indexu a vzestupu HDL cholesterolu a apo-A ve srovnání se skupinou krmenou jen vysoce cholesterolovou dietou. Tento efekt byl zároveň lepší než u skupiny krmené vysoce cholesterolovou dietou a lovastatinem.

Ve studii provedené na křečcích krmených na cholesterol bohatou dietou vedlo zařazení amarantového zrna a oleje k poklesu celkového a non-HDL cholesterolu a vzestupu HDL cholesterolu. Amarantové zrno a olej taktéž snižovaly VLDL cholesterol. Překvapivě amarantový olej zvyšoval syntézu cholesterolu pravděpodobně z důvodu kompenzatorních mechanismů (Berger, et al., 2003). Redukce plasmatického cholesterolu (převážně non-HDL) byla pozorována u stejné živočišné species i po introdukci proteinového izolátu z amarantu. Autoři předpokládají, že by proteinová složka mohla mít efekt na endogenní metabolismus cholesterolu (Mendonca, et al., 2009). V tomto ohledu zajímavým nálezem byl pokles aktivity 3-HMG-CoA reductázy zaznamenaný v experimentu na kuřatech krmených semeny nebo olejem z amarantu. Pokles celkového a LDL cholesterolu dosahoval 10-30 %, respektive 7-70 % ( $p < 0,01$ ). HDL cholesterol nebyl ovlivněn (Quereshi, et al., 1996).

Řada studií provedených na laboratorních potkanech (Chatuverdi, et al., 1993), (Grajeta, 1999), (Czerwiński, et al., 2004), (Shinn, et al., 2004), (Kim, et al., 2006), (Montero-Quintero, et al., 2014), (Lado, et al., 2015) byla stran hypocholesterolemického působení různých produktů z amarantu konzistentní. Ve studii se skvalenem z amarantu byl obdobně jako ve studii na kuřatech krmených semeny nebo olejem z amarantu pozorován inhibiční efekt na 3-



HMG-CoA reduktázu (Shinn, et al., 2004). Suplementace amarantového zrna a oleje krysám se streptozocinem indukovaným diabetem vedlo společně s poklesem sérových lipidů (TC cholesterol, triglyceridy a VLDL cholesterol) i ke zlepšení glukozového metabolismu (Kim, et al., 2006).

#### ▪ *Shrnutí prací s humánními subjekty*

180 hypercholesterolemických subjektů participujících v „National Cholesterol Education Program Step One Diet“ bylo rozděleno do šesti skupin. Po 28. dnech byl ve skupině konzumující 50 g/den amarantové vlákniny zaznamenán signifikantní pokles v hladinách celkového cholesterolu o 4,5 % (Maier, et al., 2000). V placebem kontrolované studii provedené na 125 pacientech s kardiovaskulárním onemocněním, došlo po třech týdnech aplikace amarantového oleje k poklesu celkového, LDL VLDL a triglyceridů, přičemž tento efekt byl závislý na koncentraci skvalenu. Hladina HDL cholesterolu ovlivněna nebyla (Martirosyan, et al., 2007).

#### ▪ *Negativní výsledky (obě skupiny)*

Na druhou stranu je však třeba zmínit malou pilotní studii provedenou na lidech (Berger, et al., 2000b), ve které nebyl pozitivní efekt amarantu zaznamenán. Ve studii sledující efekt odtučněného amarantu u pacientů se středně závažnou hypercholesterolémií byla dokonce zaznamenána signifikantní redukce v hladině HDL cholesterolu za současného nulového efektu na hladinu LDL cholesterolu (Chávez-Járegui, et al., 2010).

Taktéž v pokusu provedeném na křečcích nebylo hypolipidemické působení evidentní (de Castro, et al., 2013). Dle získaných údajů, amarantový olej a jeho komponenta skvalen zvýšila na jedné straně exkreci žlučových kyselin, na druhé ale nevykázala u křečků krmených dietou bohatou na tuky a cholesterol hypocholesterolemický efekt.

## **2.2. Účinné látky**

Odlišnosti ohledně hypolipidemického působení produktů z amarantu nalzáme v literatuře i v souvislosti s diskuzemi týkajícími se účinných látek zodpovědných za tento efekt.

V práci provedené na šesti týdenních kuřatech (Quereshi, et al., 1996) naznačili autoři, že olejová frakce amarantu, s ohledem na příznivé složení mastných kyselin společně s přítomností dalších látek (fytoosteroly, tokoferol, tokotrienoly), sehrává při tomto působení nejvýznamnější roli.

V práci autorů Danze a Luptona řešitelé pozorovali, že potkani krmení amarantem vykazovali obdobný hypocholesterolemický efekt jako po aplikaci rozpustné vlákniny, což naznačuje možný shodný mechanismus tohoto efektu (Danz & Lupton, 1992).

Dle dalších experimentů provedených s amarantem zbaveným tukového podílu však došlo ke stanovení hypotézy, že i jiné složky, například proteinová, jsou schopny vykazat hypocholesterolemický efekt (Mendonca, et al., 2009) (Berger, et al., 2003) (Andrea, et al., 2002).

Diskutována je též schopnost skvalenu, jež je ve vyšší míře v amarantu obsažen (Becker, et al., 1981), snižovat patologicky zvýšené hladiny především celkového a LDL cholesterolu. Tato možnost je v souladu s výsledky získanými v experimentu provedeném na potkanech (Shinn, et al., 2004), ve kterém bylo pozorované hypolipidemcké působení přisouzeno právě skvalenu, přičemž efekt byl evidentní v séru i játrech. Skvalen z amarantu zvýšil fekální exkreci žlučových kyselin a cholesterolu. Zajímavým nálezem studie byla mírná inhibice enzymu 3-HMG-CoA reductázy. Autoři práce naznačili, že skvalen snižoval cholesterol zejména zvýšením fekální eliminace steroidů díky interferenci s absorpcí cholesterolu. Dle autorů je též možné, že skvalen z různých zdrojů může ovlivňovat metabolismus cholesterolu odlišně. V placebem kontrolované studii provedené na pacientech s kardiovaskulárním onemocněním (Martirosyan, et al., 2007), která zaznamenala pozitivní výsledky po aplikaci amarantového oleje obsahujícího různé dávky skvalenu bylo zjištěno, že amarantový olej obsahující 100 mg, 200 mg, 400 mg a 600 mg skvalenu snižoval TC cholesterol o 14 %, 17 %, 20 % a 12 % a LDL cholesterol o 19 %, 23 %, 25 %, a 12 %. Autoři upozorňují, že role skvalenu v procesu snižování cholesterolu není ještě zcela objasněna a že v dávce 1 g denně po dobu 9týdnů byl dokonce reportován nárůst hladin VLDL a LDL cholesterolu (Miettinen & Vanhanen, 1994).

Podle některých autorů může být potenciální mechanismus účinku amarantu spojen s inhibicí biosyntézy skvalenu, prostřednictvím inhibice enzymu skvalen oxygenázy, který byl identifikován jako potenciální cíl pro hypocholesterolemickou terapii. V amarantu může být jedna nebo více účinných látek s tímto účinkem (Belter, et al., 2011).

Diskrepance nalezené v literatuře naznačují komplexnost celé problematiky, kdy nejen obsahové látky, ale i samotný patologický stav a výběr produktu z amarantu (olej, semeno, mouka) mohou sehrávat významnou roli v konečném hypolipidemickém působení amarantu, a ukazují na potřebu provedení dalších studií za účelem jak identifikace hypolipidemicky

aktivních látek amarantu, tak i podmínek, za kterých budou produkty z amarantu schopny dosáhnout nejlepšího účinku - určení vhodné formy a identifikace cílové populace.

### 2.3. Antidiabetický a antioxidační efekt

Diabetes v kombinaci s poruchou lipidového metabolismu významně zvyšuje celkové kardiovaskulární riziko u pacientů. Hyperglykémie hraje významnou roli v procesu glykace a oxidace LDL částic.

Oxidace LDL částic je považována za důležitý faktor pro rozvoj předčasných aterosklerotických změn. U diabetika lze nalézt vyšší podíl malých denzních LDL částic, které jsou více citlivé na oxidaci. Oxidované LDL částice následně snadněji pronikají do intimy cév a tím akcelerují rozvoj předčasných aterosklerotických změn (Češka, et al., 2012).

Antidiabetická a antioxidační aktivita amarantu (semena ze dvou variet *Amaranthus caudatus*-var. Oscar Blanco a var. Victor červená obsahující 2,2 respektive 7,5 % skvalenu) byla testována na modelu inhibice alfa-amylázy, respektive na modelu peroxidace lipidů. Inhibice  $\alpha$ -amylázy blokuje hydrolyzu glykosidických vazeb cukrů, čímž vede ke snížení absorpce glukózy z trávicího traktu a reguluje výši postprandiální hladiny glukózy v krvi (Conforti, et al., 2005). Autoři studie zjistili, že methanolový a ethylacetátový extrakt ze semen amarantu vykazovaly znatelnou hypoglykemizující aktivitu. Vzhledem k tomu, skvalen samotný byl méně účinný, došli autoři k závěru, že se na celkovém efektu podílí více složek. Kasozi ve své práci přisoudil antidiabetické vlastnosti amarantu zlepšení kalciové homeostázy v krvi ledvinách a játrech (Kasozi, et al., 2012), zatímco Velarde-Salcedo inhibiční aktivitě na dipeptidyl peptidázu IV (Velarde-Salcedo, et al., 2017). Ethylacetátový extrakt spolu se skvalenem vykazoval dobrou antioxidační aktivitu v modelu peroxidace lipidů. Snížení peroxidace lipidů a zvýšení antioxidační aktivity bylo pozorováno i v práci Paska (Pasko, et al., 2009). Stejný autor popsal ve své další práci, že jak amarantové zrno, tak i klíčky vykazovaly relativně vysokou antioxidační aktivitu (Pasko, et al., 2011). Obdobně byla zaznamenána uspokojivá antioxidační aktivita amarantového semena v práci využívající beta-karotenový a linoleátový model (Klimczak, et al., 2002). Inhibice peroxidace lipidů pomocí hydrolyzovaného proteinu z *amaranthus caudatus* byla pozorovaná v experimentu provedeném na larvách a embryích Dánia (Danio rerio) (Zebrafish) (Vilacundo, et al., 2018). Zajímavé výsledky získal Lee ve studii, ve které byla zaznamenán antioxidační efekt a suprese buněk CT 26 (rakovina rekta) prostřednictvím listů z květů amarantu (*Amaranthus cruentus* L) (Lee & Joo, 2018).

## **2.4. Antihypertenzní efekt**

Významnou roli v regulaci krevního tlaku hraje osa renin-angiotensin-aldosteron. Podle některých autorů mohou být proteiny obsažené v amarantu schopny vyvolat antihypertenzní účinek prostřednictvím inhibice funkce angiotensin konvertujícího enzymu. V práci Silva-Sanchez et al. autoři uvedli, že amarantové semeno může obsahovat proteiny s takovým účinkem (Silva-Sanchez, et al., 2008). Tiengo et al testovali in vitro inhibiční aktivitu odtučněné amarantové mouky a jejích produktů. Proteiny hydrolyzované alkalázou vykazovaly antihypertenzivní efekt před i po in vitro digesci, což naznačuje, že tyto peptidy nejsou dále ovlivněny gastrointestinálními enzymy (Tiengo, et al., 2009). Tovar-Perez et al. studoval proteinovou frakci získanou z amarantového zrna znovu s pozitivními výsledky (Tovar-Perez, et al., 2009). Přítomnost proteinů s antihypertenzním byla také nalezena v práci Vecchiho a Anona (Vecchi & Anon, 2009).

### 3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

**Pracovní hypotéza** předpokládala, že amarantová mouka by měla být schopna v metodice popsaném uspořádání pokusu snížit hladinu především LDL a celkového cholesterolu, ideálně bez negativního působení na hladinu HDL cholesterolu.

**Cílem práce** bylo ověřit ve dvou na sebe navazujících pilotních studiích využívajících obdobnou metodiku schopnost amarantové mouky snížit dietetickou manipulací navezenou patologicky zvýšenou hladinu LDL a celkového cholesterolu a sledovat její vliv na hladinu HDL cholesterolu. Zařazení diet s obsahem simvastatinu, samostatně i v kombinaci s amarantovou moukou, mělo za cíl studovat vzájemnou interakci mezi amarantovou moukou a statinem. Zařazení skvalenu mělo za úkol porovnat efekt látky považované za možného původce hypocholesterolemického efektu amarantové mouky s efektem amarantové mouky jako celku a zkusit tak blíže charakterizovat složky odpovědné za schopnost amarantové mouky snižovat hladinu cholesterolu.

**Dalším cílem práce** bylo poznatky získané v provedených experimentech a rešerši literárních podkladů publikovat do souhrnného přehledu shrnujícího aktuální poznatky o amaranthu nejen u hlediska jeho vlivů na metabolismus plazmatických lipidů, ale i v širším kontextu prevence oběhových onemocnění.

## **4. MATERIÁL A METODY**

V experimentální části dizertační práce byly realizovány dva na sebe navazující experimenty využívající stejné metodiky. Oba pokusy hodnotily schopnost vysokoenergetické diety navodit patologický stav v lipidovém spektru pokusných zvířat a taktéž schopnost amarantové mouky tento vývoj korigovat. V rámci prvního pokusu byly navíc zařazeny skupiny, jejichž dieta obsahovala simvastatin a to jak samostatně tak v kombinaci s amarantovou moukou (Pokus 1), zatímco v rámci druhého pokusu byla navíc sledována skupina, jejíž dieta obsahovala squalen (Pokus 2).

### **4.1. Zvířata**

Do experimentu bylo zařazeno 50 (Pokus 1) respektive 40 (Pokus 2) laboratorních inbredních myší C57Bl/6J SPF (Anlab s.r.o. Praha, Czech Republic) samčího pohlaví, stejného stáří 5 týdnů a podobné hmotnosti  $19 \pm 1$  g. Po týdenní aklimatizaci byla zvířata rozdělena náhodným výběrem do pěti (Pokus 1) respektive čtyř (Pokus 2) skupin po deseti jedincích a ustájena po pěti jedincích. Průměrná hmotnost při zahájení experimentu byla  $20,12 \pm 0,42$  (Pokus 1) respektive  $21.64 \pm 0.72$ g (Pokus 2).

### **4.2. Prostředí**

Oba experimenty proběhly v akreditované laboratoři Ústavu humánní farmakologie a toxikologie Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Zvířata byla umístěna ve speciálních chovných nádobách K/3 (AnLab s.r.o. Praha, Czech Republic) o rozměrech 360 x 205 x 155 mm s možností příjmu krmiva i pitné vody ad libitum, za standardních podmínek, v prostředí s kontrolovaným světelným a tepelným režimem (12:12 světlo/tma, teplota 20 - 24 °C, vlhkost 75 - 86 %). Byla použita podestýlka SAWI Typ HW 300/500 (dodavatel AnLab s.r.o. Praha, Czech Republic).

### **4.3. Krmivo**

#### **Pokus 1:**

V průběhu adaptační periody (7 dní) byly myši krmeny standardní krmnou směsí Biostan MYPO (Biokron, Blučina, Czech Republic). V průběhu experimentu (49 dní) byly myši krmeny ad libitum následujícími směsmi: kontrolní krmnou směsí (C) Biostan MYPO (Biokron, Blučina, Czech Republic), vysokoenergetickou dietou (HED), vysokoenergetickou

dietou s amarantovou moukou (HED+A), vysokoenergetickou dietou s amarantovou moukou a simvastatinem (HED+A+S) and vysokoenergetickou dietou se simvastatinem (HED+S).

### **Pokus 2:**

V průběhu adaptační periody (7 dní) byly myši krmeny standardní krmnou směsí Biostan MYPO (Biokron, Blučina, Czech Republic). V průběhu experimentu (49 dní) byly myši krmeny ad libitum následujícími směsmi: kontrolní krmnou směsí (C) Biostan MYPO (Biokron, Blučina, Czech Republic), vysokoenergetickou dietou (HED), vysokoenergetickou dietou s amarantovou moukou (HED+A), vysokoenergetickou dietou se skvalenem (HED+S).

### **Pokus 1**

### **Pokus 2**

#### **Složení diet použitých v experimentech**

Složení diet g/100g	Skupina				
	C	HED	HED+A	HED+A+S	HED+S
Biostan MYPO*)	100	68.5	48.5	48.49	68.49
Cholesterol	0	1.5	1.5	1.5	1.5
Cukr (glukóza)	0	30	30	30	30
Amarantová mouka	0	0	20	20	0
Simvastatin	0	0	0	0.01	0.01

\*) Složení: obiloviny, vedlejší produkty rostlinného původu, mléko a mléčné výrobky, minerální látky, L-lysine, monohydrochloride, D, L-methionine, a premix doplňkových látek.

\*) Složení: obiloviny, vedlejší produkty rostlinného původu, mléko a mléčné výrobky, minerální látky, L-lysine, monohydrochloride, D, L-methionine, a premix doplňkových látek.

#### **4.4. Použité látky**

Simvastatin byl zakoupen u výrobce Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Skvalen byl zakoupen u výrobce Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Amaranth byl zakoupen u výrobce AMR Amarant a.s., (Hradec Králové, Czech Republic). Výrobce deklaruje následující složení na 100 g směsi: sacharidy 58,2 g, tuky 6 g, z toho nasycené mastné kyseliny 0,3 g, nenasycené mastné kyseliny 1,2 g, cholesterol 0 g, obsah gliadinu maximálně 100 mg na 100 g sušiny, vláknina 15,2 g, sodík minimálně 21 mg, vápník minimálně 190 mg, hořčík minimálně 240 mg, fosfor minimálně 420 mg, železo minimálně 7,6 mg, měď minimálně 0,7 mg, zinek minimálně 2,8 mg, vitamín B6 minimálně 0,2 mg, vitamín C minimálně 3,7 mg, vitamín E 0,7-1 mg, squalen 300 mg.

## 4.5. Laboratorní metody

Hmotnost laboratorních myší byla u obou pokusů odečítána v den 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 a 49 trvání pokusu. Zdravotní stav zvířat byl v průběhu obou experimentů monitorován aspekci. 49. den pokusu byla zvířata po 12 hodinách lačnění a v celkové anestézii usmrcena exsanguinací krve ze srdce. Anestézie byla provedena aplikací 0,2 ml na 10 g tělesné hmotnosti směsí 1% roztoku ketaminu (Narkamon® inj., Zentiva, Prague, Czech Republic) a 2% roztoku xylazinu (Rometar® inj., Zentiva Prague, Czech Republic) v poměru 1:20. Odebraná krev byla centrifugována při 1500 g po dobu 15 minut. Vzorky byly zamrazeny. Sérový TC, LDL a HDL cholesterol byl stanoven za použití enzymatických kolorimetrických kitů (BioVendor, Brno, Czech Republic) za použití automatizovaného fotometru StarDust-MC 15 (BioVendor, Brno, Czech Republic). Všechny vzorky byly „run in duplicate“.

## 4.6. Statistická analýza

### Pokus 1:

Statistická analýza byla provedena za použití R softwaru, verze 2.10.1 (R Development Core Team, Vienna, Austria, 2009). Vyloučení extrémních hodnot bylo provedeno pomocí Grubbsova testu. Stanovení statistické významnosti bylo provedeno dvou výběrovým Welchovým testem. Statistická významnost byla stanovena pro  $P < 0.05$  a  $P < 0.01$ .

### Pokus 2:

Statistická analýza byla provedena za použití R softwaru, verze 2.10.1 (R Development Core Team, Vienna, Austria, 2009). Design experimentu byl ve prospěch normálního rozložení hodnot, proto bylo možno použít Grubbsův test pro vyloučení extrémních hodnot ( $\alpha=0.05$ ). Normalita zbylých dat byla potvrzena pomocí testu Shapiro-Wilk ( $\alpha=0.05$ ). Statistická významnost byla vypočtena za použití jedno výběrového Studentova t testu s korekcí dle Welche, statistická významnost byla stanovena pro  $P < 0.05$ . P-hodnoty t-testu byly kategorizovány pro lepší přehlednost do tří intervalů (\* -  $0.05 > P \geq 0.01$ , \*\* -  $0.01 > P \geq 0.001$  and \*\*\* -  $P < 0.001$ ).

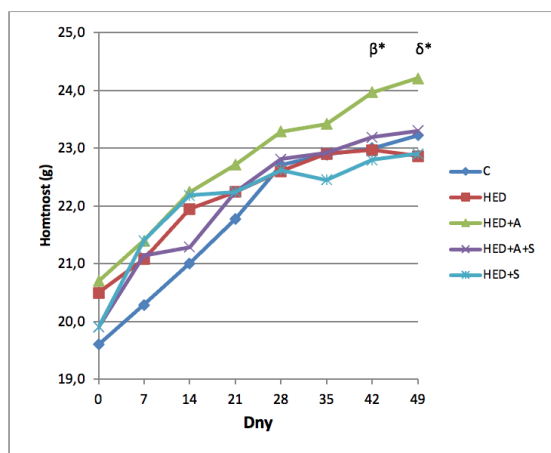


## 5. VÝSLEDKY

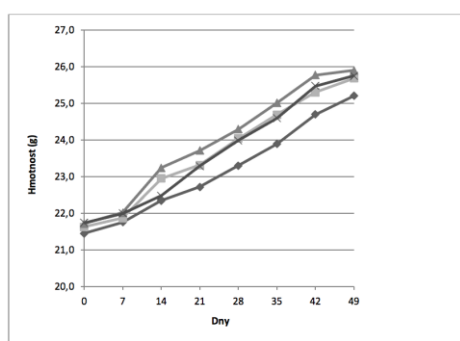
### 5.1. Efekt jednotlivých diet na hmotnost experimentálních zvířat

Průměrná hmotnost testovaných zvířat na začátku pokusu byla 20,12g (Pokus 1) respektive 21,63g (Pokus 2), na konci experimentu pak 23,66g (Pokus 1) respektive 25,56g (Pokus 2). Zvířata přibírala rovnoměrně v průběhu obou experimentů. Průměrné hmotnosti zvířat testovaných skupin byly srovnatelné. V pokusu 1 jsme u skupiny krmené dietou obohacenou o amarantovou mouku zaznamenaly statisticky významný nárůst hmotnosti mezi dny 42 a 49 v porovnání se skupinami krmenými HED dietou a HED+S dietou. Průměrný příjem potravy byl u všech skupin stejný  $4,5 \pm 0,2$  g/myš.

**Pokus 1**



**Pokus 2**



◆ = control, ■ = HED, ▲ = HED+A, x = HED+S

\* -  $0,05 > P \geq 0,01$ , \*\* -  $0,01 > P \geq 0,001$ , \*\*\* -  $P < 0,001$

C=Control

HED=High Energy Diet

HED+A=High Energy Diet+Amaranth flour

HED+A+S= High Energy Diet+Amaranth flour+Simvastatin

HED+S= High Energy Diet+Simvastatin

α=HED+A significantly different from C

β=HED+A significantly different from HED

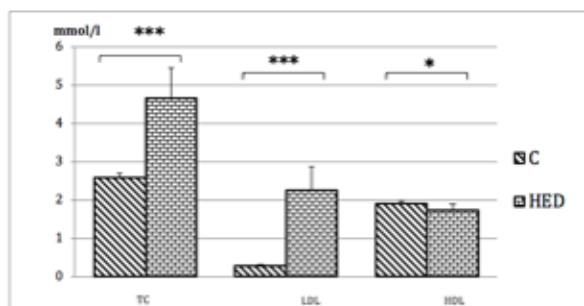
γ=HED+A significantly different from HED+A+S

δ=HED+A significantly different from HED+S

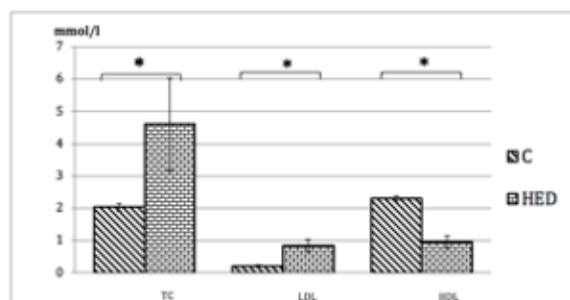
## 5.2. Efekt vysokoenergetické diety na hladinu cholesterolu

Dieta obsahující cukr a cholesterol (HED) byla zařazena za účelem navození patologického stavu. Sedmi týdenní zkrmování HED diety vedlo ke statisticky významnému zvýšení TC cholesterolu o 81 % (Pokus 1) respektive 125 % (Pokus 2), LDL cholesterolu o 612 % (Pokus 1) respektive 304 % (Pokus 2) a poklesu HDL cholesterolu o 8,4 % (Pokus 1), respektive 58 % (Pokus 2) ve srovnání s kontrolní skupinou C.

**Pokus 1**



**Pokus 2**



\*= $p < 0,05$   
\*\*= $p < 0,01$   
\*\*\*= $p < 0,001$

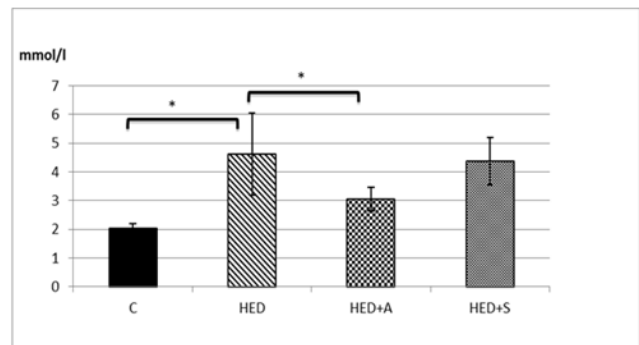
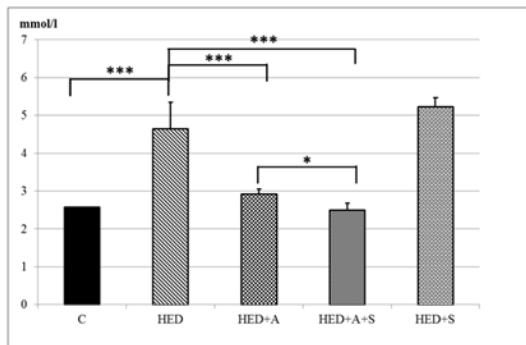
## 5.3. Efekt amarantové mouky na experimentálně indukovanou dyslipidemií

Amarantová mouka byla zařazena s cílem pozorovat její efekt na dieteticky navozenou dyslipidémii u pokusných zvířat. Sedmi týdenní zkrmování diety obohacené o amarantovou mouku diety vedlo ke statisticky významnému snížení TC cholesterolu o 37 % (Pokus 1), respektive 33 %, (Pokus 2), LDL cholesterolu o 46 % (Pokus 1) respektive 37 % (Pokus 2) a poklesu HDL cholesterolu o 27 % (Pokus 1), respektive k nárůstu 47 % (Pokus 2) ve srovnání s kontrolní skupinou HED.

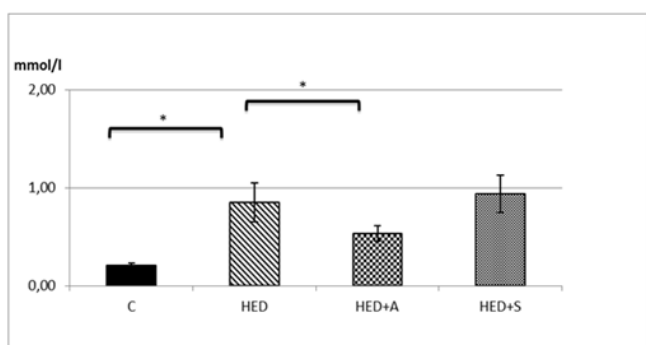
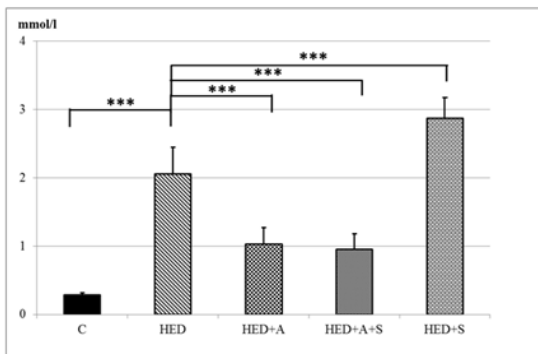
## Pokus 1

## Pokus 2

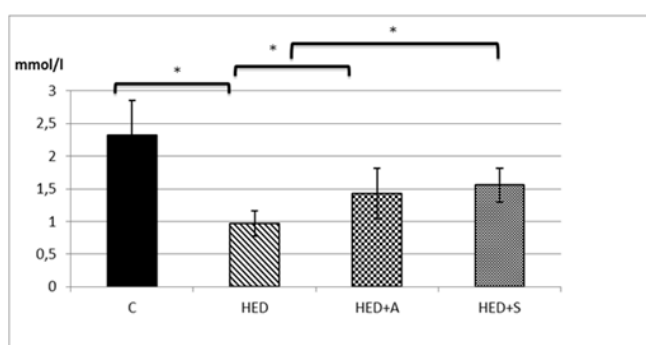
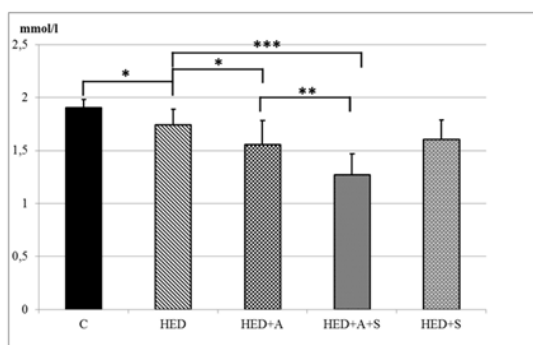
### TC cholesterol



### LDL cholesterol



### HDL cholesterol



C=control  
 HED=high energy diet  
 HED+A= high energy diet + amaranth flour  
 HED+A+S= high energy diet + amaranth flour + statin  
 HED+S<sub>(Pokus 1)</sub> = high energy diet + simvastatin  
 HED+S<sub>(Pokus 2)</sub> = high energy diet + squalene  
 \*=p<0,05  
 \*\*=p<0,01  
 \*\*\*=p<0,001

#### **5.4. Efekt simvastatinu a skvalenu na experimentálně indukovanou dyslipidemií**

Sedmi týdenní zkrmování diety obohacené o amarantovou mouku a simvastatin (HED+A+S) v Pokusu 1 vedlo ke statisticky významnému snížení TC cholesterolu o 46 %, LDL cholesterolu o 53 % a HDL cholesterolu o 27 % ve srovnání s HED skupinou. U skupiny krmené dietou obohacenou pouze o simvastatin nebyl zaznamenán pozitivní efekt na hladinu TC a LDL cholesterolu, na druhou stranu však nedošlo ani k negativnímu ovlivnění HDL cholesterolu. Sedmi týdenní zkrmování diety obohacené o skvalen (HED+S) v Pokusu 2 nevedlo k pozitivnímu ovlivnění TC a LDL cholesterolu, na druhou stranu však byl zaznamenáno statisticky významné zvýšení HDL cholesterolu o 60 % ve srovnání se skupinou HED.

### **6. DISKUZE**

#### **6.1. Efekt amarantové mouky na hmotnost**

Výsledky získané statistickou analýzou dietních přírůstků nenaznačily v obou experimentech žádný problém s nutriční hodnotou amarantové mouky, což je v souladu s pracemi, které ukázaly, že produkty z amarantu mohou být použity jako vhodná komponenta krmných směsí (Acar, et al., 1988).

#### **6.2. Efekt vysokoenergetické diety na TC LDL a HDL cholesterol**

Dle očekávání vedlo zkrmování HED diety v obou pokusech k negativnímu ovlivnění všech sledovaných parametrů (TC, LDL i HDL cholesterol). Obdobná pozorování související s dieteticky navozenou dyslipidemií učinili i další autoři provádějící experimenty na zvířecích modelech (Plate & Areas, 2002), (Kishida, et al., 2002).

#### **6.3. Efekt amarantové mouky na TC, LDL a HDL cholesterol**

Přidání amarantové mouky do krmné směsi vedlo v obou experimentech k pozitivnímu ovlivnění TC a LDL cholesterolu, což je v souladu s pozorováním, které učinili i další autoři studující vliv produktů amarantu na hladiny lipidů (Berger, et al., 2003b), (Andrea, et al., 2002), (Quereshi, et al., 1996). Z hlediska působení amarantové mouky na HDL cholesterol nebylo mezi oběma pokusy dosaženo konsenzuálních výsledků. Obdobnou nejednotnost je možno dohledat i v literatuře, kde lze nalézt jak data, která jsou v souladu s pozorováním

v Pokusu 2 (nárůst) (Berger, et al., 2003b), tak i data, která jsou v souladu s pozorováním v Pokusu 1 (pokles) (Chávez-Járegui, et al., 2010).

#### **6.4. Efekt simvastatinu a skvalenu na TC, LDL a HDL cholesterol**

Přidání **simvastatinu** k HED dietě v **Pokusu 1** nevedlo k poklesu celkového a LDL cholesterolu. Obdobě po přidání simvastatinu k dietě HED+A nebyl pozorován žádný pozitivní aditivní efekt na TC a LDL cholesterol. Toto pozorování je v souladu s faktem, že simvastatin, jako inhibitor 3-HMG-CoA reductázy, inhibuje tvorbu převážně endogenního cholesterolu, ale ne jeho exogenní příjem (Daskalopoulou & Mikhailidis, 2006). Tyto výsledky spolu s výsledky pokusu, provedeného na krysách (Takeda & Kiriyama, 1991) podporují hypotézu, která popisuje, že místo amarantové mouky účinku by mohlo být střevo. Hypotéza o schopnosti amarantové mouky blokovat vstřebávání cholesterolu ve střevě, je podpořena výsledky studie provedené na krysách se streptozotocinem indukovaným diabetem, kde bylo zjištěno statisticky významně zvýšené vylučování cholesterolu a žlučových kyselin stolicí (Kim, et al., 2006). Schopnost orálně podávaných amarantu semen a oleje interferovat s enterohepatálním cyklem žlučových kyselin byla popsána i Shinnem ve studii provedené na stejném zvířecím species (Shinn, et al., 2004). Na druhou stranu schopnost simvastatinu korigovat pokles HDL cholesterolu je pozitivní zjištění, které je v souladu s některými literárními údaji popisujícími schopnost statinů mírně zvýšit hladinu HDL cholesterolu (Češka, et al., 2012). Toto zjištění poukazuje na význam kombinace obou přístupů k léčbě dyslipidemií, jak farmakologické, tak nefarmakologické.

Přidání **skvalenu** k HED dietě v **Pokusu 2** nevedlo ke statisticky signifikantnímu poklesu TC a LDL cholesterolu a k statisticky signifikantnímu nárůstu hladiny HDL cholesterolu. Dle některých literárních zdrojů může být skvalen zodpovědný za schopnost amarantu snižovat hladinu cholesterolu v krevním séru (Andrea, et al., 2002), (Shinn, et al., 2004), (Martirosyan, et al., 2007). Na druhou stranu existuje řada prací, ve kterých je schopnost produktů z amarantu snižovat hladinu celkového a LDL cholesterolu atributovaná jiným složkám, například proteinové (Mendonca, et al., 2009) (Berger, et al., 2003) (Andrea, et al., 2002). Výsledky získané v Pokusu 2 podporují hypotézu, že amarantová mouka obsahuje více účinných látek, které se společně podílí na jejím finálním hypocholesterolemickém efektu.

## 7. ZÁVĚRY

Obě prezentované pilotní studie potvrdily potenciál amarantové mouky pozitivně ovlivnit patologicky zvýšené hladiny lipidů v séru u myši. Po porovnání výsledků s daty z dostupné literatury je možno postulovat, že primárním místem působení amarantové mouky je pravděpodobně střevo, kde může docházet k inhibici absorpce exogenně dodávaného cholesterolu. Data dále naznačují, že amarantová mouka obsahuje více účinných látek, které se společně podílí na jejím finálním hypocholesterolemickém efektu.

Na základě těchto výsledků, lze doporučit amarantovou mouku pro další testování jako komponenty vhodné pro dietní režimy u pacientů s dyslipidemií, včetně těch alergických na obiloviny, čímž by mohla přispět k prevenci i nefarmakologické léčbě tohoto typu poruch. Nicméně s ohledem na nejednotnost výsledků týkajících se HDL cholesterolu, a skutečnost, že metabolismus lipidů u myši se liší od metabolismu lipidů u člověka, jsou další pokusy u zvířat a především lidí nezbytné.

Vlastní provedené experimentální práce a rešerše literárních podkladů vyústily v publikaci souhrnného přehledu shrnujícího aktuální poznatky o amaranthu nejen u hlediska jeho vlivů na metabolismus plazmatických lipidů, ale i v širším kontextu prevence oběhových onemocnění.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Chatuverdi, A., Sarijimi, G. & Devi, N. L., 1993. Hypocholesterolemic effect of amaranth seeds (*Amaranthus esculantus*).. *Plant Foods Hum Nutr*, Issue 44, pp. 63-70.
- Conforti, F. a další, 2005. In vitro antioxidant effect and inhibition of alfa-amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds.. *Biol Pharm Bull*, Issue 28, pp. 1098-1102.
- Chávez-Járegui, R. N. a další, 2010. Effects of defatted amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) snacks on lipid metabolism of patients with moderate hypercholesterolemia. *Ciênc Tecnol Aliment*, Issue 30(4), pp. 1007-1010.
- Czerwiński, J. a další, 2004. Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol-containing diets. *J Nutr Biochem*, Issue 15(10), pp. 622-629.
- Češka, R. a další, 2012. *Cholesterol a ateroskléróza, léčba dyslipidemií*. Praha: Triton.
- Acar, N. a další, 1988. Nutritional Evaluation of Grain Amaranth for Growing Chickens. *Poult Sci*, Issue 67, pp. 1166-1173..
- Andrea, Y. A., Plate, J. & Areas, A. G., 2002. Cholesterol lowering effect of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hypercholesterolemic rabbits.. *Food Chem*, Issue 76, pp. 1-6.
- Becker, R. a další, 1981. A compositional study of amaranth grain.. *J Food Sci*, Issue 46, pp. 1175-1180.
- Belter, A. a další, 2011. Squalene monooxygenase – a target for hypercholesterolemic therapy. *Biol Chem*, Issue 392, pp. 1053-1075.
- Berger, A. a další, 2003b. Cholesterol-lowering properties of amaranth grain and oil in hamsters. *Int J Vitam Nutr Res*, Issue 73(1), pp. 39-47.
- Berger, A., Monnard, I. & Bilat, M., 2000b. Effects of highly palatable amaranth containing foods on cholesterol levels of hypercholesterolemic men: pilot study. *Faseb J*, Issue 14, p. 250.
- Berger, A. a další, 2003. Preparation of amaranth flakes, crude oils and refined oils for evaluation of cholesterol-lowering effect in hamsters.. *Food Chem*, Issue 81, pp. 119-124.

- Danz, R. A. & Lupton, J. R., 1992. Physiological-effects of dietary amaranth (*Amaranthus cruentus*) on rats. *Cereal Foods World*, Issue 37, pp. 489-494.
- Daskalopoulou, S. S. & Mikhailidis, D. P., 2006. Reaching goal in hypercholesterolaemia: dual inhibition of cholesterol synthesis and absorption with simvastatin plus ezetimibe. *Curr Med Res Opin*, Issue 22, pp. 511-528..
- de Castro, L. I. a další, 2013. Amaranth oil increased fecal excretion of bile Acid but had no effect in reducing plasma cholesterol in hamsters. *Lipids*. 2013, Issue 48(6), pp. 609-618.
- Grajeta, H., 1999. Effect of amaranth and oat bran on blood serum and liver lipids in rats depending on the kind of dietary fats.. *Nahrung*, Issue 43(2), pp. 114-117.
- Kabiri, N., Asgary, S., Madani, H. & Mahzouni, P., 2010. Effects of *Amaranthus caudatus* l. extract and lovastatin on atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *J Med Plant Res*, Issue 4(5), pp. 355-361.
- Kalač, P. & Moudrý, J., 2000. Composition and nutritional value of amaranth seeds. *Czech J Food Sci*, Issue 18, pp. 201-206.
- Kasozi, K. I. a další, 2012. Grain amaranth is associated with improved hepatic and renal calcium metabolism in type 2 diabetes mellitus of male Wistar rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, Issue 2018, pp. 1-10.
- Kim, H. K., Kim, M. J. & Shin, D. H., 2006. Improvement of lipid profile by amaranth (*Amaranthus esculantus*) supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Ann Nutr Metab*, Issue 50(3), pp. 277-281.
- Kishida, T., Nogami, H., Ogawa, H. & Ebihara, K., 2002. The hypocholesterolemic effect of high amylose cornstarch in rats is mediated by an enlarged bile acid pool and increased fecal bile acid excretion, not by cecal fermented products. *J Nutr*, Issue 132, pp. 2519-2524.
- Klimczak, I., Malecka, M. & Pacholek, B., 2002. Antioxidant activity of ethanolic extract of amaranth seeds. *Nahrung*, Issue 46, pp. 184-186.
- Lado, M. B. a další, 2015. Effects of the Dietary Addition of Amaranth (*Amaranthus mantegazzianus*) Protein Isolate on Antioxidant Status, Lipid Profiles and Blood Pressure of Rats. *Plant Foods Hum Nutr*, Issue 70(4), pp. 371-379.



- Lee, H. & Joo, N., 2018. Antioxidative Properties of Amaranth Cauline Leaf and Suppressive Effect against CT-26 Cell Proliferation of the Sausage Containing the Leaf. *Korean J Food Sci Anim Resour*, Issue 38(3), pp. 570-579.
- Maier, S. M., Turner, N. D. & Lupton, J. R., 2000. Serum lipids in hypercholesterolemic men and women consuming oat bran and amaranth products. *Cereal Chem*, Issue 77, p. 297–302.
- Martirosyan, D. M. a další, 2007. Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. *Lipids Health Dis*, Issue 6(1), pp. doi:10.1186/1476-511X-6-1.
- Mendonca, S., Saldiva, P. H., Cruz, R. J. & Areas, J. A. G., 2009. Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect.. *Food Chem*, Issue 116, pp. 738-742.
- Miettinen, T. A. & Vanhanen, H., 1994. Serum concentration and metabolism of cholesterol during rapeseed oil and squalene feeding.. *Am J Clin Nutr*, Issue 59, pp. 356-363.
- Montero-Quintero, K. C. a další, 2014. Effect of consumption of bread with amaranth (*Amaranthus dubius* Mart. ex Thell.) on glycemic response and biochemical parameters in Sprague dawley rats]. *Nutr Hosp*, Issue 31(3), pp. 313-320.
- Pasko, P. a další, 2011. Effect of amaranth seeds in diet on oxidative status in plasma and selected tissues of high fructose-fed rats. *Food Chem*, Issue 126, pp. 85-90.
- Pasko, P. a další, 2009. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chem*, Issue 115, pp. 994-998.
- Plate, A. Y. A. & Areas, J. A. G., 2002. Cholesterol-lowering effect of extruded amaranth (*Amranthus caudatus* L) in hypercholesterolemic rabbits.. *Food Chem*, Issue 77, pp. 297-302.
- Quereshi, A. A., Lehmann, J. W. & Peterson, D. M., 1996. Amaranth and its oil inhibit cholesterol biosynthesis in 6-week-old female chickens.. *J Nutr*, Issue 126, pp. 1972-1978.
- Shinn, D. H., Heo, H. J., Lee, Y. J. & Kim, H. K., 2004. Amaranth squalene reduces serum and liver lipid levels in rats fed a cholesterol diet. *Br J Biomed Sci*, Issue 61(1), pp. 11-14.
- Silva-Sanchez, C. a další, 2008. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *J Agric Food Chem* , Issue 56, pp. 1233-1240.
- Takeda, H. & Kiriyaama, S., 1991. Effect of feeding amaranth (food red no. 2) on the jejunal sucrase and digestionabsorption capacity of the jejunum in rats.. *J Nutr Sci Vitaminol*, Issue 37, pp. 611-623.

Tiengo, A., Faria, M. & Netto, F. M., 2009. Characterization and ACE-inhibitory activity of amaranth proteins. *J Food Sci*, Issue 74, pp. H121-126.

Tovar-Perez, E. G., Guerrero-Legarreta, I., Farres-Gonzales, A. & Soriano-Santos, J., 2009. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chem*, Issue 116, pp. 437-444.

Vecchi, B. & Anon, M. C., 2009. ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry*, Issue 70, pp. 864-870.

Velarde-Salcedo, A. J. a další, 2017. Consumption of amaranth induces the accumulation of the antioxidant protein paraoxonase/arylesterase 1 and modulates dipeptidyl peptidase IV activity in plasma of streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *J Nutrigenet Nutrigenomics*, Issue 10(5-6), pp. 181-183.

Vilacundo, R. a další, 2018. Inhibition of lipid peroxidation of kiwicha (*Amaranthus caudatus*) hydrolyzed protein using zebrafish larvae and embryos. *Plants (Basel)*, Issue 7(3), p. 69.

Walldius, G. a další, 2001. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. *The Lancet*, Issue 358, pp. 2026-2033.

Yusuf, S. a další, 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, Issue 364, pp. 937-952.

## 9. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

### 9.1. Publikace se vztahem k tématu dizertace

#### a) *S impakt faktorem*

CHMELÍK Z., KOTOLOVÁ H., PIEKUTOWSKA Z., HORSKÁ K., BARTOŠOVÁ L., SUCHÝ P., KOLLÁR P., 2013. A comparison of the impact of amaranth flour and squalene on plasma cholesterol in mice with diet-induced dyslipidaemia. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2013, 126, stránky 251-255. ISSN: 0005-9366, IF<sub>2012</sub>: 0.887

CHMELÍK Z., KOTOLOVÁ H., ZÁVALOVÁ V., BARTOŠOVÁ L., SUCHÝ P., KOLLÁR P., 2013. The effect of amaranth flour on plasma cholesterol profile in mice with diet-induced dyslipidemia. *Curr Top Nutraceut R.* 2013, 11, stránky 67-74. ISSN: 1540-7535, IF<sub>2012</sub>: 0.262

CHMELÍK Z., ŠNEJDRLOVÁ M., VRABLÍK M., 2019. Amaranth as a potential dietary adjunct of lifestyle modification to improve cardiovascular risk profile. *Nutr Res.* 2019, 72, stránky 36-45. ISSN: 0271-5317, IF<sub>2019</sub>: 2.627

#### b) *Bez impakt faktoru*

CHMELÍK Z., ZÁVALOVÁ V., SUCHÝ P., KOTOLOVÁ H., KOLLÁR P. 2009. Hypolipidemický účinek obsahových látek Amarantu. *Čes a slov Farm.* 2009, 58, stránky 200-202. ISSN 1210-7816

### 9.2. Publikace bez vztahu k tématu dizertace

#### a) *S impakt faktorem*

CHMELÍK Z., VACLOVÁ M., LÁNSKÁ V., LAŠTŮVKA J., VRABLÍK M. 2020. Analysis of incidence and prevalence of cardiovascular risk factors and evaluation of their control from an epidemiological survey in the Czech Republic. *CEJPH* 2020, 20(2), stránky 114-119. ISSN: 1803-1048, IF<sub>2018</sub>: 0.636

#### b) *Bez impakt faktoru*

VRABLÍK M., CHMELÍK Z., LÁNSKÁ V., 2014. Cardiovascular risk profile in 40-year-old men and 50-year-old women in the Czech Republic: results of a cross-sectional survey. *Vnitř Lék* 2014, 60(11), stránky 991-997. ISSN: 1801-7952

VRABLÍK M., CHMELÍK Z., LÁNSKÁ V., 2014. Kdy a jak určovat kardiovaskulární riziko? Lépe dříve nežli později... *Acta Med* 2015, 4(3), stránky 41-45. ISSN: 1805-398X

VRABLÍK M., CHMELÍK Z., LÁNSKÁ V., 2015. Cardiovascular risk profile in 40-year-old men and 50-year-old women in in ambulancies of general practitioners. *Practicus*. 2015, 14(8), stránky 15-19. ISSN: 1213-8711

CHMELÍK Z., VRABLÍK M., VACLOVÁ M., LÁNSKÁ V., 2016. Vysoká prevalence kardiovaskulárních rizikových faktorů a neuspokojivá kontrola hladin LDL-cholesterolu v populaci 40letých mužů a 50letých žen v České republice. *AtheroRev*. 2016, 1(3), stránky 111-115. ISSN: 2464-6555

CHMELÍK Z., VRABLÍK M., 2018. Familiární hypercholesterolemie, prenatální vývoj a ateroskleróza: Jak časovat kardiovaskulární prevenci? *Medicina po promoci*. 2018, 1, stránky 170-174. ISSN: 1212-9445

### 9.3. Prezentace na kongresech a sympoziích

1. 59. Farmakologické dni v Bratislavě: **Chmelík Z.**, Kotolová H., Kollár P. Testování hypocholesterolemického účinku amarantu a jeho srovnání se statiny na laboratorních myších. 2. – 4. 9. 2009
2. Prague European Days of Internal Medicine 2014: **Chmelík Z.**, Vrablík M. The effect of amaranth flour on plasma cholesterol levels: Another option for cardiovascular risk lowering? 18. – 20. 9. 2014
3. 18. kongres o ateroskleróze: **Chmelík Z.**, Vrablík M. Vliv amarantové mouky na hladinu plazmatického cholesterolu: další možnost pro snížení kardiovaskulárního rizika? 11. – 13. 12. 2014
4. 83. EAS Congress Glasgow: **Chmelík Z.**, Vrablík M. The effect of amaranth flour on plasma cholesterol levels: Another option for cardiovascular risk lowering? 22. – 25. 3. 2015
5. 17. ISA Congress Amsterdam: Vrablík M., **Chmelík Z.**, Lánská V. Cardiovascular risk profile in 40-year old men and 50-year old women in the Czech Republic: results of a cross-sectional survey. 23. – 26. 5. 2015
6. 19. kongres o ateroskleróze: **Chmelík Z.**, Vrablík M., Lánská V. Analýza kardiovaskulárního rizikového profilu 40 letých mužů a 50 letých žen účastnících se průřezové studie v České republice. 3. – 5. 12. 2015

7. 84. EAS congress Innsbruck: **Chmelík Z.**, Vrablík M., Lánská V. High prevalence of CVD risk factors and unsatisfactory control of LDL-C levels in 40 years old men and 50 years old women in the Czech Republic. 29. 5. – 1. 6. 2016