

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biologie

**Stanovení ochratoxinu A v močích nemocných s nádory
ledvin a vývodných močových cest**

Diplomová práce

Autor:

Bc. Darina Picková

Vedoucí práce:

doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.

Studijní program:

Biologie

Studijní obor:

Systematická biologie a ekologie

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: *Stanovení ochratoxinu A v močích nemocných s nádory ledvin a vývodných močových cest* vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

V Hradci Králové dne:

.....

Darina Picková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce panu doc. RNDr. Františku Malířovi, Ph.D. za odborné vedení a velmi přínosné konzultace při vypracování této diplomové práce. Dále bych poděkovala panu RNDr. Jakubovi Tomanovi za cenné rady při přípravě vzorků pro analýzu na HPLC-FLD. Zvláštní poděkování patří mému příteli a rodině, kteří mi svou podporou pomohli k dokončení diplomové práce.

Anotace

Cílem práce je stanovení ochratoxinu A v močích nemocných s nádory ledvin a vývodných močových cest, porovnání získaných výsledků s výsledky z národních a mezinárodních studií a úvaha, zda se ochratoxin A (nefrotoxický mykotoxin) nespolutvoří, vedle dalších etiologických agens (např. citrininu, kadmia, kouření, dietárních návyků a některých genetických faktorů) na etiopatogenezi karcinomu ledvin v ČR. ČR zaujímá v Evropě a ve světě první místo v četnosti těchto nádorů (diagnóza C64). Na základě uvedených informací budou u pacientů s touto diagnózou sbírány vzorky močí v Urologické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové. Následně budou vzorky močí analyzovány na ochratoxin A metodou HPLC s FLD za předchozí extrakce a separace na imunoafinitních kolonkách.

Klíčová slova

Ochratoxin A (OTA), moč, HPLC, imunoafinitní kolonky, nádory ledvin, diagnóza C64

Anotation

The aim of this study is to determine ochratoxin A in urine of patients with renal and urinary tract tumours, to compare the obtained results with the results of national and international studies and to consider whether ochratoxin A (a nephrotoxic mycotoxin) participates besides other etiological agents (for example citrinin, cadmium, smoking, dietary habits and some genetic factors) in the etiopathogenesis of renal carcinoma in the Czech republic. The Czech republic occupies the first place in the frequency of these tumours (diagnosis C64) in Europe and in the World. On the basis of the mentioned information, the urine samples of these patients will be collected at the Urological Clinic of the Faculty Hospital in Hradec Králové. Then the samples of urine will be analysed for ochratoxin A by HPLC-FLD method after previous extraction and separation on immunoaffinity columns.

Key words

Ochratoxin A (OTA), urine, HPLC, immunoaffinity columns, tumours of kidneys, diagnosis C64

Obsah

ÚVOD A CÍL PRÁCE	16
ÚVOD DO PROBLEMATIKY	18
1 OCHRATOXIN A (OTA)	20
1.1 CHEMICKÉ A FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI OTA	20
1.1.1 <i>Synonymní a obchodní názvy OTA</i>	20
1.1.2 <i>Molekulový a strukturní vzorec OTA</i>	21
1.1.3 <i>Chemické a fyzikální vlastnosti čisté látky</i>	21
1.2 PRODUCENTI OTA	21
1.2.1 <i>Producenti OTA rodu Aspergillus</i>	21
1.2.2 <i>Producenti OTA z rodu Penicillium</i>	24
1.3 VÝSKYT OTA V POTRAVINÁCH	25
1.3.1 <i>Systém zajištění bezpečnosti potravin a krmiv</i>	26
1.3.2 <i>Regulace mykotoxinů</i>	27
1.4 TOXIKOLOGICKÉ HODNOCENÍ OTA	29
1.4.1 <i>Toxicita</i>	29
1.4.2 <i>Toxikokinetika</i>	31
1.4.3 <i>Hodnocení působení OTA</i>	39
1.4.4 <i>Způsoby hodnocení dietární expozice mykotoxinům</i>	40
2 DIAGNÓZA C64 (TUMOR LEDVIN MIMO PÁNVIČKU)	41
2.1 DIAGNÓZA C64-66 – POROVNÁNÍ ČESKÉ REPUBLIKY S OSTATNÍMI ZEMĚMI V POČTU INCIDENCÍ V PŘEPOČTU NA 100 000 OSOB.....	42
2.2 DIAGNÓZA C64-66 – POROVNÁNÍ ČESKÉ REPUBLIKY S OSTATNÍMI ZEMĚMI V POČTU INCIDENCÍ V PŘEPOČTU NA SVĚTOVÝ STANDARD (ASR-W).....	43
2.3 DIAGNÓZA C64 - POROVNÁNÍ INCIDENCE A MORTALITY V ČR V LETECH 1977-2014 A PŘEDPOVĚĎ DALŠÍHO VÝVOJE DO ROKU 2020	45
2.4 DIAGNÓZA C64 - POROVNÁNÍ INCIDENCE A MORTALITY V ČR V LETECH 1977-2014 DLE POHLAVÍ.....	46
2.5 DIAGNÓZA C64 - POROVNÁNÍ INCIDENCE A MORTALITY V ČR V LETECH 1977-2014 DLE VĚKOVÝCH SKUPIN	47

3	TEORETICKÉ ZÁSADY MANIPULACE S BIOLOGICKÝM MATERIÁLEM (MOČÍ) V PREANALYTICKÉ FÁZI (TJ. PŘED ANALÝZOU).....	50
3.1	MANIPULACE S BIOLOGICKÝM MATERIÁLEM PŘED ANALÝZOU – TEORETICKÉ INFORMACE.....	50
3.1.1	<i>Sběr 24hodinové moče.....</i>	<i>50</i>
3.1.2	<i>Transport a skladování moče.....</i>	<i>51</i>
3.1.3	<i>Přijetí materiálu a jeho evidence.....</i>	<i>51</i>
4	STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP (SOP): STANOVENÍ OCHRATOXINU A (OTA) V MOČI METODOU HPLC-FLD	53
4.1	PŘEDMĚT A VYMEZENÍ PŮSOBNOSTI A DEFINICE	53
4.2	PRINCIP.....	53
4.3	BEZPEČNOST.....	54
4.4	SBĚR, DOPRAVA A PŘEDÁNÍ VZORKŮ	54
4.5	CHEMIKÁLIE A SPOTŘEBNÍ MATERIÁL.....	56
4.5.1	<i>Základní chemikálie.....</i>	<i>56</i>
4.5.2	<i>Spotřební materiál.....</i>	<i>56</i>
4.5.3	<i>Roztoky.....</i>	<i>56</i>
4.5.4	<i>Přístroje a pomocná zařízení.....</i>	<i>57</i>
5	POSTUP.....	59
5.1	PŘÍPRAVA VZORKŮ A SEPARACE OTA NA IMUNOAFINITNÍCH KOLONKÁCH	59
5.2	LABORATORNÍ NÁDOBÍ - DEKONTAMINACE	60
5.3	POPIS CHROMATOGRAFICKÉHO POSTUPU PŘI ANALÝZE OTA NA HPLC-FLD	61
5.4	UVEDENÍ MĚŘICÍHO PŘÍSTROJE DO CHODU A JEHO NASTAVENÍ	61
5.5	PODMÍNKY CHROMATOGRAFICKÉHO STANOVENÍ.....	61
5.6	POTVRZENÍ OTA ANALÝZOU METYLESTERU OCHRATOXINU A.....	62
5.7	VÝTĚŽNOST EXTRAKCE A ČISTÍCÍHO POSTUPU	62
6	VÝSLEDKY	64
6.1	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU OTA V MOČÍCH.....	64
6.2	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBJEMU A HMOTNOSTI MOČÍ.....	66
6.3	VÝSLEDKY STANOVENÍ KREATININU V MOČÍCH.....	67
6.4	POROVNÁNÍ KONCENTRACÍ OTA V MOČI S DALŠÍMI STUDIEMI	67

6.4.1 Porovnání koncentrací OTA v moči [ng/l] nemocných a zdravých jedinců v České republice	68
6.4.2 Porovnání koncentrací OTA v moči [ng/l] nemocných českých pacientů se zdravou populací v zahraničí.....	71
DISKUSE.....	74
ZÁVĚR	76
POUŽITÁ LITERATURA.....	78
ZDROJE POUŽITÝCH OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ	86
PŘÍLOHY	89

Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázky

Obr. 1	Strukturní vzorec ochratoxinu A (Malir <i>et al.</i> , 2013).....	21
Obr. 2	Mikrohabitus rodu <i>Aspergillus</i> – typy konidioforů: (a) uniseriální (fialidy), (b) biseriální (fialidy + metuly) – upraveno dle (Ellis <i>et al.</i> , 2007)	22
Obr. 3	Mikrohabitus rodu <i>Penicillium</i> - typy konidioforů: (a) monovercicilární (jednoduchý nevětvený), (b) biverticilární (jednostupňový rozvětvený), (c) terverticilární (dvoustupňový rozvětvený), (d) quaterverticilární (třístupňový rozvětvený) – upraveno dle Ellis <i>et al.</i> (2007)	24
Obr. 4	Schematické znázornění fungování systému RASFF, zpracováno dle (SZPI, 2011) ...	27
Obr. 5	Způsoby degradace OTA: hydrolýza a) peptidické vazby b) laktonového kruhu (Abrunhosa <i>et al.</i> , 2010)	35
Obr. 6	Biotransformace OTA (Kőszegi <i>et al.</i> , 2016).....	36
Obr. 7	Schéma extrakce OTA pomocí imunoafinitní kolonky, upraveno dle (Klabačková, 2016).....	59
Obr. 8	Rozmražené vzorky moči	97
Obr. 9	Filtrační aparatura.....	97
Obr. 10	Čištění vzorku moči pomocí prosávacího zařízení.....	98
Obr. 11	Kolonky s násadcem naplněným močí	99
Obr. 12	Promývání kolonky PBS pufrem.....	100
Obr. 13	Kolonky s násadcem naplněným PBS pufrem	101
Obr. 14	Eluce OTA metanolem	102
Obr. 15	Kolonky s násadcem naplněným metanolem	103
Obr. 16	Odpařování eluátu dusíkem pomocí koncentrátoru EVATERM při 45,5 °C.....	104
Obr. 17	Detail na vialku s eluátem odpařovaným dusíkem	105
Obr. 18	Vzorky po odpaření eluátu	106
Obr. 19	Zápis o zpracování vzorku.....	106
Obr. 20	HPLC-FLD	107

Tabulky

Tab. 1 Základní taxonomické schéma rodu <i>Aspergillus</i> (Ostrý & Škarková, 2003).....	22
Tab. 2 Druhy rodu <i>Aspergillus</i> produkující OTA v potravinách (Ostry <i>et al.</i> , 2013)	23
Tab. 3 Základní taxonomické schéma rodu <i>Penicillium</i> (BioLib, 2018).....	24
Tab. 4 Druhy rodu <i>Penicillium</i> produkující OTA v potravinách (Ostry <i>et al.</i> , 2013)	25
Tab. 5 Maximální limity OTA v potravinách/ krmivech platné pro ČR (Evropská komise, 2006; Evropská komise, 2010; Evropská komise, 2012; Evropská komise, 2015).....	28
Tab. 6 Nově navrhované limity pro OTA v potravinách diskutované v EK; zpracováno dle (MZe, Odbor bezpečnosti potravin, 2018).....	29
Tab. 7 Kategorizace věkových skupin (SVOD, 2017)	43
Tab. 8 Výťažnost extrakčního metody (Ostry <i>et al.</i> , 2010; Dohnal <i>et al.</i> , 2013; Skarkova <i>et al.</i> , 2013).....	63
Tab. 9 Opakovatelnost metody (Ostry <i>et al.</i> , 2010; Dohnal <i>et al.</i> , 2013; Skarkova <i>et al.</i> , 2013).	63
Tab. 10 Diagnózy C64-66 (ZN ledvin, ledvinné pánvičky, močovodu) – Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi Evropy v přepočtu na 100 000 osob, rok 2008, uvedeno prvních 20 zemí; zpracováno dle (SVOD, 2017).....	89
Tab. 11 Diagnózy C64-66 (ledvina, ledvinná pánvička, močovod) – Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi světa v přepočtu na 100 000 osob, rok 2008, uvedeno prvních 20 zemí; zpracováno dle (SVOD, 2017).....	89
Tab. 12 Diagnózy C64-66 (ledvina, ledvinná pánvička, močovod) – Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi Evropy v přepočtu na světový standard - ASR (W), rok 2008, uvedeno prvních 20 zemí; zpracováno dle (SVOD, 2017)	89
Tab. 13 Diagnózy C64-66 (ledvina, ledvinná pánvička, močovod) – Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi světa v přepočtu na světový standard - ASR (W), rok 2008, uvedeno prvních 20 zemí; zpracováno dle (SVOD, 2017)	90
Tab. 14 Absolutní počty incidencí a mortalit a míra úmrtnosti v ČR (1977-2014); zpracováno dle (SVOD, 2017).....	90
Tab. 15 Předpověď vývoje incidence, mortality a míry úmrtnosti v ČR v letech 2015-2020; zpracováno dle (SVOD, 2017).....	90
Tab. 16 Dg. C64 - absolutní počty incidencí a mortalit v ČR dle pohlaví v letech 1977-2014; zpracováno dle (SVOD, 2017).....	91

Tab. 17 Diagnóza C64 – Incidence, mortalita a míra úmrtnosti populace v ČR dle věkových skupin v přepočtu na 100 000 os. v dané věkové skupině, rok 2014; zpracováno dle (SVOD, 2017; PopulationPyramid, 2017)	91
Tab. 18 Záznam dat o pacientech	92
Tab. 19 Statistické zpracování dat pacientů.....	93
Tab. 20 Obsah OTA v močích	93
Tab. 21 Statistické vyhodnocení obsahu OTA v močích.....	94
Tab. 22 Objem a hmotnost močí.....	94
Tab. 23 Statistické vyhodnocení objemu močí.....	94
Tab. 24 Statistické vyhodnocení hmotnosti močí.....	94
Tab. 25 Obsah kreatininu v moči a přepočet množství OTA na g kreatininu	95
Tab. 26 Statistické vyhodnocení obsahu kreatininu v moči	95
Tab. 27 Porovnání koncentrací OTA v moči [ng/l] nemocných pacientů (s dg. C64) se zdravou populací (bez dg. C64) v rámci České republiky; částečně zpracováno dle (Ostry <i>et al.</i> , 2010).....	96
Tab. 28 Porovnání nemocných Čechů ze zdravými populacemi ve Španělsku, Maďarsku a Portugalsku; částečně zpracováno dle (Fazekas <i>et al.</i> , 2005; Manique <i>et al.</i> , 2008)	96

Grafy

Graf. 1 Diagnózy C64-66 (ZN ledvin, ledvinné pánvičky, močovodu) – Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi Evropy v přepočtu na 100 000 osob, rok 2008, uvedeno prvních 20 zemí (SVOD, 2017).....	42
Graf. 2 Diagnózy C64-66 (ZN ledvin, ledvinné pánvičky, močovodu) - Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi v přepočtu na 100 000 obyvatel, rok 2008, uvedeno prvních 20 zemí (SVOD, 2017).....	43
Graf. 3 Diagnózy C64-66 (ZN ledvin, ledvinné pánvičky, močovodu) – Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi Evropy v přepočtu na světový standard, rok 2008, uvedeno prvních 20 zemí (SVOD, 2017).....	44
Graf. 4 Diagnózy C64-66 (ZN ledvin, ledvinné pánvičky, močovodu) – Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi světa v přepočtu na světový standard, rok 2008, uvedeno prvních 20 zemí (SVOD, 2017).....	44
Graf. 5 Diagnóza C64 – Incidence, mortalita a míra úmrtnosti v ČR v letech 1977-2014 s předpovědí dalšího vývoje do roku 2020 (SVOD, 2017).....	46

Graf. 6 Diagnóza C64 - absolutní počty incidencí a mortalit v České republice dle pohlaví v letech 1977-2014 (SVOD, 2017).....	47
Graf. 7 Diagnóza C64 – Incidence, mortalita a míra úmrtnosti v České republice dle věkových skupin v přepočtu na 100 000 os., rok 2014 (SVOD, 2017; PopulationPyramid, 2017).....	48
Graf. 8 Diagnóza C64 – Incidence a mortalita v ČR dle pohlaví a věkových skupin v přepočtu na 100 000 os., rok 2014 (SVOD, 2017; PopulationPyramid, 2017)	49
Graf. 9 Porovnání množství jedinců s pozitivními/negativními výsledky na přítomnost OTA v moči	65
Graf. 10 Porovnání koncentrací OTA v moči [ng/l] pacientů s diagnózou C64 celkově a dle pohlaví (Pozn.: negativní výsledky znázorněny světlými barvami, pozitivní výsledky znázorněny tmavými barvami)	65
Graf. 11 Slepý vzorek (blank).....	108
Graf. 12 Standard 0,4 ng/ml.....	108
Graf. 13 Standard 4 ng/ml.....	108
Graf. 14 Záznam pozitivního vzorku s dalšími píky - pravděpodobně metabolity	109

Terminologický slovník

Afinita	Tendence jedné látky sloučit se s druhou látkou nebo jinými částicemi
Analyt	Konkrétní látky/složky vzorku/směsi rozdílně od sebe chromatograficky separovány – a to na základě rozdílné distribuce mezi stacionární a mobilní fází
Duodenum	Dvanáctník – počáteční úsek tenkého střeva
Embryotoxicita	Toxicita pro embryo (zárodek)
Genotoxicita	Toxicita pro genetický materiál
Hepatotoxicita	Toxicita pro jaterní tkáň
Chromatograf	Přístroj používaný pro chromatografii; pro kapalinovou chromatografii se používá vysokoúčinný kapalinový chromatograf (HPLC)
Chromatogram	Grafický záznam odezvy detektoru, na kterém je zaznamenána série vrcholů (píků); každý pík udává svou polohou kvalitativní informaci a plochou pak kvantitativní informaci o analytu
Ileum	Kyčelník – spodní úsek tenkého střeva
Imunotoxicita	Toxicita pro imunitní systém
In vitro	„Ve skle“ – tzn. mimo živé tělo, v laboratorním skle – např. zkumavce
In vivo	„V živém“ – tzn. v živém nebo na živém těle, zaživa
Incidence	Počet nově hlášených nemocných v daném období
Karcinogenita	Schopnost vyvolat rakovinový nádor
Mez detekce	Nejnižší koncentrace analytu, kterou lze danou vyšetřovací metodou prokázat a bezpečně ji lze odlišit od přístrojového šumu (tj. náhodné fluktuace signálu detektoru)
Mez stanovitelnosti	Nejnižší koncentrace analytu, kterou lze vyšetřovací metodou stanovit s požadovanou hodnotou nejistoty měření (dle IUPAC definovaná jako variační koeficient rovný 10 %)
Míra úmrtnosti	Poměr mortality a incidence
Mobilní fáze	Také eluent, pohyblivá fáze - kapalina (u kapalinové chromatografie)
Mortalita	Úmrtnost, počet zemřelých na určité onemocnění v daném období
Mutagenita	Schopnost vyvolat genetickou mutaci
Nefron	Základní stavební buňka ledvin
Nefrotoxicita	Toxicita pro ledviny, vylučovací systém
Neurotoxicita	Toxicita pro nervovou soustavu
Pík	Eluční křivka tvaru Gaussovy křivky znázorněná na chromatogramu, přičemž poloha určuje identitu analytu a plocha množství látky – tj. kvantitu analytu
Retenční čas	Celkový čas [min.] od doby nástřiku vzorku do doby zaznamenání vrcholu píku analytu (detektorem)
Retenční vzdálenost	Vzdálenost [cm] vrcholu píku od počátku chromatogramu – tzn. od nástřiku vzorku na kolonu
Stacionární fáze	Také sorbent, nepohyblivá fáze tvořena pevnou látkou nebo filmem kapaliny zakotveným na pevné látce. V HPLC stacionární fáze nejčastěji používá silikagel, velmi často také oktadecylsilan (ODS).
Standard	Obecně uznávaný vzor umožňující kvalitativní i kvantitativní porovnání
Ureter	Močovod
Vialka	Jednorázová skleněná lahvička (většinou o objemu 1,5 ml) se šroubovacím či krimpovacím víčkem opatřeným septem, které je při nástřiku propíchnuto jehlou

Seznam zkratek

10-OH OTA	10-hydroxyochratoxin A
4-OH OTA	4-hydroxyochratoxin A
ASR-W	Světový standard (Age Standardized Rate-World)
BEN	Balkánská endemická neropatie
BM	Biologický materiál
ČR	Česká republika
DON	Deoxynivalenol
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food safety Authority)
EK	Evropská komise
EU	Evropská unie
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FLD	Fluorescenční (fluorimetrický) detektor
FN HK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
FUM	Fumonisin
HPLC-FLD	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí (High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection)
I	Incidence
<i>i.p.</i>	Intraperitoneální – podání do břišní (peritoneální) dutiny
IAK	Imunoafinitní kolonka
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistotu a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
JECFA	Společný výbor expertů FAO/WHO pro potravinářské přídatné látky (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)
LC	Kapalinový chromatograf (Liquid Chromatograph)
LD₅₀	Střední letální dávka (lat. <i>dosis letalis media</i>) – tj. dávka, která způsobí úhyn 50 % testovaných jedinců
LEV	Laboratorní evidence vzorků
LIS	Laboratorní informační systém
LOAEL	Nejnižší dávka, při které byl pozorován škodlivý účinek (Lowest Observed Adverse Effect Level)
LOD	Mez detekce (Limit of Detection)
LOQ	Mez stanovitelnosti (Limit of Quantification)
M	Mortalita
M:I	Míra úmrtnosti, poměr mortality k incidenci
MF	Mobilní fáze
MO	Ministerstvo obrany
MV	Ministerstvo vnitra
MZe	Ministerstvo zemědělství
NCRI	Zanedbatelný přívod pro riziko rakoviny (Negligible Cancer Risk Intake)
NOAEL	Dávka, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek (No Observed

	Adverse Effect Level)
NRL	Národní referenční laboratoř
OAT	Transportéry organických aniontů (Organic Anion Transporters)
OATP	Polypeptidové transportéry organických aniontů (Organic Anion-Transporting Polypeptide)
ODS	Oktadecylsilan
OOVZ	Orgány ochrany veřejného zdraví
OP-OTA	Otevřená laktonová forma OTA (Lactone-Opened Ochratoxin A)
OTA	Ochratoxin A
OTB	Ochratoxin B
OTC	Ochratoxin C
OTα	Ochratoxin α
p.o.	Perorální (lat. <i>per os</i>) – podání ústy
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PT	Proximální tubulus
PTWI	Prozatímní tolerovatelný týdenní přívod (Provisional Tolerable Weekly Intake)
RASFF	Evropský systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (Rapid Alert System for Food and Feed)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
SCF	Vědecký výbor pro potraviny (Scientific Committee on Food)
SF	Stacionární fáze
ST	Sulfotransféráza
SÚJB	Státní úřad pro jadernou bezpečnost
SVS	Státní veterinární správa
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
TDLO	Nejnižší toxická dávka (Toxic Dose Low)
tR	Retenční čas (The Retention Time)
TWI	Tolerovatelný týdenní přívod (Tolerable Weekly Intake)
UGT	Uridindifosfát glukuronosyltransferáza
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
VSD	Prakticky bezpečná dávka (Virtually Safe Dose)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
ZEA	Zearalenon
ZN	Zhoubný nádor
ZÚ	Zdravotní ústav

Úvod a cíl práce

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity vláknitých mikroskopických hub (plísní). Patří mezi jedny z nejzávažnějších přírodních kontaminantů a jejich výskyt může každoročně kolísat. Dnes je známo více než 400 mykotoxinů a v lidském okolí se ve významných koncentracích vyskytuje asi 20 mykotoxinů. Mykotoxiny si zaslouží celosvětovou pozornost, protože vykazují negativní dopady nejen na zdraví člověka a zvířat, ale také způsobují ekonomické ztráty v důsledku kontaminace surovin, potravin a krmiv.

Cílem diplomové práce je stanovení mykotoxinu ochratoxinu A v močích nemocných s nádory ledvin a vývodných močových cest, porovnání získaných výsledků s národními a mezinárodními studiemi a úvaha zda se ochratoxin A (nefrotoxický mykotoxin) nespolutodílí, vedle dalších etiologických agens (např. citrininu, kadmia, kouření a dietárních návyků) a také některých genetických faktorů, na etiopatogenezi karcinomu ledvin v ČR, protože ČR je na prvním místě na světě v četnosti výskytu těchto nádorů.

Ochratoxin A (OTA) je považovaný za druhý nejvýznamnější mykotoxin. Je produkován zejména dvěma rody vláknitých mikroskopických hub, a to *Aspergillus* a *Penicillium*. Nebezpečí OTA spočívá především v jeho toxicitě představující pro zdraví lidské populace značné riziko, a proto je nezbytné monitorovat jeho výskyt a množství zejména v potravinách - a to jak rostlinného, tak živočišného původu, neboť potraviny (ale i krmiva) představují majoritní způsob přívodu do lidského (případně zvířecího organismu). Kromě toho je možné monitorovat expozici populace pomocí tzv. biomarkerů (metabolitů). Z negativních dopadů OTA, jak na zdraví lidské, tak zvířecí populace, lze jmenovat např. karcinogenní, teratogenní, hepatotoxické, embryotoxické, neurotoxické, imunotoxické, genotoxické a hlavně nefrotoxické účinky. Právě poslední zmiňované účinky stojí za podezřením, zda se taky i tento mykotoxin nespolutodílí na vzniku nádorů ledvin a vývodných močových cest. V České republice toto onemocnění představuje závažný problém a ČR v současnosti zaujímá celosvětový primát v četnosti těchto nádorů (viz veřejný portál „*Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice*“ - www.svod.cz). Příčiny vzniku nádoru ledvin nejsou jednoznačně objasněny, nicméně se předpokládá tzv. multifaktoriální působení.

Na Urologické klinice ve Fakultní nemocnici Hradec Králové (FN HK) byly od dubna roku 2015 do listopadu roku 2017 odebírány vzorky močí, krve a po operaci i vzorky nádorů a okolní ledvinné tkáně. U celkem 50 pacientů byly stanoveny následující diagnózy: diagnóza C64 – tj. zhoubný nádor ledvin mimo pánvičku (celkem u 48 jedinců – z toho u 38 mužů

a 10 žen), diagnóza N131 – tj. hydronefróza se strikturou ureteru (u 1 jedince – ženy) a diagnóza C675 – tj. zhoubný nádor hrdla močového měchýře (u 1 jedince – muže).

Tato práce se zabývá stanovením koncentrací OTA v močích pacientů především s nádory ledvin mimo pánvičku, ale výše zmíněné dva případy s odlišnými diagnózami jsou rovněž zahrnuty do celkového přehledu 50 vzorků moči, protože souvisejí s močovými cestami. Vyšetření moče bylo preferováno vzhledem k její snadné dostupnosti a šetrnému odběru u pacientů - obvykle prováděnému neinvazivním způsobem. Moč navíc patří v klinické praxi mezi nejčastěji vyšetřované biologické materiály.

Vlastní tzv. preanalytická část práce zahrnuje vedle odběru, skladování, transportu, příjmu a evidence biologického materiálu (moči) příslušnou laboratoří také jeho úpravu a je časově nejnáročnější, avšak velmi důležitá pro docílení správných a přesných výsledků.

Pro stanovení OTA ve vzorku (tzn. pro jeho kvalitativní i kvantitativní stanovení) byla použita metodika vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenčním detektorem (HPLC-FLD).

Před samotným stanovením je však nejprve nutná úprava vzorku moče z důvodu odstranění pro analýzu OTA nepotřebných (tzv. balastních) látek. Pro úspěšnou analýzu OTA je nezbytná jeho předchozí extrakce z biologického materiálu – a to ze vzorků moče pomocí imunoafinitních kolonek specifických pro OTA.

Úvod do problematiky

První zmínka o mykotoxinech pochází z roku 1955, kdy tento termín použili ve svém díle Forgzat a Carll (Ostrý, 2000). Mykotoxiny lze volně přeložit jako houbové jedy podle řeckého *mycos* či *mykes* (= houba) a latinského *toxicum* (= jed, otrava) (Malíř *et al.*, 2005; Suchý & Herzig, 2005). Pro vláknité mikroskopické houby byl zaveden v polovině 19. století J. S. Preslem také termín „plísně“, který má ekvivalent i v anglickém (moulds), německém (die Schimmelpilze) a francouzském jazyce (moisissure) (Ostrý, 2000).

Mykotoxiny jsou jedny z nejzávažnějších kontaminantů přírodního původu – produkované vláknitými mikroskopickými houbami, a proto jsou zařazeny mezi tzv. naturální toxiny či biotoxiny (Hrdina *et al.*, 2004; Malíř *et al.*, 2005). Těmito látkami se zabývá jedna z disciplín toxikologie, tzv. toxikologie přírodních látek (též toxinologie), která zkoumá jejich vznik, způsob izolace a účinek na jiné živé organismy, především člověka (Patočka, 2005).

Kvůli negativnímu dopadu mykotoxinů na lidské zdraví je třeba jim věnovat neustálou pozornost (Ostry *et al.*, 2017) – a to z důvodu jejich možného toxického působení (Ostrý & Škarková, 2003), tak kvůli ekonomickým ztrátám prostřednictvím kontaminovaných surovin a potravin (Ostry *et al.*, 2017).

Od roku 1960 po současnost bylo identifikováno více než 400 mykotoxinů (Etsel, 2002; Malíř, 2010). Z tohoto počtu se v okolí člověka ve významných množstvích vyskytuje přibližně 5 %, tj. 20 mykotoxinů (Malíř *et al.*, 2005).

Dle velikosti a četnosti dávek mohou být toxické účinky mykotoxinů na zdraví člověka a zvířat akutní – charakterizované vysokou dávkou, rychlým nástupem a zjevnou toxicitou zahrnující rychlou smrt, nebo chronické – charakterizované nízkými dávkami za delší časové období – či dokonce po dobu celého života (Malir *et al.*, 2006; Ostry *et al.*, 2017). Většina mykotoxinů vykazuje relativně nízkou akutní toxicitou, takže jejich nebezpečí tkví především v chronickém působení, které se projevuje daleko závažněji, a to vývojovou toxicitou (např. teratogenitou), mutagenitou, genotoxicitou a především karcinogenitou (Hrdina *et al.*, 2004; Patočka *et al.*, 2004; Pfohl-Leszkowics, 2009; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2007).

Z dalších negativních dopadů na lidské či zvířecí zdraví lze jmenovat účinky imunopresivní, hemoragické, neurotoxické, cytotoxické, nefrotoxické, hepatotoxické a estrogenní (Malíř *et al.*, 2005). V České republice (dále ČR) jsou považované za významné právě pozdní účinky - mezi které patří i karcinogenní (Malíř *et al.*, 2005), ke kterým dochází v důsledku opakovaného požití nízkých dávek mykotoxinů z potravin (Malir *et al.*, 2006).

Problematikou hodnocení karcinogenity (včetně hodnocení karcinogenního rizika mykotoxinů a jejich klasifikací) se v Evropě zabývá Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC), jako součást Světové zdravotní organizace (WHO), se sídlem v Lyonu. Na základě hodnocení zdravotních rizik pro člověka bylo vytvořeno následujících pět skupin: skupina 1 – „prokázaný karcinogen“, skupina 2A – „pravděpodobný karcinogen“, skupina 2B – „možný karcinogen“, skupina 3 – „zatím není klasifikován jako karcinogen“ a skupina 4 – „pravděpodobně nekarcinogenní“ (Ostry *et al.*, 2017).

Mykotoxiny jsou majoritně přiváděny do lidského organismu konzumací kontaminovaných potravin. Jiné vstupní cesty, jako transdermální či inhalační, jsou považovány pro běžnou populaci za minoritní (Malíř *et al.*, 2005; Malíř, 2010; Malir *et al.*, 2016), ovšem i takovéto způsoby příjmu mohou u menších exponovaných skupin populace hrát významnou roli, zejména pak u profesionálně exponovaných pracovníků v zemědělství, textilním průmyslu, mykotoxikologických laboratořích apod. (Malíř *et al.*, 2005; Malíř, 2010).

Proto je regulace mykotoxinů v potravinách a krmivech nezbytná, ale dosud ve všech zemích není možná. Např. v rozvojových zemích by dodržování legálních limitů určujících maximální přípustné koncentrace škodlivých látek (mykotoxinů) mělo za následek nedostatek potravin a tím i navýšení jejich ceny (Malíř *et al.*, 2005). Pro ČR jsou však platné právní předpisy EU, které stanovují maximální limity mykotoxinů v potravinách. Nejsou-li k dispozici regulační limity, lze využít tzv. expoziční limity, které se však uplatňují až při charakterizaci zdravotního rizika po provedení dietární expozice.

Mezi nejznámější producenty mykotoxinů patří 5 rodů vláknitých mikroskopických hub: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* a *Alternaria* (Malíř *et al.*, 2005). Z hlediska dané problematiky jsou významné zejména rody *Aspergillus* a *Penicillium*, neboť produkují mykotoxin ochratoxin A (OTA), druhý nejvýznamnější mykotoxin (Bhat *et al.*, 2010), který je především předmětem této studie.

1 Ochratoxin A (OTA)

OTA byl objeven a chemicky charakterizován v Jihoafrické republice v roce 1965 van der Merwem (Van der Merwe *et al.*, 1965a; Van der Merwe *et al.*, 1965b), kdy byl poprvé izolován z kultury *Aspergillus ochraceus* rostoucí na sterilní navlhčené kukuřičné mouce (IARC, 1983; Malir *et al.*, 2016). Dle způsobu biosyntézy se OTA řadí mezi pentaketidy (Ostrý, 2012). Fenylalaninová část OTA pochází ze šikimátové metabolické dráhy, kdežto dihydroizokumarinová část z polyketidové (pentaketidové) dráhy, přičemž tato druhá dráha se liší mezi rody *Aspergillus* a *Penicillium* (Heussner & Bingle, 2015). Z chemického hlediska je řazen do skupiny ochratoxinů spolu s dalšími typy (B, C, D, α) (Ostrý *et al.*, 2005; Ostrý, 2012), ovšem OTA je z nich nejrozšířenější, nejvýznamnější (Hrdina *et al.*, 2004) a nejtoxičtější (Šimůnek, 2004; Modrá *et al.*, 2014; Heussner & Bingle, 2015), a tudíž pro člověka představuje největší riziko. Samostatnou skupinou jsou metabolity ochratoxinu A např. OP-OTA, OTQ, OTHQ, které jsou ještě toxičtější než OTA (Heussner & Bingle, 2015; Malir *et al.*, 2016). Stejně toxický jako OTA je i OTC, nicméně v přírodě se nachází v podstatně nižších koncentracích (Creppy & Dirheimer, 1991).

Zajímavou skutečností je fakt, že OTA, OTB a OTC mohou být produkovány současně a jejich společný výskyt tak může vést k synergickému toxickému spolupůsobení (Ostry *et al.*, 2013). U psů, myší a potkanů byl prokázán také synergismus OTA s citrininem (CIT) - mykotoxinem jednoho z OTA-producentů, *P. verrucosum*. Naopak antagonistický účinek těchto dvou mykotoxinů byl prokázán u kuřat (Malíř, 2010). Mezi OTA a CIT existuje také aditivní účinek (Ostry *et al.*, 2013).

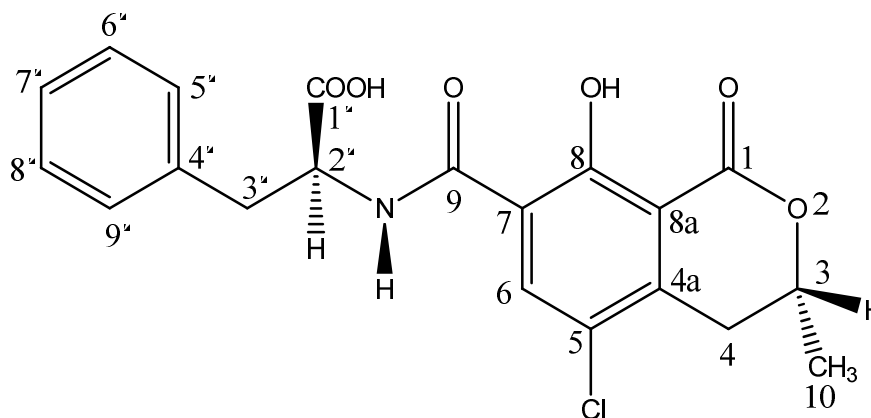
1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti OTA

1.1.1 Synonymní a obchodní názvy OTA

- **Registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Services):** 303-47-9
- **Název dle Chemical Abstracts:** L-Phenylalanine, N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl)carbonyl]-, (R)-
- **Systematický název dle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry):** N-[[[(3R)-5-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-7-isochromanyl]carbonyl]-3-phenyl-L-alanine
- **Synonymum:** (-)-N-[(5-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-7-isochromanyl)carbonyl]-3-phenylalanine (IARC, 1983).

1.1.2 Molekulový a strukturální vzorec OTA

- **Sumární (molekulový) vzorec:** C₂₀H₁₈O₆ClN
- **Strukturální vzorec** (viz Obr. 1): OTA se skládá z para-chlorofenolového zbytku obsahujícího dihydroiso-kumarinovou skupinu, která je amidem spojena s L-fenylalaninem (IARC, 1983).



Obr. 1 Strukturální vzorec ochratoxinu A (Malir *et al.*, 2013)

1.1.3 Chemické a fyzikální vlastnosti čisté látky

- **Popis:** Bílá krystalická sloučenina (Ringot *et al.*, 2006), rekrystalizovaná z xylenu, intenzivně fluoreskuje v ultrafialovém světle, emituje zelenou a modrou (při vysokých koncentracích tmavě modrou /Šimůnek, 2003/) fluorescenci v kyselých a alkalických roztocích (IARC, 1983).
- **Molekulová hmotnost:** 403.82 (Hrdina *et al.*, 2004; Ringot *et al.*, 2006)
- **Teplota bodu tání:** 169 °C (IARC, 1983).
- **Rozpustnost:** Vysoce rozpustný v organických rozpouštědlech (např. v chloroformu, ethanolu a methanolu) (IARC, 1983), slabě rozpustný ve vodě, rozpustný ve vodném roztoku hydrogenuhličitanu sodného (Ringot *et al.*, 2006).
- **Stabilita:** Stabilní v pevných látkách, částečně degradován při běžných podmínkách vaření (IARC, 1993).

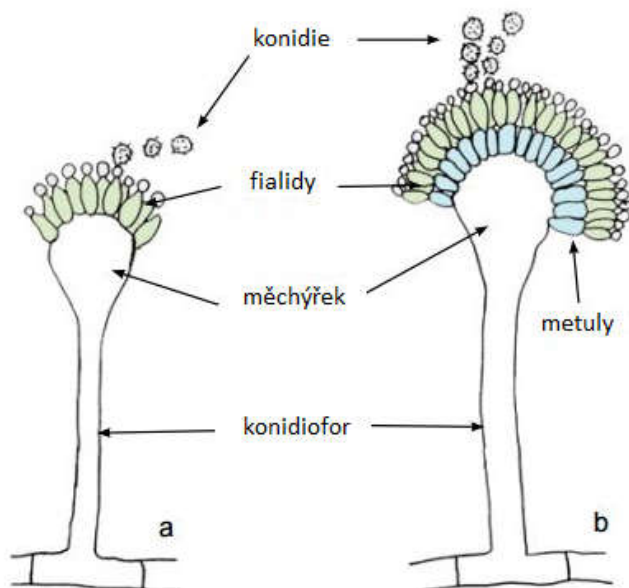
1.2 Producenti OTA

OTA je produkován v potravinách rostlinného i živočišného původu dvěma rody mikroskopických vláknitých hub *Aspergillus* a *Penicillium*.

1.2.1 Producenti OTA rodu *Aspergillus*

Aspergillus je fylogeneticky velmi starý rod vláknitých mikroskopických hub, který v roce 1729 popsal italský botanik Pier Antonio Micheli. Na základě podobnosti průřezu nepohlavním rozmnožovacím orgánem s kroupítkem mu byl udělen český název „kroupidlák“

(viz Obr. 2) (Malíř *et al.*, 2003; Šimůnek, 2004). Taxonomické zařazení rodu *Aspergillus* je znázorněno v tabulce Tab. 1.



Obr. 2 Mikrohabitus rodu *Aspergillus* – typy konidioforů: (a) uniseriální (fialidy), (b) biseriální (fialidy + metuly) – upraveno dle (Ellis *et al.*, 2007)

Tab. 1 Základní taxonomické schéma rodu *Aspergillus* (Ostrý & Škarková, 2003)

	Impérium	Říše	Oddělení	Řád	Čeleď	Rod
Latinsky	Eukaryota	Fungi	Ascomycota	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
Česky	Jaderní	Houby	Vřeckovýtusné	Plesnivkotvaré	Plísňovkovité	Kropidlák

Producenti OTA z rodu *Aspergillus* (*A.*) zahrnují zástupce ze dvou sekcí - *Circumdati* (*A. ochraceus* = syn. *A. alutaceus* /Hrdina *et al.*, 2004/, *A. westerdijkiae* a *A. steynii*) a sekce *Nigri* (*A. carbonarius*, *A. foetidus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. sclerotioniger* a *A. tubingensis*) – a jsou typičtí především pro oblasti se subtropickým a tropickým podnebím (IARC, 1976; Ostry *et al.*, 2013).

Z producentského hlediska OTA v potravinách/krmivech jsou významní především 2 hlavní producenti OTA: *Aspergillus ochraceus* a *A. carbonarius* (viz Tab. 2) (Ostrý, 2012). Odlišná ekologie a fyziologie těchto producentů umožňuje snazší determinaci v konkrétních potravinách či v geografických polohách. *A. ochraceus* je typickou kontaminantou suchých skladovaných potravin, zejména obilovin, a pro svůj růst vyžaduje nízkou vodní aktivitu a mírné teploty (Ostrý *et al.* 2013). OTA je touto vláknitou mikroskopickou houbou produkován v teplotním rozmezí 15-37 °C, přičemž 28 °C se uvádí jako optimum (Malíř *et al.*, 2002; Ostrý, 2012). *A. carbonarius* vytváří pigmentované hyfy a spory odolné vůči UV záření, díky čemuž se může vyskytovat v plodech dozrávajících při plném slunečním záření za vysokých teplot – např. v hroznech a podobném ovoci (Ostry *et al.*, 2013). Za primární producenty OTA v hroznech jsou považováni také další zástupci ze sekce *Nigri*,

např. *A. niger* a *A. tubingensis*, (Ostry *et al.*, 2013), kteří mohou přispívat k produkci OTA, nicméně *A. carbonarius* je mezi nimi považován za nejvýznamnější zdroj OTA ve víně. Výskyt OTA byl potvrzen v bílých, dezertních a ve vyšších koncentracích také v rosé a červených vínech, dále v rozinkách a mleté paprice (Ostrý, 2012; Ostry *et al.*, 2013). Nicméně je známo, že fungicidním a insekticidním ošetřením lze snížit infekci vláknitých mikroskopických hub, které produkují OTA - a tím následně snížit i kontaminaci OTA (Ostry *et al.*, 2013).

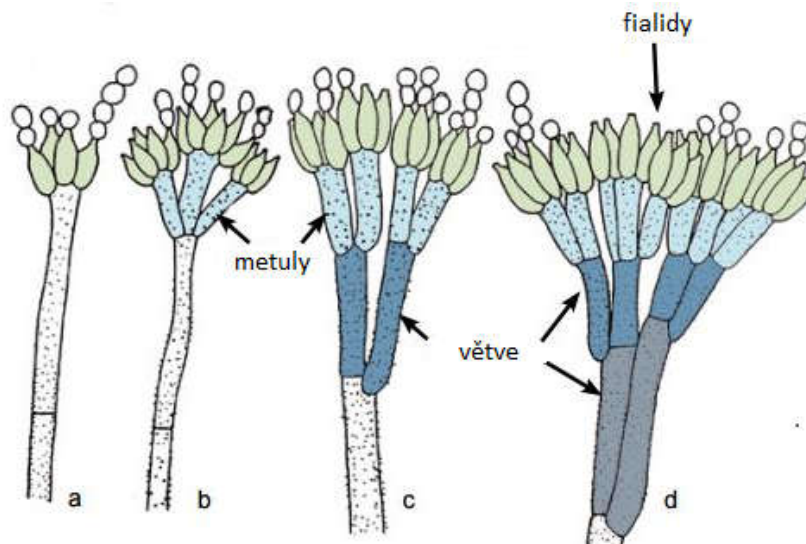
Někteří autoři uvádějí i další producenty OTA jako např. *A. sulphureus*, *A. sclerotinum*, *P. verruculosum*, *P. purpurascens*, *P. commune*, *P.* (Hrdina *et al.*, 2004), *A. melleus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum*, *A. fresnii* a *A. alliaceus* (Ostrý, 1998). *A. alliaceus* je známý pod synonymním názvem *Petromyces alliaceus* (Ringot, 2006).

Tab. 2 Druhy rodu *Aspergillus* produkující OTA v potravinách (Ostry *et al.*, 2013)

Rod	Sekce	Druh	Příklad potravin
<i>Aspergillus</i>	<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	sójové boby, ořechy, červená paprika, obiloviny, zelená kávová zrna
		<i>A. steynii</i>	kávová zrna
		<i>A. westerdijkiae</i>	kávová zrna
	<i>Nigri</i>	<i>A. carbonarius</i>	hrozny, červená paprika, kávová zrna
		<i>A. foetidus</i>	hrozny
		<i>A. lacticoffeatus</i>	kávová zrna
		<i>A. niger</i>	hrozny, arašídy
		<i>A. sclerotioniger</i>	kávová zrna
		<i>A. tubingensis</i>	hrozny

1.2.2 Producenti OTA z rodu *Penicillium*

Český název pro rod *Penicillium* štetičkovec vznikl tím, že tvar rozmnožovacího orgánu připomínal našim botanikům štětice (Obr. 3) (Šimůnek, 2004). Taxonomické zařazení rodu *Penicillium* je uvedeno v Tab. 3



Obr. 3 Mikrohabitus rodu *Penicillium* - typy konidioforů: (a) monoverticilátní (jednoduchý nevětvený), (b) biverticilátní (jednostupňový rozvětvený), (c) terverticilátní (dvoustupňový rozvětvený), (d) quaternverticilátní (třístupňový rozvětvený) – upraveno dle (Ellis *et al.*, 2007)

Tab. 3 Základní taxonomické schéma rodu *Penicillium* (BioLib, 2018)

	Impérium	Říše	Oddělení	Řád	Čeleď	Anamorfní rod
Latinsky	<i>Eukaryota</i>	<i>Fungi</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Penicillium</i>
Česky	Jaderní	Houby	Vřeckovýtrusné	Plesnivkotvaré	Plísňovkovité	Štetičkovec

Z producentského hlediska OTA v potravinách/krmivech jsou významní především 2 hlavní producenti OTA z rodu *Penicillium* - *P. verrucosum* a *P. nordicum* (viz Tab. 4) (Ostrý, 2012; Ostry *et al.*, 2013).

Rod *Penicillium* (*P.*) zahrnuje druhy *P. verrucosum* a *P. nordicum* (Ostry *et al.*, 2013) a na rozdíl od předchozího teplomilného rodu představuje potravinovou kontaminantu spíše v oblastech s mírným či chladnějším podnebím (Malir *et al.*, 2013; Ostry *et al.*, 2013), přičemž IARC (1976) z těchto oblastí uvádí např. Kanadu a severní Evropu. Za producenty OTA byly prohlášeny také druhy *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. olsonii* a *P. oxalicum*, nicméně je u nich nutné další potvrzení o schopnosti produkce OTA, protože jiní autoři tyto druhy neuvádějí a jejich výskyt v potravinách jako producentů OTA nebyl potvrzen (Abrunhosa *et al.*, 2010).

Rod *Penicillium* je dokonce typický i pro střední Evropu a řadu dalších chladných oblastí mírného pásma a je schopen růst, jak na rostlinných, tak živočišných produktech (Ostry *et al.*, 2013). *P. verrucosum* produkuje OTA v teplotním rozmezí 4-30 °C (Ostrý,

2012) a představuje hlavního producenta OTA v obilovinách s preferencí pšenice, méně v arašídech, kukuřici, řepce a sóje (Ostry *et al.*, 2013). Poslední jmenovaný druh *P. nordicum* je významným a častým producentem OTA v potravinách bohatých na bílkoviny např. v masných výrobcích typu sušené šunky (ústní sdělení, Ostry, 18. 4. 2018). Navíc se ukázalo, že produkuje více OTA než *P. verrucosum* (Malir *et al.*, 2016). Ke kontaminaci může docházet přímo, ale i nepřímo v důsledku zkrmování zvířat kontaminovaným krmivem (Ostry *et al.*, 2013). Nejvyšší oficiálně známá úroveň kontaminace OTA byla hlášena u chleba ve výši 80 mg/kg určenému ke krmení zvířat (Heussner *et al.*, 2015). U nás byl OTA na počátku 80. let 20 stol. nalezen v chlebě vyrobeném z dlouho skladované mouky. Chuť chleba byla velmi hořká a v mouce, ze které byl chléb upečen, bylo nalezeno až 15 mg OTA/kg (Veselá *et al.*, 1982).

Tab. 4 Druhy rodu *Penicillium* produkující OTA v potravinách (Ostry *et al.*, 2013)

Rod	Podrod	Série	Druh	Příklad potravin
<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Verrucosa</i>	<i>P. verrucosum</i>	obiloviny
			<i>P. nordicum</i>	sušená šunka, salám

1.3 Výskyt OTA v potravinách

Člověk je exponován OTA, stejně jako jiným mykotoxinům, několika cestami, ovšem dietární expozice je ze všech způsobů nejvýznamnější (Dohnal *et al.*, 2013). Dle odhadu Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) je na světě cca 25 % potravin a surovin kontaminováno mykotoxiny (Malíř *et al.*, 2005), přičemž ještě větší množství může být kontaminováno dosud neobjevenými typy (Suchý & Herzig, 2005). Tato informace uváděna FAO byla v roce 2004 zpochybněna společností BIOMIN, která ve svém programu zaměřeném na posuzování míry kontaminace krmiv a krmných surovin mykotoxiny shledala v 72 % vzorcích detekovatelné množství aflatoxinů, FUM, DON, ZEA a OTA, přičemž 38 % vzorků bylo kontaminováno dvěma či více mykotoxiny (Schatzmayer, 2012). Kontaminace potravin je přirozený proces, ale lze mu do určité míry zamezit při dodržování správné zemědělské, technologické a hygienické praxe (Malíř *et al.*, 2005; Malíř & Ostrý, 2012). Proto se určitý stupeň kontaminace jeví jako nevyhnutelný (Heussner & Bingle, 2015). Za hlavní zdroj kontaminace je považováno především nevhodné skladování, ke kterému dochází zejména v zemích, kde je kontrola potravin vzácná a používají se stále zastaralé techniky skladování a dopravy (Heussner & Bingle, 2015), a kontaminace mykotoxiny může v některých případech probíhat již na poli, a to zejména v období působení stresujících faktorů (např. sucho, hmyz apod.), vlivem kterých je rostlina poškozena a tím i snadněji napadnutelná plísněmi (Klaassen, 2007). Také klimatické změny a globální oteplování vykazují

negativní dopady na bezpečnost potravin rostlinného i živočišného původu v Evropě, kdy zde za poslední desítky let došlo k průměrnému oteplení o 0,46 °C. V důsledku toho dochází k šíření toxinogenních vláknitých mikroskopických hub, včetně *A. carbonarius* a *P. verrucosum* (významných producentů OTA) do mírné klimatické zóny (Ostry *et al.*, 2016).

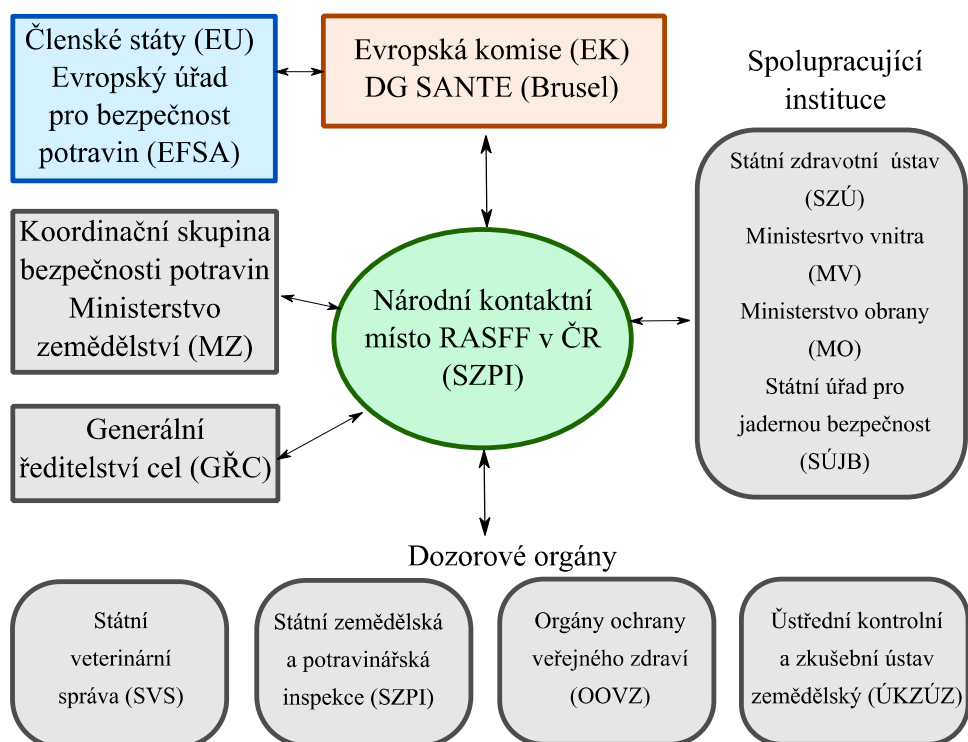
Bylo prokázáno, že OTA se vyskytuje jak v rostlinných, tak živočišných potravinách (Ostrý, 2012). Z rostlinných jsou to zejména obiloviny a výrobky z obilovin, káva, kakao, luštěniny, koření - např. muškátový oříšek, sladká a pálivá paprika v prášku (Ostry *et al.*, 2015), lékořice, kurkuma, zelený čaj, fiky, rozinky, hroznová šťáva, víno, pivo, sušené ovoce, (Malíř *et al.*, 2002; Ostrý, 2012; Ostry *et al.*, 2015). V důsledku zkrmování hospodářských zvířat kontaminovaným krmivem jsou pak mykotoxiny, včetně OTA, přítomny i v mase, výrobcích z krve, orgánech, jako např. ledvinách a játrech (Ostrý, 2012). Někteří další autoři uvádějí konkrétně drůbeží játra a ledviny (Dohnal *et al.*, 2013). Jiní autoři kladou důraz zejména na vepřové ledviny a celkově vepřové maso, u kterého byl prokázán přechod OTA po konzumaci obilných zrn kontaminovaných OTA (Ostry *et al.*, 2016). Nicméně živočišné potraviny představují pro člověka nižší riziko než rostlinné z důvodu částečné inaktivace a metabolizace mykotoxinů v trávicím traktu zvířete (Malíř *et al.*, 2005; Suchý & Herzig, 2005; Ostry *et al.*, 2015). Vegetariáni a vegani jsou naopak vystaveni zvýšenému riziku OTA (ale i dalším mykotoxinům) z přímé expozice. Odhaduje se, že největší míra expozice OTA pochází z obilovin (44 %), dále z vína (10 %), kávy (9 %), piva (7 %), kakaa (5 %), sušeného ovoce (4%), masa (3 %), koření (3 %) a ostatních potravin (15 %) (Malíř *et al.*, 2005). Obecně je však průměrná kontaminace evropských potravin OTA relativně nízká (ng/kg až µg/kg) (Heussner & Bingle, 2015).

1.3.1 Systém zajištění bezpečnosti potravin a krmiv

Na národní úrovni je Systém zajištění bezpečnosti potravin a krmiv garantován orgány ochrany veřejného zdraví (OOVZ), Státní veterinární správou (SVS) a Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí (SZPI) (Malir *et al.*, 2006).

K zajištění zdravotní nezávadnosti potravin a krmiv v rámci EU přispívá tzv. Evropský systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF). Tento systém slouží k rychlému šíření informací o nebezpečných potravinách a krmivech představujících zdravotní riziko pro spotřebitele mezi členy systému, tj. Evropskou komisí (EK) sídlící v Bruselu, členskými státy EU a Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA). SZPI představuje pro ČR tzv. národní kontaktní místo, které komunikuje na jedné straně s EK a na druhé s dozorovými orgány nad potravinami a krmivy v ČR (SVS, SZPI, OOVZ, ústřední

kontrolní a zkušební ústav zemědělský /ÚKZÚZ/), Generálním ředitelstvím cel, Ministerstvem zemědělství (MZe) – resp. koordinační skupinou bezpečnosti potravin a dalšími spolupracujícími institucemi (Státní zdravotní ústav /SZÚ/), Státní úřad pro jadernou bezpečnost /SÚJB/), Ministerstvo vnitra /MV/ a Ministerstvo obrany /MO/), přičemž tok informací je vždy obousměrný (SZPI, 2011). Komunikaci mezi jednotlivými členy RASFF schematicky znázorňuje Obr. 4.



Obr. 4 Schematické znázornění fungování systému RASFF, zpracováno dle (SZPI, 2011)

V současné době je v ČR zdravotní riziko z hlediska expozice mykotoxinům, tedy i ochratoxinům, z potravy hodnoceno jako poměrně nízké, zvláště jedná-li se o potraviny českého původu. Nicméně se celková situace může v důsledku globalizace potravinového trhu zcela změnit (Malir *et al.*, 2006). Za účelem efektivní eliminace zdravotního rizika české populace je nezbytné pravidelně kontrolovat přítomnost toxinogenních plísní, mykotoxinů či jejich biomarkerů v souladu s legislativou Evropské Unie (EU) (Malir *et al.*, 2006).

1.3.2 Regulace mykotoxinů

Pro ČR jsou z hlediska regulace mykotoxinů významná některá Nařízení Komise – viz Tab. 5, stanovující maximální limity (známé také jako tzv. „hygienické limity“) některých kontaminujících látek v potravinách. Maximální limity hlavních potravinových zdrojů OTA se pohybují v rozmezí od 0,5 µg/kg (obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti) do 80 µg/kg (výtažek z lékořice pro použití v potravinářských výrobcích, zejména v nápojích a cukrovinkách) (Evropská komise, 2006; Evropská komise, 2010).

V zájmu účinné ochrany veřejného zdraví by neměly být uvedeny na trh produkty, které obsahují nadpovolené množství kontaminujících látek, a to ani jako složky jiných potravin. Zároveň by nemělo docházet k mísení podílů splňujících limity s podíly, které limity nesplňují. Dekontaminace plodin chemickou cestou je rovněž zakázána (Evropská komise, 2006).

Tab. 5 Maximální limity OTA v potravinách/ krmivech platné pro ČR (Evropská komise, 2006; Evropská komise, 2010; Evropská komise, 2012; Evropská komise, 2015)

Nařízení Komise (NK)	Číslo položky	Potraviny	Maximální limity OTA [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
NK (ES) 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006	1	Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojenec a malé děti	0,5
	2	Dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely, určené speciálně pro kojenec	0,5
	2	Víno (včetně šumivého vína, s výjimkou likérového vína a vína s obsahem alkoholu nejméně 15 % objemových) a ovocné víno	2,0
	3	Aromatizovaná vína, aromatizované vinné nápoje a aromatizované vinné koktejly	2,0
	4	Hroznová šťáva, rekonstituovaná koncentrovaná hroznová šťáva, hroznový nektar, rekonstituovaný hroznový mošt a rekonstituovaný koncentrovaný hroznový mošt určený pro lidskou spotřebu.	2,0
	5	Nezpracované obiloviny	5,0
	6	Pražená kávová zrna a mletá pražená káva kromě rozpustné kávy	5,0
	7	Sušené hrozny révy vinné (korintky, rozinky a sultánky)	10,0
NK (EU) č. 594/2012 ze dne 5. července 2012	8	Rozpustná káva (instantní káva)	10,0
	9	Všechny produkty pocházející z nezpracovaných obilovin, včetně zpracovaných výrobků z obilovin a obilovin určených k přímé lidské spotřebě kromě potravin uvedených v bodech 1., 2. a 11.	3,0
NK (EU) 2015/1137 ze dne 13. července 2015	10	Pšeničný lepek neprodávaný přímo spotřebiteli	8,0
	11	Koření: Pepř, muškátový oříšek, zázvor, kurkuma	15
	12	Koření: <i>Capsicum</i> spp. (sušené plody, celé nebo mleté, včetně chilli, mletého chilli, kayenského pepře a papriky)	20
NK (EU) č. 105/2010 ze dne 5. února 2010	13	Směsi koření obsahující jedno z výše uvedených koření	15
	14	Kořen lékořice, složka bylinného čaje	20
	15	Výtažek z lékořice pro použití v potravinářských výrobcích, zejména v nápojích a cukrovinkách	80

Jelikož bylo v poslední době hlášeno několik případů nálezů vysokých hladin OTA v potravinách, u kterých není stanoven maximální přípustný limit, zahájila EK diskusi o stanovení nových limitů v dalších potravinách – viz Tab. 6. (MZe, Odbor bezpečnosti potravin, 2018). Nicméně se jedná pouze o návrhy a současně jsou tak platné pouze limity uvedené v tabulce Tab. 5.

Tab. 6 Nově navrhované limity pro OTA v potravinách diskutované v EK; zpracováno dle (MZe, Odbor bezpečnosti potravin, 2018)

Potravina	Návrh maximálního limitu OTA [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Sušené ovoce (vyjma sušených hroznů révy vinné)	8,0
Koření včetně sušeného koření	15
<i>Capsicum</i> spp. (sušené plody, celé nebo mleté, včetně chilli, mletého chilli, kayenského pepře a papriky)	20
Směs koření obsahující chilli, mleté chilli, kayenský pepř a papriku)	15
Sušené byliny, čaje a bylinné nálevy	10
Semena slunečnice, semena dýně, jádra podzemnice olejné a výrobky, které je obsahují	5,0
Ořechy	5,0
Kakaový (instantní) prášek prodáváný konečnému zákazníkovi nebo jako ingredience ve slazených instantních kakaových přípravcích prodávaná konečnému spotřebiteli	2

1.4 Toxikologické hodnocení OTA

1.4.1 Toxicita

Pojmem toxicita se rozumí schopnost látky poškozovat živý organismus (Pavlíková *et al.*, 2008). Toxicita je obecně ovlivněna několika faktory, zejména dávkou, dále místem, trváním a četností expozice, přičemž při opakovaném podávání je důležitá též frekvence expozice (Patočka, 2005). Toxicita OTA se rovněž liší v závislosti na zvířecím druhu, jeho pohlaví a způsobu podání. LD_{50} při podání *p.o.* pohybuje v rozmezí od 0,2 mg/kg t. hm. (pes) do 30,3 mg/kg t. hm. (samec potkana) (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007), ovšem jiní autoři uvádějí pro samce potkana hodnotu LD_{50} 22 mg/kg t. hm. (Purchase & Theron, 1968). Nicméně další autoři uvádějí ještě vyšší hodnoty pro myš: 45–46 mg/kg t. hm. (Mally & Dekant, 2009) či dokonce 48–58 mg/kg t. hm. (Abrunhosa *et al.*, 2010). Ačkoliv obecně platí, že jsou dospělá zvířata a samice odolnější než mláďata a samci (Diaz & Murcia, 2011), jiní se shodují na tom, že jsou samice potkana při podání OTA *p.o.* citlivější než samci (Purchase & Theron, 1968; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). Pro samici potkana je uváděna hodnota LD_{50} 20 mg/kg t. hm. (Purchase & Theron, 1968), což jiní autoři uvádějí jako hodnotu obecnou pro potkana při podání *p.o.* (Cayman Chemical Company, 2013). Pro porovnání je uvedena také hodnota LD_{50} 12,6 mg/kg t. hm. při podání *i.p.* (Cayman Chemical Company, 2013), což potvrzuje tvrzení, že je OTA při *i.p.* podání toxičtější než při podání *p.o.* (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2007). Ovšem pro člověka je z hlediska převládající dietární expozice OTA nejvýznamnější přívod *p.o.*, nicméně pro něho je známá pouze nejnižší dávka způsobující toxický efekt (TDLO) 650 mg/kg t. hm., což je 650 krát vyšší než TDLO u potkanů (Cayman Chemical Company, 2013).

Jelikož je OTA strukturálně podobný, díky své fenylalaninové části v molekule, esenciální aminokyselině fenylalanin, dochází k jejich záměně, v důsledku které nastává blokáce enzymu fenylalanin-tRNA syntetázy, který využívá fenylalanin jako substrát (Modrá *et al.*, 2014). Kumarinová část v molekule OTA navíc brání zapojení OTA do proteinového řetězce a tím dochází k blokaci tvorby bílkovin - proteosyntéze. Z toho důvodu může údajně fenylalanin fungovat jako antidotum, neboť mezi ním a OTA dochází ke kompetici při vazbě na t-RNA (Šimůnek, 2004). Mechanismus toxicity OTA nebyl dosud plně objasněn (Domijan *et al.*, 2005), nicméně kromě inhibice proteosyntézy se hovoří také o dalších negativních dopadech na organismus, jako např. o apoptóze různých typů buněk, interferenci s cytoskeletem, tvorbě reaktivních druhů kyslíku (ROS) s následným oxidačním poškozením DNA, tvorbě DNA-aduktů (Malir *et al.*, 2013), lipidové peroxidaci, inhibici mitochondriální respirace a s tím souvisejícím vyčerpáním ATP (Domijan *et al.*, 2005), či o narušení intracelulární homeostázy Ca^{2+} (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007; Malir *et al.*, 2013).

Dle organotropismu, tj. schopnosti dané látky působit na určitý orgán či orgánovou soustavu, je OTA řazen mezi nefrotoxické mykotoxiny, tzn. látky způsobující poškození nefronů ledvin a vylučovacího systému, které může končit až nenávratným selháním ledvin (Hrdina *et al.*, 2004), přičemž OTA je nefrotoxický pro ptáky a savce, nikoliv pro dospělé přežvýkavce (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2007). Díky této vlastnosti je OTA dáván do spojitosti s nádory močových cest a lidskou Balkánskou endemickou nefropatií (BEN) (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2007; Heussner & Bingle, 2015), což je progresivní onemocnění trvající 6-10 let vedoucí k nenávratnému selhání ledvin (Kőszegi & Poór, 2016) a postihuje zejména osoby endemických vesnic na Balkáně, konkrétně v Bulharsku, bývalé Jugoslávii a Rumunsku (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2007). Etiologie endemické nefropatie je však stále nejasná, ovšem předpokládá se, že je přírodního původu, kdy vedle mykotoxinů (OTA a CIT) se uvažuje také o kyselině aristolochové z podražce křovinného (*Aristolochia clematitis* L.) (Heussner & Bingle, 2015). Vedle karcinomu ledvin je OTA spojován také se zvýšeným výskytem karcinomu varlat, což bylo doloženo výskytem vysokého množství OTA a derivátů a tvorbou DNA-aduktů závislých na čase a dávce. Dalším možným cílem OTA by mohly být prsní žlázy, neboť byl u 56 % (28/50) testovaných samic potkana po požití vysokých dávek OTA pozorován zvýšený výskyt fibroadenomu (nezhoubného nádoru) mléčných žláz (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). OTA je dále spojován s dalšími chorobami, jako např. ochratoxikózou drůbeže či prasečí nefropatií, projevujícími se těžkým poškozením ledvin (Heussner & Bingle, 2015). Mezi lidskou BEN a prasečí nefropatií jsou určité podobnosti, zejména výskyt ledvinových lézí v epiteliálních buňkách proximálních tubulů

a ztráta integrity membrán buněčných organel v poškozených buňkách (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2007). Nefropatie je také indukovaná u potkanů, kuřat a celkově drůbeže, přičemž u kuřat byla prokázána také hepatotoxicita. U kachňátek OTA způsobuje ledvinovou a jaterní hypertrofii. Citlivost kachen a krůt je podobná, křepelky jsou mnohem citlivější (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007).

K dalším toxickým účinkům OTA patří hepatotoxicita, embryotoxicita, teratogenita, neurotoxicita, imunotoxicita, genotoxicita a konečně karcinogenita (Ostry *et al.*, 2013). Že je OTA karcinogenní u hlodavců, bylo prokázáno před více než 30 lety. Od té doby byl proveden rozsáhlý výzkum, jehož cílem bylo prozkoumat jeho mechanismus působení, který je však i nadále diskutován (Heussner & Bingle, 2015). Z hlediska hodnocení karcinogenního rizika u zvířat jsou dostatečné důkazy, ovšem u člověka nikoli (Malíř, 2010). První studie na karcinogenitu indukovanou OTA byly prováděny na potkanech, myších a pstruzích. Zatímco po podání OTA *p.o.* došlo u myši a potkanů k indukci nádoru ledvin, u pstruhů se projevil nádor jater (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). Nicméně dle IARC byl OTA v roce 1987 zařazen do skupiny 3 – tj. skupina látek, které zatím nejsou klasifikovány jako karcinogenní pro člověka (IARC, 1987). V roce 1993 však došlo k jeho přearazení do skupiny 2B – tj. skupiny možných karcinogenů pro člověka (IARC, 1993). Na základě údajů za posledních pět let by mohl být OTA přearazen alespoň do skupiny 2A – tj. skupiny pravděpodobných karcinogenů (Ostry *et al.*, 2017), avšak Malir *et al.* (2016) se spíše přiklání k jeho přearazení dokonce přímo do skupiny 1, tj. skupiny prokázaných karcinogenů.

1.4.2 Toxikokinetika

Toxikokinetika se zabývá průchodem xenobiotika (v tomto případě OTA) v organismu a zahrnuje čtyři základní děje: absorpci, distribuci, biotransformaci a exkreci (Patočka, 2005). Osud OTA v organismu se může lišit v závislosti na fyziologii různých živočišných druhů. Obecně však dochází k rychlé absorpci a relativně pomalé exkreci (Malíř *et al.*, 2002; Ringot *et al.*, 2006). Zatímco mechanismy absorpce (popsané v podkapitole 1.4.2.1), distribuce (popsané v podkapitole 1.4.2.2) a eliminace (exkrece) (popsané v podkapitole 1.4.2.4) byly zcela objasněny, biotransformační mechanismy (popsané v podkapitole 1.4.2.3) zůstávají i nadále předmětem výzkumu, neboť současné znalosti pro vysvětlení všech pozorovaných účinků jsou nedostatečné a některé údaje o metabolismu jsou dokonce kontroverzní (Ringot *et al.*, 2006).

1.4.2.1 Absorpce OTA

Děj, při kterém toxická látka pronikne z vnějšího prostředí do organismu, resp. do krevního řečiště se nazývá absorpce (Hrdina *et al.*, 2004; Klaassen, 2007). Tento proces se odehrává na tzv. vstupních branách, kterými jsou nejčastěji gastrointestinální trakt (GIT), plíce a kůže (Patočka, 2005). Jak již bylo řečeno výše, z hlediska intoxikace běžné populace mykotoxiny jsou transdermální a inhalační vstupní cesty považovány za minoritní (Malíř *et al.*, 2005; Malíř, 2010; Malir *et al.*, 2016) a daleko častěji, a tedy majoritně, jsou přijímány konzumací kontaminovaných potravin (Malíř *et al.*, 2005; Malíř, 2010; Malir *et al.*, 2016), což bylo potvrzeno analýzou krevních vzorků odebraných před změnou a po změně diety pacientů (Malíř *et al.*, 2002). Z toho důvodu je absorpce z GIT v tomto případě nejvýznamnější.

o Absorpce OTA z gastrointestinálního traktu (GIT)

OTA se v GIT vyskytuje v neionizované (v tucích rozpustné) a ionizované (v tucích méně rozpustné) formě. Zatímco ve fyziologických podmínkách dvanáctníku je OTA přítomen jako monoanion OTA^- a dianion OTA^{2-} , v kyselých podmínkách horní části GIT se nachází v neionizované formě OTA^0 (Ringot *et al.*, 2006). U většiny zvířecích druhů je OTA pasivně (tzn. bez známých specifických transportních mechanismů) absorbován ve formách OTA^0 a OTA^- ze žaludku a především z lačnicku – tj. střední části tenkého střeva (Ringot *et al.*, 2006), přičemž tenké střevo má díky své velké absorpční ploše a bohatému prokrvení největší podíl na absorpci (Hrdina *et al.*, 2004).

Poté, co je OTA absorbován z GIT, vstupuje do krevního řečiště – do tzv. enterohepatálního oběhu, který je z části odpovědný za dlouhý biologický poločas v organismu (Malíř *et al.*, 2002), což je doba, za kterou koncentrace xenobiotika v organismu poklesne na polovinu (Pavlíková *et al.*, 2008). Dlouhý poločas je rovněž ovlivněn schopností OTA setrávat v krevním séru v důsledku vazby s plazmatickými makromolekulami (Malíř *et al.*, 2002). Poločas OTA u člověka je přibližně 35 dní (840 h.) (Malíř *et al.*, 2002; Severa *et al.*, 2005), přičemž toto zjištění pochází z roku 1996 (Malíř *et al.*, 2016). Někteří autoři uvádějí o něco přesnější údaje: 35,4 dní (850 h) (Zepnik *et al.*, 2003) či 35,5 dní (852 h) (Abrunhosa *et al.*, 2010). V každém případě je to ve srovnání s ostatními druhy nejdelší plazmatický poločas, a proto se OTA snadno může kumulovat a v mezidobí, než OTA klesne na polovinu, může dojít k dalším přívodům (Köszegi & Poór, 2016).

1.4.2.2 Distribuce OTA

Distribucí se rozumí roznesení látky již přítomné v krvi do jednotlivých buněk, tkání a orgánů intoxikovaného organismu (Patočka, 2005), přičemž OTA je krví distribuován především do ledvin, jater, varlat, střev (Malíř *et al.*, 2002), kosterních svalů, tukové tkáně a v malém množství také do mozku (Kőszegi *et al.*, 2016).

V případě OTA je však distribuce poněkud složitější, neboť je v krvi vázán až z 95 % (Pfohl-Leszkwicz *et al.*, 2007), dle jiných autorů z více než 99 % (Ringot *et al.*, 2006; Malir *et al.*, 2013), na lidské sérové proteiny – zejména albumin, což částečně vysvětluje jeho dlouhý poločas v organismu (Ringot *et al.*, 2006). Pouze malé množství (méně než 1 %) OTA se vyskytuje v biodisponibilní – volné formě (Malíř *et al.*, 2013). Byla také prokázána velmi silná vazba, a to až 106 krát vyšší než u albuminu (Malíř *et al.*, 2002), na neznámé proteiny o molekulové hmotnosti 20 000 Da (Malíř *et al.*, 2002; Kőszegi & Poór, 2016). Tyto proteiny se vyskytují v mnohem nižší koncentraci než albumin a díky jejich volné filtraci přes glomeruly mohou hrát roli v patogenezi BEN (Kőszegi & Poór, 2016). Vzniklé komplexy představují mobilní rezervoáry mykotoxinu tzv. depa, ze kterých může být xenobiotikum postupně uvolněno do tkání (Hrdina *et al.*, 2004; Ringot *et al.*, 2006; Pavlíková *et al.*, 2008). Jako rezervoár OTA může sloužit také již zmíněná svalová či tuková tkáň (Malíř *et al.*, 2002). Oproti tomu erythrocyty obsahují pouze stopy OTA (Ringot *et al.*, 2006).

1.4.2.3 Biotransformace

Biotransformační procesy zahrnují biochemické, obvykle enzymatické, procesy, při kterých dochází ke změně lipofilních látek na méně lipofilní, tj. rozpustnější ve vodě, čímž je umožněno snazší vyloučení z organismu prostřednictvím moči. Obvykle dochází rovněž ke snížení nebo úplné eliminaci toxicity, a proto lze hovořit o tzv. detoxikaci. To však není vždy pravidlem, neboť může vzniknout daleko toxičtější metabolit – v tomto případě se jedná o bioaktivaci, či toxikaci (Hrdina *et al.*, 2004). Příkladem mohou být reaktivní metabolity OTA – OTQ (chinonová forma) a OTHQ (dihydrochinonová forma), jenž hrají důležitou roli v tvorbě nádorů (Tozlovanu *et al.*, 2006). OTHQ byl navíc prokázán jako hlavní metabolit odpovědný za tvorbu DNA-aduktů (Pfohl-Leszkwicz & Manderville, 2007; Malir *et al.*, 2013; Malir *et al.*, 2016).

K akumulaci OTA dochází v krvi, ledvinách a játrech, přičemž játra a ledviny představují hlavní orgány biotransformace (Ringot *et al.*, 2006). Navíc se v těchto orgánech obecně koncentruje více chemických látek, než v ostatních orgánech dohromady (Klaassen, 2007). Zranitelnost ledvin a jater může být vysvětlena jejich speciálními transportními

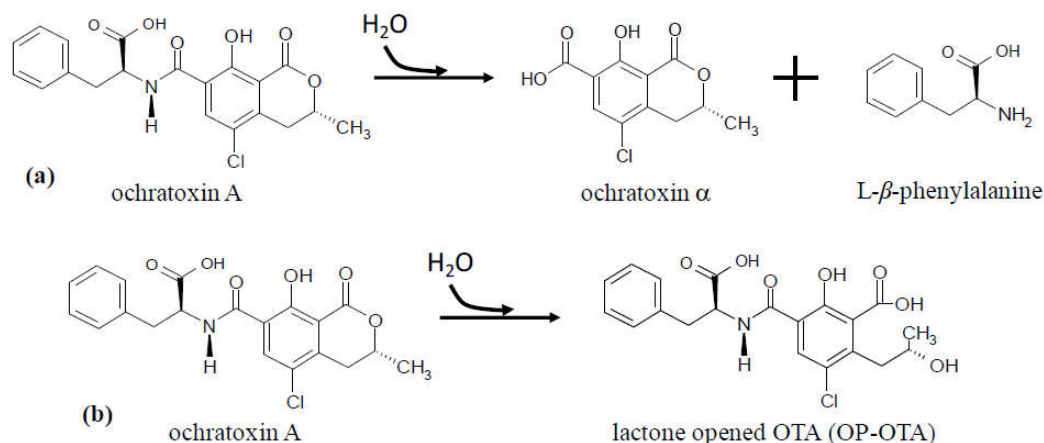
mechanismy, které aktivně vychytávají OTA, přičemž v ledvinách to jsou transportéry organických aniontů (OAT) a v játrech polypeptidové transportéry organických aniontů (OATP) (Kőszegi & Poór, 2016). Biotransformační procesy obvykle zahrnují dvě fáze – fázi I a fázi II. Zatímco Fáze I zahrnuje oxidační, redukční a hydrolytické reakce, ve fázi II probíhají reakce konjugace (syntetické) (Hrdina *et al.*, 2004).

○ **Fáze I**

Hlavní metabolická cesta OTA spočívá v jeho hydrolýze (Ringot *et al.*, 2006), při které dochází ke štěpení amidové (peptidické) vazby (Zepnik *et al.*, 2003) (viz Obr. 5), spojující L- β -fenylalaninovou část s dihydroizokumarinovým základem, tj. ochratoxinem α (OT α), pomocí specifického enzymu karboxypeptidázy A nebo kyselou hydrolýzou. Jelikož jsou po rozrušení vazby obě vzniklé části v podstatě netoxické, lze tuto reakci považovat za detoxifikační (Abrunhosa *et al.*, 2010).

Ve studiích *in vitro* byly zjištěny také další enzymy schopné hydrolýzy OTA na OT α , a to α -chymotrypsin a katepsin C (Ringot *et al.*, 2006). Ke štěpení OTA může docházet částečně ve střevním traktu a v orgánech s vysokou koncentrací OTA, jako jsou např. ledviny (Zepnik *et al.*, 2003), ovšem Ringot *et al.* (2006) uvádějí, že ledviny potkanů, stejně tak játra, mají nízkou hydrolýzovou aktivitu. Oproti tomu je vysoká schopnost hydrolýzy připisována slinivce břišní, duodenu a ileu. Ve stejné studii při pozorování tráveniny z potkana *in vitro* se také ukázalo, že jsou za hydrolýzu odpovědné především anaerobní bakterie tlustého a slepého střeva. Naopak málo hydrolytických reakcí bylo pozorováno v obsahu žaludku a trávenině tenkého střeva, a to navzdory uvolňování pankreatické šťávy, včetně karboxypeptidázy A (Ringot *et al.*, 2006).

Dalším způsobem degradace OTA, popsáním u mikroorganismů, je hydrolýza laktonového kruhu za alkalických podmínek (viz Obr. 5), kdy je výsledkem otevřená laktonová forma OTA (OP-OTA), která má však podobnou toxicitu jako OTA, je-li podán potkanům (Abrunhosa *et al.*, 2010; Kőszegi & Poór, 2016). Ovšem u myši a bakterie *Bacillus brevis* byla zpozorována nižší toxicita (Abrunhosa *et al.*, 2010).



Obr. 5 Způsoby degradace OTA: hydrolýza a) peptidické vazby b) laktonového kruhu (Abrunhosa *et al.*, 2010)

Pouze malé procento OTA je v jaterních mikrozomech hydrolyzováno na 4-hydroxyochratoxin A (4-OH OTA), který má obdobné cytotoxické a imunosupresivní účinky jako OTA (Malíř *et al.*, 2002). Rovněž se jako OTA vyznačuje inhibičním působením v proteosyntéze (IARC, 1993). Tento metabolit se vyskytuje ve dvou epimerech v závislosti na zvířecím druhu jako 4(R)-OH OTA – v lidských a potkaních játrech a 4(S)-OH OTA – v játrech prasete (Ringot *et al.*, 2006). Exkrece 4-OH OTA byla potvrzena opakovaně v testech *in vitro* a *in vivo* u myši a potkanů (IARC, 1993).

Další metabolit 10-hydroxyochratoxin A (10-OH OTA) byl identifikován v játrech králíka (IARC, 1993) a je méně toxický než 4-OH OTA (Kőszegi & Poór, 2016). Tento metabolit byl také objeven ve studiích *in vitro* u člověka a pravděpodobně není genotoxický (Ringot *et al.*, 2006).

Dalším způsobem snížení toxicity je dechlorinace OTA, po které dochází k přeměně na OTB, který je méně genotoxický (Kőszegi & Poór, 2016).

o Fáze II

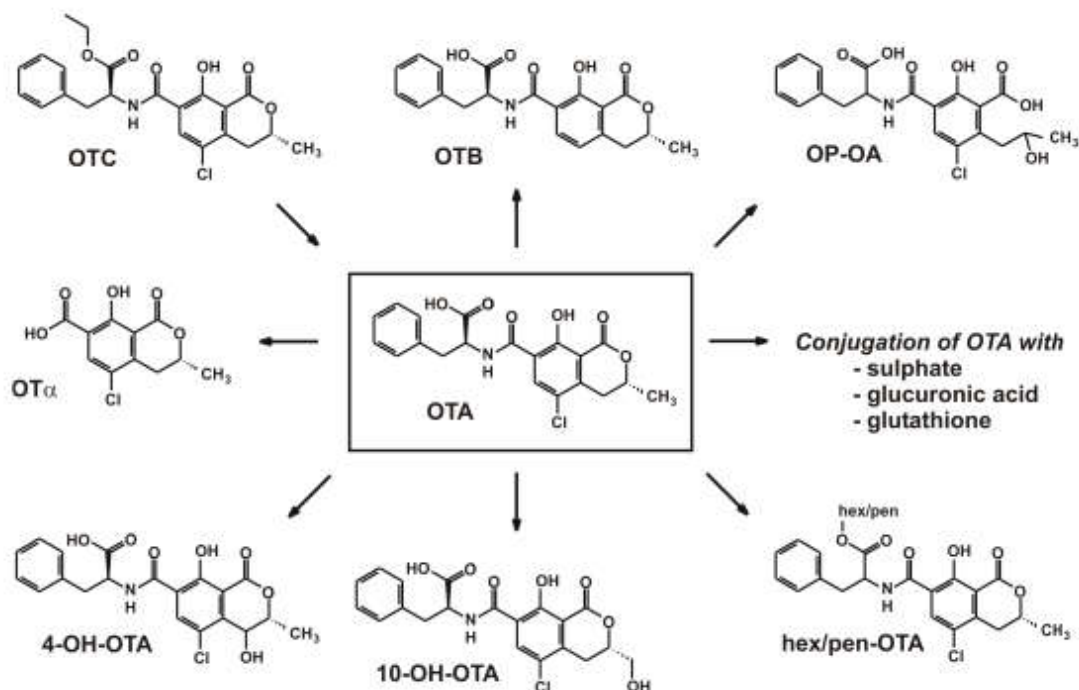
Reakce fáze II jsou konjugační, tzn. syntetické a dochází při nich ke konjugaci s endogenními látkami za vzniku nových sloučenin (konjugátů), které jsou posléze exkretovány (Patočka, 2005). Uplatňují se zde především dva enzymy: uridindifosfát glukuronosyltransferáza (UGT) zajišťující glukuronidaci a sulfotransferáza (ST) zajišťující sulfataci (Hrdina *et al.*, 2004). Neméně důležitým enzymem při biotransformaci xenobiotik je také glutathion-S-transferáza (GST) uplatňující se při konjugaci OTA s glutathionem (Malíř *et al.*, 2002; Ringot *et al.*, 2006; Kandár, 2016).

Prostřednictvím portální žíly je OTA transportován do jater, kde je podroben detoxifikačnímu procesu (Ringot *et al.*, 2006), při kterém dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou za vzniku glukuronových konjugátů (glukuronidace) či ke konjugaci se

sloučeninou obsahující síru za vzniku sulfokonjugátů (sulfatace) (Malíř *et al.*, 2002). Rovněž dochází ke konjugaci s glutathionem (Malíř *et al.*, 2002; Ringot *et al.*, 2006), který je substrátem pro glutathion peroxidázu, která hraje důležitou roli v ochraně buněk před peroxidací lipidů (Ringot *et al.*, 2006). Obecně však platí, že se jedná o detoxifikační krok, nicméně v některých případech může dojít k bioaktivaci (Malíř *et al.*, 2002; Ringot *et al.*, 2006), což může vést ke vzniku sloučenin s genotoxickým účinkem (Malíř *et al.*, 2002). Glutathionové konjugáty jsou vylučovány žlučí, reabsorbovány ve střevě a nakonec transportovány do ledvin, kde se později kumulují a tvoří vyšší koncentraci. Epiteliální buňky ledvinových tubulů jsou naštěstí bohaté na dvě peptidázy (γ -glutamyl transpeptidázu - GGT a dipeptidázu - DPP), schopné štěpit tyto konjugáty (Ringot *et al.*, 2006). GGT odstraňuje γ -glutamylový zbytek a vzniká cysteinylglycinový konjugát, ze kterého je pomocí DPP odstraněn glycin za vzniku cysteinového konjugátu, který je N-acylací přeměněn na kyselinu merkapturovou, která je vyloučena močí (Kand'ár, 2016).

Esterové konjugáty OTA s hexózou či pentózou (hex/pen-OTA) představují další skupinu konjugátů, které byly poprvé zaznamenány v kulturách potkaních a lidských hepatocytů a nedávno také v moči potkanů (Ringot *et al.*, 2006).

Veškeré uvedené metabolity ($OT\alpha$, OP-OTA, 4-OH-OTA, 10-OH-OTA, sulfokonjugáty, glutathionové konjugáty, glukuronové konjugáty, hex/pen-OTA) (viz Obr. 6) byly pozorovány v krvi, moči, tkáni zvířat a/nebo lidí (Kószegi & Poór, 2016).



Obr. 6 Biotransformace OTA (Kószegi *et al.*, 2016)

1.4.2.4 Exkrece

Pojmem exkrece se obecně rozumí vyloučení xenobiotika z organismu prostřednictvím vylučovacích orgánů (Hrdina *et al.*, 2004; Patočka, 2005), což je umožněno po vytvoření hydrofilní formy, která je snadněji vylučována (Pavlíková *et al.*, 2008). Vylučování OTA z organismu se děje převážně močí (Severa *et al.* 2005), což má zásadní význam pro tuto práci. Dále se na čištění plazmy od OTA podílí fekální exkrece a v menší míře exkrece mateřským mlékem (Ringot *et al.*, 2006).

Jak již bylo výše zmíněno, eliminace OTA je oproti absorpci pomalá – v průměru vyloučeno 20-80 ng/den nezávisle na požití dávce (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2007) – z důvodu vysoké vazebné afinity k plazmatickým proteinům, což má za následek jeho kumulaci v organismu. Z toho důvodu obecně platí, že je eliminační poločas OTA v krvi delší než ve tkáních. Studie prováděná na potkanech s nedostatkem albuminu navíc prokázala až 20-70x rychlejší eliminaci OTA ze systémové cirkulace (Ringot *et al.*, 2006). Navíc afinita OTA k albuminu není u všech druhů stejná. Zatímco k lidskému sérovému albuminu vykazuje OTA velmi silnou afinitu, k bovinnímu či potkanímu je nižší. Z toho důvodu je obtížné vyvinout účinné strategie pro oddělení OTA od albuminu, a proto je nezbytné pro další testování nalézt vhodný živočišný model (Köszegi & Poór, 2016).

o **Renální exkrece**

Pro exkreci xenobiotik jsou nejdůležitějším orgánem ledviny (Patočka, 2005; Severa *et al.*, 2005). Přítomnost metabolitů OTA v lidské moči byla potvrzena v různých studiích (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2007). Glomerulární filtrace je však do značné míry omezena vazebným potenciálem OTA na albumin (Ringot *et al.*, 2006), neboť z krve do moče jsou filtrovány pouze látky do 60 kDa, tj. menší než molekula albuminu (Patočka, 2005; Pavlíková *et al.*, 2008). Pouze volná frakce (podíl), která se může distribuovat mimo krevní řečiště do tkání, může být vyloučena glomerulární filtrací (Hrdina *et al.*, 2004). Eliminace OTA tímto způsobem je tedy zanedbatelná (Köszegi *et al.*, 2016).

OTA tak podléhá spíše tubulární sekreci (Ringot *et al.*, 2006), kterou zprostředkovává skupina specifických proteinových transportérů organických aniontů (OATs) lokalizovaných v proximálních ledvinových tubulech (PT) (Patočka, 2005; Ringot *et al.*, 2006). Po sekreci do ledvinových tubulů je OTA ve všech segmentech nefronu reabsorbován pomocí OAT či jiných transportérů, čímž se oddaluje jeho vyloučení a tím hrozí vyšší riziko akumulace ve tkáni (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). U člověka bylo identifikováno 10 OATs, přičemž nejvíce prozkoumané byly OAT₁₋₄ (Li *et al.*, 2012). OAT₁ je přítomen v bazolaterální

membráně PT, stejně jako OAT₃ (Li *et al.*, 2012), který se však nachází také v játrech a mozku (Ringot *et al.*, 2006). OAT₄ se vyskytuje v apikální membráně PT a dokonce i v placentě, kde zprostředkovává transport živin pro plod od matky (Li *et al.*, 2012). Ačkoliv byl výskyt OTA ve fetálním séru hlášen dvakrát, o mechanismu jeho přechodu přes placentu toho není příliš známo (Ringot *et al.*, 2006). V ledvinách se též vyskytuje OAT₂, ovšem jeho dominantní zastoupení je v játrech (Li *et al.*, 2012).

OTA je v moči významným biomarkerem intoxikace organismu tímto mykotoxinem, přičemž jeho koncentrace v moči může sloužit jako ukazatel přívodu OTA do organismu (Severa *et al.*, 2005).

○ **Fekální exkrece**

Fekální exkrece je úzce spjata s biliární exkrecí, neboť toxiny a jejich metabolity odváděné žlučí z jater do střeva jsou v konečné fázi vyloučeny stolicí (Patočka, 2005). Nicméně tyto látky mohou být ve střevě opětovně vstřebány do krevního řečiště (Philp, 2001) a vykonávat tak tzv. enterohepatální recirkulaci (Hrdina *et al.*, 2004), čímž je podpořena systémová redistribuce toxinu do různých tkání (Ringot *et al.*, 2006). U myši byl ve žluči prokázán významný podíl OTA v konjugované formě, která před reabsorpcí musí být hydrolyzována střevní mikroflórou. Např. glukuronidové konjugáty jsou hydrolyzovány pomocí mikrobiálního enzymu β -glukuronidázy. Uvolněné xenobiotikum pak může být reabsorbováno, a celý cyklus se tak opakuje. Také v tlustém střevě je přítomna mikroflóra, která hydrolyzuje OTA na metabolit OT α , a proto jsou obě tyto formy vylučovány stolicí (Ringot *et al.*, 2006).

○ **Exkrece mlékem**

Exkrece mlékem nemá z kvantitativního hlediska příliš velký význam (Hrdina *et al.*, 2004), nicméně jiní autoři tento způsob uvádějí jako relativně účinný (Ringot *et al.*, 2006). V mléce zvířat krmených krmivem kontaminovaným OTA byl prokázán metabolit OT α , který je sice uváděn jako netoxický, ovšem může se vykazovat genotoxickými účinky (Malíř *et al.*, 2002). Z hlediska přechodu OTA do mateřského mléka představuje značné riziko pro kojence (Philp, 2001; Hrdina *et al.*, 2004; Ringot *et al.*, 2006), přičemž kojeneček je vzhledem k jeho hmotnosti a odolnosti ohrožen více než matka (Štefan *et al.*, 2012).

1.4.3 Hodnocení působení OTA

V toxikologii ochratoxinu A v současnosti existují dva základní přístupy k hodnocení působení cizorodých látek, a to prahový přístup (threshold) – viz podkapitola 1.4.3.1 a bezprahový přístup (non-threshold) – viz podkapitola 1.4.3.2 (Malíř, 2010).

1.4.3.1 Prahové toxické působení OTA (threshold přístup)

Prahový toxický účinek je definován určitým prahem expozice, pod kterým nejsou zjišťovány žádné nepříznivé účinky na organismus (Malíř, 2010). Vzhledem k všudypřítomnosti a toxickým účinkům OTA navrhly mezinárodní orgány tolerovatelné denní/týdenní přívody OTA označující dávku, která může být bezpečně přijímána po celý život, aniž by vznikly zřetelné nepříznivé účinky na zdraví (Ostry *et al.*, 2015).

o *Historie vývoje prahového hodnocení*

Vědecký výbor pro potraviny (SCF) vyhodnotil v roce 1998 provizorní tolerovatelný denní přívod 5 ng OTA/kg t. hm./den (EFSA, 2006). Výbor odborníků FAO/WHO pro potravinářské přídatné látky (JECFA) stanovil na svém 37. zasedání v roce 1991 tolerovaný týdenní přívod (PTWI) 112 ng/kg t. hm. (tj. v přepočtu na den 16 ng/kg t. hm.). Na 44. zasedání v roce 1995 byl PTWI přehodnocen na hodnotu 100 ng/kg t. hm. (tj. v přepočtu na den 14,29 ng/kg t. hm.), která byla potvrzena i na 56. zasedání v roce 2001 s tím, že tato hodnota by měla zůstat zachována až do výsledků dalších studií o mechanismech karcinogenity a nefrotoxicity (EFSA, 2006). Poslední hodnocení PTWI na 68. zasedání v roce 2008 vedlo k zachování stávajícího PTWI 100 ng/kg t. hm. (Bui-Klimke & Wu, 2015; Malir *et al.*, 2016).

Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) v roce 2006 stanovil pro OTA TWI 120 ng/kg t. hm. (tj. v přepočtu na den 17,14 ng/kg t. hm.), a to na základě dat získaných na prasatech, jakožto nejcitlivějším zvířecím druhu, u kterého byla zjištěna nejnižší dávka, při které už je pozorován škodlivý efekt na organismus (LOAEL) 8 µg/kg t. hm./den, která představuje počáteční marker renální toxicity, resp. progresivní nefropatie u prasat. Pro zohlednění mezidruhových rozdílů (extrapolace z prasete na člověka) byl použit celkový faktor nejistoty 450 (tj. součin faktorů: 2,5 pro toxikodynamické rozdíly, 6 pro kinetické rozdíly – poločas, 10 pro extrapolaci od průměrných lidí k potenciálně citlivým lidským subpopulacím a 3 pro zohlednění použití LOAEL namísto nejvyšší dávky, při které ještě není pozorován škodlivý efekt na organismus /NOAEL/ 40 µg/kg t. hm./den). Nicméně vypočtený TWI pro člověka se vztahuje pouze na nefrotoxicitu, nikoliv na karcinogenitu (EFSA, 2006).

Údajně je v současné době dospělý člověk v EU exponován 15-60 ng/kg t. hm. za týden, což je pod limitem stanoveným odborníky z EFSA (EFSA, 2006; Mally & Dekant, 2009). Nicméně do spotřebitelů nejsou zahrnuti kojenci a děti, a tudíž by byly pro posuzování míry expozice OTA zapotřebí údaje i o těchto spotřebitelích, včetně jejich stravovacích preferencí (EFSA, 2006).

1.4.3.2 Bezprahové toxické působení OTA (non-threshold přístup)

Na rozdíl od prahového účinku, u bezprahového neexistuje žádná bezpečná hladina expozice – tzn., že pouze nulová koncentrace toxinu zaručuje nulové riziko (Malíř, 2010).

V roce 1989 byla stanovena prakticky bezpečná dávka vzhledem k riziku rakoviny ledvin (VSD) 1,5 ng OTA/kg t. hm. (Kuiper-Goodman & Scott, 1989). VSD 1,8 ng OTA/kg t. hm. byla navržena Kuiper-Goodman (Kuiper-Goodman, 1991; Castegnaro *et al.*, 2006). V roce 1992 byla na základě studií Bendeleho (Bendele *et al.*, 1985) a Boormana (Boorman *et al.*, 1992) prováděných na hlodavcích provedena extrapolace dat na člověka, dle které byla VSD přehodnocena na 0,2 ng OTA/kg t. hm. (O'Brien & Dietrich, 2005).

Riziku karcinogenity OTA se věnovala zdravotnická organizace Health Canada, která stanovila zanedbatelný přívod pro riziko rakoviny (NCRI) 4 ng/kg t. hm./den a tolerovaný denní přívod (TDI) pro nefropatii 3 ng/kg t. hm./den (Kuiper-Goodman *et al.*, 2010).

1.4.4 Způsoby hodnocení dietární expozice mykotoxinům

Existují dva typy dietárního přívodu mykotoxinů – přímý a nepřímý (Malíř *et al.*, 2005; Malíř, 2010). Zatímco přímý zahrnuje kontaminované obilniny, olejniny, koření, čaje, kávu, sušené ovoce, pivo apod., při nepřímém dochází ke konzumaci kontaminovaného masa, mléka, sýrů, krve, vnitřností apod. (Malíř *et al.*, 2002; Malíř *et al.*, 2005; Malíř, 2010). Dietární expozici mykotoxinům lze zhodnotit dvěma následujícími způsoby:

- **Odhadem denního přívodu mykotoxinů, tedy i OTA, z potravin:** Tato metoda se provádí na základě spotřeby kontaminovaných potravin o známé koncentraci mykotoxinů (Malíř *et al.*, 2002; Malíř *et al.*, 2005; Malíř, 2010).
- **Stanovením biomarkeru (mykotoxinu či jeho metabolitu) v biologickém materiálu:** Analýzou biologického materiálu lze zjistit informaci o kvantitativní úrovni expozice určitému mykotoxinu (Malíř *et al.*, 2005). Odhad dietární expozice je pak stanoven výpočtem na základě znalosti metabolizačních, distribučních a exkrečních procesů v organismu (Malíř, 2010). Tento biomonitoring je vhodnějším nástrojem pro hodnocení expozice člověka (Duarte *et al.*, 2011; Malir *et al.*, 2012; Shephard *et al.*, 2007) a lépe odráží individuální expozici, toxikokinetiku a biologickou dostupnost (Warth *et al.*, 2013).

2 Diagnóza C64 (Tumor ledvin mimo pánvičku)

Česká republika (dále ČR) je na prvním místě ve výskytu zhoubných nádorů (dále ZN) ledvin nejen v Evropě, ale i celosvětově (SVOD, 2017). V rámci ČR se lékaři nejvíce setkávají se ZN ledvin v pohraničních oblastech, přičemž nejčastější výskyt byl zaznamenán v Plzeňském kraji. Nicméně příčiny jsou stále nejasné, neboť pravděpodobně dochází k působení více faktorů – např. stres, životní styl, životní prostředí, kouření, stravování s přívodem různých kontaminantů (pozn.: nevyklučují se vlivy působení některých významných nefrotoxinů, např. OTA, CIT či kadmia) (Kolářová, 2016). O četnosti těchto nádorů lze přesvědčit z dat pocházejících z webového portálu „*Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice*“, který vytvořil kolektiv autorů Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně a Masarykova onkologického ústavu v Brně za podpory Ministerstva zdravotnictví ČR. V roce 2000 byl v rámci webového portálu vytvořen „*Software pro vizualizaci onkologických dat*“ (SVOD), který zpřístupňuje všechna data z databáze Národního onkologického registru a který je finančně podporován Ministerstvem zdravotnictví ČR (Odborem zdravotní péče) (SVOD, 2017).

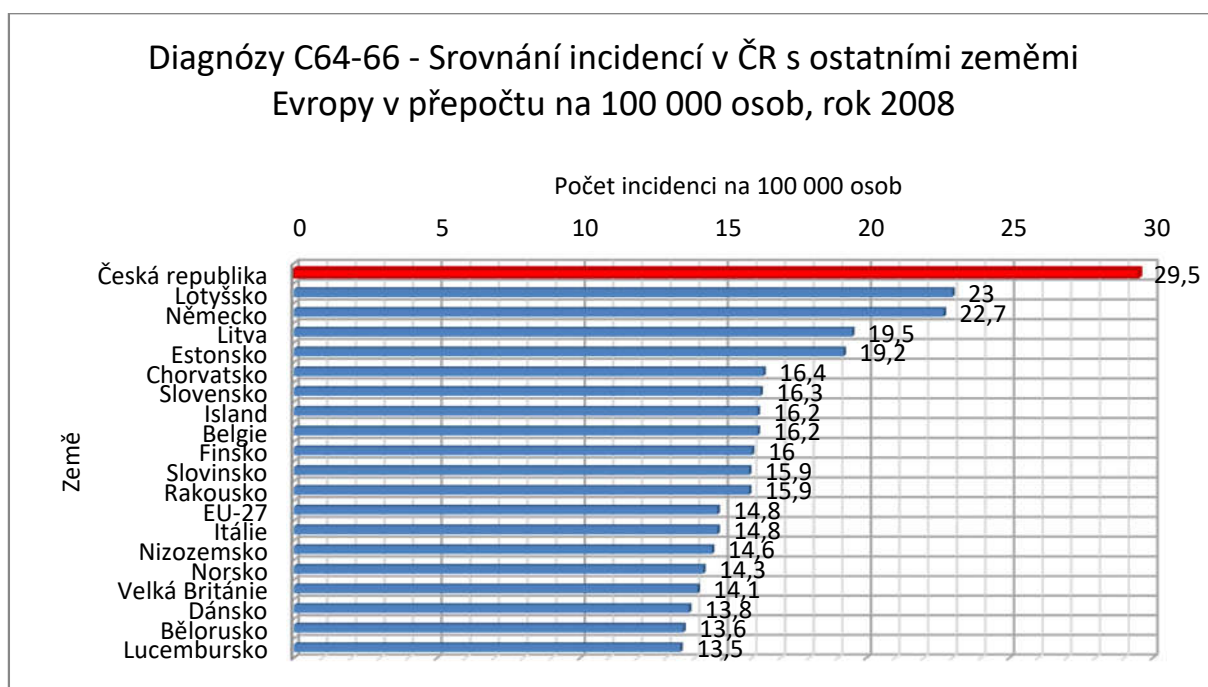
Jelikož SVOD neposkytuje samostatná data o diagnóze C64 pro porovnání jejího výskytu v ČR s výskytem v ostatních zemích (ať už v přepočtu na 100 000 osob (dále os.) – viz podkapitola 2.1, nebo na světový standard – viz podkapitola 2.2), byla použita kompletní data zahrnující diagnózy C64 (ZN ledvin mimo pánvičku), C65 (ZN ledvinné pánvičky) a C66 (ZN močovodu) dohromady jako celek.

Interní data (týkající se pouze ČR) již poskytovala informace o jednotlivých diagnózách samostatně, díky čemuž bylo možné provést analýzu pouze na požadovanou diagnózu C64. Bylo provedeno porovnání incidence a mortality v ČR v letech 1977-2014 s předpovědí dalšího vývoje do roku 2020 – viz podkapitola 2.3, dále porovnání incidence a mortality dle pohlaví – viz podkapitola 2.4 a konečně dle věkových skupin – viz podkapitola 2.5.

2.1 Diagnóza C64-66 – porovnání České republiky s ostatními zeměmi v počtu incidencí v přepočtu na 100 000 osob

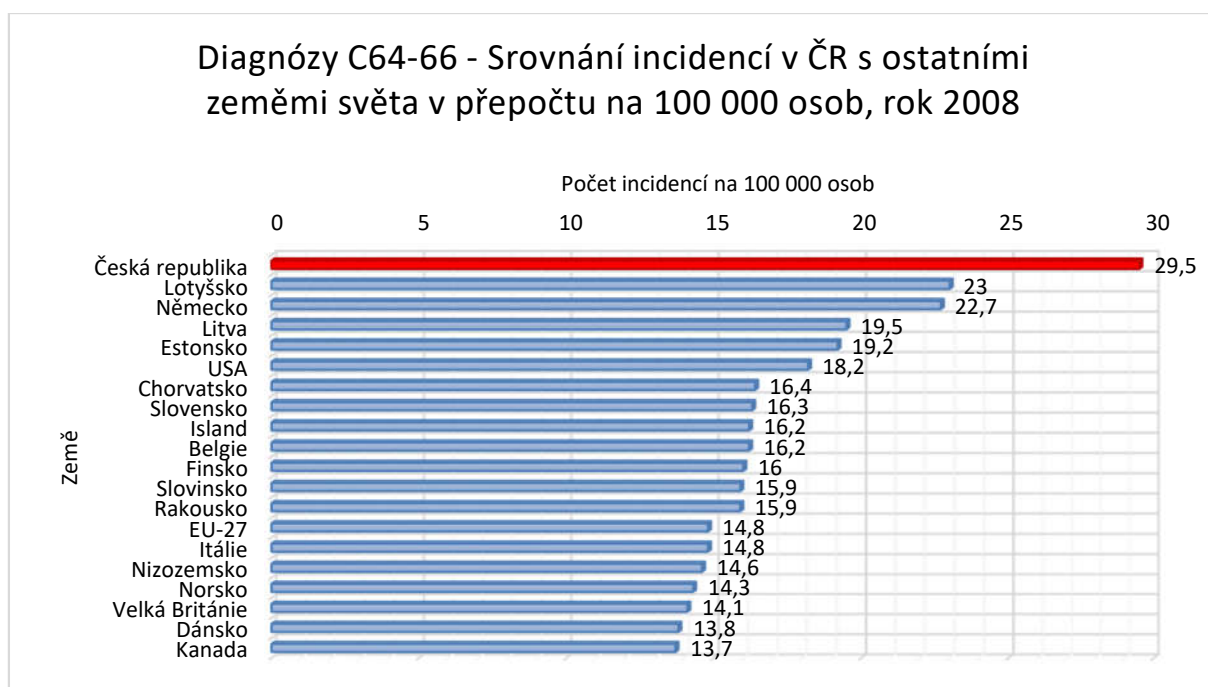
V této kapitole jsou veškerá data uvedena v přepočtu na 100 000 os., který vyjadřuje počet osob s diagnózou C64-66 na 100 000 os. v dané populaci (podle použití se rozumí celá populace, populace pouze mužů či pouze žen) bez ohledu na věkové skupiny, tzn., že se zde nebere v potaz fakt, že většina diagnostikovaných může být staršího věku a jejich počet je tak rozprostřen mezi celé různověké obyvatelstvo rovnoměrně.

Z posledních dostupných dat, tj. z roku 2008, je zřejmé, že se ČR s počtem téměř 30 incidencí (29,5 incidencí) umístila na prvním místě v evropském i celosvětovém žebříčku. Prvních 20 zemí seřazených sestupně dle počtu incidencí na 100 000 os. znázorňují tabulky – pro Evropu (Tab. 10) a pro celý svět (Tab. 11). Grafické znázornění prvních 20 zemí je uvedeno v grafech pro Evropu (Graf. 1) a celý svět (Graf. 2).



Graf. 1 Diagnóza C64-66 (ZN ledvin, ledvinné pánvičky, močovodu) – Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi Evropy v přepočtu na 100 000 osob, rok 2008, uvedeno prvních 20 zemí (SVOD, 2017)

Pořadí v evropském a celosvětovém žebříčku zůstává do 5. místa stejné (1. Česká republika, 2. Lotyšsko, 3. Německo, 4. Litva, 5. Estonsko), ovšem od 6. místa se začíná lišit. Celosvětově se na 6. místo řadí USA, čímž se dostává před Chorvatsko a u dalších zemí tak dochází oproti evropskému řazení k posunu o jednu příčku níže. Na 20. místě se celosvětově umístila Kanada, čímž se dostala před Bělorusko a Lucembursko (řazené v pořadí na 19. a 20. místo v evropském žebříčku). Tyto země se tak dostaly mimo tabulku prvních 20. zemí.



Graf. 2 Diagnózy C64-66 (ZN ledvin, ledvinné pánvičky, močovodu) - Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi v přepočtu na 100 000 obyvatel, rok 2008, uvedeno prvních 20 zemí (SVOD, 2017)

2.2 Diagnóza C64-66 – porovnání České republiky s ostatními zeměmi v počtu incidencí v přepočtu na světový standard (ASR-W)

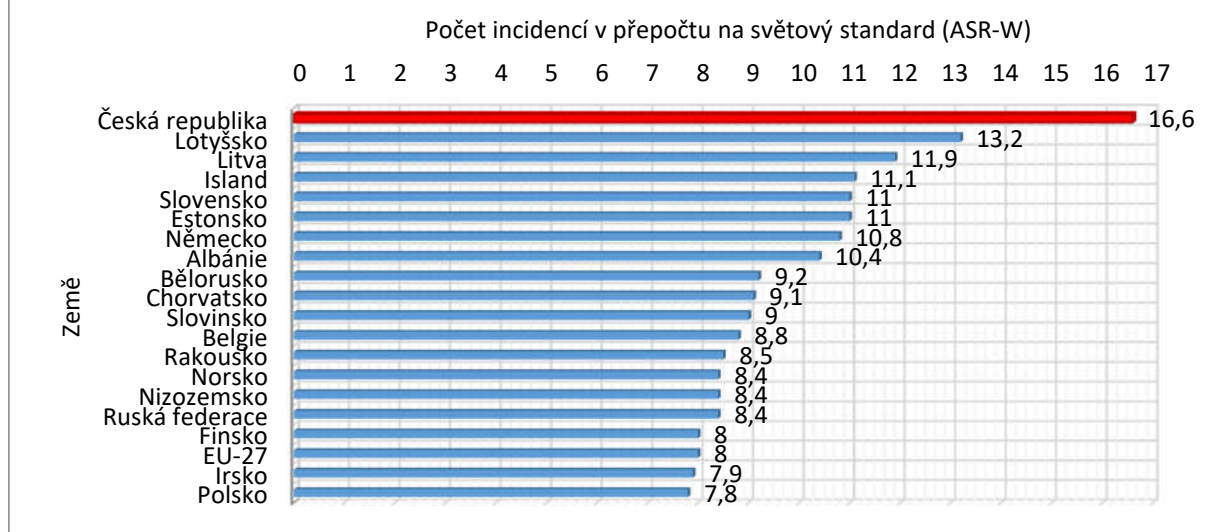
V této kapitole jsou veškerá data uvedena v přepočtu na světový standard (dále ASR-W), který vyjadřuje vážený průměr hrubých incidencí (tj. počet incidencí na 100 000 obyvatel v dané populaci), přičemž váhu určuje počet obyvatel v jednotlivých věkových skupinách, mezi které je rozděleno celkem 100 000 obyvatel světové populace. Věkových skupin je celkem 18 a jsou odstupňovány vždy po 5 letech – viz Tab. 7.

Tab. 7 Kategorizace věkových skupin (SVOD, 2017)

Věková skupina	0-4	5-9	10-14	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44
Světový standard	12000	10000	9000	9000	8000	8000	6000	6000	6000
Věková skupina	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85+
Světový standard	6000	5000	4000	4000	3000	2000	1000	500	500

Při přepočtu na ASR-W vychází hodnota pro incidenci v ČR 16,6, čímž se dostává na první místo v evropském i celosvětovém žebříčku. Prvních 20 zemí seřazených sestupně dle počtu incidencí v přepočtu na ASR-W znázorňují tabulky – pro Evropu (Tab. 12) a pro celý svět (Tab. 13). Grafické znázornění prvních 20 zemí je uvedeno v grafech pro Evropu (Graf. 3) a celý svět (Graf. 4).

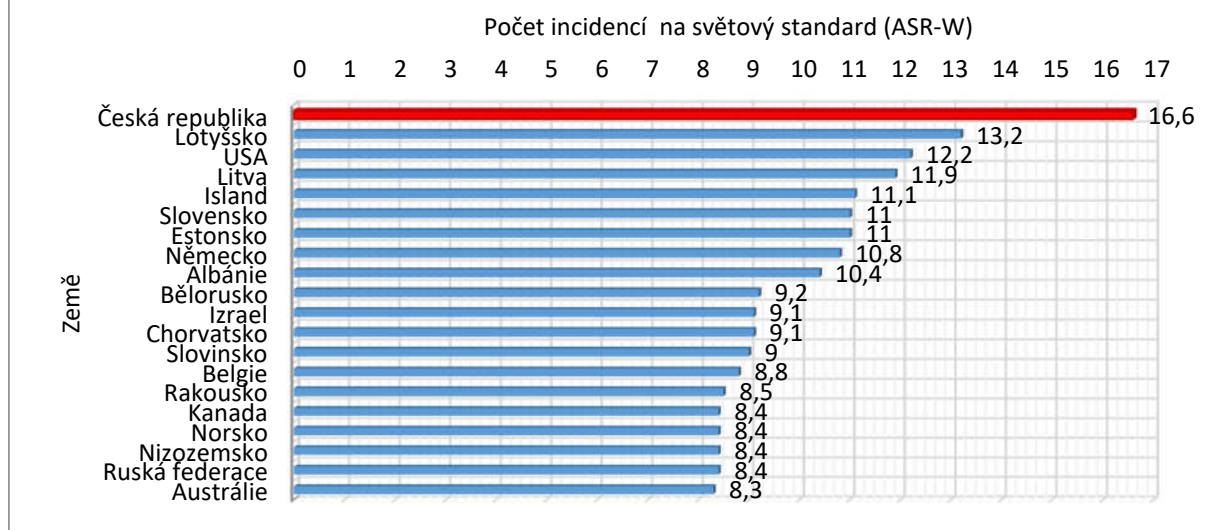
Diagnózy C64-66 - Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi Evropy v přepočtu na ASR-W, rok 2008



Graf. 3 Diagnózy C64-66 (ZN ledvin, ledvinné pánvičky, močového) – Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi Evropy v přepočtu na světový standard, rok 2008, uvedeno prvních 20 zemí (SVOD, 2017)

Pořadí v evropském a celosvětovém žebříčku se liší již od 3. místa, na kterém se celosvětově umístily Spojené státy Americké (USA), čímž se dostaly před Litvu. Další změny nastávají umístěním dalších mimoevropských zemí – Izrael (11-12. místo; 9,1), Kanada (16-19. místo; 8,4), Austrálie (20. místo; 8,3). Díky posunu se Finsko, EU-27, Irsko a Polsko dostaly mimo tabulku prvních 20 zemí.

Diagnózy C64-66 - Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi světa v přepočtu na ASR-W, rok 2008



Graf. 4 Diagnózy C64-66 (ZN ledvin, ledvinné pánvičky, močového) – Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi světa v přepočtu na světový standard, rok 2008, uvedeno prvních 20 zemí (SVOD, 2017)

2.3 Diagnóza C64 - porovnání incidence a mortality v ČR v letech 1977-2014 a předpověď dalšího vývoje do roku 2020

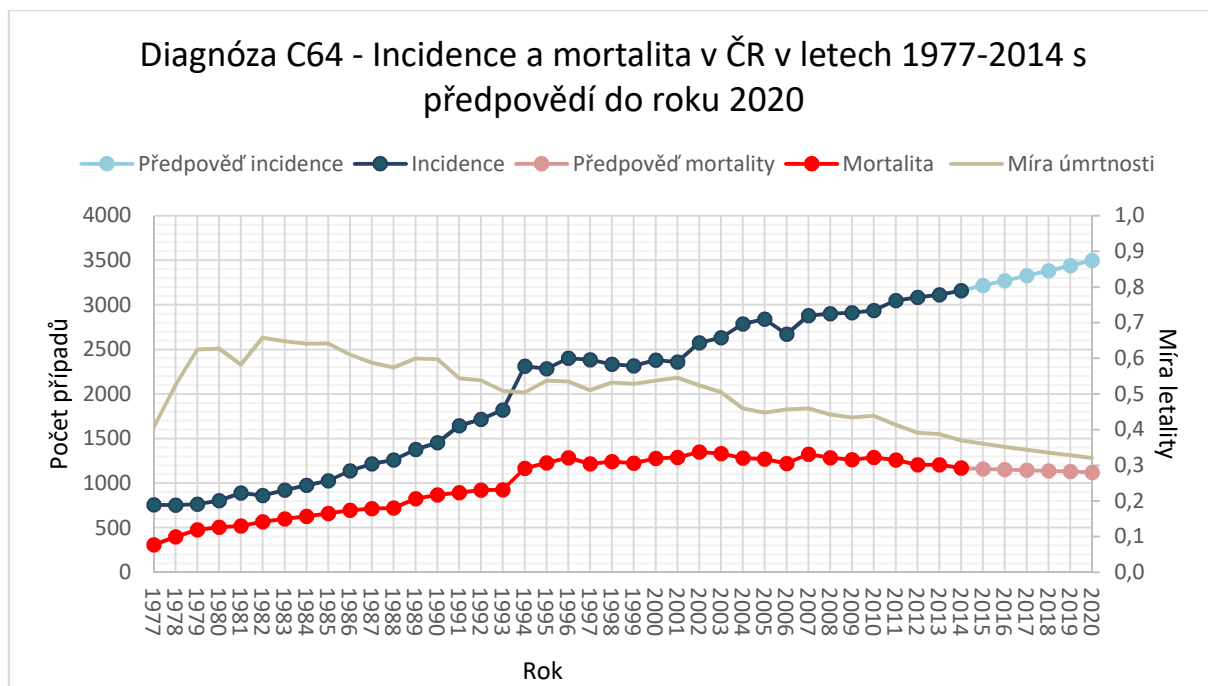
Jelikož jsou na SVODu o diagnóze C64 dostupná pouze data do roku 2014, byla pro následující roky statisticky vypočtena předpověď dalšího vývoje incidence a mortality, a to až do roku 2020. Z dat zaznamenaných v tabulce (Tab. 14) je od roku 1977 zřejmý dlouhodobý nárůst incidence i mortality, a jejich trend má tak stoupající charakter, a to i přes občasné výkyvy, které jsou patrné na křivkách vnesených do grafu (Graf. 5). Zatímco počet incidencí i nadále vzrůstá – od roku 2000 z hodnoty 2381 na hodnotu 3161 k roku 2014, mortalita se od roku 2007 snížila z hodnoty 1324 na hodnotu 1168 k roku 2014.

Dále je z tabulky (Tab. 14) patrné, že míra úmrtnosti M:I, tj. podíl zemřelých ze skupiny nově diagnostikovaných v daném roce, od roku 2001 klesá s výjimkou let 2006, 2007 a 2010, kdy došlo k nepatrnému dočasnému zvýšení maximálně o 0,01. Nejvyšší M:I (0,66) byla zaznamenána v roce 1982, naopak nejnižší hodnota (0,37) byla zaznamenána v roce 2014, což je poslední dostupný údaj.

Aby bylo zabráněno zkreslení předpovědi o dalším vývoji, zejména mortality, v důsledku dlouhodobě vzrůstajícího trendu, byla pro vypočítání předpovědi použita pouze data od roku 2000 (včetně) do roku 2014 (poslední dostupný údaj), tzn., že byla vytvořena předpověď na základě posledních dostupných 15 let.

Z vybraných dat byl vypočten průměrný absolutní přírůstek 55,71 pro incidenci a -7,93 pro mortalitu, přičemž počet pro incidenci a mortalitu v následujících letech 2015-2020 byl vždy vypočten přičtením průměrného absolutního přírůstku (incidence/mortality) k hodnotě (incidence/mortality) z předchozího roku (Tab. 15). Ve stejném grafu (Graf. 5) tak lze vidět pokračování (předpověď) dalšího vývoje, kdy křivka pro incidenci má tendenci stoupat, kdežto křivka pro mortalitu má lehkou tendenci klesat.

Dle předpovědi lze k současnému roku, tj. rok 2018, předpokládat vzrůst incidence na 3384, pokles mortality na 1136 a tím i pokles M:I na 0,34.



Graf. 5 Diagnóza C64 – Incidence, mortalita a míra úmrtnosti v ČR v letech 1977-2014 s předpovědí dalšího vývoje do roku 2020 (SVOD, 2017)

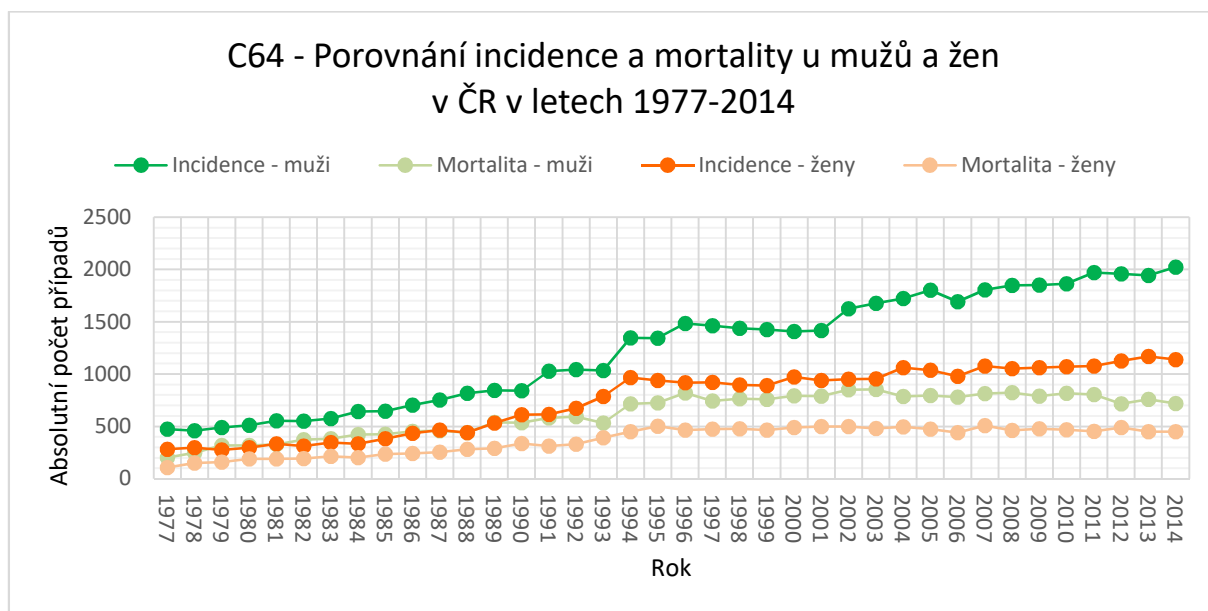
2.4 Diagnóza C64 - porovnání incidence a mortality v ČR v letech 1977-2014 dle pohlaví

Zhoubné nádory ledvin postihují přibližně 1,5krát častěji muže než ženy (Kolářová, 2016). O tom se lze přesvědčit v tabulce (Tab. 16), ve které jsou zaznamenána data o incidenci a mortalitě dle pohlaví v průběhu let 1977-2014, ze kterých vyplývá, že každý rok přibude v průměru 1,65krát více nemocných mužů než žen. Grafické znázornění incidencí a mortalit dle pohlaví v jednotlivých letech je zaznamenáno na grafu (Graf. 6).

U mužů je po celá léta vyšší počet incidencí než u žen, přičemž za posledních dostupných 20 let, tj. od roku 1994, se křivky incidencí mužů a žen znatelně rozcházejí. Ačkoliv obě křivky mají stoupající trend, počet incidencí u mužů narůstá daleko rychleji než u žen a jejich rozdíl tak nabývá vysokých hodnot, přičemž v roce 2011 byl zaznamenán nejvyšší rozdíl (895), kdy u mužů byla incidence 1971 a u žen 1076. Za posledních dostupných 20 let se incidence u mužů zvýšila z hodnoty 1346 (k r. 1994) na 222 (k r. 2014), což je cca o 50 %, a u žen z hodnoty 966 (k r. 1994) na 1139 (k r. 2014), což je o cca 18 % za 20 let, tzn., že počet incidencí u mužů narůstá téměř 3x rychleji než u žen.

Mortalita je rovněž po celá léta vyšší u mužů než u žen a ani u jednoho pohlaví se za posledních dostupných 20 let, na rozdíl od incidencí, nijak výrazně nezměnila. U mužů lze v posledních letech, přibližně od roku 2003, pozorovat pomalu klesající mortalitu, která sice nejprve vzrostla ze 717 (k r. 1994) na 852 (k r. 2003), ale poté opět klesla na 719 (k r. 2014).

U žen pokles není až tak výrazný a od roku 1994 je mortalita dlouhodobě téměř neměnná, v rozmezí 440 až 509, k r. 2014 s hodnotou 449.



Graf. 6 Diagnóza C64 - absolutní počty incidencí a mortalit v České republice dle pohlaví v letech 1977-2014 (SVOD, 2017)

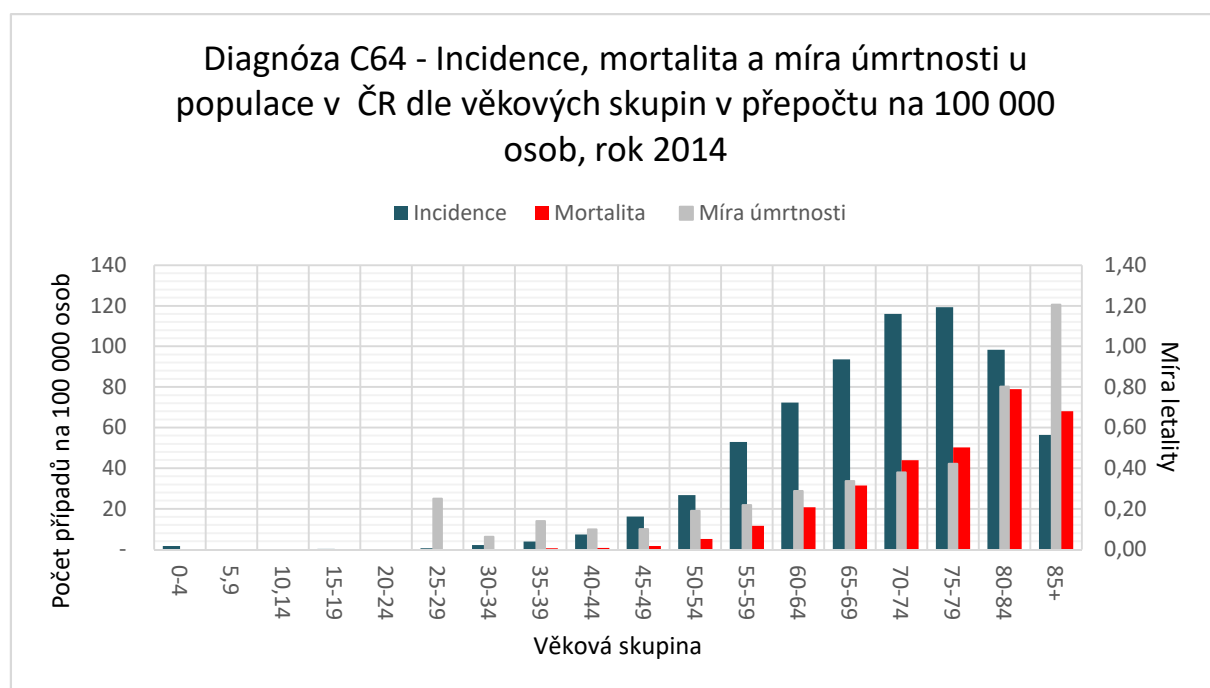
2.5 Diagnóza C64 - porovnání incidence a mortality v ČR v letech 1977-2014 dle věkových skupin

V tabulce (Tab. 17) jsou zaznamenána data z roku 2014 o incidenci, mortalitě a M:I dle věkových skupin pro celkovou populaci ČR a dále o incidenci a mortalitě dle pohlaví. Veškerá data jsou uvedena v přepočtu na 100 000 osob v dané věkové skupině, přičemž pro přepočet byla použita data absolutního počtu případů (incidencí/mortalit) dostupná na webových stránkách (SVOD, 2017) a demografická data dostupná na webových stránkách (PopulationPyramid, 2017). Grafické znázornění pro celkovou populaci je uvedeno na grafu (Graf. 7) a dle pohlaví na grafu (Graf. 8).

Nejvyšší počet incidencí (119,22 os.) se vyskytuje ve věkové skupině 75-79 let. Na druhém a třetím místě jsou věkové skupiny 70-74 let (115,95 os.) a 80-84 let (98,33 os.). Ve věkovém rozmezí 5-14 let nebyla k roku 2014 potvrzena žádná incidence a nejnižší zaznamenaná hodnota (0,16 os.) je tak ve skupině 20-24 let. Pozoruhodný je také počet incidencí v nejmladší věkové skupině 0-4 let (1,65 os.), který vysoce převyšuje počty incidencí ve věkových kategoriích od 5 do 29 let. Obecně lze s výjimkou zmíněné nejmladší skupiny a skupin nad 79 let říci, že počet incidencí roste s věkem. Od 30. roku života se počet incidencí zřetelně zvyšuje, a to až do 79. roku. Poté opět klesá a ve věkové kategorii 85+ nabývá hodnoty 56,39 os.

Nejvyšší mortalita byla zaznamenána ve věkové skupině 80-84 let (78,92 os.). Na druhém a třetím místě v počtu úmrtí jsou věkové skupiny 85+ let (67,99 os.) a 75-79 let (50,29 os.). Ve věkovém rozmezí 0-24 let nebyla potvrzena žádná mortalita a nejnižší zaznamenaná hodnota (0,13 os.) je tak ve věkové skupině 30-34 let. Obecně lze říci, že mortalita stoupá s věkem s výjimkou nejstarší věkové skupiny. Od 45. roku života mortalita znatelně stoupá, a to až do 84. roku. Poté opět klesá a ve věkové kategorii 85+ nabývá hodnoty 67,99 os., čímž přesahuje hodnotu incidence a M:I tak dosahuje nejvyšší hodnoty 1,21. Lze tedy říci, že ve věkové skupině 80-84 let dochází k nejčastějším (78,92 os.) úmrtím.

Podobně jako incidence a mortalita roste s věkem i M:I. Vzhledem k velmi nízkým počtům incidencí a ještě nižší mortalitě v mladší polovině věkových skupin je třeba brát ohled na možné vzniklé nepřesnosti v M:I v těchto skupinách. Např. ve věkové skupině 25-29 let je nejpatrnější riziko nepřesnosti, kdy M:I 0,25 je tvořena pouhým 1 úmrtím mezi 4 nově diagnostikovanými.



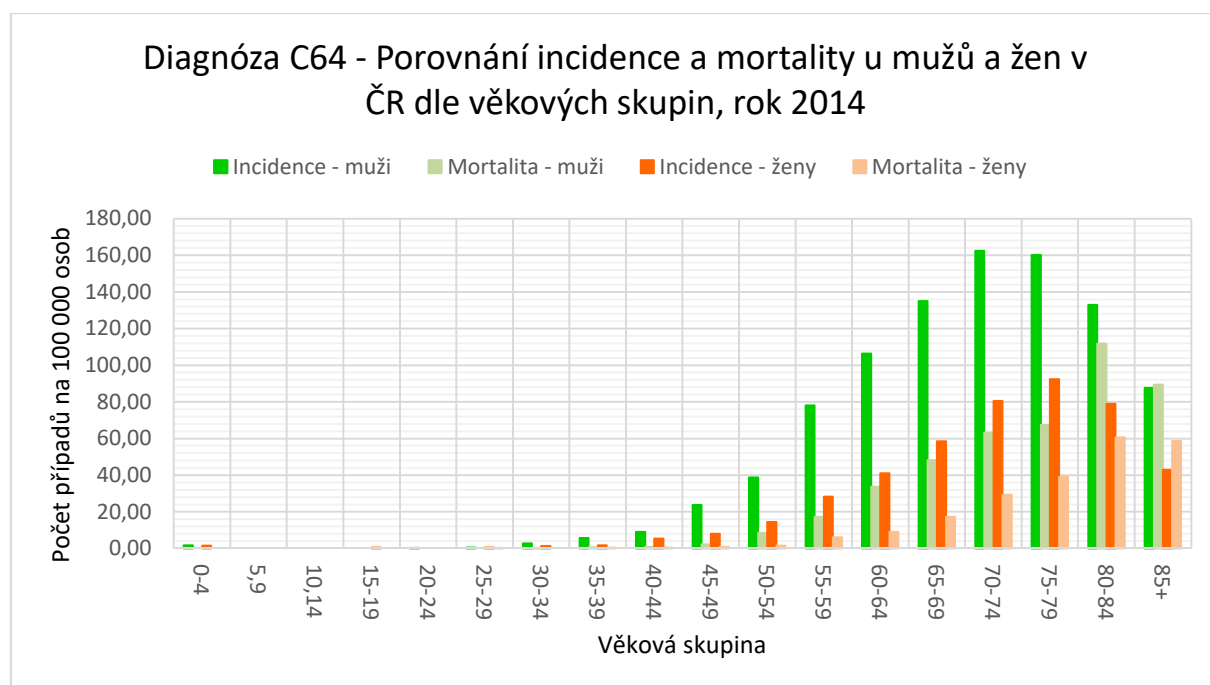
Graf. 7 Diagnóza C64 – Incidence, mortalita a míra úmrtnosti v České republice dle věkových skupin v přepočtu na 100 000 os., rok 2014 (SVOD, 2017; PopulationPyramid, 2017)

V porovnání mužů a žen se ve většině věkových skupin ukázala u mužů daleko vyšší incidence i mortalita. Největší rozdíly incidencí jsou patrné ve věkové skupině 70-74 let, ve které je u mužů počet incidencí 162,46 os. a u žen 80,54 os., což je o 81,92 os. (resp. 2krát) vyšší incidence u mužů než u žen. Největší rozdíly v mortalitě jsou ve věkové skupině 80-84 let, kdy je u mužů mortalita 111,75 os. a u žen 60,55 os., což je o 51,20 os. vyšší mortalita u mužů než u žen. U žen je nepatrně vyšší výskyt incidence i mortality zároveň

pouze ve věkové skupině 25-29 let, kdy je incidence vyšší pouze o 0,03 os. a mortalita o 0,29 os. Ve věkové skupině 15-29 je u žen vyšší pouze incidence o 0,43 os.

U mužů se incidence začíná znatelně zvyšovat od 30. roku života a vrcholí okolo 70-74 let (162,42 os.). S vyšším věkem opět klesá a u věkové skupiny 85+ dosahuje počtu 87,67 os. Oproti mužům je u žen zvýšený výskyt incidencí posunut o jednu věkovou kategorii výše a začíná tedy až od 40. let, přičemž vrcholí okolo 75-79 let (92,44 os.). S vyšším věkem opět klesá a u osob starších 85 let dosahuje počtu 42,95 os., což je oproti mužům přibližně poloviční hodnota. (Kolářová, 2016) však uvádí, že je nejvyšší výskyt nádorů ledvin pozorován mezi 50. a 70. rokem života, což se příliš neshoduje s daty ze SVODu. Pozoruhodný je již výše zmíněný zvýšený počet incidencí v nejmladší věkové kategorii 0-4 let, přičemž nyní lze vidět, že se tento jev vyskytuje jak u mužů (1,78 os.), tak u žen (1,50 os.).

U mužů začíná mortalita nabývat vyšších hodnot ve věku 45-49 let (2,29 os.) a vrcholí ve věku 80-84 let (111,75 os.). S vyšším věkem opět klesá a u osob starších 85 let dosahuje hodnoty 89,42 os. U žen začíná mortalita stoupat oproti mužům později, ve věku 50-54 let (1,5 os.), a vrcholí ve stejném věku 80-84 let (60,55 os.). S vyšším věkem počet úmrtí opět klesá a u osob starších 85 let dosahuje hodnoty 58,78 os., což je přibližně o třetinu méně než u mužů.



Graf. 8 Diagnóza C64 – Incidence a mortalita v ČR dle pohlaví a věkových skupin v přepočtu na 100 000 os., rok 2014 (SVOD, 2017; PopulationPyramid, 2017)

3 Teoretické zásady manipulace s biologickým materiálem (močí) v preanalytické fázi (tj. před analýzou)

Biologickým materiálem (BM) se rozumí např. tělní tekutiny (krev, plazma, krevní sérum), exkrety (moč) či tkáň člověka odebraná „*post mortem*“ (ledviny, plíce, játra) (Malíř *et al.*, 2002; Malíř *et al.*, 2005; Malíř, 2010), přičemž se uvádí, že krev a moč představují nejčastěji vyšetřované materiály (Mráz *et al.*, 2009). V této práci má z BM zcela zásadní význam moč.

Aby bylo při vyšetřování BM dosaženo bezpečným způsobem spolehlivých a co nejpřesnějších výsledků, je potřeba dodržovat zásady správné manipulace s BM. Nedodržení těchto zásad může vést ke zkreslení výsledků analýzy, což může vést až k poškození pacienta (Špírková, 2015).

3.1 Manipulace s biologickým materiálem před analýzou – teoretické informace

Manipulace s BM před jeho analýzou zahrnuje sérii kroků počínaje odběrem (viz podkapitola 3.1.1), transportem (viz podkapitola 3.1.2) a konče příjmem vzorku moče příslušnou laboratoří (viz podkapitola 3.1.3).

3.1.1 Sběr 24hodinové moče

Pro odběr BM obecně (tzn. nejen moči) platí několik zásad, z nichž nejdůležitější je používání osobních ochranných pomůcek (ochranný oděv, jednorázové rukavice) a sterilních nástrojů/pomůcek, a to vždy pro každou vyšetřovanou osobu (Maďar & Podstatová, 2006; Janatová, 2017). Odběr vzorku se provádí v příjmové místnosti pouze na ploše vyčleněné pro odběr či u lůžka pacienta (Maďar & Podstatová, 2006).

Moč představuje obvykle snadno dostupnou tělesnou tekutinu. Její odběr je za běžných podmínek prováděn neinvazivní metodou – tzn. bez potřeby vniknutí vyšetřovacích přístrojů/nástrojů do vnitřního prostředí organismu (Kasalová, 2017). U pacientů v intenzivní péči je však nutné odebrat vzorek moče z močového měchýře invazivním způsobem – zavedením tzv. močového katétru – tj. urologické cévky (Špírková, 2015). V expozičních studiích je doporučeno shromažďovat 24hodinovou moč namísto první ranní či náhodně odebrané moče, pokud je to možné, neboť náhodně odebrané vzorky nejsou obvykle reprezentativní pro vylučování moče během jednoho dne (Warth *et al.*, 2013).

Dle laboratorní příručky FN HK je sběr moče za 24 hodin prováděn od 6 hodin ráno, kdy se pacient naposled vymočí mimo sběrnou nádobu. Veškerá další moč je sbírána (i při

stolici) do předem označené sběrné lahve. Poslední moč je odebrána v 6 hodin ráno následujícího dne. Po důkladném promíchání množství moče sebrané za 24 hodin je změřen a zapsán celkový objem. Podle požadované analýzy je z celkového objemu odebrán jen vzorek moče (Špírková, 2015), např. 50-100 ml (Hostačná, 2015), nejlépe do jednorázových plastických vzorkovnic se šroubovým uzávěrem, protože zátky jsou zcela nevhodné z důvodu nebezpečí vystříknutí infekčního aerosolu při odzátkování (Janatová, 2017). Vzorkovnice je řádně označena pacientovým jménem a příjmením, rodným číslem, datem a časem odběru vzorku, druhem odebíraného materiálu, přičemž tyto údaje uvedené na štítku vzorkovnice musí souhlasit s údaji uvedenými v žádance a musí být čitelné (Hostačná, 2015). Neidentifikovatelný materiál je považován za bezcenný (Maďar & Podstatová, 2006). Správně označený vzorek včetně žádanky je transportován do příslušné laboratoře (Špírková, 2015).

3.1.2 Transport a skladování moče

Po odebrání jsou řádně označené vzorky neprodleně odneseny/odvezeny do příslušné laboratoře. Je důležité, aby transport proběhl co nejrychleji – bez zbytečného prodlužování a bez velkých teplotních výkyvů (Hostačná, 2015). Jakékoliv skladování moče je nevhodné (Maďar & Podstatová, 2006), není-li však možné vzorky ihned předat do laboratoře, musí být skladovány v chladničce při teplotě 1-4 °C (Hostačná, 2015).

S každým BM je nutno při transportu zacházet jako s infekčním materiálem (Maďar & Podstatová, 2006). Pro bezpečný transport je doporučeno vzorky zabalit do dvojitého obalu – ochranného a dekontaminovatelného transportního obalu (Maďar & Podstatová, 2006), nebo se doporučuje vložit nádoby se vzorky do přepravných stojánek či kontejnerů, které zajistí jejich stabilitu a tím zabrání případnému rozlití či jinému znehodnocení vzorků (Janatová, 2017). Nejdůležitější však je, aby samotná transportní nádoba dobře těsnila, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku z vnějšího prostředí, a zároveň aby vnější prostředí nebylo kontaminováno vzorkem (Maďar & Podstatová, 2006). Dojde-li při transportu k potřísnění nádoby vzorkem, nelze tento vzorek dále zpracovávat (Janatová, 2017).

3.1.3 Přijetí materiálu a jeho evidence

Před přijetím vzorku do laboratoře je provedena kontrola žádanky a přijatého materiálu. Je-li vše v pořádku, veškeré údaje ze žádanky jsou zadány do laboratorního informačního systému (LIS), který přijatému materiálu přidělí laboratorní číslo (Špírková, 2015).

Důvody pro nepřijetí materiálu mohou být různé – např. neoznačený či špatně označený vzorek, chybějící či nečitelná žádanka, neshoda mezi označením vzorku a žádankou, znečištění/poškození žádanky či vzorkovnice, viditelná kontaminace přepravního zařízení, nesprávně odebraný materiál (kvalita, druh, množství), nevhodný časový interval mezi odběrem a dodáním vzorku do laboratoře apod. (Špírková, 2015).

4 Standardní operační postup (SOP): Stanovení ochratoxinu A (OTA) v moči metodou HPLC-FLD

4.1 Předmět a vymezení působnosti a definice

Chromatografie je považována za moderní metodu sloužící nejen k oddělení (separaci) jednotlivých látek ze zkoumané směsi, ale také k identifikaci a kontrole čistoty připravovaných či izolovaných látek, tím lze získat jak kvantitativní, tak kvalitativní informace o vzorku (Novotný, 2013). Princip metody spočívá v nestejněmístné distribuci jednotlivých složek směsi (analytů) v separační koloně mezi dvě různé nemísitelné fáze – SF (sorbentem) a MF (eluentem), podmíněné odlišnou afinitou jednotlivých analytů k těmto dvěma fázím - zatímco látky s vyšší afinitou ke SF jsou zadržovány či zpoždovány, látky s nižší afinitou ke SF zůstávají přednostně v MF a jsou dále unášeny kolonou. Tím dochází k separaci jednotlivých analytů (Coufal, 1996; Cvačka, 2010; Novotný, 2013; Mikušková, 2016). V současnosti jde o jednu z hlavních využívaných moderních analytických metod, která slouží nejen k separaci, ale také identifikaci a kvantifikaci obsahu sledovaných látek v MF (LACH-NER, 2017), v našem případě mykotoxinu – ochratoxinu A. FLD je založen na principu fluorescence a měření sekundárního (emisního) záření, které daná látka vyzáří po absorpci primárního (excitačního) elektrochemického záření (Cvačka, 2010). Z toho vyplývá, že je FLD vysoce selektivní a citlivý pouze pro přirozeně fluoreskující látky či látky, které lze převést činidly předkolonovou či pokolonovou derivatizací na fluoreskující deriváty (Mikušková, 2016; VŠCHT, 2018).

4.2 Princip

Metoda HPLC-FLD je použitelná pro kvantitativní stanovení ultrastopových množství OTA v lidské moči. Při zpracování vzorku na stanovení OTA v moči se využívá imunoafinitní sloupcové chromatografie, jejíž podstatou je použití imunoafinitních kolonek (IAK) určených pro separaci OTA ze vzorku (Škarková, 2009). IAK jsou před použitím kondicionovány – tzn. vytemperovány na laboratorní teplotu (vyndány z ledničky cca 0,5-1 hodinu před použitím) a částečně vyprázdněny (pufr obsažený v IAK je vypuštěn tak, aby jeho hladina zůstala nad úrovní horní frity s gelem) (OCHRAPREP, R-Biopharm, 2005). Suspenze gelu v IAK obsahuje specifické protilátky zakotvené na bílkovinném nosiči. Je-li OTA přítomen ve vzorku, absorbuje se na specifické protilátky na základě vazby antigen (v tomto případě OTA) – protilátka. Při promytí mycím roztokem – fosfátovým pufrem (PBS) jsou ostatní látky odstraněny z kolonky. K uvolnění (tj. desorpci či eluci) OTA z komplexu

antigen-protílátka se používá jako eluční činidlo 1,5 ml směsi metanolu s kyselinou octovou (98 : 2 v/v). Vzniklý eluát je jímán do malé vialky (1,8 ml) se šroubovým uzávěrem a následně odpařen dusíkem na koncentrátoru vzorků EVATERM (Škarková, 2009).

4.3 Bezpečnost

Toxické účinky OTA jsou dobře známy (podrobně popsáno v kapitole 1.4.1). Navíc se pracuje se vzorky močí, které mohou být zdrojem různé infekce, proto je třeba při jejich zpracování postupovat v souladu se zásadami bezpečnosti práce, používat osobní ochranné pomůcky, např. laboratorní oděv, přezůvky a pracovní rukavice, případně obličejový štítek (brýle) a respirátor. Veškeré manipulace je třeba provádět v digestoři či laminárním boxu se zapnutým odsáváním. Dále je třeba používat skleněné pipety s nástavci, či automatické pipety a dávkovače. Laboratorní sklo a pomůcky je třeba mýt a dekontaminovat podle postupů, které jsou přílohou provozního řádu oddělení (viz podkapitola 5.2). Při práci s hořlavými (metanol, acetonitril), kyselinami (octová, chlorovodíková), metanolovým roztokem fluoridu boritého je třeba dodržovat příslušná bezpečnostní opatření a zabránit jejich požití, vdechování a styku s pokožkou.

4.4 Sběr, doprava a předání vzorků

Ve FN HK byly celkem 50 pacientům s následujícími diagnózami: C64 - zhoubný nádor ledvin mimo páničku, C675 - zhoubný nádor hrdla močového měchýře a N131 - hydronefróza se strikturou ureteru odebrány v průběhu 1,5 roku (listopad 2015 - duben 2017) vzorky moče s hlavním cílem stanovit v nich OTA. Celkem bylo získáno 50 vzorků moče. Vzorky moči byly odebrány 48-24 hodin před operací (maximálně 24hodinový odběr – někteří pacienti se dostavili na vyšetření později, a proto jejich odběr moči trval kratší dobu než 24 hodin), 24hodinový vzorek moče byl důkladně protřepán a z něho byl odebrán 2x dílčí vzorek moče o objemu přibližně cca 60 ml moče - do jednorázových plastických vzorkovnic se šroubovým uzávěrem – 1 x pro ZÚ se sídlem v Ústí nad Labem, pracoviště HK – NRL. V jednom vzorku bylo provedeno stanovení ochratoxinu A, ale také pH, kreatininu, objemu v ml a hmotnosti v g. Druhý vzorek moče byl záložní pro případné zopakování. Vzorky byly řádně popsány lokálním pořadovým číslem LEV (např. 1). Takto zpracované vzorky moče byly zmrazeny při teplotě -80 °C pro jejich uchování k pozdější analýze.

Pro studii byli vybráni nemocní, u kterých proběhla operace bez komplikací. Pacienti byli rovněž bez kardiovaskulárních komplikací a splňovali další kritéria, a to absenci metastáz

a celkového metabolického rozvratu. Pro nemocné byly vytvořeny příslušné dokumenty: informace pro nemocného, informovaný souhlas nemocného a také skladba konzumovaných potravin po dobu hospitalizace (Toman, 2017).

Pacienti jsou v této práci vedeni v anonymitě, v laboratoři je známé pouze tzv. interní číslo LEV. Známe jsou dále pouze údaje významné pro tuto studii (pohlaví, rok narození, hmotnost pacienta, stanovená diagnóza a místo bydliště – město/vesnice) a jsou zaznamenány v tabulce (Tab. 18). Statistické zpracování dat o pacientech je uvedeno v tabulce (Tab. 19).

Vybraná populace byla tvořena převážně muži, jenž z celkového počtu zastupovali 78 % (tj. 39 pacientů). Ženy tak zastupovaly zbývajících 22 % (tj. 11 pacientek).

Jednalo se o pacienty narozené v letech 1936-1977 (tj. k roku 2016 věkové rozmezí 39-80 let), přičemž nadpoloviční většina – 58 % (tj. 29 pacientů, z toho 5 žen a 24 mužů) spadala do věkové kategorie „stárnutí“ s věkovým rozmezím 61-75 let. Zhruba čtvrtina jedinců – 26 % (tj. 13 pacientů, z toho 3 ženy a 10 mužů) spadala do věkové kategorie „střední věk“ s věkovým rozmezím 46-60 let. Krajní věkové kategorie „zralost“ s věkovým rozmezím 31-45 let a „stárnutí“ s věkovým rozmezím 76-80 měly v porovnání s předchozími kategoriemi celkem nízké zastoupení. V kategorii „zralost“ bylo zastoupeno 10 % (tj. 5 pacientů, z toho 3 ženy, 2 muži). V poslední kategorii „stáří“ bylo pouhých 6 % (tj. 3 pacienti, z toho 0 žen, 3 muži).

Hmotnost pacientů se pohybovala v rozmezí 57-155 kg, přičemž průměrná hmotnost byla 90 kg a medián 91 kg. Průměrná hmotnost mužů dosahovala zdatně vyšších hodnot (93 kg) než u žen (80 kg), rovněž medián byl u mužů podstatně vyšší (91 kg) než u žen (64 kg).

Téměř všem pacientům byla stanovena diagnóza C64 – 96 % (tj. 48 pacientů – z toho 38 mužů a 10 žen). Zbylé diagnózy byly zastoupeny po 2 %, přičemž diagnóza C675 byla stanovena u 1 muže a diagnóza N131 u 1 ženy.

Z města pocházelo 86 % pacientů (tj. 43 osob – z toho 33 mužů, 10 žen). Pouze 14 % pacientů (tj. 7 osob – 6 mužů, 1 žena) pocházelo z venkova.

Naměřené hodnoty moči jsou zaznamenány ve výsledcích – viz podkapitola 6.2 (objem a hmotnost moči), 6.3 (množství kreatininu v moči).

4.5 Chemikálie a spotřební materiál

4.5.1 Základní chemikálie

Ochratoxin A, SIGMA-ALDRICH, obj. č. 85,628-2 (0 1877); kyselina chlorovodíková (HCl) p.a., MERCK; dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), MERCK; hydrogenfosforečnan dvojsodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), MERCK; Metanol gradient grade pro chromatografii, Lichrosolv, MERCK, Acetonitril gradient grade pro chromatografii, Lichrosolv, MERCK; Octan sodný bezvodý, Suprapur, MERCK; kyselina octová (ledová) p.a., MERCK; chlorid sodný, Suprapur, MERCK; Fluorid boritý, 14% metanolvý roztok, SIGMA-ALDRICH; ultračistá voda ze zařízení Milli Q plus, MILLIPORE.

4.5.2 Spotřební materiál

Ochraprep, imunoafinitní kolonky ke kvantitativnímu stanovení OTA HPLC, Rhone-Poulenc Diagnostics, obj. č. P 14, dodavatel Jemo Trading s.r.o., Bratislava- případně OchraTest, Vicam, dodavatel Chromservis Praha; papírové filtry Whatman č. 4, MERCK, obj. č. 1004 185 (1004090), nebo filtrační papíry KA2-M, Papírna Pernštejn s.r.o. (případně filtrační papíry Filtrak 388,389, 390); dusík tech. 4,7, SIAD spol. s.r.o., Braňany u Mostu, plastické vzorkovnice se šroubovým uzávěrem, stojan pro filtrace - s filtračními kruhy, automatické pipety, plastové špičky k pipetám

4.5.3 Roztoky

Roztoky ochratoxinu A

Roztoky o koncentraci OTA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 40 ng/ml , 4 ng/ml a 0,4 ng/ml) byly připraveny v souladu se standardním operačním postupem platným v ZÚ v Ústí nad Labem, pracoviště HK, NRL pro biomarkery mykotoxinů.

Základní roztok ochratoxinu A v metanolu 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Do lahvičky s obsahem 1 mg (tj. 1000 μg) ochratoxinu A se odpipetuje 5 ml metanolu a nechá se rozpustit. Do odměrné baňky se zábrusem se napipetuje 90 ml metanolu, pak se přidá 5 ml roztoku ochratoxinu A v metanolu z originální lahvičky. Tato lahvička se znovu vypláchne 5 ml metanolu, který se přidá do odměrné baňky. Odměrná baňka se uzavře, překryje parafilmem a připravený standard se uloží do mrazničky při $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Doba použitelnosti je 1 rok.

Pracovní roztok ochratoxinu A 40 ng/ml (40 µg/l)

Napipetuje se 0,1 ml základního roztoku a doplní se metanolem do odměrné baňky o objemu 25 ml po značku. Roztok se uchová v odměrné baňce v lednici s uzávěrem překrytým parafilmem. Doba použitelnosti je 1 rok.

Pracovní roztok I. ochratoxinu A 4 ng/ml (4 µg/l)

Napipetuje se 1 ml pracovního roztoku a doplní se metanolem do odměrné baňky o objemu 10 ml po značku. Roztok se uchová v chladničce a jeho použitelnost je maximálně 10 dnů.

Pracovní roztok II. ochratoxinu A 0,4 ng/ml (0,4 µg/l)

Napipetuje se 1 ml pracovního roztoku I a doplní se metanolem do odměrné baňky o objemu 10 ml po značku. Roztok se uchová v chladničce v nádobkách k tomu určených. Doba použitelnosti 3-5 dní.

Fosfátový pufr (PBS):

Do baňky o objemu 1000 ml se naváží 0,62 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 5,73 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu dvojsodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) a 9 g chloridu sodného (NaCl). Baňka se doplní destilovanou vodou po rysku a protřepe se. pH se upraví na 7,4 přidáním 0,1M kyseliny chlorovodíkové (HCl) dle potřeby (Skarkova *et al.*, 2013). Roztok lze uchovávat v lednici po dobu 1 roku.

Mobilní fáze na HPLC:

Methanol : acetonitril : 0,005 mol/l octan sodný : kyselina octová v poměru 300 ml : 300 ml : 400 ml : 14 ml (v/v/v/v)

4.5.4 Přístroje a pomocná zařízení

Kapalinový chromatograf s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD) – Spectra System (USA) – [vakuový odplyňovač SCM 400, USA; gradientová pumpa P 2000 USA; automatický dávkovač AS 3000, USA; fluorescenční detektor Jasco model 920 FP - Japonsko, počítač se softwarem CSW 32, zařízení pro úsporu mobilní fáze - solvent saver model 2907 Jour Research - Švédsko; analytická kolona Inertsil ODS-3V 150 x 4,6 mm (Hichrom) s velikostí částic 5 µm; předkolona Phenomenex 3 x 4 mm s náplní C18].

Dále mrazničky (-20 °C; -80 °C); chladnička, prosávací zařízení; zařízení pro odpařování pod dusíkem (tj. koncentrátor vzorků) EVATERM, výrobce Ing. V. Hanuš, Brno; váhy jemné 1. tř., Sartorius R 200 D, výrobce SARTORIUS AG, SRN, dodavatel

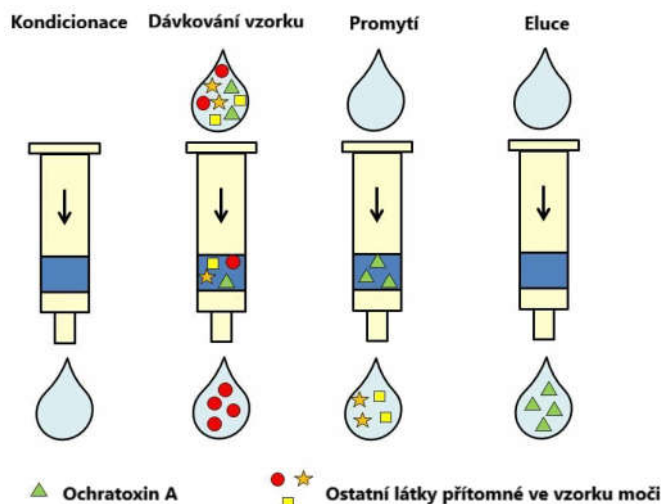
SARTALEX v.d., Ústí nad Labem; Laboratorní odstředivka (centrifuga) MPW-350e, výrobce MPW Med-Instruments, Polsko, dodavatel UNIMED v.o.s. Praha; nebo BR4i multifunkční stolní chlazená centrifuga, výrobce JOUAN, Francie, dodavatel Trigon - plus s.r.o., Čestlice; pH-metr WTW, typ 330- s kombinovanou elektrodou; zařízení pro řízený průtok imunoafinitní kolonkou, vakuová jednotka BAKER SPE 12 G s prosávací pumpou SIGMA n. MILLIPORE, BAKER, Velká Británie; filtrační zařízení Millipore – pro úpravu mobilní fáze.

5 Postup

Pracovní postup stanovení OTA lze rozdělit na dvě fáze: přípravu vzorků k analýze – resp. separace OTA na imunoafinitních kolonkách a vlastní stanovení OTA metodou HPLC – FLD.

5.1 Příprava vzorků a separace OTA na imunoafinitních kolonkách

Princip extrakce OTA ze vzorku je schematicky znázorněn na Obr. 7.



Obr. 7 Schéma extrakce OTA pomocí imunoafinitní kolonky (Klabačková, 2016)

Ze všeho nejdříve byly vzorky rozmrazeny a vytemperovány na laboratorní teplotu 20 °C (Obr. 8). Vzorek byl v plastické vzorkovnici řádně promíchán skleněnou tyčinkou, aby došlo k distribuci sedimentu v celém objemu. Poté bylo odebráno 25-30 ml moče, která byla zfiltrována pomocí filtrační aparatury (Obr. 9) přes skládaný filtrační papír KA-2. Z filtrátu bylo poté pipetou odebráno 20 ml vzorku.

IAK byly vyjmuty z chladničky a vytemperovány na teplotu laboratoře cca 20 °C, a poté nasazeny spolu s násadcem na vakuové prosávací zařízení, pomocí kterého došlo k rychlejšímu vykapání pufru obsaženého v kolonce (= tzv. kondicionace). Puftr se nechal vykat tak, aby jeho hladina zůstala lehce nad úrovní frity s gelem a nedošlo tak k jeho vyschnutí.

Do takto připravené kolonky byl pipetou nadávkován filtrát moči (20 ml) (Obr. 10, Obr. 11), který se nechal velmi pomalu prokapávat do skleněné vany – minimálně 40 min., tj. rychlost cca 10 kapek/min. Frita s gelem byla opět udržována pod hladinou kapaliny, aby nedošlo k jejímu vyschnutí před promytím PBS. Rychlost prokapávání byla regulována vytvářením podtlaku ve skleněné vaně.

Po prokapání vzorku byla kolonka dvakrát promyta 10 ml PBS pufru (Obr. 12, Obr. 13) ve stejném časovém intervalu jako filtrát moči. Díky promytí pufrům byly z kolonky

odvedeny všechny složky moči až na OTA, který zůstal zachycený v gelu díky vazebné schopnosti se specifickými protilátkami. Zbytky PBS byly vytlačeny krátkým prosátím vzduchem.

Pro uvolnění (eluci) OTA z gelu byla použita směs roztoků o celkovém objemu 1,5 ml : methanol : kyselina octová (98 : 2 v/v). 1 ml takto připraveného roztoku byl nadávkován do násadce a protlačen přes kolonku do předem označené malé vialky (1,8 ml) se šroubovým uzávěrem, přičemž rychlost prokapávání byla stejná jako u filtrátu moči (Obr. 14, Obr. 15).

Prokapaná eluční směs byla z vialky znovu vylita do násadce nad kolonkou a intenzivním proudem odsáta přes fritu s gelem, kde se nechala v kolonce 1 minutu odstát. Po uplynulé době byl eluát s obsahem OTA protlačen přes kolonku opět do malé vialky. Takto se eluce OTA opakovala a byla provedena celkem 5krát. Konečná eluce byla provedena dalším 0,5 ml eluční směsí a získalo se tak 1,5 ml eluátu. Zbytky eluátu byly z kolonky vytlačeny vzduchem.

Vialka s eluátem byla vložena do koncentrátoru vzorků EVATERM (Obr. 16, Obr. 17), kde byl eluát odpařen do sucha pod proudem dusíku při cca 45 °C (teplota by neměla přesáhnout 50 °C). Takto vysušený vzorek byl poté uložen do mrazničky při teplotě -20 °C.

O každém zhotoveném vzorku (Obr. 18) byl proveden zápis o zpracování vzorku (Obr. 19), ve kterém byly vyplněny požadované údaje (číslo a popis vzorku, požadovaná analýza, pracovníci provádějící separaci, separační postup, navážka, objem eluátu, poznámka – kolika ml vzorku je odparek ekvivalentní, datum a podpis pracovníka).

5.2 Laboratorní nádobí – dekontaminace

Před dalším zpracováním vzorků na obsah ochratoxinu A se laboratorní nádobí po skončení analýzy OTA dezaktivuje po dobu 24 hodin (vysoce koncentrované roztoky se dezaktivují 48 hodin) v lázni s obsahem 10 l vody, 100 g hydroxidu sodného a 200 ml chlornanu sodného. Poté je nádobí opláchnuto horkou vodou se saponátem (10 ml/10 l) a následně v kyselé lázni s obsahem 150 ml octa v 10 l destilované vody. Nakonec je nádobí propláchnuto 3x destilovanou vodou a 1x Milli-Q vodou a konečně vysušeno horkovzdušným sterilizátorem při teplotě 180 °C. Takto dezaktivované nádobí je uloženo do uzavíratelných skříní pro další použití (Skarkova *et al.*, 2013).

5.3 Popis chromatografického postupu při analýze OTA na HPLC-FLD

Stanovení OTA v moči bylo provedeno v souladu se standardním operačním postupem platným v ZÚ Ústí nad Labem, pracoviště HK, NRL pro biomarkery mykotoxinů. Metoda byla validována dle požadavků úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) (Bliesner, 2006).

Před zpracováním na HPLC-FLD byl odparek za působení ultrazvuku rozpuštěn ve 300 μ l methanol:acetonitril:0,005 mol/l octan sodný:kyselina octová v poměru 300 ml : 300 ml : 400 ml : 14 ml (v/v/v/v).

Vzniklá směs byla protlačena přes membránový filtr do čisté vialky se šroubovým uzávěrem se septem, která byla následně umístěna na HPLC-FLD s automatickým dávkovačem – tzv. autosamplerem.

Při měření byly použity standardní roztoky OTA 0,4 ng/ml a 4 ng/ml (viz podkapitola 4.5.3), rozpuštěné odparky a slepý vzorek – tzv. blank, který slouží ke kontrole čistoty chemikálií a postupu zpracování před nadávkováním dalšího vzorku, čímž je zabráněno vzniku falešné pozitivivity. Tzn., že je na HPLC analyzován roztok (ultra čistá voda Milli-Q a další chemikálie používané při stanovení OTA v moči), který je prakticky identický se vzorkem s tím rozdílem, že blank neobsahuje OTA. Chromatografické záznamy blanku a standardů (0,4 ng/ml a 4 ng/ml) lze v tomto pořadí spatřit v grafech – viz Graf. 11, Graf. 12, Graf. 13.

5.4 Uvedení měřicího přístroje do chodu a jeho nastavení

Příprava kapalinového chromatografu k analýze a práce s ním se řídí návodem výrobce. Před vlastním stanovením musí chromatografická aparatura pracovat alespoň 60 min. „naprázdno“ pro ustálení podmínek na chromatografické koloně a detektoru. Podmínky stanovení se nastaví dle manuálu přístroje.

Pozn.: Spráci lze začít tehdy, jakmile po nadávkování metanolu nebo mobilní fáze při zapnutém fluorescenčním detektoru dostanete rovnou základní linii.

5.5 Podmínky chromatografického stanovení

Průtok mobilní fáze: 1,5 ml/min.; nástřik: 50 μ l

Nastavení FLD: λ Ex 333 nm (případně 340 nm), λ Em 465 nm, Gain = 1000, (šíře pásma EM: 18), pozn. fluorescenční detektor Jasco FP-920 zapněte asi 15 min. před započítím práce. Při dodržení těchto podmínek je eluční čas OTA mezi cca 6,5-10 min. při přímém stanovení (Dohnal *et al.*, 2013).

Vzorky ve vialkách, včetně standardů a blanku, byly umístěny podle vytvořené sekvence do autosampleru HPLC-FLD (Obr. 20). Roztoky standardů i vzorků byly dávkovány vždy pouze jednou. Výsledkem byl grafický záznam – tzv. chromatogram. Dle chromatogramů standardů (Graf. 12 - pro 0,4 ng/ml a Graf. 13 - pro 4 ng/ml) lze zjistit retenční čas (tR), tj. dobu průchodu dané látky kolonou, který je typický pro každou látku. Pro OTA byl tR změřen okolo 8. min. Je-li vzorek pozitivní, na chromatogramu v tR 8 min. se zobrazí pík, podle jehož plochy se provádí kvantitativní stanovení. Ukázka pozitivního chromatogramu – viz Graf. 14.

5.6 Potvrzení OTA analýzou metylesteru ochratoxinu A

- Nejprve se připraví metylester: 1 ml metanolového extraktu vzorku se odpaří ve vialce do sucha proudem dusíku, který se zavede nad hladinu vzorku. K tomu se využije EVATERM.

- Pak se přidá 1 ml roztoku BF3 v methanolu, vialka se uzavře a protřepe. Vzorky se ve vialce při teplotě 60 °C nechají 15 min. reagovat.

- Stejným způsobem jako vzorky se zpracuje 1 ml standardního roztoku OTA o koncentraci 4 ng/ml.

- Na kapalinovém chromatografu se pracuje za stejných podmínek jako při přímém stanovení ochratoxinu A. Eluční čas esterů ochratoxinu A se pohybuje kolem 14-20 min. Výstraha: BF3 velmi leptá kapiláry a smyčku, proto je třeba kolonu a celý systém dobře promýt.

- Po skončení analýz se kolona promyje a nakonzervuje - a to následujícím způsobem: směsí methanol:voda (1 : 1 v/v) po dobu 20 min., dále 10 min. vodou a konečně roztokem acetonitril:voda (1 : 1 v/v) po dobu cca 60 min. Nakonec se kolona konzervuje směsí methanol:voda.

5.7 Výtěžnost extrakce a čistícího postupu

Výtěžnost metody byla testována celkem na 6 vzorcích moče se standardní přídatky OTA (tzv. spiked samples) v hodnotě odpovídající koncentraci 25 ng/l (3 vzorky) a 50 ng/l (3 vzorky) a byla stanovena v rozmezí 84-87 % - viz Tab. 8 (Ostry *et al.*, 2010; Dohnal *et al.*, 2013; Skarkova *et al.*, 2013).

Pravdivost, dříve správnost, byla ověřena výpočtem výtěžnosti separačního postupu na IAK – viz Tab. 8 (Bliesner, 2006).

Tab. 8 Výtěžnost extrakčního metody (Ostry et al., 2010; Dohnal et al., 2013; Skarkova et al., 2013).

	Přídavek OTA (spiked samples)	
	25 ng/l	50 ng/l
n	3	3
x (ng/l)	21.7	41.8
Výtěžnost (%)	86.7	83.6

n = počet vzorků

Opakovatelnost metody byla zjišťována celkem na 6 vzorcích moče s přídavkem v hodnotě odpovídající koncentraci 25 ng/l (3 vzorky) a 50 ng/l (3 vzorky). Směrodatné odchylky se pohybovaly v intervalu 0,6-0,9 ng/l – viz Tab. 9 (Ostry et al., 2010; Dohnal et al., 2013; Skarkova et al., 2013).

Preciznost, dříve přesnost, metody během krátkého časového úseku označená jako opakovatelnost byla ověřena stanovením 6 vzorků moče. Mezilehlá preciznost vyjadřuje přesnost metody v delších časových intervalech. V průběhu jednoho dne byla stanovena jako % RSD z 6 vzorků extrahovaných s minimálním odstupem 0,5 hodiny (Bliesner, 2006).

Tab. 9 Opakovatelnost metody (Ostry et al., 2010; Dohnal et al., 2013; Skarkova et al., 2013).

	Přídavek OTA (spiked samples)	
	25 ng/l	50 ng/l
n	3	3
x (ng/l)	21.7	41.8
RSD (%)	0,9	0.6

n = počet vzorků, RSD – Relativní směrodatná odchylka

6 Výsledky

6.1 Výsledky stanovení obsahu OTA v močích

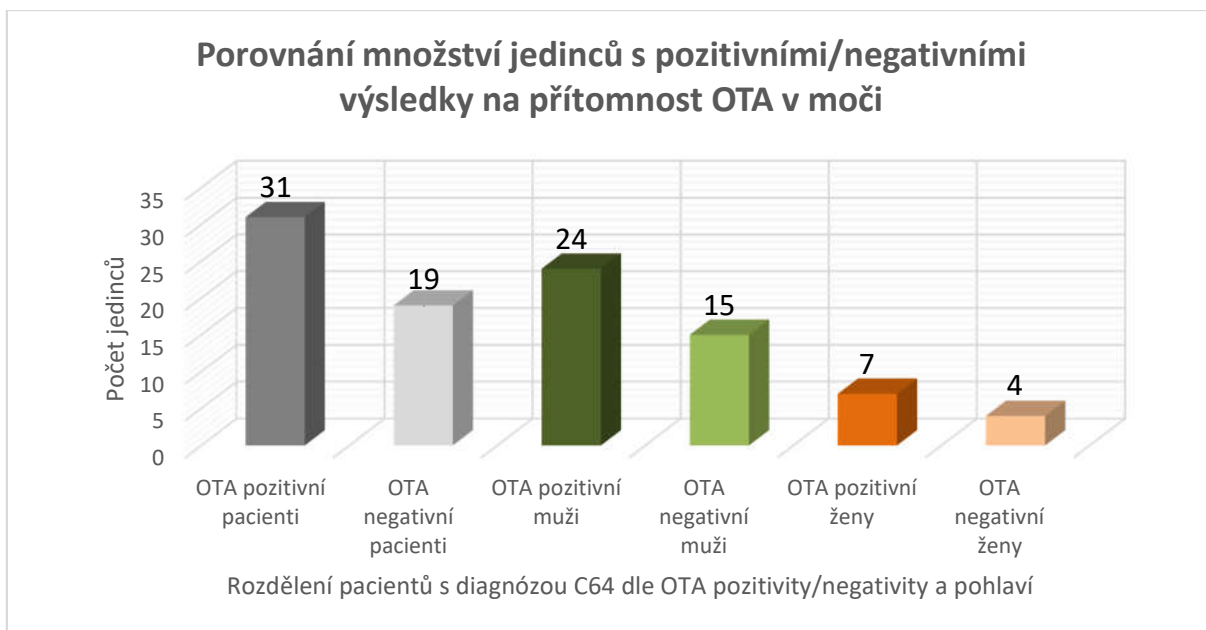
V tabulce (Tab. 20) jsou zaznamenány naměřené hodnoty OTA v ng/l moči pacientů. Pro zhodnocení obsahu byly při měření na HPLC-FLD použity následující limity: limit detekce (LOD), tj. trojnásobná hladina šumu, a limit kvantifikace (LOQ), tj. desetinásobná hladina šumu. LOD pro OTA je 1,0 ng/l a LOQ je 2,0 ng/l. Pro statistické zpracování byla pro hodnoty <LOQ, tedy pro nekvantifikovatelné hodnoty v rozmezí 0-2 ng/l, použita střední hodnota 1 ng/l. Statistické údaje jsou shrnuty v tabulce (Tab. 21). Grafické znázornění počtu pacientů s pozitivními/negativními výsledky na přítomnost OTA v moči celkově a dle pohlaví je uvedeno v grafu (Graf. 9) a porovnání množství OTA v moči [v ng/l] pacientů celkově a dle pohlaví je uvedeno v grafu (Graf. 10).

Z dat zaznamenaných v tabulkách (Tab. 20, Tab. 21) je patrné, že z celkového počtu 50 vzorků bylo 31 pozitivních (62 %), tzn., že v nich byla prokázána přítomnost OTA. Obsah OTA v moči se pohyboval v rozmezí od <LOQ (1 ng/l) – 27,80 ng/l, přičemž průměrná hodnota byla 6,09 ng/l.

Celkově byla u 90 % vzorků (45 osob) zjištěna hodnota menší/rovna 12,1 ng/l. Pouze u 10 % (5 osob) byly naměřeny hodnoty vyšší, přičemž nejvyšší obsah OTA (27,80 ng/l) byl zaznamenán u 73 letého pacienta trpícího při hmotnosti 120 kg těžkou nadváhou až obezitou. To je téměř trojnásobná hodnota nejvyšší naměřené hodnoty u 65 leté pacientky (10,00 ng/l) trpící při hmotnosti 123 kg obezitou.

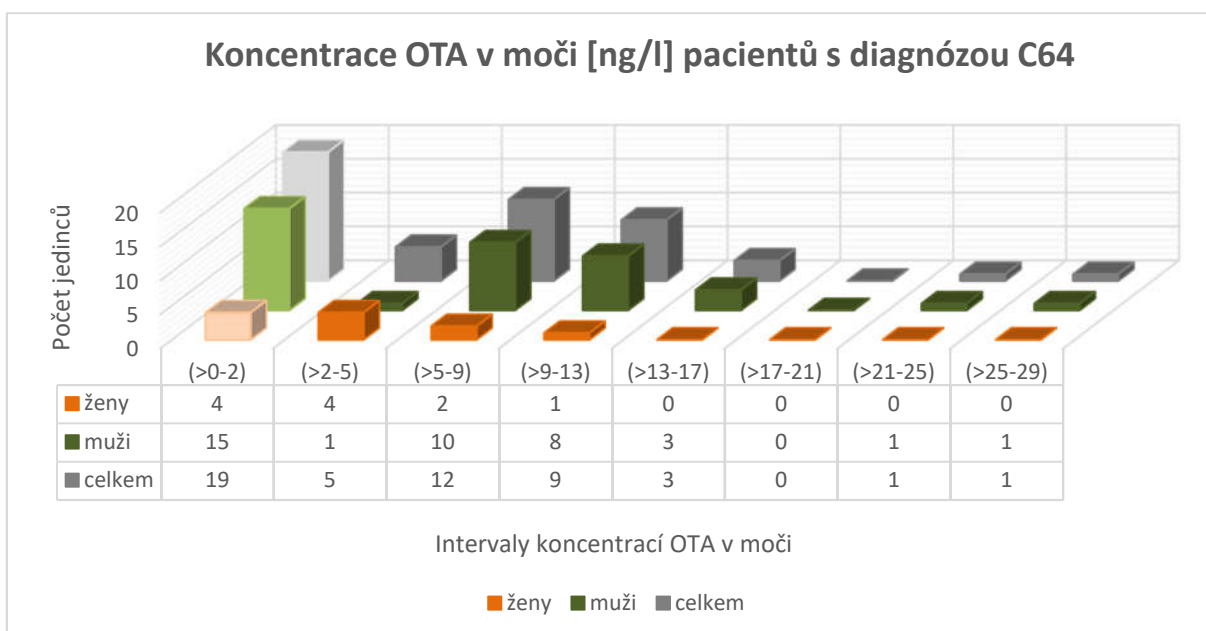
Naopak nejnižší hodnoty, resp. nekvantifikovatelné hodnoty, tj. hodnoty pod LOQ = 2 ng/l byly naměřeny u 19 pacientů obou pohlaví (4/11 žen a 15/39 mužů).

U vybrané populace (11 žen a 39 mužů) byly vypočteny střední hodnoty OTA - průměr 6,09 ng/l a medián 5,41 ng/l. U mužů průměrná hodnota 6,72 ng/l a medián 6,41 ng/l dosahují téměř dvojnásobných hodnot než u žen s průměrnou hodnotou 3,84 ng/l a mediánem 2,74 ng/l.



Graf. 9 Porovnání množství jedinců s pozitivními/negativními výsledky na přítomnost OTA v moči

V grafu (Graf. 9) lze snadněji pozorovat, že z celkového počtu 50 jedinců byla pozitivita shledána u 31 jedinců obou pohlaví dohromady (tj. 62 %). Již na první pohled je zřejmé, že za tímto poměrně vysokým počtem stojí převážně muži, neboť u nich byla pozitivita shledána ve 24 případech (tj. 77,4 %), kdežto u žen byla „pouze“ v 7 případech (tj. 22,6 %). Z uvedeného lze závěrovat, že muži jsou v tomto ohledu až 3,5krát náchylnější než ženy.



Graf. 10 Porovnání koncentrací OTA v moči [ng/l] pacientů s diagnózou C64 celkově a dle pohlaví (Pozn.: negativní výsledky znázorněny světlými barvami, pozitivní výsledky znázorněny tmavými barvami)

V grafu (Graf. 10) jsou znázorněny intervaly koncentrací OTA v moči v ng/l. První interval od 0 do 2 (včetně) ng/l zahrnuje 19 jedinců (z toho 15 mužů, 4 ženy) s negativním výsledkem na přítomnost OTA – tedy jedince, u kterých nebyl detekován, a tudíž ani kvantifikován OTA a pro statistické zpracování jim byla přidělena hodnota 1 (tj. poloviční hodnota LOQ).

Další intervaly s pozitivními koncentracemi byly pro ucelení výsledků odstupněny po 4 ng/l. Ukázalo se, že nejčastěji naměřené koncentrace OTA v moči byly v rozmezí mezi 5 a 9 (včetně) ng/l a byly zjištěny celkem u 12 jedinců (z toho 10 mužů, 2 ženy). Interval v rozmezí mezi 9 a 13 (včetně) ng/l byl shledán jako druhý nejčastější, přičemž do něho spadá celkem 9 jedinců (z toho 8 mužů, 1 žena).

6.2 Výsledky stanovení objemu a hmotnosti moči

V tabulce (Tab. 22) jsou zaznamenány hodnoty o objemu a hmotnosti moči pacientů. Statistické vyhodnocení je znázorněno v tabulkách (Tab. 23) – pro objem a (Tab. 24) – pro hmotnost.

Diuréza představuje množství vyloučené moči a u zdravého člověka má hodnotu přibližně 1500 ml/den (Rosypal, 2003). Z výsledků vyplývá, že objem odebrané moči pacientům za 24 hodin se pohyboval v rozmezí 110-586 ml, přičemž průměrná hodnota s mediánem dosahovaly 447 ml.

V porovnání výsledků u obou pohlaví je zřejmé, že ženy vyloučily za den větší objem moči než muži. Zatímco u žen byla průměrná hodnota 459 ml a medián 493 ml, u mužů byla průměrná hodnota 444 ml a medián 433 ml.

Obě pohlaví zvlášť i společně v průměru dosahovala stěží třetiny diurézy zdravého člověka. Lze tedy hovořit o tzv. oligurii – tzn. snížené tvorbě moči, která se obvykle projevuje při poškození ledvin. Oligurii lze vyjádřit jako pokles diurézy pod 500 ml/den (Merta, 2011), což by v tomto případě splňovalo 72 % (tj. 36 pacientů – z toho 6 žen, 30 mužů). Nicméně u některých pacientů mohla být nižší diuréza způsobena pozdějším příchodem na vyšetření do FN HK, tudíž sběr moče u těchto pacientů netrval 24 hodin, ale kratší dobu.

Hmotnost moči se pohybovala v rozmezí 110,5-590,2 g s průměrnou hodnotou 447,1 g a mediánem 449,9 g. U žen byla naměřena vyšší průměrná hmotnost moči než u mužů, což odpovídá vyššímu objemu moči odebrané u žen – viz výše. U žen byla průměrná hmotnost 455,0 g a medián 483,5 g. U mužů byla průměrná hmotnost 444,9 g a medián 437,8 g.

Specifická hmotnost moči je 1002-1035 kg/m³, tj. v přepočtu průměrně 1,0185 g/ml (Kittnar *et al.*, 2011). Dle výsledků vychází specifická hmotnost moči pacientů v průměru 1,0002 g/ml, tj. o 1,8 % nižší hodnota.

6.3 Výsledky stanovení kreatininu v močích

Vyšetření kreatininu v moči je běžné vyšetření, které se provádí prakticky u každého nemocného. Slouží k vyšetření a sledování funkce ledvin, zejména u pacientů trpících dlouhodobými chorobami (Kotačková, 2016). U zdravých jedinců se hodnoty moči vylučovaného kreatininu pohybují v rozmezí 1-1,2 g/den - u žen a 1,7-1,8 g/den – u mužů (Vestergaard & Leverett, 1958). Výsledky naměřených hodnot kreatininu v moči odebrané u vyšetřovaných pacientů za 24 hodin jsou zaznamenány v tabulce Tab. 25. Statistické zpracování množství kreatininu v moči je uvedeno v tabulce Tab. 26. Z dat zaznamenaných v tabulce Tab. 25 je patrné, že se obsah kreatininu v moči pohyboval v rozmezí 0,04-1,73 g/den s průměrnou hodnotou 0,34 g/den a mediánem 0,29 g/den. Pouze jeden pacient (muž, vzorek č. 7) s hodnotou kreatininu v moči 1,73 g/den spadá do výše uvedeného rozsahu množství kreatininu v moči pro muže (1,7-1,8 g/den).

U ostatních 49 pacientů byly naměřeny hodnoty kreatininu znatelně nižší, vždy pod uvedené spodní hranice (s ohledem na pohlaví) a dosahovaly maximálně hodnoty 0,88 g/den (muž, vzorek č. 37), což je přibližně dvojnásobná hodnota nejvyšší hodnoty naměřené u žen, tj. 0,48 g/den (žena, vzorek č. 26). Naopak nejnižší hodnota kreatininu byla 0,04 g/den (muž, vzorek č. 19), což je 2,75x nižší hodnota než nejnižší hodnota u žen, tj. 0,11 g/den (žena, vzorek č. 18).

U mužů byla naměřena průměrná hodnota kreatininu v moči 0,35 g/den a medián 0,30 g/den. U žen byly oproti mužům obě hodnoty nižší, přičemž průměr činil 0,30 g/den (tj. o cca 16 % méně než u mužů) a medián 0,27 g/den (tj. o 10 % méně než u mužů).

S výjimkou jednoho pacienta lze říci, že takto nízké množství kreatininu poukazuje na sníženou funkci ledvin pacientů diagnostikovaných na chorobu C64.

6.4 Porovnání koncentrací OTA v moči s dalšími studii

Ke zjištění, zda u pacientů s diagnózou C64 dochází ke kumulaci OTA, bylo potřeba získané výsledky porovnat s daty zdravé populace. Porovnání koncentrací OTA v moči nemocných (s dg. C64) českých pacientů se zdravou (bez dg. C64) populací v ČR detailněji popisuje podkapitola 6.4.1. Porovnání se zahraničními studii (maďarskou, španělskou a portugalskou) podrobněji popisuje 6.4.2.

6.4.1 Porovnání koncentrací OTA v moči [ng/l] nemocných a zdravých jedinců v České republice

V letech 2007-2008 byly v ČR odebrány vzorky 24hodinové moče od 118 zdravých pacientů obou pohlaví ve věku 45-60 let. Od každé osoby byly odebrány 2 vzorky moče s alespoň 14denním časovým odstupem, tzn., že bylo pro analýzu OTA v moči získáno celkem 236 vzorků (Ostry *et al.*, 2010).

Prováděná metodika byla obdobná metodice této práce - pro přečištění vzorku byly použity kolonky stejné značky - OCHRAPREP, detekce a kvantifikace OTA byla prováděna pomocí HPLC-FLD a LOQ pro OTA byl 2,0 ng/l (Ostry *et al.*, 2010). Porovnání výsledků nemocných a zdravých pacientů znázorňuje tabulka Tab. 27.

Z tabulky Tab. 27 je patrné, že výsledky zdravých jedinců byly vyhodnoceny pozitivně v 78 % případů, kdežto u nemocných v 62 % případů (tj. o 16 % méně než u zdravých jedinců). Za takto významný rozdíl odpovídají především muži, neboť u zdravých mužů byla shledána pozitivita 92 %, kdežto u nemocných 62 %. U žen takto velké rozdíly shledány nebyly a jejich hodnoty 65 % - u zdravých žen a 64 % - u nemocných lze považovat za shodné.

Také průměrná hodnota OTA v moči nemocných je u obou pohlaví nižší než u zdravé populace, přičemž vyšší rozdíl lze opět sledovat u mužů, kdy zdraví muži dosahovali hodnoty 10,30 ng/l, kdežto nemocní 6,72 ng/l (tj. o 34,76 % méně než u zdravých mužů). Průměrná hodnota u zdravých žen byla 4,50 ng/l, kdežto u nemocných 3,84 ng/l (tj. o 14,67 % méně než u zdravých žen).

Celková průměrná hodnota OTA v moči je u zdravé populace 7,35 ng/l, kdežto u nemocných jedinců 6,09 ng/l (tj. o 17,14 % méně než u zdravé populace). Zda se tyto hodnoty od sebe významně liší nebo je lze považovat za shodné (tzn., že by nezáleželo, zda je jedinec nemocný či zdravý) bylo ověřeno T-testem – viz podkapitola 6.4.1.1.

Oproti tomu medián nemocné populace je 5,41 ng/l, kdežto u zdravé populace 4,47 ng/l (tj. o 21,0 % více než u zdravé populace). Přesto jsou si mediány stejných pohlaví v obou skupinách podobné – u zdravých mužů je hodnota 6,30 ng/l, kdežto u nemocných 6,41 (tj. o 1,7 % více než u zdravých mužů). Naopak u zdravých žen je hodnota 2,90 ng/l, kdežto u nemocných 2,74 ng/l (tj. o 5,5 % méně než u zdravých žen).

6.4.1.1 Dvouvýběrový T-test

Otázka

Liší se průměr naměřených hodnot OTA [ng/l] u diagnostikovaných osob na chorobu C64 od průměru osob, u kterých tato diagnóza nebyla stanovena?

Stanovení hypotéz

Testovaná hypotéza $H_0: \mu(1) = \mu(2)$

Alternativní oboustranná hypotéza $H_1: \mu(1) \neq \mu(2)$

Údaje pro výpočet

	S diagnózou (1)	Bez diagnózy (2)
Počet vzorků (n)	50	236
Průměr (\bar{X}) [ng/l]	6,09	7,35
Směrodatná odchylka (S)	5,80	6,51

Ověření předpokladu rovnosti rozptylů

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

$$F = \frac{\max(S_1^2, S_2^2)}{\min(S_1^2, S_2^2)}$$

$$F = \frac{6,51^2}{5,80^2} = 1,26$$

$$F_{\text{krit.}} = F(1-\alpha/2, n_1-1, n_2-1)$$

$$F_{\text{krit.}} = F(1-0,05/2, 50-1, 236-1)$$

$$F_{\text{krit.}} = F(0,975, 49, 235) = 1,602$$

$$F < F_{\text{krit.}}$$

$F = 1,26$ je nižší kritická hodnota $F = 1,602$. Nulová hypotéza se nezamítá na hladině významnosti 0,05. Rozptyly lze považovat za shodné, tzn., že je lze použít ve výpočtu T-testu.

Vzorce pro výpočet

$$S_*^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$S_* = \sqrt{S_*^2};$$

$$T = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{S_* \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}} \sim t(n_1 + n_2 - 2)$$

S_*^2	společný rozptyl
S_*	společná směrodatná odchylka
T	T-test
S_1	směrodatná odchylka (pacienti s nádorem)
S_2	směrodatná odchylka (zdraví dobrovolníci)
n_1	počet vzorků moči (pacienti s nádorem)
n_2	počet vzorků moči (zdraví dobrovolníci)
\bar{X}_1	průměrná hodnota OTA v moči (pacienti s nádorem)
\bar{X}_2	průměrná hodnota OTA v moči (zdraví dobrovolníci)

Výpočet

$$S_*^2 = \frac{(50 - 1)5,80^2 + (236 - 1)6,51^2}{50 + 236 - 2} = 40,87$$

$$S_* = \sqrt{40,87} = 6,39$$

$$T = \frac{6,09 - 7,35}{6,39\sqrt{1/50 + 1/236}} = -1,27$$

a) Hladina významnosti $\alpha = 0,01$

Oboustranný kritický obor W

$$W = (-\infty; t_{\alpha/2}(n_1 + n_2 - 2)) \cup (t_{1-\alpha/2}(n_1 + n_2 - 2); \infty)$$

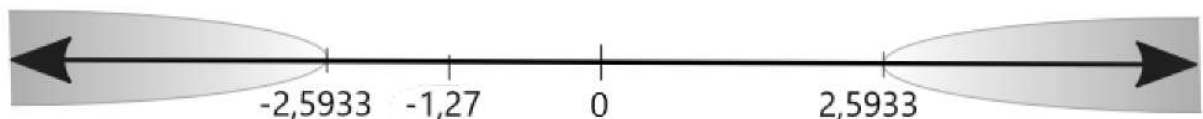
$$W = (-\infty; t_{0,005}(284)) \cup (t_{0,995}(284); \infty)$$

$$W = (-\infty; -2,5933) \cup (2,5933; \infty)$$

Výsledek

$$T \notin W$$

Grafické znázornění T-testu č. 1



Slovní odpověď

$T = -1,27$ leží mimo kritický obor $W = (-\infty; -2,5933) \cup (2,5933; \infty)$, a proto se nulová hypotéza na hladině významnosti 0,05 nezamítá. Průměrné hodnoty OTA v moči diagnostikovaných a nediodagnostikovaných se významně neliší.

b) Hladina významnosti $\alpha = 0,05$

Oboustranný kritický obor W

$$W = (-\infty; t_{\alpha/2} (n_1+n_2 -2)) \cup (t_{1-\alpha/2}(n_1+n_2-2); \infty)$$

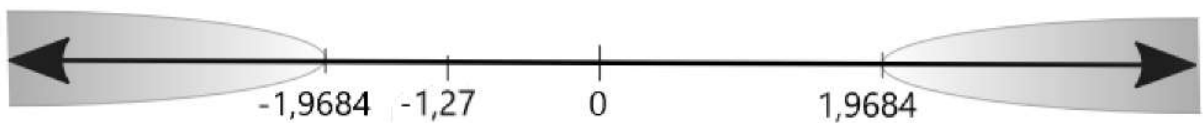
$$W = (-\infty; t_{0,025} (284)) \cup (t_{0,975} (284); \infty)$$

$$W = (-\infty; -1,9684) \cup (1,9684; \infty)$$

Výsledek

$T \notin W$

Grafické znázornění T-testu č. 2



Slovní odpověď

$T = -1,27$ leží mimo kritický obor $W = (-\infty; -1,9647) \cup (1,9647; \infty)$, a proto se nulová hypotéza na hladině významnosti 0,05 nezamítá. Průměrné hodnoty OTA v moči diagnostikovaných a nediodagnostikovaných se významně neliší.

Závěr

Na hladinách významnosti 0,01 i 0,05 bylo statisticky potvrzeno, že se koncentrace OTA v moči nemocných příliš neliší od koncentrace zdravé populace.

6.4.2 Porovnání koncentrací OTA v moči [ng/l] nemocných českých pacientů se zdravou populací v zahraničí

Kapitola porovnává koncentraci OTA v moči u zdravých jedinců ze zahraničních zemí s nemocnými pacienty z ČR. První tři podkapitoly popisují výsledky zahraničních studií - maďarské (v podkapitole 6.4.2.1), portugalské (v podkapitole 6.4.2.2) a španělské (v podkapitole 6.4.2.3). Souhrnné porovnání s těmito třemi zeměmi je uvedeno v podkapitole 6.4.2.4. Důležité je však upozornit, že porovnání s portugalskou a španělskou studií je zde uvedeno spíše pro zajímavost, neboť v těchto studiích byl proveden odlišný odběr moči (1x ráno a 1x odpoledne), než u nemocných pacientů (24hodinový odběr), a proto je nutné na jejich vzájemné porovnání nahlížet s určitou opatrností. Naopak porovnání s maďarskou studií má zde větší význam, neboť Maďarům byla rovněž odebrána 24hodinová moč.

6.4.2.1 Maďarská studie

V Maďarsku byly v roce 2003 odebrány vzorky 24hodinové moči celkem 88 zdravým jedincům obou pohlaví ve věku 8-80 let: ženy (n = 42, tj. 48 %), muži (n = 46, tj. 52 %), pocházejících z 5 měst ve 3 župách: Besenyőtelek, Füzesabony (Hevešská župa), Debrecín, Komádi (Hajducko-bihárská župa), Kapošvár (Šomodská župa) (Fazekas *et al.*, 2005).

OTA byl detekován v 54 vzorcích (61 %) s koncentracemi v rozsahu 6-65 ng/l. Průměrná koncentrace OTA v pozitivních vzorcích moči byla 13 ng/l, přičemž koncentrace u mužů a žen se významně nelišily (Fazekas *et al.*, 2005). Průměrná hodnota OTA ve všech 88 analyzovaných vzorcích tedy byla 8,36ng/l.

6.4.2.2 Portugalská studie

V portugalském městě Coimbra byly v letech 2005-2006 odebrány vzorky moče celkem 30 zdravým jedincům obou pohlaví ve věku 15-67 let: 15-55 let – ženy (n = 17, tj. 57 %) a 22-67 let – muži (n = 13, tj. 43 %). Odběr byl prováděn v jeden den ráno a odpoledne, takže bylo získáno celkem 60 vzorků moče na analýzu OTA (Manique *et al.*, 2008).

OTA byl detekován ve 13 vzorcích ranní moče (43,3 %) s koncentracemi v rozsahu 11-208 ng/l a 14 vzorcích odpolední moče (46,7 %) s koncentracemi v rozsahu 8-110 ng/l. Průměrná koncentrace OTA v ranních vzorcích byla 19 ng/l a odpoledních 18 ng/l. Celková průměrná koncentrace OTA v moči odebrané ráno i odpoledne byla 18,48 ng/l (Manique *et al.*, 2008). Průměrná hodnota OTA ve všech 60 analyzovaných vzorcích tedy byla 8,87ng/l.

6.4.2.3 Španělská studie

Ve španělské Valencii byly v roce 2005 odebrány vzorky moče celkem 31 zdravým jedincům obou pohlaví ve věku 18-53 let: 24-53 let – ženy (n = 21, tj. 68 %) a 18-51 – muži (n = 10, tj. 32 %). Odběr byl proveden v jeden den ráno a odpoledne, takže bylo získáno celkem 62 vzorků moče na analýzu OTA (Manique *et al.*, 2008).

OTA byl detekován ve 25 vzorcích ranní moče (80,6 %) s koncentracemi v rozsahu 7-124 ng/l a 26 vzorcích odpolední moče (83,9 %) s koncentracemi v rozsahu 8-89 ng/l. Průměrná koncentrace OTA v ranních vzorcích byla 32 ng/l a odpoledních 28 ng/l. Celková průměrná koncentrace OTA v moči odebrané ráno i odpoledne byla 29,96 ng/l (Manique *et al.*, 2008). Průměrná hodnota OTA ve všech 62 vzorcích tedy byla 24,82 ng/l.

6.4.2.4 Souhrnné porovnání se zahraničními zeměmi

Porovnání koncentrací OTA v moči nemocných českých pacientů se zdravou populací ve Španělsku, Maďarsku a Portugalsku je shrnuto v tabulce Tab. 28, ze které je patrné, že je pozitivita nemocných Čechů oproti zdravým Španělům (82 %) o cca 24,39 % nižší. V porovnání se zdravými Portugaly (45 %) je pozitivita nemocných Čechů naopak o cca 37,78 % vyšší. Pozitivita nemocných Čechů (62 %) se s pozitivitou zdravých Maďarů (61 %) příliš neliší a lze ji považovat za srovnatelnou.

Čeští nemocní pacienti měli průměrnou hodnotu koncentrace OTA v moči 6,09 ng/l, tj. oproti zdravým populacím Maďarů (8,36 ng/l) o 27,15 % méně, Portugalů (8,87 ng/l) dokonce o 31,34 % méně a Španělů (24,82 ng/l) dokonce o 75,74 % méně.

Porovnání těchto výsledků poukazuje na skutečnost, že u nemocných (s dg. C64) ve všech případech byla průměrná hodnota OTA v moči nemocných nižší než průměrná hodnota OTA v moči u zdravé populace jak v českých, tak zahraničních studiích.

Diskuse

U pacientů s nádory ledvin byl v naší studii zjištěn přibližně 3,5krát vyšší výskyt u mužů než u žen, což je vyšší výskyt, než uvádí prof. Milan Hora, přednosta urologické kliniky FN v Plzni, že nádorem ledvin trpí muži 1,5krát častěji (Kolářová, 2016). Odlišné výsledky ale mohly být zapříčiněny jak nízkým počtem sledovaných jedinců v naší studii (50 nemocných), tak částečně i výběrem pacientů.

Námi získané výsledky OTA v moči není možné jednoznačně interpretovat, protože dosud nejsou k dispozici žádné další relevantní domácí ani zahraniční studie týkající se stanovení koncentrací OTA v močích pacientů s dg. nádorů ledvin. Proto byly alespoň sledovány studie zabývající se stanovením OTA v moči české, maďarské, španělské a portugalské „běžné (zdravé)“ populace. V těchto studiích však dosahovaly průměrné hodnoty OTA v moči vyšších koncentrací ve srovnání s nemocnými s dg. nádorů ledvin.

Zatímco u nemocných Čechů byla průměrná hodnota 6,09 ng/l, u zdravé české populace byla hodnota o něco vyšší 7,35 ng/l. Statisticky (dvouvýběrovým T-testem) se ale potvrdilo, že se tyto hodnoty v zásadě neliší a lze je považovat za shodné – tzn., že obsah OTA v moči nesouvisí se zdravotním stavem (co se nádoru ledvin týče) jedince. Nicméně průměrné hodnoty OTA v moči zdravých zahraničních populací byly zjištěny ještě o něco vyšší – u Maďarů 8,36 ng/l, Portugalců 8,87 ng/l a u Španělů dokonce 24,82 ng/l. Se zahraničními studii však nebylo možné ověřit hypotézy, neboť nebyly známy potřebné údaje pro výpočet. Každopádně lze konstatovat, že všichni zdraví jedinci měli, ať už nepatrně či významně, vyšší hodnoty OTA v moči než nemocní jedinci v naší studii.

Tuto skutečnost lze vysvětlit následovně:

1. Na nižších koncentracích OTA v moči se zřejmě mohl podílet buď nižší přívod OTA kontaminovanými potravinami v porovnání se „zdravou“ populací (vzhledem k omezeným finančním prostředkům nemohla být dieta nemocných vyšetřena na obsah OTA).
2. Určitý vliv mohlo hrát, že pouze 1 % (či méně) OTA je biodisponibilní – vyskytující se ve volné formě. Je známo, že cca. 99 % OTA je vázáno na bílkoviny krevní plazmy (albumin a neznámou bílkovinu o hmotnosti 20 000 Da) – a tudíž je majoritně zadržováno v lidském organismu, resp. v krevní plazmě, zřejmě v důsledku pevné vazby OTA není filtrován do moče.
3. Další otázkou ale je, zda se OTA nemetabolizoval na další metabolity, méně toxické, např. OT α , či více toxické, např. OP-OTA (otevřená laktonová forma) či OTQ (chinonová

forma) či OTHQ (hydrochinonová forma), které jsou ještě toxickejší. Podezření na metabolizaci OTA vychází z některých záznamů chromatogramů, na kterých byly zaznamenány další píky – pravděpodobně metabolity OTA či metabolity ze skupiny ochratoxinů (viz Graf. 14). Pro tyto metabolity však nejsou dosud na UHK, ani v zahraničí běžně k dispozici většinou ani standardy a na našem pracovišti dosud chybí i adekvátní měřicí vybavení pro confirmaci metabolitů.

4. Dále se na nízkých výsledcích mohla s velkou pravděpodobností spolupodílet poškozená ledvina a narušení ledvinné tkáně, konkrétně epitelu z důvodu nádoru (Grawitzův nádor patří mezi epiteliální nádory) a kdy právě z tohoto důvodu mohlo dojít i k narušení běžné fyziologické a vylučovací funkce ledvin.
5. Kromě toho se dále na nízkých nálezech OTA v moči, alespoň v některých případech, mohl spolupodílet také nekompletní odběr moče, protože se někteří pacienti na vyšetření dostavili se zpožděním, tudíž v těchto případech nebyl striktně dodržen 24hodinový cyklus odběru. Byl odebrán menší objem moče, což se mohlo negativně projevit i v našich výsledcích. V důsledku toho mohla být u těchto pacientů 24hodinová diuréza nesprávně označena za oligurii.
6. Na skutečné-reálné oligurii se ale mohl podílet stres pacientů před operací a také fakt, že večer před operací již nesměli jíst ani pít. U ledvinových onemocnění tohoto typu má navíc oligurie i svoje opodstatnění.
7. V portugalské a španělské studii byla moč odebrána naprosto odlišným způsobem (1x ráno a 1x odpoledne, tj. odběr nebyl dostatečně reprezentativní ve srovnání s naší studií (24hodinový odběr)). Protože způsob odběru se lišil, nelze dost dobře námi získané výsledky s těmito studiemi srovnávat.
8. Z námi získaných výsledků vyplývá, že se OTA v moči pacientů vyskytuje v nižších koncentracích, než jsme původně očekávali, což ale nevylučuje skutečnost, že se OTA může na vzniku nádorů spolupodílet a přispívat k nim – a to na základě souhlasných (synergických) působení s jinými faktory a noxami.

Závěr

Dle dat získaných na základě podkladu ze SVOD byla Česká republika s počtem téměř 30 incidencí na 100 000 obyvatel celosvětově umístěna na prvním místě v četnosti nádorů ledvin. Příčina nádoru však dosud nebyla objasněna, neboť se na jeho vzniku pravděpodobně podílí více faktorů. Cílem bylo zjistit, zda u těchto pacientů dochází ke kumulaci OTA v ledvinách a tím odpovědět na otázku, zda se OTA významně podílí na vzniku tohoto onemocnění.

Ve FN HK byly celkem 50 pacientům (39 mužům a 11 ženám) stanoveny tyto diagnózy: C64 – tj. nádor ledvin mimo pánvičku (48 jedincům – z toho 38 mužům a 10 ženám), N131 – tj. hydronefróza se strikturou ureteru (u 1 ženy) a C675 – tj. zhoubný nádor hrdla močového měchýře (u 1 muže). Z uvedeného je zřejmé, že jsou vůči nádoru ledvin daleko citlivější muži, v tomto případě až 3,5 násobně. Ačkoliv pro tuto práci byla zásadní diagnóza C64, byly do celkového přehledu započteny i zbylé dvě diagnózy, neboť se rovněž týkají močových cest. Těmto pacientům byla odebrána maximálně 24hodinová moč, přičemž odběry byly prováděny od dubna roku 2015 do listopadu roku 2017, tzn. v časovém rozmezí 1,5 roku. Získaná moč byla podrobena analýze s cílem zjistit koncentrace OTA.

Již výsledky získané z měření objemu moče vypovídaly o narušení funkce ledvin, neboť průměrná hodnota objemu moče všech pacientů (447 ml/den) dosahovala stěží třetiny diurézy zdravého člověka (1500 ml/den). Rovněž byla snižena i specifická hmotnost moči, kdy průměrná hodnota činila u pacientů (1,0002 g/ml) a byla nižší přibližně o 1,8 % než optimální průměrná hodnota (1,0185 g/ml). Sniženou funkci ledvin potvrdila i razantně snížená hladina kreatininu v moči. Průměrná hodnota kreatininu v moči byla u mužů 0,35 g/den a u žen 0,30 g/den, přičemž spodní hranice optimálních hodnot jsou uváděny 1,0 g/den pro ženy a 1,7 g/den pro muže. Pouze u jednoho muže byla zjištěna hodnota kreatininu (1,73 g/den) spadající do intervalu optimálních hodnot pro muže (1,7-1,8 g/den). U nemocných českých pacientů byla naměřena průměrná koncentrace OTA 7,80 ng/g kreatininu.

Celkem v 62 % případů (tj. 31 vzorků z 50) byl vzorek moči pacientů shledán jako pozitivní, tzn. s obsahem OTA nad limitem (či mezi) stanovitelnosti s hodnotou 2 ng/l. Z pozitivních vzorků pocházelo celkem 77,4 % od mužů (tj. 24 vzorků z 31) a 22,6 % od žen (tj. 7 vzorků z 31). Naměřené koncentrace OTA v moči se pohybovaly v rozmezí <LOQ do 27,80 ng/l, přičemž průměrná hodnota všech vzorků (pozitivních i negativních) byla 6,09 ng/l.

Je nutné zdůraznit, že ve světě neexistuje obdobná studie zabývající se stanovením ochratoxinu A v moči u pacientů s nádory ledvin (na rozdíl od lidské krve - plazmy či séra), se kterou by se naše studie mohla porovnat, proto výsledky této studie byly alespoň porovnány s výsledky studie zabývající se stanovením OTA v moči zdravé české populace, kde byla prokázána přítomnost OTA v moči v 78 % případů s průměrnou hodnotou všech vzorků 7,35 ng/l. Na základě statistického vyhodnocení pomocí dvouvýběrového T-testu bylo na hladinách významnosti 0,01 i 0,05 potvrzeno, že se koncentrace OTA v moči českých nemocných (s diagnózou C64) pacientů významně neliší od koncentrace zdravé české populace (bez diagnózy C64), a lze je tedy považovat za shodné.

Kromě toho bylo provedeno porovnání s dalšími zahraničními studii zabývajícími se stanovením OTA v moči u zdravé populace – a to v Maďarsku, Španělsku a Portugalsku. Jako rekordmani se projeví zejména Španělé, u kterých jak pozitivita (82 %), tak průměrná hodnota (24,82 ng/l) dosahovala nejvyšších hodnot. U zdravých Portugalců byla pozitivita nižší (45 %) než u nemocných Čechů, ovšem jejich koncentrace (8,87 ng/l) dosahovala vyšších hodnot. Téměř shodná pozitivita (61 %) s nemocnými Čechy byla shledána u zdravých Maďarů, avšak jejich koncentrace (8,36 ng/l) byla v porovnání opět vyšší.

Lze shrnout, že:

- ve všech uvedených případech byla koncentrace OTA v moči u zdravé „běžné“ populace (české, španělské, portugalské, maďarské) vyšší než u českých pacientů s diagnostikovaným nádorem ledvin;

- narušení epitelu ledvinné tkáně pravděpodobně vedlo k poškození běžné fyziologické a vylučovací funkce ledvin.

Dosud není objasněno, zda se u pacientů s nádory ledvin OTA nekumuluje v organismu (např. v ledvinách, játrech apod.), dále jaké další metabolity ochratoxinu A či ochratoxinů u nich vznikají a jak se v organismu případně kumulují.

I přes relativně nízké nálezy OTA v močích pacientů se však může významně spolupodílet na synergických (souhlasných) toxických účincích – s ostatními metabolity ze skupiny ochratoxinů, dalšími nefrotoxickými mykotoxiny či např. lékovými interakcemi a s řadou dalších environmentálních toxikantů, dále s genetickými mezidruhovými a predispozičními rozdíly a jinými dalšími faktory a činiteli.

Proto bude zapotřebí průběžně pokračovat ve výzkumu uvedené problematiky jak na národní, tak mezinárodní úrovni – a to s cílem konfirmace (potvrzení) námi získaných dat.

Použitá literatura

- ABRUNHOSA, L., PATERSON, R.R. & VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins*, 2010, vol. 2, no. 5, s. 1078–1099.
- BENDELE, A.M., CARLTON, W.W., KROGH, P. & LILLEHOJ, E.B. Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J X C3H)F1 mouse. *Journal of the Cancer Institute*, 1985, vol. 75, no. 4, s. 733–742.
- BHAT, R., RAI, R.V. & KARIM, A.A. Mycotoxins in Fod and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2010, no. 9, s. 57–81.
- BIOLIB, 2018. Profil taxonu - Štětčíkovec (*Penicillium*). *BioLib.cz*, 2018.
- BLIESNER, D.M. *Validating chromatographic methods : a practical guide*. Hoboken, N. J. : Wiley, 2006. ISBN 978-0-471-74147-3.
- BOORMAN, G.A., MARGARITA, R.M., IMTO, S. & PERSING, R. Renal lesions induced by ochratoxin A exposure in the F344 rat. *Toxicol Pathology*, 1992, vol. 20, no. 2, s. 236–245.
- BUI-KLIMKE, T.R. & WU. Ochratoxin A and human health risk: A review of the evidence. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2015, vol. 55, no. 13, s. 1860–1869.
- CASTEGNARO, M., CANADAS, D., VRABCHEVA, T., PETKOVA-BOCHAROVA, T., CHERNOZEMSKY, I.N. & PFOHL-LESZKOWICS, A. Balkan endemic nephropathy: Role of ochratoxins A through biomarkers. *Molecular nutrition & food research*, 2006, vol. 50, no. 6, s. 519–529. ISSN 1613-4125.
- CAYMAN CHEMICAL COMPANY. *Safety data sheet Ochratoxin A* [online]. 2013. (Cit. 22.8.2017). Dostupné z WWW: <<https://www.caymanchem.com/msdss/11439m.pdf>>.
- COUFAL, P. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC* [online]. 1996. Dostupné z WWW: <<https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>>.
- CREPPY, E.E. & DIRHEIMER, G. Toxicité de l'ochratoxine A, une mycotoxine contaminant les aliments de l'homme et de l'animal. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 1991, vol. 26, no. 5, s. 342–348.
- CVAČKA, J. *Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii* [online]. 2010. Dostupné z WWW: <<https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>>.
- DIAZ, G.J. & MURCIA, H.W. Biotransformation of aflatoxin B1 and its relationship with the differential toxicological response to aflatoxin in commercial poultry species. In *GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G. Aflatoxins - biochemistry and molecular biology*. Croatia : INTECH, 2011, s. 3–20. ISBN 978-953-307-395-8.
- DOHNAL, V., DVOŘÁK, V., MALÍŘ, F., OSTRÝ, V. & ROUBAL, T. A comparison of ELISA and HPLC methods for determination of ochratoxin A in human blood serum in the Czech Republic. *Food and chemical toxicology*, 2013, vol. 62, s. 427–431.

- DOMIJAN, A.-M., RUDES, K. & PERAICA, M. The effect of ochratoxin A on the concentration of protein carbonyls in rats. *Arhiv za Higijenu Rada I Toksikologiju/Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 2005, vol. 56, no. 4, s. 311–315.
- DUARTE, S.C., PENA, A. & LINO, C.M. Human ochratoxin A biomarkers-From exposure to effect. *Critical Reviews in Toxicology*, 2011, vol. 41, no. 3, s. 187–202. ISSN 1547-6898.
- EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain [CONTAM] Related to Ochratoxin A in Food. *EFSA Journal*, 2006, vol. 4, no. 6, s. n/a-n/a. ISSN 1831-4732.
- ELLIS, D., DAVIS, S., ALEXIOU, H., HANDKE, R. & BARTLEY, R. *Descriptions of medical fungi* 2. vyd. Adelaide, South Australia : Nexus Print Solutions, 2007. ISBN 978-0-9598512-6-7.
- ETZEL, R. Mycotoxins. *J. Am. Med. Assoc.*, 2002, vol. 287, no. 4, s. 425–427.
- EVROPSKÁ KOMISE. Nařízení komise (ES) 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách [online]. 2006. (Cit. 22.8.2017). Dostupné z WWW: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:CS:PDF>>.
- EVROPSKÁ KOMISE. Nařízení Komise (EU) 2015/1137 ze dne 13. července 2015, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limit ochratoxinu A v kořeni *Capsicum spp.* [online]. 2015. Dostupné z WWW: <<http://www.eurlex.cz/dokument.aspx?celex=32015R1137>>.
- EVROPSKÁ KOMISE. Nařízení Komise (EU) č. 105/2010 ze dne 5. února 2010, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o ochratoxin A [online]. 2010. Dostupné z WWW: <<http://www.eurlex.cz/dokument.aspx?celex=32010R0105>>.
- EVROPSKÁ KOMISE. Nařízení Komise (EU) č. 594/2012 ze dne 5. července 2012, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity kontaminujících látek ochratoxinu A, PCB bez dioxinového efektu a melaminu v potravinách [online]. 2012. Dostupné z WWW: <<http://www.eurlex.cz/dokument.aspx?celex=32012R0594>>.
- FAZEKAS, B., TAR, A. & KOVÁCS, M. Ochratoxin A content of urine samples of healthy humans in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2005, vol. 53, no. 1, s. 35–44.
- HEUSSNER, A.H. & BINGLE, L.E.H. Comparative ochratoxin toxicity: a review of the available data. *Toxins*, 2015, vol. 7, no. 10, s. 4253–4282. ISSN 2072-6651.
- HOSTAČNÁ, L. A2.1 Příručka k odběru biologického materiálu k toxikologickému vyšetření [online]. Liberec : Krajská nemocnice Liberec, a.s., 2015. Dostupné z WWW: <https://www.nemlib.cz/assets/uploads/2015/05/280_1221.pdf>.
- HRDINA, V., HRDINA, R., JAHODÁŘ, L., MARTINEC, Z. & MĚRKA, V. *Přírodní toxiny a jedy*. Praha : Galén, 2004. ISBN 80-7262-256-0.

- IARC. *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: Some food additives, feed additives and naturally occurring substances*. Lyon, France, 1983. ISBN 92-832-1231-2.
- IARC. *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC monographs*. Lyon, France : International Agency for Research in Cancer, 1987.
- IARC. *IARC Monographs on the evaluation on of carcinogenic risk in human: Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. Lyon, France : IARC, 1993. ISBN 92-832-1256-8.
- JANATOVÁ, J. *Pravidla pro manipulaci s biologickým materiálem* [online]. Biochemická a hematologická laboratoř MZ-BIOCHEM, 2017. Dostupné z WWW: <<https://www.mz-biochem.cz/images/downloads/manipulacesbiologickymmateriálem.pdf>>.
- KANĎÁR, R. Stanovení glutathionu a glutathiondisulfidu v biologických vzorcích. *Chemické listy*, 2016, no. 110, s. 754–760.
- KASALOVÁ, E. *Moderní separační techniky pro analýzu biologického materiálu v klinickém výzkumu*. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra analytické chemie, 2017.
- KITTNAR, O., JANDOVÁ, K., KURIŠČÁK, E., LANGMEIER, M., MAREŠOVÁ, D., MLČEK, M., MYSLIVEČEK, J., POKORNÝ, J., RILJAK, V. & TROJAN, S. *Lékařská fyziologie*. Praha : Grada Publishing a.s., 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
- KLAASSEN, C. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* 7. vyd. New York : McGraw-Hill, 2007. ISBN 0-07-147051-4.
- KLABAČKOVÁ, S. *Vývoj extrakčního postupu pro stanovení tokoferolů v lidském séru. Diplomová práce. Vedoucí práce Lenka Kujovská Krčmová*. Hradec Králové : Univerzita Hradec Králové, Farmaceutická fakulta, Katedra analytické chemie., 2016.
- KOLÁŘOVÁ, Z. *Urolog: Záhadou je, proč nádory trpí nejvíc lidé u hranic. Záznam z rozhovoru s profesorem Milanem Horou, přednostou urologické kliniky Fakultní nemocnice v Plzni*. [online]. 2016, Deník.cz. Dostupné z WWW: <https://www.denik.cz/z_domova/urolog-zahadou-je-proc-nadory-trpi-nejvic-lide-u-hranic-20160115.html>.
- KŐSZEGI, T. & POÓR, M. Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. *Toxins*, 2016, vol. 8, no. 4, s. 111. ISSN 2072-6651.
- KOTAČKOVÁ, L. *Top lékař* [online]. 2016, Kreatinin. (Cit. 2.11.2017). Dostupné z WWW: <<http://www.toplekar.cz/laboratorni-hodnoty/kreatinin.html>>.
- KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment in: CASTAGNARO, M., PLESTINA, R., DIRHEIMER, G., CHERNOZEMSKY, I. N., BARTSCH, H. (Eds.), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*, IARC Sciences Publication, 1991, no. 115, s. 307–320.

- KUIPER-GOODMAN, T., HILTS, C., BILLIARD, S.M., KIPARISSIS, Y., RICHARD, I.D.K. & HAYWARD, S. Health risk assessment of ochratoxin A for all age-sex strata in a market economy. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2010, vol. 27, no. 2, s. 212–240. ISSN 1944-0057.
- KUIPER-GOODMAN, T. & SCOTT. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and environmental sciences*, 1989, vol. 2, no. 3, s. 179–248.
- LACH-NER. *Pár slov o HPLC* [online]. 2017, LACH-NER - česká chemická společnost. (Cit. 9.11.2017). Dostupné z WWW: <<http://www.lach-ner.com/par-slov-o-hplc/t-296/?n=10>>.
- LI, Z., LAM, P.H., ZHU, L., WANG, K. & ZHOU, F. Current Updates in the Genetic Polymorphisms of Human Organic Anion Transporters (OATs). *Journal of Pharmacogenomics & Pharmacoproteomics*, 2012, vol. 3, no. 6. ISSN 2153-0645.
- MAŘAR, R. & PODSTATOVÁ, R. Manipulace s biologickým materiálem. *Medicina pro praxi*, 2006, no. 4, s. 201–202.
- MALIR, F., OSTRÝ, V., GROSSE, Y., ROUBAL, T., SKARKOVA, J. & RUPRICH, J. Monitoring the mycotoxins in food and their biomarkers in the Czech Republic. *Molecular nutrition & food research*, 2006, vol. 50, no. 6, s. 513–518.
- MALIR, F., OSTRÝ, V. & NOVOTNÁ, E. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Reviews*, 2013, vol. 32, no. 2, s. 19–33.
- MALIR, F., OSTRÝ, V., PFOHL-LESZKOWICZ, A., MALIR, J. & TOMAN, J. Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins*, 2016, vol. 8, no. 7, s. 191.
- MALIR, F., OSTRÝ, V., PFOHL-LESZKOWICZ, A. & ROUBAL, T. Ochratoxin A exposure biomarkers comparison with foreign countries. *Biomarkers*, 2012, vol. 17, no. 7, s. 577–589. ISSN 1366-5804.
- MALÍŘ, F. *Aktuální informace v oblasti mykotoxinů v surovinách, potravinách ve vztahu ke zdraví člověka* [online]. Praha, Brno, 2010.
- MALÍŘ, F. & OSTRÝ, V. Aflatoxiny – toxické účinky u člověka. *Kontakt*, 2012, vol. 14, no. 1, s. 85–93. ISSN 1804-7122.
- MALÍŘ, F., OSTRÝ, V. & KOL. *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno : Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. ISBN 80-7013-395-3.
- MALÍŘ, F., OSTRÝ, V. & NOVOTNÁ, E. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Reviews*, 2013, vol. 32, no. 2, s. 19–33. ISSN 1556-9543.
- MALÍŘ, F., ROUBAL, T., SEVERA, J., ČERNÁ, M. & BRNDIAR, M. Stanovení ochratoxinu A (OTA) v lidských ledvinách. *Vojenské zdravotnické listy*, 2002, vol. LXXI, no. 1, s. 33–36.

- MALÍŘ, F., ROUBAL, T., SEVERA, J., ŘIČAŘOVÁ, B., ROLEČKOVÁ, E. & MAREŠOVÁ, H. Některé toxikologicky významné mykotoxiny a možné zdravotní riziko. *Sborník přednášek*, 2005, vol. 16, no. 1, s. 75–78.
- MALLY, A. & DEKANT, W. Mycotoxins and the kidney: Modes of action for renal tumor formation by ochratoxin A in rodents. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2009, vol. 53, no. 4, s. 467–478.
- MANIQUE, R., PENA, A., LINO, C.M., MOLTÓ, J.C. & MAÑES, J. Ochratoxin A in the morning and afternoon portions of urine from Coimbra and Valencian population. *Toxicol*, 2008, vol. 51, no. 7, s. 1281–1287.
- MERTA, M. Anurie. *Urologie pro praxi*, 2011, vol. 12, no. 5, s. 302–305.
- MIKUŠKOVÁ, A. *Chromatografické metody* [online]. Brno, 2016. Dostupné z WWW: <<http://slideplayer.cz/slide/11224669/>>.
- MODRÁ, H., SVOBODOVÁ, Z., ŠIROKÁ, Z. & BLÁHOVÁ, J. *Toxikologie potravin - vybrané kapitoly* [online]. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, 2014. (Cit. 27.9.2015). Dostupné z WWW: <<http://www.vfu.cz/inovace-bc-a-navmgr/realizovane-klicove-aktivity/skripta/ls-2013-2014/toxikologie-potravin---vybrane-kapitoly.pdf>>.
- MRÁZ, J. & STRÁNSKÝ, V. *Biologické monitorování a biologické expoziční testy* [online]. 2009, Státní zdravotní ústav. Dostupné z WWW: <<http://www.szu.cz/tema/pracovni-prostredi/biologicke-monitorovani-a-biologicke-expozicni-testy>>.
- MZE, ODBOR BEZPEČNOSTI POTRAVIN. *Kontaminanty v potravinách - přehled hlavních témat diskutovaných v EK*. [online]. 2018, Informační centrum bezpečnosti potravin. (Cit. 20.2.2018). Dostupné z WWW: <<http://www.bezpecnostpotravin.cz/kontaminanty-v-potravinach-prehled-hlavnich-temat-diskutovanych-v-ek.aspx>>.
- NOVOTNÝ, M. *Laboratorní cvičení z organické chemie* [online]. 2013.
- O'BRIEN, E. & DIETRICH, D.R. Ochratoxin A: The Continuing Enigma. *Critical Reviews in Toxicology*, 2005, vol. 35, no. 1, s. 33–60.
- OSTRÝ, V. Mikroskopické vláknité houby. *Vesmír*, 2000, vol. 79, no. 4, s. 187–189.
- OSTRÝ, V. Ochratoxin A Mykotoxin v potravinových surovinách rostlinného původu ve světle nejnovějších poznatků. *Česká společnost rostlinolékařská*, 2012, s. 1–5.
- OSTRÝ, V. *Vláknité mikroskopické houby (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka 1*. Praha : Státní zdravotní ústav, 1998. ISBN 80-7071-102-7.
- OSTRY, V., MALIR, F., DOFKOVA, M., SKARKOVA, J., PFOHL-LESZKOWICZ, A. & RUPRICH, J. Ochratoxin A Dietary Exposure of Ten Population Groups in the Czech Republic: Comparison with Data over the World. *Toxins*, 2015, vol. 7, no. 9, s. 3608–3635. ISSN 2072-6651.

- OSTRY, V., MALIR, F., JEFREMOVA, M. & RUPRICH, J. Global warming, climate change and the safety of food of animal origin. *Maso International - Journal of Food Science and Technology*, 2016, no. 81–86. ISSN 1805-529X.
- OSTRY, V., MALIR, F. & RUPRICH, J. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins*, 2013, vol. 5, no. 9, s. 1574–1586.
- OSTRY, V., MALIR, F., TOMAN, J. & GROSSE, Y. Mycotoxins as human carcinogens - the IARC Monographs classification. *Mycotoxin research*, 2017, vol. 33, no. 1, s. 65–73.
- OSTRY, V., SKARKOVA, J., KAVRIK, R. & RUPRICH, J. *An occurrence of ochratoxin A and aflatoxin M1 biomarkers in human urine*. The 32th Mycotoxin Workshop in Lyngby, Denmark, 2010.
- OSTRÝ, V. & ŠKARKOVÁ, J. Metodické doporučení mikrobiologickému zkoušení potravin a pokrmů. Kultivační metoda průkazu aflatoxinogenních mikromycetů (plísní) *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* v potravinách a pokrmech. *Státní zdravotní ústav*, 2003, no. 1, s. 28. ISSN 0862-5956.
- OSTRÝ, V., ŠKARKOVÁ, J. & HAJŠLOVÁ, J. *Informace vědeckého výboru pro potraviny ve věci: Výskyt mykotoxinu ochratoxinu A ve víně* [online]. Vědecký výbor pro potraviny, 2005. Dostupné z WWW: <http://czvp.szu.cz/vedvybor/dokumenty/informace/info_2005_3_deklas_OTAvino_re_v1.pdf>.
- PATOČKA, J. *Základy toxikologie (Kapitoly I až III)* [online]. 2005, Toxicology - Prof. RNDr. Jiří Patočka, DrSc. (Cit. 23.7.2015). Dostupné z WWW: <<http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=10>>.
- PATOČKA, J., BAJGAR, J., CABAL, J., FUSEK, J., HERINK, J., KASSA, J. & ŠTĚTINA, R. *Vojenská toxikologie*. Praha : Grada Publishing a.s., 2004. ISBN 978-80-247-6353-8.
- PAVLÍKOVÁ, D., PAVLÍK, M., MATĚJŮ, L. & BALÍK, J. *Ekotoxikologie*. Praha : Česká zemědělská univerzita, 2008. ISBN 978-80-213-1843-4.
- PFOHL-LESZKOWICS, A. Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 2009, vol. 60, no. 4, s. 465–483.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A. & MANDERVILLE, R.A. Ochratoxin A: An Overview on Toxicity and Carcinogenicity in Animals and Humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2007, vol. 51, no. 1, s. 61–99. ISSN 16134125, 16134133.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., TOZLOVANU, M., MANDERVILLE, R., PERAICA, M., CASTEGNARO, M. & STEFANOVIC, M. New molecular and field evidences for the implication of mycotoxins but not aristolochic acid in human nephropathy and urinary tract tumor. *Molecular nutrition & food research*, 2007, vol. 51, no. 9, s. 131–146.
- PHILP, R.B. *Ecosystems and Human Health: Toxicology and Environmental Hazards* 2. vyd. USA : CRC Press, 2001. ISBN 1-56670-568-1.

- POPULATIONPYRAMID. *Population Pyramids of the World from 1950 to 2100* [online]. 2017, Czech republic 2014. Dostupné z WWW: <<https://www.populationpyramid.net/czech-republic/2014/>>.
- PURCHASE, I.F.H. & THERON, J.J. The acute toxicity of ochratoxin A to rats. *Food and cosmetics toxicology*, 1968, vol. 6, no. 4, s. 479IN5481–480IN12483.
- R-BIOPHARM. *Ochraprep: Quantitative detection of ochratoxin A using HPLC*. R-Biopharm Rhône Ltd., 2005.
- RIEGEROVÁ, J., PŘIDALOVÁ, M. & ULBRICHOVÁ, M. *Aplikace fyzické antropologie v tělesné výchově a sportu*. Olomouc : Hanex, 2006. ISBN 80-85783-52-5.
- RINGOT, D., CHANGO, A., SCHNEIDER, Y.-J. & LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-biological interactions*, 2006, vol. 159, no. 1, s. 18–46.
- ROSYPAL, S. *Nový přehled biologie*. Praha : Scientia, 2003. ISBN 978-80-86960-23-4.
- SEVERA, J., MALÍŘ, F. & ROUBAL, T. Stanovení ochratoxinu A v moči metodou HPLC. *Sborník přednášek*, 2005, vol. 16, no. 1, s. 116–119.
- SHEPHARD, G.S., VAN DER WESTHUIZEN, L. & SEWRAM, V. Biomarkers of exposure to fumonisin mycotoxins: A review. *Food additives and contaminants*, 2007, vol. 24, no. 10, s. 1196–1201.
- SCHATZMAYR, G. Global impact of mycotoxina on the food and feed industry-facts and future scenarios. *WMF meets IUPAC*, 2012.
- SKARKOVA, J., OSTRY, V., MALIR, F. & ROUBAL, T. Determination of ochratoxin A in food by high performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, 2013, vol. 46, no. 10, s. 1495–1504.
- SUCHÝ, P. & HERZIG, I. *Plísně a mykotoxiny, prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech* [online]. Výzkumný ústav živočišné výroby, 2005. (Cit. 27.9.2015). Dostupné z WWW: <<http://www.vuzv.cz/sites/File/vybor/Hezig,%20Such%C3%BD-Plisne%20a%20mykotoxiny.pdf>>.
- SVOD. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. 2017, Epidemiologické analýzy. (Cit. 2.8.2017). Dostupné z WWW: <<http://www.svod.cz/>>.
- SZPI. *Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva RASFF* [online]. 2011, Státní zemědělská a potravinářská inspekce. Dostupné z WWW: <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1002819&docType=ART&nid=11414>>.
- ŠIMŮNEK, J. *Mykotoxiny* [online]. 2003. (Cit. 7.2.2018). Dostupné z WWW: <http://www.med.muni.cz/predmety/preventivni/MYKOTW/metody/mt_tox.htm>.
- ŠIMŮNEK, J. *Plísně a mykotoxiny* [online]. 2004. (Cit. 27.9.2015). Dostupné z WWW: <http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/plisne_a_mykotoxiny.pdf>.

- ŠKARKOVÁ, J. *Stanvení ochratoxinu v moči mtoou HPLC.* , 2009.
- ŠPIRKOVÁ, J. *Laboratorní příručka* [online]. Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové, 2015. Dostupné z WWW: <<https://www.fnhk.cz/fs160/laboratorni-prirucka-ukbd-verze-6.pdf>>.
- ŠTEFAN, J., HLADÍK, J. & KOLEKTIV AUTORŮ. *Soudní lékařství a jeho moderní trendy.* Praha : Grada Publishing a.s., 2012. ISBN 978-80-247-3594-8.
- TOMAN, J. *Specifický výzkum SV2105.* 2017.
- TOZLOVANU, M., FAUCET-MARQUIS, V., PFOHL-LESZKOWICZ, A. & MANDERVILLE, R.A. Genotoxicity of the hydroquinone metabolite of ochratoxin A: structure-activity relationships for covalent DNA adduction. *Chemical research in toxicology*, 2006, vol. 19, no. 9, s. 1241–1247.
- VAN DER MERWE, K.J., STEYN, P.S. & FOURIE, L. Mycotoxins Part II. The constitution of Ochratoxins A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1965a, vol. 204, s. 7083–7088.
- VAN DER MERWE, K.J., STEYN, P.S., FOURIE, L., SCOTT, D.B. & THREON, J.J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 1965b, vol. 205, s. 1112–1113.
- VESELÁ, D., VESELÝ, D. & FASSATIOVÁ, O. Nálezy toxinogenních kmenů hub z rodu *Fusarium* a *Alternaria* na skladované pšenici. *Ochrana Rostlin*, 1982, vol. 18, s. 253–258.
- VESTERGAARD, P. & LEVERETT, R. Constancy of urinary creatinine excretion. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 1958, vol. 51, no. 2, s. 211–218.
- VŠCHT. *Detektory v HPLC* [online]. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2018. Dostupné z WWW: <<https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/6%20HPLC%202012%20detektory.pdf>>.
- WARTH, B., SULYOK, M. & KRŠKA, R. LC-MS/MS–based multibiomarker approaches for the assessment of human exposure to mycotoxins. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2013, vol. 405, no. 17, s. 5687–5695.
- ZEPNIK, H., VÖLKEL, W. & DEKANT, W. Toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A in F 344 rats after oral administration. *Toxicology and applied pharmacology*, 2003, vol. 192, no. 1, s. 36–44.

Zdroje použitých obrázků, tabulek a grafů

Obrázky

Obr. 1 – MALIR, F., OSTRY, V. & NOVOTNA, E. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Reviews*, 2013, vol. 32, no. 2, s. 19–33.

Obr. 2-3 - ELLIS, D., DAVIS, S., ALEXIOU, H., HANDKE, R. & BARTLEY, R. *Descriptions of medical fungi* 2. vyd. Adelaide, South Australia : Nexus Print Solutions, 2007. ISBN 978-0-9598512-6-7.

Obr. 4 - SZPI. *Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva RASFF* [online]. 2011, Státní zemědělská a potravinářská inspekce. Dostupné z WWW: <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1002819&docType=ART&nid=11414>>.

Obr. 5 - ABRUNHOSA, L., PATERSON, R. R. & VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins*, 2010, vol. 2, no. 5, s. 1078–1099.

Obr. 6 - KŐSZEGI, T. & POÓR, M. Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. *Toxins*, 2016, vol. 8, no. 4, s. 111. ISSN 2072-6651.

Obr. 7 – KLABAČKOVÁ, S. *Vývoj extrakčního postupu pro stanovení tokoferolů v lidském séru. Diplomová práce. Vedoucí práce Lenka Kujovská Krčmová.* Hradec Králové : Univerzita Hradec Králové, Farmaceutická fakulta, Katedra analytické chemie., 2016.

Obr. 8-20 – vlastní fotografie

Tabulky

Tab. 1 – OSTRÝ, V. & ŠKARKOVÁ, J. Metodické doporučení mikrobiologickému zkoušení potravin a pokrmů. Kultivační metoda průkazu aflatoxinogenních mikromycetů (plísní) *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* v potravinách a pokrmech. *Státní zdravotní ústav*, 2003, no. 1, s. 28. ISSN 0862-5956.

Tab. 2 – OSTRY, V., MALIR, F. & RUPRICH, J. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins*, 2013, vol. 5, no. 9, s. 1574–1586.

Tab. 3 - BIOLIB, 2018. Profil taxonu - Štětíčkovec (*Penicillium*). *BioLib.cz*, 2018.

Tab. 4 - OSTRY, V., MALIR, F. & RUPRICH, J. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins*, 2013, vol. 5, no. 9, s. 1574–1586.

Tab. 5 – EVROPSKÁ KOMISE. Nařízení komise (ES) 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách [online]. 2006. (Cit. 22.8.2017). Dostupné z WWW: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:CS:PDF>>. & EVROPSKÁ KOMISE. Nařízení Komise (EU) 2015/1137 ze dne 13. července 2015, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limit ochratoxinu A v kořeni *Capsicum* spp. [online]. 2015. Dostupné z WWW: <<http://www.eurlex.cz/dokument.aspx?celex=32015R1137>>. & EVROPSKÁ KOMISE. Nařízení Komise (EU) č. 105/2010 ze dne 5. února 2010, kterým se mění nařízení (ES) č.

1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o ochratoxin A [online]. 2010. Dostupné z WWW: <<http://www.eurlex.cz/dokument.aspx?celex=32010R0105>>. & EVROPSKÁ KOMISE. Nařízení Komise (EU) č. 594/2012 ze dne 5. července 2012, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity kontaminujících látek ochratoxinu A, PCB bez dioxinového efektu a melaminu v potravinách [online]. 2012. Dostupné z WWW: <<http://www.eurlex.cz/dokument.aspx?celex=32012R0594>>.

Tab. 6 - MZE, ODBOR BEZPEČNOSTI POTRAVIN. Kontaminanty v potravinách - přehled hlavních témat diskutovaných v EK. [online]. 2018, Informační centrum bezpečnosti potravin. (Cit. 20.2.2018). Dostupné z WWW: <<http://www.bezpecnostpotravin.cz/kontaminanty-v-potravinach-prehled-hlavnich-temat-diskutovanych-v-ek.aspx>>.

Tab. 7 - SVOD. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. 2017, Epidemiologické analýzy. (Cit. 2.8.2017). Dostupné z WWW: <<http://www.svod.cz/>>.

Tab. 8-9 - OSTRY, V., SKARKOVA, J., KAVRIK, R. & RUPRICH, J. *An occurrence of ochratoxin A and aflatoxin M1 biomarkers in human urine*. The 32th Mycotoxin Workshop in Lyngby, Denmark, 2010. & DOHNAL, V., DVOŘÁK, V., MALÍŘ, F., OSTRÝ, V. & ROUBAL, T. A comparison of ELISA and HPLC methods for determination of ochratoxin A in human blood serum in the Czech Republic. *Food and chemical toxicology*, 2013, vol. 62, s. 427–431. & SKARKOVA, J., OSTRY, V., MALIR, F. & ROUBAL, T. Determination of ochratoxin A in food by high performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, 2013, vol. 46, no. 10, s. 1495–1504.

Tab. 10-16 - SVOD. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. 2017, Epidemiologické analýzy. (Cit. 2.8.2017). Dostupné z WWW: <<http://www.svod.cz/>>.

Tab. 17 - SVOD. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. 2017, Epidemiologické analýzy. (Cit. 2.8.2017). Dostupné z WWW: <<http://www.svod.cz/>>. & POPULATIONPYRAMID. *Population Pyramids of the World from 1950 to 2100* [online]. 2017, Czech republic 2014. Dostupné z WWW: <<https://www.populationpyramid.net/czech-republic/2014/>>.

Tab. 18-26 – vlastní zpracování

Tab. 27 - OSTRY, V., SKARKOVA, J., KAVRIK, R. & RUPRICH, J. *An occurrence of ochratoxin A and aflatoxin M1 biomarkers in human urine*. The 32th Mycotoxin Workshop in Lyngby, Denmark, 2010. & vlastní zpracování

Tab. 28 – FAZEKAS, B., TAR, A. & KOVÁCS, M. Ochratoxin A content of urine samples of healthy humans in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2005, vol. 53, no. 1, s. 35–44. & MANIQUE, R., PENA, A., LINO, C.M., MOLTÓ, J.C. & MAÑES, J. Ochratoxin A in the morning and afternoon portions of urine from Coimbra and Valencian population. *Toxicon*, 2008, vol. 51, no. 7, s. 1281–1287. & vlastní zpracování

Grafy

Graf 1-6 - SVOD. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. 2017, Epidemiologické analýzy. (Cit. 2.8.2017). Dostupné z WWW: <<http://www.svod.cz/>>.

Graf 7-8- SVOD. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. 2017, Epidemiologické analýzy. (Cit. 2.8.2017). Dostupné z WWW: <<http://www.svod.cz/>>. & POPULATIONPYRAMID. *Population Pyramids of the World from 1950 to 2100* [online]. 2017, Czech republic 2014. Dostupné z WWW: <<https://www.populationpyramid.net/czech-republic/2014/>>.

Graf 9-14 – vlastní zpracování

Přílohy

Tabulky

Tab. 10 Diagnózy C64-66 (ZN ledvin, ledvinné pánvičky, močovodu) – Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi Evropy v přepočtu na 100 000 osob, rok 2008, uvedeno prvních 20 zemí; zpracováno dle (SVOD, 2017)

Pořadí	Země	Počet/100 000 ob.	Pořadí	Země	Počet/100 000 ob.
1.	Česká republika	29,5	11-12.	Slovinsko	15,9
2.	Lotyšsko	23	11-12.	Rakousko	15,9
3.	Německo	22,7	13-14.	EU-27	14,8
4.	Litva	19,5	13-14.	Itálie	14,8
5.	Estonsko	19,2	15.	Nizozemsko	14,6
6.	Chorvatsko	16,4	16.	Norsko	14,3
7.	Slovensko	16,3	17.	Velká Británie	14,1
8-9.	Island	16,2	18.	Dánsko	13,8
8-9.	Belgie	16,2	19.	Bělorusko	13,6
10.	Finsko	16	20.	Lucembursko	13,5

Tab. 11 Diagnózy C64-66 (ledvina, ledvinná pánvička, močovod) – Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi světa v přepočtu na 100 000 osob, rok 2008, uvedeno prvních 20 zemí; zpracováno dle (SVOD, 2017)

Pořadí	Země	Počet/100 000 ob.	Pořadí	Země	Počet/100 000 ob.
1.	Česká republika	29,5	11.	Finsko	16
2.	Lotyšsko	23	12-13.	Slovinsko	15,9
3.	Německo	22,7	12-13.	Rakousko	15,9
4.	Litva	19,5	14-15.	EU-27	14,8
5.	Estonsko	19,2	14-15.	Itálie	14,8
6.	USA	18,2	16.	Nizozemsko	14,6
7.	Chorvatsko	16,4	17.	Norsko	14,3
8.	Slovensko	16,3	18.	Velká Británie	14,1
9-10	Island	16,2	19.	Dánsko	13,8
9-10.	Belgie	16,2	20.	Kanada	13,7

Tab. 12 Diagnózy C64-66 (ledvina, ledvinná pánvička, močovod) – Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi Evropy v přepočtu na světový standard - ASR (W), rok 2008, uvedeno prvních 20 zemí; zpracováno dle (SVOD, 2017)

Pořadí	Země	ASR-W ¹	Pořadí	Země	ASR-W ¹
1.	Česká republika	16,6	11.	Slovinsko	9
2.	Lotyšsko	13,2	12.	Belgie	8,8
3.	Litva	11,9	13.	Rakousko	8,5
4.	Island	11,1	14-16	Norsko	8,4
5-6.	Slovensko	11	14-16.	Nizozemsko	8,4
5-6.	Estonsko	11	14-16.	Ruská federace	8,4
7.	Německo	10,8	17-18.	Finsko	8
8.	Albánie	10,4	17-18.	EU-27	8
9.	Bělorusko	9,2	19.	Irsko	7,9
10.	Chorvatsko	9,1	20.	Polsko	7,8

¹ASR (W) – Age Standardized Rate (World) = Věková standardizovaná incidence (světová)

Tab. 13 Diagnózy C64-66 (ledvina, ledvinná pánvička, močovod) – Srovnání incidencí v ČR s ostatními zeměmi světa v přepočtu na světový standard - ASR (W), rok 2008, uvedeno prvních 20 zemí; zpracováno dle (SVOD, 2017)

Pořadí	Země	ASR-W1	Pořadí	Země	ASR (W) ¹
1.	Česká republika	16,6	11-12.	Izrael	9,1
2.	Lotyšsko	13,2	11-12.	Chorvatsko	9,1
3.	USA	12,2	13.	Slovinsko	9
4.	Litva	11,9	14.	Belgie	8,8
5.	Island	11,1	15.	Rakousko	8,5
6-7.	Slovensko	11	16-19	Kanada	8,4
6-7.	Estonsko	11	16-19	Norsko	8,4
8.	Německo	10,8	16-19	Nizozemsko	8,4
9.	Albánie	10,4	16-19	Ruská federace	8,4
10.	Bělorusko	9,2	20.	Austrálie	8,3

¹ASR (W) – Age Standardized Rate (World) = Věková standardizovaná incidence (světová)

Tab. 14 Absolutní počty incidencí a mortalit a míra úmrtnosti v ČR (1977-2014); zpracováno dle (SVOD, 2017)

Rok	I ¹	M ²	M:I ³	Rok	I ¹	M ²	M:I ³	Rok	I ¹	M ²	M:I ³
1977	756	307	0,41	1990	1455	869	0,60	2003	2633	1331	0,51
1978	754	396	0,53	1991	1643	894	0,54	2004	2785	1280	0,46
1979	765	478	0,62	1992	1715	923	0,54	2005	2839	1270	0,45
1980	805	505	0,63	1993	1819	925	0,51	2006	2670	1219	0,46
1981	889	518	0,58	1994	2312	1166	0,50	2007	2880	1324	0,46
1982	860	566	0,66	1995	2282	1227	0,54	2008	2900	1284	0,44
1983	921	597	0,65	1996	2400	1284	0,54	2009	2912	1264	0,43
1984	977	626	0,64	1997	2383	1217	0,51	2010	2935	1287	0,44
1985	1027	659	0,64	1998	2332	1241	0,53	2011	3047	1259	0,41
1986	1138	694	0,61	1999	2315	1223	0,53	2012	3083	1205	0,39
1987	1217	715	0,59	2000	2381	1279	0,54	2013	3112	1207	0,39
1988	1258	722	0,57	2001	2357	1287	0,55	2014	3161	1168	0,37
1989	1378	826	0,60	2002	2574	1349	0,52				

¹I – incidence, ²M – mortalita, ³M:I – míra úmrtnosti

Tab. 15 Předpověď vývoje incidence, mortality a míry úmrtnosti v ČR v letech 2015-2020; zpracováno dle (SVOD, 2017)

Rok	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Předpověď incidencí	3217	3272	3328	3384	3440	3495
Předpověď mortality	1160	1152	1144	1136	1128	1120
Předpověď M:I	0,36	0,35	0,34	0,34	0,33	0,32

Tab. 16 Dg. C64 - absolutní počty incidencí a mortalit v ČR dle pohlaví v letech 1977-2014; zpracováno dle (SVOD, 2017)

Rok	Muži ČR		Ženy ČR		Rok	Muži ČR		Ženy ČR	
	I ¹	M ²	I ¹	M ²		I ¹	M ²	I ¹	M ²
1977	475	201	281	106	1996	1483	819	917	465
1978	458	247	296	149	1997	1461	743	922	474
1979	490	319	275	159	1998	1437	765	895	476
1980	510	317	295	188	1999	1425	758	890	465
1981	555	328	334	190	2000	1407	791	974	488
1982	549	373	311	193	2001	1418	788	939	499
1983	575	383	346	214	2002	1624	849	950	500
1984	643	423	334	203	2003	1678	852	955	479
1985	646	424	381	235	2004	1722	785	1063	495
1986	704	452	434	242	2005	1801	796	1038	474
1987	753	460	464	255	2006	1691	779	979	440
1988	817	441	441	281	2007	1804	815	1076	509
1989	845	537	533	289	2008	1849	822	1051	462
1990	842	534	613	335	2009	1851	788	1061	476
1991	1027	581	616	313	2010	1863	818	1072	469
1992	1042	593	673	330	2011	1971	805	1076	454
1993	1034	533	785	392	2012	1958	717	1125	488
1994	1346	717	966	449	2013	1942	759	1170	448
1995	1342	726	940	501	2014	2022	719	1139	449

¹I - incidence, ²M - mortalita

Tab. 17 Diagnóza C64 – Incidence, mortalita a míra úmrtnosti populace v ČR dle věkových skupin v přepočtu na 100 000 os. v dané věkové skupině, rok 2014; zpracováno dle (SVOD, 2017; PopulationPyramid, 2017)

Věková kategorie	Celkem			Muži ČR		Ženy ČR	
	I ¹	M ²	M:I ³	I ¹	M ²	I ¹	M ²
0-4	1,65	0,00	0,00	1,78	0,00	1,50	0,00
5-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10-14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15-19	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,43	0,00
20-24	0,16	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00	0,00
25-29	0,57	0,14	0,25	0,55	0,00	0,59	0,29
30-34	2,06	0,13	0,06	2,75	0,25	1,33	0,00
35-39	3,86	0,54	0,14	5,84	0,63	1,77	0,44
40-44	7,29	0,72	0,10	9,08	0,93	5,40	0,49
45-49	16,10	1,61	0,10	23,80	2,29	8,08	0,90
50-54	26,67	5,06	0,19	38,72	8,57	14,42	1,50
55-59	52,85	11,57	0,22	78,16	17,24	28,28	6,06
60-64	72,25	20,82	0,29	106,44	33,67	41,09	9,10
65-69	93,63	31,46	0,34	135,12	48,23	58,59	17,30
70-74	115,95	44,00	0,38	162,46	63,18	80,54	29,39
75-79	119,22	50,29	0,42	160,27	67,48	92,44	39,07
80-84	98,33	78,92	0,80	132,93	111,75	78,98	60,55
85+	56,39	67,99	1,21	87,67	89,42	42,95	58,78

¹I – incidence, ²M – mortalita, ³M:I – míra úmrtnosti

Tab. 18 Záznam dat o pacientech

LEV	Pohlaví ¹	Rok narození	Hmotnost [Kg]	Diagnóza	Bydliště
1	Ž	1943	60	C64	Město
2	M	1936	92	C64	Město
3	Ž	1943	63	C64	Město
4	M	1955	85	C64	Ves
5	M	1944	68	C64	Ves
6	M	1943	77	C64	Město
7	M	1968	113	C64	Město
8	Ž	1976	60	C64	Město
9	Ž	1962	82	C64	Město
10	M	1973	96	C64	Město
11	M	1953	105	C64	Město
12	M	1943	94	C64	Město
13	M	1948	89	C64	Město
14	M	1959	98	C64	Město
15	M	1965	82	C64	Ves
16	M	1948	92	C64	Město
17	M	1957	100	C64	Město
18	Ž	1955	64	C64	Město
19	M	1957	85	C64	Město
20	M	1945	92	C64	Město
21	M	1947	104	C64	Město
22	M	1945	98	C64	Ves
23	M	1943	83	C64	Město
24	M	1950	85	C64	Ves
25	M	1939	87	C675	Město
26	Ž	1951	123	C64	Město
27	M	1940	94	C64	Město
28	M	1949	92	C64	Město
29	Ž	1954	57	C64	Město
30	Ž	1977	155	C64	Ves
31	M	1948	99	C64	Ves
32	M	1948	90	C64	Město
33	M	1956	118	C64	Město
34	M	1943	86	C64	Město
35	Ž	1958	85	C64	Město
36	M	1948	71	C64	Město
37	M	1943	102	C64	Město
38	M	1963	109	C64	Město
39	M	1952	108	C64	Město
40	M	1965	90	C64	Město
41	M	1968	83	C64	Město
42	M	1947	105	C64	Město
43	M	1949	95	C64	Město
44	Ž	1973	76	N131	Město
45	M	1954	107	C64	Město
46	Ž	1957	57	C64	Město
47	M	1977	98	C64	Město
48	M	1967	87	C64	Město
49	M	1954	92	C64	Město
50	M	1951	79	C64	Město

¹M - muži, Ž – ženy

Tab. 19 Statistické zpracování dat pacientů

Pohlaví		Celkem	Muži	Ženy
Počet		50	39	11
Rok narození	Průměr	1954	1952	1959
	Směrodatná odchylka	11	10	12
	Medián	1952	1949	1957
	Rozsah	1936-1977	1936-1977	1943-1977
Věková skupina	38-45 let ¹	5	2	3
	46-60 let ²	13	10	3
	61-75 let ³	29	24	5
	76-80 let ⁴	3	3	0
Hmotnost [kg]	Průměr	90	93	80
	Směrodatná odchylka	18	11	31
	Medián	91	92	64
	Rozsah	57-155	68-118	57-155
Diagnóza	C64	48	38	10
	C675	1	1	0
	N131	1	0	1
Bydliště	Město	43	33	10
	Venkov	7	6	1

Periodizace života: ¹Zralost (*Maturus I*) 31-45 let, ²Střední věk (*Maturus II*) 46-60 let, ³Stárumutí (*Presenilis*) 61-75 let, ⁴Stáří (*Senilis*) 76-90 let (Riegerová *et al.*, 2006)

Tab. 20 Obsah OTA v močích

Číslo vzorku	Pohlaví ¹	Obsah OTA ² [ng/l moči]	Číslo vzorku	Pohlaví ¹	Obsah OTA ² [ng/l moči]
1	Ž	3,60	26	Ž	10,00
2	M	14,10	27	M	9,88
3	Ž	8,50	28	M	21,10
4	M	9,80	29	Ž	2,74
5	M	<LOQ	30	Ž	4,16
6	M	<LOQ	31	M	7,03
7	M	15,30	32	M	10,60
8	Ž	<LOQ	33	M	6,72
9	Ž	<LOQ	34	M	6,42
10	M	<LOQ	35	Ž	7,03
11	M	<LOQ	36	M	6,20
12	M	<LOQ	37	M	27,80
13	M	<LOQ	38	M	10,40
14	M	<LOQ	39	M	9,52
15	M	<LOQ	40	M	11,90
16	M	<LOQ	41	M	8,40
17	M	<LOQ	42	M	11,20
18	Ž	<LOQ	43	M	6,53
19	M	<LOQ	44	Ž	<LOQ
20	M	<LOQ	45	M	10,30
21	M	7,00	46	Ž	2,20
22	M	<LOQ	47	M	6,41
23	M	<LOQ	48	M	4,52
24	M	<LOQ	49	M	5,11
25	M	15,30	50	M	5,71

¹M - muži, Ž - ženy, ²LOQ = 2 ng/l, pro statistické zpracování použita střední hodnota 1 ng/l - tj. ½ LOQ

Tab. 21 Statistické vyhodnocení obsahu OTA v močích

OTA [ng/l]	Průměr	Směrodatná odchylna	Medián	Rozsah ¹	Pozitivita	Q0,9
Celkem	6,09	5,80	5,41	<LOQ-27,80	62 %	12,1
Muži	6,72	6,22	6,41	<LOQ-27,80	62 %	-
Ženy	3,84	3,26	2,74	<LOQ-10,00	64 %	-

¹LOQ = 2 ng/l; pro statistické zpracování použita střední hodnota 1 ng/l - tj. ½ LOQ

Tab. 22 Objem a hmotnost moči

Číslo vzorku	Objem moči [ml]	Hmotnost moči [g]	Číslo vzorku	Objem moči [ml]	Hmotnost moči [g]
1	530	504,2	26	389	391,6
2	530	511,5	27	412	416,1
3	110	110,5	28	252	259,6
4	560	541,8	29	570	587,1
5	400	386,0	30	459	470,5
6	550	532,1	31	536	590,2
7	525	513,0	32	399	411,0
8	505	483,5	33	461	481,7
9	535	508,3	34	465	451,0
10	400	402,7	35	493	515,2
11	381	384,4	36	435	456,0
12	488	483,1	37	462	481,3
13	433	435,1	38	403	407,7
14	414	414,0	39	425	437,8
15	404	405,7	40	519	505,2
16	365	367,2	41	430	422,1
17	361	359,6	42	421	416,8
18	405	403,4	43	445	439,1
19	397	398,9	44	467	458,4
20	466	468,7	45	420	418,6
21	448	448,7	46	586	572,3
22	457	475,6	47	419	417,6
23	360	364,3	48	508	500,1
24	409	413,9	49	530	527,7
25	460	463,8	50	553	541,3

Tab. 23 Statistické vyhodnocení objemu moči

Objem [ml]	Průměr	SD ¹	Medián	Rozsah
Celkem	447	82	447	110 - 586
Muži	444	64	433	252 - 560
Ženy	459	131	493	110 - 586

¹SD – směrodatná odchylna

Tab. 24 Statistické vyhodnocení hmotnosti moči

Hmotnost [g]	Průměr	SD ¹	Medián	Rozsah
Celkem	447,1	86	449,9	110,5 - 590,2
Muži	444,9	63,1	437,8	259,6 - 590,2
Ženy	455,0	129,1	483,5	110,5-587,1

¹SD – směrodatná odchylna

Tab. 25 Obsah kreatininu v moči a přepočet množství OTA na g kreatininu

Číslo vzorku	Pohlaví ¹	Kreatinin v moči [g/den]	Číslo vzorku	Pohlaví ¹	Kreatinin v moči [g/den]
1	Ž	0,41	26	Ž	0,48
2	M	0,59	27	M	0,44
3	Ž	0,14	28	M	0,42
4	M	0,39	29	Ž	0,14
5	M	0,52	30	Ž	0,41
6	M	0,18	31	M	0,41
7	M	1,73	32	M	0,22
8	Ž	0,39	33	M	0,55
9	Ž	0,27	34	M	0,28
10	M	0,24	35	Ž	0,45
11	M	0,37	36	M	0,28
12	M	0,13	37	M	0,88
13	M	0,08	38	M	0,24
14	M	0,07	39	M	0,46
15	M	0,15	40	M	0,50
16	M	0,10	41	M	0,53
17	M	0,15	42	M	0,49
18	Ž	0,11	43	M	0,42
19	M	0,04	44	Ž	0,25
20	M	0,27	45	M	0,50
21	M	0,13	46	Ž	0,21
22	M	0,21	47	M	0,41
23	M	0,13	48	M	0,33
24	M	0,05	49	M	0,30
25	M	0,37	50	M	0,26

¹M - muži, Ž – ženy

Tab. 26 Statistické vyhodnocení obsahu kreatininu v moči

Kreatinin v moči [g/den]	Průměr	SD ¹	Medián	Rozsah
Celkem	0,34	0,26	0,29	0,04-1,73
Muži	0,35	0,29	0,30	0,04-1,73
Ženy	0,30	0,14	0,27	0,11-0,48

¹SD – směrodatná odchylka

Tab. 27 Porovnání koncentrací OTA v moči [ng/l] nemocných pacientů (s dg. C64) se zdravou populací (bez dg. C64) v rámci České republiky; částečně zpracováno dle (Ostry *et al.*, 2010)

	Pacienti bez diagnózy		Pacienti s diagnózou C64	
	Celkem		Celkem	
Pohlaví ¹	M	Ž	M	Ž
n celkem/n pozitivních ²	236/185		50/31	
	116/107	120/78	39/24	11/7
Pozitivita (%)	78		62	
	92	65	62	64
Průměr	7,35		6,09	
	10,30	4,50	6,72	3,84
Max	126		27,8	
	126,00	23,10	27,80	10,00
Median	4,47		5,41	
	6,30	2,90	6,41	2,74
90. perc.	-		12,10	
	16,60	10,60	14,34	8,50
Literatura	(Ostry <i>et al.</i> , 2010)		-	

¹M – muži, Ž – ženy, ²n – počet vzorků

Tab. 28 Porovnání nemocných Čechů ze zdravými populacemi ve Španělsku, Maďarsku a Portugalsku; částečně zpracováno dle (Fazekas *et al.*, 2005; Manique *et al.*, 2008)

	ČR	Maďarsko	Portugalsko	Španělsko
Diagnóza	C64	-	-	-
n celkem/n pozitivních ³	50/31	88/54	60/27	62/51
n+ [%] ⁴	62	61	45	82
Průměr pozitivních vzorků [ng/l]	9,21	13,00	¹ 18,48	¹ 29,96
Průměr všech vzorků [ng/l]	6,09	² 8,36	² 8,87	² 24,82
Literatura	-	(Fazekas <i>et al.</i> , 2005)	(Manique <i>et al.</i> , 2008)	(Manique <i>et al.</i> , 2008)

¹ **Dopočítané hodnoty:** Celková průměrná hodnota pozitivních vzorků byla vypočtena ze známých průměrných hodnot ranní a odpolední moče (tzn. součet součinů počtu pozitivních ranních/odpoledních vzorků a ranní/odpolední průměrné hodnoty OTA byl vydělen celkovým počtem pozitivních vzorků)

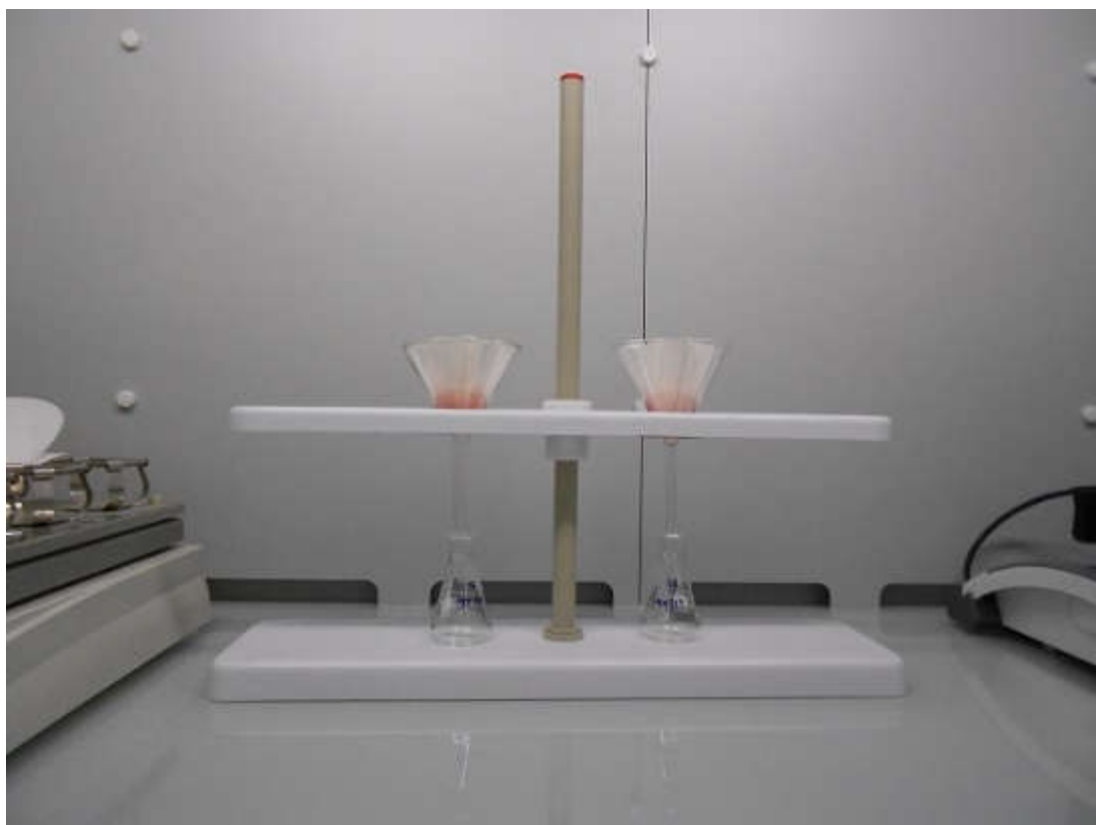
² **Dopočítané hodnoty:** Průměrná hodnota OTA všech vzorků (tj. pozitivních i negativních dohromady) byla vypočtena na základě známých/dopočítaných průměrných hodnot pozitivních vzorků. Aby bylo možné výsledné průměrné hodnoty porovnat s touto studií, byla negativním vzorků pro výpočet průměrné hodnoty přidělena hodnota 1 – tj. poloviční hodnota LOQ = 2 ng/l, která byla použita pro statistické zpracování výsledků nemocných českých pacientů.

³n – počet vzorků, ⁴n+ - počet pozitivních vzorků

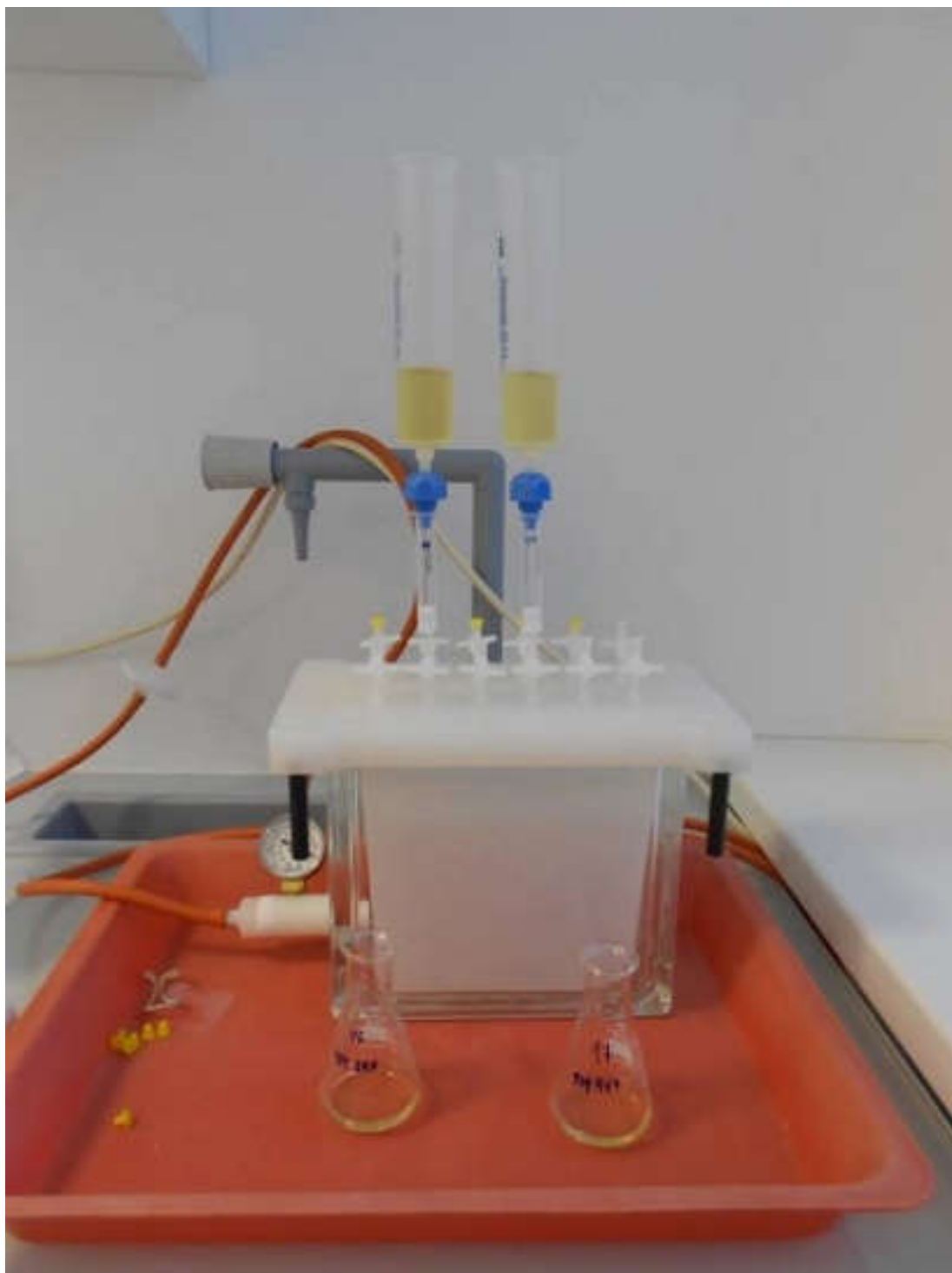
Obrázky



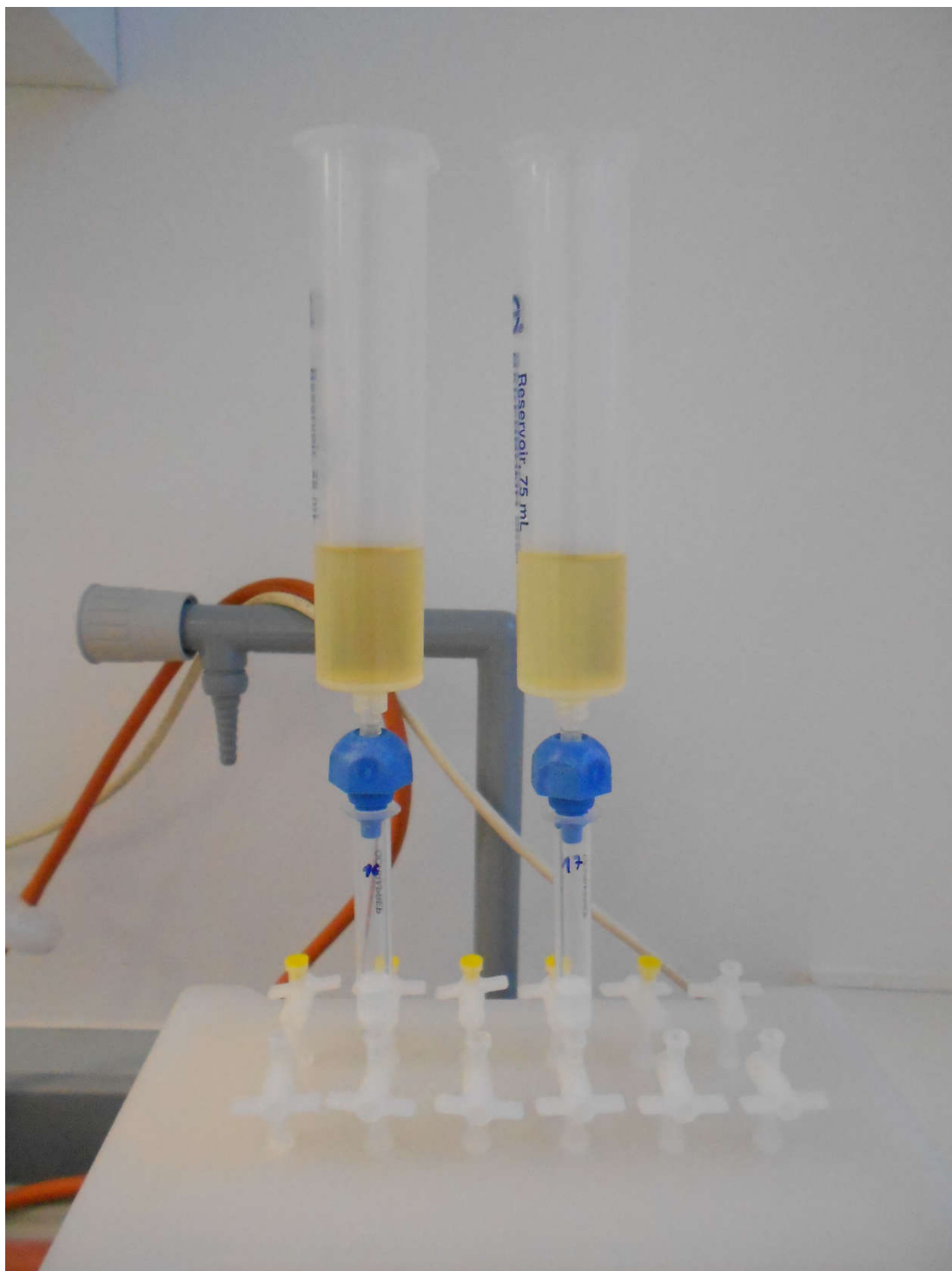
Obr. 8 Rozmražené vzorky moči



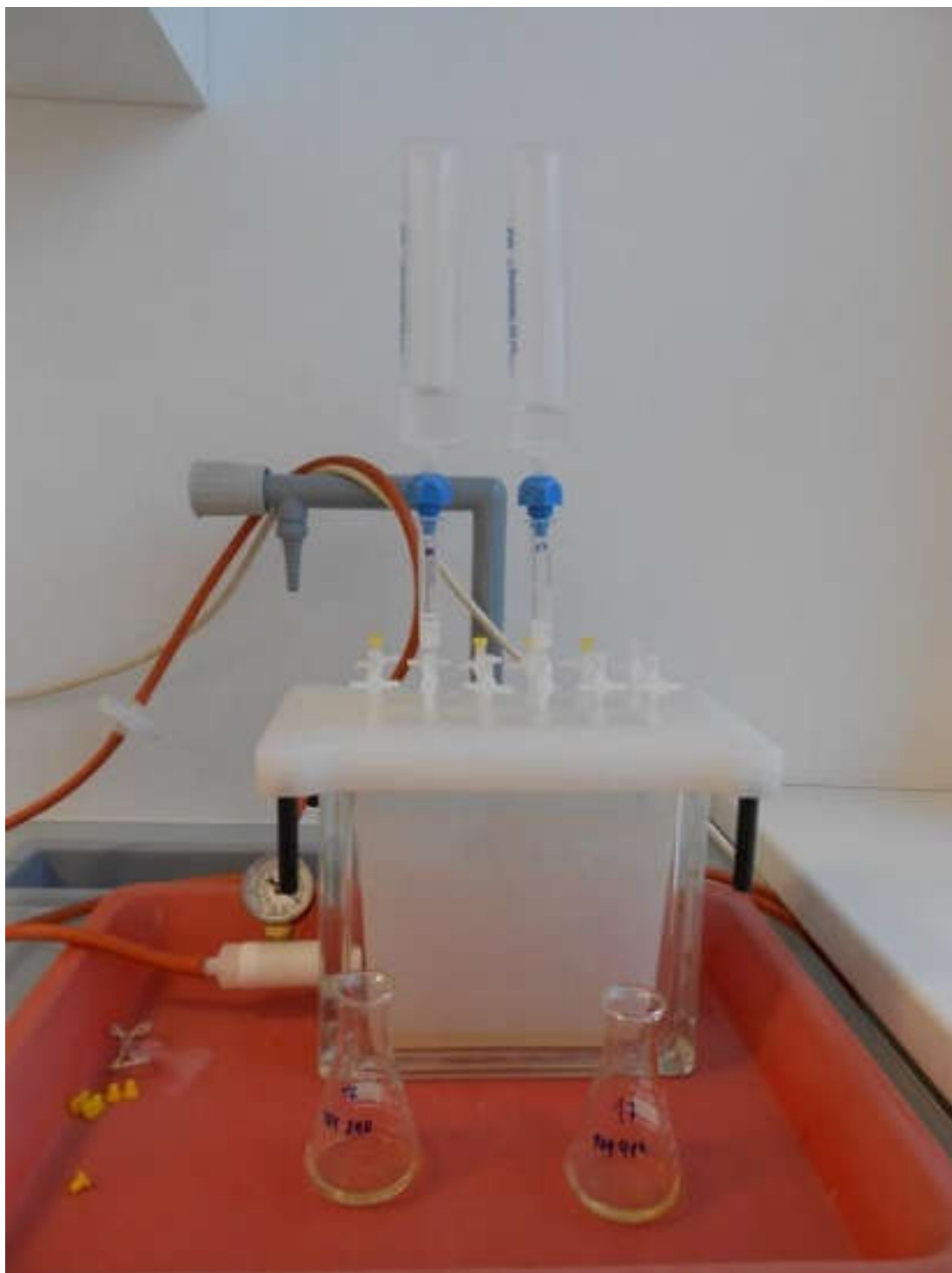
Obr. 9 Filtrační aparatura



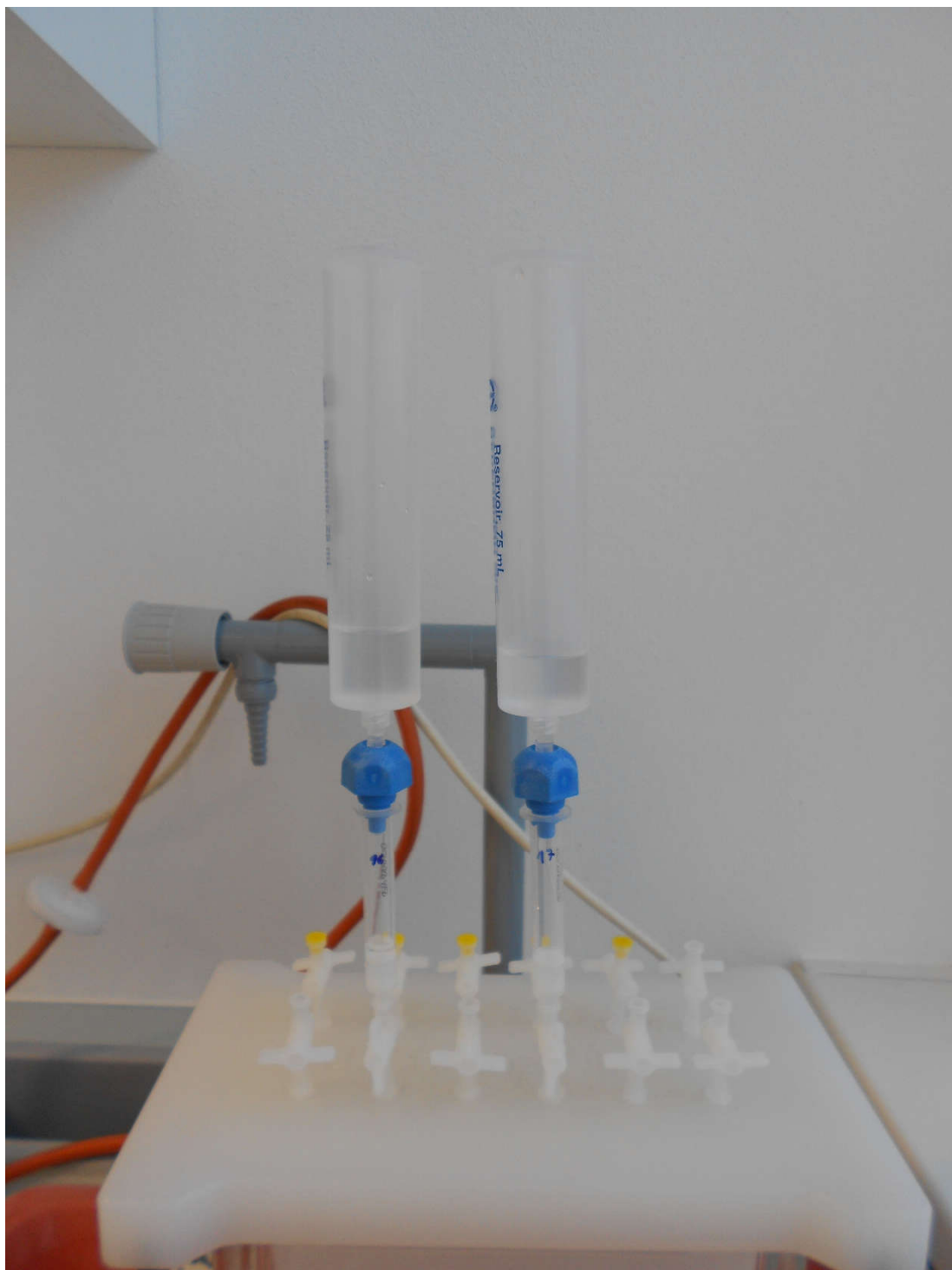
Obr. 10 Čištění vzorku moči pomocí prosávacího zařízení



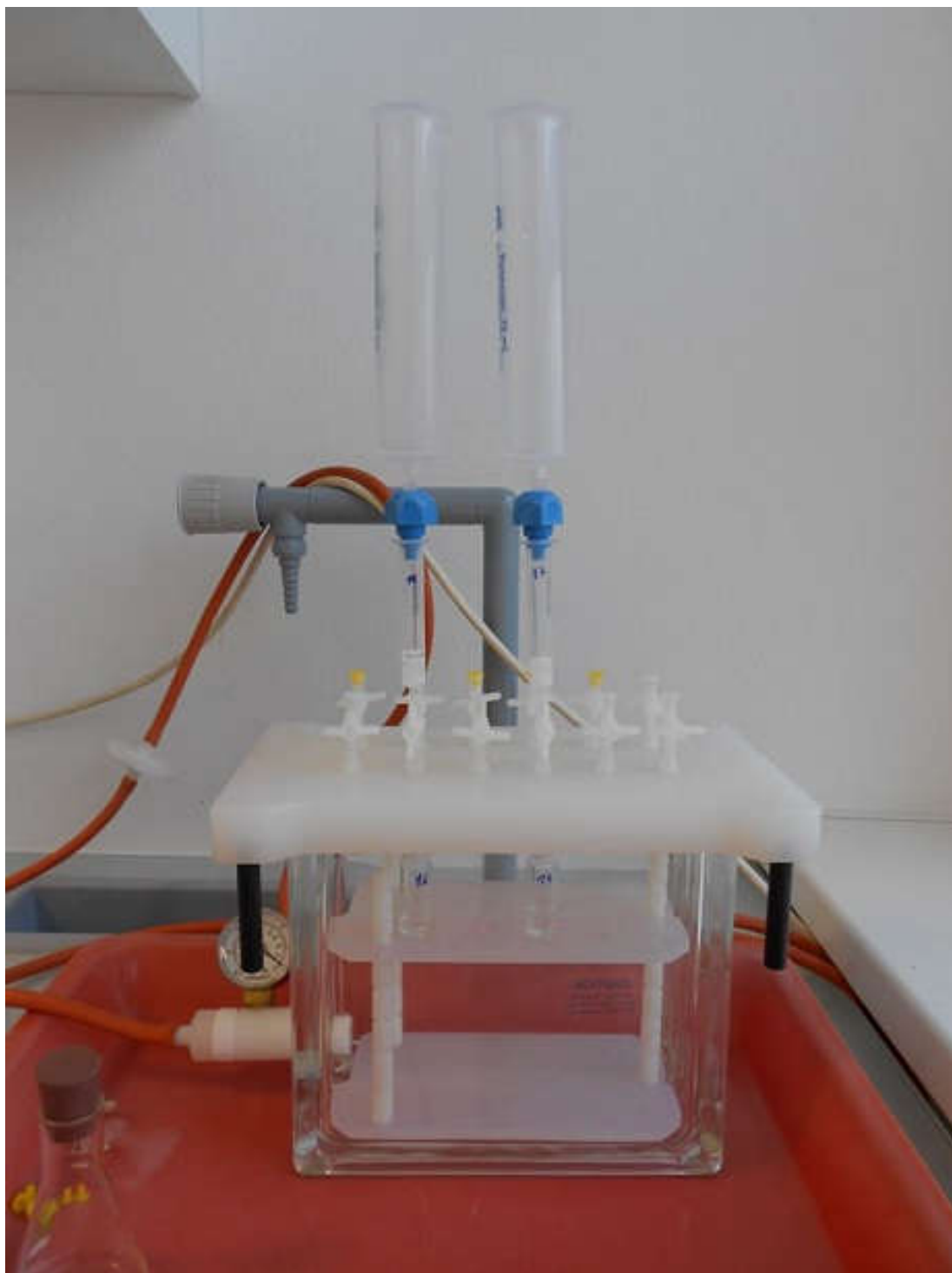
Obr. 11 Kolonky s násadcem naplněným močí



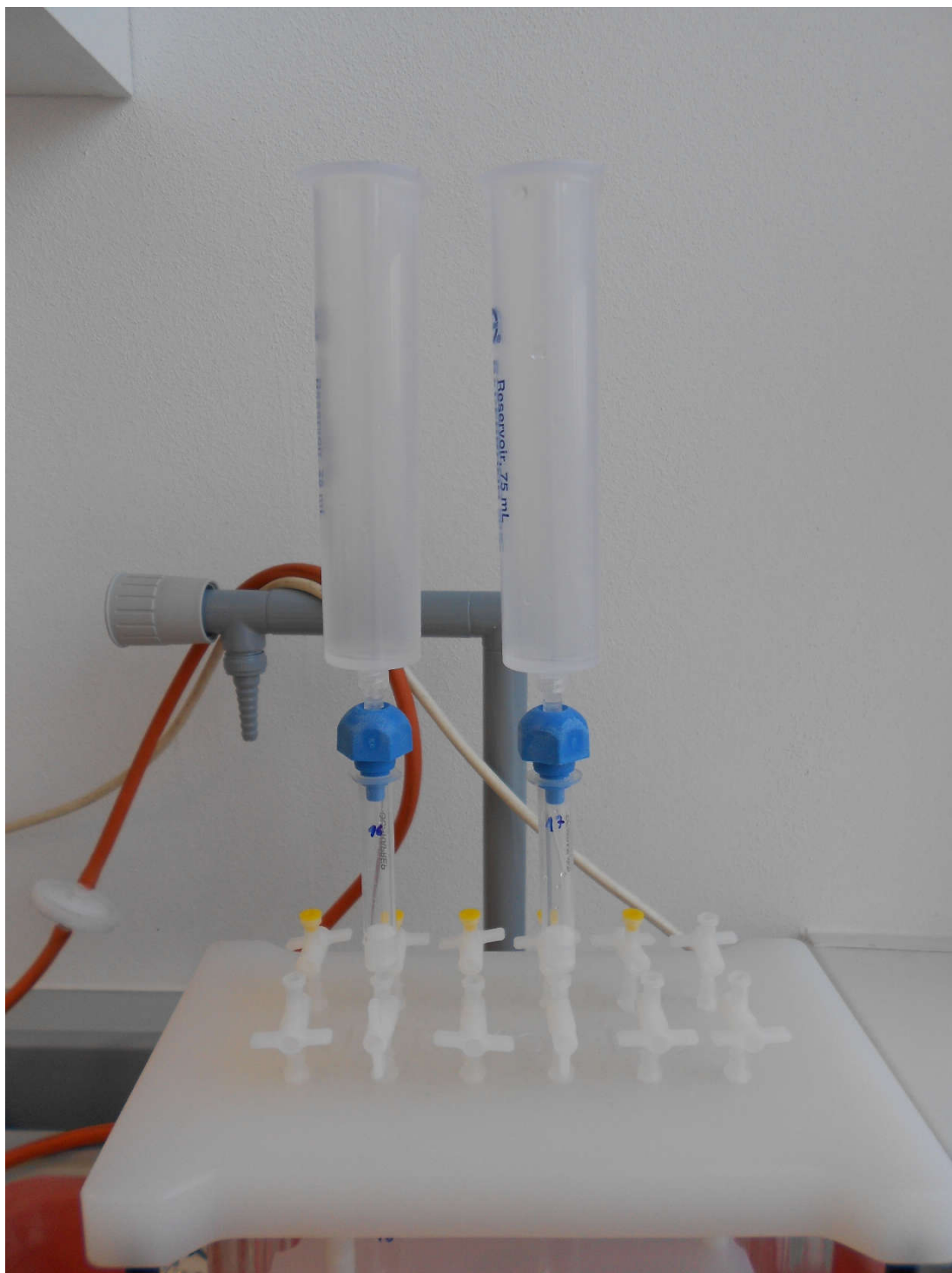
Obr. 12 Promývání kolonky PBS pufrem



Obr. 13 Kolonky s násadcem naplněným PBS pufrem



Obr. 14 Eluce OTA metanolem



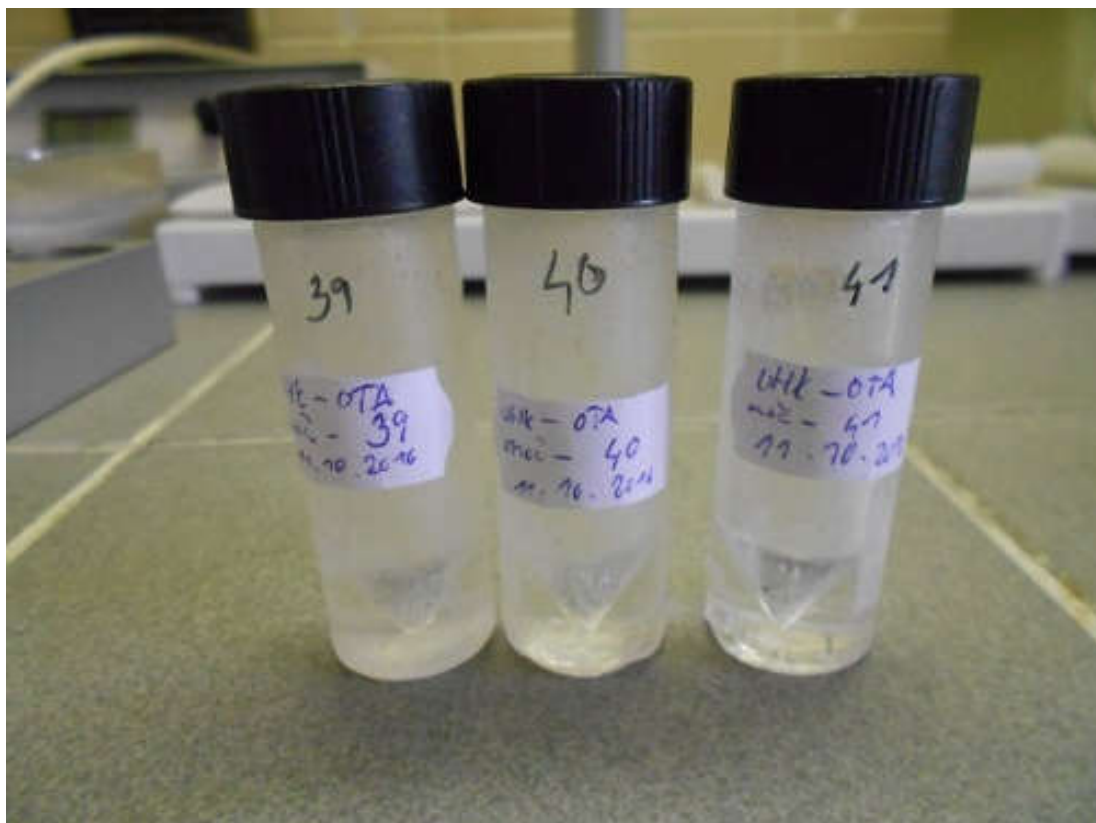
Obr. 15 Kolonky s násadcem naplněným metanolem



Obr. 16 Odpařování eluátu dusíkem pomocí koncentrátoru EVATERM při 45,5 °C



Obr. 17 Detail na vialek s eluátem odpařovaným dusíkem



Obr. 18 Vzorky po odpaření eluátu

UHk

Zápis o zpracování vzorku

Číslo vzorku: 41 Požadovaná analýza: OTA

Popis vzorku: moč

Separaci provedl: Pícková, Toman dne: 11. 10. 2016

Separční postup dle: T-79

Navážka: 10 ml

Objem eluátu: 1,5 ml

Poznámky: Odparek je ekvivalentní 10 ml vzorku

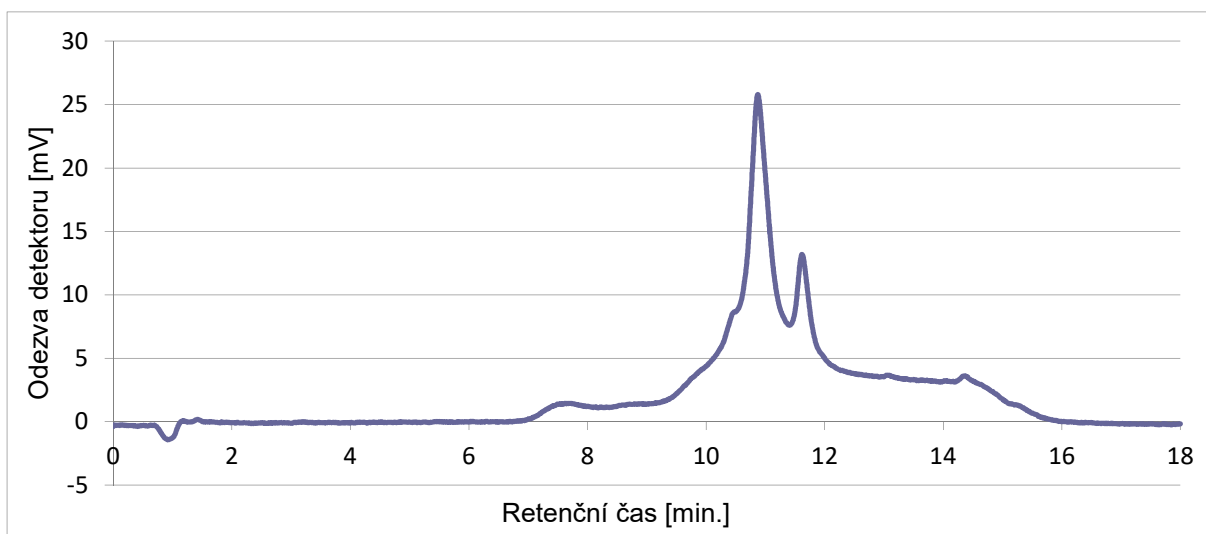
Datum a podpis pracovníka
11. 10. 2016 *T. Pícková*

Obr. 19 Zápis o zpracování vzorku

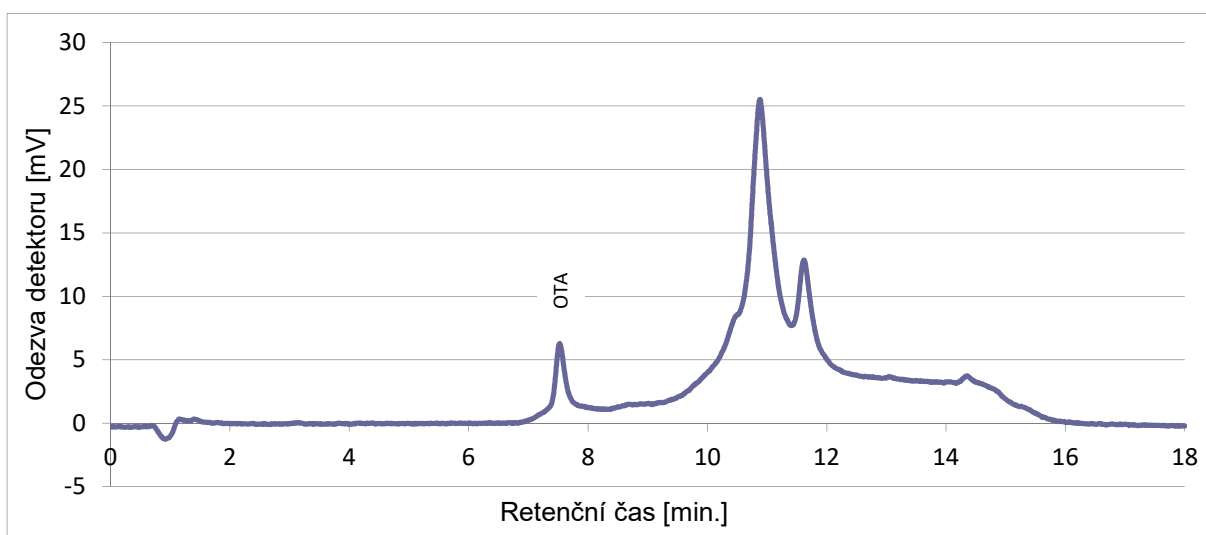


Obr. 20 HPLC-FLD

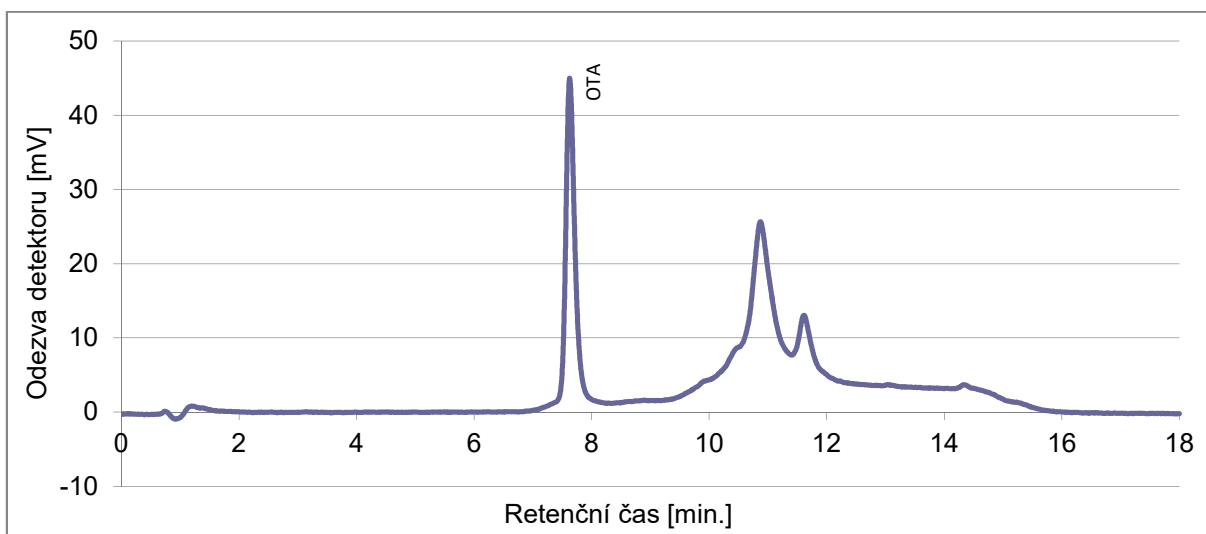
Grafy



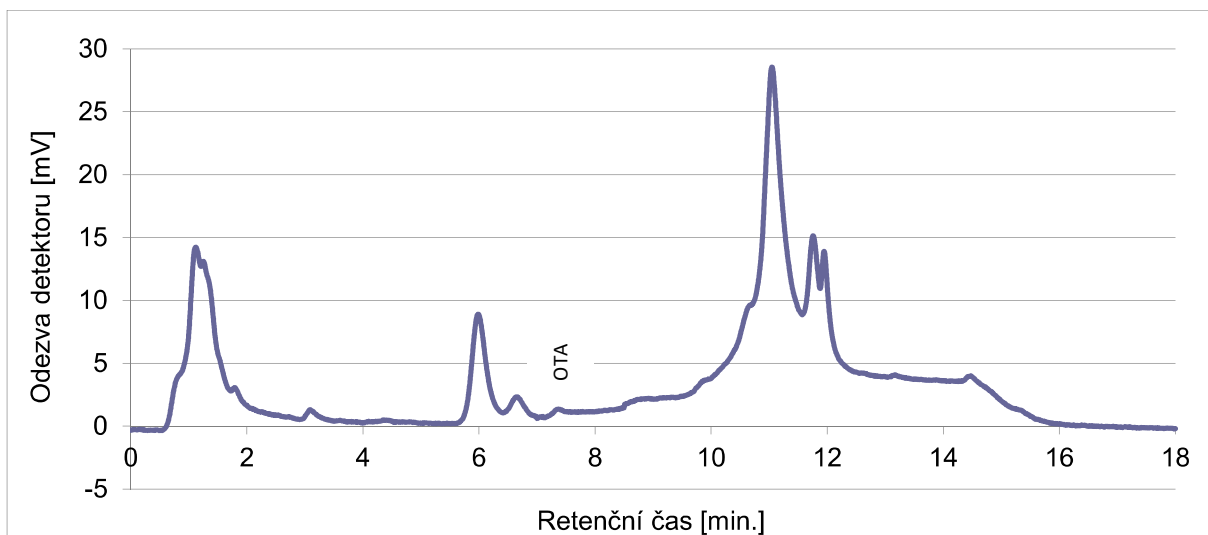
Graf. 11 Slepý vzorek (blank)



Graf. 12 Standard 0,4 ng/ml



Graf. 13 Standard 4 ng/ml



Graf. 14 Záznam pozitivního vzorku s dalšími píky - pravděpodobně metabolity