

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Stanovení mykotoxinů ochratoxinu A a citrininu ve
farmaceutických bylinách metodou ELISA

Bakalářská práce

Autor:	Marko Mečava
Studijní program:	B1501 - Biologie
Studijní obor:	BSP Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce:	RNDr. Jakub Toman, Ph.D.
Odborný konzultant:	

Hradec Králové

Červen 2021



Zadání bakalářské práce

Autor: Marko Mečava

Studium: S18BI074BP

Studijní program: B1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Název bakalářské práce: Stanovení mykotoxinů ochratoxinu A a citrininu ve farmaceutických bylinách metodou ELISA

Název bakalářské práce AJ: Determination of mycotoxins ochratoxin A and citrinin in pharmaceutical herbs by ELISA method

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Bylo zjištěno, že farmaceutické byliny často obsahují určitá množství mykotoxinů. Ačkoliv je toto již známým faktem, podrobněji však nebyla tato problematika zkoumána. Cílem práce je ELISA stanovení mykotoxinů ochratoxinu A a citrininu ve vzorcích farmaceutických bylin běžně dostupných na trhu v ČR.

Martin Weidenbörner: Mycotoxins in Foodstuffs, Springer Science & Business Media, 2007, ISBN 0387736891}

Ostry, V., Malir, F., Ruprich, J. (2013). Producers and Important Dietary Sources of Ochratoxin A and Citrinin. *Toxins*, 5 (9), 1574-1586 (DOI 10.3390/toxins5091574)

Malíř, F., Ostrý, V. a kol. (2003). Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů: Brno, 349, ISBN 80-7013-395-3.

Garantující pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Jakub Toman, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 23.1.2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedl všechny prameny, ze kterých jsem vycházel.

V Hradci Králové dne 18.7. 2021

.....
Marko Mečava

Poděkování

Velice děkuji vedoucímu práce, kterým byl RNDr. Jakub Toman, za jeho čas, vstřícnost, ochotu a milý přístup. Pan doktor Toman byl při dohledu a vedení mojí práce velmi profesionální. Dále chci poděkovat Mgr. Darině Pickové, která mi byla společně s panem Tomanem mnohokrát nápomocna při práci v laboratoři. V neposlední řadě chci poděkovat určitým členům mé rodiny, kteří mě všemi možnými způsoby podporovali a vedli ke vzdělání.

Anotace

MEČAVA, M. Stanovení mykotoxinů ochratoxinu A a citrininu ve farmaceutických bylinách metodou ELISA. Hradec Králové, 2021. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Jakub Toman, Ph.D. 65 s.

Cílem bakalářské práce je provést stanovení mykotoxinů ochratoxinu A a citrininu ve vybraných farmaceutických bylinách. Stanovení mykotoxinů ochratoxinu A a citrininu bude probíhat na vybraných, běžně dostupných a volně prodejných farmaceutických bylinách, určených převážně k přípravě odvarů a medicínálních čajů. Metodou pro testování a stanovení mykotoxinů v jednotlivých vzorcích byla zvolena metoda ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay), jež je založena na specifické interakci daného a určitého antigenu s protilátkou.

Klíčová slova: mykotoxiny, ochratoxin A, citrinin, ELISA, farmaceutické byliny

Annotation

MEČAVA, M. Determination of mycotoxins ochratoxin A and citrinin in pharmaceutical herbs using ELISA method. Hradec Králové, 2021. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis supervisor RNDr. Jakub Toman, Ph.D. 65 s.

The aim of this bachelor thesis is to determine mycotoxins ochratoxin A and citrinin in chosen pharmaceutical herbs. Determination of mycotoxins ochratoxin A and citrinin will be made on selected, commonly available and over-the-counter pharmaceutical herbs that are primarily intended for the preparation of decoctions and medicinal teas. ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) was selected as the main method for determination of mycotoxins. This method is based on a specific interaction of a given antigen with its antibody.

Key words: Mycotoxins, ochratoxin A, citrinin, ELISA, OTA, CIT

Obsah

Úvod	9
1 Teoretická část.....	10
1.1 Mykotoxiny.....	10
1.2 Systematika mikromycet	11
1.3 Morfologie mikromycetes a fungální buňky.....	12
1.4 Rozmnožování a životní cyklus mikromycet.....	14
1.4.1 Vegetativní spory	15
1.4.2 Pohlavní spory.....	15
1.5 Ochratoxin A (OTA).....	16
1.6 Citrinin (CIT).....	20
1.7 Metabolismus a toxokinetika CIT	22
1.8 Metabolismus a toxokinetika OTA	24
1.9 Toxicita při společné expozici CIT a OTA.....	27
1.10 Hygienické limity OTA a CIT	29
2 Praktická část	31
2.1 Chemikálie, spotřební a laboratorní materiál, přístroje	31
2.1.1 Použité chemikálie.....	31
2.1.2 Použité roztoky	31
2.1.3 Spotřební materiál.....	31
2.1.4 Přístroje a zařízení.....	32
2.1.5 Použité programy a software	34
2.1.6 RIDASCREEN®FAST Citrinin <i>In vitro</i> Test.....	34
2.1.7 RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 <i>In vitro</i> Test.....	35
2.2 Úprava a homogenizace vzorků	35
2.3 Metodika stanovení OTA (ochratoxinu A).....	37
2.3.1 Stručné, obecné informace k testu RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15	37
2.3.2 Princip testu RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15	38
2.3.3 Příprava vzorků pro test RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15	39
2.3.4 Protokol, testovací postup RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15.....	40
2.4 Metodika stanovení CIT (citrininu)	41

2.4.1	Stručné, obecné informace k testu RIDASCREEN®FAST Citrinin	41
2.4.2	Princip testu RIDASCREEN®FAST Citrinin.....	41
2.4.3	Příprava vzorků pro test RIDASCREEN®FAST Citrinin.....	42
2.4.4	Protokol, testovací postup RIDASCREEN®FAST Citrinin	43
3	Výsledky	45
3.1	Stanovení OTA.....	45
3.2	Stanovení CIT.....	48
4	Diskuze.....	52
	Závěr.....	55
	Seznam použitých zkratk.....	56
	Seznam zdrojů a literatura	57

Úvod

Farmaceutické, léčivé a medicínální byliny v sušené podobě určené k přípravě medicínálních a farmaceutických čajů jsou častými doplňky a užívanými prostředky při léčbě nemoci. Jsou hojně využívány k podpoře léčby, či jsou používány jako způsob prevence před různými typy onemocnění a pro podporu imunitního systému. Užívání těchto čajů a odvarů se v České republice těší poměrně velké oblíbenosti a tradici, a to obzvláště u starších generací.

Z dostupné literatury je však patrné, že byliny užívané k výrobě těchto volně prodejných a dostupných surovin pro výrobu bylinných čajů mohou být kontaminovány mykotoxiny, jež jsou produkovány mikromicety, při nevhodných podmínkách během pěstování. Mykotoxiny je souhrnné označení pro sekundární metabolity mikromicetů, vláknitých mikroskopických hub. Dalším problémem může být sekundární kontaminace těchto surovin, určených k výrobě bylinných čajů, různými mykotoxiny. K sekundární kontaminaci může dojít nevhodným a nesprávným uskladněním v domácnosti, nebo ve skladech. Během posledních let je problematika mykotoxinů stále častěji řešena a zmiňována s ohledem na lidské zdraví, jelikož se ukazuje, že mykotoxiny mohou být přítomny v širokém spektru výrobků, které člověk běžně na denní bázi konzumuje. Negativní účinky mykotoxinů na lidské zdraví byly mnohokrát prokázány, a to i včetně schopnosti bioakumulace v organismu. Zvýšená konzumace kontaminovaných farmaceutických bylin by tak mohla značně přispět k expozici a příjmu různého spektra mykotoxinů a převážit pozitivní účinky, kvůli kterým jsou tyto volně dostupné a prodávané byliny užívány v první řadě, svými negativními účinky na lidské zdraví, a dokonce zhoršovat celkové zdraví konzumenta.

Cílem této bakalářské práce je poukázat na problematiku mykotoxinů ochratoxinu A a citrininu a dále stanovit množství ochratoxinu A a citrininu v 60 vzorcích farmaceutických bylin volně dostupných a běžně prodávaných na trhu v České republice, které jsou převážně používány jako surovina pro přípravu bylinných čajů a odvarů. Stanovení výše zmíněných mykotoxinů bude probíhat metodou ELISA.

1 Teoretická část

1.1 Mykotoxiny

Malíř a Ostrý [1] definují mykotoxiny jako sekundární metabolity mikromycetů, jedná se o toxické a často karcinogenní chemické sloučeniny, které patří mezi nejvýznamnější přírodní toxiny a první užití pojmu mykotoxin připisují Forgaczovi a Carllovi v roce 1955. Pojem mykotoxin má původ v řeckém slově „*mycos*“, označující houbu a latinském „*toxicum*“, překládáno jako jed. K dnešnímu datu je světu a odborné veřejnosti známo více než 400 mykotoxinů [2]. Z toho v lidském okolí se ve významných množstvích vyskytuje přibližně 20 mykotoxinů, které mohou mít negativní, klinický dopad na lidské zdraví [1].

Obecně jako mykotoxiny označujeme pouze toxiny, sekundární metabolity, produkované pouze vláknitými mikroskopickými houbami (*Micromycetes*), takzvanými plísněmi. Plísně mohou zasahovat významným způsobem, kromě produkce mykotoxinů, do života lidí i tím, že mohou napadat živou tkáň a tvořit mykózy, či vyvolávat hyperaktivní, hypersensitivní imunitní odpověď organismu, alergie na nejrůznější chemické látky, které produkují. Zatímco toxiny makroskopických hub (*Macromycetes*) prakticky ovlivňují zdraví člověka pouze při záměně v rámci jejich sběru, toxiny mikroskopických hub jsou důležitým kontaminantem potravin, nápojů a krmiv [3]. U *Micromycetes* hraje i významnou roli vlastnost bioakumulace v potravním řetězci, s člověkem jako konečným konzumentem. Při překročení určité prahové hranice působí tyto toxiny na organismus zhoubně a negativními vlivy, jež souhrnně označujeme mykotoxikózou. Většina mykotoxinů má relativně nízkou akutní toxicitu, ale o to významnější je jejich toxicita chronická, projevující se karcinogenitou, teratogenitou, genotoxicitou nebo estrogenní či imunosupresivní aktivitou [4].

Mykotoxiny jsou strukturně odlišné komplexní organické sloučeniny o relativně nízké molekulové hmotnosti (až na výjimky nižší než 700 g/mol), jsou též nebílkovinné povahy, toxické pro člověka a živé organismy [1]. Nejvýznamnějšími producenty mykotoxinů jsou rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* a dále například rod *Alternaria*. Nejvýznamnějšími mykotoxiny produkoványi rody výše

zmíněnými jsou aflatoxiny, produkované především rodem *Aspergillus*, ochratoxiny, které produkuje v největší míře rod *Aspergillus* a *Penicillium*, fumonisiny, trichotheceny, jež jsou produkovány rodem *Fusarium*, citrinin a sterigmatocystin, jež jsou produkovány několika druhy plísní rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Monascus* a mnoho dalších.

Mykotoxiny jako takové jsou pro vláknité mikromycety velmi významné z hlediska jejich ekologie. Patrně hlavním důvodem produkce mykotoxinů je poskytnutí kompetiční výhody oproti ostatním druhům a rodům, při kompetici o potravu, zdroje a pro lepší konkurenceschopnost a uplatnění jedince.

1.2 Systematika mikromycet

Mikromycety jakožto mnohobuněčné, eukaryotické organismy spadají do samostatné říše zvané houby (*Fungi*). Do této říše spadají společně houby, plísně, kvasinky, kvasinkové mikroorganismy a mikroskopické houby. Mikromycety, co se způsobu výživy týče, jsou saprofytické, heterotrofní a parazitické mikroorganismy. Říše houby, *Fungi* jsou fylogeneticky velmi staré organismy, které se vyvinuly před více než jednou miliardou let jako výsledek terminální radiace tří velkých skupin eukaryotů spolu s prvními živočichy a rostlinami, a ačkoliv historicky byly houby v těsném „sousedství“ rostlin, analýza sekvence aminokyselin řady enzymů naznačila, že první se ze společného předchůdce těchto tří skupin eukaryotických organismů oddělily rostliny a z fylogenetického hlediska mají tedy houby blíže k živočichům než rostlinám [1].

Současná klasifikace a taxonomické členění rozděluje říši *Fungi* na čtyři oddělení *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* a *Zygomycota* a pak je zde problematická skupina s neustáleným systémem zvaná *Fungi imperfecti*, mitosporické houby či nedokonalé houby nebo *Deuteromycetes*, *Deuteromycota*.

Doposud bylo validně popsáno asi 80 000 druhů hub řazených do více než 6000 rodů. Každý rok je nově zaregistrováno asi 1700 druhů hub. Kvalifikované odhady předpokládají existenci alespoň 500 tisíc, některé až 1,5 miliónu druhů hub.

V potravinách bylo popsáno na základě současných poznatků 114 druhů vláknitých mikromycetů a 12 druhů kvasinek [1].

Zcela jedinečně se zde vyskytuje určitá nomenklatura houbových organismů. Pro řadu hub, včetně většiny patogenních zástupců, je charakteristický výskyt ve dvou formách, které jsou označovány jako anamorfa a teleomorfa [1]. Anamorfa je nepohlavní stádium, které se rozmnožuje pomocí asexuálních spór, které vznikají na základě mitotického dělení – odtud jsou některými autory takové houby nazývány mitosporické a teleomorfa je sexuální stádium, u kterého předchází vzniku pohlavních spór meióza, a proto jsou nazývány houby meiosporické [1]. Dohromady, tvoří tyto dvě stádia, kde se vyskytuje teleomorfa a jedna nebo více jí odpovídajících anamorf, celek a houba je označována jako holomorfa, jedinečné je i to, že každé stádium má vlastní binomické latinské jméno (tzv. duální nomenklatura) [1].

Starší systémy řadily anamorfní stádia do umělého, pomocného taxonu *Fungi Imperfecti* (*Deuteromycota*, *Deteromycetes*), dnes je tato koncepce zastaralá a takové houby jsou označovány jako mitosporické (cytologické hledisko) nebo deuteromycety s malým „d“ (převládá morfologické hledisko) [1].

1.3 Morfologie mikromycetes a fungální buňky

Pomocná skupina *Deuteromycetes*, *Deuteromycotina*, *Fungi imperfecti*, tj. houby nedokonalé, je dělena z praktického hlediska na vláknité mikroskopické houby (mikromycety), kvasinky a kvasinkové (yeast like) mikroorganismy [5]. Tyto fungální organismy mají morfologickou stavbu podobnou *Ascomycotina*, tedy mají přehrádkované mycelium, avšak pouze s nepohlavním rozmnožováním přes exospory [6].

Mikroskopické houby se optimálně přizpůsobily rozmanitým podmínkám životního prostředí a spolu s bakteriemi zastávají v jednotlivých ekosystémech roli destruentů látek organického původu a významně se podílejí na zajištění koloběhu biogenních prvků a látek a toku energie [1]. Tvoří i nepostradatelnou složku půdního edafonu.

Základem těla mikromycetů je vegetativní vláknitý útvar zvaný stélka, *thallus*. Houbové vlákno mikroskopické houby označujeme pojmem hyfa [5]. Základní stavební jednotkou stélky, je tedy duté vlákno nazývané hyfa, která může být opatřena přehrádkou, septem (například u *Ascomycota* a mitosporické houby) nebo je coenocytická, bez přehrádek (typické pro spájkivé houby – *Zygomycota*) [1]. Hyfy jsou tedy coenocytické, s mnohojaderným protoplastem, který není rozlišen v jednotlivé buňky, u zástupců třídy *Zygomycetes*. Pro úplnost a objasnění, hyfy mohou být tedy i morfologicky odlišné a příčně rozděleny. Tento typ hyf se septy se vyskytuje u zástupců tříd *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* a *Deuteromycetes* [1, 5]. Soubor hyf se nazývá mycelium a spleť rozvětvených hyf tvoří kolonii [5]. Zbarvení povrchu a spodiny kolonie může být značně variabilní a je působeno určitými, pro danou mikroskopickou houbu charakteristickými pigmenty, které zbarvují povrchovou membránu a spory, tyto pigmenty mohou i difundovat do prostředí či do okolí živné půdy [5].

U mikroskopických hub se vyskytuje jev zvaný dimorfismus. Například rod *Mucor* se za přístupu vzduchu vyskytuje ve formě vláknité a při zvýšené koncentraci CO₂ a při zaplynování CO₂ přechází do formy kvasinkové [5]. Kvasinková forma je typická pro patogenní mikroskopické houby [5]. U mikromycetů se také vykytuje další forma polymorfismu, již výše zmíněna, kdy se podle způsobu rozmnožování rozlišuje u mikroskopických hub několik forem, a to forma pohlavní, označovaná jako teleomorfa a anamorfa, jenž je formou nepohlavní a každá forma má svůj název [1, 5].

Houby jsou stejně jako všichni živočichové a převážná část prvoků a bakterií chemoheterotrofní organismy, a tedy jejich metabolismus je uzpůsoben k získávání energie a převážné části stavebního materiálu z látek organického původu [1]. Houby nemají žádný specializovaný aparát nebo strukturu k přijímání živin. Příjem živin probíhá čistě formou osmózy, jsou tedy osmotrofní a životně důležité látky přijímají ze svého okolí pomocí absorpce. Jelikož jsou houby aerobní a heterotrofní, eukaryotické organismy, potřebují pro výživu organické látky, které rozkládají pomocí enzymatického štěpení komplexnějších látek, mezi které patří například

proteiny, keratin, celulóza a jiné sacharidy a tyto štěpené části jsou transportovány buněčnou membránou do intracelulárního prostoru a dovnitř buňky [7].

Vedle primárního metabolismu je pro houby charakteristická tvorba anebo exkrece velkého a různorodého počtu látek, jejichž funkce není vždy zřejmá a jež shrnujeme do pojmu sekundární metabolismus. Z pohledu lidského zdraví jsou nejvýznamnější produkty sekundárního metabolismu mykotoxiny [1].

Mikromycety, vláknité mikroskopické houby neboli plísňe tvoří tedy vláknitá mycelia, což je shluk charakteristických vláken a tato vlákna neboli hyfy jsou rozdělena jednotlivými a typickými septy. Vlákna mohou být tvořena větším počtem jader, nebo jsou tvořena jednou buňkou rostoucí prodlužováním vlákna [7].

Jak již bylo napsáno výše většina hub je aerobních, respektive dává přednost a lépe roste v aerobním prostředí. Část hub může růst i za anaerobních podmínek (fakultativní anaeroby). Schopnost fermentace je vlastní a typická zejména pro kvasinky a člověk této jejich vlastnosti od pradávna využívá k výrobě a přípravě řady nápojů a potravin (alkoholové kvašení) [1].

V buňce zástupce říše *Fungi* je jedno nebo více jader, jež jsou převážně a většinou haploidní povahy, která se však pro pozorování světelným mikroskopem musí speciálně barvit, aby byla patrná. Cytoplasma buněk obsahuje endoplazmatické retikulum, mitochondrie, jednu až dvě vakuoly, zásobní zrníčka polyfosfátů a můžeme pozorovat v cytoplasmě i kapičky tuku [6]. Buněčná stěna u *Fungi* je tvořena cytoplazmatickou membránou, obsahujíc ergosterol a hlavními složkami jsou chitin a β -glukany [1, 5, 7].

1.4 Rozmnožování a životní cyklus mikromycet

Mikroskopické houby se rozmnožují jednak vegetativně růstem samotných hyf, jednak spory. Spory mohou vznikat buďto způsobem vegetativním, což je nepohlavní cestou a označujeme tyto spory jako vegetativní, nebo po spájení. Spájení je pohlavní způsob rozmnožování a dává vzniknout sporám, které označujeme jako pohlavní spory [5, 6].

1.4.1 Vegetativní spory

Vegetativní spory se tvoří buď na vegetativních hyfách, nebo na zvláštních fruktifikačních orgánech. Spory umístěné vně orgánů nazýváme exospory, konidie, zatímco spory nacházející se uvnitř orgánů označujeme jako endospory. Exospory dílčích rodů jsou pro ně zcela charakteristické a od sebe morfologicky odlišné. Spory mohou být tvaru kulovitěho, elipsoidního, válcovitěho, vřetenovitěho a další, zároveň mohou být jednobuněčné nebo tvořeny více buňkami. Jednobuněčné spory jsou někdy označovány jako mikrokonidie a vícebuněčné jako makrokonidie [6].

Jestliže je hyfa nesoucí konidie morfologicky výrazně a zřetelně odlišena od ostatních hyf, nazývá se konidiofor. Konidioforů se vyskytuje mnoho typů, většinou charakteristických pro dané rody [6].

U některých rodů se kolem jednotlivých buněk mycelia může vytvořit velmi silný obal, přičemž obsah buňky se zahustí a vytváří se tak chlamydospora. Chlamydospora je odolná proti nepříznivým podmínkám díky řadě mechanismů a snížení metabolismu, čímž umožňuje přečkat nepříznivé podmínky a přežít je bez fatálních následků [6].

Endospory vznikající ve vakovitěm útvaru zvaněm sporangium nazýváme sporangiofory. Sporangium je umístěno na jednoduchém, či větveněm sporangioforu. Část sporangioforu zasahující do kulovitěho sporangia nenazývá kolumela. Některé rody však kolumelu nemají. U některých zástupců určitých rodů je sporangium doprovázeno nebo nahrazeno drobnými a četnými sporangiolami, jež obsahuje uvnitř 1 až 10 spor, endospor přesněji [6].

1.4.2 Pohlavní spory

Pohlavní spora vzniká po spájení dvou buněk. U mikromycet se vyskytují dva typy pohlavního spájení. Hemothalické, kdy dochází ke spájení buněk vyrůstajících z téže samé hyfy. Většina mikromycet je ale heterothalických, tudíž každý druh obsahuje kmeny pohlavního typu, vlákna pohlavního ladění (+) a vlákna, kmeny

opačného typu, ladění (-). Při spájení, splývání vláken, pomocí dotyku a splnutí výběžku obou hyf, odborně výběžky označujeme jako progametangia a po spájení buněk, gametangií, jež se oddělily na konci obou progametangií, vzniká zygota a poté zygospora [5, 6]. Jestliže progametangia byla zhruba stejně velká, hovoříme o izogamním spájení, v opačném případě, kdy jsou progametangia různě velká, hovoříme o heterogamním spájení [6]. Při klíčení zygospory dochází k meióze, při níž 3 haploidní jádra zaniknou a čtvrté se dělí mitózou. Ze zygosporického útvaru následně vzniká a postupně roste sporangiofor se sporangiem, zvaný zygosporangium. V zygosporangiu jsou uloženy haploidní endospory jednoho pohlavního typu. Zygospory se vyskytují pouze u třídy *Zygomycetes* [6].

Askospory se tvoří většinou po osmi ve vřecku (asku) a vznikají z dvoujaderných hyf, jež jsou buď volné, nebo jsou uloženy ve fruktifikačních orgánech. Uzavřený fruktifikační orgán kulovitěho tvaru s neuspořádanými asky se nazývá kleistothecium, kulovitý až lahvovitý útvar s otvorem se označuje jako peritecium [6]. Před tvorbou askospor dochází ve dvoujaderné buňce ke karyogamii za vzniku diploidního jádra, jež se poté dělí mitózou, čímž se vytvoří základ pro osm askospor v asku [5, 6]. Takto rozmnožování probíhá u *Ascomycetes* [5]. U *Basidiomycetes* vzniká basidium se 4 basidiospórami [5].

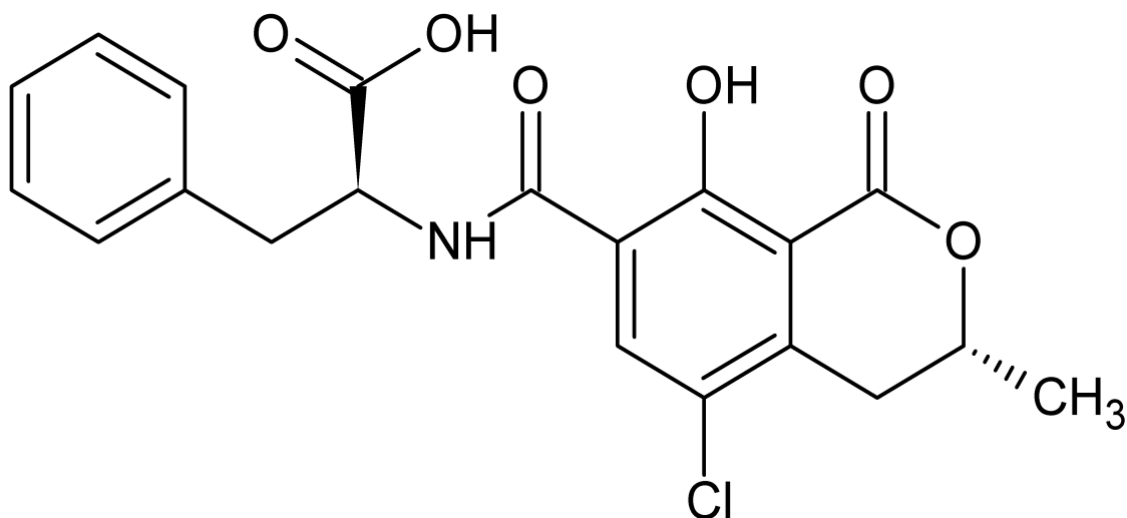
1.5 Ochratoxin A (OTA)

Ochratoxiny jsou produkovány hlavně plísněmi rodu *Aspergillus* a *Penicillium* v závislosti na teplotě a vlhkosti. Dominantní význam ve skupině ochratoxinů zaujímá především ochratoxin A, přesně se jedná o 3-metyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydroizokumarin vázaný peptidickou vazbou na molekulu L- β -fenylalaninu (8). Ochratoxin A, dále OTA, se může vyskytovat v řadě komodit rostlinného i živočišného původu [1, 9].

OTA byl objeven a chemicky charakterizován při testování toxinogenity kmenů vláknitých mikroskopických hub *Aspergillus ochraceus* v Jihoafrické republice v roce 1965. Patří do skupiny ochratoxinů, kam ještě řadíme další ochratoxiny (B, C, D a α). V této skupině je OTA dominantní. Z hlediska způsobu biosyntézy patří OTA mezi pentaketidy. Lze ho obecně charakterizovat jako derivát

7 izokumarinu vázaný na aminoskupinu L-β-fenylalaninu, což je patrné z uvedeného vzorce viz. výše [1, 9].

Jedná se bezbarvou krystalickou látkou se sumárním vzorcem $C_{20}H_{18}O_6NCl$. OTA je dobře rozpustný v organických polárních rozpouštědlech a velmi málo rozpustný ve vodě a taje při 169 °C [10].



Obrázek 1 Strukturální (konstituční) vzorec OTA (Mečava 2021, za využití ChemSketch)

V dnešní době považujeme jako hlavní zdroje OTA, kterými může být člověk vystaven a OTA přijímat do organismu: cereálie, cereální produkty, vepřové maso, krev a vnitřnosti (játra, ledviny, srdíčka), dále káva, pivo, luštěniny a koření. Mezi jeho další zdroje patří i sušené ovoce, jako např. fíky, hrozinky, a také grepová šťáva a červené víno [1, 9].

Je zajímavé, že v případě kávy je množství OTA, které končí v nápoji jako finálním produktu a je mu člověk, který nápoj konzumuje, vystaven, závislé na způsobu přípravy kávy a také na času, po jaký je káva extrahována. Záleží však na mnoha dalších faktorech jako je typ přípravy, druh kávových zrn. Nejvyšší přenos OTA do konečné podoby nápoje (66,1 %) se vyskytoval při přípravě „falešné turecké kávy“, v česku často označovaná lidově jako „turek“. Nejnižší přenos OTA (22,3 %) a nejnižší hodnoty v nápoji se týkaly italského způsobu přípravy, Ristretta. Zde u Ristretta hraje roli krátká doba extrakce i nízké standardní množství nápoje co se

objemu týče, jenž je standardizováno na 20 ml. Podobný přenos OTA se týká i čajů [11].

Stejně je tomu i tak v případě černého čaje, kde může být značné množství OTA předáno do černého čajového nápoje. A jak opět je uváděno ve studii, čím delší proces extrakce a kontakt horké, vařící vody s čajem, tím vyšší hodnoty OTA se do konečné formy nápoje uvolní. Dle studie není množství OTA přijímané skrz čajový nápoj zanedbatelné a skutečný přenos OTA z černého čaje, připraveného tradiční tureckou metodou, dosahoval v některých případech až $41.5 \% \pm 7.0 \%$ [11, 12].

Přívod OTA probíhá majoritně alimentární cestou. Zpracováván je dále v játrech a je vylučován ledvinami. Detekovatelný je určitými metodami v krevním séru a v některých případech také v moči, a to i u zdravých osob [8].

Poločas vylučování OTA činí u člověka zhruba 35,5 dne [13]. Výzkumy ukazují, že se OTA v těle člověka chová jako bioakumulativní jed s rychlou absorpcí a pomalu se z těla vylučuje [14]. OTA je distribuován v organismu krevní cestou, v krvi je velmi silně vázán hlavně na plazmatické proteiny, a to až z 95 %, zvláště dobře se pak váže na albumin, což je protein krevní plazmy, tvořící až 60 % všech plazmatických bílkovin v krevní plazmě. Hlavními místy retence, zadržení jsou ledviny, játra, varlata, střevo, pak svaly a tuková tkáň pak tvoří rezervoár [1, 13, 15]. Akutní i chronická toxicita OTA je odvozena od jeho schopnosti inhibovat syntézu proteinů na základě kompetice s fenylalaninem v reakcích katalyzovaných fenylalanin-t RNA syntázou. Toxický účinek OTA může být vázán i na buněčné oxidativní působení, kde oxiduje a poškozuje DNA. OTA způsobuje inhibici mitochondriální respirace, poškozuje a má negativní vliv na mitochondriální funkce a tvorbu ATP [16, 17]. Při studiu mechanismů účinku OTA bylo dále prokázáno zvýšení peroxidace lipidů, poškození metabolismu cukrů a vápníku. Mezi hlavní toxické účinky OTA dále patří nefrotoxicita, imunotoxicita, genotoxicita, karcinogenita, teratogenita a neurotoxicita [1, 13, 15].

Ze souhrnu experimentálních prací o nefrotoxicitě OTA *in vitro* a také *in vivo* vyplývá, že OTA narušuje intracelulární metabolické pochody (zmíněno výše) s

následnou apoptózou renálních buněk, renální hemodynamiku, významně a snad i dominantně funkce proximálního tubulu, a to i při subchronické expozici a vede k poklesu glomerulární filtrace a tubulární resorpce a ovlivňuje všechny části nefronu a ledviny „in toto“ [2, 6].

Logicky vzhledem k těmto závěrům bylo prokázáno, že rizikovou skupinu představují zejména nemocní s chronickou renální insuficiencí (CHRI), kdy dochází ke kumulaci celé řady látek z potravinového řetězce [9, 13].

Dále byl OTA navržen jako jeden z hlavních činitelů a hlavních faktorů při snížení antioxidačních mechanismů ochrany, které mají za úkol chránit nenasycené membránové lipidy, nukleové kyseliny, enzymy a další buněčné struktury před volnými radikály, volnými kyslíkovými radikály, a tedy podpoření a zvýšení oxidativního stresu na buňky [18].

OTA je dále charakterizován jako možný karcinogen pro člověka (skupina 2B) dle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny při Světové zdravotní organizaci (IARC/WHO) se sídlem v Lyonu. Byl u OTA pozorován i lehký mutagenní účinek, zřejmě právě díky působení oxidativního stresu a působení oxidativního poškození DNA, jež bylo zmíněno již výše [17]. Také testování na laboratorních myších, ukázalo mírné zvýšení počtu a nárůst ledvinových adenomů a karcinomů, při ústním podávání OTA a dále se projeví karcinogenní účinky v dalších studiích na hlodavcích [19, 20, 21]. U lidí však chybí dostatek histologických dat a všechny mechanismy účinku OTA nejsou stále objasněny [21]. Genotoxicita a karcinogenita OTA může být značně navýšena a stoupá i při společném vystavení s citrininem, fumonisinem a při společnému vystavení těmto látkám rizika značně stoupají [21].

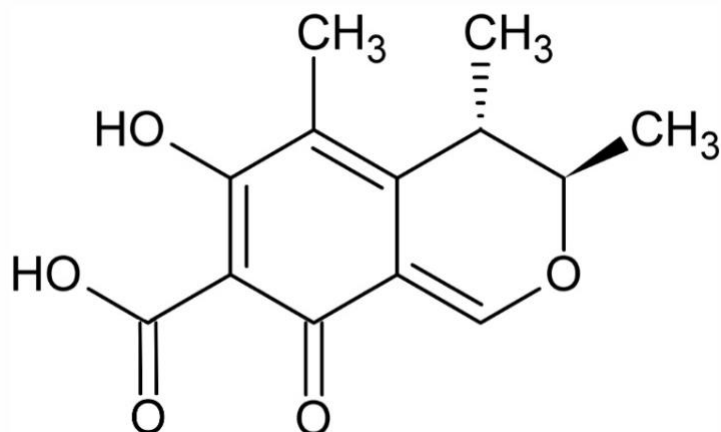
Z hlediska neurotoxicky může OTA přispět ke zhoršení stavu Alzheimerovy choroby (AD), Parkinsonovy choroby dále PD, díky vysoké afinitě, vázání na centra v mozku jako cerebellum (mozeček) s Purkyněho buňkami, ventrální mesencephalon, hippocampus. Vše je podpořeno i akutní deplecí dopaminu v mozku. Také vyvíjející se mozek plodu může být v prenatálním období náchylný

na OTA a je nutná tedy obezřetnost a snížení vystavení OTA na co nejnižší možné hodnoty [21, 22, 23, 24].

Mezi profesionální, vědeckou komunitou, je shoda, že OTA je jeden z pěti nejvíce zemědělsky významných mykotoxinů, a proto musí být studiu ochratoxinů a zvláště OTA věnována pokračující pozornost, sledování a výzkum, za účelem objasnění jejich metabolismu, genotoxicity a mechanismů karcinogenity a akce, co se renální karcinogenity týče, s cílem chránit veřejné zdraví a předcházet značným ekonomickým ztrátám [21].

1.6 Citrinin (CIT)

Název je odvozen od jeho žluté barvy [25]. Citrinin, dále CIT, je nefrotoxický mykotoxin produkovaný několika rody, a to hlavně *Aspergillus*, *Penicillium* a *Monascus*. Poprvé byl CIT izolován a určen Hetheringtonem a Raistrickem z nažloutlé kultury *Penicillium citrinum* v roce 1931 [26, 27]. CIT je nízkomolekulární sloučenina s nízkou molekulovou hmotností a sumárním vzorcem $C_{13}H_{14}O_5$, která má bod tání při 172 °C. Je rozpustný ve zředěném NaOH, Na_2CO_3 , methanolu (CH_3OH), ethanolu (C_2H_5OH) a dalších polárních rozpouštědlech [10]. CIT se vyskytuje v různých rostlinných produktech, zvláště v obilovinách ale také v luštěninách, ovoci, sušeném ovoci, zelenině, bylinách a koření. Často se vyskytuje společně a je nalézán společně s OTA, jelikož jsou produkovány stejnými rody a druhy [28, 29, 30, 31, 32, 33]. Nefrotoxicita OTA může být značně navýšena a stoupá při společném výskytu s CIT, fumonisinem a při společnému vystavení těmto látkám rizika značně stoupají [21]. Níže, na další straně je uveden chemický strukturní, konstituční vzorec CIT.



Obrázek 2 Strukturní (konstituční) vzorec CIT (Mečava, 2021, za využití ChemSketch)

CIT se obecně formuje a uvolňuje po sklizení a objevuje se hlavně ve skladovaných zrnech, obilovinách, objevuje se však i v dalších rostlinných produktech. Často, jak je již psáno výše, je pozorován výskyt s dalšími mykotoxiny, hlavně pak s OTA, který je s CIT obvykle spojován s Balkánskou endemickou nefropatií, zkráceně BEN [28]. BEN je choroba rozšířená v oblastech zemí bývalé Jugoslávie. Onemocnění je charakterizované progresivním zánětem tkání ledvin, omezení funkce glomerulů, tubulární resorpce, filtrace a nefronu jako takového. Zánět postupně vede až k totálnímu selhání ledvin. Proces je nevratný a v pokročilém stádiu je možné jej řešit pouze resekci, případně následnou dialýzou, či transplantací orgánu. CIT společně s OTA jsou suspektní jako jedna z hlavních příčin tohoto onemocnění. Tyto mykotoxiny narušují intracelulární metabolické pochody (zmíněno výše) s následnou apoptózou renálních buněk, renální hemodynamiku, významně a snad i dominantně funkce proximálního tubulu, a to i při subchronické expozici a vede k poklesu glomerulární filtrace a tubulární resorpce a ovlivňuje všechny části nefronu a ledviny „in toto“ [9, 13]. Logicky vzhledem k těmto závěrům bylo prokázáno, že rizikovou skupinu představují zejména nemocní s chronickou renální insuficiencí (CHRI), kdy dochází ke kumulaci celé řady látek z potravinového řetězce [9, 13].

Ačkoliv jsou CIT a OTA považovány za původce a schopné látky vyvolat BEN, některé výzkumy ukazují a spojují BEN s expozicí fytotoxinu kyselině aristolochové (AA, aristocholic acid), fytotoxin produkováný rostlinou *Aristolochia clematitis*. Ačkoliv jsou tedy studie, které pojí BEN s AA a vystavením fytotoxinu AA a

srovnávají ji s Čínskou bylinnou nefropatií (CHN), nemůžeme opomenout řadu studií, které ukazují na spojení mezi CIT a OTA a BEN a podporují CIT a OTA jako látky s velkým vlivem na výskyt, či původce BEN [28, 30, 34, 35, 36, 37].

Nefrotoxicita CIT byla prokázána v mnoha různých na sobě nezávislých studiích, podáváním akutních smrtelných dávek tohoto mykotoxinu králíkům, prasatům, krysám a myším, což mělo za následek drastické natékání, otok ledvin, v rámci akutního zánětu s konečnou nekrózou ledvinné tkáně (38, 39, 40, 41, 42, 43). Zároveň Petkova-Bocharova potvrzuje ve své studii na krysách z roku 1991 výše zmíněné účinky a negativní působení CIT na ledviny, ale také výše zmíněné snížení schopnosti ledvin, nefronů, výskyt nádorů a negativní vliv na glomerulární filtraci primární moči, jak zmiňuje Malíř a Ostrý u lidí ve své studii (9, 13, 31). U studie Petkova-Bocharova byla nefropatie u krys charakterizována zvýšenou hladinou a sekrecí glukózy, bílkovin do moči (*glucosuria, proteinuria*), sníženou mírou a efektivitou glomerulární filtrace a omezení krevního toku v ledvinách u pozorovaných krys, které byly CIT vystaveny a byl jim podáván [31].

Kromě nefrotoxicity prokázané mnohými studiemi, je zde důkaz, podobně jako u OTA, že CIT indukuje značný oxidativní stres, který může vest až k apoptóze buněk, poškození buněčných struktur a samotné DNA a chromozomů [28, 31].

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny při Světové zdravotní organizaci (IARC/WHO) se sídlem v Lyonu charakterizuje CIT jako karcinogen skupiny číslo 3 a tudíž spadá pod definici „doposud není možné se vyslovit, pokud se týče karcinogenního účinku na člověka“ a zatím tedy není klasifikován jako karcinogen pro člověka. Důvodem jsou limitované důkazy ve studiích o jeho karcinogenně u zvířat a žádné důkazy ve formě studií, které by potvrzovaly karcinogenitu u lidí.

1.7 Metabolismus a toxokinetika CIT

Metabolismus CIT a jeho metabolická přeměna společně s jeho metabolickými drahami není dostatečně a plně objasněna. Literatura na toto téma je nedostačující a prameny objasňující, či shrnující toxokinetiku a metabolismus CIT se prakticky

nevyskytují. Z limitovaných studií na toto téma je známo a prokázáno několik základních skutečností a vlastností CIT [44, 45].

Hlavním metabolitem CIT je dihydrocitrinon (DH-CIT), který je detekován často v moči [44]. DH-CIT značně méně toxický než primární sloučenina CIT, kterého je metabolitem [45].

Současně je stále nejasné, který enzym se podílí na detoxifikační reakci. Není ani znám rozsah konverze CIT na DH-CIT, který se může lišit mezi jednotlivci a mezi jednotlivými živočišnými druhy [46].

Phillips, Berndt a Hayes ve své studii na laboratorních krysách za užití radioaktivně značeného ^{14}C -citrininu zjistili, že většina radioaktivního C, přesněji 74 %, byla vyloučena močí a další 4% vyloučena spolu s výkaly během 24 hodin od podání. Po 72 hodinách bylo zjištěno vyloučení 95 % radioaktivního C prostřednictvím moči a výkalů. Z celkového podaného množství bylo dle studie 80 % radioaktivně značeného CIT vyloučeno močí [47].

V další studii bylo po orální aplikaci CIT laboratorním krysám zjištěno, že se toxin rapidně absorbuje a nejvyšší hodnoty CIT v krevním séru byly pozorovány po 3 hodinách od podání a tato hladina úměrně a rychle klesala. To oproti OTA naznačuje rychlé a efektivní vylučování CIT organismem [48].

Nedávná studie zkoumající kinetiku CIT u lidí, oproti předchozí a výše uvedené studii zjistila, že značná část (okolo 40 %) přijaté dávky CIT byla vyloučena močí jako suma CIT a jeho metabolitu DH-CIT během prvního dne [49, 50].

V další studii, opět prováděné na laboratorních krysách, kde byly krysy vystaveny velmi vysokým dávkám CIT, přesněji radioaktivně značeného ^{14}C -citrininu, tvořil DH-CIT vyloučený v moči 14,7 %, zatímco nezměněný CIT tvořil hlavní formu, která byla z těla vylučována a po 24 hodinách bylo z těla formou moči vyloučeno 40 % podaného CIT v nezměněné formě. Dále byl v krvi odebrané po 24 hodinách CIT v nepozměněné formě jedinou sloučeninou související s CIT a nebyl identifikován žádný jeho jiný metabolit [44].

1.8 Metabolismus a toxokinetika OTA

Mnoho studií poukazuje na fakt, že OTA může být biotransformován nejen zvířaty, člověkem, ale i rostlinami, houbami, kvasinkami, a dokonce i určitými bakteriemi. *In vivo* je metabolická biotransformace OTA u zvířat a člověka slabá, ne příliš efektivní, a zároveň je eliminace OTA a jeho metabolitů z organismu pomalá. Tento fakt nese značný podíl a hraje důležitou roli při celkové toxicitě, karcinogenitě a specificitě, s kterou OTA a jeho metabolity působí na určité orgány a tkáně [51, 52].

Míra toxicity OTA je určena jeho toxikokinetickými a toxikodynamickými faktory, společně s metabolickými přeměnami a drahami OTA v organismu [53]. Je však nutné zmínit, že veškerá biochemie, metabolické přeměny, metabolické dráhy a toxokinetika s mechanismem působení OTA nebyly ještě úplně a zcela objasněny.

Po příjmu a po adsorbci v gastrointestinálním traktu přechází OTA do krve a váže se na sérové proteiny [54]. Množství adsorbovaného toxinu je závislé na živočišném druhu a liší se druh od druhu, u prasat činí asi 60 %, zatímco například u hlodavců je mnohem nižší [55, 56]. Nejvyšší orální biologická a systémová dostupnost se vyskytuje u člověka, pohybujíc se okolo 93 % [52, 57].

Jak bylo zmíněno výše, v oběhovém systému se drtivá většina OTA váže na sérovou bílkovinu albumin. Rozsah a schopnost se vázat na albumin determinuje poločas rozpadu OTA, vylučování v plasmě a jeho vylučování močí, přičemž v porovnání s dalšími druhy je poločas rozpadu OTA a jeho čas nutný k metabolizaci a odstranění nejdelší u člověka. Tato doba se u člověka pohybuje okolo jednoho měsíce [53].

Toxokinetika OTA je tedy silně ovlivněna schopností vazby k albuminu. Toto bylo potvrzeno studií, při které bylo u krys s deficiencí albuminu pozorována dvacetkrát až sedmdesátkrát rychlejší exkrece toxinu přes ledviny než u normálních krys. Případná zvýšená eliminace může tedy snížit chronické vystavení cílových buněk OTA a jeho metabolitů. Nejvíce jsou z toxického hlediska v drtivé většině ovlivněny buňky ledvinných tubulů a jaterní buňky. Vzhledem k tomu, že albumin je klíčový faktor v transportu OTA v organismu a je hlavním transportním proteinem

toxinu v oběhovém systému, je vylučování toxinu velmi složité a pomalé. Velkou roli hraje, že glomerulární filtrace a glomerulární exkrece je silně limitována, a to díky vazbě na albumin, který je jako sérová bílkovina částečně reabsorbován. Tento fakt značně pomáhá a podílí se na vyšší akumulaci OTA a jeho metabolitů v buňkách ledvinných tubulů [53].

Hlavní vazebné místo OTA je prakticky identické s vazebným místem warfarinu, který je tvořen též kumarinovou strukturou. Kumarinová kostra dodává OTA jeho vazebné a specifické možnosti. Tato isokumarinová část molekuly je při vazbě na proteiny lokalizovaná ve specifické nepolární části mezi určitými aminokyselinami [53].

Mezi hlavní molekulární struktury zodpovědné za aktivní buněčnou absorpci (uptake) OTA jsou ledvinné OATs (organic anion transporters), zatímco v játrech mají tuto funkci převážně OATPs (organic anion-transporting polypeptides). Tyto struktury jsou hlavními molekulárními strukturami zodpovědné za buněčnou adsorpci a příjem (uptake) OTA. Jak OATs tak i OATPs jsou membránové transportní proteiny, polypeptidy ze skupiny takzvaných solute carrier transporters. OATs bazolaterální membrány jsou zodpovědné převážně za příjem OTA z krevní cirkulace do buněk tubulů ledviny. Apikální OAT4 přenašeč může být zodpovědný a podílet se na reabsorpci OTA z primární moči, což vede k jeho akumulaci v buňkách ledvinných tubulů a toxickému působení [53, 58].

Samotná distribuce OTA ve tkáni se zdá být závislá na živočišném druhu a je specifická pro určité druhy. Distribuce je také značně ovlivněna mnoha faktory zahrnující množství toxinu, cestou vstupu, délkou expozice, složení běžné stravy a celkového zdravotního stavu. Vždy jsou však mezi hlavními cílovými tkáněmi ledviny a játra [51, 53].

OTA může v organismu vstoupit do několika metabolických drah a může být přeměněn na několik metabolitů. Tyto přeměny jsou specifické pro určité živočišné druhy a pro daný druh se vyskytují pouze některé, pro daný druh specifické, metabolické dráhy a metabolity. Po přehled může být OTA za využití peroxidáz a cytochromu P450 hydroxylován hned na několik metabolitů, z nichž u člověka byl

prokázán 4-(R)-hydroxyochratoxin A, který se vyskytuje i u krys. Hydrolyzou může proběhnout přeměna na metabolity OTB a OT α , které se vyskytují u lidí a většiny zvířat a z nich pak může probíhat metabolická přeměna na další sloučeniny. Dalším důležitým mechanismem přeměny je otevření laktonové struktury a kruhu. Zároveň může OTA tvořit konjugáty, a to převážně u hlodavců, či podléhat přeměně na OTC. Přeměna mezi OTA a OTC probíhá hlavně u přežvýkavců [51, 59].

Většina metabolitů a produktů metabolizace OTA vykazují v těle žádnou, nízkou míru nebo znatelně nižší míru toxicity, než původní OTA [53].

OTA může být enzymaticky hydrolyzován pomocí karboxypeptidázy A, chymotripsinu a dalších proteolytických enzymů na méně toxický OT α . Tato enzymatická hydrolyz probíhá ve střevech za účasti proteolytických enzymů produkovaných přítomnou bakteriální mikroflórou. Tato metabolická přeměna je velmi efektivní a převažuje hlavně u hlodavců a přežvýkavců [51, 53, 59]. Určitá část přijatého OTA je vyloučena jako OT α v moči, poté co je reabsorbován ze střeva. Například u myši je 25 % přijatého OTA vyloučeno močí ve formě OT α po reabsorpci ze střeva [59, 60]. Zajímavé je i to, že OT α byl formován a vznikal *in vitro* v buňkách bronchiálního epitelu, které byly vystaveny OTA [59, 61]. Při imunosupresivním testu prováděném na myších nevykazoval a nepůsobil OT α redukcí a snížení míry imunitní odpovědi imunoglobulinů IgM a IgG, zatímco OTA a (4R)-4-hydroxyochratoxin A působili oba přibližně 90% redukcí odpovědi imunoglobulinů IgM a IgG a zároveň tyto dvě látky působili 90% (OTA) a 80% ((4R)-4-hydroxyochratoxin A) redukcí v počtu buněk, produkujících imunoglobulin M a více než 90% redukcí počtu buněk produkujících imunoglobulin G [62].

Další možností, jak hydrolyzovat OTA je otevírání laktonového kruhu ve struktuře OTA za alkalických podmínek. Tato reakce vede ke vzniku a formaci vysoce toxické látky, kterou nazýváme lakton-otevřený OTA, OP-OTA (lactone-opened OTA). Jedná se o nejvíce toxický známý metabolit OTA [51, 53, 59]. Při *in vivo* testu toxicity OP-OTA na myších a krysách, se při podání OP-OTA ukázal jako více toxický, než samotný OTA [59].

OTA může být v organismu dále hydroxylován zavedením -OH skupiny do jeho sloučeniny. Hydroxylované metabolity nacházíme převážně v moči, kterou jsou vylučovány. Hydroxylované metabolity OTA zahrnují 4-hydroxy (4R- a 4S-) epimery, které jsou tvořeny v játrech a ledvinách za účasti různých typů cytochromu P450 [51, 53]. Za pomoci mikrosomální oxidace vzniká 4-hydroxyochratoxin s nízkou úrovní toxicity a další méně toxický produkt zvaný 10-hydroxyochratoxin A [51, 53]. OTA i 4-hydroxy-OTA inhibují syntézu proteinů, pravděpodobně vázáním se na vazebné místo fenylalaninu namísto fenylalanin-tRNA syntázy [59].

Na metabolizaci a problematickém vylučování OTA z organismu se může podílet i z velké části enterohepatální oběh. U zvířat, převážně u hlodavců, byla značná role enterohepatálního oběhu a cirkulace prokázána. U myši byla pozorována exkrece konjugované formy OTA žlučníkem. OTA je pak s velkou pravděpodobností znovu absorbován ve střevě, po předcházející hydrolyze zmíněné konjugované formy za účasti bakteriální mikroflóry střeva. Jak silná vaznost na albumin, tak i enterohepatální cirkulace podporují pomalé vylučování OTA [53, 63].

1.9 Toxicita při společné expozici CIT a OTA

Mikromycety produkují široké spektrum různých mykotoxinů, různé druhy produkují rozdílné a pro ně specifické mykotoxiny, zároveň jeden druh vláknité plísně může produkovat i více mykotoxinů naráz. Jeden mykotoxin může být také produkován vícero rozdílnými druhy mikromycet. Z tohoto důvodu je v přírodě velmi často pozorována společný výskyt mykotoxinů a na kontaminaci mykotoxiny se může a často se i podílí více mykotoxinů současně. Vezmeme-li v potaz tuto vzájemně provázanou produkci a výskyt mykotoxinů, je velmi pravděpodobné a časté, že jsou zvířata a člověk po většinu času vystaven účinkům spíše většího množství mykotoxinů a jejich společným účinkům, nežli pouze jedné sloučenině tohoto typu a povahy. Toto platí právě hlavně pro OTA a CIT a OTB, který je metabolitem OTA a občas i pro patulin, jelikož se jedná o metabolity produkované velkým množstvím zástupců rodu *Penicillium* a *Aspergillus* [59].

V současné době je překvapivě málo zdrojů a literatury, která by řešila interakce mykotoxinů, ačkoliv kombinovaná expozice vícero mykotoxinům současně je více relevantní reálné situaci [59].

Vliv na expozici a působení a případně spolupůsobení mykotoxinů má překvapivě i klima a klimatické změny. Různé klimatické změny, například oteplení, má za následek změny v geografickém rozložení a distribuci pěstovaných obilovin a přispívá k potenciálním vhodným klimatickým podmínkám pro organismy produkující mykotoxiny [59].

Ve studii, kterou provedl Föllmann společně s jeho dalšími kolegy, kdy byl testován OTA v kombinaci s CIT a DH-CIT. Studie a testy probíhaly na fibroblastech plic čínské křečka (buňky V79). Hlavním výstupem této studie bylo, že kombinace OTA a CIT vykazuje převážně aditivní efekty a synergismus byl pozorován pouze při vyšších mikromolárních koncentracích [45]. Podobných výsledků dostala studie probíhající na lidských hepatocarcinomech (HepG2) [45, 64].

Podobně jako u metabolismu OTA a CIT souvisí výsledek a průběh společného působení OTA a CIT na živočišném druhu. Například ve studiích, kde jedna byla provedena na kuřatech a druhá na broilerech, došlo ke shodným výsledkům a to takovým, že kombinace CIT a OTA u těchto zvířat nevykazuje žádné aditivní nebo synergistické efekty [65, 66].

Naproti tomu některé studie provedené na savcích prokázaly značně vyšší výskyt ledvinných lézí, které se objevily hlavně v proximálních tubulech. Na novozélandských zajících byl po vystavení kombinaci OTA v množství 0.75 mg/kg a CIT v množství 15 mg/kg krmiva zjištěn častější výskyt ledvinných lézí a dalších závažnější strukturální změny ledviny než u skupin, které byly ostřeny a vystaveny pouze jednomu z toxinů. U skupin vystavených účinkům obou toxinů naráz byly pozorována patologické změny ve všech částech ledvin. Nejvíce zasaženy a ovlivněny se jevíly mitochondrie buněk proximálního tubulu, kde nastaly nejvýraznější strukturální a funkční změny. Bylo také pozorováno zmohtnutí bazální membrány glomerulů a značná degenerace endotelových buněk glomerulů [64, 67].

1.10 Hygienické limity OTA a CIT

V České republice je kontrola mykotoxinů v potravinách a v celém potravinovém řetězci zajišťována orgány spadající pod Ministerstvo zemědělství. Pro EU je zřízen tzv. Evropský systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF). Tento systém slouží k rychlému sdílení informací mezi členy systému, tj. Evropskou komisí sídlící v Bruselu, členskými státy EU a Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA), o potenciálně nebezpečných potravinách a krmivech, které mohou mít negativní vliv na zdraví a mohou představovat zdravotní riziko [68, 69, 70].

Komise EFSA zvolená pro zvážení a charakterizování rizik CIT, s ohledem na dostupná data a studie týkající se nefrotoxicity a stanovení množství a limit nevykazující žádné riziko a obavy z hlediska nefrotoxicity, vzhledem k nedostatečnému množství dostupných dat se komise pro stanovení limitu rozhodla k vyhodnocení NOAEL (no-observed-adverse-effect level) činící 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hmotnosti za den použít a přidat k hodnocení tzv. „uncertainty factor 100“. Hodnota a limit nezbuzující obavy z nefrotoxicity u lidí byl komisí vyhodnocen na 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hmotnosti na den. Komise a odborníci zároveň upozorňují, že vzhledem k dostupným datům nemohou být v rámci tohoto limitu vyloučeny genotoxické a karcinogenní účinky CIT [71].

Bezpečný limit byl v rámci studie stanoven a řešen komisí i v závislosti na věku. Pro batolata, kojence, děti ve věku od 3 do 9 let a dospělé konzumující běžně vysokého množství obilovin a obilných produktů může k dosažení kritického příjmu CIT dojít při konzumaci produktů kontaminovaných 9-53 μg citrininu/kg, u běžné konzumace obilovin je dosaženo kritického příjmu až při kontaminaci obilovin 19-100 μg citrininu/kg [71].

Vzhledem k dostupným datům nemůže být dle EFSA ustanoven pevný a jasný závěr ohledně rizik a negativních účinků, týkající se nefrotoxicity spojených s překračováním výše zmíněného denního limitu po dobu delšího časového období.

Co se OTA týče jsou v současné době v EU regulační a maximální limity pro potraviny a krmiva stanovené Evropskou Komisí a jejím nařízením č. 1881/2006. Limity pro výrobky, tj. sušené byliny, čaje a bylinné nálevy, testované v rámci této práce, nejsou však pevně ustanoveny žádnou vyhláškou či nařízením. V současné době jsou pouze k dispozici nově navrhované limity pro OTA a jsou v současné době diskutovány Evropskou Komisí. Tento návrh maximálního limitu OTA činí 10 µg/kg [72].

2 Praktická část

2.1 Chemikálie, spotřební a laboratorní materiál, přístroje

2.1.1 Použité chemikálie

- Kyselina chlorovodíková (HCl) 37%, AnalaR® NORMAPUR® Reag. Ph. Eur. analytical reagent, dodavatel VWR chemicals, pro ČR VWR International s. r. o., Pražská 442, Stříbrná Skalice 281 67
- Dichlormethan (CH₂Cl₂) ≥99.8% stabilizovaný, HiPerSolv CHROMANORM® for HPLC, dodavatel VWR chemicals, pro ČR VWR International s. r. o., Pražská 442, Stříbrná Skalice 281 67
- H₂O, ultračistá, deionizovaná
- Hydrogen uhličitan sodný (NaHCO₃) 99.7-100.3%, AnalaR NORMAPUR® Reag. Ph. Eur. analytical reagent, dodavatel VWR chemicals, pro ČR VWR International s. r. o., Pražská 442, Stříbrná Skalice 281 67
- Methanol (CH₃OH) ≥99.8%, HiPerSolv CHROMANORM® Reag. Ph. Eur., gradient grade for HPLC, dodavatel VWR chemicals, pro ČR VWR International s. r. o., Pražská 442, Stříbrná Skalice 281 67

2.1.2 Použité roztoky

- 1 M HCl (kyselina chlorovodíková)
Připravte smícháním a přidáním čistých 23,19 ml HCl do 750ml deionizované H₂O.
- 0,13 M NaHCO₃ (hydrogenuhlíčan sodný), 10,92 g.l⁻¹
Navažte 10,92 g a rozpustěte navážku v odměrné nádobě v menším množství vody. Po rozpuštění kvantitativně přelejte do 1 l odměrné baňky a doplňte po značku vodou. Roztok rozmíchejte a uložte do tmavé skleněné lahve.
- 70% metanol

2.1.3 Spotřební materiál

- Filtrační papír kruhový 150 mm Whatman® č.4, obj.č. 1 004 090 nebo 1 004 185, výrobce MERCK KGAA, Frankfurter Strasse 250, Darmstadt, 64293, Německo

- Filtrační papír, Papírna Perštejn spol. s r.o., Hlavní 20, 431 63 Perštejn, Česká republika
- Eppendorf Conical Tubes, 50 ml, výrobce Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o., Voděradská 2552/16, 251 01 Říčany u Prahy, Česká republika
- Špičky na pipety GILSON, PIPETMAN® DIAMOND Tips D1000ST TIPACK, výrobce GILSON, 3000 Parmenter Street, P.O. Box 620027, Middleton, WI 53562-0027, USA
- Špičky na pipety GILSON, PIPETMAN® DIAMOND Tips D10ml, výrobce GILSON, 3000 Parmenter Street, P.O. Box 620027, Middleton, WI 53562-0027, USA
- Špičky na pipety FINNIPIPETTE, ClipTip™ Pipette Tips, výrobce Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
- Filtrační patrony pro Filtrační zařízení Morton frits S3 z filtračního papíru KA 2M
- Centrifugační náhodky o objemu 50ml, „Centrifuge Tubes, Round Bottom PP“, Glassco Laboratory Equipments Pvt. Ltd., Khudda Kalan - 133004, Ambala, Haryana, India
- Zkumavky Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5 ml, Eppendorf Quality™, výrobce Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o., Voděradská 2552/16, 251 01 Říčany u Prahy, Česká republika
- Zkumavky Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2 ml, Eppendorf Quality™, výrobce Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o., Voděradská 2552/16, 251 01 Říčany u Prahy, Česká republika
- Laboratorní sklo
- Reagent Reservoir Demo Package o objemu 25ml, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.1.4 Přístroje a zařízení

- Homogenizátor, Mixér, DeGusto, 700w, De Gusto Art of Cooking, majitel TV PRODUCTS CZ s.r.o., Rybná 669/4, 110 00 Praha 1, Česká republika
- Analytická váha, KERN EW PCB2000, max 2000g., KERN & SOHN GmbH, Ziegelei, 72336 Balingen, Německo

- Třepačka Multi Reax, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Walpersdorfer Str. 12, D-91126 Schwabach, Německo
- Filtrační zařízení Morton frity S3, průměr frity 40 mm, výrobce KAVALIERGLASS, a.s., Křížová 1018/6, 150 00 Praha 5, Česká republika
- Laboratorní centrifuga MPW – 351e, Maximální kapacita 800 ml., max. otáčky 4 500 RPM., výrobce MPW MED.Instruments, Boremlowska 46, 04-347 Warszawa, Polsko,
- Automatická pipeta FINNIPIPETTE™ F2 Variable Volume, 100-1000 µl, výrobce Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
- Automatická pipeta FINNIPIPETTE™ F2 Variable Volume, 1-10 ml, výrobce Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
- Automatická pipeta FINNIPIPETTE™ F2 Variable Volume, 10-100 µl, výrobce Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
- Kompresor Millipore WP6122050, Chemical Duty Pump, 220 V/50 Hz, dodavatel MERCK, Burlington, Massachusetts, USA
- Automatická pipeta PIPETMAN® L P1000L, 100-1000 µL, Metal Ejector, výrobce GILSON, 3000 Parmenter Street, P.O. Box 620027, Middleton, WI 53562-0027, USA
- Automatická pipeta PIPETMAN® L P100L, 10-100 µL, Metal Ejector, výrobce GILSON, 3000 Parmenter Street, P.O. Box 620027, Middleton, WI 53562-0027, USA
- Automatická pipeta PIPETMAN® L P10 mL L, 1-10 ml, výrobce GILSON, 3000 Parmenter Street, P.O. Box 620027, Middleton, WI 53562-0027, USA
- Multikanálová 12ti poziční pipeta FINNIPIPETTE™ F1, 10-100 µl, výrobce Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
- Promývačka BioTek, ELx50, Spektrofotometr Epoch, BioTek, P.O. Box 998, Highland Park, 00 Tigan Street Winooski, VT 05404, USA, vyrobeno v USA
- Spektrofotometr Epoch, BioTek, P.O. Box 998, Highland Park, 00 Tigan Street Winooski, VT 05404, USA, vyrobeno v USA

2.1.5 Použité programy a software

- Gen5, verze 1.10., BioTek, P.O. Box 998, Highland Park, 00 Tigan Street Winooski, VT 05404, USA
- Microsoft® Excel®, verze 2019, součást sady Microsoft 365®, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA,
- Microsoft® Word, verze 2019, součást sady Microsoft 365®, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

2.1.6 RIDASCREEN®FAST Citrinin *In vitro* Test

Výrobce R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, Darmstadt, 642 97, Německo, dodavatelem pro Českou republiku je JEMO TRADING, spol. s r.o., Topol'ová 18, 811 04, Bratislava, Slovenská republika

Tabulka 1 Komponenty, látky obsažené v testovací sadě RIDASCREEN®FAST Citrinin [73].

Komponent	Formát	Koncentrace (c)	Objem (V)
Mikrotitrační destička / držák	Připraveno k použití		48 jamek
Standard 1	Připraveno k použití	0 µg/l	1,3 ml
Standard 2	Připraveno k použití	15 µg/l	1,3 ml
Standard 3	Připraveno k použití	45 µg/l	1,3 ml
Standard 4	Připraveno k použití	135 µg/l	1,3 ml
Standard 5	Připraveno k použití	405 µg/l	1,3 ml
Konjugát	Připraveno k použití		6 ml
Protilátky	Připraveno k použití		3 ml
Substrát/Chromogen	Připraveno k použití		10 ml
Stop roztok	Připraveno k použití		14 ml

2.1.7 RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 *In vitro* Test

Výrobce R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, Darmstadt, 64297, Německo, dodavatelem pro Českou republiku je JEMO TRADING, spol. s r.o., Topol'ová 18, 811 04, Bratislava, Slovenská republika

Tabulka 2 Komponenty, látky obsažené v testovací sadě RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 [74].

Komponent	Formát	Koncentrace (c)	Objem (V)
Mikrotitrační destička / držák	Připraveno k použití		96 jamek
Standard 1	Připraveno k použití	0 ppt	1,3 ml
Standard 2	Připraveno k použití	50 ppt	1,3 ml
Standard 3	Připraveno k použití	100 ppt	1,3 ml
Standard 4	Připraveno k použití	300 ppt	1,3 ml
Standard 5	Připraveno k použití	900 ppt	1,3 ml
Standard 6	Připraveno k použití	1800 ppt	1,3 ml
Promývací solný pufr	Rozpustit sůl		
Konjugát	Peroxidásový konjugát OTA, koncentrát		0,7 ml
Pufr	Ředící pufr konjugátu		7 ml
Substrát/Chromogen	Připraveno k použití		10 ml
Stop roztok	Připraveno k použití		14 ml

2.2 Úprava a homogenizace vzorků

V první fázi přípravy vzorků pro všech 60 jednotlivých druhů farmaceutických a volně prodejných bylin připravit homogenní směs ze všech nakoupených balení daného produktu a vytvořit konečný, laboratorní vzorek pro následující práci a testování na přítomnost daných mykotoxinů.

Vzhledem ke skutečnosti, že k testování byla nakoupena maloobchodní balení určená pro domácí spotřebu a užití, bylo důležité se pokusit před vlastním otevřením obalu produkt, konkrétněji určitou část farmaceutické byliny, rostliny uvnitř balení, protřepat ještě v uzavřeného obalu v ruce částečně smísit. Při

skladování, manipulaci a přepravě obalů dochází k nerovnoměrnému usazování, separaci různě velkých částí, a z toho důvodu bylo uznáno za vhodné, aby před kvartací a odběrem dílčích vzorků, tyto balené produkty byly nejprve ručně protřepány ještě v zavřeném, neotevřeném balení a obsah balení byl rozmístěn před další prací rovnoměrně.

Následně veškerý obsah balení byl v digestoři vysypán na filtrační papír, na kterém byl naznačen kříž, který filtrační papír dělil rovnoměrně na čtvrtiny. Tento proces můžeme označit termínem kvartace. Proces kvartace se užívá pro získání reprezentativního vzorku sypké a suché povahy. Vysypaný obsah všech balení pro daný vzorek byl pak následně na filtračním papíře důkladně promíchán a rovnoměrně rozprostřen od středu naznačeného kříže na filtračním papíru. Následně bylo z každé čtvrtiny filtračního papíru postupně odebírán laboratorní lžičkou vzorek. Odebírání probíhalo postupně z každé čtvrtiny. Takto jsme odebrali dílčí vzorky. Dílčí vzorek byl vždy odebírán z jednoho náhodně vybraného místa dané čtvrtiny a pozice odběru se v průběhu v dané čtvrtině vždy náhodně měnily. Tento odběr byl prováděn postupně pro každou čtvrtinu, dokud nebylo odebráno a naváženo 20 gramů pro daný zásobní vzorek, který byl následně umístěn do polyetylenové lahve se šroubovacím uzávěrem, aby se zamezilo navlhnutí odebraného vzorku a sekundární kontaminaci. Na láhev bylo uvedeno číslo vzorku a jeho latinský název nesmazatelným fixem. Laboratorní lžička byla po každém odběru určitého vzorku opláchnuta metanolem, aby bylo zamezeno případné kontaminaci následujícího vzorku, zároveň byl pravidelně měněn filtrační papír, užívaný pro kvartaci vzorků s cílem eliminovat nežádoucí a vzájemnou kontaminaci jednotlivých vzorků.

Každý z odebraných zásobních vzorků (celkem 60) byly upraveny promísením a rozmělněním pomocí mixéru DeGusto (viz. přístroje a zařízení). Do mixéru byl v zapnuté digestoři vložen veškerý obsah z polyetylenové láhve s odebraným vzorkem. Vzorek byl v mixéru rozmělněn. Namletý obsah byl ze zásobníku mixéru vysypán a vyklepán na čistý filtrační papír. U každého vzorku bylo nutné pomocí, štětečku, pinzety a laboratorní jehly očistit sekací nože mixéru, odstranit nalepené a usazené množství nasekaného vzorku a přenést jej opět na filtrační papír. Veškeré

získané množství bylo pečlivě sklepáno z filtračního papíru do polyetylenové lahve se šroubovacím uzávěrem a pevně uzavřeno, v důsledku zamezení a zabránění přístupu vlhkosti ke vzorku a případné sekundární kontaminaci. Polyetylenová láhev se označila latinským názvem pro danou rostlinu, číslem vzorku nesmazatelným fixem a dle abecedního pořadí uložena k uskladnění. Vyjímátný zásobník mixéru, štěteček, sekací nože, pinzeta a laboratorní jehla byly důkladně opláchnuty a očištěny metanolem a osušeny před opakováním výše zmíněného postupu pro další vzorek. Filtrační papír v digestoři byl pravidelně měněn. Výše zmíněný postup byl proveden u každého vzorku. Takto upravené a zpracované vzorky farmaceutických bylin byly dále použity k přípravě vzorků pro provedení testů RIDASCREEN Ochratoxin A 30/15 a RIDASCREENFAST Citrinin, s cílem stanovení množství mykotoxinů OTA a CIT v jednotlivých vzorcích.

2.3 Metodika stanovení OTA (ochratoxinu A)

2.3.1 Stručné, obecné informace k testu RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15

Pro stanovení hodnot a determinaci ochratoxinu A ve vzorcích byla užitá metoda *in vitro* testu od firmy r-biopharm RIDASCREEN Ochratoxin 30/15. Jedná se o kompetitivní enzymový imunotest pro kvantitativní vyhodnocení a určení ochratoxinu A v obilovinách a potravinách, pivu a případně i prasečím séru. Tento test je relativně rychlý, kvantitativní enzymatický imunotest, určený k detekci mykotoxinu ochratoxin A, jehož provedení je časově relativně nenáročné, a to i na laboratorní poměry. Tento test byl tedy vhodný pro využití v rámci této bakalářské práce a v rámci jeho jednoduchosti bylo tedy možné nechat tento test provádět studenta samotného. Jeden testovací kit, jedna testovací sada obsahuje všechny reagenty, materiál a látky potřebné k provedení enzymatického imunotestu. Každá sada RIDASCREEN Ochratoxin A 30/15 obsahuje dostatečné množství materiálu k testování až 90 vzorků, plus 6 standardních vzorků (lépe je měřit menší počet vzorků a použít dvě až tři kalibrační řady). Ke kvantifikaci je potřebný spektrofotometer schopný měřit mikrotitační destičku. Celkový čas potřebný pro přípravu 10 vzorků se dle výrobce orientačně pohybuje kolem 30 minut a implementace testu, čas potřebné inkubace trvá 45 minut. Udávaný limit detekce

výrobce je při námi užití citlivější metodě stanovení ochratoxinu A v obilovinách a krmivech 1,25 ppb [74].

2.3.2 Princip testu RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15

Základem testu od firmy r-biopharm RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 je antigen-protilátka reakce. Jedná se o kompetitivní enzymový imunotest pro kvantitativní vyhodnocení, analýzu ochratoxinu A [74].

Enzymové imunotesty využívají kromě protilátek a antigenů ještě enzym navázaný na jeden z reagentů, který po přidání substrátu nebo chromogenu způsobí barevnou reakci. Antigen ze vzorku při kompetitivní enzymovém imunotestu „soutěží“ s referenčním antigenem o vazebná místa na primární protilátce, tedy volný a imobilizovaný ochratoxin A provádí kompetici o vazebná místa protilátky. Z tohoto důvodu hovoříme o testu jako o kompetitivním enzymovém imunotestu [74].

Jamky mikrotitračních pásek dodávané k testu jsou pokryty specifickými protilátkami proti ochratoxinu A. Do těchto jamek jsou pipetovány jednotlivé standardy a jednotlivé roztoky vzorků. Následně je do jamek přidán enzymový konjugát, konkrétněji koncentrát ochratoxinu A konjugovaný s peroxidázou. Volný a enzymaticky konjugovaný ochratoxin A provádí kompetici o vazebné místo protilátky (kompetitivní enzymový imunotest). Zbylý nenavázaný enzymový konjugát je poté odstraněn v rámci kroku, kdy jsou jednotlivé jamky promyty destilovanou či deionizovanou vodou. Následně je do jamek přidán substrát/chromogen a je nutné provést inkubaci. Vázaný konjugovaný enzym konvertuje chromogen na modrý produkt. Přidáním stop roztoku dosáhneme změny barvy roztoku v jamkách z modré barvy na žlutou. Měření se provádí fotometricky na spektrofotometru, který je schopný měřit mikrotitrační destičky, při vlnové délce 450 nm. Absorbance je nepřímo úměrná ke koncentraci ochratoxinu A v daném vzorku [74].

2.3.3 Příprava vzorků pro test RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15

Prvním krokem pro přípravu vzorku pro následné otestování pomocí testu RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 od firmy r-biopharm bylo navážení 2 gramů vzorku. Každý homogenizovaný vzorek byl namlet, rozmělněn a míchán a následně od každého vzorku bylo pomocí analytických vah odváženo 2 gramy do centrifugovací lahvičky s uzavíratelným, šroubovacím uzávěrem [74].

Po odvážení bylo ke 2 gramům vzorku přidáno 5 ml 1 molárního roztoku HCl. Smíchané vzorky s HCl byly umístěny po 12 vzorcích na třepačku, kde byly třepány po dobu 5 minut. Nádobky byly vyndány z třepacího přístroje a do každé nádobky se vzorkem bylo pipetováno 10 ml dichlormethanu. Uzavřené nádobky byly poté párkrát manuálně protřepány a upuštěn vznikající tlak v rámci probíhající reakce, tento krok byl několikrát u každého vzorku opakován a záhy poté byly vzorky umístěny opět na třepací zařízení, kde byly třepány po dobu 15 minut. Po dokončení druhého třepání na třepací zařízení byly vzorky umístěny do laboratorní centrifugy po dobu 15 minut (3500 g, 15 °C). Dalším krokem po skončení centrifugace bylo úplné odstranění vrchní vodné vrstvy a zanechání pouze „koláče“ vzorku, aniž by došlo k jeho porušení a odebranou vodu vyřadit. K tomuto procesu se ukázalo jako nejlepší použití klasického laboratorního kapátka, které bylo dostatečně šetrné, nedocházelo k porušení vzniklého koláče vzorku a dobře se s ním manipulovalo v užších a vyšších centrifugačních nádobkách [74].

Za pomoci filtračního papíru byla celá dichlormethanová vrstva po centrifugaci oddělena od „koláče“ vzorku. Veškerý přefiltrovaný dichlormethan byl odpipetován do nové centrifugační nádobky s uzavíratelným, šroubovacím uzávěrem a ke každému centrifugovanému, přefiltrovanému a odebranému dichlormethanu daného vzorku byl přidán ekvivalentní objem 0,13 molárního pufru hydrogenuhličitano-sodného (NaHCO_3 , pH 8,1). Centrifugační nádobky s ekvivalentním objemem dichlormethanu a hydrogenuhličitano-sodného pufru byly umístěny k poslednímu třepání na třepacím zařízení, kde byly třepány 15 minut. Protřepané vzorky byly podruhé umístěny do laboratorní centrifugy a centrifugovány po dobu 15 minut (3500 g, 15 °C). Následovalo odebrání 100 μl vrchní vodné fáze z nádobky právě centrifugovaného vzorku a následně zředění 400

μl 0,13 molárního pufru hydrogenuhličitanu-sodného do zkumavek Eppendorf Safe-Lock Tubes o objemu 2,0 ml. Z tohoto finálního roztoku bylo pro každý vzorek pipetováno a použito přesně 50 μl na jamku pro provedení imunotestu. Postup zmíněn výše byl v rámci práce a omezení kapacity na třepacím zařízení, laboratorní centrifuze prováděn v sériích o 12 vzorcích. Při počtu 60 vzorků byl postup pro přípravu vzorků proveden celkem v 5 sériích [74].

2.3.4 Protokol, testovací postup RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15

Před začátkem protokolu, testu je nutné přivést veškeré reagenty, vzorky k pokojové teplotě (20–25°C). Po ponechání reagentů při pokojové teplotě po dostatečnou dobu je následně nutná příprava zředěného enzymového konjugátu. Enzymový konjugát je poskytnut ve formě koncentráту. Před pipetováním koncentráту protřepeme zakoncentrovaný konjugát a zředíme jej v poměru 1:11 (1+10) v ředicím pufru (například 200 μl koncentráту ředíme v 2 ml pufru). Vyjmeme z testovací sady, kitu dostatečné a potřebné množství mikrotitračních jamek pro všechny vzorky, standardy pro měření v duplikátu a vložíme je do mikrotitračního držáku, jež je přiložený a součástí testovací sady. Záhy pipetujeme v duplikátu 50 μl standardních roztoků a roztoků jednotlivých vzorků do oddělených a připravených mikrotitračních jamek. Pipetujeme 50 μl zředěného enzymového konjugátu do každé jamky. Smícháme obsah jamek mikrotitrační destičky pomocí manuálního a opatrného třepání mikrotitrační destičkou. Po důkladném promíchání uložíme mikrotitrační destičku do tmy k inkubaci při pokojové teplotě na dobu 30 minut. Po inkubaci vylejeme obsah všech jamek do dřezu. Po vylití oklepeme několikrát držák s jamkami, mikrotitrační destičku o čistý ručník, či papírové utěrky za účelem odstranění zbývající tekutiny z jamek a zajištění plné odstranění kapaliny z jamek. Po tomto kroku musí proběhnout promytí každé jamky destilovanou nebo deionizovanou H₂O. Ideálně za užití multikanálové pipety, případně za využití promývacího přístroje. Objem k jednomu proplachu jedné jamky činí 250 μl. Poté je nutné jamky opět vyprázdnit a odstranit veškerou kapalinu. Propláchnutí každé jamky by mělo proběhnout celkem třikrát. Do propláchnutých jamek pomocí pipety pipetuje 100 μl substrát/chromogenu na každou jamku. K tomuto kroku byla využita multikanálová pipeta a laboratorní, zásobní rezervoár obsahující substrát/chromogen. Protřepeme obsah jamek mikrotitrační destičky pomocí

manuálního a opatrného třepání mikrotitrační destičkou. Mikrotitrační destičku uložíme do tmy k inkubaci při pokojové teplotě na dobu 15 minut (+/- 1 minuta). Po uplynutí 15 minut a dokončení inkubace vyjmeme destičku ze tmy a pipetujeme 100 µl stop roztoku do každé jamky. Po napipetování stop roztoku smícháme obsah jamek mikrotitrační destičky pomocí manuálního a opatrného třepání mikrotitrační destičkou ze strany na stranu. V závěru měříme absorbanci při vlnové délce 450 nm na spektrofotometru nejpozději do 30 minut od přidání stop roztoku [74].

2.4 Metodika stanovení CIT (citrininu)

2.4.1 Stručné, obecné informace k testu RIDASCREEN®FAST Citrinin

Pro stanovení hodnot a determinaci citrininu ve vzorcích byla užitá metoda *in vitro* testu od firmy r-biopharm RIDASCREENFAST Citrinin. Jeden testovací kit obsahuje všechny reagenty, materiál a látky potřebné k provedení enzymatickému imunotestu, zahrnujíc i standarty, konjugát, substrát/chromogen, protilátky, stop roztok, mikrotitrační destičku o 48 jamkách. Každá sada RIDASCREENFAST Citrinin obsahuje dostatečné množství materiálu k testování až k 43 vzorků, plus 5 standardních vzorků. Ke kvantifikaci je potřebný spektrofotometer schopný měřit mikrotitratční destičky. Samotný test zahrnuje extrakci, filtraci a ředění, samozřejmě je nutná i homogenizace vzorků, ale tu nebereme jako vlastní součást imunotestu. Celkový čas potřebný pro přípravu 10 vzorků je dle výrobce se orientačně pohybuje kolem 10 minut a implementace testu, čas potřebné inkubace trvá 25 minut. Udávaný limit detekce výrobcem je 15 µg/kg (ppb) [73].

2.4.2 Princip testu RIDASCREEN®FAST Citrinin

Základem RIDASCREENFAST® Citrinin testu od firmy r-biopharm je antigen-protilátka reakce. Mikrotitrační jamky jsou tak pokryty citrininem. Následně jsou postupně na mikrotitrační destičku přidány standarty, roztoky vzorků a anti-citrinin protilátky [73].

Enzymové imunotesty využívají kromě protilátek a antigenů enzym navázaný na jeden z reagentů, který po přidání substrátu nebo chromogenu způsobí barevnou reakci. Antigen ze vzorku při kompetitivní enzymovém imunotestu

„soutěží“ s referenčním antigenem o vazebná místa na primární protilátce, tedy volný a imobilizovaný citrinin provádí kompetici o vazebná místa protilátky. Z tohoto důvodu hovoříme o testu jako o kompetitivním enzymovém imunotestu [73].

Jak bylo napsáno výše, referenční antigen, citrinin je imobilizován na povrchu mikrotitračních jamek, tedy povrch mikrotitračních jamek je pokryt citrininem. Po napipetování standardů a roztoků jednotlivých vzorků na mikrotitrační destičku jsou vzápětí pipetovány protilátky a destička, případně destičky jsou ponechány k inkubaci ve tmě. Volný a imobilizovaný citrinin „soutěží“ o vazebná místa na protilátkách. Po inkubaci následuje důkladné promytí jamek na mikrotitrační destičce a po promytí je pipetován konjugát, sekundární protilátky označené peroxidasou. Během následné inkubace dochází k navázání sekundární protilátky značené enzymem na primární protilátku. Nenavázané, nezreagované sekundární protilátky konjugované s enzymem jsou odstraněny během dalšího důkladného promytí mikrotitračních jamek. Přidáním substrát/chromogenu do jamek mikrotitrační destičky konvertuje konjugát vázaného enzymu neboli protilátky označené enzymem peroxidasou, chromogen na modrý produkt. Přidání stop roztoku vede ke změně barvy roztoku v jamkách z modré barvy na žlutou. Měření se provádí fotometricky na spektrofotometru, který je schopný měřit mikrotitrační destičky, při vlnové délce 450 nm. Absorbance je nepřímo úměrná ke koncentraci citrininu v daném vzorku [73].

2.4.3 Příprava vzorků pro test RIDASCREEN®FAST Citrinin

Všechny vzorky byly před přípravou v rámci testu homogenizovány, namlety a míchány před provedením procesem extrakce v rámci testu RIDASCREENFAST Citrinin. Metodika a užitý postup v rámci homogenizace vzorků je popsán výše.

Prvním krokem přípravy vzorků bylo navážení 5 gramů namletého daného vzorku do konických plastových zkumavek s možností pevného uzavření. Po navážení všech 60 vzorků bylo přidáno k naváženým 5 gramům vzorku pipetováno 12,5 ml 70% methanolu. Po přidání 70% methanolu následovalo umístění pečlivě uzavřených nádob na třepačku a třepání vzorků po dobu 3 minut. Vzorky byly vždy

zpracovávají v sériích po 12 vzorcích, vzhledem ke kapacitě na třepačce a množství laboratorního skla, celkem v 5 sériích. Po ponechání na třepačce a důkladném protřepání, byl obsah přefiltrován pomocí filtrační zařízení Morton Frita S3 za užití filtračních patron a dále za využití papírových filtrů. Frita byla před prací s dalším vzorkem důkladně promyta za pomoci vývěvy a kompresoru destilovanou vodou a 70% metanolem. Ze získaného filtrátu bylo odebráno pipetou množství přesně o objemu 1 ml do zkumavek o objemu 2,0 ml postupně u všech 12 vzorků z dané série. K odebrání každého jednotlivého filtrátu bylo nutné použít novou laboratorní špičku pipety, aby se zamezilo kontaminaci vzorků. Zkumavky s odebraným filtrátem byly během práce na jiných vzorcích ukládány do stojanu a do tmy k inkubaci. Po napipetování všech získaných filtrátů ze všech 12 vzorků z dané série, byl stojan vyjmut z inkubace a do zkumavek byl k odebranému a obdrženému filtrátu přidán a pipetou pipetován přesně 1 ml ultračisté deionizované vody. Zředěný filtrát deionizovanou vodou ve zkumavkách byl umístěn v zavřených zkumavkách ve stojanu během práce na dalších vzorcích do tmy k inkubaci [73].

2.4.4 Protokol, testovací postup RIDASCREEN®FAST Citrinin

Před použitím a začátkem testu přivedeme všechny reagenty a vzorky k pokojové teplotě (20–25°C). Po vystavení reagentů pokojové teplotě po dostatečnou dobu vložíme potřebný počet mikrotitračních jamek do mikrotitračního držáku pro všechny standardy a vzorky určené k provedení kompetitivního imunotestu RIDASCREEN®FAST Citrinin. Do jednotlivých jamek bylo pipetováno 50 µl každého standardu a připraveného vzorku, za použití nové špičky pro každý standard nebo vzorek. Po dokončení tohoto kroku bylo dále přidáno 50 µl protilátky do každého jamky. K tomuto kroku byla použita multikanálová pipeta a rezervoár pro roztok s protilátkami. Mikrotitrační destičku manuálně, jemně a opatrně protřepeme. Po protřepání byla destička uložena k následné inkubaci při pokojové teplotě na 10 minut (+/- 1 minuta) do tmy. Po vyjmutí destičky z inkubace vylejeme obsah všech jamek do dřezu. Po vylití oklepeme několikrát mikrotitrační destičku o čistý ručník, či papírové utěrky, za účelem odstranění zbývající tekutiny z jamek. Následně musí proběhnout promytí každé jamky destilovanou nebo deionizovanou H₂O. Ideálně za užití multikanálové pipety, případně promývacího přístroje, pokud je k dispozici. Objem k jednomu

proplachu jedné jamky činí 250 μ l. Poté je nutné jamky opět vyprázdnit a odstranit veškerou kapalinu. Propláchnutí každé jamky by mělo proběhnout celkem třikrát. Po promytí přidáme 100 μ l konjugátu (sekundárních protilátek) do každé jamky. Po přidání konjugátu do každé jamky se standardem, či vzorkem, dáme destičku opět k inkubaci při pokojové teplotě po dobu 10 minut (+/- 1 minuta) do tmy. Po dokončení druhé inkubace vyjmeme držák s jamkami, mikrotitrační destičku a vylejeme veškerý obsah. Po vylití oklepeme několikrát mikrotitrační destičku o čistý ručník, či papírové utěrky. Vzápětí musí opět proběhnout promytí každé jamky destilovanou nebo deionizovanou H₂O. Následně je nutné jamky opět vyprázdnit a odstranit veškerou kapalinu. Propláchnutí každé jamky by mělo proběhnout celkem třikrát. Bylo přidáno 100 μ l substrát/chromogen do každé jamky. Mikrotitrační destičku, držák s jamkami po přidání substrát/chromogenu manuálně a opatrně protřepeme. Hned jak dokončíme manuální protřepání mikrotitrační destičky, uložíme destičku k následné inkubaci při pokojové teplotě na dobu 5 minut (+/- 30 vteřin) do tmy. Následně po skončení uvedené doby inkubace přidáme 100 μ l stop roztoku do každé jamky. Obsah jamek s právě napipetovaným stop roztokem promícháme pomocí opatrného a kontrolovaného třepání mikrotitrační destičkou. Měříme absorbanci při vlnové délce 450 nm na spektrofotometru, nejpozději do 10 minut po přidání stop roztoku [73].

3 Výsledky

3.1 Stanovení OTA

Výsledky všech 60 změřených vzorků byly změřeny za využití spektrofotometru a programu Gen5. Tento program za pomoci spektrofotometrického měření vyhodnotil implementovaný test RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15. Z programu Gen5 se dále výsledky zpracovaly v programu Microsoft Excel, kde byly převedeny do tabulek znázorňující hodnoty naměřené v jednotlivých jamkách na mikrotitrační destičce. Výsledky jednotlivých absorbancí při 450 nm byly programem rovnou přepočítávány na odpovídající koncentraci v ppt, čili v ng/kg. Každý vzorek byl měřen v triplikátu.

Získané hodnoty z měření v ppt, ng/kg, bylo dále nutné převést na ng/g. Pro získání finálních hodnot byl spočítán průměr z triplikátu pro každý jednotlivý vzorek. Výsledky pro stanovení ochratoxinu A jsou uvedeny v tabulkách níže.

Tabulka 3 Výsledky stanovení OTA u vzorků číslo 1-10

Stanovení OTA (vzorek č. 1–10)		
Bylina	C AVG (ng/g)	± SMODCH
<i>Achillea millefolium flos</i>	0,09137	± 0,003931
<i>Agrimonia eupatoria herba</i>	0,072029333	± 0,003775
<i>Alchemilla herba</i>	0,160416667	± 0,003191
<i>Althaea officinalis folium</i>	0,157236667	± 0,001442
<i>Articum lappa radix</i>	0,014735667	± 0,000353
<i>Artemisia absinthium herba</i>	0,098776667	± 0,000575
<i>Angelica arhcangelica radix</i>	0,059511333	± 0,000602
<i>Bellis perennis flos</i>	0,088234	± 0,001619
<i>Borago officinalis herba</i>	0,166953667	± 0,001778
<i>Calendula officinalis flos</i>	0,038802	± 0,000523

C AVG (µg/l) průměrná koncentrace ve vzorku měřeného v triplikátu v µg/l
± SMODCH ± směrodatná odchylka měření

Tabulka 4 Výsledky stanovení OTA u vzorků číslo 11-30**Stanovení OTA (vzorek č. 11-30)**

Bylina	C AVG (ng/g)	± SMODCH
<i>Carlina radis</i>	0,110268	± 0,001386
<i>Centaurium herba</i>	0,083443333	± 0,000509
<i>Chelidonium majus herba</i>	0,048136667	± 0,001084
<i>Cichorium intybus herba</i>	0,061630333	± 0,00121
<i>Cnicus benedictus</i>	0,033826667	± 0,000394
<i>Crataegus fructus</i>	0,046227	± 0,000534
<i>Echinacea flos</i>	0,071240333	± 0,002627
<i>Echinacea radix</i>	0,055298333	± 0,001193
<i>Elymus repens</i>	0,063832667	± 0,000629
<i>Eucalyptus folium</i>	0,221329333	± 0,004376
<i>Fagopyrum sagittatum herba</i>	0,117174333	± 0,001674
<i>Filipendula ulmaria herba</i>	0,213415	± 0,004538
<i>Fragaria folium</i>	0,170421333	± 0,003439
<i>Galium odoratum herba</i>	0,090621	± 0,001202
<i>Galium verum herba</i>	0,136275667	± 0,002507
<i>Gentiana lutea radix</i>	0,232395	± 0,003254
<i>Ginkgo biloba</i>	0,165578333	± 0,004059
<i>Humulus lupulus strobilus</i>	0,206742333	± 0,004605
<i>Hyssopus officinalis herba</i>	0,288486333	± 0,008498
<i>Juglans regia folium</i>	0,04134	± 0,000316

C AVG (µg/l) průměrná koncentrace ve vzorku měřeného v triplicátu v µg/l
± SMODCH ± směrodatná odchylka měření

Tabulka 5 Výsledky stanovení OTA u vzorků číslo 31-50

Stanovení OTA (vzorek č. 31–50)

Bylina	C AVG (ng/g)	± SMODCH
<i>Laimum album herba</i>	0,079152333	± 0,000796
<i>Lavandula angustifolia flos</i>	0,025583	± 0,000815
<i>Linaria herba</i>	0,019700333	± 0,000491
<i>Malva flos</i>	0,089678667	± 0,001719
<i>Malva folium</i>	0,044890667	± 0,000747
<i>Marrubium herba</i>	0,047049667	± 0,000471
<i>Maral leuzea herba</i>	0,04248	± 0,00025
<i>Melissa officinalis herba</i>	0,025848333	± 0,000273
<i>Melilotus officinalis</i>	0,039613667	± 0,001644
<i>Petasites hybridus radix</i>	0,090841667	± 0,001133
<i>Pimpinella radix</i>	0,033152333	± 0,001352
<i>Plantago folium</i>	0,079243	± 0,000447
<i>Potentilla argentea herba</i>	0,127814667	± 0,00178
<i>Potentilla erecta</i>	0,121086667	± 0,002025
<i>Primula veris flos</i>	0,115805333	± 0,002369
<i>Pulmonaria officinalis folium</i>	0,025457667	± 0,00345
<i>Rosa canina fructus</i>	0,209254667	± 0,004709
<i>Rubus fruticosus folium</i>	0,060677333	± 0,051319
<i>Rubus idaeus folium</i>	0,025378	± 0,000412
<i>Sambucus nigra flos</i>	0,039863667	± 0,000315

C AVG (µg/l) průměrná koncentrace ve vzorku měřeného v triplikátu v µg/l
± SMODCH ± směrodatná odchylka měření

Tabulka 6 Výsledky stanovení OTA u vzorků číslo 51-60**Stanovení OTA (vzorek č. 51–60)**

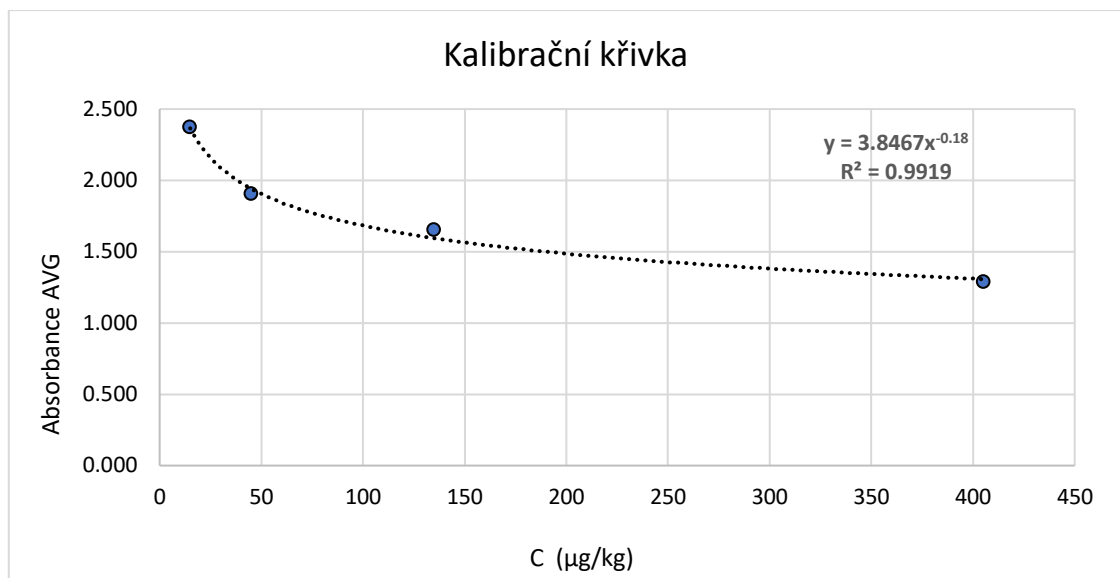
Bylina	C AVG (ng/g)	± SMODCH
<i>Sylibum marianum fructus</i>	0,008962	± 0,000421
<i>Symphytum officinale radix</i>	0,096140667	± 0,001043
<i>Taraxacum officinale radix</i>	0,051818333	± 0,001334
<i>Thymus herba</i>	0,099594	± 0,000411
<i>Tilia flos</i>	0,023594333	± 0,000504
<i>Urtica dioica herba</i>	0,026757333	± 0,00052
<i>Vaccinium myrtillus herba</i>	0,053349	± 0,003654
<i>Vaccinium vitis-idaea folium</i>	0,220921667	± 0,003877
<i>Valeriana officinalis radix</i>	0,010954333	± 0,000278
<i>Verbascum flos</i>	0,016609667	± 0,000722

C AVG ($\mu\text{g/l}$) průměrná koncentrace ve vzorku měřeného v triplikátu v $\mu\text{g/l}$
 ± SMODCH ± směrodatná odchylka měření

3.2 Stanovení CIT

Pro stanovení hodnot a množství CIT ve farmaceutických bylinách z provedeného testu RIDASCREEN®FAST Citrinin byl opět použit program Gen5 a spektrofotometr. Pro získání konkrétních hodnot a koncentrace CIT ve vzorku bylo nutné vytvoření kalibrační křivky. Za pomoci kalibrační křivky, vytvořené kalibrační řadou roztoků z kitu testu RIDASCREEN®FAST Citrinin, byly z naměřených absorbancí vypočítány koncentrace pro CIT v měřených vzorcích.

Naměřená absorbance při 450 nm při stanovení byla nepřímo úměrná koncentraci CIT v daném vzorku. Vyšší hodnoty naměřené absorbance tedy znamenaly nižší hodnoty CIT, což se koncentrace v určitém vzorku týče. Vzorky byly jako u přechodného stanovení OTA měřeny v triplikátu. Z těchto třech měření byla následně spočítána průměrná hodnota uvedená v tabulkách níže.



Obrázek 3 Kalibrační křivka vytvořená za pomoci kalibrační řady standardů, jež byly součástí použitého testovacího kitu RIDASCREEN®FAST Citrinin.

Tabulka 7 Výsledky stanovení CIT u vzorků číslo 1-15

Stanovení CIT (vzorek č. 1-15)

Bylina	C AVG (µg/kg)	± SMODCH
<i>Achillea millefolium flos</i>	25281,86298	± 933,5884
<i>Agrimonia eupatoria herba</i>	1993,068204	± 82,21652
<i>Alchemilla herba</i>	1324,868423	± 126,3788
<i>Althaea officinalis folium</i>	386,198309	± 8,092212
<i>Articum lappa radix</i>	39,47290074	± 0,55237
<i>Artemisia absinthium herba</i>	562,1064947	± 37,78423
<i>Angelica arhcangelica radix</i>	455,5281656	± 46,81974
<i>Bellis perennis flos</i>	1985,408725	± 77,33823
<i>Borago officinalis herba</i>	1070,539386	± 110,3405
<i>Calendula officinalis flos</i>	74,26696073	± 4,653881
<i>Carlina radis</i>	53,61696059	± 1,816696
<i>Centaurium herba</i>	332,8262595	± 19,10304
<i>Chelidonium majus herba</i>	261,5467953	± 4,167234
<i>Cichorium intybus herba</i>	800,7677549	± 23,2181
<i>Cnicus benedictus</i>	782,0351333	± 22,51817

C AVG (µg/l) průměrná koncentrace ve vzorku měřeného v triplikátu v µg/l
 ± SMODCH ± směrodatná odchylka měření

Tabulka 8 Výsledky stanovení CIT u vzorků číslo 16-40

Stanovení CIT (vzorek č. 16-40)

Bylina	C AVG (µg/kg)	± SMODCH
<i>Crataegus fructus</i>	2171,436134	± 283,7555
<i>Echinacea flos</i>	< MLD	< MLD
<i>Echinacea radix</i>	5,759818587	± 1,456989
<i>Elymus repens</i>	13,49077887	± 0,453455
<i>Eucalyptus folium</i>	4990,718785	± 167,6523
<i>Fagopyrum sagittatum herba</i>	169,6109773	± 11,74865
<i>Filipendula ulmaria herba</i>	287,1051775	± 12,87276
<i>Fragaria folium</i>	15,32008	± 0,969261
<i>Galium odoratum herba</i>	< MLD	< MLD
<i>Galium verum herba</i>	17,25652624	± 0,665694
<i>Gentiana lutea radix</i>	< MLD	< MLD
<i>Ginkgo biloba</i>	76,79819593	± 6,102891
<i>Humulus lupulus strobilus</i>	36,40707736	± 4,326434
<i>Hyssopus officinalis herba</i>	143,0628296	± 1,462398
<i>Juglans regia folium</i>	808,4159781	± 49,1145
<i>Laimum album herba</i>	18,80091172	± 1,066084
<i>Lavandula angustifolia flos</i>	75,10255854	± 1,466367
<i>Linaria herba</i>	< MLD	< MLD
<i>Malva flos</i>	< MLD	< MLD
<i>Malva folium</i>	11,4697695	± 0,32682
<i>Marrubium herba</i>	15,93491224	± 0,671967
<i>Maral leuzea herba</i>	560,8859705	± 29,27724
<i>Melissa officinalis herba</i>	56,33366621	± 1,736752
<i>Melilotus officinalis</i>	63,5613234	± 4,956713
<i>Petasites hybridus radix</i>	47,48513691	± 2,261417

C AVG (µg/l) průměrná koncentrace ve vzorku měřeného v triplicátu v µg/l

± SMODCH ± směrodatná odchylka měření

< MLD hodnoty nižší než minimální limit detekce RIDASCREEN®FAST testu na jamku

Tabulka 9 Výsledky stanovení CIT u vzorků číslo 41-60

Stanovení CIT (vzorek č. 41–60)

Bylina	C AVG ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	\pm SMODCH
<i>Pimpinella radix</i>	< MLD	< MLD
<i>Plantago folium</i>	36,72401695	\pm 1,965458
<i>Potentilla argentea herba</i>	16,48419431	\pm 0,538647
<i>Potentilla erecta</i>	< MLD	< MLD
<i>Primula veris flos</i>	4,450209221	\pm 0,205736
<i>Pulmonaria officinalis folium</i>	7,089189761	\pm 0,204723
<i>Rosa canina fructus</i>	2256,240316	\pm 79,09964
<i>Rubus fruticosus folium</i>	387,8232033	\pm 7,513277
<i>Rubus idaeus folium</i>	1058,176501	\pm 48,64382
<i>Sambucus nigra flos</i>	443,7816588	\pm 22,82742
<i>Sylibum marianum fructus</i>	24,43233637	\pm 0,226628
<i>Symphytum officinale radix</i>	14,96406226	\pm 0,222227
<i>Taraxacum officinale radix</i>	18,61317341	\pm 3,632296
<i>Thymus herba</i>	213,0376217	\pm 15,69989
<i>Tilia flos</i>	363,3276155	\pm 39,88104
<i>Urtica dioica herba</i>	123,6744989	\pm 12,37043
<i>Vaccinium myrtillus herba</i>	151,1872094	\pm 74,36801
<i>Vaccinium vitis-idaea folium</i>	952,9362148	\pm 101,2185
<i>Valeriana officinalis radix</i>	194,969268	\pm 44,08622
<i>Verbascum flos</i>	49,38612222	\pm 3,796643

C AVG ($\mu\text{g}/\text{l}$) průměrná koncentrace ve vzorku měřeného v triplikátu v $\mu\text{g}/\text{l}$

\pm SMODCH \pm směrodatná odchylka měření

< **MLD** hodnoty nižší než minimální limit detekce RIDASCREEN®FAST testu na jamku

4 Diskuze

Výsledky provedeného testu pro stanovení OTA ve vzorcích (viz. tabulky 3-6) je nutné, vzhledem k limitu detekce stanoveného na 1,25 ppb, který je uváděn pro použitý postup v rámci této práce, vyhodnotit jako negativní, a to u všech 60 vzorků. Všechny 60 vzorků (100 % výsledků) se nacházelo pod daným limitem detekce. Nejvyšší zjištěná koncentrace a kontaminace OTA byla zjištěna u *Hyssopus officinalis herba* s hodnotou 0,2884 ng/g.

Použití test RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 však prošel v roce 2021 revizí, při které byly změněny koncentrace jednotlivých standardů, konjugát je ve formě „připraveno k užití“ a hranice limitu detekce se podstatně snížila. Pracovní postup a implementace samotného testu je však prakticky totožná s námi použitým testem z roku 2020. V případě nižšího spodního limitu detekce by výsledky bylo možné vyhodnotit jinak a některé jako pozitivní.

V porovnání s dostupnými studiemi a dostupnou literaturou, řešící obdobnou problematiku, jsou hodnoty, co se stanovení OTA týče, v rámci této práce nižší. V porovnání se studií, jež proběhla ve Španělsku v roce 2009 a zabývala se screeningem medicínálních a aromatických bylin, jsou hodnoty OTA o jeden a více řádů vyšší v porovnání s hodnotami v tabulkách 3-6 [75]. Pro porovnání u kořene byliny *Valeriana* byly v určitých vzorcích v rámci Španělské studie naměřeny hodnoty 0,8 a 1,8 ng/g (0,8 a 1,8 µg/kg), kdežto mnou zjištěné hodnoty činily u kořene byliny *Valeriana* 0,0109 ng/g (=0,0109 µg/kg) [75]. Mírně vyšší hodnoty detekce OTA vykazuje i studie publikovaná v roce 2020, stanovující širší spektrum mykotoxinů u 7 medicínálních bylin, tato studie však nevykazovala tak vysoké hodnoty, jako dříve v diskuzi zmíněna studie [75, 76]. Rheinholds, Bogdanova & et al. stanovovali mykotoxiny v bylinných čajích, které jsou volně dostupné na území celého Lotyšska. Jedním z výstupů této studie bylo, že celkem 20 % měřených vzorků bylo pozitivních na přítomnost OTA [77]. Naproti těmto výsledkům se staví má práce, při které je nutné, s ohledem na limit detekce uvést, že nebyl OTA detekován u žádného z měřených vzorků, a tedy vzorky byly ve 100 % negativní. Každopádně je z dostupné literatury jasné, že OTA se v sušených částech různých

bylin, medicijnálních bylinách a bylinných čajích vyskytuje v menší či větší míře a tyto produkty mohou být náchylné, ať již primárně nebo sekundárně, ke kontaminaci tímto mykotoxinem [75, 76, 77].

Po dokončení stanovení množství a míry kontaminace CIT v měřených vzorcích pomocí testu RIDASCREEN®FAST Citrinin byla u 13 vzorků zjištěná koncentrace pod udávaným limitem detekce, který činí 15 µg/kg (ppb). Z tohoto důvodu je nutné vyhodnotit 21,6667 % vzorků jako negativních. Všechny zbylé 47 vzorků, a tedy 78,3333 % vykazovalo pozitivitu a kontaminaci CIT. Z těchto vzorků 17 vykazovalo hodnoty s koncentrací vyšší než u nejvyššího standardu.

RIDASCREEN®FAST Citrinin je semikvantitativní metodou, kde vzorky s koncentrací vyšší než 405 µg/kg (koncentrace nejvyšší standardu) by bylo vhodné naředit na hodnotu koncentrace maximálně tohoto standardu a poté verifikovat výsledek. Hodnota koncentrace nejvyššího standardu je dle výrobce maximální spolehlivá hodnota a vrchní limit detekce na jamku. Výsledky s koncentrací vyšší, než tento standard můžeme považovat za pozitivní na úrovni nejvyššího standardu, ale nelze přesně určit koncentraci a míru kontaminace CIT. Z důvodu nedostatku času, pandemii Covid-19, problematického a omezeného přístupu do univerzitní laboratoře a nedostatku potřebného materiálu, nebylo možné naředit a opětovně měření daných vzorků vykonat. Vše bude případně ověřeno a znovu detailněji měřeno v následující Mgr. práci, která se bude zabývat stejným typem materiálu.

Studie a články zabývající se problematikou CIT v medicijnálních a léčivých bylinách jsou limitované a literatury na toto téma se příliš nevyskytuje. Získané výsledky jsou se dostupnou literaturou shoduje, že medicijnální a léčivé byliny jsou a mohou být kontaminovány CIT [75, 78, 79]. I přesto, že není možné přesně stanovit přesné množství CIT u několika vzorků je zcela zjevné, že zjištěná kontaminace CIT značně převyšuje hodnoty uváděné v dalších zdrojích a literatuře [75, 78, 79]. Pro demonstrování tohoto rozdílu mezi touto prací a dostupnou literaturou můžeme opět použít příklad kořene byliny *Valeriana*, který byl testován v rámci této práce i ve výše zmíněné studii ve Španělsku roku 2009. V této španělské studii jeden vzorek kořene rodu *Valeriana* byl pod limitem detekce a druhý vzorek byl kontaminován

20,5 µg/kg CIT, zatímco průměrná hodnota v rámci této práce dosáhla 194,969 µg/kg CIT [75]. Jedná se tedy o hodnotu téměř 10x vyšší a zároveň se nejedná o vzorek, který by v rámci této práce patřil k těm s nejvyšší kontaminací a v rámci stanovení CIT se u mnoha vzorků vyskytla i kontaminace znatelně vyšší než u *Valeriana officinalis radix*.

Tato práce také patrně představuje jedinou studii, která stanovuje CIT v medicínálních a léčivých bylinách v takovémto rozsahu a na takovémto množství druhů. Jiné v diskuzi výše zmíněné publikace se zabývaly determinací CIT u značně nižšího množství vzorků, a to například i řádově.

Za nutné považuji v diskuzi zmínit i fakt, že není zatím možné přesně odhadnout a dělat závěry, co se týče transferu OTA a CIT ze sušené byliny do finální podoby odvaru, nebo nálevu, který je následně konzumován. Problematickým faktorem je i dávka, která je používána k přípravě nápoje. V mnohých případech je doporučená dávka k užívání udávána výrobcem v čajových lžičkách, což dle mého názoru je velmi nekonzistentní forma dávkování, a ne příliš určitá informace, která se může lišit a může mít značný vliv na množství mykotoxinů, které přecházejí do finálně připraveného odvaru, nálevu, a tudíž se může i lišit míra expozice a přijaté množství mykotoxinů jedním připraveným nápojem. I tímto se bude zabývat následující Mgr. práce. Dle studie provedené Ostrým, jsou k expozici OTA, a tedy lze předpokládat, že i dalším vyskytujícím se mykotoxinům, formou čajů a odvarů nejvíce suspektní ženy ve věku od 18 do 59 let a dále pak věková skupina starších 60 let [80]. Dovoluji si na závěr diskuze stanovit hypotézu v návaznosti na studii zmíněnou výše v praktické části. Dle mého názoru bude podobně jako u kávy množství OTA, které končí v nápoji jako finálním produktem a je mu člověk po konzumaci nápoje vystaven, s velkou pravděpodobností závislé na způsobu přípravy a také na času, po který je medicínální bylina, směs pro přípravu čaje extrahována [11]. Vliv na extrakci, a tedy i transfer mykotoxinů může mít vliv hrubost namleté směsi i například teplota vody, která je použita k zalití. Všechny tyto skutečnosti mohou přispět k problematické determinaci množství mykotoxinů, které přešlo ze sušených částí byliny do konzumovaného nápoje, a tedy jaký je celkový procentuální přenos.

Závěr

Hlavním důvodem pro vypracování této práce byla skutečnost, že jsem chtěl, aby bakalářská práce nebyla pouze rešerší, ale měla i praktický výstup a praktickou část. V rámci praktické části jsem chtěl získat zkušenosti z laboratorního prostředí a vyzkoušet si pohyb na laboratorním pracovišti a získat co nejvíce pracovních zkušeností, které bych mohl do budoucna dále využít. Toto zadání a téma bakalářské práce mi poskytlo skvělou příležitost a splňovalo výše zmíněné podmínky.

Výstupem praktické části práce je stanovení mykotoxinů CIT a OTA v medicínálních bylinách a čajích, které jsou běžně dostupné v prodeji a jsou volně prodejné. Vzhledem k tomu, že se mi nepodařilo dohledat mnoho zdrojů a literatury, týkající se přímo této problematiky a řešící společné množství a společnou kontaminaci CIT a OTA ve farmaceutických, léčivých a medicínálních bylinách a čajích, je možné, že se jedná o jedinou práci a stanovení, řešící přesně tuto problematiku v takovém rozsahu a u takového množství různých bylin. Práce by tedy snad mohla sloužit jako podklad pro důkladnější studii této problematiky a rozšíření o studie a výzkumy, zabývající se množstvím přeneseného množství mykotoxinů při tvorbě odvarů a také jaká může být průměrná konzumace a expozice těmto mykotoxinům při běžné konzumaci těchto volně dostupných výrobků a potravinových doplňků.

Seznam použitých zkratk

- **AA** – Aristochoic Acid, aristocholová kyselina
- **AD** – Alzheimer's disease, Alzheimerova choroba
- **ATP** – Adenosine triphosphate, adenosintrifosfát
- **BEN** – Balkan Endemic Nephropathy, Balkánská endemická nefropatie
- **CHN** – Chinese Herb Nephropathy, čínská bylinná nefropatie
- **CHRI** – Chronal Renal Insufficiency, Chronická renální insuficience
- **CIT** – Citrinin
- **DH-CIT** – Dihydrocitrinon
- **DNA** – Deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
- **EFSA** – European Food Safety Authority, Evropský úřad pro bezpečnost potravin
- **ELISA** – Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
- **EU** – Evropská unie
- **IARC/WHO** – International Agency for Research on Cancer/World Health Organization, Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny Světové zdravotnické organizace
- **IgG** – Immunoglobulin G, Immunoglobuliny G
- **IgM** – Immunoglobulin M, Immunoglobuliny M
- **NOAEL** – No-Observed-Adverse-Effect Level, nejvyšší dávka při níž nebyl zjištěn negativní účinek
- **OATs** – Organic Anion Transporters, organické přenašeče aniontů
- **OATPs** – Organic Anion-Transporting Polypeptides, polypeptidy přenášející organické anionty
- **OP-OTA** – lactone-opened OTA
- **OTA** – Ochratoxin A
- **OTB** – Ochratoxin B
- **OTC** – Ochratoxin C
- **OT α** – Ochratoxin α
- **PD** – Parkinson's disease, Parkinsonova choroba
- **RNA** – Ribonucleic Acid, ribonukleová kyselina
- **tRNA** – transfer Ribonucleic Acid, transferová ribonukleová kyselina

Seznam zdrojů a literatura

1. Malíř, F., Ostrý, V., Bárta, I., Buchta, V., Dvořáčková, I., Paříková, J., Severa, J., Škarková, J. (2003). Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003, vol. 1. ISBN 80-7013-395-3.
2. Etzler, R. A. (2002). Mycotoxins. JAMA. 287/4: 425-427.
<https://doi.org/10.1001/jama.287.4.425>.
3. Pohanka, M. (2008). Aflatoxiny. Toxicology.cz [online]. Dostupné z: <http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=177>.
4. Patočka, J. & kol. (2004). Vojenská toxikologie. 1. vyd. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0608-3.
5. Ostrý, V. (1998). Vlákňité mikroskopické houby (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. Státní zdravotní ústav. 1998. ISBN 80-7071-102-7
6. Šilhánová, L. (2002). Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Praha 2, Legerova 61. Academia, 2002. ISBN 8-85605-71-6
7. Schindler, J. (2010). Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů. Praha 7, U Průlomu 2. Grada Publishing, a.s. 2010. ISBN 978-80-247-3170-4
8. Šultesová, H., Brndiar, M., Ačerovský, J., Malíř, F., Knížek, J., Jebavý, L., & Horáček, J. M. (2007) Incidence of ochratoxin A in Czech Regions. MMSL. 2007;76(6):216-20.
9. Malíř, F. (2001). A study of mycotoxin ochratoxin A accumulation in patients with chronic renal insufficiency. MMSL, 70(1), 22-26.
10. Betina, V. (1990). Mykotoxíny, Chémia-biológia-ekológia. Bratislava: Alfa, 1990. ISBN 80-05-00631-4
11. Malíř, F., Ostrý, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Toman, J., Bazin, I., & Roubal, T. (2014). Transfer of Ochratoxin A into Tea and Coffee Beverages. Toxins, 6(12), 3438–3453. <https://doi.org/10.3390/toxins6123438>
12. Toman, J., Malíř, F., & Ostrý, V., (2016). Transfer of ochratoxin A from black teas to tea beverages according to type of preparation.
13. Malíř, F., Roubal, T., Severa, J., Černá, M., & Brndiar, M. (2002). Ochratoxin A (OTA) determination in the human kidneys. MMSL, 71(1), 33-36.

14. Hood, R. D., Naughton, M. J., & Hayes, A. W. (1976). Prenatal effects of Ochratoxin A in hamsters. *Teratology*, 13(1), 11–14.
<https://doi.org/10.1002/tera.1420130103>
15. Malíř, F. (2001). A study of mycotoxin ochratoxin A accumulation in patients with chronic renal insufficiency. *MMSL*, 70(1), 22-26.
16. Malíř, F., Černá, M., Severa, J., & Jergeová, Z. (1998). Ochratoxin A - toxikologický význam, expozice člověka a zdravotní riziko. *Hygiena*, 1998, 43 , s.49-62.
17. Palma, N., Cinelli, S., Sapora, O., Wilson, S. H., & Dogliotti, E. (2007). Ochratoxin A-induced mutagenesis in mammalian cells is consistent with the production of oxidative stress. *Chemical research in toxicology*, 20(7), 1031–1037. <https://doi.org/10.1021/tx700027j>
18. Cavin, C., Delatour, T., Marin-Kuan, M., Holzhäuser, D., Higgins, L., Bezençon, C., Guignard, G., Junod, S., Richoz-Payot, J., Gremaud, E., Hayes, J. D., Nestler, S., Mantle, P., & Schilter, B. (2007). Reduction in antioxidant defenses may contribute to ochratoxin A toxicity and carcinogenicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 96(1), 30–39.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl169>
19. Bendele, A. M., Carlton, W. W., Krogh, P., & Lillehoj, E. B. (1985). Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J X C3H)F1 mouse. *Journal of the National Cancer Institute*, 75(4), 733–742. <https://doi.org/10.1093/jnci/75.4.733>
20. National Toxicology Program (1989). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ochratoxin A (CAS No. 303-47-9) in F344/N Rats (Gavage Studies). *National Toxicology Program technical report series*, 358, 1–142.
21. Malíř, F., Osrý, V., Pfohl-Leskowicz, A., Malíř, J., Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins*, 191.
<https://doi.org/10.3390/toxins8070191>
22. Belmadani, A., Steyn, P., Tramu, G. *et al.* Selective toxicity of ochratoxin A in primary cultures from different brain regions. *Arch Toxicol* 73, 108–114 (1999). <https://doi.org/10.1007/s002040050594>
23. Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., Harbison, R., & Sánchez-Ramos, J. (2006). Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-

- A. *Neurotoxicology*, 27(1), 82–92.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2005.07.004>
24. Doi, K., & Uetsuka, K. (2011). Mechanisms of mycotoxin-induced neurotoxicity through oxidative stress-associated pathways. *International journal of molecular sciences*, 12(8), 5213–5237.
<https://doi.org/10.3390/ijms12085213>
25. Richard, L., et al., (2003) Mycotoxins – risk in plant, animal and human systems. Council for Agriculture Science and Technology. Ames (USA): Task Force Report. 2003. ISBN 1-88733-22-0
26. Hetherington, A. C., & Raistrick H. (1931). Studies in the Biochemistry of Micro-organisms. Part XIV.—On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 220269–295.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1931.0025>
27. Ahamad, D. B. (2019). Toxic Effects of Citrinin in Animals and Poultry.
28. Čulig, B., Bevardi, M., Bošnjir, J., Serdar, S., Lasić, D., Racz, A., Galić, A., & Kuharić, Ž. (2017). PRESENCE OF CITRININ IN GRAINS AND ITS POSSIBLE HEALTH EFFECTS. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM*, 14(3), 22–30.
<https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i3.3>
29. Tangni, E. K., & Pussemier, L. (2006). Ochratoxin A and citrinin loads in stored wheat grains: impact of grain dust and possible prediction using ergosterol measurement. *Food additives and contaminants*, 23(2), 181–189.
<https://doi.org/10.1080/02652030500391911>
30. Wawrzyniak, J., & Waśkiewicz, A. (2014). Ochratoxin A and citrinin production by *Penicillium verrucosum* on cereal solid substrates. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 31(1), 139–148.
<https://doi.org/10.1080/19440049.2013.861933>
31. Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M., Michelon, J., & Maru, V. (1991). Ochratoxin A and other mycotoxins in cereals from an area of Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. *IARC scientific publications*, (115), 83–87.

32. A. K. Roy & V. Kumari (1991) Aflatoxin and Citrinin in Seeds of Some Medicinal Plants under Storage. *International Journal of Pharmacognosy*, 29:1, 62-65.
<https://doi.org/10.3109/13880209109082851>
33. Dietrich, R., Schmid, A. & Märtlbauer, E. (2001). Citrinin in fruit juices. *Mycotox Res* 17, 156–159. <https://doi.org/10.1007/BF03036426>
34. Jelaković, B., Karanović, S., Vuković-Lela, I., Miller, F., Edwards, K. L., Nikolić, J., Tomić, K., Slade, N., Brdar, B., Turesky, R. J., Stipančić, Ž., Dittrich, D., Grollman, A. P., & Dickman, K. G. (2012). Aristolactam-DNA adducts are a biomarker of environmental exposure to aristolochic acid. *Kidney international*, 81(6), 559–567. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.371>
35. De Broe, M. E. (2012). Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy: toward a single entity, aristolochic acid nephropathy. *Kidney international*, 81(6), 513–515. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.428>
36. Anninou, N., Chatzaki, E., Papachristou, F., Pitiakoudis, M., & Simopoulos, C. (2014). Mycotoxins' activity at toxic and sub-toxic concentrations: differential cytotoxic and genotoxic effects of single and combined administration of sterigmatocystin, ochratoxin A and citrinin on the hepatocellular cancer cell line Hep3B. *International journal of environmental research and public health*, 11(2), 1855–1872.
<https://doi.org/10.3390/ijerph110201855>
37. Pepeljnjak, S., & Šegvić Klarić, M. (2010). Suspects in Etiology of Endemic Nephropathy: Aristolochic Acid versus Mycotoxins. *Toxins*, 2, 1414-1427.
<https://doi.org/10.3390/toxins2061414>
38. Ahamad, D. B. (2019). Toxic Effects of Citrinin in Animals and Poultry.
39. Jordan, W. H., & Carlton, W. W. (1978). Citrinin mycotoxicosis in the Syrian hamster. *Food and cosmetics toxicology*, 16(4), 355–363.
[https://doi.org/10.1016/s0015-6264\(78\)80007-8](https://doi.org/10.1016/s0015-6264(78)80007-8)
40. Jordan, W. H., Carlton, W. W., & Sansing, G. A. (1978). Citrinin mycotoxicosis in the rat I. Toxicology and pathology. *Food and Cosmetics Toxicology*, 16, 431-439. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(78\)80261-2](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(78)80261-2)

41. Jordan, W. H., Carlton W. W., & Sansing, G. A. (1977). Citrinin mycotoxicosis in the mouse. *Food and Cosmetics Toxicology*, *15*, 29-34.
[https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(77\)80259-9](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(77)80259-9)
42. Jordan, W. H., & Carlton, W. W. (1978). Citrinin mycotoxicosis in the Syrian hamster. *Food and cosmetics toxicology*, *16*(4), 355–363.
[https://doi.org/10.1016/s0015-6264\(78\)80007-8](https://doi.org/10.1016/s0015-6264(78)80007-8)
43. Krogh, P., Axelsen, N. H., Elling, F., Gyrd-Hansen, N., Hald, B., Hyldgaard-Jensen, J., Larsen, A. E., Madsen, A., Mortensen, H. P., Moller, T., Petersen, O. K., Ravnskov, U., Rostgaard, M., & Aalund, O. (1974). Experimental porcine nephropathy. Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A- contaminated feed. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Supplement*, *0*(Suppl 246), 1–21.
44. Dunn, B. B., Stack, M. E., Park, D. L., Joshi, A., Friedman, L., & King, R. L. (1983). Isolation and identification of dihydrocitrinone, a urinary metabolite of citrinin in rats. *Journal of toxicology and environmental health*, *12*(2-3), 283–289. <https://doi.org/10.1080/15287398309530426>
45. Föllmann, W., Behm, C., & Degen, G. H. (2014). Toxicity of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone and of mixtures of citrinin and ochratoxin A in vitro. *Archives of toxicology*, *88*(5), 1097–1107.
<https://doi.org/10.1007/s00204-014-1216-8>
46. Ali, N., & Degen, G. H. (2019). Citrinin biomarkers: a review of recent data and application to human exposure assessment. *Archives of toxicology*, *93*(11), 3057–3066. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02570-y>
47. Phillips, R. D., Berndt, W. O., & Hayes, A. W. (1979). Distribution and excretion of [¹⁴C]citrinin in rats. *Toxicology*, *12*(3), 285–298.
[https://doi.org/10.1016/0300-483x\(79\)90075-1](https://doi.org/10.1016/0300-483x(79)90075-1)
48. Frank H. K. (1992). Citrinin. *Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft*, *31*(3), 164–177. <https://doi.org/10.1007/BF01611139>
49. Degen, G. H., Ali, N., & Gundert-Remy, U. (2018). Preliminary data on citrinin kinetics in humans and their use to estimate citrinin exposure based on biomarkers. *Toxicology letters*, *282*, 43–48.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.10.006>

50. Degen, G. H., Ali, N., & Gundert-Remy, U. (2018) Recent advances in bio-monitoring of human exposure to the mycotoxin citrinin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch* 391(Suppl 1):S84–S85.
51. Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuča, K., Wang, X., Chen, G., & Yuan, Z. (2011). Metabolic pathways of ochratoxin A. *Current drug metabolism*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.2174/138920011794520026>
52. Hagelberg, S., Hult, K., & Fuchs, R. (1989). Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *Journal of applied toxicology : JAT*, 9(2), 91–96. <https://doi.org/10.1002/jat.2550090204>
53. Kőszegi, T., & Poór, M. (2016). Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. *Toxins*, 8(4), 111. <https://doi.org/10.3390/toxins8040111>
54. Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y. J., & Larondelle, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-biological interactions*, 159(1), 18–46. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.106>
55. Galtier, P., Alvinerie, M., & Charpentreau, J. L. (1981). The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food and cosmetics toxicology*, 19(6), 735–738. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(81\)90528-9](https://doi.org/10.1016/0015-6264(81)90528-9)
56. Marin, D., Taranu, I., Tabuc, C., & Burgehelea, M. (2009). Ochratoxin: nature, origin, metabolism and toxic effects in pigs.
57. Anzai, N., Jutabha, P., & Endou, H. (2010). Molecular mechanism of ochratoxin a transport in the kidney. *Toxins*, 2(6), 1381–1398. <https://doi.org/10.3390/toxins2061381>
58. Anzai, N., Jutabha, P., & Endou, H. (2010). Molecular mechanism of ochratoxin a transport in the kidney. *Toxins*, 2(6), 1381–1398. <https://doi.org/10.3390/toxins2061381>
59. Heussner, A. H. & Bingle, L. E. H. (2015). Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. *Toxins*, 7(10), 4253–4282. <https://doi.org/10.3390/toxins7104253>

60. Støren, O., Holm, H., & Størmer, F. C. (1982). Metabolism of ochratoxin A by rats. *Applied and environmental microbiology*, 44(4), 785–789.
<https://doi.org/10.1128/aem.44.4.785-789.1982>
61. Pinelli, E., El Adlouni, C., Pipy, B., Quartulli, F., & Pfohl-Leszkowicz, A. (1999). Roles of cyclooxygenase and lipoxygenases in ochratoxin A genotoxicity in human epithelial lung cells. *Environmental toxicology and pharmacology*, 7(2), 95–107. [https://doi.org/10.1016/s1382-6689\(99\)00008-3](https://doi.org/10.1016/s1382-6689(99)00008-3)
62. Creppy, E. E., Størmer, F. C., Rösenthaller, R., & Dirheimer, G. (1983). Effects of two metabolites of ochratoxin A, (4R)-4-hydroxyochratoxin A and ochratoxin alpha, on immune response in mice. *Infection and immunity*, 39(3), 1015–1018. <https://doi.org/10.1128/iai.39.3.1015-1018.1983>
63. Roth, A., Chakor, K., Creppy, E. E., Kane, A., Rosenthaller, R., & Dirheimer, G. (1988). Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology*. Mar;48(3):293-308. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(88\)90110-2](https://doi.org/10.1016/0300-483X(88)90110-2).
64. Klarić, M. S., Rašić, D., & Peraica, M. (2013). Deleterious effects of mycotoxin combinations involving ochratoxin A. *Toxins*, 5(11), 1965–1987.
<https://doi.org/10.3390/toxins5111965>
65. Glahn, R. P., Wideman, R. F., Jr, Evangelisti, J. W., & Huff, W. E. (1988). Effects of ochratoxin A alone and in combination with citrinin on kidney function of single comb White Leghorn pullets. *Poultry science*, 67(7), 1034–1042.
<https://doi.org/10.3382/ps.0671034>
66. Manning, R. O., Brown, T. P., Wyatt, R. D., & Fletcher, O. J. (1985). The individual and combined effects of citrinin and ochratoxin A in broiler chicks. *Avian diseases*, 29(4), 986–997. <https://doi.org/10.2307/1590451>
67. Kumar, M., Dwivedi, P., Sharma, A. K., Singh, N. D., & Patil, R. D. (2007). Ochratoxin A and citrinin nephrotoxicity in New Zealand White rabbits: an ultrastructural assessment. *Mycopathologia*, 163(1), 21–30.
<https://doi.org/10.1007/s11046-006-0079-9>
68. Ostrý, V., & Škarková, J. (2003) Metodické doporučení mikrobiologickému zkoušení potravin a pokrmů. Kultivační metoda průkazu aflatoxinogenních

- mikromicetů (plísní) *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* v potravinách a pokrmech. *SZÚ, 1*: 28. ISSN 0862-5956.
69. Ostrý, V., Škarková, J., Malíř, F., & Sýkorová, S. (2004). Advances on the occurrence of toxinogenic fungi and mycotoxins in the Czech Republic, in: Logrieco, A., Visconti, A., (ed) *An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 67-81.
70. Toman, J. (2018). Stanovení mykotoxinu ochratoxinu A a jeho možné dopady na lidské zdraví [Disertační práce], Přírodovědecká fakulta, Univerzita Hradec Králové.
71. Alexander, J., Benford, D., Boobis, A., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Cravedi, J.-P., Domenico, A., Doerge, D., Dogliotti, E., Edler, L., Farmer, P., Filipič, M., Fink-Gremmels, J., Fürst, P., Guérin, T., Knutsen, H. K., Machala, M., Mutti, A., Rose, M., Schlatter, J., & van Leeuwen, R. (2012). Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. *EFSA Journal* 2012, 10(3), 2605. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2605>
72. Mze. (2018) Odbor bezpečnosti potravin. Kontaminanty v potravinách – přehled hlavních témat diskutovaných v EK. [online]. 2018, Informační centrum bezpečnosti potravin. (citováno 7.7.2021) Dostupné WWW: <<https://www.bezpecnostpotravin.cz/aktualni-diskutovana-temata-v-oblasti-kontaminantu-v-potravinach-unor-2021.aspx>>
73. R-Biopharm AG. (2020). RIDASCREEN®FAST Citrinin: *Instructions manual*. An der neuen Bergstraße 17, Darmstadt, 64297, Germany. R-Biopharm AG.
74. R-Biopharm AG. (2020). RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15: *Instructions manual*. An der neuen Bergstraße 17, Darmstadt, 64297, Germany. R-Biopharm AG.
75. Santos, L., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2009). Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(10), 1802–1807. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3647>
76. Altyn, I., & Twaružek, M. (2020). Mycotoxin Contamination Concerns of Herbs and Medicinal Plants. *Toxins*, 12(3), 182. <https://doi.org/10.3390/toxins12030182>

77. Reinholds, I., Bogdanova, E., Pugajeva, I., & Bartkevics, V. (2019). Mycotoxins in herbal teas marketed in Latvia and dietary exposure assessment. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 1–10. <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1597927>
78. Li, Y., Zhou, Y.-C., Yang, M.-H., & Ou-Yang, Z. (2012). *Natural occurrence of citrinin in widely consumed traditional Chinese food red yeast rice, medicinal plants and their related products. Food Chemistry*, 132(2), 1040–1045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.051>
79. Chen, Guo, Zheng, Zhou, Liu, Chen, ... Zhang. (2020). *Occurrence and Characterization of Fungi and Mycotoxins in Contaminated Medicinal Herbs. Toxins*, 12(1), 30. <https://doi.org/10.3390/toxins12010030>
80. Ostry, V., Malir, F., Dofkova, M., Skarkova, J., Pfohl-Leszkowicz, A., & Ruprich, J. (2015). Ochratoxin A Dietary Exposure of Ten Population Groups in the Czech Republic: Comparison with Data over the World. *Toxins*, 7(9), 3608–3635. <https://doi.org/10.3390/toxins7093608>