

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Mykotoxiny ochratoxiny a jejich toxicita

Bakalářská práce

Autor:	Eva Znamínková
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. František Malíř, Ph.D

V Hradci Králové

Červenec 2015

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta

Zadání bakalářské práce

Autor: Eva Znamínková

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Název závěrečné práce: Mykotoxiny ochratoxiny a jejich toxicita

Název závěrečné práce AJ: Mycotoxins ochratoxins and their toxicity

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Ochratoxiny patří mezi sekundární metabolity toxigenních vláknitých mikroskopických hub vykazující různou míru toxicity. Cílem bakalářské práce je poskytnout čtenáři ucelený přehled o této skupině mykotoxinů a to především o nejvýznamnějším zástupci ochratoxinu A.

Garantující pracoviště: Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.

Oponent: Ing. Vladimír Dvořák, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 27. 6. 2013

Datum odevzdání závěrečné práce:

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: Mykotoxiny ochratoxiny a jejich toxicita vypracovala samostatně, a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

Jméno a příjmení

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce, panu doc. RNDr. Františku Malířovi, Ph.D., za odborné vedení a pomoc, kterou mi věnoval po celou dobu vypracovávání mé práce.

Dále bych chtěla poděkovat panu Mgr. Jakubovi Tomanovi za odbornou pomoc a cenné rady.

Anotace

ZNAMÍNKOVÁ E., 2015: *Mykotoxiny ochratoxiny a jejich toxicita*. Přírodovědecká fakulta Univerzity Hradec Králové, 35 s. Bakalářská práce.

Ochratoxiny patří mezi nejzávažnější sekundární toxické metabolity produkované několika druhy vláknitých mikroskopických hub a to především druhy rodu *Penicillium* a *Aspergillus*. Nejvýznamnějším a nejrozšířenějším mykotoxinem této skupiny je ochratoxin A (OTA), který vykazuje akutní a chronickou toxicitu a tím představuje velké riziko pro zdraví lidí a zvířat. OTA je všudypřítomný, přirozeně se vyskytující mykotoxin, u kterého byly prokázány značné toxické účinky, jako jsou nefrotoxicita, teratogenita, hepatotoxicita, neurotoxicita, imunotoxicita, genotoxicita a karcinogenita (karcinogen skupiny 2B). OTA je významný přírodní mykotoxin kontaminující suroviny, potraviny a krmiva, čímž dochází ke značným ekonomickým ztrátám. Ke kontaminaci může docházet již při zrání kulturních plodin, které se dále zpracovávají (primární kontaminace) nebo při přepravě a následném skladování (sekundární kontaminace). OTA se vyskytuje v potravinách živočišného (vejce, ryby, drůbež a mléko), ale především rostlinného původu jako jsou kakaové boby, kávová zrna, mouka, obiloviny, arašídy, sušené ovoce.

Cílem bakalářské práce je zpracování teoretické rešerše na téma mykotoxiny ochratoxiny a jejich toxicita.

Klíčová slova

ochratoxiny, ochratoxin A, OTA, toxicita OTA, metabolit, metabolické dráhy

Annotation

ZNAMÍNKOVÁ E., 2015: *Mycotoxins, ochratoxins and toxicity*. Faculty of Science University of Hradec Králové, 35p. Bachelor thesis.

Ochratoxins belong to the most important secondary toxic metabolites which are produced by a few kinds of microscopic fungi, namely by *Penicillium* and *Aspergillus*. The most significant and the most widespread mycotoxin from this group is ochratoxin A (OTA) which shows acute and chronic toxicity and thus it represents a big threat to human and animal health. OTA is an omnipresent mycotoxin whose presence is natural and which is proved to have significant toxic effects such as nephrotoxicity, teratogenicity, hepatotoxicity, neurotoxicity, immunotoxicity, genotoxicity and carcinogenicity (carcinogen 2B). OTA is a significant natural mycotoxin which contaminates resources, food and feed which results in big economical losses. Contamination can occur while ripening of cultural food which are further processed (primary contamination) or while it is transported and then stored (secondary contamination). OTA occurs both in animal products (eggs, fish, poultry and milk) and mainly vegetable foods such as cocoa beans, coffee beans, flour, grains, peanuts and dried fruit.

The aim of the bachelor thesis is to process theoretical researches about mycotoxins, ochratoxins and their toxicity.

Keywords

ochratoxins, ochratoxin A, OTA, toxicity OTA, metabolite, metabolic pathways

Obsah

1	Úvod.....	13
1.1	Historie mykotoxinů.....	14
1.2	Charakteristika mykotoxinů	15
1.3	Charakteristika plísní rodu <i>Aspergillus</i> a <i>Penicillium</i>	17
1.3.1	Popis a morfologie rodu <i>Aspergillus</i>	17
1.3.2	Popis a morfologie rodu <i>Penicillium</i>	19
1.4	Charakteristika mykotoxinů ochratoxinů.....	20
1.4.1	Producenti ochratoxinů.....	21
1.4.2	Ochratoxin A.....	22
1.4.3	Fyzikální vlastnosti OTA	23
1.4.4	Chemická charakteristika OTA.....	23
1.4.5	Metabolity OTA	26
1.4.6	Metabolické dráhy OTA u člověka	27
1.4.7	Rozšíření OTA	29
1.4.8	Výskyt OTA v potravinách.....	29
1.4.9	Hygienické a expoziční limity OTA.....	30
1.4.10	Biotransformace OTA.....	32
1.5	Toxicita ochratoxinů.....	33
1.6	Ochratoxin B.....	33
1.7	Ochratoxin C.....	34
1.8	OP-OTA.....	34
1.9	Chinonový (OTQ) a hydrochinonový (OTHQ) derivát.....	35
1.10	Ochratoxin A.....	35
1.10.1	Toxikokinetika OTA.....	36
1.11	Toxikologické hodnocení OTA.....	36
1.12	Akutní a subakutní toxicita.....	36
1.13	Chronická toxicita	37
1.13.1	Nefrotoxicita.....	37
1.14	Pozdní toxické účinky	38
1.14.1	Genotoxicita a mutagenita.....	38
1.14.2	Karcinogenita.....	40

1.14.3	Teratogenita	40
1.14.4	Imunosupresivní účinky	41
1.15	Biomonitoring OTA	42
1.15.1	Biologický monitoring lidských ledvin v ČR.....	43
1.16	Zdravotní riziko	43
1.17	Metody stanovení ochratoxinů	45
1.18	Možnosti detoxikace ochratoxinů.....	46
	Závěr.....	48
	Použitá literatura.....	50

Seznam obrázků a tabulek

Tab. č. 1	- Taxonomie rodu <i>Aspergillus</i>	17
Obr. č. 1	- Ascomycota – anamorfní stádium bez teleomorf	19
Tab. č. 2	- Taxonomie rodu <i>Penicillium</i>	19
Obr. č. 2	- Ascomycota – anamorfní stádium bez teleomorf.....	20
Obr. č. 3	- Chemická struktura OTA	24
Tab. č. 3	- Chemické struktury ochratoxinů a metabolitů OTA u zvířat a rostlin	25
Obr. č. 4	- Metabolické dráhy OTA	28

Terminologický slovník

aberrace	odchylka
adukt např. OTA-DNA	kovalentní vazba OTA na DNA
aflatoxiny	skupina mykotoxinů
amesův test	test sloužící ke stanovení karcinogenního a mutagenního potenciálu chemických sloučenin
aminokyseliny	organické kyseliny obsahující nejméně jednu aminovou (-NH ₂) a karboxylovou (-COOH) skupinu
biomarker	=biologický marker, látka používaná k identifikaci biologického stavu
biotransformace	přeměna chemické struktury látky působením živého organismu
cystein	neesenční aminokyselina
cytokinetika	osud xenobiotika v buňce
cytoskelet	trojrozměrná síť v cytoplasmě eukaryotických buněk
cytotoxicita	schopnost chemických látek ničit buňky
embryotoxicita	schopnost chemických látek projevovat nepříznivé účinky na zárodek
endemická oblast	oblast výskytu onemocnění
enterohepatální cyklus	proces, při němž se určitá látka (např. žlučové kyseliny, dále některé léky či mykotoxiny, např. OTA) dostává z jater žlučí do střeva, kde se vstřebá a vrací se krví zpět do jater
enzymurie	přítomnost enzymů v moči
epitel	=epitelová tkáň, krycí tkáň
etiologické agens	příčina onemocnění
fungicidní	ničící parazitní houby a plísně
gastrointestinální trakt	trávicí soustava
genotoxicita	schopnost chemických látek projevovat nepříznivé účinky na genetický materiál
glykosidy	deriváty sacharidů

hepatocyt	jaterní buňka
hepatom	maligní nádor jater
hepatotoxicita	schopnost chemických látek projevovat nepříznivé účinky na játra a tím způsobovat jejich poškození
hydrolyza	reakce vody s rozpuštěnou látkou s uvolňováním iontů H ⁺ a OH ⁻
hydroxylace	enzymová reakce spočívající ve vnesení hydroxylové skupiny do sloučeniny
imunotoxicita	toxicita pro imunitní systém
inhibice	zpomalení některých procesů v organismu
insekticidní	hubící hmyz
interference	vzájemné ovlivňování, prolínání nebo střetávání jevů
<i>in vitro</i>	práce s organismy v umělých laboratorních podmínkách
<i>in vivo</i>	v živém nebo na živém organismu, zaživa
karcinogen	látka, která způsobuje nebo napomáhá rakovinnému bujení buněk
karcinogenita	schopnost látky vyvolat rakovinné bujení buněk
konidiální aparát	aparát nesoucí spory vzniklé nepohlavním způsobem
konidiofor	část houbového organismu nesoucí konidie (výtrusy)
konjugace	spojení
lakton	cyklický vnitřní ester hydroxykarboxylových kyselin vznikající intramolekulární reakcí karboxylové funkce s příslušnou hydroxylovou skupinou
lypoxigenáza	oxidačně redukční enzym
mycelium	= podhoubí, shluk vzájemně propletených vláken, charakteristický zejména pro houby
mykotoxin	toxin produkováný toxinogenními vláknitými mikroskopickými houbami (plísněmi)
mykotoxikóza	onemocnění způsobené toxiny hub, zejména mikroskopických hub

mutagenita	schopnost, vlastnost způsobit změnu v genetické informaci; tj. vyvolat genetickou mutaci či dokonce chromosomovou aberaci
námelové alkaloidy	alkaloidy obsažené v žitných zrnech napadených parazitickou houbou paličkovicí nachovou (<i>Claviceps purpurea</i>)
neuropatie	nezánětlivé poškození funkce a struktury periferních nervů
nefrotoxicita	toxicita pro ledviny
patogen	organismus, který může zapříčinit onemocnění hostitele
polyferace	bujení, novotvoření, chorobný růst tkáně
reprotoxicita	účinek na reprodukci
resorpce	vstřebání
screening	metoda vyhledávání časných forem nemocí nebo odchylek od normy v dané populaci prováděná formou testů
synergický efekt	přidaný účinek současného působení dvou nebo více činitelů ve srovnání se součtem účinků každého z nich odděleně
teratogenita	schopnost látky vyvolat vrozenou vývojovou úchylku vyvíjejícího se plodu
topoizomerázy	enzym ze skupiny izomeráz
toxicita	= jedovatost, míra vlivu jakým působí jedovaté látky na živé organizmy
toxikokinetika	osud xenobiotika v živém organismu
toxin	jedovatá látka produkovaná živými buňkami nebo organismy

Seznam zkratek

ATP	adenosintrifosfát
BEN	balkánská endemická nefropatie
CE	kapilární elektroforéza
CYP 450	cytochrom P450
EFSA	European Free Trade Association - Evropské sdružení volného obchodu Island, Lichtenštejnsko a Norsko
FAO	Food and Agriculture Organization - Organizace pro výživu a zemědělství
FD	fluorescence
HPCL	High-performance liquid chromatography -vysokoučinná kapalinová chromatografie
IMA	imunoafinitní sanace
JECFA FAO	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – Společný výbor expertů FAO/WHO pro potravinářská aditiva
LD50	Lethal dose – míra toxicity
LIF	laserová indukovaná fluorescence
MS	hmotnostní spektrometrie
NADPH	Dihydronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate
OP-OTA	Lakton-otevřená forma ochratoxinu A
OTA	ochratoxin A
OTB	ochratoxin B
OTC	ochratoxin C
OTHQ	hydrochinonová forma ochratoxinu A
OTQ	chinonová forma ochratoxinu A
OT α	ochratoxin α
OT β	ochratoxin β
tRNA	transferová ribonukleová kyselina

1 Úvod

Mykotoxiny jsou významnými kontaminanty potravin a krmiv. V současnosti známe více než 400 mykotoxinů. Tyto toxiny ve velké míře negativně ovlivňují nezávadnost mnoha komodit a tím také přispívají k ekonomickým ztrátám v mnoha zemích po celém světě a navíc mnohé z nich vykazují významnou toxicitu (Bennet & Klich, 2003).

Cílem bakalářské práce je zpracování teoretické rešerše na téma mykotoxiny ochratoxiny a jejich toxicita. Ochratoxiny patří mezi nejzávažnější sekundární toxické metabolity produkované několika druhy vláknitých mikroskopických hub a to především druhy rodu *Penicillium* a *Aspergillus*. Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny je ochratoxin A (OTA), který vykazuje akutní a chronickou toxicitu a tím představuje velké riziko pro zdraví lidí a zvířat. Mezi prokázané toxické účinky patří genotoxicita, mutagenita, embryotoxicita, reprotoxicita, nefrotoxicita, teratogenita, imunotoxicita, hepatotoxicita, neurotoxicita, ale také karcinogenita (možný lidský karcinogen skupiny 2B) (Malíř *et al.*, 2013).

Ke kontaminaci může docházet již při zrání kulturních plodin, které se dále zpracovávají, nebo při přepravě a následném skladování, což vede k jeho produkci. OTA se vyskytuje v potravinách živočišného (vejce, vepřové maso a vnitřnosti, drůbež a mléko), ale především rostlinného původu, jako jsou kakaové boby, kávová zrna, mouka, obiloviny, arašídy, sušené ovoce (Malíř *et al.*, 2013).

Je známo také mnoho druhů metabolitů, které vykazují různé toxické účinky. OTC, který je stejně toxický jako OTA, ovšem vyskytuje se v menší míře. Dále OTB, který vzniká ztrátou chloru, vykazuje nižší toxické účinky oproti OTA. Naopak chinonové formy (OTQ/OTHQ) a otevřené laktonové formy jsou dokonce toxičtější než OTA (Wu *et al.*, 2011).

Bohužel není možné tyto toxiny trvale odstranit z potravního řetězce, a proto je velice důležité provádět pravidelný monitoring jejich výskytu a dohlížet na jejich kontrolu a regulaci s cílem prevence (Malíř *et al.*, 2013).

1.1 Historie mykotoxinů

Název mykotoxin vznikl spojením řeckého slova „myces-mykos“ (houba) a latinského slova „toxicum“ (jed) (Turner *et al.*, 2009). V novodobých dějinách byly mykotoxiny, konkrétně *Aspergillus flavus* toxins (aflatoxiny), které v Anglii kontaminovaly moučku X-Rosetti, na bázi podzemnice olejné, příčinou úhynu zhruba 100 000 krůt, určených na vánoční trh (Zain, 2011).

Kontaminace potravin a krmiv, a s tím spojené nákazy lidí a zvířat, jsou známy již od nepaměti, od doby, kdy člověk začal obdělávat zemědělskou půdu. V první polovině 20. století byly na území bývalého SSSR zkoumány vzorky obilí, které byly napadeny plísněmi rodu *Fusarium*. Velká část výzkumů v tomto období se soustředila spíše na bakteriální původ těchto onemocnění a informace o toxicitě obilovin byly ve velké míře odmítány. K velkému zájmu o výzkum mikroskopických hub a jimi produkováných mykotoxinů došlo až po 2. světové válce, zejména po objevu aflatoxinů. Ve 40. letech 20. století byl objeven Penicilin, což vedlo k významnému pokroku ve zkoumání vláknitých mikroskopických hub. Rozvoj biotechnologií vedl k využití různých houbových organismů k výrobě léků, vitamínů, enzymů, organických kyselin a fermentovaných potravin. V současné době našly své využití dokonce i jako herbicidní prostředky využívané v zemědělství (Šimůnek, 2000).

K zahájení výzkumu mykotoxinů v tehdejší ČSSR došlo koncem 60. let na Lékařské fakultě UJEP v Brně, pod vedením doc. RNDr. Miroslava Polstera, CSc. Mezi další významná centra v oblasti veterinární toxikologie pro studium a výzkum veterinárních mykotoxikóz a diagnostiku mykotoxinů můžeme uvést tehdejší VŠ veterinární v Brně (nyní Veterinární a Farmaceutická universita Brno). Toto pracoviště je spojováno především se jmény Piskač, Mertlík, Ruprich a Zapletal. Od 80. let se výzkumem toxinogenních mikromycet a mykotoxinů v potravinových řetězcích zabývají pracovníci Národního referenčního centra pro mikroskopické houby a jejich toxiny v Centru hygieny potravinových řetězců v Brně a ve Státním zdravotním ústavu v Praze (Ostrý, Ruprich, Škarková) (Malíř & Ostrý, 2003).

Dále nesmíme opomenout pracovníky NRL pro biomarkery mykotoxinů a mykotoxiny v potravinách při Krajské hygienické stanici v Hradci Králové, později Zdravotním ústavu v Hradci Králové (Malíř, Roubal, Severa) a v neposlední řadě je třeba připomenout Ivanu Dvořáčkovou z Fingerlandova patologicko-anatomického ústavu ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, za její naprosto mimořádný celosvětový přínos v oblasti aflatoxinů na lidského zdraví. I přes to, že v současné době je známo více než 400 mykotoxinů, nadále jsou objevovány a charakterizovány další skupiny těchto toxinů. Toxikologické výzkumy vláknitých mikroskopických hub a jejich mykotoxinů nejsou ukončené a i nadále probíhají (Malíř & Ostrý, 2003).

1.2 Charakteristika mykotoxinů

Mykotoxiny jsou sekundární toxické metabolity produkované mikroskopickými vláknitými houbami (mikromycety-plísněmi). Zatímco všechny mykotoxiny jsou houbovitého původu, ne všechny toxické látky produkované mikroskopickými houbami jsou nazývány mykotoxiny. Rozhodujícím je cíl a koncentrace daného metabolitu. Produkty plísní, které jsou toxické především pro bakterie, mnohdy patří do skupiny antibiotik. Houbové produkty, které jsou toxické pro rostliny, nazýváme fytotoxiny (Bennet & Klich, 2003).

Mykotoxiny patří mezi významné naturální toxiny, projevující své toxické účinky na lidskou i zvířecí populaci již ve velmi nízkých koncentracích (Bennet & Klich, 2003).

Toxické působení mykotoxinů na lidské a zvířecí zdraví je závislé na mnoha různých faktorech, především na toxicitě mykotoxinů a dále na rozsahu expozice, stáří jedince, individuálním stavu výživy a dalších případných synergických efektech s různými dalšími chemickými látkami, kterým je daný organismus současně s mykotoxiny vystaven. Mykotoxiny jsou komplexní organické sloučeniny nebílkovinné povahy o nízké molekulové hmotnosti, lišící se do značné míry svojí chemickou strukturou (Peraica *et al.*, 1999).

Důvody vysvětlující produkci mykotoxinů jsou objasňovány především pomocí snahy plísní bojovat o přežití a zdroj výživy. Nejedná se o látky, jejichž přítomnost je nezbytná při rozvoji vláknitých mikroskopických hub ve srovnání s proteiny, mastnými a nukleovými kyselinami a aminokyselinami. Odtud již zmíněný název sekundární metabolity (Malíř & Ostrý, 2003).

Mezi významné producenty mykotoxinů, které jsou součástí lidského a zvířecího potravního řetězce řadíme především rody mikroskopických vláknitých hub, jako: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* a *Alternaria*. Mykotoxiny produkované plísněmi rodu *Fusarium* můžeme označit jako velice destruktivní rostlinné patogeny, produkující mykotoxiny před sklizní nebo po sklizni obilovin. *Penicillium* a *Aspergillus* jsou častěji nacházeny jako kontaminanty potravin, vzniklé během sušení a následném skladování (Sweeney & Dobson, 1998).

Mezi mykotoxiny s výraznými toxickými účinky a zdravotními dopady patří zejména námelové alkaloidy, aflatoxiny, ochratoxiny, sterigmatocystin, fuzariové toxiny – např. trichoteceny- deoxynivalenol, T-2 toxin aj., dále fumonisiny, zearaleon. Mezi další významné mykotoxiny patří cyklopiazonová kyselina, patulin, citrinin, rubratoxiny a skupina tremorgenních mykotoxinů (Schwaab, 2011).

Tato bakalářská práce se věnuje problematice ochratoxinů a to především z hlediska jejich toxického působení.

K nejvýznamnějším plodinám kontaminovanými mykotoxiny patří např. obiloviny, ořechy, sušené ovoce, koření a luštěniny. Mykotoxiny se mohou tvořit a hromadit již při zrání kukuřice, pšenice, sojových bobů, arašídů a dalších plodin, které se dále zpracovávají jako potraviny nebo slouží jako krmivo pro hospodářská zvířata. Ke kontaminaci může dojít i při přepravě nebo nesprávném skladování (tzv. sekundární kontaminace). Různé rody vláknitých mikroskopických hub a tedy i produkce mykotoxinů je ve velké míře ovlivněna klimatickými podmínkami. K produkci plísní a mykotoxinů dochází v závislosti na teplotě a vlhkosti. Druhy rodu *Aspergillus* se vyskytují spíše v tropických a subtropických oblastech, naopak rody *Penicillium* a *Fusarium* jsou přizpůsobeny mírnému podnebí Severní Ameriky a Evropy. Vzhledem ke globalizaci potravinového trhu a obchodu s komoditami z různých částí světa dochází k celosvětové distribuci kontaminovaných surovin, potravin i krmiv (Schwaab, 2011).

1.3 Charakteristika plísni rodu *Aspergillus* a *Penicillium*

Vláknité mikroskopické houby (mikromycety, plísně) jsou jednobuněčné až mnohobuněčné eukaryotické organismy tvořící vláknité povlaky uvnitř nebo na povrchu substrátů. Technicky a potravinářsky významné plísně řadíme do tří skupin: *Zygomycetes*, *Ascomycotina*, *Deuteromycotina*. Optimální podmínky pro rozmnožování mikromycet je teplota 18 až 32°C a relativní vlhkost 65 až 70 %. Základ těla je tvořen stélkou, která se skládá ze stavebních jednotek hyf. Soustava navzájem spojených hyf se nazývá mycelium a slouží k výživě celku. Rozmnožování plísní je dvojího typu (vegetativní a pohlavní). Při vegetativním rozmnožování dochází k rozrůstání hyf nebo se tvoří nepohlavní spory. Při pohlavním rozmnožování se tvoří pohlavní spory a dochází ke spájení těchto buněk (Krménčík & Kysilka, 2015).

Mezi nejvýznamnější toxigenní plísně v souvislosti s potravinami patří rody *Fusarium*, *Aspergillus* a *Penicillium*, *Claviceps* a *Alternaria*, přičemž při produkci ochratoxinů se uplatňují především rody *Aspergillus* a *Penicillium* (Pitt, 2000).

1.3.1 Popis a morfologie rodu *Aspergillus*

Tab. č. 1 - Taxonomie rodu *Aspergillus*

Říše	Oddělení	Řád	Čeleď	Anamorfní rod
<i>Fungi</i> (houby)	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Aspergillus</i>

(Krménčík & Kysilka, 2015).

Poprvé popsal tyto vláknité mikroskopické houby a dal jim rodové označení *Aspergillus* toskánský botanik Pier Antonio Micheli (*1679 - +1737) v roce 1729. Někdy se používá také české označení kropidlák, které vzniklo tím, že průřez rozmnožovacím orgánem připomínal našim botanikům kropítka. V současnosti je známo přes 200 druhů rodu *Aspergillus* (Ostrý & Buchta, 2003a).

Asi 20 druhů bylo označeno za původce onemocnění člověka a zvířat. Ve skutečnosti však za více než 95 % všech infekcí odpovídají pouze tři druhy - *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* a *A. niger*, který je znám jako producent ochratoxinů (Ostrý & Buchta, 2003 a).

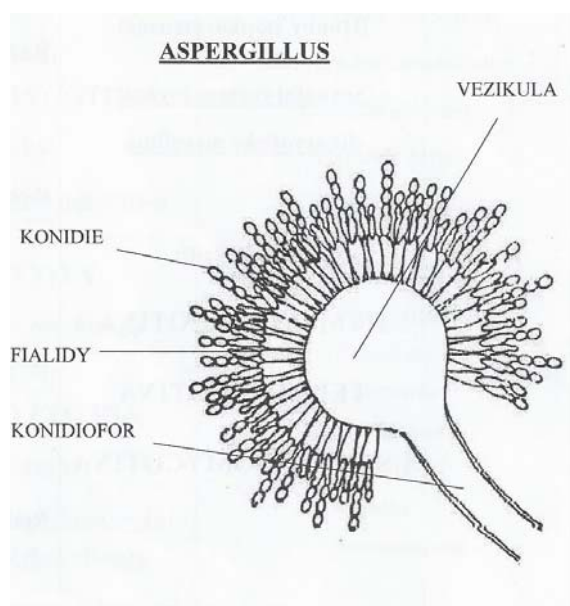
Tyto vláknité mikroskopické houby se nacházejí po celém světě v půdě, na rostlinách a ve vzduchu. Mezi nejběžněji izolovaný druh patří *Aspergillus fumigatus*, následuje *Aspergillus flavus* a *Aspergillus niger* (Krmencík & Kysilka, 2015)

Aspergillus niger tvoří bílý nebo barevný světlý povlak na krmení, obilí a půdách. Vyskytuje se pouze za určitých podmínek prostředí. Rozhodujícím faktorem je zejména vlhkost a teplota. Optimální teplota potřebná pro rozvoj této formy je 30°C až 37°C (Bartík & Piskač, 1981).

Základní morfologie je pro všechny druhy stejná, nicméně další mikroskopické struktury se u jednotlivých druhů mohou lišit. Jsou pro ně specifické a představují klíčové funkce pro určování druhů spolu s povrchovou barvou celé kolonie (Krmencík & Kysilka, 2015).

Společným znakem pro všechny druhy je dobře vyvinuté mycelium a konidiální aparát s případnými plodničkami (kleistokarpy). Nepohlavní orgány rodu *Aspergillus* jsou tvořeny konidioforem, který je zakončen hlavičkou. Konidiofor je žlutě nebo hnědě zbarvený a vyrůstá ze substrátu nebo vzdušných hyf. Na povrchu konidioforu dochází k pozvolnému nebo náhlému rozšíření v měchýřek (kulovitý, polokulovitý, elipsoidní nebo palicovitý) (Ostrý & Buchta, 2003a).

Obr. č. 1 - *Ascomycota* – anamorfní stádium bez teleomorf



(Růžek, 2008)

1.3.2 Popis a morfologie rodu *Penicillium*

Tab. č. 2 - Taxonomie rodu *Penicillium*

Říše	Oddělení	Řád	Čeleď	Anamorfní rod	Podrod
<i>Fungi</i> (houby)	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergilloides</i> <i>Penicillium</i> <i>Biverticillium</i> <i>Furcatum</i>

(Krměčık & Kysilka, 2015).

První popis a rodové označení *Penicillium* použil německý botanik Johann H. F. Link (*1767 - +1851) v roce 1809 pro konidiální stadium této houby. Kořeny historie zkoumání tohoto druhu spadají do začátku 19. století. Do současné doby bylo popsáno mnoho nových druhů rodu *Penicillium* (Ostrý & Buchta, 2003b).

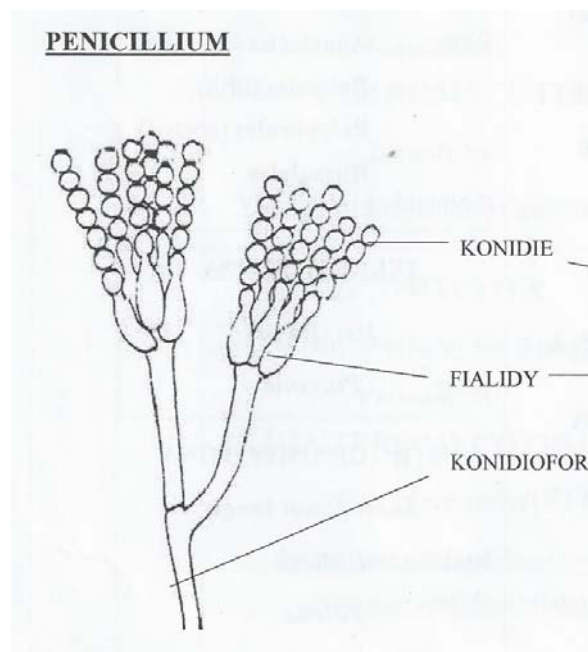
Zástupci rodu *Penicillium* jsou nejrozšířenější vláknité mikromycety teplého a mírného klimatu. Jejich spory jsou prakticky všudypřítomné, a proto jsou také velmi častými kontaminanty potravin, životního a pracovního prostředí člověka (Ostrý & Buchta, 2003b).

Kolonie rodu *Penicillium* jsou většinou rychle rostoucí, vláknité se sametovým, zvlňným vzhledem nebo bavlněnou texturou. Barva kolonií je různá od modré a zelené přes žlutou až do odstínů šedé nebo narůžovělé (Krměčık & Kysilka, 2015).

Mikromycety rodu *Penicillium* mají dobře vyvinuté vegetativní mycelium a konidiální aparát s případnými plodničkami (kleistokarpy) (Ostrý & Buchta, 2003b).

Nepohlavní rozmnořovací orgány jsou tvořeny konidioforem, který má u různých poddruhů specifickou stavbu. Uspořádaní konidií je většinou řetízkovité (Ostrý & Buchta, 2003b).

Obr. č. 2 – *Ascomycota* – anamorfní stádium bez telefomorf



(Růžek, 2008)

1.4 Charakteristika mykotoxinů ochratoxinů

Jedná se o skupinu mykotoxinů zahrnující izokumarinové deriváty spojené s fenylalaninem (podrobně viz tab. č. 3). Nejvýznamnějším a nejrozšířenějším mykotoxinem této skupiny je ochratoxin A (OTA). Biologicky aktivní jsou i další deriváty ze skupiny ochratoxinů (Hrdina *et al.*, 2004).

1.4.1 Producenti ochratoxinů

Ochratoxiny jsou produkovány po celém světě a to několika druhy rodu *Aspergillus* ze sekce *Circumdati* (*Aspergillus ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. steynii*) a *Aspergillus* ze sekce *Nigri* (*Aspergillus carbonarius*, *A. foetidus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. sclerotiumniger*, *A. tubingensis*) (Ostrý *et al.*, 2013).

Tyto plísně produkují ochratoxiny především v subtropických a tropických oblastech světa. Naopak v mírných a chladnějších zónách dochází k produkci ochratoxinů druhy rodu *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. nordicum*).

Tyto toxigenní mikroskopické houby téměř vždy produkují několik toxinů současně, například již zmíněný OTA, dále ochratoxin B (OTB) nebo ochratoxin C (OTC), což může mít za následek vznik synergických toxických účinků (Ostrý *et al.*, 2013).

Tři hlavní producenti ochratoxinů – *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* a *Penicillium verrucosum* mají zcela odlišné ekologické a fyziologické požadavky, díky kterým je relativně snadné určit, které druhy jsou zodpovědné za tvorbu ochratoxinů v určité potravíně nebo zeměpisné poloze (Ostrý *et al.*, 2013).

Aspergillus ochraceus a jemu blízké příbuzné druhy rostou při nízkých vodních aktivitách a za mírných teplot. Většinou napadají uskladněné suché potraviny, zejména obiloviny. Ačkoli mnohé zdroje popisují *A. ochraceus* jako hlavního producenta ochratoxinů, produkce tímto a dalšími příbuznými druhy nebyla často hlášena a jejich význam se zdá být nadhodnocený. Druhý významný producent rodu *Aspergillus*, *A. carbonarius* (a úzce související *A. niger*, který produkuje ochratoxiny méně často) roste i při vysokých teplotách a produkuje pigmentované hyfy a spory, díky nimž je vysoce odolný vůči UV záření. V důsledku toho se *A. carbonarius* běžně vyskytuje na potravinách, které dozrávají při vysokých teplotách na slunečním světle, jako jsou například hrozny (Ostrý *et al.*, 2013).

Druhy rodu *Aspergillus* ze sekce *Nigri* jsou považovány za primární zdroj ochratoxinů na hroznech a jsou produkovány na bobulích během vegetačního období, především při zrání. Kromě *A. carbonarius*, který je nejvýznamnějším producentem OTA na hroznech, může do určité míry přispívat k napadení hroznů na vinici *A. tubingensis* (Ostrý *et al.*, 2013).

Obsah OTA může dosáhnout vysoké úrovně ve víně, v některých částech Středomoří a v sušených hroznech révy v Jižní Americe, Austrálii a Evropě (Ostrý *et al.*, 2013).

Produkce OTA je ovlivněna různými faktory, včetně klimatických podmínek a geografických oblastí, druhy pěstovaných plodin, poškozením bobulí způsobené hmyzem, plísňovými infekcemi nebo nadměrným množstvím srážek a zavlažováním. Fungicidní a insekticidní zásahy mohou snížit infekce OTA produkovaného houbami a kontaminaci OTA (Ostrý *et al.*, 2013).

Hlavní potravinou, kterou napadá *Penicillium verrucosum* jsou nejspíše obiloviny pěstované v mírných pásmech v oblasti severní a střední Evropy a Kanadě. Je jisté, že dospělý *P. verrucosum* v obilovinách je hlavním zdrojem ochratoxinů v severní Evropě a dalších mírných podnebí. Vyšší množství OTA bylo nalezeno v pšenici než na ostatních substrátech, včetně kukuřice, podzemnice olejné, řepky a sóji (Ostrý *et al.*, 2013).

Ochratoxiny mohou být také produkovány toxigenními mikroskopickými houbami, které rostou na výrobcích z vepřového masa během jeho zrání (přímá kontaminace). *Penicillium nordicum*, silný producent ochratoxinů, byl zjištěn na mase a masných výrobcích (Ostrý *et al.*, 2013).

Ochratoxiny byly také nalezeny v masných výrobcích pocházejících ze zvířat, která byla krmena krmivem vyrobenými z kontaminovaných obilovin (nepřímá kontaminace) (Ostrý *et al.*, 2013).

1.4.2 Ochratoxin A

OTA je sekundární metabolit toxigenních vláknitých mikroskopických hub, který byl objeven r. 1965 během laboratorního screeningu toxinogenních mikromycet prováděného jihoafrickými badateli. Poprvé byl OTA izolován z *Aspergillus ochraceus*. První nálezy pocházejí z USA a to z r. 1969 ze vzorků kukuřice. V tehdejší Jihoafrické republice OTA nepředstavoval tak závažné zdravotní riziko jako tomu bylo v jiných částech světa (Malíř & Ostrý, 2003).

OTA je všudypřítomný, přirozeně se vyskytují mykotoxin produkovaný mikromycety rodu *Penicillium* a *Aspergillus*. OTA představuje významné riziko pro zdraví lidí a zvířat. U OTA byly prokázány nefrotické, teratogenní, hepatotické, neurotoxické, imunotoxické, genotoxické a karcinogenní (karcinogen skupiny 2B) toxické účinky. Tyto účinky jsou charakterizovány druhem a pohlavím jedince (Malíř *et al.*, 2013).

OTA je přírodní kontaminant mnoha druhů potravin, jako jsou kakaové boby, kávová zrna, mouka, obiloviny, ryby, arašídý, sušené ovoce, víno, vejce drůbeže a mléko. OTA byl hlášen také jako znečišťující látka tygřích ořechů a zkvašeného kukuřičného těsta v západní Africe (Zain, 2011).

1.4.3 Fyzikální vlastnosti OTA

Popis: bílá krystalická látka bez zápachu

Bod tání: 168 - 173 °C, po vysušení 1 hod. při 60 °C

Optická otáčivost: $[\alpha]^{21}_D - 46.8^\circ$ ($c = 2.65 \text{ mmol.l}^{-1}$ v chloroformu)

Rozpustnost: rozpustný v organických rozpouštědlech (chloroformu, etanolu a metanolu).

(IARC, 1993)

1.4.4 Chemická charakteristika OTA

OTA patří mezi dominantní zástupce ochratoxinů a z hlediska biosyntézy mezi pentaketidy. Tyto látky můžeme obecně definovat jako deriváty 7-izokumarinu vázané na aminoskupinu L-β-fenylalaninu (IARC, 1993).

Nesmíme ovšem opomenout jiné druhy ochratoxinů a jejich metabolity. Jejich chemická struktura je popsána níže (viz tab. 3).

Chemická struktura OTA

CAS name (Chemical Abstracts Services Registry No.): 303 - 47 - 9

Název (Chemical Abstracts): L-Phenylalanine, *N*-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1-*H*-2-benzopyran-7-yl)carbonyl]-, (R)-

Název (IUPAC name): (N-[[[(3R)-5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-7-isochromanyl] carbonyl]-3-phenyl-L-alanine)

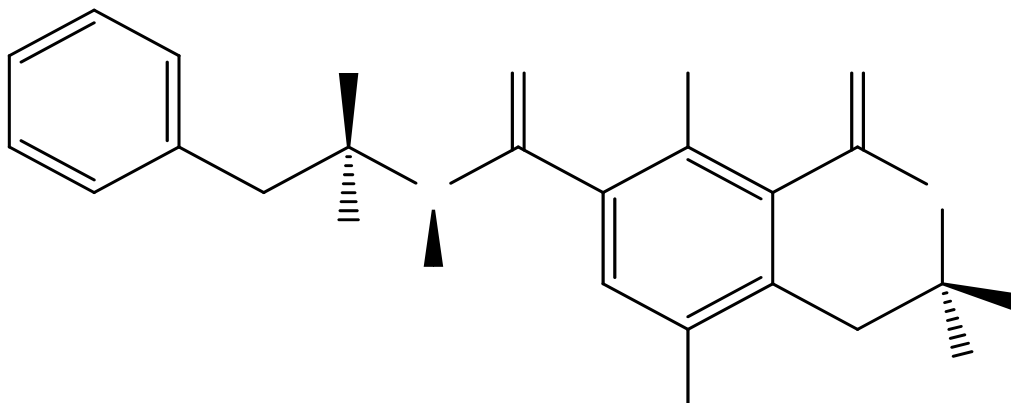
Jiný název: (-)-*N*-[(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-7-isochromanyl) carbonyl]-3-phenylalanine

Sumární vzorec: C₂₀H₁₈ O₆ClN

Molekulová hmotnost: 403

(IARC, 1993)

Obr. č. 3 - Chemická struktura OTA



(IARC, 1993)

Tab. č. 3 - Chemické struktury ochratoxinů a metabolitů OTA u zvířat a rostlin

Sloučenina	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
Ochratoxin A (OTA)	Phenylalanyl	Cl	H	H	H
Ochratoxin B (OTB)	Phenylalanyl	H	H	H	H
Ochratoxin C (OTC)	Phenylalanyl	Cl	H	H	H
Ochratoxin α (OTα)	OH	Cl	H	H	H
Ochratoxin β (OTβ)	OH	H	H	H	H
4-(<i>R</i>)-Hydroxyochratoxin A	Phenylalanyl	Cl	H	OH	H
4-(<i>S</i>)-Hydroxyochratoxin A	Phenylalanyl	Cl	OH	H	H
10-Hydroxyochratoxin A	Phenylalanyl	Cl	H	H	OH
4- <i>R</i> -Hydroxyochratoxin B	Phenylalanyl	H	H	OH	H
Ochratoxin A hydroquinone derivative OTHQ	Phenylalanyl	OH	H	H	H
Ochratoxin A hydroquinone derivative – decarboxylated (DC-OTHQ)	Phenylethylamin	OH	H	H	H
Open lactone of ochratoxin A (OP-OTA)	Phenylalanyl	Cl	H	H	H
Ochratoxin A methyl ester	Phenylalanyl, methyl ester	Cl	H	H	H
Ochratoxin B methyl ester	Phenylalanyl, methyl ester	H	H	H	H
4- <i>R</i> -Hydroxyochratoxin A-β-glucosid	Phenylalanyl	Cl	H	<i>O</i> -glucopyranosyl	H

(Wu *et al.*, 2011)

1.4.5 Metabolity OTA

Pochopení metabolismu a biotransformace OTA u lidí a zvířat je velmi důležité pro kontrolu znečištění potravin a krmiv mykotoxiny a také pro studium možných toxických účinků vyvolaných ochratoxiny. OTA se u lidí a zvířat může vyskytovat v ledvinách, játrech a střevech, kde dochází k různým metabolickým drahám. Mezi hlavní metabolické dráhy patří hydrolýza, hydroxylace, laktonové otevírání a konjugace (Wu *et al.*, 2011).

Ochratoxin α (OT α) vytvořený štěpením peptidové vazby v OTA je hlavním metabolitem a to nejen u lidí a zvířat, ale také v mikroorganismech a enzymatických systémech. Je považován za netoxický produkt. Lakton-otevřená forma (OP-OTA) nalezená u hlodavců vykazuje naopak vyšší toxicitu než samotný OTA. Hlavním hydroxy produktem u hlodavců je (4R) -4-OH-OTA. U prasat se vyskytuje také, ovšem v pozmeněné formě s izomerem 4S. 10-OH-OTA se v současné době vyskytuje pouze u králíků. Kromě těchto změn, může u OTA docházet ke ztrátě chlóru na C-5 při vzniku ochratoxinu B (OTB), dále 4-OH-OTB a ochratoxinu β (OT β). Chininové formy OTA – chinin a hydrochinon (OTQ a OTHQ) se vyskytují u zvířat. U nich mohou být nalezeny také konjugáty, jako jsou hexózy a pentosy. Více polární metabolity OTA se eliminují z organismu rychleji. V současné době vše končí na úrovni vytvoření OTA-DNA aduktů (Wu *et al.*, 2011).

K metabolismu OTA dochází také u rostlin, některých druhů kvasinek a hub. OH-OTA methylester a OH-OTA-glukosid se tvoří u mnoha rostlin kromě OT a OH-OTA. OTA může být přeměňován některými kmeny kvasinek. Houby mohou produkovat stejné metabolity jako zvířata, například OT, 4-R-OH-OTA, 4-R-OH-OTB a 10-OH-OTA. Několik komerčních enzymů je schopno biologicky rozložit OTA do netoxické OT formy (Škarková *et al.*, 2013)

Charakteristika jednotlivých metabolitů a zásadní informace o jejich toxickém působení jsou detailněji popsány v následujících kapitolách, přičemž největší pozornost je věnována OTA, který je z hlediska toxických účinků prostudován nejvíce.

1.4.6 Metabolické dráhy OTA u člověka

Vzhledem k vysoké toxicitě OTA a jeho metabolitů nelze až na nepatrné výjimky provádět studium metabolismu u lidské populace. K získání výsledků u lidí byly použity metody *in vitro*.

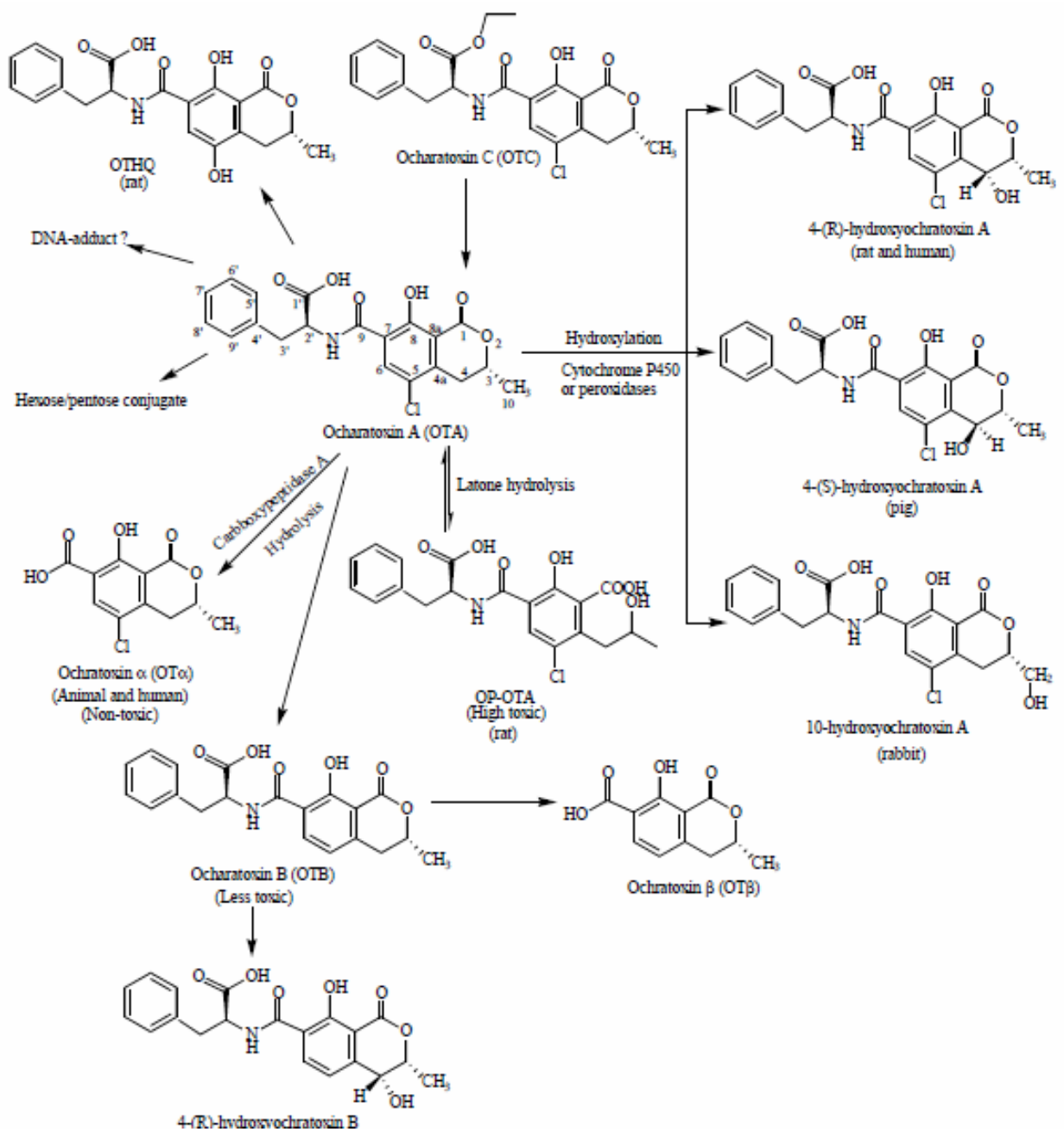
Metabolity 4 (R) a (S)-OH-OTA byly nalezeny v lidských jaterních mikrosomech s NADPH. Podobně jako u krysa byl isomer 4R jeden z hlavních. 4 (R)-OH-OTA u lidí, byl detekován jako hlavní produkt. Lidský CYP 450 1A1 a 3A4 může katalyzovat tvorbu 4 (R) -OH-OTA (Wu *et al.*, 2011).

Bylo zjištěno, že malé množství hexózových konjugátů OTA společně se stopovým množstvím 4-OH-OTA vzniká při inkubaci 3H-OTA v lidských primárních hepatocytech. 4 další metabolity byly detekovány, ale nebyly objasněny. Žádná OTA-DNA nebyla vytvořena při inkubaci DNA izolované z lidských hepatocytů společně s 3H-OTA (Wu *et al.*, 2011).

10 μ M OTA bylo inkubováno z epitelálních plicních buněk, kde byly pozorovány také DNA adukty. Další metabolity byly extrahovány a analyzovány pomocí HPLC. Byly detekovány 4 (S) -OH-OTA a neznámý metabolit - OT α , 4 (R) (Wu *et al.*, 2011).

Výsledky ukázaly, že bronchiální epitelové buňky byly schopné biotransformovat OTA do genotoxických derivátů (Wu *et al.*, 2011).

Obr. č. 4 - Metabolické dráhy OTA



(Wu *et al.*, 2011)

1.4.7 Rozšíření OTA

Toxin vykazuje ubiquitární – celosvětový výskyt, byl detekován např. ve Skandinávii a na Balkáně. Vyskytuje se také v USA, v komoditách, jako jsou kukuřice, pšenice, ječmen, burské oříšky, rýže, seno, zelená káva a dále jako reziduum ve vepřovém mase. Považuje se za etiologické agens ledvinové choroby prasat v Dánsku a Švédsku. OTA byl také detekován ve vzorcích od obyvatel endemických oblastí Bulharska, Rumunska a zemích bývalé Jugoslávie, což svědčí o kontaminaci evropské populace tímto mykotoxinem (Hrdina *et al.*, 2004).

Začátkem roku 1980 v bývalém Československu byl OTA zjištěn v chlebu vyrobeném z dlouhodobě uložené mouky. Chléb obsahoval 15 mg/kg OTA (Malíř, 2015).

Díky globalizaci potravinového trhu je však výskyt ochratoxinů celosvětovým problémem.

1.4.8 Výskyt OTA v potravinách

Dle zjištění je hlavním zdrojem expozice OTA u člověka především potravní řetězec. Dochází k tomu buď přímo (konzumací kontaminovaných obilovin a olejnin) nebo nepřímo (konzumací kontaminovaného masa a mléka). OTA patří mezi přírodní toxiny a jeho výskyt se může lišit rok od roku. Jeho produkce souvisí s teplotou, okolní vlhkostí a obsahem vlhkosti kontaminovaného média (Malíř, 2015).

Kontaminaci OTA nelze zamezit a ani odstranit, i když existují určité zemědělské postupy a technologie vedoucí ke snížení výskytu plísní a produkce OTA během vegetativního růstu, sklizně a skladování (Malíř, 2015).

OTA byl zjištěn v potravinách rostlinného a živočišného původu. Z potravin rostlinného původu se jedná zejména o cereálie, kávu, kakao, čokoládu, koření (např. sušená paprika, kurkuma aj.) luštěniny, zelený čaj, fíky, pistácie, rozinky, hroznovou šťávu, víno a pivo. Z potravin živočišného původu bývají kontaminovány mnohdy-vepřové maso, vepřové výrobky z krve, drůbeží ledviny a játra, syrové maso a dokonce uzené a solené ryby. Hlavním zdrojem podílejícím se na denním přívodu OTA jsou obiloviny a to až z 58 % (Malíř *et al.*, 2013).

Další podíl na příjmu OTA mají víno (15%), vepřové maso (3%), káva (1-10%, závisí na individuální míře spotřeby) (Malíř *et al.*, 2013).

1.4.9 Hygienické a expoziční limity OTA

S cílem minimalizovat dopady na lidské zdraví, je proto obsah OTA v potravinách v České republice řízen platnými právními předpisy Evropské unie, zejména Nařízením Komise / ES / č 1881/2006 ve znění pozdějších předpisů, nařízením Komise / ES / č 105/2010. Kromě toho existují doporučení pro limity expozice OTA stanovené výborem odborníků FAO WHO (World Health Organization, Světová zdravotnická organizace) pro potravinářské přídatné látky. Vědeckým výborem pro potraviny Evropské unie nebo Evropského úřadu pro bezpečnost potravin jsou stanoveny následující hodnoty: prozatímní tolerovatelný týdenní příjem (PTWI) 100 ng/kg tělesné hmotnosti/týden (JECFA FAO / WHO 1995) a tolerovatelný týdenní příjem (TWI) 120 ng / kg tělesné hmotnosti / týden (EFSA, 2006) (Malíř *et al.*, 2013).

Tab. č. 4 - Hygienické limity OTA v potravinách

Ochratoxin A	
Potraviny	Maximální limity (µg/kg)
Nezpracované obiloviny	5,0
Všechny produkty pocházející z nezpracovaných obilovin, včetně zpracovaných výrobků z obilovin a obilovin určených k přímé lidské spotřebě kromě obilných příkrmů a ostatních příkrmů určených pro kojence a malé děti potravin a dietních potravin pro zvláštní léčebné účely určené speciálně pro kojence	3,0
Sušené hrozny révy vinné (korintky, rozinky a sultánky)	10,0
Pražená kávová zrna a mletá pražená káva kromě rozpustné kávy	5,0
Rozpustná káva (instantní káva)	10,0
Víno (včetně šumivého vína, s výjimkou likérového vína a vína s obsahem alkoholu nejméně 15 % objemových) a ovocné víno	2,0
Aromatizovaná vína, aromatizované vinné nápoje a aromatizované vinné koktejly	2,0
Hroznová šťáva, rekonstituovaná koncentrovaná hroznová šťáva, hroznový nektar, rekonstituovaný hroznový mošt a rekonstituovaný koncentrovaný hroznový mošt určené pro lidskou spotřebu	2,0
Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti	5,0
Dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely (9), (10) určené speciálně pro kojence	5,0
Zelená káva, sušené ovoce jiné než sušené hrozny révy vinné, pivo, kakao a kakaové výrobky, likérová vína, masné výrobky, koření a lékořice	-

(Úřední věstník Evropské Unie, 2006)

1.4.10 Biotransformace OTA

Biotransformace OTA se u člověka i zvířat uskutečňuje především prostřednictvím cytochromu P 450. Tento proces vede k tvorbě metabolických meziproductů, které vykazují různé toxické účinky. Cytochrom stimuluje peroxidaci lipidů indukovanou OTA. OTA je přeměňován na genotoxický metabolit – např. prostřednictvím lipoxygenázy a cytochromu P450 epoxygenázy. Tohoto procesu, vedoucího k tvorbě toxických metabolitů se účastní i některé další enzymy obsažené v buňce. V současnosti nejsou známy všechny metabolity OTA, které vykazují genotoxický účinek, avšak z výskytu ledvinových nádorů a rakovinových nádorů v játrech myši a krysu usuzujeme na toxický účinek u člověka. Komplexní toxický účinek OTA je závislý na mnoha faktorech. Na inhibici řady reakcí se podílí část OTA, kterou je l-fenylalanin. Kovalentní vazby chemických látek nebo jejich metabolitů s DNA (kdy vznikají tzv. adukty) jsou považovány za jeden z klíčových kroků v procesech, které navozují vznik rakoviny. OTA, jakožto neionizovaná forma, se pasivně absorbuje v trávicím ústrojí a prostřednictvím enterohepatální cirkulace se vylučuje a reabsorbuje. K vstřebávání dochází v ledvinách, kde dochází také k tvorbě aduktů s DNA. Tyto adukty mizí většinou v krátké době, ovšem v ledvinách jsou nalézány i 16 dní po vstřebání. Na základě studií provedených na opicích (živočišný druh velmi podobný člověku) se zjistilo, že průměrná "životnost" OTA je delší než 500 hodin (Kvasničková, 2003). Biologický poločas činí u člověka 35,5 dne. Jedná se o dobu, za kterou se obsah mykotoxinu sníží na polovinu, ale ve skutečnosti dochází po celou dobu k jeho dalším příjmům (např. spolu s kávou) (Malíř, 2015).

1.5 Toxicita ochratoxinů

Jak bylo již nastíněno, jednotlivé metabolity OTA vykazují různou míru toxicity. Jsou známy jak netoxické formy, ale také formy, které svojí toxicitou výrazně převažují nad toxicitou samotného OTA.

Za netoxický produkt je považován $OT\alpha$, vznikající štěpením peptidové vazby v OTA. Naopak lakton - otevřený produkt (OP-OTA) nalezený u hlodavců, vykazuje vyšší toxicitu než OTA. OTB je díky ztrátě chlóru méně toxický než OTA. Chininové a hydrochinonové (OTQ/OTHQ) formy jsou výrazně toxičtější oproti OTA (Škarková *et al.*, 2013).

1.6 Ochratoxin B

Ochratoxin B je sekundární metabolit produkovaný druhem *Aspergillus ochraceus*. Jedná se o analogickou formu OTA, ovšem bez chlóru. Navzdory blízké příbuzné struktuře, je OTB považován za mnohem méně toxický. Jedná se však o jeden z nejsilnějších karcinogenů u hlodavců. V proximálním tubulu ošetřeném jedinou vysokou dávkou OTB u hlodavců byl pozorován mírný nárůst v mitotických číslech ale žádné změny související s funkcí ledvin a histologickým vyšetřením po opakovaném podání. Ochratoxin β ($OT\beta$), který je výsledkem štěpení peptidové vazby, je hlavním metabolitem OTB a je vylučován spolu s OTB v moči a stolici. Kromě něho se v malé míře vylučuje i hydroxylová forma 4-OH-OTB (Wu *et al.*, 2011).

Při testování krys nebyla nalezena na rozdíl od OTA žádná specifická tkáň pro zachování OTB a to jak po jednorázovém tak i opakovaném podání. V buňkách ledvin, které zachovávají mnoho specifických rysů proximálního tubulu, byly pozorovány pouze malé rozdíly v cytokinetice OTA a OTB. Tyto údaje zjištěné při testování krys naznačují, že OTA a OTB mají podobnou schopnost indukovat cytotoxicitu *in vitro*, ale jsou velké rozdíly v jejich potenciálu vyvolat nefrotoxicitu u hlodavců (Wu *et al.*, 2011).

OTB také inhibuje buněčnou poliferaci lidských jaterních buněk a to již při dávkách 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ale postrádá genotoxickou aktivitu OTA a to i při vyšších koncentracích (Wu *et al.*, 2011).

Nedostatek zachování OTB v ledvinách a rozdíly v toxikokinetice nám poskytují určité vysvětlení o nižší toxicitě OTB v porovnání s OTA. Některá pozorování také naznačují, že OTB snižuje toxické účinky OTA (Wu *et al.*, 2011).

1.7 Ochratoxin C

Je známo, že mezi nejvíce toxické zástupce těchto mykotoxinů patří ochratoxin A, který se vyskytuje jako přírodní kontaminant u mnoha druhů potravin a krmiv. Oproti tomu, ochratoxin C se takto vyskytuje jen velmi zřídka, nicméně jeho přítomnost byla prokázána v krmivech obsahujících vysoké koncentrace ochratoxinu A. Dle některých studií bylo prokázáno, že ochratoxin A vyskytující se v tekutině bachoru u přežvýkavců může být snadno převeden na ochratoxin C. Pokud dochází k této transformaci, tak zbytky ochratoxinu C v potravinách živočišného původu mohou představovat problémy v oblasti veřejného zdraví. Ačkoli se ochratoxin A snadno absorbuje ze střevního traktu, absorpce ochratoxinu C nebyla prokázána. Biotransformace ochratoxinu C není doposud zcela objasněna, avšak rychlá přeměna ochratoxinu C na ochratoxin A vede ke srovnatelným toxickým účinkům obou těchto látek (Fuchs *et al.*, 1984).

1.8 OP-OTA

Laktonovou otevřenou formu ochratoxinu A (OP-OTA) poprvé definoval ve své studii Xiao *et al.* Po aplikování injekce OTA (100 ug v 1 ml roztoku) u samic krys Sprague-Dawley nebyla OP-OTA detekována v krvi nebo moči, ale pouze ve žluči těchto hlodavců. Určité množství OP-OTA bylo později zjištěno také v moči krys, což naznačovalo, že OP-OTA může být naopak transformován do OTA (Wu *et al.*, 2011). Na základě těchto toxikologických výsledků můžeme hodnotit tuto laktonovou formu jako stejně, a nebo více toxickou než je samotný OTA (Wu *et al.*, 2011).

Biologická reaktivita OTA úzce souvisí s jeho laktonovou karbonylovou skupinou a izokumarinovým zbytkem (Wu *et al.*, 2011).

1.9 Chinonový (OTQ) a hydrochinonový (OTHQ) derivát

OTA vykazuje silnou míru nefrotoxicity a renální karcinogenity u hlodavců. Jedna z hypotéz vzniku nádorů působením OTA je založena na jeho genotoxických vlastnostech, které jsou podporovány jeho oxidativním metabolismem. Stejně jako jiné chlorované fenoly, OTA prochází oxidativním dechloračním procesem, při kterém dochází k tvorbě chinonového (OTQ) / hydrochinonového (OTHQ) redoxního páru, který hraje důležitou roli v jeho genotoxicitě. OTHQ derivát kromě svého vlivu na genotoxicitu hraje důležitou roli i v mutagenitě mykotoxinu a to zejména v přítomnosti cysteinu. K oběma těmito mechanismům dochází přes tvorbu DNA aduktů s OTQ / OTHQ (Tozlovanu *et al.*, 2006; Akman *et al.*, 2012).

1.10 Ochratoxin A

OTA působí hepatotoxicky, teratogenně, imunotoxicky, neurotoxicky, nefrotoxicky, genotoxicky a karcinogenně (možný lidský karcinogen skupiny 2B). Projevení toxických účinků je závislé na druhu a pohlaví cílového organismu (Malíř *et al.*, 2013).

Mezi další pozorované toxické účinky OTA patří srdeční a jaterní histologické abnormality, aberace koagulačních faktorů u potkanů, doprovázené krvácením a trombózou ve slezině, mozku, játrech, ledvinách a srdci, léze gastrointestinálního traktu a lymfatické tkáně u křečka, myelotoxicita u myši a střevní křehkost a ledvinové léze u kuřat (Malíř *et al.*, 2013).

OTA působí svými toxickými účinky na buněčné úrovni pomocí několika mechanismů. Je konkurentem fenylalaninu-tRNA ligázy a způsobuje inhibici syntézy bílkovin. Jiné mechanismy zahrnují tvorbu DNA aduktů, apoptózu, interferenci s cytoskeletem, peroxidaci lipidů a inhibici mitochondriální respirace. Je obecně známo, že OTA inhibuje produkci ATP. Dále je známa schopnost OTA redukovat molekuly Fe^{3+} na Fe^{2+} a naopak oxidovat molekuly Fe^{2+} na Fe^{3+} , což za přítomnosti CYP 450 a/nebo NADPH vede k produkci škodlivých aktivních radikálů během metabolismu toxinu za přítomnosti železa ve formě k dispozici pro redukci a oxidaci. OTA narušuje mitochondriální funkce a metabolismus sacharidů a vápníku (Malíř *et al.*, 2013).

1.10.1 Toxikokinetika OTA

Toxikologický profil OTA se mění v závislosti na druhu organismu. Jak již bylo řečeno v předešlých kapitolách OTA je považován za významný kontaminant potravin rostlinného a živočišného původu. Kontaminace potravin živočišného původu je závislá na mnoha parametrech, které jsou ve vztahu s vlastnostmi daného organismu. Jedná se především o schopnost resorpce OTA trávicím traktem a schopností vylučovat OTA z organismu (Ruprich, 1997).

OTA je kumulativní sloučenina s relativně rychlou absorpcí a pomalou eliminací. Po absorpci z gastrointestinálního traktu, ke které dochází nejčastěji v tenkém střevě, se váže na sérové proteiny (Malíř *et al.*, 2013).

Vstřebávání OTA se liší mezi druhy, například u prasat činí množství absorbovaného OTA až 66 %, dále u potkanů a králíků 56 % a u kuřat 40 %. K resorpci OTA dochází v proximálních a distálních tubulech ledvin, krvi a játrech. Játra a ledviny jsou nejdůležitějšími orgány z hlediska biotransformace OTA. Resorpce OTA ze střeva zpět do krevního oběhu v důsledku biliární recyklace upřednostňuje systémové rozdělení do různých tkání. U všech druhů hrají důležitou roli v plazmatickém odbourání toxinu fekální a močové výměšky. Kromě toho se OTA vylučuje spolu s mateřským mlékem (Ringot *et. al.*, 2003).

1.11 Toxikologické hodnocení OTA

1.12 Akutní a subakutní toxicita

Mechanismus účinku OTA spočívá především v inhibici syntézy proteinů. Syntéza probíhá na základě kompetice s fenylalaninem v reakcích katalyzovaných fenylalanin-tRNA syntetázou. Odtud odvozujeme akutní a chronickou toxicitu OTA. Studium těchto mechanismů bylo mimo jiné prokázáno poškození metabolismů cukrů a vápníku, poškození mitochondriálních funkcí a zvýšení peroxidace lipidů. Hlavními toxickými účinky OTA jsou nefrotoxicita, genotoxicita, mutagenita, imunotoxicita, neurotoxicita, teratogenita a karcinogenita. (Malíř & Ostrý, 2003).

Akutní toxicita OTA se liší v závislosti na druhu, pohlaví a na způsobu příjmu OTA. Bylo prokázáno, že psi a prasata (LD50 0,2 a 1 mg / kg tělesné hmotnosti, v tomto pořadí) jsou citlivější k akutní toxicitě více než krysy (LD50 20-30 mg/kg tělesné hmotnosti) nebo myši (LD50 46-58 mg/kg tělesné hmotnosti) (Malíř *et al.*, 2013).

Hlavním cílem toxicity OTA jsou u všech testovaných druhů zvířat ledviny. Další důsledky toxických účinků OTA jsou srdeční a jaterní abnormality, aberace koagulačních faktorů u potkanů doprovázené krvácením a trombózou ve slezině, mozku, játrech a srdci. Objevují se také léze gastrointestinálního traktu u myši a střevní křehkost a ledvinová poškození u kuřat (Malíř, 2015).

1.13 Chronická toxicita

Vystavení nízkých dávek OTA je zodpovědné za nefrotoxicitu a rakovinu močových cest. OTA je také imunotoxický, hepatotoxický a teratogenní. Při podání OTA několika druhům zvířat vyvolal OTA různé účinky na kostní dřeň a také imunitní reakce, které zahrnují lymfopenii u psů, slepic, krůt a prasat. Byla zaznamenána také regrese brzlíku a imunosuprese u myši (Malíř, 2015).

I když jsou ochratoxiny v první řadě nefrotoxicke, může dojít i k poškození jater. Při studiích na kuřecích brojlerech bylo zaznamenáno poškození jater ve shodě s nefrotoxicitou avšak účinky ochratoxinů na játra se zdají být mnohem méně výrazné než u aflatoxinů. Imunitní systém prasat je citlivý na OTA již při dávkách nižších než 1 mg/kg (10% inhibice imunitní reakce je pozorována u dávky 0,06 mg/kg) za normálních podmínek chovu. OTA je silným teratogenem u myši, potkanů a králíků. U prasat jsou teratogenní účinky ve srovnání s těmito zvířaty výrazně nižší (Malíř *et al.*, 2013).

1.13.1 Nefrotoxicita

Z výzkumů a testování živočichů vyplývá, že OTA vykazuje toxické účinky na ptáky a savce, ale u dospělých přežvýkavců pravděpodobně k nefrotickému působení nedochází. Studie v Dánsku, Maďarsku, Skandinávii, Polsku, Chorvatsku, Bulharsku a bývalém Československu prokázaly, že OTA hraje hlavní roli v etiologii prasečí neuropatie (Malíř, 2015).

Nefropatie se vyznačuje polyurií, glykosurií, proteinurií, enzymurií, sníženou osmolaritou moči, poruchou funkce tubulů a histopatologickými změnami v proximálním tubulu. Psi a prasata jsou velice citliví k nefrotickým účinkům OTA při orální expozici. U prasat je míra koncentrace krmné dávky velmi nízká a to 0,2 mg/kg (což odpovídá 8 ng/kg tělesné hmotnosti za den). Podání takové dávky po dobu 90 dní způsobilo snížení aktivity několika ledvinových enzymů a sníženou funkci ledvin. Studie chronické toxicity OTA na nefropatii prokázaly selhání ledvin u prasnic krmných krmiv s obsahem OTA 1 mg/kg (odpovídá přibližně 41 ng/kg tělesné hmotnosti za den) po dobu dvou let. Přítomnost OTA v krmivech je nejvýznamnější příčinou mykotoxikózy prasat a drůbeží neuropatie (IARC, 1993).

Experimentální studie nefrotoxicity OTA jak *in vitro*, tak *in vivo* ukázaly, že OTA narušuje intercelulární metabolické procesy (s následnými apoptózami ledvinových buněk), renální hemodynamiku a výrazně ovlivňuje funkci proximálních tubulů (a to i po subchronické expozici). OTA způsobuje pokles glomerulární filtrace a tubulární resorpce, ovlivňuje také všechny části nefronu a ledvin. OTA je nejspíše příčinou Balkánské Endemické Nefropatie (BEN) a Chronické Intersticiální Nefropatie (v severní Africe), dále uroteliálních nádorů u lidí (Malíř, 2015).

Porovnáme-li toxické účinky ostatních typů ochratoxinů, které vyplývají například ze studie na kuřatech, vychází, že OTA je až 16x méně toxický. Ochratoxin C je stejně toxický jako OTA, ale v potravinách a krmivech se vyskytuje daleko méně. Ochratoxin B se vyznačuje zejména svými genotoxickými účinky (Malíř & Ostrý, 2003).

1.14 Pozdní toxické účinky

1.14.1 Genotoxicita a mutagenita

Genotoxické účinky OTA byly prokázány za pomoci různých *in vitro* a *in vivo* studií. Výsledky těchto studií však nebyly konzistentní, protože mechanismus genotoxického působení OTA ještě není zcela objasněn a je stále v šetření. Protichůdné výsledky byly získány z různých mikrobiálních zkoušek a z testů prováděných u savců (zejména pokud šlo o tvorbu aduktů DNA) (Malíř *et al.*, 2013).

OTA byl dlouhou dobu považován jako genotoxicky necitlivý ke klasické zkoušce pro mutagenitu. Amesův test na bakteriální mutagenitu provedený na různých kmenech *Salmonella typhimurium* byl negativní. Později byla mutagenní aktivita v Amesově testu prokázána při testování metabolismu OTA aktivovaného pomocí primárních hepatocytů potkana nebo při použití mikrosomů ledvin. Tento modifikovaný organismus vykazoval jasnou mutagenní odpověď (Malíř & Ostrý, 2003).

OTA nevyvolal chromozomální aberace v buňkách CHO, ale indukovanou výměnu sesterských chromatid v prasečích epiteliálních buněk močového měchýře, stejně jako chromozomální aberace lidských lymfocytů (Malíř *et al.*, 2013).

Indukce jednořetězových zlomů potvrdila genotoxicitu OTA na úrovni DNA. Při testování *in vitro* bylo při cytogenetickém vyšetření pozorováno zvýšení výměny sesterských chromatid v lidských periferních lymfocytech. Na základě současné odborné literatury, kterou máme k dispozici, se dělí genotoxické působení OTA na DNA na přímé (tvorba aduktů DNA) a nepřímé (oxidační poškození DNA) (Malíř *et al.*, 2013).

Tvorba kovalentní vazby OTA (nebo jeho metabolitů) na strukturu DNA, průkaz aduktů OTA s DNA u testovaných zvířat, ale i u pacientů s nádory ledvin z oblasti BEN je důležitým ukazatelem možné tvorby nádorového onemocnění způsobeného expozicí OTA (Malíř & Ostrý, 2003).

U OTA byly hlášeny indukce peroxidace lipidů nebo poškození v důsledku působení nepříznivých účinků na enzymy zajišťující opravy DNA, topoizomerázy a bílkovinná vřetena.

Nejužitečnějšími testy pro detekci genotoxicity OTA je test Comet a test mikrojader. Test mikrojader je jednoduchý a citlivý test, který slouží pro stanovení klastogenicity a aneugenicity chemických látek (Malíř *et al.*, 2013).

1.14.2 Karcinogenita

V současné době je způsob karcinogenního působení OTA ne zcela objasněn, avšak genotoxický metabolismus OTA, který úzce souvisí se zprostředkováním karcinogeneze, hraje důležitou roli v iniciaci nádorového procesu. Dostupné důkazy naznačují, že OTA je genotoxický karcinogen, který indukuje oxidační poškození DNA spolu s tvorbou DNA duktů (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007).

Při studiích na potkanech a krysách byla pozorována vysoká míra vzniku metastáz z karcinomů ledvin především do plic, jater a lymfatických uzlin, což bylo pozorováno také u mužů a žen. S ohledem na tyto výsledky, Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) vyhodnotila experimentální důkazy karcinogenity jako dostatečné a označila OTA jako pravděpodobný karcinogen pro člověka (skupina 2B, IARC 1993 karcinogenní riziko OTA je dostatečně charakterizováno a známo z toxikologických údajů získaných ze studií na pokusných zvířatech) (Malíř, 2015).

Poslední informace o možné karcinogenitě OTA u lidské populace, pocházející z Francie, zveřejněné na 32. workshopu mykotoxinu v Lyngby v roce 2010 informují o tom, že OTA je považován za úplný karcinogen. Bylo rovněž prokázáno, že nitroděložní expozice OTA vytváří DNA adukty ve varlatech nově narozených myší a že tyto adukty jsou podobné DNA aduktům, které jsou pozorovány v ledvinách a varlatech dospělých myší, které jsou vystaveny působení OTA v potravě. Tyto údaje přispěly k hypotéze, že OTA může hrát roli v rakovině varlat. Toto zjištění je předmětem diskuzí o karcinogenním účinku OTA (Malíř, 2015).

1.14.3 Teratogenita

OTA je stejně účinný teratogen jako neurotoxin. Testování březích samic potkanů a krys prokázalo nižší hmotnost plodů v různých dnech březosti, zakrnělost plodů, deformace čenichů a další významné změny, včetně volných žeber a agenezí obratlů. Účinek OTA závisel na době podání dané dávky (Brown *et al.*, 1976).

Změny embryí byly pozorovány také u křečků a to již po jedné dávce OTA intraperitoneálně (2,5 - 20 mg.kg⁻¹ hmotnosti mezi 7. - 10. dnem březosti) (Malíř & Ostrý, 2003).

Mechanismus teratogenity navozené OTA nebyl dosud jednoznačně určen, ale předpokládá se přímý účinek OTA na embryonální vývoj. O účincích OTA z hlediska vývojové toxicity u člověka nejsou dosud žádné relevantní údaje (Malíř & Ostrý, 2003).

1.14.4 Imunosupresivní účinky

OTA inhibuje syntézu proteinů a do jisté míry i syntézu kyseliny ribonukleové v bakteriích (Haubeck *et al.*, 1981).

Při testování imunosupresivních účinků OTA v podmínkách *in vitro* byla prokázána schopnost OTA inhibovat proliferaci periferních T a B lymfocytů, narušit tvorbu interleukinu 2 a potlačit tvorbu interferonu. U experimentálních zvířat může indukovat lymfopenii, regresi thymu a potlačení imunitní odpovědi. Imunitní systém prasete je citlivý na dávky OTA menší než 1 mg.kg⁻¹ v podmínkách běžného standardního chovu. Dávky OTA v množství 2,5 mg.kg⁻¹ krmiva podané prasatům snižují fagocytární aktivitu makrofágů a tvorbu interleukinu 2 (Malíř & Ostrý, 2003).

Při testování bylo prokázáno, že inhibice růstu a proteinové syntézy imunosupresivními účinky OTA v kulturách buněk hepatomu tkání mohou být potlačeny přidáním fenylalaninu. U myší otrávených letální dávkou OTA (100%) okamžité intraperitoneální podání fenylalaninu zabránilo smrtícímu účinku OTA. Dále inhibice mikrofágů OTA mohla být potlačena nebo zeslabena podáním fenylalaninu (Haubeck *et al.*, 1981).

Poškození imunitního systému podporuje hypotézu o souvislosti expozice OTA s karcinogenním působením. Údaje o imunotoxických účincích OTA u člověka dosud nejsou k dispozici (Malíř & Ostrý, 2003).

1.15 Biomonitoring OTA

Biomonitoring OTA je založen na stanovení úrovně OTA v krevním séru, plazmě, moči, mléce nebo cílových tkáních jako jsou ledviny. Studie prokázaly, že expozice lidské populace OTA je celosvětovým problémem (Malíř, 2015).

Základními nástroji používanými za účelem měření expozice na toxické činidlo nebo rozsahu jakékoliv toxické reakce na toto činidlo a také odhadu pravděpodobné odpovědi jsou biomarkery. Biomarkery se obecně dělí do tří skupin a to biomarkery expozice, odpovědi nebo toxického účinku a citlivosti. Bez ohledu na tyto kategorie, by měl být jakýkoli biologický marker kvantitativní, neinvazivní, citlivý, konkrétní, snadno měřitelný a vztahující se k příslušnému biochemickému mechanismu. Výběr daného biomarkeru závisí na mnoha faktorech, například na dostupnosti a platnosti daného biomarkeru. Vnitřní dávky biomarkerů ukazují, že vystavení konkrétní sloučenině se potvrdilo měřením jeho metabolitu v tělních tekutinách nebo tkáních (Malíř *et al.*, 2012).

OTA v mléce, séru nebo moči se kvalifikuje jako biomarker expozice vzhledem k pomalému vylučování z těla, což dokládá jeho biologický poločas v krvi, který se pohybuje v řádu několika týdnů. Hlavní nevýhodou je stále neúplná znalost farmakokinetického profilu OTA. Vyšší hodnoty OTA jsou obvykle v krevním séru než v moči. Je třeba zmínit, že přítomnost OTA v těchto vzorcích odráží expozici organismů OTA vyplývající ze všech cest, dále expozici ze všech zdrojů a také biologickou dostupnost OTA. K jednoduššímu posouzení individuální a rizikové skupiny je potřeba analyzovat pouze jeden typ vzorku (Malíř *et al.*, 2012).

1.15.1 Biologický monitoring lidských ledvin v ČR

Přítomnost OTA v lidských tkáních je přímým a jednoznačným důkazem o expozici člověka OTA, i když proveditelnost měření "in vivo" je zjevně limitovaná. Jedna série těchto měření se uskutečnila z třiceti vzorků lidských ledvin shromážděných "post-mortem" v rámci Českého biologického programu sledování v roce 2001. OTA byl přítomen u 40% vzorků, avšak žádná z osob, jejichž ledviny byly studovány, netrpěla renální insuficiencí (Malíř *et al.*, 2012).

1.16 Zdravotní riziko

Lidé jsou vystaveni působení expozice ochratoxinů a jejich metabolitům několika cestami, stejně jako je to u jiných druhů mykotoxinů. V největší míře tomu dochází spolu s příjmem potravy, výrazně menší podíl má pak expozice po vdechnutí (Malíř, 2015).

Nálezy OTA v krvi a tkáních dokládají expozici člověka. OTA se v krvi velmi silně váže a to až z 95 % na proteiny obsažené v plazmě, především na albumin a makromolekulu neznámé struktury o relativní molekulové hmotnosti 20 000. Afinita této makromolekuly na OTA je 10^6 krát vyšší než u sérového albuminu. Vazba OTA na plazmatické proteiny hraje významnou roli v organismu a podílí se na toxicitě OTA. Toxikokinetický profil se liší v závislosti na živočišném druhu. OTA vstupuje do enterohepatálního cyklu, který je z části odpovědný za dlouhý biologický poločas toxinu v organismu. Poločas vylučování OTA činí u člověka kolem 35 dní (Malíř & Ostrý, 2003).

Některé studie ukazují, že se OTA chová jako kumulativní jed s rychlou absorpcí a pomalým vylučováním. Krevní cestou je pak OTA distribuován v organismu. Hlavními místy retence jsou ledviny, játra, varlata, střevo (orgány rychlé kinetiky), svaly a tuková tkáň, která tvoří rezervu. Uvádí se, že nálezy koncentrací OTA v krevním séru vyšší než $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ mohou vyvolat neuropatii (Malíř & Ostrý, 2003).

Způsob hodnocení expozice OTA, zdravotního rizika a nebezpečí pro lidskou populaci se provádí buď odhadem denního příjmu OTA spolu s potravou (stanovení OTA v potravinách ve vztahu k jejich zkonsumovanému množství), nebo stanovením OTA, jako významného biomarkeru v krevním séru a plazmě, moči, popřípadě „post mortem“ v ledvinách aj. tkáních (Malíř & Ostrý, 2003).

Riziko ochratoxinů spočívá v pomalejší eliminaci, než u ostatních testovaných druhů a tím pádem k delšímu období, ve kterém může dojít k vlivu na následné poškození lidského zdraví. Přes jednotlivé rozdíly v odolnosti nebo náchylnosti k expozici ochratoxinů, tyto mykotoxiny přispívají ke zhoršení zdraví. Ochratokikózy, nebo-li onemocnění vznikají v důsledku působení ochratoxinů, se mohou projevit jak v akutní tak i chronické formě. Mohou vést k náhlé a rychlé smrti nebo k tvorbě nádorů. Více akutní onemocnění může nastat, pokud se ochratoxiny střetávají s imunitními procesy, čímž se pacient stává více náchylným k daným onemocněním (Malíř, 2015).

Byly pozorovány vyšší hladiny OTA v krvi u pacientů trpících nefropatií než u zdravých lidí. Výrazný nárůst hladiny OTA v séru u pacientů s chronickým selháním ledvin může představovat jeden z mechanismů odpovědných za zvýšený výskyt zhoubných nádorů. Zvýšení výskytu nádorů bylo prokázáno zejména pro ledviny a močové cesty, které byly vystaveny expozici OTA. V České republice je výskyt karcinomu ledvin nejvyšší v Evropě a proto je třeba ověřit, zda OTA hraje roli v tak vysokém procentu výskytu nádorů v české populaci. Kromě těchto poznatků byla také vyslovena hypotéza, že OTA může být zapojen do patogeneze karcinomu varlat, nicméně tyto poznatky vyžadují další studie, které s určitostí potvrdí vliv OTA na karcinom varlat a objasní jeho roli v tomto procesu (Malíř *et al.*, 2013).

V nedávné Tchajwanské studii, zabývající se množstvím OTA v moči u pacientů s *diabetes mellitus* bylo zjištěno, že OTA je zde přítomen ve výrazně vyšším množství než u pacientů s jinými typy nefropatie. Také bylo zjištěno, že vylučování OTA v moči pozitivně a významně koreluje s vylučováním bílkovin v moči (příznak nefropatie).

Tyto studie ukazují vzájemný vztah a dohromady naznačují, že vystavení vysokým dávkám OTA je spojeno s poškozením ledvin. Vztah mezi OTA a *diabetes mellitus* je bohužel stále nejasný (Malíř *et al.*, 2013).

Je důležité podotknout, že OTA může synergicky spolupracovat i s ostatními druhy mykotoxinů nebo jejich chemických kontaminantů. Tato synergie může mít za následek především zesílení toxických účinků daných látek. Další problém spočívá v konjugovaných nebo maskovaných mykotoxinech, které se vyskytují společně s "volným" OTA. Maskované mykotoxiny mohou být hydrolyzovány v gastrointestinálním traktu a mohou mít toxické vlastnosti "volných" mykotoxinů, přičemž jejich skutečná toxicita a toxikokinetika zůstává do značné míry zahalena. U zvířat bylo prokázáno, že k mykotoxikózám dochází po konzumaci kontaminovaného krmiva. Přítomnost tzv. "volných" mykotoxinů v krmivu může vést k neočekávaným toxickým reakcím a závažné toxicitě. Za zmínku také stojí existence rostlinných maskovacích ochratoxinů, např. b-glukosid izomerů (4R) - a (4S) -4-hydroxyochratoxinu A (Malíř, 2015).

Nedávné studie prokázaly, že expozice může představovat i celosvětový problém. V Evropě byl OTA detekován v lidských krevních vzorcích v mnoha zemích, a to v koncentracích v rozsahu od 0,1 do 14,4 $\mu\text{g.l}^{-1}$ séra nebo plazmy. Velmi zajímavým faktem pro nás může být celosvětově dosud nejvyšší naměřená koncentrace OTA v lidském séru, která činila 1 800 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Malíř & Ostrý, 2003).

1.17 Metody stanovení ochratoxinů

Bylo vyvinuto několik metod pro stanovení ochratoxinů v různých potravinářských komoditách, jako jsou obiloviny (ječmen, kukuřice, pšeničné otruby a mouka), kakao, káva, víno, pivo a sušené ovoce. Největší pozornost je věnována detekci OTA, protože se jedná o nejvýznamnějšího zástupce této skupiny mykotoxinů (Škarková *et al.*, 2013).

Metoda tenké chromatografické vrstvy je vhodná pro detekci 2,4-4 $\mu\text{g} / \text{kg}$ OTA v rýži nebo kokosových vločkách a 10 $\mu\text{g} / \text{kg}$ OTA v pšenici. Většina metod zahrnuje imunoafinitní (IMA) sanaci v kombinaci s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) a následnou detekcí pomocí fluorescence (FD). HPLC spojená s hmotnostní spektrometrií (MS) nebo tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) se rychle šíří jako slibná technika pro screening, identifikaci a kvantitativní stanovení velkého množství mykotoxinů, včetně OTA (Škarková *et al.*, 2013).

Existují i různé alternativní metody jako je například detekce pomocí fotodiodického pole (LC-DAD). Vysoce výkonná metoda pro stanovení OTA je chromatografie na tenké vrstvě (HPTLC), plynová chromatografie ve spojení s MS, imunoenzymatický (EIA) a fluorescenční polarizační imunologický test. Pro stanovení OTA ve víně byla navržena kapilární elektroforéza (CE) s UV detekcí. Využití laserové indukované fluorescence (LIF) jako citlivějšího systému pro detekci bylo navrženo pro stanovení OTA v různých vzorcích potravin (pražené kávy, kukuřice, čiroku) (Škarková *et al.*, 2013).

V České republice vznikl nový výzkumný projekt s názvem "Ochratoxin A - hodnocení zdravotního rizika pro různé skupiny obyvatelstva v České republice". Prvním cílem tohoto projektu bylo vytvořit a upravit schválené metody (HPLC-FD) pro účely kvantifikace OTA ve velkém množství druhů potravin a to jak rostlinného tak živočišného původu (Škarková *et al.*, 2013).

1.18 Možnosti detoxikace ochratoxinů

Kapitola je věnována především možnostem detoxikace OTA, jelikož se jedná o nejvýznamnějšího a nejvíce prostudovaného zástupce ochratoxinů.

Studium možností snížení OTA a redukce jeho toxického efektu rozkladem je velice důležité, avšak stále ve stádiu zkoumání. Musíme brát také v potaz, že OTA je sloučenina, kterou nelze trvale odstranit. Detoxikačních strategií je celá řada. Můžeme zmínit například detoxikaci pomocí oxidačních činidel (peroxidu vodíku) a detoxikaci za zvýšené teploty a pH, ke které dochází například u pražené kávy. Bohužel obě tyto metody vedou jen k nepatrnému snížení OTA. Z dalších testovaných metod můžeme zmínit detoxikaci pomocí amoniaku, která byla testována v krmných pokusech na prasatech. Výsledkem bylo snížení obsahu OTA v ječmeni o 85 %, avšak v ledvinách prasat byla zjištěna rezidua toxinu vyšší, než se očekávalo, proto je tato metoda považována za nedokonalou. Detoxikace mechanickým zpracováním zrna ukázala, že běžné metody opracování zrn nejsou adekvátní pro dostačující detoxikaci. Detoxikace přísádkem adsorbentů ke krmivu patří mezi poměrně známé metody odstraňování OTA z krmiv. Metoda je založena na přísádku nenutričních sorbentů (aktivní uhlí, bentonit nebo například lminosilikáty). Princip spočívá ve vazbě toxinu a zabránění jeho vstřebání do organismu (Ruprich, 1997).

Zajímavý pokus s detoxikací mléka byl proveden s využitím jogurtových bakterií a bifidobakterií. Přídavek 0,05 - 1,5 mg bakterií k 1 litru mléka před fermentací vedl k vymizení kontaminace OTA. Jendou z možností jak chránit organismus před toxickým účinkem OTA je snažit se o jeho rychlé vyloučení z organismu nebo jeho metabolické rozložení. Snad nejznámější látkou s protektivním účinkem je fenylalanin, který tvoří část molekuly OTA. Protektivní efekt proti genotoxicitě OTA byl zkoumán také u aspirinu nebo indomethacinu. Uvedené látky výrazně snižovaly množství aduktů v močovém měchýři a ledvinách, pokud byly podány myším před aplikací OTA (Ruprich, 1997).

Závěr

Kontaminace potravin, krmiv a s tím spojené nákazy lidí a zvířat jsou známy již od nepaměti, od doby, kdy člověk začal obdělávat zemědělskou půdu. Ochratoxiny patří mezi významné naturální toxiny, produkované vláknitými mikroskopickými houbami rodu *Aspergillus* a *Pencillium*. Své toxické účinky na lidskou i zvířecí populaci projevují již ve velmi nízkých koncentracích. Nejvýznamnějším a v současné době nejvíce diskutovaným mykotoxinem této skupiny je ochratoxin A.

OTA je všudypřítomný, přirozeně se vyskytují mykotoxin, který vykazuje mnoho toxických účinků - teratogenitu, hepatotoxicitu, imunotoxicitu, neurotoxicitu, genotoxicitu, karcinogenitu (možný lidský karcinogen skupiny 2B), ale vyniká zejména svojí nefrotoxicitou. Hlavním cílem jeho toxicity jsou ledviny.

Díky různým metabolickým drahám dochází ke vzniku mnoha metabolitů s různou silou toxického působení. Za netoxický produkt je považován $OT\alpha$, vznikající štěpením peptidové vazby v OTA. Naopak lakton-otevřený produkt (OP-OTA) nalezený u hlodavců, vykazuje vyšší toxicitu než OTA. OTB je díky ztrátě chlóru méně toxický než OTA. Chininové a hydrochinonové (OTQ/OTHQ) formy jsou výrazně toxičtější oproti OTA.

Výskyt OTA je v potravinách rostlinného a živočišného původu. Z potravin rostlinného původu se jedná zejména o cereálie, kávu, kakao, čokoládu, koření luštěniny, zelený čaj, fíky, pistácie, rozinky, hroznovou šťávu, víno a pivo. Z potravin živočišného původu bývají kontaminovány mnohdy - vepřové maso, vepřové výrobky z krve, ledviny nebo játra drůbeže, syrové maso a dokonce i uzené a solené ryby. Hlavním zdrojem podílejícím se na denním příjmu OTA jsou obiloviny a to až z 58 %. Proto je třeba monitorovat OTA v surovinách a potravinách a sledovat jeho denní příjem.

Dle zjištění je hlavním zdrojem expozice člověka OTA především potravní řetězec, jehož prostřednictvím jsou lidé tomuto toxinu vystaveni. Dochází k tomu buď přímo (konzumací kontaminovaných obilovin a olejnin) nebo nepřímo (konzumací kontaminovaného masa a mléka).

Díky celosvětovému rozšíření, které je do značné míry ovlivněno současným celosvětovým obchodem s potravinami, které podléhají kontaminaci OTA a pro jeho výrazné biologické (toxické) účinky, nesmíme riziko OTA opomíjet a věnovat mu značnou pozornost.

Tato práce shrnuje dosud publikované informace o mykotoxinech ochratoxinech a jejich toxicitě. Cílem této literární rešerše je poskytnout čtenáři ucelený přehled o této skupině mykotoxinů a to především o nejvýznamnějším zástupci ochratoxinu A.

Použitá literatura

AKMAN, S. A., ADAMS, M., CASE, D., PARK, G., & MANDERVILLE, R. A. 2012. Mutagenicity of ochratoxin A and its hydroquinone metabolite in the SupF gene of the mutation reporter plasmid Ps189. *Toxins*, **4**(4), 267-280.

BARTÍK, M., PISKAČ, A. 1998. *Veterinary toxicology*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 346 s. ISBN 0-444-99751-1

BENNETT, J. W., M. KLICH. 2003: Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. [online]. July 2003, **16**(3), 497-516. [citováno: 2015-03-20]. ISSN 1098-6618. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1285777>

BROWN, M. H., SZCZECH, G., & PURMALIS, B. P. 1976. Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicology and applied pharmacology*, **37**(2), 331-338.

CAVIN, C., DELATOUR, T., MARIN-KUAN, M., HOLZHÄUSER, D., HIGGINS, L., BEZENCON, C... & SCHILTER, B. 2007. Reduction in antioxidant defenses may contribute to ochratoxin A toxicity and carcinogenicity. *Toxicological Sciences*, **96**(1), 30-39.

DEGEN, G. H., MAYER, S., & BLASZKEWICZ, M. 2007. Biomonitoring of ochratoxin A in grain workers. *Mycotoxin research*, **23**(2), 88-93.

DIRHEIMER, G.; CREPPY, E. E. 1990. Mechanism of action of ochratoxin A. *IARC scientific publications* [online]. [citováno 2015-03-10]. **115**, 171-186., dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1820332>

FUCHS, R., HULT, K., PERAICA, M., RADIĆ, B., & PLESTINA, R. 1984. Conversion of ochratoxin C into ochratoxin A in vivo. *Applied and environmental microbiology*, **48**(1), 41-42.

HAUBECK, H. D., LORKOWSKI, G., KÖLSCH, E., & RÖSCHENTHALER, R. 1981. Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Applied and environmental microbiology*, **41**(4), 1040-1042.

HRDINA V., HRDINA R., JAHODÁŘ L., MARTINEC Z., MĚRKA V. 2004. *Přírodní toxiny a jedy*. Vyd. 1. Praha. 302 s. ISBN 80-7262-256-0

IARC (International Agency for Research on Cancer). 1993: Ochratoxin A. In *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*, Vol. **56**. 489-521.

KRMENČÍK P., KYSILKA J., 2015: Mikromycety [online]. [cit. 12. 2. 2015]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/mikromycety/mikromycety.php>

KVASNIČKOVÁ A. 2003: Základní informace o ochratoxinu A [online]. [citováno 2015-03-10]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=email&val=11455>

MALÍŘ, F. Náměstí Svobody 301, Univerzita Hradec Králové. Ústní sdělení. Hradec Králové 6. 5. 2015.

MALÍŘ, F., OSTRÝ V. 2003: *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Vyd. 1. Brno. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 349 s. ISBN 80-7013-395-3.

MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., & NOVOTNÁ, E. 2013. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Reviews*, **32**(2), 19-33.

MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., PFOHL-LESZKOWICZ, A., & Roubal, T. 2012. Ochratoxin A exposure biomarkers in the Czech Republic and comparison with foreign countries. *Biomarkers*, **17**(7), 577-589.

OSTRÝ, V., BUCHTA, V., 2003 a Rod *Aspergillus*, in MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských oborů, s. 105-111. ISBN 80-7013-395-3

OSTRÝ, V., BUCHTA, V., 2003 b Rod *Penicillium*, in MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských oborů, s. 112-120. ISBN 80-7013-395-3

OSTRÝ, V., MALÍŘ, F., & RUPRICH, J. 2013. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins*, **5**(9), 1574-1586.

PERAICA, M., RADIC, B., LUCIC, A., & PAVLOVIC, M. 1999: Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, **77**(9), 754-766.

PFOHL-LESZKOWICZ, A., & MANDERVILLE, R. A. 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular nutrition & food research*, **51**(1), 61-99.

PITT, J. I. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, **56**(1), 184-192.

RUPRICH, J., 1997. *Mykotoxin ochratoxin A: hodnocení nebezpečnosti a zdravotního rizika*. Brno: Centrum hygieny potravinových řetězců. 141 s. ISSN 0862 – 5956

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.

RŮŽEK L., VOŘÍŠEK K., POPELÁŘOVÁ E., RADA V., VLKOVÁ, E., RŮŽKOVÁ M. 2008. *Mikrobiologie. Pracovní sešit*. Česká zemědělská univerzita. Praha. 75 s. ISBN 978-80-213-1815-1

SCHWAAB CH. 2011. Mycotoxin occurrence [online]. [citováno dne 2015-03-20]. Dostupné z: (http://www.mycotoxins.info/myco_info/field_myocc.html)

SWEENEY, M. J., & DOBSON, A. D. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International journal of food microbiology*, **43**(3), 141-158.

ŠIMŮNEK, J. 2000. Mykotoxiny [online]. [citováno 12.2.2015]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/prelek/MYKOTW/mtidx.htm>

ŠKÁRKOVÁ, J., OSTRÝ, V., MALÍŘ, F., & ROUBAL, T. 2013. Determination of ochratoxin A in food by high performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, **46**(10), 1495-1504.

TOZLOVANU, M., FAUCET-MARQUIS, V., PFOHL-LESZKOWICZ, A., & MANDERVILLE, R. A. 2006. Genotoxicity of the hydroquinone metabolite of ochratoxin A: structure-activity relationships for covalent DNA adduction. *Chemical research in toxicology*, **19**(9), 1241-1247.

TURNER, N. W., SUBRAHMANYAM, S., & PILETSKY, S. A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica Chimica Acta*, **632**(2), 168-180.

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÉ UNIE. 2006. Nařízení komise (ES)č. 1881/2006.

[online]. [citováno 2015-03-10]. Dostupné z:

<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:CS:PDF>

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.

ZAIN, M. E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, **15**(2), 129-144.