

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Přírodní fungicidní látky a jejich vliv na plísň rodu *Aspergillus*

Zuzana Vávrová

Bakalářská práce

2017

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Natural antifungal substances and their effects on genus *Aspergillus*

Zuzana Vávrová

Bachelor thesis

2017

Zadání

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 25. 6. 2017

.....
Vávrová Zuzana

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. a konzultantce Ing. Simoně Kučerové za odborné vedení, poskytnutí cenných rad a především za trpělivost a čas, který mi v rámci konzultací věnovaly.

Zároveň bych chtěla poděkovat celé své rodině a blízkým, kteří mě po celou dobu mého studia podporovali.

ANOTACE

Bakalářská práce je zaměřena na plísň rodu *Aspergillus*. Práce je rozdělena do tří hlavních částí. V první jsou charakterizovány plísně tohoto rodu, ve druhé jsou popsány produkty jejich metabolismu a poslední část je věnována významným syntetickým a přírodním fungicidním látkám.

KLÍČOVÁ SLOVA

vláknité houby, mykotoxiny, přírodní látky, minimální fungicidní koncentrace

ANNOTATION

The bachelor thesis is focused on the fungi of the genus *Aspergillus*. The thesis is divided into three main parts. The first one deals with characteristics of this genus, in the second part, the products of their metabolism are described and the last part is devoted to significant synthetic and natural fungicidal substances.

KEYWORDS

filamentous fungi, mycotoxins, natural substances, minimum fungicidal concentration

OBSAH

ÚVOD	11
1 ROD <i>ASPERGILLUS</i>	12
1.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA A TAXONOMIE	12
1.2 MORFOLOGIE A ROZMNOŽOVÁNÍ	13
1.3 VÝSKYT A ZDROJE	14
1.4 KULTIVACE A IZOLACE	15
1.5 VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ A PRŮMYSLU.....	16
1.6 PATOGENITA A DIAGNOSTIKA	16
1.7 VÝZNAMNÍ ZÁSTUPCI	18
1.7.1 <i>ASPERGILLUS FLAVUS</i>	18
1.7.2 <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i>	19
1.7.3 <i>ASPERGILLUS NIGER</i>	19
1.7.4 <i>ASPERGILLUS NIDULANS</i>	20
2 PRODUKTY METABOLISMU PLÍSNÍ RODU <i>ASPERGILLUS</i>.....	21
2.1 AFLATOXINY	22
2.2 OCHRATOXINY	24
2.3 STERIGMATOCYSTINY	25
2.4 VERUKULOGEN	26
2.5 LOVASTATIN.....	26
3 FUNGICIDNÍ LÁTKY	28
3.1 OBECNÉ INFORMACE O FUNGICIDNÍCH LÁTKÁCH.....	28
3.2 SYNTETICKÉ FUNGICIDNÍ LÁTKY.....	29
3.2.1 AMFOTERICIN B	29
3.2.2 AZOLY	30
3.2.2.1 ITRAKONAZOL	31
3.2.2.2 VORIKONAZOL	31
3.2.2.3 POSAKONAZOL	32
3.2.3 ECHINOKANDINY	32

3.3	PŘÍRODNÍ FUNGICIDNÍ LÁTKY	33
3.3.1	<i>CINNAMOMUM CASSIA</i> L.....	34
3.3.2	<i>ALLIUM SATIVUM</i> L.....	36
3.3.3	<i>ALLIUM CEPA</i> L.....	37
3.3.4	<i>ANETHUM GRAVEOLENS</i> L.	39
3.3.5	<i>THYMUS VULGARIS</i> L.....	40
3.3.6	<i>HYPTIS SUAVEOLENS</i> L.	41
3.3.7	<i>ECHINOPHORA PLATYLOBA</i> DC.	42
4	ZÁVĚR	44
5	SEZNAM OBRÁZKŮ	45
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ABCD	koloidní disperze amfotericinu B
ABLC	lipidový komplex amfotericinu B
ACSO	alk(en)yl-cystein sulfoxid
AFB₁	aflatoxin B ₁
CNS	centrální nervová soustava
GRAS	všeobecně považovaný za bezpečný (Generally Recognized as Safe)
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A
LAMB	liposomální amfotericin B
LD₅₀	letální dávka udávající koncentraci látky, při které uhynie 50 % testovaných organismů
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
MFC	minimální fungicidní koncentrace (minimum fungicidal concentration)
MMP	mitochondriální membránový potenciál
OTA	ochratoxin A
PCR	polymerázová řetězová reakce
TAG	triacylglycerol
TEER	transepiteliální elektrický odpor
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

ÚVOD

V posledních letech došlo k výraznému nárůstu plísňových infekcí, které představují velké zdravotní riziko po celém světě. Rod *Aspergillus* je z fylogenetického hlediska velmi starý rod, který je také velmi důležitý nejen z hlediska zemědělského a průmyslového, ale i farmaceutického. Mnoho kmenů rodu *Aspergillus* se používá v biotechnologii pro výrobu antibiotik, léků, enzymů nebo organických kyselin. Zástupci tohoto rodu se významně uplatňují také při kvašení určitých potravin.

Na druhou stranu se aspergily v ekosystému podílejí na kontaminaci přírodních organických substrátů, zejména rostlinného původu. Rovněž produkují širokou škálu mykotoxinů, které při dlouhodobém užívání mohou ohrozit život lidí nebo zvířat a také představují vážné nebezpečí pro životní prostředí.

Léčba plísňových infekcí je kvůli omezeným účinkům antifungálních látek velmi náročná. Opakované používání dostupných syntetických látek je spojeno se zvýšenou toxicitou pro ledviny nebo játra a mimo jiné vzrůstá počet rezistentních kmenů plísní. To vede k vývoji účinnějších a méně toxických fungicidních látek přírodního původu. Nová léčiva však musí projít řadou testování *in vitro* a *in vivo*, aby se prokázalo bezpečné užívání pro člověka.

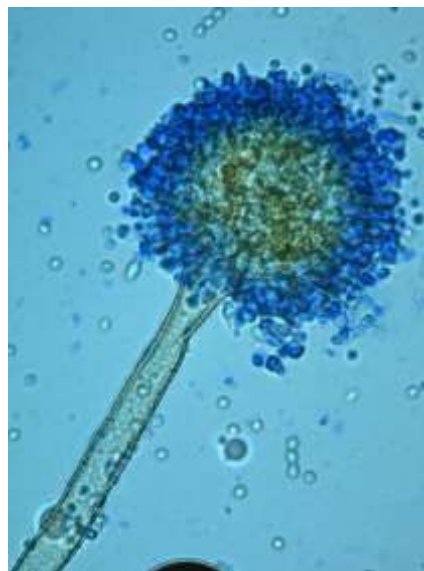
1 ROD *ASPERGILLUS*

1.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA A TAXONOMIE

Rod *Aspergillus* zahrnuje běžně se vyskytující saprofytické vláknité houby a spadá pod něj více než 250 druhů. V roce 1729 ho poprvé popsal a pojmenoval italský botanik Pier Antonio Micheli, který pozoroval charakteristickou strukturu spor, díky kterým poukázal na nepohlavní rozmnožování. Kvůli struktuře byl označen jako kropidlák, jak je znázorněno na Obrázku 1 (Goldman a Osmani, 2008; Rokas, 2013).

Plísň rodu *Aspergillus* se řadí do říše hub, oddělení *Ascomycota*, řádu *Eurotiales* a čeledi *Trichocomaceae* (Harris, 2012; Rokas, 2013). Během 20. století byl rod rozdělen na základě morfologických znaků do 18 druhů. Mezi nejvýznamnější zástupce, kteří způsobují infekce člověka, patří *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ochraceus* a *Aspergillus versicolor*. Jedná se o všudypřítomné mikroorganismy, které se vyskytují velmi hojně po celém světě (Afzal a kol., 2013).

Optimální růstová teplota pro aspergily je 37 °C, ale růst může být pozorován při teplotách od 12 °C do 48 °C. Zvýšená teplota přispívá k jejich patogenitě pro člověka a ostatní teplokrevné živočichy (Hedayati a kol., 2007).



Obrázek 1 *Aspergillus melleus*

světelný mikroskop, zvětšení 400x,

[<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/presse-download.html>; staženo dne 26. 11. 2017]

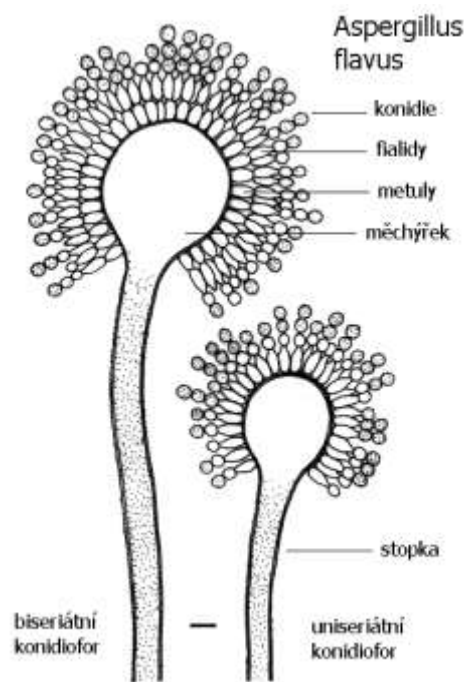
1.2 MORFOLOGIE A ROZMNOŽOVÁNÍ

Základním morfologickým znakem je stavba konidioforu, jak je patrné na Obrázku 2. Jedná se o reprodukční strukturu, která umožňuje vláknité houbě vytvářet a šířit velké množství nepohlavních spor. Na rozdíl od jiných plísní (např. rod *Penicillium*) je konidiofor rodu *Aspergillus* složitější a obsahuje větší počet buněk. Typickou vlastností je potlačení větvení stopky a tvorba septovaných hyf, které se rozrůstají a tvoří mycelium (Harris, 2012). Na základě uspořádání rozlišujeme 2 typy konidioforů. Při uniseriálním uspořádání vyrůstají fialidy s konidiemi přímo z hlavice konidioforu, naopak při biseriálním uspořádání nasedají fialidy s konidiemi na oválné buňky vyrůstající z hlavice, tzv. metuly (Harris, 2012; Samson a kol., 2014).

Dalším charakteristickým znakem je hlavičkovité zakončení konidioforu nazývaný měchýřek (Harris, 2012). Ten je porostlý fialidami, na které nasedají konidie. Měchýřek tvořený fialidami s řetízky konidií tvoří tzv. konidiální hlavičku, která je často viditelná pouhým okem. Konidiální hlavička je základem morfologické identifikace a rovněž je její uspořádání charakteristické pro jednotlivé druhy (Bartáková a kol., 2007).

Plísňe rodu *Aspergillus* se rozmnožují dvojím způsobem. Častěji dochází k nepohlavnímu rozmnožování (anamorfní stádium), při kterém plíseň produkuje nepohlavní spory, tzv. konidie. Některé druhy mohou kromě konidiálního stádia vytvářet i pohlavní stádium (teleomorfní stádium), při kterém vznikají pohlavní spory, tzv. askospory. Ty se tvoří po 8 ve vřecích, která se nejčastěji vyvíjejí v plodnicích. Rozlišení pohlavního a nepohlavního stádia je rozhodující pro studium taxonomie (Šilhánková, 2002).

V souladu s pravidly botanické nomenklatury, kterými se řídí názvosloví všech hub, pohlavní (teleomorfní) stádium vyžaduje svůj vlastní název. Například genetický model *Aspergillus nidulans*, který je anamorfou, je také nazýván *Emericella nidulans* (označuje teleomorfní stádium plísně). Tato dvojí terminologie byla pro tehdejší vědce matoucí, odmítali ji, a proto používali název *Aspergillus* jak pro konidiální, tak i pro pohlavní fázi (Goldman a Osmani, 2008).



Obrázek 2 Konidiofor *Aspergillus flavus*

[<http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/mi-niatlas/asp-fl.htm>; staženo dne 11. 11. 2016]

1.3 VÝSKYT A ZDROJE

Rod *Aspergillus* zahrnuje ubikvitární a odolné organismy, které dobře rostou i ve vlhkém prostředí, přestože k šíření spor nejlépe dochází v suchém ovzduší (Patterson a Strek, 2014). Zástupci se vyskytují na celém světě, hojněji však v tropickém a mírném podnebném pásu. Dokonce mohou obývat i polární oblasti (Galimberty a kol., 2012).

Přírodním místem výskytu plísní *Aspergillus* je půda a rozkládající se organický materiál. Také způsobují kažení potravin. Mezi nejčastěji kontaminované potraviny patří především obilniny (pšenice, oves, ječmen, kukuřice, rýže, čirok) kontaminované *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* a *Aspergillus tamarii*. *Aspergillus flavus* a *Aspergillus niger* dále napadají olejninu (slunečnice, řepka olejná), koření (pepř, chilli, kmín) a ořechy (arašídý, kešu, pistácie). *Aspergillus ochraceus* se může nacházet i v sušeném ovoci. Ke kontaminaci může docházet před sklizní, během přepravy i při skladování a to za příznivých podmínek teploty a vlhkosti vzduchu. Konzumace kontaminovaných plodin má negativní vliv na lidské zdraví, neboť způsobuje vážné onemocnění a v nejhorším případě může být smrtelná (Galimberty a kol., 2012; Reddy a kol., 2011).

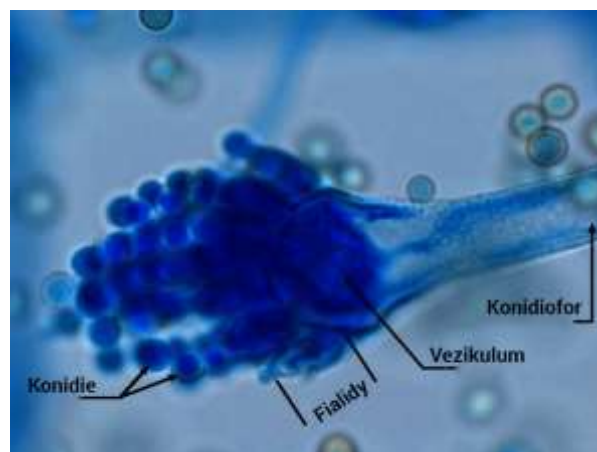
1.4 KULTIVACE A IZOLACE

Pro kultivaci *Aspergillus* z klinických vzorků se používají běžná pevná média (krevní a čokoládový agar) nebo tekutá média (BHI bujón). Také vyrůstají na speciálních mykologických půdách, např. Sabouraudův glukózový agar (SGA), Czapek-Doxův agar (CZA), maltózový agar (MEA) nebo Czapkův agar s kvasničným extraktem (CYA) (Hope a kol., 2005; Diba a kol., 2007; Afzal a kol., 2013). Na těchto kultivačních médiích vyrůstají organismy rychle a po 1 až 3 dnech inkubace tvoří dobře viditelné kolonie. Výjimečně se může inkubační doba prodloužit až na 4 týdny. Po 1 týdnu kultivace lze již pozorovat morfologické vlastnosti kolonií a mikroskopické znaky zárodků, které umožňují rozpoznat jednotlivé druhy. Plísňe rodu *Aspergillus* dobře rostou na kultivačních médiích, které neobsahují organickou sloučeninu cykloheximid, protože jsou na ni citlivé (Galimberti a kol., 2012).

Prvním krokem k identifikaci jednotlivých druhů rodu *Aspergillus* jsou makroskopické znaky pozorované na kultivačních půdách (znázorněno na Obrázku 3). Mezi nejdůležitější patří velikost a barva kolonií, vzhled rubu kolonií a zbarvení konidií, popř. zápach nebo vůně. Mikroskopické znaky (znázorněno na Obrázku 4) zahrnují větvení konidioforů, metuly, fialidy, velikost a tvar konidií a přítomnost spor (Afzal a kol., 2013). V obarvených preparátech lze pozorovat septované hyfy široké cca 2 až 4 μm , více či méně rozvětvené pod úhlem 45° (Galimberti a kol., 2012).



Obrázek 3 Kolonie *Aspergillus fumigatus* CYA agar, 5 dní, 25 °C, aerobní kultivace, měřítko 1cm
[<http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/asp-fu.htm>; staženo dne 26. 1. 2017]



Obrázek 4 *Aspergillus fumigatus* digitální mikroskop, zvětšení 1000x, obarveno laktofenolem [<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.cz/2012/01/aspergillus-fumigatus.html>; staženo dne 26. 1. 2017]

1.5 VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ A PRŮMYSLU

Aspergily jsou velmi užitečné v potravinářském průmyslu. První využití těchto plísní v lidské výživě bylo při kvašení rýže, sóji a dalších potravin rostlinného původu. Tato myšlenka vznikla v Číně před 2000 lety a jejím cílem bylo zlepšit chuť pokrmů a zároveň jejich stravitelnost. Poté se fermentované potraviny rozšířily do Indonésie, Japonska, Koreje a dalších asijských zemí (Goldman a Osmani, 2008).

V Japonsku je nejčastěji využívaným aspergilem *Aspergillus sojae* nebo blízký příbuzný druh *Aspergillus oryzae*, které se používají při výrobě koji. Jedná se o směs rýže, pšenice, ječmene nebo jiné obiloviny se sójovými boby a příslušnými aspergily. Avšak nejvíce se aspergily uplatňují při výrobě japonského rýžového vína „saké“, při výrobě sójové omáčky „shoyu“ a při fermentaci sójových bobů, které se používají na přípravu tradiční japonské kořenící pasty „misa“ (Goldman a Osmani, 2008). Prvním krokem výroby sójové omáčky je smíchání koji se sójovými boby a pšenicí. Vzniklá kultura se smísí se slanou vodou a proběhne anaerobní fermentace za použití kvasnic a bakterií mléčného kvašení (laktobacilů). Během této doby se sójové boby a pšenice přemění na polotekutou kaši a lisováním této kaše vznikne sójová omáčka. Výroba „saké“ se provádí smísením inokula koji s dušenou rýží a vodou. Poté proběhne inkubace 3 - 4 dny, přidají se kvasinky a dochází ke kvašení za vzniku alkoholu (Flickinger a Drew, 1999).

Koncem 19. století se procesem koji zabýval japonský chemik Jokichi Takamine, přezdívan jako otec japonsko-americké biotechnologie. Upravil proces pro širší komerční využití a zasloužil se o vydání 1. patentu za mikrobiální enzym izolovaný z koji, kterým byla amyláza. V současné době vědci identifikovali z koji více než 50 různých enzymů (Goldman a Osmani, 2008).

1.6 PATOGENITA A DIAGNOSTIKA

Plísně rodu *Aspergillus* jsou významnými původci nosokomiálních nákaz. U jedinců s oslabeným imunitním systémem způsobují velmi nebezpečné infekce. Jedná se zejména o pacienty po transplantaci krvetvorných kmenových buněk, o pacienty s leukémií či nádorovým onemocněním. Infekce se vyskytují i u osob, které se dlouhodobě léčí vysokými dávkami kortikosteroidů (Dagenais a Keller, 2009).

Závažným infekčním onemocněním způsobeným aspergily je aspergilóza, která se mnohdy vyskytuje u jedinců s oslabenou imunitou. Obvykle postihuje plíce, pohrudnici, hrudní

stěnu, srdce a šíří se až do CNS (Wattier a Ramirez-Avila, 2016). Příležitostně mohou spory vstoupit do těla gastrointestinálním traktem nebo kůží (Galimberti a kol., 2012).

Nejčastější formou je invazivní plicní aspergilóza a jejím častým původcem je kmen *Aspergillus fumigatus* (Lazovic a kol., 2012). Menší podíl na vzniku má také *Aspergillus flavus* a *Aspergillus niger* (Patterson a Strek, 2014). Infekční cyklus začíná tvorbou konidií, které se snadno rozptýlí do ovzduší. Člověk se primárně infikuje vdechováním těchto vzdušných konidií, které se následně ukládají v průduškách a v plicních sklípcích (Dagenais a Keller, 2009).

Vrozená imunita hraje hlavní roli v imunitní odpovědi. První obranou proti konidiím jsou makrofágy. V případě poruchy jejich aktivity dochází ke klíčení konidií a k následné tvorbě hyf (Galimberti a kol., 2012).

Klinické příznaky tohoto onemocnění zahrnují horečku a respirační symptomy, mezi které patří kašel, dušnost, bolesti na hrudi a hemoptýza. Popřípadě to může být doprovázeno tělesnou slabostí, nechutenstvím a ztrátou na váze (Patterson a Strek, 2014; Galimberti a kol., 2012). Invazivní aspergilóza se může projevit i kožními příznaky, které mohou být nespecifické. Jedná se o erytematózní plaky, papuly, vřídky, puchýře a krevní výron zvaný ekchymóza. V neposlední řadě může dojít ke změně duševního stavu nebo k poruše vidění (Wattier a Ramirez-Avila, 2016).

V dnešní době má invazivní aspergilóza špatnou prognózu, která se liší v závislosti na šíření infekce spojené s rizikovými faktory a včasné zahájenou léčbou. Často bývá příčinou smrti. V případě postižení plic nebo vedlejších nosních dutin je úmrtnost cca 25% až 50%, zatímco při působení na CNS může být smrtelná z 65 % až 90 % (Galimberti a kol., 2012).

U astmatiků a pacientů s cystickou fibrózou se může vyskytnout alergická bronchopulmonální aspergilóza, u které jsou dýchací cesty kolonizovány aspergilem, avšak nedochází k invazi do organismu (Tracy a kol., 2016). Mezi typické příznaky tohoto onemocnění patří dušnost, horečka, únava a postupně může dojít k nevratnému poškození plic. Příkladem je tzv. syndrom plíce sládků vyskytující se u pivovarských dělníků pracujících s ječmenem, na kterém se během skladování vytvoří velké množství spor *Aspergillus clavatus* (Greenwood a kol., 1999).

Další neinvazivní formou onemocnění je aspergilom, při kterém aspergily kolonizují plíce. Typickým projevem je mírný kašel a při množení mikroorganismů může dojít k hemoptýze (Greenwood a kol., 1999).

V současné době se při průkazu invazivní aspergilózy využívá stanovení antigenu, který je složkou buněčné stěny, tzv. galaktomananu. Jedná se o termostabilní polysacharid, který se

uvolňuje během růstu většiny kmenů aspergilů. K průkazu tohoto antigenu slouží enzymový imunologický test ELISA, který umožňuje kvantifikovat množství antigenu ve vyšetřovaném materiálu (Wattier a Ramirez-Avila, 2016). Vyšetření se provádí z krve a z tělesných tekutin jako je např. bronchoalveolární laváž nebo mozkomíšní mok (Galimberti a kol., 2012).

Významnou roli v diagnostice hraje i výpočetní tomografie, při které se zjišťuje přítomnost „haló efektu“, který je příznakem brzké infekce. K rychlé a spolehlivé identifikaci lze použít i metodu PCR, která umožňuje identifikaci plísní na základě detekce její sekvence v nukleové kyselině. Rovněž se provádí z krve, bronchoalveolární laváže a z mozkomíšního moku (Patterson a Strek, 2014; Wattier a Ramirez-Avila, 2016; Galimberti a kol., 2012).

Ačkoliv se molekulární metody stále zdokonalují a jsou snadno dostupné, kultivace a mikroskopie zůstávají běžně používaným a nezbytným krokem k identifikaci plísní rodu *Aspergillus* (Afzal a kol., 2013).

1.7 VÝZNAMNÍ ZÁSTUPCI

1.7.1 *ASPERGILLUS FLAVUS*

Aspergillus flavus je jedním z nejrozšířenějších druhů rodu *Aspergillus*. Při kultivaci vytváří sametové zelenožluté kolonie, jak je znázorněno na Obrázku 5 (Galimberti a kol., 2012). Hojně produkuje konidie, které jsou snadno přenášeny vzduchem a hmyzem, což je hlavní rizikový faktor pro vznik invazivních aspergilóz a alergií. Je zodpovědný za zkažení mnoha potravin a za kontaminaci plodin před sklizní nebo při skladování, jak je patrné na Obrázku 6 (Hedayati a kol., 2007).

Mezi závažné onemocnění způsobené *Aspergillus flavus* patří plicní infekce u jedinců s oslabeným imunitním systémem, záněty ucha a záněty rohovky, které se často objevují v tropických a teplých oblastech, zejména v Africe, jižní Asii a v určitých částech USA. Ve výjimečných případech vznikají záněty rohovky způsobené *Aspergillus flavus* po laserovém zákroku a po operaci šedého zákalu. Bylo prokázáno, že *Aspergillus flavus* je 100 krát nakažlivější než *Aspergillus fumigatus* (Hedayati a kol., 2007).



Obrázek 5 Kolonie *Aspergillus flavus*
SAB agar, 3 dny, 30 °C, aerobní kultivace
[<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.cz/2012/02/aspergillus-flavus.html>;
staženo dne 26. 1. 2017]



Obrázek 6 Arašíd kontaminovaný plísní *Aspergillus flavus*
[http://www.pestnet.org/fact_sheets/coconut_aspergillus_mould_233.htm; staženo dne 26. 1. 2017]

1.7.2 *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Aspergillus fumigatus je termofilní plíseň rostoucí i při teplotě 50 °C. Jedná se o významného oportunního patogena, který způsobuje závažné až fatální infekce. K přenosu často dochází v souvislosti s hospitalizací v nemocnicích (nosokomiální nákazy). Je původcem invazivní aspergilózy, která častěji postihuje jedince s oslabeným imunitním systémem. Při vdechování vzdušných konidií totiž dochází k poškození epitelu dýchacích cest. Schopnost plísně *Aspergillus fumigatus* kolonizovat dýchací cesty je podporována snížením TEER a polarizací epitelu. Aspergilóza je rozšířená nejen u člověka, ale i u zvířat, např. může napadat psy a ptáky (Khoucha a kol., 2007; Klaban, 2011).

1.7.3 *ASPERGILLUS NIGER*

Aspergillus niger je acidofilní plíseň, která roste při optimální hodnotě pH 4,4–7,5. Velký význam má v biotechnologii při výrobě kyseliny citrónové, která patří mezi nejdůležitější kyseliny produkované plísněmi a je jedinou kyselinou produkovanou výhradně fermentací (Klaban, 2011). Podstatnou roli hraje v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu (Goldman a Osmani, 2008). Díky své dlouholeté historii bezpečného užití v biotechnologiích dostala tato plíseň status GRAS (pouze pro enzymy získávané biotechnologickými procesy). Kromě výroby kyseliny citronové je *Aspergillus niger* také využíván k výrobě kyseliny glukonové, fumarové a šťavelové (Goldman a Osmani, 2008).

Neméně významná role v biotechnologii je při přípravách enzymů. Mnoho užitečných enzymů se vyrábí průmyslovou fermentací pomocí *Aspergillus niger*. Mezi nejdůležitější patří amylasy používané na hydrolýzu škrobu při výrobě chleba a piva, invertasy užívané v cukrářství a pektinasy, které se využívají při odstranění zákalu při zpracování ovocných šťáv a při číření vín. Další využití je při výrobě fytasy, která se uplatňuje v krmivech pro hospodářská zvířata a proteasy, která se používá při nakládání masa (Goldman a Osmani, 2008).

1.7.4 ASPERGILLUS NIDULANS

Aspergillus nidulans byl první vláknitou houbou, u níž byl kompletně analyzován celý genom. Díky jednoduché manipulaci je široce používán jako modelový organismus v genetice eukaryotické buňky (Klaban, 2011; Harris, 2012). Využívá se pro studium mitochondriální a populační genetiky, pro biosyntézu penicilinu a v molekulární biologii pro expresi genů (Flickinger a Drew, 1999).

2 PRODUKTY METABOLISMU PLÍSNÍ RODU *ASPERGILLUS*

Vedle primárního metabolismu zahrnujícího základní chemické přeměny zajišťující růst je pro plísně charakteristický sekundární metabolismus, při kterém dochází k tvorbě a vylučování různorodých látek (Malír a kol., 2003). Mezi prospěšné sekundární metabolity patří antibiotika (penicilin, cefalosporin), antimykotika (griseofulvin), protinádorové léky a další léčiva např. lovastatin snižující cholesterol. Avšak existuje mnoho sekundárních metabolitů, které mají negativní vliv na zdraví člověka, tzv. mykotoxiny (Yu, 2012). Určité kmeny rodu *Aspergillus* jsou schopné produkovat více než 1 druh mykotoxinu a naopak 1 mykotoxin může být vytvářen více druhy plísní (Zain, 2011).

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity přírodního původu produkované vláknitými houbami. Představují skupinu strukturně odlišných organických sloučenin nebílkovinné povahy o nízké molekulové hmotnosti způsobující vážná onemocnění člověka. Mezi jejich charakteristické vlastnosti patří karcinogenita, hepatotoxicita, neurotoxicita a nefrotoxicita. Dále mohou mít teratogenní, mutagenní a imunotoxické účinky (Bezerra da Rocha a kol., 2014; Shrestha a Mridha, 2015). Vzhledem k těmto negativním účinkům na jedince je v současnosti věnována mykotoxinům velká pozornost nejen vůči lidem, ale i zvířatům, především monogastričným. Přezvýkavci jsou proti působení mykotoxinů obvykle odolnější, protože pomocí bачoru je mikroflóra schopna degradovat mykotoxiny (Zain, 2011).

Mykotoxiny jsou nejvíce produkovány v době zralosti plísně. Ke kontaminaci může docházet dvěma způsoby. Přímá kontaminace nastane v případě, když je produkt infikován toxinogenní plísní s následnou tvorbou mykotoxinů. Nepřímá kontaminace potravin vznikne, jestliže je určitá surovina již dříve kontaminována a během jejího zpracování je odstraněna toxinogenní houba, ale přesto mykotoxiny nadále zůstávají v konečném produktu (Bezerra da Rocha a kol., 2014).

Produkce mykotoxinů je podmíněna mnoha faktory, kterými lze potlačit růst plísní a tím i případnou tvorbu jejich metabolitů. Uplatňují se fyzikální, biologické a chemické faktory, které ovlivňují produkci metabolitů již před sklizní plodin, ale i během jejich zpracování. Nejdůležitější fyzikální veličinou je teplota. Obecně platí, že optimální teplota pro tvorbu mykotoxinů je blízká optimální teplotě pro růst plísně. Při nízkých teplotách je produkce mykotoxinů pomalejší. Dalšími znaky jsou vlhkost substrátu a aktivita vody (a_w) v substrátu, která kolísá mezi 0,72-0,9. Dalším významným chemickým faktorem je kyselé pH média, složení substrátu a obsah kyslíku v prostředí. Pokles koncentrace O_2 pod 1 % a zvýšení koncentrace CO_2 přispívá k potlačení růstu plísní a tvorby mykotoxinů. Podstatným

biologickým faktorem je i přítomnost více druhů toxinogenních plísní určující synergické nebo antagonistické interakce mezi nimi (Malíř a kol., 2003; Ashiq a kol., 2014).

2.1 AFLATOXINY

Aflatoxiny patří mezi první objevené a nejlépe prozkoumané mykotoxiny. Jejich název pochází ze slov „*Aspergillus flavus* toxin.“ Pro jejich objev byl významným mezníkem rok 1960, kdy byly identifikovány na základě epidemie označované jako „krutí X onemocnění“, která se vyskytla v Anglii v okolí Londýna. Při této nákaze došlo k hromadnému uhynutí krůťat. Příčinou byla konzumace krmiva, které obsahovalo kontaminovanou arašídovou moučku (Bezerra da Rocha a kol., 2014).

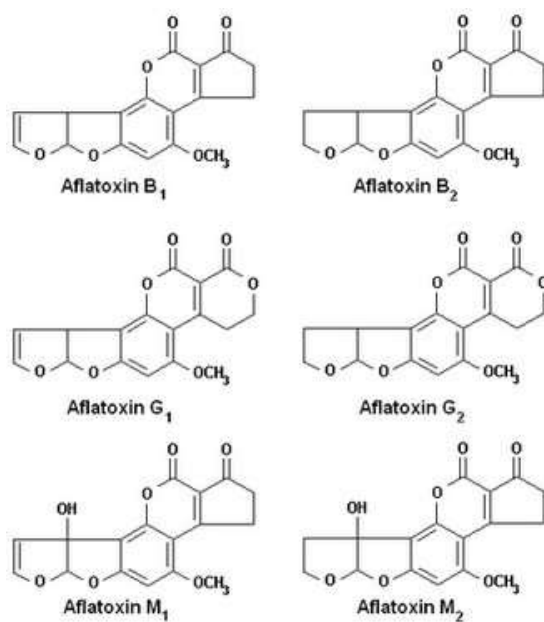
Aflatoxiny jsou vysoce toxické mutagenní a karcinogenní látky produkované několika kmeny, především *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. V současné době existuje téměř 20 různých druhů aflatoxinů, z nichž nejtoxičtější jsou aflatoxiny B₁, B₂, G₁ a G₂. Všechny 4 typy aflatoxinů jsou produkované kmenem *Aspergillus parasiticus*, zatímco *Aspergillus flavus* tvoří jen aflatoxiny B₁ a B₂. Chemické struktury těchto látek jsou znázorněny na Obrázku 7. Jejich označení je dáno fluorescencí pod UV světlem. Aflatoxiny typu B fluoreskují modře (anglicky blue = B), typu G zeleně (anglicky green = G). Dalšími aflatoxiny jsou M₁ a M₂, což jsou hydroxylové deriváty metabolizované z aflatoxinu B₁ a B₂. Často se označují jako mléčné toxiny, neboť se vyskytují v mléku krav krmených kontaminovanou potravou (Bezerra da Rocha a kol., 2014).

Aflatoxiny jsou přirozeně se vyskytující kontaminanty potravin. Mezi nejčastěji kontaminované plodiny patří zemědělské obiloviny, kukuřice, bavlník, dále olejnatá semena, koření a různé druhy ořechů jako např. arašíd, vlašské ořechy, pistácie, para ořechy a pekanové ořechy. Vzhledem k ideálním podmínkám pro růst plísní a produkci toxinů se převážně vyskytují ve vlhkých tropických a subtropických oblastech (Yu, 2012; Bezerra da Rocha a kol., 2014).

Ze všech dosud prostudovaných mykotoxinů je nejtoxičtější aflatoxin B₁, který je jedním z nejsilnějších přírodních karcinogenů pro člověka a zvířata. Primárně postiženým orgánem jsou játra, do kterých účinek AFB₁ přichází portální oběhem. Aflatoxin B₁ sám o sobě není toxický, toxickým se stává v játrech po metabolické aktivaci mikrosomálními oxidázami a cytosolickými enzymy. Vzniklá aktivní forma je velmi reaktivní a inhibuje replikaci DNA a biosyntézu RNA. Při dlouhodobém užívání vyvolává závažné hepatocelulární karcinomy.

Kromě jater může dojít k patologickým změnám v plicích, myokardu a ledvinách. Akutní toxicita vyjádřená velikostí LD₅₀ se pohybuje v rozmezí 0,4-60 mg/kg tělesné hmotnosti v závislosti na živočišném druhu. Velmi citlivá jsou káčata, u kterých LD₅₀ dosahuje 0,4 mg/kg, naopak hodně odolné jsou myši, u kterých se LD₅₀ rovná 60 mg/kg. Toxický účinek se projeví přibližně za 3 až 6 hodin nekrotizací hepatocytů, poškozením krevní srážlivosti a kapilární fragilitou, což může vést k rozsáhlým hemoragiím a v krajním případě i k úmrtí postiženého jedince (Malíř a kol., 2003; Yu, 2012).

Při nadměrném příjmu aflatoxinů dochází k otravě organismu tzv. aflatoxikóze. Rozlišují se dva typy. Akutní aflatoxikóza vznikne při nadměrné intoxikaci v rámci krátkodobé expozice. Následkem je poškození jater, v krajním případě může dojít k selhání jaterních funkcí. Chronická aflatoxikóza je důsledkem dlouhodobého příjmu aflatoxinů, při kterém vzniká hepatocelulární karcinom a dochází k oslabení imunitního systému (Monson a kol., 2015). K rozvoji hepatocelulárního karcinomu přispívá virus hepatitidy B, protože mezi aflatoxiny a hepatitidou B působí synergický účinek. Studie ukázaly, že při prodělání hepatitidy B se třicetinásobně zvyšuje riziko vzniku jaterního karcinomu (Ashiq a kol., 2014).



Obrázek 7 Chemické struktury aflatoxinů

[<http://en.engormix.com/mycotoxins/articles/aflatoxin-in-maize-t35100.htm>, staženo dne 10. 3. 2017]

2.2 OCHRATOXINY

Ochratoxiny jsou další skupinou mykotoxinů, které byly objeveny v roce 1965 během velkého testování metabolitů vláknitých hub. Nejčastějším producentem je *Aspergillus ochraceus*, podle kterého je odvozen jejich název. Mezi další druhy produkující ochratoxiny patří např. *Aspergillus niger* a *Aspergillus carbonarius* (Ismail a Papenbrock, 2015).

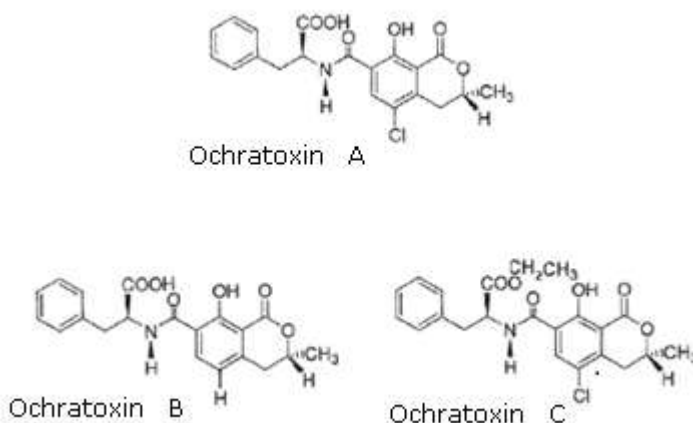
Ochratoxiny rozlišujeme dle typu na A, B a C. Nejběžnější je ochratoxin A (OTA), který má z toxikologického hlediska velký význam, jelikož je silným nefrotoxinem. Cílovým orgánem jsou tedy ledviny. U člověka byl OTA identifikován jako původce nefropatií s následným karcinomem močového ústrojí. U zvířat je zvýšený příjem toxinu spojován s rakovinou varlat. Chronické vystavení ochratoxinům může způsobit závažnější onemocnění.

Dlouhotrvající příjem OTA vyvolává tzv. balkánskou endemickou nefropatii, která byla poprvé popsána v 50. letech 19. stol. a je rozšířená především v jihovýchodní Evropě. Tato choroba je charakterizovaná chronickým selháním ledvin, které může vést ke zhoubnému renálnímu karcinomu. Dochází totiž k poškození funkce proximálního tubulu a k progresivní tubulointersticiální nefropatii vedoucí k tubulární atrofii následovanou periglomerulární fibrózou. Poté v horní části močových cest vzniká maligní nádor ledvin. Mezi typické příznaky balkánské endemické nefropatie patří anémie, urémie, proteinurie, žloutenka, bolest hlavy a nechutenství. Kromě toho je OTA schopen vyvolávat hepatotoxické, neurotoxické, teratogenní a imunosupresivní účinky. U zvířat se imunosupresivní aktivita vyznačuje zmenšením velikosti sleziny, brzlíku a lymfatických uzlin. Navíc bylo zjištěno, že u myší a potkanů má embryotoxický efekt, jelikož může procházet placentou (Marin a kol., 2013).

Akutní toxicita je variabilní v závislosti na živočišném druhu a způsobu podání. Velmi citliví jsou psi a prasata, u kterých se LD₅₀ pohybuje perorálně 0,2-1 mg/kg tělesné hmotnosti. U krys a myší je hodnota LD₅₀ vyšší a kolísá 20-58 mg/kg. Stejně jako ostatní mykotoxiny je OTA vysoce termostabilní sloučenina, kterou nelze zničit pouhým varem. Pro snížení koncentrace tohoto toxinu je nezbytná teplota minimálně 250 °C. Zajímavostí je, že toxické vlastnosti OTA jsou připisovány obsahu atomu chlóru, kterým je aromatický kruh substituován (viz Obrázek 8). Ačkoli i ochratoxin C obsahuje atom chlóru, je považován za méně toxický (Marin a kol., 2013).

Potraviny a krmiva kontaminované ochratoxiny představují vážný zdravotní problém pro člověka i zvířata. Prozatímni nejnovější tolerovatelný denní příjem OTA byl stanoven Evropským úřadem pro bezpečnost potravin na 17 ng/kg tělesné hmotnosti. Zdroje ochratoxinů jsou zejména rostlinného původu, tzn. obiloviny, zelenina, sušené ovoce, koření, kávová zrna,

kakaové boby, kvašené nápoje a léčivé rostliny. Velmi náchylné jsou i plody vinné révy, kvůli kterým jsou často kontaminovaná červená a sladká vína. Jeho přítomnost byla také zjištěna v mléce včetně mateřského mléka, což představuje velkou hrozbu pro kojence (Marin a kol., 2013; Ashiq a kol., 2014).



Obrázek 8 Chemické struktury ochratoxinů

[https://www.google.cz/search?q=struktura+ochratoxin%C5%AF&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjAnMfe7MfUAhXjDpoKHcMG C3QQ_AUICygC&biw=1242&bih=602#tbm=isch&q=+ochratoxin+A,+B,+C&imgsrc=psgG2LP2EjQA0M;; staženo dne 13. 3. 2017]

2.3 STERIGMATOCYSTINY

Z lékařského hlediska jsou kmeny toxinogenních plísní *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans* a *Aspergillus versicolor* významnými producenty nebezpečného mykotoxinu sterigmatocystinu, který je prekurzorem toxinu AFB₁. Svou strukturou a účinky se podobá aflatoxinům, protože primárním místem působení jsou játra. Obdobně jako AFB₁ značně ohrožuje zdraví člověka a zvířat. Sterigmatocystin je rovněž dobře známý pro své karcinogenní, mutagenní, hepatotoxické a nefrotoxické účinky, přičemž je méně toxický než AFB₁ (Li a kol., 2014). Jeho nižší toxicita je způsobena malou rozpustností ve vodě a v žaludečních šťávách. LD₅₀ se pohybuje v rozmezí 60-166 mg/kg tělesné hmotnosti v závislosti na druhu živočicha (Malíř a kol., 2003).

Mezi nejdůležitější faktory regulující produkci sterigmatocystinu patří kyselé pH média a zdroje uhlíku a dusíku. Je dokázáno, že dusičnan jako jediný zdroj dusíku podporuje

biosyntézu sterigmatocystinu. Naopak jeho produkci inhibuje amonný kationt (Delgado-Virgen a Guzman-de-Pena, 2009).

Sterigmatocystin patří mezi mykotoxiny nacházející se v široké škále plodin, zejména obilí, kukuřici, rýži, arašídech a pícech. Také byl nalezen v tvrdých sýrech. V České republice a na Slovensku je vymezena hodnota sterigmatocystinu pro rýži, brambory, mouku, maso a mléko do 5 µg/kg, pro ostatní potraviny je povoleno množství 20 µg/kg. V Číně je ovšem přijatelné i 25 µg/kg (Li a kol., 2014).

2.4 VERUKULOGEN

Verukulogen je dalším neméně nebezpečným mykotoxinem, který je produkován kmenem *Aspergillus fumigatus*. Jedná se o tremorgenní toxin, který představuje specifickou skupinu přírodních látek působící na CNS. U obratlovců vyvolává imobilizační syndrom, který představuje neschopnost pohybu či sníženou aktivitu doprovázenou ataxií, zvýšenou podrážděností, svalovým třesem a tetanickými záchvaty. K úmrtí dochází ojediněle (Khoufache a kol., 2007).

Tvorba tohoto mykotoxinu je v laboratorních podmínkách závislá na typu kultivačního média a na teplotě. Při teplotě 27 °C je produkováno větší množství verukulogenu než při zvýšené teplotě 37 °C. Zajímavostí je, že zvýšená produkce verukulogenu je lépe detekovatelná v kulturách obilí sterilizovaného pomocí autoklávu než v běžných kapalných médiích, neboť tvorba toxinů na zrnkách obilí je pro plíseň více fyziologická než na mykologických půdách, např. na Sabouraudově glukózovém agaru (Khoufache a kol., 2007).

2.5 LOVASTATIN

Většina látek, která je produkována plísněmi rodu *Aspergillus*, má negativní vliv na lidské zdraví, avšak některé produkty metabolismu mohou být pro člověka prospěšné. Příkladem je lovastatin, což je lék mikrobiálního původu používaný ke snížení hladiny cholesterolu. Používá se při léčbě hypercholesterolemie, čímž se snižuje riziko srdečního infarktu. Lovastatin je také znám pod obchodním názvem mevinolin a v roce 1987 byl oficiálně schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv jako lék snižující cholesterol (Goldman a Osmani, 2008).

Japonský mikrobiolog Akira Endo poprvé objevil produkci statinů v mikroorganismu *Penicillium citrinum*, ale prvním statinem vyvinutý jako lék se stal právě lovastatin produkovaný plísní *Aspergillus terreus*. Lovastatin je velice účinný ve snížení koncentrace celkového cholesterolu a LDL cholesterolu v krevní plazmě. Kromě toho bylo také pozorováno mírné zvýšení koncentrace HDL cholesterolu. Po požití se váže na aktivní místo HMG-CoA reduktáza, což je klíčový enzym katalyzující vznik mevalonátu, který je časným a rychlost omezujícím krokem v biosyntetické dráze cholesterolu (Hajar, 2011).

3 FUNGICIDNÍ LÁTKY

3.1 OBECNÉ INFORMACE O FUNGICIDNÍCH LÁTKÁCH

Fungicidy nazývané též antifungální látky jsou chemické sloučeniny, kterými se usmrcují houbové organismy a spory hub zahrnující vláknité mikromycety. Tyto antifungální látky jsou specifickým druhem pesticidů. Jelikož se množství používaných fungicidních látek každoročně zvyšuje, objevuje se velké riziko vzniku rezistence vůči lékům (Pérez-Fernández a kol., 2011). Užívání protiplísňových látek se omezilo nejen z důvodu nízké účinnosti, ale také kvůli toxicitě. Proto je v současné době nezbytný vývoj nových léčebných postupů (Kathiravan a kol., 2012).

Plísňová onemocnění ovlivňují nejen zdraví člověka a živočichů, ale mohou poškozovat i růst a vývoj rostlin. Plísně jsou stále nejčastější příčinou úbytku plodin na celém světě, a tak dochází ke snížení výnosů a zároveň k jejich znehodnocení. Proto se v dnešní době zemědělství bez použití fungicidů zkrátka neobejde. Fungicidní látky se staly nezbytným prostředkem pro ochranu rostlin a pro vysoké výtěžky kvalitních produktů. Bylo dokázáno, že v roce 2003 fungicidy představovaly více než 52 % všech přípravků na ochranu rostlin využívaných v Evropské unii. Roční spotřeba se odhadla přibližně na 100 kt (Regueiro a kol., 2015).

Významnou roli hrají především ve vinařských oblastech, jelikož vinná réva je velice náchylná k houbovým chorobám. Aplikace antifungálních látek na zemědělsky využívanou půdu vyvolává pro obyvatele potenciální riziko, protože zbytky těchto agrochemikálií mohou po sklizni zůstat na plodinách a to i po několika jejich zpracování. Velkým problémem je i vliv fungicidů na ekosystém, ve kterém plodiny rostou. Proto je před použitím těchto látek vyžadováno mnohem více studií, které samozřejmě vedou k obrovským nákladům na vývoj. Avšak většina analýz došla k závěru, že výhody fungicidů zdaleka převyšují rizika, pokud jsou použity podle předepsaných doporučení (Regueiro a kol., 2015).

U antifungálních látek rozlišujeme 2 typy účinků. Fungistatický účinek inhibuje růst patogenních plísni, zatímco fungicidní účinek způsobuje usmrcení plísně (Gleason a Marano, 2011). Antifungální látky se od sebe také rozlišují spektrem účinku. Fungicidy s úzkým spektrem účinku působí proti jednomu nebo několika souvisejícím patogenům, zatímco široké spektrum účinku působí proti velké skupině nesouvisejících patogenů (McGrath, 2004). Další dělení antimykotik je z hlediska původu. Zástupcem přírodního původu je amfotericin B, syntetického původu jsou azoly a echinokandiny, které jsou typickým příkladem polosyntetického původu (Kathiravan a kol., 2012; Chen a kol., 2011; Peyton a kol., 2015).

3.2 SYNTETICKÉ FUNGICIDNÍ LÁTKY

3.2.1 AMFOTERICIN B

Amfotericin B je polyenové antifungální antibiotikum se širokým spektrem účinku, které je izolováno z bakterie *Streptomyces nodosus* (Kathiravan a kol., 2012). Po mnoho let byl jediným dostupným přípravkem na léčbu invazivní aspergilózy. Je účinný proti všem druhům rodu *Aspergillus* s výjimkou *Aspergillus terreus*, který je rezistentní (Wattier a Ramirez-Avila, 2016).

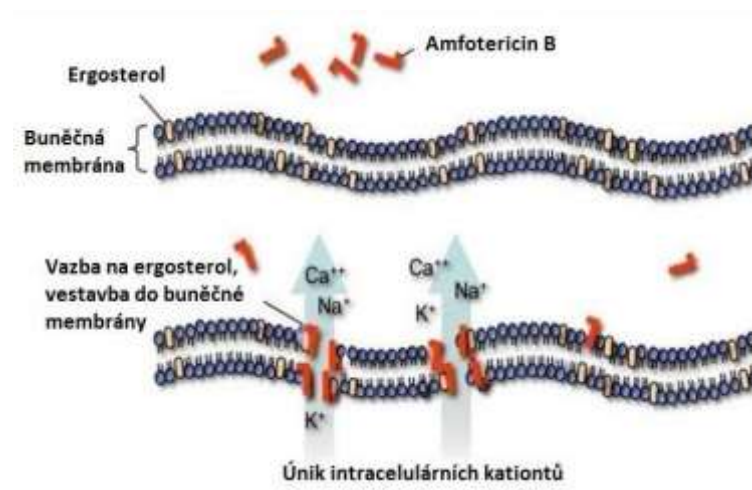
Mechanismus jeho fungicidního účinku spočívá ve vazbě na ergosterol, který je hlavní komponentou buněčné membrány hub obdobně, jako je cholesterol nezbytnou složkou buněčné membrány savčích buněk. Poté, co se amfotericin B naváže na ergosterol, dochází k porušení integrity buněčné membrány hub a tím ke zvýšení její propustnosti. To vede k úniku intracelulárních jednomocných a dvojmocných kationtů a k následné buněčné smrti plísni, jak je znázorněno na Obrázku 9. K léčbě infekcí způsobených rodem *Aspergillus* je nezbytné množství amfotericinu B v rozmezí 1 až 1,5 mg/kg/den, které je určeno pro intravenózní infúzi. Velká část podávané dávky je uložena v tkáních, zejména v tucích a depotní účinek má velký význam při pomalém uvolňování do krve (Wingard a Leather, 2004; Kathiravan a kol., 2012).

Podávání amfotericinu B je omezeno toxicitou. Hlavním chronickým nežádoucím účinkem je nefrotoxicita, ke které přispívá nadměrná hmotnost člověka, souběžné užívání diuretik a nefrotoxických léků, průměrné vyšší denní dávky amfotericinu B a také jsou častěji postiženi muži. Klinické projevy nefrotoxicity zahrnují renální insuficienci, hypokalemii, hypomagnesemii a polyurii způsobenou nefrogenním diabetes insipidus (Laniado-Laborín a Cabrales-Vargas, 2009).

Vzhledem k vážným vedlejším účinkům amfotericinu B byly vyvinuty tzv. 3 lipidové formulace amfotericinu B, které mají stejně jako amfotericin B širokospektré působení, ale jsou charakterizovány značně sníženou nefrotoxicitou. Jedná se o liposomální amfotericin B (LAMB), který se používá pro 1. linii léčby invazivní aspergilózy, a o lipidový komplex amfotericinu B (ABLC) a koloidní disperzi amfotericinu B (ABCD), které se aplikují při 2. linii (Arendrup a kol., 2012).

Lipidové formy se od sebe liší farmakokinetickými vlastnostmi a bylo zjištěno rozdílné šíření ve tkáních. Např. LAMB má u experimentálně infikovaných zvířat vyšší hladinu amfotericinu B v mozku a ABLC vytváří zvýšenou hladinu amfotericinu v plicích. Oproti amfotericinu B mají podstatně větší snášenlivost, což umožňuje vyšší dávky v léčebných

postupech. Ve většině klinických studií bylo zvoleno množství 4 až 6 mg/kg/den těchto lipidových formulací amfotericinu B (Wingard a Leather, 2004).



Obrázek 9 Mechanismus účinku amfotericinu B

[<https://pt.slideshare.net/dapab/antifngicos>; staženo dne 13. 5. 2017]

3.2.2 AZOLY

Nežádoucí účinky spojené s amfotericinem B vedly k vývoji dalších sloučenin, kterými se staly azoly. Jsou to syntetické látky, které zahrnují jednak starší imidazoly, jednak novější triazoly (Peyton a kol., 2015). Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici syntézy ergosterolu, jehož nedostatek vede ke změně permeability buněčné membrány a tím k inhibici buněčného růstu (Kathiravan a kol., 2012).

Imidazoly jako jsou mikonazol a ketokonazol mají fungistatický účinek na zástupce rodu *Aspergillus*, a proto jsou převážně používány k léčbě povrchových infekcí. Naopak triazoly jsou považovány za jedny z nejúčinnějších antifungálních léků proti rodu *Aspergillus*. Jedná se o heterocyklické sloučeniny obsahující pětičlenný kruh s 2 atomy uhlíku a 3 atomy dusíku. Na rozdíl od imidazolů mají triazoly široké spektrum účinku, čímž se ve farmaceutickém průmyslu řadí mezi velmi užívané léky. Mezi nejvýznamnější triazoly patří itraconazol a vorikonazol, které mají fungicidní účinky, a posakonazol, který má fungistatický účinek (Peyton a kol., 2015).

3.2.2.1 ITRAKONAZOL

Itrakonazol je triazol 1. generace, který se používá u systémových mykotických infekcí. Jako první azolové antimykotikum vykazoval fungicidní účinky proti rodu *Aspergillus* (Kathiravan a kol., 2012). Je metabolizován játry, čímž vzniká více než 30 různých metabolitů. Širokospektré účinky se připisují hlavnímu metabolitu, hydroxy-itakonazolu, který vykazuje znatelné antifungální vlastnosti. Itakonazol je lipofilní látka, a proto je jeho koncentrace vyšší ve tkáních např. v plicích, ledvinách, kostech a svalech stejně jako ve tkáních společných plísňovým infekcím jako jsou nehty, kůže a ženský genitální trakt (Peyton a kol., 2015; Keller, 2011).

Itrakonazol je dostupný ve formě kapslí, perorálního roztoku nebo se podává intravenózně. Doporučená denní dávka je 200 až 400 mg. Absorpce kapslí je proměnlivá v závislosti na kyselosti žaludečních šťáv. Pro správné vstřebání kapslí je nutná konzumace jídla. Naopak perorální roztok ukazuje zvýšenou biologickou aktivitu při užívání nalačno (Peyton a kol., 2015; Arendrup a kol., 2012).

Nežádoucí účinky itakonazolu se liší ve formě podání. Gastrointestinální poruchy, závratě, svědění a bolesti hlavy jsou spojeny s kapsulární formou antimykotika. U pacientů podávajícím perorální roztok se mohou vyskytnout gastrointestinální poruchy se zvýšenou aminotransferázou. Vedlejšími účinky pro intravenózní podání může být opět gastrointestinální poruchy a bolesti hlavy (Peyton a kol., 2015).

3.2.2.2 VORIKONAZOL

Vorikonazol je triazol 2. generace, který byl schválen na léčbu invazivních infekcí způsobených rodem *Aspergillus* až v roce 2002. Široké spektrum účinku je přisuzováno přidání fluoropyrimidinů (Peyton a kol., 2015; Kathiravan a kol., 2012).

Vorikonazol je podáván ve formě tablet nebo intravenózně. Má téměř kompletní biologickou dostupnost, která činí 96 %. Pokud je podáván s jídlem, jeho biologická dostupnost klesá přibližně o 20 %. Navíc potrava s vysokým obsahem tuku sníží jeho maximální koncentraci v plazmě o 34 %. Vorikonazol je vázán stejně jako itakonazol na plazmatické proteiny (Peyton a kol., 2015; Marks a kol., 2011).

Nežádoucí účinky vorikonazolu jsou obvykle mírné a považované za zcela tolerovatelné. Jedná se o kožní vyrážky a erytém na tváři. Vážná onemocnění jako např. Stevensův-Johnsonův syndrom nebo toxická epidermální nekrolýza se vyskytují výjimečně (Peyton a kol., 2015).

3.2.2.3 POSAKONAZOL

Posakonazol je triazol 2. generace, který je proti rodu *Aspergillus* účinnější než vorikonazol. Je lipofilní, což umožňuje nejvyšší koncentraci ve tkáních. Podává se ve formě tablet, perorální suspenze nebo intravenózně (Peyton a kol., 2015). Posakonazol se užívá 3 krát denně 200 mg a poté lze v průběhu léčby změnit dávku na 2 krát denně 400 mg (Arendrup a kol., 2012). Na rozdíl od absorpce itraconazolu, vstřebávání posakonazolu není závislé na pH žaludečních šťáv. Nežádoucí účinky zahrnují gastrointestinální poruchy, bolesti břicha a nevolnost (Peyton a kol., 2015).

3.2.3 ECHINOKANDINY

Echinokandiny jsou lipopeptidové sloučeniny semisyntetického původu, které se připravují z fermentovaných produktů hub. Nejvýznamnější zástupce této skupiny kaspofungin vzniká z pneumokandinu B, který je produkován *Glarea lozoyensis*. Mikafungin je vyráběn z hexapeptidu FR901370, který vytváří *Coleophoma empedri*, a anidulafungin je tvořen z echinokandinu B₀, který produkuje *Aspergillus nidulans*. Z chemického hlediska jsou echinokandiny cyklické hexapeptidy s N-acyl lipidovým postranním řetězcem. Jeho poloha a konformace je odpovědná za jejich antifungální aktivitu (Chen a kol., 2011).

Echinokandiny jsou mladou skupinou protiplísňových léčiv. Oproti ostatním antifungálním látkám se liší mechanismem účinku. Jako první antimykotika se zaměřují na buněčnou stěnu hub. Inhibují totiž enzymový komplex 1,3-β-D-glukan syntázu, čímž zabrání polymeraci glukanu, který je složkou buněčné stěny většiny patogenních hub. Lidské buňky 1,3-β-D-glukan neobsahují (Chen a kol., 2011; Perlin, 2007).

Echinokandinové léky jsou k dispozici intravenózně, protože perorálně mají nízkou biologickou dostupnost (< 0,2 % pro kaspofungin) z důvodu jejich velké molekulové hmotnosti (1200 kDa). Odbourávání echinokandinů na neaktivní metabolity probíhá hydrolýzou nebo N-acetylací především v játrech, v menší míře také v nadledvinách a slezině. Degradční produkty se vylučují primárně žlučí během několika dní. Starší lidé metabolizují pomaleji než mladší, ale úprava dávkování není vyžadována (Chen a kol., 2011).

Echinokandiny jsou zařazeny do léků kategorie C, což znamená, že teoreticky nevzniká riziko ohrožení vývoje plodu, avšak studie na zvířatech ukazují, že je potřeba zvážit jejich podání. U potkanů přecházejí kaspofungin a anidulafungin přes placentu a byly zjištěny v plazmě plodu, ale prozatím neexistují studie u těhotných žen. Také se nacházejí v mléce

březích potkanů, ale opět není známo, zda jsou vylučovány do lidského mateřského mléka (Chen a kol., 2011).

Echinokandiny, které mají širokospektré působení, vykazují proti rodu *Aspergillus* fungistatický účinek (Perlin, 2007). Jsou účinné při nižších koncentracích než např. amfotericin B nebo itraconazol. Hromadí se ve vrcholu apikálního růstu hyf, kde zastavují jejich růst. Tím dochází ke shlukům zduřelých a trnitých hyf. Proti rodu *Aspergillus* byly zjištěny synergické účinky echinokandinů v kombinaci s polyeny nebo azoly. Např. mikafungin a itraconazol vykazují synergický účinek proti polovině všech kmenů rodu *Aspergillus*. Přidání amfotericinu B do kombinace kaspofunginu a vorikonazolu zvyšuje účinnost proti *Aspergillus terreus*. Také studie králíků ukázaly synergismus mezi anidulafunginem a vorikonazolem v léčbě invazivní plicní aspergilózy (Chen a kol., 2011).

Obecně echinokandiny jsou dobře snášené. Mezi výjimečné nežádoucí účinky patří infúzní reakce, jaterní dysfunkce včetně selhání jater, které pravděpodobně souvisí s dlouhodobým užíváním. Mezi klinické projevy infúzních reakcí patří zarudnutí, svědění, bronchospasmus či otoky ve tvářích. Lze jim předejít zpomalením infúze. Přesto jsou ve srovnání s ostatními antifungálními léky velmi bezpečné u dětí i dospělých. Jejich velkou nevýhodou je vyšší pořizovací cena. Z toho důvodu je léčba ovlivňována spíše farmakoeekonomikou než antifungální účinností (Chen a kol., 2011).

3.3 PŘÍRODNÍ FUNGICIDNÍ LÁTKY

Užívání syntetických antimykotik bylo už v dřívějších dobách omezeno toxicitou, nízkou účinností a vznikem rezistentních kmenů. Tyto nežádoucí účinky vedly k výzkumu zaměřeného na nové přírodní fungicidní látky, konkrétně na rostlinné výtažky. Oproti syntetickým látkám jsou levnější, bezpečnější, snadno dostupné a ekologicky šetrné (Pawar a Thaker, 2006). Další výhodou je nižší riziko vývoje rezistentních patogenních plísň (Tian a kol., 2011). Podle nedávných výzkumů 25 % všech užívaných léků pochází z vyšších rostlin (Kaur a Arora, 2010).

Jednou z možností je použití esenciálních olejů. Jedná se o těkavé aromatické olejové kapaliny, které jsou produkovány živými organismy. Nejčastěji se syntetizují z rostlin, buď z celé rostliny, nebo jen z některých částí např. z květů, listů, kořenů, větviček, kůry nebo z plodů (Hashemi a kol., 2016). Mezi nejvýznamnější metody jejich získání patří destilace vodní parou, fermentace, extrakce a filtrace za sníženého tlaku. Antifungální aktivita

esenciálních olejů závisí na hlavních a vedlejších složkách oleje a na jejich koncentracích. Avšak složení oleje určitého rostlinného druhu může být ovlivněn klimatickými podmínkami země, způsobem sklizně a také metodou izolace (Kocić-Tanackov a kol., 2012).

3.3.1 *CINNAMOMUM CASSIA* L.

Cinnamomum cassia neboli skořice čínská je koření získané z vnitřní kůry stromu skořicovníku (viz Obrázek 10). Tento stálezelený tropický strom dorůstající do výšky 10-15 m pochází původem z jižní Indie (Shreaz a kol., 2016). Skořice je jedním z nejdůležitějších koření, které lidé používají po celém světě (viz Obrázek 11). Jako chuťová přísada se přidává do různých pokrmů a také do žvýkaček, neboť má osvěžující účinky a slouží tak k odstranění špatného dechu. Díky své výjimečné vůni našla uplatnění též v parfumeriích (Rao a Gan, 2014). Rovněž má pro své léčivé účinky dlouholetou tradici v lidové medicíně. Již starověcí Egypťané využívali skořici kvůli své vůni při balzamování mrtvých těl. V dnešní době se skořice uplatňuje při léčbě mnoha kardiovaskulárních onemocnění a též slouží jako koagulant, čímž mírní krvácení (Shreaz a kol., 2016). Navíc zvyšuje krevní oběh v děloze, podporuje regeneraci tkání a snižuje riziko vzniku rakoviny tlustého střeva. Dokonce je prokázáno, že skořice potlačuje rozvoj neurologických nemocí jako je Alzheimerova a Parkinsonova choroba (Rao a Gan, 2014). Mimo jiné jsou známy protizánětlivé, antioxidační, nematocidní, antivirové, antibakteriální a antidiabetické účinky. Při perorálním podávání skořice myším bylo zjištěno, že snižuje nejen hladinu glukózy v krvi, ale také TAG, celkový cholesterol a LDL cholesterol (Shreaz a kol., 2016).

Složení esenciálního oleje z kůry skořice je pestré. Mezi hlavní složky patří cinnamaldehyd (tzv. skořicový aldehyd, 65-80 %), cinnamyl acetát (3-15 %) a kyselina skořicová (Bansode, 2012; Pekmezovic a kol., 2015). Charakteristická chuť a vůně skořice jsou způsobeny právě přítomností cinnamaldehydu, který byl poprvé izolován již v roce 1834. Jedná se o žlutou olejovitou kapalinu nasládlé chuti, která intenzivně voní po skořici. Má silné antifungální účinky proti kmenům rodu *Aspergillus*. Studie ukázaly, že při letální koncentraci inhibuje buněčnou membránu, zatímco při subletální koncentraci proniká do periplazmy a působí jako inhibitor transmembránové ATPázy. Nedávný výzkum uvedl, že cinnamaldehyd také ovlivňuje koncentraci vápníku podílejícího se na homeostáze. Tím dochází k inhibici růstu plísně, jelikož intracelulární Ca^{2+} reguluje různé buněčné procesy jako je např. sporulace, klíčení spor, větvení hyf nebo růst konidioforu (Shreaz a kol., 2016).

MFC esenciálního skořicového oleje pro *Aspergillus flavus* činí 125 µg/ml (Pekmezovic a kol., 2015). Studie potvrdily, že antifungální účinky má nejen cinnamaldehyd, ale také jeho strukturální deriváty. V některých případech je fungicidní potenciál derivátů mnohonásobně vyšší než u cinnamaldehydu a jiných antimykotik (amfotericin B). Příkladem je o-methoxy cinnamaldehyd, který při koncentraci 100 µg/ml zcela inhibuje růst kmenů *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. Na úplnou inhibici *Aspergillus ochraceus* a *Aspergillus versicolor* je třeba dvojnásobná koncentrace, tedy 200 µg/ml. O-methoxy cinnamaldehyd také snižuje produkci mykotoxinů. 90% tvorba aflatoxinu B₁, ochratoxinu A a sterigmatocystinu byla potlačena koncentracemi 6,25 µg/ml, 25 µg/ml a 50 µg/ml. Kromě toho bylo zjištěno, že esenciální skořicový olej vykazuje synergické účinky s flukonazolem proti kmenům rezistentním na samotný flukonazol, konkrétně na *Aspergillus fumigatus* (Shreaz a kol., 2016).

Na základě bezpečného užívání byl cinnamaldehyd udělen status GRAS. Také byla Světovou zdravotnickou organizací (WHO) stanovena přijatelná denní dávka, která činí 1,25 mg/kg tělesné hmotnosti. Zajímavostí je, že se každoročně spotřebuje přibližně 180 000 kg cinnamaldehydu. Předpokládá se, že během příštích 5 let může jeho konzumace vzrůst cca o 3 % ročně (Shreaz a kol., 2016).



Obrázek 10 Skořicovník čínský

[<https://www.serafinbyliny.cz/herbar/skoricovni-k-cinsky-detail-148>; staženo dne 17. 6. 2017]



Obrázek 11 Kůra skořice

[<http://newsupdate.thaiautocars.com/2016/03/13.html>; staženo dne 17. 6. 2017]

3.3.2 *ALLIUM SATIVUM* L.

Allium sativum neboli česnek setý (viz Obrázek 12 a 13) je běžné přírodní antibiotikum, které se používá k prevenci a léčbě mnoha různých onemocnění zahrnující bolesti, průjem, zácpu, nádory, respirační potíže a dokonce i hluchotu. Tato klasická bylina má dlouholetou lidovou tradici, neboť již starobylí Egypťané znali její léčivé účinky (Marchese a kol., 2016).

Z česneku se připravuje česnekový olej, který je těkavý a má charakteristický štiplavý zápach. Obsahuje řadu sirných látek, především disulfidy (36 %), trisulfidy (32 %) a monosulfidy (29 %) (Li a kol., 2014). Hlavní složkou česnekového oleje je sirný derivát allicin (z chemického hlediska diallyl thiosulfínát), který je tvořen přeměnou alliinu kazalyzovanou enzymem alliináza. Tato enzymatická reakce vzniká po rozdrcení, nakrájení nebo tření čerstvých syrových stroužků česneku. Z toho důvodu se allicin v česneku přirozeně nevyskytuje, ale vytváří se až působením enzymu alliináza na alliin. Allicin je vysoce reaktivní a vykazuje silné protiplísňové účinky na kmeny rodu *Aspergillus*. Také snadno prostupuje do membrán, což umožňuje rychlé proniknutí do buněk (Shadkchan a kol., 2004; Marchese a kol., 2016). Další účinnou složkou česnekového oleje je sloučenina ajoene, která je derivátem allicinu. Název je odvozen od španělského pojmenování česneku „ajo“. Studie ukázaly, že působí účinněji než allicin, protože poškozuje buněčnou stěnu plísni (Irkin a Korukluoglu, 2007).

Česnekový olej našel velké uplatnění v zemědělském průmyslu, kde slouží jako antifungální přísada do krmiv nebo jako fungicid proti rostlinným patogenním plísním (Li a kol., 2014). Jeho protiplísňové účinky byly objeveny už v roce 1936 (Corzo-Martínez a kol., 2007). Vlivem allicinu a ajoene působí na plísně rodu *Aspergillus* a inhibuje jak klíčení spor, tak růst hyf. Bylo zjištěno, že proniká do buněk hyf a poškodí jejich buněčnou strukturu, což vede k úniku cytoplazmy a makromolekul. Rovněž potlačuje i produkci mykotoxinů (Irkin a Korukluoglu, 2009; Li a kol., 2014).

Kromě česnekového oleje se používají také extrakty z česneku. Jejich účinná inhibice zástupců rodu *Aspergillus* závisí na typu rozpouštědla použitého při extrakci. Např. výzkum zabývající se působením česnekového extraktu na *Aspergillus niger* zjistil, že MFC vodného extraktu je 325 mg/ml, pro ethanolovou extrakci koncentrace činí 450 mg/ml, zatímco při extrakci acetonem hodnota vzroste na 875 mg/ml. Zajímavostí je, že extrakt ze sušeného česneku zabraňuje růstu plísni mnohem více než z čerstvého česneku, jelikož obsahuje vyšší množství sloučenin síry. Navíc česnek v sušené formě má širší použití a jednodušší podmínky skladování (Irkin a Korukluoglu, 2007; Irkin a Korukluoglu, 2009).



Obrázek 12 Česnek setý

[<http://beforeitsnews.com/self-sufficiency/2015/07/poisonous-veggies-and-fruits-with-high-health-risk-to-your-family-and-pets-2491786.html>; staženo dne 24. 6. 2017]



Obrázek 13 Květ česneku setého

[<http://www.ceskestavby.cz/clanky/jak-pestovat-cesnek-23233.html>; staženo dne 24. 6. 2017]

3.3.3 *ALLIUM CEPA* L.

Allium cepa neboli cibule kuchyňská (viz Obrázek 14) je celosvětově rozšířená plodina, která původem pochází ze střední Asie. Má velkou rozmanitost v barvě, tvaru, obsahu sušiny a také v chuti. Za posledních 10 let se zvýšila její světová produkce nejméně o 25 %, přičemž současná výroba činí 44 miliónů tun ročně. Tímto se cibule řadí jako 2. nejvýznamnější zahradní plodina po rajčatech. Ačkoliv snese nízkou vlhkost, vysoký výnos vyžaduje dostatečné množství vody. Ta totiž tvoří většinu hmotnosti cibule (až 95 %). Složení cibule tvoří zejména 2 chemické složky. První z nich jsou flavonoidy, pod které spadají 2 podskupiny a to anthokyany, které způsobují purpurové zbarvení cibule, a flavanoly, které dodávají cibuli typickou žlutohnědou barvu (Griffiths a kol., 2002). Druhou složkou jsou alk(en)yl-cystein sulfoxidy, což jsou chuťové prekurzory, které při rozštěpení enzymem alliináza vytváří charakteristický zápach, štiplavou chuť cibule a také jsou zodpovědné za slzení při jejím krájení (Griffiths a kol., 2002; Ye a kol., 2013). V neporušeném pletivu se ACSO a alliináza nacházejí v oddělených buněčných segmentech, ACSO v cytoplazmě a alliináza ve vakuolách. Po mechanickém poškození rostlinné tkáně dochází k uvolnění alliinázy a k hydrolýze ACSO, čímž se získá kyselina α -iminopropionová, která samovolně hydrolyzuje za vzniku amoniaku a kyseliny pyrohroznové. Její obsah se využívá jako míra intenzity štiplavosti cibule (Griffiths a kol., 2002).

Léčebné účinky cibule mají v lidové medicíně dlouholetou tradici, která sahá až do starověkého Egypta. Bylo zjištěno, že zlepšuje krevní oběh, neboť jejíž pomocí se po staletí léčili krevní sraženiny u koní (Griffiths a kol., 2002).

Přítomností organických sloučenin síry je cibule zdrojem antifungálních vlastností proti rodu *Aspergillus*. Této aktivitě přispívají také fenolické sloučeniny a saponiny, což jsou sekundární metabolity, které se v minulosti používaly k čištění oblečení. Jejich protiplísňové účinky jsou způsobeny schopností vytvářet komplexy se steroly tzv. steroidní saponiny, které vedou ke zvýšení propustnosti membrány plísně a tím k úniku buněčného obsahu. Navíc nedávné studie zjistili synergický účinek mezi saponiny a amfotericinem B (Corzo-Martínez a kol., 2007; Lanzotti a kol., 2012). Kromě chemických látek obsahující síru existují další sloučeniny, které vykazují antifungální účinky. Příkladem je fistulosin (oktadecyl 3-hydroxyindol) izolovaný z velšské cibule (viz Obrázek 15), který primárně inhibuje syntézu proteinů (Corzo-Martínez a kol., 2007). Vysokou inhibiční aktivitu má také nově izolovaný peptid allicepin, který ovlivňuje růst mycelií (Wang a Ng, 2004).

Cibulový výtažek má silné antifungální účinky na kmeny rodu *Aspergillus* stejně jako výtažek z česneku. Míra inhibice opět závisí na typu rozpouštědla. Ve srovnání s česnekem má ethylalkoholový extrakt cibule značně vyšší inhibiční působení. Při extrakci ethylalkoholem je u *Aspergillus niger* minimální fungicidní koncentrace 275 mg/ml. U vodných a acetonových extraktů jsou pozorovány mnohem menší vlivy. U obou je hodnota MFC u *Aspergillus niger* nad 900 mg/ml. Další studie ukázaly, že proti *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* je velmi účinný etherový extrakt (Irkin a Korukluoglu, 2007). Cibulové extrakty a oleje také snižují produkci aflatoxinů a ochratoxinu A (Kocić-Tanackov a kol., 2012).



Obrázek 14 Květ cibule kuchyňské

[<https://vitanetonline.com/forums/1/Thread/2714>;
staženo dne 24. 6. 2017]



Obrázek 15 Cibule velšská

[<https://australianseed.com/shop/item/welsh-onion-white-organic-heirloom>; staženo dne 24. 6. 2017]

3.3.4 *ANETHUM GRAVEOLENS* L.

Anethum graveolens, běžně známý jako kopr vonný (viz Obrázek 16), je jednoletá bylina vysoká přibližně 90 cm původem z jihozápadní Asie nebo jihovýchodní Evropy. Vyžaduje především teplo a světlo, neboť i částečný polostín snižuje jeho výnos. V suchém podnebí se rychle přemění na semena, která jsou životaschopná 3-10 let. Pro svou silnou charakteristickou vůni je kopr široce využíván v potravinářském průmyslu jako ingredience do jídel a nápojů. Přidává se do salátů, polévek, omáček, nakládaných okurek a dokonce se z něho dělá i čaj (Jana a Shekhawat, 2010). Také se významně uplatňuje při léčbě mnoha patologických stavů např. zažívací potíže, nadýmání, bolesti břicha a onemocnění dělohy. Rovněž zmírňuje škytavku, podporuje menstruaci a u kojících matek zvyšuje tvorbu mléka (Kaur a Arora, 2010; Eleiwa a El-Diasty, 2014). Na druhou stranu extrakt z kopru snižuje plodnost u samčích potkanů, u mužů se výzkum prozatím nepotvrdil (Rana a Blazquez, 2014). Již starobylí Egypťané ho používali pro léčivé účely (Jana a Shekhawat, 2010).

Esenciální olej je přítomen ve všech částech rostliny, ale nejvíce je obsažen v semenech, která jsou znázorněna na Obrázku 17 (Stanojević a kol., 2016). Tento olej zvyšuje chuť k jídlu, podporuje trávení a navíc žvýkání semen zlepšuje svěží dech. Taktéž se přidává do repelentů a insekticidů na zvýšení jejich účinnosti (Jana a Shekhawat, 2010). Hlavními složkami esenciálního oleje jsou monoterpeny karvon (cca 40 %), limonen (cca 30 %) a apiol (cca 20 %), které způsobují charakteristickou vůni kopru. Právě těmto látkám je přisuzována hlavní antifungální aktivita (Jana a Shekhawat, 2010; Eleiwa a El-Diasty, 2014). Složení oleje je velmi ovlivňováno klimatickými podmínkami, protože např. při analýze kopru rostoucího v Srbsku bylo zjištěno, že obsahuje okolo 90 % karvonu (Stanojević a kol., 2016).

Kopr se používá jako konzervační látka inhibující růst mnoha plísňů včetně rodu *Aspergillus*. Mechanismus fungicidního účinku esenciálního oleje spočívá v narušení bariéry propustnosti plazmatické membrány (Rana a Blazquez, 2014). Navíc je ovlivněn obsah ergosterolu v plazmatické membráně. Vlivem esenciálního oleje může dojít k poškození biosyntézy ergosterolu, a proto je plazmatická membrána důležitým antifungálním cílem působení esenciálního oleje. Studie účinku kopru na *Aspergillus flavus* poukázaly na to, že při koncentraci 0,25 µl/ml esenciálního oleje byla pozorována 27% inhibice ergosterolu. Při koncentraci 0,5 µl/ml došlo k 48% inhibici, při 0,75 µl/ml se zvýšila hodnota na 55 % a při koncentraci 1 µl/ml byla nejvyšší inhibice ergosterolu, která činila 79 % (Tian a kol., 2012).



Obrázek 16 Kopr vonný

[<https://www.garten.cz/a/cz/4360-anethum-graveolens-kopr-vonny/>; staženo dne 24. 6. 2017]



Obrázek 17 Semena kopru

[<http://bylinkovyraj.net/kopr-vonny/>; staženo dne 24. 6. 2017]

3.3.5 *THYMUS VULGARIS* L.

Thymus vulgaris, obecně znám jako tymián obecný (viz Obrázek 18 a 19), je stálezelený polokeř dorůstající do výšky až 30 cm (Moghtader, 2012). Původem pochází ze Středomoří a má příjemnou charakteristickou vůni. Tymián patří mezi nejstarší užitkové rostliny a dlouho je známým a užívaným kořením (Kohiyama a kol., 2015). Již ve středověku doporučovaly kořenářky spát na tymiánu a také ho vdechovat, neboť usnadňuje spánek a působí proti melancholii a epilepsii (Moghtader, 2012). V lidové medicíně má dlouholetou tradici, jelikož se používá jako lék na odkašlávání. Také má protizánětlivý, antibronchitický účinek a podává se při průjmech a horečce (Moghtader, 2012; Kohiyama a kol., 2015).

Hlavní složkou esenciálního oleje z tymiánu obecného je thymol (2-isopropyl-5-methylfenol, 33 %), který byl poprvé izolován v roce 1725 německým lékárníkem. Jedná se o přírodní monoterpenový fenol, který dodává tymiánu typickou výraznou chuť využívanou pro kulinářské účely. V dnešní době se thymol přidává jako hlavní přísada do komerčně vyráběných ústních vod např. Listerine. Taktéž se nalézá jako účinná sloučenina v určitých dezinfekčních přípravcích na ruce. Dalšími významnými složkami esenciálního oleje jsou p-cymen (17 %), karvakrol (9 %) aj. (Moghtader, 2012).

Esenciální olej má široké spektrum účinku a vykazuje silné fungicidní účinky proti rodu *Aspergillus*. Jeho antifungální aktivita je přisuzována přítomností fenolických struktur thymolu a karvakrolu. Thymol je lipofilního charakteru, což umožňuje interakci s buněčnou membránou plísně, při které se mění její permeabilita, čímž nastane únik vnitrobuněčného obsahu (Moghtader, 2012). Rovněž dochází ke změnám struktury hyf, konidioforů a k destrukci

mitochondrií (Kohiyama a kol., 2015). Navíc thymol potencuje protiplísňový účinek amfotericinu B. Kromě toho bylo pozorováno, že samotný thymol vykazoval přibližně 3 krát silnější inhibici než esenciální olej z tymiánu (Moghtader, 2012). Studie zabývající se *Aspergillus flavus* ukázaly, že MFC byla při hodnotě 250 µg/ml. Avšak inhibice biosyntézy ergosterolu byla detekována už při koncentraci 100 µg/ml. Dále bylo zjištěno, že esenciální olej zcela inhiboval produkci aflatoxinů B₁ a B₂ při koncentraci 150 µg/ml (Kohiyama a kol., 2015).



Obrázek 18 Polokeř tymiánu obecný
[<http://www.biokado.cz/Tymian-Fredod136.htm>; staženo dne 24. 6. 2017]



Obrázek 19 Detail tymiánu obecného
[<http://www.ireceptar.cz/zahrada/uzitkova-zahrada/pestovani-a-vyuziti-vonaveho-tymianu/>; staženo dne 24. 6. 2017]

3.3.6 *HYPTIS SUAVEOLENS* L.

Hyptis suaveolens z čeledi hluchavkovitých je rychle rostoucí vytrvalá bylina, která se vyskytuje v hustých trsech podél silnic a pastvin v tropických a subtropických oblastech. Je etnobotanicky velmi důležitou rostlinou, která dorůstá výšky až 2 m a má charakteristickou mátovou vůni. Původem pochází z Ameriky a v dnešní době je považována spíše za plevel (viz Obrázek 20 a 21). Velké uplatnění našla v tradičním lidovém léčitelství v mnoha zemích, čímž se zjistil její široký farmakologický potenciál. Běžně se používá při léčbě respiračních a gastrointestinálních infekcí, trávicích poruch, nachlazení, horečky a onemocnění kůže (Moreira a kol., 2010; Rajarajan a kol., 2014).

Esenciální olej inhibující klíčivost spor vykazuje široké spektrum působení proti kmenům rodu *Aspergillus* (Moreira a kol., 2010). Získává se methanолоvou extrakcí z listů *Hyptis suaveolens* (Rajarajan a kol., 2014). Bylo zjištěno, že koncentrace 40 µl/ml a 80 µl/ml zcela inhibovaly růst *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* a *Aspergillus parasiticus*, zatímco při

koncentraci 20 $\mu\text{l/ml}$ byl růst snížen na polovinu. Dále při vystavení tomuto esenciálnímu oleji byly pozorovány morfologické změny zahrnující nedostatečnou sporulaci a abnormální vývoj konidioforu včetně zploštělých a překroucených hyf. Studie také ukázaly, že esenciální olej ve všech třech testovaných koncentracích snížil produkci aflatoxinu B₁ a B₂. Přesný mechanismus, kterým esenciální olej inhibuje klíčení konidií, není známý. Vědci však předpokládají, že snižuje propustnost živin v buněčné stěně konidií, čímž ovlivňuje jejich klíčení. Jeho hlavní složkou je terpenový alkohol eukalyptol nazývaný též 1,8-cineol. Sloučeniny často vyskytující se v esenciálních olejích jako např. germakren B nebo germakren D nebyly nalezeny, což svědčí o tom, že esenciální olej z listů *Hyptis suaveolens* odpovídá novému chemotypu (Moreira a kol., 2010; Moreira a kol., 2013).



Obrázek 20 *Hyptis suaveolens*

[http://www.mozambiqueflora.com/speciesdata/species.php?species_id=149570; staženo dne 31. 5. 2017]



Obrázek 21 Detail byliny *Hyptis suaveolens*

[http://www.mozambiqueflora.com/speciesdata/species.php?species_id=149570; staženo dne 31. 5. 2017]

3.3.7 *ECHINOPHORA PLATYLOBA* DC.

Echinophora platyloba řazená do čeledi miříkovitých je aromatická trnitá rostlina se žlutými květy (viz Obrázek 22 a 23), která roste na písčitých půdách ve vyšších nadmořských výškách (1400 až 2000 m n. m.). Tato endemická trvalka se výhradně vyskytuje na západě a severozápadě Íránu. Kvete krátce od začátku září do října a poté začíná období vegetačního klidu (Avijgan a Mahboubi, 2015; Moghaddam a kol., 2015).

Echinophora platyloba má široké uplatnění v íránské lidové medicíně po mnoho let. Je důležitou bylinkou, která se v potravinářském průmyslu používá pro svou charakteristickou vůni a chuť jako ochucovadlo do mléčných výrobků, zejména do sýrů a jogurtů (Avijgan

a Mahboubi, 2015). Také se využívá jako koření při nakládání kvěťáku, okurek či sýrů nebo do rajského protlaku (Moghaddam a kol., 2015; Hashemi a kol., 2016).

Studie ukázaly, že hlavními složkami esenciálního oleje z nadzemních částí rostlin jsou především monoterpenové uhlovodíky, okysličené monoterpeny (thymol, karvakrol), dále seskviterpenové uhlovodíky a okysličené seskviterpeny. Mezi nejčastější metodu jejich získání patří destilace s vodní parou, avšak bylo zjištěno, že při použití mikrovlnné parní destilace byl výtěžek o 40 % vyšší a zároveň doba trvání byla kratší (35 min vs. 3 hod) než u běžné destilace vodní parou (Moghaddam a kol., 2015; Avijgan a Mahboubi, 2015).

Přítomnost fenolických sloučenin např. thymolu a karvakrolu má vliv na silné antifungální účinky proti rodu *Aspergillus*. Obecně platí, že s rostoucí koncentrací esenciálního oleje roste inhibice růstu mycelia (Moghaddam a kol., 2015). Výzkum zaměřený na *Aspergillus flavus* poukázal na to, že k jeho úplné inhibici je třeba koncentrace esenciálního oleje *Echinophora platyloba* 750 ppm (Hasanvand a kol., 2016). Jiná studie zabývající se výtažky *Echinophora platyloba* uvedla, že antifungální koncentrace pro tentýž kmen činí 400 mg/ml (Moghim a kol., 2011). Působením esenciálního oleje či extraktu dochází k poškození chitinové buněčné stěny a tím k poruše její funkce, což vyvolá lýzu buňky (Moghaddam a kol., 2015).



Obrázek 22 *Echinophora platyloba*

[https://www.researchgate.net/figure/228640848_fig1_Figure-1-Picture-of-Echinophora-platyloba-in-the-field; staženo dne 5. 6. 2017]



Obrázek 23 Detail listu *Echinophora platyloba*

[http://www.imgrum.org/media/1014244904084609937_1511083493; staženo dne 5. 6. 2017]

4 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši zabývající se vlivem přírodních fungicidních látek na plísně rodu *Aspergillus*. *Aspergily* jsou ubikvitární vláknité mikromycety, které jsou častými původci nosokomiálních nákaz. Způsobují vážné infekční onemocnění, tzv. aspergilózu. Dalším negativním účinkem je kontaminace různých potravin a krmiv. Zástupci rodu *Aspergillus* produkují nebezpečné mykotoxiny, čímž ohrožují život člověka i zvířat. K nejčastěji se vyskytujícím mykotoxinům patří aflatoxiny, ochratoxiny, sterigmatocystiny a verukulogen.

Dále je tato práce zaměřena na syntetické a přírodní antifungální látky. Jedná se o sloučeniny, které specificky působí na plísně. Buď inhibují jejich růst, nebo je zcela usmrcují. U některých kmenů rodu *Aspergillus* byla prokázána rezistence k určitým syntetickým fungicidům. Proto soudobé studie testují nové přírodní látky s potenciálním terapeutickým účinkem.

Po tisíce let jsou rostliny nedílnou součástí tradičního léčebného systému. Už naši předkové znali sílu léčivých bylin. Jejich příznivých účinků se využívá dodnes, jelikož jsou součástí moderní medicíny. Lidé se stále vracejí k přírodním produktům, neboť věří, že jsou bezpečné. Esenciální oleje a extrakty z aromatických rostlin a koření (česnek, cibule) jsou v současné době široce studovány, poněvadž poskytují alternativu chemickým syntetickým látkám v potravinářském průmyslu, protože prodlužují trvanlivost pokrmů. Rovněž se uplatňují ve farmaceutickém průmyslu, jelikož jsou zdrojem přírodních produktů s různými biologickými účinky.

5 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 <i>Aspergillus melleus</i>	12
---	----

Dostupné z: <http://www.schimmel-schimmelpilze.de/presse-download.html>

Obrázek 2 Konidiofor <i>Aspergillus flavus</i>	14
---	----

Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-fl.htm>

Obrázek 3 Kolonie <i>Aspergillus fumigatus</i>	15
---	----

Dostupné z: <http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/asp-fu.htm>

Obrázek 4 <i>Aspergillus fumigatus</i>	15
---	----

Dostupné z: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.cz/2012/01/aspergillus-fumigatus.html>

Obrázek 5 Kolonie <i>Aspergillus flavus</i>	19
--	----

Dostupné z: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.cz/2012/02/aspergillus-flavus.html>

Obrázek 6 Arašíd kontaminovaný plísní <i>Aspergillus flavus</i>	19
--	----

Dostupné z: http://www.pestnet.org/fact_sheets/coconut_aspergillus_mould_233.htm

Obrázek 7 Chemické struktury aflatoxinů	23
--	----

Dostupné z: <http://en.engormix.com/mycotoxins/articles/aflatoxin-in-maize-t35100.htm>

Obrázek 8 Chemické struktury ochratoxinů	25
---	----

Dostupné z: https://www.google.cz/search?q=struktura+ochratoxin%C5%AF&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjAnMfe7MfUAhXjDpoKHcMGC3QQ_AUICygC&biw=1242&bih=602#tbm=isch&q=+ochratoxin+A,+B,+C&imgc=psgG2LP2EjQA0M:

Obrázek 9 Mechanismus účinku amfotericinu B	30
--	----

Dostupné z: <https://pt.slideshare.net/dapab/antifngicos>

Obrázek 10 Skořicovník čínský	35
--	----

Dostupné z: <https://www.serafinbyliny.cz/herbar/skoricovnik-cinsky-detail-148>

Obrázek 11 Kůra skořice	35
--------------------------------------	----

Dostupné z: <http://newsupdate.thaiautocars.com/2016/03/13.html>

Obrázek 12 Česnek setý	37
Dostupné z: http://beforeitsnews.com/self-sufficiency/2015/07/poisonous-veggies-and-fruits-with-high-health-risk-to-your-family-and-pets-2491786.html	
Obrázek 13 Květ česneku setého	37
Dostupné z: http://www.ceskestavby.cz/clanky/jak-pestovat-cesnek-23233.html	
Obrázek 14 Květ cibule kuchyňské	38
Dostupné z: https://vitanelonline.com/forums/1/Thread/2714	
Obrázek 15 Cibule velšská	38
Dostupné z: https://australianseed.com/shop/item/welsh-onion-white-organic-heirloom	
Obrázek 16 Kopr vonný	40
Dostupné z: https://www.garten.cz/a/cz/4360-anethum-graveolens-kopr-vonny/	
Obrázek 17 Semena kopru	40
Dostupné z: http://bylinkovyraj.net/kopr-vonny/	
Obrázek 18 Polokeř tymián obecný	41
Dostupné z: http://www.biokado.cz/Tymian-Fredo-d136.htm	
Obrázek 19 Detail tymiánu obecného	41
Dostupné z: http://www.ireceptar.cz/zahrada/uzitkova-zahrada/pestovani-a-vyuziti-vonaveho-tymianu/	
Obrázek 20 <i>Hyptis suaveolens</i>	42
Dostupné z: http://www.mozambiqueflora.com/speciesdata/species.php?species_id=149570	
Obrázek 21 Detail byliny <i>Hyptis suaveolens</i>	42
Dostupné z: http://www.mozambiqueflora.com/speciesdata/species.php?species_id=149570	
Obrázek 22 <i>Echinophora platyloba</i>	43
Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/228640848_fig1_Figure-1-Picture-of-Echinophora-platyloba-in-the-field	

Obrázek 23 Detail listu *Echinophora platyloba*43

Dostupné z: http://www.imgrum.org/media/1014244904084609937_1511083493

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AFZAL H., SHAZAD S., UN NISA S. Q. Morphological identification of *Aspergillus* species from the soil of Larkana district (Sindh, Pakistan). Asian Journal of Agriculture and Biology. 2013, 1(3), 105-117.

ARENDRUP M. C., CUENCA-ESTRELLA M., LASS-FLÖRL C., HOPE W. W. EUCAST technical note on *Aspergillus* and amphotericin B, itraconazole, and posaconazole. Clinical Microbiology and Infection. 2012, 18(7), 248-250.

ASHIQ S., HUSSAIN M., AHMAD B. Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants. Fungal Genetics and Biology. 2014, 66, 1-10.

AVIJGAN M., MAHBOUBI M. *Echinophora platyloba* DC. as a new natural antifungal agent. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2015, 5(3), 169-174.

BANSODE V. J. A review on pharmacological activities of *Cinnamomum cassia* Blume. International Journal of Green Pharmacy. 2012, 6(2), 102-108.

BARTÁKOVÁ H., CETKOVSKÝ P., DRGOŇA L., HABER J., HAMAL P., KOCMANOVÁ I., KOUBA M., KOUKALOVÁ D., LENGEROVÁ M., MALLÁTOVÁ N., MAYER J., MENCL K., RÁČIL Z., TESAŘOVÁ M. Invazivní aspergilóza: současné možnosti diagnostiky. Vnitřní lékařství. 2007, 53, 1-34.

BEZERRA DA ROCHA M. E., FREIRE F. CH. O., MAIA F. E. F., GUEDES M. I. F., RONDINA D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. Food Control. 2014, 36(1), 159-165.

CORZO-MARTÍNEZ M., CORZO N., VILLAMIEL M. Biological properties of onions and garlic. Trends in Food Science & Technology. 2007, 18(12), 609-625.

DAGENAIS T. R. T., KELLER N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. Clinical Microbiology Reviews. 2009, 22(3), 447-465.

DELGADO-VIRGEN F., GUZMAN-DE-PENA D. Mechanism of sterigmatocystin biosynthesis regulation by pH in *Aspergillus nidulans*. Brazilian Journal of Microbiology. 2009, 40(4), 933-942.

DIBA K., KORDBACHEH P., MIRHENDI S. H., REZAIE S., MAHMOUDI M. Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics. Pakistan Journal of Medical Sciences. 2007, 23(6), 867-872.

ELEIWA N. Z., EL-DIASTY E. M. Antifungal activity of dill essential oil (*Anethum graveolens* L.) in minced meat. Vedic Research International Phytomedicine. 2014, 2(1), 6-12.

FLICKINGER M. C., DREW S. W. Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. New York, Third Avenue, 1999, 2756 str. ISBN 0-471-13822-3.

GALIMBERTI R., TORRE A. C., BAZTÁN M. C., RODRIGUEZ-CHIAPPETTA F. Emerging systemic fungal infections. Clinics in Dermatology. 2012, 30(6), 633-650.

GLEASON F. H., MARANO A. V. The effects of antifungal substances on some zoosporic fungi (Kingdom Fungi). Hydrobiologia. 2011, 659(1), 81-92.

GOLDMAN G. H., OSMANI S. A. The *Aspergilli*: genomics, medical aspects, biotechnology and research methods. Boca Raton, CRC Press, 2008, 576 str. ISBN 978-0-8493-9080-7.

GREENWOOD D., SLACK R. C. B., PEUTHERER J. F. a kol. Lékařská mikrobiologie, přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie. Praha, GRADA Publishing, 1999, 686 str. ISBN 80-7169-365-0.

GRIFFITHS G., TRUEMAN L., CROWTHER T., THOMAS B., SMITH B. Onions – a global benefit to health. Phytotherapy Research. 2002, 16(7), 603-615.

HAJAR R. Statins: Past and present. Heart Views. 2011, 12(3), 121-127.

HARRIS S. D. Evolution of modular conidiophore development in the *aspergilli*. The New York Academy of Sciences. 2012, 1273(1), 1-6.

HASANVAND H., MOSHTAGHI H., HESHMATI A., BONIADIAN M., ABBASVALI M. Inhibitory effect of *Echinophora platyloba* essential oil on *Aspergillus flavus* in culture media and cheese. Journal of Food Quality and Hazards Control. 2016, 3(4), 122-127.

HASHEMI M., EHSANI A., AFSHARI A., AMINZARE M., RAEISI M. Chemical composition and antifungal effect of *Echinophora platyloba* essential oil against *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum* and *Fusarium graminearum*. Journal of Chemical Health Risks. 2016, 6(2), 91-97.

HEDAYATI M. T., PASQUALOTTO A. C., WARN P. A., BOWYER P., DENNING D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology. 2007, 153(6), 1677-1692.

HOPE W. W., WALSH T. J., DENNING D. W. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. The Lancet Infectious Diseases. 2005, 5(10), 609-622.

CHEN S. C. A., SLAVIN M. A., SORRELL T. C. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. Drugs. 2011, 71(1), 11-41.

IRKIN R., KORUKLUOGLU M. Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts. African Journal of Biotechnology. 2007, 6(4), 384-387.

IRKIN R., KORUKLUOGLU M. Control of some filamentous fungi and yeasts by dehydrated *Allium* extracts. Journal of Consumer Protection and Food Safety. 2009, 4(1), 3-6.

ISMAIEL A. A., PAPENBROCK J. Mycotoxins: Producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. Agriculture. 2015, 5(3), 492-537.

JANA S., SHEKHAWAT G. S. *Anethum graveolens*: An Indian traditional medicinal herb and spice. Pharmacognosy Reviews. 2010, 4(8), 179-184.

KATHIRAVAN M. K., SALAKE A. B., CHOTHE A. S., DUDHE P. B., WATODE R. P., MUKTA M. S., GADHWE S. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2012, 20(19), 5678-5698.

KAUR G. J., ARORA D. S. Bioactive potential of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi* belonging to the family *Umbelliferae* - Current status. Journal of Medicinal Plants Research. 2010, 4(2), 87-94.

KELLER K. A. Itraconazole. Journal of Exotic Pet Medicine. 2011, 20(2), 156-160.

KHOUFACHE K., PUEL O., LOISEAU N., DELAFORGE M., RIVOLLET D., COSTE A., CORDONNIER C., ESCUDIER E., BOTTEREL F., BRETAGNE S. Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysiological properties of human nasal epithelial cells. BioMed Central Microbiology. 2007, 7(5), 1-11.

KLABAN V. Ekologie mikroorganismů: Ilustrovaný lexikon biologie, ekologie a patogenity mikroorganismů. Praha, Galén, 2011, 549 str. ISBN 978-80-7262-770-7.

KOCIĆ-TANACKOV S., DIMIĆ G., LEVIĆ J., TANACKOV I., TEPIĆ A., VUJIČIĆ B., GVOZDANOVIĆ-VARGA J. Effects of onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) essential oils on the *Aspergillus versicolor* growth and sterigmatocystin production. Journal of Food Science. 2012, 77(5), 278-284.

KOHIYAMA C. Y., YAMAMOTO RIBEIRO M. M., MOSSINI S. A. G., BANDO E., BOMFIM N. da S., NERILO S. B., ROCHA G. H. O., GRESPAN R., MIKCHA J. M. G., MACHINSKI M. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. Food Chemistry. 2015, 173, 1006-1010.

LANIADO-LABORÍN R., CABRALES-VARGAS M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. Revista Iberoamericana de Micología. 2009, 26(4), 223-227.

LANZOTTI V., ROMANO A., LANZUISE S., BONANOMI G., SCALA F. Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa* L. Phytochemistry. 2012, 74, 133-139.

LI M., LI P., WU H., ZHANG Q., ZHANG Z., MA F., DING X., WANG H. An ultra-sensitive monoclonal antibody-based competitive enzyme immunoassay for sterigmatocystin in cereal and oil products. PLOS ONE. 2014, 9(9), 1-8.

LI W. R., SHI Q. S., LIANG Q., HUANG X. M., CHEN Y. B. Antifungal effect and mechanism of garlic oil on *Penicillium funiculosum*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2014, 98(19), 8337-8346.

MALÍŘ F., OSTRÝ V. a kol. Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. Brno, Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003, 349 str. ISBN 80-7013-395-3.

MARCHESE A., BARBIERI R., SANCHES-SILVA A., DAGLIA M., NABAVI S. F., JAFARI N. J., IZADI M., AJAMI M., NABAVI S. M. Antifungal and antibacterial activities of allicin: A review. Trends in Food Science & Technology. 2016, 52, 49-56.

MARIN S., RAMOS A. J., CANO-SANCHO G., SANCHIS V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology and exposure assessment. Food and Chemical Toxicology. 2013, 60, 218-237.

MARKS D. I., PAGLIUCA A., KIBBLER C. C., GLASMACHER A., HEUSSEL C. P., KANTECKI M., MILLER P. J., RIBAUD P., SCHLAMM H. T., SOLANO C., COOK G. Voriconazole versus itraconazole for antifungal prophylaxis following allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation. British Journal of Haematology. 2011, 155(3), 318-327.

McGRATH M. T. What are fungicides? The Plant Health Instructor. 2004. Dostupné také z: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/Fungicides.aspx>

MOGHADDAM M., TAHERI P., PIRBALOUTI A. G., MEHDIZADEH L. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from the seed of *Echinophora platyloba* DC. against phytopathogens fungi by two different screening methods. LWT - Food Science and Technology. 2015, 61(2), 536-542.

MOGHIM H., SHAHABI G. A., ANOOSHEH M. Comparison of antifungal effect of extracts of *Thymus vulgaris*, *Echinophora platyloba* and garlic on *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum*. Clinical Biochemistry. 2011, 44(13), S342.

MOGHTADER M. Antifungal effects of the essential oil from *Thymus vulgaris* L. and comparison with synthetic thymol on *Aspergillus niger*. Journal of Yeast and Fungal Research. 2012, 3(6), 83-88.

MONSON M. S., COULOMBE R. A., REED K. M. Aflatoxicosis: Lessons from toxicity and responses to aflatoxin B₁ in poultry. Agriculture. 2015, 5(3), 742-777.

MOREIRA A. C. P., LIMA E. de O., WANDERLEY P. A., CARMO E. S., SOUZA E. de L. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. Brazilian Journal of Microbiology. 2010, 41(1), 28-33.

MOREIRA A. C. P., LIMA E. de O., WANDERLEY P. A., CARMO E. S., SOUZA E. de L. Inhibitory effect of the essential oil from *Hyptis suaveolens* (L.) poit on the growth and aflatoxins synthesis of *Aspergillus flavus*. Journal of Life Sciences. 2013, 7(3), 276-281.

PATTERSON K. C., STREK M. E. Diagnosis and treatment of pulmonary aspergillosis syndromes. Chest. 2014, 146(5), 1358-1368.

PAWAR V. C., THAKER V. S. *In vitro* efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. Mycoses. 2006, 49(4), 316-323.

PEKMEZOVIC M., RAJKOVIC K., BARAC A., SENEROVIĆ L., ARSIC ARSENIJEVIC V. Development of kinetic model for testing antifungal effect of *Thymus vulgaris* L. and *Cinnamomum cassia* L. essential oils on *Aspergillus flavus* spores and application for optimization of synergistic effect. Biochemical Engineering Journal. 2015, 99, 131-137.

PÉREZ-FERNÁNDEZ V., GARCÍA M. Á., MARINA M. L. Chiral separation of agricultural fungicides. Journal of Chromatography A. 2011, 1218(38), 6561-6582.

PERLIN D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. Drug Resistance Updates. 2007, 10(3), 121-130.

PEYTON L. R., GALLAGHER S., HASHEMZADEH M. Triazole antifungals: a review. Drugs of Today. 2015, 51(12), 705-718.

RAJARAJAN P. N., RAJASEKARAN K. M., ASHA DEVI N. K. Antifungal and phytochemical screening of *Hyptis suaveolens* (L. Poit) *Lamiaceae* on aflatoxin producing fungi. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*. 2014, 3(1), 50-52.

RANA V. S., BLAZQUEZ M. A. Chemical composition of the essential oil of *Anethum graveolens* aerial parts. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2014, 17(6), 1219-1223.

RAO P. V., GAN S. H. Cinnamon: a multifaceted medicinal plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014, 2014, 1-12.

REDDY K. R. N., FARHANA N. I., SALLEH B. Occurrence of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B₁ in Malaysian foods used for human consumption. *Journal of Food Science*. 2011, 76(4), 99-104.

REGUEIRO J., OLGUÍN N., SIMAL-GÁNDARA J., SUNOL C. Toxicity evaluation of new agricultural fungicides in primary cultured cortical neurons. *Environmental Research*. 2015, 140, 37-44.

ROKAS A. *Aspergillus*. *Current Biology*. 2013, 23(5), 187-188.

SAMSON R. A., VISAGIE C. M., HOUBRAKEN J., HONG S. B., HUBKA V., KLAASSEN C. H. W., PERRONE G., SEIFERT K. A., SUSCA A., TANNEY J. B., VARGA J., KOCSUBÉ S., SZIGETI G., YAGUCHI T., FRISVAD J. C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 2014, 78, 141-173.

SHADKCHAN Y., SHEMESH E., MIRELMAN D., MIRON T., RABINKOV A., WILCHEK M., OSHEROV N. Efficacy of allicin, the reactive molecule of garlic, in inhibiting *Aspergillus* spp. *in vitro*, and in a murine model of disseminated aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004, 53(5), 832-836.

SHREAZ S., WANI W. A., BEHBEHANI J. M., RAJA V., IRSHAD M., KARCHED M., ALI I., SIDDIQI W. A., HUN L. T. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*. 2016, 112, 116-131.

SHRESTHA G. R., MRIDHA A. U. Detection and quantitation of aflatoxin for the diagnosis of *Aspergillus flavus*. Nepal Journal of Biotechnology. 2015, 3(1), 6-9.

STANOJEVIĆ L. P., STANKOVIĆ M. Z., CVETKOVIĆ D. J., DANILOVIĆ B. R., STANOJEVIĆ J. S. Dill (*Anethum graveolens* L.) seeds essential oil as a potential natural antioxidant and antimicrobial agent. Biologica Nyssana. 2016, 7(1), 31-39.

ŠILHÁNKOVÁ L. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Praha, Academia, 2002, 363 str. ISBN 80-200-1024-6.

TIAN J., BAN X., ZENG H., HE J., HUANG B., WANG Y. *In vitro* and *in vivo* activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. Food Control. 2011, 22(12), 1992-1999.

TIAN J., BAN X., ZENG H., HE J., CHEN Y., WANG Y. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. PLOS ONE. 2012, 7(1), 1-10.

TRACY M. C., OKORIE C. U. A., FOLEY E. A., MOSS R. B. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Journal of Fungi. 2016, 2(2), 1-18.

WANG H. X., NG T. B. Isolation of allicepin, a novel antifungal peptide from onion (*Allium cepa*) bulbs. Journal of Peptide Science. 2004, 10(3), 173-177.

WATTIER R. L., RAMIREZ-AVILA L. Pediatric invasive aspergillosis. Journal of Fungi. 2016, 2(2), 1-20.

WINGARD J. R., LEATHER H. A new era of antifungal therapy. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2004, 10(2), 73-90.

YE CH. L., DAI D. H., HU W. L. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.). Food Control. 2013, 30(1), 48-53.

YU J. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins*. 2012, 4(11), 1024-1057.

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