

Vznik a původ BSE podle „alternativní ammonia-magnesium theory“

Souhrn

1. Prionové nemoci a histologické změny v mozečku

Prionové nemoci jsou charakteristické tím, že normální prion protein (PrP^c) je nahrazen na proteázu rezistentní izoformou (PrP^{Sc}), která je patogenní. Prionové nemoci a jejich patologie se týkají pouze mozku zvířat a lidí. Jiné orgány těla nejsou postiženy. V počátečních stádiích nemoci vznikají v **cytoplasmě nervových buněk (neuronů) vakuoly**. S vývojem nemoci se vakuoly zvětšují, nervová tkáň se tak stává „houbovitou“- spongiozní a od toho je název spongiformní encefalopatie. Tento proces se nazývá „**vakuolizace**“. S dalším vývojem nemoci dochází k odúmrti až vymizení neuronů a naopak **gliové buňky (astrocyty) se zvětšují** – tento proces se nazývá „**astrocytóza**“ a mozek tak atrofuje. Obvykle dochází k výrazné atrofii mozečku. Ten sestává z granulární a molekulární vrstvy (s mezivrstvou „velkých“ Purkyňových buněk), což je dáno různými typy buněk. Axonální zduření („swellings“) Purkyňových buněk, jsou také jinak nazývány „torpedoes“. Tyto axonální „torpedoes“ se nacházejí zejména v granulární vrstvě. Na rozdíl od většiny degenerativních změn v mozečku, dochází při prionových onemocněních **ke ztrátě zejména „granulárních neuronů“** než Purkyňových buněk. Ke glióze obvykle dochází v molekulární vrstvě kůry mozečku.

K onemocnění s podobnými změnami („ryegrass staggers“) však u přežvýkavců dochází i při dlouhodobějším zkrmování „mladého“ jílku anglického. Bylo zjištěno, že čím je onemocnění chroničtější, tím větší je pravděpodobnost výskytu morfologických změn („axonální degenerace“) v CNS, spočívající v poškození výběžků (axony) Purkyňových buněk mozečku. Tyto léze sestávají z homogenních eosinofilních „zduření“ (swellings) v nervové tkáni. Nejsou „roztroušené“, ale ve „shlucích“, přiléhající k vrstvě Purkyňových buněk. Axonální „torpedoes“ jsou jen částečně myelinovány (nečastěji v místech „zduření“), v určitých „torpedoes“ jsou zjišťovány „vakuoly“.

2. Amoniak, glutamát, D-serin; jejich aktivace ionty Ca

Glutamát (kyselina glutamová) je hlavním excitačním přenašečem (neurotransmitterem) v CNS, působí postsynapticky na různé typy receptorů, jedním z nich je NMDA receptor. Při akutní jaterní insuficienci (AJI), kde je nejčastější příčinou hyperamonémie bylo prokázáno, že se zvyšuje koncentrace extracelulárního glutamátu v mozku. Je to zřejmě tím, že **čpavek inhibuje příjem glutamátu do astrocytů**. To podporuje i to, že při AJI pozitivně korelují hladiny extracelulárního (ECT) glutamátu v mozku a koncentrace čpavku v krvi a že při léčení AJI dochází ke snižování hladiny glutamátu v ECT mozku, souběžně se snižováním hladiny čpavku v mozku.

Rychlý vzestup hladiny čpavku má za následek zvýšení pH ve všech buňkách tělních tkání, včetně astrocytů. Takto vyvolanou „**buňčnou alkalizaci**“ doprovází zvýšení koncentrace Ca²⁺ i v nervových buňkách – neuronech. Bylo zjištěno, že glutamát uvolněný z astrocytů vyvolává zvýšení koncentrace vápníku v neuronech, jeho vazbou na NMDA receptor. Takže prostřednictvím astrocytů je regulován obsah vápníku v neuronech, v souvislosti na vápníku závislém uvolnění glutamátu z astrocytů. Uvolňování glutamátu z astrocytů probíhá při fyziologických hladinách intracelulárního Ca²⁺.

Za další v pořadí důležitosti druhým neurotransmitterem, je od roku 2000 považována aminokyselina D-serin. Na rozdíl od dopaminu, serotoninu a dalších známých neurotransmitterů, D-serin není uvolňován (secernován) na zakončeních nervových buněk CNS; avšak z gliových buněk-astrocytů. Je to D-aminokyselina syntetizovaná a ukládaná zejména ve gliových buňkách-astrocytech. Uvolněný glutamát působí na receptory astrocytů, napojené na synapse uvolňující D-serin a tak se ko-aktivují postsynaptické NMDA receptory s glutamátem. D-serin se vytváří působením enzymu „serine racemase“(SR), který převádí (konvertuje) L-serin na D-serin.

Inhibitory tohoto enzymu se mohou léčebně uplatňovat v situacích (mozková mrtvice...) kdy dochází ke „**glutamátové excitotoxicitě**“. Odstraněním D-serinu a enzymu SR se rychle zastavuje aktivita NMDA receptorů. Dále bylo zjištěno, že pro aktivaci enzymu SR jsou nezbytné kationty vápníku a naopak tento enzym inaktivují cheláty jakým je EDTA. Působením Ca²⁺ na astrocyty,

zvysuje se hladina D-serinu v extracelularním mediu. Na zaklade těchto zjištení se předpokládá, že koncentrace intracelularního Ca^{2+} má vliv na glutamátém usměrňovanou regulaci aktivity SR. Takže množství uvolněného glutamátu v astrocytech je závislé na Ca^{2+} , za což dříve byla považována místa na synapsích (nervových spojeních).

3. Toxickým působením EAA se v mozku vyvolávají podobné změny jako při „TSE infekci“

Nadbytek čpavku je značně škodlivý pro CNS jak z hlediska metabolismu nervové tkáně, tak neurotransmitterů. **Jaterní encefalopatie (JE)** je soubor obvykle reverzibilních neurologických a psychiatrických příznaků, které vznikají v souvislosti s pokročilým chronickým onemocněním jater-jaterní insuficiencí nebo při akutním jaterním selhání. JE začínající **akutní jaterní insuficiencí (AJI)** závisí na stupni hyperamonémie. V průběhu posledních 10-20 let bylo zjištěno, že toxicita amoniaku je ovlivněna změnami v regulaci glutamátu jako přenašeče nervových impulzů, které jsou důležité z hlediska patofyziologie JE při AJI. Avšak nejen glutamát, ale i aspartát; obě tyto aminokyseliny se označují jako „excitační aminokyseliny“ (EAA). Když se jejich koncentrace v mozku zvýší, účinkují jako neurotoxin, ničící nervové buňky v mozku. V této souvislosti byly zjištěny určité podobnosti mezi patologickými změnami v mozku vyvolanými neurotoxicitou EAA a TSE (transmisibilní spongiformní encefalopatie) infekcemi. Neurony usměrňující neuroendokrinní funkce hypotalamu a rovněž i Purkyňových buněk v mozečku jsou „společným jmenovatelem“ při poškození mozku jak vlivem EAA toxicity tak TSE infekce. Dále potom jak EAA tak TSE agens vyvolávají astrocytózu. Běžným vyvolávajícím účinkem TSE je „nabubřelost astrocytů“ (astrocytóza), které obsahují abnormální prion proteiny (PrPSc).

4. Antagonisté NMDA receptoru odstraňují poškození neuronů způsobené infekčním prionem

Normální buněčný protein (PrPC) souvisí s regulací hladiny intracelularního volného Ca^{2+} přes určitou interakci s napětím-senzitivními Ca-kanály. Fragment 106-126 infekčního prion proteinu (PrPSc) přímo stimuluje proliferaci astrocytů, při zvýšené hladině intracelularního Ca^{2+} ; přes na napětí-senzitivní Ca-kanály. Přitom jen toxicita fragmentu 106-126 má vliv na aktivitu NMDA receptoru, který je velmi důležitý při tzv. „excitotoxicitě“, při které masivní uvolňování glutamátu má za následek „nadměrnou excitaci“ neuronů, vedoucí k poškození až k odúmrti neuronů. *Antagonisté komplexu kanálů NMDA-receptoru odstraňují infekčním prionem indukované poškození neuronů.*

5. Mg^{2+} jako antagonist NMDA receptorů a oproti tomu účinek amoniaku a polyaminů

Při nadbytku bílkovin v krmné dávce (ve stravě) se zvyšuje koncentrace amoniaku v krvi. *Bylo zjištěno, že akutní toxicita amoniaku je usměrňována aktivací NMDA receptoru. Jedná se však jen o NMDA receptor (podskupina NR1 a NR2), citlivý ke glutamátu. Je to tím, že ionty NH_4^+ indukují depolarizaci kortikálních astrocytů v mozku. Takto působením NH_4^+ vyvolaná depolarizace může vyvolat odstranění Mg^{2+} na membráně neuronů, které za normálních okolností blokují kanály NMDA receptoru. Výsledkem je značný příliv Ca^{2+} do neuronů, což vede k nepřiměřené aktivaci NMDA receptoru.* Uváděným poznatkům z literatury odpovídá i to, že zablockováním NMDA receptoru (blokátorem MK-801), lze působit preventivně proti intoxikaci amoniakem. Zvláštní podskupinou NMDA receptoru je NR2B, která umožňuje vazbu na polyaminy (spermin, spermidin). Tyto mohou inhibovat nebo potencovat NMDA receptory s ohledem na jejich koncentraci.

Při nižších aktivujících, při vyšších koncentracích polyaminy blokují kanály NMDA receptoru, v závislosti na napětí na kanálech. Avšak in vivo nemohou endogenní polyaminy působit na NMDA receptor v mozku. Je to tím, že tyto polyaminy se nacházejí uvnitř buněk, kdežto NMDA receptor se nachází extracelularně. Takže **polyaminy mají vliv na NMDA receptory jen za patologických podmínek.** Endogenním „usměrňovačem“ v tomto směru mohou být Mg^{2+} nebo protony vodíku (pH), protože jejich účinek převyšuje vliv polyaminů.

Polyamin spermin je aktivátorem vstupu Ca^{2+} do mitochondrií, Mg ionty se uplatňují jako antagonisté. Účinek sperminu však je dvojitý a je závislý na jeho koncentraci. Při vyšší koncentraci

sperminu je zjišťován inhibiční (tlumivý) vliv na vstup Ca^{2+} do mitochondrií a naopak stimulační efekt je zjišťován při jeho nižší koncentraci, přičemž ionty Mg mají účinek opačný než spermin.

6. Eliminace amoniaku v játrech a protektivní účinek Mg^{2+}

Ke zvýšené hladině amoniaku v krvi dochází i při chronických a akutních onemocněních jater. Snižuje se tak kapacita jaterních buněk k syntéze močoviny, zvyšuje se hladina amoniaku v krvi, která je toxická pro CNS. Tato syntéza probíhá během tzv. „ornitinového cyklu“, přičemž se uplatňují dlouhodobé i krátkodobé „neurohormonální regulace“. Nejdůležitější při krátkodobé regulaci je vliv enzymu „carbamoyl- fosfatázy“, jehož aktivita závisí na koncentraci „N- acetylglutamátu“ v mitochondriích buněk, bez kterého nemůže enzym působit. Avšak aby mohl působit „N- acetylglutamát“ (spojení s carbamoyl- fosfatázou), je nutné aby v mitochondriích buněk byla také určitá koncentrace iontů hořčíku. Toto však má zásadní důležitost, protože celková aktivita cyklu močoviny je regulována rozsahem syntézy N-acetylglutamátu, čímž se zahajuje „eliminace“ amoniaku z krve, v průběhu ornitinového cyklu močoviny.

Při zvýšení hladiny glutamátu se zvyšuje i hladina glutaminu v CNS. Enzym glutamináza má zásadní vliv na přeměnu nadbytečného glutaminu přicházejícího z jater; na ionty amonia, které jsou vylučovány močí. Při vyšší koncentraci Mg^{2+} (blízké fyziologickému rozmezí) se stimuluje glutamináza tím, že se zvyšuje afinita tohoto enzymu k jeho fosfátové variantě. Aktivita enzymu glutamináza v játrech je aktivována polyaminem spermin. Důkazem je to, že při této aktivaci se zvyšuje produkce glutamátu z glukaminu. Bylo však zjištěno, že účinek sperminu je efektivní jen při fyziologické hladině Mg^{2+} .

7. Zvláštní význam nadbytku bílkovin a deficitu Mg^{2+} u přežvýkavců

Hořčík je živina potřebná pro všechna zvířata, u přežvýkavců je význam Mg^{2+} zvláště kritický. Již fyziologický deficit Mg^{2+} má za následek tetanii, přičemž jsou v podstatě postižena jen zvířata samičího pohlaví, obvykle v časném stádiu laktace. U starších krav je využitelnost Mg^{2+} významně snížena ve srovnání s kravami mladšími. Zatímco u živočichů s jednoduchým žaludkem je Mg^{2+} vstřebáváno v tenkém střevě, tak u přežvýkavců může být až 80% přijatého Mg^{2+} vstřebáno v batoru. Rozpustnost solí Mg v batoru významně klesá při pH vyšším jak 6,5. Amonné ionty (NH_4) při akutním zvýšení hladiny amoniaku v batoru – přímým účinkem působením na membránu buněk sliznice, snižují absorpci Mg^{2+} v batoru.

Účinek neuromediátorů na CNS je při Mg-deficitu rozdílný: koncentrace serotoninu v mozku někdy klesá nebo se nemění jindy se zase zvyšuje, zatímco dopamin klesá (v nucleus caudatus) u Mg-deficitních psů, ne však u pokusných krys. Přitom nervové příznaky výrazněji nekorelují s hladinou Mg. Avšak u skotu a ovcí bylo zjištěno, že při poklesu koncentrace Mg v cerebrospinální tekutině (CSF), tomuto odpovídají i příznaky „hypomagneziemické“ tetanie. U obou těchto druhů zvířat klesá koncentrace Mg v bederní CSF z normálních 0,9 mmol/l na 0,5 mmol/l (při tetanii), přičemž koncentrace Mg v bederní CSF je ovlivněna hladinou Mg v CSF mozku. Zásadní význam na využití Mg^{2+} u přežvýkavců však má obsah draslíku (K^+) v krmné dávce. Hořčík je nepostradatelný pro celou řadu fyziologických a biochemických funkcí. Je však překvapivé, že jeho homeostáza není regulována žádným neurohormonálním mechanismem (jako tomu je u Ca, P, K a Na).

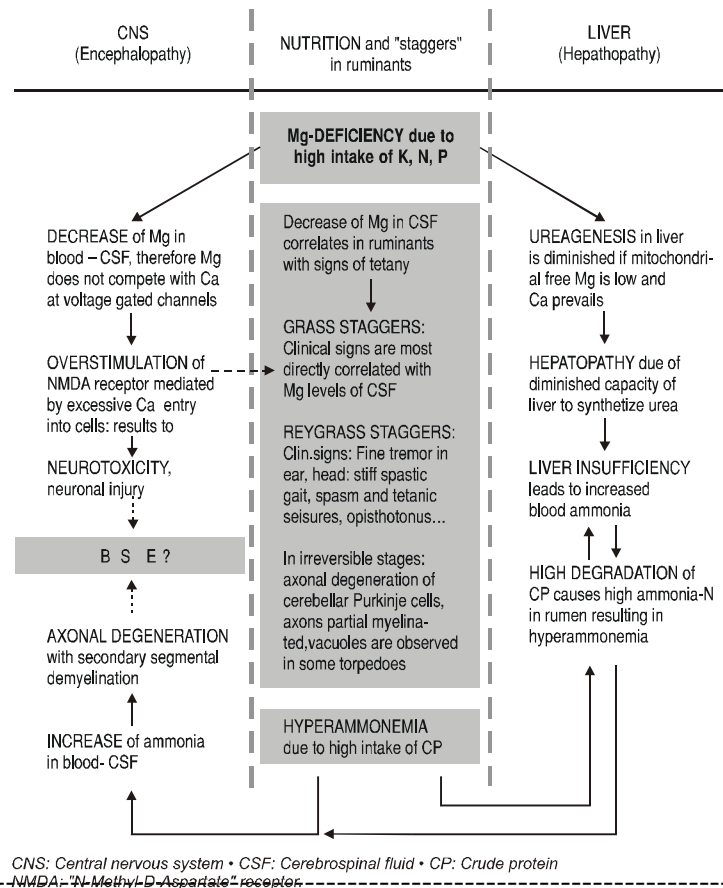
Z výše uvedeného vyplývá, že zvýšená stimulace NMDA receptoru, jakož i dalších excitačních receptorů má za následek „neurotoxicitu“ – poškození nervů, při zvýšeném přílivu Ca^{2+} do neuronů, přičemž Mg^{2+} působí jako ochrana proti této „neurodegeneraci“. Uplatnění vlivu Mg^{2+} se však vytrácí, když elektrické napětí na buněčné membráně je méně negativní nebo dokonce pozitivní, takže blokování NMDA receptoru není efektivní. Tento na elektrickém napětí závislý účinek Mg^{2+} je v literatuře považován za „stěžejní“, z hlediska mnoha zajímavých pohledů na funkce NMDA receptorů. Další důležitou ochranou proti neurodegeneraci je rovněž pH; takže při nízkém pH (okolo hodnoty 6) je aktivace NMDA receptoru téměř kompletně tlumena.

Uváděný mechanismus ukazuje na to, že BSE (TSE) nemusí mít infekční charakter, kdy vyvolávajícím faktorem má být „infekční britská“ masokostní moučka. To však také nikdy potvrzeno nebylo, takže stávající infekční teorie o vzniku a šíření BSE je pouhou hypotézou. Oproti tomu v roce 2000 bylo opakovaně potvrzeno, že ke spongiformní degeneraci mozečku dochází při dlouhodobém

zkrmování jílku anglického. Takže v souladu s výše popisovaným mechanismem neurodegenerace a toxicity- působením nadbytku bílkovin při deficitu Mg²⁺; již před pěti roky (HLÁSNÝ, 2001) jsme BSE jako možnou „metabolickou poruchu“ znázornili následovně (obr.1):

Fig. 1

Nervous diseases and connections with nutrition in ruminants



V roce 2000 nejen vzhledem k šíření paniky z onemocnění nové varianty Creutzfeldt-Jakobovi nemoci (vCJD), ale i z toho důvodu, že v samotné V.Británii byl experimentálně „ověřen“ výskyt BSE po zkrmování jílku anglického (MOORBY et al., 2000) – zareagovali jsme ve VÚCHS Rapotín a to tak, že již v březnu 2001 jsme v bulletinu „Výzkumu v chovu skotu“ (HLÁSNÝ, 2001) zveřejnili tzv. „nutriční teorii“ o možném původu BSE. Co tato teorie ve stručnosti řečeno představuje? Jedná se o trvalejší účinek nadbytku bílkovin (hyperamonémie), při současném nedostatku hořčíku nebo jeho horším využití z krmné dávky (viz obr.1). To však zejména u přežvýkavců může vyvolávat neurodegeneraci a neurotoxicitu. Publikaci „Nervová onemocnění přežvýkavců v souvislosti s jejich výživou“ jsme doplnili poměrně rozsáhlým souhrnem v angličtině, což se ukázalo jako výhodné, protože tento článek byl „přetištěn“ do mezinárodního vědeckého časopisu „Feed Mix“, vydávaného v Nizozemí (HLÁSNÝ, 2002). Redakce tohoto časopisu označila zmíněnou českou nutriční teorii jako „BSE-ammonia- magnesium theory“ s tím, že se jedná o jedinou tohoto druhu- „neinfekční BSE teorii“ na světě (<http://www.agriworld.nl/feedmix/headlines.asp?issue=3>).

Ve světové literatuře jsou k dispozici již stovky publikací o souvislostech mezi infekčností masokostní moučky (MKM), vznikem BSE, s možností přenosu tohoto nervového onemocnění (vCJD) i na člověka. Výzkumníky zabývajícími se BSE však bývají citovány

obvykle jen studie kde je podezření na souvislosti mezi MKM, BSE a vCJD. Jinak také řečeno, vzhledem k tomu, že světová vědecká literatura se zabývá jen „možnou infekčností MKM“, nejsou v podstatě až na výjimky zkoumány i možnosti „neinfekční“. Neboli jinak řečeno, nehledají se důkazy (a to již od samého začátku vzniku BSE v Británii) o tom, že by se mohlo jednat o metabolickou poruchu, tak jak to v podstatě již v průběhu jednoho experimentu bylo zjištěno (MOORBY et al., 2000). Avšak i celkový vývoj ve výskytu BSE v ČR ukazuje na to, že by se skutečně mohlo jednat o metabolickou poruchu, tak jak je výše naznačeno. Proto se zdá jako účelné připomenout všechny souvislosti, které by tuto „metabolickou hypotézu“ potvrzovaly v rovině poznatků obecných a potom i nejnovějších vědeckých poznatků čerpaných z literatury; týkající se jednak metabolismu bílkovin, hořčičku a vápníku ve vztahu ke změnám charakteristickým pro prionová onemocnění.

Cílem této studie je po pěti letech opakovaně upozornit na poruchy metabolismu bílkovin a hořčičku, ve vztahu k neurodegenerativním změnám v centrálním nervovém systému (CNS) u přežvýkavců. Dále potom připomenout i to, že v poslední době již je zpochybňována infekčnost prionů, v souvislosti se zkrmováním MKM zvířatům.

Vývoj poznatků o šíření vCJD ve Velké Británii

V letošním roce tomu bude již 10 let od zveřejnění velmi závažné hypotézy, později publikované v celé řadě nejprestižnějších světových vědeckých časopisů, týkající se možného přenosu BSE na širokou lidskou populaci. Jednalo se tehdy o zjištění výskytu nové varianty Creutzfeld-Jakobovy nemoci (vCJD) u lidí mladšího věku v Británii, přičemž tato nevyléčitelná „vysoce infekční“ nemoc je také nazývána jako „lidská forma šílených krav“. Tehdy se upozorňovalo na to, že každým rokem se bude výskyt vCJD v Británii zdvojnásobovat až dosáhne během několika málo let tisíců případů. V roce 1998 byl odhad dokonce takový, že rozšiřování vCJD bude ještě rychlejší, takže v Británii bude až pět milionů případů vCJD s vyvrcholením v letech 2010 až 2020. Poradce britské vlády profesor Roy Anderson dokonce upozornil na to, že původní jeho počítačově zpracovaný výhled o infikování priony BSE u 6 tisíc lidí v letech 1980 až 1996 je třeba přehodnotit na 130 tisíc infikovaných lidí

(<http://www.wsws.org/articles/2000/nov2000/bse-n03.shtml>).

K tomuto až značně pesimistickému názoru však nebyly žádné důkazy o tom, že by byl přenos BSE na lidi prokázán. Bylo však již v té době zjištěno, že při porovnání let 1999 (15 případů vCJD) a 2000 (28 případů), se skutečně výskyt téměř „zdvojnásobuje“. Bohužel, jen tato statisticky „zanedbatelná čísla“, doslova vyburcovala vědce na celém světě (mimo Británii, zejména v USA) k tomu, aby experimenty zejména na „myšovitých“ zvířatech prokazovali ohromné nebezpečí plynoucí od krav na lidi. Již v říjnu 2001 však byla zmíněná teorie oponována v časopise „British Medical Journal“ s názvem publikace „*New Variant Creutzfeld-Jakob disease: the epidemic that never was*“ (<http://bmj.bmjournals.com/cgi/content/full/323/7317/858>). Autorem je britský praktický lékař George A. Vinters. Ten rozpoutal mohutnou debatu, jak již z názvu publikace vyplývá o tom, že v Británii k žádné epidemii s „lidskou formou BSE“ nikdy nedošlo. Další vývoj situace jemu a jeho stoupencům dal za pravdu, protože ještě v roce 2001 nadějný trend vývoje vCJD z pohledu propagátorů „světové infekce“- se změnil na sestupnou tendenci. Takže v roce 2004 bylo zjištěno jen devět a za rok 2005 již jen pět případů vCJD ve Velké Británii. Výskyt vCJD však byl a je stále zveličován, protože se uvádí, že v Británii na vCJD (včetně výše uváděných čísel) zemřelo již celkem 153 lidí. Ve skutečnosti však to bylo jen 109 případů, protože u dalších 43 případů to nebylo „neuropatologicky“ potvrzeno.

V roce 2005 však přichází na svět teorie další, která by měla tu výše uváděnou-infekční, snad zachránit, zakonzervovat. Zřejmě již na poslední scénu tak přichází pan profesor Alan Colchester z Univerzity v Kentu se svojí dcerou Nancy Colchesterovou, která pracuje na univerzitě ve skotském Edinburghu. Přichází s teorií, která označuje jako prvotní příčinu BSE pohromy zkrmování částí lidských tkání. Jako první zveřejnil tuto kontroverzní

myšlenku špičkový vědecký časopis Lancet. Prakticky současně dopřával na Internetu prostor této myšlence i další prestižní časopis Nature. I Britský denní tisk velmi operativně informuje (RINCON, 1.9.2005) a poukazuje na originální myšlenku o původu BSE z kostí Indů, kdysi dovážených do Británie. Avšak britští státní úředníci (Spongiform Encephalopathy Advisory Committee) již začínají dávat ruce pryč od „infekčnosti MKM“, původem z kostí Indů a nedoporučují již další šíření této hypotézy (SEAC, 19.října 2005), byť i byla vědecky zdůvodněna ve světovém vědeckém časopise.

Dalším významným oponentem v době až „pesimistické euforie“, týkající se původu i přenosu BSE na lidi byl Dr. David R. Brown (Research Fellow, Cambridge University). Ten snad jako jediný z významnějších britských vědců až velmi kriticky a nápadně zpochybňoval vědecké práce o infekčnosti MKM (BROWN, 2001). Nebrání se však diskutovat o stávající vědecké hypotéze protože říká, že; „Možná je skutečně nová varianta CJD u lidí způsobena BSE. Pokud však je příčina jiná a všechny snahy toto prošetřit- zjistit jsou znevažovány až zesměšňovány, potom nebude dosaženo pokroku při prevenci- léčení vCJD; pokud jsou vyzdvihovány jen zázračné výsledky na principu pokus a omyl“. Dále poznamenává, že vědecká metoda jako protiklad „politického nátlaku“ předpokládá, že určitá teorie je ověřována- testována, na základě „nevyvracitelnosti“ důkazů. Za důvěryhodnou může být podporována jen ta teorie, když důkazy teorii oponující jsou porovnávány s tím, co teorii podporuje a když podporující důkazy jsou významnější a věrohodnější než důkazy vyvracející.

Poukazuje na to, že v podstatě veškeré důkazy o přenosnosti BSE na lidi lze od objevu vCJD (1996) najít ve čtyřech publikacích- ve špičkových („high-ranking“) vědeckých časopisech a to na základě experimentů provedených na „myšovitých“ zvířatech (BRUCE et al., 1997; COLLINGE et al., 1996; SCOTT et al., 1999; HILL et al., 1997). Jak se později ukázalo (COLCHESTER et COLCHESTER, 2005), tak měl správné, neblahé tušení o tom, co až vše lze ve vědeckých časopisech napsat a vědecky zdůvodnit, v souvislosti s BSE a vCJD. V téže době však i vědci z jiných „biologických“ oborů byly až zaskočeni troufalostí svých kolegů, týkající se jejich „rafinovaných výmyslů“ publikovaných ve světových „high-ranking“ časopisech. Kdy se zřejmě již nejednalo o vědecké výsledky, zjištěné na principu „pokus a omyl“. Nedávno se příslušná kritika „vědeckého bulváru“ objevila i v našem tisku následovně, cit.: „Jména špičkových vědeckých časopisů jako Science nebo Lancet by měla být zárukou nejvyšší kvality publikovaného výzkumu. Přesto se v lednu 2006 ocitly oba zmíněné časopisy ve velmi nepříjemné situaci, když se články na jejich stránkách ukázaly jako podvod. Časopis Science z tohoto důvodu „vyškrtával“ dva články jihokorejského vědce Woo-Suk Hwanga. Časopis The Lancet se bude muset rozloučit se studií norského lékaře Jona Sudboa, vymyšlenou od základů. Co se děje? Ztrácejí špičkové časopisy na hodnověrnosti a mění se ve „vědecký bulvár“? (PETR, 2006).

Vývoj poznatků o tlumení výskytu a celkově o „testaci BSE“ ve světě

Pokud se týká výskytu BSE v Británii, tak řádově desetitisíce případů BSE za rok začátkem 90.let; poklesly v roce 2001 (United Kingdom) na 1175 případů a v roce 2005 dokonce jen na 224 případů. Avšak i v ostatních evropských zemích se výskyt BSE významně snižuje jako je například Nizozemí a Švýcarsko, kde v roce 2001 bylo zjištěno 20 a 42 případů BSE, resp. a v roce 2005 již jen po třech případech. Podobný trend je v poslední době i ostatních zemích EU. Výjimkou však je ČR (4,7,8 případů) a Polsko (5,11,20 případů; 2003,2004,2005 resp.), kde od roku 2003 dochází k „nárůstu“ výskytu BSE, takže tyto státy potvrzují to, že na nějakou infekci z MKM lze „zapomenout“. A to i z toho důvodu, že se tam MKM kravám nikdy nezkrmovala, protože zejména v Polsku byla kolem roku 1990 velmi nízká užitkovost. Avšak zajímavý je také zvyšující se výskyt BSE v Severní Americe. Ta byla v červenci 2000 uznána (European Union Scientific Steering Committee) při „světovém“ zpracovávání přehledů o možném vlivu britské infekční masokostní moučky (MKM), za zcela

bezpečný světadíl. Avšak počínaje rokem 2002 (květen) bylo až do současné doby zjištěno v Kanadě celkem osm případů BSE. Pokud se týká USA tam však již více stojí za povšimnutí následující skutečnosti.

První případ BSE byl v USA zjištěn 23. prosince 2003. Téhož roku bylo v USA na BSE testováno asi 20 tisíc kusů skotu, přičemž na jatkách tam bylo v roce 2003 odporoženo asi 40 milionů kusů skotu. Takže testováno bylo zanedbatelné množství- okolo 0,05%. Zjištění infikované krávy v Moses Lake (stát Washington), bylo však více méně až „kuriozní“, jak se při této příležitosti uvádělo v americkém tisku. Jednalo se o šestiletou krávu, která byla inspektorem Ministerstva zemědělství USA (USDA) „viditelně označena“ - vzhledem k tomu, že nebyla schopna chůze. To však bylo přičítáno následkům poranění při porodu, což se stalo již před několika lety. Zjevné nervové příznaky BSE však nebyly zjištěny, takže kráva byla posouzena jako požitelná- vhodná pro výživu lidí. Pozapomnělo se však na „označení“ zvířete, takže vzorek na vyšetření BSE byl odebrán- odeslán. Avšak za 13 dní nato bylo oznámeno, že kráva byla BSE pozitivní. Mezitím však maso infikované krávy bylo „zamícháno“ do dalších cca 10 tisíc „poundů“ jiného hovězího masa, které bylo rozesláno do distribuční sítě osmi států USA, jakož i na ostrov Guam...

Inspektoři však i tak měli štěstí, protože po krávě zůstala zachována ušní „plastová značka“, která mnohdy v USA u porážených zvířat chybí. Farmáři tam nemusí dodržovat předpisy o značení zvířat jako tomu je v ČR- nebo se ušní značky ztratí během přesunu zvířat na jatky, jak se lze dočíst z jejich tisku. Avšak již méně šťastné bylo to, že i několik týdnů po zjištění pozitivního výsledku, inspektoři nebyli schopni „dohledat“ a karanténovat více než 80 dalších kusů skotu, který již před lety (stát Alberta, Kanada) dostával stejnou krmnou dávku, jako BSE pozitivní kráva.

Avšak i druhý v USA zjištěný případ BSE (stát Texas) byl rovněž zajímavý. Ne však již tak kuriozní. Maso této nebezpečnými priony „infikované krávy“ si již údajně nedostalo na řeznické pulty v USA. Zástupce USDA 24. června 2005 oznámil, že od britské laboratoře ve Weybridge obdrželi výsledek, potvrzující další výskyt BSE. Zajímavé na tom bylo to, že se jednalo o vzorek nervové tkáně od krávy, která již před sedmi měsíci, v listopadu 2004 byla odporožena (byla však „zablokována pro výživu lidí“). Tato zajímavá testace se vyvíjela následovně; počáteční „screeningový test“ z listopadu 2004 byl „dubiozní“, takže USDA nechalo provést IHC testy. Ty však byly negativní. I tak však bylo provedeno další vyšetření (již 7 měsíců starého vzorku) Western-blot testem, ukazující opět na možnost positivity. Po zaslání vzorku do laboratoře ve Weybridge, byla pozitivita BSE potvrzena.

Nedávno, 13. března 2006 byl u další krávy (stát Alabama) zjištěn a několika testy potvrzen třetí a opět „kuriozní“ případ BSE. V tomto případě však již lze bezpečně vyloučit, že by se maso krávy dostalo do potravního řetězce. Bylo to tím, že příslušná kráva těžce onemocněla, takže místní veterinář provedl euthanázii. Kuriozní však je to, že kráva byla na farmě „zakopána“ a později „exhumována“. Zda byly vzorky nervové tkáně odebrány až po exhumaci krávy nebo ne, lze obtížně z amerického tisku zjistit. V tomto případě zřejmě již nebylo k dispozici „ušní číslo“, protože se lze dočíst, že úředníci pod vedením USDA již obtížněji zjišťovali původ krávy (odkud byla nakoupena, identifikační „ušní číslo“...). Takže „dohledávání“ kohorty zvířat se stejnou krmnou dávkou bude zřejmě ještě zdoluhavější až nemožné, ve srovnání s prvním případem, až v Kanadě nalezeným původem BSE.

V souvislosti s tímto již třetím a jak je zřejmé opět ne zcela bezchybným odhalením jednoho z nejnebezpečnějších infekčních onemocnění přenosného ze zvířat na člověka- rozpoutala se již mohutnější kritika i ze strany prostých američanů. Nevadí jim zřejmě tolik dohledávání původu zvířat jako to, proč oni jako příslušníci státu, který již od roku 1990 disponuje obrovským diagnostickým potenciálem při detekci „šílených krav“- proč mají jíst hovězí

maso, které tam mají na řeznických pultech v podstatě na „BSE nevyšetřeno“. Oproti tomu například čeští řezníci mají u každého prodávaného masa „štítek“ (doklad) o původu (zvířata do 30 měsíců věku) a rovněž o BSE negativním výsledku (skot starší jak 30 měsíců). Takže například v ČR se takto děje již od zjištění prvního případu BSE (červen 2001) a v USA se tak ani zdaleka neděje ani již po více jak dvou letech od zjištění prvního případu BSE. Proč se tak v USA děje, nad tím jsme se již dříve pozastavili (HLÁSNÝ, 2002a). S upozorněním na to, že v USA při až „překotném“ (od roku 1990) ubezpečování obyvatelstva o „kontrolu bezpečnosti“ jejich hovězího masa (například viz Internet), se tam až do konce roku 2001 na BSE testovaly řádově jen „stovky mozků skotu ročně“! Na obhajobu tohoto stavu úřady USDA od roku 2001 uvádějí, že „plošná testace“, je příliš finančně nákladná a tento argument v podstatě uvádějí až do současné doby. Zmíněný úřad však tam má a již od roku 1990 měl mimořádnou podporu u odborníků (vědců), kteří s úředníky USDA naprosto souhlasně informovali veřejnost (médiá, Internet...) o tom, že v USA „lidská forma BSE“ nehrozí (HLÁSNÝ, 2002a). To se nezměnilo ani po tom, když se tam v prosinci 2003 BSE objevila. Něco podobného, když se například v červnu 2001 zjistilo v ČR, mělo naprosto opačný důsledek, navíc mediálně značně zveličovaný. Takže pokud by vláda ČR nerespektovala „mediální šílení“ podporované vědeckými autoritami ČR, tak by zcela určitě padla, pod kritikou opozičních politických stran. Avšak v souvislosti s USA se v některých publikacích dokonce uvádí, že zmíněná „zdrženlivost“ při testaci BSE má v USA nejen ekonomické, ale i politické pozadí (ZIGGERS, 2004). Oproti této zdrženlivosti by tam však mělo být až obrovské „opponentské pozadí“ (dvě Nobelovy ceny za „prionová onemocnění“; američtí lékaři Gajdusek a Prusiner). Takže i vzhledem k jejich obrovské vědecké a diagnostické základně by se mohla vtírat až myšlenka, že v USA již dávno úředníci USDA pochybují o existenci „lidské formy šílených krav“. Jestli však tomu tak skutečně je nebo ne, to by měl ukázat další vývoj situace ohledně výskytu BSE a to jak v USA, tak celkově i ve světě.

Avšak ještě dříve může nastat to, že BSE i v Evropě přestane být „strašákem“ z hlediska „prevence“ přenosu šílení krav na lidi. Je to zřejmé i v ČR, kde se poslední 24.případ BSE (únor 2006) zjištěný v ZOD Lubná u Poličky snad ani neobjevil v našich médiích. A zejména ani to, že v tomtéž podniku byl již dříve, v říjnu 2004 zjištěn 15.případ BSE v ČR. Ani nějak výrazněji nebyl v našich médiích komentován 22.případ BSE (říjen 2005) v ZD Krásná Hora, když u další vrstevnice postižené krávy byl v listopadu 2005 zjištěn 23.případ BSE v ČR. Za rok 2005 tak byl v ČR zaznamenán „rekord“ ve výskytu BSE (celkem 8 případů). V tomto zemědělském podniku bylo utraceno celkem asi 300 krav, pocházejících z jednoho nejkvalitnějších stád krav v ČR, podobně jako v celé řadě dalších chovů v ČR, kde se průměrná užitkovost pohybovala okolo 10 tisíc kilogramů mléka/ks/ rok.

Opakem je například Švýcarsko, které dříve až oplývalo šílenými kravami (2001- 42 případů BSE), mělo v roce 2005 již nižší výskyt BSE (3 případy BSE) nežli tomu bylo v ČR. Je tak dáváno za vzor (podobně jako i Nizozemí...), jak se lze úspěšně vyrovnat s „bývalou infekčností MKM“. Takže se může v dohledné době stát, že bude udělána tzv. „tlustá čára“ a na infekční priony původem z britské MKM či z kostí kolem řeky Ganga pohřbených Indů bude zapomenuto. Avšak strašení lidí (týká se to zejména těch mladších) tím, že i za několik desítek let mohou zemřít na „lidskou formu BSE“, na to zapomenout nelze. Zejména u těch kteří trpí různými depresemi. Pokud se však týká „tvrdé reality“ tak celá „BSE sága“ může skončit již jen neblahou vzpomínkou na obrovské finanční ztráty, s „eradicací BSE“ spojené. Aniž by se v podstatě vědělo, co toho ve skutečnosti bylo příčinou. Ohledně posuzování příčiny BSE tomu tak skutečně je, protože například v Británii, která jako jediná země na světě byla „BSE epidemií“ skutečně postižena- tam vědci (IFST,2004) uvádějí, že pravou příčinu BSE se již zřejmě nikdy nepodaří odhalit. Jako vysvětlení, proč se BSE začala vyskytovat v Británii a to právě v polovině 80.let však udávají to, že tam již začátkem 80.let byla telatům ve „stáří jednoho až dvou týdnů“ zkrmována infekčními priony kontaminovaná MKM...

Interpretace poznatků „nutričního charakteru“ v souvislosti s vývojem výskytu BSE

Z předchozích publikací zveřejněných v ústavním bulletinu „Výzkum v chovu skotu“ (HLÁSNÝ,2001; HLÁSNÝ, 2002a; HLÁSNÝ,2003, 2003a; HLÁSNÝ, 2004, 2004a) a v časopise Komory veterinárních lékařů ČR „Zvěrokruh“ (HLÁSNÝ,2003b,HLÁSNÝ,2004b, 2004c, 2004d, 2004e) však vyplývá, že celý problém týkající se BSE může mít i takovéto pozadí:

1. V Británii došlo k výskytu BSE z toho důvodu, že tam z mnoha důvodů byly v té době (okolo roku 1990), nejpříhodnější podmínky pro dlouhodobější- trvalejší nadbytek bílkovin (při horším zásobení a využitelnosti hořčíku) v krmných dávkách skotu.
2. Stalo se tak v polovině 80.let, protože počínaje rokem 1980 se ve světě začalo s normováním vysoké potřeby bílkovin zejména pro dojené krávy. Začala být normována i potřeba „nedegradovatelných bílkovin“ (rybí, masokostní a jiné živočišné moučky). Tato „papírově evidentní“ změna (v praxi zřejmě jako nepodstatná), byla „unáhleně“ a z neznámých důvodů použita jako příčina BSE. Dalším faktorem bylo to, že koncem 80.let nejen v Británii, ale i v dalších státech Evropy „kulminovala“ vysoká spotřeba NPK hnojiv používaných v zemědělství.
3. V roce 1988 byl v Británii vydán zákaz zkrmování MKM přežvýkavcům, přičemž za pět let poté (1993) se výskyt BSE v Británii začal významně snižovat. Z toho vyplynulo další „unáhlené vědecké“ rozhodnutí a sice prohlášení, že inkubační doba BSE je přibližně pět let. Nutno poznamenat, aniž by byla v době stanovení „BSE diagnózy“ (1988) nebo v době stanovení „inkubační doby“ (1994) provedena do potřebných podrobností depistáž, týkající se odborného posouzení výživy britských krav a dalších souvislostí
4. Významnou souvislostí totiž podle literárních pramenů je to, že v Británii byl a je jako nejčastější píce používán jíllek anglický (*Lolium perenne* L.), známý vysokou schopností příjmu NPK živin a tím i rychlého nárůstu hmoty. V britské literatuře je popisováno, že tento jíllek v Británii obsahoval i více jak 30% bílkovin v sušině hmoty. Při dlouhodobém zkrmování (spásání) této pícniny však je známé i to, že velmi často dochází buď jíž k akutní nebo ke chronické formě hypomagneziemie.
5. Však také i výskyt hypomagneziemie u skotu i ovcí,jako snad největší zdravotní problém tohoto druhu na světě, je rovněž v britské literatuře popisován (zejména již v 60.-70. letech). Výzkum v tomto směru tam byl tehdy na světě nejrozsáhlejší a zabýval se dokonce i tím jak nejlhodněji pícninám dodávat „hořečnaté živiny“. Rovněž tam je i když již ne tak evidentně popisováno to, že začátkem 90.let došlo k významné změně a to k výraznější „suplementaci hořčíku přímo“ do krmných dávek skotu. Tuto skutečnost však není třeba „regionálně“ tolik dokladovat, protože začátkem 90.let to byl celoevropský trend, kdy se výrazně zvýšil obsah hořčíku v minerálních krmných přísadách (MKP)- ve srovnání s roky předchozími. Mám s tím osobní zkušenosti v souvislosti s tím, že jsem i v bývalé ČSFR potřebu (nutnost) dotovat více hořčíku do MKP zjistil (HLÁSNÝ,1989, 1989a; HLÁSNÝ et STEIDL, 1990) a dokonce i obhájil s udělením čs.patentu (HLÁSNÝ, 1991).
6. Takže začátkem 90.let, bylo i v Británii započato s účinnější prevencí hypomagneziemie u skotu. To potvrzují i málo platná opatření se zákazem zkrmovat MKM od roku 1988 (do roku 1993 se výskyt BSE v Británii stále zvyšoval). Až teprve po roce 1993, až se již „více“ rozběhla Mg suplementace prostřednictvím zkrmování MKP skotu, teprve až potom docházelo ke snižování výskytu BSE v Británii. Takže podle takto popisovaného scénáře při vývoji „BSE ságy“ lze zapomenout na nějakou infekci z MKM, jakož i na nějakou „nepředvídatelnou“ inkubační dobu, ještě i v současné době po celém světě některé lidi „strašící“.
7. Pokud by tento scénář měl platit, tak vzhledem k vývoji situace po roce 2000, zůstával ještě jeden „rest“ z 80.let. Jednalo se o vědecké názory z té doby, shrnuté do příslušných norem (ARC, 1980; NRC,1985: NRC,1989...), týkající se toho, že kravám v prvních třech týdnech po porodu bylo normováno 19% bílkovin v sušině krmné dávky. Toto doporučení však bylo často „zprofanováno“ (viz například;

McCULLOUGH, 1994), takže takto vysoký příjem bílkovin byl normován po celou dobu vyšší laktace (šest i více měsíců po porodu). V ČR byla podobná „doporučení“ přenášena v jednom odborném časopise do naší praxe a to dokonce ještě i koncem roku 2002 (takže se nelze divit se v ČR výskyt BSE do konce roku zvyšoval). Popsal jsem dokonce i podrobnosti o tom, jak mně jeden z našich specialistů na krmení krav předal kopii příslušného článku. Jako vysvětlení k tomu proč v jednom z našich BSE postižených chovů uplatňoval téměř 20% bílkovin v sušině krmné dávky krav, po dobu cca 6 měsíců (HLÁSNÝ, 2004e). Přitom však již v lednu 2001 byla vydána a ve světě zveřejněna nová norma (NRC, 2001), ve které již je v prvních týdnech po porodu normováno jen 16% bílkovin. Lze předpokládat, že to budou zejména státy, kde není obvyklé zveřejňovat „odborný bulvár“, že zejména tam se nová norma začala bezprostředně respektovat a v praxi uplatňovat (Švýcarsko, Holandsko...).

Takže na základě tohoto, jakož i vzhledem k tomu, že v Evropských zemích v průběhu 90.let docházelo k poklesu spotřeby NPK hnojiv, dochází počínaje rokem 2003 (v roce 2001 byla v zemích EU zavedena povinná testace na BSE), ke prudkému poklesu ve výskytu BSE, zejména však ve Švýcarsku, Holandsku... Koncem 90.let však byl realizován v Británii experiment, ve kterém se uvádí, že ve snaze „kopírovat“ stávající „západoevropskou praxi“ (příjem nadbytku bílkovin)- bude cílem experimentu vyzkoumat různou úroveň v příjmu bílkovin u krav v posledních týdnech gravidity. Vysokou koncentrací bílkovin (až téměř 20% v sušině) v krmné dávce bylo pokračováno ještě několik měsíců po otelení krav. Když náhle došlo zřejmě ke „značnému údivu“ výzkumníků, protože téměř u 13% do experimentu zapojených krav se „objevila“ BSE! Sled událostí byl zřejmě tak rychlý a neočekávaný, že na tento experimentální poznatek nebylo ve vědeckém časopise „Journal of Dairy Science“ upozorněno (DEWHURST et al.,2000; MOORBY et al., 2000a). Stalo se tak až o dva měsíce později (začátek října 2000) v odborném časopise „The Veterinary Record“ (MOORBY et al.,2000). I to zřejmě přispělo k tomu, že výsledky zmíněného experimentu, nejsou v podstatě ve světové literatuře komentovány. Tímto pokusem však zřejmě skončila éra výzkumníků zabývat se dlouhodobým nadbytkem bílkovin při krmení dojených krav. Podnětem k tomu bylo zveřejnění (leden 2001) nové normy potřeby živin pro dojené krávy(NRC,2001), čímž byl zahájen definitivní pokles výskytu BSE. Vedoucí až k vymizení této snad nejobávanější infekční, nevyléčitelné nemoci, údajně přenosné i na lidi. Nutno však dodat jen v těch zemích a na těch farmách,kde se nová norma začala dodržovat.

Zajímavé souvislosti mezi jíllem anglickým a BSE

Zmíněný pokus lze ve stručnosti popsat tak, že 47 kravám byla během posledních 6 týdnů březosti a následně během 21 týdnů po otelení - zkrmována siláž (ad libitum) z první seče jílku anglického (Perennial ryegrass). Pokus byl zaměřen na zjištění účinku rozdílného obsahu bílkovin v krmné dávce v období vyšší březosti- na biochemické parametry krav v období po otelení, kdy obsah bílkovin v sušině krmné dávky dosahoval téměř 20%. Takováto vysoká koncentrace bílkovin, srovnatelná s potřebou bílkovin u selat či výkrmu brojlerových kuřat byla dosažena přikrmováním krmné směsi s vysokou koncentrací bílkovin. Za 27 týdnů od začátku pokusu, začalo celkem šest krav vykazovat klinické příznaky BSE, což bylo později histologicky potvrzeno. **Takže téměř 13% z pokusných krav bylo postiženo BSE!**

Tento zajímavý výsledek pokusu publikovaný v odborném časopise „The Veterinary Record“ (říjen 2000) ukazující na jistou souvislost mezi jíllem anglickým a BSE- bylo možné podpořit dalším zjištěním ze 60.let minulého století (MASON, 1968). Jednalo se o nervové onemocnění ovcí i skotu („reygrass staggers“), vyskytující se při dlouhodobějším spásání jílku anglického. Tehdy bylo zjištěno, že čím je onemocnění chroničtější, tím větší je

pravděpodobnost výskytu morfologických změn („axonální degenerace“) v CNS, spočívající v poškození výběžků (axony) Purkyňových buněk mozečku. Tyto léze sestávaly z homogenních eosinofilních „zduření“ (swellings) v nervové tkáni. Nebyly „roztrošené“, ale ve „shlucích“, přiléhající k vrstvě Purkyňových buněk. Axonální „torpedoes“ byly jen částečně myelinovány, nečastěji v místech „zduření“; v určitých „torpedoes“ byly zjišťovány „vakuoly“. Opouzdřená myelinem zůstávala jen málo poškozená místa, místa s výraznějším zduřením byla degenerována...

Nervové příznaky však byly pozorovány také i v případech aniž by při „reygrass staggers“ došlo k poškození CNS. Potom však byly klinické příznaky onemocnění (potácivá chůze až tetanické křeče svalstva..), reverzibilní a po zhruba 3 týdnech od převedení na jinou pastvinu se zvířata uzdravila. Nervové příznaky tohoto onemocnění byly pozorovány na Novém Zélandu již od roku 1953, v souvislosti s přechodem zvířat na bujně rostoucí trávy, zejména na jílek anglický (MASON, 1968).

Při onemocnění „reygrass staggers“ však je reálná možnost, že při spásání mladého porostu jílku dochází k hyperamonémii, komplikované dlouhodobější subklinickou hypomagneziemií. Že skutečně k hypomagneziemii při zkrmování této trávy může docházet, to vyplývá například z literárních poznatků shrnutých v knize „Large Animal Internal Medicine“ (SMITH, 1996), přičemž hladina Mg v mozkomíšní tekutině může být i nižší jak 1,45 mg/dl.

Neurodegenerace- neurotoxicita a „NMDA receptor“

Na těchto dvou příkladech je patrné, že by bylo vhodné zabývat se určitým mechanismem, který z hlediska účinku na CNS má něco společného s poruchami metabolismu bílkovin a hořčíku. Případně s metabolismem vápníku, který je úrovní antagonistou hořčíku. Nebo ještě lépe, zda v tomto směru existuje nějaký mechanismus v CNS v podobě určitého receptoru, kde již byla zjištěna nějaká souvislost s „toxicitou prionů“.

Hned úvodem však je třeba uvést, že antagonismus mezi vápníkem (Ca^{2+}) a hořčíkem (Mg^{2+}) - vzhledem k popisovaným neuropatologickým změnám- se odehrává na „buněčné úrovni“. Neurohormonálními mechanismy je hladina Ca^{2+} v buňkách udržována na „stabilní úrovni“. V podstatě na ni za běžných podmínek nemá vliv úroveň Ca^{2+} ve stravě a to jak u lidí tak u zvířat. Je to však nedostatek nebo horší využitelnost Mg^{2+} ze stravy lidí nebo z krmné dávky zvířat, vyvolávající nedostatek **Mg^{2+} ve tkáních (buňkách)**. **Ten je hlavním a „klíčovým faktorem“** při níže popisovaných změnách na buněčné úrovni. Takže hlavním problémem v běžných podmínkách není nadbytek Ca^{2+} ve stravě zvířat a lidí – ale nedostatek Mg^{2+} („Mg- deficit“). Takže jen za „výjimečných okolností“ u lidí při nadbytku Ca^{2+} ve stravě se zvyšují požadavky na vyšší příjem Mg^{2+} . U přežvýkavců však „využitelnost Mg^{2+} “ s nadbytkem Ca^{2+} ve stravě souvisí ještě méně, v podstatě jen v období 2-3 týdny před porodem v souvislosti s „poporodní parézou“. Avšak d a v podstatě ani není v odborné literatuře popisována; protože hlavní a zásadní vliv u nich na využitelnost Mg^{2+} má nadbytek draslíku (K^{+}) v krmné dávce .

Již v letech 1993-97 bylo zjištěno, že toxicita vyvolaná normálním buněčným prion proteinem (PrPC) má jisté souvislosti s funkcí NMDA (N-Methyl- D- Aspartát) receptoru a to v souvislosti s aktivací kanálů vápníku, což vyplývá z následujících literárních pramenů; V roce 1993 (MULLER et al.) inkubovali do buněk kůry mozkové krys infekční prion protein (PrPSc). Bylo konstatováno, že antagonisté komplexu NMDA- receptor kanálu (i) odstraňují infekčním prionem indukované poškození neuronů in vitro (ii) nemají však vliv na vytváření- syntézu PrPSc. V roce 1995 bylo zjištěno, že normální buněčný protein (PrPC) souvisí s regulací hladiny intracelulárního volného Ca^{2+} přes určitou interakci s napětím-

senzitivními Ca-kanály (WHATLEY et al., 1995). Bylo zjištěno, že fragment 106-126 infekčního prion proteinu je nositelem mnoha patologických účinků PrPSc. Tento prion protein fragment přímo stimuluje proliferaci astrocytů, při zvýšené hladině intracelulárního Ca²⁺; přes napětí- senzitivní Ca-kanály (FLORIO et al.1996). Další fragment PrPSc je beta-amyloidní 25-35. Toxicitu obou fragmentů ovlivňuje Ca²⁺ přes napětí- senzitivní Ca-kanály, avšak jen toxicita fragmentu 106-126 má vliv na aktivitu NMDA receptoru (BROWN et al., 1997).

V této souvislosti bylo již v 80. až 90. letech zjištěno, že glutamát jako hlavní excitační neurotransmitter v centrálním nervovém systému (CNS) savců, působí postsynapticky na různé typy receptorů. Jedním z nich je rovněž NMDA receptor. Tento je také velmi důležitý při tzv. „excitotoxicitě“, při které masivní uvolňování glutamátu má za následek „nadměrnou excitaci“ neuronů, vedoucí k poškození až k odúmrti neuronů (CHOI, 1988). Studium této excitotoxicity se již v té době stalo důležitým farmakologickým výzkumem, vzhledem k tomu, že tato se uplatňuje u mnoha akutních neurologických inzultů (například epilepsie), při chronicky probíhajících neurologických poruchách jako je například spongiformní encefalopatie- Huntingtonova nemoc a rovněž i při metabolických poruchách jako je hyperamonémie (CHOI,1988; CHOI et al., 1988; CHOI et ROTHMAN, 1990; LIPTON, 1993).

Amoniak jak je známo, je hlavním činitelem při jaterní encefalopatii. Bylo zjištěno, že akutní toxicita amoniaku je usměrňována aktivací NMDA receptoru. Jedná se však jen o NMDA receptor (podskupina NR1 a NR2), citlivý ke glutamátu (MARCAIDA, 1992). Výzkumníci z této skupiny rovněž zjistili, že proti toxicitě glutamátu lze preventivně zasahovat několika způsoby, mimo jiné i karnitinem (FELIPO et al.,1998). Během hyperamonémie jsou NMDA receptory intenzivně stimulovány, výsledkem je značný příliv Ca²⁺ do neuronů. Jakým způsobem amoniak vyvolává nadměrnou stimulaci NMDA receptoru? Bylo zjištěno, že NH₄⁺ indukuje depolarizaci kortikálních astrocytů v mozku krys (ALLERT et al., 1998). Takto působením NH₄⁺ vyvolaná depolarizace může vyvolat odstranění Mg²⁺ na membráně neuronů, které za normálních okolností blokují kanály NMDA receptoru; což vede k nepřiměřené aktivaci NMDA receptoru (FELIPO et BUTTERWORTH, 2002)._Výše uváděným zjištěním odpovídá i to, že zablokováním NMDA receptoru (blokátorem MK-801), lze působit preventivně proti intoxikaci amoniakem (KOSENKO et al., 1999).

Poslední výzkumné práce ukazují na stále větší význam Mg²⁺; jako antagonisty-blokátora NMDA receptoru (LIPTON, 2004). Je však poukázováno na to, že antagonisté NMDA receptoru jako je memantin, ne vždy vykazují očekávaný účinek. Rovněž například použití Mg²⁺ při léčení akutního infarktu myokardu mívá rozporuplné výsledky (ANTEMAN, 1995; BORZAK et RIDKER, 1995). V této souvislosti se poukazuje na to, že Mg²⁺ jsou potřebné pro acetylcholinem indukovanou relaxaci koronárních arterií (ALTURA and ALTURA, 1987; KU et ANN, 1991), jiné studie však to nepotvrzují (FARAGO et al., 1991). V této souvislosti se nabízí otázka; nesehrává důležitou úlohu účinek nadbytku nebo naopak nedostatku Mg²⁺ oproti Ca²⁺ (v souvislosti s pH) na vegetativní nervstvo, jak již ve 30.letech zjistil profesor Bečka? (HLÁSNÝ, 2000).

Stručný popis funkce NMDA receptoru a návaznosti na glutamát-nejdůležitější excitační neurotransmitter

V souvislosti s tím, že při působení nadbytku bílkovin a současném deficitu hořčíku je zobrazen popis BSE „ammonia-magnesium theory“, kde ústřední úlohu sehrává „dysfunkce“ NMDA receptoru, uvádíme z různých literárních pramenů alespoň následující důležitější informace.

Glutamát (kyselina glutamová) je hlavním excitačním přenašečem (neurotransmitterem) v CNS, takže sehrává rozhodující úlohu při usměrňování excitačního synaptického přenosu. Příslušný celý proces přenosu impulzů znamená to, že mozkové buňky (neurony) mohou mezi sebou navzájem komunikovat. Jeden elektrický impulz v jedné buňce vyvolává příliv Ca^{2+} a následně uvolnění chemického neurotransmitteru (například glutamátu). Ten přechází-difunduje přes malou mezeru ("synaptická štěrbiná") mezi dvěma buňkami (neurony) a stimuluje (nebo inhibuje) následující buňku, interakcí s proteiny receptoru. Specializovanou strukturou umožňující tuto důležitou (vitální) funkci je „synapse“ (dotykové místo), kde se nejčastěji nachází ionotropní receptory glutamátu. Tyto ionotropní receptory sami o sobě jsou „vazebně vstupní iontové kanály“; například při vazbě glutamátu, který byl uvolněn ze sousední buňky, nabité ionty jako Na^+ a Ca^{2+} procházejí kanálem do centra receptorového komplexu. Průtok iontů těmito kanály má za následek depolarizaci plazmy buněčné membrány a vytváření (generování) elektrického proudu který se šíří do výběžků (dendritů a axonů) neuronů nacházejících se na následující pozici (línii).

Jak již bylo řečeno, glutamát je nejdůležitějším excitačním neurotransmitterem v CNS. Na straně druhé však glutamátem usměrňovaný synaptický přenos je značně důležitý z hlediska funkčnosti CNS. Vzhledem k jeho plasticitě na synapsích je glutamátu v CNS přisuzována rozpoznávací funkce jako je učení a paměť. Schopnost CNS rychle přenášet senzoričné informace jakož i komplex motorických (hybných) příkazů z jednoho místa těla na místo jiné a vytvářet myšlení a paměť – to vše je závislé na „mocném excitačním“ neurotransmitteru- na glutamátu. V mozku jsou ještě další excitační neurotransmitery, glutamát je však nejčastěji přítomen a rozšířen. Ve většině neuronů (rovněž i ve glii) je obsažena vysoká koncentrace glutamátu (~10 mM); po oddělení- sekvestraci glutamátu ze „synaptických váček“ se tento velmi rychle uvolňuje (milisekundy), aby tak zajišťoval komunikaci mezi neurony prostřednictvím synaptických zakončení (LIPTON and ROSENBERG, 1994). Oba jak pre-synaptické tak post-synaptické neurony na glutamátové synapsi mají glutamát- korigující systémy, které rychle snižují koncentraci glutamátu.

V synaptické štěrbině se glutamát váže na dva typy receptorů; na ionotropní a metabotropní receptory glutamátu. Skupinu ionotropních receptorů glutamátu tvoří tyto tři hlavní podskupiny receptorů; AMPA, NMDA a Kainát. AMPA receptor (AMPAr) je „transmembránový“ receptor pro glutamát, umožňující rychlé synaptické přenosy v CNS. Jeho název je odvozen od AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), který je specifickým aktivátorem AMPAr. AMPA napodobuje účinek glutamátu. AMPA receptory se nacházejí v mnoha částech mozku a jsou v CNS nejčastěji se vyskytujícími receptory. Skupinu NMDA receptorů tvoří seskupení „podskupin“ NR1 a NR2, jejichž aktivita je nutná pro zachování funkční aktivity kanálů. Pole působnosti vazby glutamátu spočívá ve vazbě na podskupiny NR1 a NR2. Dále potom týkající se glutamátu, fungování NMDA receptoru vyžaduje přítomnost ko-agonisty glycinu. Vazební místo pro glycin se nachází na podskupině NR1. Další podskupinou je NR2B, která umožňuje vazbu na polyaminy (spermin, spermidin), což rovněž jsou „usměrňovači“ funkce NMDA receptoru.

Ze zmíněných kanálů je pro ionty Ca^{2+} dobře přístupný jen iontový kanál náležející ke „klasickému“ NMDA receptoru. Nadměrná aktivace NMDA receptoru má za následek vytváření škodlivých volných radikálů, jakož i dalších enzymatických procesů vyvolávajících odumrtí buněk (LIPTON and ROSENBERG, 1994; LIPTON and NICOTERA, 1998). Při nadbytku glutamátu se spouští proces nazývaný se „excitotoxicita“, vyvolávající poškození neuronů a případně i odumrtí buněk, zejména, když jsou NMDA receptory aktivovány. K této aktivaci dochází při vyšší koncentraci Ca^{2+} přesahující kapacitu buněk a poškozující mitochondrie, což vede k uvolnění cytochromu a k apoptóze

(odúmrti) . Dále to je vliv Ca^{2+} na pro- apoptické nebo na anti-apoptické geny. Na neuronových a gliových membránách jsou „glutamátové přenašeče“ odstraňující nadbytek glutamátu z extracelulárního prostoru , působící tak preventivně proti nahromadění glutamátu (SHIGERI et al., 2004).

Kanál NMDA receptoru je za běžných podmínek synaptického přenosu- blokován ionty Mg a aktivován je jen v krátkých časových intervalech. Avšak za patologických podmínek, vysoký příliv Ca^{2+} do nervových buněk- vyvolává nadměrnou aktivaci receptoru, čímž se spouští celá řada pochodů vedoucích k buněčné nekróze nebo apoptóze (BONFOCO, 1995; DAWSON et al., 1991; DAWSON et al., 1993; LIPTON et al., 1993; TENNETI et al., 1998; YUN et al., 1998; BUDD et al., 2000; OKAMOTO et al., 2002). V souvislosti s excitotoxicitou- odúmrtí buněk- je pozorováno zvýšení aktivity enzymu nitric- oxid- syntetázy (NOS). Neuronová izoforma tohoto enzymu je „fyzicky poutána“ k NMDA receptoru a aktivována přílivem Ca^{2+} přes iontový kanál receptoru. Zvyšující se hladiny oxidu dusnatého (nitric oxide- NO) byly zjištěny u zvířat při neurodegenerativních nemocech. Excitotoxicita podobná apoptóze je zčásti vyvolána nadměrnou stimulací NMDA-glutamát receptoru, kdy NMDA receptor otevírá kanál umožňující tak Ca^{2+} a dalším kationtům vstupovat do buněk.

K navození mechanismu excitotoxicity však není nezbytné zvýšení extracelulárního glutamátu . Dochází k ní dokonce i při normální hladině glutamátu; když se zvyšuje aktivita NMDA receptoru – například když neurony jsou poškozeny a tak se stávají depolarizovanými (více kladně nabitými); za těchto podmínek se zmírňuje normálně působící blokování kanálu Mg^{2+} a tak se abnormálně zvyšuje aktivita NMDA receptoru (ZEEVALK et NICKLAS, 1992).

Když dojde k souběžné vazbě glutamátu a glycinu a buňka je depolarizována odstraněním Mg^{2+} blokáce; kanál NMDA receptoru se otevírá s následným přílivem Ca^{2+} a Na^{+} do buněk (LIPTON, 2004). Energeticky deficitní neurony se stávají depolarizovanými (více kladně nabitými) , protože při nedostatku energie nemohou udržovat iontovou homeostázu ; tato depolarizace zmírňuje- tlumí blokování kanálů NMDA receptoru ionty Mg , protože odpovídající kladný náboj v buňkách odpuzuje kladně nabité ionty Mg v kanálech. Takže během ischemie a při mnoha neurodegenerativních nemocech je zjišťována nadměrná stimulace receptorů glutamátu. Tyto neurodegenerace (Alzheimerova- Parkinsonova- Huntingtonova...nemoci) jsou vyvolávány různými mechanismy avšak společné je to, že při konečném poškození neuronů se uplatňuje nadměrná stimulace receptorů glutamátu, zejména „podskupin“ glutamátu (LIPTON and ROSENBERG, 1994).

Polyaminy mohou inhibovat nebo potencovat NMDA receptory s ohledem na jejich koncentraci (ROCK and MacDONALD, 1992; WILLIAMS, 1997). Při nízké mikromolární koncentraci tyto polyaminy podporují otevírání kanálů dvěma mechanismy a to jako na „glycinu závislé“ a na „glycinu nezávislé“. Při druhém z nich je zvýšená frekvence v otevírání kanálů nezávislá na endogenních agonistech (NMDA kanálů) – glycinu a glutamátu (ROCK and MacDONALD, 1992). Polyaminy však blokují tyto kanály při vyšších koncentracích v závislosti na napětí na kanálech. Avšak in vivo nemohou endogenní polyaminy působit na NMDA receptor v mozku. Je to tím, že tyto polyaminy se nacházejí uvnitř buněk, kdežto NMDA receptor se nachází extracelulárně. Takže polyaminy mají vliv na NMDA receptory jen za patologických podmínek (MUNIR et al., 1993). Endogenním „usměrňovačem“ v tomto směru mohou být Mg^{2+} nebo protony vodíku (pH), protože jejich účinek převyšuje vliv polyaminů (PAOLETTI et al., 1995). Takže aktivita NMDA receptoru

se vyznačuje citlivostí na pH, protože vedle Mg^{2+} jsou důležité i protony vodíku (TRAYNELIS and CULL-CANDY, 1990).

LENZEN et al. (1986) zjišťovali vlivy sperminu na regulaci transportu Ca^{2+} (játra, srdce, mozek). Spermin stimuloval příjem Ca^{2+} do mitochondrií, což bylo inhibováno (tlumeno) Mg^{2+} , způsobem závislým na koncentraci. Takže bylo zjištěno, že polyamin spermin je aktivátorem vstupu Ca^{2+} do mitochondrií a Mg^{2+} se uplatňuje jako antagonist. Tímto mechanismem polyaminy mohou pro mitochondrie představovat důležitého činitele při regulaci koncentrace volného cytoplasmatického Ca^{2+} v buňkách a koncentrace volného Ca^{2+} ve vlastní matrix mitochondrií (LENZEN et al., 1986).

Později však bylo při podobném pokusu (játra, srdce, mozek) zjištěno (LENZEN et al., 1992), že účinek sperminu je dvojitý a je závislý na jeho koncentraci. Pro mitochondrie všech tří tkání byl maximální inhibiční efekt na příjem Ca^{2+} mitochondriemi- při koncentraci sperminu 180 μM a naopak stimulační efekt při koncentraci 50 μM . Ionty Mg měly vliv opačný než spermin a to tak, že v počáteční fázi inhibiční vliv (na vstup Ca^{2+} do mitochondrií) zvyšovaly a v konečné fázi snižovaly.

Při klidovém zůstatkovém membránovém potenciálu jsou NMDA receptory inaktivní. Je to vyvoláno ionty Mg, na napětí závislém vyblokování kanálu, preventivně tak působících proti přílivu iontů (vápníku...). Soustavná, nepřetržitá aktivace AMPA receptorů, například mnohočetnými impulzy přicházejícími na presynaptické zakončení; depolarizuje postsynaptickou buňku (inhibuje kanál) a tak umožňuje aktivaci NMDA receptoru. Přítomnost „subtypu“ receptoru glutamátu číslo dvě (GluR2), působí preventivně proti vstupu Ca^{2+} do celého komplexu AMPA receptoru. Avšak na rozdíl od AMPA receptoru, NMDA receptory jsou dobře prostupné pro Ca^{2+} a rovněž i pro další ionty. Takže aktivace NMDA receptoru má za následek příliv Ca^{2+} do postsynaptických buněk (neuronů), což je rozhodující podnět (signál) pro navození (indukci) na NMDA závislé „dlouhodobé aktivaci“ (long-term potentiation) a dlouhodobé inhibici (long-term depression), přílivu Ca^{2+} do neuronů.

Eliminace amoniaku a syntéza močoviny v játrech

Vysoká intenzita dusíkatého hnojení má za následek zvýšení obsahu dusíkatých látek (bílkovin) v krmných plodinách (v rostlinách obecně), zejména u rostlin v mladší vegetační fázi. Nadbytek bílkovin v krmné dávce přežvýkavců však lze zajistit i zkrmováním různých bílkovinných koncentrátů, přičemž se zvyšuje koncentrace amoniaku v krvi. K tomuto však rovněž dochází i při chronických a akutních onemocněních jater. Snižuje se tak kapacita jaterních buněk k syntéze močoviny (KAISER et al., 1988), zvyšuje se hladina amoniaku v krvi, která je toxická pro CNS. Tato syntéza probíhá během tzv. „ornitinového cyklu“, přičemž je třeba připomenout, že přímým substrátem pro funkci tohoto cyklu je nejen amoniak (ionty NH_4), ale rovněž tak stejným dílem i bikarbonát (ionty HCO_3).

V průběhu ornitinového cyklu se uplatňují dlouhodobé i krátkodobé „neurohormonální regulace“, čímž se umožňují značné změny v přísunu substrátů do tohoto cyklu, avšak při relativně konstantní koncentraci amoniaku. Nejdůležitější při krátkodobé regulaci je vliv enzymu „carbamoyl- fosfatázy“, jehož aktivita závisí na koncentraci „N- acetylglutamátu“ v mitochondriích buněk, bez kterého nemůže enzym působit (MEIJER et al., 1985). Avšak aby mohl působit „N- acetylglutamát“ (spojení s carbamoyl- fosfatázou), je nutné aby v mitochondriích buněk byla také určitá koncentrace iontů hořčíku (MEIJER, 1985). Toto však má zásadní důležitost, protože celková aktivita cyklu močoviny je regulována rozsahem syntézy N-acetylglutamátu, čímž se zahajuje „eliminace“ amoniaku z krve, v průběhu ornitinového cyklu močoviny.

Při zvýšení hladiny glutamátu se zvyšuje i hladina glutaminu v CNS. Metabolismem glutaminu jako intracelulárního „osmolytu“ se reguluje objem astrocytů. Takže při zvýšení hladiny glutaminu dochází k otoku mozku. V játrech se nalézá jak enzym glutamin syntetáza, tak glutamináza, přičemž oba enzymy jsou lokalizovány v rozdílných buněčných segmentech. To zaručuje, že játra mohou být buď producentem nebo „konzumentem“ glutaminu. Rozdílné uložení těchto dvou enzymů umožňuje řídit inkorporaci amoniaku buď do močoviny nebo do glutaminu. Dále potom to umožňuje i odstraňovat amoniak, který nemohl být inkorporován do močoviny a je odstraňován ledvinami. Glutamináza se nachází v těchto buněčných segmentech jako ostatní enzymy „cyklu močoviny“ (včetně glutamát-dehydrogenázy...). Když začne docházet k acidoze, více glutaminu začne přestupovat z jater do ledvin. Tam účinkem glutaminázy se z glutaminu uvolní jeden mol amoniaku s vytvořením glutamátu a potom glutamát dehydrogenáza uvolňuje další mol amoniaku s vytvořením alfa-ketoglutarátu. Amoniak se ionizuje na ammonium (NH_4^+), které je močí vyloučeno- efektem je zvýšení pH v tělních tekutinách. Takže enzym glutamináza má zásadní vliv na přeměnu nadbytečného glutaminu přicházejícího z jater; na ionty ammonia, které jsou vylučovány močí.

Aktivita glutaminázy v játrech krys je významně ovlivňována měnící se koncentrací Mg^{2+} avšak přibližně ve fyziologických rozmezích. Při vyšší koncentraci Mg^{2+} se stimuluje glutamináza tím, že se zvyšuje afinita tohoto enzymu k jeho fosfátové variantě (SZWEDA and ATKINSON, 1990). Aktivita enzymu glutamináza v játrech je aktivována polyaminem spermin. Důkazem je to, že při této aktivaci se zvyšuje produkce glutamátu z glutaminu. Bylo však zjištěno (KOVACEVIC et al., 1995), že účinek sperminu je efektivní jen při fyziologické hladině Mg^{2+} . Autoři předpokládají, že spermin může být fyziologickým aktivátorem jaterní glutaminázy.

Hořčík jako stabilizátor neurochemických funkcí

Centrální nervovou soustavu tvoří mozek, který v úseku prodloužené míchy přechází v míchu. Spojení nervových buněk se uskutečňuje na synapsích (spojeních), což jsou určitá specifická místa v nervové tkáni. Toto spojení je řízeno chemickými substancemi, které se nazývají „neurotransmitery“ (neuromediátory = nervové přenašeče). Podstatou tohoto chemického spojení je to, že elektrický impuls vyvolá sekreci (neuromediátoru) na synapsi, což jako určitý „příkaz“ se přenáší dále – „postsynapticky“. Poprvé byly tyto tzv. postsynaptické potenciály podrobněji objasněny v roce 1953 (ECCLES). Byly popsány dva typy potenciálů: první navozující excitační postsynaptické potenciály (EPSP) při vedení vzruchu, vlivem účinku kationtů, čímž se vyvolává „depolarizace“ membrány. Druhý, navozující inhibiční postsynaptické potenciály (IPSP) při vedení vzruchu, vlivem účinků chloridových aniontů, což obvykle vyvolává „hyperpolarizaci“ membrány nervových buněk.

Tyto elektrické potenciály jsou usměrňovány aminokyselinami a to glutamátem v prvním a gama-aminobutyratem (GABA) a glycinem ve druhém případě, což bylo podrobněji popsáno až v roce 1974 (CURTIS et JOHNSTON). Synaptický přenos je dále usměrňován i receptory (příjemce signálu), které jsou úzce napojeny na příslušné „iontové kanály“. Spojení mediátoru s receptorem má za následek výrazné zvýšení v rychlosti „iontového“ vedení vzruchů.

Důležité z celého mechanismu je to, že „vazba“ (spojení) receptorů a neuromediátorů a iontových kanálů, které jsou v konečném důsledku otevřeny nebo zavřeny, vyvolává elektro-fyziologické odpovědi a změny. Jsou známy dva důležité typy těchto vazeb. V prvním případě může být receptor součástí iontového kanálu, takže „vazba“ vede k určitému přizpůsobení v jejich otevírání. Ve druhém případě (typu vazby) ovlivňuje receptor iontový kanál přes další jinou „bílkovinu“. Když tyto vazebné mechanismy mezi receptory a iontovými kanály byly poznány, vyplynulo z toho, že neurotransmitery účinkují tak, že se

váží na proteiny a tak aktivují (urychlují) nebo zpomalují (blokují) působení elektrického napětí. Nejjednodušším příkladem těchto vazeb je vazba na „G protein“, což bylo poprvé prokázáno na vedení elektrického napětí v atriálních buňkách v srdci (BREITWEISER et SZABO, 1985; PFAFFINGER et al., 1985; YATANI et al., 1987).

Ionty hořčíku mají v činnosti CNS dvě důležité funkce: stabilizují vedení elektrických potenciálů na nervových synapsích a významně se uplatňují při neurochemických, enzymatických funkcích. V „nanomolární“ koncentraci jsou potřebné pro aktivitu „GPT-ázy“ (GILMAN, 1987; HIGASHIJIMA et al., 1987), v „mikromolární“ koncentraci jsou potřebné pro receptory usměrňovanou aktivaci G-proteinů (GILMAN, 1987; GIERSCHIK et al., 1988). V milimolárních koncentracích jsou Mg ionty potřebné k usměrňování: aktivace „G- proteinů“ (HULUME et al., 1983; BIRNBAUMER et al., 1990), napětí na „kanálech vápníku“ (AUGUSTINE et al., 1987) a napětí na iontových kanálech (CRUNELLI et MAYER, 1984; NOWAK et al., 1984), kde je receptorem „N- methyl- D- aspartát“ (NMDA). Je také velmi dobře známý tlumivý (inhibiční) vliv Mg^{2+} na uvolňování neuromediátorů na nervových synapsích (OSBORNE et al., 1991; OKADA et al., 1996, 1998).

Důležitými neuromediátory (NTS) v CNS savců jsou „excitační“ aminokyseliny glutamát a aspartát, které vyvolávají interakce s určitými receptory (MONAGHAN et al., 1989), jichž je známo celkem pět.

Vápník jako antagonist „protektivního“ hořčíku a NMDA receptor

Nejdůležitějším z nich je již zmíněný ionotropní „NMDA receptor“, který také umožňuje permeabilitu Ca^{2+} (FAROOQUI et HORROCKS, 1991). Zvýšená stimulace NMDA receptoru jakož i dalších excitačních receptorů má za následek „neurotoxicitu“ – poškození nervů (McDONALD et al., 1988), při zvýšeném „přlivu“ Ca^{2+} do neuronů (OLNEY, 1989; McMASTER et al., 1991). Bylo však zjištěno, že Mg^{2+} působí jako ochrana proti této „neurodegeneraci“, projevující se konvulzemi u pokusných zvířat (McDONALD et al., 1990; WOLF et al., 1990). Dalším blokátorem NMDA receptoru je například i známé anestetikum ketamin.

Tento „protektivní“ (ochranný) mechanismus Mg^{2+} na NMDA receptor spočívá v tom, že Mg^{2+} vstupují do iontových kanálů a blokují příliv dobře dostupných iontů jako jsou ionty Ca. Dále potom Mg^{2+} „soupeří“ s účinkem Ca^{2+} již v místech „presynaptických“ a tím znemožňují uvolnění příslušných neuromediátorů (NTS) pod vlivem Ca^{2+} . Ionty Mg jsou schopny blokovat NMDA receptor jak intra tak extracelulárně (KUPPER et al., 1998).

NMDA receptor je iontový kanál, který pro své otevírání vyžaduje nejen glutamát, ale rovněž glycin. Přitom „intracelulární nahromadění“ Ca^{2+} je velmi důležité z hlediska glutamátem- navozené neurotoxicity přes NMDA receptor (COLLINGRIDGE et al., 1983; KLECKNER and DINGLELINE, 1988). Takže čím je vyšší koncentrace Ca^{2+} v neuronech, tím je vyšší pravděpodobnost, že se vyvolá ireversibilní ischemické poškození neuronu (EIMERL et SCHRAMM, 1994; CHOI, 1985).

Účinek Mg^{2+} však také závisí na elektrickém potenciálu. Je-li na hyperpolarizované membráně napětí nižší jak -70 mV, potom fyziologická koncentrace Mg^{2+} (v extracelulární tekutině mozku) dostahuje k zabránění přílivu iontů (Ca^{2+}) do kanálů NMDA receptoru a to i v přítomnosti agonistů glutamátu a glycinu. Jakmile však je napětí na buněčné membráně méně negativní nebo dokonce pozitivní, účinek Mg^{2+} se ztrácí a blokování NMDA receptoru není efektivní. Tento na elektrickém napětí závislý účinek Mg^{2+} je „stěžejní“ z hlediska mnoha zajímavých pohledů na funkce NMDA receptoru (NOWAK et al., 1984).

Dalším důležitým endogenním inhibitorem NMDA receptoru je pH. Takže frekvence při otevírání NMDA kanálů začíná být redukována protony při pH okolo hodnoty 7,4. Při pH

na úrovni 6 je aktivace NMDA receptoru téměř kompletně tlumena (TRAYNELIS et al., 1995).

Skot a ovce se liší od ostatních zvířat

Hořčík je živina potřebná pro všechna zvířata, u přežvýkavců je význam Mg^{2+} zvláště kritický. Již fyziologický deficit Mg^{2+} má za následek tetanii, přičemž jsou v podstatě postižena jen zvířata samičího pohlaví, obvykle v časném stádiu laktace (FONTENOT et al. 1989). Bylo také zjištěno, že u starších krav je využitelnost Mg^{2+} významně snížena ve srovnání s kravami mladšími (Van MOSEL, et al. 1990). Zatímco u živočichů s jednoduchým žaludkem je Mg^{2+} vstřebáváno v tenkém střevě, tak u přežvýkavců může být až 80% přijatého Mg^{2+} vstřebáno v batoru (REMOND, et al. 1996). Zásadní význam na využití Mg^{2+} u přežvýkavců má obsah draslíku (K^+) v krmné dávce. V celé řadě experimentů bylo prokázáno, že vysoký obsah K^+ v batorové šťávě významně snižuje vstřebávání Mg^{2+} u dojených krav (FISHER, et al. 1994; KHORASANI et al. 1997; FREDEEN, et al. 1995), u ovcí (GRACE, et al. 1988; YANO, et al. 1990; DALLEY, et al. 1997; WACHIRAPAKORN, et al. 1996) a rovněž u koz (SCHONEWILLE et al. 1997. Kromě zmíněných autorů byly podobné výsledky zjištěny již i dříve, v 70. až 80. letech minulého století.

S účinkem draslíku na absorpci Mg^{+} v batoru, souvisí i koncentrace sodíku v batorové tekutině, jehož nedostatek rovněž snižuje využití Mg^{2+} . Je to tím, že při nedostatku Na^+ se zvyšuje koncentrace K^+ v batoru a rovněž i ve slinách. Výrazným příznakem hypomagneziémie jsou excitace a svalové křeče, úzce korelující s hladinou Mg^{2+} v cerebrospinální tekutině. Hořčík je nepostradatelný pro celou řadu fyziologických a biochemických funkcí. Je však překvapivé, že jeho homeostáza není regulována žádným neurohormonálním mechanismem (MARTENS et SCHWEIGEL, 2000). Rozpustnost solí Mg v batoru významně klesá při pH vyšším jak 6,5. Dochází k tomu zejména u pasoucích se zvířat na mladších pastevních porostech, protože u těch obvykle pozitivně koreluje vyšší obsah draslíku s dusíkem bílkovinné i nebílkovinné povahy (HLÁSNÝ, 1990).

Jedná se obvykle o více NPK přihnojené mladé a bujné porosty, kdy zvířata vylučují i více slin při jejich spásání. Tyto okolnosti potom ve svém komplexu způsobují to, že pH v batoru se zvyšuje a dusík nevyužitý batorovou mikroflorou ke tvorbě vlastní bílkoviny se v podobě amoniaku v batorové tekutině zvyšuje a dostává se tak do krevního oběhu. Amonné ionty (NH_4) při akutním zvýšení hladiny amoniaku v batoru – přímým účinkem působením na membránu buněk sliznice, snižují absorpci Mg^{2+} v batoru (MARTENS et SCHWEIGEL, 2000; URDAZ et al., 2003; FONTENOT et al., 1989). Při zkrmování vyšší dávky zrnin (dojeným kravám) je obvykle pH batorové šťávy nižší jak 6,5 a rozpustnost hořčíku je tak na dobré úrovni. Tím lze vysvětlit to, že při zkrmování (spásání) píce je využitelnost hořčíku horší než při zkrmování zrnin včetně kukuřice.

Při vyšším obsahu dusíku je v pícech i více vyšších mastných kyselin (MAYLAND et al., 1976), čímž se rovněž snižuje využití hořčíku i vápníku u zvířat (tvorba mýdel v zažívadlech). Při nadbytku fosforu v krmné dávce; když jeho koncentrace v batoru je vyšší jak 38 mmol/l, vytváří se nerozpustný fosforečnan hořečnatý amonný, čímž se snižuje využitelnost hořčíku (AXFORD et al., 1982). Tito autoři také zjistili, že k vytvoření této „nerozpustné“ sloučeniny dochází v batoru při pH v rozmezí 6,2 až 7,2- již při koncentraci amoniaku v batoru do 40 mmol/l. Že koncentrace amoniaku v batoru na úrovni 30 až 70 mmol/l jsou běžné, při konzumaci nadbytku hrubého proteinu z mladého travního porostu, bylo prvně popsáno v Británii (MARTENS et RAYSSIGUIER, 1980: publikace „Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants“- England). Avšak i tuk přidávaný (Megalac...) v

nadbytku zejména do TMR dojených krav může reagovat nejen s Ca^{2+} , ale i s ionty Mg^{2+} , což rovněž vede ke tvorbě vápenatých a hořečnatých mýdel a snižuje se tak využitelnost Mg^{2+} (RAHNEMA et al, 1994; PANTOJA et al, 1997). I stres (včetně změn počasí) může být vyvolávajícím faktorem hypomagneziémie, aktivací sympatického nervového systému s uvolněním epinefrinu a snížením Mg^{2+} v krevní plazmě (MARTENS et SCHWEIGEL, 2000; HOFF et al., 1993).

Účinek neuromediátorů na CNS je při Mg -deficitu rozdílný: koncentrace serotoninu v mozku někdy klesá (ESSMAN, 1976; ITOKAWA et al., 1974) nebo se nemění (BARBERAU et al., 1972; ITOKAWA et al., 1972) jindy se zase zvyšuje (BUCK et al., 1979), zatímco dopamin klesá (v nucleus caudatus) u Mg -deficitních psů (BARBEAU et al., 1972), ne však u pokusných krys (BUCK et al., 1979). Přitom nervové příznaky výrazněji nekorelují s hladinou Mg . Avšak u skotu (PAULI et ALLSOP, 1974) a ovcí (MEYER et SCHOLZ, 1972) bylo zjištěno, že při poklesu koncentrace Mg v cerebrospinalní tekutině (CSF), tomuto odpovídají i příznaky „hypomagneziemické“ tetanie. U obou těchto druhů zvířat klesá koncentrace Mg v bederní CSF z normálních 0,9 mmol/l na 0,5 mmol/l (při tetanii), přičemž koncentrace Mg v bederní CSF je ovlivněna hladinou Mg v CSF mozku (OPPELT et al., 1963).

Spongiformní encefalopatie, histologické změny v CNS a souvislosti s amoniakem

Prion protein PrP^{c} je glykoprotein nacházející se na buněčné membráně, zejména na synapsích nervových buněk. Prionové nemoci jsou charakteristické tím, že normální PrP^{c} je nahrazen na proteázu rezistentní izoformou, která je patogenní. Prionové nemoci a jejich patologie se týkají pouze mozku zvířat a lidí. Jiné orgány těla nejsou postiženy. V počátečních stádiích nemoci vznikají **v cytoplasmě nervových buněk (neurony) vakuoly**. S vývojem nemoci se vakuoly zvětšují nervová tkáň se tak stává „houbovitou“ - spongiozní a od toho je název spongiformní encefalopatie. Tento proces se nazývá „**vakuolizace**“. S dalším vývojem nemoci dochází k odúmrti až vymizení neuronů a naopak **gliové buňky (astrocyty) se zvětšují** – tento proces se nazývá „**astrocytóza**“ a mozek tak atrofuje. Obvykle dochází k výrazné atrofii mozečku. Ten se skládá ze granulární a molekulární vrstvy(s mezivrstvou „velkých“ Purkyňových buněk), což je dáno různými typy buněk.

Granulární vrstva obsahuje zejména Golgiho buňky a granulární buňky, kdežto molekulární vrstva obsahuje zejména paralelní vlákna a dendrity Purkyňových a Golgiho buněk. Axonální zduření („swellings“) Purkyňových buněk, jsou také jinak nazývány „torpedoes“. Tyto axonální „torpedoes“ se nacházejí zejména v granulární vrstvě. Na rozdíl od většiny degenerativních změn v mozečku, dochází při prionových onemocněních **ke ztrátě zejména „granulárních neuronů“** než Purkyňových buněk. Ke glióze obvykle dochází v molekulární vrstvě kůry mozečku. V některých případech se „prion protein“ vysráží (precipituje) do formací nazývaných „amyloidní plaky“. Depozice abnormálního (PrP^{Sc}) proteinu probíhá, jak bylo již zmíněno zejména na synapsích. Pokud se týká Creutzfeldt-Jakobovy nemoci, tak zeslabení presynaptických paralelních vláken u dendritů Purkyňových buněk je kardinálním důsledkem abnormálního metabolismu PrP^{c} . Akumulace synaptických proteinů ve vlastním „soma“ a v axonálních „torpedoes“ Purkyňových buněk představuje další poškození axonálního transportu při tomto onemocnění (FERRER, 2002).

Nadbytek čpavku je značně škodlivý pro CNS jak z hlediska metabolismu nervové tkáně, tak neurotransmitterů. **Jaterní encefalopatie (JE)** je soubor obvykle reverzibilních neurologických a psychiatrických příznaků, které vznikají v souvislosti s pokročilým

chronickým onemocněním jater- jaterní insuficiencí nebo při akutním jaterním selhání. JE začínající **akutní jaterní insuficiencí (AJI)** závisí na stupni hyperamonémie. V průběhu posledních 10-20 let bylo zjištěno, že toxicita amoniaku je ovlivněna změnami v regulaci glutamátu jako přenašeče nervových impulzů, které jsou důležité z hlediska patofyziologie JE při AJI. Avšak nejen glutamát, ale i aspartát; obě tyto aminokyseliny se označují jako „excitační aminokyseliny“ (EAA). Když se jejich koncentrace v mozku zvýší, účinkují jako neurotoxin, ničící nervové buňky v mozku. Je známo, že důležité pokusy (průkaz možného přenosu BSE na lidi) s „infekčními bovinními priony“, byly prováděny na zvířatech z řádu „hlodavci“ a podřádu „myšovití“.

Zajímavé v této souvislosti je, že jen u „myšovitých“ (myš, krysa...) a u skotu byla v CNS zjištěna vyšší hladina N-Acetylsuccinimidylglutamátu (asuNAAG), což je cyklická forma peptidu **N-acetylaspartylglutamátu (NAAG)**. Nejvyšší koncentrace (asuNAAG) byly zjištěny u krys v páteřní míše (1.83 +/- 0.15 pmol/mg) a v mozku (1.16 +/- 0.08 pmol/mg, původní hmoty tkáně). Hodnoty (asuNAAG) se progresivně zvyšovaly od 2.týdne do stáří 12 měsíců. U skotu byly zjištěny srovnatelné obsahy (asuNAAG) i (NAAG) v šedé i bílé hmotě CNS (BROVIA et al., 1996). Dále je vhodné připomenout, že v publikaci dostupné na Internetu „Central nervous system, abstracts by animal“ na stránkách (Aging Research Centre, 2006) je jako charakteristika u zvířete „kráva“ uvedeno pouze to, že;“ N-Acetylsuccinimidylglutamát(asuNAAG), což je cyklická forma peptidu **N-acetylaspartylglutamátu (NAAG)** je přítomný v nízkých mikromolárních koncentracích v CNS u myšovitých zvířat a u skotu“.

V této souvislosti byly zjištěny určité podobnosti mezi patologickými změnami v mozku vyvolanými neurotoxicitou excitačních aminokyselin (EAA; asparát a glutamát) a TSE infekcemi (SCALLET et al., 2003). Neurony usměrňující neuroendokrinní funkce hypotalamu a rovněž i Purkyňových buněk v mozečku jsou „společným jmenovatelem“ při poškození mozku jak vlivem EAA toxicity tak TSE infekce. Dále potom jak EAA tak TSE agens vyvolávají astrocytózu. Běžným vyvolávajícím účinkem TSE je „nabubřelost astrocytů“(astrocytóza), které obsahují abnormální prion proteiny (PrPSc). Takovéto „nabubřelé astrocyty“ však jsou rovněž pozorovány při účinku i dalších neurotoxikantů, jakým jsou například EAA. Při počátečních neuropatologických změnách je při scrapii ovčí primárně zjišťováno poškození astrocytů a terminálních zakončení (ne vlastního neuronu) a ne změny spongiformní. Autoři předpokládají, že konečná neuropatologická fáze vyvolaná TSE má hodně společných vlastností s neuronální nekrozou vyvolanou EAA. Přitom autoři připomínají, že rovněž je třeba brát v úvahu i cytoprotektivní vliv antagonistů komplexu kanálu NMDA receptoru jako je memantim (1-amino- 3,5- dimethyladamantan) nebo dizolcipin (SCALLET et al., 2003).

Při celé řadě experimentů při vyvolání akutní jaterní insuficience (AJI) bylo prokázáno, že se zvyšuje koncentrace extracelulárního glutamátu v mozku; avšak nebylo známé jakým mechanismem se tak děje. Jedním z možných vysvětlení je to, že se uplatňuje inhibiční vliv čpavku na transportní systém glutamátu v astrocytech. Bylo zjištěno, že **čpavek inhibuje příjem glutamátu do astrocytů** (CHAN et al., 2000) a má vliv na glutamátový transporter GLT-1 (EAAT-2) v mozku při AJI (KNECHT et al., 1997). Vliv čpavku při glutamerní dysfunkci pozorovaný při jaterní encefalopatii podporuje i to, že při AJI pozitivně koreluje hladiny extracelulárního (ECT) glutamátu v mozku a koncentrace čpavku v krvi (MICHALAK et al., 1996). Dále potom bylo zjištěno, že při léčení AJI dochází ke snižování hladiny glutamátu v ECT mozku, souběžně se snižováním hladiny čpavku v mozku (ROSE et al., 2000). Rychlý vzestup hladiny čpavku má za následek zvýšení pH ve všech buňkách

tělních tkání, včetně astrocytů (MARCAGGI et COPLES,2001). Bylo také zjištěno, že takto vyvolanou „buněčnou alkalizaci“ doprovází zvýšení koncentrace Ca^{2+} v acinárních buňkách (SPEAKE and ELLIOTT, 1998), v endotheliálních buňkách (DANTHULURI et al., 1990), v pituitárních buňkách (SHORTE et al., 1991) a rovněž i v nervových buňkách – neuronech (MIRONOV et LUX, 1993).

Takže hyperamonémie je klíčovým faktorem v patogenezi jaterní insuficience (JI) jakož i při jiných metabolických encefalopatiích. Při akutní JI se zvyšuje hladina čpavku v mozku (nad 5mM), dochází ke zvětšování objemu astrocytů („swelling“) a k poškození funkce glutamátu (glutamerní funkce). Výsledky prací ROSE et al. (2005) ukazují, že při akutním účinku čpavku (majícím za následek alkalizaci cytosolu) dochází v závislosti na Ca^{2+} k uvolňování glutamátu z astrocytů. Tato deregulace glutamátu vyvolaná účinkem čpavku může přispívat k dysfunkci glutamátu pozorované při akutní JI.

Akutní hyperamonémie má za následek změny (poškození) energetického metabolismu v mitochondriích buněk, vyvolané inhibičním účinkem čpavku na enzym alfa- ketoglutarát dehydrogenázu (v cyklu trikarbonových kyselin) a aktivačním účinkem čpavku na NMDA receptor. Antagonisté tohoto receptoru působí preventivně proti čpavkem indukovaným záchvatům (křeče) a mortalitě a rovněž proti změnám v homeostáze mitochondriálního Ca^{2+} a buněčného energetického metabolismu, kdy vyvolávajícím faktorem je hyperamonémie. Tato v akutní fázi má rovněž za následek pokles aktivity enzymů, uplatňujících se při odstraňování volných radikálů (FELIPO et BUTTERWORTH, 2002a). Podle výsledků prací (IZUMI et al.,2005), lze předpokládat, že L-karnitin a antagonisté NMDA receptoru mají stabilizující vliv na zachování nervových funkcí při hyperamonémii.

Spongiformní encefalopatie, histologické změny v CNS a souvislosti s vápníkem- hořčíkem

Mozek obsahuje dva typy buněk. Jsou to vlastní nervové buňky („neurony“) a gliové buňky (glia= „astrocyty“), nacházející se v okolí neuronů. Na jednu buňku neuronu připadá asi deset buněk gliových, což ukazuje na jejich značné prostorové rozložení v centrálním nervovém systému (CNS). Takže neuroglie zabírá zhruba 50% objemu mozku. Ještě zhruba před 10 lety se předpokládalo, že „neuroglia“ jsou jen buňkami podpůrnými a že jen neurony obsahující neurotransmitery (nervové přenašeče) jsou důležité při přenosu nervových impulzů.

Bylo však zjištěno, že astrocyty mají významné biologické funkce. Jednou z nejdůležitějších je vytváření příznivého chemického prostředí pro správnou funkci neuronů, při odstraňování nadbytku kyseliny glutamové („glutamátu“). Proč to je tolik důležité? Je to tím, že glutamát je neurotransmitter, který se může vázat na receptory na membráně neuronů a způsobit tak poškození (spálení) neuronu. Takže glutamát sehrává klíčovou úlohu při neurologických funkcích. Takže vyšší koncentrace glutamátu tlumí funkčnost neuronů až vyvolává jejich předčasnou odúmrtí. Tento fenomén se nazývá „toxicita glutamátu“.

Astrocytóza; toxicita glutamátu uvolněného z astrocytů je závislá na vápníku

Výsledky zjištěné během posledních let jsou základem nového pojetí o fyziologii synaptického přenosu, kdy astrocyty společně s dalšími články sehrávají aktivní úlohu při výměně informací na synapsích (ARAQUE et al., 1999; CARMIGNOTO, 2000; AULD and ROBITABILE, 2003; NEWMAN, 2003). Toto nové pojetí se zakládá na tom, že astrocyty

sehrávají úlohu excitability v souvislosti se změnami intracelulárního Ca^{2+} (PASTI et al., 1997; VERKHRATSKY et al., 1998; HAYDON, 2001; NEDERGAARD et al., 2003) odpovídající uvolnění neurotransmiterů na nervových synapsích (PORTER and McCARTHY, 1996; PASTI et al., 1997; GROSCHE et al., 1999; LATOUR et al., 2001; ARAQUE et al., 2002) a usměrňují- moduluji neuronovou excitabilitu a synaptický přenos uvolňováním neuroaktivních substancí prostřednictvím na Ca^{2+} - závislých mechanismech (ARAQUE et al., 1998a, 1998b; KANG et al., 1998; NEWMAN and ZAHS, 1998; ROBITAILLE, 1998; PARRI et al., 2001; BEATTIE et al., 2002; BROCKHAUS and DEITMER, 2002; NEWMAN, 2003; ZHANG et al., 2003; FIACCO and McCARTHY, 2004; LIU et al., 2004).

Velmi dobře je známa schopnost astrocytů uvolňovat glutamát prostřednictvím na Ca^{2+} - závislém mechanismu (BEZZI et al., 1998, 2004; ARAQUE et al., 2000; PARPURA and HAYDON, 2000; PASTI et al., 2001; ZHANG et al., 2004). Na straně druhé je velmi dobře známa **schopnost většiny neurotransmiterů zvyšovat hladinu Ca^{2+} v astrocytech** (PORTER and McCARTHY, 1997; VERKHRATSKY et al., 1998). **Zvýšení hladiny Ca^{2+} v astrocytech stimuluje uvolňování glutamátu**, který má vliv na presynaptické nebo postsynaptické receptory, usměrňující tak synaptický přenos a neuronální excitabilitu (ARAQUE et al., 1998a, 1998b; KANG et al., 1998; PARRI et al., 2001; PASTI et al., 2001; BROCKHAUS and DEITMER, 2002; FIACCO and McCARTHY, 2004; LIU et al., 2004).

Synaptická regulace intracelulárního Ca^{2+} v astrocytech je velmi důležitá z hlediska vzájemné komunikace mezi astrocyty a neurony. Předpokládá se (PEREA and ARAQUE, 2005), že astrocyty (vzhledem k neuronům) mohou být považovány za důležité „buněčné součásti“ ovlivňované nervovým systémem při zpracování informací.

Neurologové z Iowa State University (PARPURA et al., 1994) zjistili, že **glutamát uvolněný z astrocytů vyvolává zvýšení koncentrace vápníku v neuronech, jeho vazbou na NMDA receptor**. Takže prostřednictvím astrocytů je regulován obsah vápníku v neuronech, v souvislosti na vápníku závislém uvolnění glutamátu z astrocytů. Toto uvolnění může být „spuštěno“ v souvislosti s látkami, stimulující zvýšení Ca^{2+} jako jsou bradykininy (PARPURA et al., 1994), prostaglandiny (BEZZI et al., 1998). Dokonce i pouhé spontánní zvýšení koncentrace Ca^{2+} , má za následek uvolnění glutamátu z astrocytů (PASTI et al., 2001).

Ohledně uvolňování glutamátu z astrocytů však zůstávalo otázkou, zda se jedná o proces v rámci fyziologických nebo patologických stavů v CNS. Jednou z neznámých k zodpovězení této otázky byl nedostatek poznatků o tom, jaká hladina vápníku je k tomu potřebná. PARPURA et HAYDON (2000) zjistili, že uvolňování glutamátu z astrocytů probíhá při fyziologických hladinách intracelulárního Ca^{2+} .

Dalším neurotransmitterem však je rovněž i aminokyselina D-serin. Na rozdíl od dopaminu, serotoninu a dalších známých neurotransmiterů, D-serin není uvolňován (secernován) na zakončeních nervových buněk CNS, avšak z gliových buněk- astrocytů. SNYDER et FERRIS (2000) na základě přesvědčivých výsledků zjistili, že D-serin je klíčovým aktivátorem NMDA receptorů. D-serin až teprve nedávno označený za endogenního „vazače“ glycinového místa (pozice) NMDA receptoru udělal převrat v biologii neurologických věd (SNYDER et FERRIS, 2000). Je to D- aminokyselina syntetizovaná a ukládaná zejména ve gliových buňkách- astrocytech. Uvolněný glutamát působí na receptory astrocytů napojené na synapse uvolňující D-serin a tak se ko-aktivují postsynaptické NMDA receptory s glutamátem. D-serin se vytváří působením enzymu „serine

racemase“ (SR), který převádí (konvertuje) L-serin na D-serin. Inhibitory tohoto enzymu se mohou léčebně uplatňovat v situacích (mozková mrtvice...) kdy dochází ke „glutamátové excitotoxicitě“ (SNYDER and FERRIS, 2000). Tito výzkumníci také zjistili i to, že D-serin a rovněž i enzym „serine racemase“ se koncentrují zejména do astrocytů přilehlých k NMDA receptorům a ne do jiné nervové tkáně.

Do té doby neurologové předpokládali, že NMDA receptory mohou být stimulovány jednoduchým neurotransmitterem- jakým je aminokyselina, kyselina glutamová. Takže jejich výzkumem bylo zjištěno, že oba zmíněné neurotransmitery jsou potřebné ke stimulaci NMDA receptorů. D-serin byl zmíněnými vědci (Baltimore Hopkins University) označen za druhý nejdůležitější, protože při mikroskopickém vyšetření je vidět, že D-serin se nachází na synapsi v blízkosti NMDA receptorů. A dále potom, odstraněním D-serinu a enzymu SR se rychle zastavuje aktivita NMDA receptorů. Další výzkumníci (COOK et al., 2002) zjistili, že pro aktivaci enzymu „serine racemase“ (SR) jsou nezbytné bivalentní kationty vápníku a manganu, a naopak tento enzym inaktivují cheláty jakým je EDTA. Působením Ca^{2+} na astrocyty, jakož i dalšími látkami se vlivem na zvýšení koncentrace intracelulárního Ca^{2+} jako je glutamát nebo kainát- zvyšuje se hladina D-serinu v extracelulárním médiu.

Na základě těchto zjištění se předpokládá, že koncentrace intracelulárního Ca^{2+} má vliv na glutamátem usměrňovanou regulaci aktivity SR (COOK et al., 2002). Astrocyty zajišťují rychlou mezibuněčnou komunikaci prostřednictvím uvolňování chemických neurotransmitterů. Zatím však nebyly dostatečně známy mechanismy a principy jak se to děje. Další výzkumníci (BEZZI et al., 2004) identifikovali určité měchýřkovité seskupení astrocytů (obsahující protein „cellubrevin“), které souvisí s excitotoxicitou glutamátu. Tyto proteiny usměrňují uvolňování glutamátu z astrocytů. Pomocí těchto potom prokázali, že množství uvolněného glutamátu v astrocytech je závislé na Ca^{2+} , za což dříve byla považována místa na synapsích (nervových spojeních).

Zajímavé je zjištění a popis klinických a patoanatomických nálezů při zvýšení hladiny čpavku v CNS (ASBURY et al., 1963; DYCK et al., 1971; FORNO et ALSTON, 1967), kdy bylo zjištěno, že působením amoniaku vznikají:

- primární axonální degenerace se sekundární segmentální demyelinací nervové tkáně
- segmentální ztráty myelinu, které jsou významné z hlediska abnormality „axon cylinder“, což pravděpodobně souvisí s metabolickým poškozením perikarionu...

Podobné axonální degenerace se však v té době (MASON, 1968) zjistily i při déletrvajícím onemocnění ovcí a skotu „reygrass staggers“, při spásání trávy „jílek anglický“ (Lolium perenne), jak již bylo úvodem této studie zmíněno. Většina výše uváděných poznatků z literatury byla známa již do roku 2000, takže jsme je ve „Výzkumu v chovu skotu“ (HLÁSNÝ, 2001) zveřejnili a současně i zpřehlednili (obr.1) v angličtině. Bylo to zřejmě správné rozhodnutí, protože když až na výjimku (HLÁSNÝ, 2002) se k tomuto nerozběhla diskuse ve světě, tak tím již méně se dalo předpokládat, že by tomu tak mohlo být v rámci ČR.

Britští vědci v roce 2004 již „opatrněji“ obhajují infekci původem od MKM

Přenos BSE na lidi se stal a stále ještě je celosvětovým „postrachem“. Na druhé straně však v biologii prionů existuje stále mnoho nezodpovězených otázek, které teprve až v poslední době jsou více konkretizovány (AGUZZI et POLYMENIDOU, 2004; POLYMENIDOU et al., 2005; LADOGANA et al., 2005; SEEGER et al., 2005). V Británii, po zohlednění nejnovějších vědeckých poznatků týkající se BSE, je zveřejňována studie “Information Statement”, pod patronací **The Institute of Food Science and Technology**. **Předposlední studie byla zveřejněna v roce 2001, poslední studie s názvem “BSE a CJD**

u lidí” pochází ze října 2004 (IFST,2004) . Říká se tam, že diskuse týkající se původu a šíření BSE zůstává a pravděpodobně i zůstane nerozřešena. Hned úvodem však je připomínáno známé zjištění, když po zákazu zkrmování masokostní moučky (MKM) v Británii v roce 1988 se tam po pěti letech (1993) výrazně snížil výskyt BSE., což bylo popsáno na základě epidemiologických studií, zejména pod vedením Dr.Wilesmitha. Z toho vyplývající pětiletá inkubační doba pro BSE však již tolik není v “Information Statements“ v říjnu 2004 zdůrazňována.

V této zprávě se autoři již přiklánějí i k tomu názoru, že BSE v Británii vzniklo na základě působení kombinace více „náhodných“ faktorů, které měly za následek rozšíření nemoci. Britská vláda již dříve pověřila “úzkou skupinu” vědců pod vedením profesora Horna, ke prošetření všech vědeckých teorií a poznatků, v zájmu vysvětlit skutečný původ BSE. Na základě vypracované studie “The Report of the BSE Inquiry” se upozorňuje na to, že vznik BSE v Británii byl pravděpodobnější na základě genové mutace již na začátku 70.let u nějaké krávy nebo jiného zvířete, než infekcí přes scrapii od ovcí. Bohužel však ani tento vědecký tým nedospěl k jasnému závěru, týkající se původu BSE. Podal však vysvětlení, proč výskyt BSE začal právě v Británii. Vysvětlení bylo takové, že v určitých případech (**období 1970 až 1980) byla MKM v Británii zkrmována telatům a to již od prvního až druhého týdne věku.** Potom tato skutečnost společně se změnami při zpracování masokostní moučky (MKM) v Británii (“rendering process”), vytvořila příhodné podmínky pro šíření BSE.

Podrobněji je o původu a šíření BSE pojednáno na Internetu pod názvem „Horn Report“ (HORN, 2001), kde se také uvádí celkem 32 různých z odborné literatury známých studií o možném původu BSE.

Švýcarští a další vědci v roce 2005 již „zpochybňují“ MKM jako původce šílení krav i lidí

Vedoucí švýcarského týmu vědců profesor Adriano Aguzzi říká, že od roku 2004 došlo k významnému pokroku v poznacích o infekčním agens, které vyvolává fatální nervové onemocnění jako je BSE a scrapie přežvýkavců a CJD lidí. Mimo jiné **objevy jeho týmu dokazují, že infekční priony lze nalézt i v mléčné žláze ovcí postižených mastitidou** (LIGIOIS et al., 2005). Profesor Aguzzi připomíná, že fyziologické funkce normálního buněčného prionu (PrPC), který za normálních okolností buňky chrání, jsou v podstatě zatím záhadné. Říká, že zatím neznáme jak infekční forma prionového proteinu (strukturálně změněná forma normálního proteinu)- jak dokáže poškodit mozek. Z jeho práce vyplývá, že PrPC proteiny jsou přeměňovány na určitá seskupení (nahromadění) neurotoxické formy, při atakování buněk infekčními prionovými (PrPSc) částicemi. Podle něho se však naskýtá nový pohled na „infekčnost prionů“. Výzkum v tomto směru ukazuje na to, že určitá genetická skupina myší, která má „sekreční formu“ prionového proteinu, nikdy nepodlehne nemoci a to dokonce i když priony v mozku vytvářejí určité shluky-seskupení. Pokud je takováto myš infikována PrPSc, tak u ní nikdy nedochází ke klinickým příznakům prionového onemocnění. Je to docela překvapující, i když jejich mozky byly naplněny plaky PrPSc! – zdůrazňuje profesor AGUZZI (2005). Další důležitou zajímavostí publikovanou v roce 2005 však je i to, že „scrapie prion protein“ (PrPSc) má podle španělských výzkumných prací významné souvislosti s metabolismem vápníku (MOLERES et. VELAYOS, 2005).

Někteří britští vědci mají zájem teorii o infekčnosti MKM „zakonzervovat“

Na straně druhé zřejmě jen málo vědecké dílo bylo zveřejněno v časopise „The Lancet“, v souvislosti s BSE (COLCHESTER et COLCHESTER, 2005). Tito britští výzkumníci poukazují na fakt, že během šedesátých a sedmdesátých let Británie importovala

stovky tisíc tun celých a drcených kostí, včetně kadáverů a zbytků zvířecích těl. Tyto suroviny se v Anglii zpracovávaly na hnojiva a také se využívaly ke krmným účelům. Téměř celá polovina dovozu těchto surovin se uskutečňovala z oblasti Bangladéše. Vědci nyní přichází s myšlenkou, že mezi kosti, jejichž sběr prováděli tamní domorodci, se pravděpodobně dostaly i lidské ostatky. Takže vcelku „jednoduchou vědou“ zveřejněnou však ve špičkovém časopise, bylo možné vyvolat značný rozruch ve světě, týkající se BSE. A ten skutečně nastal. V Británii za odborníky bylo vládním rozhodnutím shrnuto, že tamní vědci se jako celek od zmíněné „pseudovědy“ distancují (viz Internet). Rovněž Indové se ohradili, jako například neurochirurg S.K. Shankar a jeho kolega P. Satishchandra, oba z „Národního ústavu mentálního zdraví a vědecké neurologie“ v Bangalore. Tito mají „jednoduchou odpověď“ pro vědecký časopis „The Lancet“. To by muselo ve stejné době (jako v Británii) dojít k rozšíření BSE u zvířat i lidí také v Indii. To se však nestalo, přičemž na klasickou formu CJD umírá v Indii podstatně méně lidí, nežli je světový průměr.

Nepříliš přesvědčivý je rovněž „vědecký názor“ o tom, že MKM byla v 70. letech v Británii zkrmována telatům a to již od prvního až druhého týdne věku. Jak to je uvedeno v britském „Information Statements“ (IFST, 2004). Ve zmíněném stáří bývají telata velice náchylná k výskytu různých gastrointestinálních poruch, takže v tomto typicky „mléčném období“ by zřejmě při zkrmování MKM- většina telat uhynula. O jaké procento by se jednalo, bylo by zajímavé ověřit pokusem. Podstatně zajímavější a účelnější by však bylo zopakovat vcelku jednoduchý již úvodem zmíněný „britský experiment“. Představovalo by to po dobu minimálně 7 měsíců zkrmovat kravám (průměrná denní dojivost okolo 30 kg mléka) „ad libitum“ jílky anglický a bílkovinným koncentrátem doladit na 20% bílkovin v sušiné krmné dávky. Pokud by byl pokus zopakován „lege artis“, mělo by se BSE u krav „objevit“ v souladu s tím, jak to podporuje celá řada poznatků z vědecké literatury a nakonec i dosavadní 20-letá praxe s výskytem BSE ve světě.

Další britští vědci však zjišťují, že infekčnost MKM je možné „zpochybnit“

Nedávno se však na „místě činu“ a to v samotné Británii zjistilo něco zřejmě až „převratného“, týkající se „infekčnosti prionů“ v přirozených podmínkách. Je to patrné i z toho, že již 30. března 2006 bylo na tento pokus na Internetu upozorňováno, i když příslušný článek v časopise „Journal of Pathology“ (JEFFREY et al., 2006) je zveřejňován až v „květnovém čísle“. Při pokusech, které vědci na ovčích uskutečnili (Skotsko) se potvrdilo, že při injikování prionového proteinu přímo do střeva, je tento skutečně vstřebáván. Na straně druhé však jejich pokusy ukázaly, že to je až nemožné v přirozených podmínkách, kdy se uplatňuje účinek žaludečních šťáv (ze slezu přežvýkavců).

Tyto výsledky byly zjištěny při následujícím pokusu:

1. Do pokusu bylo vybráno 50 ovčí s různou mírou jejich genetické odolnosti ke skrapii, což je typická ovčí prionová choroba. Těmto zdravím ovčím, které se geneticky lišily v míře náchylnosti k onemocnění skrapií, vpravili přímo do tenkého střeva (chirurgickou cestou) „infekční priony“. U všech ovčí došlo ke stejnému vstřebávání prionů přes stěnu střeva. Takže u ovčí s různou odolností vůči infekčním prionům neexistuje žádný „genetický mechanismus“, který by náchylnost ke vstřebávání („infekci“) prionů ve střevě nějakým způsobem podle individuality zvířat usměrňoval.

2. Druhým úkolem pokusu bylo zjistit, kterou cestou se „infekční priony“ ve střevě vstřebávají. Ukázalo se, že tyto rychle procházely ze střevního obsahu do klků střeva přes enterocyty. Takže priony do těla zvířat prostupují jinou cestou, než tomu je v případě běžných infekčních agens (bakterie, viry...), které prostupují do lymfoidní tkáně střeva (přes Payerovy plaky).

3. Během třetí části pokusu Jeffreyův tým „natrávil“ směs obsahující infekční priony pomocí šťáv, které se běžně vyskytují v žaludku (slezu). Takto natrávené priony pak opět aplikovali do tenkého střeva. Při tomto pokusu se však v klíčích žádné infekční priony nezjistily. Aby to ještě upřesnili, tak se o totéž pokusili za pomoci citlivější metody na průkaz prionů (Western Blot Test). Ukázalo se, že z původních molekul PrPSc jich účinkem žaludečních šťáv přežilo jen nepatrné množství. Přitom ve vzorku směsi (mozková tkáň) bylo obsaženo obrovské množství „infekčních prionů“ v porovnání s tím, kolik by jich prakticky vzato mohlo být obsaženo v krmivech u pasoucích se ovcí.

Bylo tedy zjištěno, že:

A/ Neexistuje genetická odolnost či vnímavost ke „prionové infekci“

B/ Při vstřebávání „infekčních prionů“ aplikovaných přímo do střeva se tyto dostávají do těla podobně jako běžné proteiny stravy přes sliznici střeva (enterocyty). Ne však přes lymfatickou tkáň střeva, jako tomu je u běžných „infekčních agens“ (viry, bakterie...)

C/ Pokud však jsou „infekční priony“ v masivní koncentraci již předem vystaveny účinku žaludeční šťávy, tak potom již jen nepatrné množství jich „proniká“ přes sliznici střeva.

To tedy ukazuje na to, že za laboratorních podmínek prionový protein může být přenesen přes stěnu střeva. Avšak současně také bylo prokázáno, že je nepravděpodobné, aby k tomu takto docházelo i v přirozených podmínkách. Takže z pokusu provedeného ve Skotsku vyplynulo, že i když ovce přijme ohromné množství infekčních prionů, tak jsou zažívacím traktu během 48 hodin trvajícím přirozeným enzymatickým trávením, prakticky všechny zničeny. Jinak tedy řečeno, pokusy na ovčích prokázaly, že by tak s konečnou platností měla být vyvrácena „infekční hypotéza“, poukazující na to, že k nakažení skotu došlo v Británii při zkrmování masokostní moučky (MKM).

Avšak nejen tento v poslední době důležitý experiment, ale i celá řada dalších počínaje zejména rokem 2004 začala ukazovat na „trhlíny“ ve stávající vědecké infekční teorii. Již za dva měsíce po zveřejnění výsledků z výše popisovaného pokusu byl v Internetovém deníku „Daily Telegraph“ (30.5.2006) zveřejněn článek s názvem „Skutečně vás to může zabít“? Autorem článku byl vědecký redaktor Roger Highfield, který komentuje několik dalších infekční BSE teorii „odporujících“ výzkumných prací. Přitom hned jako první důkaz k jejímu zpochybnění, předkládá výsledky zmíněného Jeffreyho experimentu s ovci. Připomíná, že již téměř před 10 lety byla udělena Nobelova cena vědci (lékař profesor Prusiner, Univerzita v San Francisku), který měl tak radikální myšlenku, že byla jeho kolegy až zpochybnována. Tato nedůvěra ostatních vědců spočívala zejména v tom, že označil za původce spongiformních onemocnění jako je scrapie ovcí, BSE skotu a vCJD lidí- „infekční prion“ jako zcela nový druh infekčního agens.

Ten však na rozdíl od virů, bakterií a parazitů neobsahuje žádný genetický materiál, takže není možné, aby se priony pomnožovaly. Vědecký redaktor „Telegraphu“ Roger Highfield připomíná i další výsledky výzkumných prací z posledních dvou let, které prokazují, že se profesor Prusiner a další vědci „dokladují hypotézu“ o infekčnosti prionů (masokostní moučky) mohli „pomýlit“. Dokonce je jeden z jeho závěrů ještě důraznější, protože říká, že v současné době, **téměř 10 let od udělení Nobelovy ceny jsou i nadále pochybnosti k jeho hypotéze; v nejlepším případě se jeví jako „nekompletní“ v nejhorším případě dokonce až „nepravdivá“**. Tímto až „konfrontačním sdělením“, které takto snad poprvé bylo „mezinárodně“ zveřejněno, se zřejmě otevírá „bouřlivější diskuse“, ohledně původu a šíření BSE jakož i vCJD.

Závěr a doporučení pro další rozvoj vědy

Z transmisibilních spongiformních onemocnění (TSE) je to pouze BSE která v určité době dosáhla hromadnějšího výskytu a to v podstatě jen v Británii. Z celé řady literárních pramenů však vyplývá, že v Británii byly zhruba od poloviny 80.let ideální podmínky pro výskyt dlouhodobější hyperamonémie vlivem nadbytku bílkovin při nedostatku hořčíku. Na straně druhé nejsou k dispozici žádné dokumenty – na solidním základě vysvětlující původ BSE od masokostní moučky (MKM) zkrmované britským kravám. Objevuje se však až různé „fantazírování“, které by mohlo vypadat až jako komické, pokud by však nebylo bráno vážně některými vědeckými autoritami (viz text v příloze).

V této studii popisovanou „alternativní hypotézu“ o možné patofyziologii astrocytozy charakteristické pro BSE lze zřehlednit následovně;

V počátečních stadiích prionových nemocí vznikají **v cytoplasmě nervových buněk (neuronů) vakuoly**. S vývojem nemoci se vakuoly zvětšují, nervová tkáň se tak stává „houbovitou“- spongiozní a od toho je název spongiformní encefalopatie. Tento proces se nazývá „**vakuolizace**“. S dalším vývojem nemoci dochází k odúmrti až vymizení neuronů a naopak **gliové buňky (astrocyty) se zvětšují** – tento proces se nazývá „**astrocytóza**“ a mozek tak atrofuje.

Z hlediska účinku vápníku- hořčíku a amoniaku vyplývají tyto vztahy;

Účinek Ca²⁺ (Mg-deficitu) na astrocytozu- přes fragment „infekčního prionu“

- funkce normálního buněčného proteinu (PrPC) souvisí s regulací hladiny intracelulárního volného Ca²⁺, přes určitou interakci s napětím- senzitivními Ca-kanály
- polyamin spermin je aktivátorem vstupu Ca²⁺ do buněk, Mg²⁺ se uplatňuje jako antagonisté
- účinek sperminu však je dvojnásobný a je závislý na jeho koncentraci; při vyšší koncentraci sperminu je zjišťován inhibiční (tlumivý) vliv na vstup Ca²⁺ do buněk a naopak stimulační efekt je zjišťován při jeho nižší koncentraci
- při zvýšené hladině intracelulárního Ca²⁺; fragment 106-126 infekčního prion proteinu (PrPSc) přímo stimuluje proliferaci astrocytů,; přes na napětí- senzitivní Ca-kanály.
- toxicita fragmentu 106-126 má vliv na aktivitu NMDA receptoru, který je velmi důležitý při tzv.“excitotoxicitě“, při které masivní uvolňování glutamátu má za následek „nadměrnou excitaci“ neuronů, vedoucí k poškození až k odúmrti neuronů.
- antagonisté komplexu kanálů NMDA- receptoru odstraňují infekčním prionem indukované poškození neuronů.

Účinek amoniaku při aktivaci NMDA receptoru – přes „aktivaci glutamátu“

- astrocyty mají významné biologické funkce, jednou z nejdůležitějších je vytváření příznivého chemického prostředí pro správnou funkci neuronů, při odstraňování nadbytku kyseliny glutamové („glutamátu“)
- je to důležité z toho důvodu, že glutamát je neurotransmitter, který se může vázat na NMDA receptory na membráně neuronů a způsobit tak poškození neuronu
- při hyperamonémii, která je nejčastější příčinou jaterní insuficience se zvyšuje koncentrace extracelulárního glutamátu v mozku, protože amoniak **inhibuje příjem glutamátu do astrocytů**

- při nadbytku glutamátu se spouští proces nazývaný se „excitotoxicita“ (toxicita glutamátu), vyvolávající poškození neuronů a případně i odúmrtí buněk, zejména, když jsou NMDA receptory aktivovány
- k aktivaci excitotoxicity dochází při vyšší koncentraci Ca^{2+} přesahující kapacitu buněk a poškozující mitochondrie, což vede k uvolnění cytochromu a k apoptóze (odúmrti)
- glutamát uvolněný z astrocytů vyvolává zvýšení koncentrace vápníku v neuronech a váže se na NMDA receptor.
- takže prostřednictvím astrocytů je regulován obsah Ca^{2+} v neuronech, v souvislosti na Ca^{2+} závislém uvolnění glutamátu z astrocytů.

Účinek amoniaku při aktivaci NMDA receptoru – přes inhibici vlivu Mg^{2+}

- ionty amoniaku (NH_4) indukují depolarizaci kortikálních astrocytů v mozku
- takto působením amoniaku (NH_4^+) vyvolaná depolarizace snižuje účinek Mg^{2+} na membráně neuronů, které jsou antagonisté komplexu NMDA-receptoru a tak za normálních okolností blokuje kanály NMDA receptoru
- výsledkem této depolarizace je značný příliv Ca^{2+} do neuronů, což vede k nepřiměřené aktivaci NMDA receptoru.
- hyperamonémie vyvolává „buněčnou alkalizaci“, kterou doprovází zvýšení koncentrace Ca^{2+} v buňkách včetně neuronů

Účinek Mg^{2+} při tlumení hyperamonémie – přes „cyklus močoviny“

- Mg^{2+} mají vliv již na „začlenění“ amoniaku do „ornitinového cyklu“ močoviny, čímž se omezuje zvýšení hladiny amoniaku v krvi a v buňkách tkání
- je to tím, že při „neurohormonální regulace“ tohoto cyklu je důležitý vliv enzymu „carbamoyl- fosfatázy“, jehož aktivita závisí na koncentraci „N- acetylglutamátu“ v mitochondriích buněk, bez kterého nemůže enzym působit
- avšak aby mohl působit „N- acetylglutamát“ (spojení s carbamoyl- fosfatázou), je nutné aby v mitochondriích buněk byla také určitá koncentrace iontů hořčíku
- toto však má zásadní důležitost, protože celková aktivita cyklu močoviny je regulována rozsahem syntézy N-acetylglutamátu, čímž se zahajuje „eliminace“ amoniaku z krve, v průběhu ornitinového cyklu močoviny.
- zejména u přežvýkavců z přirozených důvodů (vstřebávání Mg^{2+} již v batoru, ve kterém bývá i nadbytek alkalogenního prvku draslíku a současně i rychlé uvolňování amoniaku v batoru z lehce degradovatelných dusíkem „přehnojených pícein...) je výše uváděný vliv Mg^{2+} i tímto způsobem již v batoru oslabován a dochází k „hyperamonémii“
- druhou možností jak vyvolat hyperamonémi je zkrmování vysokého obsahu bílkovin (okolo 20% v sušině krmné dávky) původem z bílkovinných koncentrátů (extrahované šroty olejnin...), což pro přežvýkavce není „přirozené“

Účinek Mg^{2+} při tlumení hyperamonémie- přes metabolismus glutaminu

- metabolismem glutaminu jako intracelulárního „osmolytu“ se **reguluje objem astrocytů**, při zvýšení hladiny glutaminu dochází k otoku mozku.
- enzym glutamináza má zásadní vliv na přeměnu nadbytečného glutaminu přicházejícího z jater; na ionty ammonia, které jsou vylučovány močí.
- aktivita glutaminázy v játrech je významně ovlivňována měnící se koncentrací Mg^{2+} avšak přibližně ve fyziologických rozmezech.
- při vyšší koncentraci Mg^{2+} se stimuluje glutamináza tím, že se zvyšuje afinita tohoto enzymu k jeho fosfátové variantě
- aktivita enzymu glutamináza v játrech je také aktivována polyaminem spermin, jeho účinek však je efektivní jen při fyziologické hladině Mg^{2+} .

Z výše uvedeného vyplývá, že zvýšená stimulace NMDA receptoru, jakož i dalších excitačních receptorů má za následek „neurotoxicitu“ – poškození nervů, při zvýšeném přílivu Ca^{2+} do neuronů. Přitom fyziologická hladina Mg^{2+} působí jako ochrana proti této „neurodegeneraci“ a vyšší hladina amoniaku v buňkách nervové tkáně tuto neurodegeneraci vyvolává. Uplatnění vlivu Mg^{2+} se však vytrácí při depolarizaci (při nadbytku bílkovin a nedostatku energie) - když elektrické napětí na buněčné membráně je méně negativní nebo dokonce pozitivní, takže blokování NMDA receptoru není efektivní. Tento na elektrickém napětí závislý účinek Mg^{2+} je v literatuře považován za „stěžejní“, z hlediska mnoha zajímavých pohledů na funkce NMDA receptorů.

Od vzniku BSE v Británii již uplynulo 20 let. Během této doby nebylo žádným exaktním pokusem ani pozorováním v podmínkách praxe potvrzeno, že BSE vznikla po zkrmování masokostní moučky (MKM). Tato však je přežvýkavci velmi špatně přijímána. Například volně žijící přežvýkavci (vysoká zvěř) ji nepřijímají ani když by měli hladem uhynout. U domácího hospodářsky chovaného skotu (krávy...) je třeba určitý „postupný návyk“ na dosažení určitého příjmu - pro tato zvířata „zapáchajícího krmiva“. Takže například není možné jeden den- týden... MKM krávám zkrmovat, potom zase ne atd. To by byl „sedlák bez mléka“ a brzy by zkrachoval. Protože i bez nějakého vědeckého poznání velmi dobře ví, že má-li kráva hodně mléka nadojit, musí pravidelně a co nejvíce kvalitního krmiva pozřít.. Neboli jinak řečeno, sedlák- farmář musí vědět, zda je- byla či nebyla MKM při krmení krav použita. To bohužel britští farmáři v době vzniku BSE nevěděli, jak vyplývá z výpovědi při sepisování dokumentu o původu BSE v Británii „The BSE Inquiry“ (2000) (www.bseinquiry.gov.uk/files/ws/s047.pdf). Navíc potom ti co prionové nemoci zkoumají (lékaři, biologové...) se zřejmě nikdy blíže neseznamovali s tím, co se „mlsným vysokoužitkovým kravám“ může a nemůže krmit. Jedním takovým konkrétním příkladem může být úryvek z textu od jednoho českého vědce (viz příloha 1), ve kterém se 28.10. 2002 říká následující (<http://www.osel.cz/index.php?clanek=125>);

„Nejvíce případů (BSE) se objevovalo na mléčných farmách v jižní Anglii, tedy v oblasti, kde jsou krávy chovány na mléko. **Chudší oblasti severní Anglie a Skotska byly nemocí šilených krav postiženy podstatně menší měrou...** Nízká cena masokostní moučky přivedla do pokušení i chovatele vynikajících dojnic, aby tuto „**bílkovinnou bombu**“ nabídli svým svěřenkyňám. **Krávy začaly žrát maso a žraly je dlouhá desetiletí bez toho**, že by to někomu připadalo divné nebo že by proti tomu dokonce někdo hlasitěji protestoval.“- konec citátu. Takže pokud si takovýto vědecko- populární článek přečte nějaký laik, tak ho začne jímat hrůza z toho, že dokonce již celá desetiletí si pochutnával na mléčných výrobcích od

krav, které snad i „plnou tlamou“ si pochutnávali na výrobcích původem z mršín... Naštěstí však tato zvířata mají rozum, takže nic takového nejenže nežerou, ale „trhají až řetězy“, pokud by se jim takovéto maso nějaký „odborník- výzkumník“ snažil jen ukazovat. Své by si zřejmě k tomuto mohli říct příslušní praktici, kteří se měli možnost setkat s tím, kdy například byla kravám „omylem zkrmována“ krmná směs vyrobená pro výkrm kuřat, obsahující MKM.

Naopak však BSE byla experimentálně u dojených krav zjištěna, při zkrmování nadbytkem bílkovin. Za takové situace, zejména v souvislosti se zkrmováním trav (jílek anglický...), dochází zejména u přežvýkavců k nedostatku hořčíku (Mg). Za podobné situace byly již v 60. letech minulého století zjištěny ireverzibilní degenerativní změny v mozku ovcí i skotu. Z literatury 80. až 90. let je známo, že při nadměrné aktivaci NMDA receptorů vápníkem (neboli při deficitu Mg) a amoniakem (při nadbytku bílkovin) dochází k excitotoxicitě a degenerativním změnám v nervové tkáni.

V tomto směru, v souladu s příslušnými literárními údaji, byla ve VÚCHS s.r.o., Rapotín vypracována a v březnu 2001 publikována „alternativní teorie“ o možném vzniku BSE na zmíněném principu. Text z této publikace byl přetištěn do mezinárodního vědecko-odborného časopisu „Feed Mix“ a zveřejněn dne 10.6.2002. Ještě v současné době lze na Internetu (<http://www.agriworld.nl/feedmix/headlines.asp?issue=3>) k tomuto problému následující: „ We may believe that in banning MBM from ruminant diets, the BSE battle has been fought and won. Czech veterinarian Josef Hlásný thinks that we would be mistaken in that belief. His research has taken him down a very different route“ (další úryvek k tomuto textu- viz příloha 2). Takže již před zhruba 5 měsíci před fantazírováním o krmení krav v českých médiích se ve světovém tisku objevilo „opačné nakládání“ s vědeckými fakty o tom, jak až „šílená může být myšlenka o účinku MKM“ na zdraví krav.

Od té doby nastal značný pokrok ve výzkumu funkce NMDA receptorů, na jedné straně a na straně druhé je zejména v poslední době „infekčnost prionů“ již i vědecky zpochybňována. Nabízí se tedy otázka; proč nezopakovat zmíněný experiment (MOORBY et al., 2000)? A případně tak prokázat, že příčinou BSE i ostatních transmisibilních spongiformních encefalopatií (TSE) je metabolická porucha.

PŘÍLOHA 1 (<http://www.osel.cz/index.php?clanek=125>)

....Šlechtění na odolnost vůči prionovým chorobám by tedy mohlo přinést kýžený výsledek. Na druhé straně se ale někteří odborníci obávají, že u odolných zvířat sice nepropukne onemocnění, ale priony tím z jejich těl nezmizí. Tato zvířata by pak působila jako jacísi „priononosiči“. Není také jisté, nakolik budou tato odolnější zvířata v budoucnu vzdorovat novým typům prionům. To ale nic nemění na faktu, že se před námi rýsuje zatím nejnadějnější cesta ke zvládnutí prionových chorob u hospodářských zvířat a vyloučení rizika nákazy lidí zvířecími priony. Předběžné zkušenosti z pokusných britských stád naznačují, že výběrem beranů odolných vůči skrapii lze snížit výskyt choroby ve skrapii promořeném ovčím stádu na velmi nízkou úroveň. I tady je ale třeba vyvarovat se unáhlených závěrů. V některých pokusech byly nakaženy skrapii i ovce, které měly být díky své variantě genu pro prionový protein odolné. Vnímavé ovce uhynuly na skrapii zhruba za čtyři měsíce po umělé infekci priony skrapie. „Odolné“ ovce uhynuly za dva a půl roku. I tady se ukazuje, že geny pro „odolnost“ vůči prionům

mohou pouze prodlužovat inkubační dobu prionového onemocnění. Bovinní spongiformní encefalopatie – BSE („nemoc šílených krav“) Počátky choroby zřejmě spadají do sedmdesátých let 20. století. Toto je datum natolik čerstvé, že by bylo velice překvapivé, kdyby ve vzniku BSE neměl prsty člověk. Nejvíce případů se objevovalo na mléčných farmách v jižní Anglii, tedy v oblasti, kde jsou krávy chovány na mléko. Chudší oblasti severní Anglie a Skotska byly nemocí šílených krav postiženy podstatně menší měrou. Už to něco naznačovalo.

Krávy z jihu Anglie byly velmi vydatně živeny a dostávaly krmiva, která byly na chudém severu vzácností.

Dnešní dojnice jsou živé továrny na mléko. Jejich organismus je vystaven zátěži, která snese srovnání s nároky kladenými na tělo trénovaného špičkového profesionálního sportovce při vrcholném výkonu. A jako nemůže špičkový sportovec podávat vrcholné výkony poté, co schroupal suchou chlebovou kůrku, nemůže ani současná špičková dojnice nadojit denně několik konví mléka plného tuku, bílkovin a minerálů jen z věchtu slámy. Její bachor má sice objem desítek litrů, ale potřebná energie a živiny ve formě chudé píce by se do něj prostě nevešla. Musí proto dostat potravu, která v malém objemu soustředí co nejvíce živin. I když divocí tuři žerou v přírodě především „zelené“ tedy traviny, různé byliny, listí nebo dokonce jehličí stromů, jejich zdomácnělí potomci dostávají pro pokrytí spotřeby energie šroty z mletého zrní. Některé kravské rekordmanky ale nenacházejí v takové dietě dost bílkovin. To by bylo jistě možné ohnat třeba sójou nebo hrachem, ale bylo by to dost drahé.

Už ve dvacátých letech dvacátého století dostali Angličané geniální nápad, kterým zabili hned dvě mouchy jednou ranou. Zbavili se nepříjemného odpadu a získali vydatný zdroj bílkovin pro hospodářská zvířata. Tím „zázrakem“ byla tzv. masokostní moučka vyráběná z těl uhynulých nebo utracených zvířat, z odpadů vznikajících při porážce zvířat na jatkách a dalšího živočišného „harampádí“.

Když se mršiny „povaří“ v zařízení, které není ve svém principu ničím jiným než obřím Papinovým hrncem, zničí se v něm všechny choroboplodné zárodky. To je dost důležité, protože v mrtvém zvířeti může číhat řada mikroskopických zabijáků, například původce tzv. sněti slezinné čili antraxu. Právě kvůli tomuto dříve relativně hojnému onemocnění, kterým se může smrtelně nakazit i člověk, byly mršiny ohřívány na poměrně vysokou teplotu (nad 130°C) při zvýšeném tlaku (3 bary) a pod dobu nejméně 20 minut. Vzniklá masokostní moučka byla jako zdroj bílkovin přidávána do krmiva drůbeže nebo prasat. To jsou od přírody všežravci, a tak nebylo „maso“ v jejich dietě ničím nepřírodním. Nízká cena masokostní moučky přivedla do pokušení i chovatele vynikajících dojnic, aby tuto „bílkovinnou bombu“ nabídli svým svěrenkyním. Krávy začaly žrát maso a žraly je dlouhá desetiletí bez toho, že by to někomu připadalo divné nebo že by proti tomu dokonce někdo hlasitěji protestoval.

Postupem času se stal antrax a další nebezpečné choroby vzácností a důkladné tepelné zpracování mršin a jatečních opadů už se nezdálo nutné. V sedmdesátých letech navíc postihla svět ropná krize, když si arabské země vyvázející ropu postavily hlavu, omezily těžbu ropy a vyhnaly ceny této suroviny do nebeských výšin. Svět šetřil energií a spořit se rozhodli i výrobci masokostní moučky. Většina běžných mikroorganismů hyne při nižších teplotách, než jaké jsou zapotřebí ke zvládnutí bacilu sněti slezinné. A tak se živočišné odpady začaly zahřívat jen na teploty nepřesahující 100 °C. Je zřejmé, že na zničení prionů tahle teplota nestačila.

Jedna velká skupina expertů je přesvědčena, že se priony dostaly do nedostatečně zahřívaných masokostních mouček z ovcí uhynulých na skrapii. První zmínky o skrapii pocházejí právě z Británie a jsou z roku 1732. Choroba ovcí tu má ale zřejmě podstatně hlubší kořeny. Na skot ovcí priony nikdy předtím nepřeskočily. První příležitost k tomu

dostaly už ve dvacátých letech dvacátého století, když začali farmáři svým kravám „přilepšovat“ masokostní moučkou. Do té se dostávaly i těla uhynulých ovcí a mezi nimi zcela jistě i ovce uhynulé na skrapii. Odhaduje se, že ročně zahubí tato nemoc ve Velké Británii asi 4 000 ovcí. Většina jich skončila ve výrobnách masokostní moučky, které se v sedmdesátých letech začaly vyrábět za podmínek nedostačujících k likvidaci prionů. Druhá velká skupina expertů viní ze vzniku BSE priony skotu. Zastánci této „hovězí teorie“ předpokládají, že nejprve musely vzniknout v těle některých kusů skotu priony zcela spontánně, například mutací příslušného genu. V těle krávy s poškozeným genem mohlo dojít ke zcela samovolnému vzniku prionů. Když pak toto zvíře pošlo nebo muselo být zabito pro chatrné zdraví, dostalo se jeho tělo do masokostní moučky, kterou byly nakrmeny další krávy. V jejich těle se priony namnožily, a všechno se opakovalo. Krávy uhynuly nebo byly utraceny a následně byly jejich mršiny rozvařeny na masokostní moučku. Nikdo si ničeho nevšiml, protože případy „kravského šílenství“ nemusely mít z počátku příliš dramatický průběh. Jako časovaná bomba se priony šířily chlévy a stájemi britských farmářů. Všechno prasklo teprve ve chvíli, když byl veterinář Colin Whitaker pozván k případu krávy, která se „zbláznila“. Ale to už bylo na zvládnutí kalamity pozdě. Prionová epidemie byla až příliš rozjetá.

Zastánci „hovězí teorie“ nevěří, že se na vzniku BSE nějak významně podílela změna technologie výroby masokostní moučky. Podle nich „přežívají“ priony vysokoteplotní zpracování živočišného odpadu a jsou přesvědčeni, že i před ropnou krizí přeživaly ovčí priony výrobu masokostní moučky. Nic se ale nedělo, protože ovčími priony se krávy nakazit nemohly. Teprve s objevením hovězích prionů mohla masokostní moučka přispět k jejich rozšíření.

Tato „hovězí teorie“ je sympatická řadě britských čelních představitelů. Mají k tomu hned několik důvodů. Pokud by se prokázala její platnost, byli by z obliga. Za mutaci nikdo nemůže. Ta mohla postihnout skot stejně tak v Německu, ve Francii nebo v Nizozemí. Kdekoli. A snížení teplot při výrobě masokostní moučky jim také nemůže nikdo vyčítat, Novozélandský tým vědců vedených Rogerem Morrisem z Massey University je přesvědčen, že zdroj prionů musíme hledat mimo Velkou Británii, dokonce až v afrických savanách. Morris podrobil údaje o šíření BSE v Británii analýze pomocí nejnovějších počítačových modelů. Pokaždé mu vycházela jako nejpravděpodobnější zdroj prionů divoká zvířata a nikoli ovce nakažené skrapii nebo krávy stížené mutací. Když se Morris zaměřil na vytypování konkrétního druhu divokých zvířat, vyšly mu jako ideální kandidáti antilopy, které byly v sedmdesátých letech dovezeny do Anglie z Afriky. Zvířata byla chována v některých safari parcích. Nikdo tehdy netušil, že si s sebou přivezla ze své africké domoviny prionovou chorobu, která jim „rozežírала“ nervovou soustavu. Když antilopy uhynuly, nikdo nic zlého netušil. Každý se domníval, že cizokrajná zvířata nenašla ve studeném a vlhkém britském klimatu ty nejlepší podmínky a podlehla jim. Novozélandčané tvrdí, že přinejmenším částí těl uhynulých antilop se musely dostat do krmiv pro skot. Snad byly zpracována na masokostní moučku, snad se tam dostaly jinou, zatím neznámou cestou.

Tato teorie je považována za „alternativní“ a zastává ji kromě Morrise už jen malá hrstka odborníků. Jiných a podstatně divočejších alternativních teorií vzniku BSE najdeme celou řadu. Některé viní ze vzniku BSE igelitové pytle používané v zemědělství, jiné v ní vidí chorobu vyvolanou zárodky, které na Zemi přicestovaly z vesmíru. To už jsou ale jen fantazie nepodepřené vědeckými důkazy. Nemoc chronického vyčerpání (chronic wasting disease –CWD) Podobně jako u řady jiných infekčních chorob není ani v případě této „nemoci šílených jelenů“ jasné, kde máme hledat její kořeny. **Nikdo neví a asi se jen tak nedozví, a dlouho**

severoamerická vysoká zvěř chorobou trpí. Poprvé se o ní veterináři dozvěděli v roce 1961...

PŘÍLOHA 2 (<http://www.agriworld.nl/feedmix/headlines.asp?issue=3>)

*The biology of prions represents a fascinating and poorly understood phenomenon. **Can not see the wood for the trees? It is hardly surprizing that some of the more viable propositions were not heard, given the sheer number of BSE hypotheses put forward...“.***

Feeding contaminated meat and bone meal to British cattle was the cause of the BSE epidemic which raged through Europe in the 1980's and 90's. Or so we are led to believe. Research into the active agents of TSE's, long tangled protein molecules called prions is still underway. But did the desire to find a cause of BSE and its human form, new variant Creutzfeld-Jakob disease (vCJD) cloud the scientist's judgment? Were they and governments too quick to jump on the prion bandwagon?

Indeed, there are some who believe so. In fact one lone voice believes that the nutritional cause may be not be contaminated meat and bone meal (MBM) at all, but that the BSE has its roots in a more common nutritional problem. As the BSE hysteria calms, some of the quieter voices are still audible. These are offering alternative explanations for the cause of epidemic. Though research is still in its infancy, Czech scientist Dr. Josef Hlásný firmly believes that scrapie- infected MBM was not the sole culprit. He has been involved in his veterinary capacity, in studies of central nervous neurotoxicities of a nutritional cause, and has recognized a number of threads in common with BSE.

Dr. Josef Hlásný has been a practising veterinary surgeon in the Czech republic since 1969. Since 1990 he has been involved in international research into mineral imbalances in ruminants. For just over a decade, Dr. Hlásný has been involved in research into the use of high-nitrogen forages, and he suspects some of his findings to be relevant to the BSE story.

To date, Dr. Hlásný's work has been published mainly in the Czech language journal „Výzkum v chovu skotu“ (Rapotín). His original letter to Feed Mix was some 13 pages long, and so cannot be published in its entirety, but in BSE- a nutritional neurotoxicity?, he picks up the story. He reviewed about 200 papers on the central nervous system (CNS) changes associated with BSE, and detected a possibility that these mechanisms have a strong influence on CNS function, especially in ruminants.

Dr. Hlásný would like to receive comment from like- minded or interested scientists. A full list of his publications and references is available from Feed Mix on request