

**Gyulladásos folyamatok morfológiai és funkcionális vizsgálata
könnytermelési zavarok, valamint időskori macula degeneráció
esetén**

Doktori (PhD) értekezés

dr Kovács Illés
egyéni felkészülő

Programvezető: Dr Szolcsányi János akadémikus

Témavezető: Dr Pintér Erika

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2006

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
Összefoglalás	6
Summary.....	9
Bevezetés	11
A neurogén gyulladás.....	15
<i>Szenzoros proinflammációs neuropeptidek</i>	<i>16</i>
<i>A tachykininek biológiai hatásai</i>	<i>17</i>
<i>A calcitonin gén-rokon peptid</i>	<i>17</i>
<i>A CGRP biológiai hatásai.....</i>	<i>17</i>
<i>A Vasoactive Intestinal Peptide biológiai hatásai.....</i>	<i>18</i>
<i>A neuronális nitrogén-oxid szintetáz biológiai hatásai</i>	<i>18</i>
<i>A kapszaicin</i>	<i>18</i>
<i>A kapszaicin celluláris hatásmechanizmusa</i>	<i>18</i>
<i>A TRPV1 receptor</i>	<i>19</i>
Neurogén gyulladás a szemfelszínen és a szemfenéken.....	20
<i>Neurotranszmitterek expressziója és szerepe a kötőhártyában</i>	<i>20</i>
<i>Neurotranszmitterek expressziója az ideghártyában.....</i>	<i>21</i>
Az időskori macula degeneráció kialakulásának hátterében álló folyamatok	23
<i>Az időskori macula-degeneráció korai formáinak kezelési lehetőségei</i>	<i>25</i>
Célkitűzések.....	27
Módszerek.....	28
Érzőideg ingerlés hatása a könnytermelésre, valamint a retinális neurotranszmitterek expressziójára állatkísérletes modellben	28
<i>A neurogén gyulladás kísérletes vizsgálatának lehetőségei</i>	<i>28</i>
A könnytermelés vizsgálata.....	29
<i>Szövetteni vizsgálatok</i>	<i>29</i>
<i>Könnytermelés mérése.....</i>	<i>30</i>
<i>Kehelysejt sűrűség.....</i>	<i>30</i>
<i>Könnyfehérje analízis</i>	<i>30</i>
<i>Előkezelések</i>	<i>31</i>
Az ideghártya vizsgálata	31
<i>Immunhisztokémiai módszerek</i>	<i>31</i>
Morfológiai vizsgálatok időskori macula degeneráció esetében	32
<i>Elektron mikroszkópiás módszerek.....</i>	<i>32</i>
Követéses macula funkció vizsgálatok mitotrop anyagok alkalmazása során időskori macula- degenerációban	33
<i>Funkcionális vizsgálatok.....</i>	<i>35</i>
<i>Morfológiai vizsgálatok.....</i>	<i>35</i>
Statisztikai módszerek.....	36
Eredmények.....	37
A trigeminus ganglion ingerlésének hatása a könnytermelésre.....	37

<i>Alap könnytermelés, fals ingerlés hatása</i>	37
<i>Előkezelések hatása az érzőideg ingerlés kiváltotta könnytermelésre</i>	38
<i>Kehelysejt sűrűség (mucin szekréció)</i>	39
<i>Könnyfehérje koncentráció</i>	40
Antidrómos ingerlés hatása a retinában expresszáldó neuropeptidekre	42
Elektronmikroszkópos eltérések időskori macula degeneráció esetében	43
<i>Korral járó elváltozások</i>	43
<i>AMD esetében kialakuló elváltozások</i>	45
<i>Morfometriai eredmények</i>	47
Mítotróp anyagok alkalmazásának hatása az időskori macula degeneráció lefolyására.....	50
<i>Funkcionális változások</i>	50
<i>Morfológiai változások</i>	54
Megbeszélés	57
<i>Az érzőideg ingerlés hatása a könnytermelésre állatkísérletes modellben</i>	57
<i>Érzőideg antidrómos ingerlésének hatása a szenzoros neuropeptidok expressziójára retinában</i>	59
<i>Jellegzetes ultrastrukturális eltérések időskori macula degeneráció esetében</i>	62
<i>Mítotróp készítménnyel szerzett tapasztalataink az időskori macula degeneráció kezelésében</i>	64
Az értekezés új eredményei	69
Hivatkozások	71
Közlemények	98
<i>Az értekezés alapját képező publikációk</i>	98
<i>Egyéb közlemények</i>	98
<i>Poszterek, idézhető absztraktok az értekezés témájában</i>	99
<i>Egyéb poszterek, idézhető absztraktok</i>	101
<i>Előadások</i>	102
Köszönetnyilvánítás	105

Rövidítések jegyzéke

AMD: „Age-Related Macular Degeneration”, időskori macula degeneráció

ANOVA: „analysis of variance”, variancia analízis

cAMP: ciklikus adenzin monofoszfát

CALT: „Conjunctiva-associated lymphoid tissue”

CGRP: „Calcitonin Gene Related Peptide”, calcitonin gén-rokon peptid

EDTA: etiléndiamin tetraacetát

EGTA: etilén glycol (2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacetát

ETDRS: „Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study”

FS: „Foveal Sensitivity”, foveális érzékenység

G protein: GTP (Guanozin-trifoszfát) kötő protein

IL: „Interleukin”

IPL: „Inner Plexiform Layer”, belső hálózatos retina réteg

LMW: „Low Molecular Weight”, alacsony molekula súly

mean±SD: „mean±Standard Deviation”, átlag±szórás

mean±SEM: „mean±Standard Error of Mean”, átlag±standard hiba

mM: millimol (10^{-3} mol)

NIH: „National Institute of Health”

NK: „Neurokinin”

nNOS: „neuronal nitric oxide synthase”, neuronális nitrogén-oxid szintetáz

OPL: „Outer Plexiform Layer”, külső hálózatos retina réteg

OR: „Odds Ratio”

p: statisztikai szignifikancia

PMSF: Fenil-metil-szulfonil-fluorid

POS: „Photoreceptor outer segment”, fotoreceptor külső szegmens

r: korrelációs együttható

RNS: ribonukleinsav

RPE: „Retinal pigment epithelium”, retina pigmenthám

SCN: „suprachiasmatic nucleus”, nucleus suprachiasmaticus

SDS: „Sodium-Dodecyl-Sulphate”

SP: "Substance P", P-anyag

TBS: „TRIS-pufferelt sóoldat”

TRIS: hidroximetil aminometán

TRPV1: "Transient Receptor Potential Vanilloid-1"

VFMD: "Visual Field Mean Defect"

VIP: "Vasoactive Intestinal Peptide"

μm: mikrométer (10^{-6} m)

Összefoglalás

A szemfelszín krónikus irritációjával járó száraz szem szindróma, valamint az ideghártya betegségei közül az időskori macula degeneráció (Age-Related Macular Degeneration - AMD) két, megjelenésében és lefolyásában egymástól lényegesen eltérő betegségcsoport, mégis a legújabb kutatási eredmények szerint közös jellemzőjük, hogy kialakulásukban fontos szerepe van a gyulladással járó mechanizmusoknak. Immunhisztokémiai módszerekkel a kötőhártyában, a könnymirigyekben, valamint az uveában is kimutattak kapszaicin érzékeny idegvégződéseket, azonban nem vizsgálták ezek szerepét a könnytermelésben, illetve a macula lutea betegségeiben. A neurogén gyulladás a nociceptív érzőideg végződések körül kialakuló lokális folyamat, melynek jellemzője, hogy az idegvégződésekből pro-inflammációs neuropeptidok pl. Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP), Substance P (SP), neurokinin A szabadulnak fel, melyek vazodilatációt, plazma extravazációt, a hízósejtekből hisztamin felszabadulást okoznak, valamint elősegítik a gyulladással járó sejtek felszaporodását. A jelenleg elfogadott elképzelések az AMD kialakulásában szerepet tulajdonítanak a reaktív oxigénradikálok által kiváltott, a korral kumulálódó oxidatív károsodásoknak is. A pigmenthártyában lerakódott anyagcsere termékek közül elsősorban a lipofuscin felelős a felszabaduló reaktív szabadgyökökön keresztül a mitokondriumok membránjának károsításáért, következményesen a mitokondriális energiatermelés zavarát okozva. A betegség hátterében álló oxidatív károsodás csökkentése céljából a kezelésben régóta szerepet kapnak antioxidáns hatású vegyületek. Ugyanakkor, egy korábbi klinikai előtanulmány során a mitokondriumok metabolizmusát fokozó, ún. „mitokondriotrop” (acetyl-L-karnitin, az ω 3 zsírsavak és a koenzim-Q10) vegyületeket tartalmazó készítmény alkalmazásával is kedvező eredményeket értek el az időskori macula degeneráció kapcsán.

Ezen elméleti megfontolások alapján célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az érzőidegingerlés hatását a könnytermelésre, valamint a retinában expresszálandó neurotranszmitterek mennyiségére állatkísérletes modellben, illetve időskori macula

degeneráció kapcsán az ideghártya morfológiai elváltozásait és a mitokondriális anyagcsere javításának hatását tanulmányozzuk.

Kísérletes vizsgálataink eredményei szerint a trigeminus ganglion ingerlése következtében az idegvégződésekből felszabadult neuropeptidok fokozzák a könnytermelést a kehelysejtek, valamint a járulékos és a fő könnymirigyre kifejtett hatása révén. A hatásban mind a paraszimpatikus, mind a szimpatikus idegi pályák, illetve agytörzsi reflexek szerepe kizárható. Ugyanakkor a kapszaicinnal történő deszenzibilizáció teljes mértékben kivédte az ideg ingerlésének hatását, megerősítve ezzel a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből felszabaduló neurotranszmitterek szerepét. Az SP receptor antagonisták könnytermelést szignifikánsan gátló hatása az SP szerepét direkt módon bizonyítja, ugyanakkor az ingerelt oldalon megfigyelt, a kontroll oldalhoz képest szignifikáns könnytermelés fokozódás egyéb neuropeptidok szerepére utal. A szem érzőideg végződéseinek antidrómus ingerlése a retinában a vizsgált neuropeptidok expresszióját is fokozta. A kontroll szemekben kérdéses, vagy enyhe immunreakciók alakultak ki SP, VIP és nNOS ellen a külső és belső magvas rétegben, valamint SP ellen a ganglion sejt rétegben, ugyanakkor CGRP elleni immunreakciót egyik rétegben sem tapasztaltunk. A stimulált oldalon kifejezett immunreakciót figyeltünk meg SP, CGRP, VIP, valamint nNOS ellen a retina mind a négy vizsgált rétegében.

Morfológiai eredményeink szerint a mitokondriumok száma, valamint az ép szerkezetű mitokondrium membránok aránya szignifikánsan alacsonyabb AMD-s, mint normál szemekben. Továbbá, a peroxiszómák számának növekedése az AMD kialakulásával összefügg, azonban a lipofuscin felhalmozódása nem specifikus AMD kialakulására. A mitokondriális membránok elváltozásai a lipofuscin felhalmozódásával is társultak, noha ez nem volt specifikus AMD-re. Eredményeink alátámasztják a korábbi megfigyeléseket, melyek szerint a mitokondriális működés károsodásának szerepe van az AMD kialakulásában, így a mitokondrium membránok alkotóelemeit tartalmazó, funkcióját javító ún. „mitokondriotrop vagy mitotrop” vegyületeknek szerepe lehet a betegség kezelésében. Ezen elméleti megfontolások alapján megtervezett kettős vak klinikai tanulmány eredményei szerint AMD-ben szenvedő betegek Phototrop® (összetevők: lásd 4. táblázat) kezelésének hatására a látásfunkciók (látásélesség, ideghártya érzékenység)

javultak, a szemfenéken a drusenek által elfoglalt terület csökkent. Összehasonlító klinikai tanulmány keretében igazoltuk tehát, hogy a mitokondriumok anyagcseréjének javítása mitotrop anyagokat tartalmazó készítményekkel hatékony eszköz lehet korai AMD progressziójának lassításában, a létrejövő károsodások visszafordításában.

Summary

Dry eye syndrome and Age-Related Macular Degeneration (AMD) are two different diseases, however recently published results suggest similar pathophysiological features due to chronic inflammatory processes. CGRP and SP containing sensory nerve endings were identified in the conjunctiva, in the accessory lacrimal glands, and in the uveal tract. SP and CGRP are released from peripheral nerve terminals as the principle mediators of neurogenic inflammation, which is a characteristic feature of the activation of capsaicin-sensitive subgroup of afferent nerve fibers. The current pathophysiologic concept on AMD assigns a primary role to the age-related, cumulative oxidative damage to the RPE due to an imbalance between generation and elimination of reactive oxygen species, resulting in impaired mitochondrial metabolism. Epidemiological studies supported this concept showing low antioxidant diet as a risk factor for AMD, while higher antioxidant uptake seemed to attenuate risk for AMD. Based on this concept several single antioxidants or their combinations were suggested for treating AMD. A previous pilot study on the efficacy of these mitotropic compounds (combination of acetyl- *L* -carnitine, n-3 fatty acids, and coenzyme Q10) reported a marked improvement of retinal functions in a small group of patients affected by early AMD.

Based on the previous assumptions the aim of our study was to present morphological and functional evidence to evaluate whether tear secretion and neuropeptide expression in the retina is influenced by stimulation of sensory nerve endings of the eye, and to evaluate morphological alterations of retinal pigment epithelial cells in AMD as well as to examine the effect of mitochondriotropic dietary supplements on the clinical course of early AMD in a prospective, controlled clinical trial.

According to our results electrical stimulation resulted in significant increase of tear secretion and decrease of goblet cell density on the stimulated side compared to the unstimulated side. These results were not influenced by parasympatholytic, sympatholytic, or ganglionic transmission blocking pretreatments, but the use of capsaicin and selective SP receptor antagonist significantly inhibited the effect of stimulation, suggesting that the sensory neuropeptide substance P plays a pivotal role in this neurogenic regulatory mechanism. On the electrically stimulated side immunostaining for SP, CGRP, VIP and

nNOS were markedly increased in the retinal pigment epithelium/photoreceptor outer segment complex, in the inner and outer granular layers and in the ganglion cells of the retina in comparison to the control side. These studies showed, in the first time, that antidromic stimulation of trigeminal ganglion influences neurotransmitter expression in retinal cells.

With increasing age a significant decrease in number and area of mitochondria, as well as loss of cristae and matrix density were found in both AMD and control specimens. These decreases were significantly greater in AMD than in normal aging. Alterations of mitochondria were accompanied by increasing number of peroxisomes and lipofuscin granules in both AMD and control specimens, although the difference between groups was significant only for peroxisomes. We conclude that alterations of mitochondrial membranes may also play a role in the pathogenesis of AMD. According to the results of our randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial visual functions showed significant improvement in the treated group by the end of the study period. Decrease in drusen-covered area of treated eyes was also statistically significant as compared to placebo when either the most affected eyes or the less affected eyes were considered. These findings strongly suggested that an appropriate combination of compounds which affect mitochondrial metabolism, may improve and subsequently stabilize visual functions, and it may also improve fundus alterations in patients affected by early AMD.

Bevezetés

A szervezetben létrejövő gyulladással járó folyamatokat kétélű fegyverként is jellemezhetjük: az akut, kífokú gyulladással járó reakció a szervezet védekező reakciójaként segít a gyógyulásban, a krónikus formák jellemzője azonban a szöveti károsodás létrejötte, ezáltal a regeneráció késleltetése. A gyulladással járó folyamatok szerepe régóta bizonyított számos szemészeti kórkép kialakulásában. A szemfelszín krónikus irritációjával járó száraz szem szindróma, valamint az ideghártya betegségei közül az időskori macula degeneráció (AMD) két, megjelenésében és lefolyásában egymástól lényegesen eltérő betegség, mégis a legújabb kutatási eredmények szerint kialakulásukban fontos szerepe van a gyulladással járó mechanizmusoknak.

A szemfelszíni gyulladással járó száraz szem szindróma enyhe formája is klinikai tünetei miatt a mindennapi élettevékenységet hátrányosan befolyásoló elváltozásként jellemezhető. Ugyan az alkalmazott klinikai tesztek és diagnosztikai kritériumok sokrétűsége miatt prevalenciája különböző tanulmányokban eltérő, gyakorisága a korrallal egyértelműen fokozódik. Egy 2000-ben készült felmérés eredményei szerint, míg 60 éves kor alatt előfordulása a népességben csak 8.4%, addig 80 éves kor felett már 19%-ra tehető. A száraz szem okaként, illetve következményeként egyaránt jelentkező szemfelszíni irritáció jellemzően a második leggyakoribb ok, mely miatt a betegek a szemorvosokat felkeresik. A szemszárazság legfontosabb rizikófaktorai közül kiemelhetjük az ízületi gyulladást, a dohányzást, a pajzsmirigy betegséget, különböző gyógyszerek szedését, valamint a cukorbetegséget is (Moss és mtsai., 2000). A betegség a nőket jellemzően nagyobb számban érinti, előfordulása 45 éves kor felett jelentősen fokozódik, melynek hátterében a menopausa után megváltozott hormonszintek állnak. A betegség súlyossága széles skálán mozog az enyhe panaszokat okozó formáktól a kifejezett tüneteket, szövődéséig, akár vakságot okozó formákig terjedve.

A száraz szem kezelésének célja a könnyfilm integritásának helyreállításával a szemfelszín nedvesen tartása és ezáltal a tünetek megszüntetése. Ha a száraz szem egy alapbetegség következtében, pl. a rheumatoid arthritis talaján alakul ki, ez utóbbi kezelése a szemészeti panaszok enyhülését is eredményezheti. Azokban az esetekben, amikor a

tünetek hormon- vagy vitamin hiány miatt lépnek fel, a hiányzó elem pótlása a panaszokat szintén enyhítheti. Az alapbetegség gyógyítása mégsem szünteti meg minden esetben a száraz szem panaszokat és így műkönyvek alkalmazására, valamint a könnyvesztés csökkentésére szolgáló műtéti beavatkozások elvégzésére lehet szükség. Az enyhe szemszárazságban szenvedő betegek tüneteik megjelenését meghatározott tevékenységekhez vagy helyzetekhez köthetik, mint például a szem számítógép használatával vagy a vezetéssel összefüggő megerőltetése. Ezekben az esetekben az ilyen tevékenységek idejének csökkentésével, a szem pihentetésére fordított idővel, fokozott pislogással egyszerűen elkerülhető a panaszok megjelenése. Ezek az életmód változtatások azonban nem mindig kivitelezhetők és így szemcseppek, kenőcsök alkalmazása is szükséges a panaszok enyhítéséhez. Amennyiben a száraz szem kialakulása a szemfelszín gyulladásos megbetegedésére vezethető vissza, immunszupresszáns szemcseppek alkalmazása hatásos lehet.

Számos klinikai megfigyelés támasztotta alá a gyulladásos folyamatok szerepét száraz szem szindrómában. Az egészséges könnyfilm a szemfelszíni immunvédekezésben fontos szerepet tölt be lizozim, lactoferrin, immunglobulin, komplement, valamint citokin tartalma révén. A kötőhártyában bőségesen előforduló limfociták, neutrofil sejtek, Langerhans sejtek, valamint hízósejtek együttesen ún. conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) rendszert alkotva részt vesznek az immunvédekezésben. A felsorolt sejtek a kötőhártyában mind az epithel, mind a stróma rétegben normálisan is megtalálhatók, jellemzően inaktív, szupresszált állapotban. Szemfelszíni irritáció hatására azonban e sejteknek citokin mediálta aktivációja következik be, melynek eredményeképpen mennyiségük az epithel rétegben fokozódik, és további citokin termeléssel a gyulladásos válasz fokozódását váltják ki. Szemfelszíni irritációt a közismert mechanikai, fizikai, valamint kémiai ingerek mellett könnytermelési zavarok következtében létrejövő szaru- vagy kötőhártyahám károsodás is kiválthat. Az így kialakult szemfelszíni gyulladás azután befolyásolja a könnytermelést a fő könnymirigyben a klasszikus afferentáció révén, és az így mennyiségében, illetve minőségében nem megfelelő könnyfilm a szemfelszínre kellőképpen nem védve a gyulladásos folyamatok fokozódását segíti elő. Ugyanakkor, a könny lipid, illetve mucinózus komponensének termeléséért felelős járulékos

könnymirigyek, valamint kehelysejtek a kötőhártyában, illetve a szemhéj állományában elhelyezkedve a felszabaduló citokinek, valamint aktivált immunsejtek hatásának eredményeképpen direkt módon is károsodhatnak a szemfelszín lokális gyulladása esetében. Ennek megfelelően, míg a korai formák kezelésében a könnypotló szerek alkalmazása elegendőnek bizonyulhat, addig előrehaladott esetekben a kialakult szemfelszíni gyulladás csökkentése is feltétele a hatékony terápiának. Mind több morfológiai eredmény, valamint klinikai tapasztalat utal tehát arra, hogy a könnytermelési zavarok kialakulásában fontos modulátor szerepet játszhatnak lokális gyulladással komponensek.

A tanulmányunk során vizsgált másik betegségcsoport az időskori macula degeneráció, mely a fejlett társadalmakban az 55 év feletti korcsoportban a súlyos fokú látásromlások mintegy 50 százalékáért felelős. Az időskori macula degeneráció évente mintegy 40.000 új esetben jelentkezik ma Magyarországon, mellyel a hazai vaksági statisztikákban az első helyen szerepel és egyes becslések szerint a következő 25 évben ez a szám megháromszorozódhat. Az időskori macula degeneráció betegség általában 60 éves kor felett alakul ki, előfordulási gyakorisága a korrallal fokozódik (1. táblázat). A populáció idősebbé válásával az időskori macula degeneráció jelentősége egyre nő, hiszen olyan embereket érint, akik egészségi állapotuk miatt többnyire amúgy is hátrányos helyzetűek. A helyzetet súlyosbítja, hogy az érintettek nincsenek tisztában a betegség természetével, a korai diagnózis jelentőségével. Időben megkezdett kezelés nélkül a betegség hamar előrehaladott állapotba kerül, és visszafordíthatatlanná válik. A betegség korai szakaszára a macula lutea területén különböző anyagcsere termékek kóros felhalmozódása jellemző (ún. száraz forma), míg a késői formában egyes esetekben az érhártya és az ideghártya között elhelyezkedő pigmenthám repedésein keresztül abnormális vérerek növekedése indulhat meg. Az ezekből a kóros erekből kiinduló vérsavó kiszivárgás szerózus ideghártya-leválást okozhat, ezáltal károsítva annak működését (nedves vagy exsudatív forma). Előrehaladott állapotban a macula hegesedése végleges látásromlást, a centrális látás kiesését eredményezi. A betegség lefolyására a centrális látás fokozódó romlása jellemző, melynek első tünete a nedves formában a torzult látás lehet (betűk, vonalak hullámzása), melyet követően akár néhány hónap alatt igen jelentős látásromlás alakulhat ki. A természetes

lefolyás eredményeképpen a betegek felénél ez öt év alatt gyakorlatilag a központi látás elvesztéséhez vezet.

Kor	Előrehaladott AMD		Korai AMD	
	Betegek	(%)	Betegek	(%)
40-49	20	0.1%	851	2.0%
50-59	113	0.4%	1,053,000	3.4%
60-69	147	0.7%	1,294,000	6.4%
70-79	388	2.4%	1,949,000	12.0%
≥80	1,081,000	11.8%	2,164,000	23.6%
Összesen	1,749,000	1.5%	7,311,000	6.1%

1. táblázat. Az időskori macula degeneráció előfordulása különböző korcsoportokban az USA-ban (Friedman és mtsai., 2004)

A legújabb kutatási eredmények az időskori maculadegeneráció kialakulásában a lokális gyulladás szerepét is felelőssé teszik. Irodalmi adatok alapján a betegség pathomechanizmusában a korrall járó degeneratív folyamatok, valamint az oxidatív stressz hatására kialakuló retinális pigmenthám, illetve choriocapillaris-réteg károsodás mellett krónikus gyulladással járó folyamatnak, valamint annak következtében bizonyos anyagcsere termékeknek a pigmenthám sejtek alatti, illetve a choriocapillaris réteg szintjében történő felhalmozódásának tulajdonítanak oki szerepet. A szemfenéken látható drusenek a pigmenthám sejtekben levő lizoszómák aktivitásának csökkenése következtében lerakódott anyagcsere termékeknek felelnek meg. A pigmenthám anyagcsere termékei a pigmenthám bazálmembránja és a Bruch-membrán között lerakódva gyulladással járó választ váltanak ki, így további károsodást idéznek elő. A gyulladással járó folyamatokra utaló jel, hogy szövettani vizsgálatok során a pigmenthám sejtekben C-reaktív protein, immunglobulin G, vitronectin, apolipoprotein E, fibroblast-eredetű növekedési faktor 2, és komplement lerakódását figyelték meg (Anderson, 2002). A gyulladással járó folyamatok szerepét megerősíti, hogy makrofág diszfunkció eredményeként időskori macula degenerációra jellemző elváltozások alakultak ki állatkísérletes modellben is (Ambati, 2003). A pigmenthám károsodásban

ugyanakkor a mitokondriális metabolizmus csökkenésnek is fontos szerepe van. Az energiatermelő folyamatok genetikai eredetű károsodása a macula degenerációban megfigyelhető drusenek jellegzetes összetevőinek, lipid transzport fehérjék, extracelluláris mátrix komponensek, valamint gyulladáshoz vezető mediátorok lokális felhalmozódásával jár sejttényészetben (Miceli, 2005).

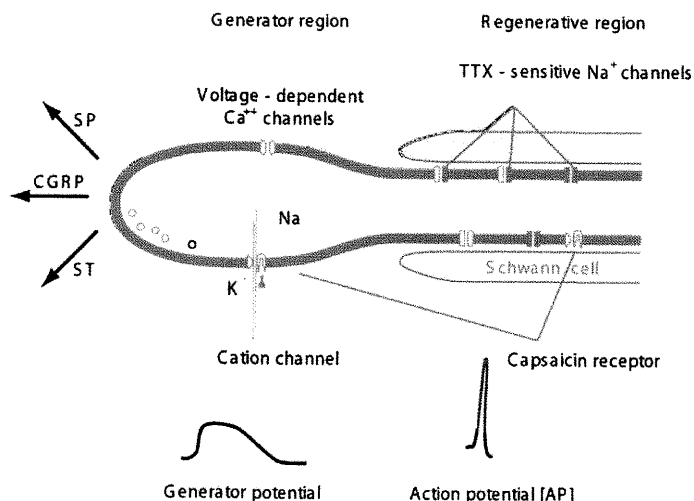
A neurogén gyulladás

Az 1940-es évek végén Jancsó Miklós magyar farmakológus írta le azt a jelenséget, hogy a paprika csípős anyagának nagy dózisa lokális vagy szisztémás alkalmazása egérben, patkányban vagy tengeri malacban az analgészia egy speciális formáját váltja ki. Kísérletes megfigyelései szerint ez a fájdalomkeltő, csípős vegyület fájdalommentes állapotot képes létrehozni. A kapszaicinnal deszenzibilizált állatok nem válaszoltak elhárító reflexekkel fájdalmas kémiai ingerekre. Kapszaicin szembe cseppentésére nem alakult ki blepharospasmus és ezek gyulladáshoz vezető reakciókat sem okoztak az alkalmazás helyén, azonban az állatok a mechanikai ingerekre ezután is reagáltak. A kapszaicin-szenzitív primér afferens neuronok vizsgálata során Jancsó és munkatársai mutatták ki először a neurogén plazma protein extravazáció létrejöttét. Leírták, hogy nervus saphenus és nervus trigeminus antidrómos izgatása gyulladást okoz patkány bőrében, ami arteriolás vazodilatációban, a vaszkuláris permeabilitás növekedésében, protein exszudációban nyilvánul meg, és az elektromos ingerlés eredményét nem befolyásolták a vegetatív idegrendszerre ható szerek. A szenzoros idegek átvágása után a lokálisan adott irritánsok kapszaicin, xilol, mustárolaj nem váltott ki gyulladást. Nagydózisú kapszaicinnal történt szisztémás vagy lokális deszenzibilizálás után, sem ortodrómos sem antidrómos úton nem lehetett neurogén gyulladást kiváltani (Jancsó és mtsai., 1967). A válasz hiánya azt bizonyította, hogy a neurogén plazma extravazáció mediátorai a kapszaicin-érzékeny fájdalomérző idegvégződésekből, az ún. nociceptorokból szabadulnak fel. A mediátor anyagra vonatkozó első közlemény 1978-ban jelent meg, mely szerint kimutatták, hogy a kapszaicin depletálja a P-anyagot a primér szenzoros neuronokból. Ezt követően arról is sikerült bizonyítékokat szerezni, hogy a neurogén plazma extravazációt a kapszaicin-

érzékeny idegvégződésekből felszabaduló P-anyag mediálja. Számos adatot publikáltak továbbá a neuropeptidok szintézisére, tárolására, felszabadulására, centrális és perifériás hatásaikra (Maggi, 1995), valamint a fájdalomérzésben betöltött szerepére vonatkozóan (Yaksh és mtsai., 1979).

Szenzoros proinflammációs neuropeptidok

Az elsőként izolált P-anyag mellett a tachykininek családjába tartozó peptidok legismertebb képviselői a neurokinin A (NKA) és a neurokinin B (NKB). Míg a P-anyag egy 11 aminosavból álló peptid, az utóbbi kettőt 10-10 aminosav alkotja. A tachykininiket sokáig kizárólag neuronális eredetűnek tartották, melyek elsődlegesen a kapszaicin-érzékeny primér afferens neuronokból szabadulnak fel, azonban újabb eredmények szerint a tachykinineknek léteznek neuronális és nem neuronális forrásai is. Így kimutatták tachykinin expressziót kapszaicin-rezisztens idegsejtekben (Neumann és mtsai., 1996; Hunter és mtsai., 2000) és az enterális idegrendszerben is (Lomax és Furness, 2000). A P-anyag jelen van az endothel sejtekben (Linnik és Moskowitz, 1989), valamint különböző gyulladásos és immunsejtekben is (Maggi, 1997). Az újonnan szintetizált peptidok szekretoros granulákban vagy vezikulákban tárolódnak az idegvégződésekből és a nem neuronális sejtekben. A tachykininek az idegvégződésekből felszabadulva G-protein függő membránreceptorokon, (NK1, NK2, NK3) fejtik ki hatásukat. Az NK1 receptor széles körben expresszálódik: jelen van a neuronokon, a vaszkuláris endothel, és simaizom sejteken és különféle immunsejteken (Patacchini és Maggi, 2001), míg indukálható formáját a csontvelői sejteken mutatták ki. Az NK2 receptor priméren a periférián van jelen, az NK3 receptor viszont főleg a központi idegrendszerben mutatható ki. Mindhárom tachykinin (P-anyag, NKA, NKB) teljes agonistaként viselkedik mindhárom receptoron, azonban az P-anyagnak az NK1-hez, az NKA-nak az NK2-höz, az NKB-nek az NK3-hoz a legnagyobb az affinitása.



1. ábra. A kapszaicin-érékeny, TRPV1-et kifejező érzőidegvégződés sematikus ábrája. Az idegvégződés ingerlésekor az akciós potenciál kialakulását a vezikulákban tárolt szenzoros neuropeptid felszabadulása kíséri, melyet kapszaicinnak a specifikus receptorához való kötődése is kiválthat. TTX=tetrodotoxin. Módosított ábra (Szolcsányi, 1993).

A tachykininek biológiai hatásai

Legfontosabb hatásai az endothel-függő vazodilatáció (Maggi, 1995), plazma protein extravazáció (Brain, 1997), simaizom kontrakció, a mirigyszekréció fokozása, hízósejt degranuláció, valamint egyéb transzmitterek felszabadulásának modulációja.

A calcitonin gén-rokon peptid

A calcitonin gén-rokon peptid (Calcitonin Gene Related Peptide - CGRP) egy 37 aminosavból álló struktúra, mely igen széles körben expresszálódik, mind a centrális mind a perifériás idegrendszerben. A CGRP egy nagyobb peptidcsaládba tartozik, amelynek tagjai még az erős vazodilatátor hatású amylin és a pro-inflamációs hatású adrenomedullin. A calcitonin peptid családjának minden tagja 7 transzmembrán domént tartalmazó G-protein-függő receptorokon keresztül hat.

A CGRP biológiai hatásai

Legfontosabbak a vazodilatátor hatás (Brain és mtsai., 1985), a vaszkuláris

permeabilitás fokozása, a simaizom relaxáló hatás, a neuromodulátor aktivitás, valamint a gyulladásmoduláló hatás.

A Vasoactive Intestinal Peptide biológiai hatásai

A Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) kifejezett vazodilatátor hatású neurotranszmitter (Wallengren, 1997).

A neuronális nitrogén-oxid szintetáz biológiai hatásai

A neuronális nitrogén-oxid szintetáz (neuronal nitric oxide synthase - nNOS) vazodilatátor tulajdonságú neurotranszmitter (Wallengren, 1997).

A kapszaicin

A paprika csípős anyagáról a kapszaicinról, melynek kémiai neve '8-metil-N-vanilil-6 nonenamid' bebizonyosodott, hogy szeletíven képes izgatni és nagy dózisban deszenzibilizálni a C és A δ szenzoros rostok egy populációját, a polimodális nociceptorokat, melyek forró hőingerre, mechanikai és kémiai stimulusra is érzékenyek. A kapszaicin humán bőrbe történő injektálása dóziszfüggő stimulációt okoz, melynek nagysága és tartama jól korrelál az égető fájdalom szubjektív érzetével. A kapszaicin a beadás helyén először bőrkivörösödést okoz, aminek közvetlen oka a kapszaicin hatásra a szenzoros rostok perifériás végződéséből felszabaduló, vazodilatátor hatású anyag, a CGRP. Majd létrejön a venuláris plazmakiáramlás és duzzanat, amelyet a szintén kiszabaduló tachykininek (elsősorban a P-anyag) okoznak (Szolcsányi, 1993)

A kapszaicin celluláris hatásmechanizmusa

A kapszaicin receptor létezését először Szolcsányi vetette fel és megszerkesztette a kapszaicin receptor első hipotetikus modelljét (Szolcsányi és Jancsó-Gábor, 1976)

A kapszaicin az alkalmazott dózistól függően excitátoros, neuronblokkoló, illetve neurotoxikus hatást okozhat a kapszaicin-érzékeny neuronokon. A kapszaicin-szenzitív hátsó gyöki ganglionsejtek izolált membrán preparátumain történő vizsgálatokkal, valamint

„patch clamp” analízissel sikerült bizonyítani a kapszaicinre nyíló kationcsatorna létezését. A kapszaicin hatására nyílik a nem-szelektív kation csatorna, melyen keresztül Na^+ és Ca^{2+} áramlik be a sejtbe és depolarizációt okoz. Kiváltódik a nociceptív szignál, illetve efferens hatásként szenzoros neuropeptidok szabadulnak fel a perifériás végződésből és természetüktől függően lokális, vagy szisztémás hatásokat okoznak. A csatorna hosszútávú nyitott állapota miatt létrejön a szenzoros neuronblokkoló hatás, megnő az intracelluláris Ca^{2+} szint, ami gátolja a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornákat és mitokondriális duzzadást indukál. Ha extrém módon megnő a nyitott állapotú csatornák száma és a nyitott állapot időtartama, létrejöhét a neurotoxikus hatás. Feltételezik, hogy a magas intracelluláris NaCl tartalom indukálja a neuronális duzzadást és a Ca^{2+} aktiválta proteázok okozzák a sejtek lízisét.

A TRPV1 receptor

1997-ben Caterina, Schumacher, Tominaga és Julius közölték elsőként a kapszaicin receptor, vagyis az általuk vanilloid 1 (VR1) receptornak keresztelt jelfogó struktúra sikeres klónozását (Caterina és mtsai., 1997). Később ezt az elnevezést a receptorok szerkezetén alapuló nemzetközi nomenklaturai ajánlásoknak eleget téve TRPV1-re változtatták. A kapszaicin receptorról feltételezik a multimér csatorna-szerkezetet, bár ezt még nem támaszják alá meggyőző experimentális adatok. A kapszaicin szerkezete hasonlít a feltételezett endogén TRPV1 ligandok, mint az anandamid, 12-hidroxiperoxi-tetraénsav és az N-arachidonil-dopamin szerkezetéhez. Bár az első közlemények az anandamidot tartották a TRPV1 receptorok elsődleges endogén ligandjának, a későbbi vizsgálatok eredményei kérdésessé tették az anandamid ilyen szerepét in vivo körülmények között (Szolcsányi, 2000). A TRPV1 receptorok az ismertén az 5-lipoxigenáz enzim által képződő hidroxiperoxi-eikozatetraénsavval is aktiválhatók (Hwang és mtsai., 2000). Ennek megfelelően az arachidonsav metabolitjai képesek aktiválni a kapszaicin receptort, újabb bizonyítékot szolgáltatva a kapszaicin-érzékeny idegvégzódéseknek a gyulladásoos folyamatokban történő részvételét illetően.

A kapszaicin-deszenzibilizáció mechanizmusát vizsgálva úgy tűnik, hogy a

kapszaicin receptor foszforilációja szükséges a kapszaicin-érzékenység fenntartásához (Koplas és mtsai., 1997). Az aktivált ioncsatornán keresztül történő Ca^{2+} beáramlás elősegíti a csatorna defoszforilációját és így deszenzibilizációhoz vezet. Az ismételt kapszaicin adás indirekt effektusa, hogy gátolja a feszültségfüggő Na^+ csatornákat, így akadályozza az akciós potenciál kialakulását a kapszaicin-érzékeny neuronokban (Liu és mtsai., 2001; Balla és mtsai., 2001). A deszenzibilizáció harmadik lehetséges mechanizmusa a mitokondriumok károsodása. Kimutatták ugyanis, hogy kapszaicin-deszenzibilizáció a B típusú szenzoros neuronokban tartós mitokondrium duzzadást eredményez (Szolcsányi és mtsai., 1975, Szőke és mtsai., 2000) akut expozíció pedig mitokondriális depolarizációhoz vezet (Dedov és mtsai., 2001).

A deszenzibilizáció hosszantartó hatása mögött az ultrastrukturális mitokondriális változások igen szelektívek és csupán a B-típusú szenzoros neuronokban, a trigeminalis, nodosalis, és hátsó gyöki ganglionokban voltak kimutathatók. Ezen érződúcok A-típusú sejtjei, valamint a szimpatikus pre- és posztganglionáris elemek, Schwann sejtek, glia sejtek, és epitheliális sejtek nem mutattak eltérést. A mitokondriális duzzadás a kapszaicin szembe cseppentése után a cornea idegvégződéseiben is kimutatható volt (Szolcsányi és mtsai., 1975).

Neurogén gyulladás a szemfelszínen és a szemfenéken

Neurotranszmitterek expressziója és szerepe a kötőhártyában

Ismert, hogy a könnyfilm megfelelő összetétele rendkívül fontos a szaruhártya normális állapotához: amellett, hogy nedvesen tartja a cornea felszínét tápanyagokat, oxigént is tartalmaz, valamint az immunvédekezésben is jelentős szerepet játszik lizozim és immunglobulin tartalma révén. A könnyfilm három, jól elkülöníthető rétegből áll, a külső lipid, a középső vizes, valamint a belső mucinózus rétegből (Chen és mtsai., 1997). A mucin túlnyomó részét a kötőhártya epithelben csoportosan elhelyezkedő kehelysejtek, kisebb részét a kötőhártya epithel sejtek termelik (Setzer és mtsai., 1987; Huang és mtsai.,

1988; Argueso és Gipson, 2001). A kehelysejtekből a mucin kiválasztása apocrin módon történik (Specian és Oliver, 1991; Dartt és mtsai., 1996), melynek jellemzője, hogy stimulus hatására a vesiculumokban tárolt összes granulum kiürül (Kessler és mtsai., 1995). A szemfelszín érző ellátását a trigeminus ganglionból eredő nervus ophthalmicus adja (Ten Tusscher és mtsai., 1989). Noha a reflexes könnytermelést nagyrészt a fő könnymirigy paraszimpatikus hatásra létrejövő szekréciónak tulajdonítják, szimpatikus, paraszimpatikus, valamint CGRP és P-anyag tartalmú érzőideg végződéseket sikerült kimutatni a kötőhártyában, valamint a járulékos könnymirigyekben is (Ten Tusscher és mtsai., 1990; Luhtala és Uusitalo, 1991; Luhtala és mtsai., 1991; Elsas és mtsai., 1994; Meyer-Bothling és mtsai., 1994; Simons és Smith, 1994; Chung és mtsai., 1996; Chanthaphavong és mtsai., 2003). P anyag (Substance P – SP) és CGRP tartalmú idegvégzések találhatók a kötőhártya többrétegű hámjában, az erek körül, valamint a Meibom mirigyekben (Luhtala és Uusitalo, 1991), azonban a kehelysejtek közvetlen közelében jelenlétüket ezidáig nem sikerült kimutatni (Dartt és mtsai., 1995). Ugyanakkor muszkarinerg, adrenerg, valamint VIP tartalmú idegvégzések találhatók a kehelysejtek közvetlen közelében (Diebold és mtsai., 2001), ezen idegvégzések mucin szekréción befolyásoló hatását jelezve, noha ez a regulációs mechanizmus ezidáig csak a VIP neurotranszmittert tartalmazó paraszimpatikus idegvégzések esetében bizonyított (Rios és mtsai., 1999). VIP alkalmazása, valamint az ellátó idegrost stimulálásának hatására a kehelysejtek granulumainak kiürülését figyelték meg állatkísérletes modellben a béltraktusban (Laboissee és mtsai., 1995), a tracheában (Joó és mtsai., 2002), a hasnyálmirigyben (Hootman és de Ondarza, 1995) és a kötőhártyában (Rios és mtsai., 1999).

Neurotranszmitterek expressziója az ideghártyában

Érzőideg végződéseket a szemgolyó számos szövetében sikerült kimutatni (Belmonte és mtsai., 2004), melyek közös jellemzője az SP és a neurokinin A koexpressziója. Annak ellenére, hogy a retinában nem sikerült érzőideg végződéseket kimutatni, SP és CGRP immunreaktivitást detektáltak a choroideában és az ideghártyában

számos állatfajban, valamint emberben is (Bagnoli és mtsai., 2003; Casini 2005). Az SP expressziója patkány retinában az amacrin és a ganglion sejtekre jellemző (Brecha és mtsai., 1989; Caruso és mtsai., 1990). Hisztológiai vizsgálatok szerint az SP immunreaktív amacrin sejtek, melyek jellemzően a bipoláris, valamint a többi amacrin sejttel állnak kapcsolatban a belső magvas rétegben oszlanak számos ágra, szinapszisokat képezve a bipoláris, valamint a ganglion sejteken. Gyakran megfigyelhető, hogy az SP immunreaktív amacrin sejtek axonszerű nyúlványokat bocsátanak a külső hálózatos-, a ganglionsejt-, valamint az idegrost rétegen keresztül, rendszerint a retina ereken végződve (Kolb és mtsai., 1995). Az SP feltételezhetően paracrin módon hat specifikus receptorán, és mint excitátoros neurotranszmitter az amacrin és a ganglion sejtek spontán aktivitási szintjét fokozza (Casini és mtsai., 1997; Cuenca és Kolb 1998). Újabb eredmények szerint nyúl retinájában NK1 receptor immunreaktivitás detektálható az ún. ON-típusú csap bipoláris sejteken, valamint a dopaminerg amacrin sejteken azt jelezve, hogy az SP a retinában számos ingerületi kört befolyásolhat (Casini és mtsai., 2002; Casini és mtsai., 2004).

A P-anyag másik feltételezett funkciója a fényinformáció közvetítése a retinából a hypothalamuszban elhelyezkedő nucleus suprachiasmaticus (suprachiasmatic nucleus - SCN) területére, mely terület emlősökben a napszaki oszcillációért felelős régió (Moore 1993). Ezen eredményeket alátámasztják morfológiai bizonyítékok, melyek szerint SP innerváció mutatható ki patkányban a retina és az SCN régió között (Takatsuji és mtsai., 1991), valamint fiziológiai eredmények is, melyek a P-anyag mennyiségének cirkadián és fotoperiodikus fluktuációját mutatták mind a retinában, mind az SCN területén (Reuss és mtsai., 1994). Sötét adaptációt követően az SP immunreaktív idegvégződések száma markánsan csökkent, míg fény adaptációt követően fokozódott mind a retinában, mind az SCN területén számos fajban (Millar és mtsai., 1984; Takatsuji és Tohyama, 1993). Ugyanakkor újabb kutatási eredmények szerint maga a P-anyag nem viselkedik neurotranszmitterként ezen retinohipotalamikus kötegben, hanem csupán modulálja a fényimpulzusok hatását az SCN területén elhelyezkedő biológiai órában (Hannibal és Fahrenkurg 2002).

A CGRP, amely a Müller és az amacrin sejtek mellett (Stindl és Skofitsch 1992) a choroideában is kimutatható, kifejezett vasodilatátor hatással bír mind a retinában (Brain

és mtsai., 1985), mind a choroidea erekben, ezáltal feltételezhetően fontos szerepet játszik a szemgolyó vérellátásának szabályozásában (Rosenblatt és mtsai., 2000). Az amacrin és a ganglion sejtek további jellemzője a neuronális nitrogén oxid szintetáz (nNOS) immunpozitivitás, így feltételezhető egy bizonyos szinergista hatás a két anyag között (Neufeld 1999, Cheon és mtsai., 2002). nNOS immunreaktivitást a choroidea ganglion sejtekben ugyancsak sikerült kimutatni, a choroidea, a pigmenthám, valamint a photoreceptor réteg metabolikus szabályozásában betöltött szerepét jelezve (May és mtsai., 2004).

Mindazonáltal e korábbi megfigyelések ellenére mostanáig nem állt rendelkezésre *in vivo* kísérletes adat az experimentális neurogén gyulladásnak a könnytermelést befolyásoló, illetve a retinális neurotranszmitterek expressziójára kifejtett hatására vonatkozóan.

Az időskori macula degeneráció kialakulásának hátterében álló folyamatok

A gyulladós folyamatok szerepének tanulmányozása manapság a macula degeneráció kialakulásának hátterét vizsgáló kutatások központi témája. A legújabb eredmények szerint a drusenek kialakulásában a complement rendszer aktiválódásának fontos szerepe van, sikerült ugyanis kimutatni hogy a Factor H (HF1), az alternatív komplement aktiválási út legfontosabb inhibitora a drusenekben felhalmozódik. A 1q25-32 kromozómán elhelyezkedő Factor H gén (HF1/CFH) termeléséért a retinában a pigmenthám felelős, genetikai variabilitását vizsgálva az eredmények szerint több, úgynevezett „missense” mutáció nagyfokban szignifikáns ($p=3.2 \times 10^{-7}$ - 1.6×10^{-13}) kapcsolatban áll AMD kialakulásával. Ezen rizikó haplotípusok homozigóta jelenléte AMD kialakulására vonatkozóan fokozott rizikót jelent (OR 2.4-3.5), melynek hátterében egyrészt az egyén érzékenységének fokozódása szerepel bizonyos fertőző ágensek által kiváltott, vagy atípusos alternatív komplement út aktiválódással szemben, másrészt sejt mediálta gyulladós folyamatok is bizonyítottan részt vesznek a folyamatban (Hageman és mtsai., 2005).

Időskori macula degeneráció során elsősorban a fotoreceptor réteg megfelelő működését biztosító retinális pigmenthám sejtek (Retinal pigment epithelium – RPE) funkciója károsodik (Bird 2003). A jelenleg elfogadott elképzelések az AMD kialakulásában szerepet tulajdonítanak a reaktív oxigéngyökök által kiváltott, a korral kumulálódó oxidatív károsodásoknak is (Winkler és mtsai., 1999; Beatty és mtsai., 2000; Dunaief és mtsai., 2002). A pigmenthámiban lerakódott anyagcsere termékek közül elsősorban a lipofuscin felelős ezen reaktív szabadgyökökön keresztül a mitokondriumok membránjának károsításáért, következményesen a mitokondriális energiatermelés zavarát okozva (Jin és mtsai., 2001; Hollyfield és mtsai., 2003; Wolf, 2003). A lipofuscin összetevői között különböző lipidek, proteinek és A vitamin lebontási termékek szerepelnek, melyek mennyisége a kor előrehaladtával jellemzően fokozódik, valamint felhalmozódásuk ismerten károsan befolyásolja az RPE sejtek működését. In vitro körülmények között a lipofuscin kifejezetten csökkenti a pigmenthám sejtek fagocitózist, lizoszómális aktivitását, valamint a reaktív oxigén szabadgyökökkel szembeni ellenállását (Sundelin és mtsai., 1998; Shamsi és mtsai., 2001). A lipofuscin jellegzetes autofluorescenciájáért felelős „N-Retinylidene-N retinylethanolamine - A2E” kifejezetten gátolja a foszfolipidek sejten belüli lebontási folyamatait (Finnemann és mtsai., 2002; Bergmann és mtsai., 2004). Transzgenikus egér modellben a fotoreceptor külső szegmens fagocitózisának csökkenése lipofuscin felhalmozódásával, az AMD klinikai és szövettani jellegzetességeinek kialakulásával járt (Rakoczy és mtsai., 2002). Az A2E a citokróm oxidáz rendszer működését is befolyásolja (Suter és mtsai., 2000; Shaban és mtsai., 2002), valamint RPE sejtekben apoptózist indukál (Jin és mtsai., 2001; Wolf 2003). Ennek megfelelően a lipofuscin felelőssé tehető az AMD esetében kialakuló oxidatív RPE károsodásért, mely az RPE anyagcseréjének zavarát, az apoptózis fokozódását okozza (Dunaief és mtsai., 2002).

Korábbi eredmények szerint a mitokondriumok az öregedésben, valamint a korral járó neurodegeneratív betegségek kialakulásában központi szereppel bírnak (Kroemer és mtsai., 2000). Öregedési folyamatok kapcsán mind a mitokondriális DNS, mind a mitokondriumok membránjának károsodását leírták (Toescu és mtsai., 2000; James és mtsai., 2002; Schon és mtsai., 2003). A mitokondrium membránok eltérései, azok

cardiolipin tartalmának csökkenése, a légzési lánc működését, az energiatermelést (Paradies és mtsai., 1997), valamint a mitokondrium és a sejt Ca^{2+} homeosztázisát károsan befolyásolják (Rottenber és Wu, 1997; Gabbita és mtsai., 1998; Sugrue és Tatton 2001; Crompton, 2004;). Az energiatermelés csökkenésének következménye a károsodott karnitin-mediált lipid transzport, csökkent mitokondriális lipid metabolizmus (Batelli és mtsai., 1992; Zammit és mtsai., 1998), koleszterin bioszintézis (Beaumont és mtsai., 1988; Campbell és mtsai., 2002; Hansson és mtsai., 2003; Papadopoulo 2003), piruvát-dehidrogenáz komplex aktivitás (Denton és mtsai., 1975; Robison és Kuwabara 1975), és végül apoptotikus folyamatok indukálódása (Szabo és mtsai., 2004). Korábbi tanulmányok idősekben, illetve AMD esetében a mitokondriális DNS károsodását, valamint az RPE sejtek számának csökkenését is leírták (Barreau és mtsai., 1996; Barron és mtsai., 2001; Del Priore és mtsai., 2002; Liang és Godley 2003), azonban mostanáig nem vizsgálták a mitokondriális membránok szerkezeti eltéréseit időskori macula-degeneráció esetében.

Az időskori macula-degeneráció korai formáinak kezelési lehetőségei

A betegség háttérében álló oxidatív károsodás (Bird, 2003) csökkentése céljából a kezelésben régóta szerepet kapnak antioxidáns hatású vegyületek. Ugyanakkor, egy korábbi klinikai előtanulmány során a mitokondriumok metabolizmusát fokozó, ún. „mitochondriotrop” vegyületeket tartalmazó készítmény alkalmazásával is kedvező eredményeket értek el a időskori macula-degeneráció kapcsán (Fehér és mtsai., 2003). Ilyen „mitochondriotrop” vegyületek az acetil-L-karnitin, az $\omega 3$ zsírsavak és a koenzim-Q10. A karnitin a béta-oxidációban szereplő játszó lipid transzporter vegyület (Kerner és Hoppel 2001), az acetil csoport az elektrontranszportban vesz részt (Levine és mtsai., 2003), az acetil-L-karnitin pedig a belső membrán protein felépítésében bír fontos szereppel (Villa és mtsai., 1988). Az $\omega 3$ zsírsavak a membránok alkotóelemeiként a sejt falban (Leaf és mtsai., 2002), illetve a sejtorganellek falában is megtalálhatók, elsősorban a neuronális szövetekben (Uauy és mtsai., 2000; Simopoulos 2002), azok fejlődését (Youdim és mtsai., 2000), valamint lipidszintézisét befolyásolva (Clarke 2001; Nakamura és mtsai., 2001). A koenzim Q10 antioxidáns hatású vegyület, mely a mitokondriális elektron transzport lánc

tagja (Papucci, 2003), a plazmában redox (Crane, 2001) és metabolikus folyamatokban (Yamamura, 2001) vesz részt. Korábbi adatok szerint ezen vegyületek a mitokondriumokban különböző szervekben, (Barzanti és mtsai., 1994; Pepe, 2000) köztük a retinában is (Rodriguez és mtsai., 1999; Wang és Saito, 2001) felhalmozódva az RPE funkcióját javítják (Furuno és mtsai., 2001), hatásukat jellemzően szinergista módon kifejtve (Atamna és mtsai., 2001).

Noha korábbi tanulmányok az antioxidáns hatású készítmények kedvező hatásairól számoltak be, valamint egy kis betegszámon végzett klinikai előtanulmány során a „mitochondriotrop” vegyületek kedvező hatását találták, mind a mai napig nem vizsgálták sem a mitokondriumok morfológiai változásait, sem a mitokondriumok anyagcseréjét javító „mitochondriotrop” vegyületek hatását összehasonlító prospektív klinikai tanulmány keretében AMD esetében.

Célkitűzések

A bevezetésben tárgyalt elméleti megfontolások alapján célul tűztük ki, hogy:

1. Megvizsgáljuk az érzőideg ingerlés könnytermelésre kifejtett hatását állatkísérletes modellben
2. A retinában expresszáladó neurotranszmitterek mennyiségét vizsgáljuk ugyanezen állatkísérletes modellben
3. Az ideghártya morfológiai elváltozásait tanulmányozzuk humán anyagon időskori macula degeneráció kapcsán
4. A mitokondriális anyagcsere javításának hatását vizsgáljuk a macula degeneráció lefolyására összehasonlító klinikai tanulmány során

Módszerek

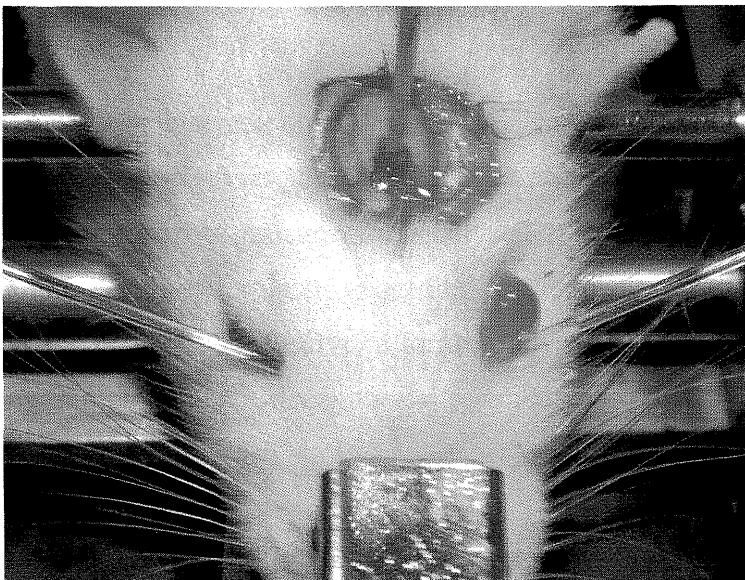
Érzőideg ingerlés hatása a könnytermelésre, valamint a retinális neurotranszmitterek expressziójára állatkísérletes modellben

A neurogén gyulladás kísérletes vizsgálatának lehetőségei

A perifériás idegek általában vegyesen tartalmaznak mozgató, érző és vegetatív rostokat. Amennyiben csak az érzőrostokat kívánjuk izgatni, lehetőségünk van farmakológiai eszközökkel, perifériás izomrelaxánsokkal, szimpatolitikumokkal és paraszimpatolitikumokkal blokkolni a motoros és vegetatív idegi szabályozást. Az érzőidegek ingerlése létrehozható az idegrostok antidrómos elektromos stimulációjával is (Andersson, 1987). Ilyenkor az elektromos impulzusok antidrómos irányban, a periféria felé terjedve jutnak el az idegvégződésig, ahol kiváltják a neuropeptid tartalmú vezikulák felnyílását, és a felszabaduló peptidok saját receptoraikon hatva értágulatot, plazmakiáramlást okoznak, vagyis lokális hatásként létrejön a neurogén gyulladás jelensége.

Az állatkísérletes modell során 250-350 g súlyú hím Wistar patkány trigeminus ganglionjának szelektív ingerlését végeztük el sztereotaxiás elektróda segítségével, a korábban leírt metodika szerint (Jancsó és mtsai., 1967; Peitl és mtsai., 1999). Az állatkísérletek az 1998 évi XXVIII számú „Az állatok védelméről és kíméletéről” szóló törvény és végrehajtási rendeletnek, valamint a Pécsi Tudományegyetem állatkísérleti etikai kódexe ajánlásainak megfelelően történtek. Az állatok elaltatását (thiopentón-nátrium, Trapanal 100 mg/kg ip.) követően intravénás készítmények beadását biztosítandó a femoralis véna preparálását és kanülálását végeztük. A trachea kanülálását követően az állatokat kisállat lélegeztetőgépre kapcsoltuk (SAR-830/P, IITC Inc./Life Science Instrument), melynek segítségével az előzetesen relaxált (pipecuronium-bromid, Arduan 0.3 mg/kg iv.) állatokat ventilláltuk. Az állatok 37 C°-os rectális hőmérsékletét termométerhez kapcsolt infravörös lámpa alkalmazásával biztosítottuk (Experimetria Ltd.). A patkányok fejét sztereotaxiás készülékben rögzítve a fejtető bőrét, az izmokat, valamint a

periosteumot eltávolítottuk, ezt követően a koponyacsonton a saggitális suturától 3.2 mm-re laterálisan, valamint a bregmától hátrafelé 3.7 mm-re 2 mm átmérőjű lyukat fúrtunk. Az elektródát a dura felszínétől számítva 9.5 mm mélyre bocsátva a bal oldali trigeminus ganglion szelektív ingerlését végeztük 20 percen keresztül 15 V, 2 Hz paraméterek mellett. A kísérletek során az ingerlési paraméterek változtatásával különböző számú elektromos beütést alkalmaztunk (300-2400 impulzus). Megerősítendő, hogy a létrejövő hatás a trigeminus ganglion szelektív ingerlésének következménye, fals elektróda pozícióban (2 mm-re a gangliontól) történő ingerlés, illetve a sértési effektus kizárására az elektróda megfelelő pozícióba süllyesztését követően ingerlés nélküli könnytermelés mérés is történt.



2. ábra. A stereotaxiás készülékbe befogott állat feje az megfelelő pozícióba süllyesztett ingerlő elektróda, és a két szemrésbe helyezett kapilláriscső. Jól látható a bal oldali trigeminus ganglion ingerlés hatására fokozódó könnytermelés.

A könnytermelés vizsgálata

Szövetteni vizsgálatok

Az ingerlést követően a szemhéjakat eltávolítottuk, majd 10% formaldehides fixálást követően paraffinos beágyazás történt, ezt követően 10 µm-es metszeteket készítettünk. A mucin

tartalmú kehelysejtek festésére kombinált hematoxilin-eosin perjódsav-Schiff (HE-PAS) festést végeztünk, a metszeteket (Olympus BX-51) fénymikroszkóppal értékeltük 200x nagyítás mellett.

Könnytermelés mérése

Az ingerlés során a termelt könnyet az áthajlásba helyezett kapilláris segítségével gyűjtöttük, különös gonddal eljárva, nehogy a szaruhártya érintésével reflexes könnyezést váltsunk ki. A gyűjtött könny mennyiségét a kapilláriscsőben mm-ben meghatároztuk és rögzítettük.

Kehelysejt sűrűség

A kehelysejtek mucin szekrécióját a kehelysejt sűrűség meghatározásával vizsgáltuk. Fénymikroszkópos vizsgálat során 500 bazális sejt leszámolásával párhuzamosan meghatároztuk az adott kötőhártya szakaszon a kehelysejtek számát is. A vizsgálatot az eltávolított szemhéjak centrális 2 mm-es területén végeztük. A számolást a szemhéjszél-felőli első kehelysejt csoport helyének megfelelően kezdve, a fornix irányába haladva végeztük. A kehelysejt sűrűséget, mint arányszámot a 100 bazális epithelsejtre vonatkozó kehelysejt számként határoztuk meg.

Könnyfehérje analízis

Az összegyűjtött könny mintákból Bradford szerinti fehérjetartalom meghatározás (150 mM TRIS HCl, pH 6.8, 1mM EDTA, 4mM EGTA, 0.2 mM PMSF, 1:25-re hígított mintákból) történt (Bradford, 1976). 3 µg fehérje 12.5%-os SDS (Sodium-Dodecyl-Sulphate) gél elektroforézisét (Laemmli, 1970) követően (Mini Protean 3 - BioRad) a fehérje csíkokat Coomassie Brilliant Blue R250 festéssel, valamint ezüstözéssel erősítettük fel (Willoughby, 1983), a géleket Kodak DC 209 kamerával fotóztuk le. Az egyes csíkok azonosítására a gélen ismert mólsúlyú markerek szolgáltak (Sigma Low Molecular Weight - LMW). A könnyfehérjék közül az IgA és a lizozim kimutatására polyclonális immunglobulin A és lizozim elleni antitestek szolgáltak. 5 µg fehérje hígítása (25 mM Tris, 192 mM glicerin 20% (v/v) metanol, pH 8.3) történt semi-dry (Pharmacia) egységben, majd a mintákat egy éjszakán át inkubáltuk 4°C-on 3%-os puffer oldatban (non fat dry milk buffer, 50 mM Tris-Hclóf pH 7.4, 150 mM NaCl -TBS).

Primer antitestként patkány IgA (kecske 1:50, Sigma), valamint tojásfehérje lizozim (nyúl, 1:50, Acris) elleni antitestet szolgált TBS gél oldatban. Másodlagos antitestként tormagyökér peroxidáz konjugált anti-kecske (nyúl, Dako) és anti-nyúl (sertés, Dako) elleni antitestet inkubálunk 1:1000 hígításban TBS-ben. A mintákat ezt követően Tween tartalmú TBS-ben (IgA esetében 0.05%, lizozim esetében 0.5% koncentrációban) pufferoltuk. Az immunreakciók vizualizálására peroxidase-diamino-benzidine festéssel kombinált, ezüst intenzifikálással (Ludany et al., 1993) erősített chemiluminescencia szolgált. A chemiluminescencia vizsgálat során kapott adatokat Kodak Image Station 2000R digitális képfeldolgozó rendszer segítségével analizáltuk.

Előkezelések

Az állatokat 5 csoportba osztottuk:

1. atropin előkezelés (1 mg/kg i.v.) a muszkarin receptorok gátlására
2. guanethidin előkezelés (8 mg/kg i.p.) a szimpatikus neuronok blokkolására,
3. hexamethonium (10 mg/kg i.v.) a ganglionáris transzmisszió megakadályozására
4. helyileg adott 5 μ l 1%-os kapszaicin oldat (10% etanol, 10% Tween 80, és 80% isotóniás sóoldatban) naponta egyszer, 3 napon keresztül a szenzoros neuropeptidek depletálására,
5. specifikus neurokinin 1 receptor antagonist SR140333 ((S)-1-{2-[3-(3-4-diklorofenil)-1-(3-isopropoxifenilacetát) piperidin-3-yl]etil}-4-fenil-1azoniabicyclo[2.2.2]oktán) adása a P-anyag hatásának kivédésére (240 nmol/kg iv, minimális mennyiségű 96%-os etanolban feloldva, majd 0.9%-os NaCl oldattal a végső térfogatra hígítva.)

Az ideghártya vizsgálata

Immunhisztokémiai módszerek

Az ingerlést követően rögtön eltávolított szemgolyókat PBS-ben történő mosást követően formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. Rotátoros mikrotómmal 10 μ m vastagságú metszeteket készítettünk, zselatinborítású tárgylemezre vittük, és immunhisztokémiai vizsgálatokra korábban leírt módszerek szerint előkészítettük. Az immunhisztokémiai vizsgálatokat nyúl P-anyag ellenes polyclonális antitesttel (anti-SP, Chemicon International), nyúl VIP ellenes polyclonális antitesttel (anti-VIP, Chemicon International), kecske CGRP

ellenes polyclonális antitesttel (anti-CGRP, a Santa Cruz), és nyúl nNOS ellenes polyclonális antitesttel (anti-nNOS, Chemicon International) végeztük. Az optimális antitest hígítást, valamint expozíciós időket a munkacsoport korábbi tanulmányainak eredményei alapján határoztuk meg. Az inkubációt követően a metszeteket kétszer foszfát pufferben mostuk, majd szobahőmérsékleten 90 percig reagáltattuk 1:100 hígítású másodlagos, tormagyökér peroxidázzal konjugált antitestekkel (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA). Az immunreakció feltárására kromogénként 0.05%-os 3,3-diaminobenzidin 0.1%-os H₂O₂ oldata szolgált. A metszeteket ezután mostuk, etanolban dehydráltuk, szintetikus médiummal fedtük, majd fénymikroszkóppal vizsgáltuk. Az endogén peroxidáz aktivitás blokkolása H₂O₂, míg a nem specifikus immunglobulin kötődés 3%-os fetális borjú szérum inkubációs médiumhoz történő adásával történt.

A kezelt és a kontroll oldalról származó metszetsorok értékelése során a létrejövő immunreakciót sötét-barna (intenzív=++), sárgásbarna (enyhe=+), kérdéses (±), vagy festődés nélküli (-) csoportok szerint jellemeztük. Az immunreakciókat a retina négy területén értékeltük: a pigmenthám és a fotoreceptor külső szegmens egység, a külső magvas réteg, a belső magvas réteg, valamint a ganglionsejt réteg területén.

Morfológiai vizsgálatok időskori macula degeneráció esetében

Hátsó pólusi elváltozást nem okozó tumor, illetve sérülés miatt eltávolított 62 szem (2-87 éves) szövettani feldolgoása, illetve elektron mikroszkópos vizsgálata során morfológiai analízist végeztünk. A minták közül 31 esetben a klinikai diagnózis AMD volt (42-87 év), míg 31 korban és nemben identikus, időskori macula-degenerációban nem szenvedő beteg szeme szolgált kontroll csoportként. Az AMD klinikai diagnózisa drusenek, illetve fokális pigment egyenetlenség jelenlétéen alapult, előrehaladott formák (geographicus atrophia, choroidea érújdonképződés) a tanulmányba nem kerültek be.

Elektron mikroszkópiás módszerek

Az enukleációt követően a szemgolyókból kis hátsó pólusi szövet eltávolítása történt, melyet 4C°-on 2%-os pufferelt glutaraldehid oldatban fixáltunk 2 órán keresztül, ezt 2 órán

keresztül 2%-os ozmium-tetroxid oldatban történő utófixálás követte, hogy a mitokondrium membránok integritását fenntartsuk (Zingsheim and Plattner 1976). A dehidrált blokkokat aralditba ágyaztuk, Reichert Ultramicrotom segítségével metszettük, majd ólom-citrátos és uranil-acetátos kontrasztfokozást követően Zeiss 109 típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A parafoveális területen 8.000-szeres nagyításban meghatároztuk a mitokondriumok, a lipofuscin granulomok, valamint a peroxiszómák számát. A mitokondrium cristák számát, valamint a mitokondriumok és a lipofuscin területét 6-8 pigmenhám sejtben 20.000-szeres nagyításban határoztuk meg, melynek során minden organelum körülrajzolását követően a terület számítása NIH Image J program segítségével történt. A morfometriai analíziseket két független vizsgáló végezte.

Követéses macula funkció vizsgálatok mitotrop anyagok alkalmazása során időskori macula-degenerációban

A Pécsi Tudományegyetem Kutatásetikai Bizottsága által jóváhagyott kutatási terv alapján lefolytatott prospektív, kettős vak, placebo kontrollált klinikai tanulmányba bekerült 106 beteg életkora 55-70 év, korai AMD klinikai diagnózisa mellett látásélességük 0.4-0.8 volt. A betegek tanulmányba történő beválogatása meghatározott kritériumoknak megfelelően történt (3. táblázat). A tanulmány megtervezésekor elsődleges vizsgálati paraméternek az automata periméterrel mért foveális érzékenységet (FS), illetve az ebből számított VFMD értéket határoztuk meg, ugyanis korábbi vizsgálatokból ismert, hogy az AMD-s betegek foveális szenzitivitása átlagosan 28.57 ± 1.80 dB (Midea et al., 1997). A vizsgálathoz szükséges mintanagyság kalkulációjának eredményeképpen csoportonként 50 beteg beválogatása volt szükséges, hogy a statisztikai analízisek 80%-os megbízhatósággal jelezzenek 1.008 dB eltérést az automata perimetriával kapott foveális érzékenység értékeiben.

Randomizációt követően a kezelt csoportba tartozó betegek napi 2x1 kapszula Phototrop[®] (összetétele: lásd 4. táblázat) a kontroll csoportba tartozó betegek placebo (ekvivalens mennyiségű szója olaj) kezelésben részesültek 1 évig. A betegek a korábban szedett gyógyszereiket tovább alkalmazták, minden terápiás változást a követési lapokban rögzítettünk. A tanulmány szempontjából kontraindikált gyógyszerek közé tartoztak a retina funkcióját ismerten befolyásoló szteroidok, fenotiazin, valamint antimaláriás szerek. A compliance

ellnőrzése céljából a betegeknek a kontrollvizsgálatokra a megmaradt gyógyszert, illetve az üres dobozokat is magukkal kellett hozniuk. A 3 havonta elvégzett szemészeti illetve belgyógyászati kontroll vizsgálatok során a látásélesség meghatározása és automata látótér vizsgálat történt, valamint digitális fundus fotó készült. A beválogatás során a betegek *jobb látású szemét* (koraibb forma), illetve *rosszabb látású szemét* (előrehaladottabb forma) kijelölve és különválasztva alcsoport analíziseket is végeztünk.

Beválogatási kritériumok
1. Korai stádiumú, kétoldali AMD diagnózisa
2. Látásélesség (Snellen) 0.4-0.8 között
3. Kaukázusi rassz, 55-70 éves életkor
4. Beleegyezés a jelenleg alkalmazott vitamin terápia felfüggesztésébe
5. Motivált, felkészült, kooperáló, a tanulmányban való részvétel feltételeit elfogadó személy
6. Írásbeli beleegyező nyilatkozat aláírása
Kizáró feltételek
1. Késői típusú AMD (geographicus atrophia vagy heges stádium)
2. Exszudatív retina betegség, exszudatív AMD
3. Klinikailag szignifikáns cornea homály vagy cataracta
4. Öröklődő retina dystrophia, degeneratív myopia
5. Kontrollál(hat)atlan glaucoma
6. PVR, rhegmatogén retina leválás
7. Látóideg betegség
8. Aktív intraoculáris gyulladás
9. Refraktív hiba, mely >-4 D vagy $>+6$ D
10. Szignifikáns kardiovaszkuláris, cerebrovaszkuláris betegség
11. Súlyos, vagy kontrollálatlan máj, vese, tüdő vagy pajzsmirigy betegség, cukorbetegség
12. HIV, Hepatitis B, Hepatitis C infekció az anamnézisben, egyéb immunszuppresszált állapot
13. Alkoholizmus, kábítószer abúzus, súlyos mentális betegség az anamnézisben
14. Vegetáriánus, vagy egyéb diéta (<1600 kcal/nap vagy >3500 kcal/nap)
15. Rossz általános állapot
16. Ismert vagy feltételezhető érzékenység a készítmény összetevőivel szemben
17. Kortikoszteroid, fenotiazin, antimaláriás szerek szedése a tanulmányt megelőző 1 hónapban, vagy a tanulmány során

3. táblázat. A Phototrop® tanulmány beválogatási és kizárési kritériumai.

Tápérték kapszulánként		
Energia	KJ	37
	kcal	8,8
Fenérje	g	0,28
Szénhidrát	g	0,15
Zsír	g	0,80
ebből telített zsírsav	g	0,06
egyszer telítetlen zsírsav	g	0,05
többszörösen telítetlen zsírsav	g	0,55
ebből omega-3	g	0,50
ebből EPA	g	0,27
DHA	g	0,18
Koenzim Q10	mg	10,0
Acetil-L-karnitin	mg	100,0

4. táblázat. A Phototrop® kapszula összetétele és tápértéke.

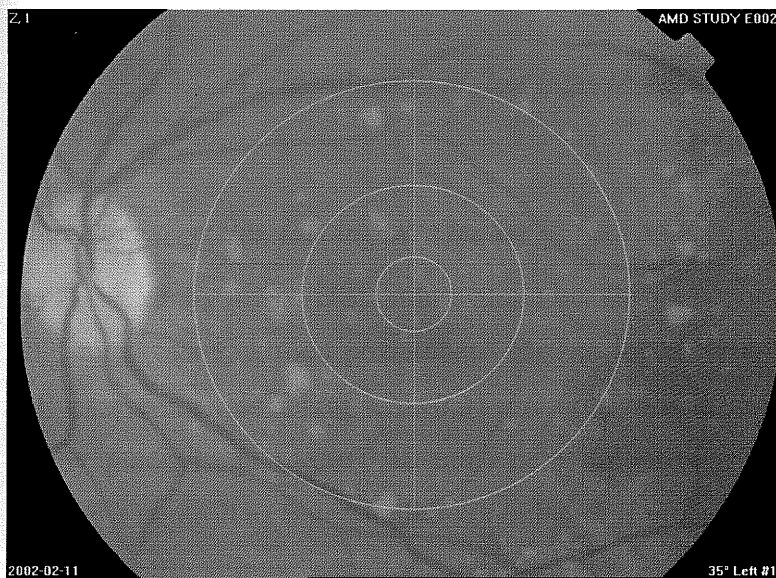
Funkcionális vizsgálatok

1. **Foveal Sensitivity (FS)** automata periméterrel mérve (Humphrey Field Analyzer Model 630, Zeiss, Germany). A vizsgálatokat a centrális 10-2 program alkalmazásával végeztük, melynek során a háttér luminancia 10cd/m^2 volt, a stimulus nagysága Goldmann III értéknek felelt meg. A vizsgálat során a centrális 20 fokban 68 pont érzékenységének meghatározása történt.
2. **Visual Field Mean Defect (VFMD)** automata periméterrel mérve.
3. **Látásélesség** Snellen táblán (Projector, Zeiss, Jena, Germany), valamint ETDRS (Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study) táblán (General Electric F20T12 D 20W Daylight, Lighthouse Low Vision Product 36-02, Long Island City, New York, USA) meghatározva.

Morfológiai vizsgálatok

A digitális fundus fotókat funduskamera segítségével (Topcon Retinal Camera TRC 50ix) készítettük a centrális 35 fokos területről. A digitális képfeldolgozás Sony 3CCD kamera (Model DXC950P) segítségével 768x576 pixeles felbontásban, Topcon Image Net 1.53 szoftver segítségével történt. A fotókat utólagos képmanipuláció nélkül, 15 colos monitoron (IBM Model 6639-U3N, IBM, Armonk, New York, USA) értékeltük. A fundusfotókra a foveára centralizáltan 6000 μm átmérőjű köröket illesztettünk, majd ezen körön belül meghatároztuk a különböző mérettartományokba (<63, <125, <250, <500 μm) tartozó drusenek számát számítógépes képszerkesztő program segítségével (Adobe PhotoDeluxe, Adobe Inc., CA, USA). A különböző mérettartományokba eső drusenek számát összegezve minden esetben kiszámítottuk a drusenek

által elfoglalt összterület nagyságát.



20. ábra. A képszerkesztő programba importált digitalizált szemfenéki kép, és a foveolára-centrált 6000 μm átmérőjű kör, melynek területén történt az értékelés.

Statisztikai módszerek

Az állatkísérletes, valamint elektronmikroszkópos tanulmányaink során a kapott adatokat $\text{mean} \pm \text{SEM}$ formában, a klinikai vizsgálat során gyűjtött adatokat $\text{mean} \pm \text{SD}$ formában kifejezve Statistica 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) program segítségével elemeztük.

A regressziós analízisek során meghatároztuk a változók közötti p és Pearson r értékeket. Az adatok normalitását Shapiro-Wilk's W teszt segítségével ellenőriztük, a csoportokat Mann-Whitney U teszt segítségével hasonlítottuk össze. Az állatkísérletek során alkalmazott előkezelések hatását faktoriális ANOVA, valamint post-hoc Dunnett teszt alkalmazásával vizsgáltuk. A klinikai tanulmány során készített 2×2 táblázatok analízise Fischer-teszt segítségével történt.

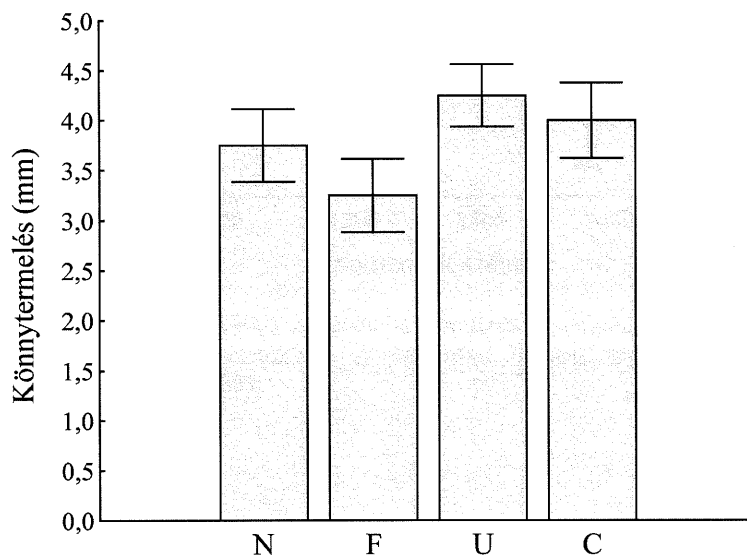
Eredmények

A trigeminus ganglion ingerlésének hatása a könnytermelésre

Alap könnytermelés, fals ingerlés hatása

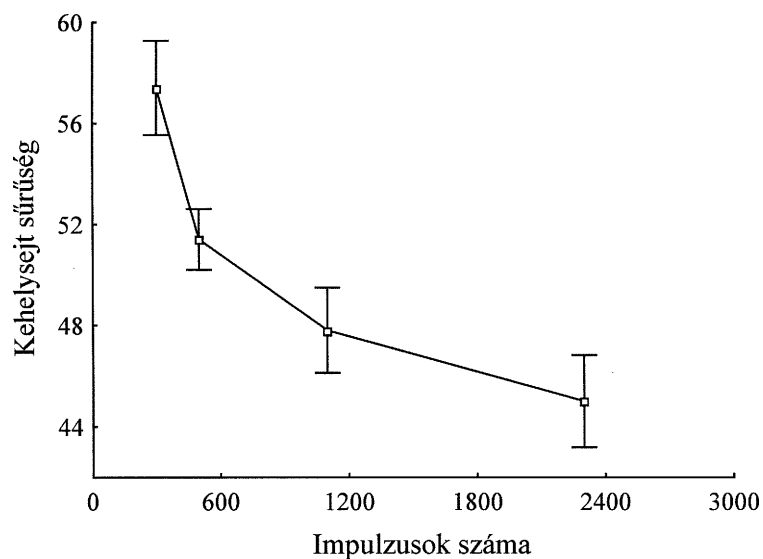
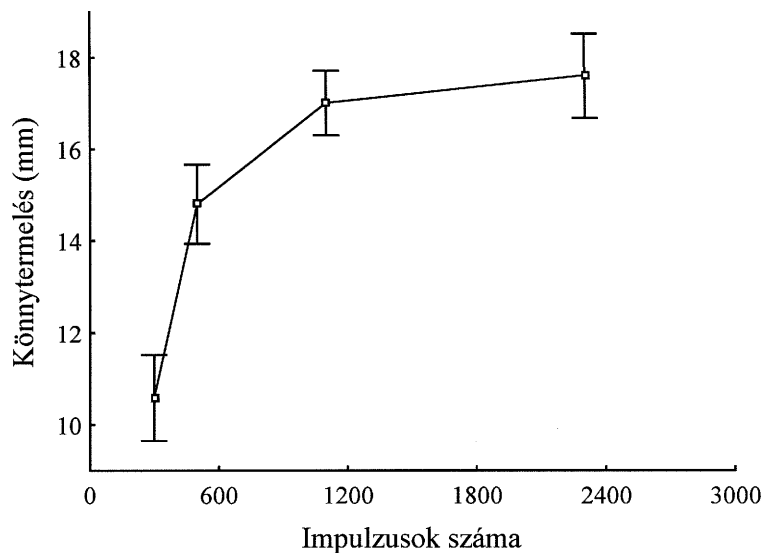
A könny mennyisége mindenfajta beavatkozástól mentes állatok eseteiben 3.75 ± 0.37 mm volt, míg „fals elektróda pozícióban” történő ingerléskor 3.25 ± 0.37 mm, a megfelelő pozícióba süllyesztve ingerlés nélkül 4.25 ± 0.31 mm volt. Miután az ingerelt állatok kontralaterális oldalán a könny mennyisége (4.00 ± 0.38 mm) nem különbözött az alap szekréciótól ($p > 0.05$), minden esetben a kontroll az ingerelt állat kontralaterális oldala volt (3. ábra).

A trigeminus ganglion ingerlése növekvő számú impulzussal (300-600-1200-2400 impulzus) egyre nagyobb mértékű hatást váltott ki. Amíg a termelt könny mennyisége 10.6 ± 0.93 mm-ről 17.6 ± 0.93 mm-re nőtt, addig a kehelysejt sűrűség a 57.4 ± 1.86 értékről 45 ± 1.81 kehelysejt/100 bazális sejt értékre csökkent. Az impulzusok száma és a létrejövő hatás erős korrelációt mutatott ($r = 0.69$, $p = 0.0007$ és $r = -0.72$, $p = 0.0003$, 4. és 5. ábra)



3. ábra. Könnytermelés mértéke beavatkozás nélkül (N); fals elektróda pozícióban történő ingerlést követően (F); stimuláció nélkül, megfelelő pozícióba süllyesztett elektróda mellett (U), illetve a stimulált trigeminus ganglionnal ellentétes oldalon (C). A könnytermelésben a négy csoport között nem mutatkozott statisztikailag szignifikáns eltérés ($n=4$, $p > 0.05$).

4. ábra. Növekvő számú (300-600-1200-2400) elektromos impulzus (15V, 0.5-2 Hz, 10-20 perc, n=5) hatása a könnytermelésre előkezelés nélküli esetekben. A kapcsolat lineáris regressziós analízissel statisztikailag szignifikánsnak bizonyult ($r=0.69$, $p=0.0007$).

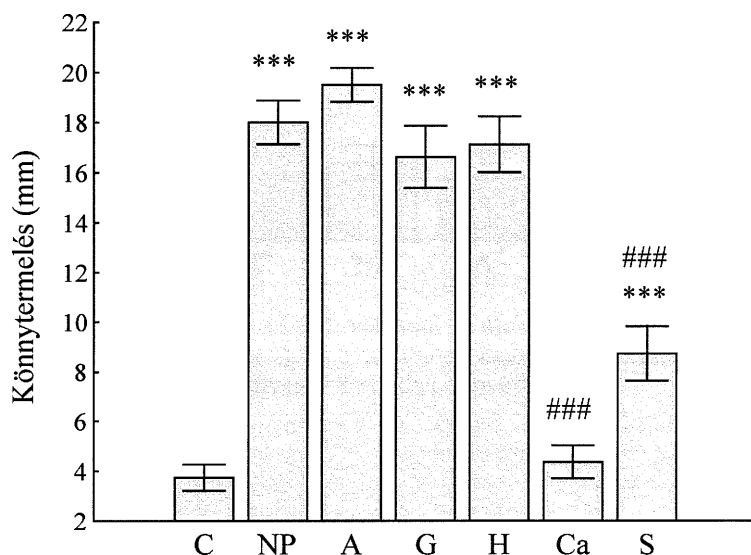


5. ábra. Növekvő számú (300-600-1200-2400) elektromos impulzus (15V, 0.5-2 Hz, 10-20 perc, n=5) hatása a kehelysejt sűrűsége előkezelés nélküli esetekben. A kapcsolat lineáris regressziós analízissel statisztikailag szignifikánsnak bizonyult ($r=-0.72$, $p=0.0003$).

Előkezelések hatása az érzőideg ingerlés kiváltotta könnytermelésre

Előkezelés nélkül a könny mennyisége az ingerelt oldalon 18.00 ± 0.86 mm az ellenoldalon 3.75 ± 0.53 mm volt ($p < 0.0001$). Atropin, guanethidin és hexamethonium előkezelés a stimulált könnytermelést nem gátolta (atropin: 19.50 ± 0.68 mm, guanethidin: 16.63 ± 1.24 mm,

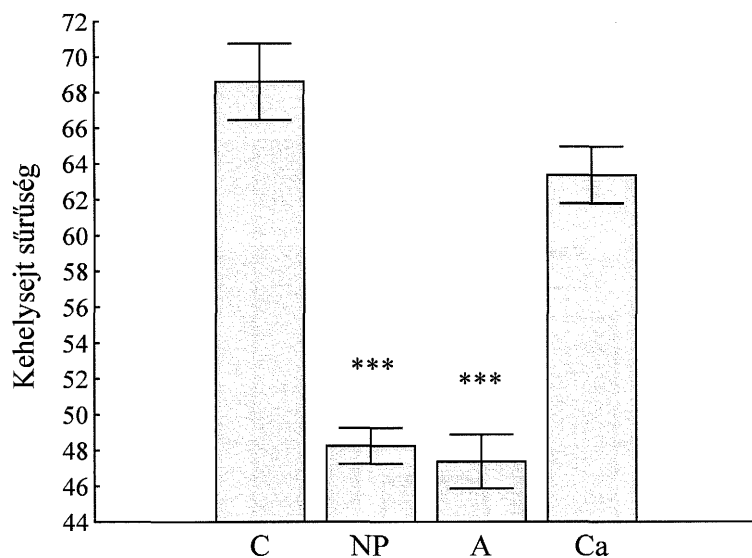
hexamethonium: 17.13 ± 1.11 mm, $p > 0.05$). Mind a kapszaicin, mind az NK1 receptor antagonistista SR140333 előkezelés szignifikánsan gátolta a stimulált könnytermelést (4.39 ± 0.65 mm és 8.75 ± 1.09 mm, $p < 0.0001$), ugyanakkor SR140333 előkezelést követően a könnytermelés szignifikánsan magasabb maradt a stimulált oldalon, összehasonlítva a kontroll oldallal (6. ábra).



6. ábra. A könnytermelés mértéke kontroll szemekben (C); az elektromos stimuláció hatása előkezelés nélkül (NP); valamint 1mg/kg iv atropin (A); 8mg/kg ip guanethidin (G); 10 mg/kg iv hexamethonium (H); 5 μ l 1%-os kapszaicin szemcsepp (Ca); és 160 μ g/kg iv SR140333 (S) előkezelést követően.*** $p < 0.0001$ az alapszekrécióval összehasonlítva és ### $p < 0.0001$ az előkezelés nélküli állatokban mért stimulált könny szekrécióhoz hasonlítva; n=8 minden csoportban.

Kehelysejt sűrűség (mucin szekréció)

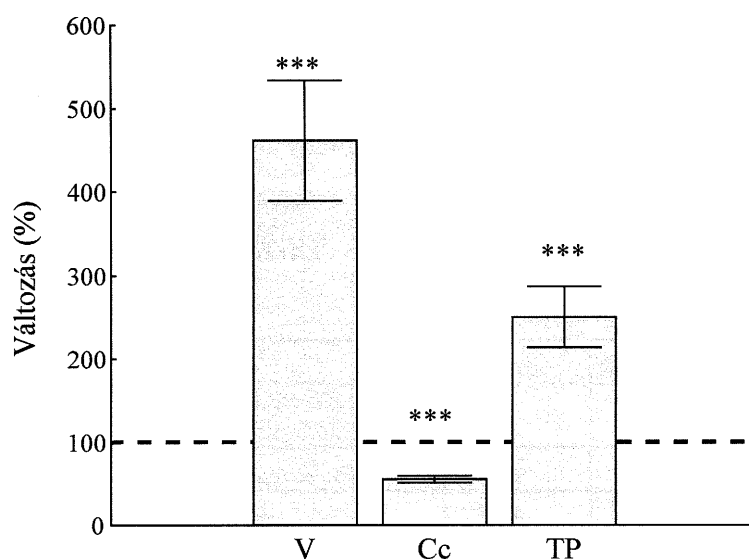
Előkezelés nélkül a kehelysejt sűrűség 48.25 ± 0.99 volt a stimulált és 68.63 ± 2.15 a kontroll oldalon ($p < 0.001$). A kehelysejtek számának csökkenését atropin előkezelés nem befolyásolta (47.38 ± 1.50 , $p > 0.05$), ugyanakkor kapszaicin előkezelés az ingerlés hatását szignifikánsan gátolta (63.38 ± 1.58 , $p < 0.001$, 7. ábra).



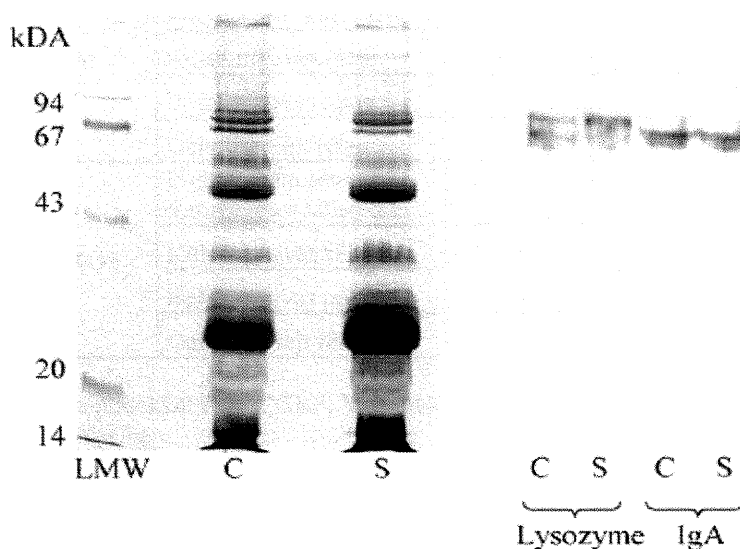
7. ábra. Kehelysejt sűrűség a kontroll szemekben (C); valamint az elektromos ingerlés hatása a kehelysejt sűrűsége előkezelés nélkül (NP); 1 mg/kg iv atropin (A) és 5 µl 1%-os kapszaicin szemcseppel (Ca) történő előkezelést követően. *** $p < 0.0001$ a kontrollal összehasonlítva; $n = 8$ minden csoportban.

Könnnyfehérje koncentráció

A könnny fehérje koncentrációja előkezelés nélküli esetekben 10.23 ± 0.89 µg/µl volt a stimulált, és 18.40 ± 1.52 µg/µl ($p < 0.005$) a kontroll oldalon. Miután a termelt könnny összmenyisége fokozódott (8.13 ± 1.05 µl a stimulált oldalon ill. 1.76 ± 0.27 µl a kontroll oldalon, $p < 0.005$) az összesen szekretált fehérje mennyisége is jelentősen fokozódott a stimulált oldalon (83.17 ± 11.03 µg ill. 32.35 ± 4.28 µg, $p < 0.005$, 8. ábra). Előkezelés nélküli mintákat vizsgálva a könnny SDS gél elektroforézissel nyert fehérje mintázata nem mutatott látható eltérést a két oldal között, valamint ugyanazon mennyiségű fehérje minták immunhisztokémiai analízise luminol chemilumineszcencia módszerével hasonló mennyiséget mutatott a vizsgált proteinekből a két oldalon (lizozim: 2711 ± 347 vs. 2802 ± 331 impulzus, $p > 0.05$, és IgA: 2718 ± 369 vs. 2383 ± 281 impulzus, $p > 0.05$, 9. ábra).



8. ábra. A termelt könny mennyisége (V), protein koncentrációja (Cc) és a termelt összfehérje mennyisége (TP) Bradford módszerrel mérve. A szaggatott vonal (100%) a kontroll oldal átlagos értékeit jelöli. A könnytermelésben kifejezett növekedés (462±72%); a fehérje koncentrációban csökkenés (55.6±4.2%); az összesen termelt fehérje mennyiségében markáns növekedés (257±36%) figyelhető meg, mely a kontrollhoz képest statisztikailag szignifikánsak bizonyult. *** $p < 0.0001$ a kontroll oldal átlagos értékével (100%) összehasonlítva, $n=8$.



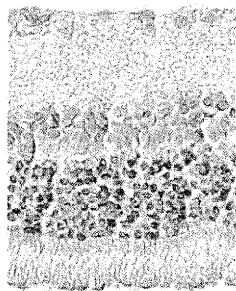
9. ábra. 3 μ g protein SDS gél elektroforetikus analízise során a fehérje mintázat nem mutatott látható eltérést a két oldal között, ugyanakkor ezüst intenzifikálással kombinált Coomassie Brilliant Blue festést követően számos elektroforetikus protein sáv figyelhető meg. Polyclonális patkány IgA (kecske, 1:50) és lizozim (nyúl, 1:50), valamint torma gyökér peroxidáz konjugált másodlagos immunglobulinok segítségével ezen fehérje frakciók szelektíven láthatóvá tehetők. Ugyanazon mennyiségű fehérje minták analízise luminal chemilumineszcencia módszerével hasonló mennyiséget mutatott a két proteinből a két oldalon (lizozim: 2711±347 vs. 2802±331 impulzus, $p > 0.05$, és IgA: 2718±369 vs. 2383±281 impulzus, $p > 0.05$).

Antidrómos ingerlés hatása a retinában expresszáldó neuropeptidekre

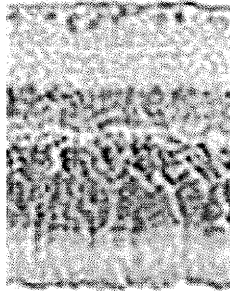
A kontroll szemekben kérdéses, vagy enyhe immunreakciók alakultak ki SP, VIP és nNOS ellen a külső és belső magvas rétegben, valamint SP ellen a ganglion sejt rétegben. Ugyanakkor CGRP elleni immunreakciót egyik rétegben sem tapasztaltunk. A stimulált oldalon kifejezett immunreakciót figyeltünk meg SP, CGRP, VIP, valamint nNOS ellen a retina mind a négy vizsgált rétegében.

		Kontroll	Stimulált
SP	Pigmenthám réteg / fotoreceptor külső tag	-	++
	Külső magvas réteg	±	++
	Belső magvas réteg	±	++
	Ganglion sejt réteg	±	++
CGRP	Pigmenthám réteg / fotoreceptor külső tag	-	++
	Külső magvas réteg	-	++
	Belső magvas réteg	-	++
	Ganglion sejt réteg	-	++
VIP	Pigmenthám réteg / fotoreceptor külső tag	-	++
	Külső magvas réteg	+	++
	Belső magvas réteg	+	++
	Ganglion sejt réteg	-	++
nNOS	Pigmenthám réteg / fotoreceptor külső tag	-	++
	Külső magvas réteg	±	++
	Belső magvas réteg	±	++
	Ganglion sejt réteg	-	++

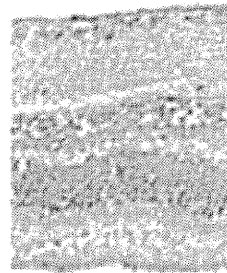
2. táblázat: A vizsgált neuropeptidekkel (SP, CGRP, VIP, nNOS) szembeni immunrakciók a kontroll és a stimulált oldalon a retina különböző rétegeiben.



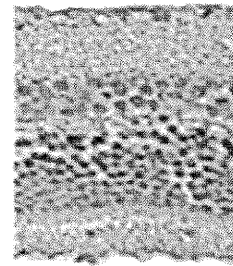
SP kontroll



SP stimulált



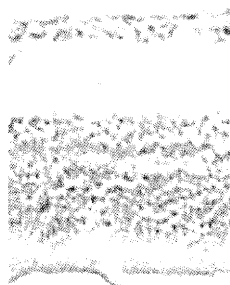
CGRP kontroll



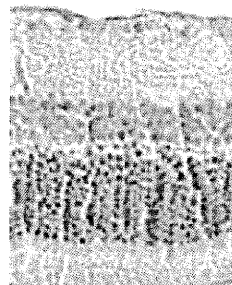
CGRP stimulált



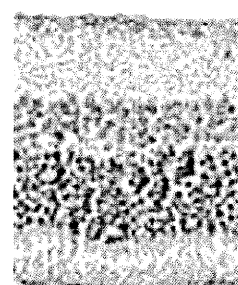
VIP kontroll



VIP stimulált



nNOS kontroll



nNOS stimulált

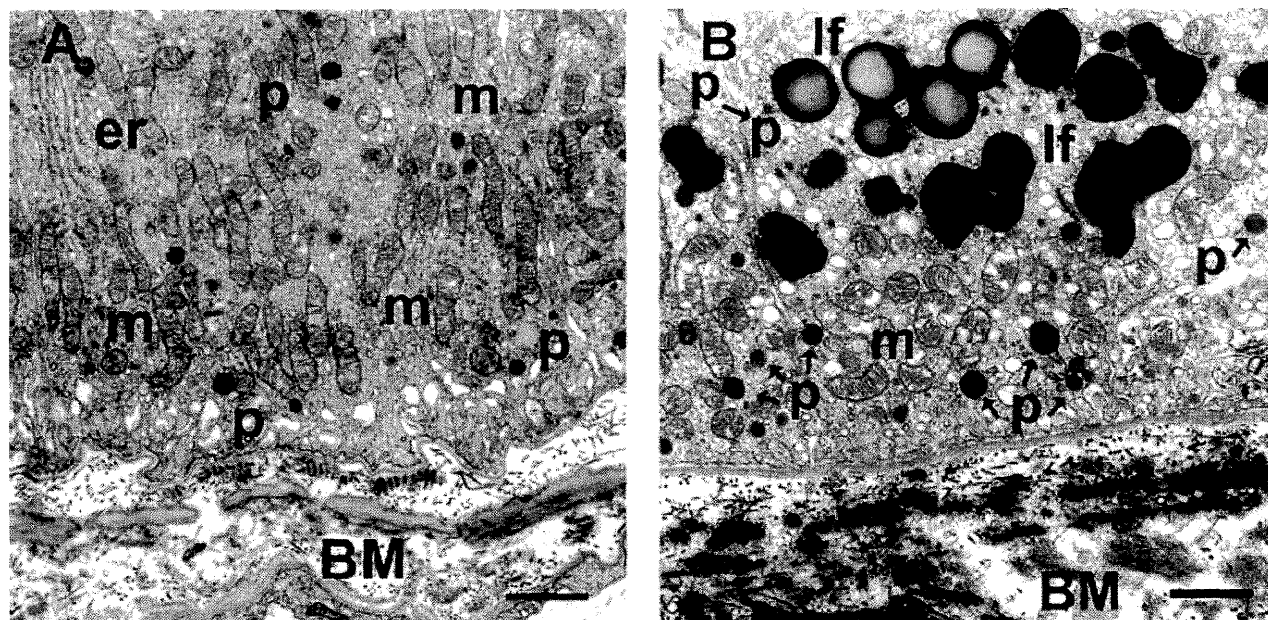
10. ábra. Az antidrómos érzőideg ingerlés hatására fokozott SP, CGRP, VIP és nNOS immunreaktivitás figyelhető meg az ingerelt oldalon.

Elektronmikroszkópos eltérések időskori macula degeneráció esetében

Korral járó elváltozások

A fiatal RPE sejtekben számos, pálcaformájú, az apiko-bazális tengellyel párhuzamos mitokondrium figyelhető meg, jól megőrzött crista szerkezettel. Idősebb, nem AMD-s szemekben a mitokondriumok száma lényegesen alacsonyabb, inkább ovoid alakúak, orientációjuk kevésbé szabályos, valamint méretük változó. Nagyrészt normális szerkezetű cristákat tartalmaznak, bár esetenként fokális dezorganizáció figyelhető meg. Normális, idős szemekben a peroxisómák száma fokozott, alakjuk és elektron denzitásuk változóbb. Továbbá, míg fiatal szemekben

eloszlásuk egyenletes volt, addig idős szemekben jellemzően kis csoportokat alkottak. A lipofuscin granulumok jelenléte fiatalabb szemekben rendkívül ritka, azonban idős mintákban jellemző, ahol számos esetben a melanoszómmákkal összekapcsolódva melano-lipofuscin granulumokat képezve az RPE sejtek apicalis részén helyezkedtek el (11. ábra).

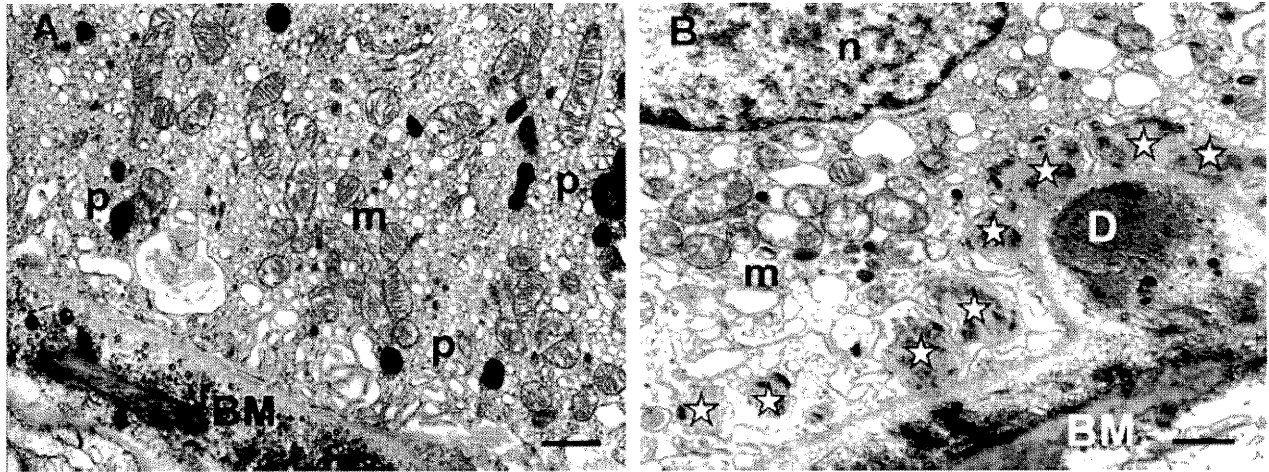


11. ábra. A pigmethám (RPE) és a Bruch-membrán elektronmikroszkópos képe. (A) Jól megfigyelhető, hogy a fiatal RPE sejtek számos pálcika alakú mitokondriumot tartalmaznak (m), hosszanti tengelyükkel az apico-bazális iránynak megfelelően orientálódnak. Szorosan egymás mellett, egymással párhuzamosan helyezkednek el a citoplazma nagy részét kiöltve. A mitokondrium cristák jól definiáltak, valamint a mátrix homogénelektrodenznek mutatkozik. A citoplazmában durva felszínű endoplazmatikus reticulum (er) is megfigyelhető számos kis vezikula, feltehetően mikroszóma mellett. Számos peroxiszóma (p) is látható kis, kerek, elektrodenz organelleként ábrázolódva, azonban lipofuscin granulum nem látható. A plazma membránnak számos bazális betüremkedése látható. Jól látható a Bruch-membrán (BM) ultrastruktúrája az elasztikus belső réteggel, a külső és belső kollagén réteggel, az RPE és a choriocapillaris réteg bazálmembránja kíséretében. 2 éves fiú, nagyítás: 19.200x (vonal=1 μ m). (B) Az idős RPE sejtekben látható mitokondriumok (m) membránja dezorganizált. Túlnyomórészt a cristák fokális hiánya, a mátrix csökkent elektrodenzitása figyelhető meg. Számos lipofuscin (lf) és melano-lipofuscin granulum figyelhető meg a sejtplazmában. Számos, különböző denzitású, alakú, és méretű peroxiszóma (p) helyezkedik el szétszórtan a citoplazmában, helyenként a lipofuscin granulumok mellett. Homogén vagy granuláris szerkezetű elektrodenz anyag is megfigyelhető a Bruch-membránban (BM). 71 éves nő, nagyítás: 19.200x (vonal=1 μ m).

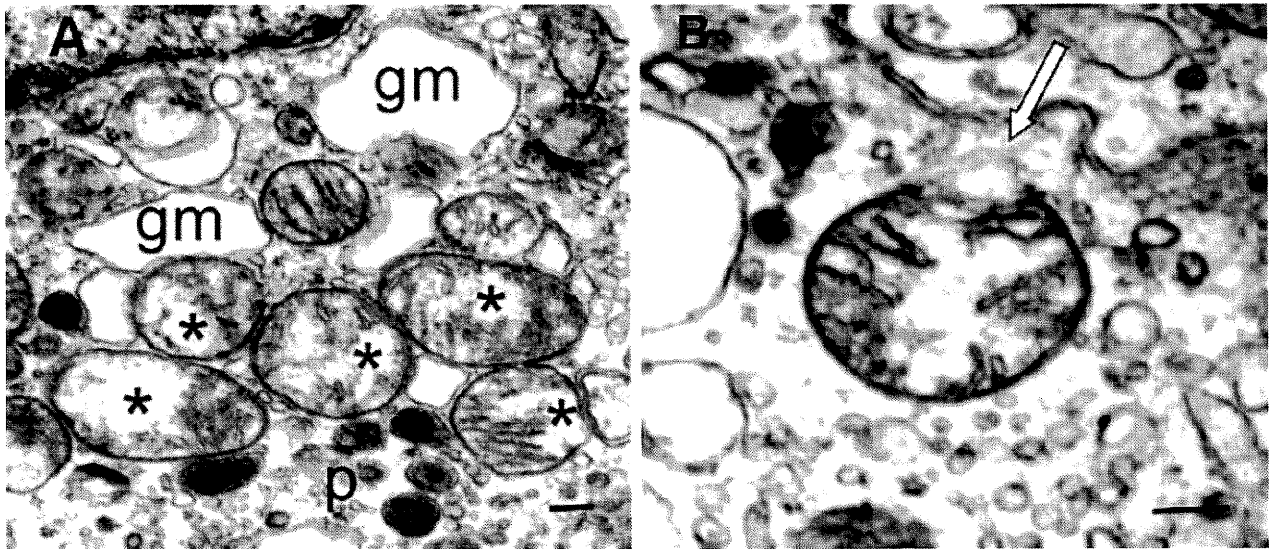
AMD esetében kialakuló elváltozások

AMD esetében a mitokondriumok száma csökkent az egészséges kontrollokhoz viszonyítva, valamint az alakjuk is inkább ovoid, belsejükben fokálisan, esetenként nagyobb területeken a cristák dezorganizációja figyelhető meg. Ugyanakkor az AMD kialakulására specifikus elváltozásokat nem találtunk, csak a normál idős szemekben látott eltérések fokozott jelenlétét. Szemben a normál szemekkel a peroxiszómák és a lipofuscin granulomok elhelyezkedése rendkívül változó volt AMD esetében (12-13. ábra). Ezen osmium-tetroxid fixált mintákban a peroxiszómák elektrodensitása változó volt. Ez feltehetően a lipid-peroxid tartalmukkal állt összefüggésben, melynek megfelelően az elektrodensebb peroxiszómák kevesebb lipid peroxidot tartalmaztak, illetve fordítva (Zingsheim és Plattner, 1976).

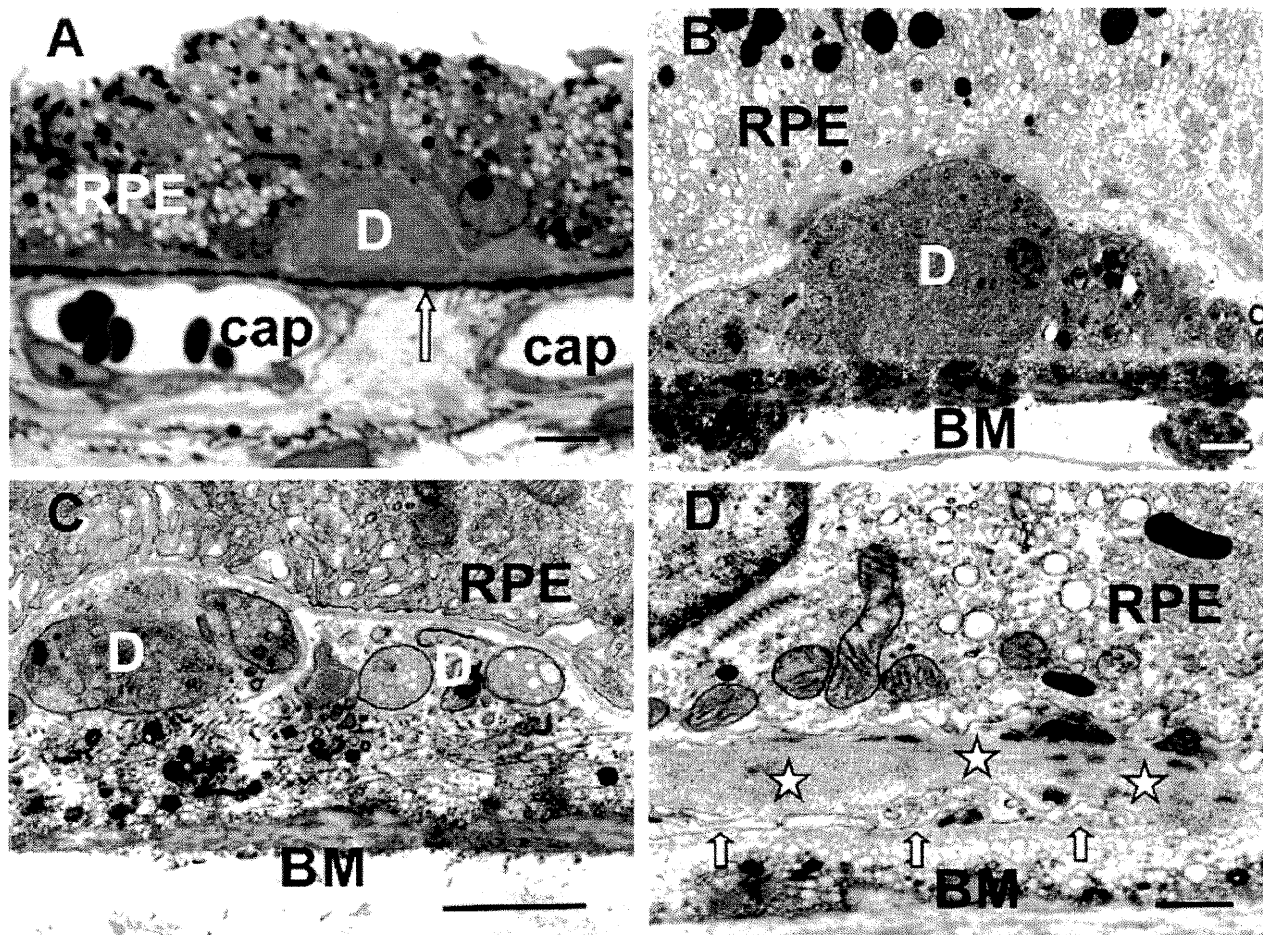
A Bruch-membrán is jellegzetes eltéréseket mutatott AMD esetében az egészséges idős szemekkel összehasonlítva. A korral járó megvastagodás, valamint a kollagén réteg elektrodensebbé válása mellett AMD esetében a belső kollagén membránon fokális megvastagodások mutatkoztak, melyek a klinikailag is detektálható kemény, illetve puha druseneknek felelhetnek meg. Mindkettő az RPE fokális elemelkedését okozta, azonban kemény drusenek esetében ez körülírtabb, elektrodensebb volt. A drusenek mellett több helyen az RPE bazálmembránjának körülírt megvastagodása is megfigyelhető volt, mely az ún. „basal laminar” depozitumoknak felelhet meg. A legtöbb esetben ezek valamilyen, feltehetően lipideket tartalmazó filamentózus anyagnak fokális, szemölcszerű lerakódásai voltak. Több helyen a pigmenthám sejtmembránjából kis nyúlványok húzódtak ezen lerakódásokhoz (14. ábra)



12. ábra. Mitokondriumok összehasonlítása idős és AMD-s RPE sejtekben. (A) Normális öregedés során a mitokondriumok (m) többségének morfológiája típusos, noha néhány esetben a cristák fokális elvesztése, a mátrix elektrodensitásának csökkenése látható. A képen az RPE és a choriocapillaris réteg vékony bazálmembránja, az elasztikus réteg megszakadásai, és a Bruch-membrán (BM) mentén amorf anyag lerakódása is megfigyelhető. Néhány kis kerek depozitum is látható a Bruch-membrán kollagén rétegében. 83 éves nő, nagyítás 18.000x (vonal=1 μ m). (B) AMD esetében kifejezett mitokondriális (m) eltérések figyelhetők meg az RPE sejtekben. A legtöbb mitokondriumban a membránok súlyos dezorganizációja látható a lokális vesztéségtől a teljes hiányig terjedve a mátrix csökkent elektrodensitásának kíséretében. Számos peroxiszóma (p) ábrázolódik véletlenszerűen elhelyezkedve az RPE sejt citoplazmájának bazális részén. Az RPE bazálmembránján fokális megvastagodások (csillag) és drusenek (D) ugyancsak láthatók a Bruch-membránban (BM). Néhány citoplazmatikus nyúlvány benyomódik a megvastagodott bazálmembránba. (n: nucleus). 84 éves nő, nagyítás 18.000x (vonal=1 μ m).



13. ábra. Az ábra szemléletesen mutatja az AMD esetében megfigyelhető mitokondriális elváltozásokat. (A) Kifejezett crista és matrix denzitás vesztés (csillagok) fordul elő a legtöbb mitokondriumban. Sok esetben a belső struktúra teljesen elvész, és ún. „ghost-mitochondrium” alakul ki (gm). Néhány peroxiszóma (p) a mitokondriumok mellett helyezkedik el. 83 éves nő, nagyítás 40.000x (vonal=1 μ m). (B) Feloldódás és tasak képződés a mitokondrium belső és külső membránjában (nyíl). 84 éves nő, nagyítás 54.000x (vonal=1 μ m)



14. ábra. A Bruch-membrán AMD esetében megfigyelhető hisztopatológiai eltérései. (A) A Bruch-membrán és a pigmenthám toluidin-kék festett fénymikroszkópos metszeteken. Egy nagy, valamint egy kisebb dóm alakú druzsen (D) elemeli az RPE sejteket (cap: choriocapillaris). 72 éves nő, nagyítás 800x, (vonal=10 μ m). (B) Egy kemény druzsen (D) mely homogén elektrodenz anyagot tartalmaz. 72 éves férfi, nagyítás 12.000x (vonal=1 μ m). (C) Egy puha druzsen (D), mely membránhoz hasonló anyagot tartalmaz, valamint változó elektrodenzitású vezikuláris és granuláris anyagot. 74 éves férfi, nagyítás 32.000x (vonal=1 μ m). (D) Az RPE bazálmembránjának megvastagodása (csillag) finom filamentosus szerkezetet mutat fokálisan fokozott elektrodenzitással. Néhány citoplazmatikus nyúlvány a megvastagodott bazálmembránba nyúlik (nyilak). Az RPE sejtek kisszámú, változatos alakú és méretű mitokondriummal rendelkeznek. A belső kollagén réteg számos elektron-világos vakuólumot tartalmaz. 84 éves nő, nagyítás 19.200x (vonal=1 μ m).

Morfometriai eredmények

A korrallal a mitokondriumok száma szignifikánsan csökkent mind a normál ($r^2=0.455$; $p<0.001$), mind az AMD-s szemek ($r^2=0.778$; $p<0.001$) esetében; a különbség a két csoport között szignifikánsnak bizonyult ($p=0.038$, 15. ábra).

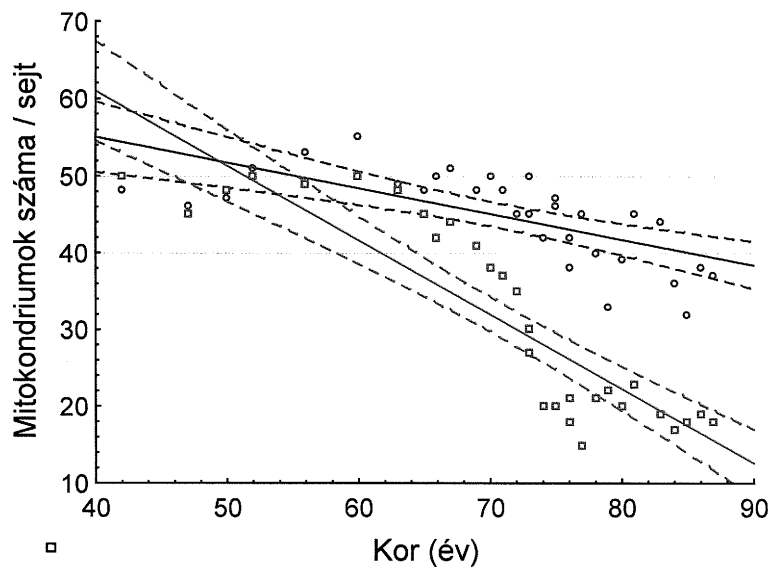
A mitokondriumok területe szintén szignifikánsan csökkent mind normál esetben ($r^2=0.743$; $p<0.001$), mind AMD-s szemekben ($r^2=0.919$; $p<0.001$) a korrallal, a két csoport közötti

különbség szintén szignifikánsnak bizonyult ($p=0.019$, 16. ábra).

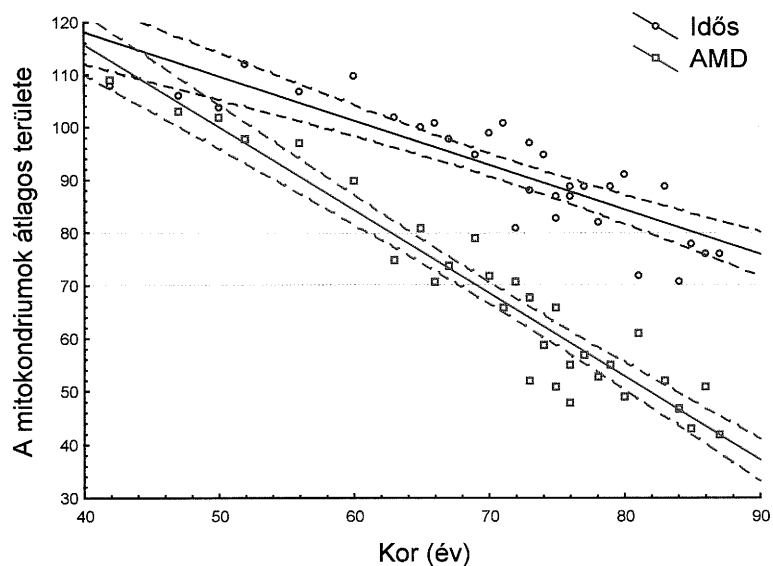
A jól definiált mitokondrium cristák aránya szintén jelentős csökkenést mutatott a korról normál ($r^2=0.861$; $p<0.001$), illetve AMD-s szemekben ($r^2=0.918$; $p<0.001$); noha a két csoport között szignifikáns különbséget nem találtunk ($p=0.28$, 17. ábra).

A peroxiszómák száma a korról emelkedett mind normál ($r^2=0.207$; $p<0.01$), mind AMD-s szemekben ($r^2=0.608$; $p<0.001$), és a növekedés statisztikailag szignifikáns módon nagyobbak bizonyult AMD esetében ($p=0.044$, 18. ábra).

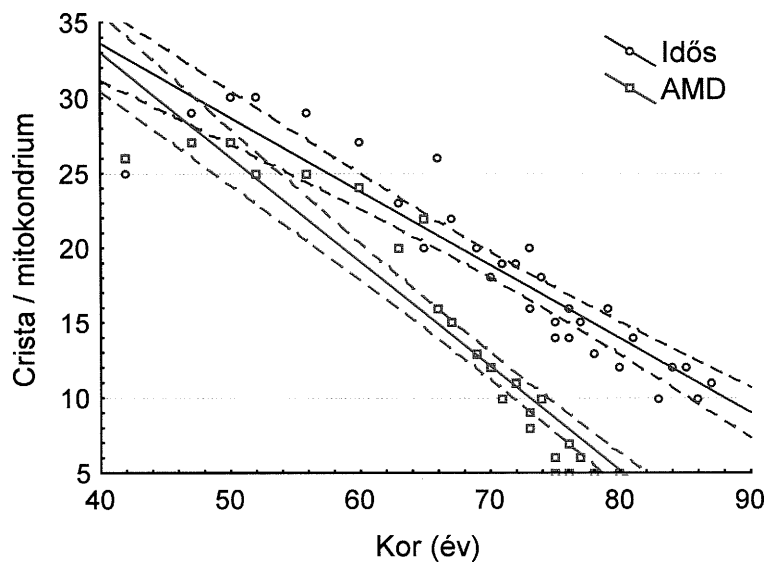
A korról mind a normál ($r^2=0.432$; $p<0.001$), mind az AMD-s szemekben ($r^2=0.535$; $p<0.001$) nőtt a lipofuscin mennyisége, noha statisztikailag szignifikáns eltérést a két csoport között nem tudtunk kimutatni ($p>0.05$, 19. ábra).



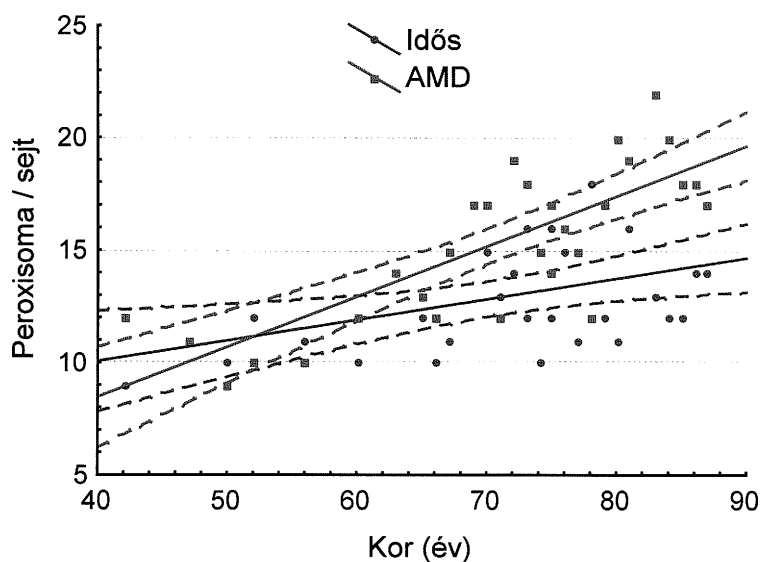
15. ábra. A mitokondriumok számának változása. Mind normál öregedés során, mind AMD esetében szignifikánsan csökken a mitokondriumok száma a korról ($p<0.001$). Ugyanakkor AMD esetében a vesztesség szignifikánsan magasabbnak mutatkozott ($p=0.038$).



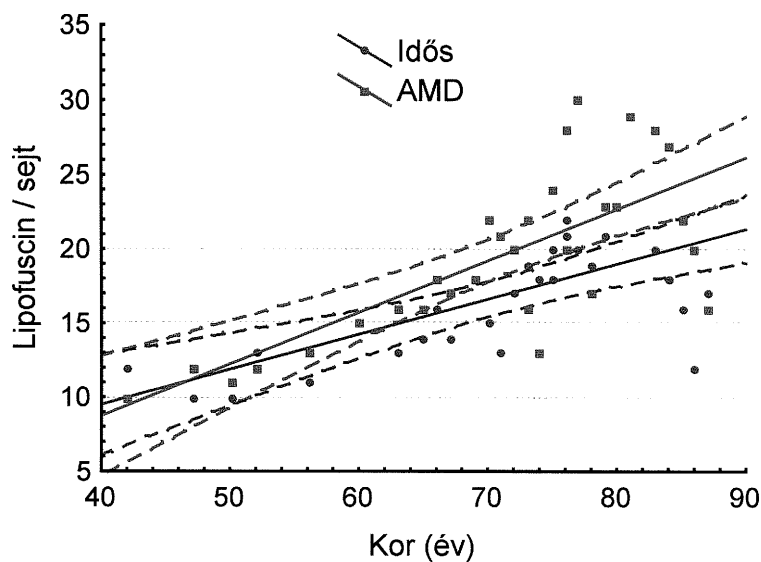
16. ábra. A mitokondriumok területének (μm^2) változása a korról. Mind normál öregedés során, mind AMD esetében szignifikánsan csökken a mitokondriumok száma a korról ($p < 0.001$). A csökkenés statisztikailag szignifikáns módon kifejezettebb AMD esetében ($p = 0.019$).



17. ábra. A mitokondrium cristák számának változása. Mind normál öregedés során, mind AMD esetében szignifikánsan csökken a mitokondrium cristák száma a korról ($p < 0.001$). Noha AMD esetében kifejezettebb volt a mitokondriális cristák dezorganizációja mint normál idős esetekben, a különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak ($p = 0.28$).



18. ábra. A peroxisómák számának változása. Mind normál öregedés során, mind AMD esetében szignifikánsan fokozódik a peroxisómák száma a korrall ($p < 0.001$). A növekedés statisztikailag szignifikánsan nagyobb AMD esetében ($p = 0.044$).



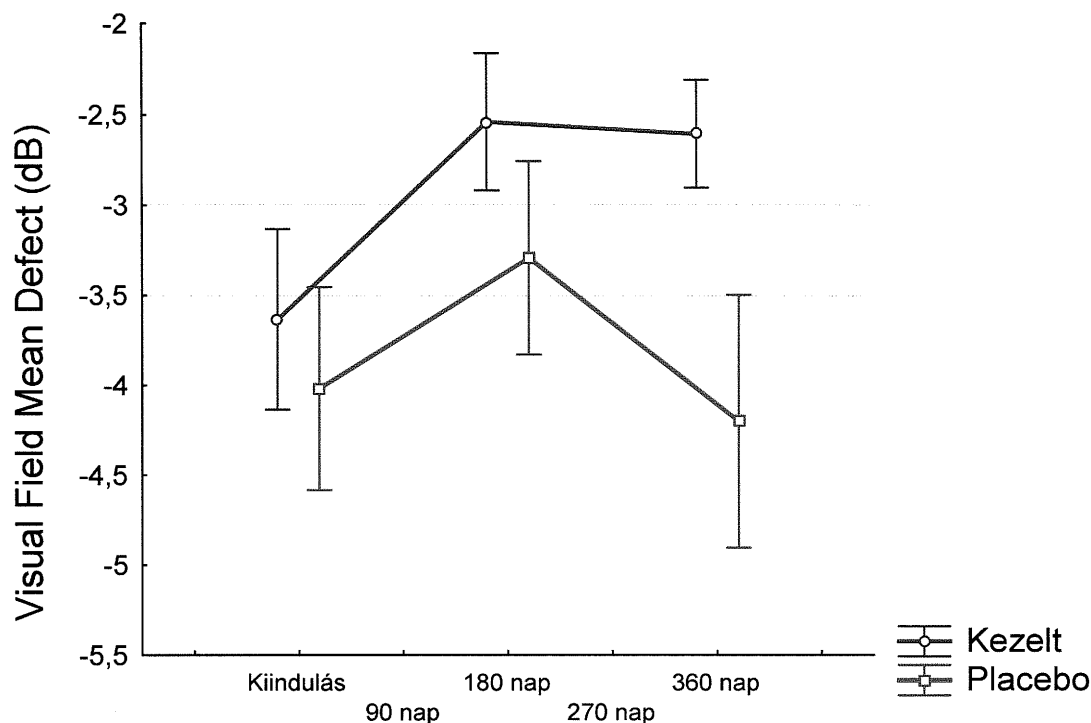
19. ábra. A lipofuscin granulumok számának változása. A lipofuscin granulumok száma mind normál öregedés során, mind AMD esetében szignifikánsan fokozódik a korrall ($p = 0.01$). A két csoport közötti különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

Mitotróp anyagok alkalmazásának hatása az időskori macula degeneráció lefolyására

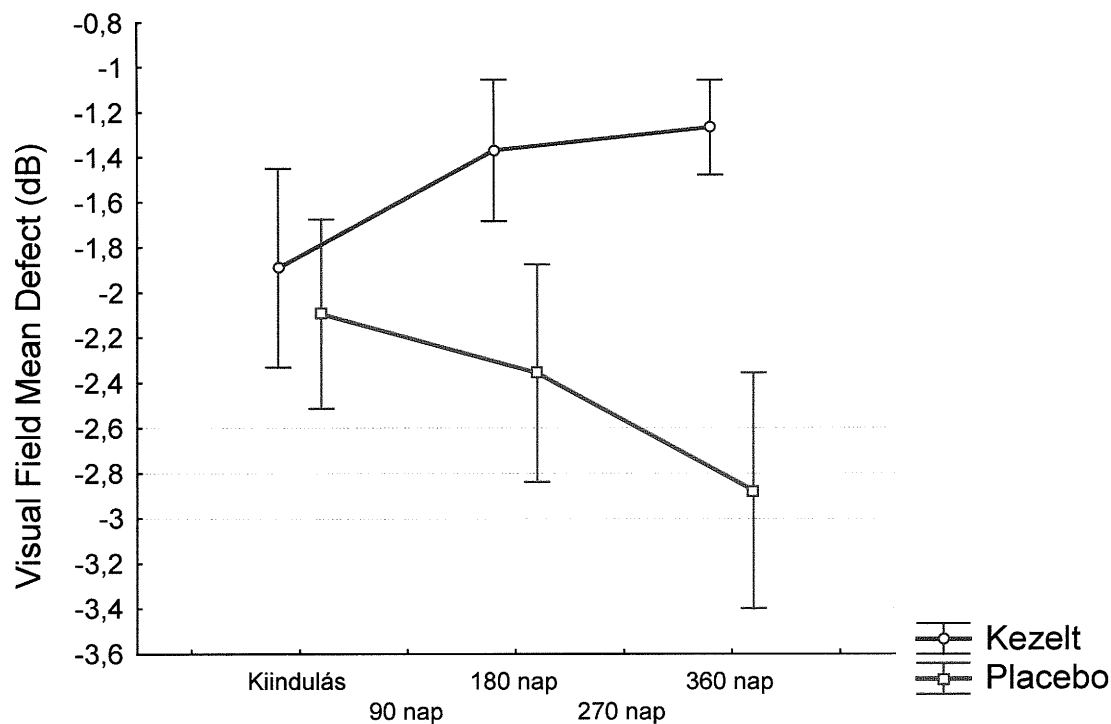
Funkcionális változások

A VFMD a rosszabb látású szemekben 12 hónap elteltével javult a kezelt csoportban

(0.77 ± 2.57 dB értékkel) míg romlott a placebo csoportban (-0.31 ± 3.70 dB értékkel), noha a különbség a két csoport között nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak ($p > 0.05$, 20. ábra). A *jobb látású szemekben* során a VFMD 12 hónap elteltével javult a kezelt csoportban (0.53 ± 2.36 dB-el), míg romlott a placebo csoportban (-0.39 ± 1.52 dB-el), a különbség a két csoport között statisztikailag szignifikáns volt ($p = 0.004$, 21. ábra). A VFMD a *rosszabb látású szemek* közül 12 hónap elteltével 48 szem közül 47-ben javult/változatlan volt, 1 esetben romlott, míg a placebo csoportban 53 szemből 44 szemben javult/változatlan volt, 9 szem esetében romlott. Az eredményekben a kezelt és a placebo csoport között statisztikailag szignifikáns különbség mutatkozott ($p = 0.006$, OR=10.93, 5. táblázat). A *jobb látású szemek* között a kezelt csoportban 43 esetben a VFMD javult/változatlan volt a vizsgált 43 szem közül, míg a placebo csoportban a 45 szemből 40 szem esetében a VFMD javult/változatlan volt, 5 esetében pedig romlott ($p = 0.031$, OR=11.81, 5. táblázat).



20. ábra. A VFMD értékeinek változása a rosszabb látású szemek esetében, a kezelés 12 hónapja alatt. A látásfunkciók kezdeti javulása a kezelt csoportban fennmaradt, azonban a placebo csoportban romlott a vizsgálat végére. 12 hónap elteltével a 2 csoport közötti különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak ($p > 0.05$)



21. ábra. A VFMD értékeinek változása a jobb látású szemek esetében, a kezelés 12 hónapja alatt. Jól látható a látásfunkciók folyamatos javulása a kezelt csoportban, és folyamatos romlása a placebo csoportban a kezelés 1 éve alatt. 12 hónap elteltével a 2 csoport közötti különbség statisztikailag szignifikáns ($p=0.004$).

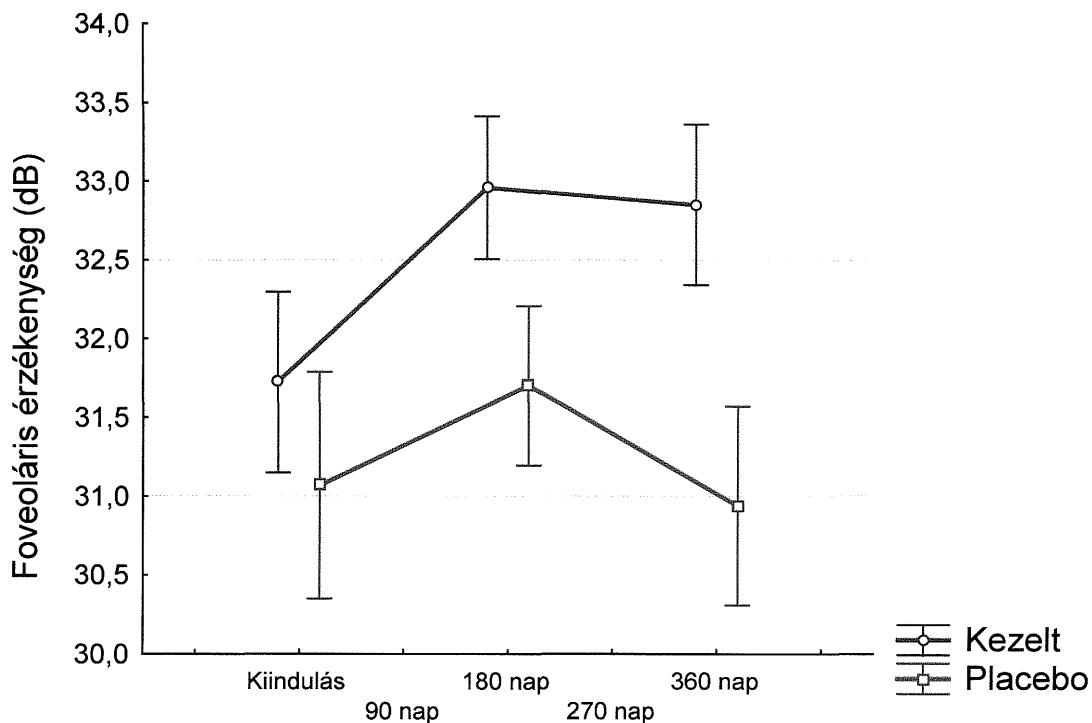
	Rosszabb vízusú szemek		Jobb vízusú szemek ^b	
	Kezelt (n=48)	Placebo (n=53)	Kezelt (n=43)	Placebo (n=45)
Javult / változatlan ^a	47 (98%)	44 (83%)	43 (100%)	40 (89%)
Romlott	1 (2%)	9 (17%)	0 (0%)	5 (11%)
p		0.006		0.031
Odds Ratio		10.93		11.81

^a ± 2.0 dB fluktuáció figyelembevételével

^b Az Odds Ratio számításához az adatokhoz 0.5-t hozzáadtunk

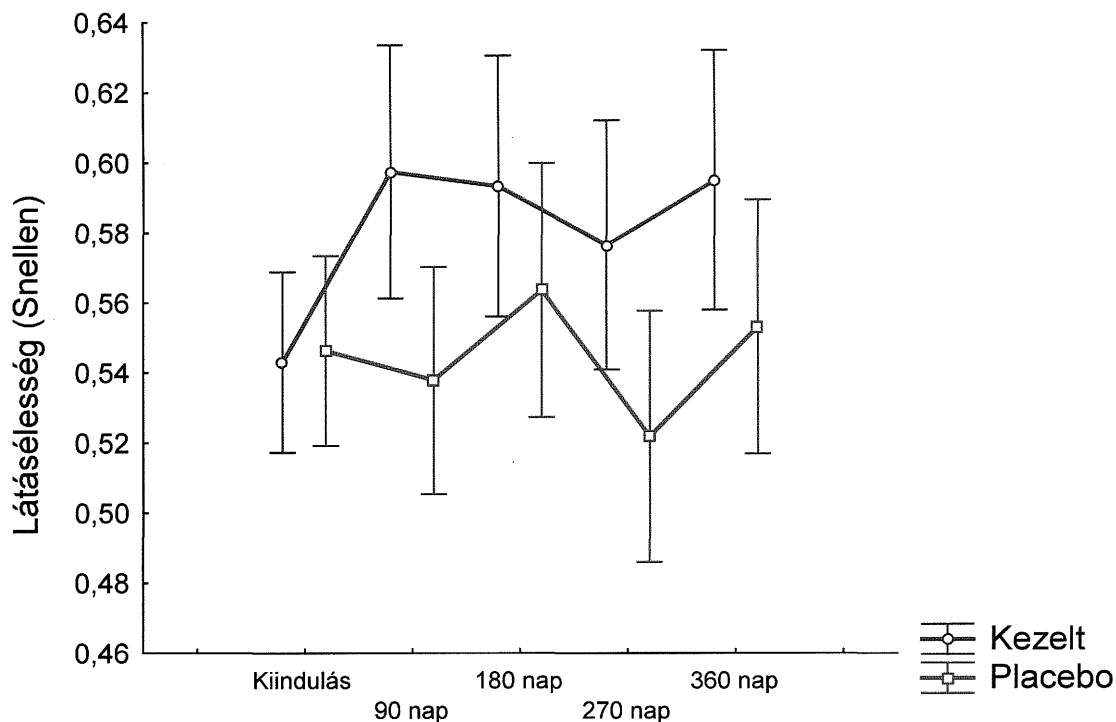
5. táblázat. A VFMD értékeinek változása a jobb- és a rosszabb látású szemekben 1 éves Phototrop® kezelést követően.

Hasonló eredményeket figyeltünk meg a FS kapcsán a rosszabb látású szemek esetében: a kezelt csoportban 33 szem javult/változatlan volt és 15 szem romlott, míg a placebo csoportban 26 szem javult/változatlan volt, 27 pedig romlott ($p=0.035$, OR=2.29, 6. táblázat).



22. ábra. A foveoláris érzékenység eredményeinek alakulása a rosszabb látású szemek esetében, a kezelés 12 hónapja alatt. A látásfunkciók kezdeti javulása a kezelt csoportban fennmaradt, azonban a placebo csoportban romlott a vizsgálat végére. 12 hónap elteltével a 2 csoport közötti különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak ($p > 0.05$).

A Snellen látásélesség a kezelés 12 hónapja alatt végig jobb volt a kezelt, mint a placebo csoportban, noha a két csoport között nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget ($p > 0.05$, 23. ábra). Ugyanakkor a látásfunkciók javultak mind a Snellen tábla szerint (37 javult/változatlan, 11 romlott a kezelt; valamint 29 javult/változatlan és 24 romlott a placebo csoportban, $p = 0.015$, $OR = 2.78$), mind az ETDRS tábla szerint (a kezelt csoportban 36 javult/változatlan, 12 romlott; míg a placebo csoportban 29 javult/változatlan, 24 romlott, $p = 0.027$, $OR = 2.48$, 6. táblázat) 1 éves Phototrop[®] kezelést követően.



23. ábra. A Snellen látásélesség eredményeinek alakulása a rosszabb látású szemek esetében, a kezelés 12 hónapja alatt. A látásfunkciók kezdeti javulása a kezelt csoportban fennmaradt, a placebo csoportban romlott a vizsgálat végére, azonban a 2 csoport közötti különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak ($p>0.05$).

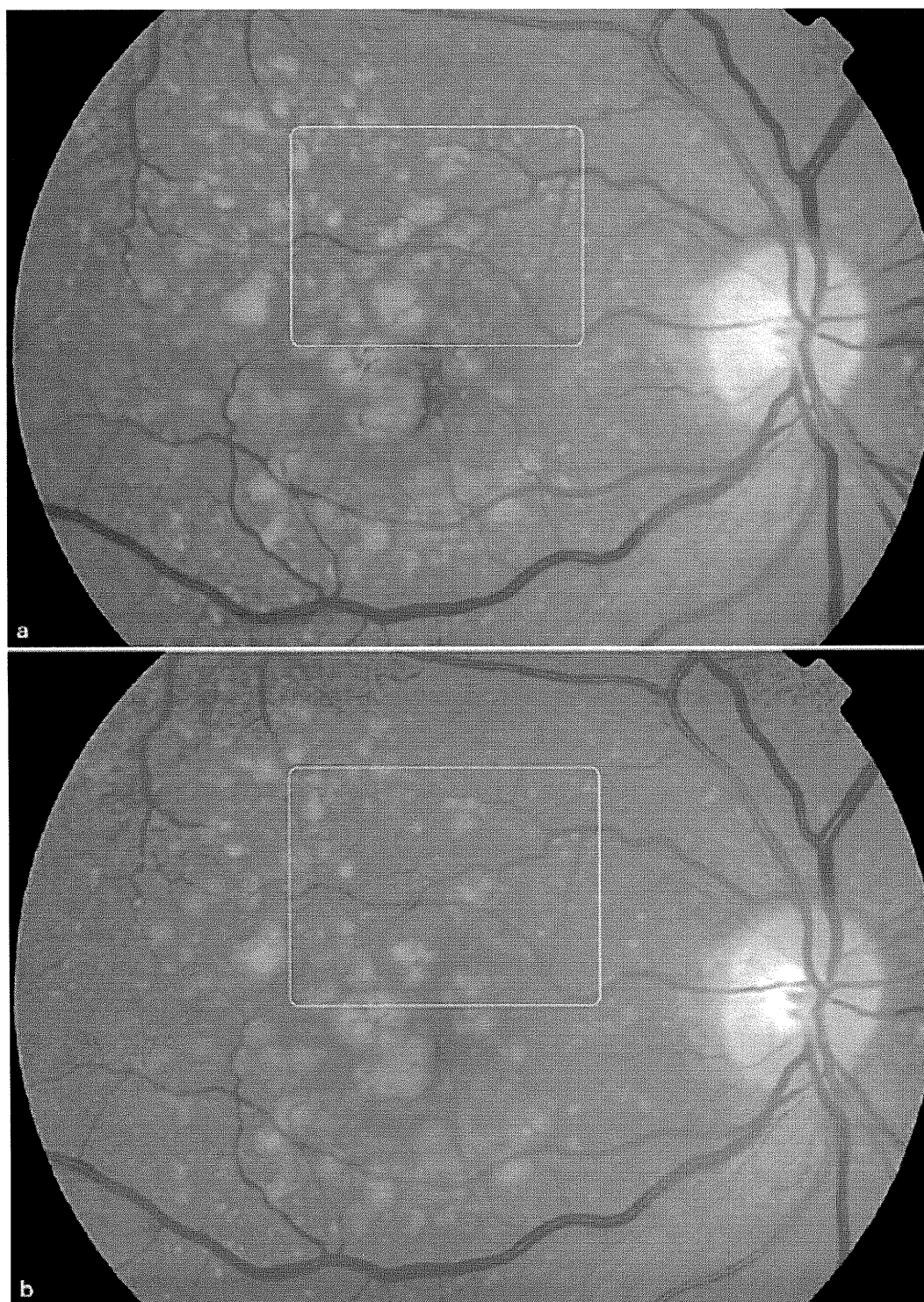
	Foveális érzékenység		Látásélesség (Snellen)		Látásélesség (ETDRS)	
	Kezelt (n=48)	Placebo (n=53)	Kezelt (n=48)	Placebo (n=53)	Kezelt (n=48)	Placebo (n=53)
Javult / változatlan ^a	33 (69%)	26 (49%)	37 (77%)	29 (55%)	36 (75%)	29 (55%)
Romlott	15 (31%)	27 (51%)	11 (23%)	24 (45%)	12 (25%)	23 (45%)
p		0.035		0.015		0.027
Odds Ratio		2.29		2.78		2.48

6. táblázat. A másodlagos paraméterekben megfigyelhető változások összehasonlítása a rosszabb látású szemekben.

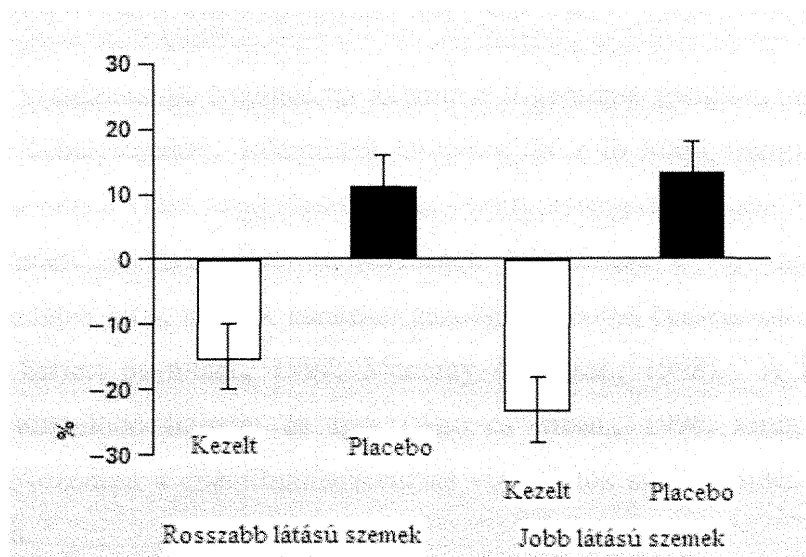
Morfológiai változások

A drusenek által elfoglalt terület nagyságának változása a kiindulási és a 12. hónapban készült fotók összehasonlításával történt (24. ábra). A *rosszabb látású szemek* esetében a tanulmány végén a drusenek által elfoglalt terület nagysága a kezelt csoportban a kiindulási érték 0.85 ± 0.39 -szerese, míg a placebo csoportban 1.11 ± 0.65 -szerese volt, a két csoport közötti különbség szignifikánsnak bizonyult ($p=0.045$, 25. ábra). A *jobb látású szemek* esetében a tanulmány végén a drusenek által elfoglalt terület nagysága a kezelt csoportban a kiindulási érték 0.77 ± 0.43 -szerese, míg a placebo csoportban 1.13 ± 0.77 -szerese volt ($p=0.017$), a kezelt

csoportban a drusenek kiindulási és a 12 hónapos viziten mért területe szignifikánsan különbözött ($p=0.0003$, 25. ábra)



24. ábra. Szemfenéki eltérések beválogatáskor (a) valamint 12 hónapos Phototrop[®] kezelést követően (b). Számos drusen felszívódása figyelhető meg, különösképpen az ábrán jelölt területen (69 éves nő).



25.ábra. A drusenek által elfoglat terület százalékos változása a kiindulási értékhez képest a kezelt és a placebo csoportban, külön vizsgálva a rosszabb, valamint a jobb látású szemeket. 12 hónapot elteltével statisztikailag szignifikáns különbség mutatkozott a kezelt és a placebo csoport között a rosszabb, valamint a jobb látású szemekben egyaránt (0.85 ± 0.39 vs 1.11 ± 0.65 , $p = 0.045$ és 0.77 ± 0.43 vs 1.13 ± 0.77 , $p = 0.017$).

Megbeszélés

Az érzőideg ingerlés hatása a könnytermelésre állatkísérletes modellben

Kísérletes vizsgálataink eredményei szerint a trigeminus ganglion ingerlése fokozza a könnytermelést a kehelysejtekre, valamint a járulékos és a fő könnymirigyre kifejtett hatása révén. Kifejezetten nőtt a vizes fázis mennyisége, valamint kevésbé, de szignifikánsan a fehérje és a mucin termelés. A vizes fázis termelésének fokozódása a fő, valamint a járulékos könnymirigyek szerepét jelzi, melyek ismertén gazdag szenzoros beidegzéssel bírnak (Williams és mtsai., 1996; Seifert és mtsai., 1997; Meneray és mtsai., 1998). A bizonyítottan a fő könnymirigyben termelődő lizozim és IgA (Aho és mtsai., 1996; Grus és mtsai., 2001) mennyiségének fokozódása a chemiluminescenciás vizsgálatok során szintén a fő könnymirigy szerepét bizonyítja.

Az ingerlő impulzusok számának emelésével a létrjövő hatás szignifikánsan korrelált, bizonyítékként szolgálva a szenzoros idegvégződésekből felszabaduló neuropeptidok szerepére vonatkozólag, melyek felszabadulása ismert módon az impulzusok számával arányos (Németh és mtsai., 1999). Miután atropin, guanethidin és hexamethonium előkezelés nem befolyásolta az eredményeket, a hatásban mind a paraszimpatikus, mind a szimpatikus idegi pályák, illetve agytörzsi reflexek szerepe kizárható. Ugyanakkor a kapszaicin előkezelés teljes mértékben kivédte az ideg ingerlésének hatását, ezzel a kapszaicin érzékeny szenzoros idegvégződésekből felszabaduló neurotranszmitterek szerepét megerősítve (Waldrep és Crosson, 1988). A kapszaicin, mely a paprika csípős érzetét adja (Govindarajan és Sathyanarayana, 1991) a TRPV1 receptoron hatva fájdalomérzet kialakulását, valamint az idegvégződésekből az SP és CGRP depletálását okozza (Szállási és Blumberg, 1999).

Kísérletes modellünkben a kapszaicinre jellemző átmeneti deszenzibilizálás (Szolcsányi és mtsai., 1988; Pethő és Szolcsányi, 1996; Szállási és Blumberg, 1999; Rigoni és mtsai., 2003) az oldat szembe cseppentését követően jelentkező reflexes pislogás csökkenő mértékében nyilvánult meg. Miután az állatokban az antidrómos ingerlést megelőző utolsó kapszaicin előkezelés során már nem alakult ki pislantási reflex, a szenzoros idegvégzésekben tárolt neurotranszmitterek depletálása révén ekkor már teljes deszenzibilizálást sikerült elérnünk.

Az SP receptor antagonistá SR140333 (Emonds-Alt és mtsai., 1993) könnytermelést szignifikánsan gátló hatása az SP szerepét direkt módon bizonyítja. Korábbi kísérletes adatok szerint ugyanis SR140333 előkezelés megakadályozza a nervus ischiadicus ingerlését követő plasma extravasatiót patkány bőrében az SP hatásának gátlása révén (Emonds-Alt és mtsai., 1993; Amann és mtsai., 1995; Pintér és mtsai., 1999; Amann és Schuligoi, 2004). Ugyanakkor az SR140333 előkezelést követően az ingerelt oldalon megfigyelt, a kontroll oldalhoz képest még mindig szignifikáns könnytermelés fokozódás egyéb neuropeptidek szerepére utal.

Az ingerlést követően a kehelysejt sűrűségben megfigyelt csökkenés a kehelysejtekben tárolt mucin kiürülésének szövettani jele (Kuo és mtsai., 1990), ezáltal indirekt bizonyítékként szolgál a mucin szekréció fokozódására. Az ingerelt, valamint a kontroll oldalról származó minták elektroforetikus vizsgálata során kialakuló hasonló fehérje mintázat a különböző fehérje komponensek termelésének arányos fokozódását jelzi. Ezt megerősíti, hogy egyenlő mennyiségű mintákat analizálva az IgA és a lizozim mennyisége nem különbözött a két oldalon, tehát ezen két fehérje mennyisége egyenlő arányban fokozódott az érzőideg ingerlés hatására.

Eredményeink alapján feltételezzük tehát, hogy a kialakult könnytermelés-fokozódás a trigeminus ganglion ingerlés kapcsán felszabaduló pro-inflammációs neuropeptidek hatására következik be. A TRPV1 receptor aktiválódása, és így az idegvégződésekből a neurotranszmitterek felszabadulása a kapszaicin mellett hőinger, illetve savas környezet hatására is bekövetkezik. A TRPV1 receptorokon történt vizsgálatok alapján a receptor önmaga egy hőszensor, és bár a folyamat pontos részleteiben még nem ismert, feltételezik, hogy hőérzékeny domének vannak jelen a receptorfehérjékben. Ugyanakkor az extracelluláris milió savasodásának két lényeges hatása van a TRPV1 funkcióra. Először is, a proton felszaporodás a csatorna aktivációhoz szükséges küszöb csökkentése révén növeli a hő vagy a kapszaicin hatáserősségét. Másodsorban pedig, a protonok önmaguk is agonistaként viselkednek, mivel további acidifikáció (pH 6 alatti környezet) csatornanyitáshoz vezet már szobahőmérsékleten is. Ennek értelmében a szemfelszíni gyulladás esetében savassá váló szemfelszíni milió, valamint a megváltozott összetételű és mennyiségű könnyfilm kapcsán kialakuló lokális hőmérsékleti változások önmagukban potenciórozhatják neurogén gyulladás kialakulását, illetve fokozódását. Az ílymódon létrejövő neurogén gyulladáshoz vezető folyamatok aztán önfenntartóvá válva az amúgy is károsodott könnytermelés további zavarát okozhatják. Új terápiás lehetőségként merülhet fel tehát a gyulladás neurogén komponenseinek gátlása, melynek eredményeképpen hatékonyabbá válhat a

krónikus könnytermelési zavarokkal, szemfelszíni gyulladással járó kórképek kezelése is.

Ezen eredmények szerint tehát a szemfelszíni neurogén gyulladás közrejátszhat a mucin, illetve a könnytermelés zavaraival járó kórképekben. A szemfelszínt érő irritatív mechanizmus a kötőhártya kapszaicin-érzékeny idegvégződéseiből neurotranszmitterek felszabadulását okozza, melyek parakrin módon hatva befolyásolhatják a kehelysejtek (Dartt és mtsai., 1995), valamint a járulékos-, illetve feltételezhetően a fő könnymirigy működését is. Miután a szemfelszín mellett a szem egyéb szövetei is kiterjedt érző beidegzéssel bírnak (Tervo és mtsai., 1982; Seifert és Spitznas, 1996; Diebold és mtsai., 2001; Belmonte és mtsai., 2004; Schmid és mtsai., 2005) ezen neurogén gyulladással járó folyamat szerepet játszhat a szemgolyó egyéb krónikus gyulladással járó folyamataiban is.

Állatkísérletes eredményeink tükrében megmagyarázható néhány korábbi klinikai tapasztalat is. Szaruhártya átültetést követően immunszuppresszió céljából adott Cyclosporin A tartalmú szemcseppek alkalmazása kapcsán megfigyelték, hogy a betegekben a gyulladással járó jelek csökkenése mellett a szemszárazsággal összefüggő tünetek, panaszok is enyhültek. Az USA-ban már kereskedelmi forgalomban van egy, a szemszárazság bizonyos formáinak kezelésére javallott Cyclosporin A tartalmú szemcsepp (Restasis[®], Allergan). A készítmény alkalmazásának eredményeképpen a betegekben a kezelést követően csökkent a cornea festődése, a homályos látásos panaszok, egyéb könnypótló készítmények használatának igénye, valamint fokozódott a termelt könny mennyisége is (Plufelder, 2004). Ugyancsak csökkent a szemfenéki gyulladással járó markerek szintje is (Sall és mtsai., 2000), míg a kötőhártyában fokozódott a kehelysejt-denzitás. A panaszok enyhülésének hátterében egyértelműen szerepet játszik a gyulladással járó folyamatok csökkentése révén helyreállt szemfelszín-könnyfilm struktúra, ugyanakkor a könnytermelés fokozódásának eredete nem kellőképpen tisztázott. Mindamelllett, állatkísérletes modellben már sikerült kimutatni topikálisan adott 0.1% cyclosporin tartalmú készítménynek a fő könnymirigyen keresztül érvényesülő könnytermelést fokozó hatását, melyet kapszaicin előkezelés meggátolt, így felmerül a szenzoros neuropeptidek (elsősorban az SP) szerepe a folyamatban (Yoshida és mtsai., 1999).

Érzőideg antidiromos ingerlésének hatása a szenzoros neuropeptidek expressziójára retinában

Eredményeink szerint a trigeminus ingerlést követően jelentősen fokozódott bizonyos

neurotranszmitterek (SP, CGRP, VIP és nNOS) immunreaktivitása a retina vizsgált négy rétegében. A pigmenthám réteg-fotoreceptor külső tag komplexben, a külső és belső magvas rétegben, valamint a ganglionsejt rétegben kimutatott immunreakciók lényeges kiegészítései korábbi tanulmányok eredményeinek, melyekben az említett neuropeptidek elleni immunreaktivitást mindössze az amacrin és a ganglion sejtek területén írták le patkány retinában (Brecha és mtsai., 1989, Caruso és mtsai., 1990). Állatkísérletes modellünkben a trigeminus ganglion elektromos ingerlését követően markáns intenzitás-fokozódás volt megfigyelhető a kontroll oldalhoz képest az ideghártya vizsgált rétegeiben. A kontroll szemekben a pigmenthám réteg-fotoreceptor külső tag komplex területén egyáltalán nem találtunk a vizsgált neuropeptidekkel szembeni immunreaktivitást, és a CGRP a retina egyik vizsgált rétegében sem volt detektálható. Ugyanakkor a trigeminus ganglion antidrómos ingerlését követően kifejezett immunreakció alakult ki a külső magvas és a pigmenthám réteg-fotoreceptor külső tag komplex területén is mind a négy vizsgált neuropeptiddel szemben, valamint az ideghártya mind a négy vizsgált rétegében a CGRP-vel szemben.

Eredményeink értékelését azonban számos tényező nehezíti. A retinában mindeztidáig nem mutattak ki direkt szenzoros innervációt, ezzel szemben a szivárványhártya, a sugártest, valamint a choroidea ismertén gazdag érző beidegzéssel bír. Az egyik lehetséges magyarázat szerint állatkísérletes modellünkben az antidrómos ingerlést követően a retina különböző rétegeiben kimutatott neuropeptidek megfelelhetnek a szivárványhártya-sugártest komplex, illetve a choroidea területéről az ideghártya szövetébe paracrin módon jutó neurotranszmittereknek. Ismert, hogy a trigeminus ganglion mechanikus vagy elektromos ingerlése a szem elülső szegmensében kifejezett vérbőséget, emelkedett szemnyomást, miosist, a vér-csarnokvíz gát sérülését okozza, mindeközben CGRP immunreakció is megfigyelhető a csarnokvízben (Wahlestedt és mtsai., 1986). A CGRP-vel szembeni immunreakció fokozódása, a szemnyomás emelkedése, és a vér-csarnokvíz gát sérülése megfigyelhető nyúlban Nd-YAG lézer capsulotomia után is (Stjernschantz és mtsai., 1986; Krootila és mtsai., 1992). Nyulak elektrokonvulzív kezelését követően SP, CGRP immunreaktivitás detektálható mind a csarnokvízben, mind a cerebrospinális folyadékban (Wang és mtsai., 1997). A CGRP az elülső csarnok immunprivilegiumának kialakításában vesz részt, hatásán keresztül történik az aktivált makrofágok NO termelésének csökkentése, mely folyamat főként a NOS2 enzim aktivitásának gátlásán, kevésbé pedig a NOS2 szintézis csökkentésén keresztül valósul meg. Ennek

megfelelően a szem szöveteiben komplex regulációs mechanizmusok szolgálnak az immunogén gyulladáshoz vezető jelenségek kialakulásának, illetve fokozódásának szuppresszáálására, a folyamatok mediálására (Taylor és mtsai., 1998). Mindezek alapján felmerülhet az ideghártyában immunhisztológiailag detektált neurotranszmitterek uveából történő transzportja a csarnokvíz, illetve üvegtesti folyadék közvetítésével, vagy a retinális pigmenthámon keresztül. Ugyanakkor az alkalmazott rövid idejű (20 perc) antidrómos ingerlést követően kialakult prompt hatás miatt valószínűbb, hogy a szenzoros idegek ingerlése direkt mechanizmussal fokozza a retinában található neurotranszmitterek expresszióját. Mindazonáltal, a retina szenzoros idegvégződéseinek hiányában a jelenség pontos magyarázata még várat magára, további kutatások szükségesek az esetlegesen közrejátsszó egyéb folyamatok felderítésére.

Ugyancsak további vizsgálatokat igényel a detektált neuropeptideknek a retinán belüli komplex jelátviteli folyamatokban betöltött szerepének tisztázása. Korábbi tanulmányok szerint exogén SP, valamint CGRP excitatorikus neurotranszmitterként viselkedik a retinában. Az elülső szemcsarnokba adott humán CGRP adását követően dózisfüggő hatást sikerült kimutatni nyúl elektroretinogrammon, mely az A és B hullámok amplitúdójának szignifikáns fokozódásában nyilvánult meg. Ezen eredmények alapján a CGRP feltehetően excitatorikus hatású lehet a retina fényingerre adott válaszában (Cao és mtsai., 1993). Ugyanakkor az SP fokozza az ismertén a fényintenzitással összefüggő dopamin felszabadulást (Djamgoz és Wagner 1992; Boelen és mtsai., 1998) jelezvén, hogy szerepe feltehetően összefügg a fényadaptációval (Colzi és mtsai., 1993; Casini és mtsai., 2002).

A szemet érő fény mennyisége egyes tanulmányok szerint kapcsolatban áll az időskori macula degeneráció kialakulásával. Godley és munkatársai in vitro eredményei szerint a kék fény a mitokondriumok DNS-ét károsítja, ezáltal azok metabolikus aktivitása csökken (Liang és Godley, 2003). A macula területén a korrall lerakódó anyagcsere termékek (elsősorban a lipofuscin) képesek hatékonyan elnyelni a kék régióba tartozó hullámhosszokat, és ezáltal a környezetükben fototoxikus reakciókat kiváltani (Sparrow és mtsai., 2000), melyek a már amúgy is csökkent metabolizmust tovább károsítják. A fototoxikus reakciók, valamint a csökkent metabolizmus következtében felhalmozódó anyagcsere termékek miatt lokális gyulladáshoz vezető folyamatok alakulnak ki, melyek tovább károsítják a fotoreceptor-pigmenthám réteg mikrokörnyezetét. Eredményeink alapján tehát a fényhatásra fokozódó jelátviteli folyamatok normálistól eltérő mediálásában a neurogén gyulladás következtében felszabaduló

neurotranszitterek is szerepet játszhatnak. További kutatások szükségesek azonban a jelenség okozati mechanizmusainak megismeréséhez, valamint az esetleges intervenciós lehetőségek feltárásához.

Jellegzetes ultrastrukturális eltérések időskori macula degeneráció esetében

A mitokondriumok minden eukarióta sejtben megtalálhatók és alapvető funkciójuk a kémiai energia átalakítása, illetve termelése. A mitokondriumok 0.5-1 μm átmérőjű hengeres képződmények saját cirkuláris szerkezetű genommal, és jellemzőjük, hogy az eukarióta gazdasejtre vannak utalva bizonyos fehérjék termelése tekintetében, míg a gazdasejt ATP termelése a mitokondriumokban zajlik. A mitokondriumokat egy külső és egy belső membrán határolja. A belső membrán egy specializált struktúra, melynek jellegzetes betüremkedései a membrán felületét növelik (cristák), összetevői a kardiolipin (a belső membrán ionokkal szembeni inpermeabilitásáért felelős), különböző transzport fehérjék (kis molekulák transzportját végzik), valamint a légzési lánc enzimeit (az elektrontranszportért, az oxidatív foszforilációért felelősek).

Klinikai vizsgálati eredményeink szerint az időskori macula degeneráció kialakulásában a mitokondriumok morfológiai, valamint funkcionális károsodásának döntő szerepe van. Eredményeink szerint a jól definiált mitokondriális szerkezettel bíró fiatal RPE sejtekkel összehasonlítva az idősebb, nem AMD-s szemekben a mitokondriumok száma lényegesen alacsonyabb, alakjuk, orientációjuk, méretük változó. AMD esetében a mitokondriumok száma csökkent az egészséges, korban identikus kontrollokhöz viszonyítva, belsejükben fokálisan a cristák dezorganizációja figyelhető meg. A Bruch-membrán jellegzetes eltérései AMD esetében a belső kollagén membránon fokális megvastagodások kialakulása, melyek a klinikailag is detektálható kemény, illetve puha druseneknek felelhetnek meg.

A mitokondriumok száma, valamint a membránok szerkezeti változásai szignifikánsan különböznek normál, illetve AMD-s szemekben. Eredményeink szerint a peroxisómák számának növekedése az AMD kialakulásával összefügg, azonban a lipofuscin felhalmozódása nem specifikus AMD kialakulására. Korábbi tanulmányok a mitokondrium membránok hasonló eltéréseit írták le különböző neurodegeneratív megbetegedésekben, Alzheimer-kórban (Hirai és mtsai., 2001), a vázizomban 2-es típusú diabétesz esetében (Kelley és mtsai., 2002),

szívelégtelenségben (Gosker és mtsai., 2000), valamint skizofréniában is (Ben-Sachar, 2002). Eredményeink alátámasztják azon korábbi megfigyeléseket, melyek szerint a mitokondriális működés károsodásának szerepe van AMD kialakulásában (Winkler és mtsai., 1999; Fox és mtsai., 2003). Az RPE sejtekben kimutatható mitokondriális béta-oxidáció (Tyni és mtsai., 2002) az energiatermeléshez elsősorban zsírsavakat használ fel (Andrews és mtsai., 1999; Hiltunen és Qin 2000). Miután az RPE sejtek részt vesznek a fény indukálta retinoid ciklusban (Kuksa és mtsai., 2003; Sparrow és mtsai., 2003), a mitokondriális diszfunkció egy lehetséges következménye a retinoid újraképződés károsodása. Ezen vélekedést támasztja alá, hogy AMD esetében károsodott sötét adaptációt (Haimovici és mtsai., 2002; Jackson és mtsai., 2002), csökkent retina érzékenységet (Tolentino és mtsai., 1994; Remky és mtsai., 2001), valamint fotostresszt követően elhúzódó regenerációs időt (Midena és mtsai., 1997; Fehér és mtsai., 2003) írtak le, mely funkciókárosodások háttérében az ideghártya metabolikus zavara áll.

Morfológiai eredményeink szerint a peroxisomák mérete AMD esetében kisebb, mely eredmény a korábbi leírásoknak szintén megfelel (Robison és Kuwabara, 1975). A peroxisomák a lipid metabolizmusban szerepet játszó, membránnal határolt sejtorganellek. A hosszú szénláncú zsírsavakat hasítva, azokat az endoplazmatikus retikulumba transzportálva részt vesznek a sejtmembránok alakításában (Sprecher, 2000), illetve a mitokondriális energiatermelésben (Hetteima és Tabak, 2000). A sejten belül a lipidek felhalmozódása a peroxisomák számának, valamint aktivitásának fokozódását vonja maga után (Kliewer és mtsai., 1997; Nagy és mtsai., 1998; Kersten és mtsai., 2000). Noha a peroxisomák szerepe a lipid metabolizmusban RPE sejtekben már ismert (Pepe és mtsai., 1999), ezidáig nem vizsgálták szerepét patológiás folyamatokban. Ismert, hogy a fotoreceptor külső szegmens fagocitózisát követően fokozódik az úgynevezett „peroxisome-proliferator-activated-receptor - PPAR” gének expressziója (Ershov és Bazan, 2000), mely folyamat elsősorban az AMD késői formájában jelentős (Murata és mtsai., 2000). Továbbá, korábbi eredmények szerint a PPAR gének aktiválódása során a peroxisomális béta-oxidáció fokozódása is megfigyelhető (Keller és mtsai., 1993; Forman és mtsai., 1997). Mindezek alapján a peroxisomák számának általunk megfigyelt fokozódása a sejten belüli lipid degradációs utak aktiválódásának felelhet meg.

A mitokondriális membránok elváltozása lipofuscin felhalmozódásával is társult, mely azonban nem volt specifikus AMD-re. A katabolizmus csökkenése, illetve az ennek következtében különböző parciális lipid degradációs termékek (lipofuscin, illetve lipid-

peroxidok) felhalmozódása szintén a csökkent mitokondriális funkció következményei lehetnek (Shamsi és Boulton, 2001; Brunk és Terman, 2002). A lerakódott lipofuscin az RPE sejtek további oxidatív károsodását okozhatja (Dunaief és mtsai., 2002). Újabb tanulmányok szerint a lipofuscin felhalmozódás nem a fiziológias metabolizmus eredménye, hanem a lipid képződési és lebontási egyensúly megbomlásának következménye (Kennedy és mtsai., 1995; von Ruckmann és mtsai. 1998; Katz és mtsai., 1999). Morfológiai eredményeink megerősítik a korábbi klinikai vizsgálatok során nyert tapasztalatokat, mely szerint a lipofuscin okozta autofluoreszcencia nem különbözött szignifikánsan az egészséges és AMD-s betegekben (Marmorstein és mtsai., 2002).

Mitotróp készítménnyel szerzett tapasztalataink az időskori macula degeneráció kezelésében

Időskori macula degeneráció esetén a macula lutea elváltozásai következtében a centrális látás romlik, melynek súlyossága a kor és a betegség előrehaladtával fokozódik, a fejlett országokban 55 éves kor felett a törvényi vakság vezető okát képezve (Klaver és mtsai., 1998; van Leuween és mtsai., 2003; Friedman és mtsai., 2004). 60 éves kor felett a betegek 6-15%-ban, 80 éves kor felett pedig 30-60%-ban már kimutathatók korai szemfenéki eltérések (Varma és mtsai., 2004). Az ún. időskori maculopathia (Age-Related Maculopathy - ARM) csoportba a kórképpel kapcsolatos legenyhébb szemfenéki eltérések tartoznak: a drusenek, valamint a retina pigmenthám pigmentációjának változásai: kisebb depigmentált vagy hiperpigmentált területek. A drusenek szemtükörrel jól megfigyelhető, sárgásfehér depozitumok a retina alatt, melyek magukban látásromlást nem okoznak, enyhe metamorphopsiát, kontrasztérzékenység-csökkenést azonban igen. Szövettanilag a drusen eozinofil, lipid természetű anyag, amely a retina pigmenthám bazálmembránja és a Bruch-membrán között halmozódik fel, felette a retina érzékszervei már károsodottak. Az időskori maculopathia önmagában lényeges látásromlást nem okoz, bizonyos formái (halmozottan előforduló nagy drusenek és pigmentrögök jelenléte) azonban fokozott kockázatot jelentenek a súlyos látásromlással fenyegető, szubretinális érújdonképződéssel járó formák felé való átmenet szempontjából.

Ugyan a látásélesség a rutin klinikai módszerekkel vizsgálva ebben a stádiumban még teljes lehet, a betegek már gyakran panaszkodnak szubjektív látásromlásról (Midea és mtsai., 1997), különösen változó fényviszonyok közepette. A későbbi stádiumokban mind a száraz (atrophiás), mind a nedves (érújdonképződéssel járó) formák jellemzője a súlyos fokú látásromlás

(Bird és mtsai., 1995).

Miután az időskori macula degeneráció a centrális látást károsítja, súlyosan befolyásolja az egyének olvasási, autóvezetői képességét, melynek jelentős kihatása van az egyén produktivására, önállóságára, életminőségére. Az öregedő populáció tükrében ezen folyamatok egyre súlyosabbá válnak, a társadalomra egyre nagyobb terhet rónak. A betegség korai felismerése mellett ezen kezdeti, enyhe formák kezelése igen fontos a késői, súlyos fokú látásromlást okozó stádiumok elkerülése végett.

Az időskori macula degeneráció háttérben álló folyamatok vizsgálata jelenleg kiemelt területet képvisel a szemészeti alap kutatásokon belül. Nem véletlen tehát, hogy 2005 júliusában az USA kongresszusi bizottságának ülésén Dr. Elias Zerhouni a National Institute of Health (NIH) elnöke a macula degeneráció gyulladósos háttérének kutatási eredményeit ismertetve, azokat az év legfontosabb tudományos eredményének nevezte (http://www.nei.nih.gov/news/statements/genes_amd.asp). A gyulladósos folyamatok szerepének vizsgálata során ugyan ezidáig nem vizsgálták a neurogén gyulladás szerepét, mindazonáltal az eddigi eredmények tükrében is megmagyarázható néhány korábbi, nagy populációs vizsgálatokból ismert tény, pl a dohányzás AMD-t provokáló hatása. A dohányzás a C3 komplement faktor modifikálása révén *in vitro* bizonyítottan aktiválja az alternatív komplement utat, hasonló folyamatok *in vivo* a gyulladós folyamatok beindulását okozhatják, melyek drusenek kialakulásával járhatnak, különösen a genetikailag arra fogékony egyéneknél. (Hageman és mtsai., 2005).

A betegség kialakulását magas antioxidáns tartalmú diéta gátolja (Seddon és mtsai., 1994; Mares-Perlmann és mtsai., 1995), míg alacsony antioxidáns tartalmú étrend elősegíti (Delcourt és mtsai., 1999). Ezen megfigyelések alapján számos antioxidáns tartalmú diéta ajánlott AMD kezelésére (West és mtsai., 1994; Mares Perlman és mtsai., 2001; AREDS Report No 8 2001; Richer és mtsai., 2004). Az oxidatív stressznek a mitokondriumok membránjaira kifejtett káros hatása jól ismert (Toescu és mtsai., 2000; James és Murphy, 2002), mely folyamat következtében csökkenő metabolikus aktivitás végül apoptózis kialakulásához vezet (Schon, 2003). Ezen eredmények alapján felmerül, hogy a mitokondriumok anyagcseréjének javítása hatékony eszköz lehet különböző neurodegeneratív betegségek korai kezelésében (Murphy és Smith, 2000; Binienda és Virmani 2003). Mind a mitokondriumok, mind a peroxisómák a celluláris lipid metabolizmus kulcsfaktorai (Ferdinandusse és mtsai., 2003), ezen lebontási mechanizmusok zavara esetén különböző lipid degradációs termékek halmozódnak fel, melyek

további károsodást, a macula degeneráció súlyosbodását okozzák (Cai és mtsai., 2000).

A mitokondrium-specifikus cardiolipin, mely a külső és belső membránnak egyaránt alkotóeleme a mitokondriumban termelődik, és az öregedési folyamatokkal kapcsolatos elváltozásokban kulcsszereppel bír (Shigenaga és mtsai., 1994). A mitokondriális cardiolipin csökkent $\omega 3:\omega 6$ telítetlen zsírsav aránya károsodott glükóz lebontással is társul (Denton és mtsai., 1978; Pepe és mtsai., 1999). Hasonló eltérések a mitokondrium membránban elhelyezkedő karnitin rendszert ugyancsak befolyásolják, a lipid metabolizmus zavarát okozva (Zammit és mtsai., 1998). A mitokondrium membránok a koleszterin metabolizmusban is esszenciális jelentőséggel bírnak (Hansson és mtsai., 2003). A koleszterin mitokondriumon belüli transzportjában egy csatorna képző fehérje vesz részt, melynek szerepe a membránok alkotórészeinek bioszintézisében alapvető (Gabbita és mtsai., 1998; Campbell és mtsai., 2002; Papadopoulo, 2003). Ezen kívül a mitokondrium membrán-potenciálok számos korral járó betegségben kórosan megváltoznak (Rottenberg és Wu, 1997; Sugrue és Tatton, 2001). A következményesen magas intaracelluláris Ca^{2+} szint, valamint szabadgyök koncentráció esetén a mitokondrium membránok permeabilitása fokozódik (Crompton, 2004), anyagcseréje károsodik, a további depolarizáció végül apoptosishoz vezet (Szabó és mtsai., 2004).

Saját morfológiai, valamint korábbi kutatási eredmények alapján a mitokondrium membránok alkotóelemeit tartalmazó, funkcióját javító ún. „mitokondriotrop vagy mitotrop” vegyületeknek szerepe lehet a betegség kezelésében. Különböző vegyületek ismertek, melyek a mitokondriumokhoz nagy affinitást mutatva, azok funkcióját hatékonyan javítják (Hatch, 2004). In vitro körülmények között $\omega 3$ -zsírsavak, karnitin, valamint acetyl-L-karnitin adása a mitokondriumok lipid metabolizmusát fokozta (Atamna, 2001; Furuno és mtsai., 2001; Binienda és Virmani, 2003). Korábbi in vivo tanulmányok szerint az $\omega 3$ -zsírsavak és acetyl-L-karnitin alkalmazása a mitokondriális metabolizmusban részt vevő enzimek aktivitásának fokozódásával járt (Barzanti és mtsai., 1994; Demaison és mtsai., 1994; Pepe és mtsai., 1999; Aureli és mtsai., 2000; Pepe, 2000; Virmani és mtsai., 2001). Ugyancsak in vitro körülmények között phosphatidilglicerol a pigmenthám sejtek oxidatív szabadgyökökkel szembeni érzékenységét, valamint az apoptosist csökkentette (Shaban és mtsai., 2002). További in vivo tanulmányok szerint a diétásan adagolt $\omega 3$ zsírsavak hatására fokozódott a membránokban a $\omega 3:\omega 6$ telítetlen zsírsavak aránya, valamint helyreállt a mitochondrium membránok cardiolipin tartalma és a membránpotenciál (Pepe, 2000). Antioxidánsokat, L-karnitint és telítetlen zsírsavakat tartalmazó,

ún. „mitokondriotrop” hatású diéta alkalmazása a tanulási és memóriefunkciók javulását okozta kutyákban (Cotman és mtsai., 2002).

Ezen elméleti megfontolások alapján megtervezett és lefolytatott összehasonlító klinikai tanulmányunk eredményei szerint AMD-ben szenvedő betegek Phototrop[®] kezelésének hatására a látásfunkciók (látásélesség, ideghártya érzékenység) javultak. Korábbi tanulmányok során különböző funkcionális tesztek már hatékonynak bizonyultak korai AMD követésében (Li és mtsai., 2001; Haimovici és mtsai., 2002), különös tekintettel a foveális szenzitivitás vizsgálatára (Tolentino és mtsai., 1994; Midena és mtsai., 1997; Remky és mtsai., 2001).

Az alcsoport analízis eredményei szerint a 1 éves Phototrop[®] kezelést követően a javulás kifejezettebb a kevésbé érintett (koraibb stádiumban levő) szemekben, mint az előrehaladottabb esetekben. Ennek megfelelően a mitotrop vegyületek alkalmazása a betegség koraibb szakában javasolt.

A tanulmány eredményei szerint 1 éves Phototrop[®] kezelést követően a drusenek területe a kezelt csoportban csökkent, míg a placebo csoportban fokozódott. Korábbi tanulmányokból ismert, hogy AMD során a drusenek felszívódása spontán is bekövetkezhet, mely folyamat egyes eredmények szerint lézerkezeléssel elősegíthető (Abdelsalam és mtsai., 1999). Ugyanakkor tanulmányunkban statisztikailag szignifikáns mértékben csökkent a kezelés hatására a drusenek összterülete, illetve 1 éves Phototrop[®] kezelést követően a két csoport között is szignifikáns különbség volt a kezelt csoport javára. A két csoport közötti különbség kifejezettebb volt a jobb látású szemekben, melynek hátterében feltehetően a kevésbé károsodott fotoreceptor-RPE-choriocapillaris réteg jobb metabolikus aktivitása áll.

Korábbi adatok alapján nem csupán a drusenek által elfoglalt terület nagysága, hanem a klinikailag épnek tűnő retinaterületek metabolikus folyamatainak károsodása is állhat a funkciócsökkenés mögött (Sunness és mtsai., 1988; Tolentino és mtsai., 1994), bár az eredmények nem egyértelműek (Midena és mtsai., 1997; Remky és mtsai., 2001; Haimovici és mtsai., 2002). Újabb megfigyelések szerint a druseneknek megfelelően a retina sejtjeiben strukturális elváltozások figyelhetők meg, melyek a klinikailag nem detektálható, ún. szubklinikai drusenek területén is megfigyelhetők (Johnson és mtsai., 2003).

Eredményeink szerint Phototrop[®] alkalmazása korai AMD esetében jól kiegészítheti az antioxidáns hatású vegyületek késői AMD-ben történő alkalmazását (AREDS Report No 8, 2001; Richer és mtsai., 2004). Egyre több adat szól amellest, hogy a fotoreceptor réteg/RPE komplex

funkcionális károsodása áll a korai AMD kapcsán megfigyelhető retinális elváltozások hátterében is (Hageman és mtsai., 2001). A drusenek összetevőinek vizsgálata alapján lipid lebontási termékek (Holz és mtsai., 1994; Spaide és mtsai., 1999), koleszterin metabolitok (Curcio és mtsai., 2001), valamint gyulladáscsökkentő fehérjék (Johnson és mtsai., 2000; Anderson és mtsai., 2001; Anderson és mtsai., 2002) lokális felhalmozódását mutatta. A lerakódott drusenek direkt citotoxikus hatásuk révén zavarják a fotoreceptor réteg/pigmenthám komplex anyagcseréjét, valamint mechanikailag károsítják a környező sejteket (Johnson és mtsai., 2003).

Ezen elgondolásokat összegezve, korai AMD esetében a fotoreceptor/RPE komplex metabolikus zavara drusenek kialakulásával jár, és a képződött drusenek az említett hatások révén tovább károsítják a fotoreceptor réteg/pigmenthám komplex anyagcseréjét. Ezen kétirányú folyamatba való hatékony beavatkozást jelentő terápiás lehetőségként merül fel Phototrop[®] alkalmazása korai AMD esetében.

Az értekezés új eredményei

1. Eredményeink szerint trigeminus ganglion ingerlésének hatására fokozódik a könnytermelés, mely bizonyítottan vonatozik mind a vizes fázis, mind a mucinózus fázis, mind a fehérje komponensek mennyiségére.
2. A fokozott könnytermelés a szenzoros idegvégződésekből felszabaduló neurotranszmitterek hatására alakul ki, melyek közül a P-anyag szerepére vonatkozóan direkt bizonyítékokat szereztünk.
3. Állatkísérletes munkánk eredményei szerint tehát a kapszaicin-érzékeny szenzoros rostok aktivációja következtében megváltozott könnytermelés szerepet játszhat a könnytermelési zavarokkal, valamint a krónikus szemfelszíni irritációkkal járó betegségekből.
4. Ugyancsak állatkísérletes munkánkkal bizonyítottuk, hogy a trigeminus ganglion antidrómos ingerlésének következtében az ideghártyában fokozódik bizonyos pro-inflammációs neuropeptidok (SP, CGRP, VIP, nNOS) expressziója. Ezen neurotranszmitterek szerepe, valamint a következményesen kialakult neurogén gyulladás pontos szerepe a szemfenéki patológiai állapotokban még nem tisztázott, azonban jelentősége lehet AMD kialakulásában.
5. Morfológiai vizsgálataink segítségével jellegzetes szerkezeti eltéréseket mutattunk ki a pigmenthám sejtekben időskori macula-degeneráció esetében. A korrallal a mitokondriumok száma és területe szignifikánsan csökkent mind az egészséges, mind az AMD-s szemek esetében; a különbség a két csoport között szignifikánsnak bizonyult. Ugyancsak szignifikáns különbséget találtunk a két csoport között a jól definiált mitokondrium cristák arányában, mely szintén jelentős csökkenést mutatott a korrallal. Mind a peroxisómák, mind a lipofuscin mennyisége mindkét csoportban emelkedett a korrallal, noha szignifikáns különbség csak a peroxisómák számában mutatkozott.
6. Összehasonlító klinikai tanulmány keretében igazoltuk, hogy a mitokondriumok anyagcseréjének javítása mitotrop tartalmú készítményekkel hatékony eszköz lehet a betegség

progressziójának lassításában, a létrejövő károsodások visszafordításában. Eredményeik szerint 1 éves Phototrop[®] kezelést követően korai AMD esetében a látásfunkciók (látásélesség, ideghártya érzékenység) javultak, a drusenek által elfoglalt terület csökkent.

Hivatkozások

1. Abdelsalam A, Del Priore L, Zarbin MA. Drusen in age-related macular degeneration. Pathogenesis, natural course, and laser photocoagulation-induced regression. *Surv Ophthalmol.* 1999;44:1-29.
2. Age-Related Eye Disease Study Research Group: A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report No. 8. *Arch Ophthalmol.* 2001;119:1417-1436
3. Aho HJ, Saari KM, Kallajoki M, Nevalainen TJ. Synthesis of group II phospholipase A2 and lysozyme in lacrimal glands. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:1826–1832.
4. Amann R, Schuligoi R, Holzer P, Donnerer J. The non-peptide NK1 receptor antagonist SR140333 produces long-lasting inhibition of neurogenic inflammation, but does not influence acute chemo- or thermociception in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1995;352:201–205.
5. Amann R, Schuligoi R. Beta adrenergic inhibition of capsaicin-induced, NK1 receptor-mediated nerve growth factor biosynthesis in rat skin. *Pain.* 2004;112:76–82.
6. Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, Rollins BJ, Ambati BK. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med.* 2003;11:1390-7.
7. Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol.* 2002;134: 411-431.

8. Anderson DH, Ozaki S, Nealon M, Neitz J, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium: Implications for the process of drusen formation. *Am J Ophthalmol.* 2001;131:767-781.
9. Andersson SE. Responses to antidromic trigeminal nerve stimulation, substance P, NKA, CGRP and capsaicin in the rat eye. *Acta Physiol Scand.* 1987;131:371-6.
10. Andrews RM, Griffiths PG, Johnson MA, Turnbull DM. Histochemical localisation of mitochondrial enzyme activity in human optic nerve and retina. *Br J Ophthalmol.* 1999;83:231–235.
11. Argueso P, Gipson IK. Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function. *Exp Eye Res.* 2001;73:281–289.
12. Atamna H, Ames BN, Liu J. Delaying aging with mitochondrial micronutrients and antioxidants. *Sci World J.* 2001;1:81–82.
13. Aureli T, Di Cocco ME, Capuani G, Ricciolini R, Manetti C, Miccheli A, Conti F. Effect of long-term feeding with acetyl-L-carnitine on the age-related changes in rat brain lipid composition: A study by ³¹P NMR spectroscopy. *Neurochem Res.* 2000;25:395-399.
14. Bagnoli P, Dal Monte M, Casini G. Expression of neuropeptides and their receptors in the developing retina of mammals. *Histol Histopathol.* 2003;18:1219-42.
15. Balla Z, Szoke E, Czeh G, Szolcsanyi J. Effect of capsaicin on voltage-gated currents of trigeminal neurones in cell culture and slice preparations. *Acta Physiol Hung.* 2001;88:173-96
16. Barreau E, Brossas JY, Courtois Y, Treton JA. Accumulation of mitochondrial DNA deletions in human retina during aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:384–391.

17. Barron MJ, Johnson MA, Andrews RM, Clarke MP, Griffiths PG, Bristow E, He LP, Durham S, Turnbull DM. Mitochondrial abnormalities in ageing macular photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:3016-3022.
18. Barzanti V, Battino M, Baracca A, Cavazzoni M, Cocchi M, Noble R, Maranesi M, Turchetto E, Lenaz G. The effect of dietary lipid changes on the fatty acid composition and function of liver, heart and brain mitochondria in the rat at different ages. *Br J Nutr.* 1994;71:193-202.
19. Battelli D, Bellei M, Arrigoni-Martelli E, Muscatello U, Bobyleva V. Interaction of carnitine with mitochondrial cardiolipin. *Biochim Biophys Acta* 1992;1117:33–36.
20. Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol.* 2000;45:115–134.
21. Beaumont K, Skowronski R, Vaughn DA, Fanestil DD. Interactions of lipids with peripheral-type benzodiazepine receptors. *Biochem Pharmacol.* 1988;37:1009–1014
22. Belmonte C, Acosta MC, Gallar J. Neural basis of sensation in intact and injured corneas, *Exp Eye Res.* 2004;78:513–525.
23. Ben-Shachar D. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: a possible linkage to dopamine. *J Neurochem.* 2002;83:1241–1251.
24. Bergmann M, Schutt F, Holz FG, Kopitz J. Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB J.* 2004;18:562–564.
25. Binienda Z, Virmani A. The mitochondriotropic effects of L-carnitine and its esters in the central nervous system. *Curr Med Chem Cent Nerv Syst Agents.* 2003;3:275-282.

26. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, de Jong PT, Klaver CC, Klein BE, Klein R. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol.* 1995;39:367-374.
27. Bird AC. The Bowman lecture: Towards an understanding of age-related macular disease. *Eye.* 2003;17:457-466.
28. Boelen MK, Boelen MG, Marshak DW. Light-stimulated release of dopamine from the primate retina is blocked by 1-2-amino-4-phosphonobutyric acid (APB). *Vis Neurosci.* 1998;15:97-103.
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
30. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature.* 1985;313:54-56
31. Brain SD. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology.* 1997;37:133-152.
32. Brecha NC, Sternini C, Anderson K, Krause JE. Expression and cellular localization of substance P/neurokinin A and neurokinin B mRNAs in the rat retina. *Visual Neurosci.* 1989;3:527-535.
33. Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem.* 2002;269:1996-2002.
34. Cai J, Nelson KC, Wu M, Sternberg P Jr, Jones DP. Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retin Eye Res.* 2000;19:205-221.

35. Campbell AM, Capuano A, Chan SH. A cholesterol-binding and transporting protein from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2002;1567:123–132.
36. Cao W, Drumheller A, Zaharia M, Lafond G, Brunette JR, Jolicoeur FB. Effects of calcitonin gene-related peptide on the rabbit electroretinogram. *Neuropeptides*. 1993;24:151-157
37. Caruso DM, Owczarzak MT, Pourcho RG. Colocalization of substance P and GABA in retinal ganglion cells: a computer-assisted visualization. *Visual Neurosci*. 1990;5:389–394.
38. Casini G, Dal Monte M, Fornai F, Bosco L, Willems D, Yang Q, Zhou ZJ, Bagnoli P. Neurokinin 1 receptor expression and substance P physiological actions are developmentally regulated in the rabbit retina. *Neuroscience*. 2004;124:147–160.
39. Casini G, Rickman DW, Sternini C, Brecha NC. Neurokinin 1 receptor expression in the rat retina. *J Comp Neurol*. 1997;389:496–507.
40. Casini G, Sabatini A, Catalani E, Willems D, Bosco L, Brecha NC. Expression of the neurokinin 1 receptor in the rabbit retina. *Neuroscience*. 2002;115:1309-1321
41. Casini G. Neuropeptides and retinal development. *Arch Ital Biol*. 2005;143:191-8.
42. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389:816-24.
43. Chanthaphavong RS, Murphy SM, Anderson CR. Chemical coding of sympathetic neurons controlling the tarsal muscle of the rat. *Auton Neurosci*. 2003;105:77–89.
44. Chen HB, Yamabayashi S, Ou B, Tanaka Y, Ohno S, Tsukahara S. Structure and composition of rat precorneal tear film: a study by an in vivo cryofixation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38:381–387.

45. Cheon EH, Park CH, Kang SS, Cho GJ, Yoo JM, Song JK, Choi WS. Nitric oxide synthase expression in the transient ischemic rat retina: neuroprotection of betaxolol. *Neurosci Lett.* 2002;330:265–269.
46. Chung CW, Tigges M, Stone RA. Peptidergic innervation of the primate meibomian gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:238–245.
47. Clarke SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: A molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr.* 2001;131:1129-1132.
48. Colzi A, D'Agostini F, Cesura AM, Borroni E, Da Prada M. Monoamine oxidase-A inhibitors and dopamine metabolism in rat caudatus: evidence that an increased cytosolic level of dopamine displaces reversible monoamine oxidase-A inhibitors in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;265:103–111
49. Cotman CW, Head E, Muggenburg BA, Zicker S, Milgram NW. Brain aging in the canine: a diet enriched in antioxidants reduces cognitive dysfunction. *Neurobiol Aging.* 2002;23:809–818.
50. Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr.* 2001;20:591-598.
51. Crompton M, Mitochondria and aging: a role for the permeability transition. *Aging Cell.* 2004;3:3–6.
52. Cuenca N, Kolb H. Circuitry and role of substance P-immunoreactive neurons in the primate retina. *J Comp Neurol.* 1998;393:439-456.
53. Curcio CA, Millican CL, Bailey T, Kruth HS. Accumulation of cholesterol with age in human Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:265-274.

54. Dartt DA, Kessler TL, Chung EH, Zieske JD. Vasoactive intestinal peptide-stimulated glycoconjugate secretion from conjunctival goblet cells. *Exp Eye Res.* 1996;63:27–34.
55. Dartt DA, McCarthy DM, Mercer HJ, Kessler TL, Chung EH, Zieske JD. Localization of nerves adjacent to goblet cells in rat conjunctiva. *Curr Eye Res.* 1995;14:993–1000.
56. Dedov VN, Mandadi S, Armati PJ, Verkrhatsky A. Capsaicin-induced depolarisation of mitochondria in dorsal root ganglion neurons is enhanced by vanilloid receptors. *Neuroscience.* 2001;103:219-226.
57. Del Priore LV, Kuo YH, Tezel TH. Age-related changes in human RPE cell density and apoptosis proportion in situ. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:3312–3318.
58. Delcourt C, Cristol JP, Tessier F, Leger CL, Descomps B, Papoz L. Age-related macular degeneration and antioxidant status in the POLA study. POLA Study Group. *Pathologies Oculaires Liées à l'Age.* *Arch Ophthalmol.* 1999;117:1384-1390
59. Demaison L, Sergiel JP, Moreau D, Grynberg A. Influence of the phospholipid n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio on the mitochondrial oxidative metabolism before and after myocardial ischemia. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1227:53-59.
60. Denton RM, Randle PJ, Bridges BJ, Cooper RH, Kerbey AL, Pask HT, Severson DL, Stansbie D, Whitehouse S. Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase. *Mol Cell Biochem.* 1975;9:27–53.
61. Diebold Y, Rios JD, Hodges RR, Rawe I, Dartt DA. Presence of nerves and their receptors in mouse and human conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:2270–2282.
62. Djamgoz MB, Wagner HJ. Localization and function of dopamine in the adult vertebrate retina. *Neurochem Int.* 1992;20:139–191.

63. Dunaief JL, Dentchev T, Ying GS, Milam AH. The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2002;120:1435–1442.
64. Elsas T, Edvinsson L, Sundler F, Uddman R. Neuronal pathways to the rat conjunctiva revealed by retrograde tracing and immunocytochemistry. *Exp Eye Res*. 1994;58:117–126.
65. Emonds-Alt X, Doutremepuich JD, Heaulme M, Neliat G, Santucci V, Steinberg R, Vilain P, Bichon D, Ducoux JP, Proietto V. In vitro and in vivo biological activities of SR140333: a novel potent non-peptide tachykinin NK1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*. 1993;250:403–413.
66. Ershov AV, Bazan NG. Photoreceptor phagocytosis selectively activates PPARgamma expression in retinal pigment epithelial cells. *J Neurosci Res*. 2000;60:328–337.
67. Feher J, Papale A, Mannino G, Gualdi G, Balacco GC. Mitotropic compounds for the treatment of age-related macular degeneration. The metabolic approach and a pilot study. *Ophthalmologica*. 2003;217:351–357.
68. Ferdinandusse S, Denis S, Dacremont G, Wanders RJ. Studies on the metabolic fate of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res*. 2003;44:1992-1997.
69. Finnemann SC, Leung LW, Rodriguez-Boulan E. The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:3842–3847.
70. Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:4312–4317.

71. Fox DA, Poblenz AT, He L, Harris JB, Medrano CJ. Pharmacological strategies to block rod photoreceptor apoptosis caused by calcium overload: a mechanistic target-site approach to neuroprotection. *Eur J Ophthalmol.* 2003;13:44–56.
72. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, Tomany SC, McCarty C, de Jong PT, Nemesure B, Mitchell P, Kempen J: Eye Diseases Prevalence Research Group. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol.* 2004;122:564–572.
73. Furuno T, Kanno T, Arita K, Asami M, Utsumi T, Doi Y, Inoue M, Utsumi K. Roles of long chain fatty acids and carnitine in mitochondrial membrane permeability transition. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1037-1046.
74. Gabbita SP, Subramaniam R, Allouch F, Carney JM, Butterfield DA. Effects of mitochondrial respiratory stimulation on membrane lipids and proteins: an electron paramagnetic resonance investigation. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1372:163–173.
75. Gosker HR, Wouters EFM, van der Vusse GJ, Schols AM. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure: underlying mechanisms and therapy perspectives. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1033–1047.
76. Govindarajan VS, Sathyanarayana MN. Capsicum – production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism; structure, pungency, pain, and desensitization sequences. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1991;29:435–474.
77. Grus FH, Dick B, Augustin AJ, Pfeiffer N. Analysis of the antibody repertoire in tears of dry-eye patients. *Ophthalmologica.* 2001;215:430–434.
78. Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2001;20:705-732.

79. Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, Hageman JL, Stockman HA, Borchardt JD, Gehrs KM, Smith RJ, Silvestri G, Russell SR, Klaver CC, Barbazetto I, Chang S, Yannuzzi LA, Barile GR, Merriam JC, Smith RT, Olsh AK, Bergeron J, Zernant J, Merriam JE, Gold B, Dean M, Allikmets R A. Common Haplotype in the Complement Regulatory Gene, Factor H (HF1/CFH), Predisposes Individuals to Age-related Macular Degeneration. *Proc Natl Sci Acad USA* 2005;102:7227-7232.
80. Haimovici R, Owens SL, Fitzke FW, Bird AC. Dark adaptation in age-related macular degeneration: relationship to the fellow eye. *Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2002;240:90–95.
81. Haimovici R, Owens SL, Fitzke FW, Bird AC. Dark adaptation in age-related macular degeneration: Relationship to the fellow eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2002;240:90-95.
82. Hannibal J, Fahrenkrug J. Immunoreactive substance P is not part of the retinohypothalamic tract in the rat. *Cell Tissue Res.* 2002;309:293-299.
83. Hansson M, Ellis E, Hunt MC, Schmitz G, Babiker A. Marked induction of sterol 27-hydroxylase activity and mRNA levels during differentiation of human cultured monocytes into macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1593:283–289.
84. Hatch GM, Cell biology of cardiac mitochondrial phospholipids. *Biochem Cell Biol.* 2004;82:99–112.
85. Hetteema EH, Tabak HF. Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1486:18–27.
86. Hiltunen JK, Qin Y. Beta-oxidation-strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters. *Biochem Biophys Acta.* 2000;1484:117–128.

87. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2001;21:3017–3023.
88. Hollyfield JG, Salomon RG, Crabb JW. Proteomic approaches to understanding age-related macular degeneration. *Adv Exp Med Biol.* 2003;533:83–89.
89. Holz FG, Sheraidah G, Pauleikhoff D, Bird AC. Analysis of lipid deposits extracted from human macular and peripheral Bruch's membrane. *Arch Ophthalmol.* 1994;112:402-406.
90. Holzer P. Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1992;121:49-146.
91. Hootman SR, de Ondarza JR. Regulation of goblet cell degranulation in isolated pancreatic ducts. *Am J Physiol.* 1995;268:24–32.
92. Huang AJ, Tseng SC, Kenyon KR. Morphogenesis of rat conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988;29:969–975.
93. Hunter DD, Satterfield BE, Huang J, Fedan JS, Dey RD. Toluene diisocyanate enhances substance P in sensory neurons innervating the nasal mucosa. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:543-549.
94. Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:6155-60.
95. Jackson GR, Owsley C, Curcio CA. Photoreceptor degeneration and dysfunction in aging and age-related maculopathy. *Ageing Res Rev.* 2002;1:381–396.

96. James AM, Murphy MP: How mitochondrial damage affects cell function. *J Biomed Sci.* 2002;9:475-487.
97. Jancso M, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol.* 1967;31:138-151.
98. Jessell TM, Iversen LL, Cuello AC. Capsaicin-induced depletion of substance P from primary sensory neurones. *Brain Res.* 1978;152:183-8.
99. Jin GF, Hurst JS, Godley BF. Rod outer segments mediate mitochondrial DNA damage and apoptosis in human retinal pigment epithelium. *Curr Eye Res.* 2001;23:11-19.
100. Johnson LV, Ozaki S, Staples MK, Erickson PA, Anderson DH. A potential role for immune complex pathogenesis in drusen formation. *Exp Eye Res.* 2000;70:441-449.
101. Johnson LV. Drusen-associated degeneration in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:4481-4488.
102. Joo NS, Saenz Y, Krouse ME, Wine JJ. Mucus secretion from single submucosal glands of pig. Stimulation by carbachol and vasoactive intestinal peptide. *J Biol Chem.* 2002;277:28167-28175.
103. Katz ML, Rice LM, Gao CL. Reversible accumulation of lipofuscin-like inclusions in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:175-181.
104. Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:2160-2164.

105. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51:2944–2950.
106. Kennedy CJ, Rakoczy PE, Constable IJ. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye*. 1995;9:763–771.
107. Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1486:1-17
108. Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*. 2000;405:421–424.
109. Kessler TL, Mercer HJ, Zieske JD, McCarthy DM, Dartt DA. Stimulation of goblet cell mucous secretion by activation of nerves in rat conjunctiva. *Curr Eye Res*. 1995;14:985–992.
110. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:4318–4323.
111. Kolb H, Fernandez E, Ammermuller J, Cuenca N. Substance P: a neurotransmitter of amacrine and ganglion cells in the vertebrate retina. *Histol Histopathol*. 1995;10:947-968.
112. Koplas PA, Rosenberg RL, Oxford GS. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*. 1997;17:3525-3537
113. Kroemer G, Redd JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*. 2000;6:513–519.
114. Krootila K, Oksala O, von Dickhoff K, Wimalawansa SJ, MacIntyre I, Uusitalo H. Ocular irritative response to YAG laser capsulotomy in rabbits: release of calcitonin gene-related peptide and effects of methysergide. *Curr Eye Res*. 1992;11:307-314.

115. Kuksa V, Imanishi Y, Batten M, Palczewski K, Moise AR. Retinoid cycle in the vertebrate retina: experimental approaches and mechanisms of isomerization. *Vision Res.* 2003;43:2959-2981.
116. Kuo HP, Rohde JA, Tokuyama K, Barnes PJ, Rogers DF. Capsaicin and sensory neuropeptide stimulation of goblet cell secretion in guinea-pig trachea. *J Physiol.* 1990;431:629-641.
117. Laboisse C, Jarry A, Branka JE, Merlin D, Bou-Hanna C, Vallette G. Regulation of mucin exocytosis from intestinal goblet cells. *Biochem Soc Trans.* 1995;23:810-813.
118. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.
119. Leaf A, Xiao YF, Kang JX. Interactions of n-3 fatty acids with ion channels in excitable tissues. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;67:113-120.
120. Lembeck F, Holzer P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1979;310:175-83.
121. Levine J, Panchalingam K, McClure RJ, Gershon S, Pettegrew JW. Effects of acetyl-L-carnitine and myo-inositol on high-energy phosphate and membrane phospholipid metabolism in zebra fish: A ³¹P-NMR-spectroscopy study. *Neurochem Res.* 2003;28:687-690.
122. Li J, Tso MO, Lam TT. Reduced amplitude and delayed latency in foveal response of multifocal electroretinogram in early age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 2001;85:287-290.

123. Liang FQ, Godley BF: Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: A possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 2003;76:397-403.
124. Liu L, Oortgiesen M, Li L, Simon SA. Capsaicin inhibits activation of voltage-gated sodium currents in capsaicin-sensitive trigeminal ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 2001;85:745-758.
125. Linnik MD, Moskowitz MA. Identification of immunoreactive substance P in human and other mammalian endothelial cells. *Peptides.* 1989;10:957-962.
126. Lomax AE, Furness JB. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res.* 2000;302:59-72.
127. Ludany A, Gallyas F, Gaszner B, Andrasfalvy B, Szucs Gy, Kellermayer M. Skimmed milk blocking improves silver post-intensification of peroxidase-diamino-benzidine staining on nitrocellulose membrane in immunoblotting. *Electrophoresis.* 1993;14:78-80.
128. Luhtala J, Palkama A, Uusitalo H. Calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerve fibers in the rat conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32:640-645.
129. Luhtala J, Uusitalo H. The distribution and origin of substance P immunoreactive nerve fibres in the rat conjunctiva. *Exp Eye Res.* 1991;53:641-646.
130. Maggi CA. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog Neurobiol.* 1995;45:1-98.
131. Maggi CA. The effects of tachykinins on inflammatory and immune cells. *Regul Pept.* 1997;70:75-90.
132. Maggi CA. The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol.* 1995;26:911-944.

133. Mares-Perlman JA, Brady WE, Klein R, Klein BE, Bowen P, Stacewicz-Sapuntzakis M, Palta M. Serum antioxidants and age-related macular degeneration in a population-based case-control study. *Arch Ophthalmol.* 1995;113:1518-1523.
134. Mares-Perlman JA, Fisher AI, Klein R, Palta M, Block G, Millen AE, Wright JD. Lutein and zeaxanthin in the diet and serum and their relation to age-related maculopathy in the third national health and nutrition examination survey. *Am J Epidemiol.* 2001;153:424-432.
135. Marmorstein AD, Marmorstein LY, Sakaguchi H, Hollyfield JG. Spectral profiling of autofluorescence associated with lipofuscin, Bruch's membrane, and sub-RPE deposits in normal and AMD eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:2435-2441.
136. Meneray MA, Bennett DJ, Nguyen DH, Beuerman RW. Effect of sensory denervation on the structure and physiologic responsiveness of rabbit lacrimal gland. *Cornea.* 1998;17:99-107.
137. Meyer-Bothling U, Bron AJ, Osborne NN. Immunohistochemical evidence for an adrenergic innervation of the rat meibomian glands. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994 (ARVO Abstract No. 1789).
138. Miceli MV, Jazwinski M. Nuclear Gene Expression Changes Due to Mitochondrial Dysfunction in ARPE-19 Cells: Implications for Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:1765-1773.
139. Midena E, Degli Angeli C, Blarzino MC, Valenti M, Segato T. Macular function impairment in eyes with early age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38:469-477.
140. Millar TJ, Chubb IW. Substance P in the chick retina: effects of light and dark. *Brain Res.* 1984;307:303-309.

141. Moore RY. Organization of the primate circadian system. *J Biol Rhythms*. 1993;8:S3-9.
142. Moss SE, Klein R, Klein BE. Prevalence of and Risk Factors for Dry Eye Syndrome. *Arch Ophthalmol*. 2000;118:1264-1268.
143. Murata T, He S, Hangai M, Ishibashi T, Xi XP, Kim S, Hsueh WA, Ryan SJ, Law RE, Hinton DR. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:2309-2317.
144. Murphy MP, Smith RA. Drug delivery to mitochondria: The key to mitochondrial medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;41:235-250.
145. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JGA, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. 1998;93:229-240.
146. Nakamura MT, Cho HP, Xu J, Tang Z, Clarke SD. Metabolism and functions of highly unsaturated fatty acids: An update. *Lipids*. 2001;36:961-964.
147. Nemeth J, Oroszi G, Than M, Helyes Zs, Pinter E, Farkas B, Szolcsanyi J. Substance P radioimmunoassay for quantitative characterization of sensory neurotransmitter release. *Neurobiology*. 1999;7:437-444.
148. Neufeld AH. Nitric oxide: a potential mediator of retinal ganglion cell damage in glaucoma. *Surv Ophthalmol*. 1999;43:129-135.
149. Neumann S, Doubell TP, Leslie T, Woolf CJ. Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature*. 1996;384:360-364.

150. Papadopoulo V. Peripheral benzodiazepine receptor: structure and function in health and disease. *Ann Pharm Fr.* 2003;61:30–50.
151. Papucci L, Schiavone N, Witort E, Donnini M, Lapucci A, Tempestini A, Formigli L, Zecchi-Paradies G, Ruggiero FM, Petrosillo G, Quagliariello E. Age-dependent decline in the cytochrome c oxidase activity in rat heart mitochondria: role of cardiopilin. *FEBS Lett.* 1997;406:136–138.
152. Patacchini R, Maggi CA. Peripheral tachykinin receptors as targets for new drugs. *Eur J Pharmacol.* 2001;429:13-21.
153. Peitl B, Petho G, Porszasz R, Nemeth J, Szolcsanyi J. Capsaicin-insensitive sensory-efferent meningeal vasodilatation evoked by electrical stimulation of trigeminal nerve fibres in the rat. *Br J Pharmacol.* 1999;127:457–467.
154. Pepe S, Tsuchiya N, Lakatta EG, Hansford RG: PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca²⁺ activation of PDH. *Am J Physiol.* 1999;276:149-158.
155. Pepe S: Mitochondrial function in ischaemia and reperfusion of the ageing heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27:745-750.
156. Petho G, Szolcsanyi J. Excitation of central and peripheral terminals of primary afferent neurons by capsaicin in vivo. *Life Sci.* 1996;58:47–53.
157. Pinter E, Brown B, Hoult JRS, Brain SD. Lack of evidence for tachykinin NK1 receptor-mediated neutrophil accumulation in the rat cutaneous microvasculature by thermal injury. *Eur J Pharmacol.* 1999;369:91–98.
158. Plugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye. *Am J Ophthalmol.* 2004;137:337-342.

159. Rakoczy PE, Zhang D, Robertson T, Barnett NL, Papadimitriou J, Constable IJ, Lai CM. Progressive age-related changes similar to age-related macular degeneration in a transgenic mouse model. *Am J Pathol.* 2002;16:1515–1524.
160. Remky A, Lichtenberg K, Elsner AE, Arend O. Short wavelength automated perimetry in age related maculopathy. *Br J Ophthalmol.* 2001;85:1432-1436.
161. Reuss S, Decker K, Hodl P, Sraka S. Anterograde neuronal tracing of retinohypothalamic projections in the hamster-possible innervation of substance P-containing neurons in the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett.* 1994;174:51-54
162. Richer S, Stiles W, Statkute L, Pulido J, Frankowski J, Rudy D, Pei K, Tsipursky M, Nyland J. Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration. The Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial). *Optometry.* 2004;75:216-230.
163. Rigoni M, Trevisani M, Gazzieri D, Nadaletto R, Tognetto M, Creminon C, Davis JB, Campi B, Amadesi S, Geppetti P, Harrison S. Neurogenic responses mediated by vanilloid receptor-1 (TRPV1) are blocked by the high affinity antagonist, iodo-resiniferatoxin. *Br J Pharmacol.* 2003;138:977–985.
164. Rios JD, Zoukhri D, Rawe IM, Hodges RR, Zieske JD, Dartt DA. Immunolocalization of muscarinic and VIP receptor subtypes and their role in stimulating goblet cell secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:1102–1111.
165. Robison WG Jr., Kuwabara T. Microperoxisomes in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol.* 1975;14:866–872.

166. Rodriguez de Turco EB, Parkins N, Ershov AV, Bazan NG. Selective retinal pigment epithelial cell lipid metabolism and remodeling conserves photoreceptor docosahexaenoic acid following phagocytosis. *J Neurosci Res.* 1999;57:479-486.
167. Rosenblatt MI, Dahl GP, Dickerson IM. Characterization and Localization of the Rabbit Ocular Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)-Receptor Component Protein (RCP). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:1159-1167.
168. Rottenberg H, Wu S. Mitochondrial dysfunction in lymphocytes from old mice: enhanced activation of the permeability transition. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;240:68-74.
169. Sall K, Stevenson OD, Mundorf TK, Reis BL. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. CsA Phase 3 Study Group. *Ophthalmology.* 2000;107:631-639.
170. Schmid E, Leierer J, Doblinger A, Laslop A, Fischer-Colbrie R, Humpel C, Theodorsson E, Teuchner B, Lalehabbasi D, Dragosits E, Kunze C, Philipp W, Göttinger W, Troger J. Neurokinin A is a main constituent of sensory neurons innervating the anterior segment of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:268-274.
171. Schon EA, Manfredi G: Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *J Clin Invest.* 2003;111:303-312.
172. Seddon JM, Rosner B, Sperduto RD, Yannuzzi L, Haller JA, Blair NP, Willett W. Dietary fat and risk for advanced age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol.* 2001;119:1191-1199.
173. Seifert P, Spitznas M. Immunocytochemical and ultrastructural evaluation of the distribution of nervous tissue and neuropeptides in the meibomian gland. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1996;234:648-656.

174. Seifert P, Stuppi S, Spitznas M. Distribution pattern of nervous tissue and peptidergic nerve fibers in accessory lacrimal glands. *Curr Eye Res.* 1997;16:298–302.
175. Setzer PY, Nichols BA, Dawson CR. Unusual structure of rat conjunctival epithelium. Light and electron microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987;28:531–537.
176. Shaban H, Borrás C, Vina J, Richter C. Phosphatidylglycerol potently protects human retinal pigment epithelial cells against apoptosis induced by A2E, a compound suspected to cause age-related macula degeneration. *Exp Eye Res.* 2002;75:99–108.
177. Shamsi FA, Boulton M. Inhibition of the RPE lysosomal and antioxidant activity by the age pigment lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:3041–3046.
178. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:10771–10778.
179. Simons E, Smith PG. Sensory and autonomic innervation of the rat eyelid: neuronal origins and peptide phenotypes. *J Chem Neuroanat.* 1994;7:35–47.
180. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr.* 2002;21:495-505.
181. Spaide RF, Ho-Spaide WC, Browne RW, Armstrong D. Characterization of peroxidized lipids in Bruch's membrane. *Retina* 1999;19:141-147.
182. Sparrow JR, Fishkin N, Zhou J, Cai B, Jang YP, Krane S, Itagaki Y, Nakanishi K. A2E, a byproduct of the visual cycle. *Vision Res.* 2003;43:2983–2990.
183. Sparrow JR, Nakanishi K, Parish CA. The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;7:1981-1989.

184. Specian RD, Oliver MG. Functional biology of intestinal goblet cells. *Am J Physiol.* 1991;260:183–189.
185. Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1486:219–231.
186. Stindl, G, Skofitsch, G. Immunohistochemical localization of calcitonin gene-related peptide in the rat eye. Response to capsaicin pretreatment. *Ann NY Acad Sci.* 1992;657:464-465.
187. Stjernschantz J, von Dickhoff K, Oksala O, Seppa H. A study of the mechanism of ocular irritation following YAG laser capsulotomy in rabbits. *Exp Eye Res.* 1986;43:641-651.
188. Sugrue MM, Tatton WG. Mitochondrial membrane potential in aging cells. *Biol Signals Recept.* 2001;10:176–188.
189. Sundelin S, Wihlmark U, Nilsson SE, Brunk UT. Lipofuscin accumulation in cultured retinal pigment epithelial cells reduces their phagocytic capacity. *Curr Eye Res.* 1998;17:851–857.
190. Sunness JS, Johnson MA, Massof RW, Marcus S. Retinal sensitivity over drusen and nondrusen areas: A study using fundus perimetry. *Arch Ophthalmol.* 1988;106:1081-1084.
191. Suter M, Reme C, Grimm C, Wenzel A, Jaattela M, Esser P, Kociok N, Leist M, Richter C. Age-related macular degeneration. The lipofusion component N-retinyl-N-retinylidene ethanolamine detaches proapoptotic proteins from mitochondria and induces apoptosis in mammalian retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem.* 2000;275:39625–39630.
192. Szabo I, Adams C, Gulbins E. Ion channels and membrane rafts in apoptosis. *Pflugers Arch.* 2004;448:304–312.

193. Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev.* 1999;51:159–212.
194. Szolcsanyi J. Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. *Agents-Actions.* 1988;23:4–11.
195. Szolcsanyi J. Action of capsaicin on sensory receptors. In Wood J. (ed): *Capsaicin in the Study of Pain.* Academic London. 1993:1-26
196. Szolcsanyi J. Anandamide and the question of its functional role for activation of capsaicin receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21:203-204.
197. Szolcsanyi J, Jancso-Gabor A, Joo F. Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1975;287:157-169
198. Szolcsanyi J, Jancso-Gabor A. Sensory effects of capsaicin congeners. Part II: Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. *Arzneimittelforschung.* 1976;26:33-37.
199. Szoke E, Balla Z, Csernoch L, Czeh G, Szolcsanyi J. Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurones. *Neuroreport.* 2000;11:1949-52
200. Takatsuji K, Miguel-Hidalgo JJ, Tohyama M. Substance P-immunoreactive innervation from the retina to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Brain Res* 1991;568:223–229.
201. Takatsuji K, Tohyama M. Differential effects on substance P immunoreactivity in rat suprachiasmatic and olivary pretectal nuclei. *Neuroreport.* 1993;4:647-650.

202. Taylor AW, Yee DG, Streilein JW. Suppression of nitric oxide generated by inflammatory macrophages by calcitonin gene-related peptide in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:1372-1378.
203. Ten Tusscher MP, Klooster J, Baljet B, Van der Werf F, Vrensen GF. Pre- and post-ganglionic nerve fibres of the pterygopalatine ganglion and their allocation to the eyeball of rats. *Brain Res.* 1990;517:315-323.
204. Ten Tusscher MP, Klooster J, van der Want JJ, Lamers WP, Vrensen GF. The allocation of nerve fibres to the anterior eye segment and peripheral ganglia of rats. I. The sensory innervation. *Brain Res.* 1989;494:95-104.
205. Tervo K, Tervo T, Eranko L, Vannas A, Cuello AC, Eranko O. Substance P-immunoreactive nerves in the human cornea and iris. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1982;23:671-674.
206. Toescu EC, Myronova N, Verkhatsky A. Age-related structural and functional changes of brain mitochondria. *Cell Calcium.* 2000;28:329-338.
207. Tolentino MJ, Miller S, Gaudio AR, Sandberg MA. Visual field deficits in early age-related macular degeneration. *Vision Res* 1994;34:409-413.
208. Tyni T, Johnson M, Eaton S, Pourfarzam M, Andrews R, Turnbull DM. Mitochondrial fatty acid beta-oxidation in the retinal pigment epithelium. *Pediatr Res.* 2002;52:595-600.
209. Uauy R, Hoffman DR, Peirano P, Birch DG, Birch EE. Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids.* 2001;36:885-895.
210. van Leeuwen R, Klaver CC, Vingerling JR, Hofman A, de Jong PT. The risk and natural course of age-related maculopathy: follow-up at 6 1/2 years in the Rotterdam study. *Arch Ophthalmol.* 2003;121:519-526.

211. Varma R, Fraser-Bell S, Tan S, Klein R, Azen SP. Los Angeles Latino Eye Study Group. Prevalence of age-related macular degeneration in Latinos; The Los Angeles Latino Eye Study. *Ophthalmology*. 2004;111:1288–1297.
212. Villa RF, Turpeenoja L, Benzi G, Giuffrida Stella AM. Action of L-acetylcarnitine on age-dependent modifications of mitochondrial membrane proteins from rat cerebellum. *Neurochem Res*. 1988;13:909-916
213. Virmani MA, Caso V, Spadoni A, Rossi S, Russo F, Gaetani F. Action of acetyl-L-carnitine on the neurotoxicity evoked by amyloid fragments on primary rat cortical neurones. *Ann NY Acad Sci*. 2001;939:162-178.
214. von Ruckmann A, Schmidt KG, Fitzke FW, Bird AC, JacobiKW. Dynamics of accumulation and degradation of lipofuscin in retinal pigment epithelium in senile macular degeneration. *Klin Monatsbl Augenheilk*. 1998;213:32–37.
215. Wahlestedt C, Beding B, Ekman R, Oksala O, Stjernschantz J, Hakanson R. Calcitonin gene-related peptide in the eye: release by sensory nerve stimulation and effects associated with neurogenic inflammation. *Regul Pept*. 1986;16:107-115
216. Waldrep JC, Crosson CE. Induction of keratouveitis by capsaicin. *Curr Eye Res*. 1988;7:1173–1182.
217. Wallengren J. Vasoactive peptides in the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 1997;2:49-55.
218. Wang JY, Saito M. Dietary supplementation of n-3 fatty acids and hydroperoxide levels in rat retinas. *Free Radic Res*. 2001;35:367-375.
219. Wang ZY, Monstein HJ, Waldeck K, Grundemar L, Hakanson R. Electroconvulsive

treatment evokes release of preprotachykinin-A mRNA into the cerebrospinal fluid and ocular aqueous humor of rabbits. *Neurosci Lett.* 1997;226:151-154.

220. West S, Vitale S, Hallfrisch J, Munoz B, Muller D, Bressler S, Bressler NM. Are antioxidants or supplements protective for age-related macular degeneration? *Arch Ophthalmol.* 1994;112:222-227
221. Williams RM , Baucé L, Lea RW, Singh J, Sharkey KA. Secretion and serotonin release in the isolated rat lacrimal gland: the effects of substance P and calcitonin gene-related peptide. *J Auton Nerv Syst.* 1996;61:37-42.
222. Willoughby EW. A sensitive silver stain for protein agarose gel. *Anal Biochem.* 1983;130:353-358.
223. Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD, Sternberg P. Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 1999;5:32 (<http://www.molvis.org/molvis/v5/p32/>).
224. Wolf G. Lipofuscin and macular degeneration. *Nutr Rev.* 2003;61:342-346.
225. Yaksh TL, Farb DH, Leeman SE, Jessel TM. Intrathecal capsaicin depletes substance P in the rat spinal cord and produces prolonged thermal analgesia. *Science.* 1979;206:481-483.
226. Yamamura T, Otani H, Nakao Y, Hattori R, Osako M, Imamura H, Das DK. Dual involvement of coenzyme Q10 in redox signaling and inhibition of death signaling in the rat heart mitochondria. *Antioxid Redox Signal.* 2001;3:103-112.
227. Yoshida A, Fujihara T, Nakata K. Cyclosporin A increases tear fluid secretion via release of sensory neurotransmitters and muscarinic pathway in mice. *Exp Eye Res.* 1999;68:541-546.

228. Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: Possible health implications. *Int J Dev Neurosci.* 2000;18:383-399.
229. Zammit VA, Corstorphine CG, Kolodziej MP, Fraser F. Lipid molecular order in liver mitochondrial outer membranes, and sensitivity of carnitine palmitoyltransferase I to malonyl-CoA. *Lipids.* 1998;33:371-376.
230. Zingsheim HP, Plattner H. Electron microscopic methods in membrane biology. In Korn ED, Ed. *Methods in membrane biology*, Plenum Press, New York. 1976:1-146.

Közlemények

Az értekezés alapját képező publikációk

1. **Kovacs I**, Ludany A, Koszegi T, Feher J, Kovacs B, Szolcsanyi J, Pinter E. Substance P Released from Sensory Nerve Endings Influence Tear Secretion and Goblet Cell Function in the Rat. *Neuropeptides*, 2005;39:395-402 **IF: 2.494**
2. Feher J, **Kovacs I**, Artico M, Cavallotti C, Papale A, Gabrieli CB. Mitochondrial alterations of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Neurobiology of Aging*, in press, 2005. **IF: 5.516**
3. Feher J, Kovacs B, **Kovacs I**, Schvoeller M, Gabrieli CB. Treatment of Early Age-related Macular Degeneration with a Combination of n-3 Fatty Acids, Coenzyme Q10 and Acetyl-L-carnitine. *Ophthalmologica*, 2005;219:154–166. **IF: 0.645**
4. Bronzetti E, Artico M, **Kovacs I**, Felici LM, Vignone D, D'Ambrosio A, Forte F, Rosa DL, Feher J. Immunohistochemical localization of neurotransmitters and neurotrophins in the retina of rats electrically stimulated at the Gasserian ganglion. (*Invest Ophthalmol Vis Sci*, lektorálás alatt), 2006

Egyéb közlemények

1. **Kovacs I**, Ferencz M, Nemes J, Somfai GM, Salacz G, Recsan Z. Intraocular lens calculation error from resolved macular edema following combined cataract surgery and pars plana vitrectomy. (*Acta Ophthalmologica Scandinavica*, közlésre elfogadva), 2006. **IF:0.974**

2. Ferencz M, Somfai GM, Farkas Á, **Kovács I**, Lesch B, Récsán Z, Nemes J, Fiedler O, Salacz G. Functional assessment of the possible toxicity of indocyanine green dye in macular hole surgery. (Am J Ophthalmol, közlésre elfogadva) 2006 **IF: 2.332**
3. **Kovács I**, Nemes J, Ferencz M, Récsán Zs, Salacz Gy. Relaxációs retinotomia szerepe a súlyos proliferatív vitreoretinopathia okozta ideghártya-leválás műtéti megoldásában. Szemészet. 2004;141(1):21-25.
4. **Kovács I**, Récsán Zs, Kovács T, Folyovits A, Kalabay L. Melanintartalmú macrophagok kimutatásának szerepe a Vogt-Koyanagi-Harada-betegség korai diagnózisában. Szemészet. 2004;141(1):109-113.
5. **Kovács I**, Salacz Gy. A diabétesz szemészeti szövődményei. Hippocrates 2003;5:290-2.
6. Szabados G, **Kovacs I**, Loderer Z, Setalo G. Distribution of Fluoro-Gold (FG) in the central nervous system of the rat following its injection into the cerebello-medullary cistern. Acta Biol Hung. 1996;47(1-4):411-8. **IF: 0.282**

Poszterek, idézhető absztraktok az értekezés témájában

1. Feher J, Kovacs B, **Kovacs I**, Schvoller M, Mannino G, Papale A, Gabrieli CB. Correlation Between Fundus Alterations and Visual Functions in Age-Related Macular Degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005: ARVO E-Abstract 198 (**IF: 3.577**).
2. **Kovacs I**, Ludany A, Kovacs B, Feher J, Szolcsanyi J. Direct Evidence for Involvement of Substance P in Tear Secretion After Antidromic Electrical Stimulation of Rat's Trigeminal Ganglion. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005: ARVO E-Abstract 4414 (**IF: 3.577**).
3. Feher J, Kovacs B, **Kovacs I**, Schvoeller M, Gabrieli CB. Improvement of Fundus Alterations in Early AMD Treated With a Combination of Acetyl-LCarnitine, Highly

- Concentrated N-3 Fatty Acids, and Coenzyme Q10. Congress of the American Academy of Ophthalmology, Poster No P0364. New Orleans, 2004.
4. Ludany A, Hartmann A, **Kovacs I**, Koszegi T. Comparative Microanalysis of Tear Proteins: an Experimental Model. 16th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Clinica Chimica Acta 2005;355: S217-218 (**IF: 1.633**).
 5. Feher J, Kovacs B, **Kovacs I**, Schvoeller M, Gabrieli CB. The Metabolich Approach for Treating Age-Relaled Macular Degeneration. IBC's 2nd International Conference, Boston, 2004.
 6. Feher J, Kovacs B, Schvoller M, **Kovacs I**. Improvement of Fundus Alterations in Early AMD Treated With a Combination of n-3 Fatty Acids, Coenzyme Q10 and Acetyl-L-carnitine. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004: ARVO E-Abstract 3093 (**IF: 3.577**).
 7. Hartmann Á, **Kovács I**, Kőszegi T, Ludány A. Modell a könnyfehérjék összehasonlító mikroanalízisére. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 52. Nagygyűlése. Sopron, 2004. szeptember 2-4. Poszter Nr 42.
 8. **Kovacs I**, Feher J, Kovacs B, Ludany A, Szolcsanyi J. Enhanced Tear Secretion Due to Neurogen Inflammation of the Eye - a Rat Modell of KCS. 14th Congress of the European Society of Ophthalmology (SOE), Madrid, 2003. Poster nr P270, pp 236-7.
 9. Kovacs B, Feher J, **Kovacs I**, Schvoeller M. The Metabolic Approach for the Treatment of Early Age-Related Macular Degeneration. A Controlled Clinical Trial. 14th Congress of the European Society of Ophthalmology (SOE), Madrid, 2003. Poster nr P043 pp. 138-9.
 10. Feher J, Kovacs B, **Kovacs I**, Schvoller M, Papale A, Mannino G, Gabrieli CB. Treatment of Age-Related Macular Degeneration with a Combination of n-3 Fatty Acid, Acetyl-L-Carnitine and Coenzyme Q10. Congress of the American Academy of Ophthalmology, 2003 Poster nr P0286.

11. **Kovacs I**, Lukacs I, Ludany A, Feher J, Kovacs B, Szolcsanyi J. Changes in Tear Composition after Antidromic Electric Stimulation of Rat's Trigeminal Ganglia. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44:ARVO E-Abstract 2529. **(IF: 4.148)**
12. Feher J, Kovacs B, **Kovacs I**, Schvoller M, Papale A, Mannino G, Gabrieli CB. Mitotrop Compounds for the Treatment of Early Age-Related Macular Degeneration: The Metabolic Approach and a Clinical Trial. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44:ARVO E-Abstract 5031. **(IF: 4.148)**
13. **Kovacs I**, Szolcsanyi J, Kovacs B, Feher J. Neurogen Inflammation, But Not Parasympathetic Nerve Stimulation Influences Tear Secretion After Electric Stimulation Of Trigeminal Ganglia In Rats. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002;43:ARVO E-Abstract 3160. **(IF: 4.172)**
14. **Kovacs I**, Szolcsanyi J, Kovacs B, Feher J. Antidromic Stimulation of the Trigeminal Ganglia Influences Mucus, Lipid and Tear Secretion in Rats. [ARVO Abstract] Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001 Abstract nr 1406. **(IF: 4.172)**

Egyéb poszterek, idézhető absztraktok

1. J Feher, A Papale, **I Kovacs**, CB Gabrieli. Improvement of Dry Eye Treated With Omega-3 Based Combination of Food Supplements. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006: ARVO E-Abstract 246 **(IF: 3.577)**.
2. Ferencz M, **Kovács I**, Lesch B, Farkas Á, Somfai GM, Barabási Z, Récsán Z, Nemes J, Fiedler O, Salacz G. Assessment of Possible Toxic Effect of Indocyanine Dye Applied in Macular Hole Surgery. Congress of the European Society of Ophthalmology (SOE), Poster Nr: P010. Berlin, Germany, 2005

3. **Kovacs I**, Reccsan Zs, Salacz G. Combined Cataract Surgery and PPV: IOL Calculation Error from Resolved Macular Edema. Congress of the European Society of Cataract and Refractive Surgeons (ESCRS), Lisszabon, 2005
4. Ferencz M, **Kovács I**, Lesch B, Farkas Á, Somfai GM, Barabási Z, Récsán Z, Nemes J, Fiedler O, Salacz G. Assessment of Possible Toxic Effect of Indocyanine Dye Applied in Macular Hole Surgery. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005: ARVO E-Abstract 4563 (**IF: 3.577**).
5. **Kovacs I**, Rigo J, Mihaltz K, Somfai GM. Serous neuroretinal detachment of the macula diagnosed by optical coherence tomography in patients with severe preeclampsia. 9th Vision Research Conference – Neuroimaging the Retina. Fort Lauderdale 2005, Poster Nr:16.

Előadások

1. **Kovács I**, Schwöller M, Kovács B, Fehér J. Látásfunkciók és a szemfenéki elváltozások közötti összefüggés időskori macula degeneráció esetében. Magyar Szemorvostársaság kongresszusa, Sopron, 2006.
2. **Kovács I**. Egy éves klinikai tapasztalatok Photorop[®] kezeléssel: Propspektív, kettős-vak, placebo kontrollált klinikai tanulmány. Imre József Jr. Klub ülése, Budapest, 2006.
3. **Kovács I**. A gyermekkori diabétesz szemészeti vonatkozásai. A diabetes szemészeti vonatkozásai továbbképző kurzus, Semmelweis Egyetem, Szemészeti Klinika, 2006
4. **Kovács I**. Száraz szem: anatómia, fiziológia, pathofiziológia. Száraz szem klubhétvége, Balatonalmádi, 2005
5. **Kovács I**. Kontaktlencse és száraz szem. Száraz szem klubhétvége, Balatonalmádi, 2005

6. **I Kovacs**, J Feher, B Kovacs, M Schvoller, G Mannino, A Papale, CB Gabrieli. Correlation Between Fundus Alterations and Visual Functions in Age-Related Macular Degeneration. Congress of the European Society of Ophthalmology (SOE), Berlin, Germany, 2005
7. **Kovács I.** A száraz szem - diagnózis és kezelés. Magyar Szemészeti Szakasszisztensek Társasága (SHAO) kongresszusa, Nyíregyháza, 2005
8. **I Kovacs**, Zs Recsan, G Salacz. Combined Cataract Surgery and PPV: IOL Calculation Error from Resolved Macular Edema. Congress of the American Society of Cataract and Refractive Surgery (ASCRS), Washington DC, USA, 2005.
9. **Kovács I**, Récsán Zs, Salacz Gy. Műlencse tervezés kombinált szürkehályog műtétet megelőzően. Magyar Műlencse Implantációs és Refraktív Sebészeti Társaság (SHIOL) kongresszusa, Keszthely, 2005.
10. **Kovács I.** Relaxációs retinotómiák. Továbbképző kurzus, Semmelweis Egyetem II. Sz. Szemészeti Klinika. Budapest, 2005.
11. **Kovács I**, Fehér J, Kovács B, Schvoeller M, Papale A, CB Gabrieli. Acetyl-L-carnitine, n-3 Fatty Acids és Coenzyme Q10 szerepe idős kori macula degeneráció kezelésében. Magyar retina társaság ülése, Budapest, 2004.
12. **Kovács I**, Fehér J, Kovács B, Szolcsányi J. Szenzoros idegvégződésekből felszabaduló neuropeptidek hatása a könnytermelésre. Nemzetközi „Száraz szem” kurzus, Debreceni Egyetem, 2004.
13. **I Kovacs**, Zs Recsan, G Salacz. Intraocular lens power calculation prior to combined cataract extraction and vitreoretinal surgery in case of severe macular edema or epiretinal membrane. „Societas Internationalis pro Diagnostica Ultrasonica in Ophthalmologia-SIDUO” XX. nemzetközi kongresszusa, Budapest, 2004.

14. **Kovács I**, Ferencz Mária, Nemes János, Récsán Zsuzsa, Salacz György. Szürkehályogműtéttel kombinált pars plana vitrektómiák. Magyar Műlencse Implantációs és Refraktív Sebészeti Társaság (SHIOL) kongresszusa, Keszthely, 2004.
15. **Kovács I**, Pintér E, Ludány E, Fehér J, Szolcsányi J. Trigemínus ingerlés következtében felszabaduló neurotransmitterek hatása a könnytermelésre. Fiatal kutatók fóruma a Magyar Szemorvostársaság tavaszi ülészakán, Budapest, 2004.
16. **I Kovacs**, G Salacz. Relaxing Retinotomy During Pars Plana Vitrectomy Due to Retinal Shrinkage Caused by Proliferative Vitreoretinopathy. Congress of the European Vitreoretinal Society (EVRS), Sopron, Hungary, 2003.
17. J Feher, **I Kovacs**, G Mannino, G Balacco. Treatment of early AMD with omega-3, acetyl-L-carnitine and coenzyme Q10. III. International Symposium of the German Ophthalmological Society (DOG), Baden-Baden, Germany, 2003.
18. **Kovács I**, Salacz Gy. A diabéteszes retinopathia kezelési lehetőségei. Erdélyi Múzeum Egyesület kongresszusa, Sepsiszentgyörgy, Erdély, 2003.
19. **Kovács I**, Salacz Gy. Szürkehályogműtéttel kombinált vitrektómiák műtéti eredményei. Magyar Műlencse Implantációs és Refraktív Sebészeti Társaság (SHIOL) kongresszusa, Keszthely, 2003.
20. **Kovács I**, Sebestyén M, Salacz Gy. Tompa trauma következtében luxálódott lencsék műtéti ellátása. Magyar Szemorvostársaság kongresszusa, Miskolc, 2003.
21. **I Kovacs**, G Radó. The Dropped Nucleus. Congress of the Romanian Society of Ophthalmology, Kolozsvár, Transsylvania, 2002.

Köszönetnyilvánítás

Köszönet Kovács Bálint és Fehér János professzor uraknak, hogy érdeklődésemet felkeltették a téma iránt, valamint értékes tanácsaikkal munkámat irányították.

Köszönet Szolcsányi professzor úrnak, programvezetőmnek, aki a neurogén gyulladás illetve a capsicin hatásmechanizmusának nemzetközi szintű szaktekintélyeként munkámat javaslataival segítette.

Köszönet dr Pintér Erika témavezetőmnek, aki bármely felmerült probléma megoldásában segített, és támogatott.

Köszönet a Pécsi Tudományegyetem Szemészeti Klinika valamennyi dolgozójának, akik a klinikai tanulmány lefolytatásában segítségemre voltak. Külön köszönet dr Schwöller Mónikának, aki a betegek kontrollvizsgálatában, valamint az adatok feldolgozásában segítségemre volt. Köszönöm Barabási Margit és Dóriné Ági asszisztensnőknek, Takács Gábor fotósnak, Fenyvesi László adminisztrátornak áldozatos munkájukat, akik nélkül a tanulmány nem valósulhatott volna meg.

Köszönönetemet fejezem ki a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás intézetében dolgozó valamennyi asszisztensnek, akik az állatkísérletek során segítségemre voltak.

Köszönet a római „La Sapienza” egyetemről Elena Bronzetti, Marco Artico, Laura M Felici, Domenico Vignone, Anna D'Ambrosio, Flavio Forte és Rosa Di Liddo az ideghártya immunhisztokémiai feldolgozásában nyújtott szakmai segítségükért.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak a biztatást, támogatást és türelmet, amit a munkám során kaptam.