

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

**Doktori (PhD) tézisek**

**dr Kovács Illés**  
egyéni felkészülő

Programvezető: Dr Szolcsányi János akadémikus

Témavezető: Dr Pintér Erika

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs, 2006



## Bevezetés

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 betegségecsoport, 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 kimutatták a kapszaicin érzékeny idegvégződéseket, azonban nem vizsgálták ezek szerepét a könnytermelésben, illetve a macula lutea betegségeiben. A neurogén gyulladás a nociceptív érzőideg végződése körül kialakuló lokális folyamat, melynek jellemzője, hogy az idegvégződésekből pro-inflammációs neuropeptidok pl. Calcitonin Gén-Rokon Peptid (CGRP), Substance P (SP), neurokinin A szabadulnak fel, melyek vazodilatációt, plasma extravasációt, a hisztamin felszabadulást okoznak, valamint elősegítik a gyulladással járó sejtek felszaporodását. Noha a reflexes könnytermelést nagyrészt a fő könnymirigy paraszimpatikus hatásra létrejövő szekréciójának tulajdonítják, szimpatikus, paraszimpatikus, valamint CGRP és SP tartalmú érző idegvégződéseket sikerült kimutatni a kötőhártyában, valamint a járulékos könnymirigyekben is.

A legújabb kutatási eredmények az időskori macula degeneráció kialakulásában a lokális gyulladás szerepét is felelőssé teszik. Irodalmi adatok alapján a betegség pathomechanizmusában a koraival 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 pigmenthámiban 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 anyagcseréjét fokozó, ún. „mitokondriotrop” (acetyl-L-karnitin,  $\omega$ 3 zsírsavak és koenzim-Q10) vegyületeket tartalmazó készítmény alkalmazásával is kedvező eredményeket értek el időskori macula-degeneráció kapcsán.

## **Célkitűzések**

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

1. Megvizsgáljuk az érzőideg ingerlés könnytermelésre kifejtett hatását állatkísérletes modellben
2. A retinában expresszáldó 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.***

Állatkísérletünk során patkány trigeminus ganglionjának szelektív ingerlését végeztünk el sztereotaxiás elektróda segítségével, 20 perc időtartamig 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.

### ***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 hematoxin-eosin perjódsv-Schiff (HE-PAS) festést végeztünk a metszeteket fénymikroszkóppal értékeltük.

### *Könnytermelés*

Az ingerlés során a termelt könnyet az áthajlásba helyezett kapilláris segítségével gyűjtöttük, különös gonddal eljárva, nehogy a szaruhártya érintésével reflexes könnyezést provokáljunk.

### *Kehelysejt sűrűség*

A kehelysejtek mucin szekrécióját a kehelysejt sűrűség meghatározásával vizsgáltuk: fénymikroszkópos vizsgálat során a 100 basalis epithelsejtre vonatkozó kehelysejt számot adtuk meg, 500 basalis sejt számolásával.

### *Könnyfehérje analízis*

Az összegyűjtött könny mintákból Bradford szerint fehérjetartalom meghatározás történt. 3 µg fehérje 12.5 % SDS-gél elektroforézisét követően a fehérje csíkokat Coomassie Brilliant Blue R250 festéssel, valamint ezüstözéssel erősítettük fel, az egyes csíkok azonosítására a gélen ismert mólsúlyú markerek szolgáltak. A könnyfehérjék közül az Immunglobulin A és a lizozim kimutatására poliklonális antitestek (IgA: kecske 1:50, Sigma; lizozim: nyúl, 1:50, Acris) szolgáltak, a kvantitatív vizsgálatokat chemilumineszcencia módszerrel végeztük.

### *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. kapszaicin (topikálisan adott 5 µl 1%-os oldattal, naponta egyszer, 3 napon keresztül) a szenzoros neuropeptidek depletálására,
5. specifikus neurokinin 1 receptor antagonist SR140333 (240 nmol/kg i.v.) adásával a substance P hatásának kivédése

### *A retina morfológiai eltéréseinek vizsgálata*

Az ingerlést követően rögtön eltávolított szemgolyókat PBS-ben történő mosást követően formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk, és immunhisztokémiai vizsgálatokra

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. A kezelt és a kontroll oldalról származó metszetsorok értékelése során a létrejövő immunreakciót sötét-barna (intenzív==++), sárgásbarna (enyhe=+), kérdéses ( $\pm$ ), 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 pólyusi elváltozást nem okozó tumor, illetve sérülés miatt eltávolított 62 szem (2-87 éves) szövettani feldolgozása, illetve elektron mikroszkópos vizsgálata során morfológiai analízist végeztünk. A minták közül 31 esetben a klinikai diagnózis AMD volt (42-87 év), míg a 31 korban és nemben identikus, időskori macula degenerációban nem szenvedő beteg szeme szolgált kontroll csoportként. Az AMD klinikai diagnózisa drusenek, illetve fokális pigment egyenetlenség jelenlétén alapult, előrehaladott formák (geographicus atrophia, choroidea érujdonképződés) a tanulmányba nem kerültek be.

#### ***Elektron mikroszkópia***

Az enukleációt követően a szemgolyók szövettani feldolgozása azonnal megkezdődött, a morfológiai analízist két független vizsgáló végezte.

### ***Követésez macula funkció vizsgálatok mitotrop anyagok alkalmazása során időskori macula degenerációban***

A Pécsi Tudományegyetem Kutatásaitikai Bizottsága által jóváhagyott kutatási terv alapján lefolytatott kettős vak, placebo kontrollált klinikai tanulmányba bekerült 106 beteg életkora 55-70 év, korai AMD klinikai diagnózisa mellett látásélességük 0.4-0.8 volt.

Randomizációt követően a kezelt csoportba tartozó betegek Phototrop® (összetevők: acetil-L-karnitin,  $\omega$ -3 zsírsavak és koenzim Q10); a kontroll csoportba tartozó betegek placebo kezelésben részesültek 1 évig. A 3 havonta elvégzett szemészeti illetve belgyógyászati kontroll vizsgálatok során a látásélesség meghatározása és automata látótér vizsgálat történt, valamint digitális fundus fotó készült. A kiértékelés során a betegek jobb látású (korábbi forma), illetve rosszabb látású (előrehaladottabb forma) szemét kijelölve és különválasztva alcsoport analíziseket is végeztünk.

### *Funkcionális vizsgálatok*

1. **Visual Field Mean Defect (VFMD)** automata periméterrel mérve
2. **Foveal Sensitivity (FS)** automata periméterrel mérve
3. **Látásélesség** (Snellen, valamint ETDRS táblán mérve)

### *Szemfenéki eltérések*

A digitális fundus fotók kiértékelése során a centrális 6000  $\mu\text{m}$  átmérőjű területen meghatároztuk a szemfenéken a különböző mérettartományba (<63, <125, <250, <500  $\mu\text{m}$ ) tartozó drusenek számát, valamint minden szem esetében kiszámítottuk a drusenek által elfoglalt összterület nagyságát.

### *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  $r$  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  $2 \times 2$  táblázatok analízise Fischer teszt segítségével történt.

## Eredmények

### *A trigeminus ganglion ingerlésének hatása a könnytermelésre*

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

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

### *Könnytermelés*

Előkezelés nélkül a könny mennyisége az ingerelt oldalon  $18.00 \pm 0.86$  mm az ellenoldalon  $3.75 \pm 0.53$  mm volt ( $p < 0.0001$ ). Atropin, guanethidin és hexamethonium előkezelés a stimulált könnytermelést nem gátolta (atropin:  $19.50 \pm 0.68$  mm, guanethidin:  $16.63 \pm 1.24$  mm, hexamethonium:  $17.13 \pm 1.11$  mm,  $p > 0.05$ ). Mind a kapszaicin, mind az NK1 receptor antagonistá SR140333 előkezelés szignifikánsan gátolta a stimulált könnytermelést ( $4.39 \pm 0.65$  mm és  $8.75 \pm 1.09$  mm,  $p < 0.0001$ ), ugyanakkor SR140333 előkezelést követően a könnytermelés szignifikánsan magasabb maradt a stimulált oldalon, összehasonlítva a kontroll oldallal.

### *Kehelysejt sűrűség (mucin szekréció)*

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



### *Könnyfehérje koncentráció*

A könny fehérje koncentrációja előkezelés nélküli esetekben  $10.23 \pm 0.89 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  volt a stimulált, és  $18.40 \pm 1.52 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ( $p < 0.005$ ) a kontroll oldalon. Miután a termelt könny összmenyisége fokozódott ( $8.13 \pm 1.05 \mu\text{l}$  a stimulált oldalon ill.  $1.76 \pm 0.27 \mu\text{l}$  a kontroll oldalon,  $p < 0.005$ ) az összesen szekretált fehérje mennyisége is jelentősen több volt a stimulált oldalon ( $83.17 \pm 11.03 \mu\text{g}$  ill.  $32.35 \pm 4.28 \mu\text{g}$ ,  $p < 0.005$ ). Előkezelés nélkül a könny SDS gélelektroforézis fehérje mintázata nem mutatott látható eltérést a két oldal között, valamint ugyanazon mennyiségű fehérje minták analízise luminol chemilumineszcencia módszerével hasonló mennyiséget mutatott a két proteinnél a két oldalon (lizozim:  $2711 \pm 347$  vs.  $2802 \pm 331$  impulzus,  $p > 0.05$ , és IgA:  $2718 \pm 369$  vs.  $2383 \pm 281$  impulzus,  $p > 0.05$ ).

### *Antidrómos ingerlés hatása a retinában expresszálandó neuropeptidekre*

A kontroll szemekben kérdéses, vagy enyhe immunreakciók alakultak kis 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.

### *Elektronmikroszkópos eltérések időskori macula degeneráció esetében*

#### *Korral járó elváltozások*

A fiatal RPE sejtekben számos, pálca-formájú, 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 peroxiszómák száma fokozott, alakjuk és elektron denzitásuk változóbb. Továbbá, míg fiatal szemekben egyenletesen eloszolva helyezkedtek el, addig idős szemekben kis csoportokat (4-6) alkottak. A lipofuscin granulomok jelenléte fiatalabb szemekben rendkívül ritka, azonban idős mintákban jellemzően fokozott, számos esetben a melanoszómákkal összekapcsolódva melanolipofuscin granulomokat képezve az RPE sejtek apikális részén helyezkedtek el.

### *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 peroxisómák és lipofuscin granulumok elhelyezkedése rendkívül változó volt AMD esetében.

### *Morfometriai eredmények*

A koral 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 ( $p=0.038$ ). 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 koral, a két csoport közötti különbség szintén szignifikánsnak bizonyult ( $p=0.019$ ). A jól definiált mitokondrium cristák aránya szintén jelentős csökkenést mutatott a koral normál ( $r^2=0.861$ ;  $p<0.001$ ), illetve az AMD-s szemekben ( $r^2=0.918$ ;  $p<0.001$ ); a két csoport között szignifikáns különbséget mutatva ( $p=0.28$ ).

A peroxisómák száma a koral emelkedett mind normál ( $r^2=0.207$ ;  $p<0.01$ ), mind AMD-s szemekben ( $r^2=0.608$ ;  $p<0.001$ ), szignifikáns különbséggel a két csoport között ( $p=0.044$ ). A koral 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 kimutatni nem tudtunk ( $p>0.05$ ).

### ***Mitotróp anyagok alkalmazásának hatása az időskori macula degeneráció lefolyására***

#### *Funkcionális eredmények*

A VFMD a rosszabb látású szemekben 12 hónap elteltével javult a kezelt csoportban ( $0.77\pm 2.57$  dB) míg romlott a placebo csoportban ( $-0.31\pm 3.70$  dB), noha a különbség a két csoport között nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak ( $p>0.05$ ). A jobb látású szemek vizsgálata során a VFMD a 12 hónap elteltével javult a kezelt csoportban ( $0.53\pm 2.36$  dB, míg romlott a placebo csoportban, ( $-0.39\pm 1.52$  dB) a különbség a két csoport között statisztikailag

szignifikáns volt ( $p=0.004$ ). 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 ( $p=0.006$ ,  $OR=10.93$ ). 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 ( $p=0.031$ ,  $OR=11.81$ )

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 ( $p=0.035$ ,  $OR=2.29$ ).

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 ( $p>0.05$ ). 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,  $p=0.027$ ,  $OR=2.48$ ) 1 éves Phototrop<sup>®</sup> kezelést követően.

### *Morfológiai változások*

A *rosszabb látású szemek* esetében a tanulmány végén a drusenek által elfoglalt terület nagysága a kezelt csoportban a kiindulási érték  $0.85\pm 0.39$ -szerese, míg a placebo csoportban  $1.11\pm 0.65$ -szerese volt, a két csoport közötti különbség szignifikánsnak bizonyult ( $p=0.045$ ). A *jobb látású szemek* esetében a tanulmány végén a drusenek által elfoglalt terület nagysága a kezelt csoportban a kiindulási érték  $0.77\pm 0.43$ -szerese, míg a placebo csoportban  $1.13\pm 0.77$ -szerese volt ( $p=0.017$ ), a kezelt csoportban a drusenek kiindulási és a 12 hónapos viziten mért területe szignifikánsan különbözött ( $p=0.0003$ ).

## **Megbeszélés**

Kísérletes vizsgálataink eredményei szerint a trigeminus ganglion ingerlése fokozza a könnytermelést a kehelysejtek, valamint a járulékos és a fő könnymirigyre kifejett hatása révén.

Kifejezetten nőtt a vizes fázis mennyisége, valamint kevésbé, de szignifikánsan a fehérje és a mucin termelés. Az ingerlő impulzusok számának emelésével a kialakuló hatás szignifikánsan korrelált, bizonyítékként szolgálva a szenzoros idegvégződésekből felszabaduló neuropeptidok szerepére vonatkozólag, melyek felszabadulása ismert módon az impulzusok számával arányos. Míután 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. Az SP receptor antagonistá szignifikánsan gátló hatása az SP szerepét direkt módon bizonyítja, ugyanakkor a kontroll oldalhoz képest szignifikáns könnytermelés fokozódás egyéb neuropeptidok szerepére utal. A kehelysejt sűrűség csökkenése a kehelysejtekben tárolt mucin kiürülésére utal, ezáltal indirekt bizonyítékként szolgál a mucin szekréció fokozódására. Az elektroforézis során kialakuló hasonló fehérje mintázat, illetve egyenlő mennyiségű mintákat analizálva az IgA és a lizozim esetében megfigyelhető egyenlő mennyiség a különböző fehérje komponensek termelésének arányos fokozódását jelzi. Ezen eredmények szerint tehát a szemfelszíni neurogén gyulladás közrejátszhat a mucin, illetve a könnytermelés zavaraival járó kórképekben. A szemfelszínre érő irritatív mechanizmus a kötőhártya kapszaicin-érzékeny idegvégződéseiből neurotranszmitterek felszabadulását okozhatja, melyek parakrin módon hatva befolyásolhatják a kehelysejteket, valamint a járulékos-, illetve feltételezhetően a fő könnymirigy működését is.

Eredményeink szerint a trigeminus ganglion 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 neuropeptidok elleni immunreaktivitást mindössze az amacrin és a ganglion sejtek területén írták le patkány retinában. Korábbi tanulmányok szerint az SP, valamint a CGRP excitatorikus neurotranszmitterként viselkedik a retinában. Eredményeink alapján tehát a neurogén gyulladás következtében felszabaduló neurotranszitterek is szerepet játszhatnak a fényhatásra fokozódó jelátviteli folyamatok normálistól eltérő mediálásában, ezáltal bizonyos szemfenéki kórképek kialakulásában. További kutatások szükségesek azonban a jelenség ok-okozati

mechanizmusainak megismeréséhez, valamint az esetleges intervenciók lehetőségei feltárásához.

Klinikai vizsgálati eredményeink szerint az időskori macula degeneráció kialakulásában a mitokondriumok morfológiai, valamint funkcionális károsodásának döntő szerepe van. A mitokondriumok száma, valamint a membránok szerkezeti változásai szignifikánsan különböznek normál, illetve AMD-s szemekben. Eredményeink szerint a peroxiszómák számának növekedése az AMD kialakulásával összefügg, azonban a lipofuscin felhalmozódása nem specifikus AMD kialakulására. Ezen morfológiai eredmények alapján a mitokondrium membránok alkotóelemeit tartalmazó, funkcióját javító ún. „mitokondriotrop vagy mitotrop” vegyületeknek szerepe lehet a betegség kezelésében. Ezen elméleti megfontolások alapján megtervezett és lefolytatott összehasonlító klinikai tanulmány eredményei szerint AMD-ben szenvedő betegek Phototrop<sup>®</sup> kezelésének hatására a látásfunkciók (látásélesség, ideghártya érzékenység) javultak, a szemfenéken a drusenek által elfoglalt terület csökkent.

### **Az értekezés új eredményei**

1. Eredményeink szerint trigeminus ganglion ingerlésének hatására fokozódik a könnytermelés, mely bizonyítottan vonatkozik 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 betegségekben.
4. Ugyancsak állatkísérletes munkánkkal bizonyítottuk, hogy a trigeminus ganglion antidiómos ingerlésének következtében az ideghártyában fokozódik bizonyos pro-inflammációs neuropeptidek (SP, CGRP, VIP, nNOS) expressziója. Ezen neurotranszmitterek szerepe, valamint

a következményesen kialakult neurogén gyulladás pontos szerepe a szemfenéki patológiás 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 peroxiszómák, mind a lipofuscin mennyisége mindkét csoportban emelkedett a korrallal, noha szignifikáns különbség csak a peroxiszómák 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<sup>®</sup> kezelést követően korai AMD esetében a látásfunkciók (látásélesség, ideghártya érzékenység) javultak, a drusenek által elfoglalt terület csökkent.

## 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, Reccsan 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 szövödményei. *Hippocrates* 2003;5:290-2.
- 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. 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**)
4. Feher J, Kovacs B, **Kovacs I**, Schvoeller M, Gabrieli CB. Improvement of Fundus Alterations in Early AMD Treated With a Combination of Acetyl-L-Carnitine, Highly Concentrated N-3 Fatty Acids, and Coenzyme Q10. *Congress of the American Academy of Ophthalmology*, Poster No P0364. New Orleans, 2004.
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. *14<sup>th</sup> 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. *14<sup>th</sup> 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. *9<sup>th</sup> 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 Reccsan, 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 időskori macula degeneráció kezelésében. *Magyar retina társaság ülése*, Budapest, 2004.
12. **Kovács I**, Fehér J, Kovács B, Szolcsányi J. Szenzoros idegvégződésekből felszabaduló neuropeptidek hatása a könnytermekésre. *Nemzetközi „Száraz szem” kurzus*, Debreceni Egyetem, 2004.

13. **I Kovacs**, Zs Reccsan, 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 neurotranszmitterek hatása a könnytermelésre. *Fiatalkutatók 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.