

**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 betegségcsoport, mégis a legújabb kutatási eredmények szerint közös jellemzőjük, hogy kialakulásukban fontos szerepe van a gyulladási mechanizmusoknak. Immunhisztokémiai módszerekkel a kötőhártyában, a könnymirigyekben, valamint az uveában is kimutattak kapszaicin kapszaicin érzékeny idegvégződéseket, azonban nem vizsgálták ezek szerepét a könnytermelésben, illetve a macula lutea betegségeiben. A neurogén gyulladás a nociceptív érzőideg végződésekből származó, illetve a macula lutea lokális folyamatait, melynek jellemzője, hogy az idegvégződésekből pro-inflammációs neuro-peptidok pl. Calcitonin Gén-Rokon Peptid (CGRP), Substance P (SP), neurokinin A szabadulnak fel, melyek vazodilatációt, plazma extravasációt, a hisztocitokémből származó hisztamin felszabadulást okoznak, valamint elősegítik a gyulladási 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 korral járó degeneratív folyamatok, valamint az oxidatív stressz hatására kialakuló retinális pigmentáció, illetve a choriocapillaris-réteg károsodás mellett krónikus gyulladási folyamatnak, valamint annak következtében bizonyos anyagcsere termékeknek a pigmentáció alatti, illetve a choriocapillaris réteg szintjében történő felhalmozódásának tulajdonítanak oki szerepet. A pigmentáció 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” (acetil-L-karnitin, ω 3 zsírsavak és koenzim-Q10) vegyületeket tartalmazó készítmény alkalmazásával is kedvező eredményeket értek el időskori macula-degeneráció kapcsán.

Céltűzések

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

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

Szöveti vizsgálatok

Az ingerlést követően a szemhéjakat eltávolítottuk, majd 10% formaldehidés fixálást követően paraffinos beágyazás történt, ezt követően 10 µm-es metszeteket készítettünk. A mucin tartalmú kehelysejtek festésére kombinált hematoxilín-eosin perjódsav-Schiff (HE-PAS) festést végeztünk a metszeteket fénymikroszkóppal értékeltük.

Könnytermelés

Az ingerlés során a termelt könnyet az áthajlásba helyezett kapilláris segítségével gyűjtöttük, különös gondot fordítva arra, hogy a szaruhártya érintésével reflexes könnyezést provokáljunk.

Kehelysejti 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 kemilumineszcencia 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 ganglionaris transzmisszió megakadályozására
4. kapszaicin (topikálisan adott 5 µl 1%-os oldattal, naponként egyszer, 3 napon keresztül) a szenzorosuropeptidek depletálására,
5. specifikus neurokinin 1 receptor antagonistá SRI40333 (240 nmo/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 ágyaztuk, 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 (±), 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 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 szemre 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.

Követéses 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: acetyl-L-karnitin, ω -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 μ m átmérőjű területen meghatároztuk a szemfenéken a különböző mérettartományba (<63, <125, <500 μ m) tartozó drusenek számát, valamint minden szem esetében kiszámítottuk a drusenek által elfoglalt összterület nagyságát.

Statistikai módszerek

Az állatkísérletes, valamint elektronmikroszkópos tanulmányaink során a kapott adatokat mean \pm SEM formában, a klinikai vizsgálat során gyűjtött adatokat mean \pm 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 2x2 táblázatok analízise Fischer teszt segítségével történt.

Eredmények

A trigeminus ganglion ingerlésének hatása a könnytermelésre

A könny mennyisége mindenfajta beavatkozástól mentes állatok esetében 3.75 ± 0.37 mm volt, míg „fals elektroda pozícióban” történő ingerléskor 3.25 ± 0.37 mm, a megfelelő pozícióba süllyesztve ingerlés nélkül 4.25 ± 0.3 mm volt. Mivel 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 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 ± 0.93 mm-ről 17.6 ± 0.93 mm-re nőtt, addig a kehelysejt-sűrűség az 57.4 ± 1.86 értékről 45 ± 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 $r = -0.72$, $p = 0.0003$)

Könyytermelés

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 antagonistá 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.

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 , $p < 0.001$).

Könyyfehérje koncentráció

A könny fehérje koncentrációja előkezelés nélküli esetekben 10.23 ± 0.89 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ volt a stimulált, és 18.40 ± 1.52 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($p < 0.005$) a kontroll oldalon. Mivel a termelt könny összmennyisége 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 több volt a stimulált oldalon (83.17 ± 11.03 μg ill. 32.35 ± 4.28 μg , $p < 0.005$). Előkezelés nélkül a könny SDS gélelektroforézis fehérje mintázata nem mutatott látható eltérést a két oldal között, valamint ugyanazon mennyiségű fehérje minták analízise lúminol chemilumineszcencia módszerével hasonló mennyiséget mutatott a két proteinből a két oldalon (lizoim: 2711 ± 347 vs. 2802 ± 331 impulzus, $p > 0.05$, és IgA: 2718 ± 369 vs. 2383 ± 281 impulzus, $p > 0.05$).

Anti-drómos ingerlés hatása a retinában expresszálódó neuropeptidokra

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

Elektronmikroszkopos eltérések időskori macula degeneráció esetében

Korral járó elváltozások

A fiatal RPE sejtekben számos, pálcá-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 peroxiszómaák 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 granulomok 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 mutata ($p=0.28$).

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 ± 2.57 dB) míg romlott a placebo csoportban (-0.31 ± 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 ± 2.36 dB), míg romlott a placebo csoportban, (-0.39 ± 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 figyeitünk 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® 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 ± 0.39 -szerese, míg a placebo csoportban 1.11 ± 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 ± 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 ($p=0.0003$).

Megbeszélés

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

Kifejezettebben 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, bizonyítottan szolgálja 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 agytrixi 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 antagonisták szignifikánsan gátoló hatása az SP szerepét direkt módon bizonyítja, ugyanakkor a kontroll oldalhoz képest szignifikáns könnytermelés fokozódás egyéb neuropeptidok szerepére utal. A helyesítést sűrűség csökkenése a helyesítésekben 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 zavarával járó körkékben. A szemfelszínre érő irritatív mechanizmus a kötőhártya kapszaicin-érzékeny idegvégződéseiből neurotranszmitterek felszabadulását okozhatja, melyek parakrin módon hatva befolyásolhatják a helyesítést, 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 pigmenthámszövet fotoreceptor külső tag komplexben, a külső és belső magvas rétegben, valamint a ganglionsejt rétegben kimutattott 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 körképek kialakulásában. További kutatások szükségesek azonban a jelenség ok-okozati

mechanizmusainak megismeréséhez, valamint az esetleges intervenciók lehetőségeinek 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 peroxisomák 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® 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 antitrdromos ingerlésének következtében az ideghártyában fokozódik bizonyos pro-inflammációs neuropeptidok (SP, CGRP, VIP, nNOS) expressziója. Ezen neurotranszmitterek szerepe, valamint

a következményesen kialakult neurogén gyulladás gyulladási pontos szerepe a szemfenéki patológiai állapotokban még nem tisztázott, azonban, jelentősége lehet AMD kialakulásában.

5. Morfológiai vizsgálataink segítségével jellegzetes szerkezeti eltéréseket mutatunk ki a pigmentált 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 anyagszerjének javítása mitotrop tartalmú készítményekkel hatékony eszköz lehet a betegség progressiójának 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.

Közlemények

Az értelekezés alapját képező publikációk

1. Kovacs I, Ludany A, Koszegi T, Feher J, Kovacs B, Szolcsányi 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, Reesan 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. 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 értelekezés témájában
1. Feher J, Kovacs B, Kovacs I, Schvöller 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, Szolcsányi 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 Metabolic Approach for Treating Age-Related 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 A, Kovacs I, Kőszegi T, Ludány A. Modell a könnyfőhéjék 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 Rats 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, Recessan 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 Photrop® kezeléssel: Prospektív, kettős-vak, placebo kontrollált klinikai tanulmány. *Imre József Jr. Klub ülése*, Budapest, 2006.
3. **Kovács I.** A gyermekkori diabétesz szemészeti vonatkozásai. *A diabétes szemészeti vonatkozásai továbbképző kurzus*, Semmelweis Egyetem, Szemészeti Klinika, 2006
4. **Kovács I.** Száraz szem: anatómia, fiziológia, pathofiziológia. *Száraz szem klubhévége*, Balatonalmádi, 2005
5. **Kovács I.** Kontaktlencse és száraz szem. *Száraz szem klubhévége*, Balatonalmádi, 2005
6. **I Kovacs, J Fehér, B Kovacs, M Schwoller, 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 Refrakatív 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 neuropeptidok 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.** Szürkehálygműtéttel kombinált pars plana vitrektómiák. *Magyar Műlencse Implantációs és Refrakatív Sebészeti Társaság (SHIOL) kongresszusa*, Keszthely, 2004.
15. **Kovács I, Pinter E, Ludány E, Fehér J, Szolcsányi J.** Trigeminus 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 (EVR)*, 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.** Szürkehálygműtéttel kombinált vitrektómiák műtéti eredményei. *Magyar Műlencse Implantációs és Refrakatív 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.

Morphological and functional evaluation of inflammatory processes in eye surface diseases and age-related macular degeneration

PhD Thesis

Illés Kovács MD

Program leader: János Szolcsányi MD, Dsc

Leader: Erika Pintér MD, PhD

Department of Pharmacology and Pharmacotherapy
Faculty of Medicine, University of Pécs

Pécs, 2006

Background

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. Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) and Substance P (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. Muscarinic, adrenergic and Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) containing nerve terminals were detected around goblet cells also. Direct functional effect of these neural pathways on conjunctival mucin secretion has been obtained only in case of parasympathetic nerves. VIP has been found to stimulate mucin secretion from cultured goblet cells in vitro.

Although the retina has no sensory innervation, SP and CGRP containing nerve endings have been observed in the choroid and in the retina in various species including humans. In general intrinsic SP acts on its specific receptor presumably in a paracrine fashion as an excitatory neurotransmitter raising the spontaneous activity level of both amacrine and ganglion cells, suggesting that substance P influences functions of multiple retinal circuits.

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.

Purpose

Based on the previous assumptions the aim of our study was:

1. 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,
2. to evaluate morphological alterations of retinal pigment epithelial cells in AMD
3. as well as to examine the effect of mitochondriotropic dietary supplements on the clinical course of early AMD in a prospective, controlled clinical trial.

Methods

The effect of sensory nerve stimulation on tear secretion and expression of retinal neurotransmitters in a rat model

Experiments were carried out on male Wistar rats weighing 250-350 g with the previously described technique of electrical stimulation of rat trigeminal ganglion. The left trigeminal ganglion was electrically stimulated with increasing number of electrical pulses (300-2400 pulses) by adjusting the parameters between 0.5 and 2 Hz for 10 to 20 min at 15 V. Effects of inadequate electrode position or incidental lesion of trigeminal ganglion was examined by placing the stimulating electrode in false position or no stimulation at a correct position. At the end of the experiments the animals were killed by overdose of thiopentone-sodium.

Measurement of tear secretion

Tear samples were collected by placing a capillary tube into the tear sac with extreme care not to evoke reflex tearing by touching the eye surface. The amount of collected tear was measured in each capillary tube and recorded in mm.

Goblet cell density

At the end of the experiments upper and lower lids were removed immediately, and fixed in 10% formaldehyde followed by staining with combined hematoxylin-eosin (HE) and periodic acid-Schiff (PAS) staining was performed to visualize the mucus; slides were examined by

standard light microscopy. Goblet cell density (GCD) was determined by quantification of the mucus containing goblet cell distribution in the conjunctiva.

Tear protein analysis

Secreted volume was measured and tear samples were diluted for a standard Bradford protein analysis. Total protein excretion was calculated from dilution, concentration, and volume data. 3 µg of protein were analyzed in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Protein bands were visualized by common Coomassie Brilliant Blue R250 staining combined with a silver intensification method. Polyclonal anti rat immunoglobulin A and anti hen egg white lysozyme antibodies (IgA: goat 1:50, Sigma; lysozyme: rabbit, 1:50, Acris) were used for primary immuno reaction. The secondary antibodies were horseradish peroxidase (HRP) conjugated immunoglobulins. The immune reaction was visualized either by peroxidase-diamino-benzidine staining with silver post intensification or enhanced chemiluminescence.

Pretreatments

Prior to electrical stimulation of the trigeminal ganglion rats received either atropine (1 mg/kg iv. 5 min before the stimulation, n=8) to block parasympathetic pathways; or guanethidine (8 mg/kg ip., 1 hour before stimulation, n=8) to exclude the involvement of adrenergic response; or hexamethonium (10 mg/kg iv., n=8) to block synaptic transmission in ganglia. Capsaicin (5 µl of 1% solution, n=8) applied as an eye drop once a day for 3 days in both eyes to deplete neurotransmitters from sensory nerve endings; or SR140333 (240 nmol/kg iv. 15 min before stimulation, n=8) to antagonize neurokinin 1 (NK1) receptors.

Histological examinations of the retina

The following molecules were investigated: neurotransmitters SP (anti-SP, Chemicon International), CGRP (anti-CGRP, a Santa Cruz), VIP (anti-VIP, Chemicon International), and nNOS (anti-nNOS, Chemicon International). Eyeballs were removed after the sacrifice and processed for immunohistochemistry. Sections of retina obtained from the treated and untreated eyeballs were exposed to the primary/secondary antibodies the developed dark-brown (intense=++), yellow-brown (slight=+) questionable (±) immunostaining or no staining at all (-) was recorded. Immunostaining was evaluated in four localization of the retina. The outermost

layer was the retinal pigment epithelium (RPE) and photoreceptor outer segment (POS) complex. Further localization for evaluating immunostaining were the outer and inner granular layers and ganglion cell layer.

Morphological examinations of human age-related macular degeneration

Sixty-five human eyes, ages 2-87 years, were selected for these electron microscopic studies. Thirty-one of them were affected by early AMD and 31 non-affected eyes were used for age- and sex-matched controls for both qualitative and quantitative morphometric studies. The selection criteria for early AMD was based on the presence of drusen and/or basement membrane thickening of the RPE, while for controls no drusen or basement membrane thickening of RPE, as observed by electron microscopy. Late form of AMD (geographic atrophy and/or choroidal neovascularization) were excluded from these studies. All these human eyes were surgically removed because of malignant tumors or severe ocular trauma, neither of which affected the posterior pole of the eyeball.

Electron microscopy

Small pieces of the retina and choroid were dissected at the posterior pole in less than 2 min after the removal of the eyeball, processed for standard electron microscopical fixation protocol and studied with an electron microscope.

Assesment of macular functions during treatment of age-related macular degeneration with mitochondriotropic compounds

Study Design

The study was designed as a randomized, double-blind, placebo-controlled, single-center protocol. Treatment of patients was carried out in the Department of Ophthalmology, University of Pecs (Pecs, Hungary). A total of 106 patients were enrolled and analyzed. Patients had to have a diagnosis of early bilateral AMD with best corrected visual acuity between 0.8 and 0.4 Snellen decimal chart (in the most affected eyes), be 55-70 years of age at enrollment. Patients were randomly assigned to receive either Phototrop[®] or placebo for 12 months. Medication consisted

of 2 oral capsules per day, containing either: 100 mg of Acetyl-L-Carnitine, 530 mg of n-3 Fatty Acids, and 10 mg of Coenzyme-Q10 or an equal quantity of soy oil.

Visual Functions

Primary efficacy variable was visual field mean defect (VFMD). Secondary efficacy variables were visual acuity as measured by the Snellen visual acuity chart and by the chart of the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS), as well as foveal sensitivity as measured by perimetry

Fundus Alterations

Fundus photographs of both eyes were taken with a retinal camera from the central 35° area centered to the fovea. No image manipulation was used before or during grading. A 6000 µm diameter circle concentric with the center of the macula was superimposed onto the photographs. The number of different size of drusens (diameters of <63, <125, <250, and >250 µm) were counted in all cases, and the total area of drusen-covered area was also determined.

Statistical methods

Data were expressed as mean±SEM in the animal research and morphological studies and mean±SD in the clinical study and were analyzed using Statistica 6.0 software (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA). Correlation analysis was measured with regression analysis by determining the 'p' and 'r' value. The normality of the data was checked with the Shapiro-Wilk's W test, Mann-Whitney U test was used to assess the significance between two groups. The effect of pretreatments during the animal research was analyzed with factorial-ANOVA combined with a post-hoc Dunnett test with categorical predictor variables of treatment vs. control and different types of pretreatments. The 2x2 tables were analyzed with Fisher's exact test. In all cases p<0.05 was considered statistically significant.

Results

Effect of sensory nerve stimulation on tear secretion

Tear secretion

In animals without any intervention secreted tear volume expressed in mm rise in the capillary tube showed almost identical amounts (3.75 ± 0.37 mm) as observed in animals stimulated at an inadequate electrode position (3.25 ± 0.37 mm) or in non-stimulated animals at a proper electrode position (4.25 ± 0.31 mm, $p > 0.05$). Since the contralateral (unstimulated) side of stimulated animals (4.00 ± 0.38 mm) showed no difference ($p > 0.05$) in secreted tear volume compare to animals without any intervention, the control samples were taken from the contralateral side of stimulated animals. Electrical stimulation of the trigeminal ganglion resulted in an increase of tear secretion on the stimulated side, demonstrated by clearly visible accumulation of tear on the eye surface and increased tear volume in capillary tubes. More pronounced effects were observed on lacrimation and goblet cell density after stimulation of the trigeminal ganglion with increasing number of electrical pulses. Secreted tear increased from 10.6 ± 0.93 mm to 17.6 ± 0.93 mm and GCD decreased from 57.4 ± 1.86 to 45 ± 1.81 ($r = 0.69$, $p = 0.0007$ and $r = -0.72$, $p = 0.0003$, respectively, difference between r : $p < 0.0001$).

In the absence of pretreatments, tear secretion evoked by electrical stimulation increased to 18.00 ± 0.86 mm on the stimulated side vs. 3.75 ± 0.53 mm at the control side ($p < 0.0001$). Atropine, guanethidine and hexamethonium pretreatments had no inhibiting effect on stimulated tear secretion (atropine: 19.50 ± 0.68 mm, guanethidine: 16.63 ± 1.24 mm, hexamethonium: 17.13 ± 1.11 mm, $p > 0.05$). Pretreatment with capsaicin or the NK1 receptor antagonist SR140333 inhibited the increase in tear secretion on the stimulated side significantly (4.39 ± 0.65 mm and 8.75 ± 1.09 mm, respectively $p < 0.0001$), however tear secretion remained significantly elevated after SR140333 pretreatment compared to the control side.

Goblet cell density (mucus secretion)

In non-pretreated animals goblet cell density was 48.25 ± 0.99 on the stimulated and 68.63 ± 2.15 on the control side ($p < 0.001$). Atropine pretreatment had no significant inhibition on GCD decrease (47.38 ± 1.50 , $p > 0.05$) but capsaicin desensitization almost prevented the electrical stimulation induced reduction of GCD (63.38 ± 1.58 , $p < 0.001$). Tear protein concentration

In non-pretreated rats protein concentration was 10.23 ± 0.89 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ at the stimulated and 18.40 ± 1.52 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($p < 0.005$) at the non-stimulated side. Since total tear volume on the stimulated side increased (8.13 ± 1.05 μl at the stimulated side vs. 1.76 ± 0.27 μl at the non-stimulated side $p < 0.005$) a remarkable increase of total secreted protein (83.17 ± 11.03 μg vs. 32.35 ± 4.28 μg , $p < 0.005$) was observed. Without any pretreatment no apparent difference was observed in the pattern of protein bands between the stimulated and non-stimulated sides by SDS gel electrophoresis of the collected tear. Using of immunoblotting technique IgA and lysozyme were detected selectively. Analysis of equal amount of tear protein with luminol chemiluminescence indicated similar volume of these components on both sides (lysozyme: 2711 ± 347 vs. 2802 ± 331 counts, $p > 0.05$, and IgA: 2718 ± 369 vs. 2383 ± 281 counts, $p > 0.05$).

Effect of antidromic nerve stimulation on expression of neurotransmitters in the retina

In the control eyes questionable or very mild immunostaining for SP, VIP and nNOS was found in the outer and inner granular layers and for SP also in the ganglion cell layer, but for CGRP it was negative in all layers. In the electrically stimulated rats immunostaining for SP, CGRP, VIP and nNOS in all four examined layers were markedly increased in comparison with the control eyes.

Electron microscopic findings in age-related macular degeneration

Age-related changes of the RPE and Bruch's membrane

Mitochondria in young RPE were numerous, mostly bacillus-like shaped, and oriented parallel with the apical-basal axis. They were typically rich in well preserved cristae. In normal aged eyes, mitochondria of the RPE clearly decreased in number. They were variable in size, usually oval shape or rarely bacillus-like and without any preferential orientation. Most of them had normal appearing cristae and matrices. However, in some instances, there was disorganization of cristae, including focal to complete loss, in association with decreased electron density of matrix. Peroxisomes were usually localized in the basal region of the cytoplasm, and occasionally next to the basal and basolateral cell membrane. In normal aged eyes, peroxisomes were more numerous and more variable in size, electron-density and distribution than in young

eyes. Furthermore, in young eyes they were dispersed randomly in the cytoplasm of the RPE, while in aged eyes they formed small groups containing four to five peroxisomes. Lipofuscin granules and residual bodies were exceptionally rare in early age, but they clearly increased in number and size with time. In aged adults they were abundantly distributed in the cytoplasm of the RPE. Numerous melanolipofuscin granules were also present, formed by fusion of melanosomes and lipofuscin. These organelles were located in the apical half of the RPE in normal aged eyes. With normal aging, there was an increase in electron density of Bruch's membrane. Moreover, both inner and outer collagenous layers contained electron-dense granular and vesicular material.

Changes of the RPE and Bruch's membrane in AMD

Mitochondria of the RPE in AMD eyes appeared to decrease in number and size compared to the controls. They were often round or oval form, and focal or even complete losses of cristae were associated with more extensive decreases in matrix density. In some instances, either bleb formation or interruption of the mitochondrial internal and external membranes was observed. Although, no abnormalities of mitochondria specific for AMD were found, all these mitochondrial alterations were apparently more marked and more extensive in AMD compared to normal aging. The distribution of peroxisomes in AMD eyes was highly variable within each RPE cell. Occasionally they were located in the apical cytoplasm among the lipofuscin granules. Rarely, peroxisomes were in close topographic correlation with mitochondria and the nucleus of the RPE cells. Lipofuscin granules and residual bodies in AMD specimens showed similar morphology and distribution as in control eyes. Bruch's membrane showed characteristic differences in AMD compared to normal aged eyes. In addition to the age-related increase in thickness and electron-density of collagenous layers, AMD specimens usually showed multiplex, focal thickenings of the inner collagenous layer known as hard or soft drusen. Both of these elevated the RPE, but the hard drusen were more circumscribed and structurally more dense and homogeneous. However, some hard drusen had membrane fragments that were similar to, but less evident than, fragments in soft drusen. Besides drusen, thickenings of the RPE basement membrane due to basal laminar deposits were also present. In most cases they were focal, wart-like depositions of filamentous material in which some electron-dense areas, possibly composed of lipids, were present.

Morphometric studies

The total number of mitochondria decreased significantly in both aged ($r^2=0.455$; $p<0.001$) and AMD ($r^2=0.778$; $p<0.001$) groups. The decrease in AMD group was more severe, and the difference was statistically significant ($p=0.038$). The area of mitochondria also decreased significantly with age in both control ($r^2=0.743$; $p<0.001$) and AMD ($r^2=0.919$; $p<0.001$) groups. The decrease in AMD group was again more severe, and the difference between control and AMD groups was statistically significant ($p=0.019$). Comparison of the regression lines showed that the area of mitochondria was similar in both ages at 40-49, but it decreased more rapidly in AMD compared to normal aging. The number of well-defined mitochondrial cristae was also counted, and it showed a significant decrease in both control ($r^2=0.861$; $p<0.001$) and AMD ($r^2=0.918$; $p<0.001$) groups. However, the difference between controls and AMD was not significant ($p=0.28$). Morphometric analysis showed a significant increase in the number of peroxisomes in both control ($r^2=0.207$; $p<0.01$) and AMD ($r^2=0.608$; $p<0.001$) groups. Moreover, the difference between controls and AMD was statistically significant ($p=0.044$). There was a significant increase of lipofuscin granules in both control ($r^2=0.432$; $p<0.001$) and AMD ($r^2=0.535$; $p<0.001$) groups. However, the difference between the two groups was not statistically significant ($p=0.61$).

Effect of mitochondrial compounds on the course of age-related macula degeneration

Functional results

When VFMD of the most affected eyes was considered in the treated group there was an improvement after 12 months from baseline (0.77 ± 2.57 dB). In the placebo group, there was a deterioration after 12 months (-0.31 ± 3.70 dB), however, none of these changes proved to be significant between the treated and the placebo group. We also performed the same set of analyses for the less affected (yellow) eyes. In the treated group there was an improvement after 12 months (0.53 ± 2.36 dB) as compared to the baseline. In the placebo group there was a worsening at the end of the study (-0.39 ± 1.52 dB), with a statistically significant difference between the two groups at the end of the study ($p=0.004$ in favor of the treated group. During the examination ± 2.0 dB was applied as a range for long-term fluctuation (i.e. 'unchanged'). When the most affected eyes were considered, in the treated group 47 out of 48 cases (98%) were

'improved' or 'unchanged', and 1 (2%) 'deteriorated'. In the placebo group 44 cases out of 53 (83%) were 'improved' or 'unchanged' and 9 (17%) 'deteriorated'. The difference between treated and placebo groups was significant ($p=0.006$, odds ratio:10.93). Comparison of changes in VFMD of the *less affected eyes* showed similar results. In the treated group all eyes were 'improved' or 'unchanged' (100%), and no eyes 'deteriorated'. In the placebo group 40 cases from 45 (89%) were 'improved' or 'unchanged' and 5 (11%) 'deteriorated'. The difference between treated and placebo groups was significant ($p=0.031$, odds ratio:11.81).

Foveal sensitivity of the *most affected eyes* in the treated group were 'improved' or 'unchanged' in 33 (69%) eyes and 'deteriorated' in 15 (31%) eyes. In the placebo group 26 (49%) cases were 'improved' or 'unchanged' and 27 (51%) 'deteriorated'. The difference between treated and placebo groups was statistically significant ($p=0.035$, odds ratio:2.29).

Comparing mean change in the visual acuity by Snellen chart between baseline and 12 months, in the treated group 37 (77%) cases were 'improved' or 'unchanged' and 11 (23%) cases were 'deteriorated'. In the placebo group 29 (55%) eyes out of 53 were 'improved' or 'unchanged' and 24 (44%) 'deteriorated'. The difference between the treated and placebo groups was statistically significant ($p=0.015$, odds ratio:2.78). Change in visual acuity expressed in ETDRS also resulted in a statistically significant difference. In the treated group 36 (75%) eyes were 'improved' or 'unchanged', and 12 (25%) eyes 'deteriorated'. In the placebo group 29 (55%) were 'improved' or 'unchanged' and 24 (45%) 'deteriorated' ($p=0.027$, odds ratio:2.48).

Morphological changes

Comparisons of changes in the drusen-covered area of *most affected eyes* (ratio of drusen area at 12 months to drusen area at screening) showed a statistically significant difference between treated and placebo groups (0.85 ± 0.39 vs. 1.11 ± 0.65 , $p=0.045$). When the *less affected eyes* were compared, the difference in the drusen-covered area between screening and 12 months was statistically significant ($p=0.0003$) in the treated group, but not in the placebo group ($p=0.587$), and comparisons of changes in drusen-covered area showed a statistically significant difference between treated and placebo groups (0.77 ± 0.43 vs. 1.13 ± 0.77 , $p=0.017$).

Conclusions

The present results revealed that electrical stimulation of trigeminal ganglion elicits tear secretion by activation of conjunctival goblet cell, exorbital and accessory lacrimal gland. These data suggest that the observed effects are due to antidromic stimulation of trigeminal sensory nerve endings in the eye. Ganglionic transmission blockade by hexamethonium pretreatment didn't influence the increased tear secretion following stimulation, providing direct evidence for the exclusive involvement of trigeminal sensory pathways. Either atropine or guanethidine pretreatment didn't show statistically significant impact on tear flow proposing that neither muscarinic nor noradrenergic mediation plays role in this process. SDS gel electrophoresis showed similar protein patterns on both sides suggesting a proportional increase in tear protein secretion, which is confirmed by luminol chemiluminescence in cases of IgA and lysozyme. The enhancement of aqueous phase suggests the role of the exorbital and accessory conjunctival lacrimal glands, which are known to receive extensive sensory innervation. Moreover results of luminol chemiluminescence indicate that secretion of IgA and lysozyme which are produced mainly in the exorbital lacrimal gland can be influenced by activation of sensory nerve endings. The significantly reduced number of mucus-containing goblet cells on the stimulated side was due to the release of the mucus-containing granules providing indirect evidence for enhanced mucus secretion by antidromic trigeminal stimulation. On the other hand tear secretion was not influenced by contralateral nerve stimulation or stimulation at a false electrode position it is suggested that neither orthodromic spread of stimulation nor involvement of other neural pathways influence the response. The absence of response following topical capsaicin desensitization suggests a cardinal role of the released sensory neuropeptides (such as substance P, CGRP) from the capsaicin-sensitive sensory nerve endings of the eye. The selective NK1 receptor antagonist SR140333 significantly inhibited tear secretion enhancement by antagonizing the effect of substance P on NK1 receptors. Since the blockade was not complete following SR140333 pretreatment, other transmitters are supposed to participate in mediation of neurogenic tear secretion. Present data suggest an important local role of sensory nerve endings in regulation of tear secretion and maintenance of the integrity of ocular surface. This local effector function of the capsaicin-sensitive sensory nerve fibres controls the watery and protein phases of tear secretory mechanism and influences mucin excretion by controlling conjunctival goblet cells.

Disruption of this neural regulation presumably contributes to pathogenesis of diseases associated with disturbed mucin and tear production. An irritative stimulus of the ocular surface activates sensory nerve endings and results in the release of sensory neuropeptides; released substances presumably stimulate goblet cell secretion by a paracrine mechanism. Further studies are needed for overall comprehension of these processes in inflammatory eye surface diseases.

Our findings showed that immunostaining for SP, CGRP, VIP and nNOS were markedly increased in four localization of the retina: in the RPE/POS, in the inner and outer granular layers and in the ganglion cells, in the electrically stimulated rats in comparison to the control eyes. Previous studies described immunoreactive for neuropeptides only in amacrine and ganglion cells of the rat retina. After electric stimulation of the trigeminal ganglion immunoreactivity increased in these cells and marked immunoreactivity was also found in the outer granular layer and RPE/POS. Previous studies showed that SP and CGRP act as excitatory neurotransmitter in the retina. These results indicate that CGRP may play a functional (excitatory) role in modulating retinal responses to light stimulation. Moreover SP mediates positive effects on dopamine release, which is related to light intensity indicating that the functional role of SP is likely to be related to light adaptation. According to this, the enhanced expression of these neuropeptides due to neurogenic inflammation might alter retinal responses to light, and may have a role in some form of macular diseases.

Our electron microscopic studies demonstrated that mitochondria of the RPE undergo significant morphological changes with age. These alterations are characterized by marked decreases in the number and area of mitochondria that were significantly more severe in AMD compared to age-matched controls. These data give a morphological support to the concept that mitochondrial membrane and subsequent mitochondrial dysfunctions may play a crucial role in the development of retinal degeneration, in particular of AMD. Mitochondrial abnormalities were also accompanied by proliferation of peroxisomes. Morphometry showed that the age-related increase in peroxisome number in AMD specimens was significantly greater than in age-matched controls. The increased number of peroxisomes in aging and AMD may be a morphologic manifestation for activation of an alternative pathway for lipid degradation. Alterations of mitochondrial membranes were accompanied by significant accumulation of lipofuscin in both AMD and aged eyes, although there was no difference between groups.

In our clinical study improvement was found in each of the four parameters of visual

functions in the most affected eyes of early AMD patients taking Phototrop®. It is particularly important that VFMD, visual acuity and foveolar sensitivity showed statistically significant differences in changes comparing treated with placebo groups. Comparison of the most and less affected eyes showed another important finding. According to the results less affected eyes respond better to Phototrop treatment than the most affected eyes. These findings seem reasonable taking into consideration that the less affected eyes had better baseline visual function, and that they responded better to this treatment. This clinical trial also showed that improvement in fundus alterations can be achieved after 1 year of treatment with Phototrop®. The drusen-covered area decreased in the treated group while it increased in the placebo group, and the difference between the treated and the placebo groups became statistically significant in favor of the treated group by the end of the study. Comparison of treatment efficacy in fundus alterations of subgroups showed a more marked improvement if the less affected eyes were evaluated. In conclusion, the results of this clinical trial suggest that treatment of early AMD with a combination of ALC, n-3 FA, and CoQ10 may improve both visual functions and fundus alterations likely by improving the metabolism of the photoreceptor/RPE/Bruch's membrane complex. Although our results have immediate clinical significance for treating early AMD, further studies are certainly needed to support this hypothesis, but first of all, to learn more on the pathophysiology of AMD.

Bibliography

Research Papers related to thesis

1. E Bronzetti, M Artico, I Kovacs, LM Felici, D Vignone, A D'Ambrosio, F Forte, DL Rosa, J Feher. Immunohistochemical localization of neurotransmitters and neurotrophins in the retina of rats electrically stimulated at the Gasserian ganglion. (*Invest Ophthalmol Vis Sci., under review*) 2006
2. I Kovacs, A Ludany, T Koszegi, J Feher, B Kovacs, J Szolcsanyi, E Pinter. 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**
3. J Feher, I Kovacs, M Artico, C Cavallotti, A Papale, CB Gabrieli. Mitochondrial alterations of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Neurobiology of Aging*, (accepted for publication), 2005. **IF: 5.552**

4. J Feher, B Kovacs, I Kovacs, M Schvoeller, CB Gabrieli. Improvement of Visual Functions and Fundus Alterations in Early Age-Related Macular Degeneration Treated with a Combination of Acetyl-L-Carnitine, n-3 Fatty Acids, and Coenzyme Q10. *Ophthalmologica*, 2005;219:154-166. **IF:0.647**

Further Research Papers

1. M Ferencz, GM Somfai, Á Farkas, I Kovács, B Lesch, Z Récsán, J Nemes, O Fiedler, G Salacz. Functional assessment of the possible toxicity of indocyanine green dye in macular hole surgery. (Am J Ophthalmol, accepted for publication) 2006 **IF: 2.332**
2. I Kovacs, J Nemes, M Ferencz, Z Reccsan, G Salacz. Role of relaxing retinotomy in management of retinal detachment with severe proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmologia Hungarica*. 2004;141(1):21-25. [Hungarian language]
3. I Kovacs, Z Reccsan, T Kovacs, A Folyovits, L Kalabay. Early diagnosis of Vogt-Koyanagi-Harada disease with detection of melanin-laden macrophages in cerebrospinal fluid. *Ophthalmologia Hungarica*, 2004;141(1):109-113. [Hungarian language]
4. I Kovacs, G Salacz. Management of Complications of Diabetic Retinopathy. Hippocrates. 2003;5:290-2 [Hungarian language]
5. G Szabados, I Kovacs, Z Loderer, G Setalo. 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**

Research Posters related to thesis

1. J Feher, B Kovacs, I Kovacs, M Schvoller, G Mannino, A Papale, CB Gabrieli. 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. I Kovacs, A Ludany, B Kovacs, J Feher, J Szolcsanyi. 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. J Feher, B Kovacs, I Kovacs, M Schvoeller, CB Gabrieli. 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.

4. J Feher, B Kovacs, I Kovacs, M Schvoeller, CB Gabrieli. The Metabolic Approach for Treating Age-Related Macular Degeneration. *IBC's 2nd International Conference*, Boston, 2004.
5. J Feher, B Kovacs, M Schvoller, I Kovacs. 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**).
6. A Ludany, A Hartmann, I Kovacs, T Koszegi. 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**).
7. A Hartmann, I Kovacs, T Koszegi, A Ludany. New model for comparative analysis of tear proteins. *52nd Congress of the Hungarian Society of Laboratory Medicine*, Sopron, 2004. Poster Nr. 42.
8. I Kovacs, J Feher, B Kovacs, A Ludany, J Szolcsanyi. Enhanced Tear Secretion Due to Nerogen Inflammation of the Eye - a Rat Model of KCS. *14th Congress of the European Society of Ophthalmology (SOE)*, Madrid, 2003. Poster nr P270, pp 236-7.
9. B Kovacs, J Feher, I Kovacs, M Schvoeller. 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. J Feher, B Kovacs, I Kovacs, M Schvoller, A Papale, G Mannino, C B Gabrieli. 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. I Kovacs, I Lukacs, A Ludany, J Feher, B Kovacs, J Szolcsanyi. 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. J Feher, B Kovacs, I Kovacs, M Schvoller, A Papale, G Mannino, C B Gabrieli. Mitotrophic 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. **I Kovacs, J Szolcsanyi, B Kovacs, J Feher.** 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. **I Kovacs, J Szolcsanyi, B Kovacs, J Feher.** 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).

Further Research Posters

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. **M Ferencz, I Kovács, B Lesch, Á Farkas, GM Somfai, Z Barabási, Z Récsán, J Nemes, O Fiedler, G Salacz.** 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. **I Kovacs, Zs Reccsan, G Salacz.** Combined Cataract Surgery and PPV: IOL Calculation Error from Resolved Macular Edema. *Congress of the European Society of Cataract and Refractive Surgeons (ESCRS)*, Lissbon, 2005
4. **I Kovacs, J Rigo, K Mihaltz, GM Somfai.** 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.
5. **M Ferencz, I Kovács, B Lesch, Á Farkas, GM Somfai, Z Barabási, Z Récsán, J Nemes, O Fiedler, G Salacz.** 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).

Paper Presentations

1. **I Kovacs, M Schwöeller, B Kovacs B, J Feher.** Correlation between fundus alterations and visual functions in age-related macular degeneration. *Congress of the Hungarian Society of Ophthalmology*, Sopron, 2006.

2. **I Kovacs.** Clinical results of one year of treatment with Photrop®: A prospective double-blind, placebo controlled clinical trial. *Meeting of Imre József Jr. Club*, Budapest, 2006
3. **I Kovacs.** Ophthalmological complications of pediatric diabetes. *Educational course at the Department of Ophthalmology, Semmelweis University*, 2006. [Hungarian language]
4. **I Kovacs.** Dry eye: anatomy, physiology, pathophysiology. *Dry eye course*, Balatonalmádi, Hungary, 2005. [Hungarian language]
5. **I Kovacs.** Contact lens wear and dry eye syndrome. *Dry eye course*, Balatonalmádi, Hungary, 2005. [Hungarian language]
6. **I Kovacs, J Feher, B Kovacs, M Schwöeller, 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. **I Kovacs.** Dry eye - diagnosis and treatment. *Congress of the Hungarian Society of Ophthalmic Administrators (SHAO)*, Nyíregyháza, Hungary, 2005. [Hungarian language]
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, U.S.A., 2005.
9. **I Kovacs, Zs Reccsan, G Salacz.** Intraocular lens calculation error from resolved macular edema following combined cataract surgery and pars plana vitrectomy. *Congress of the Hungarian Society of Intraocular Lens Implantation*, Keszthely, Hungary, 2005. [Hungarian language]
10. **I Kovacs.** Relaxing retinotomies. *Educational course of the 2nd Department of Ophthalmology*, Semmelweis University, Budapest, Hungary, 2005. [Hungarian language]
11. **I Kovacs, J Feher, B Kovacs, M Schwöeller, A Papale, CB Gabrieli.** Treatment of Early Age-related Macular Degeneration with a Combination of Acetyl-L-carnitine, n-3 Fatty Acids, and Coenzyme Q10. *Meeting of the Hungarian Society of Retinal Dystrophies*, Budapest, Hungary, 2004. [Hungarian language]
12. **I Kovacs, J Feher, B Kovacs, J Szolcsanyi.** Effect of neuropeptides released from sensory nerve endings on tear secretion. *International meeting of 'Dry eye'*, University of Debrecen, Hungary, 2004. [Hungarian language]
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.

XX. Congress of the International Society for Ophthalmic Ultrasound (SIDUO), Budapest, Hungary, 2004.

14. **I Kovacs, M Ferencz, J Nemes, Zs Recsan, G Salacz.** Combined phacoemulsification, intraocular lens implantation and pars plana vitrectomy. *Congress of the Hungarian Society of Intraocular Lens Implantation*, Keszthely, Hungary, 2004. [Hungarian language]
15. **I Kovacs, E Pinter, A Ludany, J Feher, J Szolesanyi.** Electrical Stimulation of Trigeminal Ganglion Influences Tear Secretion and Goblet Cell Function in Rat. *Spring meeting of the Hungarian Association of Ophthalmology*, Budapest, Hungary, 2004. [Hungarian language]
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 (EYRS)*, 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. **I Kovacs, G Salacz.** Current concepts in management of the diabetic retinopathy. *Congress of the Transilvanian Medical Association, Sepsiszentgyorgy*, Transsylvania, 2003.
19. **I Kovacs, G Salacz.** Results of combined Phacoemulsification, Intraocular Lens Implantation and Pars Plana Vitrectomy. *Congress of the Hungarian Society of Intraocular Lens Implantation*, Keszthely, Hungary, 2003. [Hungarian language]
20. **I Kovacs, M Sebestyen, G Salacz.** Management of Eyes With Luxated Lenses Caused by Blunt Ocular Trauma. *Congress of the Hungarian Society of Ophthalmology*, Miskolc, Hungary, 2003. [Hungarian language]
21. **I Kovacs, G Radó.** The Dropped Nucleus. *Congress of the Romanian Society of Ophthalmology*, Kolozsvár, Transsylvania, 2002.