

## IMMUNOLOGIA DELLA DEGENERAZIONE MACULARE LEGATA ALL'ETÀ

**Federico GRIGNOLO**

Clinica Oculistica, Università degli Studi, Ospedale Oftalmico, Torino

Relazione presentata al Congresso Internazionale di Oftalmologia 'Fermo... l'AMD', svoltosi il 14 e 15 aprile a Fermo AP

211

La degenerazione maculare legata all'età (AMD) è al giorno d'oggi per l'oculista il "nemico numero uno" della salute retinica delle popolazioni dei Paesi industrializzati, come ampiamente divulgato da studi pubblicati in letteratura.

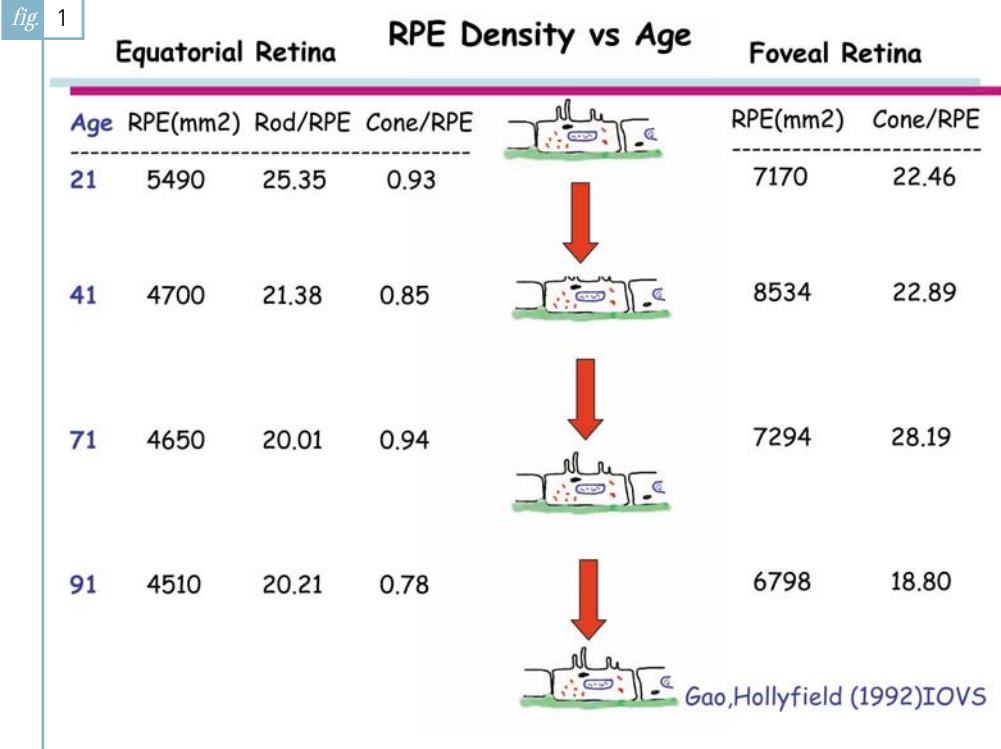
L'AMD è una patologia subdola: insorge in maniera silente, senza avere la consapevolezza di ciò che poi accadrà quando il danno a carico della retina inizierà a divenire clinicamente significativo: ben noti sono per "gli addetti ai lavori" i sintomi clinici della degenerazione maculare senile a seguito dello sviluppo delle drusen nella regione perifoveale e perimaculare. La degenerazione maculare legata all'età può seguire due differenti destini: può evolvere in maculopatia secca o atrofica (90%), che conduce poi all'atrofia a carta geografica attorno alla macula, oppure, in una minoranza di casi (10%), si può assistere alla neoformazione di vasi che nascono dalla coroide: questa forma è chiamata umida o essudativa della AMD.

Fino al giorno d'oggi molte teorie sono state avanzate sulla patogenesi, ma poca attenzione è stata dedicata all'aspetto immunologico nella sua fisiopatologia.

L'inquadramento della degenerazione maculare legata all'età sotto il profilo immunologico rappresenta un piccolo nuovo dettaglio nel suo studio.

Le ricerche anatomo-patologiche sono state il primo passo verso la consapevolezza che il sistema

immunitario è un attore "co-protagonista" nella genesi della AMD. Vi sono stati lavori "pionieristici" in questo campo, come nel caso di Sarks et al. che nel 1976 ha pubblicato sul British Journal of Ophthalmology un lavoro sulla patologia della degenerazione maculare senile identificando sei stadi, o quello del gruppo di Sparrow et al. che ha studiato il processo di accumulo della lipofusina nell'epitelio pigmentato retinico. Passaggio importante è stata l'identificazione del "trait d'union" tra i ben noti aspetti istopatologici dell'AMD ed il sistema immunitario: la correlazione tra la lipofusina, materiale membranoso autofluorescente che con l'età si accumula in molte cellule, e l'induzione di enzimi, come la caspasi, associati all'apoptosi. Il primo incremento significativo dell'accumulo di lipofusina avviene più o meno tra i 20 e i 30 anni, e poi si intensifica progressivamente nel tempo. Esiste anche un'associazione con particolari molecole o fluorofori contenuti nella lipofusina, come l'A2E. L'A2E è un'etanolamina contenente fosforo derivata dalle membrane cellulari, ed è molto interessante in quanto, attivato dalla luce blu, porta all'induzione di enzimi, come la caspasi, associati all'apoptosi. Partendo dagli aspetti fisiologici dei meccanismi che si verificano in corrispondenza dell'interfaccia corioretinica, la scuola di Aberdeen ha



cercato di ricostruire il metabolismo retinico con particolare attenzione al rapporto esistente tra fotorecettori ed il complesso membrana di Bruch ed epitelio pigmentato.

Apprendiamo dalla fisiologia che gli apici dei fotorecettori vengono fagocitati dall'epitelio pigmentato e appaiono al suo interno come fagosomi, elementi successivamente degradati e trasformati in micro-molecole, che vengono poi immessi in circolo tramite lo strato capillare della coroide previo "filtro" della membrana di Bruch, altamente specializzata e composta da due o tre diversi strati. L'antigene S, utilizzato come "marker" tramite uno specifico anticorpo monoclonale, è stato seguito nel suo percorso all'interno dei fagosomi delle cellule dell'epitelio pigmentato retinico, tentando di individuare la sua presenza nella regione al di sotto dell'epitelio pigmentato, oltre la membrana di Bruch, fino allo strato capillare della coroide, scoprendo che gran parte dei prodotti del metabolismo vengono completamente biodegradati all'interno dei fagosomi.

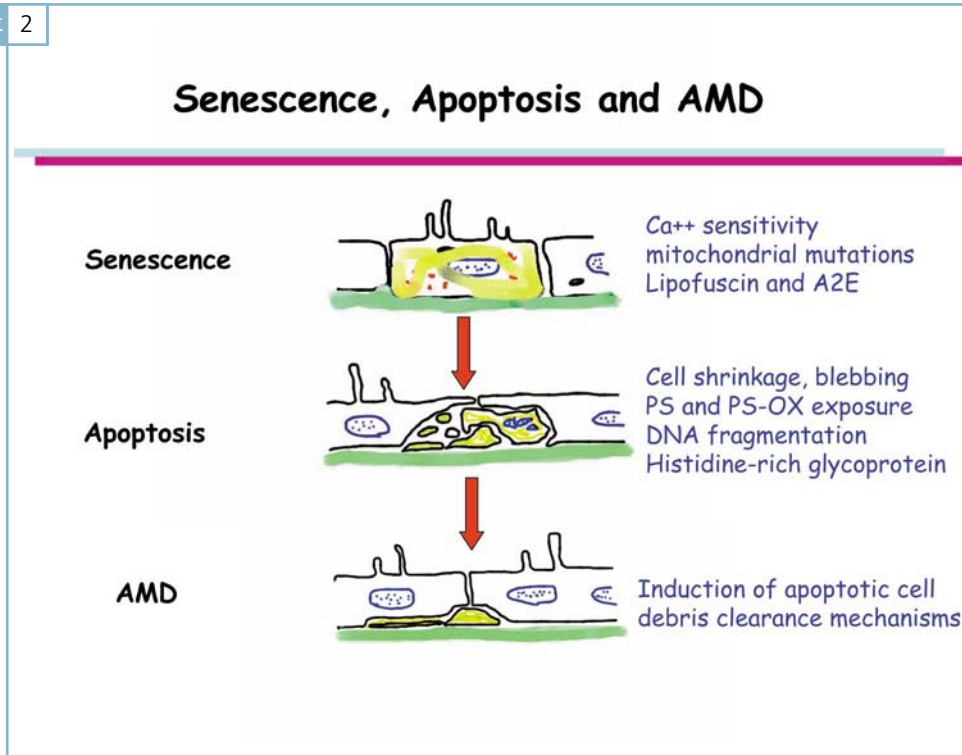
Uno degli elementi istologici maggiormente studiati è il "microcosmo" dell'epitelio pigmentato,

che racchiude ancora molteplici incertezze che spaziano dal suo metabolismo alla sua bioenergetica.

Hollyfield, assieme ai suoi collaboratori, è stato uno dei pochi a dedicarsi allo studio del "ciclo vitale dell'epitelio pigmentato" dimostrando la progressiva perdita di cellule dell'epitelio pigmentato, riducendo quindi anche il rapporto fotorecettori - epitelio pigmentato, e sollevando dubbi che ancora oggi rimangono insoluti: come perché la perdita cellulare è minore in corrispondenza della fovea, benché sia proprio questa la regione di accumulo delle drusen? (Fig. 1)

Lo spirito della medicina moderna è basato sul controllo dell'evoluzione delle patologie, e come per molte affezioni ascrivibili più propriamente alla medicina generale, molti studiosi hanno tentato di individuare in vitro un marker di invecchiamento. Gli studi in vitro hanno evidenziato un incremento dell'enzima beta-galattosidasi, un accorciamento dei telomeri nel nucleo, un decremento del fattore BrdU, un marker della proliferazione cellulare in vitro, un incremento del fattore derivato dall'epitelio pigmentato (PEDF), che si sa essere coinvolto nella soppressione

fig 2



della mitosi cellulare, nonché un incremento del livello dell'enzima catepsina-D, ma in vivo, come è ben noto, è molto più difficile ritrovare evidenze di invecchiamento o senescenza nell'epitelio pigmentato. Ciò nonostante, alcuni studi in vivo hanno dimostrato un aumento della beta-galattosidasi e anche della catepsina-D.

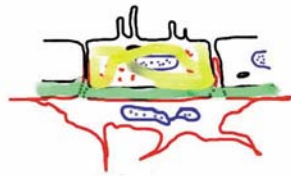
Ma quale è la fine delle cellule dell'epitelio pigmentato retinico? Per anni si è quasi univocamente ritenuto che le drusen fossero accumuli di dischi dell'articolo esterno dei fotorecettori degradati ma non propriamente metabolizzati, ma sembrerebbe una verità parziale. L'ipotesi fortemente caldeggiata da Forrester si basa su diverse fasi del ciclo biologico della cellula dell'epitelio pigmentato retinico. La cellula dell'epitelio pigmentato retinico incontra una fase di apoptosi che costituisce un precursore della AMD, contraddistinta da diverse alterazioni che si osservano nella cellula durante questa fase: aumento della sensibilità al calcio, mutazioni mitocondriali ed aumentati livelli di lipofuscina e A2E (Fig. 2). Come è ben noto, l'apoptosi è caratterizzata da riduzione del volume cellulare, con esposizione di fosfatidil-

serina nella porzione extra-membrana, nonché di fosfatidil-serina ossidata, frammentazione del DNA, e la comparsa di altre molecole, come glicoproteine ricche di istidina sulla membrana cellulare; in altre cellule dell'organismo, e sovente nell'epitelio pigmentato, questo processo conduce poi all'induzione di due meccanismi immunitari, specificatamente infiammatori che portano alla clearance dei detriti derivati dalla membrana cellulare apoptotica: meccanismo umorale e cellulare. La capacità di riconoscimento e di funzionamento di questi due sistemi, nonché l'omeostasi dei due è la "conditio sine qua non" per mantenere un equilibrio atto a ridurre la flogosi, stimolare il processo riparativo nell'organismo e promuovere o supportare la tolleranza agli auto-antigeni, in modo tale da prevenire lo sviluppo di un'auto-immunità.

La proteina C-reattiva (CRP) è nota fin dagli anni '30, e manifestamente individuata in reazioni di fase acuta, indubbio marker della flogosi. La CRP è una pentraxina, molecola caratterizzate da una determinata sequenza di amminoacidi (HxCxS/TWxS, dove x può

fig. 3

### Scavenger Function of Resident Choroid Macrophages



Express:  
Scavenger receptor eg ED2  
F4/80  
Do not express:  
Sialoadhesin, CD68

"the silent performers"



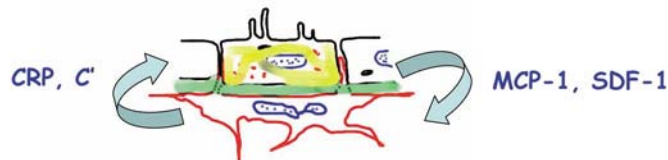
essere qualsiasi amminoacido). Le pentraxine sono molecole divise in due grandi famiglie: "corte" e "lunghe", a seconda della lunghezza della loro catena. La proteina C-reattiva è parte integrante della famiglia delle pentraxine a catena corta, insieme ad un'altra proteina di interesse in rapporto alla degenerazione maculare senile e anche ad altre condizioni, come la malattia di Alzheimer: la proteina amiloide sierica (SAP). Queste due proteine si legano ai polisaccaridi delle pareti batteriche e ad altri materiali estranei, e quando la CRP e la SAP si uniscono al ligando, questo complesso è in grado di legarsi al fattore C1q, che rappresenta il primo componente del complemento che può attivare la sua cascata seguendo tre diverse vie: la via classica, la via mediata dalla lectina e la via alternativa. È opportuno in questa fase puntualizzare pochi concetti di immunologia che non si percorrono con consuetudine durante la quotidiana pratica clinica oculistica: la via classica coinvolge il fattore 1 del complemento, attivando i fattori 4 e il 2 e da questo complesso il fattore C3 che porta al C5 e infine il C5 che conduce a un attacco di membrana da parte di un complesso di C6, 7, 8 e 9 che conduce alla morte della cellula mediante la sua lisi.

In epoca recente sono però emerse nuove conoscenze sulla bio-attivazione complementare, in particolare sono stati individuati molti inibitori del meccanismo del complemento nell'intero sistema, tra cui fattori H e I del complemento, il DAF, l'MCP e il CR1, o il CD59 che inibisce il MAC (Complesso di Attacco di Membrana), localizzati in vari siti della membrana, per poter disattivare l'intero processo. Da rimarcare la grande rilevanza del fattore H del complemento: questa molecola "previene" la completa attivazione del complemento, bloccando la formazione del complesso di attacco alla membrana, realizzandone quindi un'attivazione solamente "parziale". Coloro che più di ogni altro si sono dedicati allo studio dell'azione del complemento e di altre molecole nella AMD sono i ricercatori del gruppo di Anderson, negli Stati Uniti. Tra le altre proteine studiate, la proteina C-reattiva ha calamitato l'attenzione del gruppo dei ricercatori. L'espressione sulla superficie di molecole quali la CRP, il C3 e il C5, rende tali cellule potenzialmente destinate all'apoptosi e, quindi, alla loro eliminazione. In epoca recente la Scuola di Aberdeen aveva fornito evidenza della

fig 4

### Regulation of Scavenger Function at RPE /Choroid Interface

RPE cells: Constitutive secretion of MCP-1, SDF-1  
Induced release of CRP, C'



Macrophages: produce CRP, C'  
express Fc, CR3, PSL

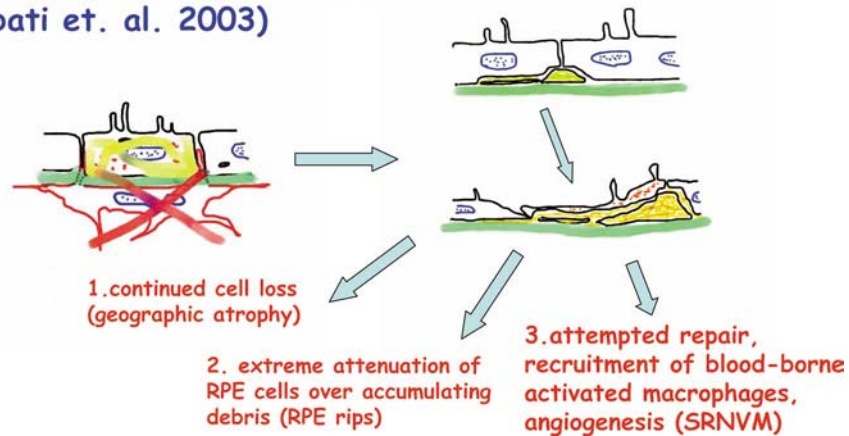
presenza di una vasta rete di cellule dendritiche e macrofagi nella coroide di diversi roditori e, successivamente, anche dell'uomo. Di grande impatto scientifico ed emotivo, alla luce della tangibile evidenza di una regia invisibile che architetta gli epifenomeni della nostra vita biologica, è stato il video della coltura in vitro delle cellule dendritiche e macrofagi, dove si possono vedere le interazioni di queste in un microcosmo atto a creare un delicato meccanismo di mutuo equilibrio. Attraverso la tecnica del microscopio confocale si è poi evidenziata la presenza di macrofagi siti nella coroide murina, a stretto contatto con i vasi sanguigni, subito al di sotto dell'epitelio. Una volta individuate queste cellule si è subito ipotizzato un qualche ruolo importante nell'induzione dell'autoimmunità (Fig. 3), e che proprio le cellule dendritiche limitrofe all'epitelio pigmentato, con i loro processi cellulari che risalgono attraverso di esso, potessero fungere da 'antigen presenting cell' dell'antigene-S o di altri autoantigeni presenti nella retina. Da qui l'induzione dell'infiammazione. Un'altra ipotesi sembra più probabile ed è che lo scopo di queste cellule sia

più quello di regolare e controllare la reazione infiammatoria inducendo una tolleranza piuttosto che quello di regolare una risposta immunitaria. In effetti, i macrofagi rivestono un ruolo importantissimo in questo senso, e ben nota è la loro funzione di scavengers nella coroide normale: il loro target biologico è la clearance delle cellule morenti dell'epitelio pigmentato retinico, la rimozione del materiale e delle cellule ormai non più vitali o in fase di apoptosi e quindi la loro eliminazione. Proprio per queste funzioni, i macrofagi sono dotati di recettori per gli scavenger (ad es.: ED2 o l'F4/80), senza esprimere markers di attivazione, come altri macrofagi, ovvero le sialoadesine e il CD68. Dimostrata da tempo (Fig. 4) è poi una regolazione della funzione scavenger in corrispondenza dell'interfaccia tra epitelio pigmentato retinico e coroide, poiché l'epitelio pigmentato retinico produce molecole quali la proteina Chemiotattica Mononocitaria 1 (MCP1) e il Fattore di Derivazione Stromale 1 (SDF1), il cui fine è l'induzione del reclutamento delle cellule dal midollo osseo ai tessuti sani, meccanismo che non avviene soltanto nel sito coroideale ma in tutti quei tessuti capaci di produrre queste molecole.

fig 5

### Failure of Scavenger Function at RPE/Choroid Interface

eg mutations in complement Factor H  
(Science 2005); MCP-1 KO mouse  
(Ambati et. al. 2003)



Analogamente, gli stessi macrofagi biosintetizzano altre componenti del sistema di regolazione: la proteina C-reattiva e il complemento, esprimendo altre molecole quali il ligando per la fosfatidil-serina, divenendo così capaci di riconoscere la cellula dell'epitelio pigmentato in apoptosi e quindi eliminarla silenziosamente.

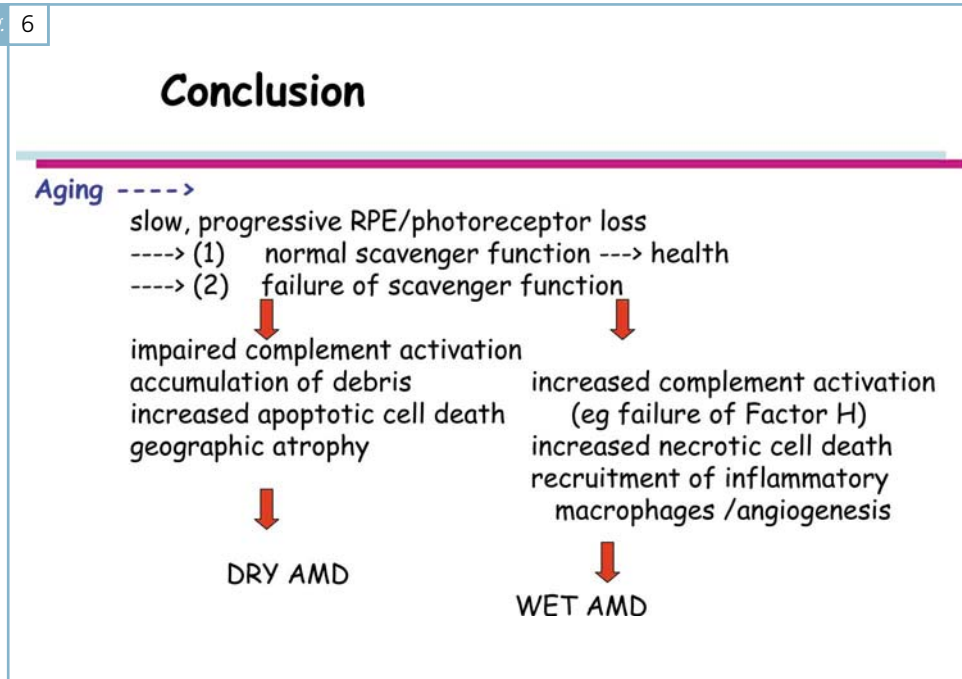
Cosa può avvenire se questo meccanismo si arresta? Il risultato è lo sviluppo di una Degenerazione Maculare Senile, o AMD.

Il grande impatto sociale dell'AMD al quale si concatenano interesse da parte della comunità scientifica e la grande produzione in letteratura medica, è un punto nodale che non ha solo destato interesse nel settore oculistico, ma anche nella medicina in generale: 'Science' ha pubblicato recentemente articoli che indicano le mutazioni nel Fattore H (Fig. 5) del complemento come le artefici dell'aumento smisurato - in misura pari al 40-50% - della suscettibilità allo sviluppo dell'AMD. Secondo Forrester il motivo potrebbe essere la perdita da parte del Fattore H del controllo del complemento, non mantenendolo più nello stato di parziale attivazione, permettendo così un'attivazione completa di quei meccanismi che portano a una necrosi

anziché a un'apoptosi delle cellule dell'epitelio pigmentato retinico, conducendo poi a delle risposte angiogeniche attraverso il reclutamento di altri macrofagi attivati provenienti dal midollo osseo. Proprio il gruppo di Ambati ha dimostrato la possibilità di produrre sperimentalmente un ottimo modello di degenerazione maculare somigliante a quella presente nell'uomo, ideando un modello murino (MCP1) incapace di reclutare questi macrofagi scavenger presenti. La tesi sposata dall'Aberdeen University sarebbe, quindi, fondata sull'inefficiente funzione di scavenging all'interfaccia epitelio pigmentato-coroide che indurrebbe pertanto una progressiva perdita cellulare, un grado di atrofia patologica, esaltazione del meccanismo di apoptosi e di conseguenza un'atrofia a carta geografica.

Dalle osservazioni del prof Forrester sembrerebbe che alla luce dell'analisi dei dati degli studi del suo gruppo di ricerca e delle pubblicazioni presenti in letteratura si può dedurre che l'invecchiamento si accompagna ad una lenta, progressiva perdita di epitelio pigmentato retinico e di cellule recettoriali; in circostanze normali, con il mantenimento delle fisiologiche funzioni di scavenging, l'anziano ha un

fig 6



occhio fisiologicamente conservato. Quando, però, la funzione di scavenging subisce un deterioramento, tale squilibrio esita in una riduzione dell'attivazione del complemento, un accumulo di scorie, un incremento della morte cellulare per apoptosi e un'atrofia a carta geografica che conduce ad una degenerazione maculare senile atrofica, oppure ad un incremento di attivazione del complemento (come può accadere per una ipo-attività del fattore H), un aumento della morte cellulare per necrosi anziché per apoptosi, e un reclutamento di macrofagi infiammatori e un'angiogenesi con il conseguente sviluppo di una forma essudativa. L'"imbalance" (Fig. 6) di questi meccanismi conduce alla genesi dell'AMD che può seguire due destini diversi, influenzati dalla suscettibilità interindividuale a sviluppare una forma atrofica o essudativa a seconda del proprio patrimonio genetico.

**BIBLIOGRAFIA**

- Crane IJ, Forrester JV. *Th1 and th2 lymphocytes in autoimmune disease*. Crit Rev Immunol **25**(2): 75-102, 2005
- Forrester JV, Lumsden L, Duncan L, Dick AD. *Choroidal dendritic cells require activation to present antigen and resident choroidal macrophages potentiate this response*. Br J

- Ophthalmol **89**(3): 369-377, 2005 Mar
- Pop-Fanea L, Vallespin SN, Hutchison JM, Forrester JV, Seton HC, Foster MA, Liversidge J. *Evaluation of MRI for in vivo monitoring of retinal damage and detachment in experimental ocular inflammation*. Magn Reson Med **53**(1): 61-68, 2005 Jan
- MacKinnon JR, Knott RM, Forrester JV. *Altered L-selectin expression in lymphocytes and increased adhesion to endothelium in patients with diabetic retinopathy*. Br J Ophthalmol **88**(9): 1137-1141, 2004 Sep
- Forrester JV. *Shedding light on a new eye protein*. Br J Ophthalmol **88**(5): 602-603, 2004 May
- Xu H, Manivannan A, Jiang HR, Liversidge J, Sharp PF, Forrester JV, Crane IJ. *Recruitment of IFN-gamma-producing (Th1-like) cells into the inflamed retina in vivo is preferentially regulated by P-selectin glycoprotein ligand 1:P/E-selectin interactions*. J Immunol **172**(5): 3215-3224, 2004 Mar 1
- Donnelly R, Idris I, Forrester JV. *Protein kinase C inhibition and diabetic retinopathy: a shot in the dark at translational research*. Br J Ophthalmol **88**(1): 145-151, 2004 Jan. Review
- Forrester JV, Cornall RJ. *Tolerance and autoimmunity in the eye: a role for CD8 T cells in organ-specific autoimmunity in the retina*. Immunology **110**(3): 293-295, 2003 Nov. Review
- Forrester JV. *Macrophages eyed in macular degeneration*. Nat Med **9**(11): 1350-1351, 2003 Nov
- Dick AD, Carter D, Robertson M, Broderick C, Hughes E, Forrester JV, Liversidge J. *Control of myeloid activity during retinal inflammation*. J Leukoc Biol **74**(2): 161-166, 2003 Aug. Review