

Tesi di dottorato in Immunologia Oculare, di
Alice Bruscolini, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 24/03/2011.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,
a condizione che ne venga citata la fonte.



Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di dottorato di ricerca in Immunologia Oculare
XXIII ciclo anno 2008

**“Ruolo delle citochine proinfiammatorie nella
Malattia di Behçet”**

Alice Bruscolini

Coordinatore
Prof. Stefano Bonini

Tutore
Prof. Alessandro Lambiase

24 Marzo 2011

INDICE

• INTRODUZIONE.....	2
• EPIDEMIOLOGIA.....	7
• EZIOLOGIA E PATOGENESI.....	9
• TERAPIA.....	16
• RICERCA PERSONALE.....	23
- PAZIENTI E METODI.....	25
- RISULTATI.....	28
- DISCUSSIONE.....	33
• BIBLIOGRAFIA.....	36

 Alice Bruscolini¹

INTRODUZIONE

Nel 1937 il dermatologo turco Hulusi Behçet descrisse una sindrome caratterizzata da afte orali, ulcerazioni genitali ed iridociclite recidivante con ipopion¹.

Negli anni seguenti fu osservato il possibile coinvolgimento di altri organi ed apparati quali la cute, le articolazioni, l'apparato cardiovascolare, gastroenterico e polmonare, i reni ed il sistema nervoso centrale.

In onore del primo clinico che la descrisse, la sindrome fu chiamata Malattia di Behçet (MB).

Sembra che questo complesso quadro patologico fosse stato già individuato nel V secolo avanti Cristo, da Ippocrate², la cui pratica medica ebbe luogo principalmente nel nord della Grecia, in Tessalia, Macedonia e Tracia, che tutt'oggi corrispondono ad aree geografiche in cui è alta³ l'incidenza della MB. Nel VII paragrafo del III libro "Delle Epidemie" (ΕΠΙΔΕΜΙΩΝ) infatti, si legge⁴:

**VII. Ἦσαν δὲ καὶ ἄλλοι πυρετοί, περὶ ὧν γε-
γράφεται. στόματα πολλοῖσιν ἀφθώδεα, ἐλκώδεα.
ῥεύματα περὶ αἰδοῖα πολλά, ἐλκώματα, φύματα
ἔξωθεν, ἔσωθεν· τὰ περὶ βουβῶνας. ὀφθαλμῖαι
ὑγραί, μακροχρόνιοι μετὰ πόνων. ἐπιφύσεις βλεφά-
ρων ἔξωθεν, ἔσωθεν, πολλῶν φθείροντα τὰς ὄψιας,
ἃ σῦκα ἐπονομάζουσιν. ἐφύετο δὲ καὶ ἐπὶ τῶν
ἄλλων ἐλκέων πολλὰ καὶ ἐν αἰδοίοισιν. ἄνθρακες
πολλοὶ κατὰ θέρος καὶ ἄλλα, ἃ σήψ καλεῖται.
ἐκθύματα μεγάλα. ἔρπητες πολλοῖσι μεγάλοι.**

 Alice Bruscolini²

"Vi erano anche altre febbri, delle quali si dirà. A molti afte, piaghe alla bocca. Flussi copiosi ai genitali, ulcerazioni, tumori esterni, interni: alcuni all'inguine. Oftalmie umide, lunghe, penose. Verruche alle palpebre, esterne e interne, che a molti facevan perdere la vista (quelle che son dette "fichi"). Si formavano escrescenze anche presso le altre piaghe, molte sui genitali. Carbonchio frequente durante l'estate, e così altre piaghe chiamate "marciume". Grandi pustole. Erpeti frequenti ed estesi"⁵.

Nel brano Ippocrate descrisse la classica triade sintomatologica identificata successivamente da H.Behçet: afte orali ("*a molti afte, piaghe alla bocca*"), afte genitali ("*flussi copiosi ai genitali, ulcerazioni*") e coinvolgimento oculare ("*oftalmie umide, lunghe, penose*"), con riferimenti anche alla follicolite ("*marciume*", "*pustole*", "*erpeti*") che rappresenta una frequente manifestazione cutanea della malattia di Behçet. E' inoltre sottolineata la severa prognosi oculare ("*che a molti facevan perdere la vista*").

La bassa incidenza e la variabile espressività clinica della MB sono responsabili della mancanza di unanimità di classificazioni e della difficoltà nel confronto e nell'interpretazione dei dati riportati in letteratura. Attualmente le classificazioni più utilizzate sono quella del Japanese Behçet's Disease Research Committee⁶ (tab.A), del 1974, e quella proposta più recentemente, nel 1990, dall' International Study Group for Behçet's Disease⁷ (tab.B). Secondo la classificazione giapponese le manifestazioni cliniche si dividono in sintomi maggiori (afte orali, lesioni cutanee, lesioni oculari, afte genitali) e minori (artralgie e/o artrite, lesioni viscerali, epididimiti, lesioni vascolari, complicazioni del sistema nervoso centrale).

Alice Bruscolini³

Si identificano fondamentalmente una forma completa, in cui sono presenti tutti i sintomi maggiori, ed una forma incompleta, in cui sono presenti tre sintomi maggiori o le lesioni oculari tipiche più un sintomo maggiore. La classificazione del 1990 pone in risalto le manifestazioni mucositarie e cutanee; infatti requisito indispensabile per la diagnosi di MB è la presenza delle afte orali recidivanti a cui si associno almeno altre due lesioni caratteristiche (afte genitali, lesioni oculari, lesioni cutanee, pathergy-test positivo). La concomitanza di tutti i sintomi è comunque assai infrequente, ma la loro comparsa è solitamente progressiva nel periodo di attività della malattia.

Ulteriori difficoltà si sono presentate nella forma pediatrica della MB, che si manifesta in modo a volte dissimile dall'adulto: sembra, infatti, che siano meno frequenti l'interessamento oculare, che tuttavia si presenta con una prognosi più severa, le lesioni cutanee e le afte genitali; queste ultime, però, si manifestano di solito nei pazienti postpuberi. Il coinvolgimento gastroenterico sembra essere più frequente nei bambini giapponesi rispetto ai pazienti adulti (54,8% vs 23,4%, Fujkawa e Suemitsu '96)⁸, mentre uno studio⁹ condotto da Koné-Paul et al. nel '98 in pazienti di ospedali pediatrici francesi, turchi, iraniani ed arabi ha messo in rilievo una minore e meno severa compromissione intestinale accompagnata da una maggior frequenza, rispetto alla popolazione adulta, di afte perianali. In Italia le manifestazioni della MB nei bambini appaiono sovrapponibili a quelle osservabili negli adulti¹⁰.

E' stata, quindi, proposta la selezione di criteri diagnostici più appropriati per l'infanzia come già avviene per altre patologie sistemiche quali l'artrite reumatoide.

4


Tab.A –Criteri diagnostici della Malattia di Behçet secondo il Comitato di
Ricerca della Malattia di Behçet in Giappone (Shimizu,1974-rivista nel 2003)

SINTOMI MAGGIORI

Afte orali

<u>Lesioni cutanee</u>	Follicoliti ed eruzioni acneiformi Eruzioni eritema nodoso-simili Thrombophlebitis migrans Iperreattività cutanea
<u>Lesioni oculari</u>	Uveite con o senza ipopion recidivante Corioretinite Vasculite retinica

Afte genitali

SINTOMI MINORI

Artralgie e/o artrite

Lesioni viscerali (intestinali, polmonari, renali, cardiache etc..)

Epididimiti

Lesioni vascolari (occlusioni, aneurismi etc..)

Complicazioni del sistema nervoso centrale

Sindrome del tronco cerebrale
Sindrome meningo-encefalomielitica
Stato confusionale

TIPI DI MALATTIA DI BEHÇET

<u>Forma completa</u>	Tutti i 4 sintomi maggiori compaiono nel decorso clinico del paziente
<u>Forma incompleta</u>	3 dei 4 sintomi maggiori oppure lesioni oculari tipiche ed 1 sintomo maggiore
<u>Forma sospetta</u>	2 sintomi maggiori
<u>Forma possibile</u>	1 sintomo maggiore

Alice Bruscolini⁵

Tab.B- Criteri diagnostici dalla Malattia di Behçet secondo il Gruppo Internazionale di Studio della Malattia di Behçet. (1990).

Ulcerazioni orali ricorrenti Afte maggiori, afte minori, ulcerazioni erpetiformi osservate dal medico o dal paziente, che ricorrono almeno 3 volte in un anno.

Più 2 tra:

Ulcerazioni genitali ricorrenti Afte ulcerate o cicatrizzate osservate dal medico o dal paziente.

Lesioni oculari Uveite anteriore, uveite posteriore o cellule vitreali osservate con la lampada a fessura; oppure vasculite retinica.

Lesioni cutanee Eritema nodoso osservato dal medico o dal paziente, pseudofollicolite o lesioni papulopustolose; oppure noduli acneiformi osservati dal medico in pazienti non adolescenti non sottoposti a terapia corticosteroidea.

Pathergy-test positivo Letto dal medico dopo 24-48 ore.

6

EPIDEMIOLOGIA

La MB è pressoché ubiquitaria, ma presenta una maggiore frequenza nelle regioni comprese fra il 30° ed il 45° grado di latitudine nord, tra cui il bacino del Mediterraneo, il Medio Oriente ed il Giappone, dove, presentandosi con un'incidenza di 1-10 casi su 10.000 abitanti, rappresenta il 20-25% delle uveiti endogene ed è la causa del 12% di cecità in età adulta (Figura1).

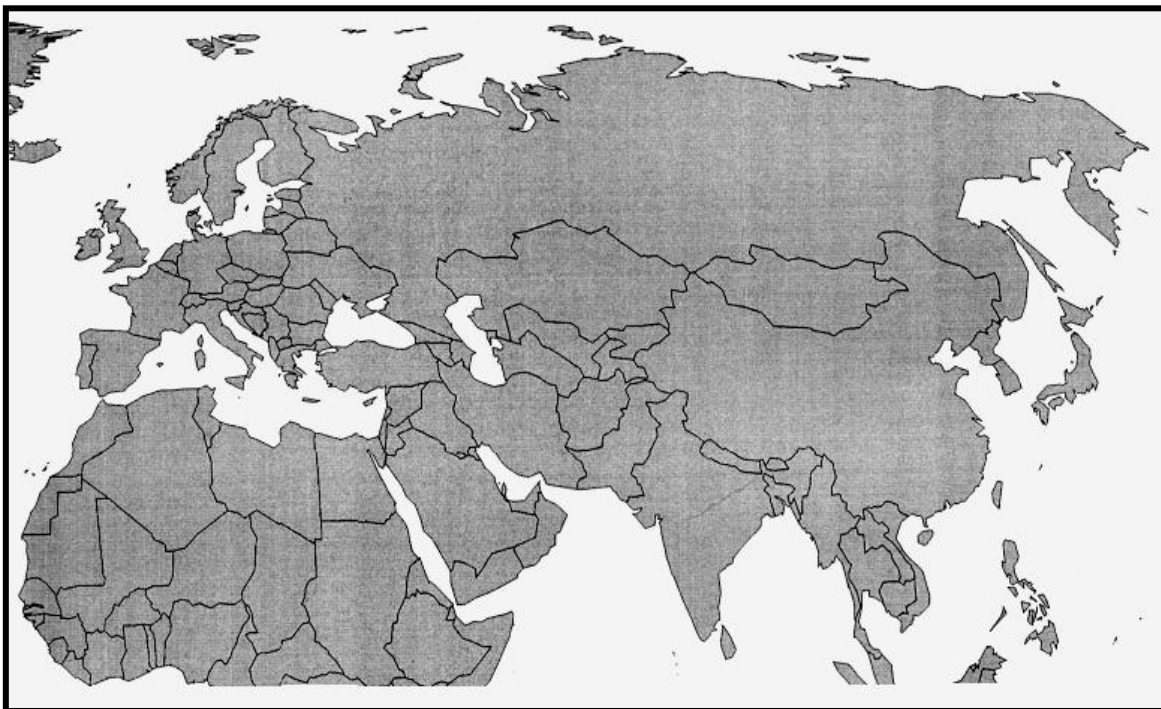


Fig.1: Propagazione della Malattia di Behçet lungo la Via della Seta.

Alice Bruscolini

In Nord America e in Europa occidentale invece l'incidenza è notevolmente più bassa circa 1-2 casi su 1.000.000 di abitanti ^{11,12}.

In Italia la MB si osserva più frequentemente nelle regioni centromeridionali ed ha un'incidenza stimata di 2,5-3 casi su 100000 abitanti, causa del 5-7% delle uveiti osservate in un centro di riferimento per lo studio delle flogosi oculari¹³.

La malattia esordisce solitamente nella II-IV decade con un'età media di circa 29 anni, più precocemente nei maschi (sotto i 24 anni) rispetto alle femmine. Il sesso maschile è tipicamente più interessato di quello femminile nei paesi a maggior incidenza della MB con una rapporto maschio/femmina variabile dal 1,7:1 del Giappone al 5:1 della Turchia. In Italia la sex ratio è di 2,9:1. Nei paesi anglosassoni, al contrario, sembra esserci una predominanza del sesso femminile¹⁴. La MB si presenta sostanzialmente in modo sporadico anche se sono stati descritti in alcuni paesi casi di familiarità (4%)¹⁵⁻¹⁷. Sembra inoltre che il fattore ereditario giochi un ruolo fondamentale nella forma infantile della malattia, ove si osserva un'alta percentuale di casi familiari, fino al 15% ¹⁰.

8


EZIOLOGIA E PATOGENESI

L'eziologia della MB resta tuttora sconosciuta; il meccanismo patogenetico più accreditato è quello di una interazione fra un substrato genetico predisponente ed una noxa infettiva capace di slatentizzare uno stato di disreattività immunologica¹⁸.

(Figura 2)

Alcuni studi sembrerebbero porre l'attenzione su alcuni agenti infettivi come l'herpes simplex virus ed alcuni ceppi di streptococco. Nel primo caso sembrerebbe che il virus abbia una ridotta capacità di replicarsi in cellule mononucleate di pazienti con malattia di Behçet; tra l'altro si è dimostrata un'elevata frequenza di trascrizione di geni virali in cellule mononucleate di tali pazienti. Nel secondo caso sembrerebbe evidente un coinvolgimento di alcuni ceppi di streptococco (Strep. sanguis, Strep. pyogenes, Strep. fecalis e Strep. salivarius) e la malattia di Behçet; sembrerebbe in tal caso coinvolta la proteina Hsp-65 come si evidenzia dall'aumento dei livelli di IgA rivolti contro tale antigene in pazienti con malattia di Behçet. Tutto ciò sembra comprovato dalla scoperta di un significativo aumento di cellule T circolanti con recettore γ d e dal fatto che peptidi derivati dalla proteina HSP-65 sono in grado di stimolare in modo evidente cellule T γ d di pazienti con malattia di Behçet^{19,20,21}.

9


Fattori genetici

La predisposizione genetica trova conferma nella maggior frequenza di casi di MB in alcune aree geografiche, un tempo attraversate dalla Via della Seta, che corrispondono al sud-est asiatico ed al Mediterraneo orientale.

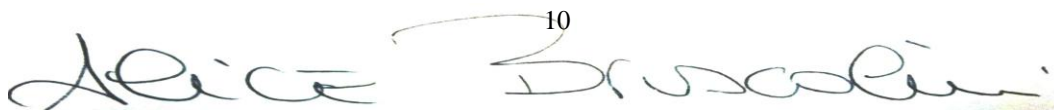
Secondo Ohno²² la commistione di popolazioni presente in tali regioni avrebbe garantito la diffusione di un genotipo favorente e di un eventuale agente infettivo.

Da tempo è stata dimostrata un'associazione significativa tra HLA-B51 e la malattia stessa in Giappone, dove il 75% dei pazienti presenta l'antigene, in Grecia ed in Turchia con percentuali rispettivamente dell'80,6% e del 61,6%. In Italia si riscontra nel 59,5% dei pazienti vs il 20,5% dei controlli. (RR= 7.9 nella popolazione giapponese)^{22,23}.

Sembra invece che il legame fra MB e B51 non sussista nei paesi anglosassoni come Gran Bretagna e USA, anche se un recente studio su 24 pazienti irlandesi ha dimostrato una positività nel 25% dei casi (Rischio Relativo 6,3)²⁴.

Altri antigeni come DR2, B12, DR7 potrebbero essere correlati anche alla localizzazione tissutale delle manifestazioni cliniche. Recentemente è stato precisato che soltanto la presenza dell'allele HLA-B*5101 e non del B*5102, né del B*5103 è strettamente correlata alla malattia di Behçet. Studi recenti hanno suggerito la possibilità che geni localizzati in prossimità di quelli codificanti per gli antigeni MHC di classe II (DP e DQ) siano in qualche modo correlati alla suscettibilità per questa malattia²¹.

Questi geni codificano per le subunità di proteine eterodimeriche coinvolte nel

10


trasporto degli antigeni nel reticolo endoplasmatico (TAP-1 e TAP-2) dove questi ultimi vengono assemblati con molecole MHC di classe I; in particolare nei pazienti affetti da malattia di Behçet si è dimostrato un fenomeno di linkage disequilibrium con gli alleli HLA-DQB1*0501 e TAP-2B; mentre sembra che l'allele TAP-1C sia maggiormente espresso in soggetti sani rispetto ai soggetti malati²⁵.

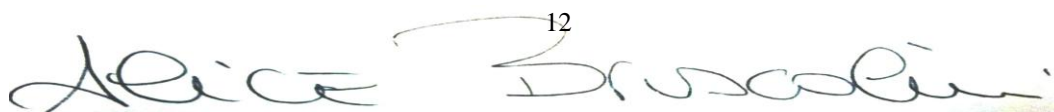
Recenti osservazioni suggeriscono l'importanza nella suscettibilità genetica allo sviluppo della malattia di una disregolazione a livello della sub-regione genica che codifica per il TNF che, come è noto, è localizzata in posizione 6p tra i geni che codificano per alcune componenti del complemento e la regione che codifica per gli antigeni MHC-I. Mediante tecniche RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism) è stato dimostrato che la presenza del frammento 10.5 kb che codifica per il TNF-b è aumentata nei pazienti con questa malattia rispetto ai controlli, mentre la frequenza del frammento 5.5 kb risulta diminuita. Attualmente è noto che i due frammenti sono forme alleliche del TNF-b capaci di influenzare da un punto di vista quantitativo la produzione di tale citochina. In effetti la presenza del frammento 10.5 kb è associata ad una ridotta sintesi del TNF-b²².

Tale osservazione assume particolare importanza in quanto recentemente il ruolo del TNF è stato valutato anche in pazienti con LES. E' stato infatti dimostrato che in pazienti con LES, positivi agli antigeni DR2 e DQw1 hanno ridotti livelli di TNF-a; tali pazienti mostrano un'alta incidenza di nefrite lupica. Da tali studi sembrerebbe dimostrato, almeno nelle fasi iniziali, un ruolo protettivo del TNF nell'induzione di processi autoimmuni. Altri autori hanno preso in considerazione l'elevata frequenza dell'allele Tau-a (regione microsatellite consistente di 14 ripetizioni guanina/timina

11


localizzata tra i geni del TNF e degli antigeni HLA-B) nei pazienti affetti da malattia di Behçet rispetto ai controlli sani ²⁶ . Tutti questi studi avrebbero evidenziato l'associazione tra la malattia e la presenza di forme alleliche di geni mappati tutti nella stessa regione (6p); tra questi anche i geni MICA e MICB (MHC Classi I Chain Related) localizzati a circa 40Kb del gene HLA-B e possibilmente coinvolti nella presentazione antigenica dei linfociti T²⁷ .

La disreattività immunologica sarebbe supportata dalle numerose alterazioni rilevabili nel corso della MB: ipergammaglobulinemia, presenza di autoanticorpi (anti-endomisio, anti-cardiolipina ed anti-endotelio) e di immunocomplessi circolanti, aumentata attività del complemento. Il coinvolgimento della immunità cellulo- mediata è testimoniato dalla diminuzione dei linfociti T totali e delle NK, dall'alterazione del rapporto TCD4/TCD8 in favore di questi ultimi e dalla eccessiva produzione delle citochine. Risultano, infine, esaltate la chemiotassi e l'attività dei granulociti neutrofili. Hiroata et al. hanno constatato che l'antigene KTH1 dello *Streptococcus sanguis*, residente nella flora batterica orale, è capace di indurre in vitro la produzione da parte dei linfociti T dei pazienti con MB di IL-6, in grado di stimolare la chemiotassi neutrofila²⁸. Alcuni studi istochimici condotti su occhi enucleati dopo la morte di pazienti affetti da MB di LTCD4+ ed un aumento dei recettori per l'interleuchina 2 ²⁹.

12


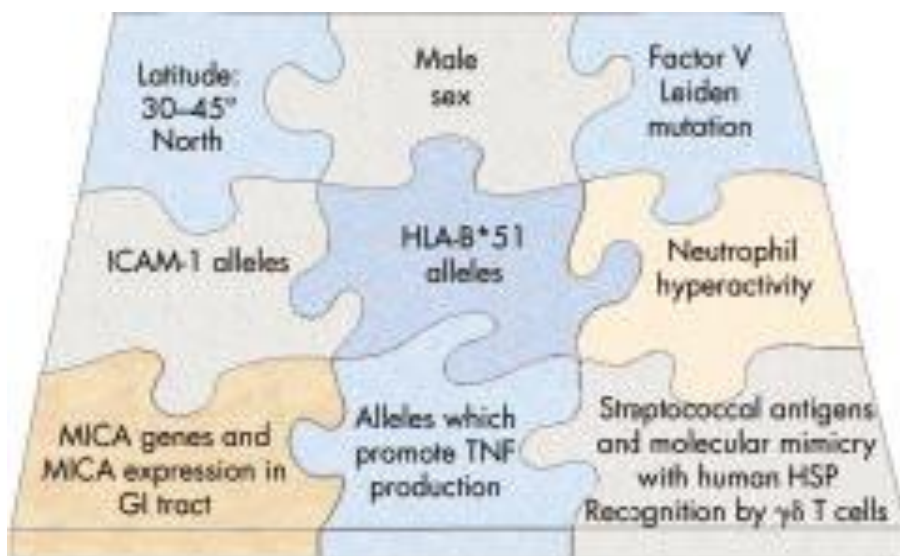


Figura 2: la MB è associata a fattori ereditari ed ambientali multipli.

E' opinione comune che alla base delle diverse manifestazioni cliniche della MB vi sia una vasculite sistemica la cui genesi potrebbe essere spiegata dal seguente modello patogenetico (figura 3).

Uno sconosciuto agente esogeno, batterico o virale, penetrato nell'organismo sarebbe fagocitato da una *antigen presenting cell* (APC), processato e successivamente presentato ai LTCD4. La produzione di IL12 e IFN γ da parte delle APC causerebbe la polarizzazione delle cellule T vergini verso il fenotipo Th1 con la conseguente stimolazione dei LB e produzione di numerose citochine che, sommate a quelle prodotte dalle stesse APC, mediano una up-regulation delle molecole di adesione endoteliali (ICAM-1, selettina E) e la produzione di molecole vasoattive e

13
Alice Bruscolini

pretrombotiche (aumenta il fattore di Von Willebrand, diminuiscono la prostaciclina e l'ossido nitrico). I granulociti neutrofili, la cui attività risulta esaltata nella MB, aderirebbero all'endotelio attraversandolo e liberando le sostanze contenute nei granuli. Il danno tissutale sarebbe quindi la risultante della degranulazione neutrofila sommata all'azione dei TCD4^{30,31}.

Gli autoanticorpi rivestirebbero solo un ruolo secondario alle lesioni, tuttavia la presenza degli anticorpi anti-endotelio risulta legata ad una maggior incidenza di eventi trombotici acuti e vasculite retinica²¹.

Dal punto di vista anatomico-patologico le lesioni più caratteristiche della vasculite nella MB si ritrovano a livello dei piccoli vasi (arteriole e venule) con infiltrati vasali e paravasali linfo-monocitari ed aree di necrosi fibrinoide. L'intima rappresenta la parte più colpita, con proliferazione dell'endotelio e parziale obliterazione del lume vasale, tuttavia la reazione flogistica può interessare anche la media, le cui fibre sono spesso scompagnate dall'edema, e l'avventizia³².

Il coinvolgimento dei vasi di grande e medio calibro è caratterizzato da dilatazioni aneurismatiche. Infine si possono verificare eventi trombotici, più frequentemente nel distretto venoso di quello arterioso.

14

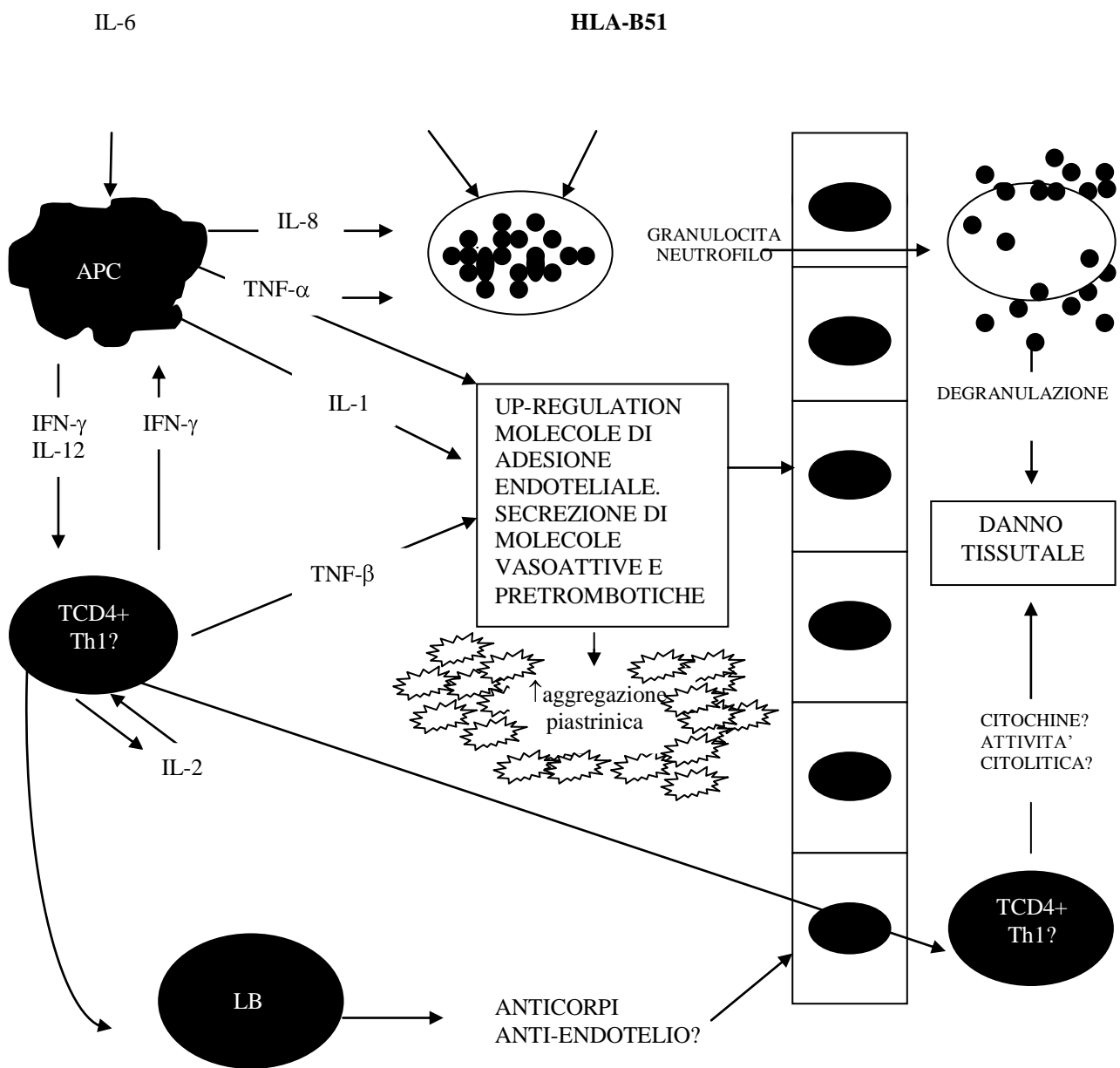



Fig. 3: possibile meccanismo patogenetico della Malattia di Behçet.

Handwritten signature

Fig.3;-Possibile meccanismo patogenetico della Malattia di Behçet.

16
Alice Bruscolini

TERAPIA

Il primo approccio terapeutico alla MB è stato l'utilizzo dei corticosteroidi, che si sono dimostrati assai utili nelle fasi iniziali della malattia. Sono farmaci preziosi per la pronta azione antiflogistica, tuttavia la terapia a lungo termine induce cortico-resistenza e dipendenza. Si è resa quindi necessaria la sostituzione con altri presidi farmacologici per poter utilizzare i corticosteroidi prevalentemente per il trattamento delle esacerbazioni ³³⁻⁵.

I farmaci immunosoppressori rappresentano la terapia più efficace e quindi di prima scelta anche nelle fasi precoci della MB: essi riducono o risolvono il problema della cortico-resistenza e dipendenza, oltre a migliorare il decorso della malattia riducendo la progressione della vasculite retinica e la frequenza e l'intensità delle recidive. Il trattamento deve essere precoce, prolungato (6-18 mesi) ed eventualmente ripetuto a distanza di tempo perché non sempre un unico ciclo di terapia può modificare il decorso ingravescente-progressivo tipico della MB.

L'obiettivo della terapia è quello di diminuire, per poi sospendere, i corticosteroidi, che di solito i pazienti assumono al momento della prescrizione, proseguendo solo con l'immunosoppressore. Lo schema di somministrazione combinata dei due farmaci e la graduale riduzione dei corticosteroidi sono di particolare importanza per il successo della terapia. Sfortunatamente in quasi il 30% dei casi la risposta è incompleta, sia per l'insorgenza degli effetti collaterali che per la scarsa efficacia, e si rende necessaria l'aggiunta di un nuovo immunosoppressore o la sostituzione di quello in uso.

17


Riassunte in tabella C le caratteristiche dei farmaci immunosoppressori più
 frequentemente prescritti nella MB

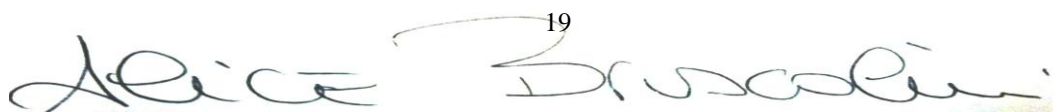
ANTIMETABOLITI	azatioprina	1-2.5 mg/kg/die x os	Tossicità epatica Tossicità midollare
	metotrexate	15-20 mg/sett x ev oppure 5-7.5 mg/die x os	Tossicità epatica Tossicità midollare
	Ciclosporina A	5 mg/kg/die (latenza effetto infiammatorio 1-2 mesi) Durata trattamento ≥ 24 mesi	ipertensione arteriosa astenia irsutismo ipertrofia gengivale aumento VES aumento transaminasi nefrotossicità
AGENTI ALCHILANTI	clorambucil	0.1-0.2/mg/die (latenza effetto infiammatorio 1- 2mesi) Durata trattamento ≤ 14-16 mesi	Azoospermia Mielodepressione ↑Rischio di infezioni ↑Rischio di linfomi e leucemie
	ciclofosfamide	1-2 mg/kg/die o 1gr/mese x ev	Azoospermia Mielodepressione ↑Rischio di infezioni ↑Rischio di linfomi e leucemie Cistite emorragica

Tabella C Immunosoppressori: classe, posologia ed effetti collaterali

Più recentemente sono state sperimentate terapie altri farmaci, tra cui l'Interferon α (9-18 MU/sett.)³⁶, il Tacrolimus o FK506 (0,05-0,1 mg/Kg/die), un potente macrolide con proprietà immunosoppressive che potrebbe essere utile per il trattamento delle manifestazioni oculari nei pazienti che non rispondono alla Ciclosporina^{37,38}, e la Pentossifillina (1200 mg/die)³⁹.

L'interferone alpha svolge un ruolo immunomodulatore, più che prettamente immunosoppressivo, nei pazienti con malattia di Behçet, ed il suo esatto meccanismo d'azione in tali soggetti non è ancora definitivamente noto. Tuttavia esso si è dimostrato altamente efficace nel trattamento delle manifestazioni oculari della MB, soprattutto se somministrato ad alti dosaggi (6M/U/die terapia di induzione) successivamente 3M/U 3 volte a settimana per una durata variabile a seconda della risposta clinica. Diversi studi hanno riportato una buona efficacia di questo farmaco sulle manifestazioni oculari ed extraoculari ma dati della letteratura anglosassone e della nostra casistica hanno evidenziato una significativa insorgenza di effetti collaterali, non solo limitati al giorno della somministrazione (una sindrome simil-influenzale), ma anche permanenti e particolarmente gravi, quali i disturbi psichiatrici (depressione grave, attacchi di panico, psicosi)⁴⁰⁻⁴³.

Negli ultimi anni è stato possibile sintetizzare in laboratorio farmaci in grado di contrastare l'azione delle citochine pro-infiammatorie, mimando gli effetti dei naturali meccanismi di regolazione cellulare e per questo detti farmaci "biologici".

19


Considerando quanto sono sofisticate le procedure per ottenerli, sarebbe appropriato chiamarli farmaci “biotecnologici”.

I farmaci biologici maggiormente utilizzati nell' uomo fino ad oggi sono gli inibitori del TNF- α , una citochina che svolge un ruolo critico in numerose patologie su base infiammatoria come l' artrite reumatoide, l' artrite psoriasica , la spondilite anchilosante e il Morbo di Crohn. Gli inibitori del TNF- α disponibili in commercio sono costituiti da due classi di molecole: gli anticorpi monoclonali (Infliximab e Adalimumab,) e i recettori solubili (Etanercept)

Recenti studi hanno riportato l'efficacia di una terapia con anti-TNF- α (infliximab) nel trattamento delle lesioni oculari ed extraoculari dei pazienti affetti da malattia di Behçet⁴⁴⁻⁴⁸ ed è stato utilizzato con successo nel trattamento dell'artrite reumatoide e del morbo di Crohn⁴⁹⁻⁵¹

L'infliximab (Remicade®), anticorpo monoclonale chimerico, neutralizza l'attività biologica del TNF- α legando le forme solubili e quelle associate alla membrana del TNF.

La sua somministrazione per via endovenosa si esegue, alle dosi di 5 mg/kg, al tempo 0 dopo 15 giorni e successivamente ogni 30-40 giorni per 4-6 mesi e dopo ogni 45-60 giorni a seconda dell'evoluzione del quadro clinico. Esso è stato dimostrato essere molto efficace sia nel trattamento della fase acuta di malattia che nel prevenire le recidive oculari e sistemiche, così come nel trattamento dell'edema maculare cistoide⁵².

Tuttavia uno studio recente ha mostrato che pazienti trattati con antagonisti del TNF- α sono soggetti ad un aumentato rischio di sviluppo di infezioni gravi rispetto

alla popolazione generale, ed in particolare può verificarsi una riattivazione di una tubercolosi latente⁵³⁻⁵⁵. A tale rischio si può associare la possibilità, nei pazienti trattati, di sviluppo di trombosi venose profonde, embolia polmonare, oltre alla formazione di anticorpi anti-TNF alpha ed antinucleo.

L'Adalimumab (Humira ®), anticorpo monoclonale IgG1 interamente umanizzato, è un altro farmaco che contrasta i disordini infiammatori attribuiti al TNF alpha in diverse patologie come l'artrite reumatoide, l'artrite psoriasica, la spondilite anchilosante e il morbo di Crohn^[56-59]. È stato approvato già nel 2002 dalla FDA per l'uso dell'artrite reumatoide. Questo farmaco possiede un'emivita di eliminazione più lunga rispetto agli altri anti-TNF alpha e può essere autosomministrato, per via sottocutanea alla dose raccomandata di 40 mg ogni 2 settimane, e a differenza dell'infliximab non necessita di una co-somministrazione di methotrexate⁶⁰.

Gli effetti collaterali riportati recentemente comprendono: reazioni cutanee al livello del sito di iniezione, endoftalmite endogena, neuriti retrobulbari, neuropatia ottica retrobulbare, insufficienza cardiaca, sindrome lupus-like, sclerosi multipla ed è associato ad un' aumentato del rischio di infezioni, compresa un'eventuale riattivazione di una tubercolosi latente, e di sviluppo di linfomi, e più in generale di tumori maligni secondari⁶¹⁻⁶³.

Dalle evidenze di alcuni autori l'Adalimumab sembra essere efficace nel trattamento della malattia di Behcet, in particolare ha dimostrato di poter essere usato con una buona risposta clinica anche nei soggetti con uveite refrattarie alle altre terapie^{60,64,65}. Il farmaco sembra essere meglio tollerato anche dai bambini e

non ha mostrato significativi effetti collaterali durante il trattamento ⁶⁶. Inoltre è stato evidenziato un buon effetto “sparing” dei corticosteroidi e degli altri immunosoppressori e un’efficacia nel ridurre il numero di recidive e mantenere in remissione la malattia ^{60;67}.

Il Daclizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato chimerico (10% murino) che antagonizza il recettore dell’IL-2 ⁶⁸. Viene somministrato per via endovenosa alla dose di 1 mg/kg/settimana e le sue indicazioni comprendevano uveiti intermedie, uveiti posteriori resistenti, ed uveiti associate ad artrite idiopatica giovanile ma la sua autorizzazione è stata ritirata dall’EMEA (European Medicines Agency) nell’ aprile 2008 su richiesta del produttore per motivi commerciali. Il farmaco determinava l’insorgenza di reazioni allergiche e anafilattiche, disturbi gastrointestinali, tremori, cefalea, disuria, ipertensione tachicardia, trombosi ⁶⁹. Secondo alcuni autori, inoltre, il daclizumab utilizzato nelle manifestazioni oculari della Behcet non risultava essere efficace ^{68,69}.

Recentemente è stata pubblicata una review sistematica sull’efficacia della terapia immunosoppressiva e dei farmaci biologici nella terapia delle uveiti posteriori autoimmuni che ha evidenziato ad oggi la mancanza di studi controllati e randomizzati che possano definire con maggior autorevolezza scientifica l’efficacia della terapia immunosoppressiva versus farmaci biologici.

I numerosi studi già effettuati, per lo più aperti o retrospettivi su casistiche spesso non molto numerose, indicano comunque una buona efficacia di tali farmaci nell’uveite autoimmune correlata alla MB ad eccezione del daclizumab che è risultato inefficace. L’EULAR (European League Against Rheumatism) ha

recentemente stabilito nove raccomandazioni, riportate in tabella D, sulla gestione terapeutica della malattia di Behcet, ottenute in accordo con l'opinione di esperti in materia alla luce degli studi scientifici attualmente pubblicati ⁷⁰.

23
Alice Bruscolini

N	RACCOMANDAZIONI EULAR
1	Ogni paziente con malattia di Behcet e infiammazione oculare coinvolgente il segmento posteriore dovrebbe essere sottoposto a terapia con azatioprina e corticosteroidi sistemici
2	Se il paziente presenta un grave interessamento oculare definito dal calo della acuità visiva di 0,2 linee su una scala di 10/10 e/o patologia retinica (vasculite retinica o coinvolgimento della macula), si raccomanda l'uso della ciclosporina A o dell' infliximab in associazione con azatioprina e corticosteroidi; in alternativa può essere utilizzato IFN-a con o senza corticosteroidi.
3	Non ci sono evidenze riguardo la gestione della patologia dei grossi vasi nella malattia di Behçet. Per la gestione della trombosi venosa profonda acuta nella malattia di Behçet sono raccomandati farmaci immunosoppressivi come i corticosteroidi, l'azatioprina, la ciclofosfamide o la ciclosporina A. Per la gestione degli aneurismi delle arterie polmonari e periferiche vengono raccomandati la ciclofosfamide e corticosteroidi.
4	Allo stesso modo, non ci sono studi controllati o evidenze di beneficio nell' uso di anticoagulanti, antiaggreganti piastrinici o agenti antifibrinolitici nella gestione della trombosi venosa profonda o nell'uso di anticoagulanti per la patologia dei vasi arteriosi nella malattia di Behçet.
5	Non esiste una terapia basata sull'evidenza che possa essere raccomandato per la gestione del coinvolgimento gastrointestinale della MB. Farmaci come la sulfasalazina, i corticosteroidi, l'azatioprina, gli antagonisti del TNF-a e la talidomide dovrebbe essere utilizzati prima di un intervento chirurgico, salvo casi di urgenza.
6	Nella maggior parte dei pazienti con MB, l'artrite può essere gestita con colchicina.
7	Non ci sono dati controllati per guidare la gestione del coinvolgimento del SNC nella MB. Per il coinvolgimento parenchimale i farmaci che posso essere utilizzati includono i corticosteroidi, l'IFN-a, l'azatioprina, la ciclofosfamide, il methotrexate e gli antagonisti del TNF-a. Per la trombosi dei seni venosi della dura madre sono raccomandati invece i corticosteroidi.
8	La ciclosporina A non dovrebbe essere somministrata nei pazienti affetti da MB con coinvolgimento del sistema nervoso, ad eccezione della necessità di trattare l'infiammazione intraoculare.
9	La decisione di trattare l'interessamento della cute e mucose dipenderà dalla gravità percepita da parte del medico e del paziente. In ogni caso le lesioni mucocutanee dovrebbero essere trattate secondo la gravità delle lesioni stesse. I trattamenti topici (es. corticosteroidi locali) dovrebbero essere la prima linea di trattamento in caso di ulcere orali e genitali isolate. Lesioni tipo acne di solito sono unicamente di interesse cosmetico, pertanto l'uso dei farmaci topici utilizzati anche nel trattamento delle acne vulgaris è sufficiente. La Colchicina dovrebbe, invece, essere preferita quando la lesione dominante è eritema nodoso. Le ulcere degli arti inferiori in pazienti con MB potrebbe avere cause diverse ed il trattamento da eseguire dovrebbe essere pianificato di conseguenza. L'uso di Azatioprina, IFNa e antagonisti del TNFa può essere considerato nei casi resistenti.

Tab. D Racomandazioni tradotte da "Expert Committee EULAR recommendations for the management of Behçet disease. Ann Rheum Dis. 2008; 67:1656-62"

24



RICERCA PERSONALE

La malattia di Behçet è una patologia infiammatoria multisistemica caratterizzata da ricorrenti aftosi orali, e genitali, uveite e lesioni cutanee. Generalmente l'interessamento oculare è presente nel 70% dei pazienti con MB e si presenta come prima manifestazione di malattia in circa il 10% dei pazienti. La diagnosi di MB viene effettuata, a causa della mancanza di biomarkers patognomici, sulla base di criteri clinici. La patogenesi della MB e dell'uveite non è stata ancora oggi completamente definita sebbene la risposta immunitaria innata e acquisita ed un'abberrante immunità cellulo-mediata unita all'alterazione del rapporto Th1/Th2 sembrano avere un ruolo cruciale nella patogenesi della MB⁷¹⁻⁷⁴

Recentemente diversi studi hanno rilevato un possibile ruolo chiave dell'IL-17, prodotta principalmente da linfociti TH 17, nella MB cosiccome in altre patologie autoimmuni⁷⁵⁻⁷⁶.

L'IL 17 sembra infatti avere un'attività pro infiammatoria in grado di mobilitare ed attivare neutrofili e macrofagi nel sito di infiammazione. Ciascuna sottoclasse di cellule T helper (Th1, Th2, Th17) si differenzia e funziona sotto l'influenza delle altre sottoclassi, molti studi hanno analizzato i diversi profili di citochine prodotte nella MB ma i risultati sembrano ancora non chiari.

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare la concentrazione plasmatica di citochine Th1 (IL2, INF- γ , TNF- α), Th-2 (IL4, 6, 10) e Th17 (IL-17) in pazienti affetti da MB in fase di remissione e di confrontarlo con i valori ottenuti da un campione di donatori sani e di evidenziare eventuali correlazioni con le manifestazioni sistemiche

25


della malattia, la presenza o meno di flogosi oculare, il tipo e la durata di uveite,
l'eventuale terapia immunosoppressiva in atto.

26
Alice Bruscolini

PAZIENTI E METODI

Pazienti

Sono stati reclutati per questo studio 29 pazienti affetti da Malattia di Behçet, 16 maschi e 13 femmine di età media $40,8 \pm 15,8$ anni (range, 19-75 anni); la diagnosi di MB è stata posta secondo i criteri stabiliti dall' International Study Group of Behçet's Disease. Al momento del prelievo di sangue venoso è stata accertata la presenza delle manifestazioni cliniche sistemiche correlate alla MB: aftosi orale e genitale, uveite, eritema nodoso, follicolite, artrite/altralgie, colite, trombosi venosa, coinvolgimento neurologico; è stata inoltre annotata la positività per l'antigene HLA B51 (tabella 1).

Tutti i pazienti arruolati risultavano al momento del prelievo in fase di remissione clinica della malattia definita dall'assenza di segni di attività di tutte le manifestazioni sistemiche MB-correlate da almeno 3 mesi.

Sono state inoltre annotate le terapie sistemiche in atto al momento dell'arruolamento successivamente raggruppate ai fini dell'analisi statistica in tre sottoclassi: 0 no terapia, 1 terapia immunosoppressiva classica (ciclosporina, azatioprina, methotrexate), 2 agenti biologici (infliximab).

La durata media di malattia è risultata essere pari a $172,8 \pm 151,2$ mesi (range 6 - 588 mesi).

All'interno del campione di pazienti affetti da MB sono stati valutati in maniera più dettagliata quelli affetti da uveite. Come mostrato in tabella 2 sono state descritte le

27


seguenti caratteristiche al momento dell'arruolamento: tipo di uveite, mono/bilateralità, presenza di vasculite retinica.

Un gruppo di 19 soggetti sani, omogenei per sesso ed età media con il gruppo di pazienti affetti da MB è stato utilizzato come gruppo di controllo (7 maschi, 12 femmine; età media $39,5 \pm 14,5$ anni).

Metodi

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue venoso che è stato immediatamente posto in provette sterili, tali provette sono state centrifugate per 5 minuti a 4500rpm. Il plasma così ottenuto è stato stoccato in provette sterili da 0,5 ml e conservato a -20°C .

Analisi multiplex delle citochine

Le concentrazioni di IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF- α sono state valutate usando kit di immunodosaggio a sandwich con sistema multiplex a base di microsferi disponibili in commercio (Human 7-plex, Bio-Rad Laboratories). I saggi sono stati eseguiti seguendo le istruzioni del produttore. Il sistema permette l'identificazione simultanea di citochine in una piastra da 96 pozzetti con filtro. Brevemente, sono stati utilizzati 7 gruppi di perle fluorescenti rivestite di anticorpi monoclonali di cattura, specifici per ciascuna delle citochine da testare. I campioni di plasma (50 μl / pozzetto) sono stati distribuiti in duplicato in una piastra da 96 pozzetti con filtro e incubate per 30 minuti a temperatura ambiente. A seguito di

28



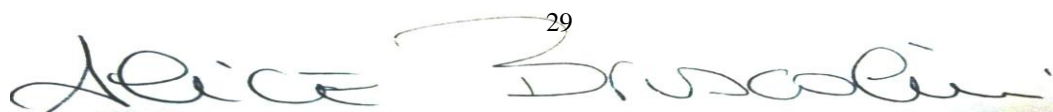
lavaggi, è stato aggiunto a ciascun pozzetto streptavidina-ficoeritrina premiscelato a cui sono seguiti più di tre lavaggi per un tempo di 10 minuti. Successivamente le perle sono state risospese con 125 LL di tampone, e la miscela di citochine è stata quantificata utilizzando il saggio di lettura per proteine Bio-Plex. I dati sono stati analizzati utilizzando il software Bio-Plex Manager versione 4.1.1. (Bio-Rad Laboratories). I valori che presentavano un coefficiente di variazione superiore al 12% sono stati scartati prima dell'analisi finale dei dati. I campioni con concentrazione (pg / mL) dei differenti analiti nei campioni di plasma sono stati determinati utilizzando le curve standard generate nel test multiplex. I livelli minimi di rilevazione (pg / mL) sono stati: 0,57 per IL-2, 0,02 per IL-4, 0,23 per IL-6, 0,17 per IL-10, 3,09 per IL-17, 0,35 per IFN- γ , 8,84 per il TNF- α .

Statistica

L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata con il test di Mann-Whitney per la comparazione dei valori plasmatici delle citochine nei pazienti affetti da MB e nei controlli sani e successivamente nei pazienti con MB con e senza interessamento oculare, articolare e cutaneo. Il test di Kruskal Wallis è stato adoperato per comparare i valori delle citochine in tre gruppi di pazienti che effettuavano diverse terapie sistemiche.

Il test rho di Spearman è stato utilizzato per correlare i valori delle citochine con la durata della malattia e con IL 17.

Valori di p inferiori a 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi.

29


RISULTATI

Sono stati arruolati nello studio 29 pazienti di età media $40,8 \pm 15,8$ anni e con una durata media di malattia pari a $14,4 \pm 12,6$ anni (range 0- 49 anni). Tutti i pazienti si trovavano in stato di remissione della malattia.

All'anamnesi patologica sistemica le afte orali ricorrenti erano presenti in tutti i pazienti (100%), le afte genitali in 15 (51,72%), l'eritema nodoso in 18 (62,07%), la follicolite in 11 (37,93%), artrite/artralgie in 16 (55,17%), tromboflebiti in 7 (24,14%), interessamento gastrointestinale in 3 (10,34%), interessamento del SNC in 1 paziente (3,45%).

Manifestazioni sistemiche	N. pazienti (%)
Afte orali	29 (100%)
Afte genitali	15 (51,72%)
Eritema nodoso	18 (62,07%)
Follicolite	11 (37,93%)
Artrite/artralgie	16 (55,17%)
Tromboflebite	7 (24,14%)
Interessamento gastrointestinale	3 (10,34%)
Interessamento del SNC	1 (3,45%)

Tabella 1: caratteristiche sistemiche dei 29 pazienti con malattia di Behçet

L'interessamento oculare era presente in 21 pazienti (72,41%). La manifestazione oculare più frequente era l'uveite con esordio monolaterale in 6 pazienti (28,6%), bilaterale asincrona in 7 (33,3%), bilaterale sincrona in 7 (33,3%), 9 pazienti (42,86%) presentavano uveite anteriore, 1



paziente (4,76%) uveite posteriore con vasculite retinica e 11 pazienti (52,38%) uveite diffusa
9 dei quali presentavano anche segni di vasculite retinica.

Interessamento oculare	N. pazienti (%)
Uveite	21 (72,41%)
Uveite anteriore	9 (42,86%)
Uveite posteriore	1 (4,76%)
Uveite diffusa	11 (52,38%)
Bilaterale sincrona	7 (33.3%)
Bilaterale asincrona	7(33.3%)
Vasculite	10 (47,82%)

Tabella 2 Caratteristiche cliniche dell'uveite associata a MB

Al momento dell'arruolamento nello studio 11 pazienti (37.93%) non effettuavano alcuna terapia sistemica immunosoppressiva, 12 (41.38%) assumevano terapia immunosoppressiva classica (azatioprina, methotrexate, ciclosporina A), 6 pazienti (20,69%) effettuavano terapia con agenti biologici (infliximab).

Tutte le citochine oggetto di studio sono risultate dosabili nel siero dei pazienti e in quello del campione di soggetti sani di controllo e sono state espresse con la media \pm deviazione standard

I valori di IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-17 sono risultati significativamente più alti nel siero dei pazienti affetti da malattia di Behçet rispetto al campione di soggetti sani: (**IL-2**: 202.02 \pm 315.06 pg/ml versus 25.55 \pm 15.30 pg/ml, Z-2.906, $p=0,004$; **IL-6**: 200.52 \pm 500.32 pg/ml versus 16.44 \pm 25.64 pg/ml, Z-3.560, $p=0.001$; **IFN- γ** : 4346 \pm 7252 pg/ml versus

562.66±1164.00 pg/ml, $Z=3.600, p=0.001$; **TNF-a**: 431,90±1026.62 pg/ml versus 31.25±30.64 pg/ml, $Z=3.019, p=0.003$; **IL-17**: 645,64±1737 pg/ml versus 18±0 pg/ml, $Z=2.468, p=0.014$).

La concentrazione di IL-4 e IL-10 non è invece risultata significativamente differente tra i pazienti con MB e controlli sani (IL-4: 19.90±50.36 pg/ml versus 3±0 pg/ml, $Z=-1.671, P=0.95$; IL-10: 36.28±71.40 pg/ml versus 6±0 pg/ml, $Z=-1.904, P=0.57$).

Prendendo in considerazione solamente i pazienti affetti da MB con uveite (21 pazienti), le concentrazioni medie di **IL -6** (248.76±583,33 pg/ml versus 16.44±25.64 pg/ml $Z=3.148, p=0.002$), **IL-17** (870.16±2007.52 pg/ml versus 18±0 pg/ml, $Z=2.485, p=0.013$), **IFN-γ** (3489.24±8585.65 pg/ml versus 562.66±1164.00 pg/ml, $Z=3.390, p=0.001$), **TNF-a** (381.13±1179.15 pg/ml versus 31.25±30.64 pg/ml $Z=3.206, p=0.001$) si rilevano significativamente aumentate rispetto ai controlli sani (tab.3).

Citochine (md±sd)	MB con interessamento oculare	Controlli sani	P
N pazienti	21	19	
IL-2	233,67±363,66	25,55±15,30	0.051
IL-4	26,21±58,29	3±0,01	0.091
IL-6	248,76±583,33	16,44±25,64	0.002*
IL-10	36,52±69,04	6±0,01	0.052
IL-17	870,16±2007,52	18±0,00	0.013*
IFN-γ	5489,24±8585,65	562,66±1164	0.001*
TNF-a	581,913±1179,15	31,25±30,64	0.001*

Tabella 3 Valori medi (media±DS) e significatività statistica (Mann Whitney -test) delle citochine proinfiammatorie nei pazienti con MB ed uveite versus controlli sani

Come mostrato in tabella 4, nei pazienti con MB senza interessamento oculare si sono evidenziate significativamente aumentate **IL -2** (118.93±90.99 pg/ml versus 25.55±15.30 pg/ml Z-4.177, $p=0.001$), **IL-6** versus (73.88±61.45 pg/ml versus 16.44±25.64pg/ml Z-3.163, $p=0.001$), **IL-17** (56.27±76.67 pg/ml versus 18±0 pg/ml Z -2.221, $p=0.026$), **IFN- γ** (1348.12±1325.28pg/ml versus 562.66±1164.00 pg/ml, Z-2.597, $p=0.009$).

Citochine (md±sd)	MB senza interessamento oculare	Controlli sani	P
N pazienti	8	19	
IL-2	118,93±90,99	25,55±15,30	0,001*
IL-4	3,32±0,89	3±0,01	0.123
IL-6	73,88±61,45	16,44±25,64	0.001*
IL-10	35,66±82,32	6±0,01	0.103
IL-17	56,27±76,67	18±0,00	0.026*
IFN-γ	1348,12±1325,28	562,66±1164	0.009*
TNF-a	40.18±32,36	31,25±30,64	0,087

Tabella 4- Valori medi (media±DS) e significatività statistica (Mann Whitney -test) delle citochine proinfiammatorie nei pazienti con MB senza uveite versus controlli sani

La concentrazione media delle citochine IL-2,IL-4,IL-6,IL-10,INF- γ ,TNF-a non è risultata significativamente differente tra i pazienti con malattia di Behçet e la presenza o meno delle seguenti manifestazioni sistemiche: uveite, altralgie/artriti, manifestazioni cutanee.

Anche L'IL-17 non sembra mostrare correlazioni statisticamente significative con nessuna delle manifestazioni sistemiche in corso di MB.

Nessuna citochina analizzata mostra una correlazione significativa con la durata della malattia mentre il IL - 2 mostra una correlazione lineare positiva altamente significativa con IL-6 E INF- γ E TNF-a.

Come mostrato in tabella 5 nessuna differenza significativa è stata evidenziata tra i pazienti con MB senza terapia immunosoppressiva (11 pazienti) e quelli con terapia immunosoppressiva classica (12 pazienti) o con agenti biologici (6 pazienti).

Citochine (md±sd)	No terapia	Terapia immunosoppressiva classica	Terapia con agenti biologici	P
N pazienti	11	12	6	
IL-2	127.18±187.65	261.91±411.11	217.66±303.47	0.52
IL-4	17.63±48.54	17.25±48.73	29±63.68	0.87
IL-6	81.54±162.33	336.91±742.23	144±240.27	0.18
IL-10	26.09±55.15	44.75±85.59	37.33±76.75	0.48
IL-17	586.27±1569.32	572.66±1809.46	899.83±2160.04	0.86
IFN-γ	3010.30±5.80	5345.08±9.04	4798±7.96	0.39
TNF-a	363.18±934.56	378.25±1.02	664.16±1.32	0.93

Tabella 5. Valori medi (media±DS) e significatività statistica (Kruscall Wallis-test) delle concentrazioni delle citochine proinfiammatorie nei pazienti con MB divisi in tre gruppi secondo la terapia sistemica in atto: no terapia, terapia immunosoppressiva classica (azatioprina, methotrexate, ciclosporina A), terapia con agenti biologici (influximab).

Discussione

La patogenesi della malattia di Behçet rimane ancora non completamente chiarita. Pazienti con MB esibiscono elevati valori di citochine proinfiammatorie e gli organi affetti mostrano un aumento significativo di infiltrazione di cellule neutrofile e di linfociti. L'azione linfocitaria sembrerebbe inoltre contribuire ad attivare e mantenere le cellule neutrofile ed endoteliali giocando così un ruolo essenziale nella patogenesi della malattia^{78,79}.

Il ruolo dell'immunità cellulo-mediata è testimoniata dai numerosi studi che recentemente hanno focalizzato l'attenzione sulle anomalie dei linfociti T: aumento dei linfociti TCR gd, ipereattività immunologica, aumento dei linf. TCD4+ citotossici⁸⁰⁻⁸².

I linfociti T-helper si dividono in 2 classi che si differenziano per il pattern citochinico e le funzioni effettrici correlate: le cellule Th1 producono IL-2, INF- γ , TNF- α , attivano i macrofagi e promuovono la risposta immunitaria cellulo-mediata; le cellule Th2 invece secernono IL-4, IL-10 e sono coinvolte nella risposta immunitaria anticorpo-mediata. Dal momento che le citokine Th1/Th2 agiscono come fattori di crescita con effetto autocrino e paracrino molti studi hanno analizzato il pattern citochinico e quindi il rapporto Th1/Th2 nella MB nei vari stadi di malattia con lo scopo di correlare l'aspetto immunitario con le varie manifestazioni cliniche ma tali studi non sembrano ad oggi aver ancora portato risultati unanimi⁸³⁻⁸⁶.

Nel nostro studio abbiamo preso in considerazione solo pazienti con MB clinicamente in fase di remissione e abbiamo rilevato un aumento significativo dell'IL-2, IL-6, INF- γ , TNF- α nei pazienti con MB rispetto ai controlli sani mentre non abbiamo evidenziato differenze statisticamente significative nelle concentrazioni di IL-4 e IL 10. In accordo con altri lo studi non abbiamo trovato uno specifico profilo citochinico, suggerendo l'idea che la MB possa essere determinata da una risposta prevalentemente di tipo Th1 (IL-2, IL-6, INF- γ , TNF- α) piuttosto che di tipo Th2 (IL4, IL-10).

35



L'IL-6 è prodotta dai monociti, cellule epiteliali e fibroblasti e causa attivazione policlonale delle cellule B con conseguente ipergammaglobulinemia e produzione di autoanticorpi. Il principale effetto inoltre è legato all'aumento della secrezione epatica delle proteine di fase acuta. Inoltre è stato riportato lo sviluppo di uveite in vivo in ratti dopo iniezione intracamerulare di IL-6⁸⁷. Pertanto IL-6 avrebbe la capacità di indurre uveite.

Inoltre un'anomala produzione di IL-6 è stata implicata in alcune patologie autoimmuni e nelle reazioni infiammatorie croniche⁸⁸;

Nel nostro studio l'interleukina 6 è stata osservata significativamente aumentata nei pazienti con MB sia con che senza segni di flogosi oculare rispetto ai controlli sani confermando il fatto che probabilmente abbia un ruolo importante nel corso della malattia.

In accordo con altri studi abbiamo inoltre rilevato un aumento significativo delle concentrazioni di INF- γ e IL-2⁸⁹⁻⁹¹. Il TNF- α invece è risultato significativamente aumentato solo nei pazienti affetti da MB con interessamento oculare versus controlli sani; il fatto che il TNF- α sia elevato in pazienti con uveite in remissione potrebbe essere legato ad un paradossale effetto protettivo di inibizione della migrazione di cellule polimorfonucleate nel sito di infiammazione già dimostrato in altri studi⁹²⁻⁹⁴.

Non abbiamo rilevato significative differenze delle stesse citochine tra pazienti con MB e le diverse manifestazioni cliniche sistemiche (uveite, manifestazioni cutanee, altralgie/artriti) ne tantomeno con diverso regime terapeutico.

La mancata correlazione tra i livelli di citochine e le manifestazioni cliniche/trattamento può essere spiegata in funzione del trattamento effettuato dai pazienti al momento del prelievo o eventualmente precedente all'arruolamento. I farmaci immunosoppressori infatti come l'azatioprina inibendo la sintesi delle purine determina in ultima analisi la migrazione cellulare ma non inibisce l'NF-kB traslocazione che è essenziale per la produzione di citochine determinando quindi una riduzione di leucociti ma non di citochine.

Recentemente è stata identificata una nuova sottoclasse di cellule Th, Th 17 caratterizzata in parte dalla produzione dell'interleuchina 17. Tale citochina sembra avere un ruolo proinfiammatorio modulando la secrezione di IL-1, TNF- α , IL-6, oltre che un effetto sull'attività dei neutrofili che ne ha fatto ipotizzare un ruolo chiave nel legare la risposta cellulo mediata e l'infiammazione neutrofila in diverse patologie autoimmuni come LES, artrite reumatoide, Morbo di Crohn e psoriasi^{76,77}

Nel nostro studio abbiamo registrato un'aumento statisticamente significativo di IL-17 nei pazienti con MB rispetto ai controlli sani; la concentrazione di tale citochina non varia significativamente in relazione alle manifestazioni cliniche sistemiche né alla terapia sistemica in atto. Studi recenti hanno rilevato un consistente aumento della concentrazione di IL-17 in corso di uveite o aftosi orale ipotizzandone un ruolo target per nuove strategie terapeutiche^{75,85,91}. Infatti Wei Chi ha rilevato in corso di attività di malattia oculare un significativo aumento delle concentrazioni di IL-17, e una positiva correlazione con l'IL-6, TNF- α e INF- γ ; anche dai nostri dati è emersa una correlazione significativamente positiva con IL-6, TNF- α e INF- γ ma tali risultati necessitano di ulteriori conferme.

In conclusione il nostro studio ha messo in evidenza un'aumento della concentrazione di alcune citochine proinfiammatorie nei pazienti con MB in fase di assoluta quiete clinica definita come l'assenza di ogni segno di attività oculare ed extraoculare.

Resta comunque necessario analizzare, nei nostri pazienti, il profilo citochinico in corso di attività delle diverse manifestazioni sistemiche con particolare riguardo alla presenza di flogosi oculare che ad oggi, in alcuni casi, rimane refrattaria anche alle nuove terapie con agenti biologici oltre che essere comunque una delle manifestazioni della MB a prognosi più infausta⁹⁵.

37



Bibliografia

1. Behçet H. Über rezidivierende aphtose, durch ein Virusverursachtes Gescwur am Mund, am Auge und an den Genitalien. *TNF-Scar.* 1937; 105:1152-1155.
2. Feigenbaum A. Description of Behçet's syndrome in the hippocratic third book of endemic diseases. *Br J Ophthalmol.* 1956; 40: 355-357.
3. Jandolo M. La sindrome di Behçet nel "Corpus Hippocraticum". Estratto dal giornale del medico *Enpas MCMLIX Anno V n° 2, Feb 1959.*
4. Ippocrate: "ΕΠΙΔΗΜΙΩΝ" III Libro (V secolo A.C.).
5. Opere di Ippocrate, traduzione a cura di M. Vegetti. UTET: II edizione, 1976; 356-357.
6. Behçet's Disease Research Committee of Japan. Behçet's Disease: guide to diagnosis of Behçet's Disease. *Jpn J Ophthalmol.* 1974; 18:291-294.
7. International Study Group For Behçet's Disease: Criteria for diagnosis of Behçet's Disease. *Lancet* 1990; 35: 1078-1080.
8. Fujikawa S, Suemitsu T. Behçet's Disease in children: A nationwide retrospective survey in Japan. *Acta Paed Japon.* 1997; 39: 285-289.
9. Koné-Paut I, Yurdakul S, Bahabri SA, Shafae N, Ozen S, Özdoğan H, Bernard JL. Clinical features of Behçet's Disease in children: An international collaborative study of 86 cases. *J Paediatr.* 1998; 132:721-725.
10. Pivetti Pezzi P, Accorinti M, Abdulaziz MA, La Cava M, Torella M, Riso D. Behçet's Disease in children. *Jpn J Ophthalmol.* 1995; 39: 309-314.
11. Suzuki Kurokawa M, Suzuki N. Behçet's disease. *Clin Exp Med.* 2004 Sep; 4(1):10-20.
12. Yazici H, Esen F. Mortality in Behçet's syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 2008 Sep-Oct; 26 (5 Suppl 51):S138-40.
13. Pivetti Pezzi P. Uveiti. *Masson, Milano.* 1996; 153-157.
14. Krause I, Uziel Y, Guedj D, Mukamel M, Molad Y, Amit M, Weinberger A. Mode of presentation and multisystemic involvement in Behçet's Disease: the influence of sex and age of disease onset. *J Rheumatol.* 1998; 25(8): 1566-1569.
15. Akpolat T, Koç Y, Yeniay I, Akpek G, Güllü I, Kansu E, Kiraz S, Ersoy F, Batman F, Kansu T, et al. Familial Behçet's Disease. *Eur J Med.* 1992 Nov; 1(7):391-5.
16. Fietta P. Behçet's Disease: familial clustering and immunogenetics. *Clin Exp Rheumatol.* 2005 Jul-Aug; 23(4 Suppl 38):S96-105.
17. Pivetti-Pezzi P, Moncada A, Catarinelli G et al. Malattia di Behçet familiare. *Clin Ocul Pat Ocul* 1988; 9:353-7.
18. González-Escribano MF, Morales J, García-Lozano JR, Castillo MJ, Sánchez-Román J, Núñez-Roldán A, Sánchez B. TAP polymorphism in patients with Behçet's disease. *Ann Rheum Dis.* 1995 May; 54(5):386-8.
19. Mumcu G, Inanc N, Yavuz S, Direskeneli H. The role of infectious agents in the pathogenesis, clinical manifestations and treatment strategies in Behçet's Disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2007 Jul-Aug; 25(4 Suppl 45):S27-33. Review.

20. Suzuki Y, Hoshi K, Matsuda T, Mizushima Y. Increased peripheral blood gamma delta+ T cells and natural killer cells in Behçet's Disease. *J Rheumatol.* 1992 Apr; 19(4):588-92.
21. Mendoza-Pinto C, García-Carrasco M, Jiménez-Hernández M, Jiménez Hernández C, Riebeling-Navarro C, Nava Zavala A, Vera Recabarren M, Espinosa G, Jara Quezada J, Cervera R. Etiopathogenesis of Behçet's disease. *Autoimmun Rev.* 2010 Feb; 9(4):241-5.
22. Ohno S, Ohguchi M, Hirose S, Matsuda H, Wakisaka A, Aizawa M. Close association of HLA-Bw51 with Behçet's Disease. *Arch Ophthalmol.* 1982; 100:1455-1458.
23. Koumantaki Y, Stavropoulos C, Spyropoulou M, Messini H, Papademetropoulos M, Giziaki E, Marcomichelakis N, Palimeris G, Kaklamanis P, Kaklamani E. HLA-B*5101 in Greek patients with Behçet's Disease. *Hum Immunol.* 1998; 59:250-255.
24. Kilmartin DJ, Finch A, Acheson RW. Primary association of HLA-B51 with Behçet's Disease in Ireland. *Br J Ophthalmol.* 1997; 81:649-653.
25. Mizushima Y. Behçet's Disease. *Curr Opin Rheumatol.* 1991; 3:32-35.
26. Mizuki N, Inoko H, Ohno S. Pathogenic gene responsible for the predisposition of Behçet's Disease. *Int Rev Immunol.* 1997; 14(1):33-48.
27. Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Goto K, Nakamura S, Bahram S, Ohno S, Inoko H. Association analysis between the MIC-A and HLA-B alleles in Japanese patients with Behçet's Disease. *Arthritis Rheum.* 1999 Sep; 42(9):1961-6.
28. Hiroata S, Oka H, Mizushima Y. Streptococcal-related antigens stimulate production of IL-6 and interferon- γ by T cells from patients with Behçet's Disease. *Cell Immunol.* 1992; 140:410-419.
29. Green WR, Bon Sool Koo. Behçet's Disease. A report of the ocular histopathology of one case. *Surv Ophthalmol.* 1967 Aug; 12(4):324-32.
30. Charteris DG, Champ C, Rosenthal AR, Lightman SL. Behçet's Disease: activated T lymphocytes in retinal perivasculitis. *Br J Ophthalmol.* 1992; 76:499-501.
31. Orem A, Vanizor B, Cimsit G, Kiran E, Deger O, Malkoc M. Decreased nitric oxide production in patients with Behçet's Disease. *Dermatology* 1999; 198(1):33-36.
32. Lee KH, Chung HS, Bang D, Lee S. Behçet's disease sera containing antiendothelial cell antibodies promote adhesion of T lymphocytes to cultured human dermal microvascular endothelial cells. *Yonsei Med J.* 1999 Apr; 40(2):152-8.
33. Yazici H, Yudarkul S, Hamurgudan V. Behçet's Disease. *Curr Opin Rheumatol.* 1999; 11:53-57.
34. Okada AA. Drug therapy in Behçet's disease. *Ocul Immunol Inflamm* 2000; 130:774-781.
35. Verity DH, Wallace GR, Vaughan RW, Stanford MR. Behçet's disease: from Hippocrates to the third millennium. *Br J Ophthalmol.* 2003; 87:1175-1183.
36. Zouboulis CC, Orfanos CE. Treatment of Adamantiades-Behçet disease with systemic interferon alfa. *Arch Dermatol.* 1998; 134:1010-1016.
37. Sloper CM, Powell RJ, Dua HS. Tacrolimus (FK506) in the treatment of posterior uveitis refractory to cyclosporine. *Ophthalmology.* 1999; 106:723-728.
38. Ishioka M, Ohno S, Nakamura S, Isobe K, Watanabe N, Ishigatsubo Y, Tanaka S. FK506 treatment of noninfectious uveitis. *Am J Ophthalmol.* 1994; 118:723-729.
39. Yasui K, Ohta K, Kobayashi M, Aizawa T, Komiyama A. Successful treatment of Behçet disease with pentoxifylline. *Ann Intern Med.* 1996; 124:891-893.

40. Deuter CM, Koetter I, Guenaydin I, Stuebiger N, Zierhut M. Interferon alfa-2a: a new treatment option for long lasting refractory cystoid macular edema in uveitis?: A pilot study. *Retina*. 2006; 26:786–791.
41. Hamuryudan V, Ozyazgan Y, Fresko Y, Mat C, Yurdakul S, Yazici H. Interferon alfa combined with azathioprine for the uveitis of Behçet's disease: an open study. *Isr Med Assoc J*. 2002; 4:928–930.
42. Pivetti-Pezzi P, Accorinti M, Pirraglia MP, Priori R, Valesini G. Interferon alpha for ocular Behçet's disease. *Acta Ophthalmol Scand*. 1997; 75:720–722.
43. Plskova J, Greiner K, Forrester JV. Interferon-alpha as an effective treatment for non infectious posterior uveitis and panuveitis. *Am J Ophthalmol*. 2007; 144:55–61.
44. Sfikakis PP, Kaklamanis PH, Elezoglou A, Katsilambros N, Theodossiadis PG, Papaefthimiou S et al. Infliximab for recurrent, sight-threatening ocular inflammation in Adamantiades-Behçet disease. *Ann Intern Med*. 2004; 140:404–406.
45. Tugal-Tutkun, Mudun A, Urgancioglu M, Kamali S, Kasapoglu E, Inanc M et al. Efficacy of infliximab in the treatment of uveitis that is resistant to treatment with the combination of azathioprine, cyclosporine and corticosteroids in Behçet's disease: an open-label trial. *Arthritis Rheum*. 2005; 52:2478–2484.
46. Niccoli L, Nannini C, Benucci M, Chindamo D, Cassara E, Salvarani C et al. Long-term efficacy of infliximab in refractory posterior uveitis of Behçet's disease: a 24-month follow-up study. *Rheumatology* . 2007; 46:1161–1164.
47. Sfikakis P, Theodossiadis PG, Katsiari CG, Kaklamanis P, Markomichelakis NN. Effect of infliximab on sight-threatening panuveitis in Behçet's disease. *Lancet* .2001; 358:295–296.
48. Lestre S, Trindade F, Martins A, Baptista J, Feio AB, Lopes MJ. Behçet's disease - Infliximab in the treatment of mucocutaneous manifestations. *Acta Reumatol Port*. 2009; 34:633-640.
49. Rutella S, Fiorino G, Vetrano S, Correale C, Spinelli A, Pagano N et al. Infliximab Therapy Inhibits Inflammation-Induced Angiogenesis in the Mucosa of Patients With Crohn's Disease. *Am J Gastroenterol*. 2011 Mar 1[Epub ahead of print].
50. Arijs I, De Hertogh G, Machiels K, Van Steen K, Lemaire K, Schraenen A, Van Lommel L et al. Mucosal Gene Expression of Cell Adhesion Molecules, Chemokines, and Chemokine Receptors in Patients with Inflammatory Bowel Disease Before and After Infliximab Treatment. *Am J Gastroenterol*. 2011 Feb 15 [Epub ahead of print].
51. Devine EB, Alfonso-Cristancho R, Sullivan SD. Effectiveness of biologic therapies for rheumatoid arthritis: an indirect comparisons approach. *Pharmacotherapy*. 2011; 31:39-51.
52. Accorinti M, Pirraglia MP, Paroli MP, Priori R, Conti F, Pivetti-Pezzi P. Infliximab treatment for ocular and extraocular manifestations of Behçet's disease. *Jpn J Ophthalmol*. 2007; 51:191-196.
53. Sfikakis PP, Markomichelakis N, Alpsyoy E, Assaad-Khalil S, Bodaghi B, Gul A, Ohno S, Pipitone N et al. Anti-TNF therapy in the management of Behçet's disease - Review and basis for recommendations. *Rheumatology* . 2007; 46:736-741.
54. Hochman D, Wolff B. Risk of serious infections and malignancies with anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis. *JAMA*. 2006; 296:2203-2204.
55. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA*. 2006; 295:2275-85.
56. Mikuls TR, Weaver AL. Lessons learned in the use of tumor necrosis factor alpha inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2003; 5:270–277.



57. Van der Heijde D, Kivitz A, Schiff MH, et al. Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a multicenter, randomized, doubleblind, placebo- controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:2136–2146.
58. Plosker GL, Lyseng-Williamson KA. Adalimumab: in Crohn's disease. *BioDrugs.* 2007;21:125–132;133-134.
59. Genovese MC, Mease PJ, Thomson GT et al. Safety and efficacy of adalimumab in treatment of patients with psoriatic arthritis who had failed disease modifying antirheumatic drug therapy. *J Rheumatol.* 2007; 34:1040–1050.
60. Bawazeer A, Raffa LH. Clinical experience with adalimumab in the treatment of ocular Behçet disease. *Ocul Immunol Inflamm.* 2010; 18:226-32.
61. Montero JA, Ruiz-Moreno JM, Rodriguez AE, Ferrer C, Sanchis E, Alio JL. Endogenous endophthalmitis by *Propionibacterium acnes* associated with leflunomide and adalimumab therapy. *Eur J Ophthalmol.* 2006; 16:343–345.
62. Chartash EK, Segurado OG. Long term efficacy and safety of adalimumab plus methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: ARMADA 4 year extended study. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65:753–759S.
63. Scheinfeld N. A comprehensive review and evaluation of the side effects of the tumor necrosis factor alpha blockers etanercept, infliximab and adalimumab. *J Dermatolog Treat.* 2004; 15:280-294.
64. Takase K, Ohno S, Ideguchi H, Uchio E, Takeno M, Ishigatsubo Y. Successful switching to adalimumab in an infliximab-allergic patient with severe Behçet disease-related uveitis. *Rheumatol Int.* 2011; 31:243-245.
65. Diaz-Llopis M, García-Delpech S, Salom D, Udaondo P, Hernandez-Garfella M, Bosch-Morell F et al. Adalimumab therapy for refractory uveitis: A pilot study. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2008; 24:351–361.
66. Biester S, Deuter C, Michels H, Haefner R, Kuemmerle-Deschner J, Doycheva D, Zierhut M. Adalimumab in the therapy of uveitis in childhood. *Br J Ophthalmol.* 2007; 91:319-24.
67. Mushtaq B, Saeed T, Situnayake RD et al. Adalimumab for sight-threatening uveitis in Behçet's disease. *Eye.* 2007; 21:824–825.
68. Buggage RR, Levy-Clarke G, Sen HN, Ursea R, Srivastava SK, Suhler EB, Altemare C et al. A double-masked, randomized study to investigate the safety and efficacy of daclizumab to treat the ocular complications related to Behçet's disease. *Ocul Immunol Inflamm.* 2007; 15:63-70.
69. Pato E, Muñoz-Fernández S, Francisco F, Abad MA, Maese J, Ortiz A, Carmona L. Uveitis Working Group from Spanish Society of Rheumatology. Systematic review on the effectiveness of immunosuppressants and biological therapies in the treatment of autoimmune posterior uveitis. *Semin Arthritis Rheum.* 2011; 40:314-323.
70. Hatemi G, Silman A, Bang D, Bodaghi B, Chamberlain AM, Gul A, Houman MH, Kötter I, Olivieri I, Salvarani C, Sfikakis PP, Siva A, Stanford MR, Stübiger N, Yurdakul S, Yazici H. EULAR Expert Committee EULAR recommendations for the management of Behçet disease. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67:1656-62.
71. Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, et al. Association of the toll-like receptor 4 gene polymorphisms with Behçet's disease. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67:725–727.
72. Nara K, Kurokawa MS, Chiba S et al. Involvement of innate immunity in the pathogenesis of intestinal Behçet's disease. *Clin Exp Immunol.* 2008; 152:245–251.
73. Pay S, Simsek I, Erdem H, Dinc A. Immunopathogenesis of Behçet's disease with special emphasize on the possible role of antigen presenting cells. *Rheumatol Int.* 2007; 27:417–424.
74. De Smet MD, Dayan M. Prospective determination of T-cell responses to S-antigen in Behçet's disease

- patients and controls. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41:3480–3484.
75. Chi W, Zhu X, Yang P, Liu X, Lin X, Zhou H, Huang X, Kijlstra A. Upregulated IL-23 and IL-17 in Behçet patients with active uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Jul; 49(7):3058-64.
76. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology.* 2010 Mar; 129(3):311-21.
77. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.* 2007 Sep;8(9):950-7.
78. Sahin S, Akoğlu T, Direskeneli H, Sen LS, Lawrence R. Neutrophil adhesion to endothelial cells and factors affecting adhesion in patients with Behçet's disease. *Ann Rheum Dis.* 1996 Feb;55(2):128-33.
79. Kobayashi M, Ito M, Nakagawa A, Matsushita M, Nishikimi N, Sakurai T, Nimura Y. Neutrophil and endothelial cell activation in the vasa vasorum in vasculo-Behçet disease. *Histopathology.* 2000 Apr;36(4):362-71
80. Hasan A, Fortune F, Wilson A, Warr K, Shinnick T, Mizushima Y *et al.* Role of $\gamma\delta$ T cells in pathogenesis and diagnosis of Behçet's disease. *Lancet*, 1996;347:789-94.
81. Direskeneli H, Eksioglu-Demiralp E, Kibaroglu A, Yavuz S, Ergun T, Akoglu T. Oligoclonal T cell expansions in patients with Behçet's disease. *Clin Exp Immunol*, 1999;117:166-70.
82. Eksioglu-Demiralp E, Dreskeneli H, Ergun T, Fresko I, Akoglu T. Increased CD4⁺ CD16⁺ and CD4⁺ CD56⁺ T cell subsets in Behçet's disease. *Rheumatol Int*, 1999;19:23-6.
83. Frassanito MA, Dammacco R, Cafforio P, Dammacco F. Th1 polarization of the immune response in Behçet's disease: A putative pathogenetic role of interleukin-12. *Arthritis Rheum*, 1999;2:167-74.
84. Guenane H, Hartani D, Chachoua L, Lahlou-Boukoffa OS, Mazari F, Touil-Boukoffa C. [Production of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in Behçet's uveitis and idiopathic uveitis]. *J Fr Ophtalmol.* 2006 Feb;29(2):146-52. French.
85. Kim J, Park JA, Lee EY, Lee YJ, Song YW, Lee EB. Imbalance of Th17 to Th1 cells in Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2010 Jul-Aug;28(4 Suppl 60):S16-9.
86. Curnow SJ, Pryce K, Modi N, Knight B, Graham EM, Stewart JE, Fortune F, Stanford MR, Murray PI, Wallace GR. Serum cytokine profiles in Behçet's disease: is there a role for IL-15 in pathogenesis? *Immunol Lett.* 2008 Nov 16;121(1):7-12
87. de Vos AF, Klaren VN, Kijlstra A. Expression of multiple cytokines and IL-1RA in the uvea and retina during endotoxin-induced uveitis in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 3873–3883.
88. Evans CA, Jellis J, Hughes SP, Remick DG, Friedland JS. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-8 secretion and the acute-phase response in patients with bacterial and tuberculous osteomyelitis. *J Infect Dis* 1998; 177: 1582–1587.
89. Akdeniz N, Esrefoglu M, Keleş MS, Karakuzu A, Atasoy M. Serum interleukin-2, interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide levels in patients with Behçet's disease. *Ann Acad Med Singapore.* 2004 Sep;33(5):596-9.
90. Sugi-Ikain, Nakazawa M, Nakamura S, Ohno S, Minami M. Increased frequencies of interleukin-2 and interferon-gamma producing T cells in patients with active Behçet's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 1998;39:996-1004.
91. Hamzaoui K, Hamzaoui A, Guemira F, Bessioud M, Hamza M, Ayed K. Cytokine profile in Behçet's disease patients. Relationship with disease activity. *Scand JRheumatol.* 2002;31(4):205-10.

92.Santos Lacomba M, Marcos Martín C, Gallardo Galera JM, Gómez Vidal MA, Collantes Estévez E, Ramírez Chamond R, Omar MM: Aqueous Humor and Serum Tumor Necrosis Factor- α in Clinical Uveitis. *Ophthalmic Res* 2001;33:251-255

93.De Vos et al., 1995 A.F. de Vos, M.A. van Haren, C. Verhagen, R. Hoekzema and A. Kijlstra, Tumour necrosis factor-induced uveitis in the Lewis rat is associated with intraocular interleukin 6 production, *Exp. Eye. Res.* 60 (1995), pp. 199–207.

94. Kasner et al., 1993 L. Kasner, C.C. Chan, S.M. Whitcup and I. Gery, The paradoxical effect of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in endotoxin-induced uveitis, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34 (1993), pp. 2911–2917

95. Alpsoy E, Donmez L, Onder M, Gunasti S, Usta A, Karıncaoglu Y, Kandi B, Buyukkara S, Keseroglu O, Uzun S, Tursen U, Seyhan M, Akman A. Clinical features and natural course of Behçet's disease in 661 cases: a multicentre study. *Br J Dermatol.* 2007 Nov;157(5):901-6.