

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО НЕВРОЛОГИЯ**

**РЪКОВОДИТЕЛ КАТЕДРА:
ЧЛ. КОР. ПРОФ. Д-Р Л. ТРАЙКОВ, Д.М.Н.**

Д-Р СОНЯ ИВАНОВА ХРИСТОВА – ЧАКМАКОВА

**СВЪРЗВАЩИ И НЕУТРАЛИЗИРАЩИ АНТИТЕЛА СРЕЩУ
ИНТЕРФЕРОН-БЕТА ПРИ ЛЕЧЕНИЕ НА МНОЖЕСТВЕНА
СКЛЕРОЗА**

АВТОРЕФЕРАТ

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ „НЕВРОЛОГИЯ“

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:
АКАД. ПРОФ. Д-Р ИВАН МИЛАНОВ, Д.М.Н.**

**СОФИЯ
2016**

СЪДЪРЖАНИЕ

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ.....	5
I. ВЪВЕДЕНИЕ	7
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	9
III. КЛИНИЧЕН КОНТИНГЕНТ	10
IV. ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ.....	13
1. Клинични методи.....	13
2. Имунологични методи.....	13
3. Статистически методи за обработка на резултатите	13
3.1. Дескриптивна статистика.....	13
3.2. Методи за проверка на хипотези	13
V. РЕЗУЛТАТИ	16
1. Изследвания за свързващи антитела срещу интерферон-бета.....	22
2. Изследвания за неутрализиращите антитела срещу интерферон-бета.....	31
3. Изследване на титъра на неутрализиращи антитела срещу интерферон-бета.....	44
4. Изследвания за антилекарствени антитела срещу интерферон-бета в юношеска възраст	46
VI. ОБСЪЖДАНЕ	48
1. VAb и NAb серопозитивност	48

2. Биологични характеристики, влияещи върху антицялообразуването срещу интерферон-бета	51
3. Инхибиране на ендогенния интерферон от антилекарствени антитела	51
4. Безопасност при поява на антилекарствени антитела	52
5. Влияние на тютюнопушенето върху антицялообразуването срещу интерферон-бета	52
6. Титър на неутрализиращи антитела срещу интерферон-бета.....	53
7. Антилекарствени антитела срещу интерферон бета в юношеска възраст	54
8. Алгоритъм за приложение в практиката	55
VII. ИЗВОДИ.....	57
VIII. ПРИНОСИ	59
1. Приноси с оригинален характер	59
2. Приноси с потвърдителен характер:	59
3. Приноси с приложен характер:.....	59
НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	60
SUMMARY.....	61

СПИСЪК С ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ARR –	Annualized relapse rate – годишна честота на пристъпите
BAbs –	Binding antibodies – свързващи антитела
EDSS –	Expanded disability status score – разширена скала за оценка на инвалидността
ELISA –	Enzyme linked immunosorbent assay – имуноензимен анализ
Gd –	Gadolinium – гадолиний
HLA –	Human leukocyte antigen – човешки левкоцитен антиген
HRP –	Horseradish peroxidase – пероксидаза от хрян
IFN- β –	Interferon- β – интерферон-бета
IFNAR –	Interferon receptor – интерферонов рецептор
IVIG –	Intravenous immunoglobulin – интравенозен имуноглобулин
IL –	Interleukin – интерлевкин
ISGs –	Interferon stimulated Genes – интерферон-стимулирани гени
ISRE –	Interferon stimulated response element – елементи, резултат от стимулиране на интерферона
IU –	International units – международни единици
LAS –	Luciferase assay system – луцифераза генерирана биолуминесценция
LCPS –	Luminescent counts per second – луминесцентно изброяване за секунда
LU –	Laboratory unit – лабораторна единица
mRNA –	messenger ribonucleic acid – информационна РНК
MS –	Multiple sclerosis – множествена склероза (МС)
MSCRG –	Multiple Sclerosis Collaborative Research Group – Група за сътрудничество и проучвания в областта на множествената склероза
MRI –	Magnetic resonance imaging – магнитнорезонансно изобразяване (ЯМР)

- NAbs – Neutralizing antibodies – неутрализиращи антитела
- NABINMS –Neutralizing antibodies in multiple sclerosis – европейско проучване за изучаване на NAbs при МС
- NU – Neutralizing unit – неутрализираща единица
- OAS – Ologoadenylsynthetase – олигоаденилсинтетаза (антивирусен ензим)
- TRAIL – tumor necrosis factor – related apoptosis-induced ligand – тумор-некротизиращ фактор – свързан с апоптозата индуциран лиганд

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Множественната склероза (МС) е хронично заболяване, засягащо работоспособната популация, носещо индивидуален и социоекономически товар. То е хетерогенно по своята същност и се характеризира с имуномедирана деструкция на миелина в централната нервна система и ранно настъпваща невродегенерация с пристъпен или прогресивен ход на протичане.

Възникването на антитела срещу медикаменти е добре известен феномен при лечение с различни биологични продукти. Неутрализиращите антитела (NAb) се свързват с биологичния агент, като пречат на взаимодействието с неговия рецептор (или в случаите с ензими – с тяхното активно място), и по този начин биологичната му активност се инхибира или неутрализира. Свързващите антитела (VAb) не повлияват сигнификантно действието на молекулата и затова носят общото название „не-неутрализиращи антитела“. Факторите, допринасящи за имуногенността на биофармацевтичните продукти, са много и включват биохимичните характеристики на молекулата, клетките, използвани за биоинженеринг, замърсяванията по време на производството, формулата, начина на приложение, дозата, продължителността на лечението, както и индивидуалните характеристики на пациента.

Лечението с рекомбинантен интерферон-бета е първото одобрено имуномодулиращо лечение при МС и до момента е най-разпространеното в света. То съществува под две форми – IFN β -1a и IFN β -1b. Установено е, че персистирането на високи титри на NAb's влияе неблагоприятно върху терапевтичния ефект на IFN β (оценен клинично и радиологично), особено когато пациентите се проследяват по-продължително (над 2 години). Сред специалистите по множествена склероза все още е налице противоречие по отношение на значимостта на антиинтерфероновите антилекарствени антитела и справянето с тях. Възникването на NAb's е само една от няколко причини за неефективност на лечението с IFN β . Част от пациентите са конституционно нереагиращи на IFN β и лечението се проваля дори при липса на NAb's. Ето защо някои пациенти с високи титри на NAb's могат да не демонстрират динамика в състоянието, напр. поради „доброкачествения“ ход на болестта, докато при други, при липса на NAb's, се установява тежка активност на заболяването. Това наблюдение обаче не променя факта, че високият титър на NAb's премахва биологичната, съответно терапевтичната активност на IFN β .

Лечението на множествената склероза – заболяване със сложен морфологичен субстрат, не само с клиничен, но и със субклиничен ход на протичане – до момента е трудно и непредвидимо. С разкриването на повече факти за патогенезата на множествената склероза е регистрирано натрупване на данни за необратима невронална загуба, водеща до инвалидизация, и се установява, че с напредване на заболяването механизмите на възстановяване са по-непълноценни. Също така е постигната яснота, че лечението е по-ефективно, ако започне рано – във възпалителната фаза на болестта, когато съществуват повече интактни аксони. Така ранното лечение може да има и невропротективен ефект. Ранното имплементиране на прогностични терапевтични биомаркери може да подобри перспективата на пациента.

При наличие на все повече терапевтични възможности концепцията за „терапевтична целесъобразност“ става все по-актуална. Тя включва избора на правилния медикамент в правилното време за подходящия пациент. При болните на интерфероново лечение това е свързано и с идентифициране на онези от тях, които не отговарят на лечението (нонреспондери) поради изработване на антилекарствени антители. До момента в нашата страна не е провеждано изследване на антиинтерферонови антители и не е анализирана връзката им с провежданото лечение. Настоящото изследване ни дава основание да потърсим точното място на NAbs като прогностичен терапевтичен биомаркер.

Възможността за обособяване на различни пациентски субпопулации, включително разграничаване на имунофармакологичните нонреспондери, може да се окаже решаващо за успеха на усилията за разработване на индивидуален терапевтичен подход.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Настоящият дисертационен труд си поставя за цел да определи клиничното значение на неутрализиращите антитела и ролята им в избора на терапия.

За постигането на посочената цел са формулирани следните задачи:

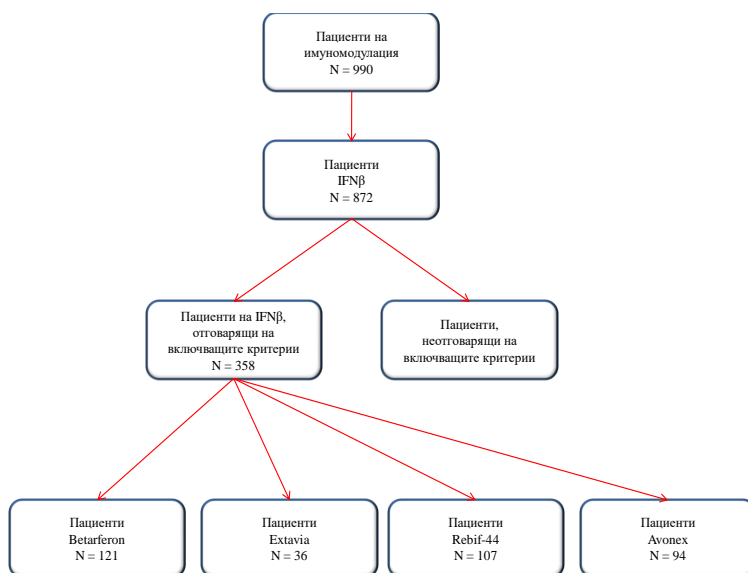
1. Изследване на терапевтичния ефект на IFN β при пристъпна МС чрез използване на клинични критерии за оценка:
 - *Годишна честота на пристъпите (Annualised relapse rate, ARR);*
 - *Установяване на трайно акумулиране на инвалидизация (Sustained Accumulation of Disability) след инициране на терапията с IFN β – дефинирано като увеличение на оценката по скалата EDSS ≥ 1.0 , което се задържа за период от 6 месеца;*
 - Процент на „свободни от пристъпи“;
 - Процент на „свободни от трайно акумулиране на инвалидизация“;
 - Процент на пациентите, които са „напълно клинично стабилни“;
 - Определяне на тежестта на пристъпа (първи и втори след започване на лечението);
 - Определяне на времето до първи и между първи и втори пристъп.
2. Изследване на имуногеността на интерфероновите медикаменти чрез двустъпков метод на имуноанализ.
3. Проучване на наличието на връзка между терапевтичния ефект от прилагания IFN β и VAb/NAb статуса.
4. Изследване на серопозитивността при пациенти в юношеска възраст.
5. Търсене на разлики в серопозитивните и серонегативните групи (търсене на биологична предиспозиция за образуване на неутрализиращи антитела).
6. Анализ на допускането, че NAb инхибират и ендогенния интерферон-бета.
7. Изследване на влиянието на тютюнопушенето върху образуването на антитела срещу IFN β .
8. Определяне на приложимостта в клиничната практика на VAb и NAb в алгоритъм при мониториране на лечението с интерферон-бета.

III. КЛИНИЧЕН КОНТИНГЕНТ

Настоящите изследвания са извършени в УМБАЛНП „Св. Наум“:

1. Установяване на клиничния ефект на интерферон-бета при пациенти, лекувани в условията на реална клинична практика в хетерогенни по отношение на продължителността на лечението подгрупи.
2. Срезово проучване на серопозитивността при пациенти, провеждащи лечение с интерферон-бета с различна продължителност, в две възрастови кохорти – зряла и юношеска – в отворен, нерандомизиран дизайн.
3. Сравнителен анализ на демографски и клинични характеристики между серопозитивните и серонегативните групи.

Фигура 1. Разпределение на пациентите по групи (дизайн на проучването)



Включващи критерии:

1. Пациенти с клинично сигурна множествена склероза според ревизираните критерии на McDonald 2010, с пристъпен ход на заболяването и провеждащи лечение с различни медикаменти, съдържащи IFN β : Betaferon© 250 μ g подкожно през ден, Extavia© 250 μ g подкожно през ден, Avonex© 30 μ g интрамускулно ежеседмично, Rebif© 44 μ g подкожно три пъти седмично.
2. Пациентите отговарят на критериите на НЗОК за започване и продължаване на лечението с интерферон-бета: най-малко два пристъпа на заболяването преди неговото започване и липса на повече от един пристъп за една година на фона на лечението.
3. Продължителност на лечението с интерферон-бета най-малко 18 месеца.
4. Наличие на информирано съгласие на пациента за имунологично изследване и анализ на резултатите. Антилекарствени антитела са изследвани в заслепен дизайн спрямо клиничното състояние на пациентите.

Изключващи критерии:

1. Прилагана кортикостероидна терапия в рамките на 4 седмици преди получаване на кръвната проба.
2. Провеждана в миналото терапия с друг, модифициращ хода на болестта медикамент (изключение: глатирамер ацетат – Сорахон©).
3. Прилагана имunosупресивна терапия.
4. Непридържане към лечението – спиране на лечението за повече от 14 последователни дни.
5. Провеждане на лечение на пристъп извън стандартната терапия с кортикостероиди (IVIG, плазмафереза).
6. Компрометирани серумни проби – липиден, хемолитичен, иктеричен серум.
7. Настоящото проучване е насочено към установяване на антилекарствени антитела и връзката на NAb статуса с клиничната ефикасност на интерферон-бета. Изследваните пациентите са системно лекувани в Центъра по множествена склероза при

УБАЛНИ „Св. Наум“ и са проследявани на всеки 6 месеца, както и при клинични изяви на пристъп. Чрез срезово проучване е установен статусът им по отношение на антиинтерфероновите антитела (2012 – 2015 г.) и е съпоставен ретроспективно с клиничната характеристика на заболяването. Изследвани са 358 пациенти с RRMS, провеждащи лечение с IFN-1a или IFN β -1b по НЗОК (отделно – пациенти в юношеска възраст, лекуващи се с дарени количества IFN β).

ЗАБЕЛЕЖКА (сътрудничество и източник на финансиране):

1. Имунологичните изследвания са извършени със съдействието на д-р Валентина Димитрова, болница „Св. Наум“, и Ралица Скробанска, Биологичен факултет, София.
2. Източник на финансиране: Фирма „РМА“ извърши тестването с финансиране от „Тева България“; Bayer Schering Pharma предостави безвъзмездно INF β -1b (Betaferon) на лекуваните пациенти под 16 години.

IV. ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ

1. Клинични методи

- Анамнеза, соматичен статус, пълен неврологичен статус.
- Функционална оценка на пациентите с използване на следните скали: Functional System Score (FSS), Expanded disability status scale (EDSS).

2. Имунологични методи

- ELISA (индиректен ензим-свързан имуносорбентен анализ) за определяне на BAb статуса на пациентите.
- BAb(+) серумите са изследвани с луцифераза-генерирана биолуминисценция чрез полуколичествен анализ за определяне на NAb статуса на пациентите.
- Малка група пациенти са изследвани за определяне на титър на NAb.

3. Статистически методи за обработка на резултатите

3.1. Дескриптивна статистика

- Вариационен анализ (количествени променливи) – средна стойност (Mean), стандартно отклонение (SD), стандартна грешка (SE), медиана (Median), минимум (Min), максимум (Max);
- Честотен анализ (номинални и рангови променливи): *абсолютни честоти* – броят на единиците в отделно взета група; *относителни честоти* – броят на единиците в отделно взета група, съотнесен към общия брой единици в съвкупността;
- Графични изображения: диаграми от типа „кутия“ (box-plot) и стълбовидни диаграми.

3.2. Методи за проверка на хипотези

- Тест на Колмогоров-Смирнов (Kolmogorov-Smirnov) и тест на Шапиро-Уилк (Shapiro-Wilk) – проверка за нормалност на разпределението на количествена променлива;
- Хи-квадрат тест (Chi-square test) или точен тест на Фишер (Fisher's exact test) – търсене на връзка между две категорийни променливи;
- Т-тест при две независими извадки (Independent Samples T-Test) – проверка за равенство на сравнимите средни стойности на две независими групи при нормално разпределение;

- Знаково-рангов тест на Уилкоксон (Wilcoxon Signed Ranks Test) – сравняване на две свързани групи, когато разпределението не е нормално;
- Тест на Ман-Уитни (Mann-Witney) – сравняване на две независими групи, когато разпределението не е нормално;
- Рангов корелационен коефициент на Спирмън – изследване на линейна корелационна зависимост;
- ROC анализ – за оценка на сензитивността и специфичността на диагностичните методи.

Използваното критично ниво на значимост е $\alpha = 0,05$. Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато стойността на P (P-value) е по-малка от α . За обработка на данните от проучването е използван специализираният статистически пакет SPSS, версия 13.0.

Описание на клиничните показатели:

Като „пристъп“ е дефинирана появата на нови или влошаване на налични неврологични симптоми, дължащи се на множествена склероза, продължаващи най-малко 48 часа, при липса на температура, след най-малко 30 дни клинична стабилизация с обективна промяна в неврологичния статус, кореспондираща на симптомите (промяна с една точка в две функционални системи от скалата EDSS или две точки в една функционална система, или покачване на оценката по скалата EDSS).

Годишна честота на пристъпите (ARR): броят на пристъпите на пациентите в групата за период от една година.

За **трайно акумулиране на инвалидизация** е прието покачването на оценката по скалата EDSS спрямо изходните стойности (оценката при започване на лечението) ≥ 1.0 , потвърдено след 6-месечен период.

Като „свободни от пристъпи“ са дефинирани онези случаи, при които за периода на наблюдение не са регистрирани пристъпи.

Като „свободни от трайно акумулиране на инвалидизация“ са дефинирани онези случаи, при които за периода на наблюдение не е регистрирано трайно акумулиране на инвалидизация чрез скалата EDSS.

Като „напълно клинично стабилни“ са дефинирани онези случаи, при които липсват и двата клинични показателя – пристъпи и трайно акумулиране на инвалидизация.

Идентични въпросници са използвани за установяване на придържане към лечението, фамилна анамнеза, тютюнопушене, съпътстващи заболявания и състояния.

Класификация според пациентския серологичен статус: Имуносерологичният нализ ELISA раздели пациентите на VAb(+) и VAb(-). VAb позитивните пациенти допълнително са субкласифицирани като NAb(+) или NAb(-). Веднъж класифицирани като положителни или отрицателни, пациентите запазват своя статус по време на изследването според дефиницията „веднъж позитивен – всякога позитивен“ (any time positive – always positive) или „непотвърдено позитивен във времето“, като за краткост ги определяме и назоваваме „позитивни“.

Описание на имунологичното изследване:

Използван е двустъпков метод на имуноанализ. Всички серуми са изследвани за наличие на свързващи антитела. За целта е използван anti-IFN-beta VAb Kit (Buhlmann) и е приложен методът ELISA. Положителните на ELISA серуми се подлагат на анализ за NAb. За изследване на наличие на неутрализиращи антитела е използван iLite™anti-Human IFN-beta-1a – IVD Kit (Biomonitor) и е приложен методът луцифераза-генерирана биолуминисценция, а реакцията е отчетена с многофункционален четец на микроплаки Beckman Coulter DTX 880.

Кръвните проби са получени минимум 12 часа след последното инжектиране с интерферонов медикамент, тъй като се счита, че биологичната активност на интерфероновата доза е достигнала своя пик.

Приетата мерна единица за VAb е VTU (Buhlmann Titer Units), като всички с VTU \geq 50 VTU са приети за позитивни.

Приетата мерна единица за NAb при приложение на метода луцифераза генерирана биолуминисценция е LU/rem/ml; всички $>$ 1 са приети за негативни, а тези $<$ 1 – за позитивни.

V. РЕЗУЛТАТИ

Осъществени са изследвания на 358 пациенти с пристъпна множествена склероза, включени на лечение с имуномодулираща терапия съгласно изискванията на НЗОК за лечение с интерферон-бета.

Изследвани са две кохорти пациенти – над и под 18 години. Средната възраст на изследвания възрастен контингент е $38,1 \pm 9,5$. В извадката могат да се оформят три гнезда: под 30 години – 23%; от 31 до 40 години – 38%; над 41 години – 39%. Изследвани са 11 пациенти в юношеска възраст от 12 до 17 години.

Разпределението по пол е както следва: 147 мъже (41,1%) и 211 жени (58,9%).

Таблица 1. Възрастово-полови характеристики на изследваните възрастни

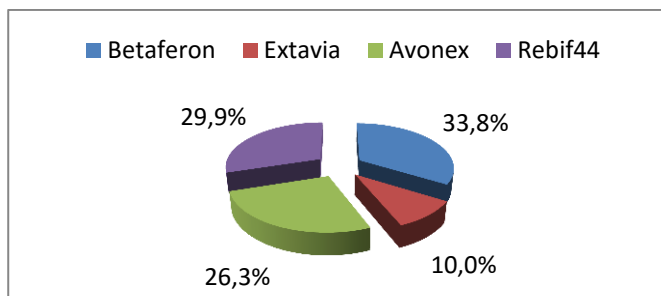
Пол	N	%	Възраст при изследването (години)			
			Mean	SD	Min	Max
Мъже	147	41,1	37,4	9,8	18,0	61,0
Жени	211	58,9	38,6	9,3	17,0	59,0
Общо	358	100,0	38,1	9,5	17,0	61,0

Болните, лекувани с лекарствен продукт от **Interferon beta-1b** (*Betaferon*, *Extavia*), съставляват 44,1%, а болните, лекувани с **Interferon beta 1a** (*Avonex*, *Rebif*) – 55,9%, т.е. разпределението по двете основни групи лекарствени продукти е приблизително еднакво.

На базата на представеното разпределение по вид на прилагания медикамент се оформят 4 гнезда:

- Болни на лечение с *Betaferon* – 121 (33,8%)
- Болни на лечение с *Extavia* – 36 (10,0%)
- Болни на лечение с *Avonex* – 94 (26,3%)
- Болни на лечение с *Rebif* – 107(29,9%).

Фигура 2. Разпределение по вид прилаган медикамент



По показателя „продължителност на лечението“ се оформят четири под-групи. Най-голям е броят на болните, при които лечението е с давност 18 месеца до 2 години.

Фигура 3. Разпределение на изследваните възрастни болни според продължителността на лечението

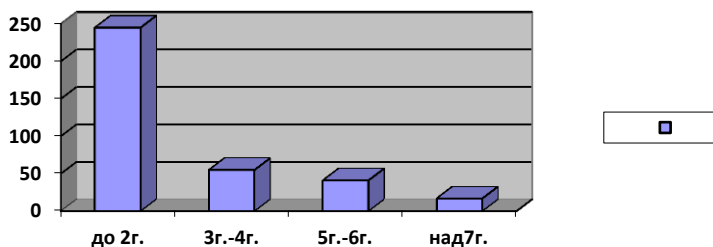


Таблица 2. Субгрупиране по продължителност на лечението

Продължителност на лечението	Брой	%
≤ 24	245	68,4
25 – 48	55	15,4
49 – 72	41	11,5
> 72	17	4,7
Общо	358	100,0

С настоящото изследване са проучени някои аспекти, свързани с антилекарствени антитела в българската популация на пациенти с множествена склероза, провеждащи лечение с интерферон-бета.

Групите са сравнени последователно според серопозитивността: положителни и отрицателни по отношение на свързващи антитела и положителни и отрицателни по отношение на неутрализиращи антитела. Като контролна група е приета групата на серонегативните пациенти. Проведеното срезово проучване трябва да отговори на въпросите какви са разликите при сравнение между субгрупите NAb(-) и NAb(+). Недостатъци на това проучване са:

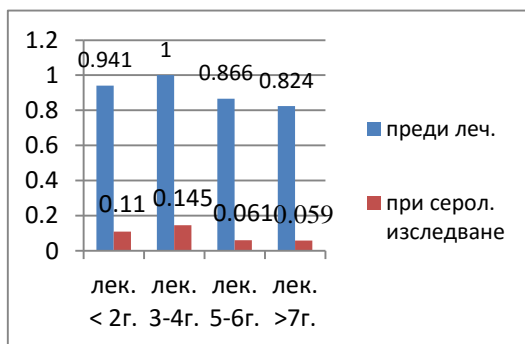
1. Възможността за сероконверсия – пациентът от позитивен може да премине в негативен статус и обратното.
2. При включване в изследването пациентите не могат да бъдат рандомизирани на серопозитивни или негативни (броят на болните не може да се уеднакви). Това означава, че предполагаеми „преморбидни“ различия, независещи от терапията, могат да бъдат причина за серологичния резултат, например имуногенни различия между индивидите още на ниво изходни характеристики. Тези „слаби места“ създават редица неудобства при интерпретацията на резултатите. Възможно е пациентите, които образуват NAb, по своята същност да не са еднакви с онези, които никога не изработват NAb или претърпяват сероконверсия.

Изследването на терапевтичния ефект на интерферон-бета при пристъпна форма на множествена склероза е осъществено с използването на двата основни клинични критерия – годишна честота на пристъпите и оценка на инвалидизацията.

Таблица 3. Годишна честота на пристъпите (ARR) в групите с различна продължителност на лечението

Период на лечение	Период на наблюдение	Общ брой пациенти	Общ брой пристъпи	ARR
Лекуваните до 2 г.	Преди лечението	245	461	0,941
	След лечението	245	54	0,110
Лекуваните 3 – 4 г.	Преди лечението	55	108	1,000
	След лечението	55	16	0,145
Лекуваните 5 – 6 г.	Преди лечението	41	71	0,866
	След лечението	41	5	0,061
Лекуваните над 7 г.	Преди лечението	17	28	0,824
	След лечението	17	2	0,059

Фигура 4. Графично изобразяване на ARR в различните групи по продължителност на лечението



На Фигура 4 са сравнени ARR преди лечението (въз основа на данните от последните две години) и към момента на срезовото серологично изследване (по групи с различна продължителност на лечението). Групата от възрастни пациенти е хомогенна по отношение на честотата на пристъпите при започване на лечението поради прилагането на критерии на НЗОК за включване на имуномодулация от първи ред. Налице е значима редукция на честотата на пристъпите във всяка група. В нашето изследване са включени само пациенти с благоприятен ефект от прилаганото лечение – т.нар. „НЗОК респондери“. Отпадналите от лечението (с по-агресивен ход или при липса на ефект) не участват в анализа, поради което резултатът не е изненадващ. Редукцията на честотата на пристъпите е не по-малка от 85% във всяка една от групите с различна продължителност на лечението. Степента на намаляване на честотата на пристъпите надхвърля данните от резултатите на редица проучвания. Този феномен може да се обясни с разликата във включващите критерии, клиничната характеристика на различната популация пациенти и използваната методология за оценка. Тенденцията при всички проучвания с множествена склероза в последните години е свързана с регистриране на все по-малък брой пристъпи преди и по време на лечението спрямо пилотните проучвания преди 20 години, при въвеждането на интерфероновата терапия. В началото на ерата на имуномодулиращото лечение в клинични проучвания са попадали пациенти с по-агресивен ход. Прогресът на невроизобразяващите методи и съвременните критерии за диагностика (McDonald 2010) довеждат до ранно уточняване на диагнозата (вече голяма част от пациентите с дебют на оплакванията могат да получат сигурна диагноза). Започването на лечението в ранен стадий на болестта има по-значим ефект и води до по-добри резултати, включително и по отношение на клиничните екзацербации. Ето защо в анализа, освен оценка на редукцията на годишната честота на пристъпите и установяване на трайно акумулиране на инвалидизация, е включено и времето до поява на първи пристъп, времето между първи и втори пристъп, както и тежестта на първи и втори пристъп.

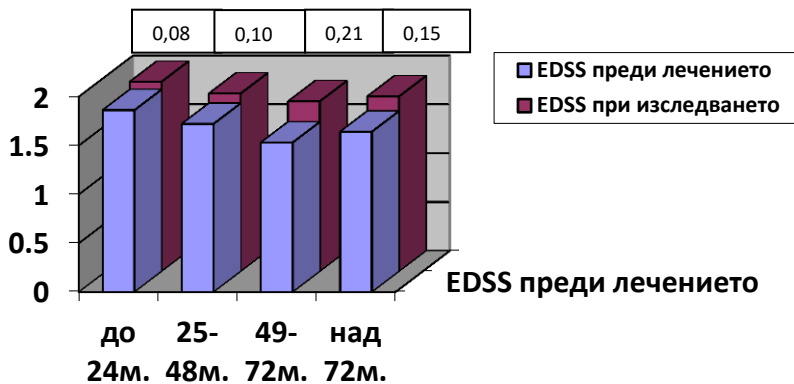
Незначимата промяна на инвалидизацията, изразена чрез оценка по скалата EDSS, за четирите групи преди лечението и към момента на изследването е обяснима отново с факта, че в това наблюдение са включени само т.нар. „НЗОК респондери“. Теоретично с напредване на времето (и въпреки лечението) се променя и фенотипната характеристика на заболяването – възпалителните процеси отстъпват на дегенеративните и е налице тенденция на влошаване на оценката по скалата EDSS. При настоящата група не са включвани пациенти с прогресивен ход и насложени пристъпи. Въпреки това е изключително трудно да се маркира моментът, в който пациентът преминава от пристъпна към прогресивна фаза на

болестта. При пациентите с продължителност на лечението повече от шест години се установява изненадващо малка прогресия в инвалидизацията, което може да означава, че тази субгрупа пациенти има оптимален отговор към лечението с интерферон-бета (напълно отговаряща на лечението с интерферон-бета) или това са пациенти с „доброкачествен ход“.

Таблица 4. Сравнение на инвалидизацията, оценена с EDSS преди лечението и при имуносерологичното изследване за антитела в различните групи според продължителността на лечението

Продължителност на лечението (месеци)	Показател	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
≤ 24	EDSS преди лечението	105	1,86	0,50	2,00	1,00	3,50	0,001
	EDSS при изследването на антитела	106	1,94	0,63	2,00	0,00	4,00	
25 – 48	EDSS преди лечението	29	1,72	0,64	2,00	0,00	3,00	0,009
	EDSS при изследването на антитела	31	1,82	0,87	2,00	0,00	3,00	
49 – 72	EDSS преди лечението	19	1,53	0,31	1,50	1,00	2,00	0,039
	EDSS при изследването на антитела	19	1,74	0,59	1,50	1,00	3,50	
> 72	EDSS преди лечението	7	1,64	0,38	1,50	1,00	2,00	n/a
	EDSS при изследването на антитела	7	1,79	0,49	2,00	1,00	2,50	

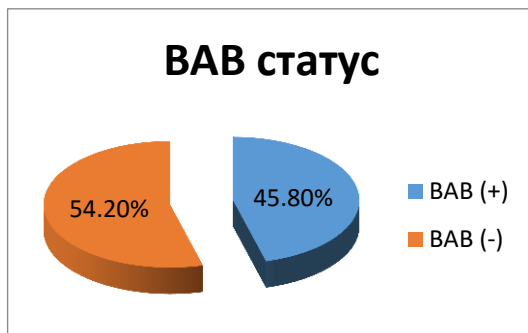
Фигура 5. Динамика на EDSS във всяка група преди лечението и при имуносерологичното изследване



1. Изследвания за свързващи антитела срещу интерферон-бета

В нашето изследване ВАb позитивните пациенти са 45,8%, т.е. под 50% от всички изследвани лица.

Фигура 6. Резултати от изследване на ВАb – общо в групата

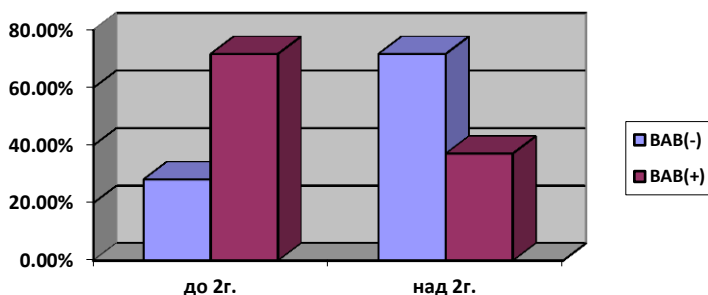


Като се има предвид придържането към критериите на НЗОК за лечение на пациентите с множествена склероза в България (прекратяване на лечението при поява на 2 пристъпа за една година), възможно е прекратилите лечение да са именно тези, които са позитивни на антитела. По тази причина е направено сравнение на пациентите, лекувани до и над 2 години:

Лекуваните до 2 години: негативни – 28,2%; позитивни – 71,8%;

Лекуваните над 2 години: негативни – 62,8%; позитивни – 37,2% (Фиг. 7). Тези резултати се дължат или на сероконверсия, или подкрепят гореизказаното съмнение, че е възможно VAb позитивността да предсказва и води до фармакологична резистентност.

Фигура 7. Процентно съотношение на пациентите VAb(+/-) с продължителност на лечението до и над 2 г.



При сравнение на субгрупите VAb (+/-) по възраст, продължителност на болестта и времева проява на първите два пристъпа след започване на лечението е установено, че няма статистически значима разлика в описаните параметри. При групата VAb(+) се установява по-кратко време между първи и втори пристъп, без статистическа достоверност. Не се установява статистически значима разлика в тежестта на първи пристъп между двете групи, но съществува такава по отношение на тежестта на втори пристъп: доста по-чести са пристъпите, изискващи приложение на кортикостероиди – „инвалидизиращи“ и „неинвалидизиращи“ в групата VAb(+).

Налице е достоверна разлика в системните нежелани реакции (леки и тежки) – те се наблюдават много по-рядко в групата VAb(+). При 12,9% от пациентите в групата VAb(+) липсват каквито и да било реакции спрямо 0,5% при VAb(-). Еднакъв е броят на тези, при които общите нежела-

ни реакции след период на пълно отшумяване след време се появяват отново.

При 18,1% от VAb негативните пациенти никога не са се проявявали локални нежелани реакции, докато в групата на VAb позитивните те са 11,7%. Локалните нежелани реакции са по-чести в групата VAb(-) – 46,1%, спрямо 34,4% в групата VAb(+).

Липсват разлики във фамилната обремененост в различните серологични групи. Не се установява разлика и по отношение на автоимунната коморбидност в двете групи.

При сравнение по фактор „Тютюнопушене“ се демонстрира разлика както при настоящи, така и при бивши пушачи: настоящите и бившите (скорошни) пушачи се срещат около три пъти по-често в VAb позитивната пациентска подгрупа. При преустановилите тютюнопушенето преди повече от 2 години разликата намалява. Непушачите са 87,6% при VAb(-) и 68,5% при VAb(+).

Таблица 5. Сравнение на различните VAb(+/-) групи по отношение на динамиката на оценката по скалата EDSS в периода от началото на лечението до имуносерологичното изследване

Увеличение по скалата EDSS	VAb		Общо n(%)	p
	Негативни n(%)	Позитивни n(%)		
0,0	179 (94,2)	131 (81,9)	310 (88,6)	0,002
0,5	7 (3,7)	16 (10)	23 (6,6)	
1,0	4 (2,1)	11 (6,9)	15 (4,3)	
1,5	0 (0)	2 (1,3)	2 (0,6)	
Общо	190 (100)	160 (100)	350 (100)	

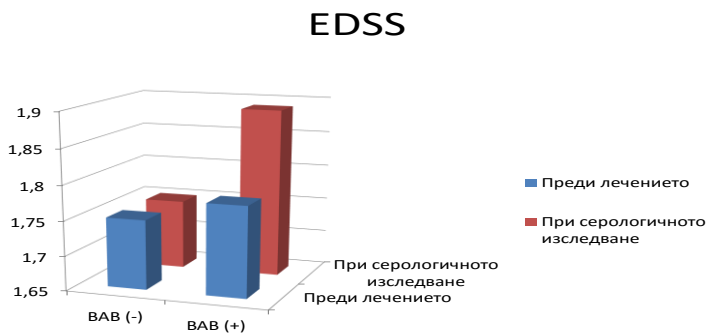
Въпреки факта, че при неголям брой пациенти (11,5%) се установява влошаване на инвалидизацията, оценена по скалата EDSS, налице е статистически достоверна разлика по отношение на двете серологични групи. Трайно акумулиране на инвалидизация с над 1.0 точки по скалата EDSS се установява при 2,1% от пациентите в групата VAb(-) спрямо 8,2% от тези в групата VAb(+). Липса на динамика в инвалидизацията се констатира при 94,2% от пациентите в групата VAb(-) спрямо 81,9% от тези в групата VAb(+).

Таблица 6. Сравнение на различните BAb (+/-) групи по отношение на стойността на оценката по скалата EDSS преди лечението и по време на имуносерологичното изследване

Показател	BAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
EDSS преди лечението	Негативни	190	1,75	0,52	1,50	0,00	3,50	0,389
	Позитивни	160	1,78	0,52	2,00	0,00	3,50	
EDSS при изследването на антитела	Негативни	193	1,76	0,61	1,50	0,00	3,50	0,026
	Позитивни	163	1,89	0,67	2,00	0,00	4,00	

Общо, преди започване на лечението инвалидизацията, отразена по скалата EDSS, е еквивалентна в двете групи. При провеждане на изследването обаче е налице статистически достоверна разлика – по-висока е средната стойност на оценката по скалата EDSS при пациентите, изработващи свързващи антитела.

Фигура 8. Сравнение на оценката по скалата EDSS преди лечение и при имуносерологичното изследване – графично изобразяване



По идентичен начин са сравнени групите BAb (+/-) по отношение на ARR в началото на лечението, в момента на серологичното изследване за антилкарствени антитела.

Таблица 7. Сравнение на ARR в различните групи VAb (+/-) преди лечението и при имуносерологичното изследване за всяка група пациенти според продължителността на терапията

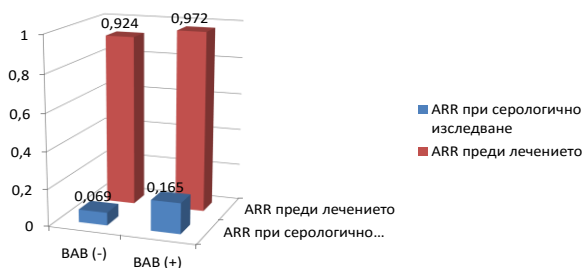
VAб	Период на лечение	Период на наблюдение	Общ брой пациенти	Общ брой пристъпи	ARR	
VAб(+)	До 2 г. след лечение	Преди лечението	106	206	0,972	
		След лечението	106	35	0,165	
	3-та и 4-та година след лечение	Преди лечението	31	62	1,000	
		След лечението	31	13	0,210	
	5-та и 6-та година след лечение	Преди лечението	19	34	0,895	
		След лечението	19	4	0,105	
	7-та и 8-ма година след лечение	Преди лечението	7	11	0,786	
		След лечението	7	1	0,071	
	VAб(-)	До 2 г. след лечение	Преди лечението	138	255	0,924
			След лечението	138	19	0,069
3-та и 4-та година след лечение		Преди лечението	24	46	0,958	
		След лечението	24	3	0,063	
5-а и 6-а година след лечение		Преди лечението	21	37	0,881	
		След лечението	21	1	0,024	
7-ма и 8-ма година след лечение		Преди лечението	10	17	0,850	
		След лечението	10	1	0,050	

Годишната честота на пристъпите е съотносима в групите VAb(+) и VAb(-) преди започване на лечението. Налице е редукция на годишната честота на пристъпите в различните групи и в двете серологични субгрупи. Макар и статистически недостоверна във всички подгрупи, налице е

по-изразена редукция при неизработващите свързващи антитела (Фиг. 9, 10, 11, 12). Установява се по-ниска годишна честота на пристъпите в групата, неизработваща VAb.

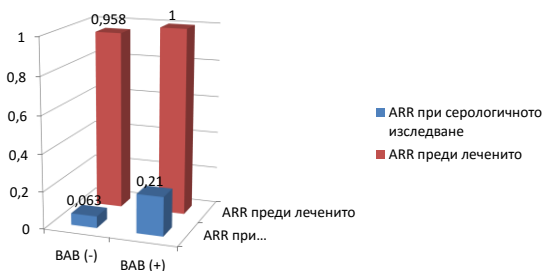
Фигура 9. Графично изобразяване на редукцията на ARR при групите VAb (+/-) при различна продължителност на лечението – лекувани до 2 г.

Пациенти, лекувани до 2г.

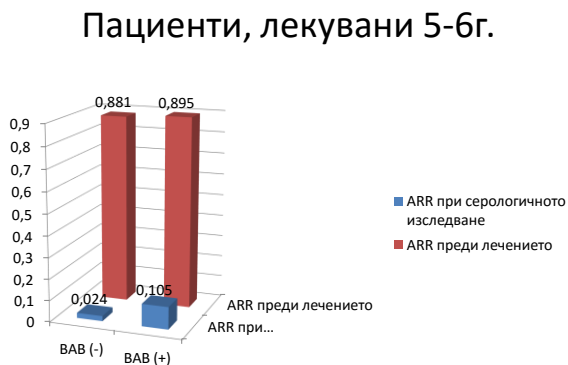


Фигура 10. Графично изобразяване на редукцията на ARR при групите VAb (+/-) при различна продължителност на лечението – лекувани 3 – 4 г.

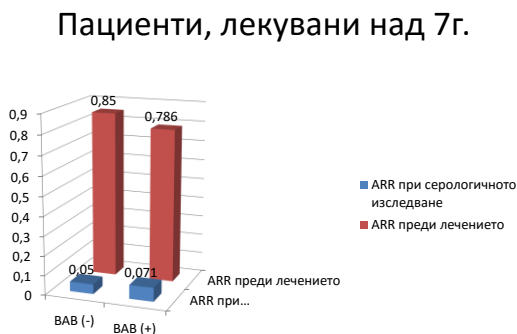
Пациенти, лекувани 3-4г.



Фигура 11. Графично изобразяване на редукцията на ARR при групите ВAb (+/-) при различна продължителност на лечението – лекувани 5– 6 г.



Фигура 12. Графично изобразяване на редукцията на ARR при групите ВAb (+/-) при различна продължителност на лечението – лекувани над 7 г.



Може да се спекулира, че най-вероятно разликата в честотата на пристъпите се дължи на „неутрализиращата активност“ на ВAb. Ако пациентите, изработващи свързващи антитела, се окажат в положение на биофар-

макологична неутрализация, във времето ще се изгуби протективният ефект на интерферона и ще се появи активност на болестта, от което следва, че пациентите могат да се окажат и „НЗОК нонреспондери“. Последното води до спиране на тяхното лечение. Факт е, че неутрализиращият ефект на антилекарствените антитела има отложен ефект. Колкото по-продължителен е периодът на антитяло медираната неутрализация на интерферона, толкова по-изявена може да стане липсата на протекция, дори да се прояви клинично с поява на пръстъпи.

РЕЗУЛТАТИ ОТ ИЗСЛЕДВАНЕ НА ВАБ ПО МЕДИКАМЕНТИ

При анализ на пациенти с VAb(+), лекувани с IFN β -1b (Betaferon, Extavia), се установява сходен висок процент на серопозитивност по отношение на не-неутрализиращи антитела, съответно 76,9% и 83,3%. При лекуваните с IFN β -1a за подкожно приложение е установена серопозитивност при 21,5%, а при лекуваните с IFN β -1a за интрамускулно приложение – 18,09%.

Фигура 13. Разпределение на VAb по медикаменти



Следвайки двустъпковия имуноанализ, всички VAb положителни серуми са подложени на анализ за NAb чрез луцифераза-генерирана биолуминисценция.

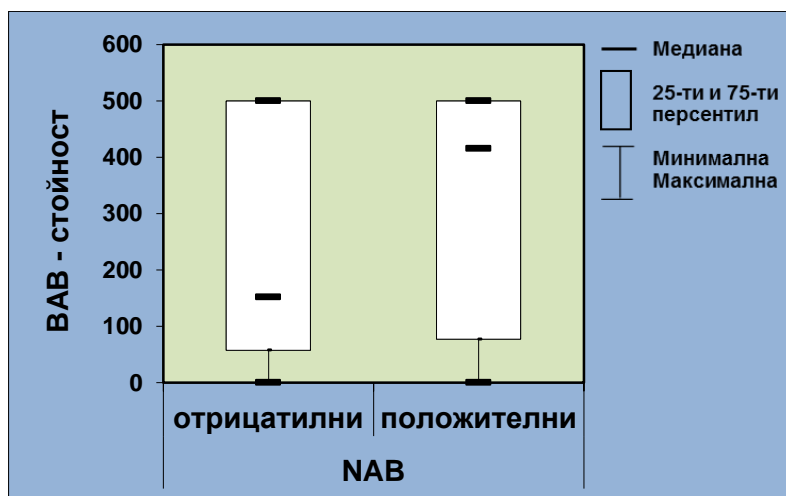
Възниква въпросът доколко позитивността за VAb може да предскаже образуването на NAb. Статистическият анализ на съставката на данните относно титъра на VAb и наличието на NAb дава отговор на този въпрос.

Таблица 8. Съпоставка на титър на VAb в групите според NAb статуса на пациентите

NAb	N	VAb стойност					p
		Mean	SD	Median	Min	Max	
Негативни	117	230,01	198,50	151,85	0,00	500,00	0,044
Позитивни	46	312,78	210,97	415,31	0,00	500,00	

Данните от нашето проучване показват, че при NAb позитивните пациенти се наблюдава сигнификантно по-висока средна стойност на VAb ($p = 0.044$).

Фигура 14. Графична съпоставка на титър на VAb в групите според NAb статуса



В допълнение, с оглед определяне на предиктивната стойност на VAb бе приложен ROC анализ.

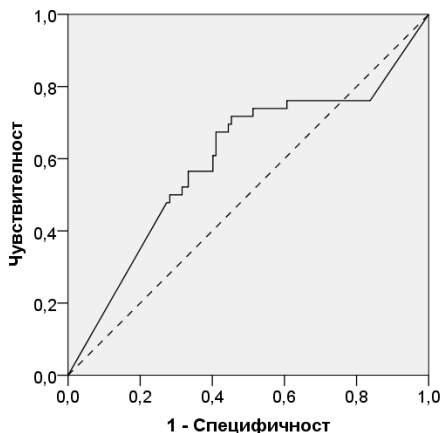
Таблица 9. ROC графичен анализ: съпоставяне на титъра на VAb с NAb позитивирането

AUC	SE	p	95% CI	
0,603	0,053	0,046	0,501	0,703

AUC – Area Under the Curve – площ под кривата;

VAb (cut-off, праг) – 250 при сензитивност 60,9% и специфичност 59,0%.

Фигура 15. ROC графична крива: съпоставяне на титъра на ВАб с NAb позитивизирането



От ROC анализа със 69% специфичност и 60,9% чувствителност може да се направи извода, че при стойности на ВАб над 250 ВТУ вероятността от позитивиране на NAb е около 60% (площта под ROC-кривата е 0.603). Всъщност всичко това прави наличието на NAb частично предвидимо. Стойности на ВАб над 250 ВТУ корелират със значимо повишен риск от неутрализация на биологичния ефект на интерферон-бета.

2. Изследвания за неутрализиращите антитела срещу интерферон-бета

С настоящото изследване е проверена евентуалната връзка между различни клинични параметри и образуването на неутрализиращи антители.

Таблица 10. Резултати от изследване на NAb: позитивиране в групата VAb и в цялата кохорта

		N	%	% от VAb+
NAb	Негативни	117	32,7	71,8
	Позитивни	46	12,8	28,2
	Общо	163	45,5	100,0
VAb		195	54,5	
Общо		358	100,0	

Позитивните на NAb пациенти са 28,2% от VAb(+) и 12,8% от всички изследвани болни, лекувани с интерферон-бета.

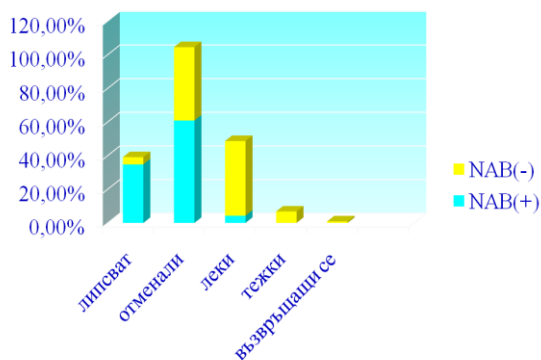
Възрастта при изследването, клиничният дебют и давността на заболяването не показват разлика в двете серологични групи. Установена е разлика по отношение на продължителността на лечението и времето до първи пристъп. Възможно е по-голямата честота на NAb при по-продължително лечение се дължи на възможната сероконверсия. Времето до първи пристъп е с разлика от 37% между пациентите с NAb(+) и пациентите с NAb(-) ($p=0,009$). Резултатът е неочакван (в серонегативната група времето до първи пристъп е по-кратко) в контекста на хипотезата за намалена терапевтична ефективност поради неутрализация на част от приложения интерферон-бета. Ако обаче се вземе предвид отложеният му терапевтичен ефект, то възникналите пристъпи в самото начало на лечението трябва да бъдат изключени от анализа за да не бъдат оценени погрешно.

Не се установява статистически значима разлика при сравнение на субгрупите NAb (+/-) по отношение на тежестта на първи пристъп, въпреки че в групата NAb(-) 22,6% от пристъпите са неквалифицирани, а 77,5% изискват кортикостероидно лечение; докато в групата NAb(+) само 4% от пристъпите са неквалифицирани, а за останалите 96%, макар и нетежки, е било необходимо КС лечение. По отношение на тежестта на втори пристъп, двете групи не се различават по отношение на „инвалидизиращите“ пристъпи, но по отношение на „неинвалидизиращите“ разликата е значима. При 87,5% от пристъпите в групата NAb(+) се е наложило приложение на кортикостероиди срещу 57,2% в групата NAb (-). Въпреки това тези данни нямат статистическа достоверност.

При съпоставяне на общите нежелани лекарствени реакции в различните серологични групи се установява обратно пропорционална зависимост. Статистически значими са разликите както по отношение на леките, така

и на тежките нежелани реакции в полза на групата NAb(-) ($p < 0,001$). В групата NAb(+) 34,8% не са имали нежелани реакции, 60,9% са отшумели и също така не са били наблюдавани тежки, неповлияващи се на лечение нежелани реакции. Аналогични системни нежелани реакции са установени при NAb(-), съответно 4,3%, 43,6%, 6,8%.

Фигура 16. *Обратнопропорционална зависимост между системните нежелани реакции и NAb положителен статус*



Статистически достоверни са разликите и по отношение на локалните нежелани реакции в полза на групата NAb(-) ($p < 0,001$). При 5,1% в групата NAb(-) никога не са наблюдавани локални нежелани реакции спрямо 28,3% в групата NAb(+).

Не е установена разлика в двете групи по отношение на фамилната обремененост, както и на автоимунната коморбидност.

При сравнение на двете серологични групи по отношение на фактора „Тютюнопушене“ е установена разлика.

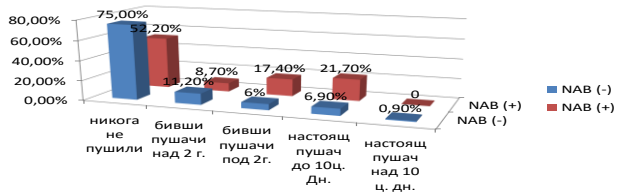
Таблица 11. Сравнение на субгрупите NAb (+/-) по отношение на фактора „Тютюнопушене“

Тютюнопушене	NAb		Общо n(%)	p
	Негативни n(%)	Позитивни n(%)		
Никога непушили	87 (75)	24 (52,2)	111 (68,5)	0,005
Някогашен пушач – не пуши повече от 2 години	13 (11,2)	4 (8,7)	17 (10,5)	
Скорошен пушач – преустановил пушенето в последните 1 – 2 години	7 (6)	8 (17,4)	15 (9,3)	
Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	8 (6,9)	10 (21,7)	18 (11,1)	
Настоящ пушач – над 10 цигари дневно	1 (0,9)	0 (0)	1 (0,6)	
Общо	116 (100)	46 (100)	162 (100)	

Налице е значима статистическа разлика в двете серологични групи ($p < 0,005$). В групата NAb(-) никога непушилите са 75%, докато в групата NAb(+) те са 52,2%. 21,7% от настоящите пушачи са NAb(+) и само 7,8% са NAb(-). Наскоро преустановилите пушенето също носят по-висок риск за образуване на неутрализиращи антитела. Налице е тенденция на изравняване на риска при преустановилите пушенето преди повече от 2 години.

Фигура 17. Тютюнопушене и NAb серопозитивност

Тютюнопушене и NAb серопозитивирание



Инвалидизацията в различните NAb серологични групи е оценена по скалата EDSS.

Таблица 12. Сравнение на различните субгрупи NAb (+/-) по отношение на динамиката на оценката по скалата EDSS преди лечението и при имуносерологичното изследване

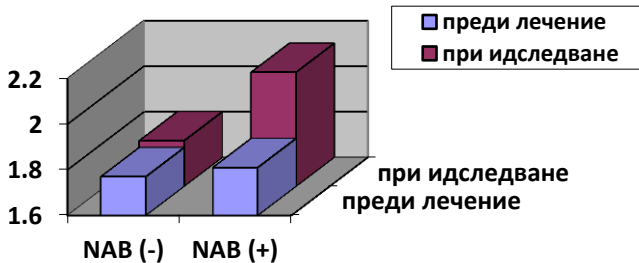
Увеличение по скалата EDSS	NAb		Общо n(%)	p
	Негативни n(%)	Позитивни n(%)		
0	105 (91,3)	26 (57,8)	131 (81,9)	<0,001
0,5	6 (5,2)	10 (22,2)	16 (10)	
1	4 (3,5)	7 (15,6)	11 (6,9)	
1,5	0 (0)	2 (4,4)	2 (1,3)	
Общо	115 (100)	45 (100)	160 (100)	

Двете серологични групи се различават статистически по отношение на динамиката на инвалидизацията ($p < 0,001$). Налице е статистически значимо увеличение на оценката по скалата EDSS в групата NAb(+): при 20% от серопозитивните е налице прогресия с над 1.0 по скалата EDSS (трайно акумулиране на инвалидизацията), докато при серонегативните такава прогресия се установява само при 3,5%.

Таблица 13. Сравнение на различните серологични субгрупи NAb (+/-) по отношение на стойността на оценката по скалата EDSS преди лечението и при имунологичното изследване

Показател	NAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
EDSS преди лечението	Негативни	115	1,77	0,56	1,50	0,00	3,50	0,491
	Позитивни	45	1,81	0,40	2,00	1,00	3,00	
EDSS при изследването на антители	Негативни	117	1,80	0,64	2,00	0,00	4,00	0,007
	Позитивни	46	2,10	0,70	2,00	0,00	4,00	

Фигура 18 Сравнение на оценката по скалата EDSS преди лечението и при серологичното изследване – графично изобразяване



Установява се статистически значимо влошаване на оценката по скалата EDSS при групата NAb(+). Промяната (влошаването) на инвалидизацията в другата група се дължи на все пак умерената ефективност на интерфероновото лечение и/или на факта, че неутрализиращите антитела не са единственият фактор за субтерапевтичност. NAb позитивните пациенти са имали по-висока оценка по скалата EDSS преди започване на лечението.

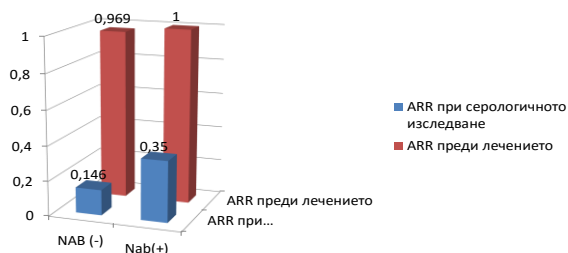
При всяка една от подгрупите според продължителност на лечението е налице редукция на честотата на пристъпите.

Таблица 14. Сравнение на ARR в различните субгрупи NAb (+/-) преди лечението и при имуносерологичното изследване за всяка група пациенти според продължителността на терапията

NAb	Период на лечение	Период на наблюдение	Общ брой пациенти	Общ брой пристъпи	ARR
NAb(+)	До 2 г. след лечение	Преди лечението	10	20	1,000
		След лечението	10	7	0,350
	3-та и 4-та година след лечение	Преди лечението	16	32	1,000
		След лечението	16	11	0,344
	5-а и 6-а година след лечение	Преди лечението	14	24	0,857
		След лечението	14	2	0,071
	7-ма и 8-ма година след лечение	Преди лечението	6	9	0,750
		След лечението	6	1	0,083
NAb(-)	До 2 г. след лечение	Преди лечението	96	186	0,969
		След лечението	96	28	0,146
	3-та и 4-та година след лечение	Преди лечението	15	30	1,000
		След лечението	15	2	0,067
	5-а и 6-а година след лечение	Преди лечението	5	10	1,000
		След лечението	5	2	0,200
	7-ма и 8-ма година след лечение	Преди лечението	1	2	1,000
		След лечението	1	0	0,000

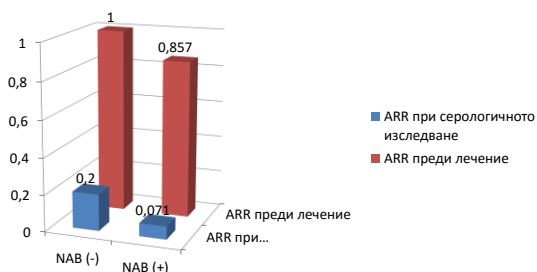
Фигура 19. Графично изобразяване на редуцията на ARR при субгрупите NAb (+/-) при различна продължителност на лечението – лекувани до 2 г.

Пациенти, лекувани до 2 г.



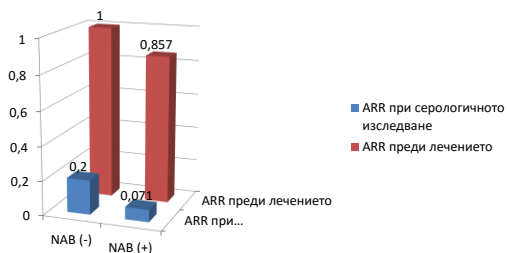
Фигура 20. Графично изобразяване на редуцията на ARR при субгрупите NAb (+/-) при различна продължителност на лечението – лекувани 3 – 4 г.

Пациенти, лекувани 3-4 г.



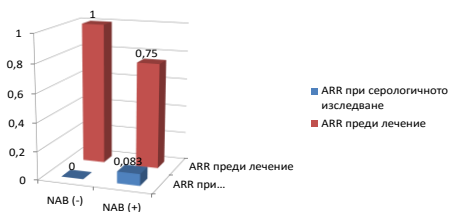
Фигура 21. Графично изобразяване на редуцията на ARR при субгрупите NAb (+/-) при различна продължителност на лечението – лекувани 5– 6 г.

Пациенти, лекувани 5-6г.



Фигура 22. Графично изобразяване на редуцията на ARR при субгрупите NAb (+/-) при различна продължителност на лечението – лекувани над 7 г.

Пациенти, лекувани над 7г.



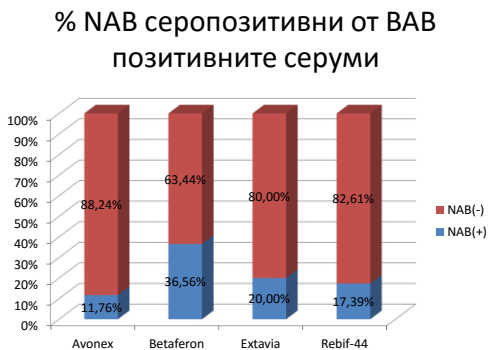
Редукцията на годишната честота на пристъпите е по-голяма в групите, неизработващи неутрализиращи антитела.

Независимо от факта, че всички болни са отговарящи на лечението по критериите на НЗОК, направена е съпоставка на пациентите, неполучили пристъпи за наблюдавания период, неволюли инвалидизацията, оценена по скалата EDSS, и онези, които са напълно клинично стабилни в различните серологични групи.

РЕЗУЛТАТИ ОТ ИЗСЛЕДВАНЕ НА NAb ПО МЕДИКАМЕНТИ

Формирането на групи на базата на прилаганите медикаменти ни позволи да анализираме имуногенността на различните IFN β молекули.

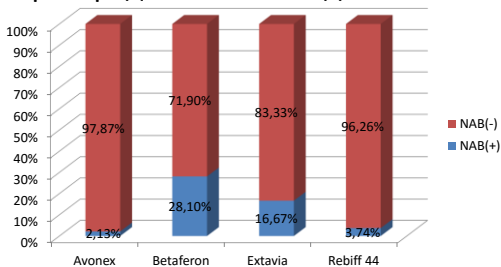
Фигура 23. Разпределение на NAb по медикаменти от ВАВ позитивната група



Съотнесено към цялата популация на изследвани пациенти, се установяват следните резултати за NAb(+): Avonex – 2,13%; Betaferon – 28,1%; Extavia – 16,67%, Rebif 44 – 3,74%.

Фигура 24. Разпределение на NAb по медикамент (цялата кохорта)

**NAb серопозитивност - от цялата
група
разпределение по медикаменти**



В настоящото наблюдение са съпоставени пациентите, никога неполучили пристъп по време на лечението в различните субгрупи NAb.

Таблица 15. Процент на пациентите без пристъпи в субгрупите NAb (+/)

Пристъпи	Статистика	NAb		Общо	p
		Негативни	Позитивни		
Не	N	83	19	102	<0,001
	%	70,9%	41,3%	62,6%	
Да	N	34	27	61	
	%	29,1%	58,7%	37,4%	
Общо	N	117	46	163	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Фигура 25. Процент на пациентите без пристъпи в субгрупите NAb (+/)

Пациенти без пристъпи



Установена е над 40% разлика между групите NAb (+/-) по отношение на никога неполучилите пристъп пациенти.

Аналогично са съпоставени пациентите без влошаване на инвалидизацията, оценена по скалата EDSS.

Таблица 16. Динамика на инвалидизацията, оценена по скалата EDSS в субгрупите NAb(+/-)

Увеличение по скалата EDSS	NAb		Общо n(%)	P
	Негативни n(%)	Позитивни n(%)		
0	105 (91,3)	26 (57,8)	131 (81,9)	<0,001
0,5	6 (5,2)	10 (22,2)	16 (10)	
1	4 (3,5)	7 (15,6)	11 (6,9)	
1,5	0 (0)	2 (4,4)	2 (1,3)	
Общо	115 (100)	45 (100)	160 (100)	

Фигура 26. Динамика на инвалидизацията, оценена по скалата EDSS в субгрупите NAb (+/-)

Пациенти без EDSS динамика



Установена е над 35% разлика между групите NAb (+/-) по отношение на пациентите без динамика на инвалидизацията. Свободни от „трайно акумулиране на инвалидизацията“ са 96,5% от групата NAb(-) и 80,0% от групата NAb(+).

Гореописаните два анализа предполагат, че пациентите с пълна клинична стабилизация ще бъдат повече в групата без неутрализиращи антитела.

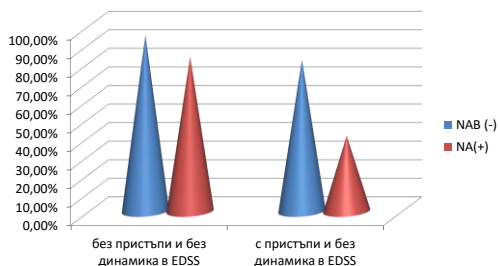
Таблица 17. Процент на пациентите със/без пристъпи + процент на пациентите със/без влошаване на инвалидизацията в субгрупите NAb(+/-)

Пристъп	EDSS динамика		NAb		Общо
			Негативни	Позитивни	
Не	0,00	N	78	15	93
		%	95,1%	83,3%	93,0%
	0,50	N	2	3	5
		%	2,4%	16,7%	5,0%
	1,00	N	2	0	2
		%	2,4%	0,0%	2,0%
	Общо	N	82	18	100
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Да	0,00	N	27	11	38
		%	81,8%	40,7%	63,3%
	0,50	N	4	7	11
		%	12,1%	25,9%	18,3%
	1,00	N	2	7	9
		%	6,1%	25,9%	15,0%
	1,50	N	0	2	2
		%	0,0%	7,4%	3,3%
	Общо	N	33	27	60
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Общо в целия пул, неполучилите пристъпи и онези без каквато и да е промяна на инвалидизацията са 95,1% при серонегативните и 83,3% при серопозитивните.

Фигура 27. Процент на пациентите без пристъпи + процент на пациентите без влошаване на инвалидизацията, оценена по скалата EDSS в субгрупите Nab (+/-)

Процент на пациентите без динамика в EDSS с и без пристъпи



Пациентите с пълна клинична стабилизация (без пристъпи и без влошаване на инвалидизацията с > 1.0 по скалата EDSS) са по-висок процент в групата на NAb(-) спрямо NAb(+). В изследваните от нас субгрупи NAb пациентите, получили пристъпи, но с динамика по скалата EDSS, са по-скоро изключение. При тях установеното влошаване е с не повече от 1.0. Това потвърждава нашето твърдение, че са включени само пациенти с пристъпен ход на болестта, като промяната на инвалидизацията на изследваните пациенти се дължи на непълно възстановяване на неврологичния дефицит след пристъп, а не на междупристъпно влошаване.

Пациентите, които не са получавали пристъпи и нямат влошаване на оценката по скалата EDSS, са голям процент – 93%. От групата пациенти, които са преживявали пристъпи, 40,7% от NAb серопозитивните са без влошаване на инвалидизацията и съответно 81,8% от NAb серонегативните.

3. Изследване на титъра на неутрализиращи антитела срещу интерферон-бета

Малка група от пациентите е изследвана за титър на неутрализиращите антитела. За целите на изследването произволно са избрани 9 от NAb позитивните серуми.

Фигура 28. Изследване на титър на NAb – висок/нисък

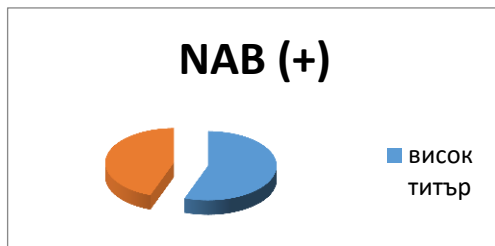


Таблица 18. Титър на NAb – оценка на стойността

Пациент	BTU	TRU/ml	Резултат	Медикамент
1	352.801	>540	hight	Avonex
2	331.338	32,09	low	Betaferon
3	>500	18,82	low	Betaferon
4	>500	>540	hight	Betaferon
5	>500	>540	hight	Betaferon
6	>500	99,14	low	Betaferon
7	>500	>540	hight	Extavia
8	>500	>540	hight	Betaferon
9	>500	143,25	low	Betaferon

Таблица 19. Сравнителна характеристика на пациентите с нисък и висок титър на NAb

	Нисък NAb титър	Висок NAb титър
Мъже/Жени	2:2	3:2
Възраст при изследване	38 – 56 Средна: 47	18 – 35 Средна: 26,5
Давност на болестта при изследването	5 – 28 Средна: 16,5	6 – 17 Средна: 11,5
Общи нежелани реакции	Липсват или са отшумели	Липсват или са отшумели
Локални нежелани реакции	Липсват или са отшумели	Липсват или са отшумели
Настоящ пушач	1 от 4	2 от 5
Средна продължителност на лечението в месеци	192	174
ARR преди лечение	0,9	0,9
ARR при изследването	0,25	0,4
Брой пристъпи по време на лечение	1	7
Промяна на EDSS преди лечение до момента на изследването	При 1 пациент с 0,5; останалите – без динамика	При 1 пациент с 0,5; при 1 с 1.0; останалите – без динамика

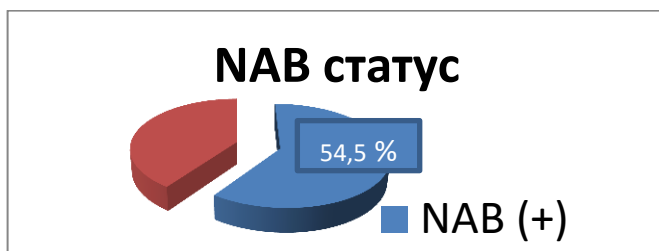
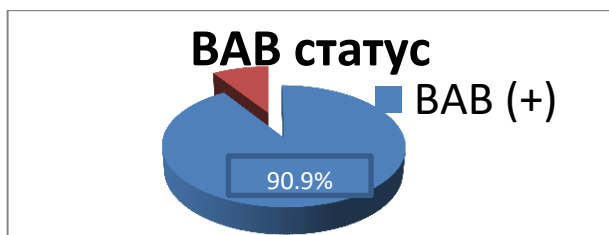
4. Изследвания за антилекарствени антитела срещу интерферон-бета в юношеска възраст

Част от анализираниите серуми са на индивиди в юношеска възраст (12 – 17 години). По-малката част от тях са лекувани по НЗОК (над 16 години, отговарящи на установените критерии за лечение), а друга част са лекувани IFN β -1b – дарение от фирмата производител.

Таблица 20. Разпределение на пациентите в юношеската група

БРОЙ ПРИСТЪПИ	NAb(+)	NAb(-)
12 месеца след лечението	10	5
12 месеца преди лечението	16	16
	ДЕБЮТ В ДЕТСКА ВЪЗРАСТ	ДЕБЮТ В ЮНОШЕСКА ВЪЗРАСТ
BAb(+)	7	5
BAb(-)	0	2
NAb(+)	3	2
NAb(-)	1	2

Фигура 29. BAb статус в юношеската кохорта



VI. ОБСЪЖДАНЕ

1. VAb и NAb серопозитивност

Последиците от възникването на антилекарствени антители към медикаменти, продукт на биотехнологиите, не са напълно ясни и са неконтролируеми. Те биват директни или отложени във времето и е необходимо да бъдат изследвани. Появата им може да бъде свързана с безопасността и/или с нарушение на фармакологичния им ефект.

Първите пилотни проучвания, както и наскоро завършилото при пациенти с клинично изолиран синдром, изследващи наличието на антилекарствени антители, не подкрепят влиянието на NAb върху клиничната ефективност на IFN β . При повечето проучвания с по-дълъг период на проследяване се установява негативното влияние на неутрализиращите антители. В нашата разработка са включени пациенти както с по-кратък, така и с по-дълъг период на интерфероново лечение. Получените резултати подкрепят зависимостта на част от клиничните показатели от наличието на неутрализиращи антители.

Някои проучвания показват че дори не-неутрализиращите (свързващите) антилекарствени антители възпрепятстват IFN β индуцираните биологични ефекти. В настоящото изследване VAb позитивните са 45,8%, което съставлява по-малък процент спрямо резултатите, получени от други авторски колективи, при които позитивността е 50 – 80%. В много от публикациите относно неутрализиращи антители честотата на VAb не се съобщава. Поради тази причина е трудно да бъде направено сравнение на резултати, особено при използване на различни методи на изследване. В нашата група честотата и тежестта на пристъпите и влошаването на инвалидизацията, установено по скалата EDSS, е по-изразено в групата на VAb позитивните пациенти. Въз основа на нашите данни и с помощта на статистически методи е доказано, че при титър над 250 BUU е налице 60% вероятност пациентът да се позитивира за NAb (сензитивност – 60,9% и специфичност – 59,0%). Според някои автори дори е уместно при пациенти с висок титър на свързващите антители лечението да се замени с неинтерфероново, за да се избегне изработването на NAb, което да доведе до намаляване на биоактивността на интерферона и съответно до загуба на клиничен ефект. Според публикация на Fox от 2014 г. при титър на VAb над 50 U съществува голяма вероятност пациентите да бъдат NAb(+), което насочва към терапевтичното решение за смяна. Няма общоприета установена стойност за титъра на VAb, която да предсказва достоверно NAb(+), но някои автори прие-

мат титър на VAb над 50 U (посочена специфичност 94%) и дори титър над 20 U (посочена специфичност 80%) за подходящ предиктор на NAb позитивирането. Водещи в областта изследователи са на мнение, че ако се определи достоверен титър на VAb, предсказващ NAb серопозитивирането, необходимостта от провеждане на по-скъпото и времеемко изследване за NAb е уместно да отпадне. Неген и сътрудници проучват дали титъра на не-неутрализиращите антители, установен рано в хода на лечението (на третия месец), може да служи като предиктор за по-късно възникващи неутрализиращи антители. Чрез измерване на намалението на протеиновата концентрация на CXCL-10 и TRAIL те установяват, че свързващите антители самостоятелно и независимо от NAb отговарят за намалена биналичност на интерферон-бета-1b. В това проучване изследваните на 3-ия месец VAb са положителни в 89%, като с времето NAb се позитивират в 43%. Авторите на тази разработка защитават препоръката за превключване към неинтерфероново лечение при онези пациенти, които образуват висок титър не-неутрализиращи антители. Тези резултати подкрепят хипотезата за титър-зависима продължителна неутрализация и твърдението, че всички антилекарствени антители притежават в известна степен неутрализираща функция. Постигнатите от нас резултати потвърждават тази теза, тъй като част от получените данни по отношение на изследваните клинични параметри се припокриват в субгрупите VAb(+) и NAb(+).

Khan и сътрудници съобщават, че 43% от изследваната група пациенти образуват антилекарствени антители. Те изследват и средната серумна IFN концентрация в различните групи – позитивни и негативни на неутрализиращи антители. При повече от половината от пациентите с NAb(+) серумните нива на IFN са под установимите. Въпреки че липсва друго изследване, което да оценява връзката между серумното ниво и наличието на антиинтерферонови антители, тези данни недвусмислено потвърждават твърдението за инхибиращия ефект на антиинтерфероновите антители, а именно – неутрализиращите антители отменят IFN индуцираните генни продукти. В нашето проучване не е направена съпоставка на серумната интерферонова концентрация с наличието на антилекарствени антители.

Ако приемем, че данните от повечето досегашни проучвания са, най-малкото, недостатъчно категорични относно влиянието на NAb върху клиничните параметри, то ефектът върху активността, показана чрез ЯМР, е доказано негативен. Съвременните изисквания за контрол върху заболяването NEDA (No evidence of disease activity) не до-

пускат нито клинични, нито магнитнорезонансни данни за активност на заболяването. Поставената от нас цел е да се определи връзката между антилекарствените антители и клиничните параметри на болестта. Не е включено изследване с ЯМР поради причини, описани по-долу, както и с аргумента, че субклиничната активност при МС е до 5 пъти по-висока в сравнение с клиничната. Това означава, че ако се установят разлики в клиничните параметри, това категорично може да се отнесе и към характеристиките за активност, показани при ЯМР. Невъзможността да постигнем унифициране на изследванията с ЯМР се дължи на следните основания:

1. Пациентите не са в условие на рандомизирано проучване, а са част от реалната клинична практика. Магнитнорезонансните им изследвания са относително несистемно провеждани.
2. Не при всички пациенти изследването с ЯМР е извършено с контрастна материя. Използването на гадолиний (Gd) i.v. или друг контраст, дозата и времевата зависимост между инжектирането и сканирането влияят върху крайния резултат.
3. Различни са техническите характеристики на апаратите за ЯМР в България (различна мощност – 0,5 Tesla; 1,0; 1,5; 3,0 – и софтуерни разлики). Конкретен пациент използва различни центрове (специалисти по ЯМР) за терапевтично мониториране.
4. Обичайно липсва изследване с ЯМР на 6-ия месец от започването на лечението, който да служи за изходен (стартов за началото на терапията) поради познатия ни отложен терапевтичен ефект на IFN β .
5. Изследването на миелона изисква специална техника и интерпретация и не се провежда рутинно.

Съгласно препоръките на EFNS (2005) спирането на лечението и промяната към неинтерфероново е уместно при установяване на NAb в две последователни изследвания. Може да се спекулира, че персистиращите NAbs имат повишена свързваща способност и отслабена скорост на дисоциация спрямо транзиторните – феномен, изразяващ се в това, че антиинтерфероновият анти тяло отговор узрява във времето. Смяната на лечението предпазва пациента от продължаване на инжектиране без терапевтичен ефект. В литературата съществуват данни за около 16% от всички пациенти, лекувани с IFN β . В нашето изследване NAbs серопозитивните са 12,8%, като този резултат се доближава до резултата на Malucchi – 12,4%. Серологичният статус в динамика не е подложен на изследване. Необходимо е

проспективното проследяване на тези пациенти за установяване на сероконверсия.

2. Биологични характеристики, влияещи върху антигялообразуването срещу интерферон-бета

Настоящото изследване не показва значими разлики при серопозитивните и серонегативните пациенти по отношение на показателя „Възраст при дебют на болестта“ и при изследването за инвалидизация. Изключение прави сравнението на пациентите от юношеската кохорта и възрастните. Макар да е статистически недостоверно (поради малкия брой на изследваните пациенти в юношеската група), антигялообразуването е по-често срещано при юношите.

Времето до първи и интервалът между първи и втори пристъп са предвидени с цел по-детайлна оценка на влиянието на неутрализиращите антитела върху клиничните параметри в контекста на установяване на ефекта от прилаганото лечение. Сравнителният анализ между различните серологични групи, по медикаменти и по продължителност на прилаганата терапия, показва някои различия. Интерпретацията обаче е трудна, тъй като при обработка на резултатите не са изключени възникналите в първите 6 месеца пристъпи. Поради отложения (с около 6 месеца) ефект на интерферона, за обективен анализ е добре да бъдат отчетени само онези пристъпи, които са регистрирани 6 месеца след започване на терапията.

3. Инхибиране на ендогенния интерферон от антилекарствени антитела

4. Интерфероните са ендогенни цитокини, произвеждани и освобождавани в отговор на патогени. Някои автори установяват, че при поява на неутрализиращи антитела срещу интерферон-бета годишната честота на пристъпите може да се повиши с 50% и да се изравни с пациенти, „лекувани“ с плацебо. Интерферонът се свързва с рецептори на клетъчната повърхност и активира интрацелуларни сигнални механизми, водещи до транскрипция на стотици гени. Възникването на NAbs (в зависимост от титъра) редуцира интерферон индуцираните генни продукти. Логично възниква въпросът дали биологичният ефект на NAbs *in vivo* може да засегне ендогенния интерферон и да поразии собствената имунна система, като например пациентът да стане податлив на вирусни инфекции. Може да се предположи също така, че наличието на NAbs засилва агресията на подлежащи болести поради

блокиране на ендогенния интерферон. Влиянието на NAb's върху ендогенния интерферон е все още неясно. Ендогенният интерферон играе роля и при превенцията на ракови образувания чрез антиангиогенни и проапоптоични свойства, както и супресира остеокласната диференциация, инхибирайки костна загуба. Интересно е да се изследва дали NAb's позитивните пациенти са поподатливи на онкологични заболявания или костна загуба.

Във връзка с допускането, че изработените антилекарствени антители могат да инактивират за дълго и ендогенния интерферон (притежаващ антивирусен, противотуморен ефект и потенциал за инхибиране на остекластната активност), е сравнена честотата на съответните заболявания и патологични състояния при групите NAb(+) и NAb(-). В кохортата на изследваните болни не са установени разлики по отношение на честотата на инфекциите, онкологичните заболявания и остеопорозата (индиректен показател за анулирани свойства на ендогенния интерферон).

5. Безопасност при поява на антилекарствени антители

Стриктното проследяване на пациентите в настоящото наблюдение дава основание да се твърди, че наличието на неутрализиращи антители срещу интерферон-бета не се свързва с увеличен риск от проява на алергични състояния. Единственият негативен ефект на NAb с свързан с неутрализицията на биоактивността на прилагания медикамент.

Честотата на системните нежелани лекарствени реакции и NAb статусът на пациентите са в обратнопропорционална зависимост помежду си. Ето защо справянето с нежеланите реакции трябва да се извършва своевременно, за да се избегне самоволното прекратяване на лечението от страна на пациента (грипоподобните реакции са най-честата причина за прекъсване на терапията, като в същото време те не означават липса на биологична активност на интерферона). Получените от нас резултати напълно подкрепят данните от литературната справка. Може да се направи изводът, че общите нежелани реакции могат да служат като прогностичен фактор за наличие на антители. В изследваната от нас група обаче локалните странични явления показват същата обратнопропорционална зависимост, макар да е известно, че те са свързани в голяма степен и с добрата инжекционна техника.

6. Влияние на тютюнопушенето върху антицялообразуването срещу интерферон-бета

Установено е, че пушенето може да допринесе за индукцията на NAb към IFN β и natalizumab. По-интензивно пушещите са изложени на повишен риск. Ролята на тютюнопушенето като фактор, способстващ антицялообразуването, е обект на анализ за нашия екип. Установено е, че белият дроб е имунореактивен орган. Механизмът, отговорен за антицялообразуването, е свързан с въздействието на тютюневия дим върху имунологичните процеси и собствените му проинфламаторни свойства. Пушенето увеличава активацията на проинфламаторни клетки и индуцира модифицирани протеини в белите дробове, което увеличава риска от автоимунен отговор. В изследването се установява, че пушачите – настоящи и бивши, са изложени на повишен риск от образуване на антитела. Резултатите от нашето изследване сочат, че рискът при преустановилите пушенето преди повече от две години се изравнява с този на непушачите. Налага се практическият извод, че пациентите с МС трябва да бъдат съветвани да не пушат (освен рискът от антицялообразуване, тютюнопушенето е и доказан негативен прогностичен фактор по отношение на хода на болестта).

7. Титър на неутрализиращи антитела срещу интерферон-бета

За титър на антитела са изследвани на случаен принцип само 9 от нашите NAb позитивни пациенти. Един от пациентите е лекуван с IFN β -1a i.m., а останалите – с IFN β -1b s.c. По литературни данни прагът (cut-off) за клинична позитивност е титър от 20 TRU/ml. Стойности на титъра под 5 се приемат за негативни, а при стойности от 5 до 19 се говори за субклинична неутрализираща активност. Експертите на NABINMS препоръчват различен праг за титъра при IFN β -1a и IFN β -1b – съответно титъра на антитела срещу IFN β -1a: 20 – 100 TRU (нисък) и над 100 (висок); срещу IFN β -1b: 20 – 400 TRU (нисък) и над 400 TRU (висок). Според някои автори титър под 20 TRU също има неутрализиращ ефект. Направено е проучване, в което се установява, че при съществуването на антитела с титър между 5 и 20 TRU (по правило се приемат за NAb отрицателни) някои изследвани интерферон индуцирани генни продукти (неоптерин, β 2 микроглобулин) прогресивно намаляват. В нашата малка група 5 от 9 пациенти са с висок титър на NAb (NAb \geq 540 TRU/ml). Серумът на единствения ни пациент, лекуван с IFN β -1a, има висок титър – по литературни данни съотносим с пълна загуба на биологична активност на интерфероновия продукт. Ето защо не е разумно изключване на пациентите, лекувани с IFN β -1a i.m. (Avonex), от планирани изс-

ледвания за откриване на неутрализиращи антитела въпреки ниската имуногенност на продукта.

От литературните данни е известно, че неутрализиращите антитела се образуват по-бързо при приложение на IFN β -1b, но и по-често претърпяват сероконверсия поради обичайно по-ниския титър. Случаите с висок титър не предполагат сероконверсия. В нашата извадка повече от 50% от пациентите са с възможно най-висок титър. На практика, всички NAb(+) пациенти изработват NAb преди 24-ия месец от началото на лечението. Ако се допусне хипотезата, че при нашите пациенти неутрализиращите антитела са изработени в началото на терапията и на 18-ия месец антителата вече са с висок афинитет, както и че не са претърпявали сероконверсия, то сумарно при тези пациенти са налице 84 месеца лечение в условия на серопозитивност и висок титър (от това изчисление са изключени първите 18 месеца от лечението на всеки пациент). Това означава, че е прилаган медикамент със силно потисната или липсваща биологична активност, което предполага липса на клинична ефективност.

8. Антилекарствени антитела срещу интерферон-бета в юношеска възраст

За наличие на антиинтерфероновите антитела е изследвана група от 11 юноши, провеждащи лечение с IFN β . Пациентите са провели лечение с давност най-малко 18 месеца. До анализ са допуснати и пациенти, прилагащи имуноглобулини като котерапия към IFN β . Нито един не е приемал имunosупресивна терапия преди или по време на лечението с интерферон-бета по повод на основното или други заболявания. Пациентите са изследвани клинично само със снемане на неврологичен статус и с оценка по скалата EDSS. Не са оценявани останалите аспекти на болестта като когниция, умора, качество на живот. Не са провеждани други параклинични изследвания. Серологичното изследване е проведено както при възрастните – двустъпков имуноанализ. Средната възраст на пациентите е 16,7 години в момента на изследването. При нито един от пациентите не е открита фамилна обремененост по отношение на MS. Средната продължителност на заболяването е 3,9 години. В общата група преобладават момичетата – 63,6%. Оценката по скалата EDSS е в диапазона от 1.5 до 6.0. Десет от единадесет са VAb позитивни (90,9%) и шест от десет са NAb позитивни (54,5%). Двама от NAb(+) и двама от NAb(-) са допълнително лекувани с имуновенин 10% интравенозно (в стандартна доза през един или три месеца). Анализът е направен върху много малък брой пациенти, но повечето описани групи при обсер-

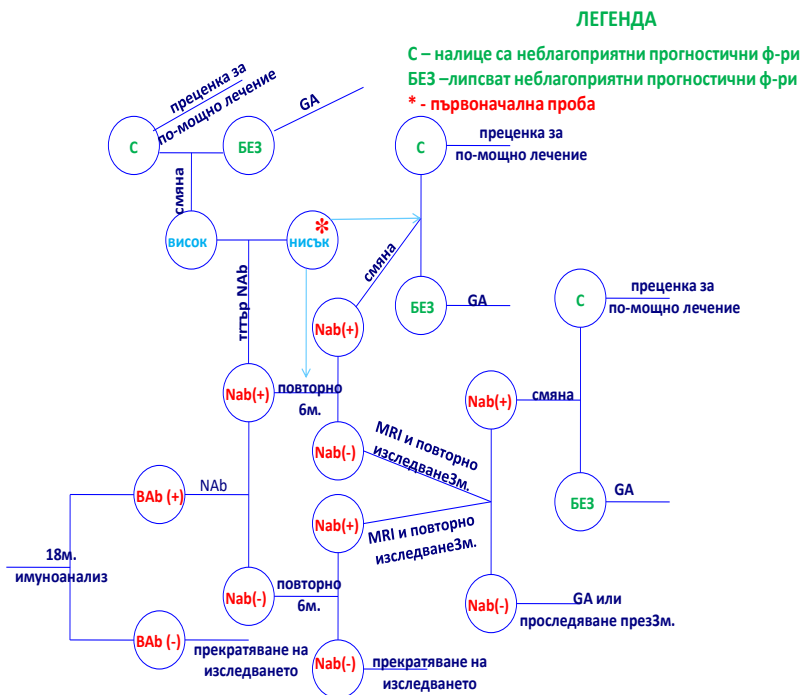
вационни наблюдения са малки. За разлика от единственото открито от нас в литературата съобщение от 2009 г. (от годишната среща на Детското неврологично дружество в Луисвил, Кентъки, САЩ) за много по-ниска честота на NAb(+) в сравнение с възрастните, нашите пациенти са серопозитивни в над 50%. Фактът, че част от юношите се лекуват допълнително с IVIG усложнява интерпретацията поради допълнителното имунологично въздействие. Известни са данните, че плазмаферезата и имуноглобулините (IgG) намаляват неутрализиращите антитела. От друга страна, IgG и плазмаферезата не нарушават паметовите плазмени клетки и въпреки че тези лечения могат да участват в елиминирането на циркулиращите NAb (полезен ефект), не се очаква да се възпрепятства продукцията им, след като веднъж е започнала. Това се потвърждава от получените данни – еднакъв брой измежду лекуващите се с IVIG са позитивни и негативни на неутрализиращи антитела.

Въпреки че анализът е върху нерепрезентативна извадка в юношеска възраст, може да се обобщи, че както и при възрастните, наличието на NAb не се свързва с влошена безопасност. И тук се установява обратна корелация между грипоподобните оплаквания и NAb статуса на пациента. Най-вероятно имунната реактивност в детско-юношеската възраст е по-различна, което обуславя както по-активното заболяване (по клинична и ЯМР характеристика), така и по-често срещаното образуване на антитела. Повечето имуномодулиращи терапии от втора линия, използвани при възрастни, са в процес на изпитване при лица под 18 години. Евентуалното одобрение на медикаменти с по-мошен ефект и различни механизми на действие ще запълни една голяма празнина в терапевтичния арсенал на МС в тази възрастова група.

9. Алгоритъм за приложение в практиката

Данните от литературния обзор и резултатите от собственото проучване, подкрепящи използването на NAb в мониторирането на интерфероновата терапия, са стимул за изработването на алгоритъм за приложение на изследването за антилекарствени антитела рано и проактивно в хода на лечението с цел своевременно разграничаване на имунофармакологичните нонреспондери.

Фигура 31. Алгоритъм



VII. ИЗВОДИ

1. При 45,8% от изследваните пациенти е установен VAb(+) статус.
2. NAb позитивни са 28,2% от VAb позитивните пациенти и 12,8% от всички включени в извадката. Това потвърждава значимостта на изследването за VAb чрез двустъпков имуноанализ като скриниращ метод.
3. Разпределението на NAb позитивните проби по лекарствени продукти потвърждава данните за по-изразена имуногенност на IFN β -1b. Най-висока е имуногенността на IFN β -1b за подкожно приложение, следван от IFN β -1a за подкожно приложение и IFN β -1a за мускулно приложение.
4. Резултатите от нашето проучване потвърждават негативния ефект на NAb статуса върху клиничната ефективност на IFN β . Наличието на NAb предсказва увеличен риск от краткосрочна и средносрочна прогресия на заболяването.
5. Тези данни подкрепят важността на определянето на NAb статуса при мониторирането на терапията с всички интерфероновите медикаменти, включително и по-слабо имуногенните.
6. При NAb(+) пациенти се наблюдава сигнификантно по-висока средна стойност на VAb. Титърът на VAb може да бъде предиктор за възникването на NAb. Макар и с известна предпазливост, титърът на VAb може да се разглежда като прогностичен маркер.
7. Своевременното изследване за антилекарствени антитела може да служи като инструмент за идентифициране на имуофармакологични нонреспондери преди клиничната изява на субтерапевтичност, което позволява навременно преминаване към рационална терапия.
8. Свързващите и неутрализиращите антитела нямат отношение към безопасността на интерфероновите медикаменти.
9. Не е констатирана връзка между антицялообразуването и възрастта и пола на пациентите.
10. Не е ясно дали и в каква степен NAb имат отношение към блокирането на ендегенния интерферон.
11. Налице е обратнопропорционална зависимост между честотата на системните нежелани реакции и антицялообразуването. Изявата на нежелани реакции може да служи за предиктор на антицялообразуването и парадоксално означава, че е добре лечението да продължи.

12. При пушачите е налице повишен риск от възникване на NAb.
13. Образоването на антиинтерферон неутрализиращи антитела е по-често в юношеска в сравнение със зрялата възраст.

VIII. ПРИНОСИ

1. Приноси с оригинален характер

- За първи път е проведено изследване на имуногенността на различни интерферонови медикаменти сред българската популация пациенти с множествена склероза.
- Извършено е клинично-имунологично изследване за оценка на наличието на антилекарствени антитела и въздействието им върху клиничния ефект на интерферон-бета.
- За първи път у нас се интерпретира наличието на свързващи и неутрализиращи антитела в контекста на определяне на пациентите като отговарящи или неотговарящи (респондери, нонреспондери) на интерфероново лечение.
- Направен е анализ на група пациенти с дълготрайно лечение (над 5 години) и NAb позитивен статус, което е рядкост в световната изследователска практика в тази научна област поради обичайната кратка продължителност на проучванията. Преди настоящата разработка в световната литература е налице само едно описание на имуногенността на интерфероновото лечение в юношеска възраст.

2. Приноси с потвърдителен характер:

- Направена е ретроспективна оценка на клиничния ефект от приложението на интерферон-бета при хетерогенна по отношение на продължителността на лечението група пациенти с МС.
- Установено е, че честотата на пристъпите намалява във времето, което е характерна особеност за хода на болестта – естествен и при имуномодулация.

3. Приноси с приложен характер:

- Предложен е алгоритъм за мониториране на терапията, включващ проактивно ранно изследване на антилекарствени антитела – акцентирание на ролята на NAb като прогностичен терапевтичен биомаркер, а не като причина за неефикасност.
- Резултатът от теста за неутрализиращи антитела срещу IFN β има значение за избора на последваща терапевтична стратегия.

•

**НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ
ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

ПУБЛИКАЦИИ В БЪЛГАРСКИ СПИСАНИЯ:

1. Иванова, С., Миланов, И. Неутрализиращи антитела към имуномодулиращи терапии при множествена склероза – част I, Двигателни нарушения, 2014, 11, Supp, 1, 5-13.
2. Иванова, С., Миланов, И. Неутрализиращи антитела към имуномодулиращи терапии при множествена склероза – част II, Двигателни нарушения, 2014, 11, Supp, 1, 14-24.
3. Иванова, С., Миланов, И. Антиинтерферон-бета антитела при лечение на множествена склероза. МедикАрт, 2014, VIII, 3, 53-55.
4. Иванова, С., Миланов, И., Скробанска, Р., Димитрова, В. Свързващи и неутрализиращи антитела към интерферон-бета при пациенти с множествена склероза, Постер на Националната конференция по неврология, Златни пясъци, 12 – 15.06.2014.

ПУБЛИКАЦИИ В ЧУЖДЕСТРАННИ СПИСАНИЯ:

1. Ivanova, S. Neutralizing Antibodies: Impact on Protein-Based Disease-Modifying Therapies in Multiple sclerosis, Am J Neuroprot Neuroregen, 2015, 7, 1-5.
2. Ivanova, S., I Milanov, R. Skrobanska, V. Dimitrova, V. Bojinova. Luciferase assay to detect neutralizing antibodies in adolescent Bulgarian multiple sclerosis patient, treated with interferon beta. PP08.3 – 2856. European Journal of Paediatric Neurology 19S (2015) S60.

SUMMARY

Even though interferon-beta (IFN β) treatment shows beneficial clinical effects, especially started at an early stage of multiple sclerosis (MS), it is associated with the development of anti-drug antibodies (ADAs). Neutralizing antibodies at high titer levels reduces drug efficacy. It is unknown why only a subgroup of treated MS patients develops ADAs.

The aim of this study was to determine the frequency of IFN β binding (BAb) and neutralizing antibodies (NAb) against different formulation of IFN β in the treatment of multiple sclerosis and to assess the clinical impact of antibody status.

Three hundred fifty-eight subjects took part in the study – 201 treated with IFN β -1a, and 157 with IFN β -1b. Separately, a group of 11 adolescents was investigated. Binding antibodies were detected by ELISA and neutralizing by gene reporter luciferase assay.

In our study seroprevalence of BAb is 45.8 %. Among the BAb(+) 28.2% were NAb seropositive. The overall frequency of NAb-positive patients in our adult cohort is 12.8%. IFN β -1b preparation are more immunogenic than IFN β -1a.

In addition to the annual relapse rate and EDSS scoring, we studied the severity of the first and the second relapse after the beginning of treatment as well as the time to first and between the first and the second attack as clinical parameters of efficacy

We hypothesized that MS patients with and without autoimmune comorbidity have different propensities to induce humoral immune responses. We did not find that the presence of other autoimmune conditions is associated with Nab development. We did not find any likely possible relationship between serological status and family history of multiple sclerosis.

Because of the notion that NAb may affect not only exogenous, but also the naturally occurring IFN, we searched for incidence of osteoporosis, cancer and frequency of viral infections. There are no differences between seropositive and seronegative groups.

Applying ROC analysis we aimed to answer whether BAb titer can be used to predict NAb positivity and the treatment response respectively.

We analyzed if presence of ADA is associated with generalized and local side effect of IFN β . Because of inversely proportional relation we conclude that the lack of generalized side effects can be used to predict patients at risk of be-

coming antibody positive. For such patients we recommend earlier NAb testing than the others.

We try to investigate cigarette smoking as factor influence the development of ADA in MS patients. Smoking may contribute to the induction of anti drug antibodies against IFN β .

We observed a small group with NAb titer. The majority of them had high titer; even the only patient, treated with IFN β -1a, also had a high titre. Because of that result we do not suggest MS patient, treated with less immunogenic IFN β -1a i.m. to be excluded from ADA screening.

Importantly in adolescent age we found higher rate of seropositivity even though it is not statistically significant because of the small number of patients.

In conclusion, a systematic immuno-clinical investigation of anti interferon-beta antibodies development and their clinical impact was performed in a huge group of multiple sclerosis patients for the first time in Bulgaria. Various important conclusions and clinical contributions were achieved. Overall, these results can be used to assist when making decisions about whether treatment should be changed or not. In addition, the identification of factors contributing to the immunogenicity of protein therapeutics can increase our understanding of the immunological mechanisms leading to ADA responses, possibly resulting in less immunogenic drugs in the future.

БЕЛЕЖКИ

