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

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ
НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН
„ДОКТОР“

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ „НЕВРОЛОГИЯ“

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:

АКАД. ПРОФ. Д-Р ИВАН МИЛАНОВ, Д.М.Н.

СОФИЯ

2016

СЪДЪРЖАНИЕ

СЪДЪРЖАНИЕ 2

СПИСЪК С ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ 4

I. ВЪВЕДЕНИЕ 7

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР 8

1. Множествена склероза 8

2. Антилекарствени антитела 30

2.1. Антиинтерферон-бета антитела 32

2.1.1 Измерване на анти INFβ антитела 41

2.1.2. Серопозитивност към антиинтерферонови антитела. Възникване и изчезване на неутрализиращи антитела 46

2.1.3. Измерване на биоактивност на IFNβ 49

2.1.4. Клинично значение на неутрализиращите антитела срещу INFβ 51

2.1.4.1. Ефект на NAbs върху пристъпите 51

2.1.4.2. Ефект на NAbs върху прогресията на заболяването 53

2.1.4.3. Влияние на NAbs върху активността на заболяването, измервано с МРТ 54

2.1.5. Приложение в клиничната практика 59

2.2. Антитела срещу glatiramer acetate 62

2.3. Антитела срещу natalizumab и други моноклонални антитела 63

3. Съвременни критерии за ефективност при приложение на имуномодулацията. Терапевтична целесъобразност 66

3.1. Терапевтична целесъобразност при множествена склероза 71

4. Изводи от литературния обзор 71

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ 76

IV. КЛИНИЧЕН КОНТИНГЕНТ 78

V. ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ 81

1. Клинични методи 81

2. Имунологични методи 81

3. Статистически методи за обработка на резултатите 81

3.1. Дескриптивна статистика 81
3.2. Методи за проверка на хипотези 81
VI. РЕЗУЛТАТИ 86
1. Изследвания за свързващи антитела срещу интерферон-бета 93
2. Изследвания за неутрализиращите антитела срещу интерферон-бета 138
3. Изследване на титъра на неутрализиращи антитела срещу интерферон-бета 190
4. Изследвания за антилекарствени антитела срещу интерферон-бета в юношеска възраст 191
VII. ОБСЪЖДАНЕ 194
1. BAb и NAb серопозитивност 194
2. Биологични характеристики, влияещи върху антилекарствени антитела срещу интерферон-бета 198
3. Инхибиране на ендогенния интерферон от антилекарствени антитела 198
4. Безопасност при поява на антилекарствени антитела 200
5. Влияние на тютюнопушенето върху антитялообразуването на антилекарствени антитела 200
6. Титър на неутрализиращи антитела срещу интерферон-бета 201
7. Антилекарствени антитела срещу интерферон-бета в юношеска възраст 204
8. Алгоритъм за приложение в практиката 206
VIII. ИЗВОДИ 207
IX. ПРИНОСИ 209
1. Приноси с оригинален характер: 209
2. Приноси с потвърдителен характер: 209
3. Приноси с приложен характер: 210
X. БИБЛИОГРАФИЯ 211
НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 232
SUMMARY 233

СПИСЪК С ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АПК – антигенпредставящи клетки

БПМ – базичен протеин на миелина

ГСТН – главна система на тъканна несъвместимост

КМБ – кръвно-мозъчна бариера

МС – множествена склероза

МРТ – магнитнорезонасна томография

ЦНС – централна нервна система

AAN – American Academy of Neurology – Американска академия по неврология

ARR – Annualized relapse rate – годишна честота на пристъпите

BAbs – Binding antibodies – свързващи антитела

CDMS – Clinicaly defined MS – клинично сигурна МС

CIS – Clinically isolated syndrome – клинично изолиран синдром

CPE – Cytopathic effect assay – цитопатологичен (цитопатен) анализ

CSF – Cerebrospinal fluid – цереброспинална течност

DIS – Dissemination in space – разпространение в пространството

DIT – Dissemination in time – разпространение във времето

DMD – Disease-modifying drugs (therapies) – модифициращи хода на заболяването медикаменти

DP – Disability progression – прогресия на инвалидността

EAE – Experimental autoimmune encephalomyelitis – експериментален автоимунен енцефаломиелит

EDSS – Expanded disability status score – разширена скала за оценка на инвалидността

EFNS – European Federation of Neurological Societies – Европейска федерация на неврологичните дружества

ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay – ензимосвързан имуносорбентен анализ, имуноензимен анализ

GA – Glatiramer acetate

Gd – Gadolinium – гадолиний

HLA – Human leukocyte antigen – човешки левкоцитен антиген

HRP – Horseradish peroxidase – пероксидаза от хрян

IFNβ – Interferon-β – интерферон-бета

IFNAR – Interferon receptor – интерферонов рецептор

Ig – Immunoglobulin – имуноглобулин

IL – Interleukin – интерлевкин

IM – Intramuscular – интрамускулен

ISGs – Interferon stimulated genes – интерферонстимулирани гени

ISRE – Interferon stimulated response element – елементи, резултат от стимулиране на интерферона

IU – International units – международни единици

IVIg – Intravenous immunoglobulin – интравенозен имуноглобулин

IVMP – Intravenous methylprednisolone – метилпреднизолон интравенозно

LAS – Luciferase assay system – луциферазагенерирана биолуминисценция

LCPS – Luminescent counts per second – луминисцентно изброяване за секунда

LU – Laboratory unit – лабораторна единица

mRNA – messenger ribonucleic acid – информационна РНК

MS – Multiple sclerosis – множествена склероза

MHC – Major histocompatibility complex – молекули на главния комплекс на тъканна съвместимост

MSCRG – Multiple Sclerosis Collaborative Research Group – Група за сътрудничество и проучвания по въпросите на множествената склероза

Mx1 – Myxovirus resistant gene – миксовирусрезистентен ген

MxA – Myxovirus resistance protein – миксовирусрезистентен протеин

MRI – Magnetic resonance imaging – магнитнорезонансно изобразяване

NAbs – Neutralizing antibodies – неутрализиращи антитела

NABINMS – Neutralizing antibodies in multiple sclerosis – европейско проучване за изучаване на NAbs при МС

NU – Neutralizing unit – неутрализираща единица

NICE – National Institute of Clinical Excellence – Национален институт по клинично превъзходство

NK – Natural killer cells – естествени клетки убийци

OAS – Ologoadenylsynthetase – олигоаденилсинтетаза (антивирусен ензим)

RIS – Radiology Isolated Syndrome – радиологично изолиран синдром

PML – Progressive multifocal leucoencephalopathy – рогресивна мултифокална левкоенцефалопатия

PPMS – Primary Progresive MS – първично прогредиентна (прогресираща) МС

RRMS – Relapsing-remitting multiple sclerosis – пристъпно-ремитентна множествена склероза

RR – Relapse rate – честотата на пристъпите

SPMS – Secondary progressive MS – вторично прогредиентна МС

TRAIL – Tumor necrosis factor – related apoptosis-induced ligand – туморнекротизиращ фактор, свързан с апоптозата индуциран лиганд

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Множествената склероза (МС) е хронично заболяване с непредвидим естествен ход. С напредване на давността му подлежащите възпалителните процеси реципрочно отстъпват на дегенеративните. Въпреки изменчивата и многолика природа на множествената склероза терапевтичните възможности се разширяват в резултат на придобиването на нови знания относно сложната патогенеза на заболяването.

Лечението с рекомбинантен интерферон-бета е първото одобрено имуномодулиращо лечение и до момента е най-разпространеното в света. Профилът на безопасност на медикаментите, базирани на интерферон-бета, е благоприятен и при дълготрайна употреба. Въпреки това и независимо от натрупаните доказателства за ефективност, няма ясен отговор защо при до 50% от пациентите с пристъпен ход на болестта липсва ефект от лечението – нонреспондери (неотговарящи). Разграничаването на пациентите с добър терапевтичен отговор изисква клинично проследяване за относително дълъг период от време. Това изчакване носи риск от натрупване на инвалидизация. Ето защо е необходимо тези болни да се идентифицират възможно най-рано и да получат алтернативна терапия. Това разграничаване на отговарящи и неотговарящи на лечението предполага наличие на надежден(ни) биомаркер(и) за ефекта от терапията. Въвеждането на надеждни предиктори ще помогне за адекватния избор, респективно за промяна, при необходимост, на лечението при всеки пациент.

Възникването на антилекарствени антитела срещу биологични продукти е добре известен факт. Пациентите, които изработват антилекарствени антитела срещу биофармацевтични продукти, се наричат „имунофармакологични нонреспондери“. Част от пациентите, лекуващи се с интерферон-бета, образуват антилекарствени антитела, които са причина за намален или липсващ клиничен отговор.

До момента не е провеждано изследване на антилекарствени антитела сред пациентите с множествена склероза в нашата страна и не е анализирана връзката им с провежданото интерфероново лечение.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Множествена склероза

Множествената склероза е заболяване на централната нервна система (ЦНС), характеризиращо се с имуномедиирана деструкция на миелина, астроглиоза, вариабилна по степен аксонопатия и хетерогенност в клиничната картина с пристъпно-ремитентен или прогредиентен ход на протичане. През 1868 г. Jean Martin Charcot описва клиничните и патоанатомични характеристики на МС, но все още не са изяснени етиологичните фактори, които предизвикват заболяването, както и точните механизмите на развитие. МС засяга повече от 2,5 милиона души в целия свят (34). След травматичните увреждания на нервната система МС е основна причина за двигателната инвалидизация при хора в млада и средна възраст. Животът на болните с МС е с намалена продължителност средно със 7 години, а поразяването на хора в активна възраст и хроничната инвалидизация обуславя социално-икономическата тежест на болестта (138).

ПАТОГЕНЕЗА

Въпреки неясната етиология на заболяването, известно е, че податливостта към него е обусловена от различни фактори – генетични и свързани с околната среда.

Разпространението на МС в света е неравномерно. Епидемиологични проучвания описват ефекта на географската ширина върху риска от развитие на МС. Честотата на МС е по-висока в региони над 42^{o} на север и на юг от Екватора (99). Миграционни проучвания сочат, че лица, променили своето местоживеене преди 15-та си година, приемат риск, близък до типичния за новата страна, в която са се установили (46,61,93). МС е по-рядко срещано заболяване сред чернокожото население на Африка. Рядко боледуват циганите, азиатците, американските индианци, австралийските аборигени и новозеландските маори. Болестността е с ниска степен на разпространение и в Япония и Корея. У нас са установени райони на клъстиране (струпване) на болни, вероятно резултат от групиране на няколко рискови фактора (3). Предразположението към МС зависи от пола. МС е по-честа при жените, като съотношението жени/мъже е приблизително 2:1. Съществуват проучвания, които показват, че полът вероятно взаимодейства със системата на

тъканната съвместимост, тъй като честотата на HLA-DR2 е значително по-висока при жените, отколкото при мъжете.

Има голям брой проучвания, които сочат съществуването на връзка между алелите на системата HLA и МС, което е директно доказателство в полза на генетичното влияние. Предразположението към МС е под контрола на няколко гена, намиращи се вътре и извън главната система на тъканната съвместимост (ГСТС). Рискът за заболяване от МС е много по-висок за роднини на болните, отколкото за общата популация (45). Този риск зависи от степента на роднинската връзка, като е по-висок при роднински връзки от първа степен. Налице е 20 – 39% конкордантност между монозиготни близнаци (115,183). Това отговаря на полигенен модел на унаследяване и означава, че някои или всички гени, отговорни за възприемчивостта към (развитието на) МС, имат рецесивен модел на унаследяване. Генетичната предразположеност е идентифицирана посредством популационни проучвания, проучвания на определени гени и секвениране на целия геном. Така се установява генетичната предразположеност, свързана с HLA клас II алели (DRB1*1501, DRB5*0101, DQB1*0602) (117), установени специфични алели – IL2 IL7 рецептори (81). Идентифицирани са няколко гена, свързани с МС, включително CLEC16A, TNFRSF1a (CD120a), IRF8, RPL5/EVI5, CD226, TYK2, CD6, CD40 (9) и над 45 нови алелни варианта, свързани предимно с имунната система (37). HLA играе централна роля в антигенната презентация на Т-клетките, както и на много гени, свързани с имунната система. Вероятно е двата механизма на антигенната презентацията и имунната дисрегулация да са в основата на развитието на множествена склероза.

Генетичната предразположеност само частично обуславя възникването на заболяването. Необходими са допълнителни фактори на околната среда, които да отключат болестта при генетично предразположени индивиди.

Предполага се, че множество инфекциозни агенти, като вируса Ebstein Barr, човешкия херпесен вирус 6, вирусът на кучешката чума, човешкия ендогенен ретровирус (HERV) и хламидията, играят такава роля. Никой от изброените агенти не е изследван в подходящи проучвания (70). Въпреки неубедителните резултати излагането на инфекциозни агенти (или поредица от такива) в уязвима възраст понастоящем се счита за фактор, способстващ възникването на МС при индивиди

със специфично генетично предразположение. Други „обвинявани“ фактори от околната среда са: намалена експозиция на слънчева светлина и ултравиолетова радиация и/или дефицит на витамин D. Това се подкрепя от установените данни за имуномодулаторна роля на тези фактори по отношение на възпалителния компонент при МС (112). Множество епидемиологични данни сочат, че тютюнопушенето сигнификантно увеличава риска от развитие на МС (112). Точният подлежащ механизъм е неясен, но някои съставки на тютюневия дим упражняват ефект върху имунната функция и могат да нарушат клетъчномедиирания и хуморалния имунитет, като това повлиява възпалителния отговор при МС. Напоследък натриевата диета се счита за предполагаем фактор от околната среда за увеличена активност на заболяването, вероятно поради индуциране на патогенетичните Т17 лимфоцити (48).

Съвременните схващания за имунопатогенезата на МС се базират на данни от експерименти при животни и изследвания при хора и са основани на връзката между възпалението и дегенерацията. Съществуват теории, според които възпалението причинява невродегенерация. Други автори твърдят, че възпалението и невродегенерацията участват в цикъл, потенцирайки се взаимно. Съществуват и схващания, че възпалението протектира невродегенерацията (127). В зависимост от загубата на протеин локализацията и обемът на плаките, олигодендроцитната деструкция, имунопатологичните доказателства за активацията на комплемента са представени 4 различни патерна на демиелинизация (105). Патерн I е свързан с Т-клетъчна и макрофагмедиирана демиелинизация, патерн II – с антитяло/комплементмедиирана демиелинизация. патерни I и II доминират при RRMS. Патерн III показва олигодендроцитна дистрофия, докато патерн IV корелира с прогредиентната форма без активност (PPMS) и първични олигодендроцитни дегенерации, имащи белези, близки до вирусни инфекции или токсична олигодендроцита увреда, но не и автоимунна такава (105).

Допускат се два главни механизма при отключването от инфекция на множествена склероза и автоимунния процес срещу миелиновия компонент. Една възможност за начална активация на автореактивните Т-клетки е чрез „молекулна мимикрия“ , т.е. активация на автореактивни клетки чрез кръстосана реактивност

между собствени и чужди антигени и чрез активация, но породена от неспецифично възпаление, възникващо по време на инфекцията (168).

Епитопното представяне води до повече антигени, които могат да индуцират имунен отговор и прогресия на МС (179).

Миелинспецифичните CD4+ Т-клетки, както и увеличените CD8+ се считат за инициатори на заболяването както при МС, така и при ЕАЕ. Преминаването на тези инфламаторни клетки в ЦНС е решаващо в патогенезата на МС. Адхезионните молекули и взаимодействието на хемокините с техните рецептори е от съществено значение за придвижването им към мястото на възпалителния процес. Антигенът (VLA-4) върху повърхността на Т-клетките и съдово-клетъчните адхезионни молекули-1 (VCAM-1) върху мозъчния съдов ендотел са важни в регулацията на лимфоцитната адхезия и миграцията през КМБ за възникване на плаки (30). Съществуват данни, че рецепторите за хемокини CXCR3 и CCR5 са важни за възникването на възпаление в ЦНС при МС (7). Поддържащи компоненти – матриксни металопротеинази: ММР-7, ММР-9, ММР-2, ММР-12, ММР-14 увеличават пермеабилитета на КМБ при МС, а по този начин и миграцията на инфламаторни клетки към ЦНС (133).

Интерферон-гама (IFN-γ) и тумornекротизиращ фактор-алфа (TNF-α), продуцирани от CD4+ Т-хелперите са главните ефекторни цитокини, които упражняват различни ефекти при МС и ЕАЕ. IFN-γ екзацербира МС, макар да показва протективен ефект при модел на ЕАЕ при плъх. Свръхекспресията на TNF-α предизвиква демиелинизация и невродегенерация при ЕАЕ, докато неутрализицията на TNF-α има протективна стойност, но при МС неутрализацията на TNF-α води до екзацербация (102).

Цитотоксичните CD8+ Т-клетки са свързани с аксонната увреда, която възниква рано в хода на болестта (173), но поради компенсаторни механизми в ЦНС това не се манифестира, докато не се достигне до критичен праг на аксонна загуба (35). Цитотоксичните CD8+ Т-клетки могат да идентифицират антигени, които се презентират от HLA I молекули и микроглия. Това от своя страна води до продукция на цитокини, като се стига до смърт на неврони и олигодендроцити.

Микроглията се счита за постоянно съществуваща в ЦНС, като може да пролиферира при активация, което води до положителна регулация на MHC молекули и секретирането на цитокини, хемокини, азотен оксид и реактивен кислород (18). Астроцитите продуцират екстрацелуларни матриксни молекули. Астроцитите могат да бъдат стимулирани от възпалителни фактори да пролиферират и мигрират към местата на увреда, за да формират глиален цикатрикс (128).

Хуморалният имунитет също играе роля в патогенезата на МС чрез интратекална синтеза на антитела и моноклонално В-клетъчно увеличение. Установено е, че антитела, продуцирани от В-клетки в цереброспиналната течност при CIS (клинично изолиран синдром) и болни от МС, взаимодействат с аксоните в остри МС лезии. Миелин олигодендроцитният гликопротеин (MOG) е таргетен миелинов антиген както за хуморалния, така и за клетъчния имунен отговор (140).

Автоантителата могат да действат синергично с Т-клетките, като предизвикват по-нататъшна деструкция на миелина и олигодендроцитите.

В заключение, процесите, отговорни за възникването на остри възпалителни лезии в ЦНС, започват в периферията с активирането на автореактивни лимфоцити CD4+T от фенотип Th1 и Th17 от досега неизвестен(ни) антиген(и). Веднъж активирани, те преминават през КМБ. В ЦНС се реактивират от локални антигени и активират допълнително В-клетки, миелоид и натурални клетки убийци. Възниква възпалителен процес, ангажиращ всички имунни клетки, водещ до демиелинизация и увреда на аксони (187). В-клетките имат своята съществена роля във възпалителните процеси с продукция на антимиелинови антитела или антитялозависима цитотоскичност. Увреда може да възникне и без участието на антигенспецифични механизми – с инфилтрация на макрофаги или реактивиране на микроглия, техните токсични продукти, компоненти на комплемента и фагоцитна активност. Регулаторните клетки от своя страна могат да секретират големи количества невропротективни фактори, които да подпомагат възстановяването.

Аксонната увреда и загуба са в основата на трайната неврологична инвалидизация при МС. Продължава да се дебатира дали невродегенерацията е причинена от възпалението, или е изцяло независим процес.

КЛИНИЧЕН ХОД

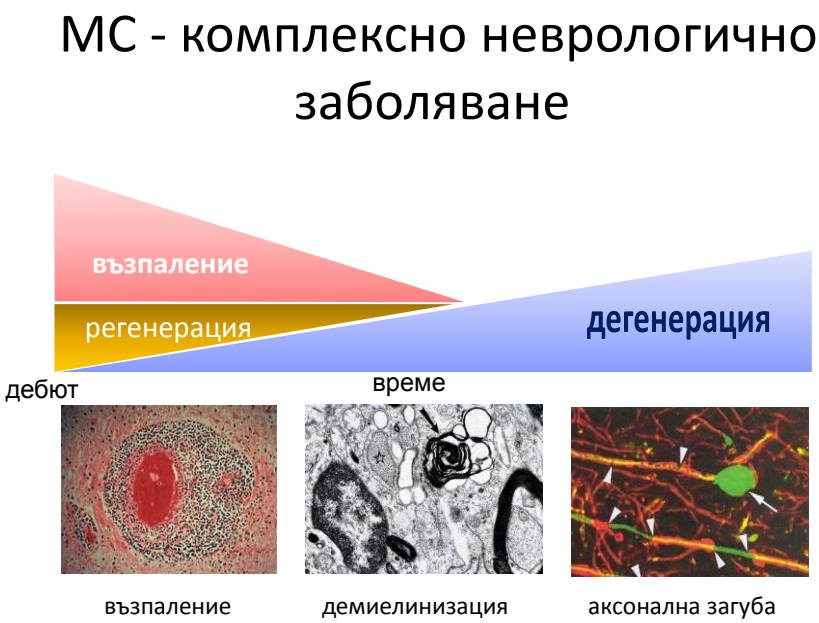
Множествената склероза е болест предимно на младите хора. Средната възраст, при която се появяват първите симптоми, е около 30 години. Значително по-рядко началото е преди 15-годишна възраст и след 50 години. При повечето болни МС започва преди навършването на 40-годишна възраст с разнообразни клинични симптоми като моно- или полисимптомно оплакване. Следващите пристъпи се появяват с различна честота, но в повечето случаи болните развиват постепенно трайни неврологични разстройства. При дебют над 40 – 50-годишна възраст най-често се наблюдават хронично прогресивно развиващи се симптоми от миелона.

МС може да засегне всяка част на ЦНС и показва голямо разнообразие от клинични симптоми. Разпространението на плаките на демиелинизация обаче показва известна специфичност, така че някои симптоми са по-чести.

Развитието на първите симптоми при МС може да варира от остро, почти инсултообразно, до бавно, постепенно прогресиращо за месеци и години. При повече от половината болни оплакванията се развиват подостро от няколко дни до няколко седмици. Някои симптоми, изглежда, възникват по-често в началото на заболяването в сравнение с други. Повечето автори считат, че такива са сетивните и двигателните нарушения, невритът на зрителния нерв и синдромите, свързани с малкия мозък и мозъчния ствол. Много често обаче при внимателно снета анамнеза се откриват предишни епизоди или „неспецифични“ оплаквания – умора, невропатна болка, депресия и други емоционални проблеми, тазоворезервоарни нарушения, включително сексуални, чувствителност към топлина, интолеранс към физически упражнения, когнитивни нарушения, нарушение на съня, включително сънна апнея, и други.

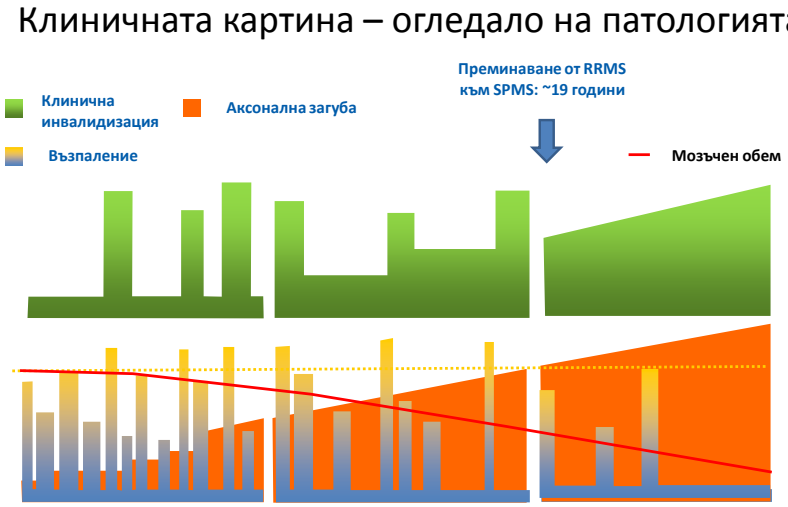
Множествената склероза има сложна патогенеза и клиничната картина е огледало на подлежащите патологични процеси и процесите на регенерация. В началото компенсаторните възможности на организма прикриват реалната глобална картина на заболяването, но с изчерпването им множество дисфункции стават очевидни, отразявайки се на качеството на живот на пациентите.

Фигура 1. Патогенетични процеси в хода на болестта



Множествената склероза е хронично заболяване с успоредно протичащи възпалителни и невродегенеративни процеси. В началото преобладават първите. Аксонната загуба и невродегенерация също се установяват рано в хода на болестта и водят до невъзвратим неврологичен дефицит. Мозъчната атрофия е маркер за невроаксонна загуба, дължаща се на демиелинизацията и невронната патология.

Фигура 2. Клиничен праг при множествена склероза – айсбергов модел



Неврологичният резерв представлява капацитетът на ЦНС да компенсира субклиничните неврологични увреди без загуба на неврологична функция. Съществуват активни (когнитивен резерв) и пасивни (мозъчен резерв) компоненти на неврологичния резерв. При множествената склероза неврологичният резерв се изчерпва с времето. Това е свързано с възможността на мозъка да възстанови функция след неврологична увреда, от която произлиза неврологичната инвалидизация (подлежащи биологични процеси).

Клиничният ход на множествената склероза е много вариабилен и непредвидим. Доскоро са разграничавани четири основни фенотипа: пристъпно-ремитентен ход, вторично прогредиентен, първично прогредиентен и прогресивнопристъпен.

Идентифицирането на допълнителни фенотипове, като клинично изолирания синдром (CIS), и напредъка в разгадаването на клиничните, патологичните и невроизобразяващите аспекти на заболяването довеждат до преразглеждане на дефинициите за клиничните формите на болестта през 2013 г. от експертен комитет, наречен „МС фенотипна група“ (MS Phenotype Group). В процеса по преразглеждане са включени активността на болестта и прогресията (104). По този начин се улеснява комуникацията между специалистите и се постига стандартизиране на описанието на заболяването, включвайки оценка на магнитното изобразяване и биомаркери, които до този момент не са били вземани под внимание. Тази осъвременена терминология ще помогне в изготвянето на по-добри дизайни на клинични проучвания и по-добро лечение на пациентите. Така се отрежда по-голяма роля на магнитнорезонансното изобразяване в диагностиката и мониторирането на хода на болестта и използването на мозъчния обем като маркер в определяне на отговора към лечението.

Заболяването МС се класифицира в три категории: пристъпно-ремитентна (RRMS), първично прогресивна (PPMS), вторично прогресивна (SPMS). Терминът „клинично изолиран синдром“ (CIS) описва първата клинична проява, сочеща възпалителна демиелинизация, която може да бъде МС, но все още не покрива критериите за дисеминация във времето – клинично или чрез МРТ.

Всяка категория съдържа субкласификация, базираща се на наличие на активност и/или прогресия. Активност при пациенти със CIS или всеки друг подтип на МС се определя с клиничен пристъп или възникване на установими с МРТ нови Т2 лезии, увеличение на Т2 лезиите или Gd усилващи се лезии през последния едногодишен период. Пациентите PPMS и SPMS могат да бъдат активни и неактивни и са препоръчва прилагането на допълнителни модификатори за установяване на данни за наличието на прогресия, независимо от релапсите. Така се установяват 4 фенотипни категории на заболяването с установени модификатори за прогресивните форми.

Фигура 3. Фенотипните дефиниции – пристъпни форми



*Активност = клиничен пристъп и/или МРТ (Gd-усилващи се лезии; нови/увеличени Т2 лезии)

В случаите, когато не е оценен клиничният ход на множествената склероза, се приема терминът „неопределен“. Радиологично изолиран синдром (RIS) не трябва да се счита за МС, когато пациентите нямат клинични признаци и симптоми. Прогресивнопристъпна форма на МС е елиминирана, такива пациенти се категоризират като първично прогредиентна (прогресираща) форма на заболяването с активност.

Първично прогредиентна МС е част от спектъра на прогресиращо заболяване, като различията с другите форми са относителни, а не абсолютни.

Фигура 4. Фенотипните дефиниции – прогресивни форми



Експертният комитет, предложил фенотиповете МС, препоръчва провеждането на магнитно изобразяване веднъж годишно при пациентите с пристъпна форма, като не се изключва по-често изобразяване с цел мониториране на активността на болестта, което може да подпомогне вземането на терапевтични решения. В специфични ситуации се допуска по-кратко или по-дълго време на наблюдение. Прогресията се оценява с клинично изследване най-малко веднъж годишно. Все още липсва консенсус относно колко често е уместно да се прави магнитнорезонансно изобразяване при прогредиентните форми.

В случаите, при които не е направена оценка на активността и прогресията, те се приемат за „неопределени“.

Преразглеждането на дефинициите на клиничния ход на болестта доуточнява и термините, описващи фенотиповете. Терминът „влошаване“ е за предпочитане пред „напредване“, за да се опише пациент с пристъпно заболяване, чието

състояние еволюира поради чести рецидиви или непълно възстановяване. Налице е и преразглеждане на термина „прогресия на заболяването“, като се запазва за тези пациенти в прогресивна фаза, при които са налице доказателства за постепенното влошаване с течение на времето. Терминът „потвърдено влошаване“ на оценката по скалата EDSS за определен период от време е за предпочитане пред „продължително влошаване“. Често се злоупотребява с употребата на термините „доброкачествена“ и „злокачествена“ форма на заболяването, затова те трябва да се използват с повишено внимание – само като ретроспективна оценка.

Необходими са допълнителни изследвания за по-точно определяне на фенотипа на заболяването. Такива биха могли да бъдат: релевантно невроизобразяване и наличие на биологични маркери, които достоверно да опишат или предскажат хода на заболяването. До този момент такива не съществуват. За определяне на активността е необходимо проследяване за определен период, напр. една година. Активността се изразява в пристъпи – остра или подостра поява на нови или влошаване на съществуващи неврологични симптоми с пълно или частично възстановяване, при отсъствие на температура или инфекция. Активността се доказва и чрез магнитнорезонансно изобразяване – поява на контрастно усилващи се Т1 хиперинтензни (светли) лезии или поява на нови или разширени Т2 хиперинтензни лезии.

За да се приеме прогресираща форма на МС, оценката отново се извършва за определен период от време, например една година. Клиничната изява на прогресията означава непрекъснато увеличаваща се и обективно документирана неврологична дисфункция/инвалидност без пълно възстановяване (допустима е поява на флуктуации и фази на стабилност). Не са дефинирани стандартни МРТ параметри, но увеличеният брой и обем на Т1 хипоинтензни лезии и загубата на мозъчен обем са съответстващи на описаната патология.

Прогресията на болестта се определя по скалата EDSS (Expanded Disability Status Scale), която оценява неврологичните симптоми в осем функционални системи. Скалата е 10-бална (0 – напълно нормален неврологичен статус, 10 – смърт). Непълното обратно развитие на оплакванията при пристъп може да доведе до акумулиране на инвалидизация. Най-значимият фактор за увеличаване на

инвалидизацията е трансформирането на заболяването от пристъпна към прогредиентна форма, което обичайно се случва след около 15 години от началото, когато оценката по скалата EDSS се променя от 3 към 5 (145). Прогресиращата форма на заболяването вероятно отразява прага на изчерпване на функционалния резерв, над който всяка по-нататъшна неврологична увреда води до необратим и прогресивен дефицит.

ФАКТОРИ, ПОВЛИЯВАЩИ ЗАБОЛЯВАНЕТО

Поради разнообразния и непредвидим ход на болестта индивидуалната прогноза е несигурна. Въпреки това няколко демографски, клинични и магнитнорезонансни характеристики се открояват като неблагоприятни прогностични фактори, водещи до бърза прогресия и конверсия от CIS към клинично сигурна МС.

Таблица 1. Клинични прогностични фактори

Клинични Прогностични Фактори

Благоприятни	Неблагоприятни
• Женски пол • Дебют в по-млада възраст (<40 г.) • Бяла раса • Оптичен неврит или изолирани сетивни симптоми като начална презентация • Монорегионално (монофокално) начало • Нечести пристъпи първите 5г. • Дълъг интервал между първи и втори пристъп • Липса или ниска инвалидизация първите 5г. • Високо ниво на vit D	• Мъжки пол • Дебют в по-късна възраст (>40 г.) • Не-бяла раса • Пирамидни, церебеларни, или сфинктерни симптоми като начална презентация • Лошо възстановяване от първия пристъп • Полирегионално начало • Чести пристъпи първите 5г. • Кратък интервал между първи и втори пристъп • Достигане на EDSS 4.0 първите 5г. • Пушене

Таблица 2. Неклинични прогностични фактори

Неклинични Прогностични Фактори

Параклинични	Магнитно-резонансни
• IgG или IgM олигокроналност в CSF • Протеинови биомаркери (напр неврофиламенти в CSF) • Абнормни евокирани потенциали • Геномни фактори	• Високо лезионно натоварване • Лезии в задна черепна ямка или спинални лезии • Контрастно усилване на лезиите • Мозъчна или гръбначномозъчна атрофия • Кортикална патология

Пациенти, при които се налице няколко неблагоприятни прогностични фактора, заслужават специално внимание при подбора на медикаменти за профилактика.

Лезиите при множествена склероза възникват навсякъде в ЦНС, основно в бялото мозъчно вещество. Те са съставени от перивенозни инфилтрати на мононуклеарни клетки, демиелинизирани аксони, намален брой олигодендроцити, напречно пресечени неврони и астроцитна пролиферация, довеждаща до глиоза, която дава името им – „плаки“. Напоследък се установява също така, че сивото мозъчно вещество се увреждa при МС и корелира по-ясно с невъзвратимата инвалидизация (106). Лезиите при МС показват значима хетерогенност в структурен и имунопатологичен план при различните пациенти (105), което предполага, че най-вероятно става дума за не едно заболяване и дава основания някои автори да дефинират множествената склероза като синдром.

Лезиите при МС се визуализират лесно с МРТ и са типични овоидни, в бялото и сивото мозъчно вещество на ЦНС, по-често юкстакортикално, перивентрикуларно, в *corpus callosum*, оптичния нерв, инфратенториално и в миелона. При новосформираните лезии се установява усилване на лезията като коляно или пръстен след приложение на контрастно вещество. Този феномен трае 4 – 6 седмици и отразява нарушената интактност на кръвномозъчната бариера (103). МРТ е мощен инструмент при МС за подкрепа на диагнозата, установяване на

лезионното натоварване и активността на заболяването, като спомага за разучаването на патогенезата, измерва мозъчната атрофия и невронна загуба, установява субклинична активност, проследява прогресията на болестта, мониторира ефекта от терапията, представлява сурогатен маркер и измерва резултати при клинични проучвания. Магнитнорезонансното изобразяване на миелона улеснява диагнозата в някои случаи, подпомага диференциалната диагноза и има прогностична стойност. Комбинираното използване на конвенционални и нови техники на МРТ увеличава значимостта му при управление на МС.

Диагнозата е предимно клинична и се основава на симптоми и признаци, дължащи се на лезии в бялото мозъчно вещество, дисеминирани във времето и пространството, и задължителното изключване на други състояния, които могат да имитират МС. Диагнозата може да бъде подкрепена с ликворен анализ (данни за увеличена концентрация на имуноглобулин или четири и повече олигоклонални фракции при електрофореза), забавени латенции при зрителни, соматосензорни и слухови евокирани потенциали, пролонгирано централно моторно време (възможност за обективизация на клинично неизявена демиелинизация) и типичен резултат при МРТ. Кръвните тестове се използват за изключване на други заболявания, имитиращи МС. Последната ревизия на диагностичните критерии за МС – McDonald 2010, позволява ранна и точна диагноза непосредствено след първия пристъп на заболяването, използвайки опростена дефиниция за дисеминация във времето и пространството, получени от едно-единствено МРТ изобразяване, ако са налице асимптомни Gd усилващи се и неусилващи се лезии.

Таблица 3. Ревизирани критерии на McDonald 2010

	2001	**2005**	**2010**
МРТ критерии за DIS	≥ 3 от: лезии ≥ 9 Т2 или ≥ 1 усилваща се ≥ 3 перивентрикуларни лезии ≥ 1 юкстакортикална лезия ≥ 1 инфратенториална лезия	≥ 3 от: лезии ≥ 9 Т2 или ≥ 1 усилваща се ≥ 3 перивентрикуларни лезии ≥ 1 юкстакортикална лезия ≥ 1 инфратенториална лезия	≥ 3 от: лезии ≥ 9 Т2 или ≥ 1 усилваща се ≥ 3 перивентрикуларни лезии ≥ 1 юкстакортикална лезия ≥ 1 инфратенториална лезия
	1 лезия в миелона може да замести 1 мозъчна лезия	Всякакъв брой лезии в миелона могат да бъдат включени	
МРТ критерии за DIT	≥ 1 усилваща се асимптомна лезия ≥ 3 месеца след CIS	≥ 1 усилваща се асимптомна лезия ≥ 3 месеца след CIS	Асимптомни усилващи се и неусилващи се лезии, едновременно присъстващи по всяко време
	или	или	или
	≥ 1 нова Т2 лезия на изобразяването ≥ 3 месеца след CIS	≥ 1 нова Т2 лезия на изобразяването ≥ 30 дни след CIS	≥ 1 нова Т2 или усилваща се лезия на последващо МРТ изобразяване по всяко време

CIS: клинично изолиран синдром; DIS: дисеминация в пространството; DIT: дисеминация във времето.

ЛЕЧЕНИЕ

Множествената склероза е заболяване със сложен патогенетичен субстрат. То следва свой подмолен ход, поради което ранното лечение и ефективната терапевтична стратегия са почти императивно поведение.

Модифицирането на естествения ход на заболяването чрез намаление на честотата на пристъпите и забавяне на прогресиращата инвалидизация е постигнато за първи път през 1990 г. с първите мадифициращи хода на заболяването медикаменти – интерферон-бета и glatiramer acetate. С постигането на напредък в разгадаването на сложната патогенеза на МС се увеличават и възможностите за разработване на нови терапевтични възможности.

При пристъп се провежда лечение с кортикостероид, независимо от приемането на модифициращо хода на болестта и симптоматично лечение, както и при липса на противопоказания. Кортикостероидите притежават антиинфламаторно, имуномодулиращо и бариеростабилизиращо действие. Освен това упражняват антиедемен ефект и подобряват аксонното провеждане. Кортикостероидите потискат експресията на HLA антигени в АПК и инхибират локалния възпалителен процес. Съществуват данни, че Methylprednisolon намалява интратекалната синтеза на IgG, а също така БПМ и антителата срещу него в ликвора. Пулсионната терапия се свежда до венозно приложение на големи дози Methylprednisolon в дози 1000 mg всяка сутрин за 3 – 5 дни.

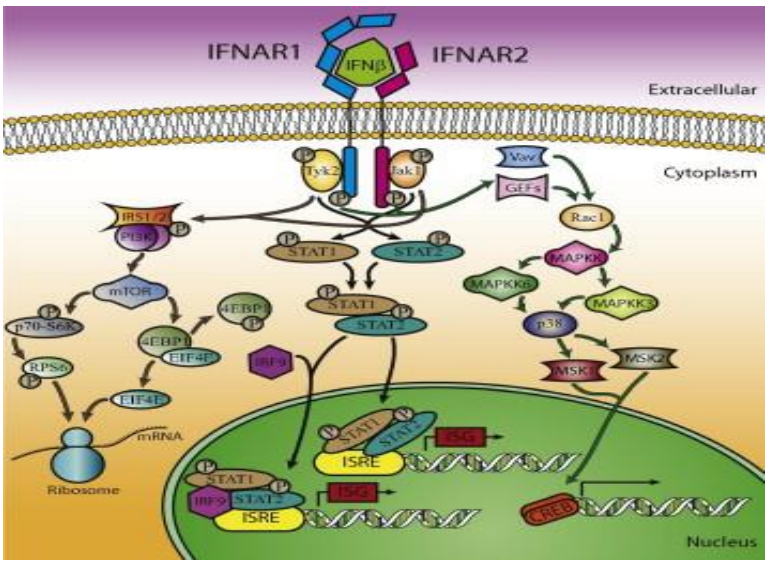
При тежки, неповлияващи се пристъпи е допустимо провеждането на плазмафереза или интревенозна апликация на имуноглобулин (98).

Лечението между пристъпите се провежда с имуномодулатори и имуносупресори. Те са ефективни само при пристъпната форма на МС.

Първата терапевтична генерация се състои от четири инжекционни медикамента, одобрени през 90-те години, за намаляване на броя на пристъпите и забавяне на прогресията на болестта. Те се характеризират с умерен ефект върху активността на заболяването и добре изразена дълготрайна безопасност и поносимост. Приемат са за „базова терапия“.

Интерферон-бета е средство на избор при лечение на RRMS. За първи път е въведен при лечението на МС през 1993 г. като първото имуномодулиращо лечение и все още е най-използваният медикамент в целия свят. Екзогенният IFNβ е рекомбинантен цитокин, използващ същия метаболитен път като естествения IFNβ, включително свързването с рецептора IFNAR (повърхностен рецептор на повечето клетки). Интрацелуларната част на рецептора взаимодейства със специфична молекула Janus kinase/signal, активатор на транскрипционния (Jak/STAT) сигнален път, водещо до индукция или редукция на експресията на голям брой гени, наречени общо „Интерферонстимулирани гени“ (ISGs) (Фиг. 6.). Генните продукти на ISGs, респективно IFNβ, притежават антивирусни, растежинхибиторни и имунорегулаторни функции. Той е бил приложен въз основа на презумпцията за вирусна етиология на МС, като се оказва, че благоприятният му ефект се дължи не толкова на антивирусните му качества, колкото на имуномодулаторните такива. IFNβ подпомага превключването от проинфламаторния Th1 имунен отговор към антинфламаторния Th2 път, увеличавайки продукцията на противовъзпалителни цитокини (като IL-10) и намалявайки продукцията на проинфламаторни цитокини. IFNβ също регулира естествените убийци (NK) Treg и CD56. Тип I IFNs, към които принадлежи IFNβ, са широкоразпространени в човешкото тяло и са част от вродената имунна система.

Фигура 5. Въздействие на интерферон-бета чрез клетъчни рецептори



Взаимодействието на експресираните стотици генни продукти след въздействието на екзогенния интерферон е изключително сложно.

В Европа и САЩ са одобрени две форми на рекомбинантен интерферон-бета: 1a и 1b.

Интерферон-бета-1b (*Betaferon, Extavia)* е негликозилиран, рекомбинантен продукт от бактериални клетки, в които серинът е субституиран от цистеин в 17-та позиция. Лечението се провежда при болни с пристъпна форма на МС с 8 милиона единици (250 μg) със субкутанни апликации през ден. Лечението резултира в редукция на броя на пристъпите с 31%, удължаване на времето до първата екзацербация, увеличаване на броя на болните без екзацербации и намаляване наполовина на появата на средни и тежки пристъпи. Намалява се количеството на лезии, установени чрез МРТ, а също така и на новите и усилени контрастно изменения при серийни МРТ.

Интерферон-бета-1a (Avonex*)* е гликозилиран, рекомбинантен продукт от клетки на бозайници с аминокиселинна последователност, идентична с тази на естествения интерферон-бета. Прилага се интрамускулно при болни с RRMS и лека до умерена инвалидизация веднъж седмично по 6 милиона единици (30 mcg). Честотата на пристъпите се намалява с 32% и при МРТ се установяват по-малко контрастно усилени лезии. Намалява се и прогресията на заболяването.

Интерферон-бета-1a (Rebif) се прилага при пристъпни форма субкутанно 3 пъти седмично по 12 милиона единици (44 mcg). Лечението забавя прогресията на инвалидизация, намалява броя на пристъпите с 32% и значително увеличава броя на болните, които не получават рецидиви. Освен това се намаляват усилените и разширени лезии, установени чрез МРТ.

IFNβ не са доказали ефективност по отношение на прогресията, несвързана с пристъпите в прогредиентните форми на болестта. Това предполага, че ефектът на IFNβ е върху възпалителната компонента на подлежащата патология.

Механизмът на действие на интерферон-бета се свързва с потискане на пролиферацията на автореактивните Т-клетки, инхибиция на експресията на HLA клас II антигените, което води до редукция на антигенното представяне. Освен това

интерферон-бета затруднява миграцията на Т-клетките в ЦНС и индуцира имуносупресивни цитокини.

И двата вида интерферон-бета се понасят много добре. Най-често срещаните странични реакции са втрисане и повишена температура, която се появява след апликацията, но тези реакции преминават след титриране в рамките на 1 – 2 месеца. Понякога се образува зачервяване, инфилтрат и подуване на мястото на поставянето и много рядко – некроза. Възможно е засилване на съществуващи преди приложението: главоболие, спастичност, депресия, менструална дисрегулация, тиреоидни дисфункции, левкопения, лимфопения, покачване на чернодробните трансаминази, което изисква периодични кръвни тестове.

Пегилираната форма на интерферон-бета-1a–Plegridy® има редица предимства. Прилага се 125 μg подкожно и по-рядко – на две седмици. Пегилирането увеличава размера на молекулата, което намалява гломерулната филтрация и увеличава полуживота, подобрява химичната стабилизация и разтворимостта и намалява имуногенността и дегенерацията, защитавайки нативната молекула от имунни въздействия и протеолиза. По-рядкото инжектиране е предпочитано при страх от убождане и в детска възраст (26).

Glatiramer acetat (Copaxone) представлява синтетичен полипептид от четири аминокиселини, който наподобява базисния протеин на миелина (БПМ) и може да предотврати развитието на ЕАЕ.

Механизмът на действие на glatiramer acetat се свързва с индукция на антигенспецифични супресорни Т-клетки. Тези glatiramer acetat специфични Th2 клетки се свързват с HLA клас II молекули на повърхността на антигенпредставящата клетка и вероятно компетитивно изместват миелиновите антигени (БПМ и миелин олигодендроцитен протеин) от връзката им с тях. По този начин glatiramer acetat възпрепятства патологичния имунен отговор с миелинови антигени в ЦНС и ограничава разпространението на автоимунния процес. Освен това glatiramer acetat преминава кръвно-мозъчната бариера и повлиява специфичните Т-клетки да продуцират мозъчен невротрофичен фактор, който ускорява възстановяването на увредените аксони и стимулира ремиелинизацията.

При болни с RRMS на МС ежедневните субкутанни апликации на 20 mg glatiramer acetat в продължение на 2 години забавят инвалидизацията на болните, намаляват сигнификантно честотата на пристъпите, повишава се броят на болните без пристъпи и се удължава времето до следващата екзацербация.

Най-честите странични ефекти на glatiramer acetat са леки реакции на мястото на апликацията. Много рядко те са общи, като обичайно са бързо преминаващи. Вече е наличен и високодозов медикамент – 40 mg, за приложение през ден. Той показва сходни странични реакции и сходна ефективност.

Имуноглобулини. Интравенозното им приложение е терапевтична възможност при различни автоимунни заболявания. Съществуват съобщения, че при PRMS интравенозното прилагане на 0,15 – 0,20 g/kg телесно тегло имуноглобулин веднъж месечно за 2 години намалява инвалидизацията на болните и броя на пристъпите. Според други са ефективни само като „спасителна“ терапия при неповлияващи се от кортикостероиди пристъпи. Имуноглобулините все още не са регистрирани за лечение на множествената склероза поради липсата на достатъчно и достоверни клинични проучвания.

Azathioprine е пуринов аналог, който потиска както клетъчномедиирания, така и хуморалния имунитет. Той потиска развитието на Т-клетките и образуването на антитела. За да се прояви имуносупресивното действие на azathioprine, е необходимо най-малко 6-месечно прилагане. Медикаментът има умерен ефект при болните с МС, като леко забавя прогресията на болестта и намалява честотата и тежестта на пристъпите. Отдалечава се появата на вторичната прогресивна фаза на заболяването. Той не е подходящ за болните с хронично прогресираща форма на заболяването. Azathioprine се прилага в доза 2 – 3 mg/kg за период от 3 до 5 години.

Mitoxantrone е имуносупресивен медикамент. Множество клинични проучвания показват, че mitoxantrone е ефективен за болни с бързо влошаваща се МС и такива с вторично прогресираща форма. Този медикамент има уникални фармакокинетични и фармакодинамични качества, много дълъг плазмен полуживот и притежава широк спектър от имуносупресивни действия. Прилага се в интравенозна инфузия в дози 12 mg/m^2 всеки три месеца. Използва се до две години с кумулативна доза < 140 mg/m^2. В стандартни дози използването му е ограничено

до 2 години поради кумулиране на дозата. След първоначалната широка употреба на mitoxantrone става ясно, че използването му е свързано с по-висока от очакваната честота на кардиомиапатия и отложена остра левкемия, поради което приложението му е ограничено.

Cyclophosphamide се използва от дълго време за лечение на МС предимно в Америка. Независимо от съобщаваните добри резултати и временно спиране на прогресията на МС, поради появата на сериозни нежелани реакции е подходящ за болни с бърза прогресия на заболяването. Прилага се интравенозно веднъж месечно в доза 1g/m^2.

Teriflunamide (Aubagio®) е пуринов аналог с имуносупресивни свойства. Блокира митохондриалния ензим дихидрооротат дехидрогеназа, с което нарушава синтеза на пиримидини. Потиска продукцията на проинфламаторните фактори IL2, TNFα и тирозинкиназната активност. Нарушава свързването на Т-клетките с APC и потиска активирането на ядрения фактор κB. Потиска пролиферацията и активацията на Т- и В-клетките. Има дълг плазмен полуживот, дължащ се на ентерохепатална рециркулация. Пълното елиминиране на лекарството при спирането му може да отнеме от няколко месеца до 2 години (54). Това налага особено внимание при пациентки, планиращи бременност, и при пациенти с проявени сериозни нежелани реакции, напр. хепатотоксичност. В тези случаи прилагането на Cholestyramin или активен въглен може да улесни и ускори елиминирането му в рамките на 11 дни. Тези особености правят teriflunamide малко подходящ при жени в детеродна възраст.

Fingolomode (Gilenya®). Представлява сфингозин-1-фосфатен (S1P) агонист, свързващ се с 4 от 5-те S1P рецепторни субтипа, но действа като функционален антагонист. Fingolimod въздейства върху ключов S1P механизъм, който лимфоцитите използват, за да напуснат лимфните възли. Задържането на лимфоцитите в лимфните възли причинява лека лимфопения и възпрепятства навлизането им в ЦНС, пряко свързано с възникването на плаки. Fingolimod е липофилен – прониква в ЦНС и упражнява невропротективен ефект върху микроглията, която експресира S1P рецептори. Страничните ефекти на fingolimod са отражение на ефекта от причинената лимфопения или са таргетно свързани с

тъканите, които експресират субтипове на S1P рецепторите. Въпреки че са докладвани няколко случая на опортюнистични инфекции по време на лечение с fingolimod, включително прогресивна мултифокална енцефалопантия (PML), по-очаквани са банални вирусни инфекции и особено такива, причинени от varicella zoster virus (VZV). Описани са дисеминирани инфекции от VZV на фона на лечението. Тъй като fingolimod има значим ефект върху гладката мускулатура на сърцето, той е противопоказан при пациенти, които са преживели пристъп на исхемична болест на сърцето в последните 6 месеца, имат симптоматична мозъчно-съдова болест, сърдечна недостатъчност, AV блок II или III степен или синдром на болния синусов възел (изключение са случаите, при които на пациенти е поставен пейсмейкър), удължен коригиран QT интервал над 500 ms или провеждащи лечение с клас Ia или III антиаритмични медикаменти.

Фумариновата киселина (Tecfidera®, DMF) е имуномодулатор, използван за лечение на псориазис. Разработен е нов естер с по-малко гастроинтестинални странични явления, който активира ядрения E2 свързан фактор-2 (Nrf2) транскрипционен път. Лимфоцитният брой намалява при 30% от лекуващите се, поради което се препоръчват периодични лабораторни изследвания. Профилът на DMF го прави приложим както за начално лечение, така и при по-късните фази на пристъпните форми на МС.

Natalizumab (Tisabry®) е първото хуманизирано мише моноклонално антитяло, одобрено за лечение на МС. То е селективно насочено срещу α4 субединица на адхезионните молекули Very late antigen 4 (VLA-4), експресирани върху повърхността на лимфоцитите и моноцитите. Natalizumab пречи на взаимодействието между VLA-4 интегрин и неговия лиганд – съдово-клетъчната адхезионна молекула 1 (VCAM-1), в ендотела на мозъчните съдове. Това взаимодействие е необходимо за мигриране на имунни молекули през кръвно-мозъчната бариера, като по този начин циркулиращите лимфоцити не могат да навлязат в ЦНС и да отключат развитието на остри МС лезии. Приложението му се свързва с повишена честота на общите инфекции, но като цяло е добре поносим. Свързва се с риск от развитие на опортюнистична инфекция, основно на мултифокална левкоенцефалопатия (PML). Рисковите фактори за поява на PML са: данни за предходен контакт с JCV (вирусът, свързан с етиологията),

продължителността на лечението с natalizumab и предходна употреба на имуносупресант. Разработена е специфична програма за наблюдение на риска при неговото приложение.

Alemtuzumab (Lemptrada®) е хуманизирано моноклонално антитяло, директно насочено срещу CD52 повърхностния клетъчен маркер на моноцитите и лимфоцитите. Установено е, че еднократен интравенозен курс намалява лимфоцитите, моноцитите, макрофагите, натуралните килърни клетки и особено CD4+ Т-клетките. В-клетките се възстановяват за период от 5 – 6 месеца, но броят на Т-клетките остава намален за повече от 1 година. Терапията се повтаря ежегодно, като от втората година се прилага не в 5, а в 3 последователни приема. Alemtuzumab се свързва с висока ефективност, но и с нежелани реакции, особено вторични автоимунни заболявания, като тиреоидит, идиопатична тромбоцитна пурпура, рядко – синдром на Goodpasure.

2. Антилекарствени антитела

Възникването на антитела срещу медикаменти е добре известен факт при лечение с различни биологични продукти. Повечето такива лекарства са биокопия на физиологично съществуващи цитокини, растежни фактори или хормони. Този феномен е детайлно описан при използване на инсулин (52), фактор VIII (20), еритропоетин (28), ботулинов токсин (78), както и интерферон алфа и бета (5,176). Естествено съществуващи протеини, генетично променени или синтезирани от клетки на небозайник, може да имат едва доловими промени в структурата, които обаче могат да тригерират загуба на имунна толерантност. Степента на изразеност на този феномен зависи от имуногенността на протеина (дефинира се като възможността на протеина да породи имунна реакция срещу себе си). Тези антитела са свързващи или неутрализиращи. 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 се инхибира или неутрализира биологичната му активност. Свързващите антитела (BAb) не повлияват сигнификантно действието на молекулата и затова носят общото название „ненеутрализиращи антитела“. Ненеутрализиращите антитела вероятно имат функцията на носачи, предпазващи от бърза елиминация от циркулацията, и по

този начин увеличават тяхната биоактивност (43) или обратно – при някои молекули увеличават тяхното елиминиране. Всички биофармацевтични продукти, произведени чрез рекомбинантни генни технологии, са потенциално имуногенни.

В последните години молекули или по-големи структури, включени в различни болестни процеси, се таргетират с лечебна цел чрез рекомбинантни антитела (напр. интерлевкин-2 рецептор, В-клетки, Т-клетки, адхезионни молекули и др.). По същество всички тези биологични терапии проявяват имуногенност в различна степен и следователно могат да предизвикват имунна реакция от страна на реципиента. Факторите, допринасящи за имуногенността на биофармацевтиците, са много и включват биохимичните характеристики на молекулата, клетките, използвани за биоинженеринг, замърсяванията по време на производството, формулата, начина на приложение, дозата, продължителността на лечение, както и индивидуалните характеристики на пациенти.

Точният механизъм, генериращ образуването на антитела срещу медикаменти, представляващи рекомбинантен протеин, все още не е добре изяснен (151). При лечението на множествената склероза изработването на антитела срещу интерферон-бета (INFβ) се дължи на нарушение на обичайно съществуващия към собствените антигени имунен толеранс и е свързан с репетитивна антигенна презентация (153), докато възникването на антителата срещу natalizumab е възможно да бъде ранна алергична реакция тип I още при започване на лечението (IgE антитяломедиирана) или късна, тип III алергична реакция (84).

Образуването на антилекарствени антитела може да намали или анулира биоактивността на рекомбинантния протеин, откъдето терапевтичният ефект на лекарството да бъде съществено редуциран. В повечето случаи последиците от неутрализиращите антитела се ограничават до блокиране на лекарството, въпреки че при изработване на антиеритропоетинови антитела са описани животозастрашаващи епизоди поради проява на кръстосана реактивност на антитела срещу нативни протеини, водещи до червеноклетъчна аплазия.

Неблагоприятният ефект на неутрализиращите антитела (NAbs) върху клиничния отговор към INFβ при пациентите с множествена склероза е описан още в пилотно проучване на INFβ-1b (42). По-късно се появяват противоречия между

водещи изследователи относно вредния ефект на NAbs върху INFβ. Напълно различни мнения относно приложението им в клиничната практика се изразяват в Европейското ръководство за приложение на изследването на анти IFNβ антитела (EFNS Task Force) (161) и становището на работната група на Подкомитета за терапевтични и технологични измервания на Американската академия по неврология (77). През 2010 г. се постига трансатлантически консенсус за изследване на NAbs срещу IFNβ в клиничната практика (131).

2.1. Антиинтерферон-бета антитела

Интерферон-бета е ендогенен цитокин, който се секретира от различни клетки – Т-клетки, В-клетки, макрофаги, ендотелни клетки, фибробласти, като отговор към микроби, по-специално вируси и бактерии. Променя експресията на няколкостотин гена и това води до антивирусен, антипролиферативен ефект и имунорегулаторна активност. Активността на интерферон-бета може да бъде медиирана от други цитокини (19). Ниски нива на естествено възникващи антитела директно срещу цитокините са намерени в циркулацията на индивиди, които никога не са били подлагани на биологично лечение, като се счита, че имат ригулираща роля за интензитета и продължителността на имунния отговор (14). Като повечето биологични продукти, IFN също така индуцира образуването на антитела. Въпросът с антителата срещу IFNβ възниква от фаза I и II проучвания за лечение на различни карциноми. Възникването на антитела е открито в тези проучвания, а първото подробно съобщение за IFNβ индуцирани NAbs при множествена склероза е от 1996 г. (90). Съгласно приложения анализ in vivo са разпознаваеми различни класове антитела: свързващи антитела (BAbs) и неутрализиращи (NAbs). Първите се свързват с интерфероновата молекула и може да не повлияят на функцията ѝ, докато неутрализиращите я повлияват in vitro най-вероятно чрез възпрепятстване на свързването на IFNβ с IFN рецепторите (INFAR) на клетките. Образуването на свързващите антитела е характерно за повечето пациенти, докато неутрализиращите – за много по-нисък процент от получаващи лечение с IFNβ (143).

Рано появяващите се антитела (Ig M и Ig G) имат нисък афинитет и разграничаването на свързващи от неутрализиращи е възможно по-скоро количествено, отколкото качествено. Разграничаването им е по свързващия им

капацитет, а не толкова по епитопната спецификация (13). Интересен е фактът, че свързващите антитела и in vitro неутрализиращата активност в серума възникват едва след тримесечно приложение на интерферон. Тези неутрализиращи антитела с нисък афинитет се свързват обратимо и може да играят защитна роля към молекулата на INFβ, като я предпазват от разрушаване и консумиране. Ето как тези антитела удължават полуживота на INFβ и засилват ефекта на инжектирането на INFβ. С увеличаване на времето за приложение се стига до узряване – повишаването на афинитета и свързването на антителата става необратимо, като анти INFβ антителата се превръщат в неутрализиращи (64). Свързващи антитела BAbs се установяват при 50 – 80% от лекуваните пациенти (39,150). Причината, поради която някои пациенти изграждат NAbs, а други – само BAbs, остава неясна. Тези, които изработват NAbs (но невинаги), имат по-висок титър на BAbs, което показва качествено различие между NAbs и BAbs: BAbs се свързват с по-нисък афинитет към интерфероновата молекула, отколкото NAbs (64).

Все още е налице противоречие по отношение на значимостта на тези антитела при пациенти с множествена склероза и справянето с тях (69,82). В някои проучвания се установява намаление на терапевтичния ефект при наличие на неутрализиращи антитела, които възникват при 2 – 45% в зависимост от използвания продукт. При пациентите, положителни на неутрализиращи антитела, е налице по-висока годишна честота на пристъпите, по-голяма активност при магнитнорезонансното изобразяване и по-висок процент на прогресия на заболяването. Неутрализиращите антитела могат да бъдат установени най-рано 3 месеца след започване на лечението, но обичайно възникват между 6-и и 18-ти месец. Свързващите антитела възникват по-рано.

Имунологични механизми, обуславящи възникването на BAbs и NAbs

Имуногенността на IFNβ не е напълно изяснена. За разлика от класическата реакция към чужд белтък след еднократно приложение, антителата срещу IFNβ са причинени от грешка на имунния толеранс към собствени, нормално съществуващи антигени. Собствените антигени трябва да бъдат представени в репетитивен порядък, преди имунният толеранс да бъде нарушен. Съществуват няколко фактора, влияещи върху производството на неутрализиращи антитела при приложението на рекомбинантен INFβ. Някои от тях са свързани с пациенти, а други със самия

продукт. Съвременни проучвания показват генетична HLA – свързана предиспозиция за възникването на NAbs срещу INFβ (89). Сравнително проучване сочи, че при пациенти с множествена склероза, лекуващи се с INFβ, е налице по-висока честота на NAbs в сравнение с пациентите с карцином на сходно лечение. Възможно е имунният отговор на пациентите с множествена склероза да бъде по-различен от този при хора с други заболявания (101). Описани е корелации между NAbs и ликворната олигоклоналност (107), автореактивните антитела (антифосфолипидни антитела и антитиреоидит пероксидазни антитела (62), ниските плазмени нива на аполипопротеин Е, както и с пушенето (154).

Факторите, които влияят на възникването на антитела, са неясни, но вероятно включват методите на производство и изчистване, дозата и честотата на администриране и потенциалната хетерогенност на имунния отговор на пациентите с множествена склероза. Аминокиселинната последователност и протеинната структура на продукта, произведен от клетки на небозайник, може да се различават от човешките молекули и да проявят чужди епитопи. Освен това липсата на гликозилиране или разлики в гликопротеините могат да разкрият иначе скрити епитопи или да доведат до по-голяма разтворимост. Препаратите интерферон-бета-1a (INFβ-1a) се синтезират от клетъчна линия на яйчник на китайски хамстер и притежават всички 166 аминокиселини, като са гликозилирани както човешкия ендогенен IFNβ. Специфичният патерн на гликозилиране обаче може да се различава. Интерферон-бета-1b (INFβ-1b) се синтезира от Escherichia colli и има различна аминокиселинна последователност, изразяваща се в изтриване на метионин на позиция 1 и субституиране на серин и цистеин на позиция 17, както и липса на гликозилиране, тъй като бактериите на са в състояние да синтезират захарни молекули. Тези промени го правят по-малко разтворим и по-податлив на агрегация, което води до нуждата от по-високи дози за достигане на подобна на INFβ-1a биоактивност. Освен това липсата на гликозилиране или разлики в гликопротеини могат да доведат до проявяване на иначе скрити епитопи или да обусловят по-голяма разтворимост. Тези различия играят роля в относително високата имуногенност на INFβ-1b в сравнение с INFβ-1a.

Така описаните факти не обясняват обаче различната имуногенност сред продуктите на INFβ-1a. Счита се, че производството е главният фактор,

детерминиращ имуногенността, но дори при един и същи продукт възникват различия. Например след промяна на формулата и процеса на производство на INFβ-1a честотата на NAbs позитивните пациенти пада от 22% на 2%. Намаляване на серопозитивността се установява с въвеждането на новата формула на INFβ-1a (RNF (Rebif44). Имуногенността се влияе и от начина на приложение. Perini и съавтори провеждат проучване, сравняващо INFβ-1b 250 μg (8 MIU) еднократно седмично i.m. срещу подкожно приложение през ден. Процентът на образуване на антитела, както и техният титър са по-ниски в групата с мускулно приложение (60). По-честото приложение на дозата, както и кумулативната седмична доза за подкожно приложение може да повлияят върху възникването на антитела. Друго проучване, сравняващо 22 μg Rebif i.m. веднъж седмично с 22 μg Rebif подкожно три пъти в седмицата, не докладва разлика в честотата на NAbs (15). Други проучвания, третиращи този спорен въпрос за различния начин на приложение (интрамускулно или подкожно), използват различни продукти, поради което резултатите са трудни за интерпретация (142), но общият извод е, че подкожното инжектиране се свързва с най-голяма имуногенност, следвано от интрамускулното и накрая – от интревенозното приложение. Някои популации пациенти са по-податливи на възникване на антиинтерферонови антитела. В неотдавнашно проучване е установено, че пациенти с алели HLA-DRB1*0401 и HLA-DRB1*0408 са с повишена честота на антитела към интерферон-бета (89). Вероятно съществуват и други, все още неизяснени фактори.

Счита се, че използването на серум от телешки фетус, добавката на човешкия албумин в продукта, свойствата на контейнера за съхранение допринасят за формиране на агрегати, което се свързва с изработване на антитела (147). Установено е, че биологичното действие на INFβ-1b in vivo е само 10% от това на INFβ-1a. Следователно INFβ-1b се прилага в приблизително 10 пъти по-висока доза за достигане на еквивалентна in vivo активност.

Ефектът от единичната доза върху образуването на антитела дава противоречиви резултати в различните проучвания (31,42,56,134).

Проблемно е сравняването на различните проучвания в посока честота на NAbs поради различията във възприетите дефиниции за NAb позитивност,

различните използвани тестове за определяне на NAbs, подбраната популация и продължителността на проучванията. В някои проучвания се изисква тестовете за NAbs да бъдат няколко последователни пъти положителни, докато при други един позитивен тест се приема като достатъчен за приемане на NAbs позитивност. В повечето клинични проучвания с INFβ-1b (89,130) пациентите са скринирани директно с тестове за NAbs. Обратно, в проучванията за INFβ-1a са провеждани скрининги за установяване на свързващи антитела и само положителните проби са последващо изследвани за наличие на NAbs (55,146). Интерферон-бета е изследван не само за приложение при пристъпно-ремитентна форма, но и при вторично прогредиентна и първично прогредиентна МС. Наблюдава се разлика в обсервационните постмаркетингови и удължените проучвания за безопасност (safety extension study) спрямо пилотните фаза III проучвания, което не води до изчерпателно обяснение.

Честота на NAbs при използването на различни продукти

Avonex INFβ-1a (30 µg i.m. веднъж дневно) има най-нисък процент на възникване на NAbs – между 2 – 6% (31,91,123). Оригиналната формула, използвана в пилотното проучване, е по-имуногенна от въведените в клиничната практика продукти. Най-вероятно това се дължи на модификация на синтезата, пречистването и самата формула. Процентът на NAbs в проучването EVIDENCE с използване на замразен и сух Avonex е 2% (123). Прилаганият понастоящем Avonex е замразена и суха стъкленица от 30 µg, разтворима в 1 ml стерилна вода или нова, предварително разтворена инжекция от 30 µg в 0,5 ml. Имуногенността на тази нова, предварително напълнена инжекция е изследвана неотдавна. В двугодишно проучване при 2% от пациентите се образуват антитела, което е съпоставимо с предходните изследвания (Табл. 4) (129).

Rebif

Проучването PRIMS използва замразен и сух 22 µg или 44 µg Rebif подкожно три пъти седмично и установява, че при по-ниската доза на медикамента образуването на NAbs е в по-висок процент (12,5% при Rebif44 спрямо 23,7% при Rebif22 след 2 години приложение). С продължаване на наблюдението в края на четвъртата година са докладвани 14% серопозитивни при Rebif44 и 24% при

Rebif22 (55). Пациентите, които са били „лекувани“ с плацебо и са били превключени на Rebif22 μg или 44 μg, имат подобни проценти на NAbs на 3-та и 4-та година (28%), като персистиращите са около 24% в рамото на 44 μg, трикратно приложен в седмицата, и 28% в рамото на 22 μg, приложен също трикратно седмично (116). Проучването OWIMS, публикувано през 1999 г., установява дозозависим патерн – получавалите Rebif44 μg веднъж седмично изработват NAbs по-бързо и са в по-висок процент позитивни до края на проучването. Серопозитивните на NAbs при групата с Rebif22 са 5% в сравнение с 16% при Rebif44. Това проучване обаче е с продължителност само 48 седмици и вероятно е твърде кратко за оценка в динамика на NAbs или техния ефект върху хода на заболяването. В повечето проучвания честотата на NAbs е между 15 и 25%.

С изработването на така наречения Rebif Нова формула (RNF) са положени усилия в полза на намаляване на имуногенността с промяна на начина на производство – без човешки серумен албумин и без ембрионален волски серум. В проучването EVIDENCE са публикувани изследванията на неутрализиращи антитела срещу RNF на 24-та и 48-ма седмица, съответно 2,5% и 14,3% (69). Изследване на серопозитивността на 96-та седмица дава следните резултати EVIDENCE: 17,4% в сравнение с последващото проучване REGARD – 27,3%. Тези данни говорят за по-нисък имуногенен потенциал на RNF (123,110).

Betaferon

Betaferon показва най-висок процент на изработване на NAbs (4,65). В разработката на MC групата от 1993 г. след тригодишно приложение при пациентите с ниска доза на INFβ-1b (1,6 MIU) са налице 47% NAbs, а при тези на високата доза (8 MIU) – 45% (38). През същата година е публикувано и сравнение на интарамускулно и подкожно приложение с 8 MIU, като NAbs се позитивират при 35% при подкожното приложение и 41% при интрамускулното. Следователно не се установява пряка зависимост от дозата или начина на администриране. Повечето по-скорошни европейски проучвания, използващи MxA измерването, показват честота на NAbs от 27,8% при 8 MIU, приложен подкожно.

Таблица 4. Честота на NAbs в пилотни проучвания и проучвания, сравняващи дозата

Проучване	**Продукт/доза**	**Метод на изследване**	**NAb позитивност**	**% позитивни**
Jacobs, et al. 1996 (MSCRG)	30 µg Avonex IM	Не е посочено	Липсва дефиниция	22%
Rudick, et al. 1998 (MSCRG)	Avonex 30 µg IM	CPE	≥ 20 x 1 титър	6%
Jacobs, et al. 2000 (CHAMPS)	Avonex 30 µg IM	CPE	≥ 20 x 1 титър	2%
Clanet, et al. 2002	Avonex 30 µg IM Avonex 60 µg IM	CPE CPE	≥ 20 x 1 титър	2,30% 5,80%
PRISMS 1998	Rebif22 µg SC Rebif44 µg SC	CPE CPE	Титър ≥ 20 в края на проучването	23,80% 12,50%
EVIDENCE 1999	Rebif22 µg SC Rebif44 µg SC	CPE CPE	Титър ≥ 20	5,30% 16,30%
PRISMS 4 2001	Rebif22 µg SC Rebif44 µg SC Rebif22 µg SC от 3 г. Rebif44 µg SC от 3 г.	CPE CPE CPE CPE	Титър ≥ 20 в края на проучването	23,70% 14,30% 27,70% 28,00%
Interferon-β MS Study Group 1996	Betaferon 1.6 MIU SC 8 MIU SC	CPE CPE	1 титър ≥ 20	47% 45%
Interferon-β MS Study Group 1996	Betaferon 1.6 MIU SC 8 MIU SC 8 MIU SC	CPE CPE CPE	2 последователни титъра ≥ 20	42% 35% 41%
European Study Group 1998	Betaferon 8 MIU SC	MxA протеин	2 последователни титъра ≥ 20	27,80%

Сравнение на честотата на NAbs

Честотата на NAbs в пилотните проучвания е представена в Таблица 4. Сравнението на възникването на NAbs между индивидуалните проучвания поставя няколко въпроса. Така например има различия в препоръчителната седмична доза: INF β-1a i.m.(Avonex) 6 MIU в сравнение с 12 MIU INF β-1a s.c. три пъти седмично (Rebif44 μg – общо 36 MIU седмично) и 8 MIU INF β-1b през ден (250 μg Betaferon – общо 28 MIU седмично). Съществува и голяма разлика в терапевтичния потенциал на всеки медикамент, както и в количеството протеин, съдържащ се във всяка доза. Betaferon 8 MIU съдържа 250 μg протеин, Rebif 6 MIU – 22 μg, а Avonex 6 MIU – 30 μg. Специфичната активност на протеина описва връзката между абсолютното тегло на протеина и неговата биологична активност и се измерва в IU/тегло. Специфичната активност на Betaferon е 32 MIU/mg, на Rebif – 253 MIU/mg, на Avonex – 200 MIU/mg (146). Възможно е въпреки въвеждането на тази мерна единица от производителите, препаратите да не са сравними поради използването на различни IFN стандарти. Това се илюстрира от Deisenhammer с директно сравняване на мощта на продуктите с количествено измерване на активността in vivo при пациенти, лекувани с интерферон, и при липса на неутрализиращи антитела. Открива се значително увеличение на експресията на MxA спрямо стойността отпреди лечението с 10 IU/ml Befaferon, което за сравнение изисква 100 IU/ml от Rebif или Avonex за постигане на сходен резултат. Ако това се коригира, отнасяйки се към IFN тегло, Rebif има най-висока специфична активност (наречена 100%), Avonex – 93% от нея и Betaferon – 71% – 80% (146). Сравнението на процентите позитивност на NAb между различните проучвания се оказва много трудно поради прилагането на различни анализи и критерии за определяне на позитивност за антитяло. Затова е важно да се вземат под внимание резултатите от сравнителните проучвания.

Таблица 5. Честота на NAbs в сравнителни проучвания

Сравнителни проучвания	**Продукт/доза**	**Метод на изследване**	**NAb позитивност**	**% позитивни**
Panitch, et al. 2002	Avonex 30 µg IM Rebif44 µg SC	NR	Титър ≥ 20 по всяко време	2% 25%
Ross, et al. 2000	Avonex 30 µg IM Rebif22 µg SC Betaferon 8 MIU	CPE Различните количества IFN променят чувствителността на анализа		Зависи от чувствителността на метода Betaferon > Rebif > Avonex
Bertolotto, et al. 2002	Avonex 30 µg IM Rebif44 µg SC Betaferon 8 MIU	CPE	2 x титър ≥ 20	2% 15% 31%
Kivisak, et al. 2000	Avonex 30 µg IM Betaferon 8 MIU	CPE	Титър ≥ 20	5% 44%

Приблизително 4% от пациентите, лекувани с INFβ, имат неутрализираща активност, немедиирана от антитела, причинена от циркулиращи разтворими INF рецептори (sINFAR), които компетитивно инхибират биоактивността на INF както in vitro, така и in vivo (66). При използване на традиционните анализи тези пациенти са NAbs позитивни, но BAbs негативни (65).

Обобщение на данните сочи, че честотата на NAbs серопозитивните е значително по-ниска при пациентите, лекувани с INFβ-1a i.m., в сравнение с INFβ-1a s.c. и особено с INFβ-1b s.c.

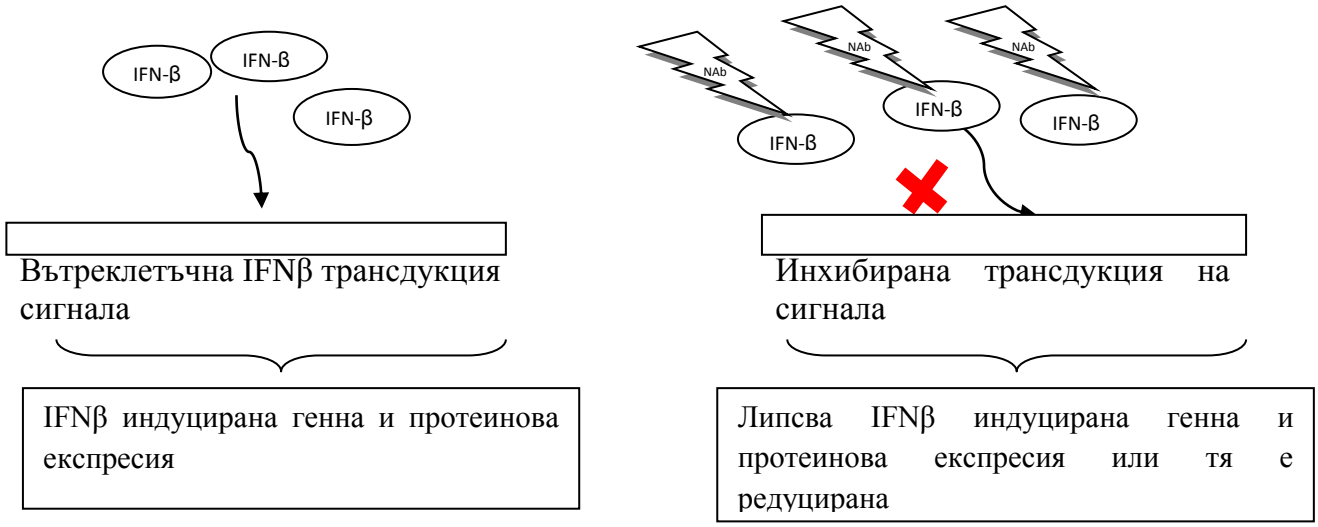
Пегилираната форма на интерферон-бета-1a (PLEGRIDY™© (peginterferon beta-1a) за подкожно приложение е одобрена от FDA и EMA. Пегилирането е лекарствомодифицираща технология за удължаване на протеиновия полуживот с

прикачване на poly- (ethylenglycol) към молекулата, като това води и до намаляване на имуногенността. Използва се вече над 20 години. Резултатите на първата година от пилотното фаза III проучване ADVANCE показват, че наличието на BAbs и NAbs е ниско и съотносимо за двата дозови режима – приложение на всеки две или на всеки четири седмици. Не е установен клиничен ефект от наличието на антитела.

2.1.1 Измерване на анти INFβ антитела

Тестовете за BAbs и NAbs са фундаментално различни. Тестовете за BAbs дават директни сведения за наличието на антитела, докато тестовете за NAbs използват информацията за биоактивността на INFβ или възможността на интерферона да индуцира биологичен отговор in vitro (Фиг. 6). Изследването на антитела се прилага широко по двустъпкова схема, базирана на идеята, че NAbs са подгрупа на BAbs. Изследването за BAbs е по-евтино и по-лесноизпълнимо от тестването за NAbs. Ето защо поради тромавостта на съществуващите анализи много лаборатории използват за установяване на BAbs по-семплия свързващ анализ ELISA като скрининг и само пациентите, позитивни на BAbs, биват изследвани за NAbs. Използването на този метод в практиката предполага фалшиво негативни резултати при 4% от пациентите. При тях въпреки липсата на NAbs е налице неутрализираща активност, причинена от неимуноглобулинови инхибиращи фактори в серума, като циркулиращите разтворими форми на INF α/β рецептори (sINFAR) (66).

Фигура 6. IFNβ индуцируеми генни продукти и NAbs като биомаркери за отговор



Понастоящем няма стандартизиран анализ за BAbs. Свързващите антитела могат да бъдат изследвани с ELISA, Western blot, радиоимунопреципитация (RIA) или афинитетна хроматография (affinity chromatography). Директният свързващ анализ ELISA (dELISA) представлява директно покритие на тестовото кладенче INFβ, а индиректният ELISA (cELISA) – покритие на тестовото кладенче с прикачени анти INFβ антитела (59,156). Анализът Western blot не позволява калкулиране на титъра на BAbs (172). При сравнението между всички тези методи – dELISA, cELISA, Western blot и търговските имуноанализи – приоритетен се оказва cELISA (73). Използването на този метод има и по-добра корелация с титъра на NAbs (73). Предимството на афинитетната хроматография (184) и на радиоимунопреципитационния анализ (58) е, че антигенът е във форма на разтвор и липсва риск от денатурация или скриване на епитопи при свързването в твърда фаза.

Не съществува и стандартизиран метод за изследване на NAbs. Принципът на изследването на NAbs in vitro е изследване на култивирани клетъчни линии, чувствителни за INFβ (клетки, които имат по мембраната си рецептори за този цитокин – интерферон). Серумните проби на пациентите се инкубират с INFβ преди добавяне на клетките. Ако пробите съдържат NAbs, то рецепторната активация се блокира. Един от типовете анализи измерва капацитета на NAbs в серума на пациенти да неутрализира протективния ефект на INFβ върху клетките, подложени на вирусно въздействие. т.е. проба за цитопатологичен ефект, приета като стандарт от Световната здравна организация (СЗО) (8,79,184). Този анализ се базира върху определяне на антивирусния ефект на IFNβ. Вирусчувствителни клетки се поставят в многоямкова плака, добавя се точно определено количество IFNβ и серия от разреждания на серумни проби от пациенти. Следва инкубация за 12 – 24 часа, по време на която IFNβ да може да прояви своята биологична активност, като промени експресията на определени гени в използваните клетки. Следва добавяне на вирусни частици и още 24 часа инкубиране. Ако в серумите е имало NAbs, те ще се свържат с IFNβ и ще предотвратят осъществяването на биологичния му ефект. Няма да се активира експресията на гени, част от чиито продукти имат антивирусно действие. Следователно при добавянето на вирусни частици те ще могат да навлязат в клетките, да се намножат в тях и впоследствие да ги разрушат. Намаленото

количество живи клетки може да се определи с всеки метод за детекция на клетъчна виталност, като например използване на витални бои. Определянето на титъра на антителата се изчислява по метода на Kawade (95). Мерителната единица е т.нар. „лабораторна единица“ (lab unit, LU), която се определя като количеството IFNβ, което намалява цитопатичния ефект на вируса с 50%. Впоследствие чрез разреждане се определя серумната проба, която намалява активността на IFNβ от 10 LU/mL на 1 LU/mL, чиято реципрочна стойност е неутрализиращият титър на пробата (79).

Варирането на количеството IFNβ, което се добавя при цитопатичното изследване, оказва съществено влияние върху крайния резултат (165). Добавянето на по-голямо количество IFNβ ще намали чувствителността на анализа, а по-малкото количество IFNβ би увеличило твърде много чувствителността на метода. Не е категорично определено какво да бъде точното количество на интерферона при този анализ. Световната здравна организация препоръчва 10 LU/mL. Друг проблем е невисоката специфичност на анализа. Върху резултата от изследването могат да повлияят и други фактори, които имат антивирусен ефект.

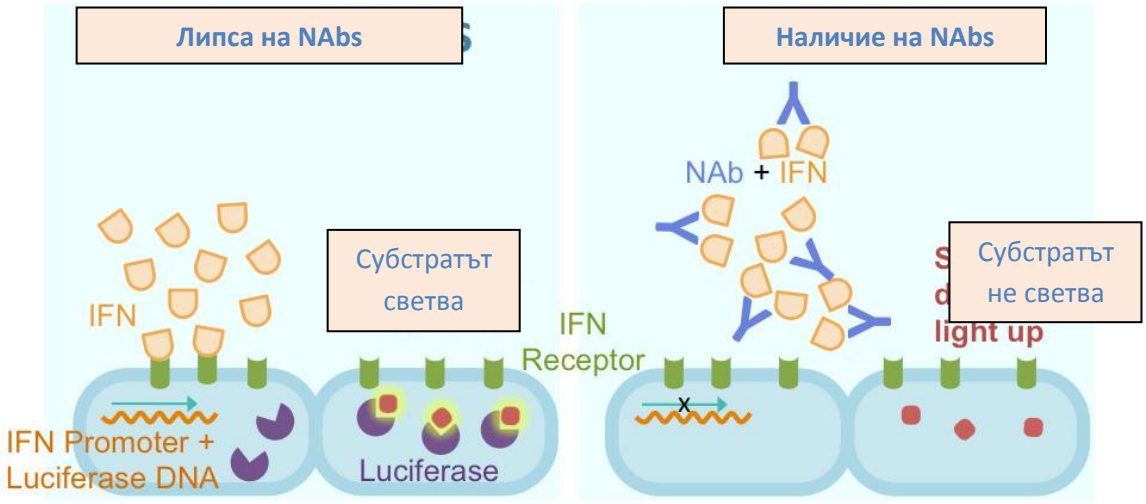
Свързването на IFNβ с рецептора от клетъчната повърхност активира вътреклетъчен сигнален механизъм, крайният ефект от който е повишаване на експресията на редица гени. Протеиновите продукти на тези гени (MxA, неопротеин, OAS, TRAIL и β-микроглобулин) могат да се определят количествено и така да се установи силата на биологичното действие на IFNβ. Наличието на NAbs пречи на свързването на IFNβ с неговия рецептор и по този начин се губи ефектът на промяна в генната експресия. Измерването на биологичната активност на IFNβ чрез количествено определяне на експресия на гени, които той регулира, може да се използва за определяне на антивирусен, антипролиферативен и имуномодулиращ ефект на интерферона. Все по-широко започва да се използва определянето на количеството протеин MxA или MxA mRNA (информационна РНК) при цитопатични изследвания. MxA е цитоплазмен протеин, чиято експресия силно се активира от алфа/бета интерферон. Промяната в експресията на MxA от IFN е дозозависима. Клетките се стимулират с точно определена концентрация IFN, след което се измерва количеството на MxA. Това може да стане чрез използването на хемилуминисцентен или флуоресцентен метод. Клетките предварително се

инкубират със серийни разреждания на серумни проби. Наличието (и титъра) на неутрализиращите антитела се определя чрез измерване на нивата на протеина MxA mRNA (17,27,118) или на MxA (4,39,97,137). Сравняването на анализите показва, че MxAmRNA е най-чувствителният метод за установяване на ниски концентрации на NAbs (17,109).

При сравнително изследване на пациентите на терапия с INFβ-1a или INFβ-1b се установява 3 – 5 пъти по-висок титър и по-чести позитивни проби на пациенти, третирани с INFβ-1a. Чувствителността на анализа, избран за измерване на NAbs, се повлиява в различните изпитвания (142). Ето защо не е изненадващо, че докладваната честота и титрите на антитела срещу INFβ варират значително в различните проучвания (31,42,44,47,91,134,169).

Напоследък е представен нов метод на изследване – луциферазагенерирана биолуминисценция, използващ човешки фибросаркомни клетки. Когато молекулата INFβ се свърже с техните рецептори, се активират трансцелуларни сигнални механизми, водещи до транскрипция на луциферазен ген. Количеството на индуцираната луцифераза може да бъде измерено в луминисцентна единица за секунда. В присъствие на NAbs отговорът бива блокиран. Луциферазният метод е надежден и чувствителен и изисква по-малко време в сравнение с останалите съществуващи методи за изследване на NAbs (100). Измерването на титъра на NAbs чрез луциферазния генен метод е напълно съотносимо с измерването на титъра с утвърдения вече метод на измерване на цитопатичен ефект (139).

Фигура 7. Схема на луциферазагенерирана биолуминисценция



Още през 1985 г. експерти от СЗО публикуват искане за експертни правила при провеждането на биоанализи и обобщават препоръки относно съдържанието на резултата от биоанализа (182). Последващ доклад на СЗО през 2004 г. включва препоръки от Комитета по стандартизация на Международното дружество за проучване на интерферон и цитокини и повтаря необходимостта от стандартизиране на измерването и докладването на анти INF NAbs (155). В този доклад се препоръчва определянето на титъра на NAbs да се извършва чрез използване на формулата на Kawade (155). Тя отразява потентността на NAbs в 10 пъти редукционни единици (TRUs) (80). Титър от 1 TRU/ml е еквивалентен на 10 пъти намаление на активността на INF, а титър от 10 TRU/ml показва 100 пъти намаление на активността на INF. Титърът се изчислява по формулата t = 5f (n-1)/9, където t представлява неутрализиращият титър (TRU/ml), f – реципрочно на антитела разреждане, стигащо до крайната точка на съответното изследване, и n – концентрацията на INF в лабораторни единици (LU/ml). Лабораторните единици се установяват отново в деня на изследването за стойността на относителния интерферон, така че средната крайна точка на биоактивността на сигмоидалната крива доза – отговор е определена с 1 LU/ml и е изявена като концентрация от LU/ml. Преизчислено, 1 LU/ml е нивото на INF, което показва 50% протективен ефект срещу прилагания вирус в съответния цитопатичен анализ (80). Друг често използван начин за отразяване на интерфероновата неутрализация е неутрализационната единица на милилитър (NU/ml), която може да е еквивалентна на TRU/ml (32). Пълно обяснение на неутрализиращия титър се съдържа в публикациите на водещите изследователи по тази тема (79,80).

В случаите с изследване на NAbs работната група на EFNS, в съответствие с експертната позиция на СЗО, препоръчва използването на валидирани изследвания с A549 клетки (човешки белодробен карцином), фиксирано количество IFN, серия разреждания на серума (161) и изчисляване на титъра по формулата на Kawade. Поради факта, че Европейската агенция по лекарствата (EMA) е валидирала изследването на MxA, Европейската федерация на неврологичните дружества (EFNS) го препоръчва при сравнение с CPE. През 2010 г. е постигнат трансатлантически консенсус след заседание на международни експертни групи, организирано от Консорциума по неутрализиращи антитела към интерферон-бета

при множествена склероза (NABINMS) (131). За подобряване на съгласуваността между различните лаборатории, изследващи NAbs, NABINMS предлагат стандартизиране на изследванията чрез използването на INFβ-1a за индукция на MxA (независимо от използвания от пациенти INFβ като терапия), използването на човешки белодробни карциномни клетки A549 и изчисляването на титъра в TRUs (131).

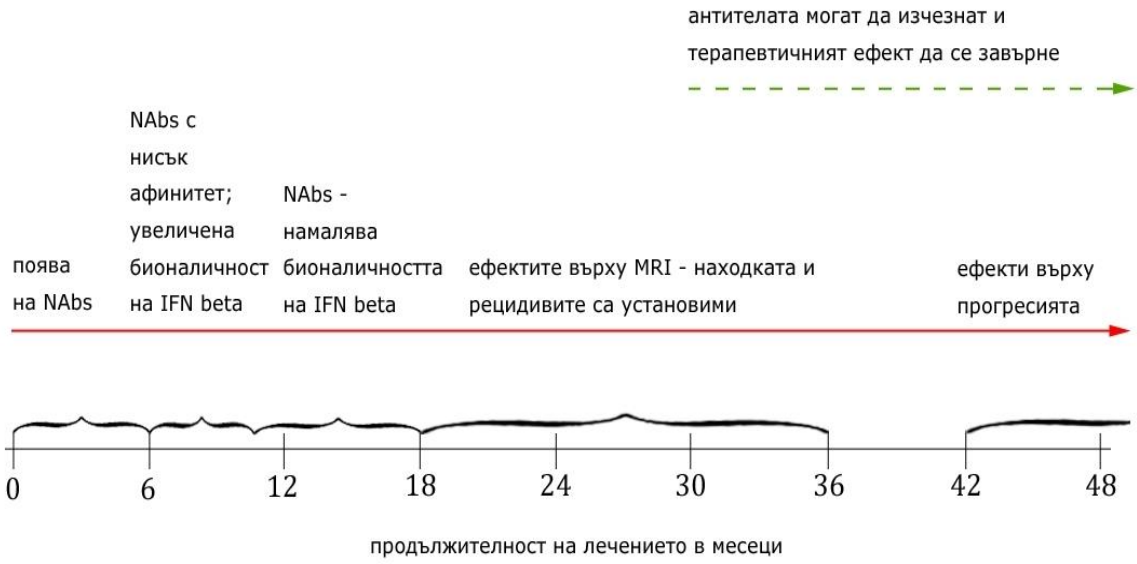
2.1.2. Серопозитивност към антиинтерферонови антитела. Възникване и изчезване на неутрализиращи антитела

Позитивността на NAbs се дефинира от титъра на антителата, запазването им във времето или и двете. Много от големите проучвания при множествена склероза приемат за позитивен титър 20 неутрализиращи единици (NU/ml), други се спират на по-висок праг (6). Някои, като INFβ-1b MS Study Group и проучвания с SPMS (124,130), изискват два последователни титъра от поне 20 NU/ml за позитивност, докато други приемат и еднократно позитивния резултат. Някои автори дефинират нисък, среден и висок титър на антителата в следните граници: 20 – 100 NU/ml, 101 – 500 NU/ml, над 500 NU/ml. Широко дебатирана е темата кой е най-ниският титър, предизвикващ биологичен ефект (11). Експертите от NABINMS препоръчват различен праг при определяне на титъра при INFβ-1a и INFβ-1b. За INFβ-1a – негативен, нисък/междинен, висок титър, изразен в TRUs, съответно под 20, 20 – 100 и над 100. За INFβ-1b – стойността, разграничаваща междинен/висок, е по-голяма: под 20, 20 – 400 и над 400. Проучванията, изследващи продължителността и рисковите фактори за възникване на NAbs, сочат, че по-високите титри в повечето случаи персистират по-дълго време от ниските (131).

Малки количества NAbs могат да бъдат установени с чувствителни методи 6 месеца след началото на лечението с INFβ (142,143), макар да са наблюдавани и едва на 1,5 месеца. Предполагаемият механизъм на възникване на персистиращи NAbs е, че в продуцираните в началото антитела са с нисък свързващ афинитет, а няколко месеца по-късно – с висок свързващ афинитет (161). Неутрализиращи антитела NAbs, оказващи негативен клиничен ефект, обикновено възникват между 9 и 18 месеца след началото на лечението (Фиг. 8). Неутрализиращите антитела, възникващи 1 година от началото на терапията, не могат за послужат за предвиждане на персистирането им спрямо техните нива на втората година и след

това (131). Пациенти, които са били NAbs негативни през първия двугодишен период на лечение, изключително рядко могат да станат NAbs положителни (163). Неутрализиращите антитела се образуват по-бързо при пациенти, лекувани с INFβ-1b, в сравнение с лекуваните с INFβ-1a, но след 12-месечно лечение дяловете се изравняват (142,143).

Фигура 8. Динамика и клиничен ефект на NAbs по време на лечението с IFNβ



Установено е, че при използването на Methyprednisolon i.v. в продължение на 12 месеца процентът на пациентите, развиващи NAbs, намалява с 50% (132). Комбинацията на IFNβ и имуносупресивна терапия дава несигурни резултати (25,51).

Възможно е някои пациенти, положителни на NAbs, след спиране или дори по време на продължаващо лечение с IFNβ да претърпят сероконверсия и постепенно антителата да изчезнат. Това се случва по-често при пациентите, лекувани с IFNβ-1b s.c., отколкото при тези с IFNβ-1a s.c. Приблизително 50% от пациентите, положителни на NAbs и лекувани с IFNβ-1b, се връщат към NAbs негативен статус 4 години след позитивирането (163), а след трансформацията в NAbs негативни пациентите възвръщат напълно и ефективността на IFNβ (164).

Възвръщането на някои от пациентите към NAbs негативен статус зависи най-много от титъра на антителата. Пациенти с нисък титър могат да претърпят сероконверсия, докато тези с висок титър рядко се променят в негативни дори след 2 или 3 години (12,63,87,108,141,159).

Възможно е обаче NAbs да персистират години след спиране на лечението. Проведено е проучване с 29 пациенти, лекувани с IFNβ, всички положителни на NAb при прекратяване на терапията. Само трима (двама от които имат титър под 200 NU/ml) възвръщат NAbs негативния си статус след проследяващ период от 22 месеца. Най-дългият период, през който пациентите са поддържали NAbs положителния си статус, е 59 месеца. При някои от пациентите NAbs титърът дори се увеличава след спиране на лечението с INFβ-1b (126). Едно от обясненията на този феномен може да бъде дългият плазмен живот на клетките, а друго – че продуциращите NAbs B-лимфоцити може да се активират от естествения INFβ, т.е. по време на вирусна инфекция. Резултатите от дългосрочно проучване показват, че 17 от 71 пациенти остават NAbs положителни след прекратяване на лечението на 25-ия месец. Персистирането на неутрализиращи антитела се свързва с по-висока годишна честота на пристъпите (ARR) и съкратено време на прогресия на заболяването, оценено по скалата EDSS (178).

След възникването на NAbs настъпването на сероконверсия е трудно дори след спиране на лечението с INFβ. Правени са различни опити за справяне с тази ситуация при пациенти, провеждащи лечение. Прилагането на високи дози methylprednisolon ежемесечно не възстановява бионаличността на INFβ (86). Незадоволителен е и ефектът от прилагането на комбинация от azathioprine и месечни курсове с methylprednisolone (139). Успешна стратегия за преодоляване на загубата на бионаличността, свързана с NAbs, може да бъде инжектирането на високи дози INFβ-1b i.v., което възстановява бионаличността на INFβ-1b преходно, но не възстановява толерантността, нито възстановява NAbs негативния статус (111).

Съществуват три категории на NAbs статус, използвани в клинични проучвания, позволяващи сравняемост на резултатите: 1. Всеки път позитивен (позитивен титър при всяко от измерванията в рамките на проучването – “once

positive – always positive"); 2. Интервал – позитивност (NAbs позитивен титър в края на специфичен времеви интервал – "interval positive"); 3. Позитивен по всяко време (който се отнася до положителен титър, пренесен от еднократното позитивиране към продължителността на проучването – "any time positive – always positive"). Проучвания, проведени с позитивен по отношение на интервала анализ позволяват клинични сравнения при преминаване на пациенти от позитивен към негативен статус (55).

2.1.3. Измерване на биоактивност на IFNβ

Интерфероните повлияват няколкостотин гена и техните производни. Биоактивността на IFNβ може да се изследва чрез измерване на предизвиканите от IFNβ генни продукти, например групата на миксовирус резистентен протеин (Mx) (напр. MxA и MxB) (38,118), β2 микроглобулин (166), неоптерин (36), олигоаденил синтетаза (2,5 OAS) (118), молекули на главния комплекс на тъканна съвместимост (MHC) клас I, Sat-1, TRAIL (туморнекротизиращ фактор свързан с апоптозата индуциращ лиганд) и много други (67,181). Много от гореизброените могат да бъдат индуцирани и от други фактори.

За оценка на биологичния отговор към IFNβ избраните биомаркери трябва да бъдат специфични за IFNβ, както и индукцията да бъде от съществена величина. Досега най-надежден тест за определяне на биоактивността на IFNβ in vivo се оказва индуцирането на гена за протеина MxA (67,119). Използва се за доказване на намаление на биоактивността на IFN in vivo в присъствието на неутрализиращи антитела. След приложение на IFN се покачва сигнификантно протеинът MxA mRNA, а при наличието на NAbs този отговор изчезва (67). Няколко проучвания сочат, че при пациентите, позитивни на NAbs, и особено при онези с висок NAbs титър отговорът на протеина MxA намалява спрямо изходните нивата преди лечението. Този факт показва анулиране на биоактивността на IFNβ от NAbs (16,39,118,121,149,177). Изследователска група по множествена склероза (MSCRG) през 1998 г. по подобен начин показва неуспешно индуциране на неоптерин само при пациентите от изследваната кохорта, които са NAbs положителни (146).

Проучване, използващо ДНК микрочип на човешки геном на фирма Affymetrix, демонстрира, че NAbs положителните пациенти с липсващ MxA отговор

не показват експресия на нито един от 1077-те IFNβ регулирани гени, които се идентифицирани в NAbs негативните пациенти. Следователно липсата на MxA отговор in vivo е маркер за пълна блокада на биологичния отговор към INFβ (88).

Блокирането на IFNβ индуциращите гени от NAbs обаче не е феномен от типа „всичко или нищо“. Установено е че при титри на NAbs между 5 и 20 прогресивно намаляват in vivo индуцираните неоптерин или β2 микроглобулин (146). Изследването на нивата на неоптерин и β2 микроглобулин показва, че докато всички NAbs негативни пациенти притежават биологичен отговор, а всички с високи нива на NAbs нямат никакъв отговор, то отговорът при пациенти с ниски нива на NAbs варира: една трета имат пълен отговор, една трета – частичен и една трета – никакъв (166).

Изследвания in vivo на биоактивността на IFNβ чрез измерване на протеините MxA mRNA и MxA за определяне на NAbs се установява, че пациенти с титър на антителата над 150 TRU/ml все още имат остатъчна биоактивност, докато много намалена биоактивност се установява при пациенти с NAbs между 150 – 600 TRU/ml, а титри над 600 TRU/ml са свързани със загуба на биоактивност (181).

Нежеланите лекарствени реакции на IFNβ медикаменти са в известна степен маркер за биоактивността на IFNβ, сигнификантно свързани с NAbs негативния статус (50).

Доскоро липсват данни относно това дали наличието на NAbs оказва някакво влияние върху ендогенния INFβ. Вече е установено, че in vivo експресията на антиинфламаторния цитокин IL10 е по-ниска при NAbs позитивните пациенти, отколкото при нелекувани болни с множествена склероза или здрави пациенти от контролните групи. Наблюдавано е, че експресията на IL 10, индуцирана от IFNβ в мононуклеарни кръвни клетки в серум на NAbs позитивни пациенти е блокирана (87). Освен това серум от NAbs позитивни пациенти индуцира неутрализация на биоактивността както на рекомбинантния, така и ендогенния IFNβ (160). Наблюдението предполага, че персистирането на NAbs може да възпрепятства имунната система.

2.1.4. Клинично значение на неутрализиращите антитела срещу INFβ

Все още ролята на NAbs за намаляването или отмяната на терапевтичния ефект на IFNβ е повод за дебатиране (77). Установено е, че персистирането на високи титри на NAbs е свързано с негативен ефект върху терапевтичния ефект на IFNβ (40,71,131,134,161). Данните от клиничните проучвания, по-дълги от 2 години, сочат негативен ефект на NAbs върху честотата на пристъпите и параметрите на изследването с МРТ (40,54,131).

Възприетият консенсус през 2010 г. относно NAbs подчертава факта, че наличието на NAbs е свързано с намалената терапевтична ефективност на IFNβ (72,120). Предишните съмнения са свързани с факта, че клинично значимите NAbs присъстват още на 6-ия – 12-ия месец от започване на лечението и могат дори да подобрят ефекта на INFβ. Това становище засилва риска от недооценяване на вредния ефект на Has при анализирането на данните от кратки периоди, напр. 2-годишно наблюдение (162).

Проблем, водещ до статистически грешки (фалшиво негативни резултати), е разделянето на пациентите на малки подгрупи според различните рамена на лечение и NAbs статус. Дефиницията за NAbs позитивност е необходимо да бъде доуточнена.

Далеч по-решаващ критерий за правилна интерпретация на неутрализиращите антитела е продължителността на проучванията. Подходящи за оценка на клиничната последствия от NAbs са само онези от тях, които имат съществена продължителност (≥ 3 години).

2.1.4.1. Ефект на NAbs върху пристъпите

Съществуват няколко проспективни проучвания, изследващи ефекта на NAbs върху клиничните резултати по отношение на пристъпите при пристъпно-ремитентните форми, но и при прогредиентните с насложени пристъпи. Някои автори не намират връзка, докато други демонстрират ясна зависимост между NAbs и честотата на пристъпите (RR). Основният критерий за разграничаване на тези проучвания е продължителността. Всички по-кратки (двугодишни) проучвания, с изключение на едно, не откриват връзка между RR и NAbs позитивната група (44,88,123). От друга страна, всички проучвания с по-дълъг период на наблюдение

демонстрират сигнификантно по-висок RR или влошаване на другите критерии (напр. времето до първия релапс след започване на лечението и съотношението на свободни от активност пациенти) при NAbs позитивните пациенти (94). Времето на възникването на антителата е фактор, който води до недоразумения по отношение на NAbs, и трябва да се има предвид, когато се прави оценка. Причината за отложения ефект на NAbs може да бъде обяснена с отложеното възникване на антитела срещу IFNβ и не следва модела на класическата имунна реакция срещу чужд антиген, но най-вероятно отразява нарушената имунна толерантност.

В проучване на Duquette по дефиницията „всеки път позитивен“ в групата на пациентите с 8 MIU IFNβ-1b s.c. 45% от изследваните лица се оказват NAbs позитивни (42). Годишната честота на пристъпите (RR) е значително по-висока в сравнение с групата на NAbs негативните ($p < 0,001$). В периода от 13-ия до 36-ия месец след началото на лечението RR в групата на NAbs позитивните е еднаква с RR на плацебо групата. Повторен анализ, използващ дефиницията „еднократно позитивен“ и „анализ на интервалите на позитивност и негативност“, също показват по-висок RR в групата на NAbs положителните в сравнение с NAbs отрицателните пациенти (5,41).

В пилотно фаза III плацебо-контролирано проучване с IFNβ-1a i.m. 30 μg ежеседмично за две години не се установява сигнификантна разлика нито в RR, нито в прогресията между групите, позитивни и негативни на антитела (88,176).

В двугодишно проучване PRIMS, сравняващо IFNβ-1a 22 μg и IFNβ-1a 44 μg срещу плацебо при 560 болни, NAbs положителните пациенти (дефинирани като „еднократно позитивни“) не се различават нито по отношение на RR, нито по прогресия на заболяването. Продължението на проучването (PRIMS – 4) обаче показва, че наличието на NAbs ясно снижава лечебната ефективност на третата и четвъртата година по отношение на пристъпите (52). Повторен анализ с използване на метода „интервалпозитивност“ потвърждава негативния ефект от NAbs (43).

Европейско тригодишно проучване, включващо 718 пациенти с вторично прогредиентен ход (SPMS), лекувани с IFNβ-1b 8 MIU през ден срещу плацебо, показва значимо покачване на RR при използване на метода „всеки път позитивен“. Налице е сигнификантно 45% увеличаване на RR, но при използване на „интервален

анализ“ покачването на RR е гранично. По-високите титри се свързват с по-значима редукция на терапевтичния ефект.

Северноамериканско плацебо-контролирано проучване установява сигнификантно увеличение на RR при пациенти с вторично прогредиентен ход, лекувани с IFNβ-1b в NAbs положителната група спрямо NAbs отрицателната (124).

Проучването SPECTRIMS с INβ-1a s.c. е единственото, проведено сред вторично прогредиентни форми, непоказващо статистически значимо влияние на NAbs върху RR (169).

Четиригодишно проучване, сравняващо дозата на IFNβ-1a i.m. 30 μg или 60 μg седмично, показва, че NAbs положителните пациенти имат сигнификантно по-висок RR в сравнение с NAbs негативните ($p < 0,04$) (165).

Ретроспективно проучване на 262 пациенти, лекувани с IFNβ за повече от три години, показва, че RR не се повлиява от статуса на NAbs през първите две години, но е значимо повишен при NAbs положителните пациенти през третата и четвърта година (78).

Исторически е съществувало твърдение, че индуцирани от IFNβ-1b NAbs, не са свързани с увеличена активност на заболяването (19). По-късно е установено обаче, че клиничният ефект на NAbs е независим от типа на IFN, който го е индуцирал (13).

2.1.4.2. Ефект на NAbs върху прогресията на заболяването

Нито едно от пилотните изследвания при пациенти с пристъпно-ремитента множествена склероза не открива влияние на NAbs върху хода на заболяването. Същият резултат се демонстрира при пациенти с вторично прогредиентен ход (42,88,91,134,150,169). Това вероятно е така, тъй като самият IFNβ няма значим ефект върху прогресията на заболяването. Само в едно датско проучване се описва тенденция към засилване на прогресията при NAbs сероположителните пациенти (165). Според някои автори разликите в резултатите отново са продиктувани от различната продължителност на наблюденията – повлияване върху хода на заболяването може да се констатира само при продължителност над две години (55). В проучване с IFNβ-1a i.m. 30 μg спрямо IFNβ-1a i.m. 60 μg за четиригодишен период се установява негативен ефект на NAbs върху прогресията на болестта (28). Друго петгодишно проучване, сравняващо IFNβ-1a i.m. 30 μg веднъж седмично с

IFNβ-1a 44 μg s.c. три пъти седмично, сочи, че NAbs положителните пациенти имат значимо по-бърза прогресия на болестта спрямо NAbs негативните (113). Други разработки свързват наличието на NAbs с повишен риск от развитие на инвалидност по време на петгодишно проследяващо проучване на 68 пациенти, лекувани с IFNβ (39). Проучване, включващо 78 пациенти при тригодишно проследяване, установява, че повечето NAbs положителните пациенти се влошават в една или повече системи на EDSS в сравнение с NAbs негативните пациенти (64).

2.1.4.3. Влияние на NAbs върху активността на заболяването, измервано с МРТ

При всички големи, рандомизирани, плацебо-контролирани проучвания и някои обсервационни се установява, че наличието на неутрализиращи антитела има ефект върху параметрите на активността на патологичния процес при множествена склероза. Такива параметри, измерени чрез МРТ, са броят на гадолинийусилващите се лезии или броят на новите Т2 лезии, или тежестта на Т2 лезионното натоварване (включва и разширение на стари Т2 лезии) (Табл. 6, 7) (52,69,82,88,91).

Проучването EVIDENCE, сравняващо IFNβ-1a 44 μg s.c. с IFNβ-1a 30 μg i.m., показва по-голяма активност, показана чрез МРТ, сред групата с NAbs положителен статус (123). В друго четиригодишно проучване, сравняващо IFNβ-1a i.m. 30 μg и 60 μg, NAbs не повлияват негативно изследваната чрез МРТ активност на заболяването (176).

Таблица 6. Ефект на NAbs върху клиничните и МРТ параметри в рандомизирани проучвания

Проучване	Тип IFNb	Дефиниция на позитивност	% NAbs позитивни	Седм. или год.	NAbs ефект				Забележка
					RR	EDSS	NMR активност	NMR BOD	
The IFNb MS Study Group	Betaferon	2 последователни NAbs+ титри	35	3 г.	+*	− (ns)	–	+ (ns)	
Rudick, et al.	Avonex	Поне една позитивна проба	17	2 г.	+ (ns)	+ (ns)	+*	–	
SPECTRIMS (Li., et al.)	Rebif22 Rebif44	Поне една позитивна проба	21,6 (Re22) 14,7 (Re44)	3 г.	+ (ns)	− (ns)	+ (ns)	+ (ns)	Заложен резултат, времето до потвърдена EDSS; прогресията не се повлиява сигнификантно от IFNb лечението
Panitch, et al. EVIDENCE (Panitch, et al.)	Avonex Rebif44	Поне веднъж позитивна стойност	25 (Re44) 2 (Av)	48 седм.	ns	–	+***	–	
Durelli, et al. (INCOMIN)	Avonex Betaferon	Поне веднъж позитивна стойност	7 (Av) 30 (Be)	2 г.	+ (ns)	–	–	–	
Polman, et al. Европейско проучване на IFNb-1b SPMS	Betaferon	Винаги позитивна стойност; включени са всички превключвания	27,8	3 г.	+**	+ (ns)	–	+**	

Проучване	Тип IFNb	Дефиниция на позитивност	% NAbs позитивни	Седм. или год.	NAbs ефект				Забележка
					RR	EDSS	NMR активност	NMR BOD	
The North American Study Group on IFNb-1b in SPMS	Betaferon 250 mcg и 160 mcg	Винаги позитивна стойност; включени са всички превключвания	23 (250 mcg) 32 (160 mcg)	3 г.	ns	ns	ns	ns	Първичен краен резултат = потвърдена EDSS прогресия: без разлика IFNb с/у плацебо групата.
PRISMS (Francis, et al.)	Rebif22 Rebif44	Веднъж позитивен или интервал позитивен	24 (Re22) 14 (Re44)	4 г.	+***	+*	+***	+***	NAbs има въздействие на 3-та – 4-та година
Kappos, et al.	Avonex 30 mcg и 60 mcg	2 последователни NAbs + титър	1,8 (30 mcg), 4,8 (60 mcg)	4 г.	+**	+*	+*	+*	
BENEFIT study, (Hartung, et al.)	Betaferon	Поне 1 позитивна стойност 2 последователни позитивни стойности	31,8; 26,7	5 г.	ns	ns	+***	+***	NAb + се св. с по-голям риск от McDonald MSP < 0,001

AV, Avonex; Be, Betaferon; Re 22, Rebif22; Re44, Rebif44; BOD, burden of disease; +, резултатите са по-лоши в NAbs позитивната група, отколкото в NAb негативната група; −, резултатите са по-лоши в NAbs негативната, отколкото в NAbs позитивната група; ns, несигнификантно; –, not done

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

Таблица 7. Въздействие на NAbs върху клиничните и МРТ параметри в обсервационни проучвания

Проучване	Тип IFNb	Дефиниция на позитивност	% NABs позитивни	Седмици или години	NAbs ефект				Забележка
					RR	EDSS	NMR активност	NMR BOD	
Sorensen, et al.	Всички IFNb	Позитивни проби 12 м. от леч.	от 9 до 46%	5 г.	+**	+ (ns)	–	+ (ns)	Значимо намаление на времето до първия пристъп
Malucchi, et al.	Всички IFNb	2 последователни NAb+ проби	17%	3 г.	+***	+*	–	–	
Frank, et al.	Betaferon	2 последователни NAb+ проби	37%	2.5 г.	–	–	+**	+**	
Perini, et al.	Всички IFNb	1 позитивна проба	24%	4 г.	+***	+**	–	–	NAbs въздейства само във висок титър
Tomassini, et al.	Rebif 11 или 33 mcg x 3–w	1 позитива проба 1 г. от лечението	25,4%	6 г.	–	+**	–	–	NAbs+ предсказва EDSS прогресията (5 г. проследяване)
Boz, et al.	Всички IFNb	1 позитивна проба	13%	>3 г.	+*	ns	–	–	NAbs въздейства през 3–4 г.
Malucchi, et al.	Всички IFNb	Позитивни проби на 12 м. от леч.	12,4%	3 г.	+**	–	–	–	MxA и NAbs предсказват времето до първи пристъп
Durelli, et al.	Betaferon	1 позитивна проба на 6 м.	34%	2 г.	+**	+ (ns)	–	–	NAbs+ предсказва риска от пристъп или EDSS прогресия

Проучване	Тип IFNb	Дефиниция на позитивност	% NABs позитивни	Седмици или години	NAbs ефект				Забележка
					RR	EDSS	NMR активност	NMR BOD	
Sato, et al.	Avonex Betaferon	1 позитивна проба	35,5%	4 г.	+***	–	+**	–	
Paolicelli, et al.	Всички IFNb	2 последователни позитивни проби	14%	5 г.	+**	+ (ns)	–	–	Негативна тенденция към EDSS 4 (IRR = 2,94;*P* = 0,0879)

AV, Avonex; Re22, Rebif22; Re44, Rebif44; BOD, burden of disease; +, резултатите са по-лоши в NAbs позитивната група, отколкото в NAb негативната група; −, резултатите са по-лоши в NAbs негативната група, отколкото в NAb позитивната група; ns, несигнификантен; – not done

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

2.1.5. Приложение в клиничната практика

Научните факти сочат, че наличието на NAbs намалява биологичната и клиничната ефективност на IFNβ. Този проблем може да се избегне с изработването на IFNβ с много ниска имуногенност. Адекватното проследяване за наличието на NAbs при пациенти, лекувани с IFNβ, както и in vivo измерваната биоактивност и превключването на NAbs положителните пациенти (които нямат in vivo MxA отговор) към по-ефективна терапия може да намали инвалидизиращата активност на болестта.

На практика, всички NAbs позитивни пациенти изработват антителата преди 24-ия месец от началото на лечението, което прави разумно скринирането им след 12 или 24 месеца от започването на IFNβ.

Не е напълно установено какъв точно титър на NAbs намалява сигнификантно биоактивността на IFNβ и съответно неутрализира ефекта му. Доказано е, че титър > 100 NU/ml при IFNβ-1a и > 400 NU/ml при IFNβ-1b е свързан с редукция или отмяна на ефекта на интерферона. Персистирането на висок титър трябва да означава прекъсване на лечението с IFNβ. В най-добрия случай продължаването на лечението означава загуба на пари, а в най-лошия – че пациентът остава под риск от тежък релапс. Ходът на заболяването множествена склероза е непредвидим и понякога пациентите, въпреки че не провеждат лечение, биха могли да се чувстват добре за дълъг период от време. Освен това наличието на NAbs е една от няколкото причини за неефективност на лечението с IFNβ. Част от пациентите са конституционно нереагиращи на INFβ и лечението се проваля дори при липса на NAbs. Ето защо някои пациенти с високи титри на NAbs могат да се чувстват добре поради доброкачествения ход на болестта, докато други NAbs негативни демонстрират тежка активност на заболяването (125). Това наблюдение не променя обаче факта, че високият титър на NAbs премахва терапевтичната активност на IFNβ.

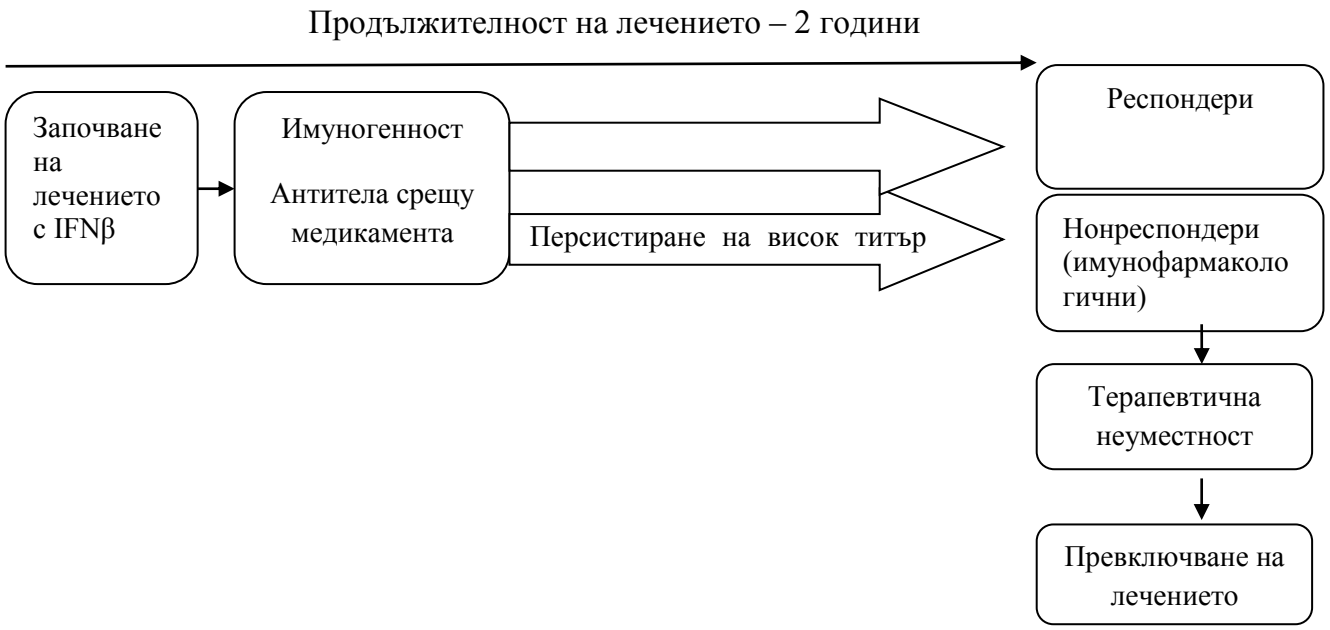
Аргумент в полза на продължаването на лечението с IFNβ при данни за висок титър на NAbs е, че пациентите могат да претърпят сероконверсия. Пациентите с висок титър обаче обикновено остават NAbs положителни няколко години. Освен това ниският титър на NAbs е единственият предиктор за преминаване от NAbs

позитивен към NAbs негативен статус (162). Понастоящем съществуват и други, дори по-ефективни лечения. Ето защо на пациентите с висок титър на NAbs (оставащи без протекция) трябва да се предложи смяна на имуномодулиращата терапия.

По много причини често не е възможно определянето на точния титър на NAbs, който редуцира или премахва терапевтичния ефект на IFNβ. В оптимални условия влиянието на ниските и средните титри върху биоактивността на IFNβ трябва да се провери чрез измерването ѝ in vivo.

Оценката на индукцията на mRNA MxA след инжектиране на IFNβ е надежден метод за определяне на интерфероновата биоактивност. При липсата ѝ пациентът е предразположен към антитяло медиирана неефективност на лечението. В тези случаи смяната на терапията е правилното решение (Фиг. 9).

Фигура 9. Имунофармакологични нонреспондери



Във връзка със справянето с NAbs срещу IFNβ в клиничната практика са публикувани като ръководства три анализа, основани на доказателства (Табл. 8). Въпреки извода, публикуван през 2007 г., че високият титър на NAbs най-вероятно е свързан с намален терапевтичен ефект, Американската академия по неврология (AAN) коментира липсата на достатъчно информация, за да се обобщят обобощени препоръки относно изследването на NAbs. Обратно, ръководството на Европейската федерация на неврологичните дружества (EFNS) предлага специфични препоръки за използване на изследването на NAbs в клиничната практика. През 2010 г. е постигнат трансатлантически консенсус, ръководен от NABINMS. Експертите се обединяват около становището, че NAbs повлияват терапевтичната активност на IFNβ и това може да бъде съображение при промяна на терапевтично решение. Резултатът от изследването при конкретен пациент помага в избора на индивидуален подход. Препоръките на NABINMS са валидни за пациенти, провели лечение, не по-кратко от 1 – 2 години. Препоръките са приложими в следните три категории: 1 – клинично стабилни пациенти; 2 – пациенти със средна активност на заболяването и 3 –клинично нестабилни пациенти.

Обобщение на препоръките: *Дори пациентът да е клинично добре, резултатът от изследването на NAb и/или изследването на биоактивността* in *vivo чрез MxA може да има терапевтични последици. Препоръчва се случаите с персистиращи високи титри на NAbs и/или липса на MxA биоактивност да бъдат превключени към неинтерферонова терапия. Второ, при пациенти със средна активност на заболяването продължаването на лечението се препоръчва само при NAbs негативните, докато при високи титри на NAbs и/или липса на MxA биоактивност трябва да се предложи превключване към неинтерферонова терапия. Трето, пациенти, които са клинично нестабилни на интерферонова терапия, трябва да бъдат превключени, независимо от NAbs статуса или MxA биоактивността.*

Таблица 8. Консенсусни препоръки за клиничното използване на изследванията за NAbs

Ръководство на EFNS – 2005 г.	**Доклад на AAN – 2007 г.**	**NABINMS препоръки*– 2010 г.**
Изследването за NAbs се провежда в специализирана лаборатория. Прилага се валидиран in vitro анализ за NAbs (CPE или MxA). Изчисляване на титъра на NAbs по формулата на Kawade. Уточняване на интервалите на анализите за NAbs. Преустановяване на лечението с INFβ при персистиране на висок титър на NAbs	Недостатъчна информация по въпроса кога да се проведе теста, кой тест, колко теста са необходими при всеки конкретен пациент, какъв е прагът (cut-off) за позитивност	Използване на валидиран in vitro NAbs анализ. Клинична база за вземане на решение въз основа на активността на заболяването, титъра на NAbs или и двете. Обмисляне на изследване на MxA in vivo на пациенти с нисък титър на NAbs. Превключване на терапията на пациенти с незадоволителен ефект.

**Препоръките са приложими за пациенти, лекувани с IFNβ за 1 – 2 години*

При взето решение за превключване на лечението експертите от NABINMS препоръчват да не се преминава към друг интерферонов продукт поради категоричната кръстосана реактивност между интерфероновите медикаменти (131).

В известна степен противоречията между северноамериканския и европейския консенсус могат да се обяснят с факта, че тестването за NAbs е по-леснодостъпно в европейските страни.

2.2. Антитела срещу glatiramer acetate

Glatiramer acetate (GA) представлява хетерогенна смесица от синтетични полипептиди от четири аминокиселини: L – глутамин, L – аланин, L – лизин, L – тирозин. Аналогично на интерфероновото лечение, ежедневното приложение на glatiramer acetate (GA) индуцира имунната система да произвежда „реактивни антитела“. Анти GA антитела възникват при повечето, ако не при всички, лекувани пациенти (21,41,148).Три клинични проучвания установяват, че пикът на анти GA антителата (153) е на 3-ия месец от лечението, а на 6-ия намаляват до стабилни нива

и нямат влияние върху клиничната ефективност (41). Ретроспективното проучване на Salama върху 42 пациенти, лекувани с GA за една година, установява, че анти GA антителата имат инхибиращ ефект върху GA индуцираната Т-клетъчна пролиферация, както и реверсията на GA стимулираната индукция на антинфламаторни цитокини (IL-10 и IL-4) (148). Резултатите от това проучване сочат корелация между високите титри на GA антителата, изследвани с ELIZA, клиничното влошаване, установено чрез скалата EDSS, и честотата на пристъпите. След едногодишно приложение се оказва, че при 48% от пациентите са установени антитела, като при 33% са във висок титър, а при 14% – в нисък. Пациентите с висок титър на антитела показват по-изразено влошаване по скалата EDSS (увеличение с 0,4) и имат повече релапси (средно увеличени с 0,4 пристъпа/година) в сравнение с пациентите с нисък титър. Това проучване допуска, че GA може също да индуцира антитела, които намаляват добрата му ефективност. Всички горецитирани други проучвания обаче установяват, че антителата срещу GA не променят ефекта от него (6,148,180). Други автори допускат, че полиреактивните антитела към GA имат свойството да провокират миелиновото възстановяване в мишия модел на демиелинизиращи заболявания (175). Бъдещи проучвания могат да допринесат за изясняване на терапевтичната и биологичната роля на анти GA антителата (54,144).

2.3. Антитела срещу natalizumab и други моноклонални антитела

Natalizumab е моноклонално антитяло, свързващо се с α4 компонент на α4β1 интегрин (VLA4; CD49d), експресирани на повърхността на лимфоцитите и моноцитите (15). Чрез свързването към α4β1 интегрин, който е медиатор на трансендотелната левкоцитна миграция, natalizumab блокира миграцията на Т-клетките в централната нервна система (143). Natalizumab първоначално е създаден в миши меланомни клетки, но е хуманизиран чрез присаждане на антитяло комплементарно определяща зона в човешката IgG4 антитяло структура.

Ефективността на natalizumab се установява в резултатите от две фаза III проучвания. Прилагано е като монотерапия в проучването AFFIRM и като добавъчна терапия към IFNβ в проучването SENTINEL (24). В проучванията AFFIRM (123) и SENTINEL (31) свързващи антитела към natalizumab са изследвани

чрез метода ELISA (91). Течноцитометричен анализ е използван за установяване на блокиращи natalizumab антитела. Този метод установява възможността специфични антитела да блокират свързването на биотинсвързан natalizumab към неговия родствен α4 рецептор (91). Всички пациенти с установени с метода ELISA антитела са били серопозитивни и при приложение на блокиращия анализ (91).

Установено е, че около 6% от пациентите са персистиращи антитяло положителни (при поне 2 – 3 последователни измервания в интервали не по-кратки от 42 дни) (31,91,123), докато при 3% се установява транзиторна антитяло позитивност (антителата изчезват след няколко месеца лечение). Анти natalizumab антителата възникват 12 седмици след началото на инфузиите с медикамента (31,91,123).

Персистирането на антителата съответства на намаление на серумната концентрация на natalizumab, което е по-изявено при пациентите с персистиращи антитела спрямо пациентите с транзиторни антитела (91). Образуването на антитела се свързва също така с продължително прекъсване на лечението след прилагането на поне три дози от медикамента.

Персистирането на антитела срещу natalizumab е свързано с появата на така наречените остри инфузионни реакции. Те възникват при 76% от пациентите с персистиращи антитела, 25% от пациентите с транзиторни антитела, 20% от пациентите с липсващи антитела срещу natalizumab и 18% от лекуваните с плацебо. В частност, хиперсензитивни реакции (част от острите) възникват при 46% от пациентите с персистиращи антитела, 15% с транзиторни антитела и 0,7% негативни на антитела (91). При тези пациенти изследването за NAbs е от съществено значение, тъй като истинската IgE медиирана алергична реакция, свързана с антитялообразуването, е клинично неразличима от т.нар. инфузионна реакция, която може да бъде медиирана от активация на комплемента или Fc рецептора с освобождаване на туморнекротизиращ фактор алфа (3).

Инфузионно свързаната хиперсензитивност възниква най-често след втората инфузия и не е наблюдавана никога след седмото вливане на natalizumab (123). Един от пациентите, участник в клинично проучване обаче, развива тежка, системна, хиперактивна реакция с уртикария, диспнея, абдоминална болка и треска

на осмия ден от първата инфузия. При него се установяват антитела срещу natalizumab при два анализа – на 20-ия и 60-ия ден след възникването на симптомите (129).

Късни инфузионни реакции, наподобяващи реакция тип серумна болест (III тип реакция), са докладвани често при други моноклонални антитела (infliximab, rituximab), но рядко при лекуваните с natalizumab (55,116). Само в един доклад са налични данни за отложена/късна инфузионна реакция (при 4 от 40 пациенти), като при двама от тях са установени антитела срещу natalizumab (84).

Няколко постмаркетингови проучвания сочат, че честотата на образуването на антитела срещу natalizumab е сравнимо с данни от AFFIRM. В италианско проучване 6,6% от пациентите са антитяло положителни 6 месеца след началото на лечението (69), докато проучване от Швейцария установява позитивност при 7,1% от пациентите (123).

Синтезирането на неутрализиращи антитела срещу IFNβ не е предиспозиция за образуване на антитела и срещу natalizumab (110).

В клиничните проучвания присъствието на анти natalizumab антителата води до анулиране на терапевтичния му ефект (31,91,123). При пациентите с персистиращи антитела към natalizumab честотата на пристъпите е сходна с тази в групата на плацебо (123).

В някои страни изследването на антитела срещу natalizumab е рутинно възприето, докато други го препоръчват, ако след 6-месечно лечение персистират инфузионните реакции или са налице данни за клинична активност на заболяването (91). Положителният тест непременно налага преповтарянето му след три месеца за определяне на статуса на антителата – постоянни или транзиторни.

За разлика от факта, че прилагането на IFNβ все още предизвиква дебати, при установяване на персистиращи антитела срещу natalizumab експертите са единодушни, че лечението трябва да бъде преустановено поради анулирането на терапевтичния ефект, дължащ се на имунофармакологична резистентност на иначе мощния natalizumab. Счита се, че времето за възникване на антитела срещу natalizumab е по-предсказуемо и по-ранно от времето на възникване на антитела срещу IFNβ (31,91,123).

При провеждане на фаза III клинично проучване с alemtuzumab свързващи антитела са установени при 29% от пациентите чрез метода ELISA преди втория цикъл на лечение и 81% един месец след него. Наличието и концентрацията на анти alemtuzumab антителата не повлиява намалението на броя на лимфоцитите или тяхното възстановяване, терапевтичната ефективност и безопасност (33).

Предстоят проучвания за уточняване на имуногенността и ролята ѝ за ефективността и безопасността при приложението на нововъзникващите терапевтични моноклонални антитела.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Неутрализиращи антитела срещу IFNβ възникват често и рутинното им изследване чрез стандартизиран подход е препоръчително в клиничната практика. NAbs са свързани с намаление на терапевтичния ефект на IFNβ и пациентите с персистиращи високи титри на антителата трябва да бъдат превключени на друго лечение. Пациентите с нисък или среден титър на антитела е добре да бъдат тествани за промяна на IFNβ биоактивността чрез измерването на индукцията на mRNA MxA in vivo.

Антителата срещу GA не се свързват с намаляване на клиничната ефективност и изследването им в клиничната практика е неоснователно.

Антителата срещу natalizumab възникват много по-рядко в сравнение с антителата срещу IFNβ, но категорично са свързани с анулиране на неговия ефект. Ако антителата персистират, се налага спиране на лечението с natalizumab.

Проучва се възникването и влиянието на неутрализиращи антитела срещу други, сега разработвани моноклонални антитела за лечение на множествена склероза.

3. Съвременни критерии за ефективност при приложение на имуномодулацията. Терапевтична целесъобразност

С разширяване на терапевтичната кошница и възможността да се прилагат своевременно по-мощни медикаменти се променят и терапевтичните цели при лечението на МС. В началото на ерата на имуномодулация, при липсата на алтернатива при прилагане на медикаментите от първа линия, се поставят няколко

цели: намаление на честотата и тежестта на пристъпите, забавяне на прогресията на болестта и намаляване на акумулацията на лезии, оценени с МРТ. Поради умерения ефект на инжекционните препарати от първа линия, въпреки че няма консенсусно решение, неуспехът на терапията се дефинира като възникване на два или три инвалидизиращи пристъпа или засилване на инвалидизацията с 1,0 или повече, оценена по скалата EDSS за 1 година лечение. Постепенно се натрупват данни за необратима невронна загуба, водеща до инвалидизация, мозъчна атрофия и когнитивен упадък още в ранната фаза на заболяването и е установено, че механизмите на възстановяване са по-непълноценни с напредване на болестта. Става ясно също така, че лечението е по-ефективно, ако започне рано – във възпалителната фаза, когато съществуват повече интактни аксони. Така ранното лечение може да има и невропротективен ефект. С въвеждането на natalizumab през 2006 г. започва новата ера на приложение на по-ефективна имунотерапия. Лечението с моноклоналното антитяло демонстрира за първи път нови достижими цели, а именно липса на активност, измерена чрез клинични и МРТ параметри. Установена е концепцията за „свободно от активност“ заболяване, или NEDA (no evidence of disease activity, „липса на данни за активност на заболяването“). С подобна претенция за ефективност, водеща до липса на активност при множествена склероза, се присъединяват голям брой медикаменти – перорални и моноклонални антитела, имащи различен механизъм на действие, път на приложение и съотношение риск/полза. За наблюдавания период някои от тях постигат целта NEDA при част от пациентите (предстои установяване на динамика във времето). Настоящото разбиране за NEDA се усложнява поради възникване на основателни дебати за ролята на други важни показатели, като мозъчен обем, когниция, качество на живот и докладвани от пациенти данни (умора и др.). Ето защо се появяват публикации за NEDA-4 (освен оценка на активността се включва и оценка на мозъчния обем), NEDA-5 и т.н. Някои от последно регистрираните за употреба медикаменти (alemtuzumab), освен че покриват тези критерии, заявяват по-амбициозни резултати – регрес на преди това съществуваща инвалидизация (Фиг. 10). Новопоявяващите се медикаменти имат и допълнителни предимства, като перорално или нечесто парентерално приложение, по-добра поносимост и по-добра степен на придържане към лечението. От друга страна, във връзка с механизма им

на действие се появяват нови предизвикателства и рискове при тяхното приложение: кардиологични нарушения и макулен едем при fingolimode, възможна поява на общи и опортюнистични инфекции (PML при natalizumab, DMF), артериална хипертония при fingolimode и teriflunamide, вторични B-клетъчно предизвикани автоимунопатии, свързани с alemtuzumab, и потенциален риск от малигненост. Тези данни изискват въвеждането в практиката на строги програми за наблюдение на риска.

Фигура 10. Оценка на терапевтичните цели



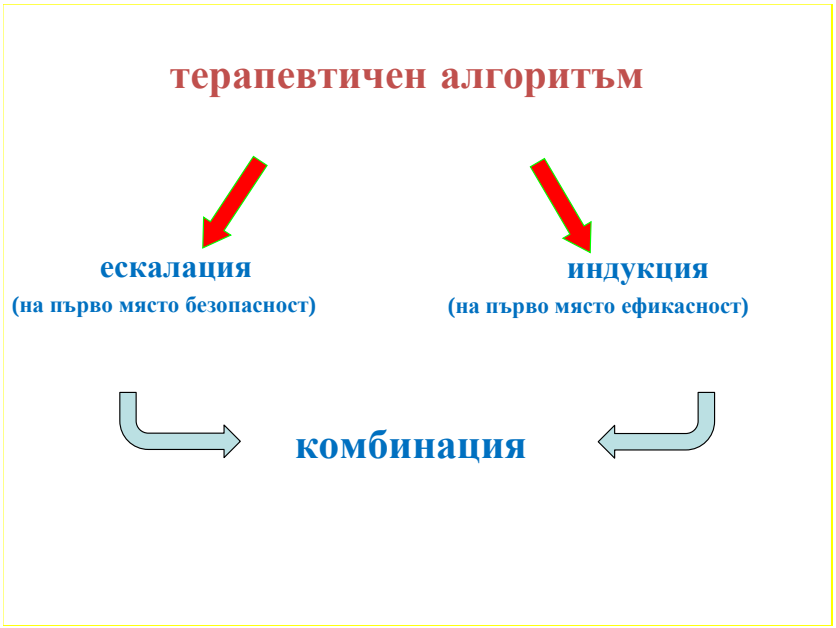
Множеството ефективни терапевтични възможности, комбинирани с амбициозните терапевтични цели, установяват принципа на нулева толерантност (“zero tolerance” (ZeTo) към активността на заболяването. Клиничните и МРТ критерии се използват в комбинация за оценка на терапевтичния отговор и краткотрайния риск от влошаване на инвалидизацията при пациенти, прилагащи DMT. Различни изследователски екипи изготвят системи за оценка. Такива са Модифицираната оценка Rio (Modified Rio Score) (167) и Канадския модел за терапевтична оптимизация (Canadian Treatment Optimization Model) (57) за своевременно установяване на евентуалния неуспех на лечението и бързо терапевтично решение за нов рационален избор. Тези модели позволяват да се

приеме за неуспех наличието на изразена МРТ активност при клинично стабилни пациенти и този параметър да бъде достатъчен аргумент за промяна на лечението.

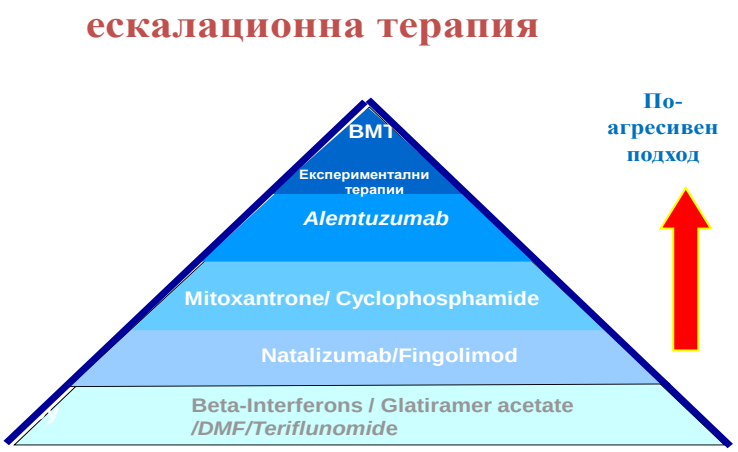
Лечението на прогресивните форми, характеризиращи се с предомининаща невродегенерация, за момента остават непосрещната медицинска нужда. Съществуват данни, че fingolimode и DMF могат да активират невропротективни пътища, които облекчават ремиелинизацията и възстановяването, но това все още е недоказано за прогресиращите фенотипове.

Множествената склероза е хетерогенно заболяване – ходът и активността са различни при отделните пациенти. Изборът на лечение следва оценката на баланса полза – риск и е съобразен с индивидуалните характеристики на пациенти. Съществуващите алгоритми на лечение се основават на агресията на заболяването и наличието на добри или лоши прогностични фактори. Съществуват два модела на лечение с модифициращи хода на заболяването медикаменти – ескалационен и индукционен (Фиг. 11.1).

Фигура 11.1. Терапевтичен алгоритъм

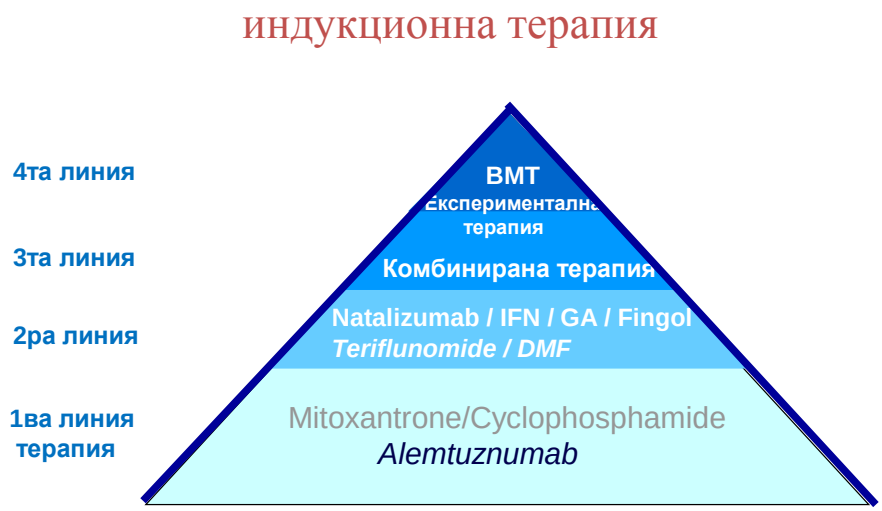


Фигура 11.2. Ескалационен модел на лечение



BMT – костномозъчна трансплантация

Фигура 11.3. Индукционен модел на лечение



Поради натрупаните данни за кратък терапевтичен прозорец императивното поведение при болните с множествена склероза трябва да бъде свързано с изготвяне на ефективна терапевтична стратегия с ранно започване на лечението.

3.1. Терапевтична целесъобразност при множествена склероза

Концепцията за „терапевтична целесъобразност“ за първи път е въведена от редакционния съвет на British Medical Journal през 1994 г. (23). Авторите твърдят, че здравните грижи често са разпределени неподходящо: много пациенти използват здравни ресурси прекомерно, а други – недостатъчно. Диагностичните и терапевтичните интервенции могат да се определят като релевантни, когато максимизират ефикасността и безопасността. Понятието „подходящи грижи“ се дефинира като предоставяне на „подходящия пациент в точното време на правилната доза, без прекомерно или недостатъчно използване на системата на здравеопазване“ (60). При пациентите, лекувани с IFNβ, терапевтичната целесъобразност е строго свързана с откриване на нонреспондерите. Множествената склероза е свързана със съществен икономически товар поради засягането на млади хора в социално активна и трудоспособна възраст. Според СЗО множествената склероза е сред най-скъпите заболявания. Италианско проучване установява, че годишните разходи за един пациент с МС възлизат на 38 845 евро, като модифициращите хода на заболяването медикаменти представляват само 12,2% от всички разходи, а те се покачват линеарно с покачване на оценката по скалата EDSS (60). В контекста на терапевтичната целесъобразност изборът на рентабилна терапия (cost-effective) е от съществено значение, за да се гарантира благосъстоянието на пациентите при оптимален разход на здравни ресурси. Идентифицирането на фармакологичните нонреспондери е част от тези усилия.

4. Изводи от литературния обзор

Въз основа на литературния обзор могат да бъдат направени някои изводи, подкрепящи целта на дисертационния труд.

Множествената склероза е хронично заболяване, засягащо работоспособната популация, носещо индивидуален и социо-икономически товар. Множествената склероза следва своя естествен, подмолен ход, водещ до инвалидизация. Сега съществуващите медикаменти за повлияване хода на болестта имат ефект предимно върху възпалителните процеси, които преобладават в началото на болестта. Това обяснява събраните медицински доказателства за по-добър ефект на модулиращите хода на заболяването медикаменти при ранно приложение. Данните от клиничните

проучвания сочат, че невъзвратима неврологична загуба, водеща до трайна инвалидизация, мозъчна атрофия и когнитивен упадък възникват рано в хода на болестта и могат да бъдат установени при CIS, а дори и при радиологично изолиран синдром (RIS). Високата честота и тежестта на първите пристъпи имат лоша прогностична стойност. Възстановителните механизми са все по-слабо ефективни в хода на болестта. Тези факти налагат концепцията за краткостта на терапевтичния прозорец. Анализ на данните демонстрира по-висока ефективност при ранно започване на лечението, когато са налични повече интактни неврони. Категорично е установено, че лечението на CIS забавя конверсията към клинично сигурна МС и невродегенерацията. Ето защо ранното лечение може да има невропротективен ефект, докато закъснялото по-малко възпрепятства увредата и прогресията на болестта. Това обяснява защо пациентите на плацебо никога не „настигат/догонват“ терапевтичното ниво на ранно лекуваните.

Лечението с рекомбинантен интерферон-бета е първото одобрено имуномодулиращо лечение и до момента е най-разпространеното в света. Всички медикаменти за лечение на МС са частично ефективни, вероятно поради хетерогенния характер на болестта. Различен процент от хората са оказват нонреспондери. От една страна, вече разполагаме с много нови медикаменти с различен механизъм на действие. Понастоящем са регистрирани над 10 лекарствени продукта, а други очакват одобрение. Въпреки че новите терапевтични възможности са многообещаващи, все още липсват достатъчно данни за дълготрайната безопасност и ефикасност. От друга страна, профилът на безопасност на интерферон-бета и glatiramer acetate е впечатляващ. Доказателство за това са не само данните от клиничните проучвания, а и тези от реалната клинична практика с давност над две десетилетия.

Лечението на заболяване със сложен морфологичен субстрат като множествената склероза, не само с клиничен, но и със субклиничен ход на протичане, до момента е трудно и непредвидимо. Всяка възможност за избягване или отлагане на инвалидизацията трябва да се използва. Задачата на клиницист за адекватен избор, респективно за своевременна промяна (при необходимост) на лечението при всеки отделен пациент, би била улеснена, ако в практиката

съществуват чувствителни, специфични и достъпни за изследване прогностични биомаркери за терапевтична ефективност.

Основни причини за неефективност на интерфероновото лечение са:

1. Липса на биологична активност на лекарството въпреки правилното му приложение;
2. Невъзможност на медикамента да контролира заболяването въпреки биологичната си активност;
3. Непридържане към лечението.

Биологичната активност, дефинирана като „фармакологичния, физиологичния и биохимичен ефект, резултат от взаимодействието на лекарството с таргетните му рецептори“ е необходимо, но недостатъчно условие за ефективността на един медикамент. Главната причина за намалена или потисната биологична активност на интерферон-бета е възникването на неутрализиращи антилекарствени антитела. Пациентите, които изработват антилекарствени антитела срещу биофармацевтични продукти, се наричат имунофармакологични нонреспондери“.

Голям процент от пациентите, лекуващи се с интерферон-бета, образуват свързващи антилекарствени антитела. Оказа се, че само част от свързващите антиинтерферонови антитела имат неутрализиращ ефект – чрез предотвратяване на взаимодействието на интерферона с рецептора му, което инхибира биологичното му действие. Свързващите антитела се установяват при до 80% от лекуваните пациенти, а неутрализиращите възникват при 2 – 45% в зависимост от използвания интерферонов продукт. Неутрализиращите антитела могат да бъдат открити още на третия месец след започване на лечението, но обикновено се регистрират между 6-ия и 18-ия месец. Свързващите антитела се появяват много по-рано.

Въпреки че IFNβ бионаличността е намалена при наличие на неутрализиращи антитела, ефектът върху клиничната ефикасност все още остава дискусионен и ненапълно установен. Не е съвсем ясно дали неутрализиращите антитела имат еднакъв ефект при различните интерферонови препарати, прилагани в клиничната практика. Въпреки че различни клинични проучвания до момента сочат противоречиви резултати по отношение на клиничните параметри, всички те

категорично установяват влошаване на магнитнорезонансните параметри при пациентите с персистиращи неутрализиращи антиинтерферонови антитела. До момента в нашата страна не е провеждано изследване на антилекарствени антитела и не е анализирана връзката им с провежданото интерфероново лечение.

В условията на разширен лечебен избор концепцията за терапевтична целесъобразност става все по-актуална. Тя представлява предписването на правилния медикамент в правилното време на подходящия пациент. При болните на интерфероново лечение това е свързано с идентифициране на неотговарящи на лечението (нонреспондери). Ранното разпознаване на нонреспондерите е критичен клиничен проблем в контекста на множеството опции за имуномодулация и невъзможността за предварителната им селекция спрямо очаквания ефект, краткия терапевтичен прозорец и необходимостта от оптимизиране на разходите. Докато имунофармакологичните нонреспондери могат да бъдат идентифицирани рано, свързаните с патогенезата нонреспондери се разпознават късно, когато заболяването е нанесло необратими увреди на централната нервна система. Няма единна дефиниция в литературата за отговарящи на лечението пациенти (респондери), но терапевтичният прогрес е довел до развитието на нова концепция за ефективност. Желана терапевтична цел е покриването на съвременните критерии за ефективност на модулиращи хода на заболяването медикаменти NEDA (no evidence of disease activity). Някои от новопоявяващите се медикаменти покриват дори по-висока и амбициозна цел за регрес на предварително съществуващата инвалидизация. Липсата на данни за активност на заболяването включва комплексна клинична и магнитнорезонансна оценка за липса на пристъпи, липса на прогресия (оценена с оценка по скалата EDSS), никаква магнитнорезонансна активност (липса на Gd контрастиращи T1 лезии или нови/уголемени T2 лезии). Разграничаването на пациентите с оптимален терапевтичен ефект (респондери) от тези със суботпитмален и лош терапевтичен отговор (нонреспондери) към лечението с интерферон-бета изисква клинично проследяване за относително дълъг период от време (времето е не само загуба на пари, а и загуба на терапевтичен прозорец). Ето защо възможността за ранна прогноза е от съществено значение. Установяването на надеждни биомаркери като ранен предиктор за очаквания

терапевтичния ефект е приоритет в терапевтичната стратегия. Желателно е рутинното въвеждане в клиничната практика на такива прогностични биомаркери.

В контекста на амбициозните терапевтични цели, установяващи принципите на „нулева толерантност“ (ZeTo=zero tolerance) към активността на заболяването, допускането, че дори само магнитнорезонансните параметри са влошени при персистирането на неутрализиращи антиинтерферонови антитела е неприемливо. Това ни дава основание да потърсим точното място на NAbs като прогностичен терапевтичен биомаркер. Възниква въпросът за уместността и момента на тяхното изследване при мониториране на лечението с интерферон-бета. Изработването на ръководни принципи за клинична употреба при изследване на неутрализиращи антилекарствени антитела може да подобри лечението на пациентите с множествена склероза. Въвеждането на скриниране за NAbs като инструмент за ранно разпознаване на нонреспондери и промяна на лечението в унисон с модела на терапевтична целесъобразност би ограничило разходите и би подобрило индивидуалната перспектива.

Времето ще покаже дали инжекционните препарати ще бъдат изместени като терапевтичен лидер от нововъведените медикаменти с по-удобен път на въвеждане и/или с по-мощен ефект. Възможно е интерфероните да останат първа и предпочитана терапевтична опция заради благоприятния си профил на безопасност и дълготрайна ефикасност при ранно започване на лечението. Въпреки че в сравнение с новите по-потентни медикаменти, те са умерено ефективни, при част от пациентите могат да се окажат оптималният избор за дълготрайно приложение. Постулатът „ако не е счупено – не го поправяй“ е приложим при провеждане на интерфероново лечение, но при липса на данни за активност на заболяването и липса на маркери за субтерапевтичност.

Изследването на свързващите и неутрализиращите антилекарствени антитела като прогностичен фактор за субтерапевтичност на интерферон-бета сред българската МС популация би подпомогнало установяването на правилна дългосрочна терапевтична стратегия. Възможността за обособяване на различни пациентски субпопулации може да се окаже решаващо за успеха на усилията за разработване на индивидуален терапевтичен подход.

III. 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 IFNβ 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 иницииране на терапията с IFNβ – *дефинирано като увеличение на EDSS с ≥ 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 IFNβ и BAb/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 IFNβ.

8. Определяне на приложимостта в клиничната практика на BAb и NAb в алгоритъм при мониториране на лечението с интерферон-бета.

IV. КЛИНИЧЕН КОНТИНГЕНТ

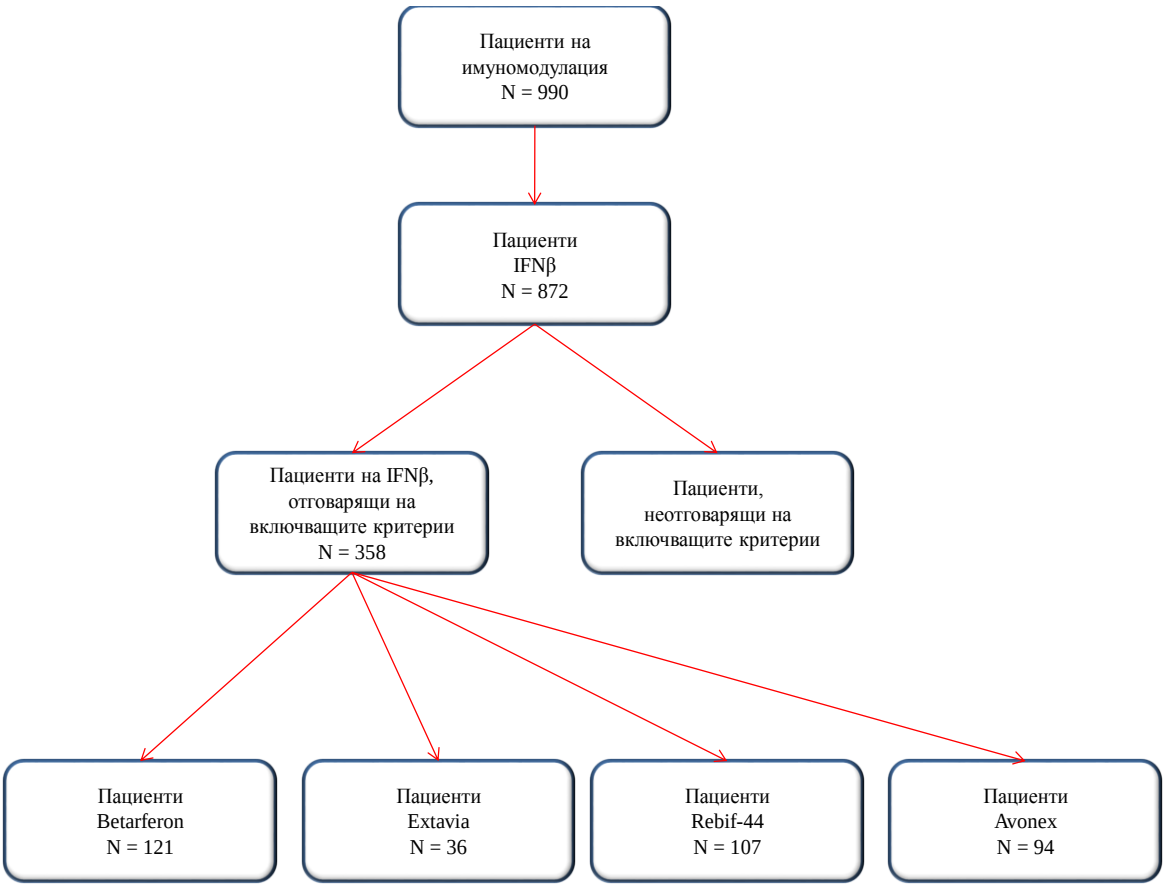
Настоящите изследвания са извършени в УМБАЛНП „Св. Наум“:

I. 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.

II. 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.

III. Сравнителен анализ на демографски и клинични характеристики между серопозитивните и серонегативните групи.

Фигура 12. 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 IFNβ: Betaferon© 250 μg подкожно през ден, Extavia© 250 μg подкожно през ден, Avonex© 30 μg интрамускулно ежеседмично, Rebif© 44 μg 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 пациенти 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: glatiramer acetate – Copaxon©).

3. Прилагана имуносупресивна 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, плазмофереза).

6. Компрометирани серумни проби – липиден, хемолитичен, иктеричен серум.

Проучването е насочено към установяване на изработването на антилекарствени антитела и връзката на NAb статуса с клиничната ефикасност на

интерферон-бета при кохорта пациенти, посещаващи Центъра по множествена склероза в УМБАЛНП „Св. Наум“. Пациентите са системно лекувани в Центъра и са проследявани на всеки 6 месеца, както и при клинични изяви на пристъп. Чрез срезово проучване е установен статусът им по отношение на антиинтерферонови 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 IFNβ-1b по НЗОК (отделно пациенти в юношеска възраст, лекуващи се с дарени количества IFNβ). Пациентите са с различна продължителност на лечението, но не по-малка от 18 месеца.

ЕТИЧНИ АСПЕКТИ

Всички участници в проучването, проведено в специализиран център по множествена склероза в УМБАЛПН „Св. Наум“, са дали информирано съгласие както за изследване на кръвната проба, така и за участие в анализ на данните. На доброволците е обяснено, че могат да откажат да участват в проекта, без да изтъкват причина за това.

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“ извършва тестването с финансиране от „Тева България“; Bayer Schering Pharma предоставя безвъзмездно INFβ-1b (Betaferon) на лекуваните пациенти под 16 години.

V. ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ

1. Клинични методи

1. Анамнеза, соматичен статус, пълен неврологичен статус.

2. Функционална оценка на пациентите с използване на следните скали: Functional System Score (FSS), Expanded disability status scale (EDSS).

2. Имунологични методи

1. ELISA (индиректен ензимосвързан имуносорбентен анализ) за определяне на BAb статуса на пациентите.

2. BAb(+) серумите са изследвани с луциферазагенерирана биолуминисценция чрез полуколичествен анализ за определяне на NAb статуса на пациентите.

3. 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 влошаването 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) с $\geq 1,0$, 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 по 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 анализ ELISA разделя пациентите на BAb(+) и BAb(–). BAb 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 BAb 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 луциферазагенерирана биолуминисценция, а реакцията е отчетена с многофункционален четец на микроплаки Beckman Coulter DTX 880.

Събиране и съхраняване на серумните проби: От пациенти се взема кръв еднократно, най-малко 18 месеца след започване на лечението с интерферон-бета. 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. За избягване на хемолиза епруветката се оставя да престои 45 минути на стайна температура до ясно отделяне на кръвния серум. Следва центрофугиране за 15 минути на 2 000 оборота на стайна температура и отделяне на серума. Липемични, хемолитични и иктерични проби не се използват за последващ анализ за наличие на BAb. Така получените серуми се съхраняват на –20ºC до три месеца за анализ.

Изследване за BAb: За целта е използван Anti-IFN-beta BAb Kit (Buhlmann). Серумните проби се разреждат 1:50 с инкубационен буфер, като се оставят да престоят 30 минути на стайна температура. Стандартите, високата и ниската контрола се разтварят в инкубационния буфер, както е описано в упътването на Anti-human-IFN-beta BAb Kit. Четирите стандарта съдържат съответно по 500, 200, 80 и 20 BTU (Buhlmann titer units) човешки anti-IFN-beta IgG антитела, т.е. BAb антитела. Многоямковата плака се промива трикратно с измиващ буфер и в нея се накапват по 100 µl/ямка стандартите, контролите и разредените серумни проби. Следва инкубиране за 2 часа на 4^0C, трикратно промиване с измиващ буфер, прибавяне към всяка ямка по 100 µl HRP (пероксидаза от хрян) свързано anti-human-IgG антитяло и инкубация за 2 часа на 4^0C. Следва ново промиване и добавяне по 100 µl/ямка TMB (тетраметилбензидин) субстрат, като се инкубира на тъмно за 30 минути на клатачка на стайна температура,. Реакцията се спира, като се добавя по 50 µl/ямка „стоп“ буфер. Интензитетът на оцветяване на пробите се измерва при 450 nm на многофункционален четец на микроплаки Beckman Coulter DTX 880.

Построява се стандартна крива, на която на ординатата се нанасят стойностите на абсорбция на стандартите при 450 nm, а на абцисата – съответстващите им човешки anti-IFN-beta IgG антитела (BTU). На така построената графика на ординатата се нанасят стойностите на абсорбция на серумните проби и се определят съответстващите им стойности на количество anti-IFN-beta IgG антитела. Серумни проби със стойност на BAb над 50 BTU биват последващо анализирани за наличие на NAb.

Изследване за наличие на NAb в серумните проби: за изследване на наличие на неутрализиращи антитела в серумни проби от пациенти, лекувани с

интерферонови препарати, е използван iLite™anti Human-IFN-beta-1a – IVD Kit (Biomonitor). Преди започването на експеримента топлинно денатурираните серумни проби се разреждат с еквивалентно количество разтворител и стандартите се приготвят по протокола на iLite™anti Human IFN-beta-1a – IVD Kit. За всички тестове стандартите съдържат 120 IU/ml, 48 IU/ml, 19 IU/ml, 8 IU/ml, 3,1 IU/ml, 1,2 IU/ml, 0,5 IU/ml и 0,00 IU/ml IFN. Негативната и позитивната контрола са готови за употреба без предварително разреждане. Всяка серумна проба, стандарт и контрола се накапват в две повторения по време на анализа. В 96-ямковата плака се поставят по 100 µl на ямка от стандартите, по 15 µl на ямка от разредените серумни проби, позитивната и негативната контрола, към които се добавя по 85 µl IFN с концентрация, посочена от производителя. Следва инкубация на 37°C при 5% CO_2 за 30 минути iLite™ клетките се добавят с концентрация 40 000 кл/ямка и отново следва инкубация за 18 часа на 37°C при 5% CO_2. След изтичане на инкубационното време към всяка ямка се добавя Bright-Glo™ субстрат, като луминисценцията се отчита след 2 минути на многофункционален четец на микроплаки Beckman Coulter DTX 880. Построява се стандартна крива, където абцисата показва IFN LU/ml активност, а на ординатата се поставят опитно получените стойности на луминисценция, изразени в RLU (Relative Light Units; относителни „светещи“ единици). Определя се средата на логоритмичната (експоненциалната) част на стандартната крива, която отговаря на 1 LU/ml IFN активност. На така построената графика на ординатата се нанасят стойностите на луминисцентното светене на серумните проби и се определят съответстващите им стойности на IFN активност по абцисата. Ако IFN LU/ml активността на серумната проба е по-малка или равна на 1 LU/ml, в анализираната проба следователно има неутрализиращи антитела.

VI. РЕЗУЛТАТИ

ИЗСЛЕДВАН КОНТИНГЕНТ

I. 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.

Пациенти с различна продължителност на лечението са изследвани серологично за наличието на антилекарствени антитела.

II. Отделно е анализирана група пациенти в юношеска възраст, като болните под 16 години са лекувани с дарен интерферон-бета-1b от фирмата производител с изричното съгласие на двамата родители и при спазване на всички правила за добра медицинска практика, приети в Детска неврологична клиника при УМБАЛНП „Св. Наум“.

III. При малка група NAb серопозитивни пациенти е изследван NAb титър.

Приетата мерна единица за BAb е BTU (Buhlamm Titer Units); всички с BTU ≥ 50 BTU са приети за позитивни.

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

Разпределение по пол и възраст:

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

Изследвани са две кохорти пациенти – над и под 18 години. Средна възраст на изследвания възрастен контингент – 38,1 ± 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.

Фигура 13. Разпределение по пол на изследваните възрастни, лекувани по НЗОК

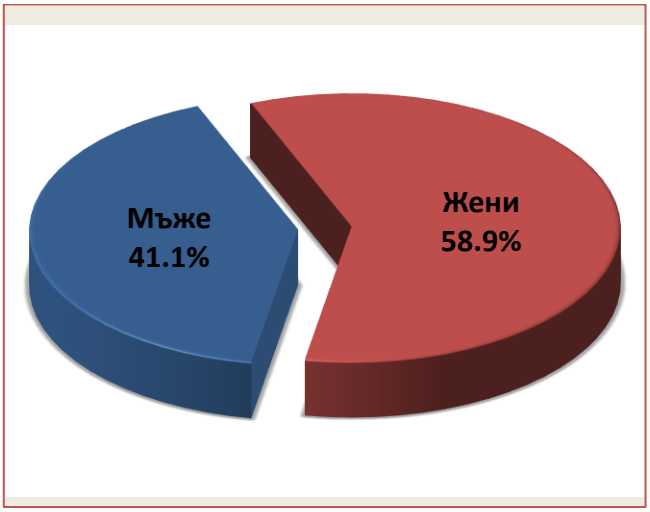


Таблица 9. Възрастово-полови характеристики на изследваните възрастни, лекувани по НЗОК

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

Разпределение на изследваните болни по вид на прилагания медикамент:

При изследваните болни с RRMS лечението се провежда с лекарствените продукти *Avonex, Betaferon, Extavia, Rebif* за срок, по-голям от 18 месеца (Фиг. 14).

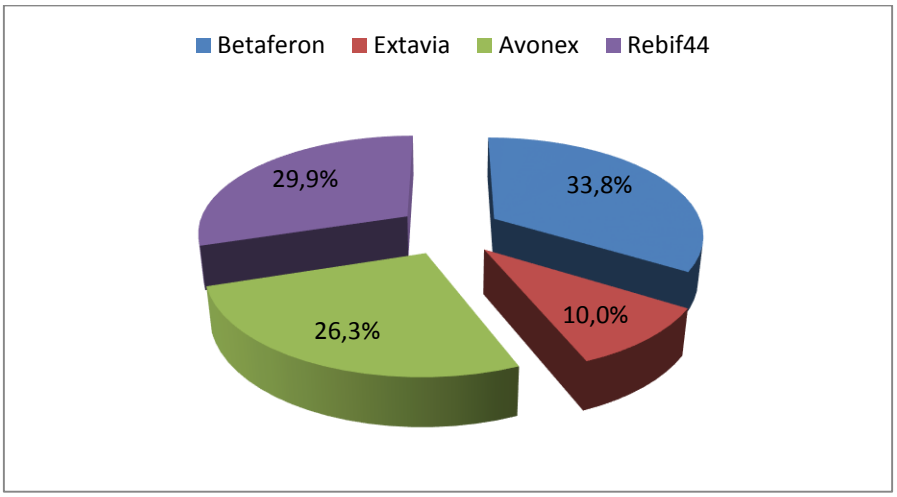
Болните, лекувани с лекарствен продукт от **Interferon-beta-1b** (*Betaferon, Extavia*), съставляват 44,1%, а тези, лекувани с **Interferon-beta-1a** (*Avonex, Rebif*), са

55,9%, т.е разпределението в двете основни групи по лекарствени продукти е почти 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 14. Разпределение по вид прилаган медикамент



Разпределение на изследваните болни според продължителността на лечението:

За нуждите на изследването поради по-малкия брой болни, провеждащи по-дългосрочно лечение, се налага групирането им в интервал от по две години. По показател „Продължителност на лечението“ се оформят четири подгрупи (Фиг. 15, Табл. 10). Най-голям е броят болни, при които лечението е с давност 18 месеца до 2 години.

Фигура 15. Разпределение на изследваните болни, лекувани по НЗОК, според продължителността на лечението

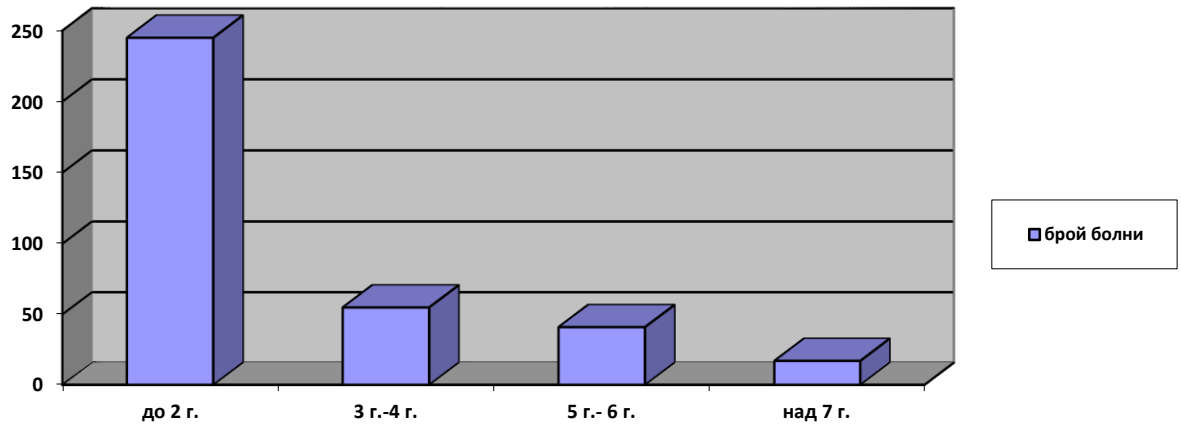


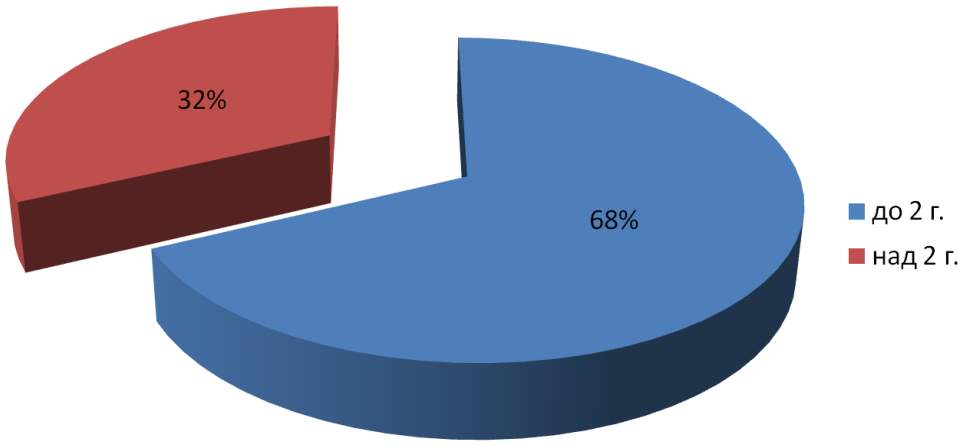
Таблица 10. Субгрупиране по продължителност на лечението

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

На базата на представеното разпределение по продължителност на лечението в извадката са оформени още две гнезда – с кратка продължителност на лечението – до 2 години, и с по-дълга продължителност на лечението – над 2 години:

- болни с продължителност на лечението от 18 месеца до 2 години – 68,4%;
- болни с продължителност на лечението над 2 години – 31,6%.

Фигура 16. Продължителност до и над 2 години лечение



С настоящото изследване са проучени някои аспекти, свързани с неутрализиращите антилекарствени антитела в българската популация на пациенти с множествена склероза, провеждащи лечение с интерферон-бета. Анализът на обективните данни е от полза за имплементирането им в рационални терапевтични стратегии.

Последователно са сравнени групите 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 си поставя за цел да отговори на въпросите какви са разликите при сравнение между субгрупите NAb(–) и NAb(+). Това срезово проучване има следните недостатъци:

1. Възможността за сероконверсия – пациентът от позитивен може да премине в негативен статус и обратното.

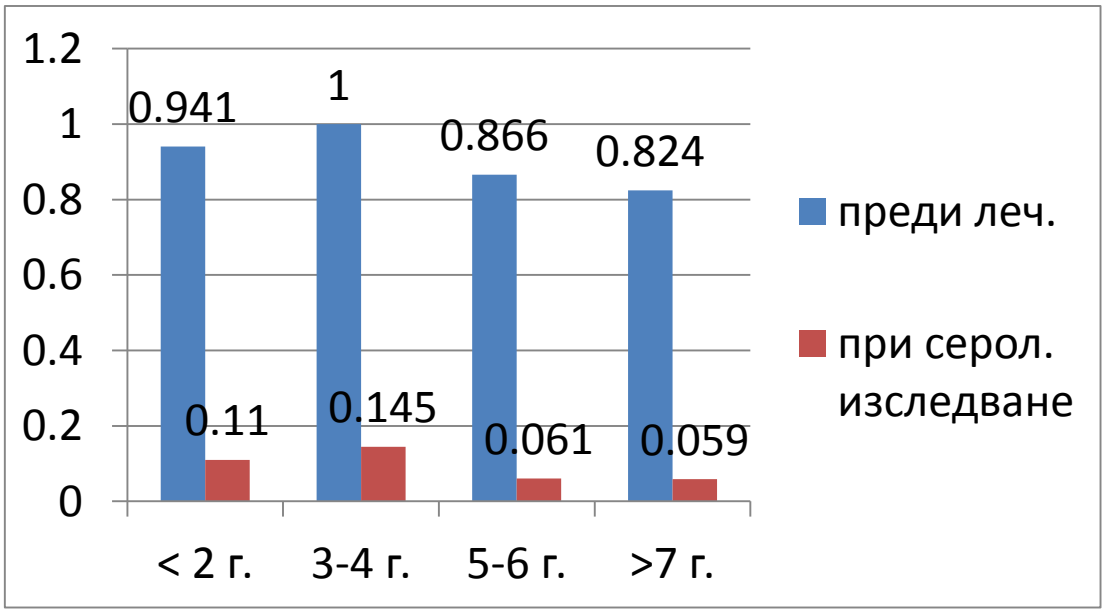
2. При включване в изследването пациентите не могат да бъдат рандомизирани на серопозитивни или негативни (не може да се уеднакви броят на болните). Това означава, че предполагаеми „преморбидни“ различия, независещи от терапията, могат да бъдат причина за серологичния резултат, например имуногенни различия между индивидите още на ниво изходни характеристики. Тези „слаби места“ създават редица неудобства при интерпретацията на резултатите. Възможно

е пациентите, които образуват NAb, да не са по своята същност еднакви с онези, които никога не изработват NAb или претърпяват сероконверсия.

Таблица 11. 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 17. Графично изобразяване на ARR в различните групи по продължителност на лечението



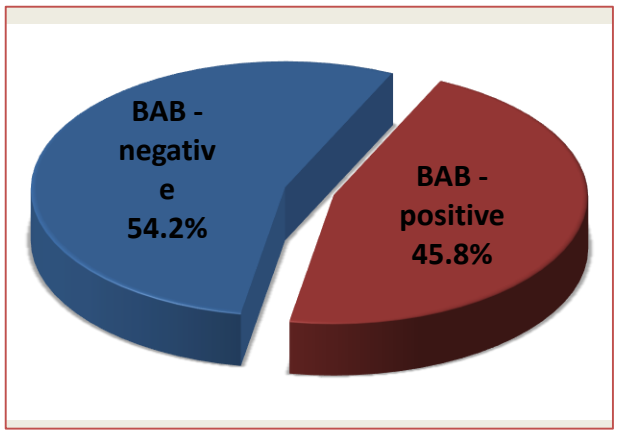
На Фигура 17 са сравнени ARR преди лечението (цялата група) и в момента на серологичното изследване (по групи с различна продължителност на лечението). Налице е значима редукция на честотата на пристъпите във всяка група. В изследването са включени само пациенти с благоприятен ефект от прилаганото лечение – „НЗОК респондери“. Отпадналите от лечението (с по-агресивен ход или при липса на ефект) не участват, поради което резултатът не е изненадващ. Редукцията на честотата на пристъпите е не по-малка от 85% във всяка една група с различна продължителност на лечението. Степента на намаление на пристъпите надхвърля данните от резултатите на редица проучвания. Този феномен може да се обясни с разликата във включващите критерии, клиничната характеристика на различната популации пациенти и използваната методология за оценка. Тенденцията в последните години при всички проучвания на множествена склероза е да се регистрират по-малък брой пристъпи преди и по време на лечението. 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) са довели 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, са включени и времето до поява на първи пристъп, времето между първи и втори пристъп, както и тежестта на първи и втори пристъп. Оценен е процентът на пациентите без пристъп, процентът пациенти без влошаване на инвалидизацията и процентът на пациентите, обединени от последните два показателя.

1. Изследвания за свързващи антитела срещу интерферон-бета

Таблица 12. Резултати от изследване на BAb – в общата кохорта

BAb	N	%
Негативни	193	54,2
Позитивни	163	45,8

Фигура 18. Резултати от изследване на BAb – в общата кохорта



В нашето изследване BAb позитивните са под 50%. Това е под средния процент в публикуваните данни, които сочат 50 – 80% позитивност (43). При много от изследванията за неутрализиращи антитела обаче честотата на BAb не се съобщава. Ето защо е трудно да се направи сравнение на резултатите, особено когато са използвани различни методи на изследване.

Като се има предвид, че формираната група за изследване отговаря на критериите на НЗОК за продължаване на лечението (не повече от един пристъп годишно), възможно е прекратилите лечение да са именно позитивните на антитела. Поради тази причина е направено сравнение на пациентите, лекувани до и над 2 години.

Пациентите, провели лечение до 2 години: съотношението е 28,2% негативни и 71,8% позитивни, докато при онези, продължили лечението си над 2 години, 62,8% са негативни и 37,2% – позитивни. Тези резултати се дължат или на сероконверсия, или подкрепят гореизказаното съмнение, че е възможно BAb позитивността да предсказва фармакологична резистентност.

При анализ на BAb серопозитивни пациенти, лекувани с медикаменти IFNβ-1b (Betaferon, Extavia), е установен висок процент на позитивност по отношение на ненеутрализиращи антитела, съответно 83,6% и 83,3%. При прилагане на формула за подкожно приложение IFNβ-1a позитивност на ненеутрализиращи антитела е установена при 22,1% от серопозитивните пациенти, а при IFNβ-1a за интрамускулно приложение – при 17,4%.

Фигура 19. Процентно съотношение на пациентите BAb(+/–) с продължителност на лечението до и над 2 години

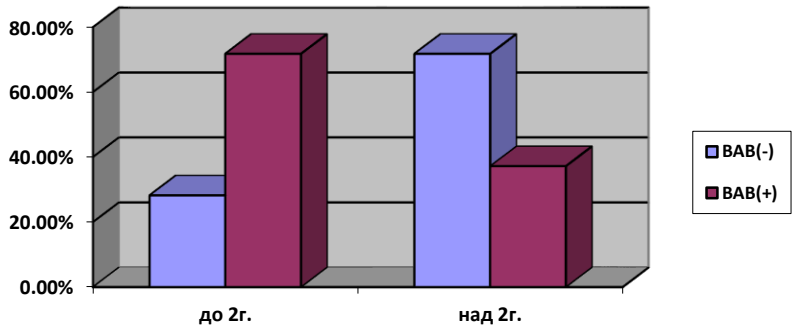


Таблица 13. Сравнение на групите BAb(+/–) по възраст, продължителност на болестта и времева проява на първите два пристъпа след започване на лечението

Показател	BAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативни	193	37,7	9,2	38,0	20,0	61,0	0,400
	Позитивни	163	38,6	9,9	38,0	17,0	59,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	193	27,5	8,2	27,0	8,0	47,0	0,191
	Позитивни	163	28,7	8,5	29,0	5,0	48,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	193	10,1	4,9	10,0	2,0	27,0	0,409
	Позитивни	163	9,6	4,9	9,0	2,0	28,0	
Време до 1-ви пристъп – месеци	Негативни	43	25,7	18,2	20,0	4,0	88,0	0,357
	Позитивни	60	22,5	15,8	19,0	1,0	84,0	
Време между първи и втори пристъп – месеци	Негативни	7	17,9	19,9	12,0	5,0	61,0	n/a
	Позитивни	28	13,5	10,5	10,0	5,0	45,0	

От представените данни е видно, че няма статистически значима разлика в описаните параметри. При групата на BAb(+) се установява по-кратко време между първи и втори пристъп, макар това да не е статистически достоверно.

Таблица 14. Сравнение на групите BAb(+/–) по тежест на първи пристъп

Тежест на първи пристъп	**BAb**		**Общо n (%)**	**p**
	Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Неквалифициран	6 (13,6)	8 (14,3)	14 (14)	1,000
„Неинвалидизиращ“ с КС	37 (84,1)	47 (83,9)	84 (84)	
„Инвалидизиращ“ с КС	1 (2,3)	1 (1,8)	2 (2)	
Общо	44 (100)	56 (100)	100 (100)	

Не се установява статистически значима разлика в тежестта на първи пристъп между двете групи, макар да става ясно, че повече пристъпи, изискващи кортикостероидно лечение, са налице в групата на BAb(+).

Таблица 15. Сравнение на групите BAb(+/–) по тежест на втори пристъп

Тежест на втори пристъп	**BAb**		**Общо n (%)**	**p**
	Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Не е пристъп	4 (36,4)	1 (3,3)	5 (12,2)	0,030
Неквалифициран	3 (27,3)	7 (23,3)	10 (24,4)	
„Неинвалидизиращ“ с КС	4 (36,4)	18 (60)	22 (53,7)	
„Инвалидизиращ“ с КС	0 (0)	4 (13,3)	4 (9,8)	
Общо	11 (100)	30 (100)	41 (100)	

Налице е разлика по отношение на тежестта на втори пристъп: значително по-чести са пристъпите, изискващи приложение на кортикостероиди – „инвалидизиращи“ и „неинвалидизиращи“ в групата на BAb(+).

Таблица 16. Сравнение на групите BAb(+/–) по отношение на системни странични реакции

Системни странични реакции	BAb		Общо n (%)	p
	Негативни n (%)	Позитивни n (%)		
Липсват	1 (0,5)	21 (12,9)	22 (6,2)	<0,001
Отшумели	64 (33,2)	79 (48,5)	143 (40,2)	
Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВ или др. лечение	105 (54,4)	54 (33,1)	159 (44,7)	
„Тежки“, повлияващи се от НСПВ	22 (11,4)	8 (4,9)	30 (8,4)	
Наново появяващи се	1 (0,5)	1 (0,6)	2 (0,6)	
Общо	193 (100)	163 (100)	356 (100)	

Налице е достоверна разлика в системните нежелани реакции (леки и тежки) – те се наблюдават много по-рядко в групата на BAb(+).

Не са се проявили никакви общи нежелани реакции при 12,9% от пациентите BAb(+) спрямо 0,5% BAb(–). Еднакъв е процентът на тези, при които системните нежелани реакции, след като напълно са отшумели, след време се появяват наново.

Таблица 17. Сравнение на групите BAb(+/–) по отношение на локални нежелани реакции

Локални нежелани реакции	BAb		Общо n (%)	p
	Негативни n (%)	Позитивни n (%)		
Липсват	35 (18,1)	19 (11,7)	54 (15,2)	0,007
Отшумели	69 (35,8)	88 (54)	157 (44,1)	
Леки персистиращи или появяващи се спорадично	82 (42,5)	52 (31,9)	134 (37,6)	
„Тежки“, повлияващи се от локално лечение	7 (3,6)	4 (2,5)	11 (3,1)	
Общо	193 (100)	163 (100)	356 (100)	

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

Таблица 18. Сравнение на групите BAb(+/–) според фамилната обремененост

Фамилност	**BAb**		**Общо n (%)**	**p**
	Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Липсва	189 (98,4)	160 (99,4)	349 (98,9)	0,752
Един родственик от първа или втора линия	2 (1)	0 (0)	2 (0,6)	
Повече от 1 родственик от първа или втора линия	1 (0,5)	1 (0,6)	2 (0,6)	
Общо	192 (100)	161 (100)	353 (100)	

Липсват разлики във фамилната обремененост в различните серологични групи.

Таблица 19. Сравнение на групите BAb(+/–) според придружаващите автоимунни заболявания

Придружаващи автоимунни заболявания	**BAb**		**Общо n (%)**	**p**
	Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Не	184 (95,3)	154 (94,5)	338 (94,9)	0,713
Да	9 (4,7)	9 (5,5)	18 (5,1)	
Общо	193 (100)	163 (100)	356 (100)	

Не се установява разлика по отношение на автоимунната коморбидност в двете групи.

Таблица 20. Сравнение на групите BAb(+/–) по фактор тютюнопушене

Тютюнопушене	BAb		Общо n (%)	p
	Негативни n (%)	Позитивни n (%)		
Никога непушили	169 (87,6)	111 (68,5)	280 (78,9)	<0,001
Някогашен пушач – над 2 години	10 (5,2)	17 (10,5)	27 (7,6)	
Скорошен пушач – близките 1 – 2 години	6 (3,1)	15 (9,3)	21 (5,9)	
Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	7 (3,6)	18 (11,1)	25 (7)	
Настоящ – над 10 цигари дневно	1 (0,5)	1 (0,6)	2 (0,6)	
Общо	193 (100)	162 (100)	355 (100)	

Демонстрира се разлика както при настоящи, така и при бивши пушачи: около три пъти по-често са настоящите и бивши (скорошни) пушачи в подгрупата на BAb позитивните пациенти. При бивши някогашни пушачи (над 2 г.) разликата е със същия знак, но е намалена два пъти. Непушачите са 87,6% при BAb(–) и 68,5% при BAb(+).

Таблица 21. Сравнение на различните групи BAb(+/–) по отношение на динамиката на оценката по скалата EDSS в периода от началото на лечението до имуносерологичното изследване

Увеличение по скалата EDSS	BAb		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)	

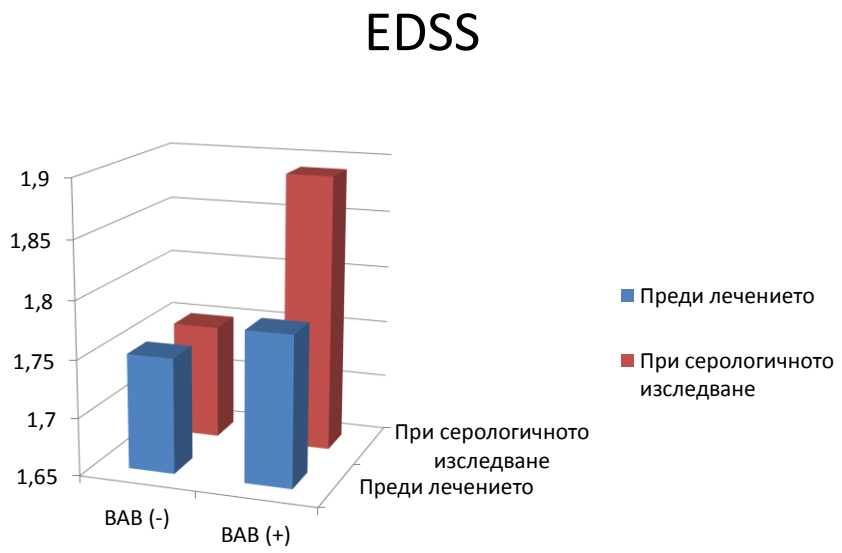
Въпреки че при неголям брой пациенти (11,5%) се установява влошаване на инвалидизацията, оценена по скалата EDSS, налице е статистически достоверна разлика по отношение на двете серологични групи. Трайно акумулиране на инвалидизация с над 1,0 точки по EDSS се установява при 2,1% от групата на BAb(–) спрямо 8,2% от групата BAb(+). Липса на динамика в инвалидизацията се констатира при 94,2% от пациентите в групата на BAb(–) спрямо 81,9% от групата BAb(+).

Таблица 22. Съпоставяне на различните серологични групи BAb(+/–) според оценката по скалата EDSS преди лечението и по време на имунологичното изследване; съпоставяне на различните серологични групи BAb(+/–) по ARR според продължителността на лечението

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	
ARR – 2 г. преди лечение	Негативни	193	0,92	0,26	1,00	0,50	2,00	0,263
	Позитивни	163	0,95	0,26	1,00	0,00	2,00	
ARR – лекувани до 2 г.	Негативни	138	0,07	0,17	0,00	0,00	0,50	0,012
	Позитивни	106	0,17	0,31	0,00	0,00	1,00	
ARR – лекувани 3 – 4 г.	Негативни	24	0,06	0,17	0,00	0,00	0,50	0,048
	Позитивни	31	0,21	0,31	0,00	0,00	1,00	
ARR – лекувани 5 – 6 г.	Негативни	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n/a
	Позитивни	19	0,03	0,11	0,00	0,00	0,50	
ARR – лекувани над 7 г.	Негативни	10	0,05	0,16	0,00	0,00	0,50	0,793
	Позитивни	7	0,07	0,19	0,00	0,00	0,50	

Общо в групата 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 20. Сравнение на оценката по скалата EDSS преди лечение и при имуносерологичното изследване – графично изобразяване



Годишната честота на пристъпите е съотносима в групите BAb(+) и BAb(–) преди започване на лечението, но се появява статистически значима разликата между групите по време на имунологичното изследване при пациентите, лекуващи се до 2 години, и онези, които се лекуват 3 – 4 години. Установява се по-ниска годишна честота на пристъпите в групата, неизработваща BAb. За по-дълго лекуващите се пациенти – над 5 години, такава зависимост не се демонстрира.

Може да се спекулира, че най-вероятно разликата в честотата на пристъпите се дължи на „неутрализиращата активност“ на BAb. Ако пациентите, изработващи свързващи антитела се окажат в положение на биофармакологична 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 лечението им. Факт е, че

неутрализиращият ефект на антилекарствените антитела има отложен ефект. Колкото по-продължителен е периодът на антитяломедиираната неутрализация на интерферона, толкова по-изявена може да стане липсата на протекция, което да доведе до изява на пристъпи.

Таблица 23. Сравнение на групите BAb(+/–) ARR преди лечението и при имуносерологичното изследване според продължителността на лечението

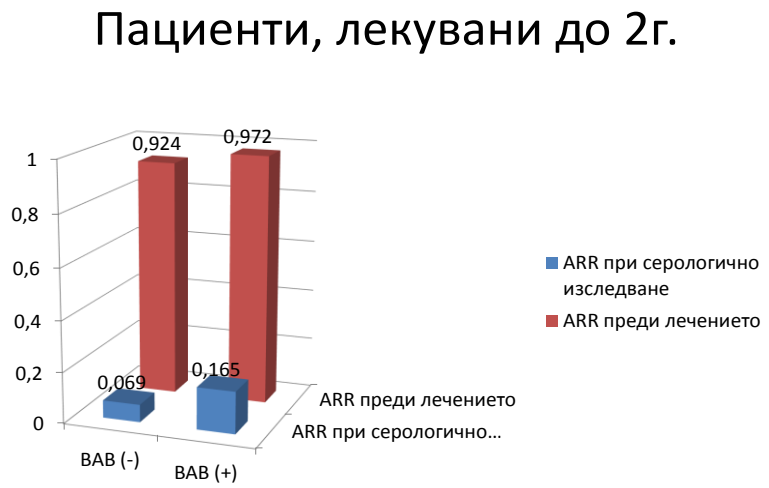
BAb	**Период на лечение**	**Период на наблюдение**	**Общ брой пациенти**	**Общ брой пристъпи**	**ARR**
BAb(+)	До 2 г. след лечение	Преди лечението	106	206	0,972
		След лечението	106	35	0,165
	3-та и 4-та година след лечение	Преди лечението	31	62	1,000
		След лечението	31	13	0,210
	5-а и 6-а година след лечение	Преди лечението	19	34	0,895
		След лечението	19	4	0,105
	7-ма и 8-ма година след лечение	Преди лечението	7	11	0,786
		След лечението	7	1	0,071
BAb(–)	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

Таблица 24. Статистическа достоверност

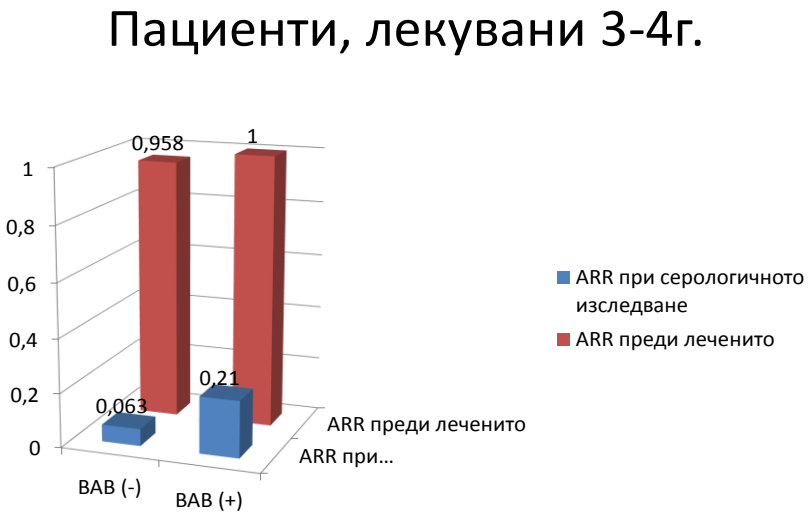
BAb	Сравнение на ARR преди и по време на лечението		p
BAb(+)	До 2 години преди лечение ↔	До 2 г. след лечение	<0,001
	До 2 години преди лечение ↔	3-та и 4-та година след лечение	<0,001
	До 2 години преди лечение ↔	5-а и 6-а година след лечение	<0,001
	До 2 години преди лечение ↔	7-ма и 8-ма година след лечение	0,015
BAb(–)	До 2 години преди лечение ↔	До 2 г. след лечение	<0,001
	До 2 години преди лечение ↔	3-та и 4-та година след лечение	<0,001
	До 2 години преди лечение ↔	5-а и 6-а година след лечение	<0,001
	До 2 години преди лечение ↔	7-ма и 8-ма година след лечение	0,004

Годишната честота на пристъпите е съотносима в групите BAb(+) и BAb(–) 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. 21.1, 21.2., 21.3., 21.4.). Установява се по-ниска годишна честота на пристъпите в групата, неизработваща BAb.

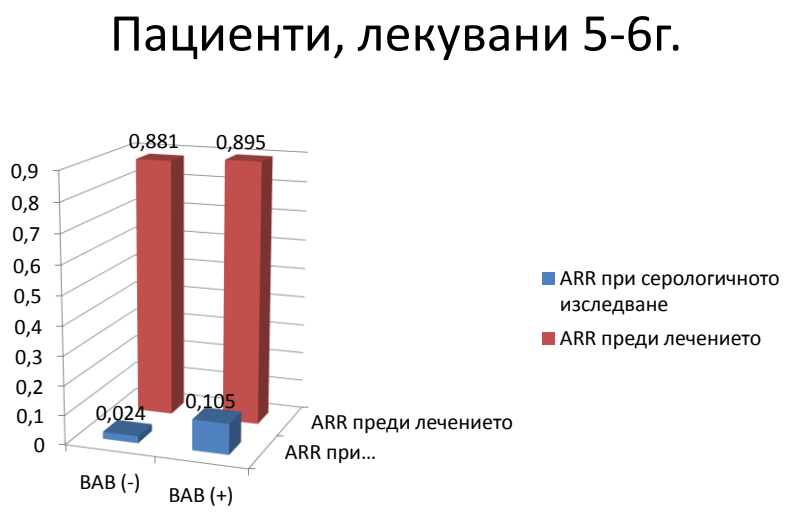
Фигура 21.1. Графично изобразяване на редукцията на ARR при групите BAb(+/–) при различна продължителност на лечението – лекувани до 2 години



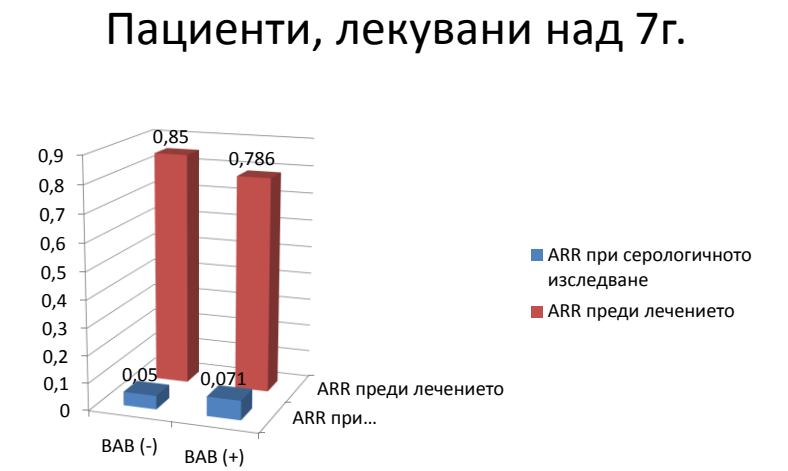
Фигура 21.2. Графично изобразяване на редукцията на ARR при групите BAb(+/–) при различна продължителност на лечението – лекувани 3 – 4 години



Фигура 21.3. Графично изобразяване на редукцията на ARR при групите BAb(+/–) при различна продължителност на лечението – лекувани 5 – 6 години



Фигура 21.4. Графично изобразяване на редукцията на ARR при групите BAb(+/–) при различна продължителност на лечението – лекувани над 7 години



РЕЗУЛТАТИ ОТ ИЗСЛЕДВАНЕ НА BAb ПО МЕДИКАМЕНТИ

Сравнението на резултатите по медикаменти си поставя за цел разширяване и задълбочаване на познанията ни за имуногеността на различните интерферонови медикаменти.

Фигура 22. Разпределение на BAb по медикаменти

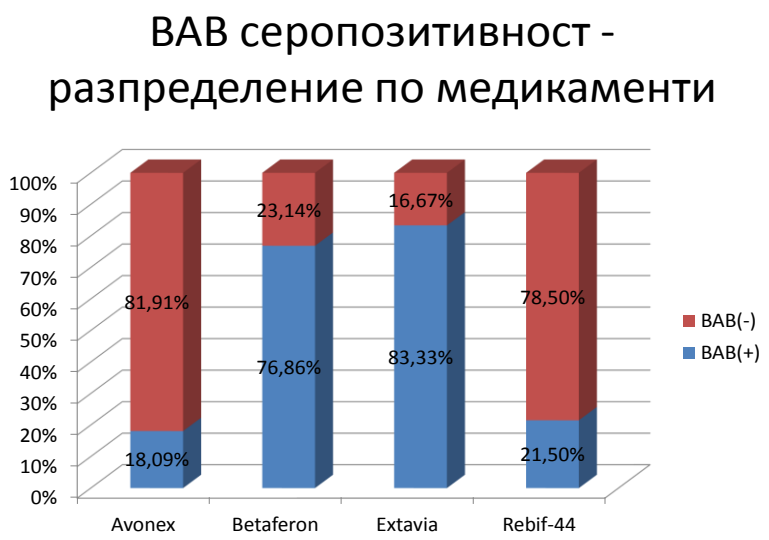


Таблица 25. Сравнение на групите BAb(+/–) по възраст, продължителност на болестта и терапията и времева проява на първите два пристъпа след започване на лечението в кохортата, лекувана с Avonex

Показател	BAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативен	77	37,1	8,8	38,0	20,0	55,0	0,976
	Позитивен	17	37,2	10,4	37,0	18,0	56,0	
Продължителност на терапията – месеци	Негативен	77	30,1	21,0	18,0	18,0	102,0	0,102
	Позитивен	17	21,5	6,7	18,0	18,0	42,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативен	77	28,6	8,1	28,0	8,0	44,0	0,382
	Позитивен	17	26,7	9,1	27,0	12,0	48,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативен	77	8,3	4,8	7,0	2,0	22,0	0,096
	Позитивен	17	10,5	5,4	9,0	3,0	25,0	
Време до 1-ви пристъп – месеци	Негативен	12	22,1	12,3	20,0	6,0	46,0	n/a
	Позитивен	7	17,1	15,0	10,0	5,0	48,0	
Време между първи и втори пристъп – месеци	Негативен	2	13,0	11,3	13,0	5,0	21,0	n/a
	Позитивен	3	6,0	1,0	6,0	5,0	7,0	

В групата на Avonex 17 пациенти (18,1%) са BAb(+).

Няма разлика по отношение на продължителността на лечението и характеристиките на болестта. Времето до първи пристъп и времето между първи и втори пристъп е по-кратко в групата на BAb серопозитивните.

Таблица 26. Съпоставяне на различните серологични групи BAb(+/–) според оценката по скалата EDSS преди лечението и по време на имунологичното изследване; съпоставяне на различните серологични групи BAb(+/–) по ARR според продължителността на лечението в кохортата, лекувана с Avonex

Показател	BAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
EDSS преди лечението	Негативен	76	1,71	0,43	1,50	0,00	3,00	0,816
	Позитивен	16	1,75	0,41	1,50	1,00	2,50	
EDSS при изследването на антитела	Негативен	77	1,70	0,49	1,50	0,00	3,50	0,582
	Позитивен	17	1,71	0,59	2,00	0,00	2,50	
ARR – 2 г. преди лечение	Негативен	77	0,95	0,28	1,00	0,50	2,00	0,929
	Позитивен	17	0,91	0,32	1,00	0,00	1,50	
ARR – лекувани до 2 г.	Негативен	55	0,05	0,16	0,00	0,00	0,50	0,014
	Позитивен	14	0,29	0,43	0,00	0,00	1,00	
ARR – лекувани 3 – 4 г.	Негативен	12	0,04	0,14	0,00	0,00	0,50	n/a
	Позитивен	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
ARR – лекувани 5 – 6 г.	Негативен	4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n/a
	Позитивен							
ARR – лекувани над 7 г.	Негативен	6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n/a
	Позитивен							

Промяна в инвалидизацията преди и след лечението не се наблюдава нито в групата BAb(+), нито в групата BAb(–).

Само при пациентите, провели лечение до 2 години, е налице статистически значима по-висока честота на пристъпите (ARR) в групата BAb(+). В останалите групи с продължителност на лечението 3 и повече години, броят на болните е малък, неподатлив на статистическа обработка.

Таблица 27. Сравнение на групите BAb(+/–) по възраст, продължителност на болестта и терапията и времева проява на първите два пристъпа след започване на лечението в кохортата, лекувана с Betaferon

Показател	BAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативни	28	39,1	9,8	41,0	20,0	54,0	0,996
	Позитивни	93	39,1	10,5	40,0	17,0	59,0	
Продължителност на терапията – месеци	Негативни	28	35,4	37,8	18,0	18,0	204,0	0,907
	Позитивни	93	34,7	21,4	24,0	18,0	84,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	28	26,7	7,7	27,0	12,0	40,0	0,317
	Позитивни	93	28,6	9,1	30,0	5,0	48,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	28	12,4	5,0	12,5	3,0	21,0	0,034
	Позитивни	93	10,0	5,4	8,0	2,0	28,0	
Време до първи пристъп в месеци	Негативни	8	24,1	13,1	28,0	4,0	40,0	n/a
	Позитивни	37	24,4	17,2	19,0	1,0	84,0	
Време между първи и втори пристъп в месеци	Негативни	0						n/a
	Позитивни	20	15,1	11,9	12,0	5,0	45,0	

В групата на Betaferon 93 пациенти (76,9%) са BAb(+).

Статистически достоверна е разликата по отношение на давността на заболяването по време на изследването – в групата на BAb(–) давността е го-голяма. Останалите параметри са съпоставими.

Таблица 28. Съпоставяне на различните серологични групи BAb(+/–) според оценката по скалата EDSS преди лечението и по време на имунологичното изследване; съпоставяне на различните серологични групи BAb(+/–) по ARR според продължителността на лечението в кохортата, лекувана с Betaferon

Показател	BAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
EDSS преди лечението	Негативни	27	1,81	0,56	1,50	1,00	3,50	0,829
	Позитивни	92	1,79	0,51	2,00	0,00	3,50	
EDSS при изследването на антитела	Негативни	28	1,80	0,72	1,50	0,00	3,50	0,231
	Позитивни	93	1,92	0,65	2,00	0,00	4,00	
ARR – 2 г. преди лечение	Негативни	28	0,89	0,21	1,00	0,50	1,00	0,524
	Позитивни	93	0,94	0,27	1,00	0,50	2,00	
ARR – лекувани до 2 г.	Негативни	19	0,08	0,19	0,00	0,00	0,50	0,426
	Позитивни	54	0,14	0,26	0,00	0,00	1,00	
ARR – лекувани 3 – 4 г.	Негативни	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n/a
	Позитивни	17	0,26	0,36	0,00	0,00	1,00	
ARR – лекувани 5 – 6 г.	Негативни	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n/a
	Позитивни	15	0,03	0,13	0,00	0,00	0,50	
ARR – лекувани над 7 г.	Негативни	1	0,00		0,00	0,00	0,00	n/a
	Позитивни	7	0,07	0,19	0,00	0,00	0,50	

Разликите в различните серологични групи не достигат статистическа значимост по отношение на оценката по скалата EDSS.

Таблица 29. Сравнение на групите BAb(+/–) по възраст, продължителност на болестта и терапията и времева проява на първите два пристъпа след започване на лечението в кохортата, лекувана с Extavia

Показател	BAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативни	6	37,2	10,5	34,5	26,0	51,0	n/a
	Позитивни	30	35,7	7,8	34,5	23,0	55,0	
Продължителност на терапията в месеци	Негативни	6	21,0	5,0	18,0	18,0	30,0	n/a
	Позитивни	30	26,1	9,8	22,0	18,0	48,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	6	32,2	9,0	31,5	21,0	45,0	n/a
	Позитивни	30	28,8	7,0	28,0	17,0	47,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	6	5,0	4,0	3,0	3,0	13,0	n/a
	Позитивни	30	7,2	3,4	6,5	2,0	17,0	
Време до първи пристъп в месеци	Негативни	0						n/a
	Позитивни	11	21,3	12,5	20,0	1,0	41,0	
Време между първи и втори пристъп в месеци	Негативни	0						n/a
	Позитивни	3	10,0	3,0	10,0	7,0	13,0	

В групата на Exravia 30 пациенти (83,3%) са BAb(+).

Липсва разлика или възможност за сравнение на описаните параметри в двете серологични групи.

Таблица 30. Съпоставяне на различните серологични групи BAb(+/–) според оценката по скалата EDSS преди лечението и по време на имунологичното изследване; съпоставяне на различните серологични групи BAb(+/–) по ARR според продължителността на лечението в кохортата, лекувана с Extavia

Показател	BAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
EDSS преди лечението	Негативни	6	2,17	0,52	2,00	1,50	3,00	n/a
	Позитивни	29	1,98	0,63	2,00	0,00	3,00	
EDSS при изследването	Негативни	6	2,17	0,52	2,00	1,50	3,00	n/a
	Позитивни	30	2,03	0,86	2,00	0,00	4,00	
ARR – 2 г. преди лечение	Негативни	6	0,92	0,20	1,00	0,50	1,00	n/a
	Позитивни	30	1,05	0,15	1,00	1,00	1,50	
ARR – лекувани до 2 г.	Негативни	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n/a
	Позитивни	19	0,18	0,34	0,00	0,00	1,00	
ARR – лекувани 3 – 4 г.	Негативни	1	0,00		0,00	0,00	0,00	n/a
	Позитивни	11	0,18	0,25	0,00	0,00	0,50	

Поради малкия брой пациенти след групиране според серологичния статус групите не могат да бъдат сравнявани статистически достоверно, но прави впечатление, че при петимата негативни пациенти с двугодишна продължителност на терапията не е регистриран нито един пристъп на заболяването.

Таблица 31. Сравнение на субгрупите BAb(+/–) по възраст, продължителност на болестта и терапията и времева проява на първите два пристъпа след започване на лечението в кохортата, лекувана с Rebif44

Показател	BAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативни	82	37,9	9,4	38,0	21,0	61,0	0,121
	Позитивни	23	41,3	8,9	43,0	22,0	55,0	
Продължителност на терапията – месеци	Негативни	82	29,7	20,6	18,0	18,0	96,0	0,379
	Позитивни	23	25,6	17,0	18,0	18,0	66,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	82	26,4	8,4	26,0	9,0	47,0	0,042
	Позитивни	23	30,4	7,6	31,0	15,0	45,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	82	11,4	4,4	11,0	3,0	27,0	0,655
	Позитивни	23	10,9	3,4	10,0	6,0	22,0	
Време до първи пристъп – месеци	Негативни	23	28,0	22,1	15,0	4,0	88,0	n/a
	Позитивни	5	18,8	13,5	24,0	5,0	36,0	
Време между първи и втори пристъп – месеци	Негативни	5	19,8	23,3	12,0	5,0	61,0	n/a
	Позитивни	2	14,0	5,7	14,0	10,0	18,0	

В групата на Rebif44 23 пациенти (21,5%) са BAb(+).

Възрастта на клиничния дебют е по-висока при групата BAb(+).

Таблица 32. Съпоставяне на различните серологични групи BAb(+/–) според оценката по скалата EDSS преди лечението и по време на имунологичното изследване; съпоставяне на различните серологични групи BAb(+/–) по ARR според продължителността на лечението в кохортата, лекувана с Rebif44

Показател	BAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
EDSS преди лечението	Негативни	81	1,73	0,59	1,50	0,00	3,50	0,078
	Позитивни	23	1,54	0,30	1,50	1,00	2,00	
EDSS при изследването	Негативни	82	1,77	0,68	1,50	0,00	3,50	0,476
	Позитивни	23	1,70	0,45	1,50	1,00	3,00	
ARR – 2 г. преди лечение	Негативни	82	0,91	0,26	1,00	0,50	2,00	0,767
	Позитивни	23	0,89	0,30	1,00	0,50	1,50	
ARR – лекувани до 2 г.	Негативни	59	0,08	0,19	0,00	0,00	0,50	0,399
	Позитивни	19	0,13	0,28	0,00	0,00	1,00	
ARR – лекувани 3 – 4 г.	Негативни	8	0,13	0,23	0,00	0,00	0,50	n/a
	Позитивни							
ARR – лекувани 5 – 6 г.	Негативни	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n/a
	Позитивни	4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
ARR – лекувани над 7 г.	Негативни	3	0,17	0,29	0,00	0,00	0,50	n/a

Изследваните параметри не се различават в различните серологични групи на пациенти, лекуващи се с Rebif.

Таблица 33. Сравнение на тежестта на първи пристъп при различните серологични групи BAb(+/–) по медикаменти

Терапия	**Тежест на първи пристъп**	**BAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Avonex	Неквалифициран	2 (16,7)	2 (33,3)	4 (22,2)	n/a
	„Неинвалидизиращ“ с КС	10 (83,3)	4 (66,7)	14 (77,8)	
	Общо	12 (100)	6 (100)	18 (100)	
Betaferon	Неквалифициран	2 (25)	4 (11,4)	6 (14)	0,308
	„Неинвалидизиращ“ с КС	6 (75)	31 (88,6)	37 (86)	
	Общо	8 (100)	35 (100)	43 (100)	
Extavia	Неквалифициран	(0)	1 (10)	1 (10)	n/a
	„Неинвалидизиращ“ с КС	(0)	8 (80)	8 (80)	
	„Инвалидизиращ“ с КС	(0)	1 (10)	1 (10)	
	Общо	(0)	10 (100)	10 (100)	
Rebif	Неквалифициран	2 (8,3)	1 (20)	3 (10,3)	0,553
	„Неинвалидизиращ“ с КС	21 (87,5)	4 (80)	25 (86,2)	
	„Инвалидизиращ“ с КС	1 (4,2)	0 (0)	1 (3,4)	
	Общо	24(100)	5 (100)	29(100)	

След съпоставяне на данните прави впечатление, че първите пристъпи, които изискват лечение с кортикостероиди, са повече при пациентите BAb(+) на лечение с IFNβ-1b и повече при пациентите BAb(–) на лечение с IFNβ-1a.

Таблица 34. Сравнение на тежестта на втори пристъп при различните серологични групи BAb(+/–) по медикаменти

Терапия	**Тежест на втори пристъп**	**BAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Avonex	Не е пристъп	1 (33,3)	0 (0)	1 (14,3)	n/a
	Неквалифициран	0 (0)	1 (25)	1 (14,3)	
	„Неинвалидизиращ“ с КС	2 (66,7)	3 (75)	5 (71,4)	
	Общо	3 (100)	4 (100)	7 (100)	
Betaferon	Неквалифициран	(0)	6 (30)	6 (30)	n/a
	„Неинвалидизиращ“ с КС	(0)	11 (55)	11 (55)	
	„Инвалидизиращ“ с КС	(0)	3 (15)	3 (15)	
	Общо	(0)	20 (100)	20 (100)	
Extavia	Не е пристъп	(0)	1 (25)	1 (25)	n/a
	„Неинвалидизиращ“ с КС	(0)	2 (50)	2 (50)	
	„Инвалидизиращ“ с КС	(0)	1 (25)	1 (25)	
	Общо	(0)	4 (100)	4 (100)	
Rebif	Не е пристъп	3 (37,5)	0 (0)	3 (30)	n/a
	Неквалифициран	3 (37,5)	0 (0)	3 (30)	
	„Неинвалидизиращ“ с КС	2 (25)	2 (100)	4 (40)	
	Общо	8 (100)	2 (100)	10 (100)	

От направената съпоставка е видно, че втори пристъп са получавали само пациенти BAb(+) от лекуваните с IFNβ-1b.

Таблица 35. Сравнение на системните нежелани реакции при различните серологични групи BAb(+/–) по медикаменти

Терапия	Общи нежелани реакции	BAb		Общо n (%)	p
		Негативни n (%)	Позитивни n (%)		
Avonex	Липсват	0 (0)	3 (17,6)	3 (3,2)	0,025
	Отшумели	36 (46,8)	7 (41,2)	43 (45,7)	
	Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВС или друго лечение	32 (41,6)	6 (35,3)	38 (40,4)	
	„Тежки“, повлияващи се от НСПВС	8 (10,4)	1 (5,9)	9 (9,6)	
	Отново появяващи се	1 (1,3)	0 (0)	1 (1,1)	
	Общо	77 (100)	17 (100)	94 (100)	
Betaferon	Липсват	0 (0)	15 (16,1)	15 (12,4)	0,001
	Отшумели	8 (28,6)	47 (50,5)	55 (45,5)	
	Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВС или друго лечение	15 (53,6)	26 (28)	41 (33,9)	
	„Тежки“, повлияващи се от НСПВС	5 (17,9)	5 (5,4)	10 (8,3)	
	Общо	28 (100)	93 (100)	121 (100)	
Extavia	Липсват	0 (0)	3 (10)	3 (8,3)	1,000
	Отшумели	2 (33,3)	11 (36,7)	13 (36,1)	
	Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВС или друго лечение	4 (66,7)	15 (50)	19 (52,8)	
	Отново появяващи се	0 (0)	1 (3,3)	1 (2,8)	
	Общо	6 (100)	30 (100)	36 (100)	
Rebif	Липсват	1 (1,2)	0 (0)	1 (1)	0,003
	Отшумели	18 (22)	14 (60,9)	32 (30,5)	
	Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВС или друго лечение	54 (65,9)	7 (30,4)	61 (58,1)	
	„Тежки“, повлияващи се от НСПВС	9 (11)	2 (8,7)	11 (10,5)	
	Общо	82 (100)	23 (100)	105 (100)	

В групата на Avonex и Betaferon както леките, така и тежките нежелани реакции са по-изразени в групата на BAb(–).

В групата на Extavia не са наблюдавани тежки нежелани реакции, но леките са малко повече при BAb(–).

В групата на Rebif44 системните нежелани реакции (по-подчертано за леките персистиращи) са по-често срещани в групата на BAb(–).

Таблица 36. Сравнение на локалните нежелани реакции при различните серологични групи BAb(+/–) по медикаменти

Терапия	**Локални нежелани реакции**	**BAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Avonex	Липсват	33 (42,9)	6 (35,3)	39 (41,5)	0,348
	Отшумели	31 (40,3)	5 (29,4)	36 (38,3)	
	Леки персистиращи или появяващи се от време на време	12 (15,6)	6 (35,3)	18 (19,1)	
	„Тежки“, повлияващи се от локално лечение	1 (1,3)	0 (0)	1 (1,1)	
	Общо	77 (100)	17 (100)	94 (100)	
Betaferon	Липсват	0 (0)	10 (10,8)	10 (8,3)	<0,001
	Отшумели	8 (28,6)	56 (60,2)	64 (52,9)	
	Леки персистиращи или появяващи се от време на време	19 (67,9)	24 (25,8)	43 (35,5)	
	„Тежки“, повлияващи се от локално лечение	1 (3,6)	3 (3,2)	4 (3,3)	
	Общо	28 (100)	93 (100)	121 (100)	
Extavia	Липсват	0 (0)	3 (10)	3 (8,3)	0,254
	Отшумели	1 (16,7)	12 (40)	13 (36,1)	
	Леки персистиращи или появяващи се от време на време	4 (66,7)	15 (50)	19 (52,8)	
	„Тежки“, повлияващи се от локално лечение	1 (16,7)	0 (0)	1 (2,8)	
	Общо	6 (100)	30 (100)	36 (100)	
Rebif	Липсват	2 (2,4)	0 (0)	2 (1,9)	0,065
	Отшумели	29 (35,4)	15 (65,2)	44 (41,9)	
	Леки персистиращи или появяващи се от време на време	47 (57,3)	7 (30,4)	54 (51,4)	
	„Тежки“, повлияващи се от локално лечение	4 (4,9)	1 (4,3)	5 (4,8)	
	Общо	82 (100)	23 (100)	105 (100)	

По отношение на локалните нежелани реакции при IFNβ-1b около 10% от пациентите никога не са имали нежелани реакции в групата на BAb(+), при IFNβ-1a s.c. те са 0%, а при IFNβ-a i.m. процентът на пациентите без локални нежелани реакции е дори по-малък при серопозитивната, отколкото при серонегативната група.

Таблица 37. Сравнение на фамилната обремененост по отношение на множествена склероза при различните серологични групи BAb(+/–) по медикаменти

Терапия	**Фамилност**	**BAb**		**Общо n (%)**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**	
Avonex	Липсва	77 (100)	16 (100)	93 (100)
	Общо	77 (100)	16 (100)	93 (100)
Betaferon	Липсва	27 (96,4)	93 (100)	120 (99,2)
	Повече от 1 родственик първа или втора линия	1 (3,6)	0 (0)	1 (0,8)
	Общо	28 (100)	93 (100)	121 (100)
Extavia	Липсва	5 (83,3)	28 (96,6)	33 (94,3)
	Един родственик от първа или втора линия	1 (16,7)	0 (0)	1 (2,9)
	Повече от 1 родственик първа или втора линия	0 (0)	1 (3,4)	1 (2,9)
	Общо	6 (100)	29 (100)	35 (100)
Rebif	Липсва	80 (98,8)	23 (100)	103 (99)
	Един родственик от първа или втора линия	1 (1,2)	0 (0)	1 (1)
	Общо	81 (100)	23 (100)	104 (100)

Не се установяват разлики в групите по медикаменти.

Таблица 38. Сравнение на коморбидността по отношение на други автоимунни заболявания при различните серологични групи BAb(+/–) по медикаменти

Терапия	**Придружаващи автоимунни заболявания**	**BAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Avonex	Не	74 (96,1)	17 (100)	91 (96,8)	1,000
	Да	3 (3,9)	0 (0)	3 (3,2)	
	Общо	77 (100)	17 (100)	94 (100)	
Betaferon	Не	27 (96,4)	89 (95,7)	116 (95,9)	1,000
	Да	1 (3,6)	4 (4,3)	5 (4,1)	
	Общо	28 (100)	93 (100)	121 (100)	
Extavia	Не	6 (100)	28 (93,3)	34 (94,4)	1,000
	Да	0 (0)	2 (6,7)	2 (5,6)	
	Общо	6 (100)	30 (100)	36 (100)	
Rebif	Не	77 (93,9)	20 (87)	97 (92,4)	0,369
	Да	5 (6,1)	3 (13)	8 (7,6)	
	Общо	82 (100)	23 (100)	105 (100)	

Не са провеждани специализирани изследвания по отношение на анамнестичните данни и физикалния преглед. Не се установяват статистически значими разлики в изследваните групи.

Таблица 39. Сравнение на влиянието на тютюнопушенето при различните серологични групи BAb(+/–) по медикаменти

Терапия	Тютюнопушене	BAb		Общо n (%)	p
		Негативни n (%)	Позитивни n (%)		
Avonex	Никога непушили	65 (84,4)	15 (88,2)	80 (85,1)	0,402
	Някогашен пушач – не пуши повече от 2 години	7 (9,1)	0 (0)	7 (7,4)	
	Скорошен пушач – преустановил пушенето в последните 1 – 2 години	2 (2,6)	0 (0)	2 (2,1)	
	Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	3 (3,9)	2 (11,8)	5 (5,3)	
	Общо	77 (100)	17 (100)	94 (100)	
Betaferon	Никога непушили	25 (89,3)	55 (59,8)	80 (66,7)	0,020
	Някогашен пушач – не пуши повече от 2 години	1 (3,6)	14 (15,2)	15 (12,5)	
	Скорошен пушач – преустановил пушенето в последните 1 – 2 години	0 (0)	10 (10,9)	10 (8,3)	
	Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	1 (3,6)	12 (13)	13 (10,8)	
	Настоящ – над 10 цигари дневно	1 (3,6)	1 (1,1)	2 (1,7)	
	Общо	28 (100)	92 (100)	120 (100)	
Extavia	Никога непушили	5 (83,3)	23 (76,7)	28 (77,8)	0,807
	Някогашен пушач – не пуши повече от 2 години	0 (0)	2 (6,7)	2 (5,6)	
	Скорошен пушач – преустановил пушенето в последните 1 – 2 години	0 (0)	3 (10)	3 (8,3)	
	Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	1 (16,7)	2 (6,7)	3 (8,3)	
	Общо	6 (100)	30 (100)	36 (100)	
Rebif	Никога непушили	74 (90,2)	18 (78,3)	92 (87,6)	0,229
	Някогашен пушач – не пуши повече от 2 години	2 (2,4)	1 (4,3)	3 (2,9)	
	Скорошен пушач – преустановил пушенето в последните 1 – 2 години	4 (4,9)	2 (8,7)	6 (5,7)	
	Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	2 (2,4)	2 (8,7)	4 (3,8)	
	Общо	82 (100)	23 (100)	105 (100)	

Само в групата на Betaferon при BAb позитивните настоящите и бивши пушачи са статистически повече, никога непушилите обаче са повече в групата на BAb(–) при всички медикаменти, като само при Avonex процентите са сходни.

Таблица 40. Сравнение на серологичните групи BAb (+/–) по отношение на динамиката на оценката по скалата EDSS при различните медикаменти

Терапия	**Увеличение по скалата EDSS**	**BAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Avonex	0	74 (97,4)	14 (87,5)	88 (95,7)	0,138
	0,5	2 (2,6)	2 (12,5)	4 (4,3)	
	Общо	76 (100)	16 (100)	92 (100)	
Betaferon	0	25 (92,6)	73 (79,3)	98 (82,4)	0,563
	0,5	1 (3,7)	12 (13)	13 (10,9)	
	1	1 (3,7)	5 (5,4)	6 (5)	
	1,5	0 (0)	2 (2,2)	2 (1,7)	
	Общо	27 (100)	92 (100)	119 (100)	
Extavia	0	6 (100)	25 (86,2)	31 (88,6)	1,000
	0,5	0 (0)	1 (3,4)	1 (2,9)	
	1	0 (0)	3 (10,3)	3 (8,6)	
	Общо	6 (100)	29 (100)	35 (100)	
Rebif	0	74 (91,4)	19 (82,6)	93 (89,4)	0,184
	0,5	4 (4,9)	1 (4,3)	5 (4,8)	
	1	3 (3,7)	3 (13)	6 (5,8)	
	Общо	81 (100)	23 (100)	104 (100)	

В групата на Avonex е установено нарастване на инвалидността само с 0,5 точки по скалата EDSS, като в серопозитивната група процентът е по-висок спрямо серонегативната. При Betaferon тази тенденция е валидна за покачване както с 0,5, така и с 1,0 и с 1,5 при серопозитивните. При болните, лекувани с Extavia, макар и малък процент да са покачили оценката по скалата EDSS, то това са тези, което са

BAb(+). В групата на Rebif44 съотношението на влошените с 0,5 е еднакво, но влошените с 1,0 са 13% в групата на BAb(+) спрямо 3% в BAb(–). При сравнение в групите се установява следната обща промяна в оценката по скалата EDSS: Avonex – 12,5%, Betaferon – 20,6%, Extavia – 13,7%, Rebif44 – 17,3% при BAb позитивните и съответно 2,6%, 7,4%, 0%, 8,6% при BAb негативните, като трайната акумулация на инвалидността с над 1,0 по скалата EDSS е както следва: Betaferon – 7,6%, Extavia – 10,3%, Rebif44 – 13,3% при BAb позитивните и съответно 0,0%, 0,0%, 3,7% при BAb негативните.

Таблица 41. Съотношение на пациентите според продължителността на лечението

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

Таблица 42. Сравнение на групите BAb(+/–) по възраст, давност на болестта и време до проява на първи пристъп в кохортата, лекувана с продължителност до 24 месеца (2 години)

Показател	**BAb**	**N**	**Mean**	**SD**	**Median**	**Min**	**Max**	**p**
Възраст при изследването – години	Негативни	138	37,7	8,8	38,0	20,0	61,0	0,956
	Позитивни	106	37,7	10,1	38,0	17,0	57,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	138	27,7	8,2	26,0	8,0	47,0	0,910
	Позитивни	106	27,6	8,6	27,0	5,0	48,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	138	9,9	4,9	10,0	2,0	27,0	0,788
	Позитивни	106	9,8	5,0	9,0	2,0	26,0	
Време до първи пристъп – месеци	Негативни	31	24,8	16,0	20,0	4,0	72,0	0,051
	Позитивни	35	17,8	11,9	16,0	1,0	48,0	

Не се установяват статистически значими разлики в субгрупите BAb(+) и BAb(–) по отношение на възрастта при клиничния дебют и при изследването, както и на давността на болестта. Независимо че е налице различие във времето до първи пристъп, липсва статистическа междугрупова разлика.

Таблица 43. Сравнение на групите BAb(+/–) по възраст, давност на болестта и време до проява на първи пристъп в кохортата, лекувана с продължителност до 24 – 48 месеца (3 – 4 години)

Показател	BAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативни	24	37,0	11,6	34,5	20,0	56,0	0,469
	Позитивни	31	39,0	8,9	40,0	20,0	55,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	24	27,4	8,6	26,5	14,0	42,0	0,104
	Позитивни	31	31,0	7,5	31,0	14,0	47,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	24	9,6	6,4	7,0	3,0	27,0	0,240
	Позитивни	31	7,8	3,7	7,0	2,0	19,0	
Време до първи пристъп – месеци	Негативни	6	25,7	14,7	25,5	6,0	46,0	n/a
	Позитивни	15	26,9	11,3	26,0	7,0	42,0	

Липсва разлика или възможност за статистическо сравнение на описаните параметри в двете серологични групи.

Таблица 44. Сравнение на групите BAb(+/–) по възраст, давност на болестта и време до проява на първи пристъп в кохортата, лекувана с продължителност до 48 – 72 месеца (5 – 6 години)

Показател	BAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативни	21	37,2	9,9	38,0	21,0	56,0	0,222
	Позитивни	19	41,0	9,9	40,0	26,0	59,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	21	26,2	8,8	28,0	11,0	46,0	0,154
	Позитивни	19	30,6	8,8	31,0	17,0	46,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	21	10,5	2,9	10,0	6,0	16,0	0,504
	Позитивни	19	10,4	4,1	9,0	6,0	22,0	
Време до първи пристъп – месеци	Негативни	2	8,5	6,4	8,5	4,0	13,0	n/a
	Позитивни	7	30,3	21,3	23,0	13,0	70,0	

Липсва разлика или възможност за статистическо сравнение на описаните параметри в двете серологични групи.

Таблица 45. Сравнение на групите BAb(+/–) по възраст, давност на болестта и време до проява на първи пристъп в кохортата, лекувана с продължителност над 72 месеца (7 и повече години)

Показател	BAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативни	10	40,6	7,1	42,0	23,0	47,0	n/a
	Позитивни	7	44,1	9,4	43,0	33,0	56,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	10	28,1	7,2	27,5	16,0	38,0	n/a
	Позитивни	7	30,1	9,2	27,0	23,0	46,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	10	12,5	4,5	10,5	7,0	19,0	n/a
	Позитивни	7	14,0	7,3	10,0	8,0	28,0	
Време до първи пристъп – месеци	Негативни	4	40,5	35,0	34,5	5,0	88,0	n/a
	Позитивни	3	37,3	40,7	19,0	9,0	84,0	

Статистическо сравнение е невъзможно поради малкия брой пациенти.

Таблица 46. Сравнение на групите BAb(+/–) по тежест на първи пристъп според продължителността на лечението

Продължителност на лечението (месеци)	**Тежест на първи пристъп**	**BAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
≤ 24	Неквалифициран	5 (16,1)	4 (11,8)	9 (13,8)	0,858
	„Неинвалидизиращ“ с КС	26 (83,9)	29 (85,3)	55 (84,6)	
	„Инвалидизиращ“ с КС	0 (0)	1 (2,9)	1 (1,5)	
	Общо	31 (100)	34 (100)	65 (100)	
25 – 48	Неквалифициран	0 (0)	2 (15,4)	2 (10)	n/a
	„Неинвалидизиращ“ с КС	6 (85,7)	11 (84,6)	17 (85)	
	„Инвалидизиращ“ с КС	1 (14,3)	0 (0)	1 (5)	
	Общо	7 (100)	13 (100)	20 (100)	
49 – 72	Неквалифициран	0 (0)	1 (16,7)	1 (12,5)	n/a
	„Неинвалидизиращ“ с КС	2 (100)	5 (83,3)	7 (87,5)	
	Общо	2 (100)	6 (100)	8 (100)	
> 72	Неквалифициран	1 (25)	1 (33,3)	2 (28,6)	n/a
	„Неинвалидизиращ“ с КС	3 (75)	2 (66,7)	5 (71,4)	
	Общо	4 (100)	3 (100)	7 (100)	

По отношение на тежестта на първи пристъп не се демонстрират значими корелации. Това е в съответствие с клиничния ход и механизма на повлияване, независещ от продължителността на лечението.

Таблица 47. Сравнение на групите BAb(+/–) по тежестта на втори пристъп според продължителността на лечението

Продължителност на лечението (месеци)	**Тежест на втори пристъп**	**BAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
≤ 24	Не е пристъп	3 (42,9)	0 (0)	3 (13)	n/a
	Неквалифициран	1 (14,3)	3 (18,8)	4 (17,4)	
	„Неинвалидизиращ“ с КС	3 (42,9)	10 (62,5)	13 (56,5)	
	„Инвалидизиращ“ с КС	0 (0)	3 (18,8)	3 (13)	
	Общо	7 (100)	16 (100)	23 (100)	
25 – 48	Не е пристъп	1 (50)	1 (12,5)	2 (20)	n/a
	Неквалифициран	0 (0)	1 (12,5)	1 (10)	
	„Неинвалидизиращ“ с КС	1 (50)	6 (75)	7 (70)	
	Общо	2 (100)	8 (100)	10 (100)	
49 – 72	Неквалифициран	1 (100)	2 (50)	3 (60)	n/a
	„Неинвалидизиращ“ с КС	0 (0)	1 (25)	1 (20)	
	„Инвалидизиращ“ с КС	0 (0)	1 (25)	1 (20)	
	Общо	1 (100)	4 (100)	5 (100)	
> 72	Не е пристъп	1 (100)	1 (50)	2 (66,7)	n/a
	Неквалифициран	0 (0)	1 (50)	1 (33,3)	
	Общо	1 (100)	2 (100)	3 (100)	

Във всички групи според продължителността на лечението тенденцията е еднаква: по-висок процент на пристъпите, изискващи КС е налице при BAb(+), макар да липсва статистическа достоверност.

Таблица 48. Сравнение на групите BAb(+/–) по системните нежелани реакции според продължителността на лечението

Продължителност на лечението (месеци)	Общи нежелани реакции	BAb		Общо n (%)	p
		Негативни n (%)	Позитивни n (%)		
≤ 24	Липсват	1 (0,7)	5 (4,7)	6 (2,5)	0,003
	Отшумели	43 (31,2)	52 (49,1)	95 (38,9)	
	Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВС или друго лечение	82 (59,4)	42 (39,6)	124 (50,8)	
	„Тежки“, повлияващи се от НСПВС	12 (8,7)	7 (6,6)	19 (7,8)	
	Общо	138 (100)	106 (100)	244 (100)	
25 – 48	Липсват	0 (0)	8 (25,8)	8 (14,5)	0,003
	Отшумели	11 (45,8)	14 (45,2)	25 (45,5)	
	Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВС или друго лечение	8 (33,3)	8 (25,8)	16 (29,1)	
	„Тежки“, повлияващи се от НСПВС	5 (20,8)	0 (0)	5 (9,1)	
	Наново появяващи се	0 (0)	1 (3,2)	1 (1,8)	
	Общо	24 (100)	31 (100)	55 (100)	
49 – 72	Липсват	0 (0)	6 (31,6)	6 (15)	0,005
	Отшумели	7 (33,3)	9 (47,4)	16 (40)	
	Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВС или друго лечение	11 (52,4)	3 (15,8)	14 (35)	
	„Тежки“, повлияващи се от НСПВС	3 (14,3)	1 (5,3)	4 (10)	
	Общо	21 (100)	19 (100)	40 (100)	
> 72	Липсват	0 (0)	2 (28,6)	2 (11,8)	n/a
	Отшумели	3 (30)	4 (57,1)	7 (41,2)	
	Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВС или друго лечение	4 (40)	1 (14,3)	5 (29,4)	
	„Тежки“, повлияващи се от НСПВС	2 (20)	0 (0)	2 (11,8)	
	Отново появяващи се	1 (10)	0 (0)	1 (5,9)	
	Общо	10 (100)	7 (100)	17 (100)	

Независимо от продължителността на лечението в около 60% при всяка една от групите се проявяват системни реакции. Леките и тежки грипоподобни симптоми

са по-чести в серонегативната група, като в различните по продължителност на лечението групи тези симптоми се проявяват с около 30% по-често при BAb(–).

Таблица 49. Сравнение на групите BAb(+/–) по локални нежелани реакции според продължителността на лечението

Продължителност на лечението (месеци)	**Локални нежелани реакции**	**BAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
≤ 24	Липсват	30 (21,7)	5 (4,7)	35 (14,3)	<0,001
	Отшумели	47 (34,1)	57 (53,8)	104 (42,6)	
	Леки персистиращи или появяващи се от време на време	57 (41,3)	40 (37,7)	97 (39,8)	
	„Тежки“, повлияващи се от локално лечение	4 (2,9)	4 (3,8)	8 (3,3)	
	Общо	138 (100)	106 (100)	244 (100)	
25 – 48	Липсват	1 (4,2)	9 (29)	10 (18,2)	0,016
	Отшумели	10 (41,7)	15 (48,4)	25 (45,5)	
	Леки персистиращи или появяващи се от време на време	12 (50)	7 (22,6)	19 (34,5)	
	„Тежки“, повлияващи се от локално лечение	1 (4,2)	0 (0)	1 (1,8)	
	Общо	24 (100)	31 (100)	55 (100)	
49 – 72	Липсват	2 (9,5)	4 (21,1)	6 (15)	0,300
	Отшумели	9 (42,9)	11 (57,9)	20 (50)	
	Леки персистиращи или появяващи се от време на време	9 (42,9)	4 (21,1)	13 (32,5)	
	„Тежки“, повлияващи се от локално лечение	1 (4,8)	0 (0)	1 (2,5)	
	Общо	21 (100)	19 (100)	40 (100)	
> 72	Липсват	2 (20)	1 (14,3)	3 (17,6)	n/a
	Отшумели	3 (30)	5 (71,4)	8 (47,1)	
	Леки персистиращи или появяващи се от време на време	4 (40)	1 (14,3)	5 (29,4)	
	„Тежки“, повлияващи се от локално лечение	1 (10)	0 (0)	1 (5,9)	
	Общо	10 (100)	7 (100)	17 (100)	

Локалните нежелани реакции – леки, персистиращи, както и тежките преобладават при BAb негативните пациенти, с изключение на групата, лекуваща се до 24 месеца, където процентите са относително сходни.

Таблица 50. Сравнение на групите BAb(+/–) по фамилна обремененост според продължителността на лечението

Продължителност на лечението (месеци)	**Фамилност**	**BAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
≤ 24	Липсва	135 (98,5)	103 (99)	238 (98,8)	1,000
	Един родственик от първа или втора линия	1 (0,7)	0 (0)	1 (0,4)	
	Повече от 1 родственик първа или втора линия	1 (0,7)	1 (1)	2 (0,8)	
	Общо	137 (100)	104 (100)	241 (100)	
25 – 48	Липсва	23 (95,8)	31 (100)	54 (98,2)	0,436
	Един родственик от първа или втора линия	1 (4,2)	0 (0)	1 (1,8)	
	Общо	24 (100)	31 (100)	55 (100)	
49 – 72	Липсва	21 (100)	19 (100)	40 (100)	n/a
	Общо	21 (100)	19 (100)	40 (100)	
> 72	Липсва	10 (100)	7 (100)	17 (100)	n/a
	Общо	10 (100)	7 (100)	17 (100)	

Не се установява разлика по отношение на фамилността при различните групи според давността на болестта.

Таблица 51. Сравнение на групите BAb(+/–) по съпътстващи автоимунни заболявания според продължителността на лечението

Продължителност на лечението (месеци)	**Придружаващи автоимунни заболявания**	**BAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
≤ 24	Не	130 (94,2)	99 (93,4)	229 (93,9)	1,000
	Да	8 (5,8)	7 (6,6)	15 (6,1)	
	Общо	138 (100)	106 (100)	244 (100)	
25 – 48	Не	24 (100)	30 (96,8)	54 (98,2)	
	Да	0 (0)	1 (3,2)	1 (1,8)	
	Общо	24 (100)	31 (100)	55 (100)	
49 – 72	Не	20 (95,2)	18 (94,7)	38 (95)	1,000
	Да	1 (4,8)	1 (5,3)	2 (5)	
	Общо	21 (100)	19 (100)	40 (100)	
> 72	Не	10 (100)	7 (100)	17 (100)	n/a
	Общо	10 (100)	7 (100)	17 (100)	

Не се установява разлика по отношение на автоимунните коморбидни състояния при различните групи според давността на болестта.

Таблица 52. Сравнение на групите BAb(+/–) по влияние на тютюнопушенето според продължителността на лечението

Продължителност на лечението (месеци)	**Тютюнопушене**	**BAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
≤ 24	Никога непушили	121 (87,7)	75 (71,4)	196 (80,7)	0,025
	Някогашен пушач – не пуши повече от 2 години	7 (5,1)	14 (13,3)	21 (8,6)	
	Скорошен пушач- преустановил пушенето в последните 1 – 2 години	4 (2,9)	7 (6,7)	11 (4,5)	
	Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	5 (3,6)	8 (7,6)	13 (5,3)	
	Настоящ – над 10 цигари дневно	1 (0,7)	1 (1)	2 (0,8)	
	Общо	138 (100)	105 (100)	243 (100)	
25 – 48	Никога непушили	23 (95,8)	24 (77,4)	47 (85,5)	0,206
	Някогашен пушач – не пуши повече от 2 години	0 (0)	1 (3,2)	1 (1,8)	
	Скорошен пушач – преустановил пушенето в последните 1 – 2 години	0 (0)	4 (12,9)	4 (7,3)	
	Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	1 (4,2)	2 (6,5)	3 (5,5)	
	Общо	24 (100)	31 (100)	55 (100)	
49 – 72	Никога непушили	16 (76,2)	8 (42,1)	24 (60)	0,005
	Някогашен пушач – не пуши повече от 2 години	3 (14,3)	0 (0)	3 (7,5)	
	Скорошен пушач – преустановил пушенето в последните 1 – 2 години	1 (4,8)	4 (21,1)	5 (12,5)	
	Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	1 (4,8)	7 (36,8)	8 (20)	
	Общо	21 (100)	19 (100)	40 (100)	
> 72	Никога непушили	9 (90)	4 (57,1)	13 (76,5)	n/a
	Някогашен пушач – не пуши повече от 2 години	0 (0)	2 (28,6)	2 (11,8)	
	Скорошен пушач – преустановил пушенето в последните 1 – 2 години	1 (10)	0 (0)	1 (5,9)	
	Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	0 (0)	1 (14,3)	1 (5,9)	
	Общо	10 (100)	7 (100)	17 (100)	

Статистическата достоверност се запазва в различните групи по продължителност на лечението, подобно на общата група: настоящите и бивши пушачи са повече в групата на BAb(+); никога непушилите са повече при серонегативните. Процентната разлика при увеличение на давността на лечението между настоящи и скорошни пушачи в различните серологични групи нараства, което предполага, че вероятно давността на пушенето също е от значение.

Таблица 53. Сравнение на групите BAb(+/–) по отношение на динамиката на оценката по скалата EDSS според продължителността на лечението

Продължителност на лечението (месеци)	**Увеличение по скалата EDSS**	**BAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
≤ 24	0	130 (94,9)	91 (86,7)	221 (91,3)	0,093
	0,5	4 (2,9)	8 (7,6)	12 (5)	
	1	3 (2,2)	5 (4,8)	8 (3,3)	
	1,5	0 (0)	1 (1)	1 (0,4)	
	Общо	137 (100)	105 (100)	242 (100)	
25 – 48	0	20 (87)	21 (72,4)	41 (78,8)	0,419
	0,5	2 (8,7)	3 (10,3)	5 (9,6)	
	1	1 (4,3)	5 (17,2)	6 (11,5)	
	Общо	23 (100)	29 (100)	52 (100)	
49 – 72	0	19 (95)	14 (73,7)	33 (84,6)	0,154
	0,5	1 (5)	3 (15,8)	4 (10,3)	
	1	0 (0)	1 (5,3)	1 (2,6)	
	1,5	0 (0)	1 (5,3)	1 (2,6)	
	Общо	20 (100)	19 (100)	39 (100)	
> 72	0	10 (100)	5 (71,4)	15 (88,2)	0,154
	0,5	0 (0)	2 (28,6)	2 (11,8)	
	Общо	10 (100)	7 (100)	17 (100)	

Таблица 54. Сравнение на групите BAb(+/–) според оценката по скалата EDSS преди лечението и при имуносерологичното изследване според продължителността на лечението

BAb	Продължителност на лечението (месеци)		N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
(-)	≤ 24	EDSS преди лечението	137	1,77	0,50	1,50	0,00	3,50	0,015
		EDSS при изследването на антитела	138	1,79	0,57	1,50	0,00	3,50	
	25 – 48	EDSS преди лечението	23	1,80	0,62	2,00	0,00	3,50	0,102
		EDSS при изследването на антитела	24	1,81	0,79	2,00	0,00	3,50	
	49 – 72	EDSS преди лечението	20	1,63	0,65	1,50	0,00	3,50	0,317
		EDSS при изследването на антитела	21	1,57	0,73	1,50	0,00	3,50	
	> 72	EDSS преди лечението	10	1,60	0,39	1,50	1,00	2,00	1,000
		EDSS при изследването на антитела	10	1,60	0,39	1,50	1,00	2,00	
(+)	≤ 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	0,157
		EDSS при изследването на антитела	7	1,79	0,49	2,00	1,00	2,50	

Динамиката на оценката по скалата EDSS при BAb(+) и BAb(–) се запазва в различните групи по продължителност на лечението, подобно на общата група – трайно акумулиране на инвалидизация се регистрира по-често при BAb положителните пациенти.

Таблица 55. Процент на пациентите без пристъпи в групите BAb(+/–)

Пристъпи	Статистика	BAb		Общо	p
		Негативни	Позитивни		
Не	N	150	102	252	0,002
	%	77,7%	62,6%	70,8%	
Да	N	43	61	104	
	%	22,3%	37,4%	29,2%	
Общо	N	193	163	356	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

От Таблица 55 е видно, че 37,4% от негативните на свързващи антитела пациенти са получили пристъп срещу 22,3% негативните.

Таблица 56. Процентна пациентите без пристъпи в групите BAb(+/–) според продължителността на лечението

Продълж. на лечението	Пристъпи	Статистика	BAb		Общо
			Негативни	Позитивни	
≤ 24	Не	N	108	72	180
		%	78,3%	67,9%	73,8%
	Да	N	30	34	64
		%	21,7%	32,1%	26,2%
	Общо	N	138	106	244
		%	100,0%	100,0%	100,0%
25 – 48	Не	N	17	16	33
		%	70,8%	51,6%	60,0%
	Да	N	7	15	22
		%	29,2%	48,4%	40,0%
	Общо	N	24	31	55
		%	100,0%	100,0%	100,0%
49 – 72	Не	N	19	10	29
		%	90,5%	52,6%	72,5%
	Да	N	2	9	11
		%	9,5%	47,4%	27,5%
	Общо	N	21	19	40
		%	100,0%	100,0%	100,0%
> 72	Не	N	6	4	10
		%	60,0%	57,1%	58,8%
	Да	N	4	3	7
		%	40,0%	42,9%	41,2%
	Общо	N	10	7	17
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Таблица 57. Процент на пациентите без пристъпи + процент на пациентите без влошаване на инвалидизацията, оценена по скалата EDSS в групите BAb(+/–)

Пристъп	**EDSS динамика**		**BAb**		**Общо**
			Негативни	**Позитивни**	
Не	,00	N	142	93	235
		%	96,6%	93,0%	95,1%
	,50	N	4	5	9
		%	2,7%	5,0%	3,6%
	1,00	N	1	2	3
		%	0,7%	2,0%	1,2%
	Общо	N	147	100	247
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Да	,00	N	37	38	75
		%	86,0%	63,3%	72,8%
	,50	N	3	11	14
		%	7,0%	18,3%	13,6%
	1,00	N	3	9	12
		%	7,0%	15,0%	11,7%
	1,50	N	0	2	2
		%	0,0%	3,3%	1,9%
	Общо	N	43	60	103
		%	100,0%	100,0%	100,0%

В 18,3% от пациентите, позитивни на свързващи антитела и получили пристъп, имат трайно увеличение на инвалидността, докато при BAb(–) те са само 7%.

Таблица 58. Сравнение на групите BAb(+/–) според продължителността на лечението под и над 24 месеца (2 години)

Продължителност на терапията	Статистика	BAb		Общо	p
		Негативни	Позитивни		
≤ 24 месеца	N	138	106	244	0,190
	%	71,5%	65,0%	68,5%	
> 24 месеца	N	55	57	112	
	%	28,5%	35,0%	31,5%	
Общо	N	193	163	356	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

При лекуваните до 2 години BAb(–) са с около 10% повече от BAb(+). При по-дългосрочно лечение съотношението е еднакво.

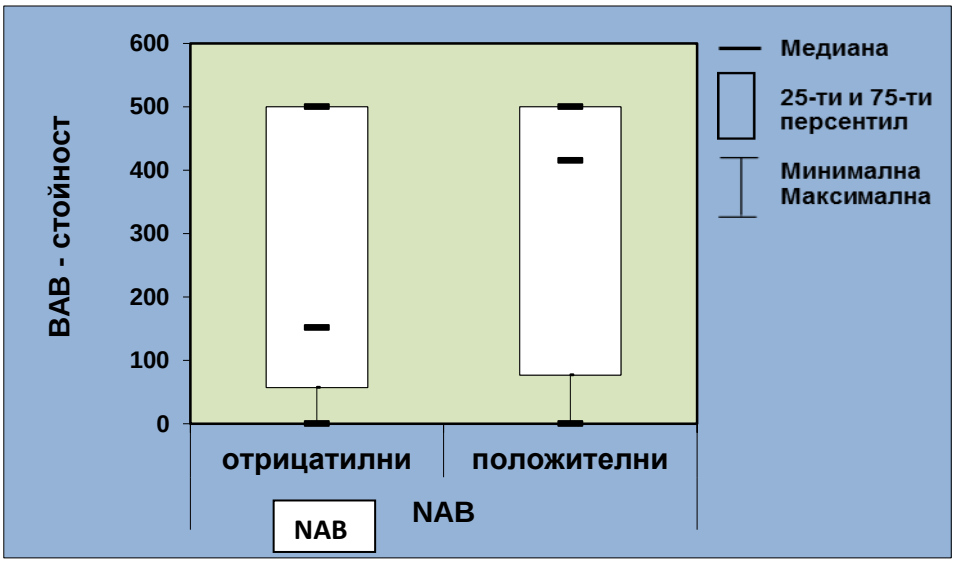
В хода на изследването възниква въпросът доколко позитивността за BAb може да предскаже образуването на NAb. Поради факта, че NAb са субгрупа на BAb, наличието на неутрализиращи антитела може да се окаже частично предвидимо. Статистическият анализ на съпоставката на данните относно титъра на BAb и наличието на NAb предлага отговор на този въпрос.

Таблица 59. Съпоставка на титър на BAb в групите според NAb статуса на пациентите

NAb	N	Стойност на BAb					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 BAb (p = 0,044).

Фигура 23. Графична съпоставка на титър на BAb в групите според NAb статуса



В BAb положителната група се констатират NAb(+) – 28,25% и NAb(–) – 71,8%. От цялата пациентска кохорта NAb(+) са 12,8%.

В допълнение, с оглед на определянето на предиктивната стойност на BAb е приложен ROC анализ.

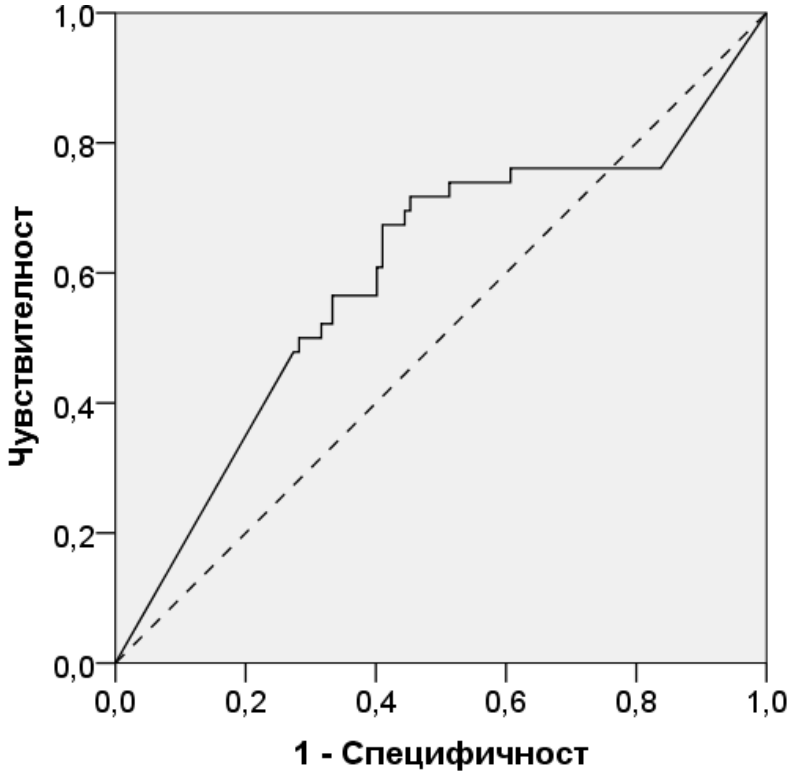
Таблица 60. ROC анализ: съпоставяне на титъра на BAb с NAb позитивирането

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

AUC – Area Under the Curve – площ под кривата

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

Фигура 24. ROC графична крива: съпоставяне на титъра на BAb с NAb позитивирането



От ROC анализа с 69% специфичност и 60,9% чувствителност може да се направи извода, че при стойности на BAb над 250 BTU 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 BAb над 250 BTU корелират със значимо повишен риск от неутрализация на биологичния ефект на интерферон-бета.

2. Изследвания за неутрализиращите антитела срещу интерферон-бета

Изследвани са честотата на NAb и клиничното им значение – евентуалната връзка между различни клинични параметри и антитялообразуването.

Таблица 61. Резултати от изследване на NAb: позитивиране в групата на BAb и в цялата кохорта

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

Позитивните на NAb пациенти са 28,2% от BAb(+) и 12,8% от всички изследвани болни, лекувани с IFNβ.

Таблица 62. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) по възраст, продължителност на болестта и времева проява на първите два пристъпа след започване на лечението

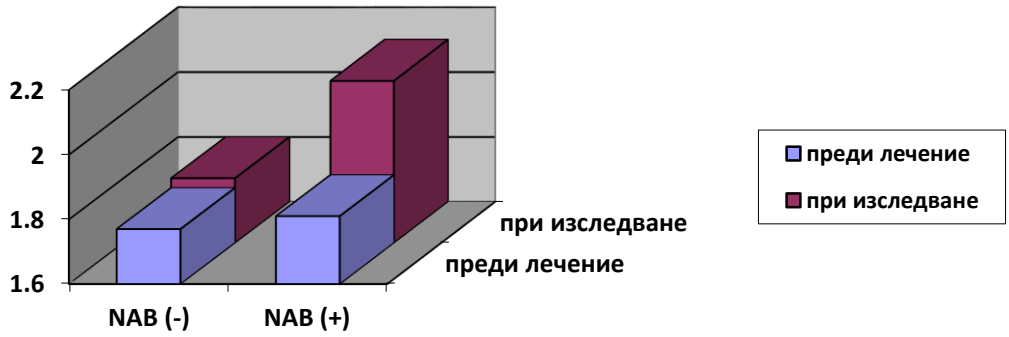
Показател	NAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативни	117	39,2	9,6	39,0	18,0	59,0	0,211
	Позитивни	46	37,0	10,5	37,5	17,0	56,0	
Продължителност на терапията – месеци	Негативни	117	24,1	13,1	18,0	18,0	78,0	<0,001
	Позитивни	46	46,6	20,8	42,0	18,0	84,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	117	29,2	8,3	29,0	5,0	48,0	0,243
	Позитивни	46	27,5	8,9	28,0	12,0	48,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	117	9,7	4,8	9,0	2,0	26,0	0,816
	Позитивни	46	9,5	5,3	8,0	2,0	28,0	
Време до първи пристъп – месеци	Негативни	34	17,9	12,1	16,5	1,0	48,0	0,009
	Позитивни	26	28,5	18,2	26,0	7,0	84,0	
Време между първи и втори пристъп – месеци	Негативни	12	11,8	4,8	11,0	6,0	20,0	0,427
	Позитивни	16	14,8	13,3	6,5	5,0	45,0	

Възрастта при изследването, клиничният дебют и давността на заболяването не показват разлика в двете групи. Статистически достоверна се оказва разликата по отношение на продължителността на лечението и времето до първи пристъп. Вероятно 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 NAb(+) спрямо NAb(–) (p = 0,009). Резултатът е неочакван в контекста на хипотезата за намалена терапевтична ефективност поради неутрализация на част от интерферон-бета. Ако се вземе предвид обаче отложеният терапевтичен ефект на интерферон-бета, полученият резултат не противоречи на обсъжданата хипотеза.

Таблица 63. Сравнение на различните субгрупи NAb(+/–) според оценката по скалата EDSS преди лечението и по време на имуносерологичното изследване; съпоставяне на различните субгрупи NAb(+/–) по ARR според продължителността на лечението

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 антитела	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	
ARR – 2 г. преди лечение	Негативни	117	0,97	0,24	1,00	0,00	1,50	0,027
	Позитивни	46	0,89	0,31	1,00	0,50	2,00	
ARR –лекуваните до 2 г.	Негативни	96	0,14	0,28	0,00	0,00	1,00	0,033
	Позитивни	10	0,40	0,46	0,25	0,00	1,00	
ARR – лекуваните 3 – 4 г.	Негативни	15	0,07	0,18	0,00	0,00	0,50	0,012
	Позитивни	16	0,34	0,35	0,50	0,00	1,00	
ARR – лекуваните 5 – 6 г.	Негативни	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n/a
	Позитивни	14	0,04	0,13	0,00	0,00	0,50	
ARR – лекуваните над 7 г.	Негативни	1	0,00		0,00	0,00	0,00	n/a
	Позитивни	6	0,08	0,20	0,00	0,00	0,50	

Фигура 25. Динамика на оценката по скалата EDSS в субгрупите NAb(+/–) преди лечението и по време на имуносерологичното изследване



Установява се статистически значимо влошаване на оценката по скалата EDSS при групата на NAb(+). Промяната (влошаването) на инвалидизацията в другата група вероятно се дължи на 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.

Фигура 26. Динамика на ARR в цялата кохорта спрямо съответната подгрупа по продължителност на лечението

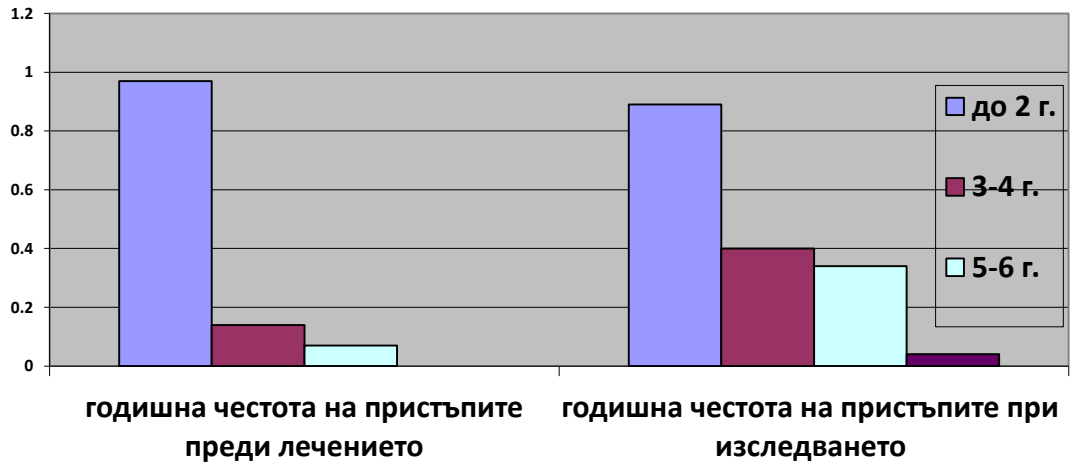


Таблица 64. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) по тежест на първи пристъп

Тежест на първи пристъп	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
	Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Неквалифициран	7 (22,6)	1 (4)	8 (14,3)	0,086
„Неинвалидизиращ“ с КС	23 (74,2)	24 (96)	47 (83,9)	
„Инвалидизиращ“ с КС	1 (3,2)	0 (0)	1 (1,8)	
Общо	31 (100)	25 (100)	56 (100)	

Сравнението на групите не показва статистическа достоверност, въпреки че в групата на NAb(–) 22,6% от пристъпите са неквалифицирани, а 77,5% изискват кортикостероидно лечение, докато в групата на NAb(+) само 4% от пристъпите са неквалифицирани, а останалите 96%, макар и нетежки, са имали нужда от КС лечение.

Таблица 65. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) по тежест на втори пристъп

Тежест на втори пристъп	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
	Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Не е пристъп	1 (7,1)	0 (0)	1 (3,3)	0,210
Неквалифициран	5 (35,7)	2 (12,5)	7 (23,3)	
„Неинвалидизиращ“ с КС	6 (42,9)	12 (75)	18 (60)	
„Инвалидизиращ“ с КС	2 (14,3)	2 (12,5)	4 (13,3)	
Общо	14 (100)	16 (100)	30 (100)	

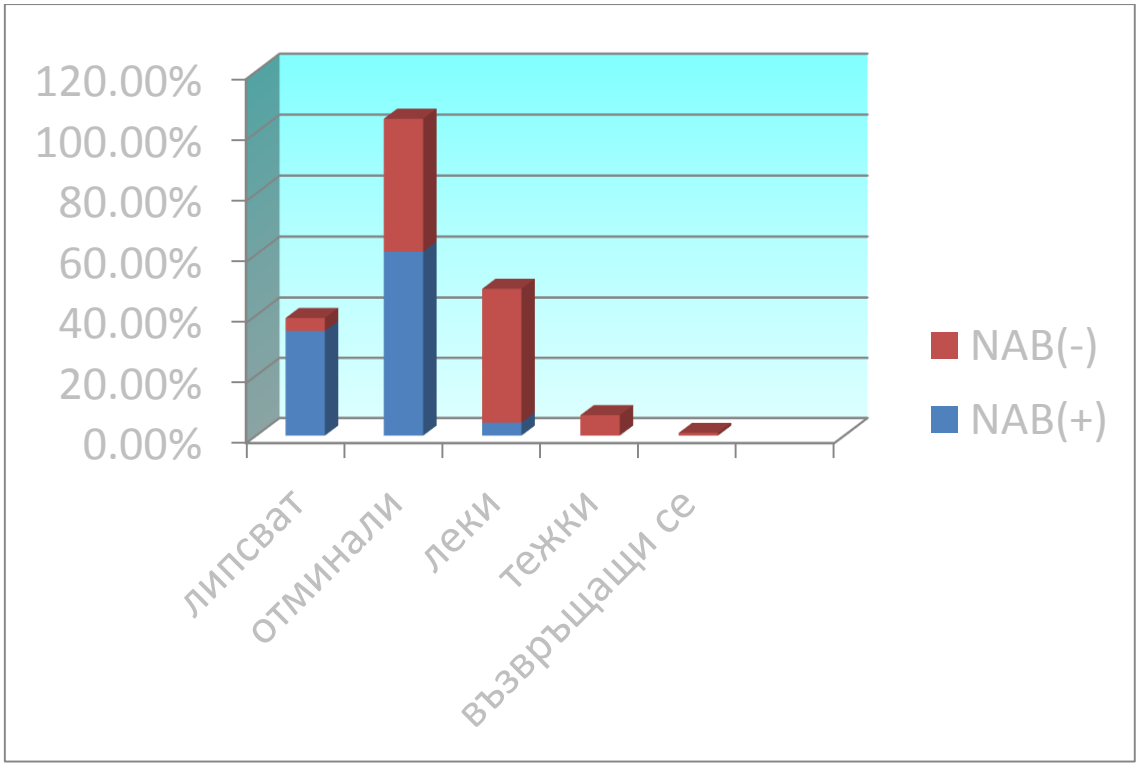
Двете групи не се различават по отношение на „инвалидизиращите“ пристъпи, но по отношение на „неинвалидизиращите“ разликата е очевидна. При 87,5% от пристъпите в групата на NAb(+) се е наложило приложението на кортикостероид срещу 57,2% в групата на NAb(–). Въпреки това тези данни нямат статистическа достоверност.

Таблица 66. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) по системни странични реакции

Системни нежелани реакции	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
	Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Липсват	5 (4,3)	16(34,8)	2(12,9)	<0,001
Отшумели	51 (43,6)	28(60,9)	79(48,5)	
Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВС или друго лечение	52 (44,4)	2 (4,3)	54(33,1)	
„Тежки“, повлияващи се от НСПВС	8 (6,8)	0 (0)	8 (4,9)	
Отново появяващи се	1 (0,9)	0 (0)	1 (0,6)	
Общо	117(100)	46 (100)	163(100)	

Статистически достоверни са разликите както по отношение на леките, така и на тежките нежелани реакции в полза на групата на NAb(–) ($p < 0,001$). В групата на NAb(+) 34,8% не са имали нежелани реакции, 60,9% са отшумели. Не са били наблюдавани тежки, неповлияващи се на лечение нежелани реакции. Такива системни нежелани реакции са установени в групата на NAb(–), съответно 4,3%, 43,6%, 6,8%.

Фигура 27. 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 на NAb(–) ($p < 0,001$). При 5,1% в групата NAb(–) никога не са наблюдавани локални нежелани реакции спрямо 28,3% в групата на 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 67. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) по локални нежелани реакции

Локални нежелани реакции	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
	Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Липсват	6 (5,1)	13(28,3)	19(11,7)	<0,001
Отшумели	56(47,9)	32(69,6)	88 (54)	
Леки персистиращи или появяващи се от време на време	51(43,6)	1 (2,2)	52(31,9)	
„Тежки“, повлияващи се от локално лечение	4 (3,4)	0 (0)	4 (2,5)	
Общо	117(100)	46 (100)	163(100)	

Оказа се, че тенденцията се повтаря при оценка на локалните реакции. Статистически достоверни са междугруповите разлики между групите NAb(+) и NAb(–) ($p < 0,001$). При 5,1% в групата на NAb(–) никога не са наблюдавани локални нежелани реакции спрямо 28,3% в групата на NAb(+).

Таблица 68. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) според фамилната обремененост

Фамилност	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
	Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Липсва	115 (100)	45 (97,8)	160 (99,4)	n/a
Повече от 1 родственик първа или втора линия	0 (0)	1 (2,2)	1 (0,6)	
Общо	115 (100)	46 (100)	161 (100)	

Видно е, че статистическата оценка е невъзможна по отношение на фамилната обремененост в двете групи.

Таблица 69. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) според придружаващите автоимунни заболявания

Придружаващи автоимунни заболявания	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
	Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Не	109 (93,2)	45 (97,8)	154 (94,5)	0,447
Да	8 (6,8)	1 (2,2)	9 (5,5)	
Общо	117 (100)	46 (100)	163 (100)	

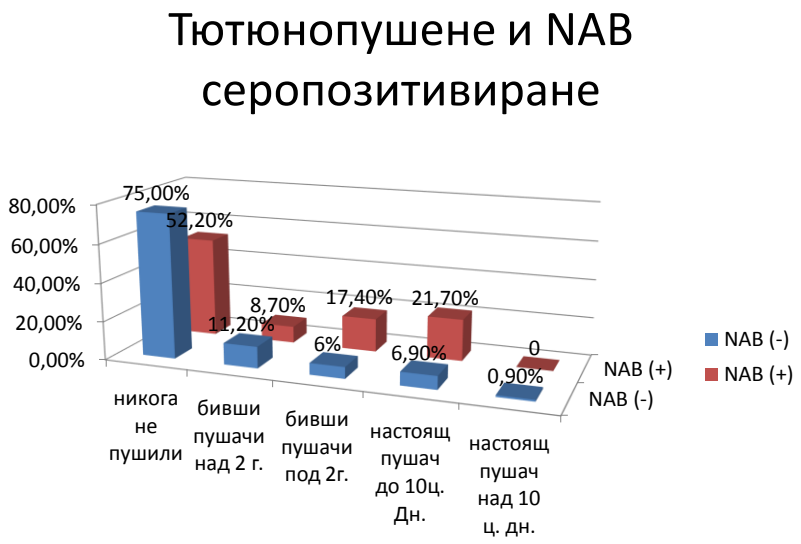
В двете групи липсва статистически значима разлика по отношение на автоимунната коморбидност.

Таблица 70. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) по фактор „Тютюнопушене“

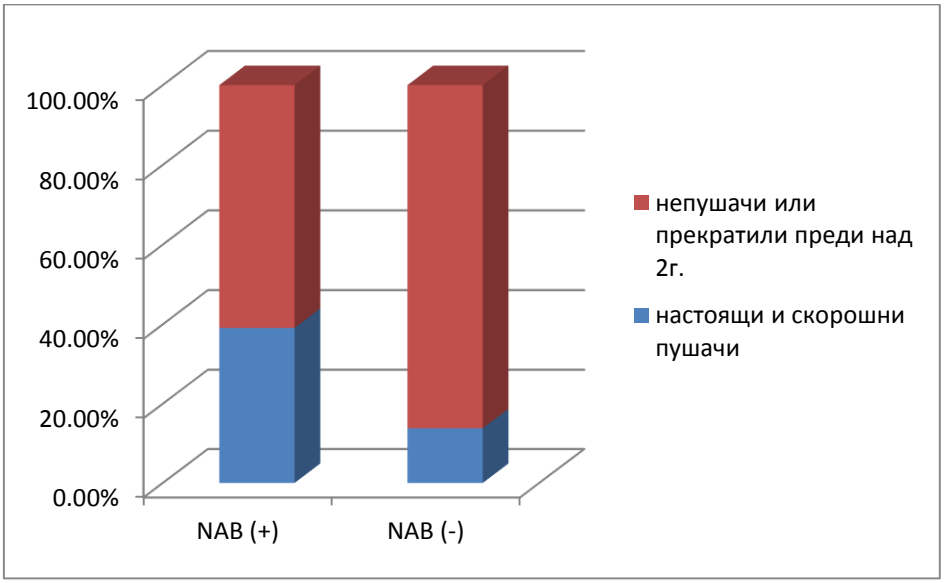
Тютюнопушене	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
	Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Никога непушили	87 (75)	24 (52,2)	111 (68,5)	0,005
Някогашен пушач – не пуши повече от 2 години	13 (11,2)	4 (8,7)	17 (10,5)	
Скорошен пушач – преустановил пушенето в последните 1 – 2 години	7 (6)	8 (17,4)	15 (9,3)	
Настоящ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

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

Фигура 28. Тютюнопушене и NAb серопозитивност



Фигура 29. Съпоставка на тютюнопушенето и NAb статуса

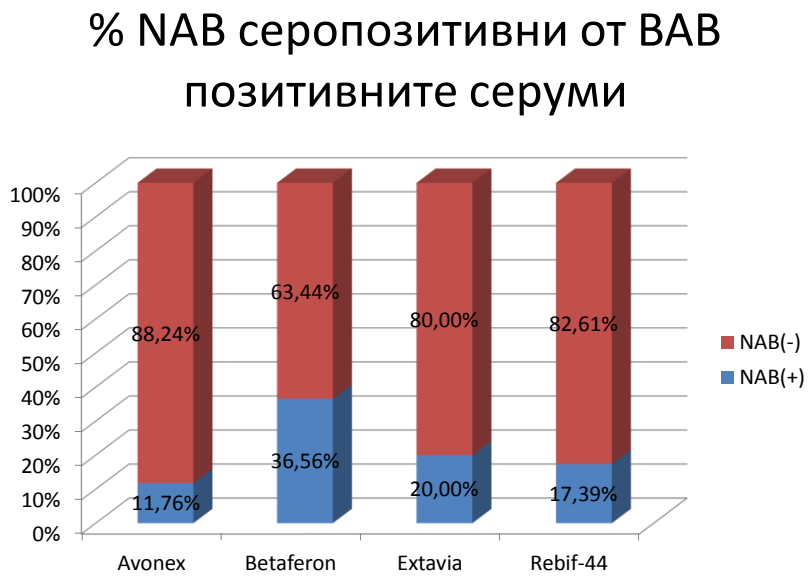


Анализът на данните сочи, че независимо от дефинираната категория пушачи, по отношение на сравняваните групи съществува разлика от над 10%. Това води до извода за наличие на връзка между антитялообразуването и тютюнопушенето. Внимание заслужава и фактът, че сред изследваните в проучването пациенти, пушещите над 10 цигари дневно са рядкост.

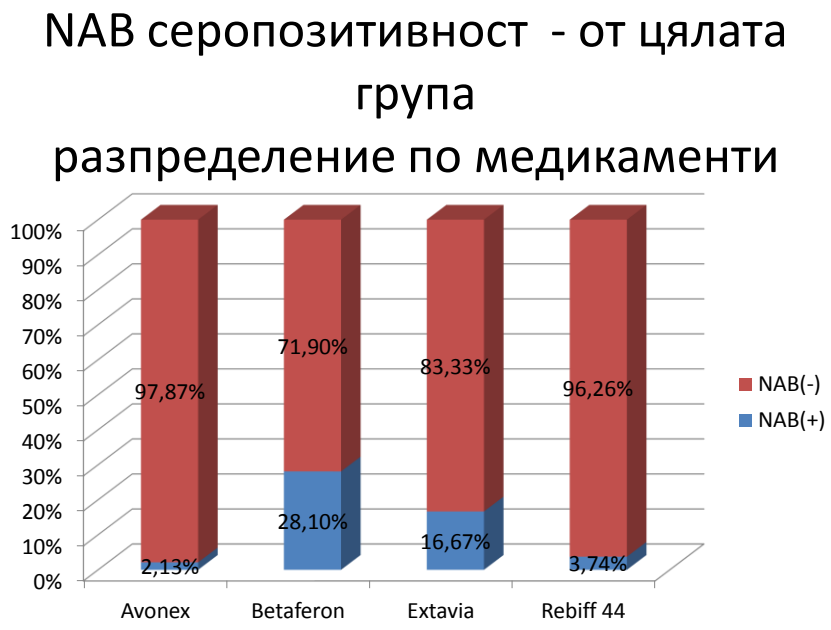
РЕЗУЛТАТИ ОТ ИЗСЛЕДВАНЕ НА NAb ПО МЕДИКАМЕНТИ

Формирането на групи на базата на прилаганите медикаменти позволява да анализираме имуногенността на различните IFNβ молекули.

Фигура 30. Разпределение на NAb по медикаменти (BAb позитивната група)



Фигура 31. Разпределение на NAb по медикамент (цялата кохорта)



Анализът на данните изненадва със съществената разлика между Betaferon и Extavia – идентични по своята същност медикаменти. Този факт демонстрира значимата роля в антитялообразуването на факторите, свързани с пациентите. За интерферон-1a за подкожно приложение установената NAb серопозитивност е 3,7%, близка до тази при най-малко имуногенния – интерферон-1a за мускулно приложение (2,1%).

Таблица 71. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) по възраст, продължителност на болестта и терапията и времева поява на първите два пристъпа след започване на лечението в кохортата, лекувана с Avonex

Показател	NAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативни	15	38,0	9,7	37,0	24,0	56,0	n/a
	Позитивни	2	31,0	18,4	31,0	18,0	44,0	
Продължителност на терапията – месеци	Негативни	15	21,2	6,8	18,0	18,0	42,0	n/a
	Позитивни	2	24,0	8,5	24,0	18,0	30,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	15	27,5	8,9	27,0	16,0	48,0	n/a
	Позитивни	2	21,0	12,7	21,0	12,0	30,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	15	10,5	5,6	9,0	3,0	25,0	n/a
	Позитивни	2	10,0	5,7	10,0	6,0	14,0	
Време до първи пристъп – месеци	Негативни	6	18,5	15,9	13,0	5,0	48,0	n/a
	Позитивни	1	9,0		9,0	9,0	9,0	
Време между първи и втори пристъп – месеци	Негативни	2	6,5	0,7	6,5	6,0	7,0	n/a
	Позитивни	1	5,0		5,0	5,0	5,0	

От общата група на пациентите, приемащи Avonex 94, BAb(+) са 17, а от тях NAb(+) са само 2-ма – 2,13% от всички лекуващи се с този медикамент. От групата на BAb(+) 11,7% са NAb (+).

При серологичната субгрупа NAb(+) времето до първия пристъп и времето между първия и втория пристъп е по-кратко. Статистическата достоверност не може де се прецени поради малкия брой на изследваните болни.

Таблица 72. Сравнение на различните серологични субгрупи NAb(+/–) според оценката по скалата EDSS преди лечението и по време на имунологичното изследване; съпоставяне на различните серологични субгрупи NAb(+/–) по ARR според продължителността на лечението в кохортата, лекувана с Avonex

Показател	**NAb**	**N**	**Mean**	**SD**	**Median**	**Min**	**Max**	**p**
EDSS преди лечението	Негативни	14	1,75	0,43	1,50	1,00	2,50	n/a
	Позитивни	2	1,75	0,35	1,75	1,50	2,00	
EDSS при изследването на антитела	Негативни	15	1,67	0,62	1,50	0,00	2,50	n/a
	Позитивни	2	2,00	0,00	2,00	2,00	2,00	
ARR – 2 г. преди лечение	Негативни	15	0,90	0,28	1,00	0,00	1,00	n/a
	Позитивни	2	1,00	0,71	1,00	0,50	1,50	
ARR – 2 г. след лечение	Негативни	13	0,23	0,39	0,00	0,00	1,00	n/a
	Позитивни	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
ARR – 3-та и 4-та година след лечение	Негативни	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n/a
	Позитивни	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

В групата на Avonex липсва статистическа достоверност относно разликите с групите поради изключително малкия брой пациенти. NAb(+) са само 2,13%. Изключително ниската имуногенност на интерферон-бета за мускулно приложение е причина за становището на някои изследователи, че е основателно изключването на лекуващите се с Avonex от имуносерологичните анализи за неутрализиращи антитела.

Таблица 73. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) по възраст, продължителност на болестта и терапията и времева поява на първите два пристъпа след започване на лечението в кохортата, лекувана с Betaferon

Показател	NAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативни	59	40,0	10,4	42,0	18,0	59,0	0,26
	Позитивни	34	37,5	10,6	38,0	17,0	56,0	
Продължителност на терапията – месеци	Негативни	59	26,4	16,4	18,0	18,0	78,0	<0,001
	Позитивни	34	49,1	21,6	42,0	18,0	84,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	59	29,1	9,0	30,0	5,0	46,0	0,496
	Позитивни	34	27,8	9,2	28,5	12,0	48,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	59	10,2	5,1	9,0	2,0	26,0	0,589
	Позитивни	34	9,6	5,8	8,0	2,0	28,0	
Време до първи пристъп – месеци	Негативни	16	17,5	11,3	16,0	1,0	47,0	0,027
	Позитивни	21	29,7	19,3	26,0	7,0	84,0	
Време между първи и втори пристъп – месеци	Негативни	6	13,0	5,3	12,5	6,0	20,0	n/a
	Позитивни	14	16,0	13,9	9,0	5,0	45,0	

Пациентите NAb(+) са 34 – 36,60% от всички BAb(+) и 28,10% от всички, лекувани с този медикамент.

Както в анализа на общата група на NAb(+), така и в субгрупата на лекуваните с Betaferon, със статистическа достоверност се установява, че NAb(+) са провеждали по-дълготрайно лечение ($p < 0,001$). Това може да се обясни със сероконверсията, която в настоящото наблюдение не е изследвана. Известно е, че IFNβ-1b обичайно генерират по-нисък титър и по-често подлежат на сероконверсия, макар че пациентите, лекувани с IFNβ-1b, по-често изработват неутрализиращи антитела спрямо онези, които се лекуват с IFNβ-1a. Любопитно е, че времето до първия пристъп е по-кратко при NAb(–). При нашето изследване не са изключвани

от анализ първите пристъпи, възникнали в началните 6 месеца от лечението. Този подход би елиминирал объркването, което би повлияло на резултата от отложения терапевтичен ефект на интерфероновото лечение.

Таблица 74. Сравнение на различните серологични субгрупи NAb(+/–) според оценката по скалата EDSS преди лечението и по време на имунологичното изследване; съпоставяне на различните серологични субгрупи NAb(+/–) по ARR според продължителността на лечението в кохортата, лекувана с Betaferon

Показател	NAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
EDSS преди лечението	Негативни	59	1,78	0,58	1,50	0,00	3,50	0,556
	Позитивни	33	1,80	0,37	2,00	1,00	2,50	
EDSS при изследването на антитела	Негативни	59	1,81	0,59	2,00	0,00	3,50	0,013
	Позитивни	34	2,12	0,72	2,00	0,00	4,00	
ARR – 2 г. преди лечение	Негативни	59	0,96	0,23	1,00	0,50	1,50	0,155
	Позитивни	34	0,90	0,32	1,00	0,50	2,00	
ARR – 2 г. след лечение	Негативни	47	0,12	0,24	0,00	0,00	1,00	n/a
	Позитивни	7	0,29	0,39	0,00	0,00	1,00	
ARR – 3-та и 4-та година след лечение	Негативни	6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n/a
	Позитивни	11	0,41	0,38	0,50	0,00	1,00	
ARR – 5-а и 6-а година след лечение	Негативни	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n/a
	Позитивни	10	0,05	0,16	0,00	0,00	0,50	
ARR – 6-а и 7-ма година след лечение	Негативни	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n/a
	Позитивни	6	0,08	0,20	0,00	0,00	0,50	

От анализа на данните на лекуваните с Betaferon се установява, че при NAb(+) увеличаването на оценката по скалата EDSS е по-показателно (p = 0,13) спрямо изходните нива в сравнение с NAb(–).

Таблица 75. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) по възраст, продължителност на болестта и терапията и времева поява на първите два пристъпа след започване на лечението в кохортата, лекувана с Extavia

Показател	NAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативни	24	36,0	7,0	34,5	25,0	55,0	n/a
	Позитивни	6	34,3	10,9	33,0	23,0	49,0	
Продължителност на терапията – месеци	Негативни	24	25,1	10,5	18,0	18,0	48,0	n/a
	Позитивни	6	30,0	5,4	30,0	24,0	36,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	24	29,5	6,7	28,0	19,0	47,0	n/a
	Позитивни	6	26,0	8,2	26,0	17,0	40,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	24	6,9	3,2	6,0	2,0	17,0	n/a
	Позитивни	6	8,5	4,4	7,0	5,0	17,0	
Време до първи пристъп – месеци	Негативни	7	17,9	12,2	20,0	1,0	36,0	n/a
	Позитивни	4	27,3	12,2	25,5	17,0	41,0	
Време между първи и втори пристъп – месеци	Негативни	2	11,5	2,1	11,5	10,0	13,0	n/a
	Позитивни	1	7,0		7,0	7,0	7,0	

NAb(+) са 6 от 30 BAb(+) пациенти от общо 36 в групата. Това прави 20,00% от позитивните на ненеутрализиращи антитела и 16,67% от всички пациенти на това лечение.

Броят на пациентите в групите е недостатъчен за статистически достоверен анализ.

Таблица 76. Сравнение на различните серологични субгрупи NAb(+/–) според оценката по скалата EDSS преди лечението и по време на имунологичното изследване; съпоставяне на различните серологични субгрупи NAb(+/–) по ARR според продължителността на лечението в кохортата, лекувана с Extavia

Показател	NAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
EDSS преди лечението	Негативни	23	1,93	0,68	2,00	0,00	3,00	n/a
	Позитивни	6	2,17	0,41	2,00	2,00	3,00	
EDSS при изследването на антитела	Негативни	24	1,92	0,89	2,00	0,00	4,00	n/a
	Позитивни	6	2,50	0,55	2,50	2,00	3,00	
ARR – 2 г. преди лечение	Негативни	24	1,06	0,17	1,00	1,00	1,50	n/a
	Позитивни	6	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	
ARR – 2 г. след лечение	Негативни	17	0,15	0,29	0,00	0,00	1,00	n/a
	Позитивни	2	0,50	0,71	0,50	0,00	1,00	
ARR – 3-та и 4-та година след лечение	Негативни	7	0,14	0,24	0,00	0,00	0,50	n/a
	Позитивни	4	0,25	0,29	0,25	0,00	0,50	

Ясна е разликата в динамиката на EDSS и ARR, но липсва възможност за статистическа обработка.

Таблица 77. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) по възраст, продължителност на болестта и терапията и времева поява на първите два пристъпа след започване на лечението в кохортата, лекувана с Rebif44

Показател	NAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативни	19	41,5	9,3	43,0	22,0	55,0	n/a
	Позитивни	4	40,5	7,6	39,5	33,0	50,0	
Продължителност на терапията – месеци	Негативни	19	18,0	0,0	18,0	18,0	18,0	n/a
	Позитивни	4	61,5	5,7	63,0	54,0	66,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	19	30,5	7,8	31,0	15,0	45,0	n/a
	Позитивни	4	30,3	8,1	28,0	24,0	41,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	19	11,1	3,7	10,0	6,0	22,0	n/a
	Позитивни	4	10,3	1,5	10,0	9,0	12,0	
Време до първи пристъп – месеци	Негативни	5	18,8	13,5	24,0	5,0	36,0	n/a
	Позитивни	0						
Време между първи и втори пристъп – месеци	Негативни	2	14,0	5,7	14,0	10,0	18,0	n/a
	Позитивни	0						

Пациентите NAb(+) са 4 от 23 BAb(+) от общо 107 лекувани с този медикамент. Това прави 17,39% от позитивните на ненеутрализиращи антитела и 3,74% от всички пациенти на това лечение.

Броят на пациентите в групите е недостатъчен за статистически достоверен анализ.

Таблица 78. Сравнение на различните серологични субгрупи NAb(+/–) според оценката по скалата EDSS преди лечението и по време на имунологичното изследване; съпоставяне на различните серологични субгрупи NAb(+/–) по ARR според продължителността на лечението в кохортата, лекувана с Rebif44

Показател	NAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
EDSS преди лечението	Негативни	19	1,58	0,30	1,50	1,00	2,00	n/a
	Позитивни	4	1,38	0,25	1,50	1,00	1,50	
EDSS при изследването на антитела	Негативни	19	1,76	0,45	1,50	1,00	3,00	n/a
	Позитивни	4	1,38	0,25	1,50	1,00	1,50	
ARR – 2 г. преди лечение	Негативни	19	0,95	0,28	1,00	0,50	1,50	n/a
	Позитивни	4	0,63	0,25	0,50	0,50	1,00	
ARR – 2 г. след лечение	Негативни	19	0,13	0,28	0,00	0,00	1,00	n/a
	Позитивни							
ARR – 5-а и 6-а година след лечение	Негативни	4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n/a
	Позитивни							

Броят на пациентите е недостатъчен за статистически анализ.

Таблица 79. Сравнение на тежестта на първи пристъп при различните серологични субгрупи NAb(+/–) по медикаменти

Терапия	**Тежест на първи пристъп**	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
	Неквалифициран	2 (40)	0 (0)	2 (33,3)	
	„Неинвалидизиращ“ с КС	3 (60)	1 (100)	4 (66,7)	n/a
	Общо	5 (100)	1 (100)	6 (100)	
Betaferon	Неквалифициран	3 (20)	1 (5)	4 (11,4)	
	„Неинвалидизиращ“ с КС	12 (80)	19 (95)	31 (88,6)	0,292
	Общо	15 (100)	20 (100)	35 (100)	
Extavia	Неквалифициран	1 (16,7)	0 (0)	1 (10)	
	„Неинвалидизиращ“ с КС	4 (66,7)	4 (100)	8 (80)	
	„Инвалидизиращ“ с КС	1 (16,7)	0 (0)	1 (10)	n/a
	Общо	6 (100)	4 (100)	10 (100)	
Rebif	Неквалифициран	1 (20)	(0)	1 (20)	
	„Неинвалидизиращ“ с КС	4 (80)	(0)	4 (80)	n/a
	Общо	5 (100)	(0)	5 (100)	

Липсва статистическа достоверност при сравнението на тежестта на първи пристъп. С изключение на групата на Rebif, в останалите пристъпите, изискващи кортикостероидно лечение, са повече при сероположителните пациенти.

Таблица 80. Сравнение на тежестта на втори пристъп при различните серологични субгрупи NAb(+/–) по медикаменти

Терапия	**Тежест на втори пристъп**	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Avonex	Неквалифициран	1 (33,3)	0 (0)	1 (25)	n/a
	„Неинвалидизиращ“ с КС	2 (66,7)	1 (100)	3 (75)	
	Общо	3 (100)	1 (100)	4 (100)	
Betaferon	Неквалифициран	4 (66,7)	2 (14,3)	6 (30)	n/a
	„Неинвалидизиращ“ с КС	1 (16,7)	10 (71,4)	11 (55)	
	„Инвалидизиращ“ с КС	1 (16,7)	2 (14,3)	3 (15)	
	Общо	6 (100)	14 (100)	20 (100)	
Extavia	Не е пристъп	1 (33,3)	0 (0)	1 (25)	n/a
	„Неинвалидизиращ“ с КС	1 (33,3)	1 (100)	2 (50)	
	„Инвалидизиращ“ с КС	1 (33,3)	0 (0)	1 (25)	
	Общо	3 (100)	1 (100)	4 (100)	
Rebif	„Неинвалидизиращ“ с КС	2 (100)	(0)	2 (100)	n/a
	Общо	2 (100)	(0)	2 (100)	

Невъзможно е статистическото сравнение поради малкия брой пристъпи във всяка група.

Таблица 81. Сравнение на системните нежелани реакции при различните серологични субгрупи NAb(+/–) по медикаменти

Терапия	Общи нежелани реакции	NAb		Общо n (%)	p
		Негативни n (%)	Позитивни n (%)		
Avonex	Липсват	1 (6,7)	2 (100)	3 (17,6)	n/a
	Отшумели	7 (46,7)	0 (0)	7 (41,2)	
	Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВС или друго лечение	6 (40)	0 (0)	6 (35,3)	
	„Тежки“, повлияващи се от НСПВС	1 (6,7)	0 (0)	1 (5,9)	
	Общо	15 (100)	2 (100)	17 (100)	
Betaferon	Липсват	2 (3,4)	13 (38,2)	15 (16,1)	<0,001
	Отшумели	27 (45,8)	20 (58,8)	47 (50,5)	
	Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВС или друго лечение	25 (42,4)	1 (2,9)	26 (28)	
	„Тежки“, повлияващи се от НСПВС	5 (8,5)	0 (0)	5 (5,4)	
	Общо	59 (100)	34 (100)	93 (100)	
Extavia	Липсват	2 (8,3)	1 (16,7)	3 (10)	0,138
	Отшумели	7 (29,2)	4 (66,7)	11 (36,7)	
	Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВС или друго лечение	14 (58,3)	1 (16,7)	15 (50)	
	Наново появяващи се	1 (4,2)	0 (0)	1 (3,3)	
	Общо	24 (100)	6 (100)	30 (100)	
Rebif	Отшумели	10 (52,6)	4 (100)	14 (60,9)	n/a
	Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВС или друго лечение	7 (36,8)	0 (0)	7 (30,4)	
	„Тежки“, повлияващи се от НСПВС	2 (10,5)	0 (0)	2 (8,7)	
	Общо	19 (100)	4 (100)	23 (100)	

Въпреки невъзможността за статистическата обработка на данните за лекуваните с IFNβ-1a, в групата на NAb(+) е открита е пълна липса на системни нежелани реакции.

При IFNβ-1b системните нежелани реакции са значително повече при лекуваните с Betaferon NAb(–) ($p < 0,001$). Макар и без статистическа значимост, преобладават общите странични явления при NAb(–) и при лекуваните с Extavia.

Таблица 82. Сравнение на локалните нежелани реакции при различните серологични субгрупи NAb(+/–) по медикаменти

Терапия	Локални нежелани реакции	NAb		Общо n (%)	p
		Негативни n (%)	Позитивни n (%)		
Avonex	Липсват	5 (33,3)	1 (50)	6 (35,3)	n/a
	Отшумели	4 (26,7)	1 (50)	5 (29,4)	
	Леки персистиращи или появяващи се от време на време	6 (40)	0 (0)	6 (35,3)	
	Общо	15 (100)	2 (100)	17 (100)	
Betaferon	Липсват	0 (0)	10 (29,4)	10 (10,8)	<0,001
	Отшумели	33 (55,9)	23 (67,6)	56 (60,2)	
	Леки персистиращи или появяващи се от време на време	23 (39)	1 (2,9)	24 (25,8)	
	„Тежки“, повлияващи се от локално лечение	3 (5,1)	0 (0)	3 (3,2)	
	Общо	59 (100)	34 (100)	93 (100)	
Extavia	Липсват	1 (4,2)	2 (33,3)	3 (10)	0,009
	Отшумели	8 (33,3)	4 (66,7)	12 (40)	
	Леки персистиращи или появяващи се от време на време	15 (62,5)	0 (0)	15 (50)	
	Общо	24 (100)	6 (100)	30 (100)	
Rebif	Отшумели	11 (57,9)	4 (100)	15 (65,2)	n/a
	Леки персистиращи или появяващи се от време на време	7 (36,8)	0 (0)	7 (30,4)	
	„Тежки“, повлияващи се от локално лечение	1 (5,3)	0 (0)	1 (4,3)	
	Общо	19 (100)	4 (100)	23 (100)	

При лекуващите се с IFNβ-1b са налице статистически значими по-често срещащи се локални нежелани лекарствени реакции в серонегативната група. В IFNβ-1a такива междугрупови разлики не са открити.

Таблица 83. Сравнение на фамилната обремененост по отношение на множествена склероза при различните серологични субгрупи NAb(+/–) по медикаменти

Терапия	**Фамилност**	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Avonex	Липсва	14 (100)	2 (100)	16 (100)	n/a
	Общо	14 (100)	2 (100)	16 (100)	
Betaferon	Липсва	59 (100)	34 (100)	93 (100)	n/a
	Общо	59 (100)	34 (100)	93 (100)	
Extavia	Липсва	23 (100)	5 (83,3)	28 (96,6)	n/a
	Повече от 1 родственик първа или втора линия	0 (0)	1 (16,7)	1 (3,4)	
	Общо	23 (100)	6 (100)	29 (100)	
Rebif	Липсва	19 (100)	4 (100)	23 (100)	n/a
	Общо	19 (100)	4 (100)	23 (100)	

Не се установява разлика в групите по медикаменти.

Таблица 84. Сравнение на коморбидността по отношение на други автоимунни заболявания при различните серологични субгрупи NAb(+/–) по медикаменти

Терапия	**Придружаващи автоимунни заболявания**	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Avonex	Не	15 (100)	2 (100)	17 (100)	n/a
	Общо	15 (100)	2 (100)	17 (100)	
Betaferon	Не	56 (94,9)	33 (97,1)	89 (95,7)	1,000
	Да	3 (5,1)	1 (2,9)	4 (4,3)	
	Общо	59 (100)	34 (100)	93 (100)	
Extavia	Не	22 (91,7)	6 (100)	28 (93,3)	1,000
	Да	2 (8,3)	0 (0)	2 (6,7)	
	Общо	24 (100)	6 (100)	30 (100)	
Rebif	Не	16 (84,2)	4 (100)	20 (87)	n/a
	Да	3 (15,8)	0 (0)	3 (13)	
	Общо	19 (100)	4 (100)	23 (100)	

В изследваните групи не се установяват статистически значими разлики.

Не са провеждани специализирани изследвания по отношение на анамнестичните данни и физикалния преглед.

Таблица 85. Сравнение на влиянието на тютюнопушенето при различните серологични субгрупи NAb(+/–) по медикаменти

Терапия	Тютюнопушене	NAb		Общо n (%)	p
		Негативни n (%)	Позитивни n (%)		
	Никога непушили	13 (86,7)	2 (100)	15 (88,2)	n/a
	Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	2 (13,3)	0 (0)	2 (11,8)	
	Общо	15 (100)	2 (100)	17 (100)	
Betaferon	Никога непушили	37 (63,8)	18 (52,9)	55 (59,8)	0,087
	Някогашен пушач – не пуши над 2 години	11 (19)	3 (8,8)	14 (15,2)	
	Скорошен пушач-преустановил пушенето в последните 1 – 2 години	5 (8,6)	5 (14,7)	10 (10,9)	
	Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	4 (6,9)	8 (23,5)	12 (13)	
	Настоящ – над 10 цигари дневно	1 (1,7)	0 (0)	1 (1,1)	
	Общо	58 (100)	34 (100)	92 (100)	
Extavia	Никога непушили	20 (83,3)	3 (50)	23 (76,7)	0,114
	Някогашен пушач – не пуши над 2 години	1 (4,2)	1 (16,7)	2 (6,7)	
	Скорошен пушач – преустановил пушенето в последните 1 – 2 години	1 (4,2)	2 (33,3)	3 (10)	
	Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	2 (8,3)	0 (0)	2 (6,7)	
	Общо	24 (100)	6 (100)	30 (100)	
Rebif	Никога непушили	17 (89,5)	1 (25)	18 (78,3)	n/a
	Някогашен пушач – не пуши над 2 години	1 (5,3)	0 (0)	1 (4,3)	
	Скорошен пушач – преустановил пушенето в последните 1 – 2 години	1 (5,3)	1 (25)	2 (8,7)	
	Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	0 (0)	2 (50)	2 (8,7)	
	Общо	19 (100)	4 (100)	23 (100)	

Не е възможен статистически анализ на данните, но е налице засилена тенденция, повтаряща находката от серологичните подгрупи на BAb, а именно – по-чести настоящи и скорошни пушачи в серопозитивната група.

Таблица 86. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) по отношение на динамиката на оценката по скалата EDSS при различните медикаменти

Терапия	**Увеличение по скалата EDSS**	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
Avonex	0	13 (92,9)	1 (50)	14 (87,5)	n/a
	0,5	1 (7,1)	1 (50)	2 (12,5)	
	Общо	14 (100)	2 (100)	16 (100)	
Betaferon	0	56 (94,9)	17 (51,5)	73 (79,3)	<0,001
	0,5	3 (5,1)	9 (27,3)	12 (13)	
	1	0 (0)	5 (15,2)	5 (5,4)	
	1,5	0 (0)	2 (6,1)	2 (2,2)	
	Общо	59 (100)	33 (100)	92 (100)	
Extavia	0	21 (91,3)	4 (66,7)	25 (86,2)	0,180
	0,5	1 (4,3)	0 (0)	1 (3,4)	
	1	1 (4,3)	2 (33,3)	3 (10,3)	
	Общо	23 (100)	6 (100)	29 (100)	
Rebif	0	15 (78,9)	4 (100)	19 (82,6)	n/a
	0,5	1 (5,3)	0 (0)	1 (4,3)	
	1	3 (15,8)	0 (0)	3 (13)	
	Общо	19 (100)	4 (100)	23 (100)	

Заложеният от нас клиничен критерий за трайно акумулиране на инвалидизация (увеличение на оценката по скалата EDSS ≥ 1, което се задържа за период от 6 месеца) статистически достоверно е по-честа находка в серопозитивната група на лекуваните с Betaferon. Макар и да не достига статистическа значимост, находката е подобна и при лекуваните с Extavia. В изследваната от нас група болни нито един от лекуваните с Avonex не е влошил инвалидизацията с оценка по скалата EDSS > 1,0. При лекуваните с Rebif44 трайното акумулиране на инвалидизация се констатира само при NAb(–), но поради изключително малкия брой пациенти общо в групата анализът на данните би бил непълноценен.

Таблица 87. Сравнение на различните субгрупи NAb(+/–) според оценката по скалата EDSS преди лечението и по време на имунолосерологичното 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)	

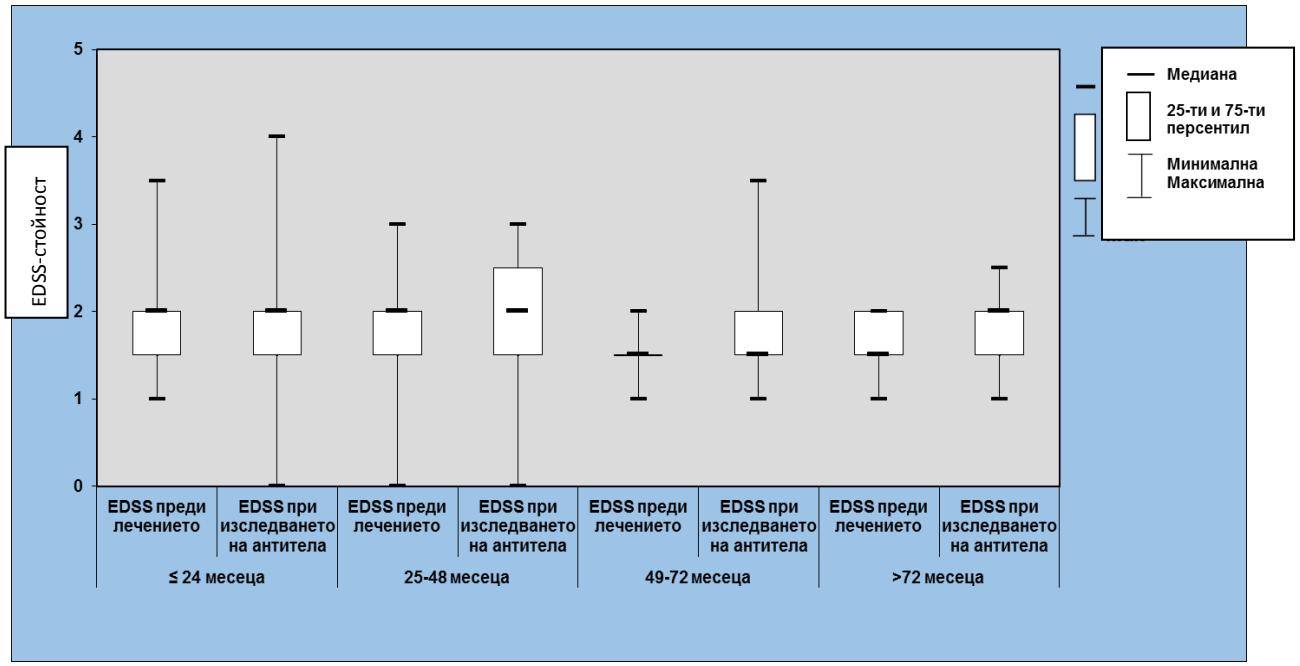
Двете серологични групи се различават статистически по отношение на динамиката на инвалидизацията, оценена по скалата EDSS ($p < 0,001$). Налице е статистически значимо увеличение на оценката по скалата EDSS в групата на NAb(+): при 20% от серопозитивните е налице прогресия с над 1,0 (трайно акумулиране на инвалидизацията), докато при серонегативните такава прогресия се установява само при 3,5%.

Таблица 88. Сравнение на инвалидизацията, оценена по скалата EDSS преди лечението и по време на изследването 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	

В различните групи по продължителност е видно увеличение на оценката по скалата EDSS за времето на лечение, което е в съгласие с умерената ефективност на лечението с интерферон-бета. Степента на влошаване на инвалидността обаче е малка – признак на имуномодулаторния ефект на терапията.

Фигура 32. Промяна на инвалидността в четирите групи, изразена чрез оценка по скалата EDSS преди лечението и към момента на изследването



Промяната на инвалидността, изразена чрез оценка по скалата EDSS за четирите групи преди лечението и към момента на изследването, е обяснима с факта, че в това наблюдение са включени т.нар. „НЗОК респондери“ и липсват случаите с по-агресивен ход. 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 пациентите от нашата извадка не са включвани пациенти с прогредиентен ход и насложени пристъпи. Въпреки това е изключително трудно да се маркира моментът, в който пациентът преминава от пристъпна към прогредиентна фаза на болестта. При пациентите с продължителност на лечението над 7 години се установява изненадващо малка прогресия в инвалидизацията, което може да означава, че тази субгрупа пациенти имат оптимален отговор към лечението с интерферон-бета (напълно отговаряща на лечението с интерферон-бета) или това са пациенти с „доброкачествен ход“.

Фигура 33. Динамика на оценката по скалата EDSS във всяка група преди лечението и при имуносерологичното изследване

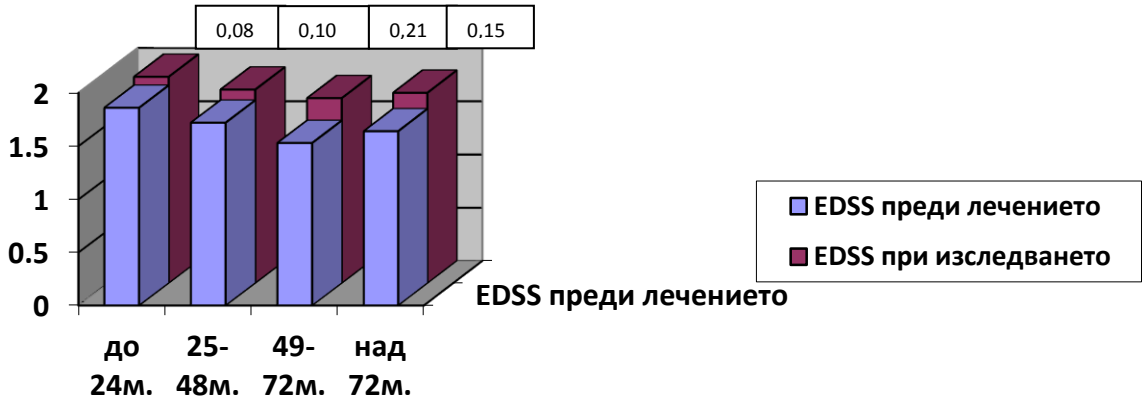


Таблица 89. Сравнение на ARR преди лечението и при имуносерологичното изследване

Сравнение на ARR преди и по време на лечението		p
До 2 години преди лечение ↔	Пациенти, лекувани до 2 г.	<0,001
До 2 години преди лечение ↔	Пациенти, лекувани до 3 – 4 г.	<0,001
До 2 години преди лечение ↔	Пациенти, лекувани до 5 – 6 г.	<0,001
До 2 години преди лечение ↔	Пациенти, лекувани над 7 г.	0,015

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

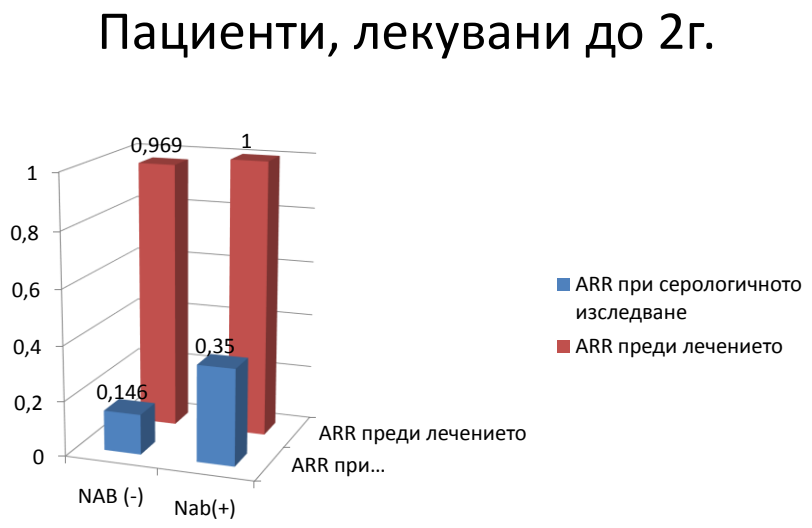
Таблица 90. Сравнение на серологични субгрупи NAb(+/–) по ARR преди лечението и при имуносерологичното изследване според продължителността на лечението

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

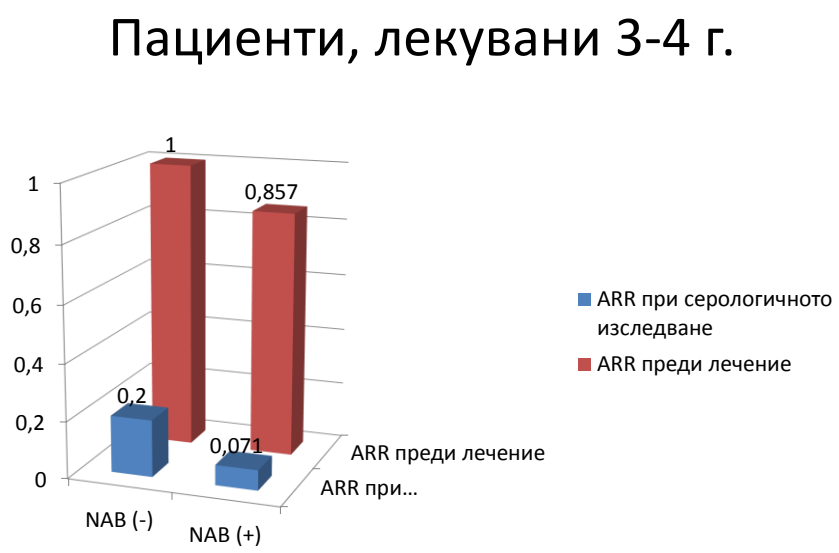
Таблица 91. Статистическа достоверност

NAb	Сравнение на ARR преди и по време на лечението		p
NAb(+)	До 2 години преди лечение ↔	До 2 г. след лечение	<0,001
	До 2 години преди лечение ↔	3-та и 4-та година след лечение	<0,001
	До 2 години преди лечение ↔	5-а и 6-а година след лечение	<0,001
	До 2 години преди лечение ↔	7-ма и 8-ма година след лечение	n/a
NAb(–)	До 2 години преди лечение ↔	До 2 г. след лечение	<0,001
	До 2 години преди лечение ↔	3-та и 4-та година след лечение	<0,001
	До 2 години преди лечение ↔	5-а и 6-а година след лечение	n/a
	До 2 години преди лечение ↔	7-ма и 8-ма година след лечение	n/a

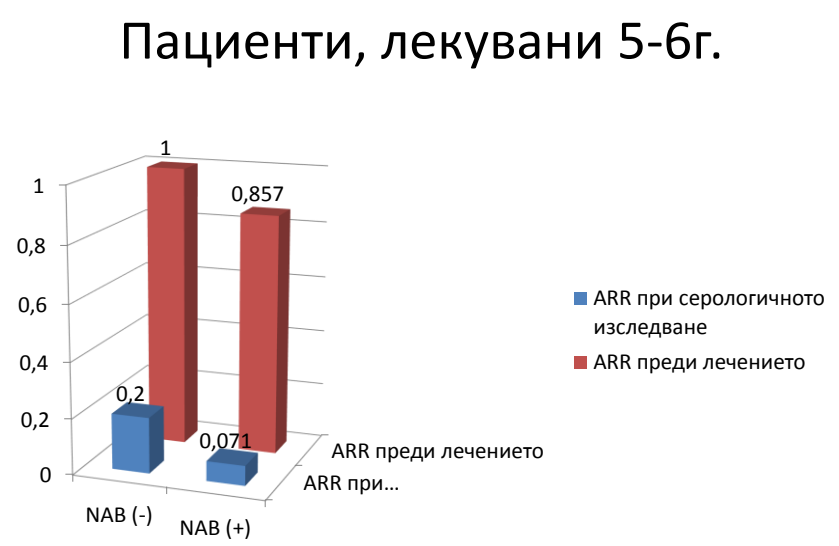
Фигура 34.1. Графично изобразяване на редукцията на ARR при субгрупите NAb(+/–) при различна продължителност на лечението – лекувани до 2 години



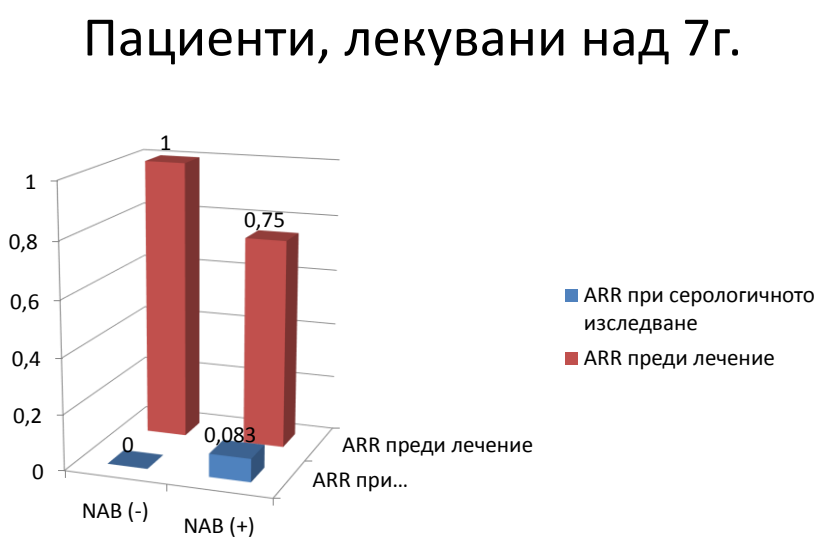
Фигура 34.2. Графично изобразяване на редукцията на ARR при субгрупите NAb(+/–) при различна продължителност на лечението – лекувани 3 – 4 години



Фигура 34.3. Графично изобразяване на редукцията на ARR при субгрупите NAb(+/–) при различна продължителност на лечението – лекувани 5 – 6 години



Фигура 34.4. Графично изобразяване на редукцията на ARR при субгрупите NAb(+/–) при различна продължителност на лечението – лекувани над 7 години



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

Таблица 92. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) по възраст, давност на болестта, време до поява на първи пристъп и време между първите два пристъпа в кохортата, лекувана с продължителност до 24 месеца (2 години)

Показател	NAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативни	96	38,3	9,7	38,0	18,0	57,0	0,002
	Позитивни	10	32,0	12,9	31,5	17,0	53,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	96	28,1	8,2	27,5	5,0	48,0	0,058
	Позитивни	10	23,0	11,3	21,0	12,0	48,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	96	9,8	5,0	9,0	2,0	26,0	0,573
	Позитивни	10	9,1	5,5	7,5	3,0	17,0	
Време до първи пристъп – месеци	Негативни	28	17,5	12,5	15,5	1,0	48,0	n/a
	Позитивни	7	19,3	9,8	17,0	9,0	36,0	
Време между първи и втори пристъп – месеци	Негативни	10	12,0	5,2	11,0	6,0	20,0	n/a
	Позитивни	7	11,7	11,7	6,0	5,0	36,0	

Липсва статистическа междугрупова разлика по отношение на възрастта при изследването, възрастта при дебюта на заболяването и неговата давност. Времето до поява на първи пристъп е с около 2 месеца по-дълго при серопозитивните пациенти.

Таблица 93. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) по възраст, давност на болестта, време до поява на първи пристъп и време между първите два пристъпа в кохортата, лекувана с продължителност до 24 – 48 месеца (3 – 4 години)

Показател	NAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативни	15	41,4	7,4	41,0	30,0	55,0	0,030
	Позитивни	16	36,7	9,7	39,0	20,0	52,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	15	33,3	6,6	31,0	25,0	47,0	0,227
	Позитивни	16	28,8	7,9	30,5	14,0	40,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	15	8,1	3,4	7,0	5,0	18,0	0,495
	Позитивни	16	7,6	4,0	6,5	2,0	19,0	
Време до първи пристъп – месеци	Негативни	4	22,3	11,6	22,5	8,0	36,0	n/a
	Позитивни	11	28,6	11,2	29,0	7,0	42,0	
Време между първи и втори пристъп – месеци	Негативни	0						n/a
	Позитивни	5	8,8	5,0	6,0	5,0	16,0	

В двете серологични групи липсват разлики или възможност за статистическо сравнение на описаните параметри.

Таблица 94. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) по възраст, давност на болестта, време до поява на първи пристъп и време между първите два пристъпа в кохортата, лекувана с продължителност до 48 – 72 месеца (5 – 6 години)

Показател	NAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативни	5	47,2	8,3	44,0	38,0	59,0	n/a
	Позитивни	14	38,8	9,7	38,0	26,0	54,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	5	34,8	7,8	35,0	26,0	43,0	n/a
	Позитивни	14	29,1	9,0	30,5	17,0	46,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	5	12,4	3,8	10,0	9,0	17,0	n/a
	Позитивни	14	9,6	4,1	8,5	6,0	22,0	
Време до първи пристъп – месеци	Негативни	1	23,0		23,0	23,0	23,0	n/a
	Позитивни	6	31,5	23,0	22,0	13,0	70,0	
Време между първи и втори пристъп – месеци	Негативни	1	13,0		13,0	13,0	13,0	n/a
	Позитивни	3	24,7	19,6	23,0	6,0	45,0	

Въпреки че не подлежат на статистически достоверна обработка, прави впечатление, че при серопозитивните възрастта в години при дебюта на заболяването, възрастта при изследването и давността на заболяването е по-ниска.

Таблица 95. Сравнение на субгрупите NAb(+/–) по възраст, давност на болестта, време до поява на първи пристъп и време между първите два пристъпа в кохортата, лекувана с продължителност над 72 месеца (>7 години)

Показател	NAb	N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
Възраст при изследването – години	Негативни	1	55,0		55,0	55,0	55,0	n/a
	Позитивни	6	42,3	8,8	40,5	33,0	56,0	
Възраст при клиничния дебют на заболяването – години	Негативни	1	46,0		46,0	46,0	46,0	n/a
	Позитивни	6	27,5	6,5	25,5	23,0	40,0	
Давност на болестта при изследването – години	Негативни	1	9,0		9,0	9,0	9,0	n/a
	Позитивни	6	14,8	7,7	12,5	8,0	28,0	
Време до първи пристъп – месеци	Негативни	1	9,0		9,0	9,0	9,0	n/a
	Позитивни	2	51,5	46,0	51,5	19,0	84,0	
Време между първи и втори пристъп – месеци	Негативни	1	9,0		9,0	9,0	9,0	n/a
	Позитивни	1	36,0		36,0	36,0	36,0	

Поради малкия брой пациенти не е възможно статистическо сравнение.

Таблица 96. Сравнение на серологични субгрупи NAb(+/–) по системни нежелани реакции според продължителността на лечението

Продължителност на лечението (месеци)	**Общи нежелани реакции**	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
≤ 24	Липсват	3 (3,1)	2 (20)	5 (4,7)	0,004
	Отшумели	44 (45,8)	8 (80)	52 (49,1)	
	Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВС или друго лечение	42 (43,8)	0 (0)	42 (39,6)	
	„Тежки“, повлияващи се от НСПВС	7 (7,3)	0 (0)	7 (6,6)	
	Общо	96 (100)	10 (100)	106 (100)	
25 – 48	Липсват	1 (6,7)	7 (43,8)	8 (25,8)	0,010
	Отшумели	6 (40)	8 (50)	14 (45,2)	
	Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПС или друго лечение	7 (46,7)	1 (6,3)	8 (25,8)	
	Отново появяващи се	1 (6,7)	0 (0)	1 (3,2)	
	Общо	15 (100)	16 (100)	31 (100)	
49 – 72	Липсват	1 (20)	5 (35,7)	6 (31,6)	n/a
	Отшумели	1 (20)	8 (57,1)	9 (47,4)	
	Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВС или друго лечение	2 (40)	1 (7,1)	3 (15,8)	
	„Тежки“, повлияващи се от НСПВС	1 (20)	0 (0)	1 (5,3)	
	Общо	5 (100)	14 (100)	19 (100)	
> 72	Липсват	0 (0)	2 (33,3)	2 (28,6)	n/a
	Отшумели	0 (0)	4 (66,7)	4 (57,1)	
	Леки персистиращи или от време на време, неналагащи НСПВС или друго лечение	1 (100)	0 (0)	1 (14,3)	
	Общо	1 (100)	6 (100)	7 (100)	

Във всички групи според продължителността на лечението системни реакции се наблюдават по-често при серонегативните пациенти. Поради малкия брой в групите на лекуващите се над 5 години е невъзможно да се определи статистическата значимост, но е видно, че тенденцията се преповтаря.

Таблица 97. Сравнение на серологични субгрупи NAb(+/–) по локални нежелани реакции според продължителността на лечението

Продължителност на лечението (месеци)	**Локални нежелани реакции**	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
≤ 24	Липсват	5 (5,2)	0 (0)	5 (4,7)	0,022
	Отшумели	47 (49)	10 (100)	57 (53,8)	
	Леки персистиращи или появяващи се от време на време	40 (41,7)	0 (0)	40 (37,7)	
	„Тежки“, повлияващи се от локално лечение	4 (4,2)	0 (0)	4 (3,8)	
	Общо	96 (100)	10 (100)	106 (100)	
25 – 48	Липсват	1 (6,7)	8 (50)	9 (29)	0,002
	Отшумели	7 (46,7)	8 (50)	15 (48,4)	
	Леки персистиращи или появяващи се от време на време	7 (46,7)	0 (0)	7 (22,6)	
	Общо	15 (100)	16 (100)	31 (100)	
49 – 72	Липсват	0 (0)	4 (28,6)	4 (21,1)	n/a
	Отшумели	2 (40)	9 (64,3)	11 (57,9)	
	Леки персистиращи или появяващи се от време на време	3 (60)	1 (7,1)	4 (21,1)	
	Общо	5 (100)	14 (100)	19 (100)	
> 72	Липсват	0 (0)	1 (16,7)	1 (14,3)	n/a
	Отшумели	0 (0)	5 (83,3)	5 (71,4)	
	Леки персистиращи или появяващи се от време на време	1 (100)	0 (0)	1 (14,3)	
	Общо	1 (100)	6 (100)	7 (100)	

Локалните нежелани реакции се наблюдават по-често при серонегативните пациенти във всички групи, независимо от факта, че изводът е направен въз основа на малък брой пациенти.

Таблица 98. Сравнение на серологични субгрупи NAb(+/–) по фамилна обремененост според продължителността на лечението

Продължителност на лечението (месеци)	**Фамилност**	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
≤ 24	Липсва	94 (100)	9 (90)	103 (99)	0,096
	Повече от 1 родственик първа или втора линия	0 (0)	1 (10)	1 (1)	
	Общо	94 (100)	10 (100)	104 (100)	
25 – 48	Липсва	15 (100)	16 (100)	31 (100)	n/a
	Общо	15 (100)	16 (100)	31 (100)	
49 – 72	Липсва	5 (100)	14 (100)	19 (100)	n/a
	Общо	5 (100)	14 (100)	19 (100)	
> 72	Липсва	1 (100)	6 (100)	7 (100)	n/a
	Общо	1 (100)	6 (100)	7 (100)	

Не се установява разлика по отношение на фамилната обремененост при различните групи според давността на заболяването.

Таблица 99. Сравнение на серологични субгрупи NAb(+/–) по съпътстващи автоимунни заболявания според продължителността на лечението

Продължителност на лечението (месеци)	**Придружаващи автоимунни заболявания**	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
≤ 24	Не	89 (92,7)	10 (100)	99 (93,4)	1,000
	Да	7 (7,3)	0 (0)	7 (6,6)	
	Общо	96 (100)	10 (100)	106 (100)	
25 – 48	Не	15 (100)	15 (93,8)	30 (96,8)	1,000
	Да	0 (0)	1 (6,3)	1 (3,2)	
	Общо	15 (100)	16 (100)	31 (100)	
49 – 72	Не	4 (80)	14 (100)	18 (94,7)	n/a
	Да	1 (20)	0 (0)	1 (5,3)	
	Общо	5 (100)	14 (100)	19 (100)	
> 72	Не	1 (100)	6 (100)	7 (100)	n/a
	Общо	1 (100)	6 (100)	7 (100)	

Не се установява разлика по отношение на автоимунните комобидни състояния при различните групи според давността на заболяването.

Таблица 100. Сравнение на серологични субгрупи NAb(+/–) по влияние на тютюнопушенето според продължителността на лечението

Продължителност на лечението (месеци)	**Тютюнопушене**	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
≤ 24	Никога непушили	68 (71,6)	7 (70)	75 (71,4)	0,816
	Някогашен пушач – не пуши над 2 години	13 (13,7)	1 (10)	14 (13,3)	
	Скорошен пушач – преустановил пушенето в последните 1 – 2 години	6 (6,3)	1 (10)	7 (6,7)	
	Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	7 (7,4)	1 (10)	8 (7,6)	
	Настоящ – над 10 цигари дневно	1 (1,1)	0 (0)	1 (1)	
	Общо	95 (100)	10 (100)	105 (100)	
25 – 48	Никога непушили	15 (100)	9 (56,3)	24 (77,4)	0,011
	Някогашен пушач – не пуши над 2 години	0 (0)	1 (6,3)	1 (3,2)	
	Скорошен пушач – преустановил пушенето в последните 1 – 2 години	0 (0)	4 (25)	4 (12,9)	
	Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	0 (0)	2 (12,5)	2 (6,5)	
	Общо	15 (100)	16 (100)	31 (100)	
49 – 72	Никога непушили	3 (60)	5 (35,7)	8 (42,1)	n/a
	Скорошен пушач – преустановил пушенето в последните 1 – 2 години	1 (20)	3 (21,4)	4 (21,1)	
	Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	1 (20)	6 (42,9)	7 (36,8)	
	Общо	5 (100)	14 (100)	19 (100)	
> 72	Никога непушили	1 (100)	3 (50)	4 (57,1)	n/a
	Някогашен пушач – не пуши над 2 години	0 (0)	2 (33,3)	2 (28,6)	
	Настоящ пушач – до 10 цигари дневно	0 (0)	1 (16,7)	1 (14,3)	
	Общо	1 (100)	6 (100)	7 (100)	

Статистическа достоверност може да се потърси в групата, лекувана до 2 години, и тази, която е лекувана 3 – 4 години. При втората се констатира статистически значима разлика (p = 0,011) по отношение на това, че са налице повече настоящи и скорошни пушачи след серопозитивните.

Таблица 101. Сравнение на серологични субгрупи NAb(+/–) по отношение на динамиката на оценката по скалата EDSS според продължителността на лечението

Продължителност на лечението (месеци)	**Увеличение по скалата EDSS**	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
≤ 24	0	85 (89,5)	6 (60)	91 (86,7)	0,019
	0,5	6 (6,3)	2 (20)	8 (7,6)	
	1	4 (4,2)	1 (10)	5 (4,8)	
	1,5	0 (0)	1 (10)	1 (1)	
	Общо	95 (100)	10 (100)	105 (100)	
25 – 48	0	14 (100)	7 (46,7)	21 (72,4)	0,002
	0,5	0 (0)	3 (20)	3 (10,3)	
	1	0 (0)	5 (33,3)	5 (17,2)	
	Общо	14 (100)	15 (100)	29 (100)	
49 – 72	0	5 (100)	9 (64,3)	14 (73,7)	n/a
	0,5	0 (0)	3 (21,4)	3 (15,8)	
	1	0 (0)	1 (7,1)	1 (5,3)	
	1,5	0 (0)	1 (7,1)	1 (5,3)	
	Общо	5 (100)	14 (100)	19 (100)	
> 72	0	1 (100)	4 (66,7)	5 (71,4)	n/a
	0,5	0 (0)	2 (33,3)	2 (28,6)	
	Общо	1 (100)	6 (100)	7 (100)	

В различните групи според продължителността на лечението се запазва разликата във влошаването на инвалидизацията – по-изразена при серопозитивните спрямо серонегативните, като в групите с достатъчен брой пациенти се установява и статистическа значимост

Таблица 102. Сравнение на серологични субгрупи NAb(+/–) според оценката по скалата EDSS преди лечението и при имуносерологичното изследване според продължителността на лечението

NAb	Продължителност на лечението (месеци)		N	Mean	SD	Median	Min	Max	p
(-)	≤ 24	EDSS преди лечението	95	1,83	0,51	1,50	1,00	3,50	0,004
		EDSS при изследването на антитела	96	1,89	0,60	2,00	0,00	4,00	
	25 – 48	EDSS преди лечението	14	1,54	0,77	2,00	0,00	2,50	1,000
		EDSS при изследването на антитела	15	1,43	0,84	2,00	0,00	2,50	
	49 – 72	EDSS преди лечението	5	1,50	0,35	1,50	1,00	2,00	n/a
		EDSS при изследването на антитела	5	1,50	0,35	1,50	1,00	2,00	
	> 72	EDSS преди лечението	1	1,00			1,00	1,00	n/a
		EDSS при изследването на антитела	1	1,00			1,00	1,00	
(+)	≤ 24	EDSS преди лечението	10	2,10	0,32	2,00	1,50	2,50	0,066
		EDSS при изследването на антитела	10	2,45	0,72	2,00	2,00	4,00	
	25 – 48	EDSS преди лечението	15	1,90	0,43	2,00	1,00	3,00	0,009
		EDSS при изследването на антитела	16	2,19	0,75	2,00	0,00	3,00	
	49 – 72	EDSS преди лечението	14	1,54	0,31	1,50	1,00	2,00	0,039
		EDSS при изследването на антитела	14	1,82	0,64	1,50	1,00	3,50	
	> 72	EDSS преди лечението	6	1,75	0,27	1,75	1,50	2,00	n/a
		EDSS при изследването на антитела	6	1,92	0,38	2,00	1,50	2,50	

Независимо от факта, че всички болни са отговарящи на лечението по критериите на НЗОК, направена е съпоставка на пациентите, неполучили пристъпи за наблюдавания период, невлошили инвалидизацията, оценена по скалата EDSS, и онези с клинична стабилност в различните серологични групи.

Таблица 103. 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 35. Процент на пациентите без пристъпи в субгрупите NAb(+/–)



Таблица 104. Процент на пациентите без пристъпи (relapse free) в субгрупите NAb(+/–) според продължителността на лечението

Продължителност на лечението	**Пристъпи**	**Статистика**	**NAb**		**Общо**
			Негативни	**Позитивни**	
≤ 24	Не	N	69	3	72
		%	71,9%	30,0%	67,9%
	Да	N	27	7	34
		%	28,1%	70,0%	32,1%
	Общо	N	96	10	106
		%	100,0%	100,0%	100,0%
25 – 48	Не	N	11	5	16
		%	73,3%	31,3%	51,6%
	Да	N	4	11	15
		%	26,7%	68,8%	48,4%
	Общо	N	15	16	31
		%	100,0%	100,0%	100,0%
49 – 72	Не	N	3	7	10
		%	60,0%	50,0%	52,6%
	Да	N	2	7	9
		%	40,0%	50,0%	47,4%
	Общо	N	5	14	19
		%	100,0%	100,0%	100,0%
> 72	Не	N	0	4	4
		%	0,0%	66,7%	57,1%
	Да	N	1	2	3
		%	100,0%	33,3%	42,9%
	Общо	N	1	6	7
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Тенденцията на общата група се запазва при лекуваните до 5 години. При по-дългосрочно лекуваните съотношението на пациентите, получаващи пристъпи,

расте в NAb(+), като в нашата извадка при пациентите с продължителност на терапията над 7 години пристъпите се асоциират напълно със серопозитивността.

Таблица 105. 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)	

Липсата на динамика общо в серонегативната група се наблюдава при 91,3% от пациентите, като с трайно акумулиране на инвалидността са 35%. При серопозитивните се открояват съответно 57,8% и 8,2%. Тези междугрупови разлики са статистически значими.

Фигура 36. Липса на динамика на инвалидизацията, оценена по скалата EDSS в субгрупите NAb(+/–)

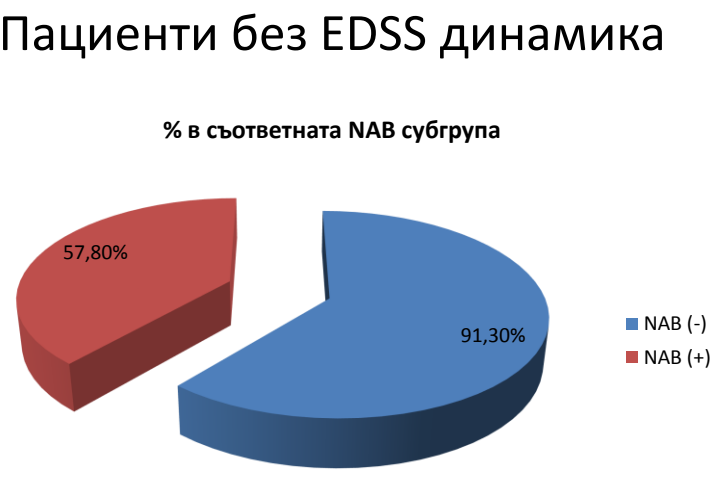


Таблица 106. Динамика на инвалидизацията, оценена по скалата EDSS в субгрупите NAb(+/–) според продължителността на лечението

Продължителност на лечението (месеци)	**Увеличение по скалата EDSS**	**NAb**		**Общо n (%)**	**p**
		Негативни n (%)	**Позитивни n (%)**		
≤ 24	0	85 (89,5)	6 (60)	91 (86,7)	0,019
	0,5	6 (6,3)	2 (20)	8 (7,6)	
	1	4 (4,2)	1 (10)	5 (4,8)	
	1,5	0 (0)	1 (10)	1 (1)	
	Общо	95 (100)	10 (100)	105 (100)	
25 – 48	0	14 (100)	7 (46,7)	21 (72,4)	0,002
	0,5	0 (0)	3 (20)	3 (10,3)	
	1	0 (0)	5 (33,3)	5 (17,2)	
	Общо	14 (100)	15 (100)	29 (100)	
49 – 72	0	5 (100)	9 (64,3)	14 (73,7)	n/a
	0,5	0 (0)	3 (21,4)	3 (15,8)	
	1	0 (0)	1 (7,1)	1 (5,3)	
	1,5	0 (0)	1 (7,1)	1 (5,3)	
	Общо	5 (100)	14 (100)	19 (100)	
> 72	0	1 (100)	4 (66,7)	5 (71,4)	n/a
	0,5	0 (0)	2 (33,3)	2 (28,6)	
	Общо	1 (100)	6 (100)	7 (100)	

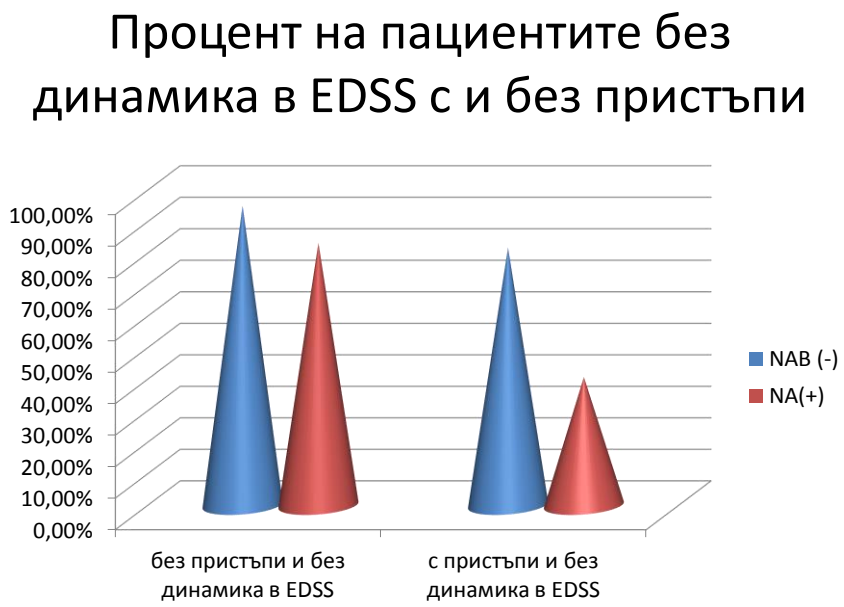
В групите, лекувани над 2 години, трайно акумулиране на инвалидността се откроява само с серопозитивната група.

Таблица 107. Процент на пациентите без пристъпи + процент на пациентите без влошаване на инвалидизацията, оценена по скалата EDSS 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 цялата група неполучилите пристъпи и тези, които са без влошаване на инвалидизацията, са 95,1% при серонегативните и 83,3% при серопозитивните.

Фигура 37. Процент на пациентите без пристъпи + процент на пациентите без влошаване на инвалидизацията, оценена по скалата EDSS в субгрупите NAb(+/–)



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, неполучили 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 изследвани 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 EDSS, са голям процент – 93%. Тези обаче с преживени пристъпи и липса на влошаване на инвалидизацията са 63,3%. От NAb серопозитивните без преживян пристъп и без EDSS динамика са 83,3%, докато при NAb серонегативните този процент е 95,1%. От групата пациенти, които са преживяли 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 нашите пациенти е изследвана за титър на неутрализиращите антитела. Произволно са подбрани 9 от NAb позитивните серуми.

Фигура 38. Изследвана серопозитивна група титър на NAb

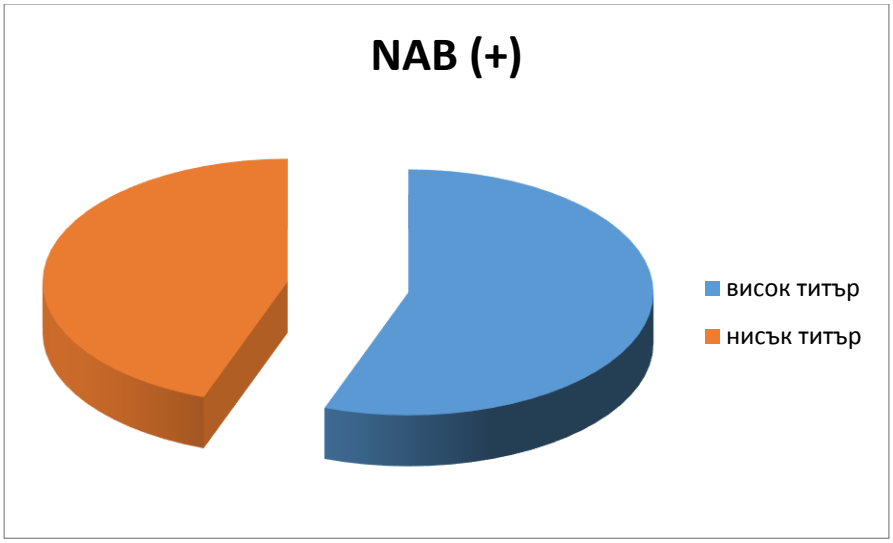


Таблица 108. Титър на NAb – оценка на стойността

Пациент	BTU	TRU/ml	Резултат	Медикамент
1	352,801	> 540	Висок	Avonex
2	331,338	32,09	Нисък	Betaferon
3	> 500	18,82	Нисък	Betaferon
4	> 500	> 540	Висок	Betaferon
5	> 500	> 540	Висок	Betaferon
6	> 500	99,14	Нисък	Betaferon
7	> 500	> 540	Висок	Extavia
8	> 500	> 540	Висок	Betaferon
9	> 500	143,25	Нисък	Betaferon

Таблица 109. Сравнение на 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 анализираните серумите са на индивиди в юношеска възраст (12 –17). По-малката част от тях са лекувани по НЗОК (над 16 години, отговарящи на установените критерии за лечение), а друга част са лекувани с IFNβ-1b – дарение от фирмата производител.

Таблица 110. Разпределение на пациентите в юношеската група

БРОЙ ПРИСТЪПИ	**NAb(+)**	**NAb(–)**
12 месеца след лечението	10	5
12 месеца преди лечението	16	16

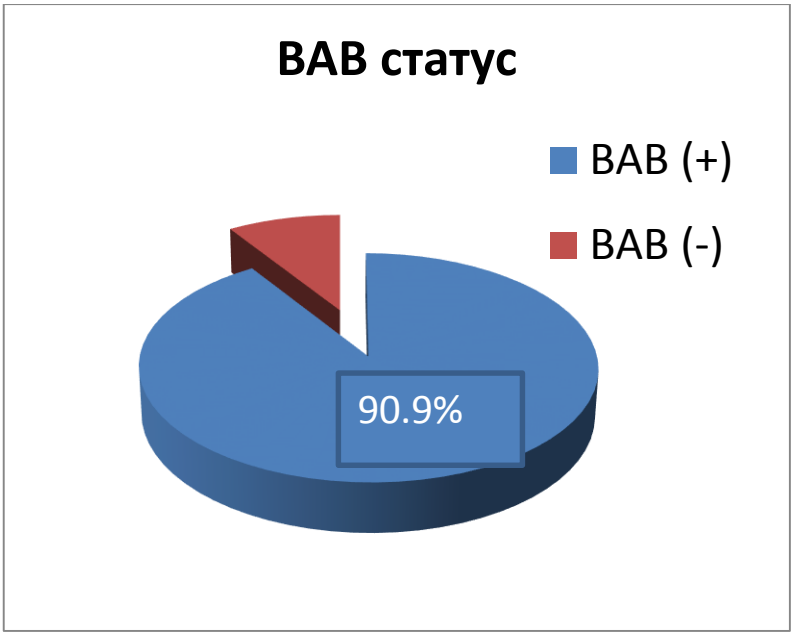
Таблица 111. Разпределение на пациентите в юношеската група

	ДЕБЮТ В ДЕТСКА ВЪЗРАСТ	**ДЕБЮТ В ЮНОШЕСКА ВЪЗРАСТ**
BAb(+)	7	5
BAb(–)	0	2
NAb(+)	3	2
NAb(–)	1	2

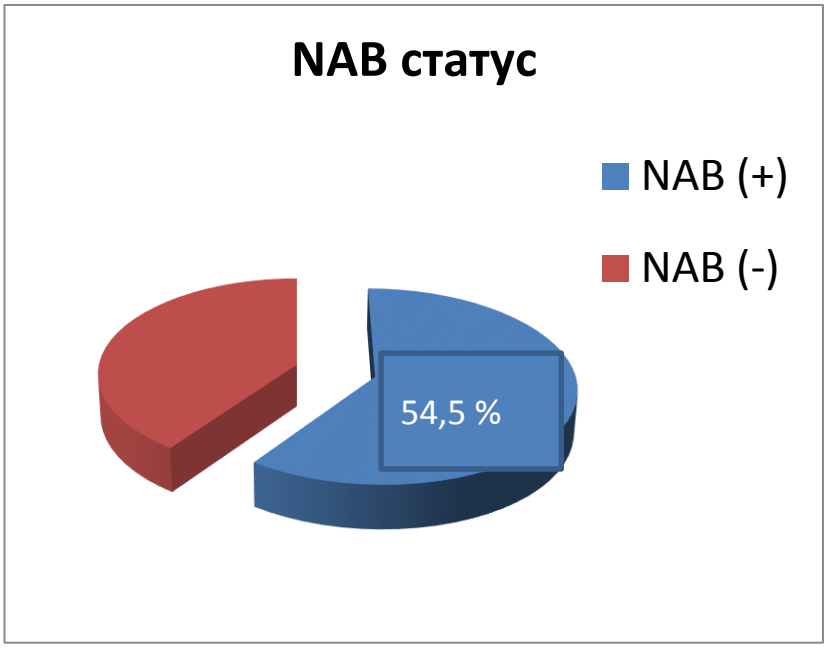
Таблица 112. Допълнително лекувани с IVIG в юношеската група

	Курс IVIG – ежемесечно	**Курс IVIG –през 3 месеца**
NAB(+)	n = 0	n = 2
NAB(–)	n = 1	n = 1

Фигура 39. BAb статус в юношеска кохорта



Фигура 40. NAb статус в юношеска кохорта



x

VII. ОБСЪЖДАНЕ

1. BAb и NAb серопозитивност

Последиците от възникването на антилекарствени антитела 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.

Интерфероновите медикаменти са все още най-често използваната имуномодулация при лечение на множествена склероза. Първите пилотни проучвания, както и наскоро завършилото при пациенти с клинично изолиран синдром, изследващи наличието на антилекарствени антитела, не подкрепят влиянието на NAb върху клиничната ефективност на IFNβ. При по-дълъг период на проследяване се установява негативното влияние на неутрализиращите антитела. Въпреки това все още се дебатира темата за ефекта на NAb и липсва общовъзприет консенсус за тяхното изследване, както и за промяна на лечебния план при появата им (4,19-21). 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 антитела.

Някои проучвания показват, че дори ненеутрализиращите (свързващите) антилекарствени антитела възпрепятстват IFNβ индуцираните биологични ефекти (83). В нашето изследване BAb позитивните са 45,8%, което съставлява по-малък процент спрямо резултатите, получени от други авторски колективи: 50 – 80% (43). В много от публикациите относно неутрализиращи антитела честотата на BAb 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 BAb позитивните пациенти. Въз основа на нашите данни и с помощта на статистически методи се доказва, че при титър над 250 BTU е налице 60% вероятност пациентът да се позитивира на NAb (сензитивност – 60,9% и специфичност – 59,0%). Според някои автори при

пациенти с висок титър на свързващите антитела дори е уместно да се смени лечението 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 (83). Според публикация на Fox от 2014 г. (53) при титър на BAb над 50 U съществува голяма вероятност пациентите да бъдат NAb(+), което насочва към терапевтичното решение за смяна. Няма общоприета установена стойност за титъра на BAb, която да предсказва достоверно NAb(+), но някои автори приемат титър на BAb над 50 U (посочена специфичност 94%) и дори титър над 20 U (посочена специфичност 80%) за подходящ предиктор на NAb позитивирането. Част от изследователите изказват становище, че ако се определи достоверен титър на BAb, предсказващ NAb серопозитивирането, необходимостта от провеждане на по-скъпото и времеемко изследване за NAb е уместно да отпадне. Hegen и сътрудници (83) проучват дали титъра на ненеутрализиращите антитела, установени рано в хода на лечението (на третия месец), могат да служат като предиктор за по-късно възникващи неутрализиращи антитела. Чрез измерване на намалението на протеиновата концентрация на CXCL-10 и TRAIL те установяват, че свързващите антитела самостоятелно и независимо от NAbs отговарят за намалена бионаличност на интерферон-бета-1b. В това проучване изследваните на 3-ия месец BAb 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 ненеутрализиращи антитела. Тези резултати подкрепят хипотезата за титързависима продължителна неутрализация и твърдението, че всички антилекарствени антитела 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 BAbs(+) и NAbs(+).

Khan и сътрудници съобщават, че 43% от изследваната група пациенти образуват антилекарствени антитела. Те изследват и средната серумна IFN концентрация в различните групи – позитивни и негативни на неутрализиращи антитела. 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 антитела, тези

данни недвусмислено потвърждават твърдението за инхибиращия ефект на антиинтерфероновите антитела, а именно – неутрализиращите антитела отменят IFN индуцираните генни продукти. Такива биомаркери са MxA, 2-5A синтетаза, неоптерин, β2 микроглобулин, разтворим туморнекротизиращ фактор, свързания с апоптоза индуциращ лиганд и хемокин CXCL10.

Въпреки събраните разнообразни данни, подкрепящи инхибиторния ефект на NAbs, клиничните резултати понякога са противоречиви. При повечето дълготрайни проучвания (над три години) се установява, че при пациентите, изработващи неутрализиращи антилекарствени антитела, е налице увеличена активност на МРТ и по-висока ARR, спрямо тези без NAb. Някои изследователи установяват сходна параметри с тези при пациентите в плацебо групата (90).

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 МРТ, е доказано негативен. Съвременните изисквания за контрол върху заболяването NEDA (No evidence of disease activity) не допускат нито клинични, нито магнитнорезонансни данни за активност на заболяването. Поставената от нас цел е да се определи връзката между антилекарствените антитела и клиничните параметри на болестта. Не е включено изследване с МРТ 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 МРТ.

Невъзможността да бъде постигнато унифициране на изследванията с МРТ се дължи на следните основания:

1. Пациентите не са в условия на рандомизирано проучване, а са част от реалната клинична практика. Техните изследвания с МРТ са несистемно провеждани.

2. Не при всички пациенти изследването е проведено с контрастна материя. Използването на гадолиний (Gd) i.v. или друг контраст, приложената доза

на контраста и времевата зависимост между инжектирането и сканирането повлияват значимо крайния резултат.

3. Различни са техническите характеристики на апаратите за МРТ в България по отношение на мощността (0,5 Tesla; 1,0; 1,5; 3,0) и софтуерните показатели. Едни и същи пациенти използват различни центрове (специалисти по МРТ) за терапевтично мониториране.

4. При повечето пациенти липсва изследване с МРТ на 6-ия месец от започване на лечението, който да служи за изходен (стартов за начало на терапията) поради познатия ни отложен терапевтичен ефект на IFNβ.

5. Изследването на миелона изисква специална техника и интерпретация и не се провежда рутинно.

Съгласно препоръките на EFNS (2005 г.) спирането на лечението и промяната с неинтерфероново е уместно при установяване на NAb в две последователни изследвания (131). 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 антитяло 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 IFNβ. В нашето изследване NAbs серопозитивните са 12,8%, като този резултат се доближава до резултата на Malucchi – 12,4% (108). Серологичният статус в динамика не е подложен на изследване. Необходимо е проспективното проследяване на тези пациенти за установяване на сероконверсия.

В нашето наблюдение подбраният контингент пациенти е с пристъпна форма на МС и отговаря на критериите на НЗОК за респондери. Промяната на инвалидизацията, оценена по скалата EDSS, при нашите пациенти е резултат от остатъчни симптоми при непълното възстановяване след пристъпи, а не във връзка с междупристъпно прогресиране на инвалидността. Пациенти с прогредиентна фаза на болестта не са изследвани. В настоящото проучване се демонстрира негативният ефект на неутрализиращите антитела върху годишната честота на пристъпите и свързаното с резидуалните симптоми влошаване на инвалидизацията. Собствените ни резултати не противоречат на резултатите на европейския Консорциум за

изследване на неутрализиращите антитела при множествена склероза (NABINMS) (49) по отношение на ефекта на антилекарствените антитела срещу интерферон-бета.

2. Биологични характеристики, влияещи върху антилекарствени антитела 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 сравняването на пациентите от юношеската кохорта и възрастните. Макар да е статистически недостоверно (поради малкия брой на изследваните пациенти в юношеската група), антитялообразуването е по-често срещано при юношите, което вероятно се дължи на по-активната им имунна система.

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

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 интерфероноиндуцираните генни продукти.

Логично възниква въпросът дали биологичният ефект на NAbs in vivo може да засегне ендогенния интерферон и да порази 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 NAbs върху едногенния 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. Би било интересно да се изследва дали NAbs позитивните пациенти са по-податливи на онкологични заболявания или костна загуба.

Интерес предизвиква и фактът, че и при продължително приложение на IFNβ (над 4 години и повече) в серума на пациентите се установяват антилекарствени антитела. Има съобщения, че терапия с IFNβ може да предизвика дълготрайно образуване на антитела, персистиращи дори след нейното преустановяване. Във връзка с допускането, че изработените антилекарствени антитела могат да инактивират задълго 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 (данните не са представени).

Какво би било влиянието на персистиращите неутрализиращи антитела и след спиране на интерфероновото лечение, може да бъде изяснено с проспективни бъдещи изследвания.

4. Безопасност при поява на антилекарствени антитела

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

Изследвана е връзката между образуването на антитела и нежеланите реакции на интерферон-бета – системни грипоподобни и локални. Честотата на общите нежелани лекарствени реакции и NAb статуса на пациентите са в обратнопропорционална зависимост помежду си (154). Ето защо се препоръчва справянето с нежеланите реакции да става своевременно, за да се избегне самоволното прекратяване на лечението от страна на пациенти (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 антитела. Резултатите от анализа на локалните странични явления обаче показват същата обратнопропорционална зависимост, макар да е известно, че те са свързани в голяма степен и с добрата инжекционна техника.

5. Влияние на тютюнопушенето върху антитялообразуването на антилекарствени антитела

Установено е, че пушенето може да допринесе за индукцията на NAb към IFNβ и natalizumab. По-интензивно пушещите са изложени на повишен риск. Ролята на тютюнопушенето като фактор, способстващ антитялообразуването, е обект на анализ за нашия екип. Установено е, че белият дроб е имунореактивен орган. Механизмът, отговорен за антитялобразуването, е свързан с въздействието на тютюневия дим върху имунологичните процеси и собствените му проинфламаторни свойства. Пушенето увеличава активацията на проинфламаторни клетки и индукцията на следтранслационна модификация на протеини в белите дробове (9), което увеличава риска от автоимунен отговор (10,11). В изследването е установено, че пушачите – настоящи и бивши, са изложени на повишен риск от образуване на

антитела. Резултатите 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, тъй като, освен риска от антитялообразуване, тютюнопушенето е и доказан негативен прогностичен фактор по отношение на хода на болестта.

6. 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 IFNβ-1a i.m., а останалите – с IFNβ-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 IFNβ-1a и IFNβ-1b – съответно титъра на антитела срещу IFNβ-1a: 20 – 100 TRU (нисък) и над 100 (висок); срещу IFNβ-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 интерфероиндуцирани генни продукти (неоптерин, β2 микроглобулин) прогресивно намаляват (146). В нашата малка група 5 от 9 пациенти са с висок титър на NAb (NAb ≥ 540 TRU/ml). Серумът на единствения ни пациент, лекуван с IFNβ-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 IFNβ-1a i.m. (Avonex), от планирани изследвания 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 IFNβ-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. При положение че пациентите отговарят на изискванията за лечение на НЗОК („НЗОК респондери“), може да се предположи, че при тях е налице или субклинична активност, или имат „доброкачествена МС“. Последното не отменя предположението, че финансовият ресурс за лечение е изразходван нецелесъобразно. Това налага установяване на критерии за субефективност като основание за навременно превключване към ефективна за конкретния пациент терапия с цел предотвратяване на инвалидизираща активност на болестта. Персистиране на висок титър на неутрализиращи антитела насочва към прекъсване на лечението с интерферон-бета. Продължаването на терапията в най-добрия случай означава загуба на пари, а в най-лошия – че пациентът е с повишен риск от поява на активност на заболяването и пристъп.

Гореописаните данни потвърждават, че при болните, изработили NAb, не е препоръчително да се чака спонтанното им изчезване. Данните от достъпната литература сочат, че в много случаи пациентът може да остане серопозитивен дълго време (163), като по този начин е изложен на липса на протекция по отношение на клинична и/или субклинична активност на заболяването. Ето защо при индивидите с висок титър на NAb трябва да се препоръчва смяна на лечението.

Ако изхождаме от хипотезата, че нашите пациентите с висок титър не са претърпявали сероконверсия и е налице намалена или анулирана биоактивност на интерферон-бета, то ARR е по-висок в сравнение с този в общата група след лечение. Този факт е в съгласие с нашето предположение за намалена или анулирана биоактивност, следователно и за влошен клиничен резултат.

В групата с нисък титър неутрализиращи антитела се наблюдава само един пристъп. Това е неочаквано добър резултат при пристъпна форма на болестта дори

при употреба на медикаменти с по-висока ефикасност от интерферон-бета. Този факт може да бъде обяснен с възрастта на пациентите (47 години средна възраст) и продължителността на болестта (16,5 години средна стойност за групата). Известен медицински факт, свързан с естествения ход на болестта, е, че честотата на пристъпите е зависима от възрастта и давността на заболяването (174). Можем да спекулираме, че пациентите по-скоро имат „доброкачествена форма“ на множествена склероза, отколкото задължително да са се повлияли от медикацията (вероятно компрометирана). Можем също да допуснем, че е възможно всички четири пациенти да са сред изключенията, при които въпреки серопозитивността биологичната активност на интерферона не е намалена и терапията е успешна. Изследване на антитяломедиирано намаление на биологичната активност показва, че всички NAb негативни пациенти притежават биологичен отговор. Всички пациенти с високи нива на NAb нямат никакъв отговор (изследвания in vivo потвърждават пълна загуба на биоактивност при титри над 600 TRU/ml), а отговорът на пациенти с ниски нива варира. Антитяломедиираната намалена биоактивност е вариращ феномен и не съществува във вида „всичко или нищо“. Една трета от пациентите с ниски нива имат пълен биологичен отговор, една трета – частичен и една трета – никакъв (166).

Управлението на пациентите с множествена склероза е предизвикателство, но и отговорност. Ако споделим убежденията на някои автори, основани на наблюденията, за по-високата активност на заболяването при наличието на антитела дори след спиране на интерфероновата терапия, то навременната смяна с по-подходящ, дори по-мощен, медикамент е задължителна (145). Данните са недостатъчни относно склонността на пациентите към антитялообразуване и към други биологични продукти. Дали изборът на следващата терапевтична стратегия трябва да бъде повлиян от серологичния статус при интерфероновото лечение, е тема на следващи анализи.

7. Антилекарствени антитела срещу интерферон-бета в юношеска възраст

В контекста на предимствата от ранното започване на лечението болните с МС в детска и юношеска възраст (3 – 10% от цялата популация с МС) също трябва да получат достъп до адекватна терапия. При 97% от тях е налице пристъпно-ремитентна форма на болестта. Годишната честота на пристъпите в първите три години от заболяването е 2 – 3 пъти по-висока от тази при възрастните (29). Освен двигателните и другите физически симптоми, 30 – 40% от децата развиват когнитивни нарушения рано в хода на болестта. Съществуват много ясни предпоставки, че модифициращите хода на заболяването медикаменти са от полза в детско-юношеската популация: ходът на болестта е пристъпен в почти всички случаи, честотата на пристъпите е по-висока в началото на болестта; честотата на пристъпите се свързва с лоша прогноза; прогресията е по-бавна в сравнение с възрастните, но достигането до умерена или тежка инвалидизация се случва по-рано; времето на промяна от умерена към тежка инвалидност е кратко (средно 7 години) в сравнение с времето за достигане на умерена инвалидност (средно 17 години); чести са когнитивните нарушения. Съществуват много доказателства, че интерфероните са безопасни, добре поносими и ефективни преди 18-годишна възраст (170). Както и при възрастните, възприетите критерии за оценка на лечението са: честотата на пристъпите, активността, показана чрез МРТ, и прогресията на инвалидизацията (186).

За наличие на антиинтерферонови антитела е изследвана група от 11 юноши, провеждащи лечение с IFNβ. Пациентите са провели лечение с давност най-малко 18 месеца. Допуснати до анализ са и пациенти, прилагащи имуноглобулини като съпътстваща терапия към IFNβ. Нито един не е приемал имуносупресивна 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 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 като при възрастните – двустъпков имуноанализ. Само BAb положителните серуми, установени с метода ELISA, са скринирани за наличие на NAb чрез

луцифераразагенерирана биолуминисценция. Дефиницията и прагът за позитивност са същите, както при възрастната популация. Като праг (cut-off) за BAbs позитивност са възприети > 50 BTU, а за NAb позитивност – < 1 LU/ml. Средната възраст на пациентите в момента на изследването е 16,7 години. При нито един от пациентите не е открита фамилна обремененост по отношение на МС. Средната продължителност на заболяването е 3,9 години (1,5 – 12). В общата група преобладават момичетата – 63,6%. Оценката по скалата EDSS е в диапазона от 1,5 до 6,0. Десет от единадесет са BAb 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. Повечето описани групи при обсервационни наблюдения също са малобройни поради липса на разрешение за употреба на интерфероновите продукти под 16-годишна възраст. За разлика от единственото намерено от нас в литературата съобщение от 2009 г. (на годишната среща на Детското неврологично дружество в Луисвил, Кентъки, САЩ) за много по-ниска честота на NAb(+) при юноши, отколкото при възрастни (185), 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 (146) и въпреки че тези лечения могат да участват в елиминирането на циркулиращите NAb (полезен ефект), не се очаква продукцията им да бъде възпрепятствана, след като веднъж е започнала. Това се потвърждава от получените резултати – еднакъв брой измежду лекуващите се с IVIG са позитивни и негативни на неутрализиращи антитела.

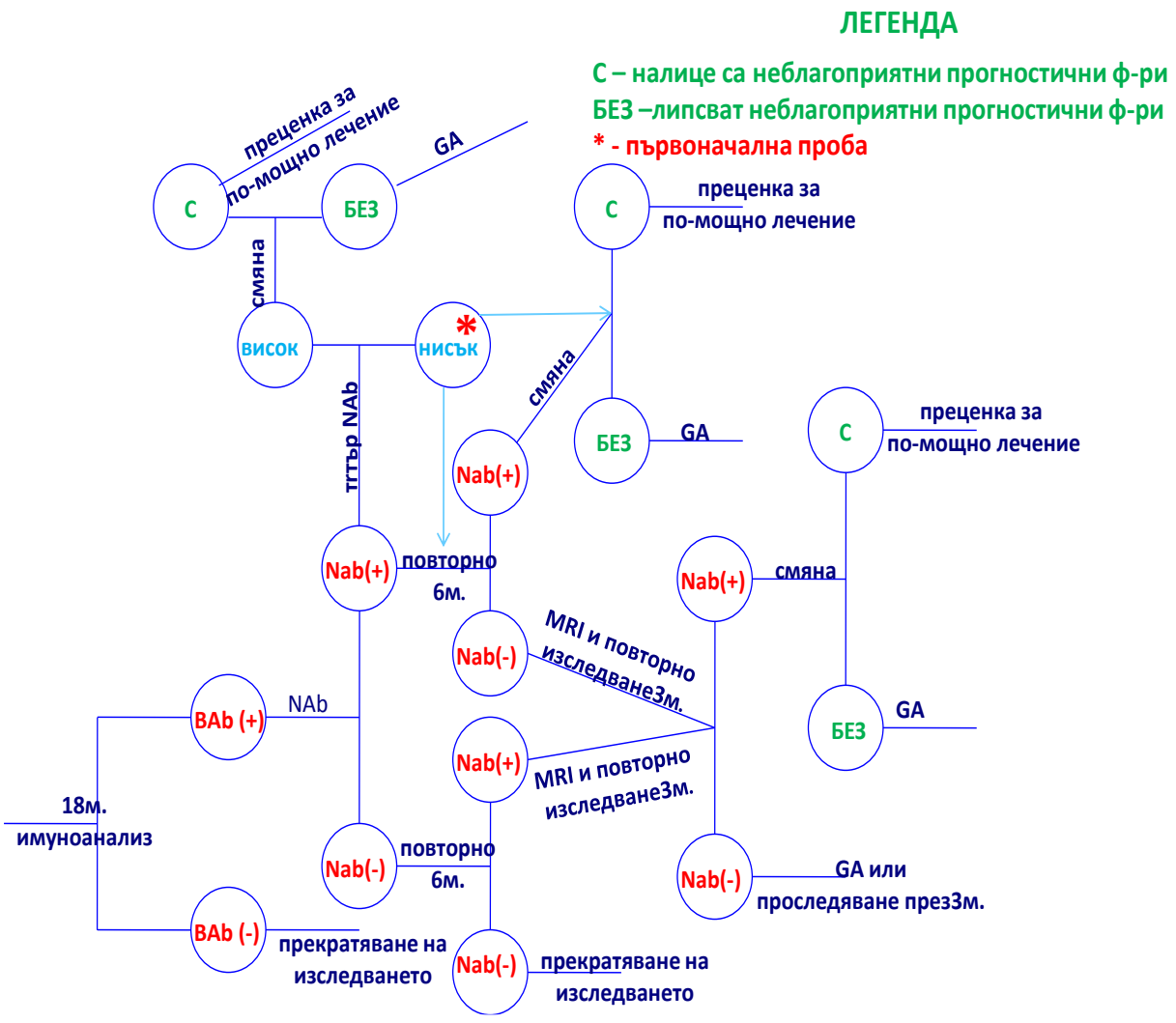
Въпреки че анализът е върху нерепрезентативна извадка в юношеска възраст, може да се обобщи, че както и при възрастните, наличието на NAb не се свързва с влошена безопасност. И тук се установява обратна корелация между общите грипоподобни оплаквания и NAb статуса на пациентите. Най-вероятно имунната реактивност в детско-юношеската възраст е по-различна, което обуславя както по-активното заболяване (по клинична и МРТ характеристика), така и по-често срещаното образуване на антитела. Повечето от одобрените при възрастни

имуномодулиращи терапии от втора линия при лица под 18 години са в процес на изпитване. Евентуалното одобрение на медикаменти с по-мощен ефект и различни механизми на действие ще запълни една голяма празнина в терапевтичния арсенал на МС в тази възрастова група.

8. Алгоритъм за приложение в практиката

Данните от литературния обзор и резултатите от собственото проучване, подкрепящи използването на NAbs 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 41. Алгоритъм



VIII. ИЗВОДИ

1. В изследваната кохорта всички пациенти са с пристъпна форма на множествена склероза. При 45,8% от тях е установен BAb(+) статус.

2. NAb позитивни са 28,2% от BAb позитивните пациенти и 12,8% от всички включени в извадката. Това потвърждава значимостта на изследването за BAb чрез двустъпков имуноанализ като скриниращ метод.

3. Разпределението на NAb позитивните проби по лекарствени продукти потвърждава данните за по-изразена имуногенност на IFNβ-1b. Най-висока е имуногенността на IFNβ-1b за подкожно приложение, следван от IFNβ-1a за подкожно приложение и IFNβ-1a за мускулно приложение.

4. Резултатите от нашето проучване потвърждават негативния ефект на NAb статуса върху клиничната ефективност на IFNβ. 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 интерферонови медикаменти, включително и по-слабо имуногенните.

6. При пациенти, които са NAb(+), се наблюдава сигнификантно по-висока средна стойност на BAb. Титърът на BAb може да бъде предиктор за възникването на NAb. Макар и с известна предпазливост, титърът на BAb може да се разглежда като прогностичен маркер.

7. Своевременното изследване за антилекарствени антитела може да служи като инструмент за идентифициране на имунофармакологични нонреспондери преди клиничната изява на субтерапевтичност, което позволява навременно превключване към по-рационална терапия.

8. Свързващите и неутрализиращите антитела нямат отношение към безопасността на интерфероновите медикаменти.

9. Не е установена връзка между антитялообразуването и възрастта и пола на пациентите.

10. Не е ясно дали и в каква степен NAb имат отношение към блокирането на ендогенния интерферон.

11. Налице е обратнопропорционална зависимост между честотата на системните нежелани реакции и антитялообразуването. Изявата на нежелани реакции може да служи за предиктор на антитялообразуването и парадоксално означава, че е добре лечението да продължи.

12. При пушачите е налице повишен риск от възникване на NAb.

13. Образуването на антиинтерферон неутрализиращи антитела е по-често в юношеска в сравнение със зрялата възраст.

IX. ПРИНОСИ

1. Приноси с оригинален характер:

1. За първи път е проведено изследване на имуногенността на различни интерферонови медикаменти сред българската популация пациенти с множествена склероза.

2. Извършено е клинико-имунологично изследване за оценка на наличието на антилекарствени антитела и въздействието им върху клиничния ефект на интерферон-бета.

3. 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.

4. 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:

1. Направена е ретроспективна оценка на клиничния ефект от приложението на интерферон-бета при хетерогенна по отношение на продължителността на лечението група пациенти с МС.

2. 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:

1. Предложен е алгоритъм за мониториране на терапията, включващ проактивно ранно изследване на антилекарствени антитела – акцентиране на ролята на NAb като прогностичен терапевтичен биомаркер, а не като причина за неефикасност.

2. Резултатът от теста за неутрализиращи антитела срещу IFNβ има значение за избора на последваща терапевтична стратегия.

X. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Георгиев, Д. Множествена склероза и други демиелинизиращи заболявания. В: Неврология, Клинична неврология, том II. Янчева, Ст., ред. София, Знание ЕООД, 2000.

2. Миланов, И. Множествена склероза. София, Медицина и физкултура, 2014, с. 319.

3. Топалов, Н. Клинико-епидемиологично проучване на множествена склероза в България – дисертационен труд, София, 1999, с. 190.

4. Aarskog, N.K., Maroy, T., Myhr, K.M., Vedeler, C.A. Antibodies against interferon-beta in multiple sclerosis. Journal of Neuroimmunology, 2009, 212, 1-2, 148-150.

5. Antonelli, G., Giannelli, G., Currenti, M., et al. Antibodies to interferon (IFN) in hepatitis C patients relapsing while continuing recombinant IFN-alpha2 therapy. Clin Exp Immunol, 1996, 104, 384-387.

6. Arnon, R., Sela, M. Immunomodulation by the copolymer glatiramer acetate. J Mol Recognit, 2003, 16, 412-21.

7. Balashov, K.E., Rottman, J.B., Weiner, H.L., Hancock, W.W. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. Proc Natl Acad Sci USA. 1999, 8, 96, 12, 6873-6878.

8. Bansil, S., Singhal, B.S., Ahuja, G.K., et al. Comparison between multiple sclerosis in India and United States: A case – control study. Neurology, 1996, 46, 2, 385-387.

9. Baranzuni, S., Wang, J., Gilbson, R., et al. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. Human Molecular Genetics, 2009, 18, 4, 767-778.

10. Bell, C., Graham, J.U., Earnshaw, S., Oleen-Burkey, M., et al. Cost-effectiveness of four immunomodulatory therapies for relapsing-remitting multiple

sclerosis: A Markov model, based on long-term clinical data. J Manag Care Pharm, 2007, 13, 245-261.

11. Bellomi, F., Bramani, P., Trojano, M., Scagnolari, C., Muto, A., Sessa, E., et al. Neutralizing and binding antibodies to interferon betain patients with multiple sclerosis: A comparison of assay results from three Italian Centers. J Immunoassay Immunochem, 2009, 30, 40-50.

12. Bellomi, F., Scagolari, C., Tomassini, V., et al. Fate of neutralizing and binding antibodies to INF beta in MS patients treated with INFβ for 6 years. J Neurol Sci, 2003, 215, 1-2, 3-8.

13. Bendszen, K., Anti-INF BAb antibodies: a minireview. Neurology, 2003, 61, 9 Suppl 5, S6-S10.

14. Bendtzen, K., Hansen, M.B., Ross, C., Svenson, M. Detection of autoantibodies to cytokines. Mol Biotechnol, 2000, 14, 3, 251-261.

15. Bertolotto, A., Malucchi, S., Sala, A., et al. Differential effects of three interferon betas onneutralising antibodies in patients with multiple sclerosis: A follow-up study in an independent laboratory. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2002, 73, 2, 148-153.

16. Bertolotto, A., Gilli, F., Sala, A., et al. Persistent neutralizing antibodies abolish the interferon beta bioactivity in multiple sclerosis. Neurology, 2003, 60, 4, 634-639.

17. Bertolotto, A., Sala, A., Caldano, M., et al. Development and validation of a real time PCR-based bioassay for quantification of neutralizing antibodies against human interferon-beta. J Immunol Methods, 2007, 321, 1-2, 19-31.

18. Bezzi, P., Voltera, A. A neuron-glia signalling network in the active brain. Curr Opin Neurobiol, 2001, 11, 387-394.

19. Borden, E.C., Wadler, S. Interferons as biochemical modulators. J Clin Oncol, 1996, 14, 10, 2627-2630.

20. Bray, G.L., Gomperts, E.D., Courter S., et al. A multicenter study of recombinant factor VIII (recombinate): safety, efficacy, and inhibitor risk in previously untreated patients with hemophilia A. The Recombinate Study Group. Blood, 1994, 83, 2428-2435.

21. Brenner, T., Arnon, R., Sela, M., Abramsky, O., Meiner, Z., Riven-Kreitman, R., Tarcik, N., Teitelbaum, D. Humoral and cellular immune responses to Copolymer 1 in multiple sclerosis patients treated with Copaxone. J Neuroimmunol, 2001, 2, 115, 1-2, 152-160.

22. British Isles survey of multiple sclerosis in twins. Neurology, 1994, 44, 11-15.

23. Brook, R.H. Appropriateness of care: the new frontier. BJM, 1994, 308, 218-219.

24. Calabresi, P.A., Giovannoti, G., Confavrex, C., Galetta, S.L., Havrdova, E., Hutchinson, M., et al. The incidence and significanceof antinatalizumab antibodies: results from AFFIRM and SEMTINEL. Neurology, 2007, 69, 1391-1403.

25. Calabresi, P.A., Wilterdink, J.K., Rogg, J.M., Mills, P., Webb, A., Whartenby, K.A. An open-label trial of combination therapy with interferon-beta-1a and oral methotrexate in MS. Neurology, 2002, 58, 2, 314-317.

26. Calavresi, P.A., Kieseier, B.C., Arnold, D.L., et al. Pegylated interferon β-1a for relapsing-remitting multiple sclerosis (ADVANCE): a randomized, phase 3, double blind study. Lancet Neurology, 2014, 13, 657-665.

27. Capra, R., Sottini, A., Cordioli, C., et al. INF-beta bioactivity in multiple sclerosis patients: MxA versus antibody-detecting assay. J Neuroimmunol, 2007, 189, 1-2, 102-110.

28. Casadevall, N., Nataf, J., Viron, B., et al. Pure red-cell aplasia and antierythropoetin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. N Engl J Med, 2002, 346, 469-475.

29. Chitnis, T., Glanz, B., Jaffin, S., Healy, B. Demographics of pediatric-onset multiple sclerosis in an MS center population from the Northeastern United States. Mult Scler, 2009, 15, 5, 627-631.

30. Chofflon, M. Mechanisms of action for treatments in multiple sclerosis: Does a heterogeneous disease demand a multi-targeted therapeutic approach? BioDrugs, 2005, 19, 299-308.

31. Clanet, M., Radue, E.W., Kappos, L., et al. A randomized, double-blind, dose-comparison study of weekly interferon beta-1a in relapsing MS. Neurology, 2002, Nov 26, 59, 10, 1507-1517.

32. Cohen, B., Oger, J., Gagnon, A., Giovannonni, G. The implication of immunogenicity for protein-based multiple sclerosis therapies. J Neurol Sci, 2008; 15, 7-17.

33. Coles, A., Twyman, C., Arnold, D., Cohen, J., et al. Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. The Lancet, 2012, 24, 380, 1829-1839.

34. Compston, A., Coles, A. Multiple sclerosis. Lancet, 2008, 372, 1502-1517.

35. Confavreux, C., Vukusic, S., Moreau, T., Adeleine, P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. N Engl J Med, 2000, 343, 1430-1438.

36. Cook, S.D., Quinless, J.R., Jotkowitz, A., Beaton, P. Serum INF neutralizing antibodies and neopterin levels in a cross-section of MS patients. Neurology, 2001, 57, 6, 1080-1084.

37. De Rager, P. International MS Genetic Consortium. The Genomic map of multiple sclerosis: over 45 novel and translation of genetics to biology. Mult Scler, 2014, 20(S), 498-499.

38. Deisenhammer, F., Mayringer, I., Harvey, J., et al. A comparative study of the relative bioavailability of different interferon beta preparations. Neurology, 2000, 54, 2055-2060.

39. Deisenhammer, F., Reindl, M., Harvey, J., Gasse, T., Dilitz, E., Berger, T. Bioavailability of interferon beta 1b in MS patients with and without neutralizing antibodies. Neurology, 1999, 12, 52, 6, 1239-1243.

40. Deisenhammer, F. Neutralizing antibodies to interferon-beta and other immunological treatments for multiple sclerosis: prevalence and impact on outcomes. CNS Drugs, 2009, 23, 5, 379-396.

41. Duquette P., Girard M., Dubois R., et al. Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b: experience during the first three years. Neurology, 1996, 47, 4889-4894.

42. Duquette, P., Girard, M., Duspault, L., et al. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis – clinical results of multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Neurology, 1993, 43, 4, 655-661.

43. Durelli, L., Ricci, A. Anti-interferon antibodies in multiple sclerosis. Molecular basis and their impact on clinical efficacy. Front Biosci, 2004, 9, 2192-2204.

44. Durelli, L., Verdun, E., Barbero, P., et al. Every-other-day interferon beta-1b versus once-weekly interferon beta-1a for multiple sclerosis: results of a 2-year prospective randomized multicentre study (IMCOME). Lancet, 2002, 359, 9316, 1453-1460.

45. Dyment, D.A., Sadovnick, A.D., Ebers, G.C. Genetics of multiple sclerosis. Hum Mol Genet, 1997, 6, 1693-1698.

46. Elian, M., Nightingale, S., Dean, G. Multiple sclerosis among United Kingdom-born children of immigrants from the Indian subcontinent, Africa and the West Indies. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1990, Oct, 53, 10, 906-911.

47. European Study Group on interferon beta-1b in secondary progressive MS. Placebo-controlled multicentre randomized trial of interferon beta-1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis. Lancet, 1998, 352, 9139, 1491-1497.

48. Farez, M.F., Fiol, M.P., Gaitan, M.I., et al. Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2015, 86, 26-31.

49. Farrell, R., Bendtzen, K., Bertolotto, A., Clark, B., Comabella, M., Deisenhammer F., Fogdell-Hahn, A., Giovannoni, G., Hartung, H.P., Hemmer, B., Hillert, J., Kappos, L., Killestein, J., Lindberg, R., Montalban, X., Polman, C., Sorensen, P.S. European NABINMS Consortium Neutralizing antibodies to interferon beta-1b are not associated with disease worsening in multiple sclerosis. J Int Med Res., 2008, 36, 1, 204-208.

50. Farrell, R., Kapoor, R., Leary, S.M., et al. Neutralizing anti-interferon antibodies are associated with reduced side effect and delayed impact on efficacy of Interferon-beta. Mult Scler, 2008, 14, 2, 212-218.

51. Fernandez, O., Guerrero, M., Mayorga, C., et al. Combination therapy with interferon-beta-1b and azathioprine in secondary progressive multiple sclerosis. A two-year pilot study. J Neurol, 2002, 249, 8, 1058-1062.

52. Fineberg, S.E., Galloway, J.A., Fineberg, N.S., Rathbun, M.J., Hufferd, S. Immunogenicity of recombinant DNA human insulin. Diabetologia, 1983, 25, 6, 465-469.

53. Fox, E., Green, B., et al. The effect of scheduled antibody testing on treatment pattern in interferon-treated patients with multiple sclerosis. BMC Neurol, 2014, 4, 14-73.

54. Fox, E.J., Vartanian, T.K., Zamvil, S.S. The immunogenicity of disease-modifying therapies for multiple sclerosis: clinical implication for neurologists. Neurologist, 2007, 13, 355-362.

55. Francis, G.S., Rice, G.P., Alsop, J.C. Interferon beta-1a in MS: results following development of neutralizing antibodies in PRISMS. Neurology, 2005, 12, 65, 1, 48-55.

56. Freedman, M.S., Francis, G.S., Sanders, E.A., et al. Randomized study of once-weekly interferon beta-1a therapy in relapsing multiple sclerosis: three years' data from OWIMS study. Mult Scler, 2005, 11, 11, 41-45.

57. Freedman, M.S., Selene, D., Arnold, D.L., et al. Canadian Multiple Sclerosis Working Group updated recommendation. Can J Neurol Sci., 2013, 40, 307-323.

58. Freeman, J.A., Langdon, D.W., Hobart, J.C., Thompson, AJ. The impact of inpatient rehabilitation on progressive multiple sclerosis. Ann Neurol, 1997, 42, 2, 236-244.

59. Friedman, J.E., Zabriskie, J., Bourgansaia, E. A pilot study of pentoxifylline in multiple sclerosis. Arch Neurol, 1996, 53, 10, 956-957.

60. Fuchs, V.R. The doctor's dilemma – what is "appropriate" care. NEJM, 2011, 365, 7, 585-587.

61. Gale, C.R., Martyn, C.N. Migrant studies in multiple sclerosis. Prog Neurobiol, 1995, 47, 4-5, 425-448.

62. Garg, N., Weinstock-Gutttman, B., Bhasi, K., Locke, J., Ramanathan, M. An association between autoreactive antibodies and anti-interferon-beta antibodies in Multiple sclerosis. Mult Scler, 2007, 13, 7, 895-899.

63. Geneiss, C., Tripp, P., Reichartseder, F., et al. Differing immunogenic potentialsof interferon beta preparations in multiple sclerosis patients. Mult Scler, 2006, 12, 6, 731-737.

64. Gibbs, E., Oger, J. A biosensor-based characterization of the affinity maturation of theimmune response against interferon-beta and correlations with neutralizing antibodies in treating multiple sclerosis patients. J Interferon Cytokine Res, 2008, 28, 713-723.

65. Gilli, F., Hoffmann, F., Sala, A., et al. Qualitative and quantitative analysis of antibody response against interferon beta in patients with multiple sclerosis. Mult Scler, 2006, 12, 6, 738-746.

66. Gilli, F., Marnetti, F., Caldano, M., et al. Anti – interferon-beta neutralizing activity is not entirely mediated by antibodies. J Neuroimmunol, 2007, 192, 1-2, 198-205.

67. Gilli, F., Marnetto, F., Caldano, M., et al. Biological markers of interferon-beta therapy: comparison among interferon-stimulated genes MxA, TRAIL and XAF-1. Mult Scler, 2006, 12, 1, 47-57.

68. Gilli, F., Marnetto, F., Caldano, M., et al. Biological responsiveness to first injections of interferon-beta in patients with multiple sclerosis. J Neuroimmunol, 2005, 158, 1-2, 195-203.

69. Giovannoni, G., Barbarash, O., Casset-Semanaz, F., et al. Immunogenicity and tolerability of an investigational formulation of interferon-beta-1a: 24- and 48-week interim analyses of a 2-year, single-arm, historically controlled, phase IIIb study in adults with multiple sclerosis. Clin Ther, 2007, 29, 6, 1128-1145.

70. Giovannoni, G., Cutter, GR., Lunemann, J., et al. Infectious causes of multiple sclerosis. Lancet Neurol, 2006, 5, 10, 887-894.

71. Giovannoni, G., Barbarash, O., Casset-Semanaz, F., King, J., Metz, L., Pardo, G., et al. Safety and immunogenicity of new formulation in interferon b-1a (Rebif® New Formulation) in phase IIIb study in patient with relapsing multiple sclerosis: 96-week results. Mult Scler, 2009, 15, 219-228.

72. Giovannoni, G., Goodman, A. Neutralizing anti-IFN-beta antibodies: how much more evidence do we need to use them in practice? Neurology, 2005, 65, 1, 6-8.

73. Gneiss, C., Brugger, M., Milloning, A., et al. Comparative study of four different assays for four different assay for detection of binding antibodies against interferon-beta. Mult Scler, 2008, 14, 6, 830-836.

74. Gneiss, C., Reidl, M., Lutterotti, A., et al. Interferon-beta: the neutralizing antibodies (NAb) titre predicts reversion to NAb negativity. Mult Scler, 2004, 10, 5, 507-510.

75. Gneiss, C., Tripp, P., Ehling, R., et al. Interferon-beta antibodies have a higher affinity in patient with neutralizing antibodies compared to patients with non-neutralizing antibodies. J Neuroimmunol, 2006, 174, 1-2, 174-179.

76. Goldberg, L.D., Edwards, N.C., Fincher, C., Doan, Q.V., Al-Sabbagh, A., Meletiche, D.M. Comparing the cost-effectiveness of disease-modifying drugs for the first-line treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. J Manag Care Pharm, 2009, 15, 7, 543-555.

77. Goodin, D.S., Frohman, E.M., Hurwitz, B., et al. Neutralizing antibodies to interferon beta: assessment of the clinical and radiographic impact: an evidence report: Report of the therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology, 2007, 68, 13, 977-984.

78. Goschel, H., Wohlfarth, K., Frevert, J., Dengler, R., Bigalke, H. Botulinum. A toxin therapy: neutralizing and non-neutralizing antibodies-therapeutic consequences. Exp Neurol, 1997, 147, 1, 96-102.

79. Grossberg, S.E., Kawabe, T., Kohase, M., Yokoyama, H., Finter, N. The neutralization of interferons by antibody. I. Quantitative and theoretical analyses of the neutralization reaction in different bioassay systems. J interferon Cytokine Res, 2001, 21, 9, 729-742.

80. Grossberg, S.E., Kawade, Y., Grossberg, L.D. The neutralization of interferones by antibody III. The constant antibody bioassay, a highly sensitive quantitative detector of low antibodies level. J Interferon Cytokine Res, 2009, 29, 93-104.

81. Hafler, D.A., Compston, A., Sawcer, S., et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. N Engl J Med, 2007, 357, 851-862.

82. Hartung, H.P., Munschauer, F.E. 3rd. Assessment and management of neutralizing antibodies in patients with multiple sclerosis. J Neurol, 2004, 251, Suppl 2:II40-2.

83. Hegen, H., Milloning, A., Bertolotto, A. Early detection of NAb to IFN in MS patients: binding antibodies predict neutralizing antibody development. Mult Scler, 2014, 20, 577-587.

84. Hellwing, K., Schimrigk, S., Fischer, M., et al. Allergic and non-allergic delayed infusion reactions during natalizumab therapy. Arch Neurol, 2008, 65, 5, 656-658.

85. Herndon, R.M., Rudick, R.A., Munschauer, FE., et al. Eight-year immunogenicity and safety of interferon beta-1a–Avonex treatment in patients with multiple sclerosis. Mult Scler, 2005, 11, 11, 409-419.

86. Hesse, D., Frederiksen, J.L., Koch-Henriksen, N., et al. Methylprednisolone in multiple sclerosis patients with neutralizing antibodies against interferon-beta. Eur J Neurol, 2009, 16, 1, 43-47.

87. Hesse, D., Krakauer, M., Lund, H., et al. Disease protection and interleukin-10 induction by endogenous interferon-beta in multiple sclerosis? Eur J Neurol, 2011, 18, 2, 266-272.

88. Hesse, D., Sellebjerg, F., Sorensen, P.S. Absence of MxA induction by interferon beta in patients with MS reflects complete loss of bioactivity. Neurology, 2009, 73, 5, 372-377.

89. Hoffmann, S., Cepok, S., Grummel, V., Lehmann-Horn, K., Hackermuller, J., Stadler, PF., Hartung, H., et al. HLA-DRB1*0401 and HLA-DRB1*0408 are strongly associated with the development of antibodies against interferon-b therapy in multiple sclerosis. Am J Hum Genet, 2008, 83, 219.

90. INF Multiple Sclerosis Study Group and the UBC MS/MRI Analysis Group. Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b: Experience during the first three years, Neurology, 1996, 47, 889-894.

91. Jacobs, L.D., Cookfair, D.L., Rudick, R.D., et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG), Ann Neurol, 1996, 39, 3, 285-294.

92. Jansen, P.E., Sellebjerg, F., Søndergaard, H.B., Sørensen, P.S. Correlation between anti-interferon-β binding and neutralizing antibodies in interferon-β-treated multiple sclerosis patients. Eur J Neurol, 2012, 19, 1311-1312.

93. Kahana, E., Zilber, N., Abramson, J.H., Biton, V., Leibowitz, Y., Abramsky O. Multiple sclerosis: genetic versus environmental aetiology: epidemiology in Israel updated. J Neurol, 1994, 241, 341-346.

94. Kappos, L., Freedman, M.S., Polman, C.H., et al. Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. Lancet, 2007, 370, 389-397.

95. Kawade, Y. Quantitation of neutralization of interferon by antibody. Methods Enzymo, 1986, 119, 558-573.

96. Khan, O.A., Dhib-Jalbut, S.S. Serum interferon beta-1a (Avonex) levels in multiple sclerosis patient following subcutaneous administration. Neurology, 1996, 46, 1639-1643.

97. Kob, M., Harvey, J., Schautzer, F., et al. A novel and rapid assay for detection of neutralizing antibodies against interferon-beta. Mult Scler, 2003, 9, 1, 32-35.

98. Kolev, O., Kenarov, P. Vestibular and ocular motor function prior to and after therapeutic apheresis with small plasmafilter in multiple sclerosis. Journal of Clinical Apheresis, 2015, 1-3.

99. Kurtzke, J.F. Epidemiology and etiology of multiple sclerosis. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2005, 16, 327-349.

100. Lam, R., Farrell, R., Aziz, T., et al. Validating parameters of a luciferase receptor gene assay to measure neutralizing antibodies to INFβ in multiple sclerosis patients. J Immunol Methods, 2008, 336, 2, 113-118.

101. Larocca, A.P., Leung, S.C., Marcus, S.G., Colby, C.B., Borden, E.C. Evaluation of neutralizing antibodies in patient treated with recombinant interferon-beta ser. J Interferone Res, 1989, 9 Suppl 1, 51-60.

102. Lassman, H., Ransohoff, R.M. The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a crucial re-appraisal. Trends Immunol, 2004, 25, 3, 132-137.

103. Lopez-Soriano, A., Zivadinov, R., Neuroimaging of multiple sclerosis. In Minagar A. Neuroinflammation. Elsevier, Burlington, MA, 2010, Chapter 5, 81-105.

104. Lubin, F.D., Reingold, SC., Cohen, J.A., et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. Neurology, 2013, 83, 278-286.

105. Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. Ann Neurol, 2000, 47, 6, 707-717.

106. Lucchinetti, C.F., Popescu, B.F., Bunyan, R.F., et al. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. N. Engl J Med., 2011, 365, 2188-2197.

107. Lundkvist, M., Greiner, E., Hiller, J., Fogdell-Hahn, A. Multiple sclerosis patient lacking oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid are less likely to develop neutralizing antibodies against interferon-beta. Mult Scler, 2010, 16, 7, 796-800.

108. Malucchi, S., Capobianco, M., Gilli, F., et al. Fate of multiple sclerosis patients positive for neutralizing antibodies towards interferon-beta shifted to alternative treatments. Neurol Sci, 2005, 26 Suppl, 4, 213-214.

109. McKay, F., Schibeci, S., Heard, R., Stwart, G., Booth, D. Analysis of neutralizing antibodies to therapeutic interferon-beta in multiple sclerosis patient: a comparison of three methods in a large Australasian cohort. J Immunol Methods, 2006, 310, 1-2, 20-29.

110. Mikol, D.D., Barkhof, F., Chang, P., et al. Comparison of subcutaneous interferon beta-1a with glatiramer acetate in patients with relapsing multiple sclerosis (the Rebif vs. Glatiramer Acetate in Relapsing MS Disease [REGARD] study): a multicentre,randomised, parallel, open-label trial. Lancet Neurol, 2008, 7, 903-914.

111. Milloning, A., Rudzki, D., Holzl, M., et al. High-dose intravenous interferon beta in patients with neutralizing antibodies (HINABS): A pilot study. Mult Scler, 2009, 15, 8, 977-983.

112. Milo, R., Kahana, E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. Autoimmun Rev, 2010, 9, 387-394.

113. Minagara, A., Murray, T.J. Efficacy and tolerability of intramuscular interferon beta-1a compared with subcutaneous interferon beta-1a in relapsing MS: results from PROOF. Curr Med Res Opin, 2008, 24, 4, 1049-1055.

114. Multiple Sclerosis CollaborativeResearch Group (MSCRG). Incidence and significance of neutralizing antibodies to interferon beta-1a in multiple sclerosis. Neurology, 1998, 50, 1266-1272.

115. Mumford, C.J., Wood, N.W., Kellar-Wood, H., Thorpe, J.W., Miller, D.H., Compston, D.A. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. Neurology, 1994, 44, 11-15.

116. Oger, J., Francis, G., Chang, P. Prospective assessment of changing from placebo to IFN beta-1a in relapsing MS: The PRISMS study. J Neurol Sci, 2005, Oct 15, 237, 1-2, 45-52.

117. Olerup, O., Hillert, J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis:a critical evaluation. Tissue Antigens, 1991, 38, 1-15.

118. Pacher, A., Narayan, L., Price, N., Hurd, M., Dail, D. MxA gene expression analysis as an interferon-beta bioactivity measurement in patients with multiple sclerosis and the identification of antibody-mediated diseased bioactivity. Mol Diagn, 2003, 7, 1, 17-25.

119. Pachner, A., Narayan, K., et al. Multiplex analysis of expression of three INFβ-induced genes in antibody-positive MS patients. Neurology, 2006, 66, 3, 444-446.

120. Pachner, A., Bortolotto, A., Deisenhammer, F. Measurement of MxA mRNA or protein as a biomarker of INFβ bioactivity: detection of antibody-mediated decreased bioactivity (ADB). Neurology, 2003, 61, 9 Suppl 5, 24-26.

121. Pachner, A., Dail, D., Pak, E., Narayan, K. The importance of measuring IFNβ bioactivity: monitoring in MS patients and the effect of anti-INFβ antibodies. J Neuroimmunol, 2005, 166, 1-2, 180-188.

122. Pachner, R., Warth, J., Pace, A., Goelz, S. Effect of neutralizing antibodies on biomarker responses to interferon-beta: INSIGHT study. Neurology, 2009, 73, 18, 1493-1500.

123. Panitch, H., Goodin, D.S., Francis, G., et al. Randomized, comparative study of interferon beta-1a treatment regimens in MS: The EVIDENCE Trial. Neurology, 2002, Nov 26, 59, 10, 1496-1506.

124. Panitch, H., Miller, A., Paty, D., Weinshenker, B. Interferon beta-1b in secondary progressive MS: results from a 3-year controlled study. Neurology, 2004, 63, 10, 1788-1795.

125. Perini, P., Facchinetti, A., Bulian, P., et al. Interferon-beta (INF-beta) antibodies in interferon-beta-1a- and interferon-beta-1b-treated multiple sclerosis patients. Prevalence, kinetics, cross-reactivity, and factors enhancing interferon-beta immunogenicity in vivo. Eur Cytokine Netw, 2001, 12, 56-61.

126. Petersen, B., Bendtzen, K., Koch-Henriksen, N., Ravnborg, M., Ross, C., Sorensen, PS. Persistence of neutralizing antibodies after discontinuation of INFβ therapy in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Mult Scler, 2006, 12, 3, 247-252.

127. Peterson, J.W., B.o, L., Mork, S., Chang, A., Trapp, BD. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. Ann Neurol, 2001, Sep, 50, 3, 389-400.

128. Peterson, L.K., Fujinami, R.S. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. J Neuroimmunol, 2007, 184, 37-44.

129. Phillips, J.T., Rice, G., Frohman, E., et al. A multicentre, open-label, phase II study of the immunogenicity and safety of a new prefilled syringe (liquid)

formulation of Avonex inpatients with multiple sclerosis. Clin Ther, 2004, 26, 511-521.

130. Polman, C., Kappos, L., White, R., et al. Neutralizing antibodies during treatment of secondary progressive MS with interferon beta-1b. Neurology, 2003, 60, 37-40.

131. Polman, C.H., Bertolotto, A., Deisenhammer, F., et al. Recommendations for clinical use of data on neutralizing antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. Lancet Neurol, 2010, 9, 7, 740-750.

132. Pozzilli, C., Antonini, G., Bagnato, F., et al. Monthly corticosteroids decrease neutralizing antibodies to INFβ-1b: a randomized trial in multiple sclerosis. J Neurol, 2002, 249, 1, 50-56.

133. Prat, A., Antel, L. Pathogenesis of multiple sclerosis 2005. Curr Opin Neurol, 2005, 18, 225-230.

134. Randomized double-blind placebo-controlled study on interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis. PRIMS (Prevention of Relapse and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneous in Multiple sclerosis) Study Group. Lancet, 1998, 352, 9139, 1498-1504.

135. PRIMS Study Group and the UBC MS/MRI Analysis Group. PRIMS – 4: Long-term efficacy of interferone-beta-1a in relapsing MS. Neurology, 2001, 56, 1628-1636.

136. Prince, H.E., Lape-Nixon, M., Audette, C., Van, H.K. Identification of interferon-beta antibodies in a reference laboratory setting: Findings for 1144 consecutive sera. J Neuroimmunol, 2007, 190, 1-2, 165-169.

137. Pungor, E. Jr., Files, J.D., et al. A novel bioassay for determination of neutralizing antibodies to INF-beta-1b. J Interferon Cytokine Res, 1998, 18, 12, 32-35.

138. Ragonese, P., Aridon, P., Salemi, G., D'Amelio, M. and Savettieri, G. Mortality in multiple sclerosis: a review. Eur J Neurol, 2008, 15, 123-127.

139. Ravnborg, M., Bendtzen, K., Christensen, O., et al. Treatment with azathioprine and cyclic methylprednisolone has little or no effect on bioactivity in anti-interferon beta antibody-positive patients with multiple sclerosis. Mult Scler, 2009, 15, 3, 323-328.

140. Reindl, M., Khalil, M., Berger, T. Antibodies as biological markers for pathophysiological processes in MS. J Neuroimmunol, 2006, 180, 50-62.

141. Rice, G.P., Paszner, B., Oger, J., Lesaux, J., Paty, D., Ebers, G. The evolution of neutralizing antibodies in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b. Neurology, 1999, 52, 6, 1277-1279.

142. Ross, C., Clemmesen, K.M., Svenson, M., et al. Immunogenicity of interferon-beta in multiple sclerosis patients: influence of preparation, dosage, dose frequency, and route of administration. Danish Multiple Sclerosis Study Group. Ann Neurol, 2000, 48, 706.

143. Ross, C., Svenson, M., Clemmesen, K.M., Sorensen, P.S., Koch-Henriksen, N., Bendtzen, K. Measuring and evaluating interferon-beta-induced antibodies in patient with multiple sclerosis, 2006, 12, 39-46.

144. Rossman, H.S. Neutralizing antibodies to multiple sclerosis treatments. J Manag Care Pharm., 2004, 10, 3 Suppl B, S12-9.

145. Rovaris, M., Confavreux, C., Furlan, R., et al. Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. Lancet Neurol, 2006, 5, 343-354.

146. Rudick, R.A., Simonian, NA., Alam, J.A., et al. Incidence and significance of neutralizing antibodies to interferon-beta-1a in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). Neurology, 1998, 50, 5, 1266-1272.

147. Runkel, L., Meier, W., Pepinsky, R.B., et al. Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (INF-beta). Pharm Res, 1998, 15, 4, 641-649.

148. Salama, H.H., Hong, J., Zang, Y.C., et al. Blocking effect of serum reactive antibodies induced by glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis. Brain, 2003, 126, 2638-2647.

149. Santos, R., Weinstock-Guttman, B., Tomano-Blanco, M., et al. Dynamics of interferon-beta modulated mRNA biomarkers in multiple sclerosis patients with anti-interferon-beta neutralizing antibodies. J Neuroimmunol, 2006, 176, 1-2, 125-133.

150. Scagnolari, C., Duda, P., Bagnato, F., et al. Pharmacodynamics of interferon beta in multiple sclerosis patients with or without serum neutralizing antibodies. J Neurol, 2007, 254, 597-604.

151. Schellekens, H., Casadevall, N. Immunogenicity of recombinant human protein: causes and consequences. J Neurol, 2004, 231, Suppl 2, 114-119.

152. Schellekens, H. The immunogenicity of biopharmaceuticals. Neurology 2003, 61, 9 Suppl 5, S11.

153. Schellekens, H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1, 6, 457-462.

154. Sena, A., Bendtzen, K., Cascais, MJ., Pedrosa, R., Ferret-Sena, V., Campos, E. Influence of Apolipoprotein E plasma levels and tobacco smoking on the induction on neutralizing antibodies to interferon-beta. J Neurol, 2010, 257, 1703-1707.

155. Seventh WHO Informal Consultation on Standard for cytokines, growth factors and endocrinological substances. The National Institute for biological standards and control (NIBSC), UK. 20-21 October 2003. World Health Organization Quality Assurance and Safety of Biologicals, April 2004.

156. Smith, D.R., Balashov, K.E., Hafler, D.A., Khoury, S.J., Weiner, H.L. Immune deviation following pulse cyclophosphamide/methylprednisolone treatment of multiple sclerosis: increased interleukin-4 production and associated eosinophilia. Ann Neurol, 1997, 42, 3, 313-318.

157. Sominanda, A., Hillert, J., Fogdell-Hahn, A. In vivo bioactivity of interferon-beta in multiple sclerosis patients with neutralizing antibodies in titre-dependent. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2008, 79, 1, 57-62.

158. Sominanda, A., Rot, U., Suoniemi, M., Deisenhammer, F., Hiller, J.,Fogdell-Hahn, A. Interferon-beta preparation for the treatment of multiple sclerosis patient differ in neutralizing antibody seroprevalence and immunogenicity. Mult Scler, 2007, 13, 2, 208-214.

159. Sominanda, A., Hillert, J., Fogdell-Hahn, A. Neutralizing antibodies against interferon-beta: fluctuation is modest and titre dependent. Eur J Neurol, 2009, 18, 1, 21-28.

160. Somonanda, A., Lundkvist, M., Fogdell-Hahn, A., et al. Inhibition of endogenous interferon-beta by neutralizing antibodies against recombinant interferon beta. Arch Neurol, 2010, 67, 9, 1095-1101.

161. Sorensen, P.S., Deisenhammer, F., Duda, P., et al. Guidelines on use of anti-interferon beta antibody measurements in multiple sclerosis – Report of an EFNS Task Force on INF-beta antibodies in multiple sclerosis. Eur J Neurol, 2005, 12, 11, 817-827.

162. Sorensen, P.S., Koch-Henriksen, N., Bendtzen, K. Are ex vivo neutralizing antibodies against INFβ always detrimental to therapeutic efficacy in multiple sclerosis? Mult Scler, 2007, 13, 5, 616-621.

163. Sorensen, P.S., Koch-Henriksen, N., Ross, C., Clemmesen, K.M., Bendtzen, K. Appearance and disappearance of neutralizing antibodies during interferon-beta therapy. Neurology, 2005, 65, 1, 33-39.

164. Sorensen, P.S., Koch-Henriksen, N., Flachs, E., Bendtzen, K. Is the treatment effect of INFβ restored after the disappearance of neutralizing antibodies? Mult Scler, 2008, 14, 6, 837-842.

165. Sorensen, P.S., Ross, C., Clemmensen, K.M., et al. Clinical importance of neutralizing antibodies against interferon-beta in patient with relapsing-remitting multiple sclerosis Lancet, 2003, 362, 9391, 1184-1191.

166. Sorensen, P.S., Tschering, T., Mathiesen, HK., et al. Neutralizing antibodies hamper INF beta bioactivity and treatment effect on MRI in patients with MS. Neurol, 2006, 67, 9, 1681-1683.

167. Sormani, M.P., Rio, J., Tintore, M., et al. Scoring treatment response in patient with relapsing multiple sclerosis. Mult Scler., 2013, 19, 605-612.

168. Sospedra, M, Martin, R. Immunology of multiple sclerosis. Annu Rev Immunol, 2005, 23, 683-747.

169. SPECTRIMS Randomized controlled trial of interferone-beta-1a in secondary progressive MS: clinical results. Neurology, 2001, 56, 11, 1496-1504.

170. Chitnis T., Disease-Modifying Therapy of Pediatric Multiple Sclerosis. Neurotherapeutics, 2013, Volume 10, 89-96.

171. The IFNB Multiple sclerosis study group and the University of British Columbia MS/MRI analysis Group. Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b: experience during the first 3 years. Neurology, 1996, 47, 889-894.

172. Thomson, A.J., Miller, Dm., Toul, B., et al. Serial gadolinium-enhanced MRI in relapsing-remitting multiple sclerosis of varying disease duration. Neurology, 1992, 42, 60-63.

173. Trapp, B.D., Ransohoff, R., Rudick, R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. Curr Opin Neurol, 1999, 12, 295-302.

174. Tremlett, H., Zhao, Y., Joseph, J., Devonshire, V. Relapses in multiple sclerosis are age- and time-dependent. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2008, 79, 12, 1368-1374.

175. Ure, D.R., Rodriguez, M. Polyreactive antibodies to glatiramer acetate promote myelin repair in murine model of demyelinating disease. FASEB, J, 2002, 16, 1260-1262.

176. Vallbracht, A., Treuner, J., Flehmig, B., Joester, KE., Niethammer, D. Interferon-neutralizing antibodies in a patient treated with human fibroblast interferon. Nature, 1981, 289, 496-497.

177. Vallittu, A.M., Eralinna, J.P., Ilones, J., Salmi, A.A., Waris, M., et al. MxA protein assay for optimal monitoring of INFβ bioactivity in the treatment of MS patients. Acta Neurol Scand, 2007, 118, 12-17.

178. Van Der Voort, L.F., Gilli, F., Bertolotto, A., et. al. Clinical effect of neutralizing antibodies to interferon beta that persist long after cessation of therapy for multiple sclerosis. Arch Neurol, 2010, 67, 4, 402-407.

179. Vanderlugt, C.L., Miller, S.D. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. Nat Rev Immunol, 2002, 2, 85-95.

180. Vartanian, T.K., Zamvil, S.S., Fox, E., et al. Neutralizing antibodies to disease-modifying agents in the treatment of multiple sclerosis, 2004, 63, Suppl 5, S42-9.

181. Wandinger, K.P., Lunemann, JD., Wengert, O., et al. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. Lancet, 2003, 361, 9374, 2036-2043.

182. WHO Committee on Biological Standardization. Thirty-fifth report. World Health Organization Technical Report, Series 725. World Health Organization, Geneva; 1985.

183. Willer, C.J., Dyment, D.A., Risch, N.J., Sadovnick, A.D., Ebers, G.C. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100, 22, 12877-12882.

184. Wood, N.W., Sawcer, S.J., Kellar Wood, H.F., et al. The T-cell receptor beta locus and susceptibility to multiple sclerosis. Neurology, 1995, 45, 10, 1859-1863.

185. Yeh, E., Heim, R., Karpinski, M, Ray, J., Weinstock-Guttman, B. Neutralizing antibodies to interferon in children with MS on interferon treatment.

Presented at the Annual Meeting of the Child Neurology Society. October 14-17, 2009, Louisville, KY.

186. Yeh, E.A., Waubant, E., Krupp, L.B., Ness, J., Chitnis, T., Kuntz, N., et al. National Network of Pediatric MS Centres of Excellence. Multiple sclerosis therapies in pediatric patients with refractory multiple sclerosis. Arch Neurol., 2011, 68, 4, 437-44.

187. Zamvil, S.S., Steinman, L. Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. Neuron, 2003, 38, 685-688.

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, 1, 5-13.

2. Иванова, С., Миланов, И. Неутрализиращи антитела към имуномодулиращи терапии при множествена склероза – част II, Двигателни нарушения, 2014, 11, 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., Milanov, I., Skrobanska, R., Dimitrova, V., Bojinova, V. Luciferase assay to detect neutralizing antibodies in adolescent Bulgarian multiple sclerosis patient, treated with interferon beta. PP08.3 – 2856. European Journal of Paediatric Neurology, 2015, 19S, S60.

SUMMARY

Even though interferon-beta (IFNβ) 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 IFNβ binding (BAbs) and neutralizing antibodies (NAbs) against different formulation of IFNβ 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 IFNβ-1a, and 157 with IFNβ-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%. IFNβ-1b preparation are more immunogenic than IFNβ-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 NAbs 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 IFNβ. Because of inversely proportional relation we conclude that the lack of generalized side effects can be used to predict patients at risk of becoming 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 IFNβ.

We observed a small group with NAb titer. The majority of them had high titer; even the only patient, treated with IFNβ-1a, also had a high titre. Because of that result we do not suggest MS patient, treated with less immunogenic IFNβ-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.