

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

lek. med. Agnieszka Wencel – Warot

*Występowanie przeciwciał wiążących interferony beta
u chorych na stwardnienie rozsiane leczonych
immunomodulacyjnie*

Praca na stopień doktora nauk medycznych
z Katedry i Kliniki Neurologii
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu
Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. Wojciech Kozubski

Promotor: Prof. UM dr hab. Radosław Kaźmierski

Poznań 2011

Panu prof. dr. hab. Radosławowi Kaźmierskiemu

Za cenne rady merytoryczne oraz pomoc

przy realizacji niniejszej pracy

składam serdeczne podziękowania

Rodzinie...

SPIS TREŚCI

Objaśnienie skrótów.....	7
Spis tabel	9
Spis rycin	11
1. Wstęp.....	13
1.1 Informacje ogólne.....	13
1.2 Rys historyczny	13
1.3 Epidemiologia.....	16
1.4 Postacie kliniczne i naturalny przebieg SM	19
1.4.1 Postacie kliniczne stwardnienia rozsianego	19
1.4.2 Naturalny przebieg stwardnienia rozsianego i postęp niesprawności	20
1.5 Kryteria diagnostyczne.....	22
1.5.1 Kryteria diagnostyczne rzutowo-remisyjnej postaci SM	22
1.5.2 Kryteria diagnostyczne przewlekłe-postępującej postaci SM	24
1.6 Leczenie stwardnienia rozsianego	25
1.6.1 Leczenie modyfikujące przebieg choroby	25
1.6.1.1 Leczenie immunomodulujące	25
1.6.1.1a Informacje ogólne	25
1.6.1.1b Interferony beta	26
1.6.1.1c Octan glatirameru	29
1.6.1.2 Leczenie immunosupresyjne	30
1.6.1.3 Nowe terapie stwardnienia rozsianego	30
1.6.2 Skuteczność leczenia immunomodulującego	31
1.7 Występowanie przeciwciał przeciwko lekom stosowanym w stwardnieniu rozsianym	32
1.8 Założenia pracy	34
2. Cel pracy	36
3. Materiał i metody	37
3.1 Materiał	37
3.2 Metodyka	38
3.2.1 Oznaczenie poziomu przeciwciał wiążących interferon beta	39
3.2.2 Analiza statystyczna	41
4. Wyniki badań	42
4.1 Informacje ogólne	42
4.2 Charakterystyka grupy badanej	42
4.2.1 Płeć chorych	42
4.2.2 Wiek chorych	43
4.2.3 Średni czas trwania choroby	43
4.2.4 Sprawność ruchowa chorych oceniana w skali EDSS w momencie zakwalifikowania do leczenia immunomodulującego	44

4.2.5	Liczba rzutów choroby, które wystąpiły od początku zachorowania do momentu zakwalifikowania do leczenia immunomodulującego w grupach leczonych	44
4.3	Oznaczenia przeciwciał wiążących u pacjentów leczonych immunomodulacyjnie	45
4.3.1	Porównanie poziomów przeciwciał anti-Rebif w obydwu pobraniach (w chwili zakończenia terapii i w rok po jej zakończeniu)	45
4.3.2	Korelacje pomiędzy przeciwciałami wiążącymi w grupie pacjentów leczonych immunomodulacyjnie	46
4.3.2.1a	Korelacje pomiędzy poziomami przeciwciał wiążących w grupie pacjentów leczonych interferonem beta 1a (Rebif) – pobranie pierwsze (w chwili ukończenia terapii immunomodulującej)	47
4.3.2.1b	Korelacje pomiędzy poziomami przeciwciał wiążących w grupie pacjentów leczonych octanem glatirameru (Copaxone) - pobranie pierwsze (w chwili ukończenia terapii immunomodulującej)	49
4.3.2.2a	Korelacje pomiędzy poziomami przeciwciał wiążących w grupie pacjentów leczonych interferonem beta 1a (Rebif) – pobranie drugie (rok po zakończeniu terapii immunomodulującej)	51
4.3.2.2b	Korelacje pomiędzy poziomami przeciwciał wiążących w grupie pacjentów leczonych octanem glatirameru (Copaxone) – pobranie drugie (rok po zakończeniu terapii immunomodulującej)	53
4.4	Porównanie absorbancji próbek z przeciwciałami wiążącymi anti-Rebif w grupach pacjentów nieleczonych (grupy kontrolnej) i leczonych immunomodulacyjnie	55
4.4.1	Porównanie absorbancji próbek z przeciwciałami anti-Rebif u pacjentów leczonych i nieleczonych immunomodulacyjnie (z uwzględnieniem wyników pochodzących od 35 pacjentów nieleczonych)	56
4.4.2	Porównanie absorbancji próbek z przeciwciałami anti-Rebif u pacjentów leczonych i nieleczonych immunomodulacyjnie (z uwzględnieniem wyników pochodzących od 33 pacjentów nieleczonych po usunięciu 2 danych odstających).....	57
4.5	Korelacje absorbancji próbek badanych w kierunku obecności przeciwciał anti-Rebif, anti-Betaferon i anti-Avonex w grupie pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie	60
4.6	Związek między stanem klinicznym pacjentów i liczbą rzutów a poziomem przeciwciał wiążących anti-Rebif	62
4.6.1	Związek między stanem klinicznym wyrażonym w skali EDSS a poziomem przeciwciał anti-Rebif	62
4.6.2	Związek między liczbą rzutów a poziomem przeciwciał anti-Rebif	62

4.7	Ocena stanu klinicznego oraz liczby rzutów w trakcie i po zakończeniu terapii immunomodulującej	65
4.7.1	Analiza stanu niepełnosprawności wyrażonego w skali EDSS w trakcie terapii immunomodulującej oraz po jej zakończeniu	65
4.7.2	Liczba rzutów stwardnienia rozsianego w trakcie oraz po roku od zakończenia terapii immunomodulującej	69
4.7.3	Porównanie rocznego wskaźnika rzutów w trakcie i po zakończeniu terapii	70
5.	Dyskusja	71
5.1	Ogólna charakterystyka grupy badanej	71
5.2	Przeciwciała przeciwko interferonom	72
5.3	Reakcje krzyżowe przeciwciał przeciwko interferonom	76
5.4	Przeciwciała wiążące u pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie	77
5.5	Implikacje kliniczne obecności przeciwciał anty interferon beta	78
5.6	Stan kliniczny pacjentów po zakończeniu terapii immunomodulującej	80
5.7	Podsumowanie	82
6.	Wnioski	84
7.	Aneks	85
7.1	Skala EDSS	85
7.2	Związek między stanem klinicznym pacjentów a poziomem przeciwciał wiążących anty-Rebif	86
7.3	Przykładowe krzywe kalibracyjne z oznaczeń przeciwciał	88
8.	Streszczenie / Summary.....	89
8.1	Streszczenie	89
8.2	Summary	92
9.	Piśmiennictwo	95

OBJAŚNIENIE SKRÓTÓW

- ACA - ang. affinity chromatography assay
- ADEM - ang. acute disseminated encephalomyelitis - ostre rozsiane demielinizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia
- AU - ang. Arbitrary Units – jednostki arbitralne
- BAbs - ang. binding antibodies - przeciwciała wiążące
- BDNF - ang. brain-derived neurotrophic factor – czynniki neurotroficzne pochodzenia mózgowego
- CI - ang. confidence interval – przedział ufności (95% CI- 95% przedział ufności)
- EAE- ang. experimental autoimmune encephalomyelitis - doświadczalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia
- EDSS - ang. Expanded Disability Status Scale - Rozszerzona Skala Niepełnosprawności
- EFNS - ang. European Federation of Neurological Societies – Europejska Federacja Towarzystw Neurologicznych
- ELISA - ang. enzyme-linked immunosorbent assay - test immunoenzymatyczny
- FS - ang. Kurtzke Functional Systems (Focus Scale) – Podskale funkcjonalne skali EDSS (Kurtzkego)
- Gd - gadolin
- GDNF - ang. glial cell derived neurotrophic factor - czynniki neurotroficzne pochodzenia glejowego
- IFN - interferon
- IgG - immunoglobulina G
- IL - interleukina
- MBP - ang. myelin basic protein - białko zasadowe mieliny
- MSFC - ang. Multiple Sclerosis Functional Composite - wskaźnik oceniający funkcje motoryczne i funkcje poznawcze
- MSIS - ang. Multiple Sclerosis Impact Scale - Skala Wpływu Stwardnienia Rozsianego na Jakość Życia Chorych
- MR - ang. magnetic resonance - rezonans magnetyczny

- n. II - nerw wzrokowy
- NAbs - ang. neutralizing antibodies – przeciwciała neutralizujące
- NFZ - Narodowy Fundusz Zdrowia
- NT - neurotrofina
- OUN - ośrodkowy układ nerwowy
- p - poziom istotności
- PPMS - ang. primary progressive multiple sclerosis - postać pierwotnie postępująca stwardnienia rozsianego
- PRMS - ang. progresive-rellapsing multiple sclerosis - postać przewlekłe postępująca z rzutami
- RIA - ang. radio immuno assay - metoda radioimmunologiczna
- RRMS - ang. remitting-relapsig multiple sclerosis - postać rzutowo-remisyjna stwardnienia rozsianego
- s.c. - łac. sub cutaneus - podskórnice
- SD - ang. standard deviation - odchylenie standardowe
- SM - łac. Sclerosis Multiplex - stwardnienie rozsiane
- SPMS - ang. secondary progressive multiple sclerosis - postać wtórnie przewlekłe postępująca stwardnienia rozsianego
- TNF - ang. tumor necrosis factor - czynnik martwicy nowotworów
- VLA - ang. very late antigen – antygen bardzo późny (cząsteczka adhezyjna z grupy integryn)

SPIS TABEL

Tabela 1. Różnice w budowie interferonów beta 1

Tabela 2. Sposób dawkowania różnych preparatów interferonu beta 1

Tabela 3. Czas trwania choroby wyrażony w latach od chwili zachorowania do momentu kwalifikacji do leczenia immunomodulacyjnego

Tabela 4. Porównanie poziomu przeciwciał anti-Rebif (AU/ml) w obydwu pobraniach w grupie pacjentów leczonych interferonem beta 1a (preparat Rebif)

Tabela 5. Porównanie poziomu przeciwciał anti-Rebif (AU/ml) w obydwu pobraniach w grupie pacjentów leczonych octanem glatirameru (preparat Copaxone)

Tabela 6. Porównanie wartości absorbancji próbek z przeciwciałami wiążącymi anti-Rebif w grupie pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie i leczonych interferonem beta 1a (Rebif)

Tabela 7. Porównanie wartości absorbancji próbek z przeciwciałami wiążącymi anti-Rebif w grupie pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie i leczonych octanem glatirameru (Copaxone)

Tabela 8. Porównanie wartości absorbancji próbek badanych przeciwciał wiążących anti-Rebif w grupie pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie i leczonych interferonem beta 1a (Rebif)

Tabela 9. Porównanie wartości absorbancji badanych próbek przeciwciał wiążących anti-Rebif w grupie pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie i leczonych octanem glatirameru (Copaxone)

Tabela 10. Analiza poziomu przeciwciał anti-Rebif u pacjentów leczonych interferonem beta 1a (Rebif) w grupie, w której wystąpił minimum 1 rzut choroby podczas 2 lat terapii i grupie wolnej od rzutów

Tabela 11. Analiza poziomu przeciwciał anti-Rebif u pacjentów leczonych octanem glatirameru (Copaxone) w grupie, w której wystąpił minimum 1 rzut choroby podczas 2 lat terapii i grupie wolnej od rzutów

Tabela 12. Zmiana stanu klinicznego pacjentów w trakcie 2 lat terapii immunomodulującej

Tabela 13. Analiza stanu niepełnosprawności pacjentów wyrażona w skali EDSS w momencie rozpoczęcia terapii, chwili jej zakończenia i po kolejnym roku

Tabela 14. Analiza stanu niepełnosprawności pacjentów leczonych octanem glatirameru (Copaxone) wyrażona w skali EDSS w chwili rozpoczęcia oraz zakończenia terapii immunomodulującej i po kolejnym roku

Tabela 15. Analiza stanu niepełnosprawności pacjentów leczonych interferonem beta 1a (Rebif) wyrażona w skali EDSS w chwili rozpoczęcia oraz zakończenia terapii immunomodulującej i po kolejnym roku

Tabela 16. Charakterystyka badanych grup pod względem rzutów choroby, które wystąpiły w trakcie 2 lat terapii

Tabela 17. Liczba rzutów, które wystąpiły w badanej grupie pacjentów w ciągu roku od zakończenia terapii immunomodulującej

Tabela 18. Częstość występowania przeciwciał wiążących i neutralizujących w zależności od stosowanego w terapii immunomodulującej interferonu beta wg Prince i wsp. Podano odsetek osób z dodatnimi przeciwciałami BAb wśród wszystkich badanych chorych, a w nawiasach odsetek osób z dodatnimi przeciwciałami neutralizującymi wyłącznie wśród chorych z dodatnimi przeciwciałami wiążącymi (BAb+)

Tabela 19. Skala EDSS

Tabela 20. Analiza poziomów przeciwciał anty-Rebif wyrażonych jako AU/ml w badanej grupie u kobiet i mężczyzn

SPIS RYCIN

Rycina 1. Liczba kobiet i mężczyzn w badanej grupie leczonej immunomodulacyjnie

Rycina 2. Rozkład wieku chorych leczonych interferonem beta i octanem glatirameru

Rycina 3. Liczba rzutów w badanych grupach pacjentów od czasu zachorowania do rozpoczęcia terapii immunomodulującej odpowiednio glatiramerem i interferonem

Rycina 4. Korelacja przeciwciał wiążących anty-Rebif (Anty-Reb oś y) / anty-Betaferon (anty-Bet oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących interferon beta 1a (Rebif) – pobranie pierwsze

Rycina 5. Korelacja przeciwciał wiążących anty-Rebif (Anty-Reb oś y) / anty-Avonex (anty-Av oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących interferon beta 1a (Rebif) – pobranie pierwsze

Rycina 6. Korelacja przeciwciał wiążących anty-Betaferon (Anty-Bet oś y) / anty-Avonex (anty-Av oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących interferon beta 1a (Rebif) – pobranie pierwsze

Rycina 7. Korelacja poziomu przeciwciał wiążących anty-Rebif (Anty-Reb oś y) / anty-Betaferon (anty-Bet oś x) wyrażonego jako AU/ml u pacjentów przyjmujących octan glatirameru (Copaxone) – pobranie pierwsze

Rycina 8. Korelacja poziomu przeciwciał wiążących anty-Rebif (Anty-Reb oś y) / anty-Avonex (anty-Av oś x) wyrażonego jako AU/ml u pacjentów przyjmujących octan glatirameru (Copaxone) – pobranie pierwsze

Rycina 9. Korelacja poziomów przeciwciał wiążących anty-Betaferon (Anty-Bet oś y) / anty-Avonex (anty-Av oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących octan glatirameru (Copaxone) – pobranie pierwsze

Rycina 10. Korelacja poziomów przeciwciał wiążących anty-Rebif (Anty-Reb oś y) / anty-Betaferon (anty-Bet oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących interferon beta 1a (Rebif) – pobranie drugie

Rycina 11. Korelacja poziomów przeciwciał wiążących anty-Rebif (Anty-Reb oś y) / anty-Avonex (anty-Av oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących interferon beta 1a (Rebif) – pobranie drugie

Rycina 12. Korelacja poziomów przeciwciał wiążących anty-Betaferon (Anty-Bet oś y) / anty-Avonex (anty-Av oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących interferon beta 1a (Rebif) – pobranie drugie

Rycina 13. Korelacja poziomów przeciwciał wiążących anty-Rebif (Anty-Reb oś y) / anty-Betaferon (anty-Bet oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących

octan glatirameru (Copaxone) – pobranie drugie

Rycina 14. Korelacja poziomów przeciwciał wiążących anty-Rebif (Anty-Reb oś y) / anty-Avonex (anty-Av oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących octan glatirameru (Copaxone) – pobranie drugie

Rycina 15. Korelacja poziomów przeciwciał wiążących anty-Betaferon (Anty-Reb oś y) / anty-Avonex (anty-Av oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących octan glatirameru (Copaxone) – pobranie drugie

Rycina 16. Analiza testem Grubbsa grupy 35 pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie. Zaznaczono wartości odstające

Rycina 17. Absorbancja badanych próbek przeciwciał anty-Reb u pacjentów leczonych interferonem beta 1a (Rebif) – wykres po stronie lewej i chorych nieleczonych immunomodulacyjnie – wykres po stronie prawej

Rycina 18. Absorbancja badanych próbek przeciwciał anty-Reb u pacjentów leczonych octanem glatirameru (Copaxone) – wykres po stronie lewej i chorych nieleczonych immunomodulacyjnie – po stronie prawej

Rycina 19. Korelacja absorbancji próbek badanych na obecność przeciwciał wiążących anty-Betaferon (Bet abs - oś Y) / anty-Rebif (Reb abs - oś X) u pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie

Rycina 20. Korelacja absorbancji próbek badanych na obecność przeciwciał wiążących anty-Rebif (reb abs oś Y) / anty-Avonex (av abs oś X) u pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie

Rycina 21. Korelacja absorbancji próbek badanych na obecność przeciwciał wiążących anty-Avonex (av abs oś Y) / anty-Betaferon (bet abs oś X) u pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie

Rycina 22. Analiza poziomu przeciwciał wyrażonych jako AU/ml w grupie wolnej od rzutów w trakcie 2-letniej terapii (wykres po stronie lewej) oraz z minimum 1 rzutem choroby (wykres po stronie prawej) u pacjentów leczonych interferonem beta 1a (Rebif)

Rycina 23. Analiza poziomu przeciwciał wyrażonych jako AU/ml w grupie wolnej od rzutów w trakcie 2-letniej terapii (wykres po stronie lewej) oraz z minimum 1 rzutem choroby (wykres po stronie prawej) u pacjentów leczonych octanem glatirameru (Copaxone)

Rycina 24. Wartości EDSS w grupie pacjentów leczonych interferonem beta 1a i octanem glatirameru w momencie zakończenia 2-letniej terapii

Rycina 25. Krzywa kalibracyjna dla oznaczeń przeciwciał – pobranie I.

Rycina 26. Krzywa kalibracyjna dla oznaczeń przeciwciał – pobranie II.

1. WSTĘP

1.1 Informacje ogólne

Stwardnienie rozsiane (*SM – Sclerosis Multiplex*) jest najczęstszą nabytą chorobą demielinizacyjną ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Tradycyjnie uważano, że jej istotą jest pierwotne wieloogniskowe uszkodzenie mieliny z względnym zachowaniem aksonów, utratą oligodendrocytów i bliznowaceniem astrogleju. Zmiany demielinizacyjne występują w SM w formie ognisk o rozsianym charakterze i nazywane są plakami. Należy jednak zauważyć, że wraz z postępowaniem wiedzy na temat patologii SM coraz częściej zwraca się uwagę na istotny udział patologii aksonalnej, a nawet neuronalnej w SM [1]. W 1998 roku Trapp i wsp. wykazali histopatologiczne cechy przerwanej ciągłości aksonów w obrębie plak demielinizacyjnych [2].

Stwardnienie rozsiane najczęściej dotyczy młodych dorosłych - największą zapadalność stwierdza się u osób między 20 a 40 rokiem życia (r.ż). Stwardnienie rozsiane jest także wiodącą przyczyną niepełnosprawności ruchowej osób w wieku do 40 r.ż. Na całym świecie chorobą dotkniętych jest około 2,5 miliona pacjentów. Stąd właśnie wynika stałe i rosnące zainteresowanie samą chorobą, jej patogenezą, patofizjologią a przede wszystkim opracowaniem jak najskuteczniejszych sposobów leczenia SM.

1.2 Rys historyczny

Historię badań nad SM tradycyjnie można podzielić na trzy okresy:

- pierwszy okres - analiz biograficznych,
- drugi – badań opisowych i
- trzeci – badań doświadczalnych, laboratoryjnych (ze szczególnym uwzględnieniem badań immunologicznych i genetycznych) [3].

Pierwsze opisy prawdopodobnego SM pochodzą z XV wieku, kiedy to Jan Gerlacus opisał chorobę Świętej Ludwiny z Schiedam (1380-1433) mającą wiele cech charakterystycznych dla SM [4]. Natomiast bardziej usystematyzowane źródła pisane sięgają XVIII wieku. Szczególnie interesujące są opisy zawarte w pamiętnikach i listach księcia Augusta D'Este (1794-1848), w których znajduje się dość dokładny przekaz 26 letniego okresu jego choroby. Zaniewidzenie jednostronne z następową remisją było pierwszym objawem choroby. Dalej wystąpiły kolejne epizody zaburzeń widzenia, do których po kilku

latach dołączył się niedowład spastyczny kończyn dolnych, „niezgrabność rąk”, drętwienia, zaburzenia funkcji pęcherza moczowego i impotencja [3-5] .

XIX wiek okazał się być przełomowy dla badań nad SM. Początkowo opisywano charakterystyczne dla stwardnienia rozsianego zmiany anatomopatologiczne stwierdzone w badaniu sekcyjnym. Jednymi z pierwszych były opisy Roberta Carswella z 1838 roku i Jeana Cruveilhiera, który zilustrował je w atlasie anatomopatologicznym wydanym w latach 1829-1842. Obserwując zwiększoną twardość opisywanych zmian nazwał je „sclerose en taches” oraz „sclerose en iles” [6,7]. Niedoceniona do dziś w badaniach nad SM pozostaje rola niemieckiego uczonego pracującego we Wrocławiu Friedricha von Frerichsa, który już w 1849 roku po raz pierwszy postawił przyżyciowo diagnozę choroby przez niego zwaną „Hirnsklerose”, a później nazwaną SM. Trafność rozpoznania została potwierdzona w badaniu autopsyjnym przeprowadzonym przez jego ucznia Georga Valentainera (publikacja z 1856 roku). Frerichs opisał także (razem z Valentainerem) wiele cech klinicznych choroby – początek zachorowania u młodych dorosłych, częstą asymetrię objawów w początkowych stadiach procesu, rzuty i spontaniczne remisje, późniejszą powolną progresję choroby, zajęcie w większym stopniu układu ruchu niż czucia, często obecność oczopląsu oraz związek z pogorszeniem funkcji poznawczych u części pacjentów [8-10]. Mimo odkryć Frerichsa za ojca współczesnego rozumienia SM powszechnie uważa się Jeana-Martina Charcota (1825-1893). Ten wybitny neurolog w drugiej połowie XIX wieku opisał kilkadziesiąt przypadków choroby, wprowadził nazwę „sclerose en plaques” i stworzył słynną triadę Charcota, w skład której wchodziło drżenie zamiarowe, oczopląs i mowa skandowana. To właśnie ona przez wiele lat stanowiła podstawę rozpoznania SM [11]. Także Charcot w roku 1869 podał pierwszy pełny opis histopatologiczny SM, choć trzeba zaznaczyć, że pierwszy rysunek plak demielinizacyjnych przedstawił już w 1828 roku Robert Hooper z Londynu. Natomiast sama nazwa „multiple sclerosis” pojawiła się w artykułach Schulego. Stwardnieniem rozsianym interesował się także Józef Babiński, który w 1885 roku uzyskał stopień doktora medycy dzięki pracy *Etude anatomique et clinique sur la sclerose en plaques*” przedstawiającej korelacje pomiędzy zmianami morfologicznymi i klinicznymi w SM[12].

Wiek XX to okres opisu zjawisk będących podstawą patofizjologii SM. Dzięki odkryciom kolejnych naukowców możliwe było coraz dokładniejsze poznawanie tej ciekawej

i jakże skomplikowanej choroby. James Dawson w 1916 roku przeprowadził mikroskopową analizę wycinków mózgowia osób zmarłych na stwardnienie rozsiane oraz opisał ewolucję zmian zachodzących w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) w przebiegu procesu chorobowego [13]. Z kolei rejestracja elektrycznej transmisji nerwu dokonana w 1925 roku przez Edgara Douglasa Adrian (laureata Nagrody Nobla z 1932 roku) zapoczątkowała badanie elektrofizjologiczne układu nerwowego i w 1944 roku umożliwiła Derekowi Denny-Brown wykazanie, że to właśnie uszkodzenie mieliny jest odpowiedzialne za zwolnienie transmisji nerwowej i blok przewodnictwa nerwowego. Stało się wtedy jasne, że za deficyt neurologiczny w SM odpowiadają zmiany demielinizacyjne [14,15] .

Kolejnym krokiem milowym w badaniach nad SM było opracowanie w 1935 roku przez Thomasa Riversa i współpracowników modelu zwierzęcego SM. Odkrycie to związane było pierwotnie z badaniami nad szczepionką przeciw wściekliźnie. Zauważono, że u niektórych osób po jej podaniu rozwija się zespół objawów zwanych poszczepiennym zapaleniem mózgu i rdzenia kręgowego dotyczący przede wszystkim istoty białej. Obraz choroby podobny był jednak do stwardnienia rozsianego. Jego pojawienie się początkowo tłumaczono niepełną inaktywacją wirusa obecnego w szczepionce. Thomas Rivers wykazał jednak, że to obecność tkanki nerwowej znajdującej się w szczepionce, a nie obecność wirusa odpowiedzialna jest za wystąpienie reakcji poszczepiennej. Wielokrotne domięśniowe podania ekstraktu mózgu królika (mieliny) małpom powodowały rozwój zapalno-demielinizacyjnej choroby mózgu przypominającej SM. Zjawisko to znane jest obecnie jako doświadczalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE – experimental autoimmune encephalomyelitis) [16,17]. Dalsze badania nad EAE wykazały, że ważną rolę w jego powstaniu ma również silna niespecyficzna aktywacja układu immunologicznego (rola kompletnego adiuwantu Freund). Udowodniły one także, że to właśnie autoreaktywne limfocyty T są odpowiedzialne za powstanie zmian zapalnych i demielinizacyjnych w obrębie OUN. Okazało się również, że EAE może być wywołane nie tylko przez białko zasadowe mieliny ale również przez antygeny nie pochodzące z mieliny. Stwierdzono, że obraz patologiczny i kliniczny EAE jest różny u różnych gatunków zwierząt – u szczurów bardziej przypomina ostre rozsiane demielinizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia, nazywane też ostrą rozsianą encefalopatią (ADEM - acute disseminated encephalomyelitis), natomiast u myszy – SM [16]. Teorię, że SM należy do chorób autoimmunologicznych potwierdzili w 1981 roku Petinnelli i Mc Farlin [18].

Lata czterdzieste XX wieku to przede wszystkim przełomowe odkrycie immunologa Elvina Kabata (1914-2000) i jego współpracowników z Uniwersytetu Columbia. Wykorzystali oni metodę elektroforezy do analizy płynu mózgowo-rdzeniowego u pacjentów chorujących na kiłę układu nerwowego oraz stwardnienie rozsiane. Rozkład elektroforetyczny białek u pacjentów chorujących na SM wykazał większe stężenie gamma-globulin w płynie mózgowo-rdzeniowym, natomiast wzrostu tego nie obserwowano w krwi chorych. Obserwacja ta stała się pierwszym krokiem w laboratoryjnej diagnostyce SM [19]. Kolejne odkrycie przyniosły lata 1959 i 1960, kiedy to Karcher, Lowenthal oraz van Sande stwierdzili obecność w płynie mózgowo-rdzeniowym prążków oligoklonalnych [20,21] (sam termin prążki oligoklonalne został wprowadzony przez neurologa Christiana Laterre [22]). Jednak prawdziwy przełom w badaniach nad SM przyniósł rok 1981, kiedy to zastosowano po raz pierwszy obrazowanie rezonansem magnetycznym (MR) [23]. Pozwoliło ono nie tylko lepiej zrozumieć i poznać chorobę oraz przyżyciowo oceniać ogniska demielinizacji OUN, ale także stało się podstawą nowoczesnej diagnostyki SM. Dodatkowo wprowadzenie w 1986 roku kontrastu gadolinowego zdecydowanie zwiększyło możliwości diagnostyki rezonansowej SM [24].

W odniesieniu do leczenia istotny postęp odnotowano już w roku 1961 roku, kiedy to Miller razem z współpracownikami po raz pierwszy wprowadził do leczenia zastrzeń kortykotropinę. Terapia okazała się skuteczna i pociągnęła za sobą dalsze intensywne badania nad patogenezą zjawisk leżących u podstawy SM [25]. Natomiast w 1993 roku zarejestrowano pierwszy lek immunomodulujący zmieniający naturalny przebieg choroby – interferon beta. Terapia ta dała nadzieję chorym oraz lekarzom na zmianę niekorzystnego rokowania.

1.3 Epidemiologia

Stwardnienie rozsiane to choroba głównie rasy białej, znacznie rzadziej dotyka przedstawicieli rasy negroidalnej i mongoidalnej [26]. Ponieważ istnieje duże zróżnicowanie częstości występowania SM na świecie – współczynnik chorobowości waha się od 15 do 180 na 100 000 osób - powszechnie rozróżnia się 3 strefy ryzyka zachorowania na SM: strefę wysokiego współczynnika chorobowości – powyżej 40 na 100 000 mieszkańców, umiarkowanego ryzyka od 20 do 39 na 100 000 mieszkańców i niskiego ryzyka ze współczynnikiem chorobowości poniżej 20 na 100 000 mieszkańców [27].

Nieco inny podział, jak się wydaje lepiej przystający do realiów epidemiologicznych, zaproponował w 1993r. Lauer. W podziale tym współczynniki chorobowości na SM wynoszą:

- w strefie bardzo wysokiego zagrożenia powyżej $100 / 10^5$
- w strefie wysokiego zagrożenia $51 - 100 / 10^5$
- w strefie średniego zagrożenia $11 - 50 / 10^5$
- w strefie niskiego zagrożenia $0 - 10 / 10^5$ mieszkańców [28].

Jednym z najbardziej znanych epidemiologicznych faktów jest zależność występowania SM od szerokości geograficznej – na półkuli północnej obszary wysokiego współczynnika chorobowości to te występujące pomiędzy 44° a 64° szerokości geograficznej, natomiast obszary umiarkowanego ryzyka położone są między 32° a 44° [26]. Podobny trend zauważalny jest też na półkuli południowej.

Polska zaliczana jest do krajów wysokiego współczynnika chorobowości. Ponieważ nie przeprowadzono wiarygodnych badań epidemiologicznych obejmujący cały kraj, wskaźnik chorobowości podawany jest różnie i waha się w przedziale od 45 do 92 na 100 000 mieszkańców [29] - w Wielkopolsce na przykład wynosi 45 na 100 000 [30].

Większość nowszych badań przeprowadzonych w poszczególnych województwach wskazuje, że rozpowszechnienie SM może być wyższe i wynosi od 52 – 62 chorych na 100 000 mieszkańców [31-33]. Jednak szereg prac z ostatnich 10 - 15 lat wskazuje na możliwość występowania jeszcze wyższej chorobowości na SM - np. badania przeprowadzone w wybranych miastach (Szczecin, Gniezno) wykazały, że współczynnik ten sięgał nawet 90-110/100 000. Trudno jednak stwierdzić, czy dotyczy to tylko tych wybranych miast, czy dane te wskazują na bardziej ogólny trend epidemiologiczny [32-34]. Konieczne są dalsze badania w tym zakresie.

Ze względu na zależność wartości współczynnika zapadalności od szerokości geograficznej dość trudno jest oszacować średnią zapadalność na SM na świecie. Duża meta-analiza Alonso i Hernána opublikowana w 2008r. w czasopiśmie *Neurology* wskazuje, że na podstawie dostępnych danych epidemiologicznych w latach 1966 -2007 współczynnik zapadalności na SM na 100 000 mieszkańców można szacować na 3,6 (95% przedział ufności (95% CI) 3,0 – 4,2) wśród kobiet i 2,0 (95% CI 1,5 – 2,4) wśród mężczyzn [35]. Opierając się na wiarygodnych badaniach epidemiologicznych przeprowadzonych w dłuższych okresach autorzy ci stwierdzili, że najwyższe współczynniki zapadalności – standaryzowane

do wieku populacji - obserwowano w miejscowości Seinajoki (Finlandia) w latach 1979-1993 i wynosiły one 10,3 i 6,2 / 100 000 mieszkańców odpowiednio dla kobiet i mężczyzn. Duży wzrost zapadalności stwierdzono też na Sycylii np. w Caltanissetta w latach 1993-2002 wynosiła ona 12,4 i 7,0 / 100 000 odpowiednio dla kobiet i mężczyzn. Natomiast najniższa zapadalność odnotowana była w tym badaniu w Queensland w Australii, gdzie w latach 1971-1981 wynosiła tylko 1,5 dla kobiet, a dla mężczyzn 0,6 / 100 000 [35]. Nadal bardzo niskie wskaźniki zapadalności obserwuje się w Japonii, choć ostatnie badania przeprowadzone w północnej części tego kraju wskazują na umiarkowany wzrost współczynnika zapadalności z 0,15 w latach 1975 - 1989 do 0,68 /100 000 w latach 1990 - 2004 [36].

Odnosnie badań prowadzonych w Wielkopolsce - warto zauważyć, że od lat 60. ubiegłego wieku kontynuowane są systematyczne badania epidemiologiczne w Gnieźnie. Stwierdzono, że w latach 1965-1999 współczynnik zapadalności na SM wynosił tam średnio 3,7/100 000 [34,37].

Dla Europy współczynnik zapadalności wynosi 3,5 – 5,5 / 100 000 [38]. Na podstawie tych danych można przyjąć, że w Polsce każdego roku zapada na SM 1300 – 2100 pacjentów. Ponieważ w około 80% przypadków są to chorzy z postacią rzutowo-remisyjną, co roku do leczenia immunomodulującego powinno być zakwalifikowanych 1100 – 1700 nowych pacjentów [29].

Stwardnienie rozsiane to choroba głównie młodych dorosłych ze szczytem zachorowania między 20. a 40. rokiem życia. Rzadziej występuje dziecięca postać SM (gdy początek choroby wystąpił przed ukończeniem 16 roku życia) oraz przypadki choroby stwierdzane po 50 roku życia - 10% wszystkich przypadków SM. Od 10% do 15% zachorowań to postać rodzinna stwardnienia rozsianego [39]. Częściej chorują kobiety niż mężczyźni, stosunek zachorowania dla płci wynosi przeciętnie 2:1 (zależnie od źródła od 2:1 poprzez 3:1 do 6:4 [26,38,40,41].

1.4 Postacie kliniczne i naturalny przebieg SM

1.4.1 Postacie kliniczne stwardnienia rozsianego

Wyróżnia się kilka postaci stwardnienia rozsianego. Około 80% przypadków SM rozpoczyna się jako postać rzutowo-remisyjna (**remitting-relapsing multiple sclerosis - RRMS**). Charakteryzuje się ona występowaniem objawów neurologicznych w formie rzutów, które to definiowane są jako nowy deficyt neurologiczny utrzymujący się minimum 24 godziny. Pod koniec rzutu trwającego zazwyczaj kilka dni lub nawet tygodni objawy cofają się całkowicie lub częściowo. We wcześniejszych fazach tej postaci choroby pomiędzy rzutami nie dochodzi do stopniowej progresji deficytu neurologicznego, a badanie przedmiotowe pacjenta może w ogóle nie wykazywać żadnych objawów ogniskowych (gdy doszło do ich całkowitego wycofania po przebytych rzucie choroby) lub mogą występować objawy będące pozostałością rzutu (gdy doszło tylko do ich częściowego wycofania).

Z biegiem czasu u części pacjentów nie stwierdza się już nowych rzutów, natomiast ich stan neurologiczny stopniowo się pogarsza, a deficyt neurologiczny przewlekłe postępuje – wówczas mamy do czynienia z wtórnie przewlekłe postępującą postacią SM (**secondary progressive multiple sclerosis – SPMS**). Przyjmuje się, że po 10 latach choroby aż 50% chorych z RRMS przechodzi w postać SPMS, a w ogólnej populacji chorych 40% przypadków to postać RRMS i 40% to postać SPMS [42-44].

Pomiędzy postacią rzutowo – remisyjną a postacią wtórnie przewlekłe postępującą można wyodrębnić trzecią postać stwardnienia rozsianego – w której występują rzuty, a pomiędzy nimi dochodzi do stopniowej progresji deficytu neurologicznego. W takim przypadku mamy do czynienia z postępującą-nawracającą (zwaną też rzutowo-przewlekłą [44]) postacią SM (**progresive-rellapsing multiple sclerosis - PRMS**). Stanowi ona około 10% wszystkich przypadków i może także występować od początku zachorowania.

Odrębną postacią stwardnienia rozsianego jest postać pierwotnie przewlekłe postępująca (**primary progressive multiple sclerosis - PPMS**). W tej postaci rzuty w ogóle nie występują, a deficyt neurologiczny od początku choroby stale stopniowo narasta. Przewlekłe postępująca postać SM występuje u około 15-20% chorych i wiąże się najczęściej z późniejszym wiekiem zachorowania [43,44]. Dla tej grupy chorych szczególnie charakterystyczny jest postępujący niedowład piramidowy kończyn dolnych z zaburzeniami zwieraczowymi oraz rzadszym występowaniem innych objawów charakterystycznych dla SM [44]. Dla PPMS istnieją odrębne kryteria diagnostyczne, inny jest też obraz zmian obserwowanych w badaniu rezonansu magnetycznego. Rokowanie jest gorsze, a progresja

choroby jest zdecydowanie szybsza niż w postaci rzutowo-remisyjnej SM. Dla tej postaci choroby badania kliniczne są odrębnie planowane, inne są też punkty końcowe. Leki zarejestrowane do leczenia RRMS nie oddziałują w takim samym stopniu w postaci PPMS jak w RRMS. Leczenie postaci PPMS jest trudniejsze i mniej efektywne.

1.4.2 Naturalny przebieg stwardnienia rozsianego i postęp niesprawności

Najistotniejszym elementem oceny postępu choroby jest ocena stopnia niesprawności. Narastanie niesprawności może mieć charakter skokowy (w przypadku występowania rzutów) lub postępujący (w postaci SPMS, PPMS i PRMS). To właśnie w głównym stopniu niesprawność determinuje losy chorego, stąd bardzo istotny jest sposób jej obiektywnej oceny. Dlatego właśnie stosowane są skale, które pozwalają porównać wyniki w czasie i mogą być przeprowadzane przez różnych badaczy. Otrzymane wyniki są porównywalne i obiektywne.

Najczęściej stosowaną skalą jest skala stworzona w 1955 roku przez Johna Kurtzkego, rozszerzona w 1983 roku i funkcjonująca jako Rozszerzona Skala Niepełnosprawności (ang. Expanded Disability Status Scale - EDSS). Skala ta ma zakres od 0 (bez objawów neurologicznych) do 10 (zgon z powodu SM). Obejmuje ona 8 podskal funkcjonalnych (FS – Kurtzke Functional Systems (Focus Scales)) służących do oceny poszczególnych elementów deficytów wynikających z zaburzeń widzenia, uszkodzenia pnia mózgu, układu piramidowego, zaburzeń mózdkowych, czucia, uszkodzenia funkcji zwieraczy oraz wyższych czynności mózgowych. Wyniki uzyskane przy ocenie poszczególnych elementów dają w sumie końcowy wynik w EDSS [45]. Skalę EDSS przedstawiono w aneksie.

Innymi skalami używanymi w ocenie niesprawności są często: indeks niesprawności chodzenia (ocenia się szybkość przejścia przez chorego dystansu 7,5 m), wskaźnik oceniający funkcje motoryczne i funkcje poznawcze – Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) [46] oraz skala przeprowadzana przez samego pacjenta na podstawie 29 pytań dotyczących funkcji różnych układów – Skala Wpływu Stwardnienia Rozsianego na Jakość Życia Chorych (ang. Multiple Sclerosis Impact Scale - MSIS) [47].

Najczęściej zadawane pytanie przez pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane dotyczy rokowania i ryzyka osiągnięcia niepełnosprawności. Precyzyjna odpowiedź na nie jest niemożliwa, natomiast pewne cechy przemawiają za bardziej korzystnym rokowaniem. Należą do nich:

- początek objawów < 40 roku życia (- z wyjątkiem objawów zaczynających się w dzieciństwie);
- płeć żeńska;
- całkowita remisja objawów po pierwszym rzucie;
- długi czas pomiędzy pierwszym i drugim rzutem choroby;
- pierwszy rzut pod postacią pozagałkowego zapalenia n. II lub objawów czuciowych;
- postać rzutowo-remisyjna;
- mniej niż dwa rzuty w pierwszym roku trwania choroby;
- niewielka całkowita liczba zmian w sekwencji T1 i T2 stwierdzana w badaniu MR podczas pierwszego rzutu [44,48].

Na podstawie wieloletniej obserwacji wyróżniono tzw. łagodną postać stwardnienia rozsianego – czyli taki przebieg choroby, w którym po 10 (lub wg innych badaczy po 15) latach choroby pacjent zachowuje relatywnie normalną aktywność życiową – czyli osiąga maksymalnie 3,0 punkty w skali EDSS [39,49]. Różne badania wskazują na różny udział procentowy łagodnej postaci SM – średnio przyjmuje się, że dotyczy ona 10 – 15% chorych i związana jest z czynnikami korzystnego rokowania przedstawionymi powyżej (najsilniejszym korzystnym czynnikiem prognostycznym w dalszym rokowaniu jest osiągnięcie maksymalnie EDSS = 2,0 po 10 latach choroby) [49]. Jednak z drugiej strony należy zauważyć, że średni czas trwania choroby, po którym pacjent zmuszony jest do korzystania z wózka inwalidzkiego wynosi 18,1 roku.

Średni czas przeżycia pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane oceniany jest na 35-40 lat od momentu zachorowania i jest krótszy o 6-7 lat niż w populacji ogólnej [49]. Zgon związany z powikłaniami choroby (przede wszystkim powikłaniami internistycznymi) stwierdzany jest u około 47% pacjentów; u ponad 15% przyczyną śmierci jest samobójstwo. Zgon w przebiegu wariantu choroby typu Marburg lub plaki zlokalizowanej w pniu mózgu jest bezpośrednio związany z chorobą i występuje bardzo rzadko [44,49].

1.5 Kryteria diagnostyczne

Podstawą rozpoznania stwardnienia rozsianego było i jest nadal współlistnienie dwóch aspektów: rozsiania zmian w przestrzeni, czyli stwierdzenia objawów z ognisk o różnej lokalizacji (minimum dwie różne lokalizacje) oraz rozsiania zmian w czasie. Wcześniej stosowano kryteria rozpoznania SM wg McAlpine'a, następnie Schumachera i inne. Opierały się one wyłącznie na danych klinicznych [50,51] i obowiązywały do 1983 roku, kiedy to zostały wprowadzone kryteria Posera, biorące już pod uwagę także wyniki badań dodatkowych takich jak: badanie rezonansu magnetycznego oraz płynu mózgowo – rdzeniowego z uwzględnieniem obecności prążków oligoklonalnych i wartości indeksu IgG [52]. Kryteria Posera obowiązywały przez kilkanaście lat do roku 2001, kiedy to zespół badaczy pod przewodnictwem Mc Donalda i pod auspicjami Amerykańskiego Towarzystwa Stwardnienia Rozsianego oraz Międzynarodowej Federacji Towarzystw SM opracował nowe kryteria [53], zaktualizowane w 2005 roku przez Polmana i współpracowników [54]. W chwili obecnej obowiązują nowe kryteria rozpoznania SM, opublikowane w lutym 2011 roku – jest to rewizja kryteriów McDonalda opracowana w 2010 roku przez panel ekspertów pod przewodnictwem Polmana [55].

1.5.1 Kryteria diagnostyczne rzutowo-remisyjnej postaci SM

Obecne kryteria diagnostyczne (McDonalda w modyfikacji Polmana z 2010 roku) [55], tak jak wszystkie poprzednie, również oparte są na konieczności udowodnienia rozsiania zmian w czasie i przestrzeni. Pozwalają one jednoznacznie postawić rozpoznanie stwardnienia rozsianego, nie zawierają pojęć „pewne” SM i „prawdopodobne” SM, które występowały w kryteriach Posera. Rozpatrują kilka możliwych sytuacji klinicznych:

- - wystąpiły minimum 2 rzuty choroby, co pozwala rozpoznać rozsianie w czasie; z objawami neurologicznymi z minimum 2 ognisk o różnej lokalizacji – co pozwala stwierdzić rozsianie w przestrzeni – do postawienia rozpoznania SM nie jest konieczne wykonanie żadnych badań dodatkowych. Jednak warunkiem postawienia diagnozy SM jest wykluczenie obecności innych chorób mogących tłumaczyć występujące u chorego objawy.

Znowelizowane kryteria diagnostyczne dopuszczają także rozpoznanie SM w sytuacji, gdy stwierdza się 2 rzuty choroby, w tym jeden rzut stwierdzany przez badającego oraz jeden rzut w wywiadzie. (W tego typu sytuacjach klinicznych należy jednak zachować dużą ostrożność diagnostyczną; w cytowanych kryteriach autorzy nie podają, że jest to warunek konieczny, jednak zalecają wykonanie badań MR i płynu

mózgowo-rdzeniowego. W przypadku, gdy wyżej wymienione badania nie potwierdzają podejrzenia SM, zalecają zachować szczególną ostrożność przy stawianiu rozpoznania. Należy też pamiętać, że zawsze konieczne jest wykluczenie innych przyczyn objawów neurologicznych prezentowanych przez chorego);

- - wystąpiły 2 rzuty choroby – rozsianie w czasie, ale objawy neurologiczne wskazują na tą samą lokalizację ogniska; wtedy konieczne jest udowodnienie w badaniu MR **rozsiania w przestrzeni** - czyli stwierdzenie minimum po 1 zmianie w sekwencji T2 w co najmniej 2 z 4 lokalizacji typowej dla SM (okołokomorowo, podkorowo, podnamiotowo lub w rdzeniu kręgowym) lub oczekiwanie na kolejny rzut o innej lokalizacji;
- - wystąpił 1 rzut ale o objawach z minimum 2 różnych lokalizacji – udowodniono rozsianie w przestrzeni; by udowodnić **rozsianie w czasie** konieczne jest wykonanie badania MR i stwierdzenie: równoczesnej obecności asymptotycznej zmiany wzmacniającej się po podaniu gadoliny i zmian nie wzmacniających się lub stwierdzenie nowych ognisk w sekwencji T2 i/lub zmiany wzmacniającej się po kontraście w kontrolnym MR niezależnie od czasu, w którym kolejne badanie zostanie wykonane. (Należy zauważyć, że w poprzednich kryteriach z 2005r. wymagany był odstęp odpowiednio do 30 dni lub 3 miesięcy); alternatywą jest oczekiwanie na drugi rzut);
- - wystąpił 1 rzut z 1 ogniska – konieczne jest udowodnienie w badaniach dodatkowych **rozsiania zarówno w przestrzeni** – czyli stwierdzenie obecności w obrazie MR minimum po 1 ognisku w sekwencji T2 w minimum 2 z 4 lokalizacji typowych dla SM (okołokomorowo, podkorowo, podnamiotowo lub w rdzeniu kręgowym) lub oczekiwanie na kolejny rzut o innej lokalizacji; **jak i czasie** – to znaczy wykazanie równoczesnej obecności asymptotycznej zmiany wzmacniającej się po podaniu gadoliny i zmian nie wzmacniających się lub stwierdzenie nowych ognisk w sekwencji T2 i/lub zmiany wzmacniającej się po kontraście w kontrolnym MR (podobnie jak w poprzednim kryterium i tutaj zniesiono ograniczenia czasowe); alternatywą jest oczekiwanie na drugi rzut choroby [55].

W porównaniu z kryteriami z 2005 roku uproszczono i skrócono czas niezbędny do postawienia rozpoznania stwardnienia rozsianego. Przede wszystkim uproszczono kryteria

radiologiczne. Obecnie również do postawienia rozpoznania w żadnej z sytuacji klinicznych nie jest konieczne wykonanie badania płynu mózgowo-rdzeniowego, niemniej jednak stwierdzenie obecności w płynie mózgowo rdzeniowym prążków oligoklonalnych ma znaczenie rokownicze i jest przydatne w diagnostyce różnicowej [56,57]. Autorzy nowych kryteriów podkreślają, że przeznaczone są one dla przypadków typowych, nie budzących wątpliwości; nowe uproszczone kryteria nie zwalniają także z obowiązku prowadzenia diagnostyki różnicowej. Dzięki nim łatwiejsze będzie także podjęcie decyzji o szybkim zastosowaniu leczenia immunomodulującego, które ma udowodniony wpływ na naturalny przebieg choroby.

1.5.2 Kryteria diagnostyczne przewlekle-postępującej postaci SM

Postać przewlekle postępująca stwardnienia rozsianego charakteryzuje się brakiem rzutów. Z tego powodu dla postawienia rozpoznania SM w przypadku PPSM konieczne było stworzenie odrębnych kryteriów diagnostycznych.

Aby postawić rozpoznanie PPSM konieczne jest wykazanie progresji choroby – narastania deficytu neurologicznego w ciągu 1 roku trwania choroby (retro- lub prospektywnie) przy użyciu 1 z powszechnie obowiązujących obiektywnych skal oraz spełnienie 2 z 3 warunków:

- 1 – wykazanie minimum 1 zmiany w sekwencji T2 w lokalizacji charakterystycznej dla SM (okołokomorowo, podkorowo lub podnamiotowo);
- 2 – wykazanie minimum 2 zmian MR w sekwencji T2 w rdzeniu kręgowym;
- 3 – obecność prążków oligoklonalnych i/lub podwyższonego indeksu IgG w płynie mózgowo-rdzeniowym [52].

W przypadku PPSM kryteria rozpoznania nie zmieniły się w porównaniu z tymi z 2005 roku; uproszczono jedynie kryteria radiologiczne spełnienie których jest konieczne do postawienia rozpoznania. W tej postaci choroby badanie płynu mózgowo-rdzeniowego może być pomocne w ustaleniu diagnozy, a jego pozytywny wynik pozostał jednym z kryteriów rozpoznania PPSM.

1.6 Leczenie stwardnienia rozsianego

Rozważając metody leczenia stwardnienia rozsianego trzeba wziąć pod uwagę trzy aspekty:

- leczenie rzutu choroby
- leczenie modyfikujące naturalny przebieg SM
- leczenie objawowe, oddziałujące na poszczególne objawy takie jak spastyczność, zaburzenia czynności zwieraczy, zmęczenie, ból, depresję czy zaburzenia funkcji seksualnych.

Sposób leczenia różni się także w zależności od postaci choroby – nie wszystkie leki zarejestrowane do leczenia postaci rzutowo-remisyjnej są odpowiednie do leczenia postaci przewlekłe postępującej. Ponadto pacjenci chorujący na PPSM nie odnoszą korzyści ze stosowania terapii sterydowej. Wspólne natomiast jest leczenie objawowe obu postaci SM.

Wystąpienie objawów jedno- lub wielogniskowego uszkodzenia OUN lub nasilenie objawów już istniejących utrzymujące się powyżej 24 godzin wymaga dokładnej oceny neurologicznej i zastosowania odpowiedniego leczenia. Terapią z wyboru w przypadku rzutu SM zgodnie z zaleceniami European Federation of Neurological Societies (EFNS) jest dożylnie podanie metylprednizolonu. Dokładne wytyczne odnośnie dawki i czasu trwania kuracji oraz sytuacji specjalnych zostały ustalone przez EFNS [58].

Leczenie objawowe ma na celu zmniejszenie rozwiniętych niekorzystnych objawów wynikających z postępu choroby (np. zaburzenia zwieraczowe, wzmożone napięcie mięśniowe). W jego skład wchodzi zarówno farmakoterapia, jak i szeroko stosowana rehabilitacja. Dokładne omówienie tego aspektu terapii SM wykracza poza ramy niniejszej pracy [59,60].

1.6.1 Leczenie modyfikujące przebieg choroby

1.6.1.1 Leczenie immunomodulujące

1.6.1.1a Informacje ogólne

Rok 1993 okazał się przełomowy w terapii stwardnienia rozsianego - w tym właśnie roku zarejestrowano w Stanach Zjednoczonych interferon beta 1b (Betaferon/Betaseron). Był to pierwszy lek wpływający na naturalny przebieg choroby o działaniu immunomodulującym.

Obecnie oprócz interferonu beta 1b stosuje się także 2 preparaty interferonu beta 1a - Avonex, który uzyskał rejestrację w 1996 oraz Rebif – zarejestrowany w Europie i Kanadzie od 1997, w Stanach Zjednoczonych od 2002 roku. Lekiem immunomodulującym powszechnie stosowanym w terapii SM jest także octan glatirameru (Copaxone) wprowadzony do leczenia w 1997 roku oraz zarejestrowane niedawno natalizumab (Tysabri, Antegren) zarezerwowany dla terapii tylko wybranych przypadków choroby oraz fingolimod (Gilenya) [61,62].

Leki immunomodulujące wpływają na proces zapalny, dominujący w patogenezie głównie na początku choroby. Dlatego są stosowane głównie w postaci rzutowo-remisyjnej SM (oprócz interferonu beta 1b, który ma także rejestrację dla postaci wtórnie przewlekłe postępującej) w początkowych stadiach choroby, gdy proces zapalny jest aktywny. Obecnie przeważają poglądy, że leczenie powinno być rozpoczęte jak najwcześniej [63] nawet już po pierwszym rzucie choroby, gdy istnieje wysokie ryzyko kolejnego rzutu – w badaniu MR stwierdza się powyżej 9 zmian hiperintensywnych w obrazach T2 zależnych i/lub po podaniu kontrastu minimum 1 ognisko ulega wzmocnieniu [61]. Skuteczność takiego postępowania udowodniły duże badania kliniczne – badanie CHAMPS (w którym stosowano interferon beta 1a - Avonex), ETOMS (interferon beta 1a - Rebif) oraz BENEFIT (interferon beta 1b - Betaferon) czy PRECISE (octan glatirameru) [64-69]. Wykazały one wydłużenie czasu, po którym wystąpił kolejny rzut choroby oraz zmniejszenie ogólnej liczby pacjentów, u których wystąpił drugi rzut choroby w trakcie trwania badania.

1.6.1.1b Interferony beta

Interferony to naturalne cytokiny, glikoproteiny wytwarzane głównie przez komórki układu immunologicznego w odpowiedzi na zakażenie wirusowe. Poza działaniem przeciwwirusowym wykazują działanie przeciwnowotworowe oraz szerokie spektrum działań immunomodulujących. Wyróżnia się 3 typy interferonów – typ I, do którego należą interferon α , β , ϵ , ω , κ ; typ II – zwany immunologicznym – interferon γ oraz typ III – interferony λ obejmujące IL 28-A, IL-28B i IL 29. Endogenny interferon beta, zwany fibrocytarnym, zbudowany jest z 166 aminokwasów i wytwarzany przez fibroblasty głównie w wyniku zakażenia komórek przez wirusy. Jego syntezę stymulują także cytokiny takie jak IL-1, IL2 i TNF [70,71]. W terapii SM wykorzystywane jest przede wszystkim działanie immunomodulacyjne interferonu beta. Interferon beta:

- hamuje proces zapalny poprzez hamowanie produkcji prozapalnych cytokin (interferonu gamma, IL-12, TNF, IL-1) oraz pobudzenie produkcji cytokin przeciwzapalnych (IL-10, IL -4);
- zmniejsza ekspresję cząsteczek MHC na komórkach prezentujących antygen;
- zwiększa poziom cytokin o działaniu regulatorowym;
- pobudza supresorowe limfocyty CD8+ hamując tym samym nadmierną aktywność limfocytów pomocniczych CD4+ oraz makrofagów;
- hamuje proliferację limfocytów T;
- wpływa na zmniejszenie przepuszczalności bariery krew-mózg;
- ogranicza przemieszczanie się komórek zapalnych w OUN [48,61].

Interferony beta 1a i beta 1b różnią się w niewielkim stopniu od siebie. Różnice te przedstawia tabela nr 1.

Tabela 1. Różnice w budowie interferonów beta 1 [61,63].

	Interferon beta 1a	Interferon beta 1b
produkcja	komórki ssaków	komórki bakteryjne
długość sekwencji	166 aminokwasów	165 aminokwasów
aminokwas w pozycji 17	seryna	cysteina
glikozylacja	tak	nie

Obecnie w leczeniu immunomodulacyjnym SM stosowany jest jeden preparat interferonu beta 1b (Betaferon/Betaseron) oraz dwa preparaty interferonu beta 1a (Rebif oraz Avonex). Dawkowanie oraz sposób podania leków przedstawia tabela nr 2.

Tabela 2. Sposób dawkowania różnych preparatów interferonu beta 1 [63].

	Betaferon	Rebif	Avonex
droga podania	podskórnice	podskórnice	domięśniowo
dawkowanie	250 µg co 2 dni	22 lub 44 µg 3 razy w tygodniu	30 µg 1 raz w tygodniu

W badaniu rejestracyjnym interferonu beta 1b wykazano zmniejszenie o 32% częstości rzutów u chorych przyjmujących lek w porównaniu do grupy placebo oraz prawie 6-krotne zmniejszenie częstości występowania zmian aktywnych wzmacniających się po podaniu gadoliny (Gd(+)) w badaniu MR. Także długoletnie obserwacje wskazują na pozytywne oddziaływanie leku na naturalny przebieg choroby [65].

Z kolei badanie PRISM, w którym porównywano chorych otrzymujących Rebif z grupą placebo, wykazało: zmniejszenie o 32,5% częstości rzutów w grupie leczonej interferonem w porównaniu do grupy placebo, zwolnienie tempa rozwoju niepełnosprawności, 4-krotne zmniejszenie liczby zmian ulegających wzmocnieniu po podaniu gadoliny [Gd(+)] oraz zmniejszenie przyrostu całkowitej objętości zmian w sekwencji T2 w obrazach MR [66]. Podobnie jak w przypadku interferonu beta 1b, tak i beta 1a długoletnie obserwacje udowadniają pozytywny wpływ leku na naturalny przebieg choroby, w tym zmniejszenie średniej rocznej liczby rzutów [67].

Także badanie będące podstawą rejestracji Avonexu w leczeniu SM wykazało: istotne zmniejszenie rocznego wskaźnika rzutów, który wynosił w grupie leczonej interferonem 0,61 a w grupie placebo 0,9, zmniejszenie progresji postępu niepełnosprawności u chorych przyjmujących Avonex oraz jego pozytywny wpływ na zmiany obrazowane w badaniu rezonansowym [68].

1.6.1.1c Octan glatirameru

Octan glatirameru (Copaxone) to mieszanina syntetyczny polipeptydów wprowadzona do leczenia SM w 1997 roku. Jest to kopolimer czterech aminokwasów: L-kwas glutaminowy, L-lizyna, L-alanina, L-tyrozyna i swoją budową zbliżony jest do białka zasadowego mieliny (MBP). Prawdopodobny mechanizm działania octanu glatirameru polega na:

- zmniejszaniu reaktywności limfocytów rozpoznających MBP oraz konkurencji o miejsce wiązania na powierzchni komórek prezentujących antygen przez cząsteczki układu MHC;
- sprzyjaniu powstawania immunoregulacyjnych limfocytów pomocniczych Th2 mogących przenikać do OUN gdzie wydzielają cytokiny przeciwzapalne (IL-10, IL-4) i produkują czynniki neurotroficzne, jak BDNF (brain-derived neurotrophic factor), GDNF (glial cell derived neurotrophic factor) i NT 3 (neurotrofina 3); ponadto limfocyty te także ograniczają działanie limfocytów autoreaktywnych [61,63].

W badaniu rejestracyjnym potwierdzono skuteczność octanu glatirameru – średni roczny wskaźnik rzutów w grupie leczonej był niższy o 32% niż w grupie pobierającej placebo. Także stwierdzono wydłużenie czasu do wystąpienia rzutu o 89 dni w grupie leczonej w porównaniu do grupy kontrolnej oraz korzystny wpływ na postęp niepełnosprawności chorych – w trakcie 35 miesięcznej obserwacji różnica ta wyniosła 0,45 punktu skali EDSS na korzyść grupy przyjmującej lek. Stwierdzono również pozytywny wpływ octanu glatirameru na obraz MR – mniejszą liczbę ognisk aktywnych, nowych ognisk oraz mniejszą całkowitą objętość zmian w sekwencji T2/PD wykazano w grupie chorych leczonych glatiramerem [69].

1.6.1.2 Leczenie immunosupresyjne

Leki o działaniu immunosupresyjnym, stosowane przede wszystkim w terapii chorób nowotworowych i reumatologicznych także mają swoje miejsce w terapii stwardnienia rozsianego. Należą do nich:

- mitoksantron – antracykliczny cytostatyk, którego korzystne działanie udowodniono w grupie pacjentów z wtórnie postępującą postacią SM. Może być także zastosowany u chorych z gwałtownym postępem choroby;
- cyklofosfamid – przeciwnowotworowy lek alkilujący, stosowany w tzw. ratunkowej terapii SM; również u osób, które pozytywnie odpowiedziały na leczenie mitoksantronem ale z powodu przyjęcia dawki maksymalnej leku dalsze nim leczenie nie może być prowadzone;
- kladrybina – analog adenozyiny z dość wybiórczym działaniem cytotoksycznym wobec limfocytów; w dotychczas przeprowadzonych badaniach uzyskano niejednoznaczne wyniki; prowadzone są jednak dalsze badania leku podawanego w postaci doustnej;
- azatiopryna – doustna pochodna purynowa, dość łatwa w dawkowaniu o umiarkowanych objawach ubocznych. Jednak badania kliniczne nie potwierdziły jednoznacznie jej skuteczności w stosunku do postępu choroby [61,63].

1.6.1.3 Nowe terapie stwardnienia rozsianego

Mimo niekwestionowanego przełomu w terapii SM nieprzerwanie trwają badania nad wprowadzeniem do leczenia nowych leków, bardziej skutecznych, łatwiejszych w stosowaniu i obciążonych mniejszymi działaniami niepożądanymi. Badania prowadzone są w obrębie trzech typów terapii – immunoterapii niespecyficznej, immunoterapii antygenowo-specyficznej oraz immunosupresji [63]. Wśród leków tych najbardziej zaawansowane badania trwają między innymi nad:

- natalizumabem (Tysabri) - humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko integrynie $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4 (Very Late Antigen – antygen bardzo późny); obecnie lek ten zarezerwowany jest wyłącznie do terapii osób niereagujących na leczenie interferonem beta lub octanem glatirameru;
- alemtuzumabem (Campath) – przeciwciałem przeciwko CD52;
- declizumabem – przeciwciałem przeciwko CD25;
- lakwinimodem i teriflunamidem – doustnymi lekami immunosupresyjnymi;

- szczepieniem TCR – eliminującym limfocyty MBR-reaktywne;
- kwasem fumarowym – doustnym lekiem immunomodulującym, który zmienia równowagę Th1/Th2;
- fingolimodem (Gilenya) – agonistą receptora SP1, który został zarejestrowany w 2011 roku do leczenia SM [61,63].

1.6.2 Skuteczność leczenia immunomodulującego

Skuteczność leczenia immunomodulującego interferonami beta oceniana jest na około 30% - w badaniach klinicznych III fazy preparatów interferonu oraz glatirameru wykazano zmniejszenie o około 30% liczby rzutów oraz mniejszą liczbę zmian w badaniu rezonansowym w porównaniu z grupą chorych otrzymujących placebo. Po pierwszym roku leczenia należy przeprowadzić ocenę odpowiedzi pacjenta na stosowane leczenie [72]. Zmianę stosowanej terapii powinno się rozważyć gdy:

- w trakcie leczenia wystąpił jeden poważny rzut choroby lub dwa rzuty o małym nasileniu (szczególnie dotyczy to rzutów, które wystąpiły po 6 miesiącach od momentu rozpoczęcia terapii);
- nastąpiła trwała progresja niepełnosprawności – wzrost wskaźnika EDSS o 2 punkty u pacjentów z wyjściową niepełnosprawnością określoną na 3,5 punkty w skali EDSS lub wzrost o 1 punkt dla pacjentów ocenionych w skali EDSS powyżej 3,5 punkta;
- w przypadku progresji zmian obserwowanych w badaniu MR – nowa zmiana wzmacniająca się po podaniu kontrastu, nowa zmiana lub powiększenie zmian w obrazach T2 zależnych, powiększenie objętości lub nowa zmiana w sekwencjach T1 oraz powiększenie zmian atroficznych mózgu [63].

Według rekomendacji ekspertów opublikowanych w czasopiśmie Lancet Neurology w lipcu 2010 roku pacjentów można podzielić na 3 grupy chorych:

- dobrze reagujących na leczenie „doing well” – to chorzy bez rzutów i bez lub z ograniczoną aktywnością rezonansową;
- z umiarkowaną aktywnością choroby („intermediate disease activity”), u których stwierdzono 1 rzut w trakcie terapii i bez lub z ograniczoną aktywnością zmian w obrazowaniu metodą MR;

- słabo reagujących na leczenie („doing poorly”) – to chorzy z wieloma rzutami lub jednym rzutem i dużą aktywnością choroby stwierdzaną w badaniu MR, tzw. „aktywnością rezonansową* [73].

** aktywność rezonansowa rozumiana jako obecność zmian wzmacniających się po kontraście lub nowe ogniska w sekwencji T2 [73].*

1.7 Występowanie przeciwciał przeciwko lekom stosowanym w stwardnieniu rozsianym

Jednym z czynników warunkujących niepełną odpowiedź pacjentów na stosowane leczenie może być powstawanie przeciwciał przeciwko stosowanym lekom. Zjawisko to znane to jest od wielu lat i obserwowane podczas terapii wieloma substancjami:

- ✓ hormonami, np. insuliną;
- ✓ czynnikami wzrostu – erytropoetyną, hormonem wzrostu, czynnikiem stymulującym wzrost kolonii limfocytów, nabłonkowym czynnikiem wzrostu;
- ✓ przeciwciałami monoklonalnymi – natalizumabem, rituximabem i infliximabem;
- ✓ toksynami bakteryjnymi, jak np. toksyną botulinową;
- ✓ substancjami peptydowymi u chorych na SM - octanem glatirameru;
- ✓ czy wreszcie cytokinami takimi jak interferon alfa i beta [74].

Zjawisko powstawania przeciwciał badane jest właściwie od początku stosowania terapii immunomodulującej. Wszystkie znane mechanizmy działania interferonu beta oparte są na jego związaniu z receptorem na powierzchni docelowej komórki układu immunologicznego. Proces ten aktywuje kaskadę wewnątrzkomórkowej kinazy tyrozynowej prowadzącą do transkrypcji genów. Może on zostać przerwany, gdy przeciwciała przesłonią lub zaburzą strukturę białka konieczną do rozpoznania receptora [74].

W przypadku terapii interferonem rozróżnia się dwa rodzaje przeciwciał:

- przeciwciała wiążące („binding antibodies” – BAbs) oraz
- przeciwciała neutralizujące („neutralizing antibodies” – NAbs) [74-77].

Należy zauważyć, że w literaturze pojawiają się także głosy, że podział ten jest sztuczny, a wykrywanie obecności przeciwciał neutralizujących związane jest z wytwarzaniem przeciwciał wiążących [77].

Obydwa rodzaje przeciwciał wiążą molekułę interferonu beta, z tym że przeciwciała wiążące przyłączają się w różnych miejscach, a przeciwciała neutralizujące w miejscu odpowiedzialnym za interakcję z receptorem komórki docelowej [76]. Tak więc przeciwciała neutralizujące stanowią podklasę przeciwciał wiążących. Powiązanie to ma znaczące implikacje kliniczne, bowiem stwierdzenie obecności przeciwciał wiążących w surowicy pacjentów jest stosunkowo tanie i szeroko dostępne, natomiast oznaczenie przeciwciał neutralizujących jest kosztowne, trudne do wykonania z technicznego punktu widzenia i przez to mało dostępne [75,76].

Dlatego mimo możliwych wyników fałszywie dodatnich BAbs (gdy stwierdzany jest ich wysoki poziom nie potwierdzony w późniejszych badaniach obecnością NAbs i obniżeniem biologicznego oddziaływania interferonu) oznaczanie BAbs zalecane jest jako badanie przesiewowe (screeningowe) i tylko u pacjentów z obecnymi przeciwciałami wiążącymi w dalszym etapie oznacza się przeciwciała neutralizujące [76].

Przeciwciała wiążące wykrywane są za pomocą różnych metod, w tym ELISA (ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), Western blot, RIA (Radio-Immuno Assay) i ACA (Affinity Chromatography Assay), natomiast do oznaczenia przeciwciał neutralizujących wykorzystywane jest działanie przeciwwirusowe IFN. Stosuje się w tym przypadku pomiar efektu cytopatycznego indukowanego przez wirusa lub pomiar neutralizacji antyproliferacyjnej oraz metodę wykorzystującą zdolność IFN do indukowania białka MxA (*myxovirus resistance protein A*) [76].

Również octan glatirameru jest substancją biologicznie czynną, której zastosowanie w leczeniu SM indukuje powstawanie przeciwciał. Mechanizm jego działania jest jednak inny. Po związaniu z komórkami prezentującymi antygen dochodzi do klonalnej proliferacji specyficznych limfocytów T, które kontrolują procesy zapalne zaangażowane w rozwój stwardnienia rozsianego. Mimo, że wykrywane są u prawie wszystkich chorych przyjmujących lek uważa się, że ich obecność nie wpływa na aktywność biologiczną glatirameru [74]. Badania prowadzone na dużych grupach chorych leczonych octanem glatirameru, a także obserwacje wieloletnie wskazują na brak aktywności neutralizującej powstałych przeciwciał [78,79].

1.8 Założenia pracy

U chorych na SM leczonych interferonami beta zjawisko występowania przeciwciał dla tych interferonów jest dość powszechne. Ich obecność stwierdza się, w zależności od preparatu interferonu, jego dawki, badanej populacji, a także metodologii badania u od 2% aż do 47% leczonych [80].

Wpływ obecności przeciwciał na efekt kliniczny terapii interferonem oraz wyniki neuroobrazowania jest szeroko dyskutowany. Stwierdzenie obecności przeciwciał neutralizujących ma też swoje konsekwencje terapeutyczne – w niektórych przypadkach jest wskazaniem do zmiany dotychczasowego leczenia, według niektórych autorów nawet w przypadkach pozytywnej odpowiedzi na terapię w grupie chorych dobrze reagujących na terapię – (tzw. „doing well”) [73]. Obecność przeciwciał może tłumaczyć zjawisko braku reakcji części pacjentów na terapię. Identyfikacja takich chorych jest niezwykle istotna z klinicznego punktu widzenia, pozwala we wczesnym okresie choroby uniknąć długotrwałego i kosztownego, a przy tym nieefektywnego leczenia oraz umożliwia zmianę terapii na bardziej dopasowaną do indywidualnych potrzeb chorego.

Według wytycznych EFNS oznaczenie przeciwciał neutralizujących powinno być przeprowadzone u wszystkich pacjentów leczonych immunomodulacyjnie po 12 i 24 miesiącach terapii (oraz kolejne oznaczenia w zależności od wyników badań podstawowych i odpowiedzi chorego na leczenie) [75].

W Polsce badania takie nie są ogólnie dostępne. Pojedyncze doniesienia na temat ich oznaczania pochodzą jedynie z badań naukowych [81]. Wobec ograniczonych środków

finansowych i wysokich kosztów terapii immunomodulującej być może rutynowe stosowanie oznaczeń przeciwciał zarówno wiążących, jak i neutralizujących mogłoby skutecznie pomóc w optymalizacji terapii, tak by była ona jak najbardziej skuteczna i właściwa dla indywidualnego pacjenta.

Istnieje przekonanie, że niektóre preparaty interferonów beta są w mniejszym stopniu immunogenne niż inne [82].

Powstaje także pytanie, czy w przypadku stwierdzenia przeciwciał przeciwko jednemu z preparatów warto zamienić go na inny preparat interferonu, czy też należy zalecić preparat odrębnej grupy np. octan glatirameru lub lek nowszej generacji.

Dlatego też w niniejszej pracy podjęto się zbadania występowania przeciwciał dla interferonów u chorych leczonych takim rodzajem terapii.

Z praktycznego punktu widzenia ważne wydaje się także określenie reakcji krzyżowych pomiędzy przeciwciałami przeciwko poszczególnym stosowanym w Polsce preparatom interferonów beta oraz zbadanie, czy dochodzi do tworzenia przeciwciał przeciw interferonom również u chorych leczonych octanem glatirameru.

W końcu istotne jest porównanie poziomu przeciwciał u chorych na SM leczonych i nieleczonych immunomodulacyjnie, ponieważ nie można wykluczyć występowania reakcji przeciw interferonom endogennym.

2. CEL PRACY

Głównym celem niniejszej pracy było:

1. Stwierdzenie obecności przeciwciał wiążących interferon w surowicy krwi chorych na stwardnienie rozsiane w trakcie terapii lekami immunomodulującymi oraz określenie zmian ich poziomu po roku od zakończenia terapii.
2. Zbadanie, czy występuje krzyżowa reakcja immunologiczna w zakresie przeciwciał wiążących pomiędzy wszystkim preparatami interferonu beta stosowanymi w terapii stwardnienia rozsianego w Polsce w ramach programów terapeutycznych Narodowego Funduszu Zdrowia.
3. Porównanie poziomu przeciwciał wiążących przeciwko interferonowi beta w surowicy krwi w grupie chorych na stwardnienie rozsiane leczonych immunomodulacyjnie i grupie kontrolnej pacjentów ze stwardnieniem rozsianym nie leczonych immunomodulacyjnie.

Ponadto określono dodatkowe cele pracy, takie jak:

4. Określenie korelacji poziomu przeciwciał wiążących interferon beta ze stanem niepełnosprawności i liczbą rzutów stwardnienia rozsianego w trakcie terapii lekami immunomodulującymi i w rok od jej zakończenia.
5. Określenie przy użyciu skal klinimetrycznych stopnia niepełnosprawności chorych na stwardnienie rozsiane oraz liczby rzutów choroby w trakcie leczenia lekami immunomodulującymi i w rok po jego zakończeniu.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1 Materiał

Grupę badaną stanowiło 70 pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane, którzy brali udział w programie Narodowego Funduszu Zdrowia (NFZ) leczenia immunomodulującego prowadzonego w Zakładzie Opieki Zdrowotnej Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji im. prof. L. Bierkowskiego (ZOZ MSWiA) w Poznaniu w latach 2004-2006.

Badanie miało charakter prospektywny, nierandomizowany.

W grupie 70 pacjentów 15 chorych leczonych było octanem glatirameru (preparat Copaxone) w standardowej dawce 20 mg 1 x dobę sc.; 55 chorych otrzymywało interferon beta 1a (preparat Rebif) w dawce 44 µg 3 x tydzień sc.

Leczenie było prowadzone przez 2 lata (2004 - 2006).

Wszyscy chorzy zakwalifikowani do badania spełniali kryteria rozpoznania SM wg. Mc Donalda obowiązujące w 2004 roku [53]. Po roku 2005 w związku ze zmianami kryteriów diagnostycznych, w leczonej grupie rozpoznanie zweryfikowano także zgodnie z kryteriami Polmana i wsp. [54]. Wprowadzenie nowszych kryteriów nie spowodowało w u żadnego z leczonych pacjentów zmiany rozpoznania.

Ponadto wszyscy chorzy spełniali kryteria kwalifikujące do leczenia immunomodulacyjnego zgodnie z rozporządzeniem Prezesa NFZ nr 8/2004 z 2004 roku.

Kwalifikacja do leczenia zgodnie z w/w. rozporządzeniem obejmowała badanie lekarskie, w czasie którego przyznawane były pacjentowi punkty wg punktowego systemu kwalifikacji. Pod uwagę brano wiek chorego, postać choroby (kwalifikowani do leczenia byli tylko pacjenci z postacią rzutowo-remisyjną), liczbę rzutów w ostatnim roku, czas trwania choroby oraz stan neurologiczny pacjenta wyrażony w skali EDSS. Dolną granicą kwalifikacji do programu NFZ leczenia immunomodulującego stanowiło uzyskanie 21 punktów zgodnie z w/w systemem kwalifikacji. W czasie prowadzenia badania czas trwania terapii wynosił 24 miesiące bez możliwości jego przedłużenia.

Dodatkowo w celu stwierdzenia, czy badane przeciwciała przeciwko interferonom stosowanym w leczeniu SM występują u chorych na SM nigdy nieleczonej immunomodulacyjnie – przeprowadzono badanie poziomu przeciwciał u 35 chorych na SM nie leczonych immunomodulacyjnie hospitalizowanych w Klinice Neurologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Podstawowym warunkiem uczestnictwa w badaniu było wyrażenie świadomej zgody przez pacjentów po zapoznaniu się z informacją dla chorego.

Badanie zostało przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwała nr 792/-06) oraz Dyrektora ZOZ MSWiA im. L. Bierkowskiego w Poznaniu.

3.2 Metodyka

Po uzyskaniu świadomej zgody na udział w badaniu przeprowadzono dokładne badanie podmiotowe ze szczególnym uwzględnieniem historii choroby stwardnienia rozsianego (początek objawów, rok rozpoznania, wykonane badania dodatkowe, liczba rzutów, hospitalizacje, dotychczasowe leczenie, wywiad rodzinny, choroby współistniejące) oraz przedmiotowe badanie neurologiczne z oceną stopnia niepełnosprawności według skali EDSS.

Zapoznano się także z dokumentacją medyczną chorego, która została dostarczona przez niego w momencie kwalifikacji do leczenia immunomodulującego oraz tą prowadzoną w trakcie terapii.

Przy włączaniu chorego do programu terapeutycznego oceniano jego sprawność ruchową w skali EDSS oraz odnotowywano liczbę rzutów w czasie pierwszego i drugiego roku leczenia. Po przeprowadzeniu badania podmiotowego i przedmiotowego pobierano od chorego 5 ml krwi pełnej. Po wytworzeniu skrzepu krew wirowano w celu uzyskania surowicy wg ogólnie przyjętych standardów.

Powyższe badania przeprowadzone były w chwili zakończenia dwuletniego cyklu terapii immunomodulującej. Badanie powtórne przeprowadzono po roku od zakończenia terapii. Obejmowało ono szczegółowe badanie lekarskie – badanie podmiotowe ze szczególnym uwzględnieniem przebiegu SM w ciągu ostatniego roku, wystąpieniem ewentualnych rzutów

choroby i ich liczbą oraz badanie przedmiotowe neurologiczne z oceną stanu niepełnosprawności wyrażoną w skali EDSS.

Po badaniu ponownie pobierano 5 ml krwi od chorego. Po odwirowaniu krwi (zgodnie z ogólnie przyjętymi standardami) surowicę dostarczano do Zakładu Neurochemii Katedry Neurologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Badania lekarskie zostały każdorazowo przeprowadzone przez głównego badacza – autorkę rozprawy.

Na kontrolną wizytę po roku zgłosiło się 64 chorych (91,4%) i wyniki tej grupy chorych zostały poddane analizie statystycznej.

W celu oznaczenia poziomu przeciwciał u chorych na SM nie leczonych immunomodulacyjnie do badania włączono grupę kontrolną. Grupę tę stanowiło 35 pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane hospitalizowanych w Klinice Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Rozpoznanie choroby postawione było na podstawie wyżej wymienionych kryteriów. Badanie kliniczne i laboratoryjne przeprowadzono u osób z grupy kontrolnej w taki sam sposób jak w grupie badanej. Wszyscy pacjenci grupy kontrolnej wyrazili świadomą zgodę na udział w badaniu.

3.2.1 Oznaczenie poziomu przeciwciał wiążących interferon beta

W pobranej od chorych surowicy oznaczono poziom przeciwciał wiążących interferon beta.

Do oznaczeń poziomu przeciwciał wykorzystano jako antygeny dostępne komercyjnie preparaty interferonów beta 1 a (Rebif oraz Avonex) i beta 1b (Betaferon). Oznaczenia te przeprowadzono w Zakładzie Neurochemii i Neuropatologii, Katedry Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (kierownik Zakładu dr hab. n. med. Sławomir Michalak, kierownik Katedry prof. dr hab. n. med. Wojciech Kozubski).

Do wykonania oznaczeń zastosowano metodę ELISA opracowaną w Zakładzie Neurochemii i Neuropatologii Katedry Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Metodyka oznaczeń: 96-dołkową płytkę do ELISA (firmy Nunc, Roskilde, Dania) opłaszczano preparatem interferonu (odpowiednio Rebif, Avonex, Betaferon). Po 12 godzinach inkubacji w temperaturze pokojowej dodawano odpowiednio kozie przeciwciała anty-ludzki interferon (SIGMA-Aldrich) - jako standard, w rozcieńczeniach malejących 4; 1,6; 0,8; 0,4; 0,2; 0,125 $\mu\text{g/ml}$, surowicę szczurzą (jako kontrolę ujemną), surowicę od chorych ze stwardnieniem rozsianym nigdy nie poddanych leczeniu immunomodulującemu oraz surowicę badaną w rozcieńczeniu 1:100.

Płytkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, płukano trzykrotnie, a następnie dodawano odpowiednio królicze przeciwciała anty-kozie IgG (SIGMA-Aldrich) lub królicze przeciwciała anty-ludzkie IgG znakowane fosfatazą zasadową (SIGMA, Aldrich). Następnie przeprowadzono kolejną 60 minutową inkubację i dodano p-nitrofenylofosforan jako substrat (SIGMA-Aldrich).

Po 30 minutach inkubacji reakcję zatrzymywano przy pomocy 1 M HCL i mierzono absorbancję w czytniku ELISA ELx800 (firmy BIO-TEK) przy długości fali 405 nm.

W każdym z kolejnych cykli analiz na płytce dodawano surowice szczurze, surowice chorych z SM nie poddawanych leczeniu immunomodulującemu (35 osób) oraz surowice badanych chorych.

Powyższą procedurę przeprowadzono kolejno dla płytek opłaszczonych wszystkimi badanymi preparatami leczniczymi –Rebif, Betaferon oraz Avonex.

Oznaczenia te wykonano dla surowic z obydwóch pobrań u pacjentów leczonych zarówno interferonem beta 1a, jak i octanem glatirameru.

Przykładowe krzywe kalibracyjne przedstawiono w aneksie pracy – rycina 25 i 26.

Wynik wyrażono jako uzyskaną wartość absorbancji oraz w tzw. jednostkach arbitralnych AU/ml (AU – Arbitrary Units).

Jednostki te obliczono według wzoru: $10 \times \text{absorbancja próbki} / \text{absorbancja wartości odcięcia}$ (ang. cut – off).

Wartość odcięcia ustalono jako odpowiadającą 95 percentylowi odpowiedniej grupy oznaczeń.

Dla przeciwciał:

- anty-Rebif wynosiła ona 0,1798;
- dla przeciwciał anty-Avonex 0,2076;
- dla przeciwciał anty-Betaferon 0,0735.

Poziom przeciwciał przekraczający 3-krotnie wartość odchylenia standardowego powyżej średniej arytmetycznej w grupie kontrolnej uznano za wskaźnik obecności przeciwciał (pacjenci BAb +).

3.2.2 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu MedCalc ver. 11.0.1.0.

W celu określenia charakteru rozkładu normalnego zmiennych wykorzystano test D`Agostino - Pearson. Zmienne o rozkładzie normalnym przedstawiono jako średnią \pm SD, a o rozkładzie niegaussowskim jako medianę i zakres międzykwartyłowy. Zmienne o rozkładzie normalnym analizowano testem t-Studenta.

Do porównania zmiennych o rozkładzie odbiegającym od normalnego zastosowano test U Manna – Whitneya, a wyniki przedstawiano jako medianę i zakres międzykwartyłowy. W przypadku zmiennych powiązanych stosowano test Wilcoxon.

Porównywanie danych wyrażonych w skali nominalnej było możliwe po zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Yates`a oraz w przypadku małych liczebności oczekiwanych – testu dokładnego Fishera.

Przeprowadzono także analizę korelacji stosując nieparametryczny test korelacji rang Spearmana (dla zmiennych nie spełniających kryteriów normalności rozkładu).

Dla wykazania wartości odstających przeprowadzono test Grubbsa.

Testowanie istotności statystycznej przeprowadzono na poziomie $p \leq 0,05$.

4. WYNIKI BADANIA

4.1 Informacje ogólne

Pierwotnie na udział w badaniu wyraziło zgodę 70 pacjentów, z których 15 (21,4%) leczonych było octanem glatirameru (Copaxone), a 55 (78,6%) interferonem beta 1a (Rebifem).

Na wizytę kontrolną po roku zgłosiło się 64 chorych (91,4%) i wyniki tej grupy chorych zostały poddane analizie statystycznej.

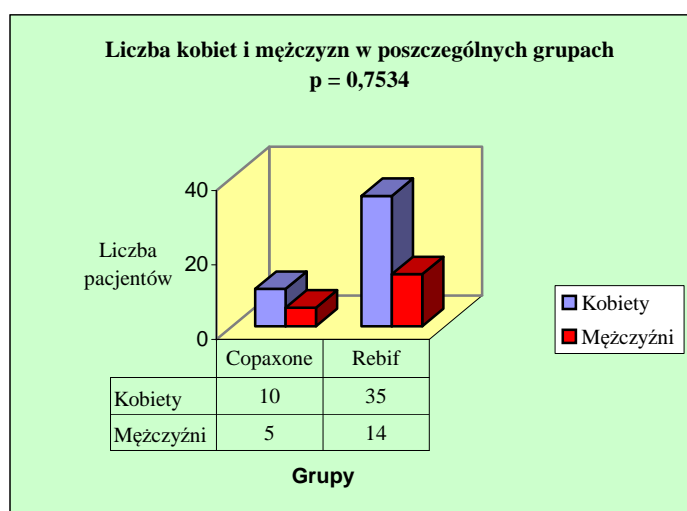
W poddanej analizie grupie 15 pacjentów to chorzy otrzymujący octan glatirameru (23,4%); pozostałych 49 chorych otrzymywało interferon beta 1a (76,6%).

4.2 Charakterystyka grupy badanej

4.2.1 Płeć chorych.

Wśród 64 chorych było 45 kobiet, co stanowi 70,3% ogółu pacjentów, oraz 19 mężczyzn – 29,7%. Przeprowadzono analizę rozkładu płci testem dokładnym Fishera w grupie leczonej octanem glatirameru (10 kobiet i 5 mężczyzn) oraz interferonem beta 1a (35 kobiet i 14 mężczyzn), nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie płci chorych leczonych poszczególnymi preparatami ($p = 0,75$). W grupie kontrolnej pacjentów nieleczonych 24 chorych stanowiły kobiety (68,6%), 11 pacjentów mężczyźni (31,4%).

Udział kobiet i mężczyzn w grupie osób leczonych przedstawia ryc.1.



Rycina 1. Liczba kobiet i mężczyzn w badanej grupie leczonej immunomodulacyjnie

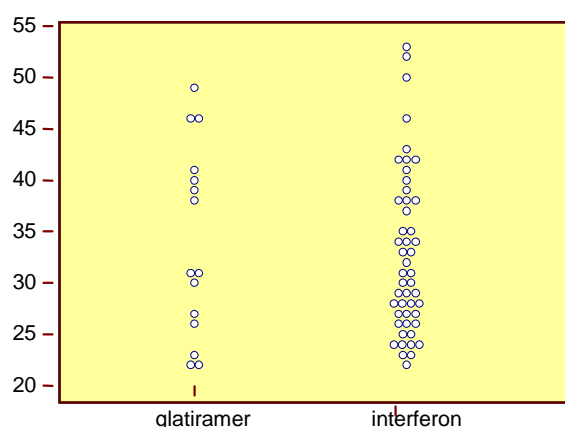
4.2.2 Wiek chorych

W poszczególnych grupach średnia wieku przedstawiała się następująco:

- grupa leczona octanem glatirameru $34,1 \pm 9,2$ lat,
- grupa leczona interferonem beta 1a $32,8 \pm 7,9$ lat,
- grupa kontrolna – nieleczona immunomodulacyjnie $33,7 \pm 11,4$ lat.

W wykonanym teście t-Studenta nie wykazano istotnej różnicy w zakresie wieku leczonych interferonem lub octanem glatirameru ($p = 0,42$).

Wyniki obrazuje rycina 2.



Rycina 2. Rozkład wieku chorych leczonych interferonem beta i octanem glatirameru

Nie stwierdzono także istotnych różnic w zakresie rozkładu płci i wieku osób leczonych i nieleczonych immunomodulacyjnie.

4.2.3 Średni czas trwania choroby

Średni czas trwania choroby w całej badanej grupie wyrażony w latach wynosił

$7,8 \pm 4,0$ roku (tabela 3). W grupie kontrolnej wynosił on $8,1 \pm 5,2$ roku.

Tabela 3. Czas trwania choroby wyrażony w latach od chwili zachorowania do momentu kwalifikacji do leczenia immunomodulacyjnego

grupa	średni czas trwania choroby (w latach)	odchylenie standardowe (w latach)	poziom istotności
leczona glatiramerem	8,8 mediana - 8,0 min. - 5,0 max. - 15,0	$\pm 3,2$	p = 0,057
leczona interferonem	7,5 mediana - 6,0 min. - 2,0 max. - 18	$\pm 4,2$	

Do przeprowadzenia analizy w celu określenia zgodności rozkładu wyników wyszczególnionych w tabeli 3 z rozkładem normalnym zastosowano test D`Agostino - Pearsona. Z uwagi na to, że w grupie pacjentów leczonych interferonem beta 1a ($p = 0,021$) uzyskane wyniki nie spełniały kryteriów normalności rozkładu, do dalszej analizy użyto testu U Manna-Whitneya uzyskując wartość $p = 0,057$. Różnica czasu trwania choroby u chorych leczonych dwoma preparatami nie okazała się istotna przy założonym progu istotności $p=0,05$.

4.2.4 Sprawność ruchowa chorych oceniana w skali EDSS w momencie zakwalifikowania do leczenia immunomodulującego

Mediana punktacji EDSS w całej badanej grupie wyniosła 1,0; przy minimalnej wartości EDSS 0, maksymalnej 4 punkty.

W poszczególnych grupach wartości EDSS wynosiły:

- grupa leczona glatiramerem – minimum 0, maximum 3,5; mediana 1,0 punkt
- grupa leczona interferonem beta 1a – minimum 0, maximum 4,0; mediana 1,0 punkt.

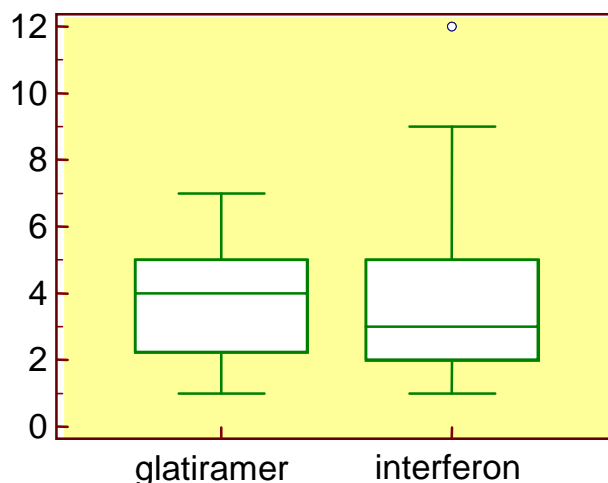
Różnica punktacji skali EDSS nie była istotna ($p=0,93$).

4.2.5 Liczba rzutów choroby, które wystąpiły od początku zachorowania do momentu zakwalifikowania do leczenia immunomodulującego w grupach leczonych

Średnia liczba rzutów w całej badanej grupie wyniosła 3 (minimum 1, maksimum 4).

W grupie leczonej glatiramerem wartość mediany to 4, w grupie leczonej interferonem 3. Wartości minimalne wynoszą 1 dla obydwu grup, maksymalne odpowiednio 7 dla grupy leczonej glatiramerem i 12 dla grupy leczonej interferonem beta 1a.

Przeprowadzono analizę statystyczną obydwu grup stosując test U Manna Whitneya, uzyskano $p = 0,40$. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami w zakresie liczby rzutów przed włączeniem do leczenia (Rycina 3).



Rycina 3. Liczba rzutów w badanych grupach pacjentów od czasu zachorowania do rozpoczęcia terapii immunomodulującej odpowiednio glatiramerem i interferonem

4.3 Oznaczenia przeciwciał wiążących u pacjentów leczonych immunomodulacyjnie

W grupie pacjentów przyjmujących interferon beta 1a stwierdzono obecność przeciwciał wiążących anti-Rebif po 24 miesiącach leczenia u 12 chorych – co stanowi 24,4% badanej grupy. Po roku utrzymywała się ona u 8 chorych czyli u 16,3%, a u 4 pacjentów zaobserwowano znaczne ich obniżenie, szczegóły przedstawiono w dalszej części rozdziału.

Stwierdzono również obecność przeciwciał anti-Rebif u 6 pacjentów (40%) leczonych octanem glatirameru.

Po roku od zakończenia terapii obecność przeciwciał anti-Rebif stwierdzano tylko u jednego chorego z tej grupy.

4.3.1 Porównanie poziomów przeciwciał anti-Rebif w obydwu pobraniach (w chwili zakończenia terapii i w rok po jej zakończeniu)

Porównano poziom przeciwciał anti-Rebif wyrażony w jednostkach arbitralnych (AU/ml) oznaczony w próbkach krwi z pierwszego pobrania – w momencie ukończenia terapii oraz z drugiego pobrania – po roku od zakończenia kuracji. Analizę przeprowadzono osobno dla grupy pacjentów leczonych octanem glatirameru oraz interferonem beta 1a.

W obu grupach stwierdzono tylko nieistotne statystycznie zmniejszenie poziomu przeciwciał w rok po zakończeniu terapii immunomodulacyjnej (Tabela 4 i 5).

Tabela 4. Porównanie poziomu przeciwciał anty-Rebif (AU/ml) w obydwu pobraniach w grupie pacjentów leczonych interferonem beta 1a (preparat Rebif)

pobranie	mediana (AU/ml)	zakres międzykwartylowy (RU/ml)	poziom istotności
pobranie I	5,145 min 0,667 max 55,367	2,551 - 9,677	p = 0,25
pobranie II	3,754 min 0,946 max 55,033	2,545 - 8,481	

Tabela 5. Porównanie poziomu przeciwciał anty-Rebif (AU/ml) w obydwu pobraniach w grupie pacjentów leczonych octanem glatirameru (preparat Copaxone)

pobranie	mediana (AU/ml)	zakres międzykwartylowy (AU/ml)	poziom istotności
pobranie I	5,617 min 1,029 max 39,877	1,495 – 20,008	p = 0,389
pobranie II	4,088 min 0,473 max 23,026	2,524 – 10,206	

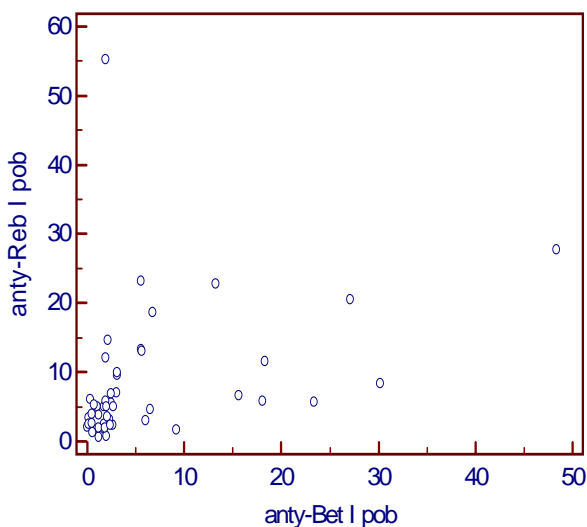
4.3.2 Korelacje pomiędzy przeciwciałami wiążącymi w grupie pacjentów leczonych immunomodulacyjnie

Przeprowadzono analizę korelacji między poszczególnymi przeciwciałami (anty-Rebif/antyBetaferon, anty-Rebif/anty-Avonex i anty-Betaferon/anty-Avonex) dla pacjentów leczonych interferonem beta 1a i octanem glatirameru.

Analizowano osobno wyniki dla pobrania pierwszego (wykonanego w momencie zakończenia terapii immunomodulującej) i drugiego (po roku od zakończenia terapii).

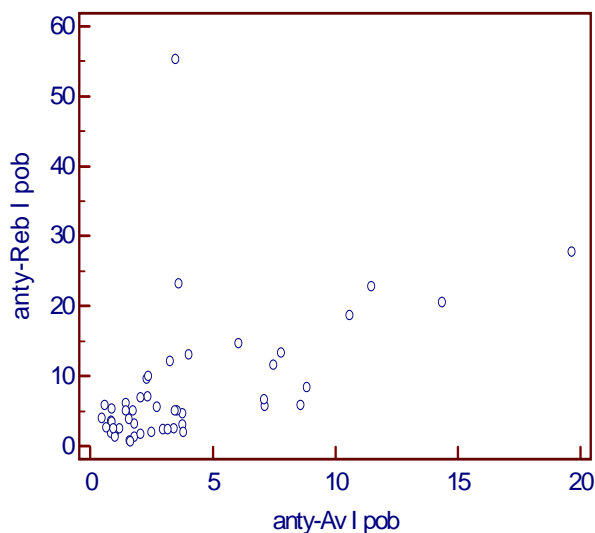
4.3.2.1a Korelacje pomiędzy poziomem przeciwciał wiążących w grupie pacjentów leczonych interferonem beta 1a (Rebif) – pobranie pierwsze (w chwili ukończenia terapii immunomodulującej)

Istotną statystycznie ($p < 0,0001$) korelację poziomu przeciwciał anti-Rebif z poziomem przeciwciał anti-Betaferon (wskaźnik korelacji Spearmana $\rho = 0,555$) przedstawiono na rycinie 4.



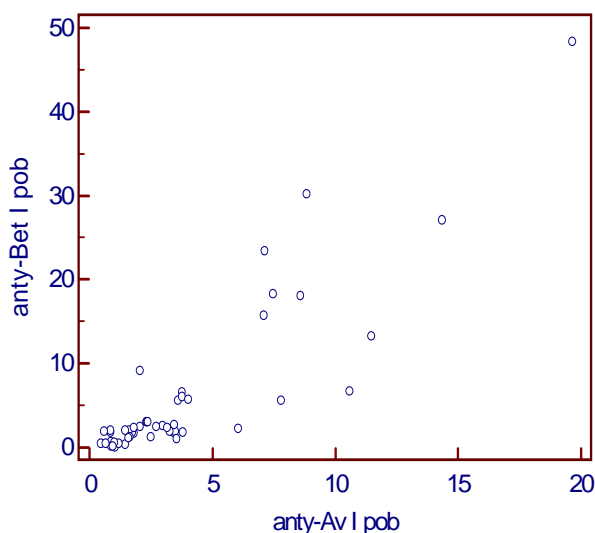
Rycina 4. Korelacja przeciwciał wiążących anti-Rebif (Anty-Reb oś y) / anti-Betaferon (anty-Bet oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących interferon beta 1a (Rebif) – pobranie pierwsze

Poziom przeciwciał anti-Rebif korelował również (wskaźnik korelacji Spearmana $\rho = 0,588$) istotnie statystycznie z poziomem przeciwciał anti-Avonex ($p < 0,0001$) (Rycina 5).



Rycina 5. Korelacja przeciwciał wiążących anti-Rebif (Anty-Reb oś y) / anti-Avonex (anty-Av oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących interferon beta 1a (Rebif) – pobranie pierwsze

Wykazano także silną korelację (wskaźnik korelacji Spearmana $\rho = 0,793$) poziomu przeciwciał anti-Betaferon z poziomem przeciwciał anti-Avonex ($p < 0,0001$) (Rycina 6).

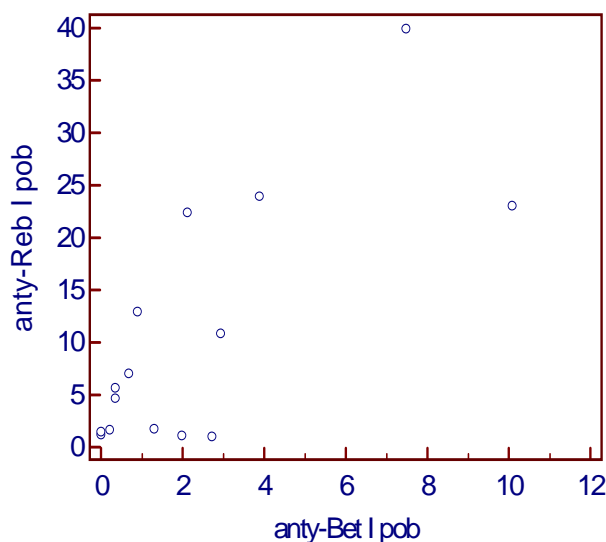


Rycina 6. Korelacja przeciwciał wiążących anti-Betaferon (Anty-Bet oś y) / anti-Avonex (anty-Av oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących interferon beta 1a (Rebif) – pobranie pierwsze

Podsumowując: jak przedstawiono na ryc. 4 – 6 stwierdzono silne wzajemne korelacje pomiędzy poziomami przeciwciał dla poszczególnych preparatów interferonów beta 1a i 1b dostępnych w Polsce i stosowanych w praktyce klinicznej do leczenia chorych na SM.

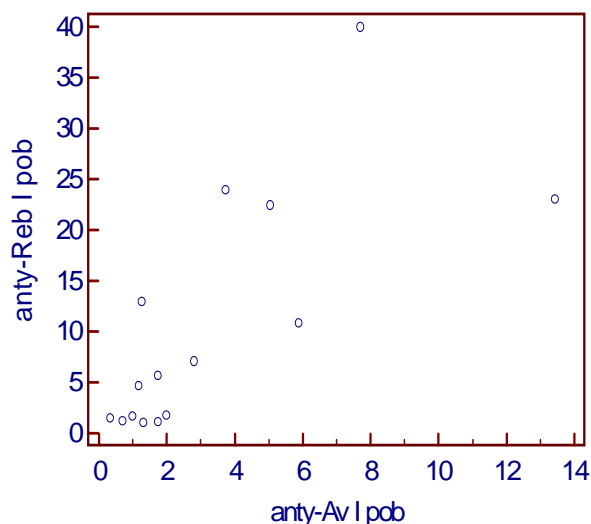
4.3.2.1b Korelacje pomiędzy poziomami przeciwciał wiążących w grupie pacjentów leczonych octanem glatirameru (Copaxone) – pobranie pierwsze (w chwili ukończenia terapii immunomodulującej)

Poziom przeciwciał anty-Rebif koreluje (wskaźnik korelacji Spearmana $\rho = 0,601$) z poziomem przeciwciał anty-Betaferon ($p = 0,018$) po zakończeniu leczenia immunomodulującego. (Rycina 7)



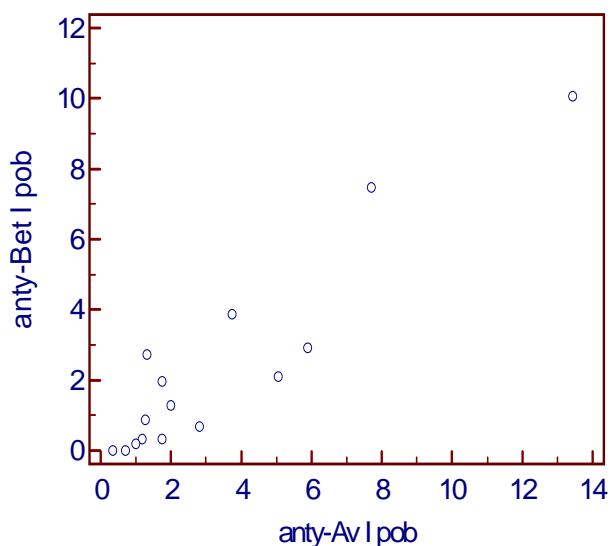
Rycina 7. Korelacja poziomu przeciwciał wiążących anty-Rebif (Anty-Reb oś y) / anty-Betaferon (anty-Bet oś x) wyrażonego jako AU/ml u pacjentów przyjmujących octan glatirameru (Copaxone) – pobranie pierwsze

Wykazano również istotnie statystycznie korelację (wskaźnik korelacji Spearmana $\rho = 0,736$) pomiędzy poziomem przeciwciał anty-Rebif a anty-Avonex ($p = 0,002$). (Rycina 8).



Rycina 8. Korelacja poziomu przeciwciał wiążących anti-Rebif (Anty-Reb oś y) / anti-Avonex (anty-Av oś x) wyrażonego jako AU/ml u pacjentów przyjmujących octan glatirameru (Copaxone) – pobranie pierwsze

Poziomy przeciwciał anti-Betaferon i anti-Avonex korelują (wskaźnik korelacji Spearmana rho = 0,88) istotnie statystycznie ($p < 0,0001$). (Rycina 9)

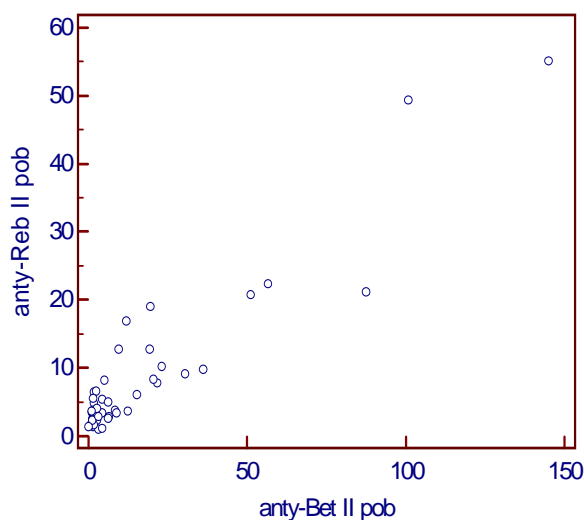


Rycina 9. Korelacja poziomów przeciwciał wiążących anti-Betaferon (Anty-Bet oś y) / anti-Avonex (anty-Av oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących octan glatirameru (Copaxone) – pobranie pierwsze

Podsumowanie: także w grupie chorych pobierających octan glatirameru stwierdzono istotne dodatnie wzajemne korelacje pomiędzy poziomem przeciwciał dla poszczególnych preparatów interferonu beta.

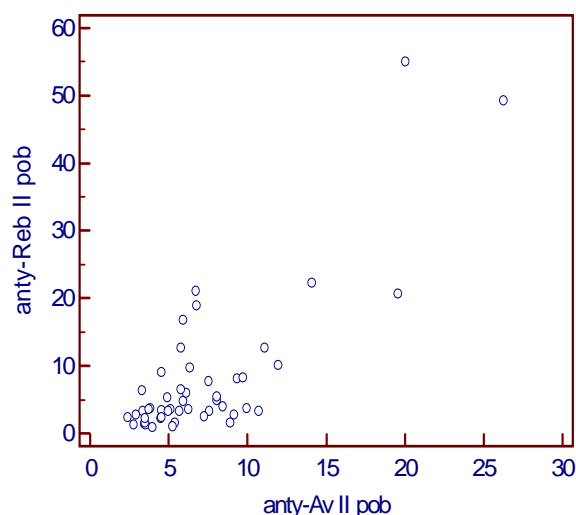
4.3.2.2a Korelacje pomiędzy poziomami przeciwciał wiążących w grupie pacjentów leczonych interferonem beta 1a (Rebif) – pobranie drugie (rok po zakończeniu terapii immunomodulującej)

Analiza statystyczna wykazała istotną ($p < 0,0001$) korelację pomiędzy poziomami przeciwciał anty-Rebif i anty-Betaferon (wskaźnik korelacji Spearmana $\rho = 0,748$) (Rycina 10).



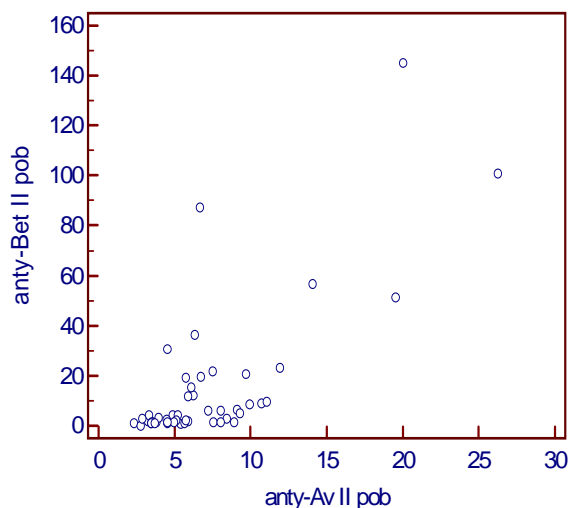
Rycina 10. Korelacja poziomów przeciwciał wiążących anty-Rebif (Anty-Reb oś y) / anty-Betaferon (anty-Bet oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących interferon beta 1a (Rebif) – pobranie drugie

Istotną statystycznie ($p < 0,0001$) korelację wykazano również pomiędzy poziomami przeciwciał anty-Rebif i anty-Avonex (wskaźnik korelacji Spearmana $\rho = 0,611$) (Rycina 11).



Rycina 11. Korelacja poziomów przeciwciał wiążących anti-Rebif (Anty-Reb oś y) / anti-Avonex (anty-Av oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących interferon beta 1a (Rebif) – pobranie drugie

Poziomy przeciwciał anti-Betaferon i anti-Avonex korelują (wskaźnik korelacji Spearmana $\rho = 0,653$) istotnie statystycznie ($p < 0,0001$) (Rycina 12).

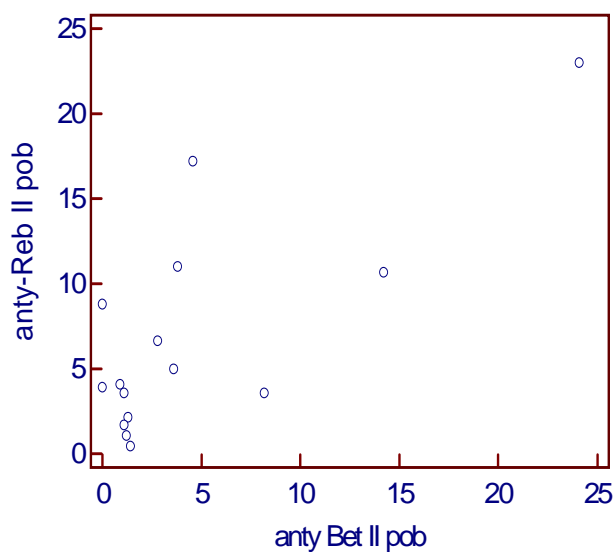


Rycina 12. Korelacja poziomów przeciwciał wiążących anti-Betaferon (Anty-Bet oś y) / anti-Avonex (anty-Av oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących interferon beta 1a (Rebif) – pobranie drugie

Podsumowanie: jak przedstawiono na rycinach 10 – 12 stwierdzono silne korelacje pomiędzy poziomami przeciwciał dla poszczególnych preparatów interferonów beta 1a i 1b także po roku od zakończenia terapii immunomodulującej.

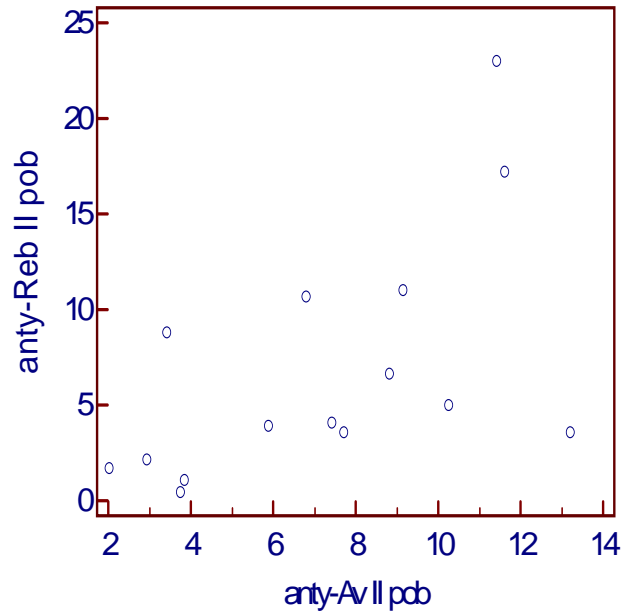
4.3.2.2b Korelacje pomiędzy poziomami przeciwciał wiążących w grupie pacjentów leczonych octanem glatirameru (Copaxone) – pobranie drugie (rok po zakończeniu terapii immunomodulującej)

Po roku od zakończenia leczenia immunomodulującego wykazano dodatnią lecz nieistotną statystycznie korelację pomiędzy poziomem przeciwciał anti-Rebif i anti-Betaferon (wskaźnik korelacji Spearmana $\rho = 0,475$; $p = 0,073$) (Rycina 13).



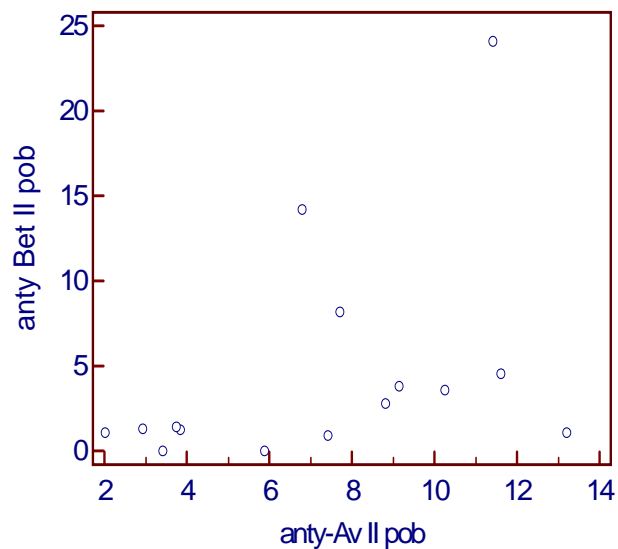
Rycina 13. Korelacja poziomów przeciwciał wiążących anti-Rebif (Anti-Reb oś y) /anti-Betaferon (anti-Bet oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących octan glatirameru (Copaxone) – pobranie drugie

Stwierdzono natomiast istotną korelację pomiędzy poziomem przeciwciał anti-Rebif i anti-Avonex (wskaźnik korelacji Spearmana $\rho = 0,579$; $p = 0,024$) (Rycina 14).



Rycina 14. Korelacja poziomów przeciwciał wiążących anti-Rebif (Anty-Reb oś y) / anti-Avonex (anty-Av oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących octan glatirameru (Copaxone) – pobranie drugie

Nie wykazano natomiast istotnej statystycznie ($p = 0,069$) korelacji pomiędzy poziomem przeciwciał anti-Betaferon i anti-Avonex (wskaźnik korelacji Spearmana $\rho = 0,481$) (Rycina 15).

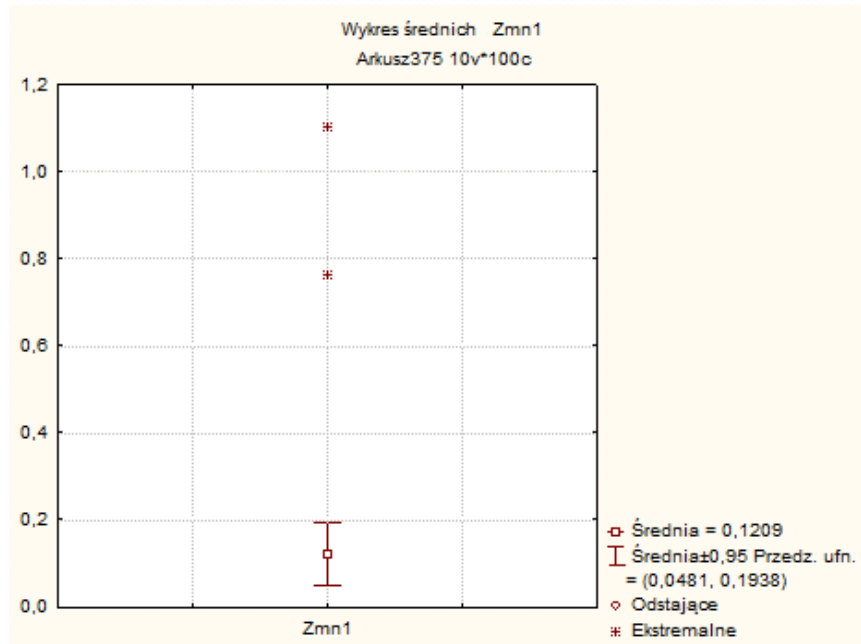


Rycina 15. Korelacja poziomów przeciwciał wiążących anti-Betaferon (Anty-Reb oś y) / anti-Avonex (anty-Av oś x) wyrażonych jako AU/ml u pacjentów przyjmujących octan glatirameru (Copaxone) – pobranie drugie

Podsumowanie: w grupie chorych leczonych octanem glatirameru po roku od zakończenia terapii stwierdzano istotną (choć słabszą niż w przypadku osób leczonych interferonem) wzajemną korelację poziomów przeciwciał anty Rebif i anty Avonex, stwierdzono także dodatnie ale nieistotne statystycznie korelacje poziomu przeciwciał dla par anty-Betaferon i anty-Avonex oraz anty-Rebif i anty-Betaferon.

4.4 Porównanie absorbancji próbek z przeciwciałami wiążącymi anty-Rebif w grupach pacjentów nieleczonych (grupy kontrolnej) i leczonych immunomodulacyjnie

Oznaczenie przeciwciał wiążących wykonano również dla grupy 35 pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane, ale nie leczonych wcześniej immunomodulacyjnie. Przeprowadzono analizę danych testem Grubbsa, w którym stwierdzono obecność danych odstających (Rycina 16). Wobec powyższego porównanie absorbancji przeciwciał anty-Rebif u pacjentów leczonych i nieleczonych przeprowadzono dwukrotnie – z uwzględnieniem i po usunięciu danych odstających.



Rycina 16. Analiza testem Grubbsa grupy 35 pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie. Zaznaczono wartości odstające

4.4.1 Porównanie absorbancji próbek z przeciwciałami anty-Rebif u pacjentów leczonych i nieleczonych immunomodulacyjnie (z uwzględnieniem wyników pochodzących od 35 pacjentów nieleczonych)

Testem U Manna Whitneya porównano absorbancje próbek z przeciwciałami anty-Rebif w grupie pacjentów leczonych i nie leczonych immunomodulacyjnie.

W grupie pacjentów poddanych leczeniu immunomodulującemu wykorzystano dane uzyskane z pobrania pierwszego.

Wyniki grupy chorych leczonych interferonem beta 1a (Rebif) dane przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Porównanie wartości absorbancji próbek z przeciwciałami wiążącymi anty-Rebif w grupie pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie i leczonych interferonem beta 1a (Rebif)

grupa	mediana	zakres międzykwartylowy	poziom istotności
pacjenci nieleczeni (n = 35)	0,072 min 0,006 max 1,101	0,032 – 0,105	p = 0,1
pacjenci leczeni interferonem beta (n = 49)	0,092 min 0,012 max 0,996	0,046 – 0,174	

Wyniki chorych leczonych octanem glatirameru przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Porównanie wartości absorbancji próbek z przeciwciałami wiążącymi anty-Rebif w grupie pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie i leczonych octanem glatirameru (Copaxone)

grupa	mediana	zakres międzykwartyłowy	poziom istotności
pacjenci nieleczeni (n = 35)	0,072 min 0,006 max 1,101	0,032 – 0,105	p = 0,391
pacjenci leczeni octanem glatirameru (n = 15)	0,101 min 0,019 max 0,0717	0,027 – 0,36	

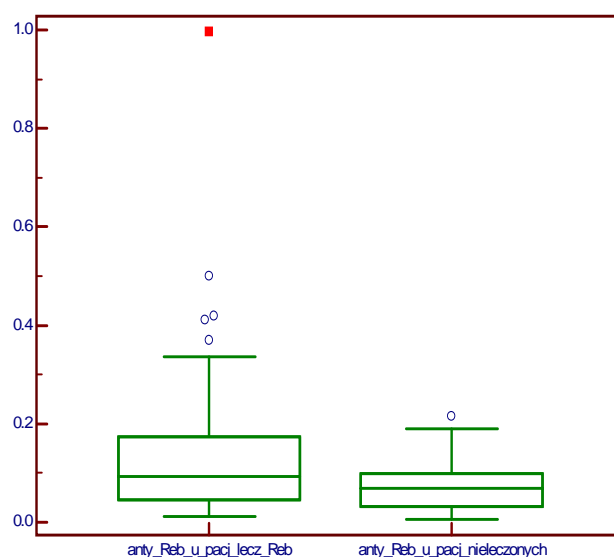
Jakkolwiek poziom przeciwciał anty-Rebif w grupie pacjentów leczonych immunomodulacyjnie był nieco wyższy niż w grupie chorujących na SM ale nie leczonych, to jednak nie wykazano istotnych statystycznie różnic w zakresie poziomów wartości absorbancji próbek z przeciwciałami pomiędzy w/w grupami.

4.4.2 Porównanie absorbancji próbek z przeciwciałami anty-Rebif u pacjentów leczonych i nieleczonych immunomodulacyjnie (z uwzględnieniem wyników pochodzących od 33 pacjentów nieleczonych po usunięciu 2 danych odstających)

Analogiczną analizę przeprowadzono dla porównania pacjentów leczonych i nieleczonych immunomodulacyjnie po wyeliminowaniu dwóch odstających pomiarów absorbancji.

Tabela 8. Porównanie wartości absorbancji próbek badanych przeciwciał wiążących anty-Rebif w grupie pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie i leczonych interferonem beta 1a (Rebif)

grupa	mediana	zakres międzykwartyłowy	poziom istotności
pacjenci nieleczeni (n = 33)	0,069 min 0,006 max 0,216	0,031 – 0,099	p = 0,03
pacjenci leczeni interferonem beta (n = 49)	0,093 min 0,012 max 0,996	0,046 – 0,174	



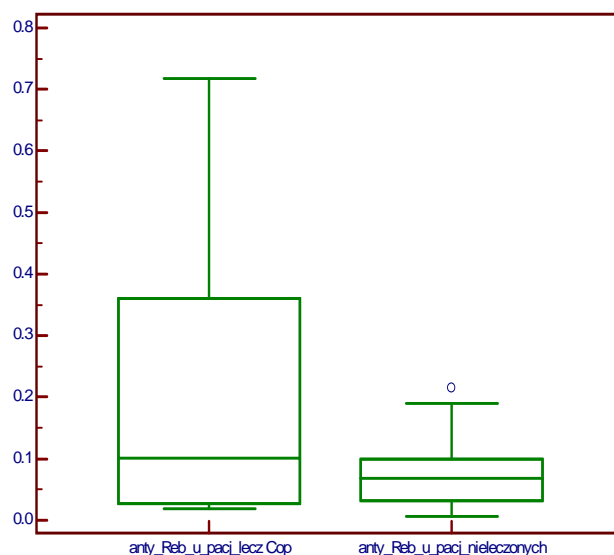
Rycina 17. Absorbancja badanych próbek przeciwciał anty-Reb u pacjentów leczonych interferonem beta 1a (Rebif) – wykres po stronie lewej i chorych nieleczonych immunomodulacyjnie – wykres po stronie prawej

U chorych leczonych interferonem beta 1a (Rebif) stwierdzono wyższe ($p = 0,03$) wartości absorbancji próbek badanych w porównaniu do pacjentów nie leczonych – wyniki obrazuje tabela 8 i rycina 17.

Poniżej w tabeli 9 i na rycinie 18 przedstawiono porównanie wartości absorbancji badanych próbek przeciwciał wiążących anty-Rebif w grupie chorych nieleczonych immunomodulacyjnie i leczonych octanem glatirameru (Copaxone).

Tabela 9. Porównanie wartości absorbancji badanych próbek przeciwciał wiążących anty-Rebif w grupie pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie i leczonych octanem glatirameru (Copaxone)

grupa	mediana	zakres międzykwartyłowy	poziom istotności
pacjenci nieleczeni (n = 33)	0,069 min 0,006 max 0,216	0,031 – 0,099	p = 0,217
pacjenci leczeni octanem glatirameru (n = 15)	0,101 min 0,019 max 0,717	0,027 – 0,36	



Rycina 18. Absorbancja badanych próbek przeciwciał anty-Reb u pacjentów leczonych octanem glatirameru (Copaxone) –wykres po stronie lewej i chorych nieleczonych immunomodulacyjnie – po stronie prawej

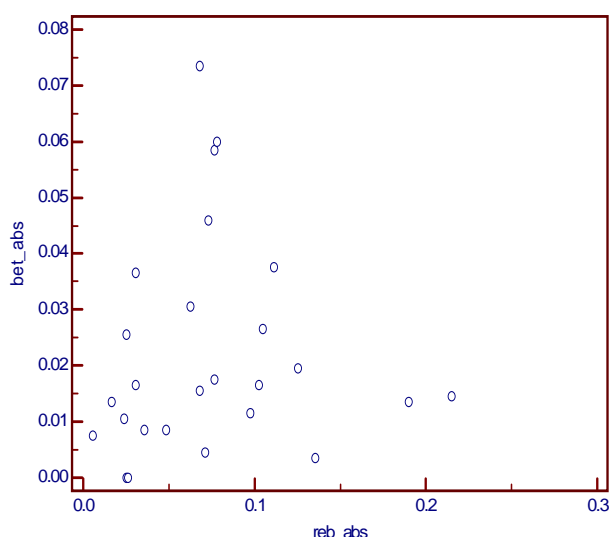
Po usunięciu wartości odstających nie wykazano także różnic wartości absorbancji badanych próbek u pacjentów leczonych octanem glatirameru (Copaxone) i pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie (p = 0,217).

Podsumowując, w powyższej analizie stwierdzono, że u chorych na SM leczonych interferonami absorbancja badanych próbek jest istotnie statystycznie wyższa niż w grupie porównawczej nie leczonej interferonami (po usunięciu wartości odstających). Zależności takiej nie stwierdzono dla grupy leczonej octanem glatirameru i nieleczonej immunomodulacyjnie.

4.5 Korelacje absorbcyjności próbek badanych w kierunku obecności przeciwciał anti-Rebif, anti-Betaferon i anti-Avonex w grupie pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie

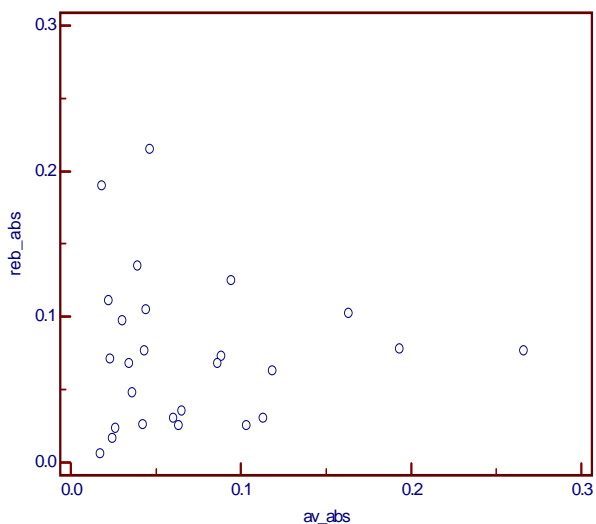
Przeprowadzono analizę korelacji absorbcyjności próbek badanych w kierunku obecności przeciwciał anti-Rebif, anti-Betaferon i anti-Avonex w grupie chorych nie leczonych immunomodulacyjnie. Zastosowano test Spearmana ze względu na brak zgodności z rozkładem normalnym stwierdzonym w teście D'Agostino-Pearsona.

Nie wykazano istotnej statystycznie ($p = 0,178$) korelacji pomiędzy absorbcyjnościami próbek badanych pod kątem obecności przeciwciał anti-Rebif i anti-Betaferon (współczynnik korelacji Spearmana $\rho = 0,273$) (Rycina 19).



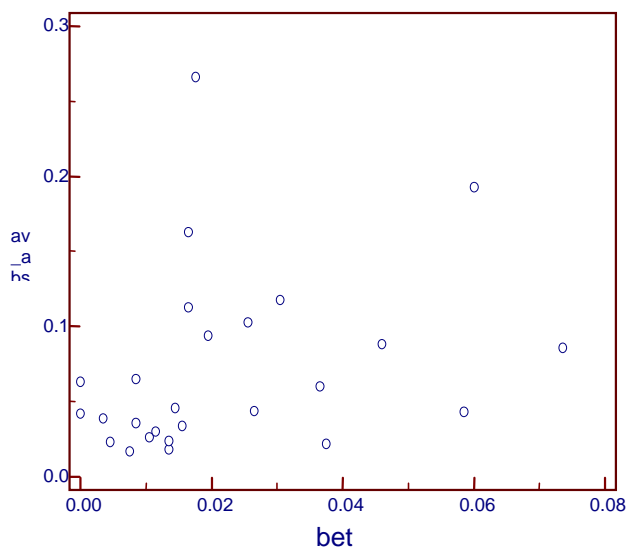
Rycina 19. Korelacja absorbcyjności próbek badanych na obecność przeciwciał wiążących anti-Betaferon (Bet abs - oś Y) / anti-Rebif (Reb abs - oś X) u pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie

Również absorbcyjności próbek badanych na obecność przeciwciał anti-Rebif i anti-Avonex nie wykazały istotnej statystycznie ($p = 0,762$) korelacji (współczynnik korelacji Spearmana $\rho = 0,072$) (Rycina 20).



Rycina 20. Korelacja absorbancji próbek badanych na obecność przeciwciał wiążących anti-Rebif (reb abs oś Y) / anti-Avonex (av abs oś X) u pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie

Natomiast absorbancje próbek badanych w kierunku obecności przeciwciał anti-Avonex i anti-Betaferon – korelowały (współczynnik korelacji Spearmana $\rho = 0,469$) istotnie statystycznie ($p = 0,016$) - rycina 21.



Rycina 21. Korelacja absorbancji próbek badanych na obecność przeciwciał wiążących anti-Avonex (av abs oś Y) / anti-Betaferon (bet abs oś X) u pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie

Podsumowując - nie stwierdzano korelacji pomiędzy absorbancjami próbek badanych na obecność przeciwciał przeciw dostępnym w Polsce preparatom interferonu beta - Rebif i Avonex w grupie osób nie leczonych immunomodulacyjnie. Natomiast wykazano umiarkowaną – istotnie statystyczną dodatnią korelację dla Avonexu i Betaferonu.

4.6 Związek między stanem klinicznym pacjentów i liczbą rzutów a poziomem przeciwciał wiążących anty-Rebif

4.6.1 Związek między stanem klinicznym wyrażonym w skali EDSS a poziomem przeciwciał anty-Rebif

Przeprowadzono analizę korelacji między poziomem przeciwciał anty - Rebif a stanem klinicznym pacjentów leczonych preparatem Rebif ocenionym w skali EDSS w różnych punktach czasowych.

W żadnej z analiz - przeprowadzonych po zakończeniu terapii ani w 1 rok później nie wykazano korelacji między stanem klinicznym chorych a poziomem przeciwciał wiążących anty-Rebif (w momencie zakończenia terapii dla pacjentów leczonych interferonem beta 1a $p = 0,573$; dla pacjentów leczonych octanem glatirameru $p = 0,794$; rok po zakończeniu terapii - dla pacjentów leczonych interferonem beta 1a $p = 0,078$; dla pacjentów leczonych Copaxonem $p = 0,354$).

Pozostałe aspekty związku stanu klinicznego pacjentów wyrażonego w skali EDSS i poziomu przeciwciał wiążących anty-Rebif przedstawiono a aneksie niniejszej pracy.

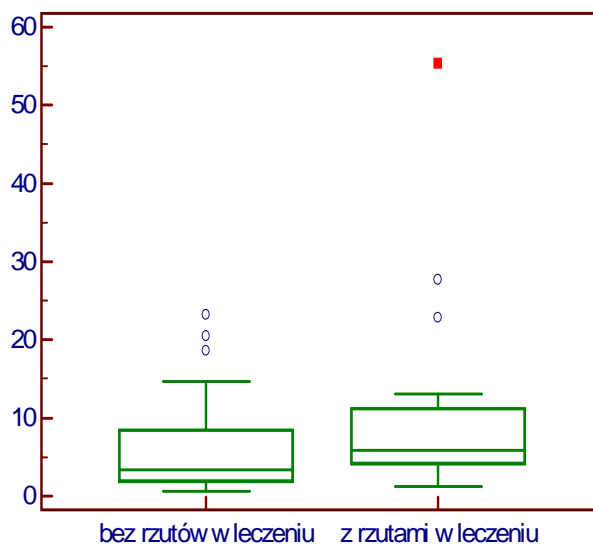
4.6.2 Związek między liczbą rzutów a poziomem przeciwciał anty-Rebif

Porównano poziom przeciwciał anty-Rebif u pacjentów, u których wystąpiły rzuty choroby oraz u chorych wolnych od rzutów.

U chorych leczonych interferonem beta i z rzutami choroby w ciągu 2 lat terapii poziom przeciwciał anty-Rebif stwierdzony w chwili jego zakończenia (pobranie I) był istotnie statystycznie wyższy niż u osób bez rzutów ($p = 0,035$) – wyniki obrazuje tabela 10 i rycina 22.

Tabela 10. Analiza poziomu przeciwciał anti-Rebif u pacjentów leczonych interferonem beta 1a (Rebif) w grupie, w której wystąpił minimum 1 rzut choroby podczas 2 lat terapii i grupie wolnej od rzutów

grupa (n)	mediana (AU/ml)	zakres międzykwartylowy	poziom istotności
bez rzutów (n = 26)	3,323 min 0,667 max 23,276	2,002 – 8,426	p = 0,035
z rzutami (n = 23)	5,868 min 1,279 max 55,367	4,199 – 11,221	

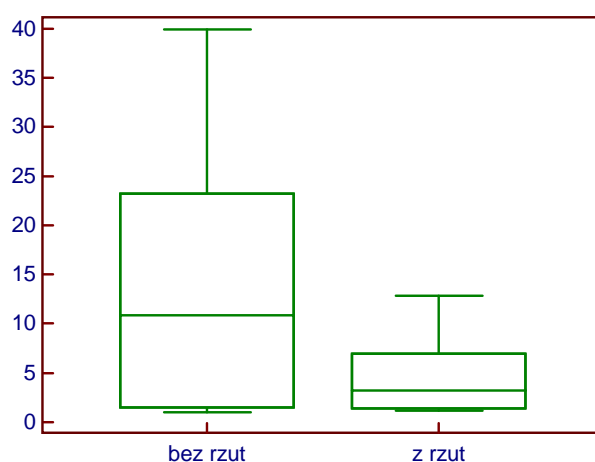


Rycina 22. Analiza poziomu przeciwciał wyrażonych jako AU/ml w grupie wolnej od rzutów w trakcie 2-letniej terapii (wykres po stronie lewej) oraz z minimum 1 rzutem choroby (wykres po stronie prawej) u pacjentów leczonych interferonem beta 1a (Rebif)

U chorych leczonych octanem glatirameru nie wykazano statystycznie istotnych różnic poziomu przeciwciał ($p = 0,388$) - tabela 11 i rycina 23.

Tabela 11. Analiza poziomu przeciwciał anty-Rebif u pacjentów leczonych octanem glatirameru (Copaxone) w grupie, w której wystąpił minimum 1 rzut choroby podczas 2 lat terapii i grupie wolnej od rzutów

grupa (n)	mediana (AU/ml)	zakres międzykwartyłowy	poziom istotności
bez rzutów (n = 9)	10,846 min 1,029 max 39,87	1,495 – 23,199	p = 0,388
z rzutami (n = 6)	3,198 min 1,168 max 12,874	1,446 – 6,98	



Rycina 23. Analiza poziomu przeciwciał wyrażonych jako AU/ml w grupie wolnej od rzutów w trakcie 2-letniej terapii (wykres po stronie lewej) oraz z minimum 1 rzutem choroby (wykres po stronie prawej) u pacjentów leczonych octanem glatirameru (Copaxone)

Natomiast w przypadku analizy dotyczącej liczby rzutów w okresie 1 roku od zakończenia terapii i poziomu przeciwciał anty-Rebif stwierdzonych w II pobraniu nie wykazano istotnych statystycznie różnic :

- u chorych leczonych interferonem beta 1a ($p = 0,4$),
- ani u chorych leczonych octanem glatirameru ($p = 0,596$).

Podsumowanie: w grupie chorych leczonych interferonem beta 1a (Rebif) stwierdzono istotnie statystycznie niższy poziom przeciwciał anty-Rebif u pacjentów wolnych od rzutów w porównaniu z chorymi z przynajmniej jednym rzutem choroby podczas leczenia (Tab. 12); nie stwierdzono natomiast istotnie statystycznie różnic poziomu przeciwciał anty-Rebif u chorych przyjmujących octan glatirameru (Copaxone) w grupach bez rzutów i z rzutami w ciągu 2 lat terapii.

Natomiast w rok po zakończeniu terapii nie stwierdzono istotnie statystycznej zależności pomiędzy liczbą rzutów a poziomami przeciwciał anty-Rebif w grupach leczonych octanem glatirameru i interferonem beta 1a.

Pozostałe wyniki badań korelacji klinicznych i poziomu przeciwciał przedstawiono w aneksie.

4.7 Ocena stanu klinicznego oraz liczby rzutów w trakcie i po zakończeniu terapii immunomodulującej

4.7.1 Analiza stanu niepełnosprawności wyrażonego w skali EDSS w trakcie terapii immunomodulującej oraz po jej zakończeniu

W zakresie dynamiki zmian stanu klinicznego w trakcie 2 –letniej terapii stan neurologiczny pacjentów wyrażony w skali EDSS w całej badanej grupie nie zmienił się u 26 chorych co stanowi 40,6% pacjentów.

Punktacja EDSS wzrosła u 24 chorych (37,5%), a obniżyła się u 14 chorych (21,9%) (Tabela 12).

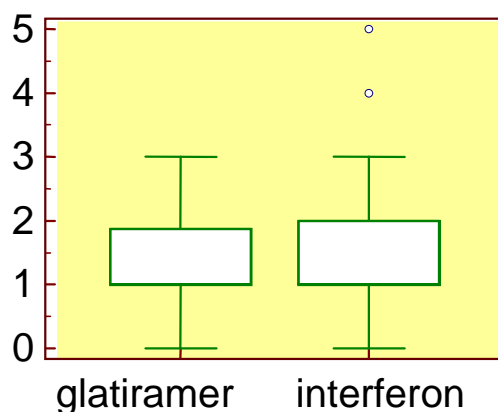
Tabela 12. Zmiana stanu klinicznego pacjentów w trakcie 2 lat terapii immunomodulującej

grupa	punktacja EDSS nie zmieniła się (n, %)	punktacja EDSS zwiększyła się (n, %)	punktacja EDSS zmniejszyła się (n, %)
leczone glatiramerem	4 (26,7%)	6 (40,0%)	5 (33,3%)
leczone interferonem	22 (44,9%)	18 (36,7%)	9 (18,4%)
suma	26 (40,6%)	24 (37,5%)	14 (21,9%)

Natomiast minimalna wartość EDSS w całej badanej grupie wyniosła 0, maksymalna 5,0, mediana równa 1,0 punkt.

W grupie chorych przyjmujących glatiramer minimalna wartość EDSS wyniosła 0, maksymalna 3,0, mediana 1,0. Odpowiednio w grupie leczonej interferonem beta 1a wartości te wynosiły: minimalna 0, maksymalna 5,0; mediana 1 (Rycina 24).

Wartość p wyliczona testem U Manna Whitneya wyniosła $p = 0,86$.



Rycina 24. Wartości EDSS w grupie pacjentów leczonych interferonem beta 1a i octanem glatirameru w momencie zakończenia 2-letniej terapii (dla obu wykresów mediana wynosi 1)

Podsumowując, jak przedstawiono na ryc. 24, po 2 latach terapii immunomodulującej nie stwierdzono istotnej statystycznie zmiany stanu klinicznego badanych chorych wyrażonej w skali EDSS pomiędzy grupami chorych leczonych badanymi lekami.

Porównano wartości wyników oceny uzyskane dla całej badanej grupy w skali EDSS w momencie rozpoczęcia terapii, w chwili jej zakończenia i po kolejnym roku od zakończenia leczenia.

Wartości EDSS w momencie rozpoczęcia terapii i chwili jej zakończenia dla całej badanej grupy nie różniły się statystycznie ($p = 0,06$).

Natomiast wartości EDSS w momencie zakończenia terapii i po kolejnym roku wskazywały na niewielkie (o 0,5 punktu), ale istotne statystycznie pogorszenie stanu klinicznego wyrażonego w punktacji EDSS po przerwaniu leczenia immunomodulującego ($p = 0,001$) (Tabela 13).

Tabela 13. Analiza stanu niepełnosprawności pacjentów wyrażona w skali EDSS w momencie rozpoczęcia terapii, chwili jej zakończenia i po kolejnym roku

EDSS	mediana	minimum / maksimum		poziom istotności
w momencie rozpoczęcia terapii	1,0	0,0	4,0	p = 0,06
w momencie zakończenia terapii	1,0	0,0	5,0	
rok po zakończeniu terapii	1,5	0,0	5,0	p = 0,001

Podobny wynik uzyskano dla analizy przeprowadzonej w podgrupach zależnie od stosowanego preparatu.

W grupie pacjentów leczonych glatiramerem :

- wartości EDSS w momencie rozpoczęcia terapii i bezpośrednio po jej zakończeniu nie różniły się statystycznie ($p = 0,765$);
- wartości EDSS ocenione bezpośrednio po zakończeniu leczenia były istotnie statystycznie niższe niż po 1 roku od przerwania terapii immunomodulującej ($p = 0,012$) (Tabela 14).

Tabela 14. Analiza stanu niepełnosprawności pacjentów leczonych octanem glatirameru (Copaxone) wyrażona w skali EDSS w chwili rozpoczęcia oraz zakończenia terapii immunomodulującej i po kolejnym roku

EDSS	mediana	minimum / maksimum		poziom istotności
w momencie rozpoczęcia terapii	1,0	0,0	3,5	p = 0,765
w momencie zakończenia terapii	1,0	0,0	3,0	
rok po zakończeniu terapii	1,5	1,0	3,0	p = 0,012

Natomiast w grupie pacjentów leczonych interferonem beta 1a :

- wartości EDSS stwierdzone w chwili rozpoczęcia terapii immunomodulującej i bezpośrednio po jej ukończeniu różniły się na granicy istotności statystycznej – $p = 0,046$;
- wartości EDSS stwierdzone po 1 roku od zakończenia leczenia immunomodulującego były istotnie statystycznie wyższe niż bezpośrednio po przerwaniu terapii ($p = 0,014$) (Tabela 15).

Tabela 15. Analiza stanu niepełnosprawności pacjentów leczonych interferonem beta 1a (Rebif) wyrażona w skali EDSS w chwili rozpoczęcia oraz zakończenia terapii immunomodulującej i po kolejnym roku.

EDSS	mediana	minimum / maksimum		poziom istotności
w momencie rozpoczęcia terapii	1,0	0,0	4,0	p = 0,046
w momencie zakończenia terapii	1,0	0,0	5,0	
rok po zakończeniu terapii	1,5	0,0	5,0	p = 0,014

4.7.2 Liczba rzutów stwardnienia rozsianego w trakcie oraz po roku od zakończenia terapii immunomodulującej

W grupie 64 osób leczonych immunomodulacyjnie w trakcie terapii u 35 osób (54,7%) nie wystąpił żaden rzut choroby. Jeden rzut wystąpił u 23 pacjentów (35,9%) a dwa u 6 chorych (9,4%). Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy liczbą rzutów u chorych leczonych interferonem beta 1a, a octanem glatirameru, $p = 0,61$ (Tabela 16).

Tabela 16. Charakterystyka badanych grup pod względem liczby rzutów choroby, które wystąpiły w trakcie 2 lat terapii

grupa	bez rzutów (n, %)	1 rzut (n, %)	2 rzuty (n, %)
leczona glatiramerem	9 (60%)	5 (33,3%)	1 (6,7%)
leczona interferonem	26 (53,1%)	18 (36,7%)	5 (10,2%)
suma	35 (54,7%)	23 (35,9%)	6 (9,4%)

W ciągu jednego roku od zakończenia terapii immunomodulującej u 42 chorych (65,6%) nie wystąpił żaden rzut choroby, u 18 pacjentów wystąpił 1 rzut (28,1%), a u 4 pacjentów wystąpiły 2 rzuty stwardnienia rozsianego (6,3%).

Liczbę rzutów w obydwu badanych grupach przedstawia tabela nr 17.

Tabela 17. Liczba rzutów, które wystąpiły w badanej grupie pacjentów w ciągu roku od zakończenia terapii immunomodulującej.

grupa	bez rzutów	1 rzut	2 rzuty
leczona glatiramerem (n = 15)	9 (60%)	5 (33,3%)	1 (6,7%)
leczona interferonem (n = 49)	33 (67,4%)	13 (26,5%)	3 (6,1%)
Suma (n = 64)	42 (65,6%)	18 (28,1%)	4 (6,3%)

Liczba rzutów, które wystąpiły w obydwu grupach nie różniła się statystycznie w sposób istotny ($p = 0,63$).

4.7.3 Porównanie rocznego wskaźnika rzutów w trakcie i po zakończeniu terapii

Obliczono roczny wskaźnik rzutów dla badanych pacjentów w trakcie i po zakończeniu terapii immunomodulującej.

W trakcie terapii wyniósł on odpowiednio:

- dla pacjentów leczonych interferonem beta 1a - 0,29
- dla pacjentów leczonych octanem glatirameru - 0,23
- sumaryczny dla całej badanej grupy - 0,27

Natomiast po 1 roku od zakończenia leczenia przedstawia się on następująco:

- dla pacjentów leczonych interferonem beta 1a - 0,39
- dla pacjentów leczonych octanem glatirameru - 0,47
- sumaryczny dla całej badanej grupy - 0,41.

Porównując roczny wskaźnik rzutów testem Wilcoxon'a nie stwierdzono istotnie statystycznej różnicy zarówno w przypadku całej badanej grupy ($p = 0,14$), jak i pacjentów leczonych interferonem beta 1a ($p = 0,31$) oraz octanem glatirameru ($p = 0,25$).

5. Dyskusja

5.1 Ogólna charakterystyka grupy badanej

Leczenie immunomodulujące interferonem beta jest pierwszym, stosowanym na szeroką skalę postępowaniem, które korzystnie wpływa na rokowanie i zmienia naturalny przebieg choroby [65-69]. W Polsce od kilku lat jest ono prowadzone w ramach programu Narodowego Funduszu Zdrowia.

Przedstawione badanie prowadzone było w początkowym okresie działania Narodowego Programu Leczenia Immunomodulującego. Objętych wówczas leczeniem była zdecydowanie mniejsza niż obecnie liczba osób (w ZOZ MSWiA im. L. Bierkowskiego – leczonych wówczas było 70 chorych, a obecnie leczonych jest 240 pacjentów). Według ówczesnych przepisów NFZ także czas terapii był krótszy i wynosił 24 miesiące, bez możliwości przedłużenia o kolejne 12 miesięcy.

W przeprowadzonym badaniu w trakcie dwuletniej obserwacji pacjentów pozostających w leczeniu immunomodulującym i rok po jego zakończeniu oceniono liczbę rzutów i postęp niepełnosprawności wyrażony w skali EDSS. Pacjenci leczeni byli dwoma lekami – interferonem beta 1a (Rebif) – 49 chorych oraz octanem glatirameru (Copaxonem) – 15 pacjentów. W badanej grupie było 49 kobiet (70,3%) oraz 19 mężczyzn (29,7%) – dane te są zgodne z odsetkowym udziałem obu płci wśród osób leczonych podawanymi w literaturze, a także z danymi przedstawionym na stronie internetowej Polskiego Towarzystwa Stwardnienia Rozsianego [83].

Spośród badanych chorych 95,3% miało nie więcej niż 50 lat, a 62,5% mieściło się w przedziale 18-35 lat (średni wiek pacjentów w grupie przyjmującej octan glatirameru wynosił 34,1 lat; a u leczonych interferonem beta 1a 32,8 lat).

Stosowane w Polsce kryteria kwalifikacji do leczenia immunomodulującego do tej pory faworyzowały osoby młode. Tak więc wiek chorych w badanej grupie leczonej immunomodulacyjnie uwarunkowany jest w znacznej mierze kryteriami kwalifikacji do tego typu terapii. W Polsce w 2010 roku 90% pacjentów leczonych w ramach programu NFZ miało 19-50 lat, w tym 56% 19-35 lat [83]. Można więc stwierdzić, że badana grupa jest reprezentatywna w stosunku do populacji chorych na SM leczonych immunomodulacyjnie w Polsce.

Średni czas trwania choroby w badanej grupie wyniósł $7,8 \pm 4,0$ roku. Mediana EDSS wyniosła 1,0 (minimum 0, maksimum 4,0). Wynika ona w głównej mierze z warunków kwalifikacji do leczenia - w pierwszym rzędzie leczeni byli chorzy młodzi w bardzo dobrym stanie klinicznym. Średnia liczba rzutów w badanej grupie wyniosła 3 i nie różniła się statystycznie w grupie chorych leczonych interferonem beta 1a i octanem glatirameru.

W odniesieniu do prezentowanych powyżej wyników warto zauważyć, że obecnie trwają prace nad zmianą kryteriów kwalifikacji do leczenia immunomodulującego – ostatnio zgodnie z postulatami środowiska lekarzy i pacjentów (od 15.12.2011r) zniesiono kryterium wieku. Umożliwi to podjęcie leczenia także przez osoby nieco starsze, ale w dobrym stanie klinicznym.

5.2 Przeciwciała przeciwko interferonom

Zjawisko immunogenności interferonów stosowanych w lecznictwie (zarówno alfa, jak i beta) znane jest od wielu lat. Dlatego wraz z początkiem terapii immunomodulującej badano jej występowanie. Jak przedstawiono we wstępie pracy, wyróżnia się dwa rodzaje przeciwciał przeciwko interferonom – interferony wiążące i neutralizujące, które oznaczane są różnymi metodami [75,76]. Według europejskich rekomendacji oznaczanie poziomu przeciwciał neutralizujących powinno być poprzedzone oznaczeniem przeciwciał wiążących [75].

Nie ma jednoznacznych wytycznych odnośnie najlepszej metody oznaczania przeciwciał. Wskazuje się jedynie na konieczność przeprowadzania badań w wyspecjalizowanych laboratoriach [75].

Powszechnie przyjętą i szeroko stosowaną metodą oznaczania przeciwciał wiążących jest metoda ELISA, zastosowana także w niniejszej pracy [75,76,84,85]. Zgodnie z obserwacjami autorów amerykańskich i kanadyjskich wykazujących, że zastosowanie jako antygeny leku, którym pacjent był leczony zwiększa wiarygodność testu [85] w niniejszej pracy wykorzystano preparaty interferonów beta dostępnych w Polsce.

Postacie farmakologiczne interferonu beta wykorzystywane w leczeniu różnią się swoją immunogennością, dlatego w zależności od stosowanego preparatu różny jest odsetek chorych, u których stwierdza się podwyższony poziom przeciwciał [85,86].

Przeciwciała wiążące występują u większej liczby pacjentów niż przeciwciała neutralizujące. Większość danych literaturowych wskazuje na występowanie przeciwciał wiążących u 5-30%

pacjentów przyjmujących Avonex, 25-45% leczonych Rebifem i 50-80% leczonych Betaferonem [87-91]. Przeciwciała neutralizujące stwierdzano u 2-6% leczonych Avonexem, 12-28% przyjmujących Rebif oraz 28-47% leczonych Betaferonem, [86,92].

W badaniu przeprowadzonym na 1144 surowicach chorych na SM obecność przeciwciał wiążących stwierdzono u 23%, a wśród nich u 55% stwierdzono obecność przeciwciał neutralizujących [85] (Tabela 18).

Tabela 18. Częstość występowania przeciwciał wiążących i neutralizujących w zależności od stosowanego w terapii immunomodulującej interferonu beta wg Prince i wsp. Podano odsetek osób z dodatnimi przeciwciałami BAb wśród wszystkich badanych chorych, a w nawiasach odsetek osób z dodatnimi przeciwciałami neutralizującymi wyłącznie wśród chorych z dodatnimi przeciwciałami wiążącymi (BAb+) [85]

sposób leczenia i liczba chorych	przeciwciała wiążące BAb	przeciwciała neutralizujące NAb
Avonex – 500 pacjentów	10,6%	6,8% (64% z Bab+)
Rebif – 310 pacjentów	30,6%	17,4% (56,8% z Bab+)
Betaferon - 334 pacjentów	34,7%	16,8% (48,3% z Bab+)
W sumie 1144 chorych	23,1%	54,5% (12,6% z Bab+)

Wyniki publikowanych dotąd badań wykazują, że interferon beta 1b jest bardziej immunogenny niż interferon beta1a [77,86], a interferon beta 1a przyjmowany podskórnie bardziej niż ten stosowany domięśniowo. Związane jest to z różnicą w budowie interferonów (np. brakiem glikozylacji interferonu beta 1b), różnicą w strukturze czwartorzędowej oraz modyfikacjami posttranslacyjnymi. Także dawka preparatu oraz częstość i sposób jego podawania także mogą mieć znaczenie przy powstawaniu przeciwciał [86].

Szeroko badana jest także kinetyka powstawania przeciwciał oraz ich zanikanie. Kivisakk i wsp. stwierdzili, że powstawanie przeciwciał wiążących wyprzedza powstawanie przeciwciał neutralizujących o około 3 miesiące [93].

W przypadku interferonu beta 1b obserwowane jest szybsze narastanie poziomu przeciwciał – obecne są one już w 3 miesiącu leczenia, osiągają maksymalny poziom w 6-12 miesiącu leczenia po czym ich stan osiąga stan zbliżony do plateau z tendencją do zmniejszania mian i zanikania.

Podobnie przedstawia się kinetyka przeciwciał neutralizujących, jednak z pewną różnicą wynikającą z przesunięcia w czasie - pojawiają się one około 6 miesiąca leczenia i osiągają szczyt w ciągu 12 – 24 miesiąca terapii po czym ich miano się obniża [76,90]. Co ważne, w przypadku leczenia interferonem beta 1b częściej niż przy leczeniu interferonem beta 1a stwierdza się przechodzenie pacjentów z grupy NAb+ do NAb- [94,95].

Natomiast w przypadku interferonu beta 1a obserwuje późniejsze pojawianie się przeciwciał – przeciwciała wiążące wykrywane są w około 6 miesiącu od rozpoczęcia terapii i osiągają maksimum około 15 – 18 miesiąca; następnie dochodzi do stabilizacji i ich utrzymywania się na stałym poziomie od około 21-24 miesiąca. Przeciwciała neutralizujące pojawiają się jeszcze później – około 9 miesiąca, osiągając maksimum również w 15-18 miesiącu terapii. Podobnie jak w wypadku przeciwciał wiążących, od 24 miesiąca ich stan się stabilizuje i osiąga plateau z mniejszą tendencją do zanikania niż ma to miejsce w przypadku terapii interferonem beta 1b [90,94]. Istnieją jednak doniesienia, że samo zjawisko tolerancji bardziej związane jest z mianem przeciwciał niż z preparatem używanym podczas terapii [96,97]. Badanie kanadyjskie przeprowadzone na grupie 129 chorych leczonych interferonem beta 1b i 88 pacjentów interferonem beta 1a podawanym podskórnie wykazało, że w trakcie długotrwałej terapii (okres obserwacji > 60 miesięcy) przeciwciała wiążące stwierdzone u pacjentów leczonych Betaferonem mają tendencję do zanikania, natomiast u chorych przyjmujących Rebif utrzymują się na stałym poziomie [84].

W niniejszym badaniu przeprowadzonym u chorych leczonych interferonem beta 1a podawanym podskórnie 3 x w tygodniu obecność przeciwciał wiążących stwierdzono u 12 pacjentów (24,4%). Wynik ten jest nieznacznie niższy niż w przytoczonych danych literaturowych. Może to być związane z tym, że pomiaru przeciwciał dokonano w 24 miesiącu terapii, czyli w momencie, w którym osiągnęły już one pewną stabilizację a nie w miesiącu 15 – 18, czyli wtedy, gdy według danych z piśmiennictwa osiągają one swoje maksimum.

Nowym aspektem niniejszej pracy jest oznaczenie przeciwciał także po 12 miesiącach od zakończenia terapii. W zdecydowanej większości publikowanych badań oznaczeń dokonuje się u chorych, u których terapia jest kontynuowana a nie w przypadkach, w których została już zakończona [95,96].

W badaniu duńskim przeprowadzonym w grupie 37 chorych oznaczano przeciwciała neutralizujące po zakończeniu terapii immunomodulującej. Średni czas obserwacji wyniósł 22 miesiące. Wśród 29 pacjentów z wyjściowym mianem przeciwciał 25 jednostek Kawady, tylko u 3 stwierdzono jego obniżenie do poniżej 25 jednostek; u pozostałych utrzymywało się na podwyższonym poziomie. Autorzy wyciągnęli wniosek, że przeciwciała neutralizujące, szczególnie w wysokich mianach, utrzymują swój poziom nawet po zakończeniu terapii interferonem [98].

W przedstawionym badaniu po roku od zakończenia terapii stwierdzono przejście pacjentów z grupy BAb+ w BAb- jedynie u 4 chorych ze stosunkowo niskim poziomem przeciwciał wiążących (minimum 10,01 AU/ml, maksimum 13,38 AU/ml).

U pozostałych 8 chorych nadal stwierdzano podwyższony poziom przeciwciał anti-Rebif. Dodatkowo nie stwierdzono różnicy w poziomie przeciwciał anti-Rebif pomiędzy zakończeniem terapii po 2 latach leczenia i w kolejnym roku po jej ukończeniu w badanej grupie chorych (jakkolwiek zaobserwowano nieznamiennie statystycznie obniżenie poziomu przeciwciał z 5,145 AU/ml do 3,754 AU/ml). Uzyskane wyniki potwierdzają obserwację, że przeciwciała obecne są we krwi pacjentów nawet po zakończeniu terapii immunomodulującej. Wyniki własne również wskazują na to, że zmniejszenie poziomu przeciwciał po zakończeniu terapii zależne jest od jego wartości wyjściowej. Brak różnicy statystycznej pomiędzy poziomami przeciwciał w próbkach z obydwu pobrań wskazuje na stały poziom przeciwciał osiągnięty w ciągu 2 lat terapii interferonem beta 1a.

Zaskakujące są wyniki uzyskane w grupie pacjentów leczonych octanem glatirameru. Stwierdzono bowiem obecność przeciwciał anti-Rebif u 6 pacjentów, co stanowi 40% badanej grupy.

Nie znaleziono danych literaturowych dotyczących badania, w którym wykonywano by oznaczenia przeciwciał wiążących interferon beta u pacjentów leczonych glatiramerem. Jednak na przykład w badaniu rejestracyjnym interferonu beta 1b u 11% pacjentów przyjmujących placebo stwierdzono obecność przeciwciał neutralizujących [65]. Istnieją także dane, że przeciwciała te mogą pojawiać się samoistnie we krwi [93]. Również sam octan glatirameru powoduje powstawanie przeciwciał anty- octan glatirameru [78]. Innym mechanizmem mogącym tłumaczyć obecność przeciwciał wiążących przeciwko interferonowi w grupie pacjentów przyjmujących octan glatirameru jest zjawisko zachodzącej reakcji krzyżowej, także w stosunku do endogennego interferonu [99].

5.3 Reakcje krzyżowe przeciwciał przeciwko interferonom

W przebiegu leczenia interferonem beta powstają przeciwciała, które mają zdolność tworzenia krzyżowych reakcji między sobą. W badaniu przeprowadzonym przez Khana i wsp. na grupie 10 pacjentów leczonych interferonem beta 1a, u 3 z nich stwierdzono obecność przeciwciał wiążących i neutralizujących. Oba rodzaje przeciwciał wykazywały krzyżową reakcję z interferonem beta 1b. Analogicznie w surowicy 6 pacjentów leczonych interferonem beta 1b z obecnymi przeciwciałami zachodziła krzyżowa reakcja z interferonem beta 1a [100]. Badanie to potwierdziło wyniki wcześniejszej obserwacji, w której stwierdzono obecność reakcji krzyżowej pomiędzy stosowanym w celach leczniczych interferonem beta 1a i endogennym interferonem beta u pacjentów z wysokimi mianami przeciwciał wiążących [93]. Podobne wyniki uzyskano w kolejnych badaniach [101,102].

W niniejszym badaniu stwierdzono obecność silnych wzajemnych korelacji między mianami przeciwciał w badanej grupie, zarówno wśród chorych leczonych interferonem beta 1a, jak i octanem glatirameru. Wykazano je zarówno między przeciwciałami anty-Rebif anty-Betaferon, anty-Rebif anty-Avonex, jak i anty-Avonex anty-Betaferon. Otrzymane wyniki są zgodne z wcześniej przeprowadzonymi badaniami oraz potwierdzają efekt krzyżowej reakcji między różnymi preparatami interferonu beta. Są one o tyle istotne, że odnoszą się do preparatów stosowanych powszechnie w Polsce i wykazują, że u chorych u których stwierdzono wysokie miana przeciwciał przeciwko jednemu z preparatów interferonu należy spodziewać się wysokich mian przeciwciał przeciwko pozostałym dostępnym preparatom. Obserwacja ta ma ważne implikacje kliniczne. W razie obecności przeciwciał neutralizujących należy rozważyć zmianę dotychczasowej terapii na lek nie będący

interferonem; w świetle powyższych ustaleń zmiana jednego preparatu interferonu na inny nie jest zalecana [73,74].

W grupie chorych leczonych octanem glatirameru nie stwierdzano istotnych różnic w mianach przeciwciał w porównaniu z osobami nieleczonymi, w przeciwieństwie do osób leczonych interferonami. W grupie tej stwierdzano także słabsze reakcje krzyżowe przeciw preparatom interferonów stosowanych w praktyce klinicznej.

Oznacza to, że octan glatirameru w mniejszym stopniu indukuje odpowiedź immunologiczną przeciw interferonom. Przepuszczalnie także odnosi się to do interferonów endogennych. W związku z powyższym leczenie octanem glatirameru może być alternatywą dla pacjentów z dużymi mianami przeciwciał przeciw interferonom.

5.4 Przeciwciała wiążące u pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie

Grupę kontrolną stanowiło 35 pacjentów z rozpoznaniem stwardnieniem rozsianym nigdy nie leczonych immunomodulacyjnie. Przeciwciała anty-Rebif, anty-Betaferon i anty-Avonex oznaczono w tej grupie według tej samej metodyki jak w grupie leczonej. U dwóch chorych stwierdzono obecność wyników odstających, zdecydowanie wyższych niż u pozostałych chorych. Może być to związane z opisywanym w literaturze zjawiskiem spontanicznego pojawiania się przeciwciał przeciwko interferonowi u chorych nigdy nie leczonych [93] lub występowania przeciwciał przeciw endogennemu interferonowi beta [93,99]. Przemawia za tym fakt, że przeciwciała przeciwko interferonowi beta stwierdzane były także u pacjentów przyjmujących placebo [65].

Przedstawiono wyniki porównujące stężenie przeciwciał anty-Rebif w grupie pacjentów nieleczonych i leczonych z uwzględnieniem i po odrzuceniu 2 wartości odstających. Po odrzuceniu tych wartości stwierdzono istotną statystycznie różnicę między stężeniami przeciwciał w grupie pacjentów nieleczonych i leczonych interferonem beta 1a.

Dwuletni okres terapii interferonem beta 1a spowodował produkcję przeciwciał wiążących anty-Rebif, których nie stwierdzono w surowicy pacjentów nieleczonych immunomodulacyjnie. Statystycznie istotnej różnicy nie stwierdzono natomiast przy porównaniu grupy nieleczonej immunomodulacyjnie i przyjmującej octan glatirameru ($p = 0,217$). Wynika to przypuszczalnie z faktu, że pacjenci ci leczeni byli lekiem o innej budowie

i wytworzyli przeciwciała w mniejszym stopniu, porównywalnym z chorymi nieleczonymi immunomodulacyjnie.

5.5 Implikacje kliniczne obecności przeciwciał anty interferon beta

Po kilkunastu już latach obserwacji i doświadczeń stosowania interferonów w leczeniu stwardnienia rozsianego zgodnie ustalono, że obecność przeciwciał skierowanych przeciwko interferonom ma swoje implikacje kliniczne i wpływa na skuteczność terapii. Szczególnie podkreślana jest rola przeciwciał neutralizujących, w mniejszym stopniu znaczenie przypisywane jest przeciwciałom wiążącym. Należy także pamiętać, że wpływ obecności przeciwciał na skuteczność terapii może być zauważony dopiero w długoterminowej obserwacji chorych. W badaniu rejestracyjnym interferonu beta 1b stwierdzono u chorych z obecnością przeciwciał neutralizujących w 2 i 3 roku terapii zdecydowanie większy roczny wskaźnik rzutów - 1,08, porównywalny z grupą placebo – 1,06 niż u pacjentów bez przeciwciał – 0,56 ($p < 0,01$) [65]. W przypadku interferonu beta 1a stosowanego podskórnie stwierdzono wpływ przeciwciał neutralizujących na liczbę rzutów w kolejnych latach leczenia (jakkolwiek nie stwierdzono zależności w pierwszych 2 latach terapii) [66,103]. Także duże badanie duńskie przeprowadzone w grupie 541 pacjentów z obserwacją 5 letnią wykazało wpływ przeciwciał na: roczny wskaźnik rzutów (zanotowano zwiększenie rocznego wskaźnika rzutów u pacjentów NAb+ o ponad 50% w porównaniu z pacjentami NAb-), skrócenie średniego czasu do wystąpienia pierwszego rzutu i zmniejszenie odsetka chorych wolnych od rzutu [104]. Badanie Farrella i wsp. opublikowane w 2008 roku wykazało również większy roczny wskaźnik rzutów u pacjentów z obecnością przeciwciał neutralizujących - 0,67 niż w grupie chorych bez przeciwciał – 0,5. Badanie to potwierdziło także silny związek między wysokim mianem przeciwciał a ryzykiem wystąpienia rzutu [105]. Mniej jasny jest wpływ przeciwciał na stan kliniczny chorych wyrażony w skali EDSS. W przeprowadzonych badaniach obecny jest raczej trend sugerujący wpływ przeciwciał na progresję niepełnosprawności [75,76,104,106].

Istnieją jednak badania, które sugerują wpływ obecności przeciwciał wiążących na pogorszenie stanu klinicznego pacjentów. Przytoczone badanie kanadyjskie wykazało, że wśród 88 pacjentów z obecnymi przeciwciałami wiążącymi tylko u 27 (32%) nie stwierdzono rzutu ani pogorszenia w skali EDSS; w grupie pacjentów bez przeciwciał odsetek ten był zdecydowanie wyższy i wyniósł 54% (20 chorych w grupie 37 pacjentów), $p < 0,005$ [84].

Również badanie autorów włoskich, w którym wzięło udział 90 pacjentów (30 otrzymywało interferon beta 1b 8 MIU podskórnie codziennie, 30 - interferon beta 1a 22 mcg podskórnie 3 x w tygodniu i 30 - interferon beta 1a 30 mcg raz w tygodniu domięśniowo) wykazało wpływ przeciwciał wiążących na stan kliniczny chorych. Pacjenci leczeni byli przez 4 lata; oznaczano zarówno przeciwciała wiążące, jak i neutralizujące. Nie wykazano korelacji między obecnością przeciwciał neutralizujących a wzrostem wskaźnika rzutów w całej grupie ($p = 0,07$), z drugiej jednak strony w podgrupie chorych z bardzo wysokimi mianami przeciwciał wykazano ich korelację z większą liczbą rzutów ($p = 0,03$).

Korelacje te były zdecydowanie bardziej wyraźne, gdy wzięto pod uwagę miana zarówno przeciwciał neutralizujących, jak i wiążących ($p < 0,001$). U 10 pacjentów z wysokimi mianami NAb i BAb stwierdzono istotny statystycznie wzrost w punktacji EDSS w stosunku do badania wyjściowego ($z 2,2 \pm 0,8$ na $3,6 \pm 1,2$ po 2 latach terapii) [91]. Wyniki te wpisują się w opinię, że obydwa rodzaje przeciwciał stanowią pewne *continuum*, a ich rygorystyczny podział być może jest sztuczny [77].

W prezentowanym badaniu własnym nie znaleziono zależności pomiędzy poziomem przeciwciał anti-Rebif a stanem klinicznym chorych wyrażonym w skali EDSS w obydwu badanych grupach leczonych immunomodulacyjnie zarówno podczas terapii, jak i po jej zakończeniu. Nie było także statystycznie istotnej różnicy w liczbie pacjentów BAb+ i BAb- u których wystąpiło nasilenie stopnia niepełnosprawności. Stwierdzono natomiast istotnie statystycznie różnice w poziomie mian przeciwciał między pacjentami, u których wystąpił rzut choroby i tych bez rzutu – $p = 0,035$. Różnicę tę wykazano tylko dla grupy leczonej interferonem, nie stwierdzono jej w przypadku chorych przyjmujących octan glatirameru $p = 0,388$ (co może być także związane z mniejszą liczebnością tej grupy). Nie stwierdzono natomiast różnicy w liczbie rzutów u pacjentów BAb+ i BAb- w obydwu grupach.

Stwierdzono, że w grupie leczonej octanem glatirameru miana przeciwciał przeciwko interferonom wykazywały krzyżowe reakcje z poszczególnymi preparatami interferonów, co potwierdza obserwacje omówione w rozdziale 5.3 i może być tłumaczone obecnością endogennych przeciwciał u osób chorujących na SM.

Natomiast na podstawie przeprowadzonych badań nie można się wypowiedzieć, czy zjawisko występowania przeciwciał przeciw interferonom jest rozpowszechnione w populacji osób zdrowych - dane literaturowe na ten temat są bardzo ubogie i zagadnienie to wymaga dalszych badań.

Przedstawione wyniki potwierdzają wpływ przeciwciał na stan kliniczny pacjentów – przede wszystkim ich związek z wystąpieniem rzutów. Niewątpliwie większa grupa chorych oraz dłuższy czas leczenia immunomodulującego i tym samym obserwacji klinicznej mógłby dać podstawy do wyciągnięcia bardziej ogólnych wniosków. Stwardnienie rozsiane jest chorobą przewlekłą, która w postaci rzutowo-remisyjnej najczęściej powoduje obserwowane pogorszenie stanu klinicznego pacjentów po latach a nie miesiącach choroby, zwłaszcza przy stosowaniu leczenia wpływającego na jej naturalny przebieg. Dlatego długoletnie obserwacje mogą dać bardziej obiektywny obraz wpływu przeciwciał na stan kliniczny chorych.

5.6 Stan kliniczny pacjentów po zakończeniu terapii immunomodulującej

W przedstawionym badaniu przeanalizowano stan pacjentów w trakcie i po zakończeniu terapii immunomodulującej, biorąc pod uwagę wystąpienie rzutów choroby oraz stan kliniczny chorych wyrażony w skali EDSS. W czasie 2 lat leczenia stan kliniczny 26 pacjentów nie zmienił się (40,6%), pogorszył się u 24 pacjentów (37,5%) a poprawił u 14 chorych (21,9%). Nie stwierdzono różnicy istotnej statystycznie porównując pacjentów leczonych interferonem beta 1a i octanem glatirameru . Z kolei u 35 pacjentów w trakcie 2 lat terapii nie wystąpił żaden rzut choroby (54,7%), u 23 1 rzut (35,9%) a 2 rzuty u 6 chorych (9,4%). Również nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej między pacjentami leczonymi różnymi lekami. Roczny wskaźnik rzutów wyniósł odpowiednio dla pacjentów leczonych interferonem beta 1a 0,29; dla leczonych octanem glatirameru 0,23 (dla całej badanej grupy 0,27).

Przedstawione wyniki wskazują na bardzo dobrą odpowiedź badanej grupy chorych na leczenie, z niskim wskaźnikiem rzutów (niższym niż cytowanych badaniach). Zjawisko to można tłumaczyć rygorystyczną kwalifikacją chorych kwalifikowanych do leczenia immunomodulacyjnego zgodną z założeniami i warunkami programu NFZ. Większe szanse na otrzymanie leczenia mieli chorzy młodzi, z krótkim czasem trwania choroby i niską punktacją w skali EDSS (w całej badanej grupie mediana punktacji EDSS wyniosła 1,0, a maksymalna wartość 4,0).

Nie stwierdzono również różnicy w skuteczności stosowanych leków, zarówno w zakresie ich wpływu na liczbę rzutów, jak i postęp choroby.

Podobną analizę przeprowadzono w odniesieniu do rocznej obserwacji prowadzonej po zakończeniu leczenia. W badanej grupie stwierdzono zwiększenie się punktacji EDSS u 25 pacjentów (39,1%), zmniejszenie u 3 chorych (4,7%), brak zmiany u 36 pacjentów (56,2%). Nie stwierdzono istotnie statystycznie różnicy między chorymi leczonymi interferonem beta 1a i octanem glatirameru. Natomiast stwierdzono istotnie statystyczną różnicę w porównaniu wartości EDSS w chwili zakończenia terapii i po kolejnym roku, ze zmianą mediany wartości EDSS z 1,0 na 1,5 (zarówno u chorych leczonych interferonem beta 1a, jak i octanem glatirameru). Podobnie zwiększeniu uległ roczny wskaźnik rzutów - odpowiednio z 0,29 na 0,39 u chorych przyjmujących interferon i z 0,23 na 0,47 u tych przyjmujących glatiramer.

Dostępne dane literaturowe podkreślają konieczność prowadzenia jak najdłuższej terapii immunomodulującej w razie pozytywnej odpowiedzi na leczenie. Choć badania rejestracyjne dostępnych leków prowadzone były właśnie przez dwa lata, po ich zakończeniu kontynuowano leczenie, włączając do badania pacjentów wcześniej przyjmujących placebo [67,103,107].

W dostępnej literaturze nie znaleziono danych, odpowiadających sytuacji klinicznej kiedy to przy dobrej odpowiedzi na leczenie przerywane jest ono w sposób arbitralny po zaledwie 2 latach terapii.

Obowiązujący system refundacji leków immunomodulujących w Polsce w latach, kiedy prowadzono badanie stworzył możliwość oceny klinicznej takiej metody leczenia. Przedstawione wyniki wskazują na niekorzystne skutki wczesnego przerywania terapii. Obecnie trwają prace nad wydłużeniem okresu leczenia immunomodulującego w ramach programu NFZ do pięciu lat i od 15.12.2011r taka możliwość będzie istniała. W świetle uzyskanych wyników można przypuszczać, że rozwiązanie takie dałoby pacjentom szansę bardziej skutecznej terapii.

Z pewnością poważnym ograniczeniem pracy jest mała grupa obserwowanych pacjentów. W licznych pracach wieloośrodkowych wpływ leków immunomodulujących na przebieg SM oceniany jest na podstawie analizy stanu setek chorych. Prowadzone obserwacje są kilku-kilkunastoletnie, a nie jedynie dwuletnie. Dopiero one dają obiektywny i pełny obraz wpływu leczenia immunomodulującego na naturalny przebieg SM.

Przeprowadzona ocena w badanej grupie jest jedynie dodatkowym elementem pracy oraz wykorzystaniem posiadanych danych klinicznych, a badacz ma świadomość związanych z nią

ograniczeń. Dodatkowy wpływ na wyniki analizy może mieć fakt, że grupa była wyselekcjonowana w związku z wprowadzonymi przez NFZ kryteriami włączenia do leczenia immunomodulującego. Niemniej jednak wyniki potwierdzają udowodniony korzystny wpływ terapii immunomodulującej na przebieg stwardnienia rozsianego.

5.7 Podsumowanie

Problem obecności przeciwciał jako odpowiedzi na prowadzone leczenie immunomodulacyjne SM jest szeroko dyskutowany i opisywany w literaturze. Oznaczenie przeciwciał powinno być rutynowym postępowaniem w trakcie prowadzonej terapii, po to by była ona jak najbardziej efektywna dla pacjenta [75]. Ma ono także znaczenie w optymalizacji terapii i ponoszonych kosztów. Niestety, w Polsce mimo stopniowego rozwoju leczenia immunomodulującego i systematycznego zwiększania się liczby pacjentów nim objętych badania obecności przeciwciał wiążących i neutralizujących nie są prowadzone. Między innymi dlatego właśnie w przedstawionym badaniu podjęto to zagadnienie.

Wykazano obecność przeciwciał wiążących w surowicy badanych osób po dwóch latach leczenia immunomodulującego oraz silne krzyżowe reakcje przeciwciał anty-Rebif, anty-Betaferon i anty-Avonex. Może stanowić to kolejny dowód na to, że w przypadku niezadowolającej odpowiedzi na stosowane leczenie interferonem beta 1 nie jest celowa zamiana jednego preparatu interferonu na drugi. Lepszym rozwiązaniem jest wybór preparatu o innym mechanizmie działania, zwłaszcza wobec faktu rejestrowania nowych leków przeznaczonych do terapii immunomodulującej.

Interesujące z poznawczego i klinicznego punktu widzenia jest stwierdzenie obecności przeciwciał wiążących interferon także u chorych leczonych octanem glatirameru (aż u 6 pacjentów – 40%). Zjawisko to nie było dotychczas szeroko badane i oceniane. Mniej znany jest fakt, że w tej grupie pacjentów stwierdzono silniejsze tendencje do zmniejszania się poziomów przeciwciał po zakończeniu terapii (po roku utrzymywały się one jedynie u 1 pacjenta leczonego glatiramerem – w porównaniu do 8 z całkowitej liczby 12 chorych w grupie leczonych interferonem beta 1a).

Dodatkowo stwierdzono, że rzuty SM w grupie chorych leczonych octanem glatirameru rzadziej występowały u pacjentów z obecnymi przeciwciałami przeciwko interferonowi beta

1a. Niestety mała grupa pacjentów oraz relatywnie krótki czas obserwacji nie pozwalają na wysuwanie dalej idących wniosków o charakterze naukowym.

Wydaje się jednak, że zjawisko powstawania przeciwciał wiążących interferon u pacjentów leczonych octanem glatirameru i ich wpływ na przebieg kuracji jest ciekawe i problem ten wymaga dalszych badań.

Dalsze badania na większej liczbie chorych i z dłuższym czasem obserwacji wydają się być uzasadnione. Bardzo cenne mogłoby być oznaczanie przeciwciał i obserwacja chorych leczonych interferonem beta, u których z powodu niezadowalającej odpowiedzi na leczenie zmieniono lek na inny preparat immunomodulujący – szczególnie z grupy nowych leków.

Przeprowadzone badanie wskazało także na niekorzystne skutki zakończenia terapii immunomodulującej zaledwie po 2 latach leczenia. Z oczywistych względów jednoroczna obserwacja jest niewystarczająca, ale może ona stanowić kolejny argument w planowaniu zmian w systemach kwalifikacji i prowadzenia leczenia immunomodulującego w ramach programu NFZ.

6. WNIOSKI

1. W trakcie leczenia immunomodulującego w surowicy pacjentów z SM stwierdza się obecność przeciwciał wiążących interferon, których poziom utrzymuje się także po roku od zakończenia terapii.
2. Występują silne krzyżowe reakcje immunologiczne w zakresie przeciwciał wiążących przeciwko preparatom interferonów rutynowo stosowanych u chorych na SM leczonych immunomodulacyjnie.
3. Chorzy, którzy nie byli leczeni immunomodulacyjnie wykazują niższe poziomy przeciwciał przeciw interferonom beta niż pacjenci, którzy byli nimi leczeni .

W zakresie dodatkowych celów pracy stwierdzono:

4. Obecne w surowicy chorych przeciwciała wiążące mogą wpływać na przebieg terapii i powodować częstsze występowanie rzutów w grupie pacjentów leczonych interferonem beta.
5. Przerwanie terapii immunomodulującej po 2 latach leczenia przy dobrej odpowiedzi chorych na leczenie związane jest ze zwiększeniem liczby rzutów i nasileniem stopnia niepełnosprawności w porównaniu z okresem objętym leczeniem.

7. ANEKS

7.1 Skala EDSS

Tabela 19. Skala EDSS [108]

0	Normalna sprawność ruchowa; we wszystkich podskalach funkcyjnych (FS) 0
1	Normalna sprawność; wartość 1 w jednej FS
2	Minimalna niesprawność; wartość 2 w jednej FS, pozostałe 1 lub 0
3	Umiarkowana niesprawność; wartość 3 w jednej FS, pozostałe 2, 1 lub 0 lub wartość 2 w 3 – 4 FS
4	Zachowane samodzielne poruszanie się; nie wymaga opieki przez co najmniej 12 godz.; wartość 4 1 jednej FS lub niższa w kilku FS; możliwość przejścia bez pomocy 500 metrów
5	Niesprawność zaburzająca codzienną aktywność; wartość 5 w jednej FS lub niższa w 3 – 4 FS; możliwość samodzielnego przejścia 200 m
6	Wymagana stała jednostronna pomoc, laska lub kula do przejścia 100 m; wartość powyżej 3 w kilku FS
7	Niemożliwość przejścia powyżej 5 m nawet z pomocą; konieczność korzystania z wózka; samodzielne poruszanie się na wózku oraz transfer z wózka i na wózek; wartość 4 lub 5 w kilku FS, w tym w FS funkcji piramidowych
8	Aktywność ograniczona do łóżka lub wózka; zachowana samodzielność w zakresie kończyn górnych
9	Pacjent leżący bez ruchu, zachowana komunikacja i połykanie
10	Śmierć z powodu stwardnienia rozsianego

7.2 Związek między stanem klinicznym pacjentów a poziomem przeciwciał wiążących anty-Rebif

W trakcie prowadzonych badań porównano także u pacjentów leczonych interferonem beta 1a poziomy przeciwciał anty-Rebif w grupie chorych z pogorszeniem i bez pogorszenia stanu klinicznego (wyrażonego w skali EDSS). Dla okresu leczenia różnica poziomów przeciwciał w obydwu podgrupach nie różniła się statystycznie, $p = 0,756$. Ze względu na małe liczebności podgrup analogicznej analizy nie przeprowadzono dla pacjentów leczonych octanem glatirameru.

Przeprowadzono również analizę stanu klinicznego (pogorszenie w skali EDSS / bez pogorszenia w trakcie dwóch lat terapii) w zależności od obecności przeciwciał anty-Rebif (I pobranie). W grupie 49 chorych leczonych interferonem przeciwciała obecne były u 12 pacjentów – wśród nich EDSS wzrósł się u 5 pacjentów; odpowiednio w grupie bez przeciwciał – u 13 chorych. Dla porównania obydwu grup wykonano test dokładny Fishera, $p = 0,738$. Wśród pacjentów leczonych octanem glatirameru wzrost EDSS nastąpił u 1 pacjenta z obecnymi przeciwciałami anty-Rebif i u 5 chorych bez przeciwciał. Porównano grupy z przeciwciałami / bez przeciwciał w teście dokładnym Fishera, $p = 0,287$. W przeprowadzonym badaniu nie stwierdzono zależności między występowaniem przeciwciał anty-Rebif a progresją stanu klinicznego chorych zarówno w grupie chorych leczonych interferonem beta 1a, jak i octanem glatirameru.

Przeprowadzono także analizę wystąpienia rzutów (jakikolwiek rzut / bez rzutów w trakcie 2 lat terapii) w zależności od obecności przeciwciał anty Rebif (pobranie I). W grupie pacjentów leczonych interferonem beta 1a choć 1 rzut wystąpił u 5 chorych z obecnymi przeciwciałami anty-Rebif i u 16 pacjentów bez przeciwciał. Dla porównania grup wykonano test dokładny Fishera, $p = 1,0$. Analogiczną analizę wykonano dla grupy leczonej octanem glatirameru. Jakikolwiek rzut choroby wystąpił u 1 pacjenta z obecnymi przeciwciałami i u 5 chorych bez obecnych przeciwciał anty-Rebif; p uzyskane w teście dokładnym Fishera = 0,287- jest nieistotne statystycznie.

Porównano także poziomy przeciwciał anty-Rebif w badanej grupie występujące u kobiet i mężczyzn (analizę przeprowadzono dla pobrania I wykorzystując test U Manna Whitneya ze względu na brak zgodności z rozkładem normalnym danych stwierdzonym testem D'Agostino-Pearsona). Wyniki przedstawia tabela nr 20.

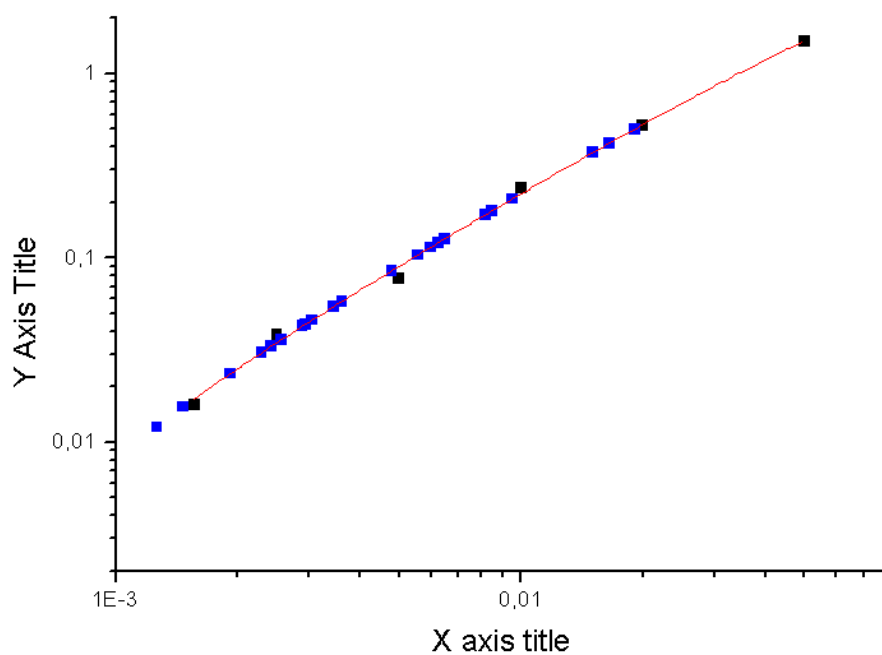
Tabela 20. Analiza poziomów przeciwciał anti-Rebif wyrażonych jako AU/ml w badanej grupie u kobiet i mężczyzn

grupa	mediana	zakres międzykwartyłowy	poziom istotności
kobiety (n = 45)	5,617 min 0,667 max 55,367	2,406 – 11,763	p = 0,713
mężczyźni (n = 19)	5,117 min 1,057 max 27,809	2,204 – 9,886	

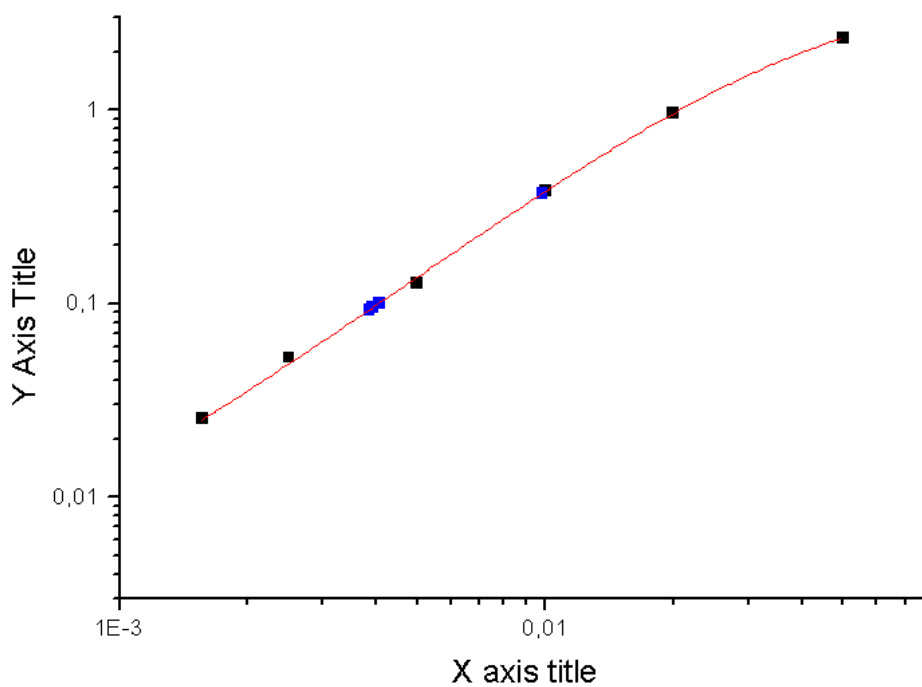
Dokonano także korelacji wieku chorych z poziomem przeciwciał anti-Rebif (dla I pobrania) korzystając z testu Spearmana sprawdzając wcześniej zgodność z rozkładem normalnym testem D'Agostino-Pearsona. Dla całej badanej grupy $p = 0,573$; dla pacjentów leczonych interferonem beta 1a $p = 0,635$; dla leczonych octanem glatirameru $p = 0,97$ – nie stwierdzono istotności statystycznej.

Podobną analizę przy użyciu tych samych testów przeprowadzono także dla lat choroby i poziomu przeciwciał anti-Rebif. Dla całej badanej grupy chorych uzyskano $p = 0,863$; dla leczonych interferonem beta 1a $p = 0,837$, octanem glatirameru $p = 0,924$ - nie stwierdzono istotności statystycznej.

7.3 Przykładowe krzywe kalibracyjne z oznaczeń przeciwciał



Rycina 25. Krzywa kalibracyjna dla oznaczeń przeciwciał – pobranie I.



Rycina 26. Krzywa kalibracyjna dla oznaczeń przeciwciał – pobranie II.

8. STRESZCZENIE

8.1 Streszczenie

8.1.1 Wstęp

Stwardnienie rozsiane (*SM – Sclerosis Multiplex*) jest najczęstszą nabytą chorobą demielinizacyjną ośrodkowego układu nerwowego (OUN). W 1993 roku zarejestrowano pierwszy lek immunomodulujący zmieniający naturalny przebieg choroby – interferon beta. Obecnie w leczeniu stwardnienia rozsianego stosowane są: interferon beta 1b, 2 preparaty interferonu beta 1a, octan glatirameru, natalizumab oraz fingolimod. Skuteczność leczenia lekami pierwszego rzutu (preparatami interferonów oraz octanem glatirameru) oceniana jest na około 30%. W badaniach klinicznych III fazy preparatów interferonu oraz glatirameru wykazano zmniejszenie o około 30% liczby rzutów oraz mniejszą liczbę zmian w badaniu rezonansowym w porównaniu z grupą pacjentów otrzymujących placebo. Jednym z czynników warunkujących niepełną odpowiedź pacjentów na stosowane leczenie może być powstawanie przeciwciał przeciwko stosowanym lekom. W przypadku terapii interferonem beta rozróżnia się dwa rodzaje przeciwciał – przeciwciała wiążące („binding antibodies” – BAbs) oraz przeciwciała neutralizujące („neutralizing antibodies – NAbs). U chorych na SM leczonych interferonami beta zjawisko występowania przeciwciał jest dość powszechne i stwierdzone, w zależności od stosowanego preparatu interferonu, jego dawki, badanej populacji, a także metodologii badania u 2% aż do 47% leczonych pacjentów. Dodatkowo występują reakcje krzyżowe przy powstawaniu przeciwciał przeciw interferonom – przeciwciała powstają nie tylko przeciwko preparatowi stosowanemu w terapii, ale także przeciwko innym preparatom interferonu beta. Wobec ograniczonych środków finansowych i wysokich kosztów terapii immunomodulującej być może rutynowe stosowanie oznaczeń przeciwciał zarówno wiążących, jak i neutralizujących mogłoby skutecznie pomóc w jej optymalizacji, tak by była ona jak najbardziej skuteczna i właściwa dla każdego pacjenta.

8.1.2 Cel

Celem pracy było stwierdzenie obecności przeciwciał wiążących interferon w surowicy krwi chorych na stwardnienie rozsiane w trakcie terapii lekami immunomodulującymi i określenie zmian ich poziomu po roku od zakończenia terapii oraz zbadanie, czy występuje krzyżowa reakcja immunologiczna w zakresie przeciwciał wiążących pomiędzy wszystkim preparatami interferonu beta stosowanymi w terapii stwardnienia rozsianego w Polsce w ramach programu terapeutycznego Narodowego Funduszu Zdrowia.

8.1.3 Materiał i metody

Grupę badaną stanowiło 70 pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane, którzy brali udział w programie Narodowego Funduszu Zdrowia (NFZ) leczenia immunomodulującego w latach 2004-2006. Badanie miało charakter prospektywny, nierandomizowany. Piętnastu pacjentów przyjmowało octan glatirameru (Copaxone), 55 interferon beta 1a (Rebif).

W badanej grupie dwukrotnie przeprowadzono badanie podmiotowe (ze szczególnym uwzględnieniem wywiadu odnośnie rzutów choroby), przedmiotowe badanie neurologiczne oraz oceniono stan kliniczny w skali EDSS – w momencie ukończenia terapii immunomodulującej oraz po roku. W tym samych punktach czasowych oznaczono metodą ELISA miana przeciwciał wiążących anti-Rebif, anti-Betaferon i anti-Avonex. Przeciwciała wiążące oznaczono także w grupie kontrolnej, którą stanowiło 35 pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane dotychczas nie leczonych immunomodulacyjnie. Na kontrolną wizytę po roku zgłosiło się 64 chorych i wyniki tej grupy chorych zostały poddane analizie statystycznej.

8.1.4 Wyniki

W grupie pacjentów przyjmujących interferon beta 1a stwierdzono obecność przeciwciał wiążących anti-Rebif po 24 miesiącach leczenia u 12 chorych – to jest 24,4% badanych. Po roku przeciwciała utrzymywały się u 8 chorych czyli u 16,3%, a u 4 pacjentów zaobserwowano znaczne ich obniżenie – u wszystkich chorych poziom przeciwciał wynosił < 16 AU/ml. Stwierdzono również obecność przeciwciał anti-Rebif u 6 pacjentów leczonych

octanem glatirameru , tj. 40% chorych. Po roku od zakończenia terapii obecność przeciwciał stwierdzano u jednego chorego z tej grupy. W obu badanych grupach stwierdzono nieznaczne, nieistotne statystycznie, zmniejszenie poziomu przeciwciał po roku od zakończenia terapii.

Stwierdzono obecność silnych wzajemnych korelacji przeciwciał wiążących anty-Rebif, anty-Avonex i anty-Betaferon zarówno u pacjentów leczonych interferonem beta 1a, jak i octanem glatirameru; nie stwierdzono tej zależności u chorych nie leczonych immunomodulacyjnie (za wyjątkiem umiarkowanej, ale statystycznie istotnej korelacji dla Avonexu i Betaferonu).

Stwierdzono także, że u chorych na SM leczonych interferonami absorpcja badanych próbek jest wyższa niż w grupie porównawczej nie leczonej immunomodulacyjnie. Zależności takiej natomiast nie stwierdzono w grupach leczonej octanem glatirameru i nieleczonej immunomodulacyjnie.

Nie znaleziono zależności między stanem klinicznym pacjentów wyrażonym w skali EDSS a obecnością przeciwciał wiążących anty-Rebif. Stwierdzono natomiast istotną statystycznie różnicę w poziomie przeciwciał anty-Rebif u pacjentów wolnych od rzutów i z przynajmniej jednym rzutem choroby podczas leczenia w grupie chorych leczonych interferonem beta 1a (Rebif); nie stwierdzono jej natomiast u chorych przyjmujących octan glatirameru (Copaxone).

8.1.5 Wnioski

W trakcie leczenia immunomodulującego w surowicy pacjentów z SM stwierdza się obecność przeciwciał wiążących interferon, których poziom utrzymuje się także po roku od zakończenia terapii. Ponadto występują silne reakcje krzyżowe między przeciwciałami wiążącymi przeciwko preparatom interferonów rutynowo stosowanym u chorych leczonych immunomodulacyjnie. Chorzy, którzy nie byli leczeni immunomodulacyjnie wykazują statystycznie istotnie niższe poziomy przeciwciał przeciw interferonom beta niż pacjenci, którzy byli nimi leczeni.

8.2 Summary

8.2.1 Introduction

Multiple sclerosis (*MS*) is the most common acquired demyelinating disease of the central nervous system (CNS). In 1993, interferon beta was registered as the first immunomodulating drug, changing the natural course of the disease. Currently, there are several immunomodulating agents used for the treatment of multiple sclerosis, namely interferon beta-1b, 2 preparations of interferon beta-1a, glatiramer acetate, natalizumab and fingolimod. The effectiveness of treatment with the first-line drugs (interferons and glatiramer acetate) is estimated at approximately 30%. Phase III clinical trials of interferon preparations and glatiramer acetate demonstrated a 30% reduction of the annualised relapse rate and fewer changes in the MRI studies compared to patients receiving placebo.

One of the reasons for incomplete response to treatment may be the process of developing antibodies against drugs. In case of beta interferon therapy, there are two kinds of antibodies one can develop, namely the binding antibodies (Babs) and neutralizing antibodies (NABs).

In MS patients treated with interferon beta, antibody prevalence is quite common. It depends on the used formulation of interferon, the dose, the study population and methodology of the study, differing from 2% up to 47% of patients under treatment. In addition, cross-reactions occur, with the formation of antibodies against different interferons - antibodies are produced not only against the drug used in therapy, but also against other preparations of interferon beta. Considering the limited financial resources and high cost of immunomodulating therapy, the routine assay of binding and neutralizing antibodies could effectively help in its optimization, so that it would be the most effective and appropriate for individual patients.

8.2.2 The aim of the study

The aim of this study was to establish the presence of IFN-binding antibodies in sera of MS patients during immunomodulatory therapy and to determine changes in their levels after one year of therapy endpoint as well as to examine whether there is cross-immune reactivity of binding antibodies between different preparations of interferon beta used in

therapy for multiple sclerosis in Poland, as part of the therapeutic program of the National HealthFund (NFZ).

8.2.3 Materials and methods

The study group consisted of 70 patients suffering from multiple sclerosis, who participated in the National Health Fund (NFZ) immunomodulatory therapy programme between years 2004 and 2006. It was a prospective and non-randomized study. 15 patients received glatiramer acetate (Copaxone), and 55 were on interferon beta 1a (Rebif). Physical examination, neurological examination and clinical status assessment in EDSS scale was performed twice for each patient - upon completion of immunomodulating therapy and after one year. At the same time points titers of anti-Rebif, anti-Betaferon and anti-Avonex binding antibodies were measured using ELISA method. Binding antibodies were also measured in the control group, which included 35 MS patients that had never undergone immunomodulatory treatment. 64 patients came back for the follow-up visit after one year and the results of this group of patients were subject to statistical analysis.

8.2.4 Results

In patients receiving interferon beta-1a anti-Rebif antibodies were detected in 12 patients after 24 months of treatment, which constituted 24.4% of respondents. One year after completion therapy antibodies persisted in 8 patients (16.3%), and in 4 patients significant reduction was observed - for all patients antibody levels were <16 AU/ml. 6 patients treated with glatiramer acetate (40% of the whole group) had anti-Rebif antibodies. One year after completion of therapy antibodies were found in one patient in this group. In both groups we found slight, statistically non-significant reduction in antibodies' levels after one year since therapy termination.

There was a strong mutual correlation of anti-Rebif, anti-Avonex and anti-Betaferon antibodies, both in patients treated with interferon beta-1a and glatiramer acetate. There was no such correlation in the untreated group (except for a moderate, but statistically significant correlation for Avonex and Betaferon).

It was also found that in patients with MS treated with interferon absorbance of the samples tested was higher than in the untreated group. No such correlation was found in patients treated with glatiramer acetate and in untreated patients.

There was no relationship between patients' clinical status, expressed in EDSS score, and the presence of binding antibodies. We found a statistically significant difference in the level of anti-Rebif antibodies in patients free from relapses and patients with at least one relapse of the disease during treatment in patients treated with interferon beta-1a (Rebif). There was no such difference in patients treated with glatiramer acetate (Copaxone).

8.2.5 Conclusion

Binding antibodies to interferon may develop in MS patients in the course of immunomodulatory therapy. Their levels are maintained after one year of treatment termination. Moreover, there are strong cross-reactions between binding antibodies against different interferon preparations that are routinely used for immunomodulation. Patients who were not treated with immunomodulation had statistically significant lower levels of antibodies against beta interferon than patients who were treated with interferon preparations.

9. PIŚMIENNICTWO

- 1 – Selmaj K. Patologia SM. *Stwardnienie rozsiane*, Selmaj K. Termedia Wydawnictwo Medyczne Poznań 2006: 23-44
- 2 - Trapp B.D., Peterson J., Ranshoff R.M. et al. . Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 278-285
- 3 - Cendrowski W. *Choroby demielinizacyjne* PZWL Warszawa 1986; 15-16
- 4 - Meader R. Does the history of multiple sclerosis go back as far as the 14th century? *Acta Neurol Scand* 1979; 60: 189-192
- 5 - Firth D. The case of August D'Este. *Cambridge Univ. Press* ; London 1948
- 6 - Carswell R. Pathological Anatomy: Illustrations of the elementary forms of disease. London, Longman; 1838
- 7 - Cruveilhier J.: Anatomie pathologique du corps humain. Paris, JB Balliere; 1829-1842
- 8 - Frerichs FT. Ueber Hirnslerosse. *Arch. fur die Gesamte Medizin* 1849; 10:334-350
- 9 - Valentiner W. Ueber die Sklerose des Gehirns und Ruckenmarks. *Deutsche Klein.* 1856 147-151, 158-162, 167-169
- 10 - Murrey T.J. The Steps Toward a Discovery: The Early Medical Reports in Murrey T.J. Multiple Sclerosis: The History of Disease Demos Medical Publishing 2005; 61-94
- 11 - Charcot JM. Histologie de la sclerose en palques. *Gaz Hop.* (Paris) 1886; 41: 554-566
- 12 - Babinski J. Étude anatomique et clinique sur la sclérose en plaques. Paris, G Masson; 1885.
- 13 - Dawson J.W. The histology of disseminated sclerosis. *Trans Roy Soc. Edinb.* 1916; 50: 517
- 14 - Adrian E.D. The mechanism of nervous action. Electrical studies of the neurone. London, Milford; 1932
- 15 - Denny-Brown D. Lesion in peripheral nerve resulting from compression by spring clip. *Arch Neurol Psych* 1944; 52: 1-19
- 16 - Selmaj K. Modele doświadczalne chorób autoimmunologicznych w Losy J., K.Selmaj *Neuroimmunologia kliniczna* Wydawnictwo Czelej 2007; 31-48;
- 17 - Rivers T.M., Schwentker F.F. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J Exp Med* 1935; 61: 689-702

- 18- Petinnelli CB., McFarlin DE. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J Immunol* 1981; 127: 1420-1423
- 19 - Kabat E.M., Moore D.H., Landow H. An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. *J Clin Invest* 1942; 21, 571–577
- 20 - Karcher D., Van Sande M., Lowenthal A. Micro-electrophoresis in agar gel of proteins of the cerebrospinal fluid and central nervous system. *J Neurochem* 1959; 4: 135–140
- 21 - Lowenthal A., van Sande Mm, Karcher D. The differential diagnosis of neurological diseases by fractionating electrophoretically the CSF γ -globulins. *J Neurochem* 1960; 6: 51–56
- 22 - Laterre EC., Heremans JF., Carbonara A. Immunological comparison of some proteins found in cerebrospinal fluid, urine and extracts from brain and kidney. *Clin Chim Acta* 1964;10:197–209
- 23 - Young I.R., Hall AS., Pallis CA., Legg NJ., Bydder GM., Steiner RE. Nuclear magnetic resonance imaging of the brain in multiple sclerosis. *Lancet* 1981; 1063-1066
- 24 - Grossman R.I., Gonzalez-Scarano F., Atlas S.W., Galetta S., Silberberg D.H. Multiple sclerosis: gadolinium enhancement in MR imaging. *Radiology* 1986;161: 721-725
- 25 - Miller H.G., Newell D.J., Ridley A. Multiple sclerosis treatment of acute exacerbations with corticotropin (ACTH). *Lancet* 1961; 2: 1120-1122
- 26 - Selmaj K. Epidemiologia *Stwardnienie rozsiane* Selmaj K. Terrmedia Wydawnictwo Medyczne Poznań 2006; 10-16
- 27 - Kurtzke J.F. MS epidemiology world wide. One view of current status. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1995; 161: 23-33
- 28 - Lauer K. Multiple sclerosis in the Old World: the new old map. Firnhaber W., Lauer K. (red.) Multiple Sclerosis in Europe. Leuchtturm-Verlag/LTV Press. Darmstadt 1994; 14-27.
- 29 - Potemkowski A. Stwardnienie rozsiane w świecie i w Polsce – ocena epidemiologiczna. *Aktual Neurol* 2009; 9 (2): 91-97
- 30 - Wender M., Pruchnik-Grabowska D., Hertmanowska H., Kowal P., Zielinska M., Namysł .I, Marcinkowski J. Epidemiology of multiple sclerosis in Western Poland - a comparison between prevalence rates in 1965 and 1981. *Acta Neurol Scand* 1985; 72: 210–217

- 31 - Wender M., Kowal P., Pruchnik-Grabowska D., Marcinkowski J., Hertmanowska H., Namysł I., Zielińska M. Stwardnienie rozsiane – rozpowszechnienie i zapadalność wśród ludności miejscowej w zachodniej Polsce. *Neurol Neurochir Pol* 1987; 21 (1) :33-39
- 32 - Potemkowski A. Analiza epidemiologiczna stwardnienia rozsianego w województwie szczecińskim: ocena zachorowalności i chorobowości w latach 1993-1995. *Neurol Neurochir Pol* 1999; 33(3): 34-44
- 33 - Łobińska A., Stelmasiak Z. Wybrane epidemiologiczne aspekty stwardnienia rozsianego w populacji miasta Lublina. *Neurol Neurochir Pol* 2004; 38: 361-366
- 34 - Kaźmierski R., Wender M., Guzik P., Zielonka D. Association of influenza incidence with multiple sclerosis onset. *Folia Neuropathol* 2004; 42: 19-24
- 35 - Alonso A., Hernán MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology* 2008;71:129-135
- 36 - Houzen H., Niino M, Hata D., Nakano F., Kikuchi S., Fukazawa T., Sasaki H. Increasing prevalence and incidence of multiple sclerosis in northern Japan. *Mult Scler* 2008; 14:887-892
- 37 - Cendrowski W., Wender M., Dominik W., Fleisierowicz Z., Owsianowski M., Popiel M. Epidemiological study of multiple sclerosis in western Poland. *Europ Neurol* 1969; 2: 90–108
- 38 - Cendrowski W. Neuroepidemiologia kliniczna. *Volumed* Wrocław 1997
- 39 - Sadovnick A.D., Baird P.A. The familial nature of multiple sclerosis: age-corrected empiric recurrence risks for children and siblings of patients. *Neurology* 1988; 38: 990-991
- 40 - Firnhaber W. Clinical and social medicine aspects in multiple sclerosis. *Nervenarzt* 1973; 44: 117-127.
- 41 - Ropper A.H., Samuels M.A. Multiple Sclerosis and Demyelinating Diseases, Adams and Victor Principles of Neurology 9 edition Mc Graw Hill 2009; 878
- 42 - Confavreux C, Compston A. The natural history of multiple sclerosis. Compston A, Editor. McAlpine's multiple sclerosis, 4th edition. London: Churchill Livingstone Elsevier, 2006; 183–272.
- 43 - Montalban X. Primary progressive multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2005; 18: 261-266
- 44 - Naturalny przebieg SM. Stwardnienie rozsiane, Selmaj K. Termedia Wydawnictwo Medyczne Poznań 2006; 68-83
- 45 - Kurtzke J.F. Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33: 1444-1452
- 46 - Ruddick R.A., Cutter G., Baier M et al. Use of the Multiple Sclerosis Functional Composite to predict disability in relapsing MS. *Neurology* 2000; 56: 1324-1330

- 47 - Hobart J.C., Lamping D., Fitzpatrick D. et al. The Multiple Sclerosis Impact Scale (MSIS-29): a new patient-based outcome measure. *Brain* 2001; 124: 962-973
- 48 - Hauser S. Goodin D. Stwardnienie rozsiane i inne choroby demielinizacyjne Harrison Neurologia w medycynie klinicznej. Wydanie I polskie 2008; 479-500
- 49 - Bonek R., Maciejek Z. Naturalny przebieg stwardnienia rozsianego. *Aktualn Neurol.* 2009; 9 (2): 116-125
- 50 - Schumacker G.A., Beebe G, Kibler R.F., Kurland L.T., Kurtzke J.F., Mcdowell F., Nagler B., Sibley W.A., Tourtellotte W.W., Willmon T.L. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1965; 31 (122): 552-568
- 51 - McAlpine The benign form of multiple sclerosis. A study based on 241 cases seen within three years of onset and followed up until the tenth year or more of the disease. *Brain* 1961; 84: 186-203
- 52 - Poser C.M., Paty D.W., Scheinberg L., McDonald W.I., Davis F.A., Ebers G.C., Johnson K.P., Sibley W.A., Silberberg D.H., Tourtellotte W.W. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; 13: 227-231
- 53 - McDonald W.I., Compston A., Edan G., Goodkin D., Hartung H.P., Lublin F.D., McFarland H.F., Paty D.W., Polman C.H., Reingold S.C., Sandberg-Wollheim M., Sibley W., Thompson A., van den Noort S., Weinshenker B.Y., Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50 :121-127
- 54 - Polman C.H., Reingold S.C., Edan G., Filippi M., Hartung H.P., Kappos L., Lublin F.D., Metz L.M., McFarland H.F., O'Connor P.W., Sandberg-Wollheim M., Thompson A.J., Weinshenker B.G., Wolinsky J.S. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria" *Ann Neurol* 2005; 58: 840-846
- 55 - Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B., Clanet M., Cohen J.A., Filippi M., Fujihara K., Havrdova E., Hutchinson M., Kappos L., Lublin F.D., Montalban X., O'Connor P, Sandberg-Wollheim M., Thompson A.J., Waubant E., Weinshenker B., Wolinsky J.S. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69 :292-302
- 56 - Ruet A., Deloire M., Ouallet J-C., Molinier. S., Brochet B. Predictive factors for multiple sclerosis in patients with clinically isolated spinal cord syndrome. *Mult Scler.* 2011;17: 312-318

- 57 - Skov, A. G., Skov T., Frederiksen J. L. Oligoclonal bands predict multiple sclerosis after optic neuritis: a literature survey. *Mult Scler.* 2011; 17:, 404-410
- 58 - Sellebjerg F., Barnes D., Filippini G, Midgard R., Montalban P., Rieckmann P., Selmaj K., Visser L.H., Soelberg Sorensen P. Ostre rzuty stwardnienia rozsianego. Zasady postępowania w neurologii. Zalecenia EFNS, tom. I. (Red. Hughes R., Brainin M., Gilhus N.E.), ViaMedica 2009: 157-167
- 59 - Selmaj K. Leczenie objawowe. Stwardnienie rozsiane. Selmaj K. Termedia Wydawnictwo Medyczne Poznań 2006; 257-270
- 60 - Selmaj K. Rehabilitacja. Stwardnienie rozsiane, Selmaj K. Termedia Wydawnictwo Medyczne Poznań 2006: 271-276
- 61 - Podlecka-Piętowska A. Leczenie modyfikujące przebieg choroby w stwardnieniu rozsianym. *Neurologia po dyplomie* 2008; 3(5): 11-18
- 62 - Coyle PK. Early treatment of multiple sclerosis to prevent neurologic damage. *Neurology* 2008; 71(24 Suppl 3):S3-7
- 63 - Selmaj K. Leczenie immunomodulacyjne. Stwardnienie rozsiane, Selmaj K. Termedia Wydawnictwo Medyczne Poznań 2006; 217-223
- 64 - Coyle PK. Early treatment of multiple sclerosis to prevent neurologic damage. *Neurology* 2008; 71(24 Suppl 3): S3-7
- 65 - The IFN- β Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* 1993; 43: 662-667
- 66 - PRISM Group. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon β -1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 39: 285-294
- 67 - Kappos L., Traboulsee A., Constantinescu C., Erälinna J.P., Forrestal F., Jongen P., Pollard J., Sandberg-Wollheim M., Sindic C., Stubinski B., Uitdehaag B., Li D. Long-term subcutaneous interferon beta-1a therapy in patients with relapsing-remitting MS. *Neurology* 2006; 67 :944-953
- 68 - Jacobs L.D., Cookfair D.L., Rudick R.A., Herndon .RM., Richert J.R., Salazar A.M., Fischer J.S., Goodkin D.E., Granger C.V., Simon J.H., Alam J.J., Bartoszak D.M., Bourdette D.N., Braiman J., Brownschidle C.M., Coats M.E., Cohan S.L., Dougherty D.S., Kinkel R.P., Mass M.K., Munschauer F.E. 3rd, Priore R.L., Pullicino P.M., Scherokman B.J., Whitham R.H., et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 1996; 39: 285-294

- 69 - Johnson K.P, Brooks B.R., Cohen J.A., Ford C.C., Goldstein J., Lisak R.P., Myers L.W., Panitch H.S., Rose J.W., Schiffer R.B. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1995; 45 :1268-1276
- 70 – Gołąb J., Jakóbsiak M. Cytokiny. Immunologia, Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2007; 108-152
- 71 – Chapel H., Haeney M., Misbah S., Snowden N. Immunoterapia. Immunologia Kliniczna, Chapel H., Haeney M., Misbah S., Snowden N. Wydawnictwo Czelej Lublin 2009; 135-160
- 72 - International Working Group of Treatment Optimization in MS. Treatment optimization in multiple sclerosis: report of an international consensus meeting. *Eur J Neurol* 2004; 11: 43-47
- 73 – Polman Ch., Bertoletto A. , Deisenhammer F., Sorensen S. and others Recommendation for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Lancet Neurology* 2010; 9:740-750
- 74 - Bertoletto A. Implication of neutralizing antibodies on therapeutic efficacy. *J Neurol Sci.* 277, S1 (2009) S29-S32
- 75 - Sorensen P.S., Deisenhammer F., Duda P., Hohfeld R., Myhr KM., Palace J., et al Guidelines on use of anti-IFN- β antibody measurements in multiple sclerosis: report of an EFNS Task Force on IFN- β antibodies in multiple sclerosis. *Europ J Neurol* 2005; 12:817-827
- 76 - Oger J., Gibbs E. Binding antibodies: Vancouver's perspective. *Mult Scler* 2007; 13: S36-43
- 77 - Pachner A. Anti-IFN β antibodies in IFN β -treated MS patients Summary. *Neurology* 2003; 61 (Suppl 5): S1-S5
- 78 - Karaussis D., Teitelbaum D., Sicsic C., Brenner T. and the AC001 multi-center Israeli study group. Long-term treatment of multiple sclerosis with glatiramer acetate: Natural history of the subtypes of anti-glatiramer acetate antibodies and their correlation with clinical efficacy. *J Neuroimmunol.* 2010; 220: 125-130
- 79 - Brenner T., Arnon R., Sela M., Abramsky O., Meiner Z., Riven-Kretzman R. et al. Humoral and cellular immune responses to Copolymer 1 in multiple sclerosis patients treated with Copaxone. *J Neuroimmunol* 2001; 115:152-160
- 80 - Menge T., Hartung H-P., Kieseier B.C. Neutralizing antibodies in interferon beta treated patients with multiple sclerosis: knowing what to do now. *J Neurol* 2011; 258: 904–907

- 81 - Bartosik-Psujek H., Mitosek-Szewczyk K., Belniak E., Stelmasiak Z.: Powstawanie przeciwciał wiążących interferon beta w trakcie leczenia stwardnienia rozsianego różnymi preparatami interferonu beta *Pol Merkuriusz Lekarski* 2004; 17 (97): 28-32
- 82 - Sorensen P.S., Deisenhammer F., Duda P. et al. Zastosowanie oznaczeń przeciwciał przeciwko interferonowi beta w stwardnieniu rozsianym. Zasady postępowania w neurologii. Zalecenia EFNS, tom. I. (Red. Hughes R., Brainin M., Gilhus N.E.), ViaMedica 2009; 80
- 83 - strona informacyjna Polskiego Towarzystwa Stwardnienia Rozsianego www.ptsr.org.pl
- 84 - Pachner A., Oger J., Palace J. The measurement of antibodies binding to IFN β in MS patients treated with IFN β . *Neurology* 2003; 61 (Suppl. 5): S18-20
- 85 - Prince H., Lape-Nixon M., Audette C., Van Horn Identification of ineterferon-beta antibodies in a reference labolatory setting: Findings for 1144 consecutive sera. *J Neuroimmunol* 2007; 190: 165-169
- 86 - Bertoletto A., Deisenhammer F., Gallo P., Sorensen S. Immunogenicity of interferon beta: differences among products. *J Neurol* 2004; 251 [suppl 2]:II/15-II/24
- 87 - Fernandez O., Mayorga C., Luque G., Guerrero M., Guerrero R., Leyva L., Leon A., Blanca M., Study of binding and neutralizing antibodies to interferon- β in two groups of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *J Neurol* 2001; 248: 383-388
- 88 - Francis G., Rice G., Alsop J. Interferon- β 1a in MS. Results following development of neutralizing antibodies in PRISMS. *Neurology* 2005; 65: 48-55
- 89 - Kinisakk P., Alm G., Fredrikson S., Link H. Neutralizing and binding anti-interferon- β antibodies. A comparison between IFN- β -1a and IFN- β -1b treatment in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2000; 7: 27-34
- 90 - Perini P., Calabrese M., Biasi G., Gallo P. The clinical impact of interferon beta antibodies in relapsing-remitting MS. *J Neurol* 2004; 251: 305-309
- 91 - Scagnolari C., Bellomi F., Turrziani O., Bagnato F., Tomassini V., Lavolpe V., Ruggieri M., Bruschi F., Meucci G., Dicuonzo G., Antonelli G. Neutralizing and binding antibodies in IFN- β : relative frequency in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with different IFN- β products. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 207-213
- 92 - Menge T., Hartung H-P., Kieseier B.C. Neutralizing antibodies in interferon beta treated patients with multiple sclerosis: knowing what to do now. *J Neurol* 2011; 258: 904-907
- 93 - Kivisakk P., Alm GV., Tian WZ., Matusevicius D., Fredrikson S., Link H. Neutralising and binding anti-interferon beta-I-b (IFN-beta-Ib) antibodies during IFN-beta-Ib treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler* 1997; 3: 184-190

- 94 - Gibbs E., MacDonnell G., Deisenhammer F., Oger J. Binding antibodies to Interferon Beta during treatment of MS are biologically and clinically relevant. *Neurology* 2002; 58: A72
- 95 - Sorensen PS., Koch-Henriksen N., Ross C., Clemmensen KM., Bendtzen K. Appearance and disappearance of neutralizing antibodies during interferon-beta therapy. *Neurology* 2005; 65:33-39
- 96 - Bellomi F., Scagnolari C., Tomassini V., Gasperini C., Paolillo A., Pozzilli C., Antonelli G. Fate of neutralizing and binding antibodies to IFN beta in MS patients treated IFN beta for 6 years. *J Neurol Sci* 2003; 215: 3-8
- 97 - Gneiss C., Reindl M., Lutterotti A. et al. Interferon-beta: the neutralizing antibody (Nab) titre predicts reversion to Nab negativity. *Mult Scler* 2004; 10: 507-510
- 98 - Petersen B., Bendtzen K., Koch-Henriksen N., Ravnborg M., Ross C., Sorensen PS. Persistence of neutralizing antibodies after discontinuation of IFN β therapy in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2006;12: 247-252
- 99 - Noseworthy J., Miller D., Compston A. Disease-modifying treatments in multiple sclerosis. *McAlpine's Multiple Sclerosis* 2006; 779-783
- 100 - Khan O., Dhib-Jalbut S. Neutralizing antibodies to interferon β -1a and interferon β -1b in MS patients are cross reactive. *Neurology* 1998; 51: 1698-1702
- 101 - Bertolotto A., Malucchi S. Milano E., Castello A., Capobianco M., Mutani R. Interferon beta neutralizing antibodies in multiple sclerosis: neutralizing activity and cross-reactivity with three different preparations. *Immunopharmacology* 2000; 48 : 95-100
- 102 - Antonelli G., Simeoni E., Bagnato F., Pozzilli C., Turriziani O., Tesoro R., Di Marco P., Gasperini C., Fieschi C., Dianzani F. Further study on specificity and incidence of neutralizing antibodies to interferon (IFN) in relapsing remitting multiple sclerosis patients treated with IFN beta-1a or IFN beta-1b. *J Neurol Sci* 1999; 168: 131-136
- 103 - The PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon-b-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group; and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group PRISMS-4: Long-term efficacy of interferon-b-1a in relapsing MS. *Neurology* 2001; 56:1628-1636
- 104 - Sorensen PS., Ross C., Clemmensen KM. et al. Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 2003; 362: 1184-1191

105 - Farrell R., Giovannoni G. Neutralizing anti-interferon beta antibodies are associated with reduced side effect and delayed impact on efficacy of Interferon-beta. *Mult Scler* 2008; 14:212-218

106 - Boz C., Oger J., Gibbs E. Reduced effectiveness of long-term interferon- β treatment on relapses in neutralizing antibody-positive multiple sclerosis patients: a Canadian multiple sclerosis clinic-based study. *Mult Scler* 2007; 13 : 1127-1137

107 - Ford, C.C., Johnson K.P., Lisak R.P., Panitch H.S., Shifroni G., Wolinsky J.S. A prospective open-label study of glatiramer acetate: over a decade of continuous use in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2006; 12: 309-320

108 - Selmaj K. Skale kliniczne oceny niesprawności w SM. Stwardnienie rozsiane, Selmaj K. Termedia Wydawnictwo Medyczne Poznań 2006; 106-110