

- zhskiy meditsinskiy zhurnal* (Ukrainian). 2011; 13(3): 74—5. (in Russian)
- Akyay A., Olcay L., Kuzu I., Bozdoğan N., Ünal-İnce E., İleri T. et al. A child with myelodysplastic syndrome with hypocellular fibrosis. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2010; 32(8): 617—20.
 - Buttarelo M., Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *Am. J. Clin. Pathol.* 2008; 130(1): 104—6.
 - Homoncik M., Jilma-Stohlawetz P., Schmid M., Ferlitsch A., Peck-Radosavljevic M. Erythropoietin increases platelet reactivity and platelet counts in patients with alcoholic liver cirrhosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2004; 20(4): 437—43.
 - Kabutomori O., Kanakura Y., Iwatani Y. Marked decreases of total and immature reticulocytes in myelodysplastic syndrome among patients with pancytopenia. *Acta Haematol.* 2003; 109(4): 212—3.
 - Kim H.R., Park B.R., Lee M.K., Park A.J., Ahn J.Y. Comparison of an immature platelet fraction and reticulated platelet in liver cirrhosis. *Korean J. Lab. Med.* 2007; 27(1): 7—12.
 - Parker R., Armstrong M.J., Bruns T. Reticulocyte count and hemoglobin concentration predict survival in candidates for liver transplantation. *Transplantation.* 2014; 97(4): 463—9.
 - Weiman A., Weiman K., Lun A. Hämatologische Veränderungen in der intensivmedizin — Das erweiterte Blutbild. *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 2009; 44(3): 164—70. (in German)

Received 18.05.16

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.373:578.2451.03:616.832-004.21.015.4

Назаров В.Д.¹, Лапин С.В.¹, Суркова Е.А.¹, Макшаков Г.С.², Мазинг А.В.¹, Евдошенко Е.П., Тотолян А.А.³

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВЯЗЫВАЮЩИХ И НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ПРЕПАРАТАМ ИНТЕРФЕРОНА-БЕТА

¹ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский ГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург;

²СПбГБУЗ «Городская клиническая больница № 31», 197110, г. Санкт-Петербург; ³Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Рекомбинантный человеческий интерферон-бета (ИФН-β) является наиболее часто используемым для лечения ремиттирующей-рецидивирующей формы рассеянного склероза лекарственным средством. У части пациентов отсутствует клинический ответ на проводимую терапию, что может быть обусловлено появлением антител к био-препарату. В зависимости от возможности блокировать связывание ИФН-β со своим рецептором все антитела, образующиеся против ИФН-β, делятся на связывающие и нейтрализующие. Целью данной работы является исследование аналитических и клинико-диагностических параметров тестов, используемых для определения различных типов антител, синтезирующихся против ИФН-β. В исследовании участвовали 33 пациента с диагнозом рассеянный склероз, ремиттирующая-рецидивирующая форма, получавших терапию ИФН-β-1а, а также 40 доноров и 15 больных рассеянным склерозом, не получавших терапию ИФН-β. Концентрация связывающих антител измерялась с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), а также методом иммуноблоттинга. Титр нейтрализующих антител был определен с помощью чувствительной к ИФН-β клеточной линии HL-116. Связывающие и нейтрализующие антитела у доноров и пациентов, не получавших ИФН-β, выявлены не были. Распространенность связывающих антител к препаратам ИФН-β-1а составила 57,6% при исследовании образцов с помощью метода иммуноблоттинга и 60,6% при использовании коммерческой тест-системы. Статистический анализ результатов показал высокую сходимость и корреляцию значений концентрации связывающих антител, полученных при использовании метода иммуноблоттинга и иммуноферментного теста ($r = 0,9159$, $p < 0,0001$). У 21,21% пациентов обнаружены клинически значимые титры нейтрализующих антител. Все пациенты с клинически значимым титром нейтрализующих антител были положительны в отношении связывающих антител, измеренных методами ИФА и иммуноблоттинга. Показана высокая корреляция значений титров нейтрализующих антител с концентрацией связывающих антител, измеренных методом иммуноблоттинга ($r = 0,7909$, $p = 0,0055$). Использование в клинической практике данных о наличии связывающих и нейтрализующих антител к ИФН-β поможет оптимизировать терапию дорогостоящими биологическими препаратами у пациентов с рассеянным склерозом и другими аутоиммунными заболеваниями.

Ключевые слова: рассеянный склероз; интерферон-бета; иммуногенность; нейтрализующие антитела; связывающие антитела.

Для цитирования: Назаров В.Д., Лапин С.В., Суркова Е.А., Макшаков Г.С., Мазинг А.В., Евдошенко Е.П., Тотолян А.А. Методы определения связывающих и нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61 (10): 710-714. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-710-714.

Nazarov V.D.¹, Lapin S.V.¹, Surkova E.A.¹, Makshakov G.S.², Mazing A.V.¹, Evdoshenko E.P., Totolian A.A.³

THE METHODS OF DETECTION OF BINDING AND NEUTRALIZING ANTIBODIES TO PREPARATIONS OF INTERFERON-BETA

Для корреспонденции: Назаров Владимир Дмитриевич, сотр. научно-исследовательского центра по мол. медицине ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский ГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, e-mail: Nazarov19932@mail.ru

¹The I.P. Pavlov first St. Petersburg state medical university, 197022 St. Petersburg, Russia

²The municipal clinical hospital № 31, 197110 St. Petersburg, Russia

³The Pasteur Sankt-Peterburgskii research institute of epidemiology and microbiology, 197101 St. Petersburg, Russia

The human recombinant β -interferon is most frequently applied for treatment of remittent recurrent form of multiple sclerosis using pharmaceuticals. The clinical response to applied therapy is absent in some of patients that can be conditioned by development of antibodies too preparations. Depending on possibility of blocking binding of human recombinant β -interferon with its receptor, all antibodies are divided on binding and neutralizing ones. The purpose of study is to investigate analytical and clinical diagnostic parameters of tests using for detection of different types of antibodies synthesized against human recombinant β -interferon. The study sampling consisted of 33 patients with remittent recurrent form of multiple sclerosis receiving therapy with human recombinant β -interferon and also of 40 donors and 15 patients with multiple sclerosis without therapy with human recombinant β -interferon. The concentration of binding antibodies was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Also immune blotting assay was applied. The titer of neutralizing antibodies was determined using cell line HL-116 sensitive to human recombinant β -interferon. The binding and neutralizing antibodies were not detected in donors and patients without human recombinant β -interferon therapy. The prevalence of binding antibodies to human recombinant β -interferon amounted to 57.6% when analysis of samples using immune blotting assay was used and 60.6% when commercial testing system was applied. The statistical analysis of results demonstrated high convergence and correlation of values of concentrations of binding antibodies obtained using immune blotting assay and enzyme-linked immunosorbent assay ($r=0.9159$, $p<0.0001$). The clinically significant titers of neutralizing antibodies were detected in 21.21% of patients. All patients with clinically significant titer of neutralizing antibodies were positive in relation to binding antibodies measured by immune blotting assay and enzyme-linked immunosorbent assay. The high correlation between values of titers of neutralizing antibodies and concentration of binding antibodies measured by immune blotting assay ($r=0.7909$, $p=0.0055$). The application in clinical practice of data concerning presence of binding and neutralizing antibodies to human recombinant β -interferon can input into optimization of therapy with expensive biologic preparations in patients with multiple sclerosis and other autoimmune diseases.

Key words: multiple sclerosis; human recombinant β -interferon; immunogenicity; binding antibodies; neutralizing antibodies.

For citation: Nazarov V.D., Lapin S.V., Surkova E.A., Makshakov G.S., Mazing A.V., Evdoshenko E.P., Totolian A.A. The methods of detection of binding and neutralizing antibodies to preparations of interferon-beta. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (10): 710-714.* (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-10-710-714.

For correspondence: Nazarov V.D., worker of the research center of molecular medicine. e-mail: Nazarov19932@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Financing. The study had support of the Russian Scientific Foundation Agreement № 16-15-00118

Received 11.05.2016
Accepted 24.05.2016

Введение. Рассеянный склероз (РС) представляет собой хроническое аутоиммунное заболевание центральной нервной системы, характеризующееся эпизодами демиелинизации и прогрессирующей атрофией головного мозга [1, 2]. Препараты интерферона-бета (ИФН- β) являются наиболее часто используемым для лечения ремиттирующей-рецидивирующей формы рассеянного склероза (РРС) лекарственным средством [3—5]. Несмотря на доказанную эффективность препаратов ИФН- β при РРС, у 30—50% пациентов отсутствует клинический ответ на проводимую терапию [6, 7]. Некоторые авторы связывают это с высоким уровнем эндогенной экспрессии генов интерферонового ответа, а также со снижением фармакологической активности ИФН- β , что обусловлено иммуногенностью генно-инженерного биологического препарата (ГИБП) [8, 9].

На данный момент существует два типа препаратов ИФН- β . Идентичный человеческому аналогу ИФН- β -1a синтезируют в клетках яичника хомячка, а негликозилированный рекомбинантный ИФН- β -1b — в бактериальной клеточной линии *E. coli*. Препараты ИФН- β , являясь по своей структуре белковыми молекулами, потенциально иммуногенны [10]. Иммуногенностью называют склонность ГИБП вызывать иммунный ответ в отношении молекул биопрепарата, а также родственных белков организма [11]. Одним из следствий иммуногенности препаратов ИФН- β является появление антител, ингибирующих их биологическую и фармакологическую активность. Данные антитела синтезируются в результате постепенного снижения толерантности иммунной системы к молекуле ГИБП, что обусловлено многократным введением ИФН- β [12]. На иммуногенность ИФН- β значительное влияние оказывают различия в аминокислотной последовательности с эндогенным аналогом,

отсутствие гликозилирования, формулировка препарата, путь введения и наличие молекулярных агрегатов [12, 13]. Кроме этого, aberrации гуморального иммунного ответа, наблюдаемые при РС, также предрасполагают к появлению антител к ИФН- β . Пациенты с олигоклональным синтезом иммуноглобулинов в спинно-цереброспинальной жидкости, принимающие ИФН- β , имеют больший риск появления нейтрализующих антител (НАТ), чем пациенты с нормальным паттерном интертеккального синтеза [14]. Различают два типа синтезирующихся против препаратов ИФН- β антител — связывающие антитела (САТ) и НАТ. Образующиеся против ИФН- β САТ представляют собой совокупность всех антител, способных связываться с молекулой ГИБП [15, 20]. Однако остается неясной клиническая значимость выявления САТ к ИФН- β . Высокие концентрации САТ могут изменять фармакодинамику и фармакокинетику препаратов ИФН- β , а также предсказывать снижение клинической эффективности проводимого лечения в будущем. В методах, направленных на выявление САТ, используется специфическое взаимодействие антител с исследуемым иммобилизованным ГИБП, что позволяет получить количественную информацию о концентрации САТ. Иммуноферментный анализ (ИФА) и иммуноблоттинг являются распространенными методами определения САТ. В свою очередь НАТ представляют собой высокоаффинную фракцию иммуноглобулинов класса G, входящую в пул САТ, способную препятствовать связыванию ИФН- β со своим рецептором и таким образом нарушать фармакологическую активность и ингибировать терапевтический эффект препарата [10, 15]. Показано снижение эффективности терапии, а именно увеличение количества рецидивов и появление новых очагов в головном мозге, детектируемых с помощью магнитно-резонансной томографии, у пациентов с РС в присутствии высоких титров НАТ к ИФН- β [5, 16]. Концен-

трация НАТ к препаратам ИФН- β определяется с помощью чувствительных к ИФН клеточных линий. Любой образец, содержащий НАТ, будет снижать или полностью устранять ответ клеточной линии, индуцированный известной концентрацией ИФН- β [16, 17].

Целью данной работы является исследование аналитических и клинико-диагностических параметров тестов, используемых для определения различных типов антител, синтезирующихся против ИФН- β .

Материал и методы. В исследовании принимали участие 33 амбулаторных больных РРРС, получавших терапию препаратами ИФН- β -1a различных производителей более одного года. Кроме того, были использованы сыворотки 40 доноров крови, не получавших препараты ИФН- β и не имевших аутоиммунных заболеваний, 15 пациентов с диагнозом РРРС, не получавших препараты ИФН- β , а также контрольные положительные и отрицательные образцы на САТ и НАТ. У всех 33 пациентов с РС была измерена концентрация САТ с помощью иммуноблоттинга и ИФА.

Для определения САТ использовался коммерческий набор для ИФА компании BÜHLMANN Laboratories AG (Швейцария). Исследования проводились в полном соответствии с инструкцией производителя. Контрольные образцы были предоставлены производителем. Кроме того, для определения концентрации САТ к препаратам ИФН- β была разработана методика, основанная на принципе иммуноблоттинга. В качестве несущей поверхности использовалась пористая нитроцеллюлозная мембрана (НМ) с размером пор 0,45 мкм (GEHealthCare, LifeTechnologies), на которую наносился ГИБП. После отмывки фосфатно-солевым буфером проводилась забивка свободных участков мембраны путем инкубации в блокирующем буфере, содержащем 1% твин-20 и 0,5% альбумин человека. Далее НМ с иммобилизованным на них белковым препаратом инкубировались с исследуемыми сыворотками пациентов. Для детекции связавшихся с мембраной антител использовались вторичные антитела к Fc-сегменту IgG человека, конъюгированные со щелочной фосфатазой (Life Technologies, США). Количество связавшихся меченых антител определялось цветной реакцией с использованием хромогена BCIP-NCT (Life Technologies, США). Окрашивание мембран измерялось в условных единицах оптической плотности (ед. опт. пл.) путем денситометрии окрашенных участков мембраны. Принцип метода и характерные результаты приведены на рис. 1 (см. обложку).

Для определения референсных значений была исследована концентрация антител в серии пошаговых разведений (от 1:10 до 1:200) 40 образцов сывороток крови доноров, никогда не получавших препаратов ИФН- β . Для подтверждения специфичности реакции связывания САТ с ИФН- β была проведена проба нейтрализации антител. Пошаговые разведения препарата ИФН- β в концентрациях 100; 10; 1 мкг/мл были инкубированы с тремя образцами, в которых ранее были выявлены высокие концентрации САТ, что позволило проанализировать ингибирование реакции избытком антигена. После этого образцы были проанализированы на наличие САТ методом иммуноблоттинга. В постановку также был включен отрицательный контроль.

В данном исследовании концентрация НАТ была измерена с помощью чувствительной к ИФН- β клеточной линии HL-116 фибросаркомы человека, несущей стабильный трансфект гена люциферазы, экспрессия которого контролируется регуляторной областью интерферонового ответа. Концентрация определялась с помощью метода, предложенного Y. Kawade [18, 19]. После каждого измерения при расчетах использовался поправочный «фактор Каваде». Титр антител измерялся в лабораторных единицах на миллилитр (ЛЕ/мл). Клеточная линия HL-116, а также контрольные образцы бы-

Результаты реакции нейтрализации связывающихся антител к препаратам ИФН- β

Концентрация препарата в буфере для инкубации, мкг/мл	Отрицательный контроль	Образец 1	Образец 2	Образец 3
		Ед. опт. пл.		
0	1,17	105	98	58
1	1,44	90	90	58
10	1,09	58	20	37
100	1,23	30	3,9	6

ли любезно предоставлена проф. G. Giovannoni (Лондон, Великобритания). Для детекции уровня люциферазы использовались наборы реактивов Steady Glo Luciferase Kit (Promega, США). Для измерения уровня люминесценции использовался микропланшетный люцинометр LM-01Г с термостатом (производства Immunotech, Чехия), с программным обеспечением LIANA.

В исследовании использовались референтные значения титров НАТ к ИФН- β , описанные в международных рекомендациях [16]. Отрицательными в отношении НАТ считались сыворотки со значениями < 20 ЛЕ/мл, с низкими/промежуточными значениями — 20—100 ЛЕ/мл, с высокими — >100 ЛЕ/мл. У всех 33 пациентов был проведен скрининг на наличие НАТ, а в дальнейшем рассчитаны точные титры антител с использованием метода Kawade и коррекционного фактора.

Для статистической обработки использовалась программа GraphpadPrism 6.0. Для изучения связи между двумя переменными использовался метод ранговой корреляции по Спирмену. Уровень значимости для всех статистических тестов принимался менее 0,05. Для всех обследованных групп проводился анализ на нормальность распределения данных, в зависимости от типа которого применялись параметрические или непараметрические методы оценки выборок. Для изучения связи между двумя переменными использовался метод ранговой корреляции по Спирмену.

Результаты. В ходе исследования порога нормы САТ в контрольной группе доноров крови, измеряемых с помощью методики иммуноблоттинга, было установлено, что референсное значение Ед. опт. пл. составляет 16,08 (доверительный интервал 95% \pm 0,43). Данное значение нормы было получено путем пошагового разведения сывороток доноров и определения наименьшей возможной ОП при наибольшем разведении образца.

Для подтверждения специфичности САТ к препарату ИФН- β была проведена реакция нейтрализации. Высокие концентрации ИФН- β (100 мкг/мл), инкубированные с образцами, вызвали связывание САТ с растворенным препаратом, что привело к ингибированию их связывания с ИФН- β , иммобилизованным на НМ. С увеличением концентрации растворенного препарата снижается оптическая плотность хромогенной реакции, что указывает на эффективное подавление связывания САТ с растворенным препаратом. Данные приведены в таблице.

У 15 пациентов с РРРС, не получавших терапию препаратами ИФН- β , проведено исследование концентраций САТ к ИФН- β с помощью ИФА и иммуноблоттинга, а также определены титры нейтрализующих антител. Концентрации САТ, измеренные двумя лабораторными методами, а также титры НАТ к ИФН- β не достигли положительных значений ни у одного из пациентов данной группы.

У 33 больных РС, получавших терапию ИФН- β -1a более одного года, был уточнен уровень САТ с помощью двух методов: иммуноблоттинга и коммерческого ИФА-теста. По

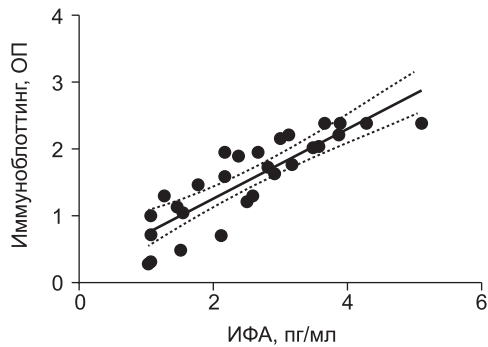


Рис. 2. Корреляция значений концентрации связывающих антител, измеренных методами ИФА (ось абсцисс, пг/мл) и иммуноблоттинга (ось ординат, ед. опт. пл.), ($r = 0,9159$, $p < 0,0001$).

данным иммуноблоттинга, у 19 (57,6%) пациентов были выявлены положительные титры САТ, в то время как по данным ИФА у 20 (60,7%) пациентов титр САТ соответствовал критериям позитивности. Корреляционный ранговый анализ результатов тестов иммуноблоттинга и ИФА показал статистически значимое соответствие полученных данных ($r = 0,9159$, $p < 0,0001$). Данные приведены на рис. 2.

Кроме того, у всех 33 пациентов был измерен титр НАТ. С помощью скрининг-теста нами были обнаружены НАТ к препаратам ИФН-β в 11 (33,3%) из 33 образцов. Из исследованных 11 образцов, положительных по результатам скрининга, в семи выявлено клинически значимое повышение титра НАТ (>20 ЛЕ/мл) — крайне высокое содержание НАТ. У всех пациентов с клинически значимыми значениями НАТ были высокие концентрации САТ. Также была обнаружена статистически значимая зависимость между титром НАТ и концентрацией САТ, измеренных методом иммуноблоттинга ($r = 0,7909$, $p = 0,0055$) и ИФА ($r = 0,6636$, $p = 0,0306$). Данные приведены на рис. 3 и 4. У всех пациентов, имеющих клинически значимые титры НАТ, были обнаружены САТ, измеренные как методом иммуноблоттинга, так и ИФА.

Обсуждение. Препараты ИФН-β являются рекомбинантными белковыми молекулами. Они хорошо зарекомендовали себя во многих научных и клинических исследованиях в качестве базисных средств терапии РС, позволяющих достичь стойкой ремиссии у большинства пациентов и поддержать ее [20]. Развитие терапевтической резистентности к препаратам данной группы остается серьезной проблемой при лечении

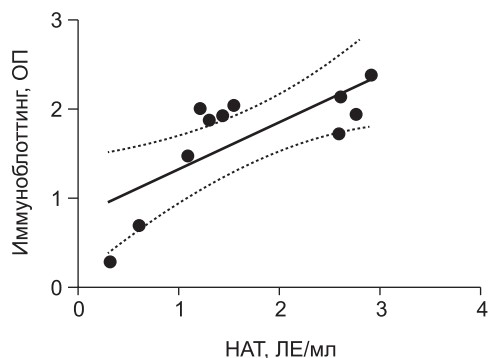


Рис. 3. Корреляция значений нейтрализующих антител (ось абсцисс, ЛЕ/мл) и связывающих антител, измеренных методом иммуноблоттинга (ось ординат, ед. опт. пл.) ($r = 0,7909$, $p = 0,0055$).

этого тяжелого и инвалидизирующего заболевания. Одной из причин сниженного ответа на терапию может быть образование антител, ингибирующих эффект ИФН-β. Допускается, что САТ к ИФН-β синтезируются у 80% пациентов [21, 22]. И хотя САТ не обязательно ингибируют действие ИФН-β, рядом авторов показано, что отсутствие САТ исключает возможность наличия НАТ [23]. Распространенность НАТ к ИФН-β-1a сильно варьирует в различных исследованиях: НАТ были обнаружены у 2—35,4% пациентов, принимавших ИФН-β [15, 24]. После окончания трехлетнего исследования NABINMS (Neutralizing Antibodies on Interferon-Beta in Multiple Sclerosis) были изданы международные рекомендации, уточняющие референсные значения титров НАТ, предпочтительные способы измерения НАТ, клиническое использование титров НАТ, а также подходы к ведению пациентов, имеющих высокие титры НАТ к ИФН-β [16].

Данная работа посвящена исследованию САТ и НАТ у пациентов с РРС, получающих терапию ИФН-β-1a более года, с помощью различных лабораторных тестов.

При исследовании концентраций САТ в группе пациентов с РС было обнаружено, что при использовании метода иммуноблоттинга у 57,6% больных определяются высокие концентрации САТ к препаратам ИФН-β. В то же время при использовании ИФА высокие концентрации САТ были обнаружены у 60,6% больных. Оба теста показали высокий уровень схожимости и корреляции результатов измерений концентраций САТ ($r = 0,9159$, $p < 0,0001$). Полученные данные о распространенности САТ, измеренных двумя лабораторными методами, сопоставимы с таковыми других авторов. Так, в исследовании С. Gneiss и соавт. (2006) САТ определялись у 45—66% пациентов, получающих ИФН-β-1a, а N. Aarskog и соавт. (2009) обнаружили САТ к ИФН-β-1a в 45,9—67% случаев [21, 25]. Следует отметить, что данные о распространенности САТ у пациентов, принимающих ИФН-β-1a, сильно варьируют, что связано с разными критериями включения пациентов в исследование, временем проведения анализа, гетерогенностью пациентов с РС, а также методами детекции САТ [26, 27].

При исследовании титра НАТ с помощью клеточной линии HL-116 фибросаркомы человека, несущей стабильный трансфект гена люциферазы, более чем у 20% пациентов обнаружены клинически значимые титры антител. Данные, полученные нами, соответствуют результатам ранних клинических исследований препаратов ИФН-β-1a, а также научных работ, проведенных различными группами исследователей [28, 29]. Исследовательские группы PRISM и SPECTRIMS показали, что у 15—22% пациентов, длительно получающих ИФН-β-1a, обнаруживаются НАТ [4, 5]. Важным результатом про-

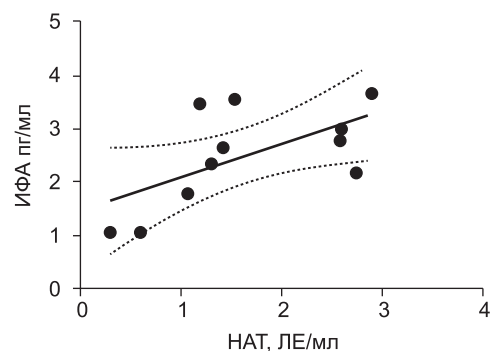


Рис. 4. Корреляция значений нейтрализующих антител (ось абсцисс, ЛЕ/мл) и связывающих антител, измеренных методом ИФА (ось ординат, пг/мл) ($r = 0,6636$, $p = 0,0306$).

веденного исследования было доказательство возможности использования САТ в качестве маркера наличия клинически значимых титров НАТ к препаратам ИФН-β. Все пациенты с титром НАТ, превышающим 20 ЛЕ/мл, были положительны в отношении САТ, измеренных методами ИФА и иммуноблоттинга. Также была показана высокая корреляция титра НАТ с концентрацией САТ, измеренных методом иммуноблоттинга ($r = 0,7909$, $p = 0,0055$). Полученные нами данные подтверждают предположения, выдвинутые рядом других исследователей [25]. Так, высокая концентрация САТ говорит о возможном наличии НАТ у пациента, а отсутствие САТ полностью исключает такую возможность. Надо также отметить, что некоторые авторы говорят о возможном прогностическом значении САТ. Высокий титр САТ на 3-м месяце терапии ИФН-β предсказывает появление НАТ на 2-й год терапии [15]. Данный феномен требует дальнейших исследований. Показано, что САТ образуются у достаточно большого количества пациентов, долгое время находящихся на терапии ИФН-β-1а. Кроме того, высокая концентрация САТ предсказывала наличие НАТ, а также статистически значимо коррелировала с титром НАТ.

Понимание закономерностей продукции антител к препаратам ИФН-β, а также использование описанных методов детекции САТ и НАТ в клинической практике поможет персонализировать терапию пациентов с РС.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование было поддержано грантом РНФ. Соглашение № 16-15-00118.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2—29 см REFERENCES)

1. Бойко А.Н., Фаворова О.О., Кулакова О.Г., Гусев Е.И. Эпидемиология и этиология рассеянного склероза. В кн.: Гусев Е.И., Завалишин И.А., Бойко А.Н., ред. Рассеянный склероз. М.; 2004: 7—42.

Поступила 11.05.16

REFERENCES

1. Boyko A.N., Favorova O.O., Kulakova O.G., Gusev E.I. Epidemiology and etiology of multiple sclerosis. In: Gusev E.I., Zavalishin I.A., Boyko A.N., eds. Multiple Sclerosis [Rasseyannyi skleroz]. Moscow; 2004: 7—42. (in Russian)
2. Makshakov G., Nazarov V., Kochetova O., Surkova E., Lapin S., Evdoshenko E. Diagnostic and Prognostic Value of the Cerebrospinal Fluid Concentration of Immunoglobulin Free Light Chains in Clinically Isolated Syndrome with Conversion to Multiple Sclerosis. PLoS One. 2015; 10(11): e0143375.
3. Manfredonia F., Pasquali L., Dardano A., Iudice A., Murri L., Monzani F. Review of the clinical evidence for interferon beta 1a (Rebif) in the treatment of multiple sclerosis. Neuropsychiatr. Dis. Treat. 2008; 4(2): 321—36.
4. Evdoshenko E., Maslyanskiy A., Lapin S., Zaslavsky L., Dobson R., Totolian A. et al. Dynamics of B-Cell Populations in CSF and Blood in Patients Treated with a Combination of Rituximab and Mitoxantrone. ISRN Neurol. 2013: 748127.
5. Ebers G.C. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. Lancet. 1998; 352(9139): 1498—504.
6. Río J., Nos C., Tintoré M., Borrás C., Galán I., Comabella M. et al. Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. Ann. Neurol. 2002; 52(4): 400—6.
7. Jacobs L.D., Cookfair D.L., Rudick R.A., Herndon R.M., Richert J.R., Salazar A.M. et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). Ann. Neurol. 1996; 39(3): 285—94.
8. Vosslander S., van Baarsen L.G., Verweij C.L. Pharmacogenomics of IFN-beta in multiple sclerosis: towards a personalized medicine approach. Pharmacogenomics. 2009; 10(1): 97—108.
9. Comabella M., Lünemann J.D., Río J., Sánchez A., López C., Julià

- E. et al. A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis. Brain. 2009; 132(Pt.12): 3353—65.
10. Sorensen P.S. Neutralizing antibodies against interferon-Beta. Ther. Adv. Neurol. Disord. 2008; 1(2): 125—41.
11. FDA Wound Healing Clinical Focus Group. Guidance for industry: chronic cutaneous ulcer and burn wounds — developing products for treatment. Wound Repair Regen. 2006; 9(4): 258—68.
12. Schellekens H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. Nat. Rev. Drug Discov. 2002; 1(6): 457—62.
13. Runkel L, Meier W, Pepinsky RB, et al. Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). Pharm Res. 1998; 15(4): 641—649. doi:10.1023/A:1011974512425.
14. Lundkvist M., Greiner E., Hillert J., Fogdell-Hahn A. Multiple sclerosis patients lacking oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid are less likely to develop neutralizing antibodies against interferon beta. Mult. Scler. 2010; 16(7): 796—800.
15. Deisenhammer F. Interferon-Beta: Neutralizing Antibodies, Binding Antibodies, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, and Clinical Outcomes. J. Interferon Cytokine Res. 2014; 34(12): 938—45.
16. Polman C.H., Bertolotto A., Deisenhammer F., Giovannoni G., Hartung H.P., Hemmer B. et al. Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. Lancet Neurol. 2010; 9(7): 740—50.
17. Martins T.B., Rose J.W., Gardiner G.L., Kusakawa N., Husebye D., Hill H.R. Cell-based reporter gene assay for therapy-induced neutralizing antibodies to interferon-beta in multiple sclerosis. J. Interferon Cytokine Res. 2013; 33(2): 52—7.
18. Kawade Y., Finter N., Grossberg S.E. Neutralization of the biological activity of cytokines and other protein effectors by antibody: Theoretical formulation of antibody titration curves in relation to antibody affinity. J. Immunol. Methods. 2003; 278(1-2): 127—44.
19. Grossberg S.E., Kawade Y., Kohase M., Yokoyama H., Finter N. The neutralization of interferons by antibody. I. Quantitative and theoretical analyses of the neutralization reaction in different bioassay systems. J. Interferon Cytokine Res. 2001; 21(9): 729—42.
20. Kappos L., Polman C.H., Freedman M.S., Edan G., Hartung H.P., Miller D.H. et al. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. Neurology. 2006; 67(7): 1242—9.
21. Gneiss C., Tripp P., Reichartseder F., Egg R., Ehling R., Lutterotti A. et al. Differing immunogenic potentials of interferon beta preparations in multiple sclerosis patients. Mult. Scler. 2006; 12(6): 731—7.
22. Ross C., Clemmesen K.M., Sorensen P.S., Koch-Henriksen N., Bendtzen K. Measuring and evaluating interferon b-induced antibodies in patients with multiple sclerosis. Mult. Scler. 2006; 12(1): 39—46.
23. Gilli F., Hoffmann F., Sala A., Marnetto F., Caldano M., Valentino P. et al. Qualitative and quantitative analysis of antibody response against IFNbeta in patients with multiple sclerosis. Mult. Scler. 2006; 12(6): 738—46.
24. Govindappa K., Sathish J., Park K., Kirkham J., Pirmohamed M. Development of interferon beta-neutralising antibodies in multiple sclerosis — A systematic review and meta-analysis. Eur. J. Clin. Pharmacol. 2015; 71(11): 1287—98.
25. Aarskog N.K., Marøy T., Myhr K.M., Vedeler C.A. Antibodies against interferon-beta in multiple sclerosis. J. Neuroimmunol. 2009; 212(1-2): 148—50.
26. Hegen H., Millonig A., Bertolotto A., Comabella M., Giovannoni G., Guger M. et al. Early detection of neutralizing antibodies to interferon-beta in multiple sclerosis patients: binding antibodies predict neutralizing antibody development. Mult. Scler. 2014; 20(5): 577—87.
27. Cakal B., Uygunoglu U., Saip S., Altintas A., Siva A., Badur S. BAb and MxA as functional biomarkers in routine clinical laboratories for the determination of anti-IFN-beta antibodies and their bioactivity levels in multiple sclerosis patients. J. Immunoassay Immunochem. 2014; 35(4): 398—411.
28. Sorensen P.S., Ross C., Clemmesen K.M., Bendtzen K., Frederiksen J.L., Jensen K. et al. Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Lancet. 2003; 362(9391): 1184—91.
29. Hartung H.P., Polman C., Bertolotto A., Deisenhammer F., Giovannoni G., Havrdova E. et al. Neutralising antibodies to interferon beta in multiple sclerosis: expert panel report. J. Neurol. 2007; 254(7): 827—37.

Received 11.05.16

К ст. В.Д. Назарова соавт.

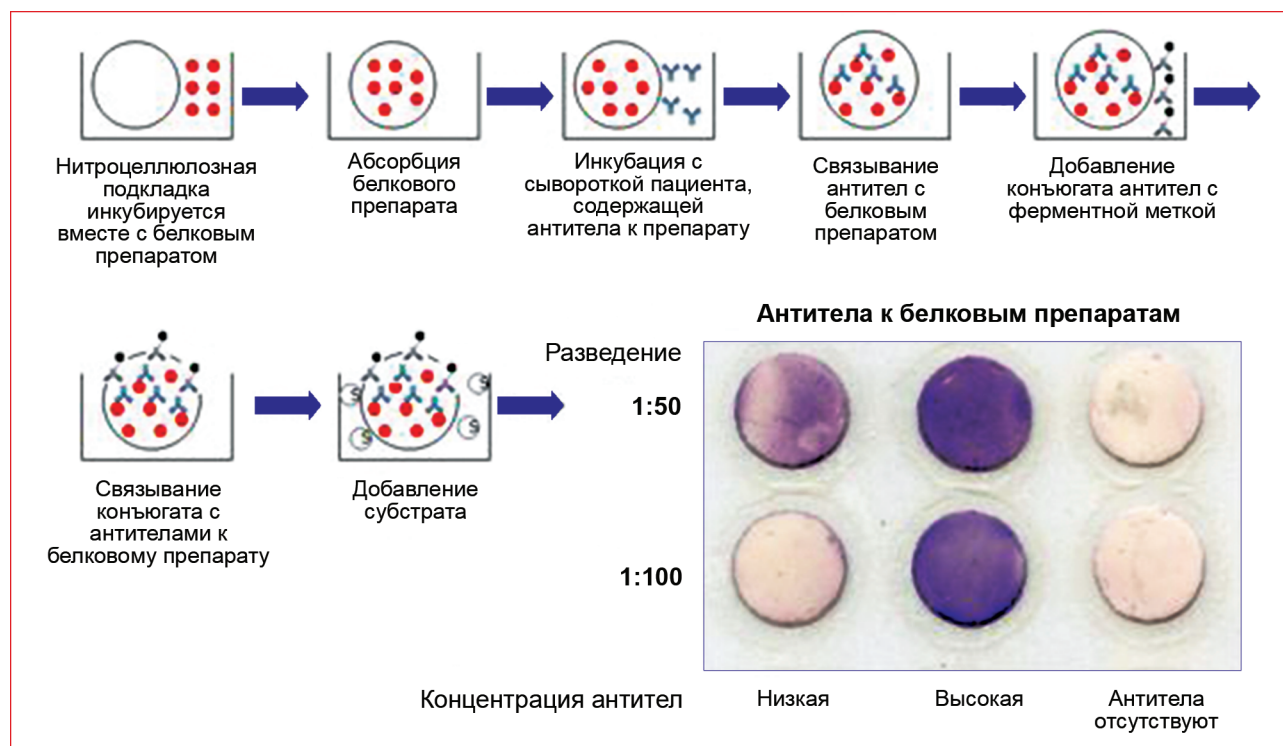


Рис. 1. Этапы детекции связывающих антител с помощью метода иммуноблоттинга.