



## بررسی میزان تولید آنتی‌بادی بر علیه داروی اینترفرون بتا در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس

**محمود اسراء بغدادی:** کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران  
**امید میرمسیب:** پزشک، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران  
**وحید شایگان نژاد:** استاد، گروه داخلی اعصاب، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران  
**سید حمید زركش اصفهانی:** استاد، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران (\* نویسنده مسئول)  
 s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk  
**نرجس رضانی پور:** دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران  
**رحمان امام‌زاده:** دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

مولتیپل اسکلروزیس،  
 اینترفرون بتا، آنتی‌بادی‌ها،  
 آنتی‌بادی‌های اتصال،  
 آنتی‌بادی‌های خنثی کننده،  
 الایزا

**زمینه و هدف:** مولتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری خود ایمنی تخریب کننده غلاف میلین تشکیل دهنده اکسون در نورون‌های سیستم دستگاه عصبی مرکزی است که به طور معمول در افراد جوان ایجاد می‌شود. اینترفرون بتا (IFN-β) از اولین داروها با اثرات سودمند برای بیماری ام‌اس است. اینترفرون‌ها (IFN) سیتوکین‌هایی هستند که دارای طیف گسترده ای از خواص ضد التهابی هستند. هدف اصلی این مطالعه، اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضد اینترفرون بتا (CinnoVex) در سرم بیماران است که این دارو را مصرف می‌کنند.

**روش کار:** نمونه‌های سرم ۲۶ فرد سالم و ۵۲ بیمار مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس تحت درمان با اینترفرون بتا (۲۶ بیمار از هر گروه) برای سنجش حضور آنتی‌بادی بررسی شد. سرم این گروه‌ها با روش الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج به دست آمده بصورت جداگانه مورد بررسی آماری قرار گرفت.

**یافته‌ها:** بر اساس نتایج به دست آمده از ۲۶ بیمار مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس که اینترفرون بتا دریافت کردند و به درمان پاسخ مثبت دادند، ۴ بیمار (۱۶٪) دارای آنتی‌بادی علیه اینترفرون بتا بودند، اما در ۲۶ بیمار غیر پاسخ دهنده به اینترفرون بتا، ۹ بیمار (۳۵٪) مثبت بودند.

**نتیجه‌گیری:** در این پژوهش ملاحظه شد که درصد آنتی‌بادی ضد اینترفرون بتا در بیماران گروه دوم بیشتر از بیماران گروه اول است. بنابراین می‌توان نتیجه‌گرفت که یکی از مهم‌ترین عواملی که باعث می‌شود بیمار به داروی اینترفرون بتا پاسخ ندهد، تشکیل آنتی‌بادی ضد این دارو در سرم بیمار است که می‌تواند کارایی بالینی و فعالیت زیستی آن را کاهش دهد.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت کننده:** دانشگاه اصفهان

شیوه استناد به این مقاله:

Baghdadi ME, Mirmosayyeb O, Shaygannejad V, Zarkesh Esfahani SH, Ramezanipour N, Emamzadeh R. Evaluation of antibody production against interferon-beta in Multiple Sclerosis patients. Razi J Med Sci. 2020;27(6):28-38.

\*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.

## Evaluation of antibody production against interferon-beta in Multiple Sclerosis patients

**Mahmoud Esraa Baghdadi:** Master degree, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

**Omid Mirmosayyeb:** Medical doctor, Department of Neurology, School of Medicine and Neuroscience Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Vahid Shaygannejad:** Professor, Department of Neurology, School of Medicine and Neuroscience Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Sayyed Hamid Zarkesh Esfahani :** Professor, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran (\* Corresponding author) s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk

**Narjes Ramezanipour:** PhD Student of Microbiology, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

**Rahman Emamzadeh:** Associate Professor, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

### Abstract

**Background:** Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune demyelinating disease of the central nervous system affecting young adults. MS attacks the myelinated axons in the CNS, destroying the myelin and the axons to varying degrees. The course of MS is highly varied and unpredictable. In most patients, the disease is characterized initially by episodes of reversible neurological deficits, which is often followed by progressive neurological deterioration over time. Twice as many women are affected as men. The disease is diagnosed on the basis of clinical findings and supporting evidence from ancillary tests, such as magnetic resonance imaging (MRI) of the brain and examination of the cerebrospinal fluid (CSF). MS typically present in adults 20 to 45 years of age; occasionally, it present in childhood or late middle age. The cause is unknown, but it appears to involve a combination of genetic susceptibility and a nongenetic trigger, such as a virus, metabolism, or environmental factors, that together result in a self-sustaining autoimmune disorder that leads to recurrent immune attacks on the CNS. Neurologists agree that patients may be grouped into four major categories based on the course of disease: Relapsing–remitting, Secondary progressive, Primary progressive and Progressive-relapsing. RRMS – the most common disease course – is characterized by clearly defined attacks of new or increasing neurologic symptoms. These attacks – also called relapses or exacerbations are followed by periods of partial or complete recovery (remissions). During remissions, all symptoms may disappear, or some symptoms may continue and become permanent. However, there is no apparent progression of the disease during the periods of remission. RRMS can be further characterized as either active (with relapses and/or evidence of new MRI activity over a specified period of time) or not active, as well as worsening (a confirmed increase in disability following a relapse) or not worsening. Approximately 85 percent of people with MS are initially diagnosed with RRMS. Interferon-beta (IFN- $\beta$ ) medications are commonly used as first-line therapy in multiple sclerosis. Interferons (IFNs) are naturally occurring cytokines possessing a wide range of anti-inflammatory properties. Recombinant forms of IFN $\beta$  are widely used as first-line treatment in relapsing forms of MS. The mechanism of action of IFN $\beta$  is complex, involving effects at multiple levels of cellular function. IFN $\beta$  appears to directly increase expression and concentration of anti-inflammatory agents

### Keywords

Multiple sclerosis,  
Interferon-beta,  
Antibodies,  
Binding Antibodies,  
Neutralizing Antibodies,  
Enzyme-linked  
Immunosorbent Assay

Received: 02/05/2020

Published: 26/08/2020

while downregulating the expression of proinflammatory cytokines. Antibodies can develop during interferon-beta treatment and reduce or abrogate normal biologic and treatment effects. Anti-IFN- $\beta$  antibodies can reduce both bioactivity and clinical efficacy of IFN- $\beta$ . Binding antibodies (BAbs) are antibodies that bind to the drug but do not necessarily inhibit its biological action. BAbs may be detected within the first month of therapy. The rate at which they appear is dependent on the type of IFN $\beta$  used. Although BAbs do not necessarily inhibit the biological action of IFN $\beta$ , as therapy is continued, maturation of the antibody body response may result in the production of high-affinity neutralizing antibodies (NAbs). NAbs are a subset of BAbs which prevent the binding of the IFN $\beta$  to its receptor on the surface of cells. When BAbs are detectable it is likely that NAbs are also present, however their concentration and affinity generally increase as the response matures. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) can potentially be used to characterize the composition of the anti-IFN-beta antibody response. Currently, CinnoVex, a biosimilar product to Avonex produced by CinnaGen Company, Iran, is used to treat MS patients in Iran. The objective of this study was to measure serum anti-interferon antibodies (CinnoVex) in patients with MS and compare it between two groups of patients. The first group is patients with MS that received interferon-beta and responded to it. The second group was patients with MS that received interferon-beta and did not respond to it.

**Methods:** An Indirect ELISA test was used for the measurement of anti-IFN- $\beta$  antibodies. Sera were studied for anti-IFN- $\beta$  antibodies from 26 healthy individuals and 52 MS patients (26 patients from each group) treated with Interferon-beta and the obtained results were analyzed statistically.

**Results:** Patients were considered positive for Anti-IFN- $\beta$  antibodies, if they had a positive sample with an optical density of more than 0.085. Anti-IFN- $\beta$  antibodies were found in 4(14%) of MS patients treated with Interferon-beta and responded to it, but in 9 (35%) of MS patients treated with Interferon-beta and did not respond to it.

**Conclusion:** In this study, we found that the percentage of anti-IFN- $\beta$  antibodies in the second group was higher than in the first group, so we can conclude that one of the most important factors that caused the patients not to respond to interferon-beta, formation of anti-drug antibodies in the serum that can reduce clinical efficacy and bioavailability of drug.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** Esfahan University

#### Cite this article as:

Baghdadi ME, Mirmosayyeb O, Shaygannejad V, Zarkesh Esfahani SH, Ramezanipour N, Emamzadeh R. Evaluation of antibody production against interferon-beta in Multiple Sclerosis patients. Razi J Med Sci. 2020;27(6):28-38.

\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

## مقدمه

بیماری مولتیپل اسکلروزیس که به اختصار به آن ام‌اس (MS) گفته می‌شود، یک بیماری تخریب کننده‌ی غلاف میلین و یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن سیستم عصبی مرکزی است که ماهیت ناتوان کننده‌ی آن دارد. این بیماری ماهیت التهابی و خود ایمن دارد و در آن غلاف‌های میلین سلول‌های عصبی در مغز و نخاع آسیب می‌بیند. چنین آسیبهایی با تظاهرات بالینی متنوعی همراه می‌باشد که منجر به ناتوانی‌های پیشرفته و در نهایت فلج کامل می‌شود (۱). گزارش شده است میزان ابتلای زنان به این بیماری نسبت به مردان بیشتر است و به ازای هر دو زن مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس یک مرد مبتلا می‌باشد. به طور کلی مولتیپل اسکلروزیس در سنین جوانی شایع‌تر است و بیشترین میزان ابتلا در سنین ۲۰ تا ۴۰ سالگی می‌باشد (۲). اتیولوژی بیماری در سطح سلولی و مولکولی به درستی مشخص نیست و احتمال دارد چندین فاکتور مختلف در این روند دخالت داشته باشند، از جمله این فاکتورها می‌توان به فاکتور ایمنی، فاکتور ژنتیکی و فاکتور محیطی اشاره کرد (۳). ممکن است سیر بالینی بیماری مولتیپل اسکلروزیس در بین بیماران متفاوت و در یک بیمار در زمان‌های مختلف، متفاوت باشد، با این حال فرم‌های مختلف بیماری را می‌توان با توجه به نحوه بروز و پیشرفت بیماری در چهار فرم کلی دسته‌بندی کرد. این فرم‌ها شامل عود کننده-بهبود پذیرنده، پیشرونده-اولیه، پیشرونده-ثانویه، پیشرونده-عود کننده می‌باشد (۴). با وجود این که تاکنون درمان قطعی برای بیماری مولتیپل اسکلروزیس شناخته نشده است، اما برخی داروها جهت بهبود علائم و کند کردن سیر بیماری و در نتیجه بهبود کیفیت زندگی بیماران تجویز می‌شوند. اینترفرون بتا، گلاتیرامر استات، میتوکسانترون، ناتالیزوماب و فینگولیمود، از جمله داروهایی هستند که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرند (۵).

اینترفرون بتا ( $\text{IFN-}\beta$ ) یک پروتئین کروی است که به گروه I اینترفرون‌ها تعلق دارد و در پاسخ به عفونت‌های ویروسی و یا برخی عوامل بیولوژیک دیگر به وسیله سلول‌های اپیتلیال و فیبروبلاست به طور گذرا بیان می‌شود. این گلیکوپروتئین دارای ۱۶۶ اسید آمینه است و ۲۰ درصد وزن آن را بنیان‌های ساکاریدی

تشکیل می‌دهند. وزن مولکولی فرم گلیکوزیله آن ۲۲ کیلو دالتون و وزن مولکولی فرم غیر گلیکوزیله آن ۱۸ کیلو دالتون است (۶). تولید این گلیکوپروتئین به وسیله ژن اینترفرون بتا و بر روی بازوی کوچک کروموزوم ۹ و در منطقه p21,3 انجام می‌شود (۷). اینترفرون بتا اولین داروی تأیید شده توسط FDA (Food and Drug Administration) برای درمان مولتیپل اسکلروزیس می‌باشد (۸) و تاکنون دو نوع اینترفرون بتا نوترکیب در درمان مولتیپل اسکلروزیس مورد استفاده قرار گرفته است. داروی اینترفرون بتا 1a و اینترفرون بتا 1b به ترتیب توسط سلول‌های پستانداران و باکتری‌های /شیشیا کولی ساخته می‌شوند (۹). گزارش شده است که محصولات نوترکیب اینترفرون بتا ایمنی‌زایی متفاوتی دارند و با وجود تفاوت اندک در خصوصیات ساختاری دو اینترفرون، به گیرنده‌ی مشابهی متصل می‌شوند. همچنین به نظر می‌رسد هر دو مکانیسم اثر مشابهی دارند و باعث کاهش تعداد دفعات عود بیماری و پیشرفت آن می‌شوند (۱۰).

زمانی که دارویی با ماهیت پروتئینی مانند اینترفرون بتا تجویز می‌شوند، ممکن است سیستم ایمنی بیمار یک پاسخ ایمنی در برابر این دارو ایجاد کند و بر علیه آن آنتی‌بادی تولید نماید و در نتیجه باعث مقاومت بیمار به دارو شود. چنین آنتی‌بادی‌های تولید شده‌ای بر اساس مکانیسم اثرشان در دو گروه آنتی‌بادی‌های اتصالی (BAb (Binding Antibodies) و آنتی‌بادی‌های خنثی کننده (NAb (Neutralizing Antibodies) طبقه‌بندی می‌شوند. آنتی‌بادی‌های تولید شده ممکن است با مکانیسم‌های مختلفی همانند کاهش نیمه عمرگردشی اینترفرون بتا، ممانعت از اتصال اینترفرون بتا به گیرنده‌ی اختصاصی بر روی سلول‌های هدف و یا تغییر در ساختار فعال اینترفرون بتا، باعث غیر فعال شدن دارو شوند. این تغییرات در نهایت سیگنالینگ سلولی را تغییر می‌دهد و ضمن کاهش اثر بخشی دارو، باعث افزایش تعداد دفعات عود بیماری و تشدید علائم و نیز افزایش ناتوانی می‌شود. بنابراین شناسایی آنتی‌بادی ضد دارو می‌تواند در تعیین پروتکل درمانی و تعیین داروی مناسب برای بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس مفید باشد (۱۱-۱۲).

جدول ۱- جدول دموگرافیک اطلاعات بیماران

متغیرها	گروه ۱ (پاسخ مثبت به درمان)	گروه ۲ (پاسخ منفی به درمان)
جنس	گروه ها	فرآوانی
مرد	۴	۷/۶۹ درصد
زن	۲۲	۲ فرآوانی
فرم بیماری	عود کننده-بهبودپذیرنده	عود کننده-بهبود پذیرنده
سن	پیشرونده-اولیه	(RR-MS)
ضریب ناتوانی (EDSS)	پیشرونده-ثانویه	۲۰-۴۶ سال (میانگین ۳۰ سال)
نوع درمان	پیشرونده-عود کننده	۲ (محدوده ۱ تا ۴)
مدت درمان	-	اینترفرون بتا (Cenovex)
	-	یک سال

جنس بیمار انجام شد. در تحقیق حاضر ۷۸ نمونه سرم جمع‌آوری و از این میان ۵۲ نمونه از دو گروه بیمار مورد بررسی قرار گرفتند. این بیماران پس از مراجعه به کلینیک مغز و اعصاب بیمارستان کاشانی انتخاب و با رضایت کامل وارد مطالعه شدند. داده‌های دموگرافیک بیماران در جدول شماره ۱ ارائه شده است. گروه اول شامل ۲۶ بیمار مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس متشکل از ۴ مرد و ۲۲ زن بود که به مدت یک سال تحت درمان با اینترفرون بتا قرار داشتند و نسبت به درمان پاسخ دادند. گروه دوم شامل ۲۶ بیمار مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس متشکل از ۲ مرد و ۲۴ زن بود که به مدت یک سال تحت درمان با اینترفرون بتا قرار داشتند و به درمان پاسخ ندادند. تشخیص بیماری بر اساس معیار مک‌دونالد و توسط متخصصین مغز و اعصاب کلینیک مولتیپل اسکلروزیس به اثبات رسیده بود. نوع بالینی مولتیپل اسکلروزیس در این بیماران نیز توسط پزشکان همین مرکز تعیین شده بود و چون بیماری آن‌ها برای بار اول تشخیص داده شده بود همگی فرم عود کننده-بهبود پذیرنده (RR-MS) بودند. ضریب ناتوانی (EDSS) در بیماران ۲ و در محدوده ۱ تا ۴ بود. سن افراد در گروه بیماران ۲۰ تا ۴۶ سال با میانگین ۳۰ سال بود. سرم ۲۶ نمونه از افراد سالم که دارای بیماری مولتیپل اسکلروزیس نبودند، جمع‌آوری و تیتراژ آنتی‌بادی‌های ضد اینترفرون بتا در آن‌ها اندازه‌گیری شد و نتایج با گروه‌های بیماران مولتیپل اسکلروزیس مقایسه گردید. اولین مرحله نمونه‌گیری در ماه‌های پاییز و زمستان ۱۳۹۶ انجام شد. بعلاوه سرم این

تست‌های تشخیصی متفاوت شامل ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)، (WB) Western Blot، Radio Immune Precipitation Assay و Affinity Chromatography (ACA) برای تعیین آنتی‌بادی‌های اتصال (BAb) استفاده می‌شود. از میان این تست‌ها، الایزا (ELISA) به دلیل اختصاصیت و حساسیت بالا، عدم خطر استفاده از مواد رادیواکتیو و پرتوزا، قیمت مناسب، در دسترس بودن و سرعت بالای انجام تست بیشتر بکار برده می‌شود (۱۳).

با توجه به افزایش تعداد موارد تشخیص داده شده بیماری مولتیپل اسکلروزیس به خصوص در ایران و شیوع آن در استان اصفهان، شناسایی عوامل مؤثر در درمان این بیماری از اهمیت زیادی برخوردار است. هدف از این پروژه، اندازه‌گیری و تعیین فراوانی آنتی‌بادی ضد اینترفرون بتا (با نام تجاری CinnoVex) در سرم بیمارانی است که تحت درمان به صورت تزریق داخل عضلانی (Intramuscular) با این دارو بوده‌اند.

## روش کار

برای جمع‌آوری نمونه، پرسشنامه‌های مخصوص توسط بیماران و پزشک مربوطه تکمیل گردید و فرم رضایت‌نامه کامل به کلیه بیماران ارائه و دلیل نمونه‌گیری، عوارض احتمالی آن و هدف پژوهش برای افراد شرح داده شد. تمامی مراحل نمونه‌گیری با رعایت پروتکل کمیته اخلاق زیستی در دانشگاه اصفهان انجام گردید. همزمان جمع‌آوری اطلاعات مربوط به سن و

۲ ساعت در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. در ادامه، محلول‌ها دور ریخته شد و با حدود ۳۰۰  $\mu\text{l}$  بافر شستشو و با دستگاه شستشوی الیزا، ۳ مرتبه شستشو انجام گردید. سپس ۱۰۰  $\mu\text{l}$  محلول آنتی‌بادی نشاندار شده با آنزیم، به تمام چاهک‌ها اضافه و بار دیگر پلیت به مدت ۲ ساعت به دور از نور در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد دما دهی شد. سپس، محلول‌ها دور ریخته و مرحله شستشو تکرار گردید. بعد از این مرحله، ۱۰۰  $\mu\text{l}$  محلول سوپسترا به هر چاهک اضافه شد و پلیت الیزا برای ۳۰ دقیقه در تاریکی در دمای آزمایشگاه ( $18^{\circ}\text{C}$ - $28^{\circ}\text{C}$ ) انکوبه شد تا تغییر رنگ آبی در نمونه‌های دارای آنتی‌بادی ضد اینترفرون بتا مشاهده شود. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، ۱۰۰  $\mu\text{l}$  محلول متوقف کننده به تمام چاهک‌ها اضافه شد تا واکنش آنزیمی متوقف شود. افزودن اسید، باعث تغییر رنگ نمونه‌های مثبت از آبی به زرد می‌شود. در مرحله‌ی آخر، شدت رنگ در هر چاهک با استفاده از دستگاه خوانشگر الیزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی

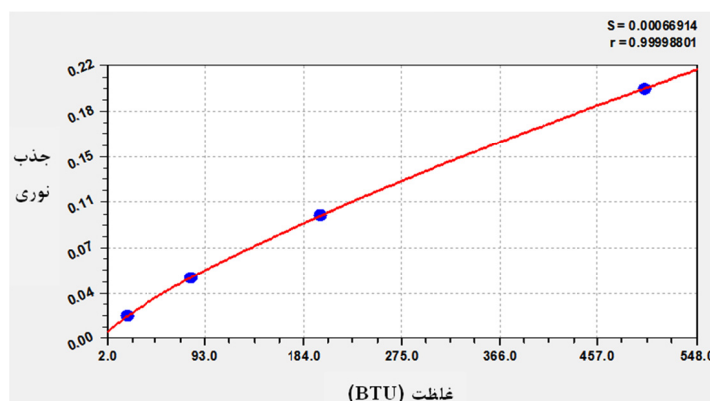
گروه‌ها با روش الیزا مورد ارزیابی قرار گرفت. از هر بیمار ۱۰ میلی‌لیتر خون توسط تکنسین آموزش دیده و در شرایط استریل جمع آوری شد. سرم نمونه ضمن انجام سانتریفیوژ در دور ۶۰۰۰ rpm جداسازی شد. سپس سرم‌های به دست آمده در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری تقسیم و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

در این تحقیق، از کیت الیزا (Anti-Interferon-beta Binding Antibodies) ساخت شرکت (BUHLMANN) سوئیس و اختصاصی جهت تشخیص آنتی‌بادی‌های اتصال‌ی علی‌ه اینترفرون بتا موجود در سرم استفاده گردید. این کیت به روش الیزا غیر مستقیم، سنجش آنتی‌بادی در نمونه بیمار را انجام می‌دهد. برای انجام آزمایش و آنالیز کمی بر اساس پروتکل کیت، ابتدا نمونه‌ها به نسبت ۱:۵۰ یا بافر رقیق کننده، رقیق و سپس ۱۰۰  $\mu\text{l}$  از بلانک، کالیبراتورها، کنترل‌ها و نمونه‌های رقیق شده به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و در ادامه ضمن پوشاندن پلیت با فویل، نمونه‌ها به مدت

جدول ۲- میزان جذب نوری استاندارد و کنترل‌ها

غلظت آنتی‌بادی (BTU)	جذب نوری	استاندارد یا کنترل
۵۰۰	۰/۲۰	استاندارد A
۲۰۰	۰/۱۰	استاندارد B
۸۰	۰/۰۵	استاندارد C
۲۰	۰/۰۲	استاندارد D
۳۸/۲۴	۰/۰۳	کنترل پایین
۲۲۴/۲۰	۰/۱۱	کنترل بالا

BTU: Buhlmann Titer Units



شکل ۱- منحنی جذب نوری استاندارد

نمونه‌های استاندارد موجود در کیت بطور همزمان با نمونه‌های بیماران و افراد سالم بررسی گردید و براساس دستورالعمل کیت، منحنی استاندارد کیت شامل میزان جذب نوری حاصله در محور افقی و میزان آنتی‌بادی موجود در نمونه استاندارد در منحنی عمودی رسم گردید. منحنی حاصله مطابق با موارد مندرج در کیت بوده که نشان‌دهنده صحت انجام تست می‌باشد.

گروه) و ۲۶ نمونه سرم در گروه کنترل توسط دستگاه قرائت شد. جذب نوری و مقادیر آنتی‌بادی‌های ضد اینترفرون بتا برای هر یک از گروه‌های مورد بررسی در جدول ۳ و میانگین جذب نوری برای نمونه‌های شاهد و بیماران در جدول ۴ و شکل ۲ نشان داده شده است. به منظور تعیین خط برش، ابتدا میانگین جذب نوری در افراد سالم محاسبه شد. مطالعات نشان داد که میانگین جذب نوری ۰/۰۳۴ با احتساب سه انحراف معیار (۰/۰۱۷) معادل ۰/۰۸۵ می‌باشد. بنابراین بیمارانی که جذب نوری بالاتر از ۰/۰۸۵ داشتند، به عنوان موارد مثبت از نظر حضور آنتی‌بادی ضد اینترفرون بتا در نظر گرفته شدند. بر اساس نتایج به دست آمده، از ۵۲ بیمار مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و تحت درمان با اینترفرون بتا، ۱۳ بیمار معادل ۲۵٪ از

استاندارد جهت به دست آوردن میزان آنتی‌بادی موجود در نمونه‌ها با استفاده از جذب نوری و غلظت کالیبراتورها رسم گردید (جدول ۲ و شکل ۱). یافته‌ها با استفاده از نرم افزار Excel 2010 و SPSS 20 و به روش‌های آماری Chi-Square، Kruskal-Wallis و Independent T-test مورد آنالیز قرار گرفت. در این روش‌ها  $p < 0/05$  معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود.

### یافته‌ها

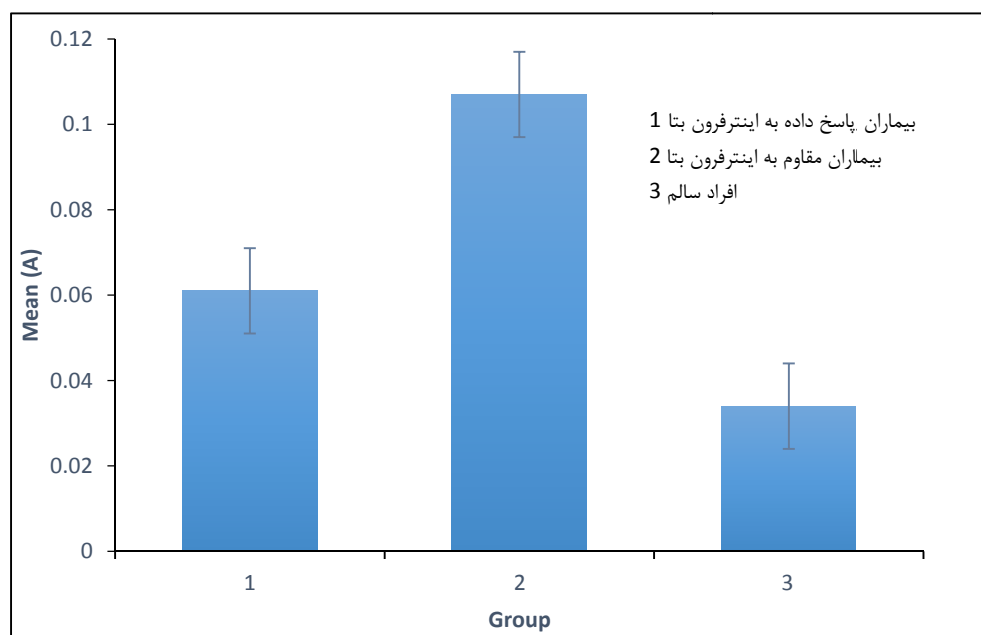
در پژوهش حاضر، اندازه‌گیری و تعیین فراوانی آنتی‌بادی ضد اینترفرون بتا در سرم بیمارانی که تحت درمان با داروی اینترفرون بتا بوده‌اند به روش الیزا انجام گرفت. جذب نوری ۵۲ نمونه سرم در دو گروه بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس (۲۶ نمونه از هر

جدول ۳- جذب نوری و مقادیر آنتی‌بادی‌ها ضد اینترفرون بتا برای هر یک از گروه‌های مورد بررسی

شماره‌ی فرد بیمار	جذب نوری بیماران گروه اول	غلظت به دست آمده (BTU)	جذب نوری بیماران گروه دوم	غلظت به دست آمده (BTU)	جذب نوری افراد سالم	غلظت به دست آمده (BTU)
۱	۰/۰۳	۲۰/۰۵	۰/۰۲	۲۰/۰۵	۰/۰۲	۲۰/۰۵
۲	۰/۴۳	>۵۰۰	۰/۰۹	۱۷۵/۱۳	۰/۰۲	۲۰/۰۵
۳	۰/۰۳	۳۸/۲۴	۰/۶۸	>۵۰۰	۰/۰۳	۳۸/۲۴
۴	۰/۰۳	۳۸/۲۴	۰/۰۸	۱۴۹/۷۱	۰/۰۷	۱۲۵/۲۰
۵	۰/۰۴	۵۸/۰۳	۰/۰۲	۲۰/۰۵	۰/۰۲	۲۰/۰۵
۶	۰/۲۹	>۵۰۰	۰/۴۷	>۵۰۰	۰/۰۲	۲۰/۰۵
۷	۰/۰۱	<۲۰	۰/۰۹	۱۷۵/۱۳	۰/۰۲	۲۰/۰۵
۸	۰/۰۵	۵۸/۰۳	۰/۰۸	۱۴۹/۷۱	۰/۰۳	۳۸/۲۴
۹	۰/۰۲	۲۰/۰۵	۰/۱۰	۲۰/۱۳۶	۰/۰۲	۲۰/۰۵
۱۰	۰/۰۱	<۲۰	۰/۰۲	۲۰/۰۵	۰/۰۴	۵۸/۰۳
۱۱	۰/۰۷	۱۲۵/۲۰	۰/۰۲	۲۰/۰۵	۰/۰۴	۵۸/۰۳
۱۲	۰/۰۳	۳۸/۲۴	۰/۰۵	۷۹/۲۳	۰/۰۵	۷۹/۲۳
۱۳	۰/۰۳	۳۸/۲۴	۰/۰۴	۵۸/۰۳	۰/۰۲	۲۰/۰۵
۱۴	۰/۰۳	۲۰/۰۵	۰/۰۴	۵۸/۰۳	۰/۰۲	۲۰/۰۵
۱۵	۰/۰۲	۲۰/۰۵	۰/۰۸	۱۴۹/۷۱	۰/۰۳	۳۸/۲۴
۱۶	۰/۰۶	۱۰۱/۶۷	۰/۱۳	۲۸۴/۴۸	۰/۰۳	۳۸/۲۴
۱۷	۰/۰۳	۳۸/۲۴	۰/۰۷	۱۲۵/۲۰	۰/۰۲	۲۰/۰۵
۱۸	۰/۱۳	۲۸۴/۴۸	۰/۱۳	۲۸۴/۴۸	۰/۰۳	۳۸/۲۴
۱۹	۰/۰۵	۷۹/۲۳	۰/۰۳	۳۸/۲۴	۰/۰۳	۳۸/۲۴
۲۰	۰/۰۴	۵۸/۰۳	۰/۰۲	۲۰/۰۵	۰/۰۹	۱۷۵/۱۳
۲۱	۰/۰۹	۱۷۵/۱۳	۰/۰۸	۱۴۹/۷۱	۰/۰۳	۳۸/۲۴
۲۲	۰/۰۱	<۲۰	۰/۰۹	۱۷۵/۱۳	۰/۰۴	۵۸/۰۳
۲۳	۰/۰۲	۲۰/۰۵	۰/۰۷	۱۲۵/۲۰	۰/۰۴	۵۸/۰۳
۲۴	۰/۰۳	۳۸/۲۴	۰/۰۵	۷۹/۲۳	۰/۰۴	۵۸/۰۳
۲۵	۰/۰۲	۲۰/۰۵	۰/۲۰	۴۹۹/۴۷	۰/۰۵	۷۹/۲۳
۲۶	۰/۰۱	<۲۰	۰/۰۳	۳۸/۲۴	۰/۰۳	۳۸/۲۴

جدول ۴- میانگین جذب نوری و انحراف معیار گروهها

گروه	تعداد کل نمونه‌ها	میانگین جذب نوری	انحراف از (SD) معیار	حد اقل (Minimum)	حد اکثر (Maximum)
۱	۲۶	۰/۰۶۱	۰/۰۹۵	۰/۰۱	۰/۴۳
۲	۲۶	۰/۱۰۷	۰/۱۴۷	۰/۰۲	۰/۶۸
۳	۲۶	۰/۰۳۴	۰/۰۱۷	۰/۰۲	۰/۰۹



شکل ۲- نمودار مربوط به تفاوت میانگین جذب نوری در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و کنترل (افراد سالم)

میانگین جذب نوری ( $\pm$  انحراف معیار) حاصل از تست الایزا بین سه گروه افراد سالم، بیماران پاسخ داده به اینترفرون بتا و بیماران مقاوم به اینترفرون بتا رسم گردیده است. بیماران دریافت کننده اینترفرون بتا در مقایسه با افراد سالم که اینترفرون بتا دریافت نکرده‌اند، آنتی‌بادی بالاتری بر علیه اینترفرون بتا دارند و در بین دو گروه بیمار، بیمارانی که مقاوم به اینترفرون بتا بوده‌اند آنتی‌بادی بیشتری بر علیه اینترفرون بتا در مقایسه با بیمارانی که به اینترفرون بتا پاسخ داده‌اند نشان می‌دهند.

مولتیپل اسکلروزیس با توجه با نرمال نبودن داده‌ها از آزمون Kruskal-Wallis استفاده شد. نتیجه آزمون نشان داد که در میانگین جذب نوری بین دو گروه بیماران پاسخ دهنده به درمان و مقاوم به درمان و نیز گروه کنترل اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $\alpha \leq 0/05$ ). برای مقایسه بین گروه کنترل و دو گروه بیماران مولتیپل اسکلروزیس از نظر مثبت و منفی بودن، از آزمون Chi-Square استفاده شد. نتیجه آزمون نشان داد که بین دو گروه بیماران و گروه کنترل از نظر مثبت و منفی بودن این آنتی‌بادی تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $\alpha \leq 0/05$ ,  $p=0/003$ ).

برای مقایسه جذب نوری بین دو جنس زن و مرد از آزمون Independent T-test استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد که بین دو جنس زن و مرد در

نظر آنتی‌بادی ضد اینترفرون بتا مثبت و ۳۹ بیمار معادل ۷۵٪ از نظر آنتی‌بادی منفی بودند. از ۲۶ بیمار مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس که اینترفرون بتا دریافت کردند و به درمان با آن پاسخ دادند، ۴ بیمار معادل ۱۶٪ از نظر آنتی‌بادی ضد اینترفرون بتا مثبت بودند. با این حال از گروه ۲۶ نفره بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس بدون پاسخ به درمان با اینترفرون بتا، ۹ بیمار معادل ۳۵٪ از نظر آنتی‌بادی ضد اینترفرون بتا مثبت بودند و در گروه افراد سالم (کنترل) از ۲۶ نمونه مورد آزمایش، ۱ نمونه معادل ۴٪ از نظر آنتی‌بادی ضد اینترفرون بتا مثبت بود (شکل ۳).

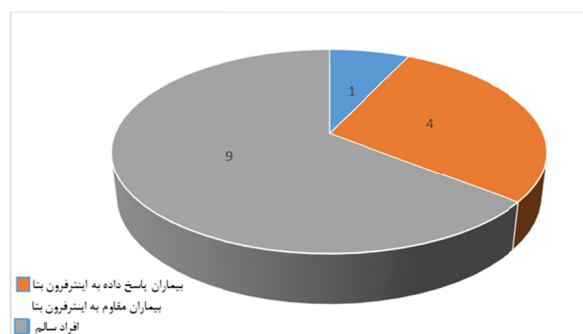
نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 و SPSS 20 آنالیز شد. برای مقایسه جذب نوری بین گروه کنترل و دو گروه بیماران



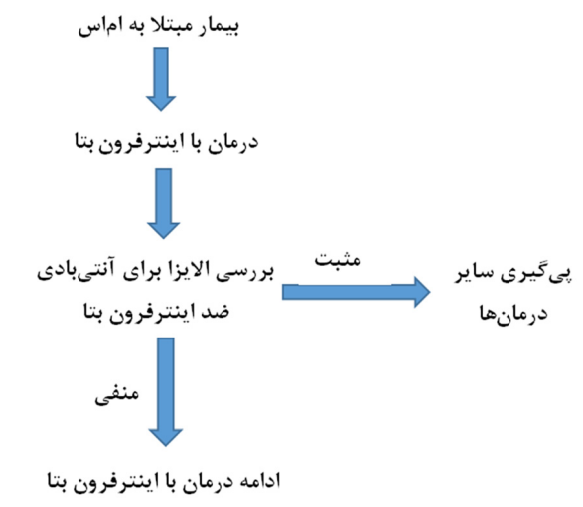
گروه‌های بیماران از نظر آنتی‌بادی تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $p=0/001, \alpha \leq 0/05$ ).  
 مولتیپل اسکلروزیس از آزمون Kruskal-Wallis استفاده شد. اگرچه مقدار عددی مربوط به میانگین جذب نوری در گروه‌های سنی مختلف، تفاوت بین بیماران

**جدول ۵-** پژوهش‌های انجام شده در سال‌های گذشته در مورد اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های اتصال بر علیه اینترفرون بتا در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس با استفاده از روش الایزا

نام پژوهشگر	سال	تعداد بیماران مورد آزمایش برای تشخیص BAbs	مدت درمان به اینترفرون بتا	تعداد بیماران مثبت	درصد تعداد بیماران مثبت
Ivanova و همکاران (۱۴)	۲۰۱۸	۳۵۸	۱۸ ماه	۱۶۴	۴۶٪
Alexander Lau و همکاران (۱۵)	۲۰۱۷	۷۸	۹ ماه	۷۱	۷۹٪
Wencel-Warot و همکاران (۱۶)	۲۰۱۶	۴۹	۲ سال	۱۲	۲۵٪
Zarkesh-Esfahani و همکاران (۱۳)	۲۰۱۳	۱۲۴	۳ ماه	۳۶	۲۹٪
Giantzi و همکاران (۱۷)	۲۰۱۱	۹۴	۱ سال	۳۰	۳۲٪
Rodica Blaşa و همکاران (۱۸)	۲۰۱۰	۲۲۹	۱ سال	۷۵	۳۳٪
Bellomi و همکاران (۱۹)	۲۰۰۹	۵۰	۱ سال	۱۹	۳۸٪
Aarskog و همکاران (۲۰)	۲۰۰۹	۸۲۷	۱ سال	۳۶۳	۴۴٪
Perini و همکاران (۲۱)	۲۰۰۴	۹۰	۱ سال	۴۳	۴۸٪
Monzani و همکاران (۲۲)	۲۰۰۲	۴۵	۱ سال	۲۰	۴۵٪



**شکل ۳-** تعداد نمونه‌های مثبت و منفی در آزمایش الایزا در دو گروه مبتلایان به مولتیپل اسکلروزیس و گروه کنترل



**شکل ۴-** هدف از تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد اینترفرون بتا در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس

می‌تواند کارایی بالینی و فعالیت زیستی آن دارو را کاهش دهند.

نتایج این تحقیق با برخی از پژوهش‌های انجام شده در سال‌های گذشته همخوانی و با برخی دیگر تضاد داشت، که به تعدادی از آنها در جدول ۵ اشاره شده است. علت این اختلاف‌ها را می‌توان به اختلاف در نوع اینترفرون بتای مصرفی و روش تجویز دارو و اختلاف مدت درمان با این دارو دانست. در مطالعات قبلی فراوانی آنتی‌بادی‌های اتصالی (BAbs) برای بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس تحت درمان با اینترفرون بتا در محدوده‌ی ۲۵-۷۹ درصد بوده است (۱۳-۱۴-۱۵-۱۶-۱۷-۱۸-۱۹-۲۰-۲۱-۲۲).

در نهایت، پیشنهاد می‌شود، تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد اینترفرون بتا و بررسی اثر درمانی آن پس از چند ماه از شروع درمان با اهمیت انجام شود به نحوی که بتوان در صورت لزوم، داروهای دیگری را جایگزین داروی اینترفرون بتا نماییم تا روند درمان دچار وقفه نشود. بنابراین ردیابی حضور آنتی‌بادی‌های ضد اینترفرون بتا ممکن است به مدیریت بهتر بیماران تحت درمان با اینترفرون بتا کمک نماید (شکل ۴).

### تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی می‌باشد. بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه اصفهان جهت تأمین هزینه‌ی مالی اجرای این طرح تحقیقاتی تشکر می‌شود. از بیماران نیز به دلیل شرکت در این طرح تحقیقاتی تشکر می‌شود. نویسندگان از آزمایشگاه پاتوبیولوژی میلاد اصفهان برای فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی قدردانی می‌نمایند.

### References

1. Cappa R, Theroux L, Brenton JN. Pediatric multiple sclerosis: genes, environment, and a comprehensive therapeutic approach. *Pediatr Neurol*. 2017 Oct 1;75:17-28.
2. Cohen BA, Oger J, Gagnon A, Giovannoni G. The implications of immunogenicity for protein-based multiple sclerosis therapies. *J Neurol Sci*. 2008 Dec 15;275(1-2):7-17.
3. Koriem KM. Multiple sclerosis: New insights

گروه‌های سنی را نشان داد اما نتایج این آزمون نشان دهنده آن است که بین گروه‌های سنی مختلف در بیماران مولتیپل اسکلروزیس از نظر آنتی‌بادی، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ( $p=0/674$ ,  $\alpha \leq 0/05$ ).

### بحث و نتیجه‌گیری

داروی اینترفرون بتا برای درمان بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس تجویز می‌شود ولی بعضی از بیماران بر علیه آن آنتی‌بادی تولید می‌کنند که خاصیت دارو را از بین می‌برد. بنابراین با اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضد اینترفرون بتا در بیماران که این دارو را مصرف می‌کنند، می‌توان فعالیت بیولوژیکی و اثر بالینی دارو را تعیین نمود تا از این طریق تصمیم صحیح در ارتباط با ادامه‌ی درمان یا استفاده از راهکارهای درمانی دیگر ایجاد شود.

در این مطالعه، ایمنی‌زایی داروی اینترفرون بتا توسط روش الایزا بررسی شد. آنتی‌بادی ضد اینترفرون بتا در دو گروه بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس شامل بیماران پاسخ دهنده به درمان با اینترفرون بتا و بیماران بدون پاسخ به درمان با اینترفرون بتا و یک گروه کنترل اندازه‌گیری گردید. مطالعات نشان داد که در ۱۶ درصد بیماران گروه اول که مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس بوده و به درمان با اینترفرون بتا پاسخ دادند، آنتی‌بادی ضد اینترفرون بتا مشاهده می‌شود. در حالی که در ۳۵ درصد بیماران گروه دوم که مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس بوده و به درمان با اینترفرون بتا پاسخ نداده‌اند، آنتی‌بادی ضد اینترفرون بتا مشاهده می‌شود. نتایج نشان داد که تنها در ۴ درصد از سرم افراد سالم، آنتی‌بادی ضد اینترفرون بتا یافت می‌شود.

نتایج نشان می‌دهد که تعداد افراد دارای BAbs در دو گروه مبتلایان به مولتیپل اسکلروزیس بیشتر از گروه افراد سالم است. بعلاوه تعداد افراد دارای BAbs در گروه بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس که به اینترفرون بتا پاسخ می‌دهند بیشتر از بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس که اینترفرون بتا دریافت کردند و به آن پاسخ ندادند، می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که یکی از مهم‌ترین عواملی که باعث می‌شود بیماری به داروی اینترفرون بتا پاسخ ندهد، تشکیل آنتی‌بادی‌های ضد این دارو در سرم بیمار است که

4. and trends. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2016 May 1;6(5):429-40.
5. Montalban X. Primary progressive multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2005 Jun 1; 18(3):261-6.
6. Merino AG, Callizo JA, Fernández OF, Pascual LL, Torres EM, Zarrantz AR. Consensus statement on the treatment of multiple sclerosis by the Spanish Society of Neurology in 2016. *Neurología (English Edition).* 2017 Mar 1;32(2):113-9.
7. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* 2004 Dec;202(1):8-32.
8. Pasté M, Huez G, Kruys V. Deadenylation of interferon- $\beta$  mRNA is mediated by both the AU-rich element in the 3'-untranslated region and an instability sequence in the coding region. *Eur J Biochem.* 2003 Apr;270(7):1590-7.
9. Rudick RA, Goelz SE. Beta-interferon for multiple sclerosis. *Exp Cell Res.* 2011 May 15;317(9):1301-11.
10. Sottini A, Capra R, Serana F, Chiarini M, Caimi L, Imberti L. Interferon-beta therapy monitoring in multiple sclerosis patient. *Endocr Metab Immun.* 2009 Mar 1;9(1):14-28.
11. Comini-Frota ER, Vasconcelos CC, Mendes MF. Guideline for multiple sclerosis treatment in Brazil: Consensus from the Neuroimmunology Scientific Department of the Brazilian Academy of Neurology. *Arq Neuropsiquiatr.* 2017 Jan;75(1):57-65.
12. Link J, Ramanujam R, Auer M, Ryner M, Hässler S, Bachelet D, et al. Clinical practice of analysis of anti-drug antibodies against interferon beta and natalizumab in multiple sclerosis patients in Europe: a descriptive study of test results. *PLoS One.* 2017;12(2).
13. Cohen BA, Oger J, Gagnon A, Giovannoni G. The implications of immunogenicity for protein-based multiple sclerosis therapies. *J Neurol Sci.* 2008 Dec 15;275(1-2):7-17.
14. Zare N, Zarkesh-Esfahani SH, Gharagozloo M, Shaygannejad V. Antibodies to interferon beta in patients with multiple sclerosis receiving CinnoVex, rebif, and betaferon. *J Korean Med Sci.* 2013 Dec 1;28(12):1801-6.
15. Ivanova S, Skrobanska R, Kolyovska V, Milanov I. Do binding antibodies predict neutralizing antibody development in multiple sclerosis patients?. *Cr Acad Bulg Sci Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences.* 2018 Jan 1;71(8).
16. Lau AY, Ip WK, Au C, Lau KK, Wong W, Yip KK, et al. Prevalence of neutralising antibodies to interferon-beta and clinical response in Chinese patients with relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler J Exp Transl Clin.* 2017 Oct; 3(4):2055217317733485.
17. Wencel-Warot A, Michalak S, Warot M, Kalinowska-Lyszczarz A, Kazmierski R. The cross-reactivity of binding antibodies with different interferon beta formulations used as disease-modifying drugs in multiple sclerosis patients. *Medicine.* 2016 Nov;95(45).
18. Giantzi V, Lagoudaki R, Poulatsidou KN, Kotta K, Grigoriadis N, Daniilidis M, et al. Assessment of the sensitivity of anti-interferon binding and neutralizing antibody assays in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis under interferon-beta treatment-A comparative study. *AUMJ.* 2011 May 1;38(1):9-16.
19. Blaşa R, Huanu A, Feier C, Bajko<sup>1</sup> Z, Pascu I. Incidence and clinical significance of binding antibodies and their relationships with neutralizing antibodies, both induced by interferon-treatment in multiple sclerosis patients. *Rev. Romana Med Lab.* Vol. 2010; 18(3/4).
20. Bellomi F, Bramanti P, Trojano M, Scagnolari C, Muto A, Sessa E, et al. Neutralizing and binding antibodies to interferon beta in patients with multiple sclerosis: a comparison of assay results from three italian centres. *J Immun Immun.* 2008 Dec 31;30(1):40-50.
21. Aarskog NK, Marøy T, Myhr KM, Vedeler CA. Antibodies against interferon-beta in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2009 Jul 25;212(1-2):148-50.
22. Perini P, Calabrese M, Biasi G, Gallo P. The clinical impact of interferon beta antibodies in relapsing-remitting MS. *J Neurol.* 2004 Mar 1;251(3):305-9.
23. Monzani F, Meucci G, Caraccio N, Saviozzi M, Casolaro A, Moscato G, et al. Discordant Effect of IFN- $\beta$  1a Therapy on Anti-IFN Antibodies and Thyroid Disease Development in Patients with Multiple Sclerosis. *JICR.* 2002 Jul 1;22(7):773-81.