

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје
Медицински факултет, Скопје

Универзитетска клиника за неврологија

Докторска дисертација

Наслов

**Поврзаност на HLA и ризикот за развој на антиинтерферонски
антитела кај пациенти со мултипла склероза третирани со
интерферон бета**



Кандидат

Д-р Бојан Бошковски

Ментор

Проф. Д-р Весела Малевска-Ивановска

Јануари 2021

На моите родители, сопругата Надица и прекрасните деца Неда и Александар

Благодарност

Оваа докторска дисертација е крај на едно богато научно патување за да стигнам до титулата доктор на медицински науки. Но, тоа не доаѓа само по себе, со минување на времето. Овој труд беше помогнат од многу луѓе и институции без чија помош немаше да го види светлото на денот и затоа им се заблагодарувам на сите оние без кои немаше да стигнам до оваа цел

Најпрво, огромна благодарност до мојот ментор Проф. Д-р Весела Малевска-Ивановска од Институтот за Физиологија за непрекорното водење низ целиот процес, нејзината поддршка, трпение, мотивација како и знаењето што го сподели со мене, како и за предлозите, размислувањата, концептот и идеите при дизајнот на истражувањето.

Благодарност до Научен Советник Д-р Анита Христова-Димчева од Институтот за трансфузиона медицина, Скопје без која оваа дисертација немаше да може да се изработи. Благодарност за соработката, идеите и сработените генетски анализи на ХЛА алелите.

Благодарност до Виолета Петковска, биолог, специјалист по медицинска генетика од Институтот за трансфузиона медицина, Скопје за приемот и обработката на материјалот и изработка на генетските анализи.

Благодарност до Научен сор. Д-р Игор Кузмановски, како директор на Универзитетската клиника за неврологија што ми овозможи да ја сработам оваа дисертација, набавувајќи дел од реагенсите, чии резултати подоцна беа употребени за оваа дисертација.

Благодарност до М-р. Сци. Васко Алексовски, специјалист по мед. биохемија, на Универзитетската клиника за неврологија за дискусиите, идеите, изработката на титарот на антителата и собирањето на резултатите за мојата дисертација.

Благодарност за Проф. Д-р Емилија Цветковска, за бескрајните разговори и совети низ текот на целиот процес на изработката на дисертацијата

Особена благодарност до Проф. Д-р Розалинда Исијановска од Институт за епидемиологија и биостатистика за помошта околу статистичката обработка на податоците, за нејзиното трпение особено што секогаш барав нешто повеќе и се трудев да добијам повеќе од возможното.

Посебна благодарност до Д-р Мери Киријас од Институтот за имунобиологија и хумана генетика за помошта и статистичката анализа на податоците од ХЛА алелите, без кои анализи оваа дисертација немаше да го види крајот.

Благодарност до Проф. Д-р Александар Петличковски за поддршката што ја добив од Институтот за имунологија и хумана генетика.

Благодарност до М-р. Соња Стамболиева од Медицински факултет, Скопје, која неуморно ми помагаше и ме потсетување за сите административни процедури што треба да ги завршам.

На крај огромна благодарност на моите родители за вербата, на мојата сопруга и моите прекрасни деца за поддршката и трпението што ми го дадоа за целото време додека ја изработував дисертацијата.

Содржина

Апстракт	8
Abstract	10
1. Вовед	14
1.1 Епидемиологија	14
1.2 Клиничка презентација	15
1.3 Клинички форми на МС	16
1.3.1 Клинички изолиран синдром (КИС)	16
1.3.2 Релапсирачко ремитентна мултипла склероза (РРМС)	16
1.3.3 Примарно прогресивната мултипла склероза (ППМС)	17
1.3.4 Секундарно прогресивна мултипла склероза (СПМС)	17
1.4 Дијагноза на мултипла склероза	18
1.5 Патофизиологија на МС	21
1.6 Фактори кои влијаат на болеста	23
1.6.1 Генетски фактори	23
1.6.2 Вирусни инфекции и витамин Д	25
1.7 Терапија на мултипла склероза	26
1.7.1 Интерферони	26
1.7.2 Рекомбиниран интерферон бета IFNB	27
1.7.3 Механизам на дејство IFNB1	28
1.7.4 Терапевтска ефикасност	28
1.8 Развој на антитела против интерферон	29
2. Мотив на истражувањето	32
3. Цели на истражувањето	33
4. Материјал и методи	33
4.1 Пациенти и дизајн на студијата	33
4.1.1 Критериуми за вклучување	34
4.1.2 Критериуми за исклучување	34
4.2 Одредување на врзувачки антитела	35
4.3 HLA типизација	36
4.4 Одредување на VEP P100 бранот	37
4.4 Статистичка анализа	37
5. Резултати	38
6. Дискусија	68
6.1 Антитела кон интерферон бета	68
6.2 HLA и развој на антиинтерферонски антитела	72
6.3 Алелна фреквенција на HLA и ризик за мултипла склероза	74

6.4 Поврзаноста на HLA со должината на P100 бранот	80
7. <i>Заклучоци</i>	82
8. <i>Литература</i>	83

Апстракт

Мултипла склероза (МС) е честа инфламаторна болест на централниот нервен систем која се карактеризира со демиелинизација на аксоните. Болеста е хронична, ги зафаќа големиот мозок, рбетниот мозок и оптичките нерви и е водечка причина за нетравматски инвалидитет кај младата популација помеѓу 20-40 годишна возраст. Генетската предиспозиција игра голема улога во развој на МС, особено HLA алелите. Интерферон бета (IFNB) е прва терапевтска линија во лекување МС. Има протеинска структура што предизвикува имун одговор за создавање и развој на антиинтерферонски антитела (ВAB) кон него.

Цел на студијата беше одредување на процентот пациенти позитивни на ВAB, одредување на ризикот за развој на ВAB во зависност од HLA алелите и ризик за развој на МС во зависност од HLA алелите. Секундарни цели беа одредување на влијанието на времетраењето на терапијата врз развојот на ВAB, влијанието на поделни HLA алели врз развојот на МС и должина на Р100 бранот при визуелни евоцирани потенцијали (ВЕП) како еден од симптомите при МС.

Во студијата беа вклучени вкупно 132 пациенти со МС кои беа на терапија со IFNB и тоа со IFNB-1a 22 mcg и IFNB-1b 8MIU супкутано (СК) и со IFNB-1a 30 mcg интрамускулно (ИМ) најмалку 2 месеци, во период од 2015 до 2019 година. Контролната група ја сочинуваа 1418 здрави испитаници, заведени во Институтот за имунологија и хумана генетика, медицински факултет, Скопје и Дарителскиот регистар на коскена срцевина на Р Македонија. Кај сите пациенти беа одредени ВAB антитела со ЕЛИСА методот и според титарот на ВAB антителата беа поделени во две групи: група со титар на ВAB >50 pg/ml, позитивни и група со титар на ВAB <50 pg/ml, негативни. Кај сите пациенти беа одредена HLA алелите, класа I (A, B и C) и класа II (DRB1 и DQB1) во претходно изолирана ДНА која потоа се амплифицираше во термосајклер, PCR (Eppendorf) апарат со користење кит Olerup SSP за HLA DR-DQ. Добиените ПЦР продукти (ампликони) се визуелизираа на 2% агарозен гел. Кај 70 пациенти беше одредена должината на Р100 бранот при ВЕП во две последователни мерења на четири канален EMG/EP Keypoint апарат со стандардни сребрени електроди.

Резултатите од ова истражување покажаа дека 71 од пациентите со МС беа ВAB позитивни, а 61 ВAB негативни. Средната вредност на титарот на ВAB антителата кај пациентите третирани ИМ со IFNB - 1a изнесуваше 402,1 pg/ml, доедка титарот на

ВАН антителата кај пациентите на СК терапија со IFNB - 1b, изнесуваше 394,0 pg/ml, а кај IFNB - 1a, 82,9 pg/ml и е статистички значајна. Кај пациентите третирани ИМ со IFNB - 1a не се најде статистичка значајност меѓу ВАН позитивните и ВАН негативните пациенти. Статистичка значајност, $P < 0,05$ се најде во групата третирана СК со Interferon β - 1b, (78,4% ВАН позитивни, 21,6% ВАН негативни) и со Interferon β - 1a (28,2% ВАН позитивни и 71,8% ВАН негативни). Пациентите третирани СК со Interferon β - 1a имаа 0,3 пати ($OR=0,317$) помал ризик за зголемен титар за создавање ВАН антитела во однос Interferon β - 1a ИМ и 0,1 пати ($OR=0,108$) помал ризик за зголемен титар во однос на Interferon β - 1b администриран СК. Не се најде статистички значајност за времетраењето на терапијата врз концентрацијата на титарот на ВАН антителата.

Во однос на HLA алелите и ризикот за МС, се покажа дека HLA-A*02 има заштитна улога за МС, ($P=0,00283$, $OR = 0,652$), додека HLA-A*03 е ризичен алел за развој на МС ($P=0,0444$, $OR = 1,602$). Алелот HLA-B*44 е заштитен алел за развој на МС ($P=0,0469$, $OR=0,49532$) во однос на контролата. Алелот HLA-DRB1*15 и HLA-DQB1*06 и е ризичен алел за развој на МС ($P < 0,0001$, $OR = 2,945$, $P < 0,0001$, $OR = 1,9878$, соодветно), а пак алелот HLA-DQB1*03 е заштитен алел за развој на МС ($P=0,0004$, $OR = 0,51634$) во однос на контролата. Не се докажа поврзаност на HLA алелите и ризикот за развој на ВАН антителата. Алелот HLA-A*11 го намалува ризикот за патолошко времетраење на P100 бранот ($P=0,000183$, $OR = 0,1138$).

Врз основа на добиените резултати може да се заклучи дека повеќе од 50% од пациентите третирани со IFNB се позитивни на ВАН. Времетраењето на терапијата не влијае врз развојот на ВАН антитела. Алелите HLA-A*02, HLA-B*44, HLA-DQB1*03 имаат заштитна улога за развој на МС, додека алелите HLA-A*03, HLA-DRB1*15 и HLA-DQB1*06 се ризични алели за развој на МС. Носителите на алелот HLA-A*11 имаа статистички значајно покусо времетраење на P100 бранот што може да оди во прилог на фактот дека кај тие пациенти прогресијата на болеста е помала.

Клучни зборови: мултипла склероза, интерферон бета, врзувачки антитела, HLA,

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is common inflammatory disease of the central nervous system (CNS) and the hallmark is demyelination of the axons. Demyelination affects the cerebrum, Cerebellum, spinal cord and optic nerves. Multiple sclerosis is a leading cause of nondramatic disability in young population of 20-40 years of age. Genetic factors have a major role for MS development, especially HLA alleles. Interferon beta (IFNB) is a first line of treatment for MS. IFNB is a protein molecule that induces an immune response and development of antiinterferon binding antibodies (BAB).

Aim of this study was to determine the percentage of patents with interferon beta BAB, to evaluate the influence of HLA alleles for BAB development and to evaluate the risk of HLA alleles for development of MS. Secondary endpoints were to determine of treatment duration will influence on BAB development and risk of HLA alleles for prolonged P100 wave of visual evoked potentials (VEP).

In this study we have included 132 patients with MS treated with IFNB-1a 22 mcg and IFNB-1b 8MIU subcutaneously (SC) and IFNB-1a 30 mcg intramuscularly (IM) with a treatment duration of at least 2 months prior the start of the study. The study was conducted from 2015 to 2019. Our control group consisted of 1418 healthy individuals listed in the Institute of Immunology and Human Genetics and Macedonian Registry for Bone Marrow Donors. In all patients were tested for BAB antibodies with ELISA method. According to BAB titer were divided in two groups: BAB >50 pg/ml as a positive and BAB <50 pg/ml as a negative for BAB. All patients were genotyped for HLA class one alleles A, B, C and class II alleles DRB1 and DQB1. DNA was isolated and amplified in a thermoshaker, PCR method was used with an n Olerup SSP kit for HLA DR-DQ alleles. PCR products were visualized on a 2% agarose gel. In a 70 patients VEP P100 wave was measured in two consecutive measurements with a four channel EMG/EP Keypoint machine with a standard silver electrodes

From the results of this study we can see that 71 of the patients with MS were tested positive for BAB, and 61 were negative for BAB. Mean titer of BAB in patients treated IM with IFNB - 1a was 402,2 pg/ml and the BAB titer for IFNB - 1b 394,0 pg/ml, in the group of

patients treated with IFNB - 1a SC BAB titer was 82,9 pg/ml which was statistically significant. In patients treated with IFNB intramuscularly we did not confirm statistically significant difference between BAB positive and BAB negative patients. In the group treated subcutaneously with Interferon β - 1b 78,4% were BAB positive and 21,6% were BAB negative and that was significant difference ($P < 0,05$). The group treated with Interferon β - 1a, 28,2% were BAB positive and 71,8% were BAB negative ($P < 0,05$). Patients treated SC with Interferon β - 1a had 0,3 (OR=0,317) times less risk for BAB development compared to IM Interferon β - 1a and 0,1 times less risk compared to Interferon β - 1b IM (OR=0,108). We did not confirm statistical significance between treatment duration and risk for BAB development.

We confirmed HLA alleles to be either risk or a protective factor for MS development. HLA allele HLA-A*02 has a protective role for MS development ($P=0,00283$, OR = 0,652) and HLA-A*03 was a risk factor for MS ($P=0,0444$, OR = 1,602) compared to control group. We confirmed HLA-B*44 to a protective allele ($P=0,0469$, OR=0,49532) compared to control group. Alleles HLA-DRB1*15 and DQB1*06 were confirmed as risk alleles for MS development compared to the control group ($P < 0,0001$, OR = 2,945, $P < 0,0001$, OR = 1,9878 respectively). The allele HLA-DQB1*03 was confirmed as a protective allele for MS ($P=0,0004$, OR = 0,51634) compared to the control group. We have not confirmed HLA risk for BAB development. Allele HLA-A*11 plays as a protective allele and reduces the risk for prolonged P100 wave ($P=0,000183$, OR = 0,1138).

According to these results we conclude that more than 50% of the patients treated with IFNB are positive for BAB. Treatment duration did not influence BAB development. Alleles HLA-A*02, HLA-B*44, HLA-DQB1*03 have a protective role for MS development and alleles HLA-A*03, HLA-DRB1*15 and HLA-DQB1*06 are risk alleles for MS development. Carriers of the HLA-A*11 have lower chances to develop prolonged P100 which can be assumed to have slower disease progression.

Keywords: multiple sclerosis, interferon beta, binding antibodies, HLA

Листа на кратенки

АПК	Антиген презентирачки клетки
ВAB	Binding antibodies / врзувачки антитела
ВТУ	Bulhman Titer Units
ВЕП	Визуелни евоцирани потенцијали
ЕАЕ	Еспериментален автоимун енцефаломиелит
ЕВV	Erstein Barr Virus
ЕDSS	Expanded Disability Status Score
ЕМG	Електромиографија
ЕР	Евоцирани потенцијали
ННV	Human Herpes Virus
НLА	Human Leukocyte Antigen / хуман леукоцитен антиген
КИС	Клинички изолиран синдром
IFN	Интерферон
IFNB	Интерферон бета
IL	Интерлеукин
IU	International units / интернационални единици
МКБ	Мозочно крвна бариера
МР	Магнетна резонанса
МС	Мултипла склероза
ОКТ	Олигоклонални траки
ППМС	Примарно прогресивна мултипла склероза
РРМС	Релапсно ремитентна мултипла склероза
СПМС	Секундарно прогресивна мултипла склероза
NAВ	Neutralizing antibodies / неутрализирачки антитела
VEP	Визуелни евоцирани потенцијали
ЦНС	Централен нервен систем
ЦСЛ	Цереброспинален ликвор

1. Вовед

1.1 Епидемиологија

Мултипла склероза (МС) е честа инфламаторна болест на централниот нервен систем (ЦНС) која се карактеризира со демиелинизација на аксоните (1). Болеста е хронична, ги зафаќа големиот мозок, 'рбетниот мозок и оптичките нерви и е водечка причина за нетравматски инвалидитет кај младата популација помеѓу 20-40 годишна возраст (2).

Инциденцата на МС е седум заболени на 100.000 жители за една година. Во светот, од МС боледуваат 2,5 милиони луѓе (3). Во Република Северна Македонија нема прецизна епидемиолошка студија за инциденцата и преваленцата на МС. Денес кај нас се регистрирани вкупно 1573 пациенти со МС. Во околните земји и земјите во Европа, преваленцата за МС варира во зависност од епидемиолошките студии и годината на објавување. Во регионот, според објавените податоци, преваленцата варира, од 20/100000 жители, во Романија до 50/100000 во Бугарија. За разлика од овие две земји, во регионот на Горски Котор, Хрватска, има повисока преваленца, 144-152/100000 (4). Во западниот дел на Грција преваленцата изнесува 120/100000 со инциденца од околу 9,5/100000 жители (5). Во земјите од Централна Европа преваленцата се разликува во зависност од периодот на објавување на студиите. На пример, во Германија, преваленцата се движи помеѓу 62 па се до 128/100000, така што во 1986 била помала во однос на 2016 година (6), (6,7), додека во 2006 година била највисока. Иако методологиите на епидемиолошките студии се разликуваат, добиените податоците во поновите студии укажуваат на повисока преваленца и инцидента за истите земји и региони. Една од причините за ваквите резултати е времето до поставување вистинска дијагноза, подобрување на дијагностичките протоколи и достапноста на магнетна резонанца (МР) во дијагноза на МС (8) Досега во Република Северна Македонија не се објавени епидемиолошки студии за МС или пак доколку ги има, не се индексирани во литературната база достапна за пребарување. Овие податоци се важни за правилно планирање и предвидување на терапијата и грижата за болните од МС.

Мултипла склероза претставува голем личен и социо-економски проблем. Просечна возраст за почеток на болеста е околу 30 години старост, време кога

работоспособноста и планирањето фамилија е најактивно. По 25 години, од поставување дијагноза, 50 % од пациентите имаат потреба од инвалидска количка (3).

1.2 Клиничка презентација

Мултипла склероза е хетерогена имунолошка болест која ги зафаќа аксоните на централниот нервен систем и предизвикува нивна демиелинизација. Ова предизвикува загуба или намалување на функцијата на невроните и појава на типични симптоми поврзани со болеста. Презентацијата на болеста е различна и зависи од местото на лезијата. Болеста се состои во релапси и ремисии. Кога се развива клиничката слика и се јавуваат симптомите станува збор за напади или релапс. Кога симптомите полека се повлекуваат и немаме нови симптоми зборуваме за состојба на ремисија. Кога ќе се постави дијагнозата многу е тешко да се предвиди нејзиниот тек и фреквенцијата на релапсите. Честите релапси придонесуваат за зголемување на инвалидитетот и трајно оштетување на функцијата на аксоните, а со тоа и трајно намалување на моторните и когнитивните функции на пациентот. Текот на болеста може да се разликува, може да биде со бавна и со нешто побрза прогресија. Има бројни студии во кои се опишани групи пациенти со многу бавна прогресија на болеста и со релативно мал инвалидитет во текот на многу години (9). Најчести симптоми се моторна слабост, парестезии, намален сензибилитет, проблеми со видот, атаксија, вртоглавица и главоболка (10). Една од главните потешкотии кај пациентите со МС е одењето, опишани во повеќе студии, потоа видот и когницијата. Чест клинички симптом е заморот при одењето, особено кај пациенти кои имаат лезии на ‘рбетниот мозок. При подолго одење се чувствува замор во нозете кој претходно не бил присутен. Одењето е важен дел во клиничкиот преглед кај пациенти со МС, бидејќи одењето е еден од критериумите за прогресијата на болеста. Намалената подвижност ја намалува работоспособноста на пациентите и го намалува изборот на работното место (11). Во поновите студии опишан е и заморот на рацете кој влијае врз секојдневните активности, симптом кој често се занемарува од страна на невролозите. Студиите покажуваат дека поради замор на рацете и намалена спретност, пациенти, имаат проблем на работното место и имаат намалена ефикасност при извршување на работните обврски (12).

1.3 Клинички форми на МС

Според клиничките карактеристики МС се дели на клинички изолиран синдром, релапсирачко ремитентна форма, примарно прогресивна форма и секундарно прогресивна форма.

1.3.1 Клинички изолиран синдром (КИС)

Клинички изолиран синдром претставува прва клиничка епизода со невролошко нарушување кое трае повеќе од 24 часа и кое може да се развива акутно или субакутно, а е предизвикано од воспаление на ЦНС. Кај овој тип МС нема покачена телесна температура, инфекција или енцефалитис (13). КИС не се разликува од клиничките релапси на МС. Освен тоа што КИС е прва клиничка епизода и нема податок за слични симптоми во минатото. Околу една третина од пациентите со КИС, долг период нема да развијат МС и болеста ќе остане монофазна долг период. Денес е тешко да се предвиди кои пациенти со КИС ќе развијат МС или ќе имаат втора клиничка епизода. Тоа би имало импликации на терапијата и прогнозата (14).

1.3.2 Релапсирачко ремитентна мултипла склероза (РРМС)

Ова е најчеста форма на МС која често се карактеризира со појава на нови симптоми или потенцирање на веќе постоечките. Појавата на нови симптоми се нарекува релапс, по кои следи потполно или делумно опоравување, ремисија. Во многу популационите студии, процентот на оваа клиничка форма на МС се разликува. Така, неодамна во Франција, во големата популациона студија податоците од Европската дата база на пациенти со МС сместена во Лион, покажала дека од вкупно 15035 пациенти со МС, 75% се со РРМС од кој најголем број или 76,2% се на возраст од 18-40 години, период кој е репродуктивен и најпродуктивен (15). Слична преваленца на РРМС најдена е и кај 212 пациенти кои живеат во Гетеборг, Шведска кои се следени во период од 50 години. Резултатите покажале дека во првата година од почетокот на болеста, 50% од испитаниците имале РРМС со два релапси во првата година, додека во третата година од поставување на дијагнозата, 72% од пациентите развиле РРМС (16). Пациентите со РРМС доколку не се лекуваат, во период од 10 години ќе преминат во секундарно прогресивна МС.

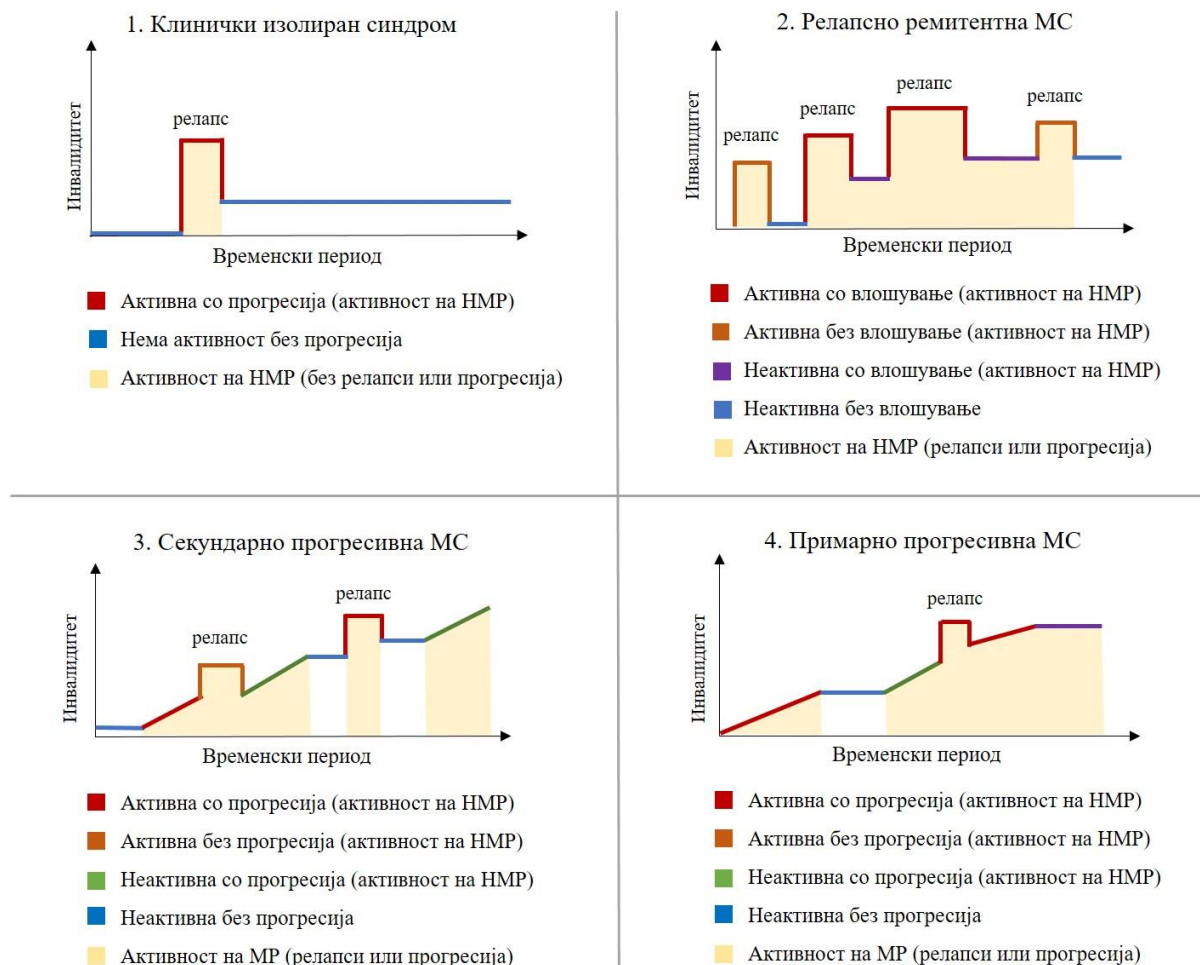
1.3.3 Примарно прогресивната мултипла склероза (ППМС)

се карактеризира со постојано влошување на состојбата и објективно зголемување на инвалидитетот, иако има и период на стабилна состојба на болеста. Кај ППМС не се регистрираат релапси и период на ремисија како кај РРМС. Оваа форма ги зафаќа подеднакво двата пола и започнува малку подоцна во животот и понекогаш за докторот може да биде и дијагностички предизвик (17). Кај оваа форма постепено се зголемува инвалидитет и најголемиот дел од лековите одобрени за МС немаат ефект врз спречувањето на прогресијата. Во 2018 година прв пат беше одобрено првото моноклонално антителино лекување на ППМС. Ова форма е најретка форма на МС. Инцидентата се движи од 0,4 до 1,4/10000 жители. Резултатите од студијата на Rojas и соработниците, објавена во 2018 година, укажуваат на ваква преваленца и во Латинска Америка, доминантно кај населението во Бразил (18).

1.3.4 Секундарно прогресивна мултипла склероза (СПМС)

Оваа форма се јавува кај пациентите со веќе дијагностицирана РРМС. По одреден период болеста поминува во СПМС и се карактеризира со континуирано влошување и зголемување на инвалидитетот и отсуство на типични релапси и ремисии. Како доказ за активноста на болеста може да послужи магнетната резонанса каде се регистрира зголемување на бројот и волуменот на демиелинизирачките лезии (1). Кај пациентите со РМСС со текот на годините се зголемува инвалидитетот. Според Expanded Disability Status Scale (EDSS, скала со која се мери инвалидитетот кај пациентите со МС и чија вредност се движи во граници од 1-10 (19), кога инвалидитетот ќе достигне вредност 6, се смета дека болеста преминува во секундарно прогресивна форма. Засега сеуште нема лекови кои се одобрени за лекување на СПМС, а од постоечките лековите ниеден не покажал ефикасност во лекување на оваа форма МС. Доколку МС не се лекува, просечното време болеста да ја добие СПМС формата изнесува околу 12 години и според резултатите објавени од многу студии овој временски период значително се разликува кај испитуваните групи (16,20). Навремената терапија е има за цел да ја спречи прогресијата на болеста од РРМС во СПМС форма.

На Слика 1 се прикажани сите четири клинички форми нивната клиничка прогресија и активноста регистрирана на МР.



Слика 1. Клинички форми на МС – Класификација од 2013 година

1. **Клинички изолиран синдром** – една клиничка епизода која има промени на нуклеарна магнетна резонанса за време на траењето на симптомите, состојбата не се влошува со текот на времето, 2. **Релапсно ремитентна МС** – болеста се состои од повеќе влошувања релапси со текот на времето, има активност на МР и постепено зголемување на инвалидитетот, 3. **Примарно прогресивна МС** – постојана активност на болеста без присуство на релапси и постепено зголемување на инвалидитетот. 4. **Секундарно прогресивна МС** – постепено намалување на релапсите со постепено зголемување на инвалидноста, активност на МР е во текот на целиот период

МР-нуклеарна магнетна резонанца; МС – мултипла склероза

1.4 Дијагноза на мултипла склероза

Поради карактеристичните симптоми, дијагностицирањето на МС претставува дијагностички предизвик последните 120 години. Дисеминација во простор и време е основно обележје на МС, присуството на демиелинизирачки лезии во ЦНС на различни локации и појавата на клинички епизоди (релапси) во различно време е главна карактеристика на МС, што ја имаат две третини од пациентите со МС со РРМС форма. (21,22). Клиничката презентација на МС може да биде различна. Најчесто,

првиот симптом на болеста може да биде нарушен или отежнат вид, дупли слики, симптоми кои потекнуваат од мозочното стебло или парцијален миелит (1). Првата епизода со карактеристики на МС се нарекува клинички изолиран синдром (КИС) и најчесто се јавува кај пациенти помлади од 40 години. Симптомите се субакутни се развиваат многу брзо во период од неколку часови или денови и за период од 15 до 40 дена се повлекуваат (23). Кај пациенти што доживеале КИС веројатноста е многу голема за втора клиничка епизода на слични или различни симптоми кои го дефинираат терминот дисеминација во време, што значи во одреден временски период два или повеќе различни клинички епизоди.

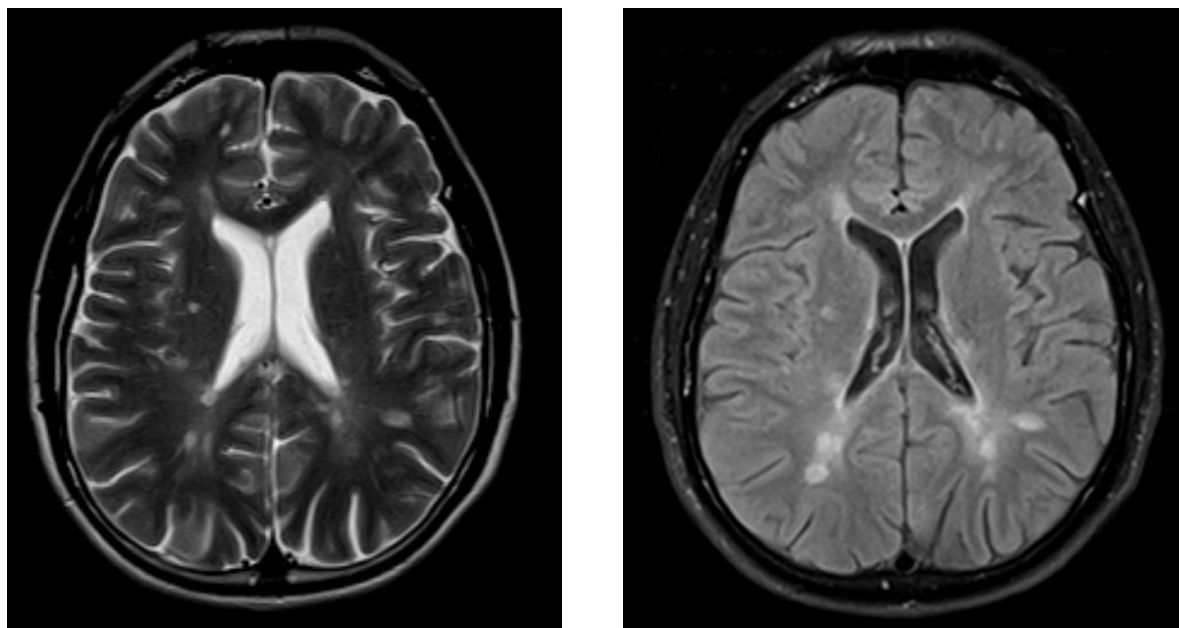
Кај пациентите кај кои клинички се забележани симптоми кои сугерираат на демиелинизација, треба да се земе детална анамнеза и историја на болеста, заради тоа што во минатото, можеби имале симптоми кои биле препознаени или пак поминале спонтано. Целосен невролошки преглед е клучен за клинички да се одреди локализација од кој дел на ЦНС доаѓаат симптомите. Исто така, невролошкиот преглед може да открие и други знаци за инволвираност на ЦНС, како што се живи или отсечни мускулно тетивни рефлекси или пак патолошки рефлекси како знакот на ински.

За првпат во 1868 година Jean-Martin Charcot се обидел да направи критериуми за дијагноза на МС и опишал неколку симптоми кои денес не се сметаат специфични за МС. Тоа биле тријада од нистагмус, интенционен тремор и скандиран говор. Подоцна, во 1936 година, свои критериуми за дијагноза на МС се обидел да постави и Otto Marburg кој дополнително ги вклучил и пирамидните патишта, но и овие критериуми се малку специфични за дијагностицирање на МС (21).

Први официјални критериуми за дијагноза на МС биле објавени во 1954 година од страна на Allison и Millar (24). Сите критериуми биле различни и сеуште постоела тешкотија и не го олесниле протоколот за дијагностицирање на МС. За да се стандардизира дијагностичкиот протокол особено за вклучување на пациенти во клиничките студии Schumacher направил нови критериуми и ги објавил во 1965 година (25). Поради различни термини и дефиниции што е МС и немање на специфичен лабораториски доказ за МС, Poser во 1983 година објавил свој водич за дијагноза кој за првпат вклучувало лабораториска потврда со наод од цереброспинален ликвор (ЦСЛ) во кој докажал присуство на ИгГ и постоење на олигоклонални траки (ОКТ) во ЦСЛ кај болните од МС. Овие критериуми ќе бидат темел за дијагностицирање на МС наредните 20 години (26). Во 2001 година, Ian W. McDonald и соработниците за прв пат за првпат ќе ги објави своите критериуми кои за првпат ја вклучуваат магнетната

резонанса како основен неврорадиолошки критериум за дијагностицирање МС (27). Лезиите на МС одлично се регистрираат со МР и се изразуваат со појачен сигнал (хиперсигнал) во Т2 и ФЛЕР секвенците. Нови лезии на МР кои се јавиле подоцна во текот на болеста ја одредуваат дисеминацијата во простор и во време. Овие критериуми сеуште се користат иако претрпуваат неколку ревизии: во 2005, 2010, (28,29) и во 2018 година (30). Засега ревизијата од 2010 година се користи како основа за дијагноза на МС.

Целта на овие критериуми е поедноставно да се дијагностицира МС водејќи, при тоа сметка за диференцијалната дијагноза. Поставување точна и брза дијагноза влијае на исходот од терапијата кај овие пациенти. Последната ревизија главно го поедноставува критериумот дисеминација во време и простор користејќи МР како основен критериум за дијагноза. Разликата со критериумите од 2005 година за дисеминација во простор е во тоа што сега се бара една хиперсигнална лезија во Т2 секвенцата во најмалку два од вкупно 4 региони во ЦНС (јукстакортикално, перивентрикуларно инфратенторијално и рбетен мозок), Слика 2.



Слика 2. Лево Т2 секвенца МР каде во белата маса се гледаат хиперсигнални лезии карактеристични за МС. Десно, ФЛЕР секвенца каде паравентрикуларно, најмногу кај задните рогови на латералните комори се гледаат хиперсигнални лезии на МС.

Групата MAGNIMS (31) составена од експерти кои се занимаваат со МС и МР како основа за дијагноза, во 2016 го поедноставува критериумот за дисеминација во време, односно нови лезии на МС кој се јавиле во одреден временски период. Со новите

критериуми доказ за дисеминација во време е потребно една нова T2 хиперсигнална лезија или лезија во T1 која се бои со контраст во споредба со претходната МР (32). Со новите критериуми полесно се дијагностицира МС и попрецизно се дефинираат клиничките форми на МС. Другите параклинички методи имаат јасна позиција во дијагнозата на МС како што е анализата на ЦСЛ и детекција на ИГГ ОКТ. Ревизијата на критериумите во 2018 треба да донесе податоци од новите студии како и користење на се понапредната технологија на МР апаратите се со цел поедноставување и раната дијагноза на МС.

Исто така како дополнителна клиничка метода за потврда на оштетување на оптичките нерви се користат визуелните евоцирани потенцијали (ВЕП). ВЕП со помош на визуелна стимулација преку екран и регистрација на скалпот со електроди се регистрира електричен мозочен одговор кој се трансформира во ВЕП бранови. Најважен дијагностички бран е P100 бранот кој доколку е штетен оптичкиот нерв е пролонгиран. Во различни студии и препораки P100 бранот кој е подолг од 116 ms се смета за пролонгиран (33). Кај пациенти кои за првпат имаат симптоми на МС доколку вредноста на P100 бранот е пролонгирана тогаш шансите за развој во дефинитивна форма е зголемен (34). Засега се уште ВЕП имаат свое место во дополнителните испитувања при поставување на дијагноза кај МС особено кога имама клинички тивки лезии.

1.5 Патофизиологија на МС

Главна одлика на МС е демиелинизација на аксоните а со тоа се губи нивна функција во делот од ЦНС каде случува активноста на болеста по што произлегуваат и симптомите. Демиелинизираните аксони се подложни на дополнително оштетување од околината, под влијание на кислородни радикали и инфламаторни супстанции кои учествуваат во патофизиологијата на МС

Во основата на патофизиологијата на МС се CD4+ Т клетки кои се активираат во периферијата и остваруваат имун одговор во ЦНС преку миграција и преминување на мозочно крвната бариера (МКБ). Кога ќе навлезат во ЦНС, CD4+ Т клетките го препознаваат миелинот, поточно специфичниот миелински протеин како антиген. Овој антиген е презентираан од антиген презентирачки клетки (АПК) кој пак доведува до зголемена синтеза на про-инфламаторни супстанции од страна на CD4+ Т клетките како цитокини и кемокини. Антиген презентирачки клетки ги стимулираат околните

макрофаги и микроглија клетките дополнително да привлекуваат друг тип клетки во ЦНС како што се цитотоксични ЦД8+ Т клетки, Б клетки и наивни Б клетки (35). Како резултат на влијанието на овие клетки како и токсичната средина заради присуството на инфламаторните медијатори, доведува до локално уништување на миелинот и изумирање на аксоните. ЦД8+ Т клетките дополнително ги убиваат олигодендроцитите, клетки кои го создаваат и одржуваат миелинот (36).

Во воспалителните лезии на МС, најчесто се наоѓаат Т клетките и макрофагите кои најчесто се наоѓаат во вид на АПК, Б клетките се во помал број. Кај експерименталните модели на автоимун енцефаломиелит (ЕАЕ), (37) експериментален ин витро модел на МС докажале дека ЦД4+ Т клетките насочени кон миелинот можат да ја пренесат болеста од еден модел во друг. Овие наоди покажуваат дека ЦД4+ Т клетките се најверојатно главната причина за развивање на МС и дека МС е клеточно посредувана автоимуна болест (38,39).

Зошто доаѓа до активација на Т клетките, нивна диференцијација во ЦД4+ Т клетки и нивна стимулација кон миелинскиот протеин, се уште не е познато. Се претпоставува дека потфрла механизмот на ниво на периферните лимфни жлезди. Кога автореактивните Т клетки ќе ја избегнат контролата на тимусот доаѓаат во периферните лимфни жлезди. Во периферните лимфни жлезди има Т регулаторни клетки кои ги препознаваат автореактивните клетки и ги убиваат. Кога има нарушен механизам на регулација од страна на Т регулаторните клетки или пак отпорност на автореактивните Т клетки, доаѓа до нивна стимулација и активација. Се претпоставува дека ова е почетниот механизам за развој на МС (40,41)

Бројот на автореактивните Б клетки во лезиите на МС се разликува во однос на Т клетките и варира во текот на болеста. Порано се сметаше дека Б клетките и синтезата на антитела немаат влијание во патофизиологијата на МС, но денес е докажано дека имаат клучна улога. Делбата на Б клетките и нивното размножување се регистрира во менингите, паренхимот на ЦНС и во ЦСЛ каде синтетизираат антитела кои се детектираат преку анализа на ликворот и имаат дијагностичка вредност. Со текот на болеста бројот на Б клетките (плазма клетките) кои синтетизираат антитела се зголемува. Повеќе студии покажуваат дека и при првиот симптом на МС и без присуство на ИгГ синтеза во ЦСЛ, се регистрираат лози на Б клетки кои учествуваат во хуморланиот имун одговор и оштетување на миелинската обвивка (42,43). Денес има

се повеќе лекови за МС кои директно ги таргетираат Б клетките, а со тоа го намалуваат воспалението.

Кај 7% - 10% пациентите и покрај доказите за учество на Б клетките во патофизиологијата на МС, не можат да се детектираат олигоклонални траки (ОКТ) во ликворот. Ова покажува дека постои различен имун механизам кај дел од пациентите кој се негативни на ОКТ. Повеќе студии покажуваат и за влијанието врз имуниот одговор на хуманиот леуокцитен антиген (HLA) и тоа класа II алелите. Кај пациенти кои се позитивни на ОКТ, клучна улога има HLA-DRB1*15:01, а кај ОКТ негативни пациенти, најмногу игра улога HLA-DRB1*04:04 и 04:05 (44). Пациентите кои се ОКТ негативни маат подобра прогноза и побавна прогресија на болеста. Исто така, податоците покажуваат дека ОКТ негативните пациенти третирани со интерферон бета имаат подобар одговор на терапијата. Оттука произлегува дека постојат и генетски фактори кои влијаат врз развојот на болеста и нејзината прогноза (45).

1.6 Фактори кои влијаат на болеста

1.6.1 Генетски фактори

Во многу објавени трудови докажано е дека генетскиот фактор влијае за појавата на МС, а еден од најважните, досега, докажани генетски фактори се лоцирани во HLA регионот. Најцврсти докази се пронајдени за HLA класа II алелите и тоа HLA-DRB1*15:01 кои го зголемува ризикот за појава на МС за околу 3 пати. Кај белгиската популација е изведена студија во 2016 година на група од 119 испитаници и контролна група од 124 здрави индивидуи со цел да се одреди ризикот на HLA за појава на МС. Резултатите покажале дека и кај белгиската популација е HLA DRB1*15:01 го зголемува ризикот за МС за 2,47 пати, доколку пак хаплотипот од DRB1*1501-DQA1*0102 го зголемува ризикот за МС 2,65 пати. Слични резултати добиле и кај словачката популација на група од 282 пациенти каде носителите на DRB1*15 алелот имаат 3,64 пати поголем ризик за МС во однос на индивидуи кои се негативни на тој HLA алел. Исто така во оваа група носителите на хаплотипот DRB1*15- DQB1*06 имале 3 пати зголемен ризик за МС во однос на контролната група. Заштитна улога за појава на МС се смета HLA класа I алелите и тоа HLA-A*02 (46).

Ромеро и соработниците добиле слични резултати кај шпанска група од 380 пациенти со МС и контролна група од 1088 здрави индивидуи. Во оваа кохорта DRB1*15 алелот бил повеќе присутен кај индивидуите со МС во однос на контролната

група и го зголемува ризикот за 2 пати за МС во однос на индивидуите кои се негативни за овој алел. Во оваа група дополнително и DRB1*03 алелот бил повеќе присутен кај пациентите со МС во однос на индивидуите од контролната група и го зголемува ризикот за МС за 1,34 пати. Спротивно алелот DRB1*11 бил помалку присутен кај групата со МС во однос на контролната група. Во оваа група ниту еден алел не покажал асоцијација со формата на МС. Спротивно кај групата со МС, носителите на DRB1*01 и DRB1*04 имале статистички значајно пократко време до инвалидитет од 3 на ЕДСС скалата. Овие алели независно се ризик фактор за полоша прогноза и побрза прогресија на МС. (47)

Enz и соработници анализираше церебрална сива маса кај пациенти кои имале МС земена постмортем при обдукција и сива церебрална маса кај контролна група кој немала МС. Целта била да се види дали има разлика во генетската експресија на мозочните клетки кај пациенти со МС и контролната група, дали биохемиските процеси се различни. Резултатите покажале дека кај на изглед нормална церебрална сива маса експресијата на DRB1*15 протеините е повисока и тоа кај носителите на хаплотипот DRB1*15:01 кај групата со МС е значително поголема во однос на контролната група. Најголема експресија на DRB1*15 протеините имало во микроглија клетките. Дополнително се анализирани и демиелинизирачките лезии каде исто така експресијата на DRB1*15 протеините е висока кај носителите на DRB1*15:01 алелот во однос на негативните на овој алел. Ова покажува дека хипотезата за генетската предиспозиција на кортикалните лезии и големината на лезиите сепак може да е точна. (48)

Досега не е изработена студија на македонска популација кој ај покажува алелната фреквенција на HLA алелите кај пациенти со МС.

Една од главните улога на HLA е во презентацијата (прикажување) на антигенот од страна на АПК како основа за активација на ЦД4+ Т клетките (49). Иако е докажано дека генетските ефекти може да го зголемат или намалат ризикот за појава на МС, сепак, тешко е да се предвиди кои од лицата во фамилијата ќе добијат мултипла склероза. На пример, кај монозиготни близнаци можноста да добијат МС (бидат двајцата зафатени) е 26%, додека кај хетерозиготните близнаци е околу 3%. Ова покажува дека за појавата на МС влијаат и други фактори, меѓу кои најверојатно се и фактори на средината (50). Исто така генетскиот фактор влијае на прогресијата на болеста и времето на појавување на првиот симптом на МС. Во Литванија кај група од 120 пациенти дијагностицирани со МС кој биле позитивни на HLA-DRB1*15 алелот имале побрза прогресија на болеста, зголемен број на Т2 хиперсигнални лезии на МР и

патолошки пролонгирани ВЕП латенци на P100 бранот (51). Кај поголема група од 1457 испитаници со МС од Норвешка и Шведска кој биле анализирани, се покажало дека оние кои се позитивни на HLA-DRB1*15 имаат почеток на болеста на помлада возраст (52). Оттука DRB1*15 може да се смета и како ризик фактор за побрза прогресија на болеста и биомаркер за ран почеток на болеста.

1.6.2 Вирусни инфекции и витамин Д

Вирусите долго време се истражуваат како едни од моќните тригери за развој на МС. Најмногу докази постојат за два типа ДНА вируси Epstein-Bar вирус (EBV) и Human Herpes Virus (HHV) кои влијаат за развој на МС (53). Во првата декада од животот, 90% од популациите најчесто биле во контакт со вирусот EBV кој е лесно пренослив вирус, а кај младата популација, најчесто, 40% од пациентите развиваат инфективна мононуклеоза и 90% од популацијата била во контакт со вирусот, најчесто во првата декада од животот. Доколку се развие инфективна мононуклеоза, ризикот за добивање МС се зголемува за 2-3 пати за разлика од пациенти кои се позитивни на EBV ни не се развила мононуклеоза (54). Вирусот живее во латентна форма во Б клетките. Епидемиолошките студии покажуваат дека лицата кои биле инфицирани со EBV вирусот, во подоцнежните години се со зголемен ризик за појава на МС (55). За разлика од EBV вирусот HHV вирусот по инфекцијата живее во латентна форма во Т и во Б клетките. Кај пациенти со МС е пронајден е тип А на HHV вирусот и тоа во демиелинизирачките лезии и во ликворот што е докажано во студијата на Rogmohammad и соработници (56). Најновите истражувања покажуваат дека присуството на антитела и нивниот титар кон протеинските структури на HHV-6A и HHV-6B се асоцирани со појава на МС. Во студијата на Енгдал и соработниците кај голема група од 8742 испитаници со МС и контролна група од 7215 и група покажале дека ИгГ одговорот кон протеинот на HHV-6A и HHV-6B е повеќе присутен кај испитаниците со МС во споредба со контролната група. Дополнително кај група од 478 испитаници кои подоцна развиле МС бил измерен поголем ИгГ одговор кон протеинот на HHV-6A и HHV-6B во споредба со контрола контролна група од 476 испитаници. Ова истражување сугерира дека еден од ризик факторите за развој на МС е вирусниот одговор и јачината на имуниот одговор за време на инфекцијата со овој вирус. ИгГ

одговор кон вирусните протеини е одреден преку HLA и најголема застапеност на хаплотипот DRB1*13:01-DQA1*01:03-DQB1*06:03 за HHV-6A и хаплотипот DRB1*13:02-DQA1*01:02-DQB1*06:04 за HHV-6B (57)

Витамиот Д има заштитна улога во развојот на МС. Претпоставката е дека витаминот Д го менува имуниот одговор. Истражувањата за поврзаноста на витаминот Д и мултипла склероза укажуваат дека во географските предели поблиску до северниот и јужниот пол, преваленцата на МС е поголема, најверојатно заради намалената изложеност на сонце, а со тоа и синтеза на витамин Д кој се претпоставува дека е ризик фактор за развој на МС. Меѓутоа, ова не е случај со народите кои живеат во северните предели на земјата. Објаснувањето е во фактот што во нивната исхрана морската храна е најзастапена, а таа е богата со витамин (58)

1.7 Терапија на мултипла склероза

1.7.1 Интерферони

Во последните години за третман на МС се одобрија повеќе лекови. Така, за лекување на РРМС формата на МС, во 2018 година за прв пат е одобрен лек за третман. Денес интензивно се работи на развој на нови лекови кои допрва ќе бидат одобрувани во третманот на МС.

Прв лек за лекување на РРМС формата е интерферон бета (IFN β) кој е одобрен во 1994 година (59).

Во хуманиот организам има повеќе интерферони, кои ја сочинуваат групата супстанции наречени цитокини, а интерферонот бета е еден од нив. До денес, се опишани три групи интерферони: IFN1, IFN2, IFN3. Во групата IFN1 спаѓаат Пет хумани интерферони: IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ и IFN ω . Интерфероните имаат специфична улога врз механизмите во клетката и се разликуваат по своите биолошки функции (60)

Интерфероните од групата на IFN1 се прва линија на одбрана против вирусните инфекции во организмот и се дел од вродениот имунитет. IFN1 ја намалуваат вирусната репликација во клетките. Како прва линија на одбрана, сите клетки кои имаат јадро при контакт со вирус, синтетизираат интерферони. Најмногу интерферон синтетизираат дендритските клетки (61). IFN1 врши сигнализација во клетките и со тоа

ја извршува биолошката функција. Речиси сите клетки имаат рецептор за IFN1 преку кој IFN сигнализира. Сите IFN1 интерферони се врзуваат на ист рецептор, но во зависност од интерферонот имаат различна сигнализација и биолошка функција. Сигнализацијата на IFN1 врши промена на експресијата на повеќе од 100 гени кои кодираат различни супстанции кои имаат анти-вирусни, антипролиферативни, апоптотични и имуномодулаторни ефекти (60). Интерфероните од групата на IFN1, денес се користат како терапија за повеќе болести. Така, IFN алфа се користи за лекување на некои малигни и вирусни болести, додека IFN бета се користи за лекување на МС. Најмногу користен лек за МС во светот е IFNB и е прва линија на избор на РРМС формата.

1.7.2 Рекомбиниран интерферон бета IFNB

Постојат два вида рекомбиниран IFNB за третман на МС, IFNB-1a и IFNB-1b. Интерферонот IFNB-1a е протеин кој се состои од 166 аминокиселини, се наоѓа во овариумите на кинескиот хрчак и е идентичен со хуманиот IFNB (62). Рекомбиниранот IFNB-1b е синтетизиран од страна на култури на Ешерихија коли, исто така, е протеин кој содржи 165 аминокиселини заради што малку се разликува во биохемиската структура во споредба со хуманиот интерферон. Различната биолошка активност и термичката стабилност меѓу IFNB-1a и IFNB-1b се должи на тоа што IFNB-1a е гликолизан за разлика од IFNB-1b. Интерферонот IFNB-1a има 10-15 пати поголема биолошка активност ин виво во однос на IFNB-1b. Заради помалата биолошката потентност на IFNB-1b, тој се администрира во поголема неделна доза во споредба со IFNB1-a (62). Двата типа рекомбиниран IFNB, еден interferon-1b (Betaferon) и два Interferon-1a (Avonex) и Interferon beta-1a (Rebif), се разликуваат по дозата, начинот на администрација и бројот на дози во период од една недела (63). Така IFNB-1a се инјектира 30 mcg интрамускулно еднаш неделно или 22 и 44 mcg субкутано три пати неделно, во зависност од производителот, додека IFNB1-б, се инјектира субкутано во дози од 250 mcg секој втор ден.

1.7.3 Механизам на дејство IFN β

Механизмот на дејство на β не е потполно разјаснет, но се смета дека има имуномодулаторна улога, го менува начинот на кој се развива специфичен имун одговор и влијае на повеќе нивоа врз имуниот систем. Влијае на АПК, а со тоа ја намалува активацијата на CD4⁺ Т клетките и го намалува бројот на дендритични клетки (64). Исто така, β ја намалува презентацијата на миелин специфичниот антиген на Т клетките од страна на микроглија и моноцитите во централниот нервен систем. Од друга страна, β ја намалува адхезијата на Т клетките за крвните садови преку намалување на експресијата на адхезионите молекули алфа-4 интегрин VLA-4 и со тоа ја спречува миграцијата на Т клетките преку крвно мозочната бариера (65). Интерферонот β влијае и врз диференцијацијата на Th17 помагачките клетки и со тоа ја намалува синтезата на интерлеукин 17 како еден од проинфламаторните цитокини (66). Дополнително, влијае врз Т_H17 Б клетките преку намалување на специфичниот рецептор CD80, ја намалува синтезата на хуманиот интерферон од втората група, IFN γ гама, ја зголемува синтезата на интерлеукин 10 како антиинфламаторен цитокин (67), ја намалува синтезата на интерлеукин 12 како проинфламаторен цитокин одговорен при имуниот одговор кај автоимуните болести (68). Регулацијата на антиинфламаторните цитокини и нивната зголемена синтеза овозможува полесна ремиелинизација на аксоните. Со овие механизми интерферонот дејствува на два нивоа и имуномодулаторно и антиинфламаторно.

1.7.4 Терапевтска ефикасност

Повеќе рандомизирани мултицентрични студии покажаа дека интерферонот бета го менува текот на МС и ја намалува прогресијата на болеста (59). Навремено започнатата терапијата со интерферон бета, ја намалува прогресијата на болеста и го намалува бројот на нови хиперсигнални лезии на T2 секвенцата и нови лезии кои се потенцираат со контраст (гадолиниум) на МНР (1,69,70). Ефикасноста на IFN β е добро позната и е докажана во многу студии од реалната клиничка пракса (real world efficacy) со оглед на долгиот период во кој користи терапија на МС. Доколку се започне со

третман со IFN β при првиот клинички симптом на МС, ризикот за развој на дефинитивна МС се намалува за 5 пати во период од 3 години (71), а исто така, значително се намалува и стапката на годишни релапси (70).

1.8 Развој на антитела против интерферон

Интерферонот како протеин, но и многу други протеински молекули, денес се користат за третман на различни болести. Овие лекови се нарекуваат биофармацевтици. Овие молекули се скоро идентични на хуманите протеини. Таков е и IFN β . Поради нивната сличност, се очекува да бидат добро толерирани во организмот. Меѓутоа, и покрај сличноста на протеинската структура, во одредени ситуации тие го активираат имуниот систем создавајќи антитела против самиот лек. Ова може да доведе до намалена ефикасност на лекот дури и до потполно отсуство на лекот во организмот (72,73).

Механизмот за развојот на антитела е познат за вродениот имунитет. Антигенот, во овој случај е преземен од страна на АПК каде е преработен и е презентираан на површината на клетката преку молекули на HLA класа II. Реактивните Т клетки го препознаваат овој антиген и настанува нивна активација. Во исто време, антигенот е преземен од Б клетките и разложен на пептиди кои се прикажани на специфичните рецептори на површината на Б клетките преку кои настанува активација на сродните Б клетки и презентација на антигенот на површината на клетката преку HLA класа II молекулите (74). При тоа настанува интеракција на Б клетките преку сигнализација од страна на цитокини кои ги лачат активирани Т клетки. Оваа сигнализација го докрајчува процесот на зреење на Б клетките кои потоа создаваат антитела со висок афинитет кои можат да го неутрализираат антигенот, во овој случај. Т клетките помагаат Б клетките да се диференцираат во памтетчки клетки и клетки со долг живот како што се плазма клетките кои можат брзо и во големо количество да лачат антитела (75,76).

Иако постои сличност во хемиската структура со хуманиот интерферон, сепак предизвикуваат имун одговор. Една од причините може да биде и континуираната параентерална употреба. Имуниот одговор и синтезата на антитела може да биде независен од помошта на Т клетките. Во овој случај, Б клетките можат да бидат

стимулирани преку самите Б клетки кои го имаат прикажано (прикачено) антигенот на својата површина и да создадат антитела. Една од можните причини за независната активација на Б клетките е можеби оштетувањето на ткивото на местото на инјектирање. Покрај овие класични механизми на имун одговор, не кај сите болни од МС што примаат IFN β се развиваат антитела (77). Се претпоставува дека генетските варијации играат своја улога во активација или спречување на имуниот систем да реагира, затоа што врз создавањето антитела влијаат не само лекот туку и индивидуални фактори на пациентот (78).

Имуногеноста на рекомбинираниот IFN β е добро позната и е докажана уште во првата клиничка студија со IFN β -1b во која е опишано дека 42% од пациентите биле позитивни на антиинтерферонски антитела (79). Подоцна, во клинички студии потврдена е имуногеноста и за IFN β -1a, но фреквенцијата на позитивни пациенти за антиинтерферонски антитела била помала во споредба со оние пациенти кои примале - IFN β 1b (59,80). Фреквенцијата на позитивни пациенти за антиинтерферонски антитела зависи и од дозата и од начинот на администрација на лекот. Така пациентите кои биле третирани со IFN β -1a интрамускулно, 22% биле позитивни на антиинтерферонски антитела (81). Пациенти третирани субкутано со доза од 22 mcg со IFN β -1a 13% имале антиинтерферонски антитела додека кај 24% од пациентите што примале субкутано доза од 44 mcg се најдени антиинтерферонски антитела (81). Разликата во имуногеноста според дозата и начинот на администрирање потврдена е и во подоцнежните студии. Така најдено е дека таа се движи од 21-61% кога IFN β -1b се администрира субкутано (82,83) Кога субкутано се администрира IFN β -1a со доза од 22mcg, 5-39% од пациентите биле позитивни, а 13-35% кај оние третирани со доза од 44 mcg, кај интрамускулно администрација на IFN β -1a позитивни на АИА биле од 1-13% (84,85).

Антителата кои се создаваат кон интерферонот се делат на две подгрупи: врзувачки антитела (BAV – binding antibodies) и неутрализирачки антитела (NAB – neutralizing antibodies). Се смета дека BAV имаат мало или немаат никакво влијание врз ефектот на интерферонот, додека NAB влијаат врз активноста на интерферонот и го намалуваат неговиот биолошки ефект. Меѓутоа, поновите студии укажуваат дека пациентите кои имаат висок титар на BAV, во наредните 2 години ќе имаат зголемен ризик за развој на NAB антитела кои со сигурност ќе ја намалат ефикасноста на интерферонот Најдено е дека 89% од пациентите третирани со IFN β и се позитивни на BAV, развиле NAB антитела. (86)

Голем процент пациенти третирани со $IFN\beta$, по три месеци од почеток на терапијата, развиваат ВАВ антиинтерферонски антитела што е докажано со нивно изолирање од серумот на тие пациенти (86). Во период од 6 до 19 месеци од почетокот на терапија со $IFN\beta$, кај околу 50% од ВАВ позитивните пациенти се развиваат неутрализирачки антитела (73,87). Присуството на NAB се поврзува со намалена ефикасност на интерферонот, значително зголемување на бројот на годишните релапси, зголемена НМР активност и зголемена прогресија на болеста во споредба со пациентите кај кои нема неутрализирачки антитела (87–89).

Разликите во имуногеноста може да се должи и на разликите во молекулите на интерферонот. Така на пример, $IFN\beta$ -1b се разликува од ендогениот интерферон заради што е склон за да формира агрегати кои можат да ги стимулираат Б клетките и да предизвикаат нивна активација. Кај двете формулации на $IFN\beta$ -1a, поголема фреквенција на развој на антитела има кај оние пациенти кои примаат супкутано што може да се должи на почестото давање на $IFN\beta$ кое пак може да го зголеми оштетувањето на ткивото на местото на администрација и да дојде до активација на Б клетките. Дополнително $IFN\beta$ -1a кој се дава супкутано содржи агрегати на хуман албумин што може да биде причина за зголемена имуногеност, во споредба со $IFN\beta$ -1a кој се дава интрамускулно. Оттука, протеинската агрегати можат да бидат тригер за отпочнување на имуна реакција против $IFN\beta$ (90)

Најдено е дека не кај сите пациенти третирани со $IFN\beta$ се развива подеднаков титар на антитела против лекот. Оттука произлегува дека најверојатно, генетските карактеристики на пациентите влијаат за различниот имун одговор на организмот. Така кај некои пациенти се создаваат висок титар на ИгГ антитела и за да имаат висок титар потребна е стимулација од страна на $CD4^+$ Т клетки врз чија активација директно влијаат HLA класа II молекулите (91).

Денес има се повеќе докази дека имуногеноста на зависи од HLA генотипот на пациентот. Докажана е поврзаност помеѓу DRB1*15:01- DQB1*06:02 хаплотипот и зголемена пролиферација на $CD4^+$ Т клетките за специфични епитопи за $IFN\beta$ -1b (92). Исто така, присуството на HLA-DRB1*07:01-DQA1*02:01 хаплотипот е поврзано со имуногеноста на моноклеарите клетки кои од периферијата мигрираат кон ЦНС (93). Постојат докази дека кај пациенти со присутни HLA-DRB1*04:01 и HLA-DRB1*04:08 алели се со зголемен ризик за развој на антиинтерферонски антитела

(94,95). Во студијата на Вебер и соработниците, докажан е зголемен ризик за развој на антиинтерферонски антитела заради полиморфизам на еден нуклеотид на хромозомот 8q24.3 и полиморфизам во HLA регионот (96). Наведените резултати јасно покажуваат дека постои поврзаност на HLA со развој на антиинтерферонски антитела кај пациентите со МС третирани со интерферон бета.

Покрај генетската структура, начинот на живот, исто така, може да влијае врз развојот на антиинтерферонски антитела. Постојат наоди дека пушењето може да го зголеми ризикот на за развој на антитела кон IFN β -1a (97). Ова покажува дека животните навики можат да влијаат на имуниот одговор и на имуногеноста на лековите, во случајот кон IFN β (98)

2. Мотив на истражувањето

Во Република Северна Македонија е ограничен бројот пациенти кои примаат терапија за мултипла склероза. Пациентите што се лекуваат со интерферонска терапија немаат можност често да преминат на втора линија терапија, поради недостигот на регистрирани лекови или пак ограничени средства кои се наменети за лекување на МС. Од друга страна, пак, пациентите кои се лекуваат со интерферон, често развиваат антиинтерферонски антитела кои ја намалуваат ефикасноста на лекот. Доколку постои можност да се предвиди кај кои пациенти е зголемен ризикот за развој на антитела против интерферон, тогаш при отпочнување терапија ќе се води сметка за изборот на лекот, следење на ефикасноста на лекот и активноста на болеста. Оттука произлезе и мотивот на ова истражување. Доколку може да се предвиди кај кои пациенти постои зголемен ризик за развивање антиинтерферонски антитела кон интерферонот, следењето на болеста, третманот и долгорочната стратегија би била поинаква. Уште повеќе, доколку, пак, може да се предвиди ризикот за развој на антиинтерферонски антитела кон конкретна формулација на интерферон, тогаш изборот на лекот би бил за секој пациент различен. Подолг период на ефикасен третман би го намалил инвалидитетот кај пациентите, а од друга страна третманот во целина би бил со пониска цена на чинење.

3. Цели на истражувањето

1. Примарни цели

- да се одреди поврзаноста на HLA алелите и ризикот за развој на висок титар врзувачки антиинтерферонски (ВAB) антитела кон интерферон бета кај пациенти на терапија со интерферон;

- да се одреди статусот на пациентите на интерферонска терапија во однос на антиинтерферонските ВAB антитела на терапија со интерферонска терапија;

- да се одреди алелната фреквенција на HLA алелите и нивна асоцијацијата со МС.

2. Секундарни цели

- да се одреди дали времетраењето на терапијата има влијание врз создавањето врзувачките ВAB антитела;

- да се испита влијанието на HLA алелите и должината на Р100 бранот кај визуелни евоцирани потенцијали како можен маркер за прогресија на болеста.

4. Материјал и методи

4.1 Пациенти и дизајн на студијата

Ова истражување е пресечна студија во која беа вклучени 132 пациенти, 48 мажи и 84 жени, со дијагностицирана МС според Мекдоналд критериумите (27), кои се лекуваа на Универзитетската клиника за неврологија при Медицинскиот факултет во Скопје, УКИМ и кои примаа интерферон бета терапија најмалку 2 месеци, во период од 2015 до 2019 година. Контролната група ја сочинуваа 852 здрави испитаници.

4.1.1 Критериуми за вклучување

Од вкупниот број пациенти во базата на пациенти со дјагноза, мултипла склероза кои се лекуваа на Клиниката за неврологија, во студијата беа вклучени 132 пациентите кои ги исполнуваа условите за да бидат вклучени во оваа студија, односно пациенти кои беа на терапија со интерферон бета најмалку 2 месеци во текот на целиот период на времетраење на студијата и не примаа друга терапија која може да влијае врз имуниот систем на пациентите.

4.1.2 Критериуми за исклучување

Во ова истражување беа исклучени пациентите кај кои за време на студијата е сменета терапијата со формулација на интерферон од датумот на скринингот, не ја примаат редовно терапијата или пак примале цитостатска терапија која влијае врз имуниот систем.

Сите пациенти беа на терапија со еден од наведените интерферони:

- а) IFN β -1b (Betaferon) 8MIU аплициран субкутано секој втор ден
- б) IFN β -1a (Avonex) 30 mcg аплициран интрамускулно еднаш неделно
- в) IFN β -1a (Rebif) 22mcg аплициран субкутано три пати неделно

Според тоа дали пациентите во текот на интерферонската терапија создале или не антиинтерферонски (BAB) антитела беа поделени во две групи:

1. Група пациенти кај кои се создале, развиле BAB антитела, со титар на врзувачки антиинтерферонски (BAB) антитела > 50 pg/ml (позитивни за BAB+).
2. Група пациенти кај кои не се развиле, создале BAB антитела со титар на врзувачки антиинтерферонски (BAB) антитела < 50 pg/ml, (негативни за BAB-).

Исто така, бидејќи една од целите во оваа студија беше и да се анализира поврзаноста на HLA алелите и ризикот за развој на висок титар врзувачки антиинтерферонски (BAB) антитела кон интерферон бета, пациентите беа поделени и во две подгрупи според HLA алелите на:

- а. Подгрупа на HLA класа I алелите: HLA-A, HLA-B, HLA-C и
- б. Подгрупа на HLA класа II алелите: HLA-DRB1 и HLA-DQB1

Од вкупно 852 здрави испитаници кои ја сочинуваа контролната група, 286 беа несродни лица, потенцијални дарители на хематопоетски матични клетки, заведени на Институтот за имунологија и хумана генетика при Медицинскиот факултет во Скопје, УКИМ, кај кои била направена HLA типизација за споредба на алелната фреквенција на алелите HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 (99). Другите, 566 здрави испитаници, беа дарители на коскена срцевина кои беа запишани во Македонскиот дарителски регистар за коскена срцевина, а се користеа за споредба на алелната фреквенција за DQB1 локусот (100).

Кај сите 132 пациенти се направи HLA типизација и се одреди титарот на антиинтерферонските BAV антитела.

Кај 70 пациенти од 132, беше одреден P100 бранот од визуелните евоцирани потенцијали како маркер за оштетување на визуелните патишта. Ова тестирање опфати прво тестирање при поставување дијагноза и втор пат, 12 месеци по отпочнување на терапијата.

Кај сите пациенти и испитаници беше направена генетска анализа на HLA и беа одредени HLA алелите.

4.2 Одредување на врзувачки антитела

Како материјал за анализа за определување на титарот, на антиинтерферонските врзувачки антитела (BAV) беше користен серум добиен според стандардна процедура во серумска вакуета, кој се чуваше на -196°C во течен азот до денот на анализата.

За квантификација на антителата беше користен индиректен ELISA метод, ползувајќи го анти-BAV китот на фирмата BÜHLMAN LABORATORIES AG. Принципот на методот се состоеше во реакција на антиген и антитело и создавање комплекс антиген-антитело. Накусо, во 96 бунарчињата кои ја сочинуваа микротитарската плоча, во состав на китот, кои се претходно фабрички обложени со смеса од различни молекули на антигени на интерферон бета $\text{IFN}\beta$ (природен хуман $\text{IFN}\beta$, $\text{IFN}\beta$ -1a и $\text{IFN}\beta$ -1b), се додаваа примероците серуми, стандарди и контроли, по што следуваа инкубација од 2 часа на $+4^{\circ}\text{C}$. За време на овие два часа, антителата (доколку се присутни) специфично се врзуваа за молекулите на $\text{IFN}\beta$ кои се имбибирани на внатрешниот ѕид од бунарчињата. По инкубација, следуваа миене на бунарчињата со фосфатен пуфер, со што сите останати молекули освен анти- $\text{IFN}\beta$ антителата се отстрануваа. За визуелизација на врзаните антитела, се користеше

антитело конјугирано со ензимот пероксидаза од рен (анг. Horseradish peroxidase, HRP), кое специфично се врзуваше за Fc фрагментот од хуманите антиела. По инкубацијата со антителото и второто миење на бунарчињата, следуваше додавање супстрат ТМВ (тетраметил бензидин), при што се доби сина боја. По инкубација од 30 минути, реакцијата се стопираше со сулфурна киселина при што сината боја поминуваше во жолта. По инкубација од 15 минути се мереше апсорбанцата на 450 nm на ELISA читач Spectra Max 190, Molecular Devices. Интензитетот на бојата беше правопрпорционална на концентрацијата, титарот, на анти-IFN β антителата (ВAB) во серумот. Одредувањето на концентрацијата, титарот, на антителата беше извршено во лабораторијата на Природно-математичкиот факултет во Скопје, Институт за биологија (одделение за општа физиологија и имунологија и катедра за биотехнологија).

За да се одреди cut-off вредноста, се користеше контролна група од 15 здрави лица. Средната вредност за апсорбанцата плус 3 стандардни девијации беше земена како cut-off вредност. Добиената cut-off вредност изнесуваше 48,5 pg/mL, што беше во согласност со литературните податоци и вредностите за cut-off дадени од производителот на китот (101).

Согласно добиените вредности, сите пациенти со пониска cut-off вредност од 50,0 pg/mL беа земени како негативни за ВAB, а оние со вредности над 50,0 pg/mL беа земени како позитивни за ВAB.

4.3 HLA типизација

За определување на HLA класите 1 и 2 алелите се користеше 200 μ L крв земена од кубитална вена во ЕДТА вакуета. Изолацијата на ДНА од примерокот крв беше направена со автоматски апарат Promega, а за изолација се користеше Maxwell, purification kit. Добиената ДНА се амплифицираше во термосајклер, PCR (Eppendorf) апарат со користење кит Olegup SSP за HLA DR-DQ. Добиените ПЦР продукти (ампликони) се визуелизираа на 2% агарозен гел (102,103). Интерпретацијата на резултатите се вршеше со компјутерски софтвер Halmberg SCORE. HLA генотипизацијата се изврши на Универзитетската клиника за трансфузиона медицина при Медицинскиот факултет во Скопје при УКИМ.

4.4 Одредување на VEP P100 бранот

Кај дел од испитаниците, 70, се анализираа и резултатите од визуелно евоцирани потенцијали, VEP и тоа P100 бранот како маркер за оштетување на визуелните патишта.

Снимањето на VEP брановите се изврши на 4 канален EMG/EP Keypoint апарат со стандардни сребрени електроди. Регистрирањето на VEP брановите беше извршено преку еден канал, додека електродите на скалпот беа поставени во однос на коскените обележја на скалпот во склад со интернационалниот систем 10/20. Активната електрода за регистрација беше поставена окципитално во проекција на визуелниот кортекс. Референтите електроди беа поставени на вертексот. Испитувањето е направено во темна и тивка просторија. Визуелната стимулација беше направена со дигитална слика со црно бели полиња во вид на шаховско поле која ја генерира софтверот на апаратот. Ова испитување ги регистрираше и латенците на P100 бранот. За патолошки пролонгиран P100 бран беше земен бранот подолг од 116 ms

Од првата анализата за P100 бранот на двете очи беше одредена средна вредност од двете очи. Исто така, второто VEP испитување по 12 месеци беше направено на двете очи и беше пресметана средна вредност од двете очи. Потоа од двете регистрации беше пресметана средна вредност и пациентите беа поделени во две групи: **1.** група со нормално времетраење на P100 бранот и **2. група** со пролонгирано времетраење на P100 бранот. За пролонгирано времетраење на P100 бранот е земена вредност еднаква или повисока од 116 ms.

4.4 Статистичка анализа

Статистичката анализа беше изработена во статистички програми: Statistica 7.1; SPSS 20.0. Собраните податоци се обработија со помош на следните статистички методи:

1. Базите на податоците беа формирани користејќи Microsoft Excel 2013. Нивната обработка беше направена со помош на стандардни дескриптивни и аналитички биваријатни и мултиваријатни методи.
2. Атрибутивните статистички серии се анализираа со одредување на коефициент на односи, пропорции, стапки и со утврдување на статистичката значајност меѓу откриените разлики- Тест на разлики - Difference тест.

Нумеричките серии се анализираа со мерки на централна тенденција и со мерки на дисперзија на податоците, средна вредност (\bar{X}) и стандардна девијација (SD).

Статистичката значајност на разликите беа анализирани со Mann-Whitney U тест.

Статистичката значајност на разликите меѓу нумеричките серии со нормална дистрибуција се анализираа со помош на Student T - тест.

Веројатноста за асоцијацијата меѓу дистрибуциите на фреквенциите на две атрибутивни варијабли е анализирана со Chi-квадрат тестот.

Статистичката значајност на разликите се анализираа со АНОВА тест со Post Hoc тест, корелативните односи и се реализираа со помош на Pearson - коефициент на корелација, доколку се работи за нормална дистрибуција. Со Shapiro-Wilks тест се испита нормалната распределба на варијаблите. За интервал на доверба (CI) точност се зема $p < 0,05$. Резултатите се прикажани табеларно и графички.

Алелната фреквенција кај испитаниците со МС и контролната група беше пресметана со помош на Arlequin 3.5 софтвер (104). Значајноста на разликите помеѓу групата со МС и контролната група беше одредена со помош на χ^2 тестот, доколку кај вредностите < 5 беше користе Fisher-овиот егзактен тест. За статистички значајна беше сметана вредноста за $p < 0,05$. Odds ratio поголемо од 1 се значи како прифатлив алел (susceptible, risk allele), додека помало од 1 се значи како заштитен алел (protective allele).

5. Резултати

Групата пациенти во оваа студија ја сочинува вкупно 132 пациенти. Од 132 пациенти, 84 или 63% беа жени и 48 или 37% мажи и сите беа на интерферонска терапија, администрирана интрамускулно и субкутано. Демографските и клиничките податоци на пациентите со мултипла склероза третирани интрамускулно и субкутано со интерферон бета се прикажани на **табела 1**. Статистичката анализа на резултатите меѓу мажите и жените не покажа статистичка значајност, заради што резултатите во понатамошниот текст ќе бидат преставени сумарно за двата пола.

Табела 1. Демографски и основни клинички податоци на пациентите со мултипла склероза третирани интрамускулно и субкутано со интерферон бета

Варијабла	Сите испитаници
n	132
Жени/мажи (% жени)	84/48 (63,6)
Возраст, средна вредност (SD)	39,7 (7,9)
EDSS медијана (IQR)	1,5 (1-2,5)
Интерферон бета, n (%)	
Interferon β - 1a IM	56 (42)
Interferon β - 1b SC	37 (28)
Interferon β - 1a SC	39 (30)

IQR - interquartile range; EDSS – Expanded Disability Severity Score; IM, интрамускулно; SC, субкутано.

Процентуалната застапеност на пациентите со мултипла склероза според терапијата со различни интерферони е прикажана на графикон 1.

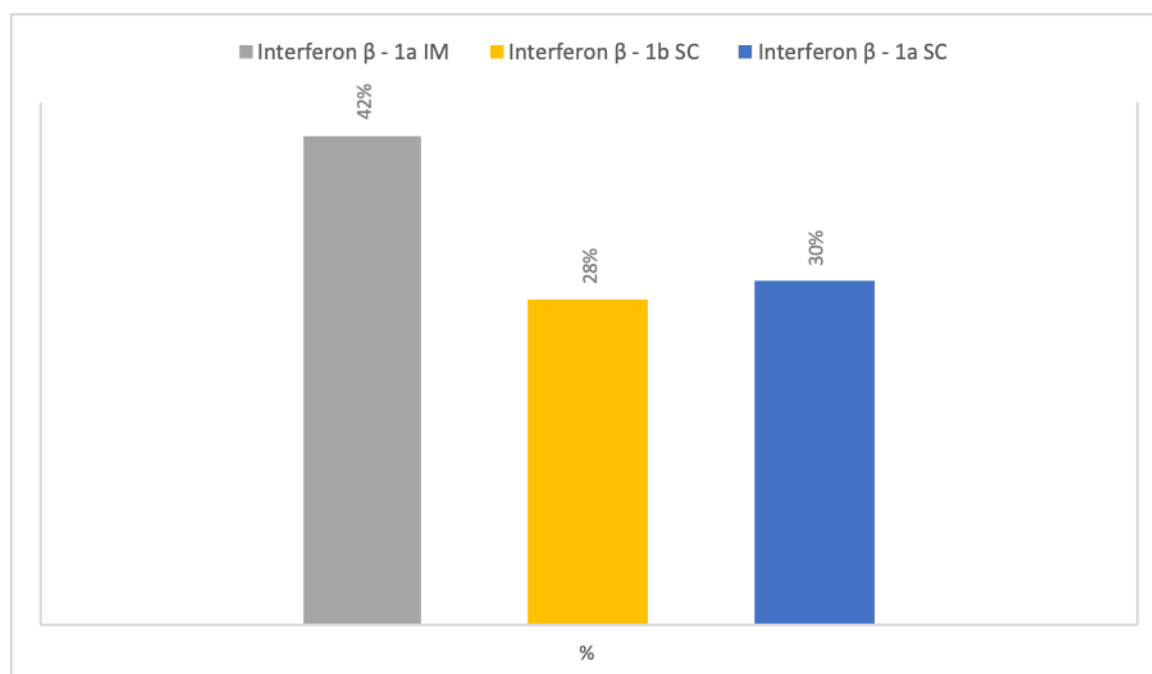


График 1. Процентуална застапеност на испитаниците според формулацијата на интерферонската терапијата.

*IM, интрамускулно; SC, субкутано

Од графиконот може да се забележи дека најголем процент, 42%, или 56 пациенти беа на терапија со интрамускулна администрација на Interferon β - 1a, 28% или 37 пациенти на терапија со субкутана администрација на Interferon β - 1b и 20% или 39 пациенти на терапија со Interferon β - 1a, исто така, со субкутана администрација.

Пациентите кои примаа Interferon β -1a интрамускулно, беа статистички значајно повеќе во однос на останатите две групи пациенти кои беа третирани субкутано со Interferon β - 1b, ($p = 0,000463$) и групата со Interferon β - 1a ($p = 0,000022$)

Табела 2. Приказ на пациентите со мултипла склероза на терапија со интерферон бета и ВАВ антитела

Варијабла	Сите пациенти	*ВАВ +	*ВАВ -	**p
n	132	71	61	0,384
Жени/мажи (% жени)	84/48 (63,6)	47/24 (66,1)	36/25 (59)	0,003
Возраст (год) средна вредност \pm SD	39,7 \pm 7,9	39,2 \pm 7,9	40,2 \pm 8,1	0,104
EDSS медијана (IQR)	1,5 (1-2,5)	1,5 (1-2,5)	2 (1-3)	0,075
Интерферон бета, n (%)				
Interferon β - 1a IM	56 (42)	31 (55,4)	25 (44,6)	0,423
Interferon β - 1b SC	37 (28)	29 (78,4)	8 (21,6)	$p < 0,05$
Interferon β - 1a SC	39 (30)	11 (28,2)	28 (71,8)	$p < 0,06$

*ВАВ +/- позитивни/негативни на антиинтерферонски ВАВ антитела, IQR - interquartile range, **p, статистичка значајност меѓу вредностите кои се однесуваат на споредбата на ВАВ позитивни и негативни пациенти, EDSS – Expanded disability Severity Score

Од табелата 2 може да се забележи дека вкупно ВАВ+ (ВАВ позитивни) беа 71 пациент кај сите формулации на IFNB и 61 пациент беа ВАВ- (ВАВ негативни). Разликата помеѓу групите ВАВ+ и ВАВ- не беше статистичка значајна ($p=0,384$). Во групата ВАВ позитивни пациенти, 47 беа жени или 66%, а 24 беа мажи или 34%. Во

групата ВАВ негативни пациенти 36 или 59% беа жени, а 25 или 41% мажи. Степенот на инвалидитет изразен преку вредноста медијана на EDSS е без статистичка значајна разлика помеѓу двете групи, ВАВ+ и ВАВ-, **табела 2**.

Кај пациентите третирани ИМ со Interferon β - 1a, 31 пациент или 55,4% имаа позитивни вредности за ВАВ, за разлика од 25 или 44,6% кои беа ВАВ негативни, но без статистичка значајност. Групата третирана SC со Interferon β - 1b, од вкупно 37 пациенти, 28 или 78,4% беа ВАВ позитивни, а 8 пациенти или 21,6% беа ВАВ негативни, додека групата третирани SC со Interferon β - 1a од вкупно 39 пациенти 11 (28,2%) беа ВАВ позитивни, а 28 беа (71,8%) ВАВ негативни. Разликите кај овие две групи беа статистички значајни, **табела 2**.

Средното времетраење на терапијата со трите формулации на интерферон кај трите групи пациенти се прикажани на **табела 3** и **график 2**. Просечното време на ИМ терапија со лекот Interferon β – 1a, траеше просечно 32 месеци (од 14,2 до 80,2 месеци), додека SC терапија со лековите Interferon β - 1b, просечно 62,6 месеци (од 10,2 до 158,3 месеци) односно Interferon β - 1a , просечно 79,9 месеци (од 2,03 до 170,4 месеци).

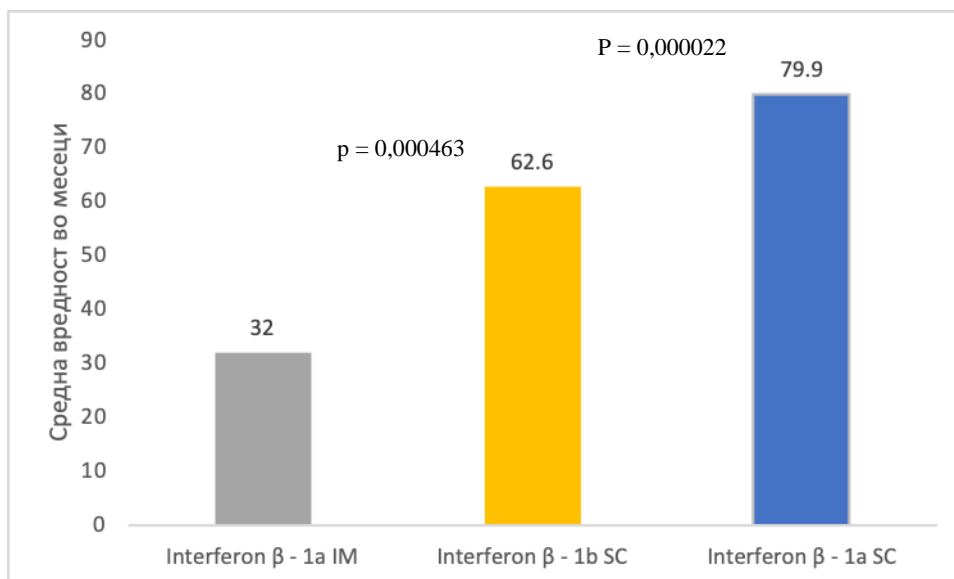


График 2. Приказ на просечното времетраење (месеци) на терапијата со различни формулации на интерферон кај трите групи пациенти
ИМ, интрамускулно; SC, субкутано

Според ANOVA (Analysis of Variance) и Post hoc Tukey HSD тестот, просечното времетраење во месеци на IM терапија со Interferon β - 1a е статистички значајно во однос на времетраењето на SC терапија со Interferon β - 1b и Interferon β - 1a ($p=0.000463$, $p=0.000022$). .

Табела 3. Времетраење (месеци) на терапијата со интерферон кај пациентите со MC

Интерферон	Времетраење на терапија во месеци				
	N	%	$\bar{X} \pm SD$	Ранг (месеци)	p
Interferon β - 1a IM	56	42	32,0 \pm 11,50	14,2 - 80,2	
Interferon β - 1b SC	37	28	62,6 \pm 48,9	10.2 - 158.3	0,000463
Interferon β - 1a SC	39	30	79,9 \pm 49,8	2.03 - 170.4	0,000022

Вредностите се прикажани како средна вредност \pm стандардна девијација, $\bar{X} \pm SD$; p, статистичка значајност на времетраењето на терапија со Interferon β - 1a во однос на Interferon β - 1b и Interferon β - 1a ; IM интрамускулно, SC – субкутано.

Средната вредност на титарот (концентрацијата) на BAV антителата изразен во pg/ml во крв кај пациентите со IM терапија со Interferon β - 1a изнесуваше 402,1 pg/ml во граници од 0,0 до 5526,1 pg/ml, кај пациентите на со SC терапија со Interferon β - 1b, титарот изнесуваше 394,0 pg/ml во граници од 11,7 до 1489,4 pg/ml и кај пациентите со Interferon β - 1a , 82,9 pg/ml во граници од 0,0 до 823,6 pg/ml, прикажано на **табела 4** и **график 3**.

Според ANOVA (Analysis of Variance) тестот, просечната разлика во титарот на BAV антителата кај пациентите третирани со терапија со трите различни формулации интерферон не покажа статистички сигнификантност за $p>0,05$.

Табела 4. Приказ на средната, минималната и максималната вредност на титарот (pg/ml) на ВАВ антителата

ВАВ титар (pg/ml)							
Интерферон	n	%	Минимум	Максимум	$\bar{X} \pm SD$	CI -95%	CI +95%
Interferon β - 1a IM	56	42	0,00	5526,10	402,1 \pm 1042.21	123,006	681,220
Interferon β - 1b SC	37	28	11,70	1489,40	394,0 \pm 406.79	258,402	529,666
Interferon β - 1a SC	39	30	0,00	823,60	82,9 \pm 150.93	33,970	131,822

Вредностите се прикажани како средна вредност \pm стандардна девијација, $\bar{X} \pm SD$; IM, интрамускулно; SC, субкутано; CI, интервал на доверливост.

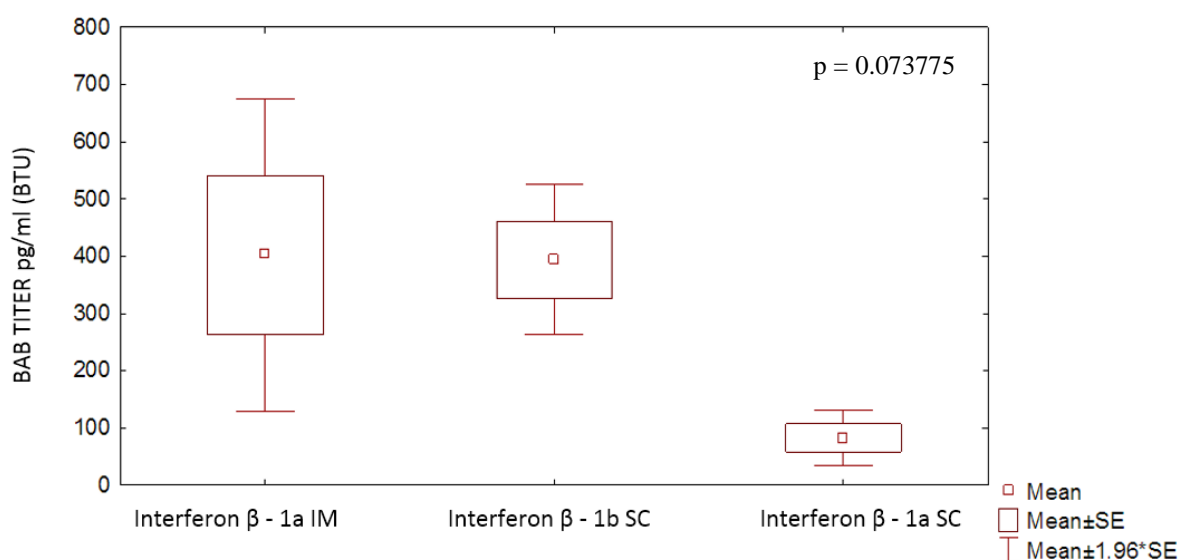


График 3. Графички приказ на средната вредност на титарот (pg/ml) на ВАВ антителата во крв кај трите групи пациенти третирани со трите различните формулации на интерферон

*p, статистичка значајност; IM, интрамускулно; SC, субкутано

Статистичката анализа за поврзаноста меѓу титарот на ВАВ антителата во крв и видот на интерферонот, покажа дека има статистички значајна корелација, (Pearson Chi-square: 19,3254, df=2, p=,000064). Униваријантна логистичка регресивна анализа покажа зголемен ризик за развој на висок титар ВАВ антитела во крв кај пациентите третирани IM со Interferon β - 1a и SC со Interferon β - 1a во однос на пациентите третирани SC со интерферон Interferon β - 1a. Всушност, пациентите третирани SC со Interferon β - 1a имаат за 0,3 пати (OR=0,317) сигнификантно помал ризик за зголемен

титар на ВАВ антителата во крв, во однос на пациентите третирани ИМ со Interferon β - 1a и за 0,1 пати (OR=0,108) сигнификантно помал ризик за зголемен титар во однос на терапијата Interferon β - 1a администриран SC, **табела 5**.

Табела 5. Титар (pg/ml) на ВАВ антитела во крв кај трите групи пациенти третирани со различни формулации интерферон

Интерферон	n	%	$\bar{x} \pm SD$	OR	p	95%CI	
						Lower	Upper
Interferon β - 1a SC*	39	30	82,9 \pm 150.93				
Interferon β - 1a IM	56	42	402,1 \pm 1042,21	0,317	> 0,005	0,132	0,759
Interferon β - 1b SC	37	28	394,0 \pm 406.79	0,108	> 0,005	0,038	0,309

*, p статистичка значајност на титарот на ВАВ антитела во крв кај пациенти третирани SC со Interferon β - 1a во однос на титарот на ВАВ антитела во крв кај пациентите третирани со другите две формулации на интерферон; CI, интервал на доверливост; OR, odd ratio

Испитуваната корелација меѓу должината на времетраењето на терапијата и појавата на ВАВ антителата во крв кај трите групи пациенти покажа дека времетраењето нема влијание врз титарот на антитела. Се регистрира слаба негативна корелација која не е статистички значајна ($r = -0.1158$, $p = 0.186$), **график 4**.

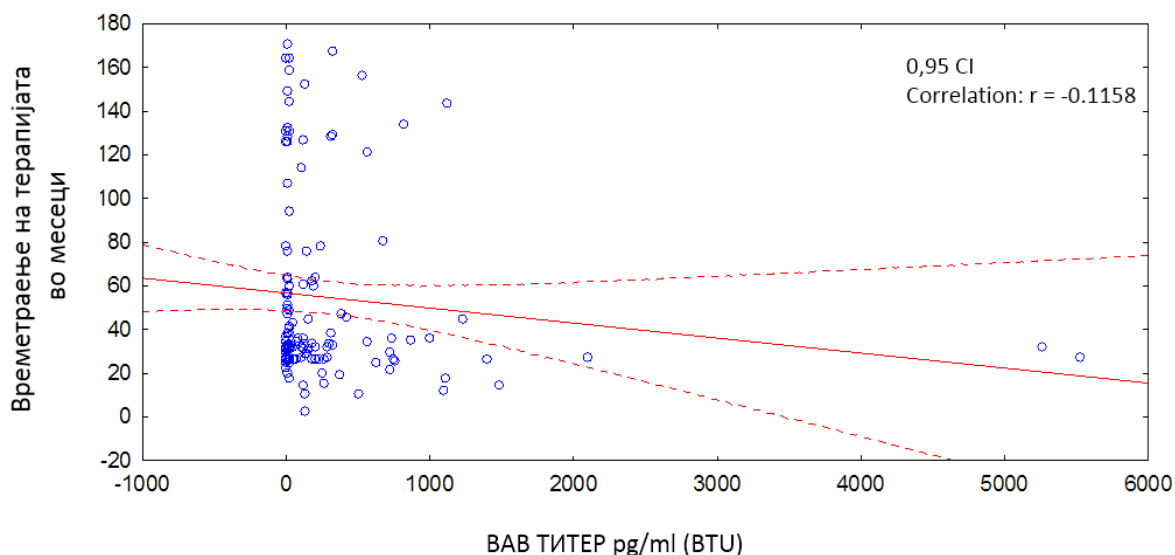


График 4. Корелација помеѓу времетраењето на терапијата со различни формулации интерферон и титарот на ВАВ антителата во крв
CI, интервал на доверливост; r, коефициент на корелација

Во испитуваната популација кај HLA молекулите во локусот HLA-A беа одредени 16 алелни групи. Најголем процент па испитаниците, 21,6%, беа носители на алелот A*02 со, следува алелите A*24 со 18,6%, A*03 со 16,3% и алелот A*01 со 11,7%. Овие четири алели беа застапени со 68% од вкупниот број алели во експерименталната група во која се пациентите со мултипла склероза. Останатите алели од HLA-A групата A*26, A*11, A*68, A*32, A*25, A*30, A*29, A*33 беа застапени со помалку од 10%, а најмалку застапени, помалку од 1%, беа алелите A*31, A*23, A*66 и A*13. Кај контролната група од вкупно 286 испитаници беа пронајдени 17 алелни групи во локусот HLA-A. Најмногу застапен беше алелот A*02 со 30,05%, следуваа алелите A*24 со 12,43%, A*01 со 13,21% и A*03 со 10,25%. Останатите алели беа застапени со помалку од 10% проценти.

Фреквенција на HLA-A алелите кај контролната и групата со мултипла склероза е претставена на **график 5**. Најголема статистичка значајна разлика на алелната фреквенција помеѓу групата со мултипла склероза и контролната група беше најдена кај алелите A*02, 21% кај MS групата наспроти 29,02% ($p = 0,0283$) во контролната група и во A*03 алелот, кој беше застапен со 16,3% во MS групата наспроти 10,14% во контролната група ($p=0,0444$).

Споредено со контролната група, алелот A*02 има заштитна улога, во однос на алелот A*03 кој е ризичен алел и го зголемува ризикот за MS за 1,5 пати (OR 0,65212, 1,60442), **Табела 6**.

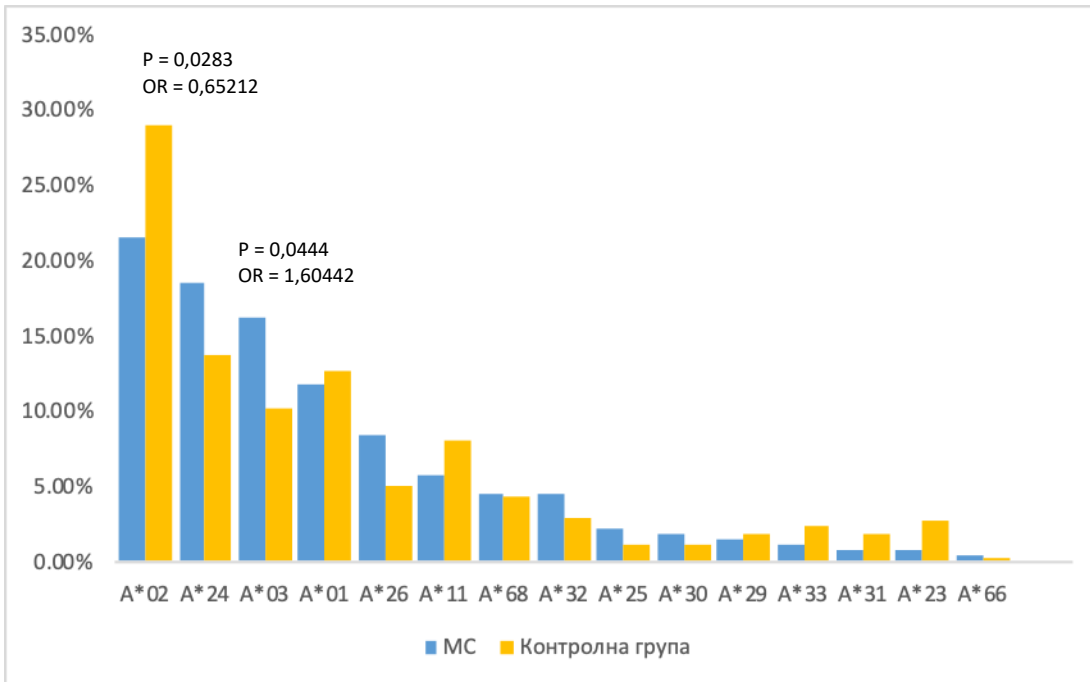


График 5. Графички приказ на фреквенцијата (%) на HLA-A алелите кај пациенти со мултипла склероза и контролната група

P, статистичка значајност; OR, odd ratio; MC, мултипла склероза

Табела 6. Фреквенција (%) на HLA-A алелите кај пациенти со мултипла склероза и контролната група

HLA алел	Пациенти со МС				Контролна група				p **	OR
	Алелна фреквенција	%	SD	N*	Алелна фреквенција	%	SD			
A*02	0.215909	21,6	0.025371	43	0.290210	29,02	0.018993	0.0283	0.65212	
A*24	0.185606	18,6	0.023974	40	0.138112	13,81	0.014439	0.0744		
A*03	0.162879	16,3	0.022769	33	0.101399	10,14	0.012632	0.0444	1,60442	
A*01	0.117424	11,7	0.019851	23	0.125874	12,59	0.013882	0.4780		
A*26	0.083333	8,3	0.017043	17	0.050699	5,07	0.009181	0.1852		
A*11	0.056818	5,7	0.014275	14	0.080420	8,04	0.011380	0.4053		
A*68	0.045455	4,5	0.012844	11	0.043706	4,37	0.008556	0.7709		
A*32	0.045455	4,5	0.012844	11	0.029720	2,97	0.007107	0.1938		
A*25	0.022727	2,3	0.009190	6	0.012238	1,22	0.004601	0.1526		
A*30	0.018939	1,9	0.008405	5	0.012238	1,22	0.007107	0.5479		
A*29	0.015152	1,5	0.007532	4	0.019231	1,92	0.005747	0.8791		
A*33	0.011364	1,1	0.006536	2	0.024476	2,45	0.006466	0.1535		
A*31	0.007576	0,8	0.005347	2	0.019231	1,92	0.005747	0.2931		
A*23	0.007576	0,8	0.005347	2	0.027972	2,80	0.006901	0.0524		
A*66	0.003788	0,4	0.003788	1	0.001748	0,17	0.001748	0.4980		

*хомозиготите се броени како еден; **,p, статистичка значајност на застапеност на HLA-A алелите меѓу контролната група и групата со мултипла склероза; SD, стандардна девијација; OR, odd ratio.

Фреквенција на HLA-B алелите кај контролната и групата со мултипла склероза е претставена на **график 6**. Најголем број HLA алелни групи, вкупно 22, во групата со МС беа одредени кај локусот HLA-B. Најзастапена HLA група беше B*35 со 18,18%, по што следуваа B*51 со 17,42%, B*18 со 9,85% и B*07 со 9,47%. Вкупно овие четири алели сочинуваа повеќе од половина од алелите кои беа присутни во групата со МС, односно 55%. Останатите 18 алелни групи беа застапени со помалку од 10%. Алелната група B*44 беше статистички значајно помалку застапена кај групата со МС, 4,55%, во споредба со застапеноста во контролната група, 7,87%, $P < 0,05$, **табела 7**. Оттука носителите на алелот B*44 имаа помал ризик за развој на МС, во однос на другите HLA-B алели. Овој алел претставува заштитен алел за МС

Табела 7. Фреквенција (%) на HLA-B алелите кај пациенти со мултипла склероза и контролната група

HLA алел	Пациенти со МС				Контролна група				P **	OR
	Алелена фреквенција	%	SD	N*	Алелена фреквенција	%	SD			
B*35	0,181818	18,18	0,023783	38	0.160839	16,08	0.015374	0.9281		
B*51	0,174242	17,42	0,023390	46	0.146853	14,69	0.014813	0.1127		
B*18	0,098485	9,85	0,018374	25	0.146853	14,69	0.014813	0.1252		
B*07	0,094697	9,47	0,018055	23	0.062937	6,29	0.010163	0.1412		
B*40	0,083333	8,33	0,017043	18	0.045455	4,55	0.008717	0.1458		
B*08	0,053030	5,30	0,013818	13	0.059441	5,94	0.009895	0.6726		
B*44	0,045455	4,55	0,012844	10	0.078671	7,87	0.011267	0.0469	0.49532	
B*38	0,034091	3,41	0,011189	9	0.033217	3,32	0.007499	0.7946		
B*39	0,034091	3,41	0,011189	8	0.020979	2,10	0.005998	0.3811		
B*27	0,030303	3,03	0,010570	8	0.040210	4,02	0.008221	0.5190		
B*13	0,026515	2,65	0,009907	6	0.031469	3,15	0.007306	0.5147		
B*15	0,022727	2,27	0,009190	5	0.012238	1,22	0.004601	0.4234		
B*56	0,018939	1,89	0,008405	5	0.010490	1,05	0.004264	0.2986		
B*37	0,022727	2,27	0,009190	6	0.013986	1,40	0.004914	0.3355		
B*55	0,015152	1,52	0,007532	4	0.017483	1,75	0.005485	0.8392		
B*49	0,015152	1,52	0,007532	4	0.020979	2,10	0.005998	0.5967		
B*41	0,011364	1,14	0,006536	3	0.012238	1,22	0.004601	0.9420		
B*14	0,011364	1,14	0,006536	3	0.024476	2,45	0.006466	0.2269		
B*52	0,007576	0,76	0,005347	2	0.017483	1,75	0.005485	0.2776		
B*57	0,011364	1,14	0,006536	3	0.013986	1,40	0.004914	0.7847		
B*50	0,003788	0,38	0,003788	1	0.003497	0,35	0.002470	0.9319		
B*53	0,003788	0,38	0,003788	1	0.008741	0,87	0.003895	0.4444		

* фенотип, хомозиготите се броени како еден; **, p, статистичка значајност на застапеност на HLA-B алелите меѓу контролната група и групата со мултипла склероза; SD, стандардна девијација; OR, odd ratio

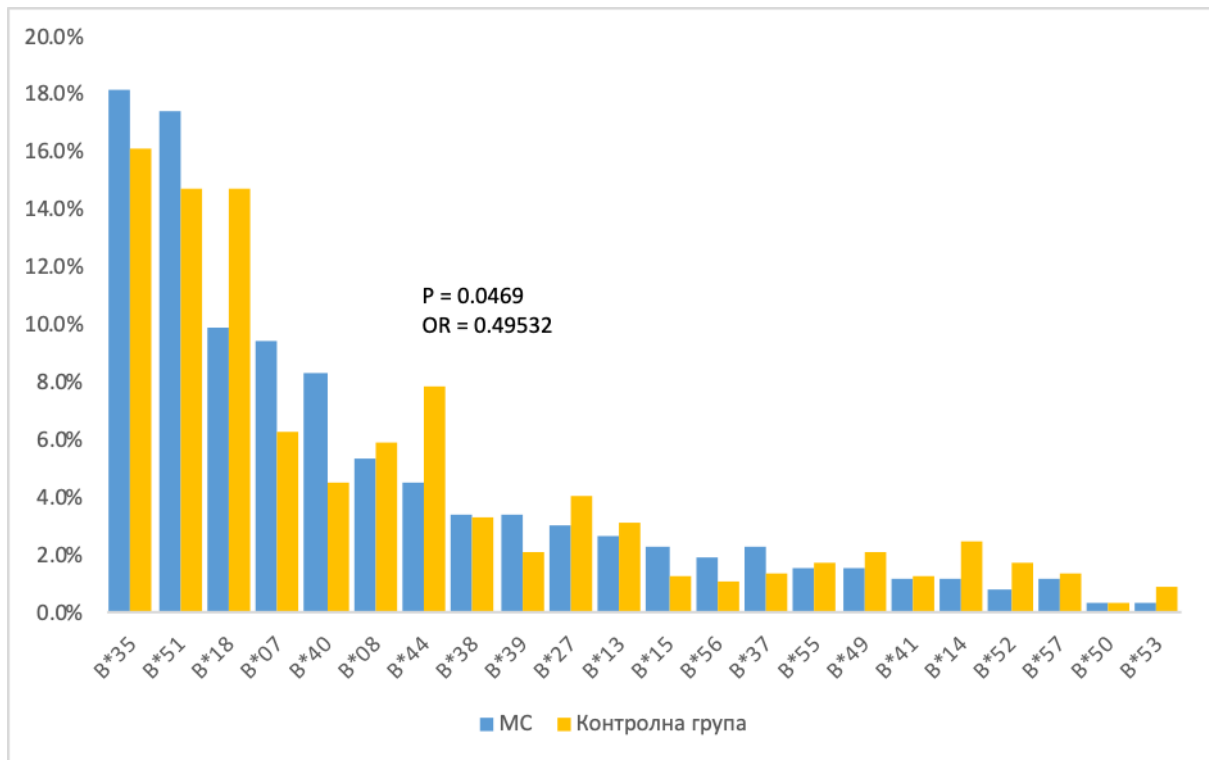


График 6. Фреквенција (%) на HLA-B алелите кај групата со мултипла склероза (МС) и контролната група

p, статистичка значајност на застапеност на HLA-B алелите меѓу контролната група и групата со мултипла склероза; OR, odd ratio

Фреквенција на HLA-C алелите кај контролната и групата со мултипла склероза е претставена на **график 7**. Во групата на HLA-C локусот беа одредени вкупно 13 алелни групи. Најзастапена алелна група во групата со МС беше C*07 со застапеност од 28%, по што следуваа алелите C*12 со 14,7%, C*04 со 12,5% и најмалку застапена C*02. Овие 4 алела сочинуваа 65,5 % од сите алелни групи кај групата со МС. Најмалку застапен со помалку од 1% беше алелот C*16.

Во споредба со контролната група, најдена беше најголема разлика кај алелот C*04 кој беше застапен со 18,36% во контролната група во споредба со 12,5% кај групата со МС, но без статистичка значајност. Исто така, статистичката анализа за застапеноста на другите алели меѓу групата со мултипла склероза и контролната група не покажа статистичка значајност, **табела 8**.

Табела 8. Фреквенција (%) на HLA-C алелите кај пациенти со мултипла склероза и контролна група

HLA алел	Пациенти со МС				Контролна група				P **	OR
	Алелена фреквенција	%	SD	N*	Алелена фреквенција	%	SD			
C*07	0.280303	28,03	0.027696	60	0.279720	27,97	0.018784	0,4109		
C*12	0.147727	14,77	0.021880	34	0.127622	12,76	0.013964	0,4275		
C*04	0.125000	12,50	0.020393	29	0.183566	18,36	0.016201	0,184		
C*02	0.102273	10,23	0.018684	24	0.068182	6,82	0.010548	0,1644		
C*15	0.075758	7,58	0.016317	18	0.068182	6,82	0.010548	0,7539		
C*06	0.064394	6,44	0.015135	13	0.061189	6,12	0.010030	0,5486		
C*03	0.064394	6,44	0.015135	16	0.045455	4,55	0.008717	0,2387		
C*01	0.056818	5,68	0.014275	14	0.043706	4,37	0.008556	0,8881		
C*05	0.030303	3,03	0.010570	8	0.038462	3,85	0.008048	0,9457		
C*14	0.018939	1,89	0.008405	5	0.034965	3,50	0.007687	0,5412		
C*08	0.015152	1,52	0.007532	4	0.027972	2,80	0.006901	0,7579		
C*17	0.015152	1,52	0.007532	4	0.003497	0,35	0.002470	0,2825		
C*16	0.003788	0,38	0.003788	1	0.017483	1,75	0.005485	0,8881		

* фенотип, хомозиготите се броени како еден; **, p, статистичка значајност на застапеност на HLA-C алелите меѓу контролната група и групата со мултипла склероза; SD, стандардна девијација; OR, odd ratio

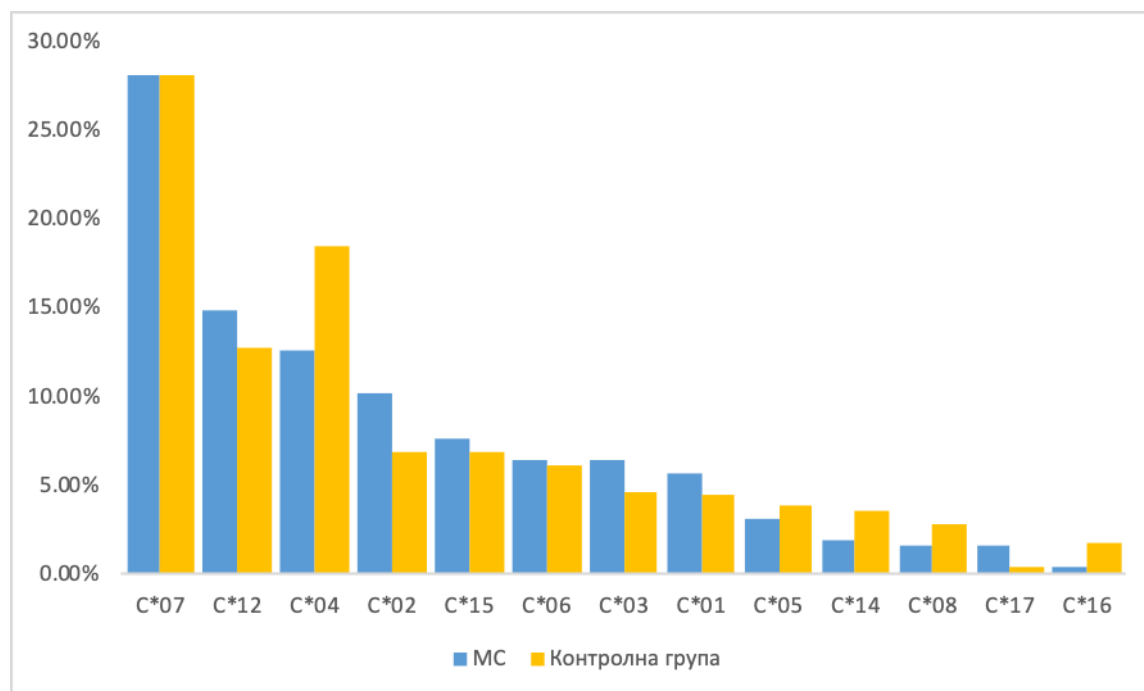


График 7. Фреквенција (%) на HLA-C алелите контролната група и групата со мултипла склероза

Исто така, кај двете групи испитаници беа одредени и алели од алелната група HLA-DRB1 и тоа вкупно 12 различни алелни групи. Најзастапен алел беше DRB1*15 со 18,5%, со иста застапеност од 18,5% е и алелот DRB1*11, понатаму следуваа DRB1*16 со застапеност од 14% и DRB1*13 со 11%. Овие четири алелни групи вкупно беа застапени со 62% кај пациентите со МС. Со помала застапеност, и тоа со помалку од 10% беа DRB1*4 и DRB1*3 со 9,4%, односно 9,2%. Фреквенцијата на алелите DRB1*01 и DRB1*07, беа уште помалку застапени (6,8% односно 5,68%), додека DRB1*12 и DRB1*08 беа застапени со 1%. Најмалку застапен алел кај групата со МС беше алелот DRB1*10 со помалку од 1%, **график 8**. Алелната фреквенција на алелот DRB1*15 кај групата со МС во однос на алелната фреквенција на DRB1*15 кај контролната група беше статистички значајно повисока, $P < 0,0001$. Направената анализа за ризикот на зголеменото присуството на алелот DRB1*15 за појава на МС, покажа дека тој го зголемува ризикот за МС за 2,5 пати, $OR = 2,495$, во однос на другите алели на HLA-DRB1 алелите, **табела 9**.

Табела 9. Фреквенција (%) на HLA-DRB1 алелите кај пациенти со мултипла склероза и контролната група

HLA алел	Пациенти со МС				Контролна група				P **	OR
	Алелна фреквенција	%	SD	N*	Алелна фреквенција	%	SD			
DRB1*15	0.185606	18,56	0.023974	45	0.090909	9,09	0.012031	<0.0001	2.495	
DRB1*11	0.185606	18,56	0.023974	41	0.255245	25,52	0.018246			
DRB1*16	0.140152	14,02	0.021406	36	0.146853	14,69	0.014813			
DRB1*13	0.109848	10,98	0.019282	27	0.085664	8,57	0.011712			
DRB1*04	0.094697	9,47	0.018055	24	0.080420	8,04	0.011380			
DRB1*03	0.090909	9,09	0.017727	22	0.078671	7,87	0.011267			
DRB1*01	0.068182	6,82	0.015543	18	0.075175	7,52	0.075175			
DRB1*07	0.056818	5,68	0.014275	15	0.078671	7,87	0.01126			
DRB1*14	0.037879	3,79	0.011772	9	0.059441	5,94	0.009895			
DRB1*12	0.011364	1,14	0.006536	3	0.013986	1,40	0.004914			
DRB1*08	0.011364	1,14	0.006536	3	0.013986	1,40	0.004914			
DRB1*10	0.007576	0,76	0.005347	2	0.019231	1,92	0.005747			

* фенотип, хетерозиготите се броени два пати, хомозиготите се броени како еден; **,p, статистичка значајност на застапеност на HLA-DRB1 алелите меѓу контролната група и групата со мултипла склероза; SD, стандардна девијација; OR, odd ratio.

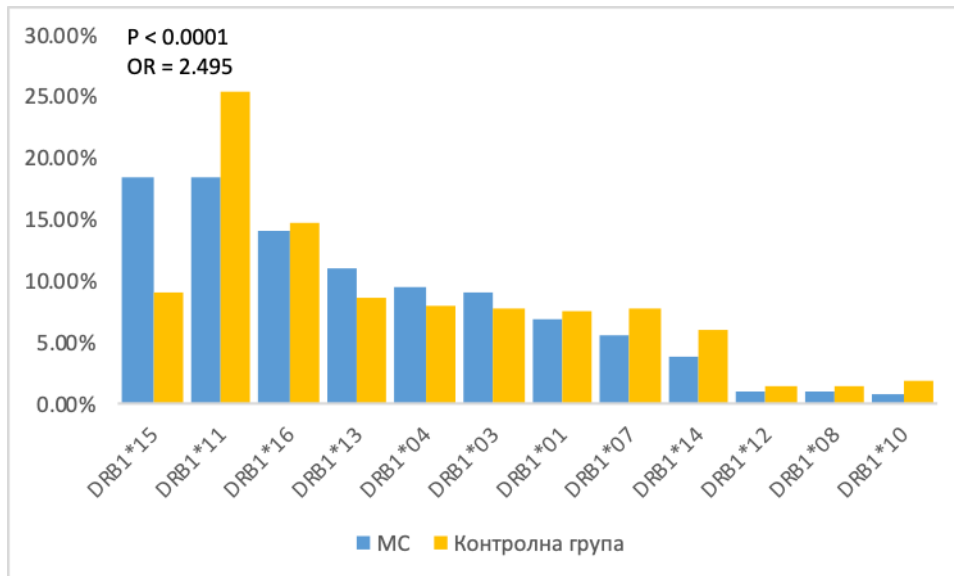


График 8. Фреквенција на HLA-DRB1 алелите кај контролната група и групата со мултипла склероза

p, статистичка значајност на застапеност на HLA-DRB1 алелите меѓу контролната група и групата со мултипла склероза; OR, odd ratio.

Во испитуваните групи најмалку алелни групи беа одредени кај HLA-DQB1, вкупно 5 алелни групи. Најзастапена алелна група беше DQB1*05 со 32,5% што е приближно слично, 34,6%, со контролната група. Понатаму следувааше алелот DQB1*06 со застапеност од 28% што е значајно повисок во однос на контролната група каде изнесуваше 15%. Алелот DQB1*03 кај MC групата беше застапен со 18,4% и статистички значајно помалку застапен во споредба со контролната група каде беше застапен со 33,5% ($p=0,0001$). Со помала застапеност беа алелните групи DQB1*02 со 17% и DQB1*04 со 3,4% кај MC групата во споредба со контролата. Во однос на другите алели не беше најдена статистичка значајна разлика меѓу групата со мултипла склероза и контролата. Направената анализа за ризикот од зголемено присуство на алелот DQB1*06 за развој на мултипла склероза покажа дека тој го зголемува ризикот за скоро за два пати ($OR = 1,9878$), за разлика од присуството на алелот DQB1*03 кој го намалува ризикот за појава на MC за 0,5 пати ($OR = 0,51634$), **табела 10** и **график 9**

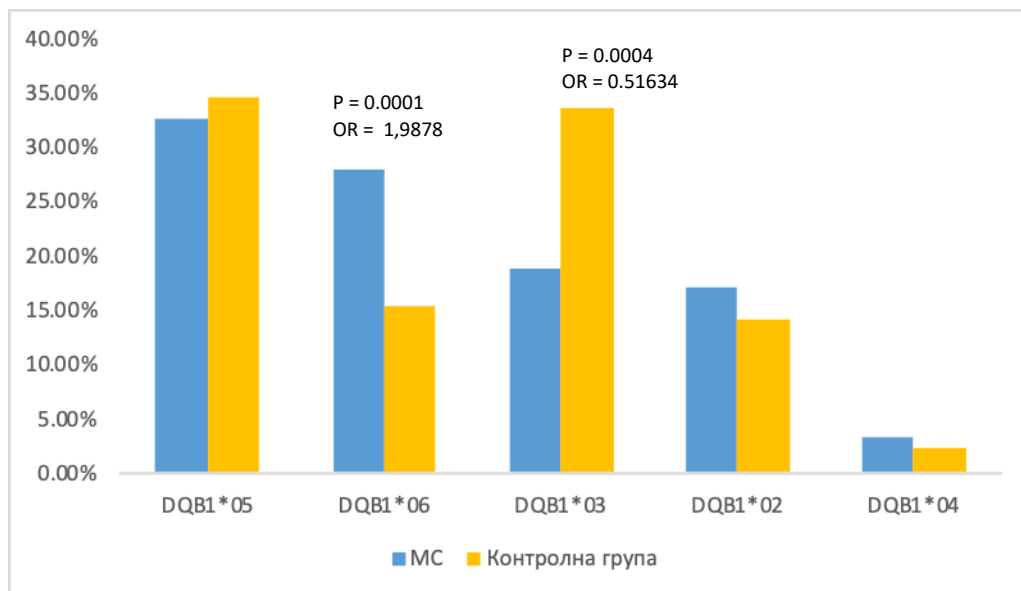


График 9. Фреквенција (%) на HLA-DQB1 алелите кај контролната група и групата со мултипла склероза

p, статистичка значајност на застапеност на HLA- DQB1 алелите меѓу контролната група и групата со мултипла склероза; SD, стандардна девијација; OR, odd ratio.

Табела 10. Фреквенција на HLA-DQB1 алелите кај пациенти со мултипла склероза и контролната група

HLA алел	Пациенти со MC				Контролна група				P **	OR
	Алелна фреквенција	%	SD	N*	Алелна фреквенција	%	SD			
DQB1*05	0.325758	32,58	0.028899	63	0.346290	34,63	0.014148	0.5485		
DQB1*06	0.280303	28,03	0.027696	56	0.152827	15,28	0.010699	0.0001	1,9878	
DQB1*03	0.189394	18,94	0.024161	40	0.335689	33,57	0.014042	0.0004	0,51634	
DQB1*02	0.170455	17,05	0.023187	36	0.141343	14,13	0.010359	0.3822		
DQB1*04	0.034091	3,41	0.011189	7	0.023852	2,39	0.004537	0.5773		

* фенотип, хетерозиготите се броени два пати, хомозиготите се броени како еден **p, статистичка значајност на застапеност на HLA- DQB1 алелите меѓу контролната група и групата со мултипла склероза; SD, стандардна девијација; OR, odd ratio.

Во ова истражување една од целите беше и испитување на влијанието на различните HLA алели врз создавањето антиинтерферонски BAV антитела кај пациентите со дијагностицирана мултипла склероза кои се на терапија со различни формулации интерферон администрирани интрамускулно и субкутано.

Резултатите на влијанието на алелната група HLA-A врз развојот на антиинтерферонски BAV антитела кај групата со мултипла склероза на интерферонска терапија без разлика дали е администриран интрамускулно или субкутано, се прикажани на **табела 11** и **график 10**. Од табелата може да се забележи дека кај

најзастапениот А*02 алел од групата HLA-A, 21 пациент беа ВAB позитивни и 22 пациенти ВAB негативни, односно пациенти кај кои се создале, односно не се создале антитела. Кај 40 пациенти кај кои најзастапен е алелот А*24, 20 пациенти беа позитивни на ВAB антитела, а 20 негативни на ВAB антитела. Кај 33 пациенти кај кои најзастапен беше А*03 алелот, 18 беа позитивни на ВAB антитела, а 15 негативни. Кај вкупно 23 пациенти со А*01, 13 беа ВAB позитивни, а 10 беа ВAB негативни. Кај ниту еден алел од HLA-A групата не се доби статистички значајна разлика во однос на ВAB статусот.

Табела 11. Број на пациенти кои развиле ВAB (pg/mL) антитела од алелната група HLA-A

#	HLA-A	N*	Број на пациенти ВAB > 50 pg/mL	Број на пациенти ВAB < 50 pg/mL	p
1	A*01	23	13	10	0.6364
2	A*02	43	21	22	0.6562
3	A*03	33	18	15	0.7379
4	A*11	14	6	8	0.4851
6	A*23	1	1	1	0.2980
7	A*24	40	20	20	0.7930
8	A*25	6	3	3	0.9259
9	A*26	17	8	9	0.6790
10	A*29	4	2	2	0.9397
11	A*30	5	3	2	0.7127
12	A*31	2	0	2	0.1402
13	A*32	11	8	3	0.1551
14	A*33	2	1	1	0.9576
15	A*66	1	1	0	0.3342
16	A*68	11	6	5	0.8552

*испитаници носители на алел од алелната група HLA-A, хетерозиготите се броени два пати, а хомозиготите еднаш; p, статистичка значајност меѓу ВAB статусот и HLA-A алелната група; ВAB, антиинтерферонски антитела.

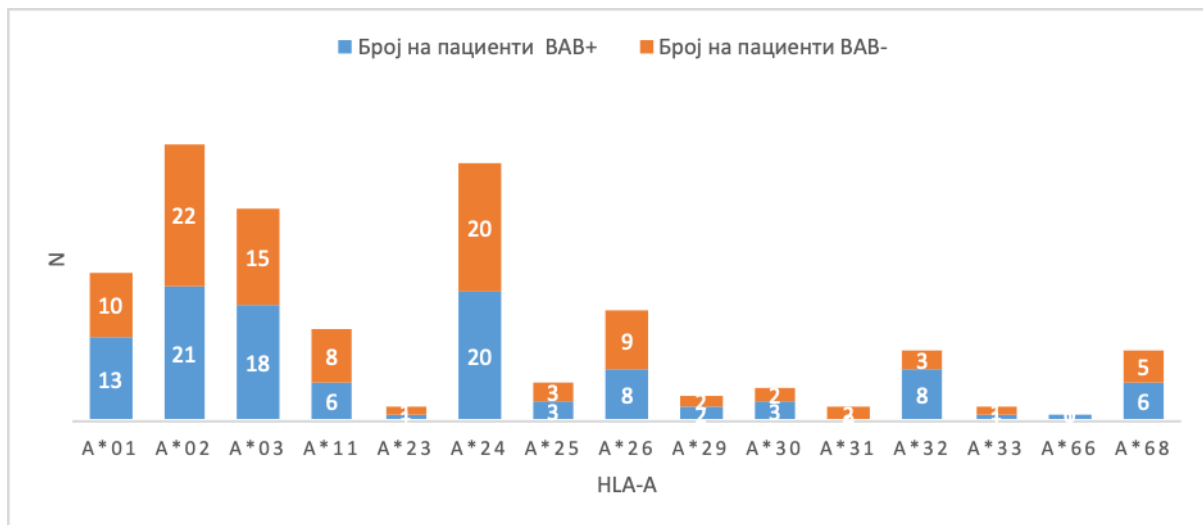


График 10. Број на пациенти и BAV статус кај алелната група HLA-A

*BAV+, пациенти кои развиле интерферонски антитела, (позитивни); BAV-, пациенти кои не развиле интерферонски антитела

Резултатите на влијанието на алелната група HLA-B врз развојот на BAV антитела кај групата со мултипла склероза на интерферонска терапија се прикажани на **табела 12**.

Од алеланата група HLA-B најмногу беше застапен алелот B*51, 42 испитаници, носители на овој алел, и тоа од кои 18 беа BAV позитивни, а 24 BAV негативни. Следуваа алелите B*35 (22 BAV позитивни и 16 BAV негативни) и B*18 со 25 пациенти (17 BAV позитивни и 8 BAV негативни), потоа алелот B*40 со 18 пациенти (8 BAV позитивни и 10 BAV негативни), со B*08 13 пациенти (7 BAV позитивни и 6 BAV негативни). Остататите алели беа застапени кај помалку од 10 пациенти со и без развиени BAV антитела. Врз основа на направената статистичка анализа се покажа дека кај алелната група HLA-B, не постои статистичка значајност помеѓу оделните алели и BAV статусот, односно создавањето антитела, **график 11**.

Табела 12. Број на пациенти кои развиле ВАВ антитела(pg/mL) од алелната група HLA-B

#	HLA-B	N*	Број на пациенти ВАВ > 50 pg/mL	Број на пациенти ВАВ < 50 pg/mL	P
1	B*07	23	14	9	0.4610
2	B*08	13	7	6	0.9845
3	B*13	6	4	2	0.5152
4	B*14	3	2	1	0.6475
5	B*15	5	1	4	0.1279
6	B*18	25	17	8	0.1265
7	B*27	8	4	4	0.8360
8	B*35	38	22	16	0.5611
9	B*37	6	2	4	0.3136
10	B*38	9	6	3	0.4224
11	B*39	8	2	6	0.0990
12	B*40	18	8	10	0.4184
13	B*41	3	1	2	0.4790
14	B*44	10	5	5	0.8162
15	B*49	4	3	1	0.3864
16	B*50	1	1	0	0.3510
17	B*51	42	18	24	0.1242
18	B*52	2	2	0	0.1862
19	B*53	1	0	1	0.2815
20	B*55	4	2	2	0.8846
21	B*56	5	4	1	0.2313
22	B*57	3	2	1	0.6475

*испитаници носители на алел од алелната група HLA-B; хетерозиготите се броени два пати, а хомозиготите еднаш; p, статистичка значајност меѓу ВАВ статусот и HLA-B алелната група ; ВАВ, антиинтерферонски антитела

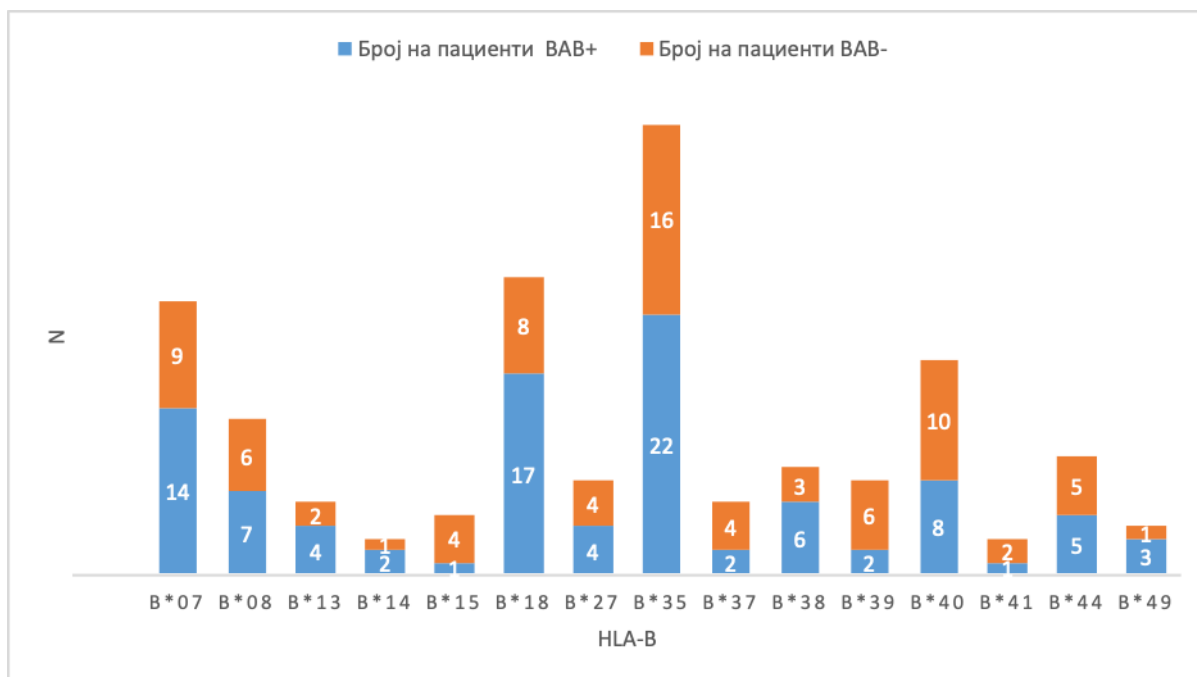


График 11. Број на пациенти и BAV статус кај алелната група HLA-B

*BAV+, пациенти кои развиле интерферонски антитела, (позитивни); BAV-, пациенти кои не развиле интерферонски антитела

Кај алелната група HLA-C најзастапен алел во двете групи според BAV статусот беше на алелот C*07 со вкупно 60 носители, од кој 36 пациенти беа позитивни на BAV со вредности над 50 pg/mL, а 24 пациенти беа негативни на BAV, график 12. Потоа следуваа алелите C*12 со 34 пациенти, 18 BAV позитивни и 16 BAV негативни, со алелот C*04 од вкупно 29 пациенти од кои 19 беа BAV позитивни и 10 BAV негативни и алелот C*02 кој беше застапен кај 24 пациенти од кои 11 беа BAV позитивни, а 13 BAV негативни. Кај ниту еден алел не беше најдена статистички значајна разлика во однос на бројот на пациенти кои развиле BAV антитела кон интерферон бета, **табела 13** и **график 12**.

Табела 12. Број на пациенти кои развиле ВАВ (pg/mL) антитела од алелната група HLA-C

#	HLA-C	N*	Број на пациенти ВАВ > 50 pg/mL	Број на пациенти ВАВ < 50 pg/mL	P
1	C*01	14	6	8	0.4109
2	C*02	24	11	13	0.4275
3	C*03	16	6	10	0.1840
4	C*04	29	19	10	0.1644
5	C*05	8	4	4	0.7539
6	C*06	13	8	5	0.5486
7	C*07	60	36	24	0.2387
8	C*08	4	2	2	0.8881
9	C*12	34	18	16	0.9457
10	C*14	5	2	3	0.5412
11	C*15	18	9	9	0.7579
12	C*16	1	0	1	0.2825
13	C*17	4	2	2	0.8881

*испитаници носители на алел од алелната група HLA-C; ; хетерозиготите се броени два пати, а хомозиготите еднаш; p, статистичка значајност меѓу ВАВ статусот и HLA-C алелната група ; ВАВ, антиинтерферонски антитела;

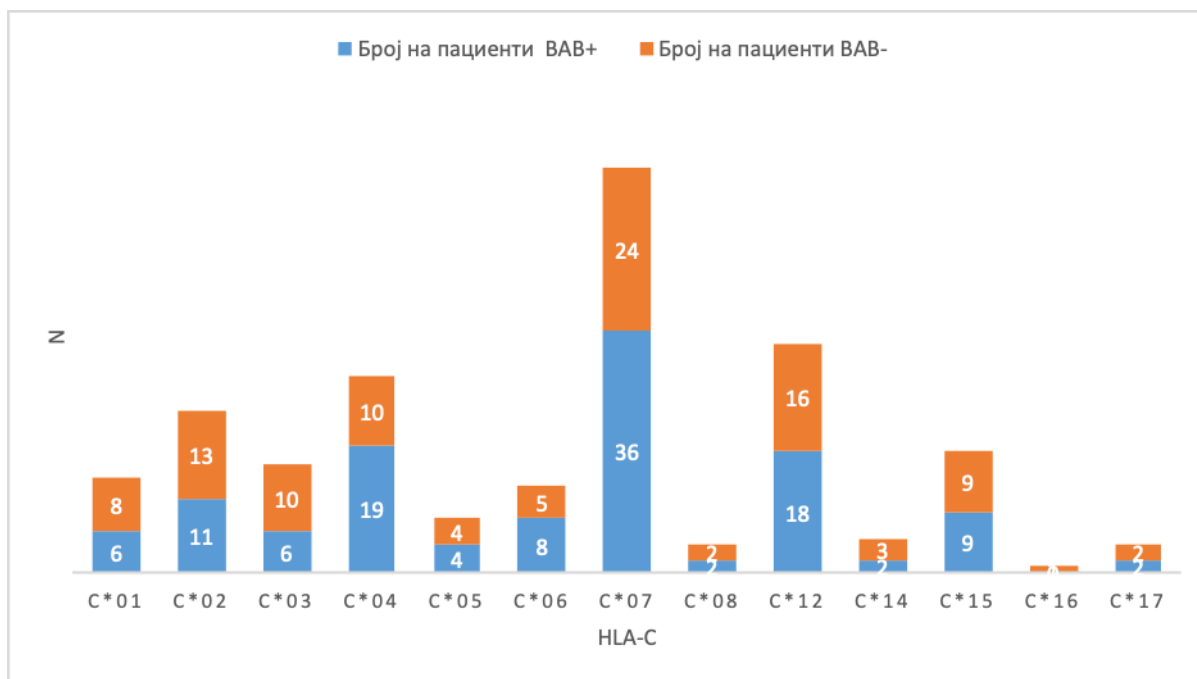


График 12. Број на пациенти и ВАВ статус кај алелната група HLA-C

*ВAV+, пациенти кои развиле интерферонски антитела, (позитивни); ВAV-, пациенти кои не развиле интерферонски антитела

Резултатите добиени за алелната група HLA-DRB1 и BAV статусот кај MC пациентите се прикажани на **табела 13** и **график 13**. Најзастапени алели беа DRB1*15 кај вкупно 45 пациенти, DRB1*11 кај 41 пациент и DRB1*16 кај 36 пациенти, график 13. Од вкупно 45 пациенти со DRB1*15, 24 испитаници беа BAV позитивни, а 21 BAV негативни, со DRB1*11 од вкупно 41 испитаник, 20 беа BAV позитивни, а 21 BAV негативни и кај групата DRB1*16 од вкупно 36 испитаници, 21 беа BAV позитивни, а 15 BAV негативни. Понатаму следуваа алелите DRB1*13, DRB1*04 и DRB1*03. Кај алелот DRB1*01 беше добиена најголема разлика, каде од вкупно 18 пациенти, 6 беа BAV позитивни и 12 BAV негативни, но не беше најдена статистичка значајност ($p=0,0881$). Исто така, и кај останатите алелни групи од DRB1 не беше најдена статистички значајна разлика помеѓу оние кои развиле и оние кои не развиле антитела кон интерферон, **табела 14**.

Табела 14. Број на пациенти кои развиле BAV (pg/mL) антитела од алелната група HLA-DRB1

#	HLA-DRB1	N*	Број на пациенти BAV > 50 pg/mL	Број на пациенти BAV < 50 pg/mL	P
1	DRB1*01	18	6	12	0.0881
2	DRB1*03	22	11	11	0.7939
3	DRB1*04	24	13	11	0.8757
4	DRB1*07	15	9	6	0.5564
5	DRB1*08	3	1	2	0.5000
6	DRB1*10	2	2	0	0.1781
7	DRB1*11	41	20	21	0.5862
8	DRB1*12	3	3	0	0.0984
9	DRB1*13	27	15	12	0.7488
10	DRB1*14	9	4	5	0.6152
11	DRB1*15	45	24	21	0.9194
12	DRB1*16	36	21	15	0.4598

*испитаници носители на алел од алелната група HLA-DRB1; ; хетерозиготите се броени два пати, а хомозиготите еднаш; p, статистичка значајност меѓу BAV статусот и HLA-DRB1 алелната група; BAV, антиинтерферонски антитела;

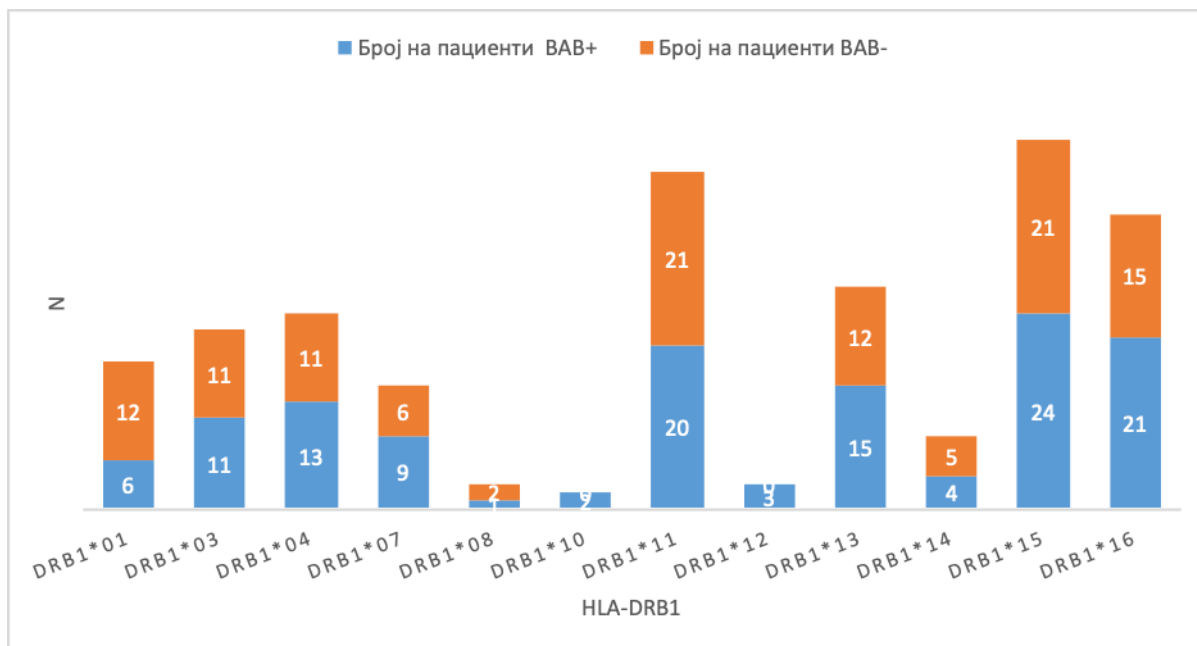


График 13. Број на пациенти и BAV статус кај алелната група HLA-DRB1
 *BAV+, пациенти кои развиле интерферонски антитела, (позитивни); BAV-, пациенти кои не развиле интерферонски антитела

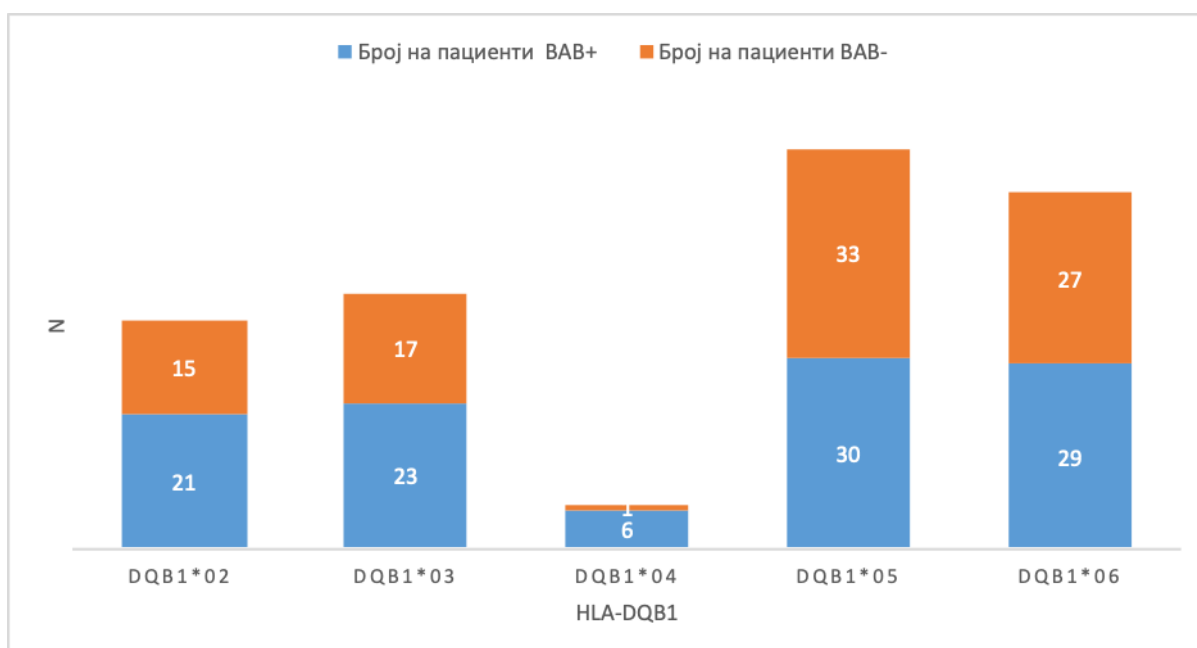


График 14. Број на пациенти и BAV статус кај HLA-DQB1
 *BAV+, пациенти кои развиле интерферонски антитела, (позитивни); BAV-, пациенти кои не развиле интерферонски антитела

Кај алелната група HLA-DQB1 најзастапени алели беа DQB1*06 со вкупно 56 пациенти од кои 29 беа ВАВ позитивни и 27 ВАВ негативни, кај DQB1*05 од вкупно 63 испитаници, 30 беа ВАВ позитивни, а 33 ВАВ негативни. Помалку застапени беа алелите DQB1*03 со вкупен број од 40 пациенти, каде 23 беа ВАВ позитивни, а 15 ВАВ негативни и DQB1*02 со вкупен број 36 од кои 21 беа ВАВ позитивни, а 15 ВАВ негативни. Кај ниту една од групите не е најдена статистичка значајна разлика. Најмалку застапен беше алелот DQB1*04 со вкупен број 7, но со најголема разлика, од кои 6 беа ВАВ позитивни, а само 1 ВАВ негативен, но без статистички значајна разлика ($p=0,5614$), **табела 15** и **график 14**.

Табела 15. Број на пациенти кои развиле ВАВ (pg/mL) антитела од алелната група HLA-DQB1

#	HLA-DQB1	N*	Број на пациенти ВАВ > 50 pg/mL	Број на пациенти ВАВ < 50 pg/mL	P
1	DQB1*02	36	21	15	0.5614
2	DQB1*03	40	23	17	0.6159
3	DQB1*04	7	6	1	0.0862
4	DQB1*05	63	30	33	0.2234
5	DQB1*06	56	29	27	0.7009

*испитаници носители на алел од алелната група HLA- DQB1; ; хетерозиготите се броени два пати, а хомозиготите еднаш; p, статистичка значајност меѓу ВАВ статусот и HLA- DQB1 алелната група ; ВАВ, антиинтерферонски антитела;

Како цел во оваа дисертација беше поставено и одредување на влијанието на HLA алелите и должината на P100 бранот кај визуелни евоцирани потенцијали, ВЕП, како можен маркер за прогресија на болеста.

Направени беа две мерења на P100 бранот на двете очи. Првото мерење на двете очи беше направено при дијагностицирање на болеста. Беше пресметана средна вредност на P100 бранот од двете очи и беше означена како **P100AVG_1**. Второто мерење на двете очи на P100 беше направено една година по отпочнување со терапија и и беше пресметана средна вредност од двете очи и означена како **P100AVG_2**. Потоа од двете вредности беше пресметана средна вредност означена како **P100_AVG** која понатаму се споредуваше со HLA алелите.

Од вкупно 132 пациенти, кај 70 пациенти се направи ВЕП испитување. Од нив, 51 беа жени, а 19 мажи. Средната вредност пресметана од двете последователни средни вредности на времетраењето на должината на P100 бранот **P100_AVG** изнесуваше 120,31 ms кај жените, а 121,07 ms кај мажите. Во однос на P100 бранот и

ВAB статусот, во групата со развиени антиинтерферонски антитела, ВAB+, средната вредност на P100 бранот изнесуваше 119,94 ms, а во групата пациенти кои не развиле ВAB антитела, ВAB-, изнесуваше 121,34 ms. Во однос на полот и ВAB статусот не беше најдена статистички значајна разлика, $p=0,862$, односно $p=0,721$, **табела 16**.

Табела 16. Средни вредности (ms) на P100 бранот во две последователни мерења и односот помеѓу полот и ВAB статусот

Варијабла	N	P100AVG_1 средна вредност (ms)	SD(ms)	P100AVG_2 средна вредност (ms)	SD (ms)	P100_AVG средна вредност (ms)	SD (ms)	*P
Пол								
Жени	51	120,53	17,68	120,13	18,94	120,31	17,05	0,862
Мажи	19	119,68	12,75	122,47	16,16	121,07	13,11	
ВAB статус								
ВAB+	41	119,78	15,72	120,13	18,18	119,94	2,44	0,721
ВAB-	29	121,04	17,57	121,65	18,38	121,34	3,09	

* разлика помеѓу P100_AVG во однос на полот и ВAB статусот; P100AVG_1 средна вредност од прво мерење; P100AVG_2 средна вредност од второто мерење по 12 месеци од започнување на терапија; P100_AVG средна вредност од двете мерења; ms – милисекунди; SD – стандардна девијација; p, статистичка значајност на средните вредности на P100 бранот меѓу мажите и жените и ВAB статусот.

Средната вредност на патолошки пролонгирано времетраење на бранот P100, поголем од 116 ms, имаа вкупно 36 пациенти од кои 28 беа жени и 8 мажи. Нормална вредност на P100 имаа 34 пациенти од кои 23 беа жени и 11 мажи

Во однос на ВAB статусот, од вкупно 70 пациенти, 41 пациент беа со статус ВAB позитивни, од кои 19 имаа патолошки P100, а 29 пациенти кои беа со статус ВAB негативни, 17 имаа патолошки P100, **табела 17**.

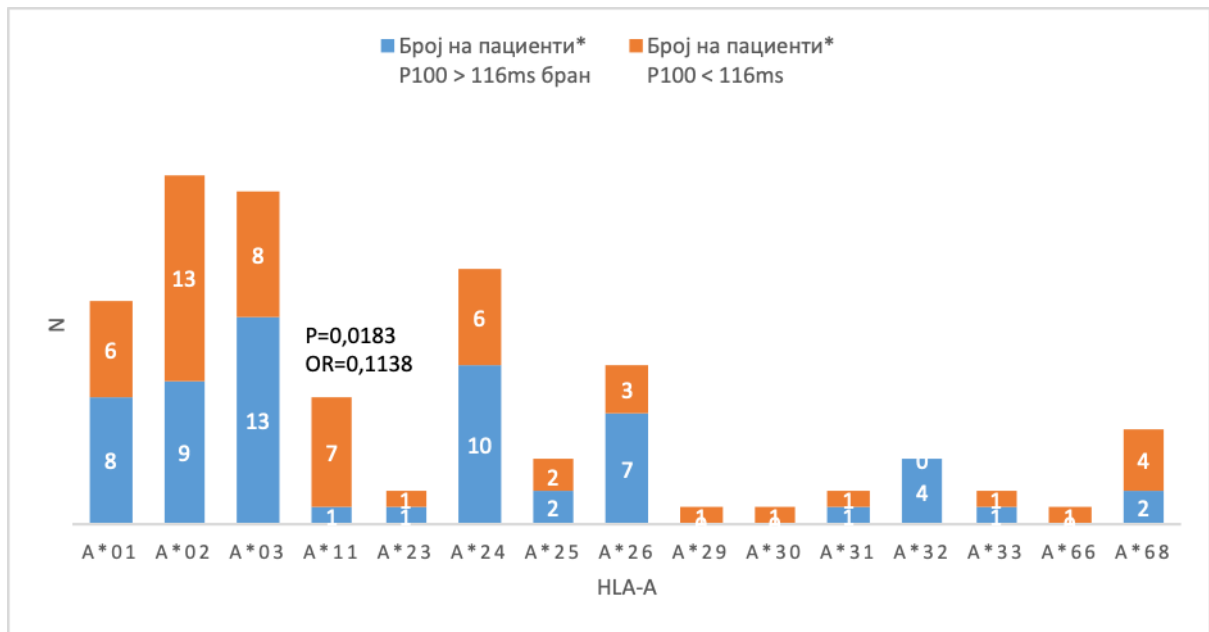
Табела 17. Број на пациенти со патолошки пролонгирано времетраење P100 (ms) бран во однос на полот и ВАВ статусот

Варијабла	Сите испитаници	*P100_AVG > 116 ms	P100_AVG < 116 ms	p
N	70	36	34	p > 0.05
Жени/мажи	51/19	28/8	23/11	0,341
ВАВ статус				
ВАВ + / ВАВ -	41/29	19/17	22/12	0,311

*P100_AVG средна вредност од двете последователни мерења; p, статистичка значајност на патолошки пролонгирано времетраење на P100 бранот меѓу жените и мажите и ВАВ статусот; ms – милисекунди

Исто така, беше анализирана и поврзаноста помеѓу должината на P100 бранот и припадноста на пациентите во поодделните алелни групи.

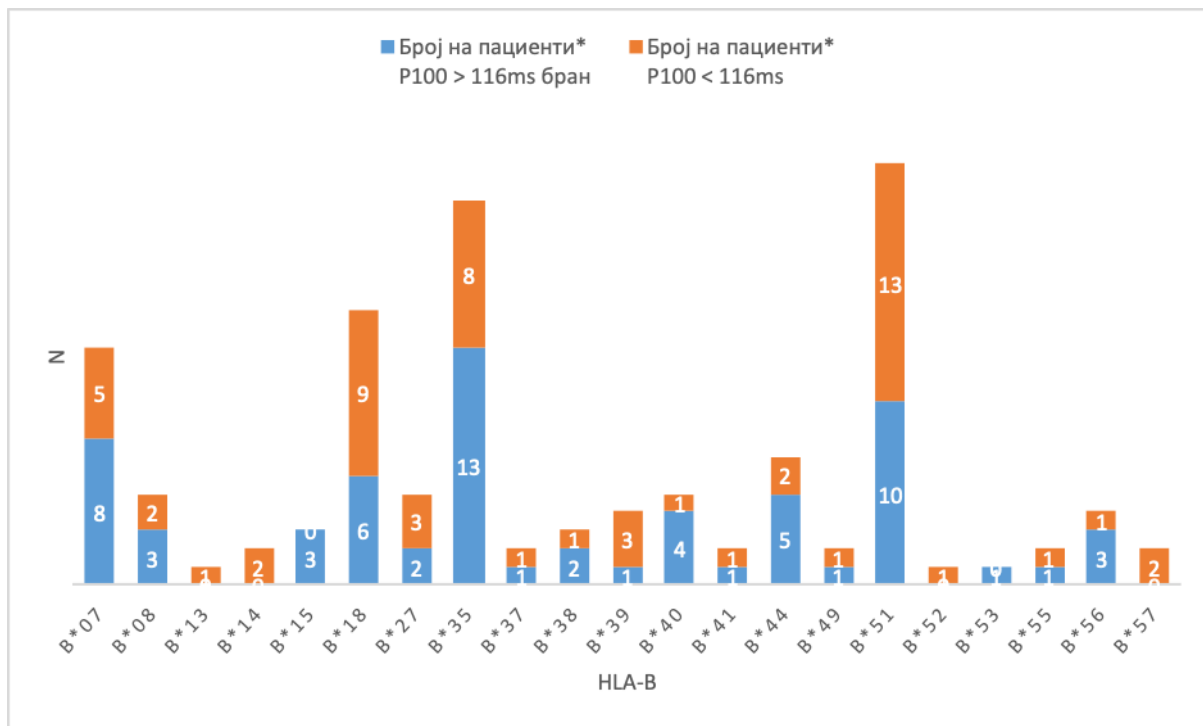
Кај 60 носители на една од HLA-A алелната група, најдено беше дека имаат патолошки пролонгиран P100 бран, а кај 54 носители на HLA-A нормален P100 бран. Испитувањата покажаа дека освен за алелната група A*11 каде се најде статистичка значајност во однос на бројот на пациенти и P100 бранот, 7 со пролонгиран P100 бран во однос на 1 пациент со уреден P100 бран, ($p=0,00183$), кај другите алели од HLA-A алелната група не се најде статистичка значајност. Според добиената анализа, произлегува дека алелот A*11 претставува заштитен алел во однос на должината на P100 бранот (OR=0,1138), **график 15**.



* Бројот на пациенти е фенотип за одредениот алел. ; хетерозиготите се броени два пати, а хомозиготите еднаш

График 15. HLA-A и бројот на пациенти во зависност од времетраење на P100 (ms) бранот

Бројот на пациенти со HLA-B алелната група и должината на P100 бранот се прикажани на **график 16**. Анализата на резултатите за поврзаноста на поодделните алели од HLA-B алелната група и должината на P100 бранот покажа дека нема статистичка значајност.

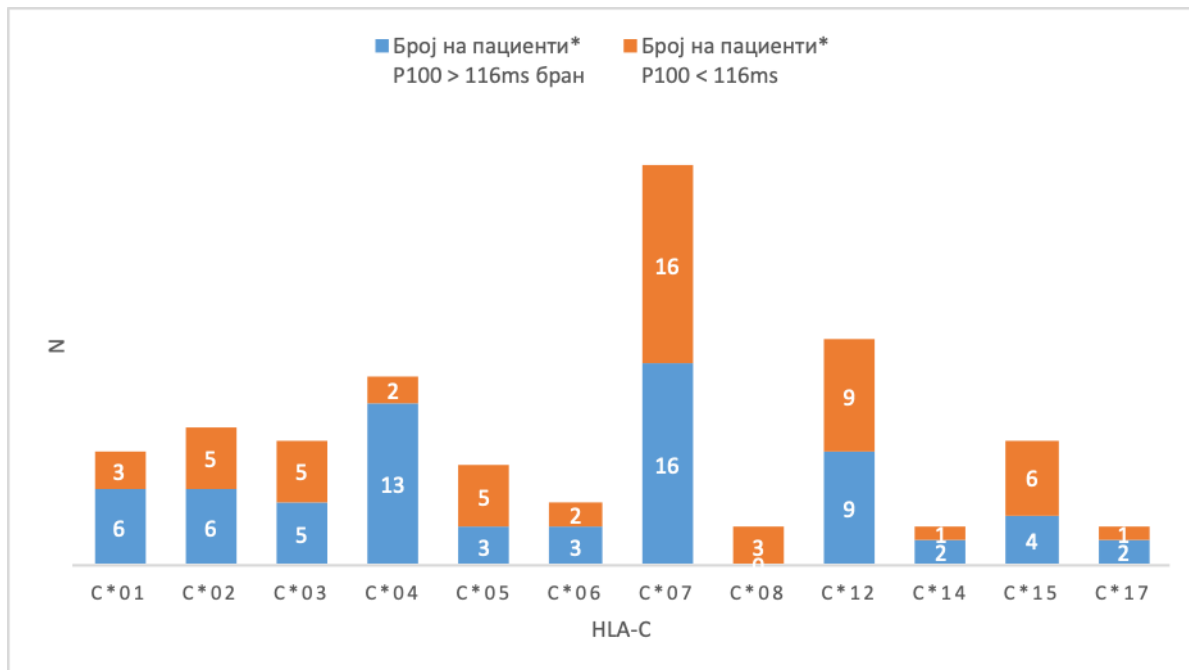


* Бројот на пациенти е фенотип за одредениот алел. ; хетерозиготите се броени два пати, а хомозиготите еднаш

График 16. Број на пациенти со HLA-B алелна група во зависност од времетраење на P100

Испитувањата за алелната група HLA-C, покажаа дека 69 пациенти имаа патолошки пролонгиран P100 бран, а кај 58 пациенти беше регистриран уреден P100 бран. Освен кај алелот C*04, каде се најде статистички значајна разлика меѓу бројот на пациенти со патолошки пролонгиран P100 бран (13 пациенти) во однос на два пациента со уреден P100 бран, $P = 0,0074$, кај другите алели не се најде статистичка значајност. Оваа анализа укажува дека алелот C*04 претставува ризичен алел за пролонгиран патолошки P100 бран кој го зголемува ризикот за 6,5 пати ($OR = 6,5$).

График 17.



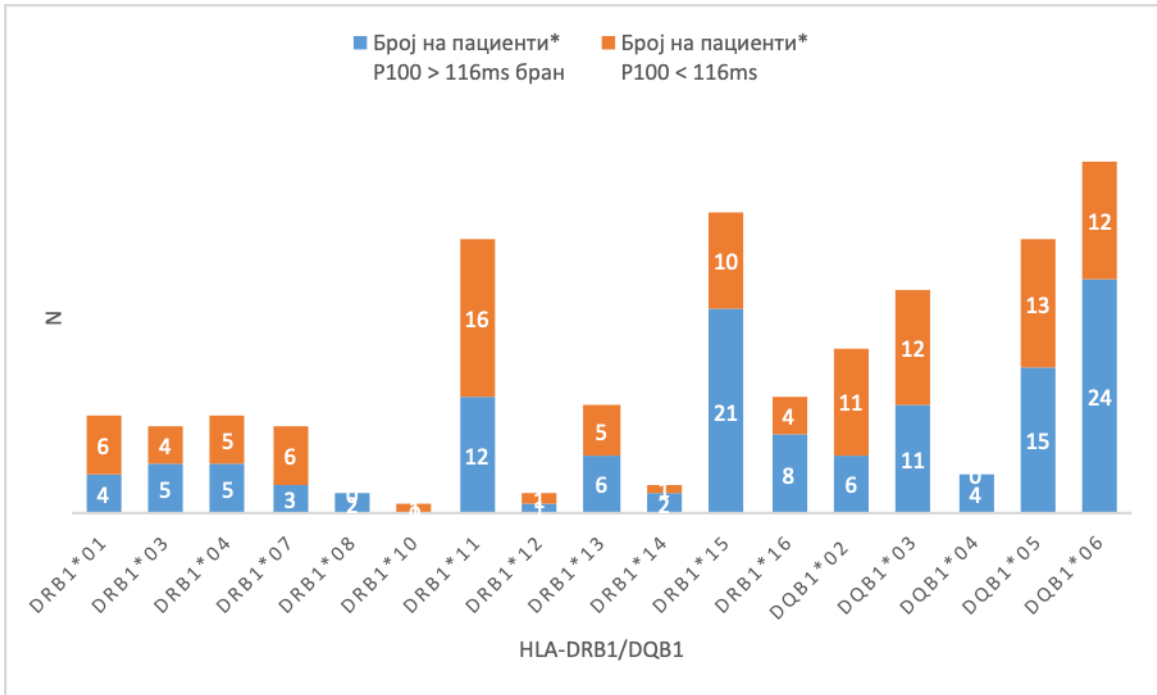
* Бројот на пациенти е фенотип за одредениот алел. ; хетерозиготите се броени два пати, а хомозиготите еднаш

График 17. Број на пациенти со HLA-C алелна група во зависност од времетраење на P100 бранот

Кај алелната група DRB1, 69 пациенти имаа патолошки пролонгиран P100 бран, а кај 59 беше регистриран уреден P100 бран. Најголема разлика беше регистрирана кај алелот DRB1*15 каде 21 испитаник имаа пролонгиран P100 бран, а 10 пациенти имаа уреден P100. Меѓутоа, и покрај големата разлика помеѓу групите, не беше најдена статистичка значајност $p = 0,0758$.

Бројот на пациенти со алелната група DQB1 и должината на P100 бранот се прикажани на графиконот 18. Анализата на резултатите за поврзаноста на поделните алели од алелната група DQB1 и должината на P100 бранот покажа дека нема статистичка значајност.

Во алелната група DQB1, кај 60 пациенти беше одреден патолошки пролонгиран P100 бран, а кај 48 беше регистриран уреден P100 бран. Кај алелот DQB1*02, од вкупно 17 испитаници, кај 6 беше одреден патолошки P100 бран, а кај 11 беше одреден уреден P100, но разликата не беше статистички значајна $p = 0,0670$, **график 18**.



* Бројот на пациенти е фенотип за одредениот алел. ; хетерозиготите се броени два пати, а хомозиготите еднаш

График 18. HLA-DRB1/DQB1 и бројот на пациенти во зависност од времетраење на P100 бранот

6. Дискусија

6.1 Антитела кон интерферон бета

Интерферон бета претставува протеинска структура од групата на биофармацевтици кој има исклучителна имуногеност и кон него се создаваат антитела. Овие антитела ќе ја намалат ефикасноста на интерферонот и ќе го отежнат лекувањето на МС. Оттука клиничките ефикасност ќе се намали што се гледа по наодите на нуклеарната магнетна резонанса и скалата на инвалидитет

Нашата студија за првпат го анализира присуството на антителата кај пациентите со МС кои примаат интерферонска терапија и тоа на стандардизиран начин во иста лабораторија и ист метод.

Присуството на ВАВ беше евидентно во нашата група и се разликуваше во однос на формулацијата на интерферон. Преку 50 % од пациентите во нашата група беа ВАВ позитивни што слично на резултатите опишани во литературата. Пациентите кои примаат интерферонска терапија ќе развијат ВАВ антитела во првите 3- 6 месеци од почетокот на терапијата во опсег од 20-60%. Нашата група е слична на претходно објавените резултати. На, пример Чакал и соработниците (105) пронашле вкупно 40% позитивни на ВАВ од вкупно 218 пациенти третирани со интерферон бета, Хеген и соработници (86) објавиле од вкупно третирани 222 пациенти по 3 месеци терапија со интерферон бета 42,9% биле ВАВ позитивни. Слични резултати има и Перини и соработници (73) каде од вкупно 90 пациенти третирани со интерферон бета 47, 7% биле ВАВ позитивни. Лау и соработници (106) пак , пронашле многу висок процент на на ВАВ позитивни пациенти, 79% од вкупно 78 пациенти третирани со интерферон бета. Овој висок процент во нивната група се објаснува со тоа што во нивниот метод е користено нешто пониска cut off точка за ВАВ од 30 ВТУ (pg/mL). Нашата студија и другите студии користат cut off точка од 50 ВТУ (pg/mL). Слични резултати прикажува и Бак и соработници (94) каде од група 1093 пациенти, ВАВ позитивни се 47%. Нашата група има нешто повисок процент на ВАВ позитивни пациенти што може да оди во прилог што нема стандардна процедура за одредување на ВАВ ниту пак групи се хомогени и примероците за одредување на ВАВ се земени во различен период од третманот.

Во однос на формулацијата на интерферон процентот на позитивни пациенти на ВАВ се разликува како и во светската литература. На пример Рос и соработници кај

данската група од 311 испитаници кои примале 3 пати неделно супкутано Interferon β - 1b после 12 месеци терапија 97% биле позитивни на ВАВ, во споредба со Interferon β - 1a 89%, супкутано 3 пати неделно. Групата пак која примала еднаш неделно Interferon β - 1a развила помалку ВАВ во споредба со 3 пати неделна терапија 58% наспроти 89%. Групата пак што прималае интрамускулно Interferon β - 1a развила ВАВ антитела помалку во однос на групата која примала супкутано, 33% наспроти 58%, (107).

Во нашата студија резултатите се разликуваат од данската студија. Во групата што примаше Interferon β - 1b супкутано 3 пати неделно, 78,4% од испитаниците беа позитивни на ВАВ; во групата што примаше Interferon β - 1a супкутано 3 пати неделно 28,2% беа позитивни на ВАВ, што е значително помалку во споредба со данската група. Во однос на данската група, нашите пациенти кои примаа Interferon β - 1a интрамускулно развија нешто повисок процент позитивни на ВАВ, 55,4%.

Кивисак и сор. од Каролинска пак анализирале две групи на пациенти кои примале Interferon β - 1a интрамускулно еднаш неделно и Interferon β - 1b супкутано 3 пати неделно и добиле нешто слични резултати. Групата која примала интрамускулно еднаш неделно, 20% од пациентите развиле ВАВ антитела во споредба со групата која примала 3 пати неделно супкутано препарат, 81%. Овие резултати се разликуваат со нашите во однос на Interferon β - 1a интрамускулно (108).

Првата причина за разликата што се наоѓа во различните објавени трудови се должи на различните препрати кои се користат за одредување на ВАВ антителата и на не постоењето на стандардизиран метод за нивно одредување. Втора причина е нехомогеноста на групите, што е случај и со резултатите од нашата студија и можеби дизајнот на студијата. Друга причина може да биде и времето кога е земена крвта по инјектирањето на интерферонската терапија, бидејќи повеќе студии покажуваат на временската поврзаност со активацијата на интерферон генот за создавање на антитела (109).

Во нашата студија која е пресечна не беа следени пациентите од почетокот на терапијата со интерферон, туку примероците беа земени во пресечен момент кога пациентите се вклучуваа во студијата. Исто така друга причина која влијае во разликата на ВАВ позитивни пациенти е времетраењето на терапијата. Во нашата група средното времетраење на терапијата во месеци кај групата третирана со Interferon β - 1a интрамускулно е значително помала во однос на другите две групи, 32 месеци во споредба 62,6 месеци кај Interferon β - 1b супкутано и 79,9 месеци Interferon β - 1a супкутано.

И нашата студија покажа дека интерферонската терапија е имуногена и може да предизвика имун одговор кон лекот и развој на специфични антитела. Од литературата се добива впечаток дека типот на дозирањето, трипати неделно во однос на еднаш неделно и интрамускулно во однос на супкутано влијае во развојот на специфични ВАВ антитела.

Должината на терапијата изгледа нема влијание во развојот на антитела. Што се покажува од нашите резултати а и од трудовите објавени во консултираната литература. Најчесто по 4- 6 месец од терапијата голем процент од пациентите веќе имаат развиени ВАВ антитела. Потоа тој титар или останува ист ила пак незначително се менува со текот на терапијата (110).

Исто така влијание во формирање на антитела има видот на формулацијата на интерферонот, типот на протеин кој се вбригува во организмот.

Кај нашата група најголема средна вредност на титарот на ВАВ антитела имаше кај формулацијата Interferon β – 1a субкутано со средна вредност од 82,9 pg/mL за разлика од останатите формулации, а средната вредност на времетраењето беше значително пониска кај Interferon β – 1a кој се прима субкутано, 82,9 средна вредност во месеци. Оттука произлегува дека во зависност од формулацијата и квантитетот на антителата е различен.

Важност на ВАВ антителата е поврзаност со неутрализирачките антитела. Присуството на ВАВ антитела е директно врзано со развојот на неутрализирачки антитела (NAB). NAB се подгрупа на ВАВ кои се врзуваат за интерферонската молекула и го неутрализираат ефектот на лекот во организмот. Намаленото присуство на лекот ја зголемува активноста и прогресијата на болеста. Ние , во нашата студија не одредуваме неутрализирачки антитела, поради тоа што методот е скап и не е достапен во рутинска пракса ниту во истражувачки цели. Но, од литературата се добиваат податоци за поврзаноста на ВАВ со NAB, односно високиот титар на ВАВ е директно поврзан со присуството на NAB.

Хеген и соработници ја докажуваат поврзаноста на ВАВ со NAB антителата, односно висок процент на ВАВ позитивни пациентите ќе развијат NAB антитела кои имаат неутрализирачки ефект. Во нивната студија од вкупно 190 пациенти кои ја завршиле студијата во времетраење од 24 месеци се покажало дека на третиот месец од 149 испитаници кои биле ВАВ позитивни 23% биле и NAB позитивни, а само 3,5% ВАВ негативни развиле NAB антитела. Дополнително присуството на ВАВ во првите 3 месеци ја предвидува и позитивноста на NAB во наредните 24 месеци. Исто така Хеген и сор. Успеале да докажат дека кај ВАВ позитивните пациенти биорасположивоста на

интерферон бета во серумот е помала иако се уште немало развој на NAB кај истите пациенти. Ова ни покажува дека и BAV би ја намалило ефикасноста на интерферонот бета. Во нивната група по 3 месеци од терапија кај групата со Interferon β – 1b субкутано 89% од пациентите биле BAV позитивни, што е слично со нашата група на пациенти третирани со Interferon β – 1b која изнесува 78,4%. Резултатите се слични и во други студии објавени за односот на BAV и NAB антителата (85,86,108,111).

Мора да се напомене дека ние во нашата не ја испитувавме клиничката слика на пациентите поврзана со BAV антитела. Иако при вклучувањето на сите пациенти им беше одреден EDSS статусот, не успеавме да најдеме статистички значајна поврзаност со BAV статусот. Една од причините е тоа што еден дел од испитаниците долго време примаат интерферонска терапија и можеби акумулираниот инвалидитет е и од природниот тек на болеста, но знаеме дека и покрај интерферонската терапија сепак болеста кај некои пациенти и понатаму прогресира.

Проценката на BAV статусот и оправданоста за давање на интерферонската терапија во долг период се доведува во прашање. Доколку интерферонот не ефикасен и болеста напредува тогаш треба да се размисли за друга стратегија на лекување и премин во втора линија или пак третман со високо ефикасни нови лекови.

Во студијата на Фокс и соработници промената од интерферонската терапија кај BAV позитивните во втора линија терапија е поголема во однос на BAV негативните е и тоа 21,1% кај BAV+ наспроти 14,1% кај BAV-. Основна причина за промена на терапијата било клиничкото влошување (112).

Оттука титарот на BAV антителата би бил показател за евентуалната ефикасност на терапијата со интерферон. Одуката останува на неврологот но сепак одредувањето на BAV е лесна процедура а може да го предвиди понатамошниот тек на лекувањето. Иако не постојат јасни водичи и препораки во однос на BAV тестирањето и менувањето на терапија, сепак некои студии предлагаат промена на терапија во однос на BAV титарот (113).

Одредувањето на BAV антитела не е комплицирана метода во рутинската пракса. Доколку кај пациентите лекот не е ефикасен или пак има присуство на антитела тогаш треба да се промени стратегијата на лекувањето. Една од опциите е да се промени лекот од лекови со слична ефикасност, но различна формулација. Во студијата COPTIMISE кај пациентите што немале задоволувачки ефект од терапијата со интерферон била направена промена во глатирамер ацетат по што е видено драстично подобрување на клиничките параметри. Промената од една интерферонска формулација во друга интерферонска формулација се чини дека не е добра опција(114)

Причината за создавање на антителата е се уште не докрај позната. Некои пациенти и по повеќе години терапија нема да развијат антитела кон интерферонот. Една можните причини е и влијанието на HLA во изразување на имуниот одговор кон протеинската структура на интерферонот. Познато е дека HLA влијае на CD4+ Т лимфоцитите во презентацијата на антигенот по што Б лимфоцитите започнуваат да создаваат антитела. Од објавените трудови а и во нашата група дел од пациентите остануваат негативни на ВАВ антитела. Во неодамна објавена студија од Калури и соработници, кај пациенти кои примаат интерферон бета се докажува посебна лоза на Т лимфоцити кои директно влијаат во создавањето на антитела во однос на пациенти кои не примаат терапија. Овие Т клетки се под влијание на HLA (115).

6.2 HLA и развој на антиинтерферонски антитела

Последните 15 години фармацевтската технологија и фармацевтските компании развија многу нови протеински молекули во групата на биофармацевтици за третман на голем број на имуни заболувања. Последниве неколку години се повеќе се откриваат и одобруваат моноклонални антитела за различни болести. Покрај нивната терапевтска ефикасност и безбедност, овие молекули се имуногени и затоа што најчесто содржат протеинска структура. Создавањето на антитела не само што ја намалува нивната ефикасност и биосрасположивост туку може да биде и причина за сериозни алергиски реакции. Засега не постојат јасни предиктори кај кои пациенти ќе се развијат антитела кон компонентите на лекот. Слични се искуствата и со интерферонот бета кој се користи за МС. Еден од можните предиктори кои би носеле ризик за развој на антитела е генетскиот фактор кај пациентите, особено HLA гените. Нашето испитување се обиде да најде поврзаност со HLA генотипот и развојот на антитела. Во нашата група не успеавме да најдеме поврзаност со HLA генотипот на класа 1 и класа 2 молекулите.

Кај ниту една алелна група немаше статистичка значајност помеѓу бројот на ВАВ позитивни ВАВ негативни испитаници. Една од претпоставките е користењето на генетска метода со ниска резолуција за одредување на HLA генотипот. Втора можна причина е малиот број на испитаници поделени во различни алелни групи како носители на алели од HLA класа I и класа II.

Бак и соработници покажаа дека во испитуваната група на германска популација HLA класа 2 молекулите влијаат за развој на антитела. Во нивната студија каде се

анализиран ДРВ1локусот се покажа дека алелите HLA-DRB1*04:01, *04:08, *16:01 се ризик фактори за создавање антитела кај пациенти кои примаат интерферонска терапија. Во спротивно пак алелите DRB1*03:01, *04:04, *11:04 изгледа дека имаат заштитен фактор за развој на антитела кон интерферонот. Исто така доколку пациентите биле носители на два ризични алела тогаш се зголемува ризикот за развој на антитела и спротивно доколку се носители на два продуктивни алела се намалува ризикот за развој на антитела (94). Доколку пак имале еден ризичен и еден заштитен алел ризикот за развој на антитела се намалува. Оваа студија се разликува во генотипизацијата за HLA од нашата студија и користи HLA типизација со висока резолуција. Од друга страна групата на пациенти кои примаат интерферон е многу поголема од нашата.

Истата група истражувачи пак користејќи ги податоците од клиничките студии BENEFIT и BEYOND каде пациентите примале Interferon β - 1b најмалку 6 месеци покаже дека HLA класа II молекулите исто така се поврзани со создавање на антитела кон интерферон бета. Кај оваа група најголем ризик имаме носителите на алели HLA-DRB1*04:01 и HLA-DRB1*07:01. Од оваа студија се гледа дека алелната фреквенција на различните алели е различна во испитуваните групи. Конкретно во оваа група алелот DRB1*04:08 бил застапен во многу мал процент (116). Што не значи дека не е ризик за развој на антитела. Ние во нашата студија не најдовме ризичен алел и затоа не продолживме понатаму со одредување на алелите со висока резолуција. Едно од објаснувањата зошто кај нас нема ризичен алел е можеби малата група на испитаници а со тоа и ниската процентуална застапеност на одредени алели.

Во Шведската студија на Линк и соработници каде е се анализирани 903 пациенти кои примале различни формулации на интерферон, покажаа дека HLA-DRB1*15 алелот е поврзан со развој на антитела кон Interferon β – 1a, а пак алелот HLA-DRB1*04 е ризик за развој на антитела кон Interferon β – 1b. Каде се разгледувала поврзаноста на HLA со различните формулации на интерферон (117). Во претходните студии на германската популација не е потврдена поврзаност на HLA-DRB1*15 и ризик за развој на антитела. Исто така е направен обид со типизација со висока резолуција HLA-DRB1*15:01, но и покрај тоа сепак не е најдена поврзаност кај германската популација за ризик за развој на антитела (94,95).

Нунез и соработници изработиле слична студија на шпанска популација каде дел од резултатите се поклопуваат со останатите објавени трудови.

Кај шпанската популација се потврди дека HLA-DRB1*04:01 е потврден како ризичен алел, HLA-DRB1*04:08 не е пронајден во шпанската популација. Дополнително во

шпанската популација најдена е сила поврзаност за развој на антитела во зависност од хаплотипот на HLA алелите, така кај носителите на хаплотипот DRB1*07:01/DQA1*02:01/DQB1*02:02 ризикот за присуство на антитела е поголем (118).

Разликите што се забележуваат во различните објавени трудови поврзани со HLA алелите и развојот на антитела може да се должи поради неколку причини. Различни студии користат различни методи за одредување на HLA генотипот. Втора причина е можеби нехомогеноста на групите особено алелната фреквенција на различните алели. Дополнително е разликата во групите на различните формулации на интерферон, но исто така е вкупниот број на испитаниците.

Нашата цел беше да се одреди поврзаноста на HLA и поврзаноста со BAV антитела користејќи ЕЛИСА техника за одредување на антитела и Olerup SSP метод за одредување на HLA генотипот со ниска резолуција кој се разликува од претходно цитираните трудови кои се со висока резолуција. Дополнително не изработивме статистичка анализа на различни хаплотипови на HLA особено на класа два молекулите поради тоа што не најдовме цврста врска со ниту еден алел кој би бил поврзан со развој на антитела. Потребни е дополнителни истражувања и зголемување на бројот на пациенти кои ќе бидат вклучени за докажување на генетската поврзаност во нашата популација. Направен беше обид и да се спореди просечниот титар на антитела со HLA алелите но ни тогаш не најдовме поврзаност која има статистичка вредност.

6.3 Алелна фреквенција на HLA и ризик за мултипла склероза

Една од примарните цели на ова истражување беше и да се одреди HLA алелната фреквенција кај пациентите со МС во македонската популација споредено со контролна група и ризикот за развој на МС.

Повеќе алели кои можат да бидат ризични или заштитни учествуваат во моделирање на ризикот за развој на МС. Повеќе студии во светот покажуваат слични резултати околу влијанието на генетскиот фактор во позадината на болеста.

За првпат на македонска група на пациенти со МС направена е HLA типизација во 1996 година на Институтот за хематологија во Скопје. Тогаш кај група од 249 пациенти со МС пронајдена е статистички поголема алелна фреквенција на HLA-B*07 во однос на контролната група од 1300 здрави испитаници, со релативен ризик (RR = 1.9) за развој на МС. (119).

Нашата студија е прва која ја истражува врската на пациентите со МС и HLA класа I и класа II и нивната алелна фреквенција споредено со контролна група на здрава популација.

Нашите резултати потврдија дека во македонската популација има слични алелни групи кои се повеќе застапени кај пациентите со МС во однос на здравата популација. Овие резултати се конзистентни со објавените трудови од консултираната литература. Во нашето истражување кај групата со МС алелната фреквенција на алелот A*02 беше статистички помалку застапен во однос на контролната група. Овие резултати се слични со објавените трудови. Во белгиската група објавена од Лисандропулос и сор. кај вкупно 149 пациенти со MS процентот на алелната фреквенција исто така бил помал во однос на контролната група, 35% наспроти 49,2% кај контролната група. Оттука алелот A*02 би бил заштитен алел што е потврдено и во студијата Moutsianas кај голема група на испитаници со МС од речиси сите европски земји (OR=0,67) (120) што е слично со нашата група OR=0,65. Слични резултати се добиени и за алелот B*44 кој е почесто присутен во контролната група во споредба со групата за МС, така овој алел исто така има слаба заштитна улога за МС, OR=0,78. Речиси идентични резултати добивме и ние во однос на алелот B*44. Во нашата група алелот B*44 има заштитна улога во за МС, OR=0,495. Moutsianas и сор, дополнително ги вбројуваат и алелите B*38 и B*55 како заштитни алели во нивната група. Ние не успеавме да докажеме поврзаност на овие два алела со нашата група.

Nealy и соработниците исто така докажале на независна протективна улога на HLA-A*02 и HLA-B*44 кај американската популација. Нивната група се состоела од 532 испитаници со МС и 776 здрави индивидуи како контролна група. Во нивната студија A*02 имала протективна улога OR=0,67 резултат речиси идентичен со нашата група OR=0,65. Дополнително кај нивната група за првпат е анализиран и B*44 алелот кој се покажал за протективен со OR = 0,62, во нашата група нешто понизок резултат OR = 0,495. Нашите резултати се слични и со оваа студија изработена на северноамериканскиот континент.

Понатаму Nealy и сор. Анализирале влијанието на HLA и промените на HMP како маркер за прогресијата на болеста. Покрај тоа што алелите A*02 и B*44 имале заштитна улога, исклучиво алелот B*44 имал влијание на наодите од HMP прегледите. Испитаниците кои биле носители на B*44 алелот имале поголем просечен мозочен волумен и помал број лезии во белата маса во однос на оние испитаници кои не биле носители на алелот B*44 (121).

Лисандропулос и сор. пак во неодамна објавена студија не успеал да ја докаже заштитната улога на алелот В*44. Во нивната студија биле анализирани пациенти со МС, присуство или отсуство на одреден HLA алел и доста клинички параметри. Носителите на алелот В*44 имале значително статистички полош наод на НМР. Групата ја сочинувале значително помал број на носители на алелот В*44 во однос на оние кои го не се носители на В*44. Кај носителите на алелот В*44 вкупниот број на Т2 лезии бил статистички поголем во однос на негативните пациенти на В*44. Дополнително вкупниот волумен на лезиите на НМР бил поголем кај носителите на алелот В*44 но не била докажана статистичка значајност. Во нивната студија се покажало дека пациентите кои се носители на алелот В*44 се имаа зголемен ризик за влошување на спретноста на рацете изразено преку 9 Peg Hole Test (9ПНТ) во однос на пациентите кои не се носители на В*44 (122).

Оваа студија фрла светло кон друг насока и не секогаш резултатите од различните студии се совпаѓаат кога станува збор за генетскиот фактор и развој на болеста. Разликата може да се должи на дизајнот на студијата и бројот на испитаниците во различните групи. Исто така не е јасно кој е синергистичкиот ефект помеѓу алелите. Носителите на еден алел во комбинација на со друг алел дали би имале негативно влијание односно ризик за развој и влошување на болеста или пак заштитна улога. Потребни се поопсежни и подобро контролирани студии кои би го истражил дополнително ефектот на HLA гените и ризикот за развој на болеста .

Слични резултати се добиени и од The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium студијата која анализира огромна бројка на пациенти од повеќе европски земји од југот и од северот на континентот и дополнително од Обединетото кралство и САД. Вкупно се вклучени 9772 пациенти со МС и 17376 контроли. Во оваа студија исто така е потврдена заштитената улога на HLA-A*02 со сличен заштитен фактор како и кај нашата група, OR= 0,73, а пак во нашата група е 0,65 (123).

Исто така во италијанската и во шведската популација алелот А*02 е протективен за МС со сличен ризик како во нашата група. Во наште испитување се потврди како ризичен алел А*03 што не е случај во италијанската популација. Но во шведската популација овој алел е одреден како независен ризичен алел (124,125).

Еден од најчестите алели кој се смета за ризичен за појава на МС и за лоша прогноза е HLA-DRB1*15. Нашата студија го потврди влијанието на алелот DRB1*15 кај групата со МС во однос на контролната група. Овие резултати се во склоп со објавените резултати од различни студии во светот.

Link и соработниците добиле слични резултати на голема скандинавска група на пациенти каде носителите на алелот DRB1*15 имале зголемен ризик за појава на МС за 3 пати во однос на пациентите кои не биле носители на DRB1*15 (126). Слични резултати добивме и ние каде носителите на DRB1*15 имаат речиси 2,5 пати зголемен ризик за МС во однос на контролната група на здрави испитаници (OR=2,495). Студијата на Link дополнително ги анализирале и комбинациите на хаплотипови односно ризични и заштитни алели. Така доколку пациентите биле носители на ризичниот алел DRB1*15 и носители на заштитен алел како HLA-A*02 ризикот за МС значително се намалил на 1,25 пати.

Исто така и Moutsianas и соработници на голема група од 17465 испитаници со МС докажале зголемен ризик за развој на МС кај пациентите кои биле носители на алелот DRB1*15 (127).

Слични резултати се добиени и кај шпанската популација каде биле испитувани 380 пациенти со МС и контролна група од 1088 испитаници. Во нивната студија носителите на DRB1*15 имале 2 пати поголем ризик за развој на МС во однос на контролната група (OR=2,07). Исто така пак носителите на DRB*01 и DRB*04 имале пократко време до развој на значителен инвалидитет (47). Ние не добивме статистичка значајност во степенот на EDSS и алелните групи. Можеби се должи на тоа што нашата студија е пресечна и не можевме пациентите да ги следиме од почетокот на болеста за да се одреди времето до развој на значителен инвалидитет. Оттука алелот DRB1*15 е добро познат ризик фактор кој е докажан во повеќе студии на различни популации. DRB1*15 алел е присутен со голема фреквенција кај белата популација на американскиот континент како доселеници (128). Голема фреквенција на DRB1*15 кај пациентите со МС е присутна и во северните европски народи. Овој алел се поврзува исто така и со појава на МС во помлада возраст (128). Силна асоцијација со овој алел имаат и медитеранските народи, како што е опишано кај шпанската популација но и во грчката популација овој алел има силна поврзаност со пациентите со МС (129,130). Кај словачката популација фреквенцијата на алелот DRB1*03 била статистички значајно поголема кај пациентите со МС во однос на контролната група. Оттука Michalik овој алел го смета како втор можен ризичен алел кај словачката популација. Ние не успеавме да добиеме поврзаност со овој алел и кај алелната група. Фреквенцијата на DRB1*03 е поголема во групата со МС кај нашата група но без статистички значајна разлика. Слични резултати за алелот DRB1*03 добиле и шпанските истражувачи каде како втор независен ризичен алел е DRB1*03 (45). Слични резултати се добиени кај

скандинавската популација, популацијата на Сардинија и австралиската популација (128,131,132).

Алелот DRB1*03 се смета за ризичен алел за повеќе автоимуни болести како дијабетес мелитус или Хашимото тироидит, но ние не ја потврдивме поврзаност со MC групата. Тоа можеби се должи на малата група на испитаници што ја имаме или пак можеби кај македонската популација овој алел нема влијание на болеста. Во иднина потребно е да се направат истражувања на поголема група на испитаници во нашата популација.

Алелот DRB1*13 е негативно поврзан со MC кај словачката и шпанската популација и се посочен како заштитен алел, што не е случај кај нашата група (45,46). Напротив, фреквенцијата на алелот DRB1*03 е поголема во однос контролната група но без статистички значајна разлика.

Алелот DRB1*07 исто така е посочен како заштитен алел за MC кај белата популација и кај скандинавската популација (126,133). Во нашето истражување алелот DRB1*07 исто така беше повеќе застапен во контролната група но без статистички значајна разлика. Исто така на популација од блискиот исток и северна Африка е докажано заштитен ефект на алелите DRB1*07 и DRB1*11 (134). Кај нас фреквенцијата на алелот DRB1*11 беше исто така повеќе застапен кај контролната група 25,5% во однос на групата со MC 18,5%, но не добивме статистичка значајна разлика. Од ревијалниот руд пак на Zhang и соработници алелот DRB1*13:03 е прикажан како ризичен алел за MC кај белата раса со европско потекло (133). Во нашата група кај испитаниците со MC овој алел беше нешто повеќе застапен од контролната група но без статистичка значајност.

Заштитната улога на алелите DRB*11 и DRB*14 што е забележана кај Zhang и соработниците, кај нас не се потврди. Веројатно тоа се должи на ниската фреквенција во двете групи кај нашите испитаници.

Нашата студија го потврди и алелот HLA-DQB1*06 како ризичен алел и HLA-DQB1*03 како заштитен алел. Слични резултати се добие и на словачката популација објавени преку студијата на Michalik и соработници каде на група од 282 пациенти носителите на DQB1*06 имале зголемен ризик (OR = 1.99) за MC во споредба со контролната група (135). Кај нашата група носителите на DQB1*06 имаа идентичен ризик за MC, OR=1,98. Резултати со најголема асоцијација добил е Fernandez на група во Малага. Шпанија каде носителите на DQB1*06 имале 3 пати повисок ризик за развој на MC. Слична асоцијација добил и Caballero на афро-бразилската популација (136). За разлика од европската бела популација каде се најдени влијанија на DQB1

алелите и асоцијација со МС, кај афроамериканската популација овие алели немаат асоцијација со МС (137)

Најверојатно во патогенезата на болеста и ризикот на поедините алели не зависи од само еден алел туку можеби и нивна комбинација.

Информации за ова добиваме и од едно истражување изведено на генетски модифицирани глувци каде ризикот на алелот DRB1*15:01 е докажан преку индуцирана автоимуна реакција кон базичниот миелински протеин како основен патофизиолошки механизам МС. Но, исто така докажале и ризик кај хуманизирани глувци носители на DQB1*06:02 алелот, но во отсуство на DRB1*15, развиваат автоимуна реакција кон базичниот миелински протеин и кон олигодендорглиоцитите, инаку основен протеин кој ја стабилизира миелинската обвивка на аксоните (138). Ова потврдува дека различните алели можеби имаат различен механизам на моделирање на имуниот одговор и изразување на ризикот за развој на МС. Нешто слично со словачката популација и во нашата група фреквенцијата на алелот DQB1*03 беше присутен повеќе во контролната група во однос на групата со МС. Оваа разлика покажа статистичка значајност. Алелот DQB1*03 има заштитна улога кај македонската популација, OR=0,516. Слични резултати добил и Michalik кај словачката популација (46). Заштитната улога на алелот DQB1*03 не се покажал како заштитен алел во другите објавени трудови до кои пристапиме. Тоа може да се должи на различната алелна фреквенција што ја има популацијата. Потребни се дополнителни студии за обезбедување на поверодостојни резултати и поцврсти докази за заштитната улога на DQB1*03. Во шпанската популација Fernandez не успеал да покаже заштитна улога на овој алел, иако студијата е работена со висока резолуција на одредување на HLA фенотипот. Ограничување во нашата студија што HLA фенотипизацијата е со ниска резолуција. Во друга прилика би можело да се анализира самостојно алелот DQB1*03 со висока резолуција и точно да се одреди кој алел изразен со 4 бројки како DQB1*03:XX има најголема асоцијација со контролната група. За ова е потребна поголема група при испитувањето.

Фреквенцијата на различните генотипови значително варира кај мали популации на испитаници, особено постои опасност од исчезнување на поединечни гени. Појава позната како генетско отстапување (genetic drift). Факторите на средината исто така влијаат на фреквенцијата на HLA алелите во одредена популација.

При испитување на HLA асоцијација е важно да се има добар контролен примерок. Ние во нашата студија користиме обемна контролна група за споредба на HLA алелните фреквенции. Контролната група ја сочинуваат податоци добиени преку македонскиот

регистар за донатори за коскена срцевина. Сметаме дека ова е репрезентативен примерок на македонската популација за споредба. Во нашата студија не е земена во предвид етничката припадност. Сметавме дека групата која ја сочинуваат пациентите со МС е мала за да се поделат пациентите по етничка припадност.

6.4 Поврзаноста на HLA со должината на P100 бранот

Една од секундарните цели беше и влијанието на HLA алелите на времетраењето на латенцата на P100 бранот во две последователни мерења, пресметана како средна вредност. P100 бранот беше земен како можен независен маркер за прогресијата на болеста. Изразен преку средна вредност од двете очи, во нашата група се покажа дека HLA-A*11 има заштитна улога или влијае на помала прогресија на болеста. Иако добивме позитивни резултати сепак треба да имаме резерва кон толкувањето и влијанието на овој алел со оглед на тоа дека групата беше многу мала. Од вкупно 8 носители на овој алел 7 имаа уредно времетраење на латенцата на P100 бранот. Ваква асоцијација досега не може да се најде во литературата ниту пак е објавено дека HLA-A11 има заштитна улога во прогресијата на болеста. Исто така во нашата група се покажа алелот HLA-C*04 како ризичен алел кој го зголемува ризикот за 6,5 пати за патолошки пролонгиран P100.

Интересно што кај носителите на алелот HLA-DRB1*15 кој се покажа ризичен за МС во нашата група не добивме статистичка значајност со должината на P100 бранот, $p = 0,0758$. Иако групата што имаше патолошки P100 броеше 21 испитаник, во споредба со групата со уреден P100 бран кои ја сочинуваа 10 испитаници. Од овие резултати не може со сигурност а се исклучи првичната претпоставка дека HLA би влијаела на P100 бранот од неколку причини. Прво групата кои се носители на алелот DRB1*15 е мала и ние во нашето испитување речиси кај половина од испитаниците не успеавме да обезбедиме резултати од P100 бран, на почетокот и по 1 година од терапија. Исто така доколку пациентите се следат во период од повеќе години и доколку е поголема група можеби ќе се докаже влијанието на DRB1*15 на времетраењето на P100 бранот.

Очекувањата за можно влијание на DRB18*15 алелот за прогресијата на болеста изразено преку подолго времетраење на P100 бранот произлегува од литературата и моќното влијание на DRB1*15 во прогресијата на инвалидитетот. Во една неодамна објавена студија на Sturmer и сор. каде биле вклучени 1230 испитаници со МС покажале дека носителите на алелот DRB1*15 е сам по себе ризик за МС и има

негативно влијание за побрза прогресија и зголемување на инвалидитетот (139). Ограничувања во нашата студија е малиот број и можеби методот на мерење латенцата. Наместо мерење на времетраењето можеби подобро е се мери на скала, како што предлага Schlaeger, (140).

Слични резултати добил и Ćierny и сор. на Словачка популација каде алелите HLA-DRB1*15 и DRB1*03 биле позитивно асоцирани со побрза прогресија на EDSS збирот и зголемување на времетраењето на P100 бранот.(141).

Генот на HLA-DRB1*15 учествува во создавање на пептид со ароматични аминокиселини кои се слични на базичниот миелински протеин. Овој пептид е доминантен кај носителите на DRB1*15 алелот кој пак ефикасно се презентира од антиген презентирачките лимфоцити на Т лимфоцитите. Понатаму настанува специфична активација на Т клетките и нивна пролиферација. Вакви реактивни Т клетки се откриени во лезиите во белата маса кај пациенти со МС (142–145).

Можниот механизам за влијанието на HLA гените особено на алелот DRB1*15 го опишал Okuda и сор. во нивната студија за спектроскопски мерења на НМР и клинички параметри кај пациенти со МС (145).

Оттука би претпоставиле дека носителите на DRB1*15 алелот би имале повеќе шанса да развијат повеќе лезии порано во текот на болеста и да се зголеми шансата за прогресија на инвалидитетот.

Нашата идеја за користење на визуелните евоцирани потенцијали, односно P100 бранот е тоа што оптичките нерви речиси многу рано во текот на болеста се погодени и не мора секогаш да имаат клинички симптоми. Но промените во P100 би можеле да значат тивка прогресија на болеста и без јасни клинички симптоми на болеста.

7. Заклучоци

1. Во нашата студија докажавме за првпат на македонската популација присуство на антиинтерферонски антитела. Преку 50% од испитаниците беа ВАВ позитивни што е резултат сличен во објавената литература. Во иднина можеби кај пациентите со висок титар на ВАВ треба да се размислува за промена на интерферонската терапија. Методот за одредување на ВАВ е брз, едноставен и евтин.
2. Времетраењето на терапијата не влијае за развој на антиинтерферонски антитела. Во нашата група ја сочинуваа пациенти со различно време на терапија со интерферон бета. Не успеавме да докажеме дека долгогодишната примена на интерферон би го зголемил ризикот за развој на антитела кон лекот.
3. Во нашата студија HLA алелите немаат влијание за развој на антитела. Ние не успеавме да докажеме асоцијација на HLA алелите и ризикот за развој на антитела. Исто така нема асоцијација на титарот на антитела и HLA алелите, ниту пак тие носат ризик за развој на висок титар на ВАВ антитела.
4. Алелите HLA-A*02, HLA-B*44, HLA-DQB1*03 се заштитни алели во македонската популација и го намалуваат ризикот за развој на мултипла склероза.
5. Алелите HLA-A*03, HLA-DRB1*15, HLA-DQB1*06 се ризични алели и ги зголемуваат шансите за развој на мултипла склероза во македонската популација.
6. Носителите на алелот HLA-A*11 имаат статистички значајно пократок P100 бран што би можело да се претпостави дека кај нив има помала прогресија на болеста. За да се одреди влијание во прогресијата на болеста и HLA алелите потребни се дополнителни и истражувања.

8. Литература

1. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2018 Jan 16];83(3):278–86.
2. Fox RJ, Bethoux F, Goldman MD, Cohen JA. Multiple sclerosis: Advances in understanding, diagnosing, and treating the underlying disease. Vol. 73, *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2006. p. 91–102.
3. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis [Internet]. *The Lancet Elsevier*; Oct 25, 2008 p. 1502–17.
4. Peterlin B, Ristić S, Sepčić J, Vracko BK, Rako A, Lovrečić L, et al. Region with persistent high frequency of multiple sclerosis in Croatia and Slovenia. *J Neurol Sci* [Internet]. 2006 Sep 25 [cited 2018 Dec 4];247(2):169–72.
5. Papathanasopoulos P, Gourzoulidou E, Messinis L, Georgiou V, Leotsinidis M. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in western Greece: a 23-year survey. *Neuroepidemiology* [Internet]. 2008 [cited 2018 Dec 4];30(3):167–73.
6. Poser S, Stickel B, Krtisch U, Burckhardt D, Nordman B. Increasing Incidence of Multiple Sclerosis in South Lower Saxony, Germany. *Neuroepidemiology* [Internet]. 1989 [cited 2018 Dec 4];8(4):207–13.
7. Fasbender P, Kolmel HW. Incidence of multiple sclerosis in the urban area of Erfurt, Thuringia, Germany. *Neuroepidemiology* [Internet]. 2008 [cited 2018 Dec 4];30(3):147–51. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/122331>
8. Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol* [Internet]. 2013 Dec 26;13(1):128. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/342779>
9. Fabis-Pedrini MJ, James I, Seewann A, Yau WY, van de Bovenkamp AA, Sanders FRK, et al. Natural history of benign multiple sclerosis: Clinical and HLA correlates in a Western Australian cohort. *J Neurol Sci* [Internet]. 2018;388(February):12–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.02.036>
10. Lucchinetti CF, GavriloVA RH, Metz I, Parisi JE, Scheithauer BW, Weigand S, et al. Clinical and radiographic spectrum of pathologically confirmed tumefactive multiple sclerosis. *Brain*. 2008;131:1759–75.

11. Pike J, Jones E, Rajagopalan K, Piercy J, Anderson P. Social and economic burden of walking and mobility problems in multiple sclerosis. *BMC Neurol* [Internet]. 2012 Dec 18 [cited 2018 Jan 4];12(1):94. Available from: <http://bmcneurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2377-12-94>
12. Severijns D, Van Geel F, Feys P. Motor fatigability in persons with multiple sclerosis: Relation between different upper limb muscles, and with fatigue and the perceived use of the arm in daily life. *Mult Scler Relat Disord* [Internet]. 2017 Nov 22 [cited 2018 Jan 4];19:90–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29182994>
13. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2008 Oct 25 [cited 2017 Dec 1];372(9648):1502–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18970977>
14. Miller DH, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, Freedman MS, Galetta SL, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis : a consensus approach. *Mult Scler*. 2008;(July):1157–74.
15. Defer G, de Seze J, Bouee S, Courouve L, Longin J, Payet M, et al. Outcomes and treatment management of a French cohort suffering from multiple sclerosis: A retrospective epidemiological study. *Mult Scler Relat Disord* [Internet]. 2018;25:276–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msard.2018.08.004>
16. Tedeholm H, Skoog B, Lisovskaja V, Runmarker B, Nerman O, Andersen O. The outcome spectrum of multiple sclerosis: disability, mortality, and a cluster of predictors from onset. *J Neurol*. 2015;262(5):1148–63.
17. Thompson AJ, Montalban X, Barkhof F, Brochet B, Filippi M, Miller DH, et al. Diagnostic criteria for primary progressive multiple sclerosis: A position paper. *Ann Neurol*. 2000;47(6):831–5.
18. Rojas JI, Romano M, Patrucco L, Cristiano E. A systematic review about the epidemiology of primary progressive multiple sclerosis in Latin America and the Caribbean. *Mult Scler Relat Disord* [Internet]. 2018;22:1–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msard.2018.02.024>
19. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* [Internet]. 1983 Nov [cited 2018 Dec 28];33(11):1444–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6685237>
20. Kister I, Chamot E, Salter AR, Cutter GR, Bacon TE, Herbert J. Disability in multiple sclerosis: A reference for patients and clinicians. *Neurology* [Internet]. 2013 Feb 20 [cited 2015 Mar 17];80(11):1018–24. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3653203&tool=pmcentrez>

&rendertype=abstract

21. Poser CM, Brinar V V. Diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2001;103(1):1–11.
22. Tintoré M, Rovira A, Río J, Nos C, Grivé E, Sastre-Garriga J, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Application in first demyelinating episode. *Neurology*. 2003;60(1):27–30.
23. Brownlee WJ, Miller DH. Clinically isolated syndromes and the relationship to multiple sclerosis. *J Clin Neurosci* [Internet]. 2015;21(12):2065–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2014.02.026>
24. MILLAR JH, ALLISON RS. Familial incidence of disseminated sclerosis in Northern Ireland. *Ulster Med J* [Internet]. 1954 Mar [cited 2019 Jan 2];23(Suppl. 2):29–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13238438>
25. SCHUMACHER GA, BEEBE G, KIBLER RF, KURLAND LT, KURTZKE JF, MCDOWELL F, et al. 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* [Internet]. 1965 Mar 31 [cited 2019 Jan 2];122:552–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14313512>
26. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols. *Ann Neurol* [Internet]. 1983 Mar [cited 2019 Jan 2];13(3):227–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.410130302>
27. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung H-P, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* [Internet]. 2001 Jul;50(1):121–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.1032>
28. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung H-P, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria.” *Ann Neurol* [Internet]. 2005 Dec;58(6):840–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.20703>
29. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292–302.
30. Aktas O, Wattjes MP, Stangel M, Hartung HP. Diagnosis of multiple sclerosis: revision of the McDonald criteria 2017. *Nervenarzt*. 2018;17(February):1–10.

31. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, De Stefano N, Evangelou N, Kappos L, et al. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet Neurol.* 2016;15(3):292–303.
32. Rovira À, Wattjes MP, Tintoré M, Tur C, Yousry TA, Sormani MP, et al. Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis—clinical implementation in the diagnostic process. *Nat Rev Neurol.* 2015;11:471–82.
33. Chirapapaisan N, Laotaweerungsawat S, Chuenkongkaew W, Samsen P, Ruangvaravate N, Thuangtong A, et al. Diagnostic value of visual evoked potentials for clinical diagnosis of multiple sclerosis. *Doc Ophthalmol* [Internet]. 2015 Feb 21 [cited 2019 May 9];130(1):25–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25330954>
34. Gary S. G. Appendix D: Practice Parameter: The Usefulness of Evoked Potentials in Identifying Clinically Silent Lesions in Patients with Suspected Multiple Sclerosis (An Evidence-Based Review). *Contin Lifelong Learn Neurol.* 2013;10:240–5.
35. Höftberger R, Lassmann H. Inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. In: *Handbook of clinical neurology* [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 11]. p. 263–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28987175>
36. Kutzelnigg A, Lassmann H. Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. In: *Handbook of clinical neurology* [Internet]. 2014 [cited 2019 Apr 11]. p. 15–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24507512>
37. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology.* 2015.
38. Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS. In 2014 [cited 2019 Apr 11]. p. 173–89. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978044452001200008X>
39. Hohlfeld R, Steinman L. T Cell–Transfer Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Pillar of Multiple Sclerosis and Autoimmunity. *J Immunol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2019 Apr 11];198(9):3381–3. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1700346>
40. Harkioliaki M, Holmes SL, Svendsen P, Gregersen JW, Jensen LT, McMahon R, et al. T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity* [Internet]. 2009 Mar 20 [cited 2019 Apr 11];30(3):348–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761309001125>

41. Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2019 Apr 11];14(7):463–77. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri3705>
42. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain* [Internet]. 2011 Sep [cited 2019 Apr 11];134(9):2755–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21840891>
43. Choi SR, Howell OW, Carassiti D, Magliozzi R, Gveric D, Muraro PA, et al. Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Brain* [Internet]. 2012 Oct [cited 2019 Apr 11];135(Pt 10):2925–37. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/aws189>
44. Balnytė R, Rastenytė D, Vaitkus A, Skrodenienė E, Vitkauskienė A, Ulozienė I. Associations of HLA DRB1 alleles with IgG oligoclonal bands and their influence on multiple sclerosis course and disability status. *Medicina (B Aires)* [Internet]. 2016 [cited 2019 Apr 11];52(4):217–22. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1010660X16300404>
45. Romero-Pinel L, Martínez-Yélamos S, Bau L, Matas E, Gubieras L, María Pujal J, et al. Association of HLA-DRB1*15 allele and CSF oligoclonal bands in a Spanish multiple sclerosis cohort. *Eur J Neurol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2019 Apr 11];18(10):1258–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21418440>
46. Michalik J, Čierny D, Kantorová E, Kantárová D, Juraj J, Párnická Z, et al. The association of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles with genetic susceptibility to multiple sclerosis in the Slovak population. *Neurol Res*. 2015;37(12):1060–7.
47. Romero-Pinel L, Pujal JM, Martínez-Yélamos S, Gubieras L, Matas E, Bau L, et al. HLA-DRB1: Genetic susceptibility and disability progression in a Spanish multiple sclerosis population. *Eur J Neurol*. 2011;18(2):337–42.
48. Enz LS, Zeis T, Schmid D, Geier F, van der Meer F, Steiner G, et al. Increased HLA-DR expression and cortical demyelination in MS links with HLA-DR15. *Neurol Neuroimmunol neuroinflammation*. 2020 Mar 1;7(2).
49. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, et al. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet* [Internet]. 2015 Oct 7 [cited 2019 Apr 11];47(10):1107–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26343388>
50. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and

- environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2017 Jan 9 [cited 2019 Apr 11];13(1):25–36. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrneurol.2016.187>
51. Balnyte R, Rastenyte D, Vaitkus A, Mickeviciene D, Skrodeniene E, Vitkauskiene A, et al. The importance of HLA DRB1 gene allele to clinical features and disability in patients with multiple sclerosis in Lithuania. *BMC Neurol* [Internet]. 2013 Dec 9 [cited 2019 May 9];13(1):77. Available from: <http://bmcneurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2377-13-77>
 52. Smestad C, Brynedal B, Jonasdottir G, Lorentzen ÅR, Masterman T, Åkesson E, et al. The impact of HLA-A and -DRB1 on age at onset, disease course and severity in Scandinavian multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* [Internet]. 2007 Aug [cited 2019 May 9];14(8):835–40. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-1331.2007.01825.x>
 53. Marrodan M, Alessandro L, Farez MF, Correale J. The role of infections in multiple sclerosis. *Mult Scler J*. 2019;1–11.
 54. Pender MP, Csurhes PA, Burrows JM, Burrows SR. Defective T-cell control of Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Clin Transl Immunol* [Internet]. 2017;6(1):e126-17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cti.2016.87>
 55. Levin LI, Munger KL, Rubertone M V, Peck CA, Spiegelman D, Ascherio A. of Epstein-Barr Virus Antibody Titers and Initial Onset of Neurological Symptoms in Multiple Sclerosis. *Bibliothek*. 2010;293(20):2496–500.
 56. Pormohammad A, Azimi T, Falah F, Faghihloo E. Relationship of human herpes virus 6 and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *J Cell Physiol*. 2018;233(4):2850–62.
 57. Engdahl E, Gustafsson R, Huang J, Biström M, Lima Bomfim I, Stridh P, et al. Increased Serological Response Against Human Herpesvirus 6A Is Associated With Risk for Multiple Sclerosis. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Nov 26;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.02715/full>
 58. Wergeland S, Myhr KM, Løken-Amsrud KI, Beiske AG, Bjerve KS, Hovdal H, et al. Vitamin D, HLA-DRB1 and Epstein-Barr virus antibody levels in a prospective cohort of multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol*. 2016;23(6):1064–70.
 59. PRISMS Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group., PRISMS Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. TP (Prevention of R and D by I-β-1a S in MSS, Group the U of BCMA. PRISMS-4: Long-term efficacy of interferon-beta-1a in relapsing MS.

- Neurology [Internet]. 2001 Jun 26 [cited 2018 Jan 6];56(12):1628–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425926>
60. George PM, Badiger R, Alazawi W, Foster GR, Mitchell JA. Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2012 Jul [cited 2019 Apr 9];135(1):44–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725812000629>
 61. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernán MA, Olek MJ, et al. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: A prospective study. *J Am Med Assoc*. 2001;286(24):3083–8.
 62. Runkel L, Meier W, Pepinsky RB, Karpusas M, Whitty A, Kimball K, et al. Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). *Pharm Res* [Internet]. 1998 Apr [cited 2019 Apr 9];15(4):641–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9587963>
 63. Farrell R a. Neutralising antibodies to interferon beta in multiple sclerosis. 2010; Available from: <http://discovery.ucl.ac.uk/624498/>
 64. McKay FC, Hoe E, Parnell G, Gatt P, Schibeci SD, Stewart GJ, et al. IL7R α Expression and Upregulation by IFN β in Dendritic Cell Subsets Is Haplotype-Dependent. Derfuss T, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Oct 16 [cited 2019 Apr 9];8(10):e77508. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0077508>
 65. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology* [Internet]. 2010 Jan 5 [cited 2019 Apr 9];74 Suppl 1(1 Supplement 1):S17-24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20038758>
 66. Guo B, Chang EY, Cheng G. The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *J Clin Invest* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2019 Apr 9];118(5):1680–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18382764>
 67. Huang H, Ito K, Dangond F, Dhib-Jalbut S. Effect of interferon beta-1a on B7.1 and B7.2 B-cell expression and its impact on T-cell proliferation. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2013 May 15 [cited 2019 Apr 9];258(1–2):27–31. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165572813000374>
 68. Meinel E, Krumbholz M, Hohlfeld R. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: Migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann Neurol* [Internet]. 2006 Jun 1 [cited 2019 Apr 9];59(6):880–92. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.20890>
 69. Kappos L, Freedman MS, Polman CH, Edan G, Hartung H-P, Miller DH, et al.

- Articles Long-term effect of early treatment with interferon beta-1b after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: 5-year active treatment extension of the phase 3 BENEFIT trial. *Lancet Neurol* [Internet]. 2009 [cited 2018 Jan 6];8:987–97. Available from:
[https://lirias.kuleuven.be/bitstream/123456789/257768/1/BENEFIT_long term.pdf](https://lirias.kuleuven.be/bitstream/123456789/257768/1/BENEFIT_long%20term.pdf)
70. Comi G, Filippi M, Barkhof F, Durelli L, Edan G, Fernández O, et al. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* [Internet]. 2001 May;357(9268):1576–82. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600047255>
 71. Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, Kinkel RP, Brownscheidle CM, Murray TJ, et al. Intramuscular Interferon Beta-1A Therapy Initiated during a First Demyelinating Event in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2000 Sep 28 [cited 2018 Jan 6];343(13):898–904. Available from:
<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200009283431301>
 72. Schellekens H. Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects. *Clin Ther* [Internet]. 2002 Nov [cited 2019 Apr 9];24(11):1720–40; discussion 1719. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12501870>
 73. Perini P, Calabrese M, Biasi G, Gallo P. The clinical impact of interferon beta antibodies in relapsing-remitting MS. *J Neurol* [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2017 Mar 29];251(3):305–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-004-0312-8>
 74. Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ, Kimber I. Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation. *J Immunotoxicol*. 2014;11(2):99–109.
 75. Avery DT, Bryant VL, Ma CS, de Waal Malefyt R, Tangye SG. IL-21-Induced Isotype Switching to IgG and IgA by Human Naive B Cells Is Differentially Regulated by IL-4. *J Immunol* [Internet]. 2008 Aug 1 [cited 2019 Apr 10];181(3):1767–79. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.181.3.1767>
 76. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* [Internet]. 2008 Aug [cited 2019 Apr 10];224(1):166–82. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2008.00662.x>
 77. De Groot AS, Scott DW. Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends Immunol* [Internet]. 2007 Nov [cited 2019 Apr 10];28(11):482–90. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147149060700230X>
 78. Schellekens H. Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins.

- Nephrol Dial Transplant [Internet]. 2005 Jun 1 [cited 2019 Apr 10];20(suppl_6):vi3–9. Available from: http://academic.oup.com/ndt/article/20/suppl_6/vi3/1889557/Factors-influencing-the-immunogenicity-of
79. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis: I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* [Internet]. 1993 Apr 1 [cited 2015 Mar 18];43(4):655–655. Available from: <http://www.neurology.org/content/43/4/655.short>
 80. Jacobs L, Cookfair D, Rudick R, Herndon R, Richert J, Salazar A, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* [Internet]. 1996;39:285–94. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ana.410390304/full>
 81. Ebers GC. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon β -1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* [Internet]. 1998 Nov 7 [cited 2019 May 8];352(9139):1498–504. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9820297>
 82. Malucchi S, Gilli F, Caldano M, Marnetto F, Valentino P, Granieri L, et al. Predictive markers for response to interferon therapy in patients with multiple sclerosis. *Neurology* [Internet]. 2008 Mar 25 [cited 2019 May 8];70(Issue 13, Part 2):1119–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18272865>
 83. Foley P, Reilly P, Coulson A, O’Riordan JI. Routine interferon-neutralising antibody testing in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J R Coll Physicians Edinb* [Internet]. 2010 Jun 14 [cited 2019 May 8];40(2):105–10. Available from: http://www.rcpe.ac.uk/journal/issue/journal_40_2/oriordan.pdf
 84. Sominanda A, Rot U, Suoniemi M, Deisenhammer F, Hillert J, Fogdell-Hahn A. Interferon beta preparations for the treatment of multiple sclerosis patients differ in neutralizing antibody seroprevalence and immunogenicity. *Mult Scler* [Internet]. 2007 Mar 30 [cited 2019 May 8];13(2):208–14. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1352458506070762>
 85. Perini P, Calabrese M, Biasi G, Gallo P. The clinical impact of interferon beta antibodies in relapsing-remitting MS. *J Neurol* [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2019 May 8];251(3):305–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-004-0312-8>
 86. Hegen H, Millonig A, Bertolotto A, Comabella M, Giovanonni 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 J* [Internet]. 2014 Apr 5 [cited 2017 Mar 29];20(5):577–87. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009164>
87. Sorensen PS, Ross C, Clemmesen KM, Bendtzen K, Frederiksen JL, Jensen K, et al. Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet*. 2003;362:1184–91.
 88. Paolicelli D, D’Onghia M, Pellegrini F, Direnzo V, Iaffaldano P, Lavalpe V, et al. The impact of neutralizing antibodies on the risk of disease worsening in interferon β -treated relapsing multiple sclerosis: A 5 year post-marketing study. *J Neurol*. 2013;260:1562–8.
 89. Kappos L, Clanet M, Sandberg-Wollheim M, Radue EW, Hartung HP, Hohlfeld R, et al. Neutralizing antibodies and efficacy of interferon beta-1a: a 4-year controlled study. *Neurology* [Internet]. 2005 Jul 12 [cited 2018 Feb 1];65(1):40–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009883>
 90. Wang W, Singh SK, Li N, Toler MR, King KR, Nema S. Immunogenicity of protein aggregates—Concerns and realities. *Int J Pharm* [Internet]. 2012 Jul [cited 2019 Apr 10];431(1–2):1–11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517312003869>
 91. Deisenhammer F, Reindl M, Berger T. Immunoglobulin Subclasses in Patients with Neutralizing and Nonneutralizing Antibodies Against IFN- β 1b. *J Interf Cytokine Res*. 2002;21(3):167–71.
 92. Stickler M, Valdes AM, Gebel W, Razo OJ, Faravashi N, Chin R, et al. The HLA-DR2 haplotype is associated with an increased proliferative response to the immunodominant CD4+ T-cell epitope in human interferon- β . *Genes Immun* [Internet]. 2004 Jan 21 [cited 2018 Feb 1];5(1):1–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/6364027>
 93. Barbosa MDFS, Vielmetter J, Chu S, Smith DD, Jacinto J. Clinical link between MHC class II haplotype and interferon-beta (IFN- β) immunogenicity. *Clin Immunol* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2018 Feb 1];118(1):42–50. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521661605003207>
 94. Buck D, Cepok S, Hoffmann S, Grummel V, Jochim A, Berthele A, et al. Influence of the HLA-DRB1 genotype on antibody development to interferon beta in multiple sclerosis. *Arch Neurol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2015 Jan 8];68(4):480–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21482927>
 95. Hoffmann S, Cepok S, Grummel V, Lehmann-Horn K, Hackermüller J, Hackermueller J, et al. HLA-DRB1*0401 and HLA-DRB1*0408 are strongly associated with the development of antibodies against interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Am J*

- Hum Genet [Internet]. 2008 Aug [cited 2015 Jan 29];83(2):219–27. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2495071&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
96. Weber F, Cepok S, Wolf C, Berthele A, Uhr M, Bettecken T, et al. Single-nucleotide polymorphisms in HLA- and non-HLA genes associated with the development of antibodies to interferon- β therapy in multiple sclerosis patients [Internet]. Vol. 12, The Pharmacogenomics Journal. 2012 [cited 2015 Jan 29]. p. 238–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21502966>
 97. Hedström AK, Ryner M, Fink K, Fogdell-Hahn A, Alfredsson L, Olsson T, et al. Smoking and risk of treatment-induced neutralizing antibodies to interferon β -1a. *Mult Scler*. 2014;
 98. Sena A, Bendtzen K, Cascais MJ, Pedrosa R, Ferret-Sena V, Campos E. Influence of apolipoprotein E plasma levels and tobacco smoking on the induction of neutralising antibodies to interferon-beta. *J Neurol* [Internet]. 2010 Oct 4 [cited 2019 Apr 10];257(10):1703–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-010-5606-4>
 99. Kirijas M, Genadieva Stavrik S, Senev A, Efinska Mladenovska O, Petlichkovski A. HLA-A, -B, -C and -DRB1 allele and haplotype frequencies in the Macedonian population based on a family study. *Hum Immunol*. 2018;79(3):145–53.
 100. Kirijas M, Genadieva Stavrik S, Trajkov D, Hristomanova Mitkovska S, Senev A, Efinska Mladenovska O, et al. HLA profile of the donors in the Macedonian Bone Marrow Donor Registry. *Int J Immunogenet*. 2018;45(6):337–46.
 101. Brickelmaier M, Hochman PS, Baciu R, Chao B, Cuervo JH, Whitty A. ELISA methods for the analysis of antibody responses induced in multiple sclerosis patients treated with recombinant interferon- β . *J Immunol Methods*. 1999;227(1–2):121–35.
 102. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*. 1992;
 103. Zetterquist H, Olerup O. Identification of the HLA-DRB1*04, -DRB1*07, and -DRB1*09 Alleles by PCR Amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Hum Immunol*. 1992;
 104. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinforma*. 2005 Jan;1:117693430500100.

105. 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 Immunoass Immunochem* [Internet]. 2014 Oct 2 [cited 2015 Dec 7];35(4):398–411. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24547871>
106. Lau AY, Ip W, Au C, Lau K, Wong W, Yip K, 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* [Internet]. 2017 Dec 9 [cited 2018 Jan 15];3(4):205521731773348. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2055217317733485>
107. Ross C, Clemmesen KM, Svenson M, Sørensen PS, Koch-henriksen N, Skovgaard GL, et al. Immunogenicity of Interferon- β in Multiple Sclerosis Patients : Influence of Preparation , Dosage , Dose Frequency , and Route of Administration. 2000;706–12.
108. Kivisäkk P, Alm G V., Fredrikson S, Link H. Neutralizing and binding anti-interferon- β (IFN- β) antibodies. A comparison between IFN- β -1a and IFN- β -1b treatment in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2000;7(1):27–34.
109. Buttman M, Merzyn C, Rieckmann P. Interferon- β induces transient systemic IP-10/CXCL10 chemokine release in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2004 Nov;156(1–2):195–203.
110. Caldano M, Raoul W, Rispens T, Bertolotto A. Drug Efficacy Monitoring in Pharmacotherapy of Multiple Sclerosis With Biological Agents. *Ther Drug Monit* [Internet]. 2017 Aug [cited 2018 Jan 16];39(4):350–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28328761>
111. Kivisäkk P, Alm G, Tian W, Matusевич D, Fredrikson S, Link H. Neutralising and binding anti-interferon- β -1 b (IFN-b-1 b) antibodies during IFN- β -1 b treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler J* [Internet]. 1997 Jun 2;3(3):184–90. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/135245859700300303>
112. Fox E, Green B, Markowitz C, Murray R, Goodman AD, Glenski SJ, et al. The effect of scheduled antibody testing on treatment patterns in interferon-treated patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol* [Internet]. 2014 Dec 4 [cited 2017 Mar 29];14(1):73. Available from: <http://bmcneurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2377-14-73>
113. Polman CH, Bertolotto A, Deisenhammer F, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, et al. Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* [Internet]. 2010;9(7):740–

50. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70103-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70103-4)
114. Ziemssen T, Bajenaru OA, Carrá A, de Klippel N, Correia de Sá J, Edland A, et al. Erratum to: A 2-year observational study of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis converting to glatiramer acetate from other disease-modifying therapies: the COPTIMIZE trial. *J Neurol* [Internet]. 2015 Jan 25;262(1):248–248. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-014-7565-7>
115. Kalluri SR, Grummel V, Hracsko Z, Pongratz V, Pernpeintner V, Gasperi C, et al. Interferon-beta specific T cells are associated with the development of neutralizing antibodies in interferon-beta treated multiple sclerosis patients. *J Autoimmun* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2020 Jun 11];88:83–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896841117305875>
116. Buck D, Andlauer TF, Igl W, Wicklein E-M, Mühlau M, Weber F, et al. Effect of *HLA-DRB1* alleles and genetic variants on the development of neutralizing antibodies to interferon beta in the BEYOND and BENEFIT trials. *Mult Scler J* [Internet]. 2018 Mar 9 [cited 2018 Nov 27];135245851876308. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1352458518763089>
117. Link J, Lundkvist Ryner M, Fink K, Hermanrud C, Lima I, Brynedal B, et al. Human leukocyte antigen genes and interferon beta preparations influence risk of developing neutralizing anti-drug antibodies in multiple sclerosis. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jan 7 [cited 2015 Jan 28];9(3):e90479. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0090479#pone-0090479-g001>
118. Núñez C, Cénit MC, Alvarez-Lafuente R, Río J, Fernández-Arquero M, Arroyo R, et al. HLA alleles as biomarkers of high-titre neutralising antibodies to interferon- β therapy in multiple sclerosis. *J Med Genet* [Internet]. 2014 Jun [cited 2015 Jan 29];51(6):395–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24748646>
119. Anita H-D, Kocho D, Jasmina P, Perko K. Frequency of HLA antigens at patients with sclerosis multiplex. *Hum Immunol* [Internet]. 1996 Apr [cited 2020 Jul 8];47(1–2):31. Available from: <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-c1c7119f-7c51-3837-b357-9a2e28329494>
120. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, et al. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet* [Internet]. 2015 Oct [cited 2018 Jan 4];47(10):1107–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26343388>
121. Healy BC, Liguori M, Tran D, Chitnis T, Glanz B, Wolfish C, et al. HLA B*44:

- Protective effects in MS susceptibility and MRI outcome measures. *Neurology* [Internet]. 2010 Aug 17;75(7):634–40. Available from: <http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.0b013e3181ed9c9c>
122. Lysandropoulos AP, Perrotta G, Billiet T, Ribbens A, Du Pasquier R, Pot Kreis C, et al. Human Leukocyte Antigen Genotype as a Marker of Multiple Sclerosis Prognosis. *Can J Neurol Sci.* 2020;47(2):189–96.
 123. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature.* 2011;476(7359):214–9.
 124. Brynedal B, Duvefelt K, Jonasdottir G, Roos IM, Åkesson E, Palmgren J, et al. HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS One.* 2007;2(7):1–5.
 125. Bergamaschi L, Leone MA, Fasano ME, Guerini FR, Ferrante D, Bolognesi E, et al. HLA-class I markers and multiple sclerosis susceptibility in the Italian population. *Genes Immun.* 2010;11(2):173–80.
 126. Link J, Kockum I, Lorentzen ÅR, Lie BA, Celius EG, Westerlind H, et al. Importance of Human Leukocyte Antigen (HLA) Class I and II Alleles on the Risk of Multiple Sclerosis. Seo J-S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 May 7 [cited 2020 Jul 12];7(5):e36779. Available from: www.plosone.org
 127. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, et al. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet* [Internet]. 2015 Sep 29 [cited 2020 Jul 8];47(10):1107–13. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng.3395>
 128. Masterman T, Ligers A, Olsson T, Andersson M, Olerup O, Hillert J. HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Ann Neurol* [Internet]. 2000 Aug 15 [cited 2020 Jul 13];48(2):211–9. Available from: <https://academic.oup.com/aje/article/165/10/1097/57468>
 129. Fernández O, Fernández V, Alonso A, Caballero A, Luque G, Bravo M, et al. DQB1*0602 allele shows a strong association with multiple sclerosis in patients in Malaga, Spain. *J Neurol.* 2004;251(4):440–4.
 130. Kouri I, Papakonstantinou S, Bempes V, Vasiliadis HS, Kyritsis AP, Pelidou SH. HLA associations with multiple sclerosis in Greece. *J Neurol Sci* [Internet]. 2011 Sep 15 [cited 2020 Jul 13];308(1–2):28–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21741664/>
 131. Cocco E, Sardu C, Pieroni E, Valentini M, Murru R, Costa G, et al. HLA-DRB1-

- DQB1 haplotypes confer susceptibility and resistance to multiple sclerosis in Sardinia. *PLoS One* [Internet]. 2012 [cited 2019 Jan 28];7(4):e33972. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22509268>
132. Stankovich J, Butzkueven H, Marriott M, Chapman C, Tubridy N, Tait BD, et al. HLA-DRB1 associations with disease susceptibility and clinical course in Australians with multiple sclerosis. *Tissue Antigens* [Internet]. 2009 Jul [cited 2020 Jul 13];74(1):17–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19392788/>
 133. Zhang Q, Lin CY, Dong Q, Wang J, Wang W. Relationship between HLA-DRB1 polymorphism and susceptibility or resistance to multiple sclerosis in Caucasians: A meta-analysis of non-family-based studies [Internet]. Vol. 10, *Autoimmunity Reviews*. *Autoimmun Rev*; 2011 [cited 2020 Jul 13]. p. 474–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21440682/>
 134. Mohajer B, Abbasi N, Pishgar F, Abdolalizadeh A, Ebrahimi H, Razaviyoun T, et al. HLA-DRB1 polymorphism and susceptibility to multiple sclerosis in the Middle East North Africa region: A systematic review and meta-analysis [Internet]. Vol. 321, *Journal of Neuroimmunology*. Elsevier B.V.; 2018 [cited 2020 Jul 13]. p. 117–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29957381/>
 135. Michalik J, Čierny D, Kantorová E, Kantárová D, Juraj J, Párnická Z, et al. The association of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles with genetic susceptibility to multiple sclerosis in the Slovak population. *Neurol Res*. 2015;37(12):1060–7.
 136. Caballero A, Alvéz-León S, Papais-Alvarenga R, Fernández O, Navarro G, Alonso A. DQB1*0602 confers genetic susceptibility to multiple sclerosis in Afro-Brazilians. *Tissue Antigens* [Internet]. 1999 Nov [cited 2020 Jul 12];54(5):524–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-0039.1999.540511.x>
 137. Isobe N, Gourraud PA, Harbo HF, Caillier SJ, Santaniello A, Khankhanian P, et al. Genetic risk variants in African Americans with multiple sclerosis. *Neurology*. 2013;81(3):219–27.
 138. Kaushansky N, Ben-Nun A. DQB1*06: 02-associated pathogenic anti-myelin autoimmunity in multiple sclerosis-like disease: Potential function of DQB1*06:02 as a disease-predisposing allele [Internet]. Vol. 4, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2014 [cited 2020 Jul 13]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25360418/>
 139. Stürner KH, Siembab I, Schön G, Stellmann J-P, Heidari N, Fehse B, et al. Is multiple sclerosis progression associated with the HLA-DR15 haplotype? *Mult Scler J - Exp Transl Clin*. 2019;5(4):205521731989461.

140. Schlaeger R, Hardmeier M, D'Souza M, Grize L, Schindler C, Kappos L, et al. Monitoring multiple sclerosis by multimodal evoked potentials: Numerically versus ordinally scaled scoring systems. *Clin Neurophysiol* [Internet]. 2016;127(3):1864–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2015.11.041>
141. Čierny D, Lehotský J, Kantorová E, Sivák Š, Javor J, Kurča E, et al. The HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles are associated with multiple sclerosis disability progression in Slovak population. *Neurol Res* [Internet]. 2018 Jul 3 [cited 2020 Jul 12];40(7):609–16. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01616412.2018.1456711>
142. Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA. T-cell recognition of an immuno-dominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* [Internet]. 1990 Jul;346(6280):183–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/346183a0>
143. Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Grummel V, Sommer N, Brück W, et al. Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 Dec 12;103(50):19057–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17142321>
144. Scholz C, Patton KT, Anderson DE, Freeman GJ, Hafler DA. Expansion of autoreactive T cells in multiple sclerosis is independent of exogenous B7 costimulation. *J Immunol* [Internet]. 1998 Feb 1;160(3):1532–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570577>
145. Okuda DT, Srinivasan R, Oksenberg JR, Goodin DS, Baranzini SE, Beheshtian A, et al. Genotype–Phenotype correlations in multiple sclerosis: HLA genes influence disease severity inferred by 1HMR spectroscopy and MRI measures. *Brain* [Internet]. 2009 Jan [cited 2020 Jul 30];132(1):250–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2638695/>

