

# Myxovirus resistance protein A v terapii interferony- $\beta$ u pacientů s roztroušenou sklerózou a algoritmus sledování účinnosti léčby

## Myxovirus Resistance Protein A in Interferon- $\beta$ Therapy in Patients with Multiple Sclerosis and Treatment Effectiveness Monitoring Algorithm

### Souhrn

**Úvod:** Interferony- $\beta$  (IFN $\beta$ ) patří mezi léky první volby v terapii roztroušené sklerózy. Myxovirus resistance protein A (MxA) je považován za marker účinnosti IFN $\beta$ . Odpovídatost na léčbu IFN $\beta$  může být snížena přítomností neutralizačních protilátek (NABs). **Soubor a metodika:** Ve skupině pacientů zahajujících léčbu IFN $\beta$  jsme po dobu 24 měsíců prospektivně sledovali výskyt NABs a expresi mRNA MxA. mRNA MxA byla vyšetřována real-time PCR každé tři měsíce, při opakovaném poklesu následoval MxA indukční test. NABs byly stanovovány každých šest měsíců pomocí metody cytopatického efektu. Pacienti byli pravidelně sledováni klinicky i pomocí MR. **Výsledky:** Do sledování bylo zařazeno 119 pacientů, z nichž 99 jej dokončilo. Pozitivita NABs se objevila u 17 pacientů, nejčastěji v měsíci 12 a 18, u 10 pacientů (10 %) zůstala trvale. Při NABs v titru 20–100 TRU/ml kleslo MxA pod cut-off v 85 % případů, při titru > 100 TRU/ml ve 100 %. Opakovaný pokles MxA pod cut-off jsme zaznamenali u 19 (19 %) pacientů – u všech pacientů s trvalou NABs pozitivitou (10 pacientů), u některých s přechodnou pozitivitou NABs (u třech z pěti takových pacientů) a také u šesti pacientů bez NABs. MxA indukční test byl nedostatečný u všech pacientů s trvalou NABs pozitivitou. Nedostatečný byl navíc i u dvou pacientů s poklesem MxA bez NABs. Pokles MxA předcházel obecně vzniku NABs ve 40 % případů. **Závěr:** MxA se stává hlavním laboratorním ukazatelem účinnosti IFN $\beta$ , neboť zachytí pacienty s podezřením na ztrátu účinnosti IFN $\beta$  i v případech, kdy NABs nevznikají. K ověření reaktivity na IFN $\beta$  je nezbytné doplnit MxA indukční test.

### Abstract

**Introduction:** Interferon- $\beta$  (IFN $\beta$ ) is the first-line treatment for relapsing-remitting multiple sclerosis. Myxovirus resistance protein A (MxA) is considered to be an IFN $\beta$  bioactivity marker. Responsiveness to the IFN $\beta$  treatment may be reduced by neutralizing antibodies (NABs). **Material and methods:** We investigated the presence of NABs and mRNA MxA expression in a group of patients who had started IFN $\beta$  treatment. mRNA MxA was measured with real-time PCR every three months. MxA induction was performed in patients in whom continuous decline was detected. NABs were determined using the cytopathic effect method every six months. Patients were regularly observed clinically and with MRI. **Results:** 119 patients were included, 99 completed the observation period of 24 months. NABs positivity was observed in 17 patients, mostly in month 12 and 18. NABs positivity was permanent in ten patients (10%). Nabs titre of 20–100 TRU/ml was associated with a decline in MxA levels under the cut-off in 85% of cases, and in all patients when Nabs titre exceeded 100 TRU/ml. Permanent MxA decline was seen in 19 patients – in all 10 patients with permanent NABs positivity, in three patients with transitional NABs positivity and in six patients without NABs. The MxA induction was insufficient in all permanent NABs positive patients and in two patients with isolated MxA decrease and without NABs. MxA decrease preceded NABs positivity in 40% of cases. **Conclusion:** MxA becomes the main laboratory marker of IFN $\beta$  efficacy as it can indicate patients at risk of IFN $\beta$  efficacy loss, even in situations when patients produce NABs. MxA induction is necessary to verify IFN $\beta$  efficacy.

Práce byla podpořena výzkumným projektem IGA MZ ČR NT/12385-5 a programem PRVOUK-P26/LF1/4.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

J. Libertínová<sup>1</sup>, E. Meluzínová<sup>1</sup>,  
E. Havrdová<sup>2</sup>, D. Horáková<sup>2</sup>,  
I. Kovářová<sup>2</sup>, E. Hynčicová<sup>1</sup>,  
P. Lišková<sup>1</sup>, E. Houzvičková<sup>1</sup>,  
V. Maťoška<sup>3</sup>, M. Zajac<sup>4</sup>, A. Tomek<sup>1</sup>,  
M. Bojar<sup>1</sup>, P. Marusič<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Neurologická klinika

2. LF UK a FN v Motole, Praha

<sup>2</sup> Neurologická klinika a Centrum klinických neurověd, 1. LF UK a VFN v Praze

<sup>3</sup> Laboratoř molekulární diagnostiky, Nemocnice Na Homolce, Praha

<sup>4</sup> Ústav lékařské mikrobiologie,

2. LF UK a FN v Motole, Praha



MUDr. Mgr. Jana Libertínová

Neurologická klinika

2. LF UK a FN v Motole

V Úvalu 84

150 06 Praha

e-mail: jana.libertinova@fnmotol.cz

Přijato k recenzi: 19. 1. 2016

Přijato do tisku: 18. 3. 2016

### Klíčová slova

interferon- $\beta$  – MxA indukční test – myxovirus resistance protein A – neutralizační protilátky – roztroušená skleróza

### Key words

interferon- $\beta$  – MxA induction test – myxovirus resistance protein A – neutralising antibodies – multiple sclerosis

## Úvod

Interferony- $\beta$  (IFN $\beta$ ) se řadí mezi léky první volby používané v léčbě pacientů s klinicky izolovaným syndromem (CIS) s vysokým rizikem rozvoje roztroušené sklerózy (RS) a/nebo v léčbě pacientů s relaps-remitentní formou RS (RR RS). Díky jejich imunomodulačnímu účinku dochází ke snížení aktivity zánětlivého procesu v centrálním nervovém systému [1]. Pacienti, kteří neodpovídají na léčbu IFN $\beta$ , bývají v literatuře děleni do dvou skupin [2]:

1. patogeneticky podmíněni nonrespondenti, u nichž léčba IFN $\beta$  nedokáže dostatečně ovlivnit vysokou aktivitu onemocnění;
2. imuno-farmakologicky podmíněni nonrespondenti, u nichž IFN $\beta$  selhává v důsledku vzniku neutralizačních protilátek (NAbs), které jeho biologickou účinnost snižují.

Podávání IFN $\beta$  může způsobit tvorbu NAbs u 2–42 % pacientů [2].

Myxovirus resistance protein A (MxA), který lze v podobě mRNA MxA detekovat metodou PCR (Polymerase Chain Reaction), je obecně považován za spolehlivý marker účinnosti léčby IFN $\beta$  [3]. Při poklesu mRNA MxA pod určitou hodnotu (cut-off) vzniká podezření na ztrátu účinnosti IFN $\beta$  [3,4].

Zatím nebylo jednoznačně stanoveno, zda pro sledování účinnosti léčby IFN $\beta$  je vhodnějším markerem stanovení hladiny NAbs nebo mRNA MxA [5,6].

Cílem naší práce bylo sledovat dynamiku mRNA MxA po zahájení léčby IFN $\beta$ , stanovit vzájemnou souvislost hladiny MxA a klinického vývoje onemocnění a v případě pozitivní NAbs pak časový vztah a souvislost hodnoty MxA s titrem NAbs.

## Metodika

Prospektivní, observační, nerandomizovaná studie probíhala v letech 2010–2015 paralelně v RS centrech Neurologické kliniky

1. LF UK a VFN v Praze a Neurologické kliniky 2. LF UK a FN v Motole. Zařazení byli všichni dosud neléčení pacienti indikovaní k zahájení terapie IFN $\beta$  s diagnózou CIS nebo RR RS stanovené dle McDonaldových kritérií [7]. Protokol studie byl schválen etickou komisí FN v Motole a všichni pacienti podepsali při vstupu do studie informovaný souhlas.

Sledování trvalo 24 měsíců. V rámci pravidelných tříměsíčních kontrol byly prováděny standardní krevní odběry (krevní obraz vč. diferenciálu, základní biochemie), byl hodnocen klinický stav a sledovány nežádoucí vedlejší účinky IFN $\beta$ .

MxA bylo vyšetřováno v podobě mRNA MxA pomocí real-time PCR každé tři měsíce. Množství detekované mRNA MxA je vztažováno k mRNA genu *GAPDH* (glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza), jehož exprese na stimulaci IFN $\beta$  nereaguje a zůstává stabilní. Výsledný poměr tak umožňuje interindividuální srovnání. Jako hraniční (cut-off) byla stanovena hodnota 160 – ta odpovídá 95. percentilu hodnot mRNA MxA získaných vyšetřením 100 pacientů s RR RS, kteří nebyli léčeni IFN $\beta$  [8].

Při opakovaném poklesu hodnot mRNA MxA pod cut-off byl u pacientů při následující kontrole proveden MxA indukční test – po týdenní periodě, kdy pacient IFN $\beta$  neaplikuje („wash out“), je odebrána krev před aplikací IFN $\beta$  a 4 hod po ní. Za účinnou je terapie považována v případě minimálně trojnásobného vzestupu nebo při hodnotě mRNA MxA nad cut-off ve vzorku odebraném po 4 hod [9].

Hladina NAbs byla stanovena každých šest měsíců pomocí metody cytopatického efektu. Za pozitivní byly považovány hodnoty  $\geq 20$  TRU/ml.

Vyšetření mozku magnetickou rezonancí (MR) proběhlo v době zahájení sledování (měsíc 0) a dále v měsíci 6, 12 a 24. Všechna vyšetření byla na obou pracovištích prováděna na stejném přístroji – MR 1,5T a ve stej-

ném protokolu – axiální FLAIR, tloušťka řezů 1,5 mm a axiální T1 vážené obrazy, tloušťka řezu 1 mm.

Za klinicky stabilizovaného byl považován pacient bez relapsu, se stabilní hodnotou EDSS. Relapsy byly hodnoceny pomocí „relapse rate“ – četnosti atak za 12 měsíců. K analýze klinického průběhu v rámci celého souboru byla použita veličina „time to next relapse“ vyjadřující dobu, která u jednotlivých pacientů uplynula k první atace. Tíže neurologického postižení byla stanovována dle škály EDSS, za zhoršení byla považována konfirmovaná progresse EDSS, tj. vzestup hodnoty EDSS nejméně o 1 bod (pokud je vstupní EDSS  $\geq 1,0$ ) a o 1,5 (pokud je vstupní EDSS = 0) přetrvávající po dobu minimálně 6 měsíců.

Pacient s diagnózou CIS konvertoval do klinicky definitivní RR RS při prokázané klinické aktivitě (výskyt další ataky) či při progresi na MR (nárůst o  $\geq 1$  nové ložisko).

Statistické analýzy byly provedeny v softwaru IBM SPSS Statistics 22, (IBM Corporation, Armonk, New York, USA). K výpočtu rizika relapsu (Hazard Ratio; HR) byl použit Coxův model poměrných rizik s 95% konfidenčními intervaly, jako čas byl stanoven čas k relapsu. Výsledky byly považovány za statisticky signifikantní v případech  $p < 0,05$ .

## Výsledky

Do sledování bylo zařazeno celkem 119 pacientů, 43 mužů a 76 žen, v době zařazení medián věku 33 let (rozpětí 19–65 let) s diagnózou CIS (54 pacientů) či RR RS (65 pacientů). Vstupní EDSS se pohybovalo od 0 do 4,5 (medián 2,0).

U 38 pacientů byla zahájena léčba IFN $\beta$ -1a i. m., u 42 pacientů IFN $\beta$ -1a s. c. a 39 pacientů bylo léčeno preparátem IFN $\beta$ -1b s. c. Léčba byla volena individuálně dle klinické rozvahy ošetřujícího lékaře.

Dvouleté sledování dokončilo 99 pacientů, 20 pacientů léčbu předčasně ukončilo, důvody jsou detailně uvedeny v tab. 1.

## MxA

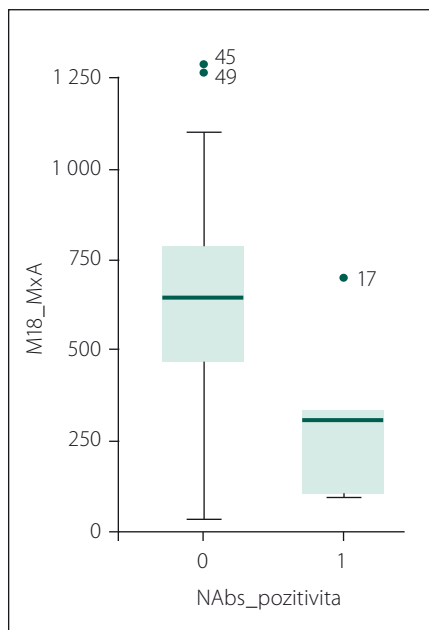
Hodnoty MxA se před zahájením terapie IFN $\beta$  a po třech měsících léčby významně lišily, léčbou IFN $\beta$  došlo k nárůstu průměrně o 610,7 (95 % CI 544,8–676,7;  $p < 0,001$ ).

V průměru zůstávala během léčby IFN $\beta$  hodnota MxA trvale nad cut-off hodnotou.

U jednotlivých pacientů jsme však zachytili jak přechodné poklesy (s hodnotou MxA při další kontrole již nad cut-off), tak poklesy trvalé.

**Tab. 1. Důvody předčasného ukončení léčby IFN $\beta$  a doba setrvání ve studii do ukončení sledování u jednotlivých pacientů.**

Důvod ukončení	Počet pacientů	Trvání léčby do ukončení (měsíce)
klinická aktivita ( $\geq 2$ relapsy/rok)	6	4, 7, 12, 14, 21, 23
MR aktivita	2	15, 22
nežádoucí účinky IFN $\beta$	4	4, 7, 11, 17
gravidita	3	9, 12, 21
non-compliance	5	3, 11, 12, 20, 23



**Graf 1. Porovnání hodnoty mRNA MxA v závislosti na NAb pozitivitě.**

NAb pozitivita na ose X: 0 – NAb negativní, 1 – NAb pozitivní.

K trvalému poklesu MxA pod cut-off hodnotu v průběhu léčby IFNβ došlo u 19 pacientů (19 %, tab. 2). U 10 pacientů s poklesem MxA se současně trvale vyskytovala NAb pozitivita. U třech pacientů s trvalým poklesem MxA se NAb objevily jen přechodně. U šesti pacientů se MxA od určité kontroly trvale pohybovalo pod cut-off bez současného výskytu NAb.

**NAb a jejich vztah k MxA**

Positivita NAb se v průběhu studie objevila celkem u 17 pacientů (17 %).

U 10 pacientů (10 %) byla NAb pozitivita trvalá, tzn. po první detekci přetrvávala i při dalších kontrolách. U všech těchto pacientů došlo i k trvalému poklesu MxA pod cut-off hodnotu (graf 1).

U pěti pacientů se jednalo o přechodnou NAb pozitivitu – MxA kleslo pod cut-off hodnotu jen u třech z nich, u dvou bylo dostatečné.

U dvou pacientů se NAb objevily poprvé až v posledním, 24. měsíci sledování a o jejich přetrvávání v čase se není možné vyjádřit (tab. 2).

Jinými slovy, v případě přítomnosti NAb v titru 20–100 TRU/ml kleslo MxA pod cut-off v 85 % případů, při titru NAb > 100 TRU/ml kleslo MxA ve 100 %.

Trvale NAb pozitivní pacienti byli léčeni IFNβ-1a s.c. (pět pacientů) a IFNβ-1b s.c. (pět

**Tab. 2. Podezření na pokles účinnosti IFNβ.**

Pacienti NAb<sup>+</sup> a/nebo s poklesem MxA pod cut-off hodnotu.

Pacient	IFNβ	Pacienti NAb <sup>+</sup> a/nebo MxA <sup>↓</sup>				
		NAb <sup>+</sup> od	MxA <sup>↓</sup> od	MxA indukční test	RR 0–12	RR 12–24
<b>trvale NAb<sup>+</sup>, trvale MxA<sup>↓</sup></b>						
Ž 40	1b	M18	M12	nedostatečný	1	0
M 40	1b	M6	M6	nedostatečný	0	0
Ž 40	1b	M12	M12	nedostatečný	1	1
Ž 57	1a s.c.	M12	M12	nedostatečný	0	0
Ž 27	1a s.c.	M12	M12	nedostatečný	2	0
Ž 59	1a s.c.	M18	M18	neproveden	0	0
Ž 49	1a s.c.	M18	M12	neproveden	1	0
M 30	1a s.c.	M12	M12	neproveden	1	1
M 28	1b	M12	M6	nedostatečný	0	0
Ž 22	1b	M12	M12	neproveden	0	0
<b>NAb<sup>+</sup>, MxA<sup>↓</sup> v M24</b>						
Ž 24	1a s.c.	M24	M24	neproveden	2	0
M 19	1a s.c.	M24	M24	neproveden	0	0
<b>přechodná NAb<sup>+</sup>, trvale MxA<sup>↓</sup></b>						
M 42	1b	M18	M6	dostatečný	0	0
Ž 34	1b	M18	M12	neproveden	0	1
M 27	1b	M12	M6	dostatečný	0	0
<b>přechodná NAb<sup>+</sup>, MxA<sup>↑</sup></b>						
Ž 45	1a i.m.	M12	–	–	0	0
Ž 37	1a s.c.	M12	–	–	0	0
<b>NAb<sup>-</sup>, trvale MxA<sup>↓</sup></b>						
Ž 35	1b	–	M6	dostatečný	0	0
M 46	1b	–	M12*	nedostatečný	0	0
Ž 23	1b	–	M18**	nedostatečný	0	1
Ž 22	1a s.c.	–	M18	neproveden	1	0
Ž 40	1b	–	M6	dostatečný	0	0
M 21	1b	–	M18	dostatečný	0	0
<b>NAb<sup>-</sup>, MxA<sup>↓</sup> v M24</b>						
Ž 28	1a i.m.	–	M24	neproveden	0	0
Ž 37	1a i.m.	–	M24	neproveden	0	0

Tabulka zachycuje mj. i časový výskyt a posloupnost vzniku abnormit obou laboratorních parametrů. S ohledem na možnost časového srovnání poklesu MxA s výskytem NAb jsou zohledněny pouze náběry MxA prováděné paralelně s vyšetřením NAb, tj. až 6 měsíců.

V 1. sloupci je uveden věk a pohlaví v době zahájení studie (Ž – žena, M – muž).

Sloupec „NAb<sup>+</sup> od“ udává návštěvu, při které byla poprvé zachycena NAb pozitivita, nebo od které pak již byla pozitivita trvalá.

„MxA<sup>↓</sup> od“ udává návštěvu, kdy došlo poprvé k poklesu MxA, nebo od které byl již pokles trvalý. NAb<sup>+</sup> – NAb pozitivita, NAb<sup>-</sup> – NAb negativita, MxA<sup>↓</sup> – pokles MxA pod cut-off hodnotu (< 160), MxA<sup>↑</sup> – MxA nad cut-off (≥ 160), RR – relaps rate.

\*vyřazen M15 pro progresi na MR, \*\*vyřazena M22 pro progresi na MR.

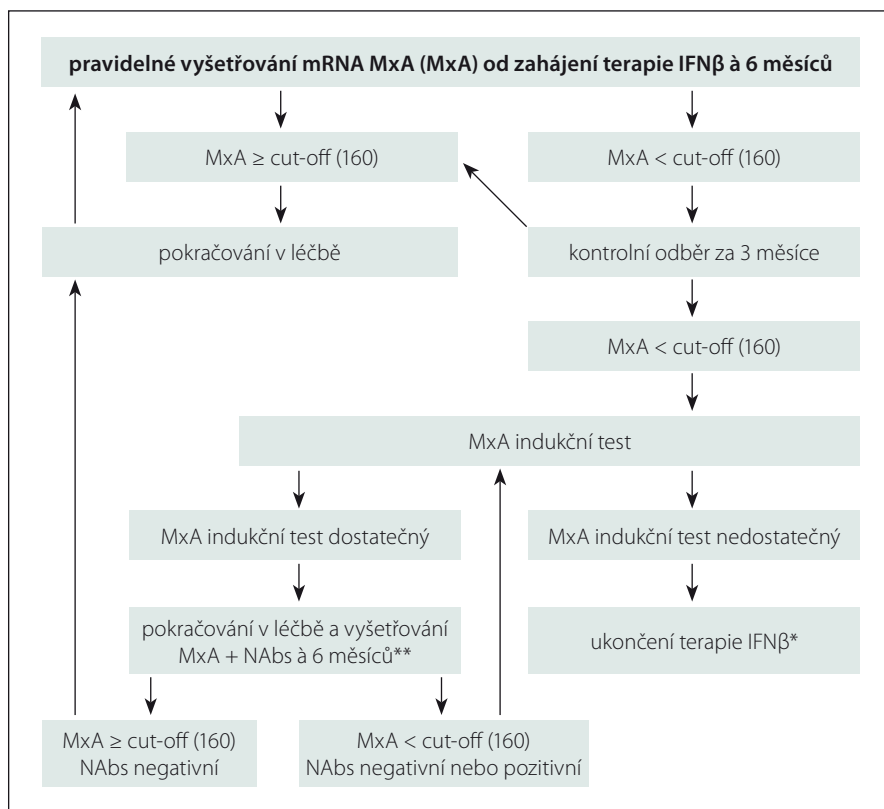


Schéma 1. Monitoring účinnosti IFN $\beta$  pomocí MxA a NAb v klinické praxi.

\*Je možné v tuto chvíli pátrat po příčině poklesu MxA a testovat přítomnost NAb, ale k rozhodnutí o ukončení terapie není tato informace nutná.

\*\*Situaci MxA  $\geq$  cut-off (160) a NAb pozitivní považujeme za nepravděpodobnou.

pacientů). Oba pacienti, u kterých se NAb poprvé objevily v 24. měsíci léčby, užívali IFN $\beta$ -1a s.c. Pacienti s jednorázovým výskytem NAb a pacienti s izolovaným poklesem MxA bez NAb byli léčeni různými přípravky (tab. 2).

### Výskyt NAb a pokles MxA v čase

V šesti případech z 15 (40 %), kdy se objevila NAb pozitivita i kleslo MxA, předcházel pokles MxA vzniku NAb pozitivity. U devíti pacientů kleslo MxA pod cut-off až při kontrole, kdy byl současně poprvé zaznamenán výskyt NAb. Situaci, že by NAb pozitivita předcházela poklesu MxA, jsme nezaznamenali.

U pacientů s přechodnou pozitivitou NAb a poklesem MxA (pokud k němu došlo) přetrvával pokles MxA i po normalizaci hladiny NAb, po celou dobu studie.

### MxA indukční test

Pokud byl u pacientů s trvalou pozitivitou NAb a poklesem MxA proveden MxA indukční test, byl vždy s nedostatečnou odpovědí. Byl-li ale proveden MxA indukční test u pacientů s přechodnou pozitivitou NAb,

reaktivita MxA (i přes pokles v předchozích vyšetření MxA) v něm byla pokaždé zachována. MxA indukční test u pacientů s poklesem MxA bez NAb pozitivity byl nedostatečný jen u dvou z nich – tyto pacienti byli posléze vyřazeni pro významnou progresi nálezu na MR, čtyři zbývající měli reaktivitu v indukčním testu zachovanou.

Uvedené spektrum hodnot MxA a NAb umožňuje z hlediska pravděpodobné účinnosti IFN $\beta$  rozdělit pacienty do následujících skupin:

1. Biologičtí respondenti jsou pacienti bez NAb, s hodnotou MxA nad cut-off hodnotou – 74 pacienti.
2. Pravděpodobní biologičtí respondenti definovaní jako:
  - a) pacienti s NAb pozitivitou, ale s dostatečným MxA indukčním testem – v našem souboru se jednalo o pět pacientů s přechodnou NAb pozitivitou, tři z nich měli sice MxA pod cut-off hodnotou, nicméně byl-li proveden MxA indukční test, reaktivita na IFN $\beta$  byla v normě;

b) pacienti s poklesem MxA bez NAb, ale s dostatečným MxA indukčním testem – čtyři pacienti.

3. Biologičtí nonrespondenti, mezi kterými lze opět odlišit dvě podkategorie:

a) NAb pozitivní pacienti s poklesem MxA a nedostatečným MxA indukčním testem – takových pacientů jsme zachytili 10 (ne u všech byl proveden MxA indukční test);

b) pacienti s opakovaným poklesem MxA a nedostatečným MxA indukčním testem, ale bez NAb – dva pacienti.

4. Pacienti, u nichž k výskytu NAb či poklesu MxA došlo poprvé při ukončení studie (měsíc 24), a k dynamice abnormit se proto není možné vyjádřit – čtyři pacienti.

### Klinický průběh

Do studie bylo zařazeno 54 pacientů s CIS, z nichž 51 (94 %) v průběhu následujících 24 měsíců konvertovalo do klinicky definiční RR RS dle klinické nebo MR aktivity.

U šesti pacientů, u nichž byla léčba IFN $\beta$  ukončena pro klinickou aktivitu (tab. 1), jsme nedetekovali NAb pozitivitu ani pokles MxA.

Pacienti s přítomnými NAb (NAb<sup>+</sup>) tvoří spolu s pacienty s poklesem MxA (MxA<sup>↓</sup>) skupinu, u kterých máme podezření na pokles účinnosti IFN $\beta$  (souhrnně v tab. 2). V průběhu našeho sledování se riziko rozvoje relapsu v této skupině ve srovnání s ostatními pacienty nelišilo (HR = 1,032 (95% CI 0,493–2,162; p = 0,933)).

U dvou pacientů byla léčba a sledování ukončeno pro aktivitu na MR. Jednalo se o pacienty s poklesem MxA i nedostatečnou reaktivitou v MxA indukčním testu.

Konfirmovanou EDSS progresi dosáhlo ve studii celkem 11 pacientů. Tři z nich patřili do skupiny pacientů NAb<sup>+</sup>/MxA<sup>↓</sup>, nárůst postižení vždy souvisel iniciálně s atakou. Ostatních osm pacientů s konfirmovanou progresí EDSS mělo hladinu MxA nad cut-off a NAb u nich byly negativní.

Ukončení léčby IFN $\beta$  u NAb pozitivních pacientů vycházelo z doporučení skupiny expertů Evropské federace neurologických společností (EFNS) [10], nověji konzorcia odborníků sdružených v rámci NABINMS (Neutralising AntiBodies on Interferon beta in Multiple Sclerosis) [5] a z rozhodnutí ošetřujícího lékaře. Nebylo závislé na klinické aktivitě onemocnění pacienta – léčba IFN $\beta$  byla ukončena u šesti NAb pozitivních pacientů. Pacienti byli dále sledováni.



Z důvodu izolovaného poklesu pouze hodnoty MxA (bez NAbů pozitivita) nebyla léčba při současné klinické a MR stabilizaci ukončena u žádného z pacientů.

## Diskuze

Prokázali jsme, že kromě pacientů, kteří na léčbě IFN $\beta$  selhávají z důvodu aktivity onemocnění, může být pokles účinnosti IFN $\beta$  způsoben různými patofyziologickými mechanismy – u části pacientů tvorbou NAbů, v jiných případech ale mechanismy na NAbů nezávislými.

MxA odráží biologickou odpověď na léčbu IFN $\beta$ , jeho hladina po zahájení terapie významně stoupá a při účinné léčbě se po celou dobu sledování udržuje nad cut-off hodnotou. U jednotlivých pacientů však může hladina MxA nárazově kolísat. Interkurtní, i subklinicky probíhající infekce způsobí nárůst hodnot mRNA MxA [11], naopak nesprávná aplikace, nedostatečná compliance, nebo přechodná saturace receptoru při aplikaci několikrát týdně (IFN $\beta$ -1a s.c., IFN $\beta$ -1b s.c.) mohou způsobit jednorázový pokles MxA pod cut-off hodnotu [12,13].

Nejčastější příčinou trvalého poklesu MxA je tvorba NAbů. V našem souboru se NAbů trvale vyskytly v 10 % případů, což je v souladu s literárními údaji [3]. Zachyceny byly v průběhu celé studie, nejčastěji v měsíci 12 (šest pacientů) a 18 (tři pacienti). V literatuře se udává možnost jejich vzniku od 6. do 24. měsíce po zahájení terapie IFN $\beta$  [2]. I v rámci našeho sledování jsme zachytili pacienty, u kterých byla pozitivita NAbů detekována poprvé až ve 24. měsíci léčby.

U šesti pacientů s pozitivitou NAbů předcházel jejich detekci pokles MxA pod cut-off (tab. 2). Situaci, kdy by se nejprve izolovaně objevily NAbů a teprve poté kleslo MxA pod cut-off, jsme nezachytili. Jistě to ale neznamená, že k takovému vývoji nemůže dojít. NAbů jsou nepřímým markerem účinnosti a jejich přítomnost svědčí pouze o možnosti inaktivace IFN $\beta$ . U některých pacientů vede NAbů pozitivita k významnému poklesu aktivity IFN $\beta$ , zatímco u jiných může při srovnatelných (zejména při pouze mírně zvýšených) titrech zůstávat IFN $\beta$  ještě dostatečně účinný [6]. U dvou pacientů s jednorázovou pozitivitou NAbů (titry 20 a 67 TRU/ml) zůstal MxA nad cut-off (336 a 836). Souhrnně při NAbů v titru 20–100 TRU/ml kleslo v našem souboru MxA pod cut-off v 85 % případů, při titru > 100 TRU/ml ve 100 %.

Pokud MxA klesá pod cut-off opakovaně, je doporučováno provedení MxA indukčního testu.

U všech našich pacientů s trvalou pozitivitou NAbů a poklesem MxA pod cut-off potvrdil následně provedený MxA indukční test ztrátu účinnosti IFN $\beta$ . Jeho doplnění je tedy v takových případech možné, ale s ohledem na rozhodnutí o dalším postupu nepřínosné. Naopak v případě jen přechodného výskytu NAbů pozitivita doprovázené poklesem MxA a zejména pak v případě izolovaného poklesu MxA bylo provedení indukčního testu zásadní. V klinické praxi by provedení MxA indukčního testu mělo předcházet vyšetření NAbů (schéma 1). Pokud prokáže indukční test zachovanou reaktivitu na IFN $\beta$ , je možné v léčbě pokračovat. To byl i případ všech našich pacientů s jednorázovou pozitivitou NAbů.

Pokud je reaktivita v indukčním testu nedostatečná, je indikována změna terapie. Ze šesti pacientů s izolovaným poklesem MxA v našem souboru byl MxA indukční test nedostatečný u dvou z nich. V průběhu sledování jsme NAbů u těchto pacientů nezachytili a vzhledem k následné progresi na MR (plus  $\geq$  2 nová ložiska/rok) byli pacienti převedeni na jinou medikaci. Je možné spekulovat, zda by se u těchto pacientů NAbů pozitivita objevila později.

Riziko vzniku relapsu ve skupině pacientů s podezřením na pokles účinnosti IFN $\beta$  (tab. 2) bylo srovnatelné s rizikem pacientů bez NAbů a s hladinou MxA nad cut-off. Výhodou laboratorní detekce pacientů s podezřením na ztrátu účinnosti IFN $\beta$  je ale právě časový předstih, a tedy možnost optimalizovat terapii, dříve než dojde k reálnému klinickému zhoršení [3]. K ověření této skutečnosti by bylo nutné sledovací období delší než 24 měsíců [14].

V klinické praxi lze na základě našich výsledků doporučit u všech pacientů monitoring účinnosti IFN $\beta$  pomocí mRNA MxA vzhledem k jednoduchosti jeho stanovení, rychlosti získávání výsledků a jejich snadné interpretaci. Sledováním hodnot MxA zachytíme situace, kdy je za ztrátu účinnosti odpovědná tvorba NAbů. Můžeme ale navíc zachytit i ztrátu účinnosti v případech, kdy NAbů nevznikají. Důležité je, že jednorázový pokles MxA nelze považovat za průkaz ztráty účinnosti léčby IFN $\beta$ , a vyšetření je nutné v takovém případě opakovat a doplnit indukčním testem (schéma 1).

MxA se stává hlavním laboratorním ukazatelem účinnosti IFN $\beta$ , vyšetření NAbů ho může významně doplnit. Vzhledem k tomu, že jsme v našem souboru zachytili pokles MxA (doprovázený vznikem NAbů) až na konci sledovacího období, bylo by v klinické praxi vhodné prodloužit sledování účinnosti léčby IFN $\beta$  na období delší než 24 měsíců.

## Literatura

- Loleit V, Biberacher V, Hemmer B. Current and future therapies targeting the immune system in multiple sclerosis. *Curr Pharm Biotechnol* 2014;15(3):276–96.
- Hesse D, Sorensen PS. Using measurements of neutralizing antibodies: the challenge of IFN-beta therapy. *Eur J Neurol* 2007;14(8):850–9.
- Bertolotto A, Granieri L, Marnetto F, et al. Biological monitoring of IFN- $\beta$  therapy in multiple sclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015;26(2):241–8. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.12.002.
- Malucchi S, Gili F, Caldano M, et al. Predictive markers for response to interferon therapy in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2008;70(13):1119–27. doi: 10.1212/01.wnl.0000304040.29080.7b.
- Polman CH, Bertolotto A, Deisenhammer F, et al. Recommendations for clinical use of data on neutralizing antibodies to interferon- $\beta$  therapy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2010;9(7):740–50. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70103-4.
- Libertínová J, Meluzínová E, Maťoška V, et al. Neutralizační protilátky a Myxovirus resistance protein A při sledování biologické účinnosti interferonu  $\beta$ . *Cesk Slov Neurol N* 2014;77(110(5)):3638–41.
- Polman CH, Reingold S, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69(2):292–302. doi: 10.1002/ana.22366.
- Libertínová J, Kumstýřová T, Meluzínová E, et al. mRNA MxA jako marker biologické účinnosti léčby interferonem- $\beta$  u pacientů s RS v ČR. *Cesk Slov Neurol N* 2009;72/105(Suppl 2):S120.
- Voort van der LF, Kok A, Visser A, et al. Interferon- $\beta$  bioactivity measurement in multiple sclerosis: feasibility for routine clinical practice. *Mult Scler* 2009;15(2):212–8. doi: 10.1177/1352458508096877.
- Sorensen PS, Deisenhammer F, Duda P, et al. Guidelines on use of anti-IFN- $\beta$  antibody measurements in multiple sclerosis: report of an EFNS Task Force on IFN- $\beta$  antibodies in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2005;12(11):817–27.
- Roers A, Hochkeppel HK, Horisberger MA, et al. MxA gene expression after live virus vaccination: a sensitive marker for endogenous type I interferon. *J Infect Dis* 1994;4(4):807–813.
- Bertolotto A, Sala A, Malucchi S, et al. Biological activity of interferon betas in patients with multiple sclerosis is affected by treatment regimen and neutralising antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75(9):1294–9.
- Serana F, Imberti L, Amato MP, et al. MxA mRNA quantification and disability progression in interferon beta-treated multiple sclerosis patients. *PLoS One*. 2014;9(4):e94794. doi: 10.1371/journal.pone.0094794.
- Voort van der LF, Visser A, Knol DL, et al. Lack of interferon-beta bioactivity is associated with the occurrence of relapses in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2009;16(9):1049–52. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02649.x.