مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۰۷/هفته اول آذرماه ۱۳۹۱
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۲

طراحی روش ELISA برای اندازه‌گیری فراوانی آنتی‌بادی‌های سرمی ضد اینترفرون بتا در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروز تحت درمان با CinnoVex

نسرین زارع[۱]، دکتر سید حمید زرکش اصفهانی[۲]، دکتر وحید شایگان‌نژاد[۳]، دکتر مرجان قراگوزلو[۴]

چکیده

مقدمه: اینترفرون بتا (IFN-β یا Interferon beta) اولین داروی تأیید شده برای درمان مولتیپل اسکلروز (MS یا Multiple sclerosis) است. برخی از بیماران مبتلا به MS تحت درمان با IFN-β در برابر این دارو آنتی‌بادی ایجاد می‌کنند. آنتی‌بادی‌های ضد IFN-β می‌توانند کارایی بالینی و فعالیت زیستی آن را کاهش دهند. هدف از این مطالعه، طراحی روش ELISA برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های سرمی ضد اینترفرون در بیماران مبتلا به MS تحت درمان با CinnoVex (شکل تجاری IFN-β-1a) بود.

روش‌ها: برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های ضد IFN-β یک روش ELISA طراحی گردید. نمونه‌های سرم ۴۰ فرد سالم و ۴۲ بیمار مبتلا به MS تحت درمان با CinnoVex که حداقل شش ماه دارو دریافت کرده بودند، برای حضور آنتی‌بادی بررسی شد.

یافته‌ها: بیمارانی برای آنتی‌بادی ضد IFN-β مثبت در نظر گرفته شدند که جذب نوری (OD یا Optical density) آن‌ها در تست ELISA بالاتر از ۱/۲ بود. آنتی‌بادی ضد IFN-β در ۱۳ بیمار مبتلا به MS که تحت درمان با CinnoVex بودند، وجود داشت.

نتیجه‌گیری: روش ELISA یک روش سریع و ارزان برای سنجش آنتی‌بادی ضد IFN-β در بیماران مبتلا به MS است. آنتی‌بادی ضد IFN-β در ۳۱/۱ درصد از بیماران مبتلا به MS که تحت درمان با CinnoVex هستند، تولید می‌شود.

واژگان کلیدی: مولتیپل اسکلروز، CinnoVex، آنتی‌بادی‌های ضد اینترفرون، ELISA

مقدمه

مولتیپل اسکلروز (MS یا Multiple sclerosis) یک بیماری التهابی مزمن سیستم اعصاب مرکزی است که به طور معمول در دهه‌ی دوم و سوم زندگی ایجاد می‌شود و در زنان شیوع بالایی دارد. عامل این بیماری به طور کامل شناخته نشده است، هر چند مواردی مانند وراثت، عوامل محیطی و حتی عفونت‌های ویروسی را می‌توان به عنوان علل زمینه‌ساز این بیماری معرفی نمود (۳-۱). اینترفرون بتا (IFN-β یا Interferon beta) از اولین داروها با اثرات سودمند برای MS است که باعث کاهش عود و تعداد پلاک‌ها می‌گردد (۴).

دو نوع محصول نوترکیب اینترفرون بتا شامل IFN-β-1b و IFN-β-1a وجود دارد. محصولات نوترکیب اینترفرون بتا، ایمنوژنسیته‌ی متفاوتی دارند. IFN-β-1a یک زنجیره‌ی پلی‌پپتیدی گلیکوزیله‌ی ۱۶۶ اسید آمینه‌ای با وزن مولکولی ۲۳ کیلودالتون است که توالی اسید آمینه‌ی مشابه با اینترفرون بتا طبیعی دارد و توسط رده‌ی سلولی پستانداران تولید می‌شود. در حالی که IFN-β-1b یک زنجیره‌ی پلی‌پپتیدی غیر گلیکوزیله‌ی ۱۶۵ اسید آمینه‌ای با وزن مولکولی

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] دانشیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و گروه بیولوژی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] دانشیار، گروه داخلی اعصاب، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۴] استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سید حمید زرکش اصفهانی
Email: s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk

۱۸/۵ کیلودالتون است که توسط باکتری اشرشیا کلی تولید می‌شود. همچنین در این فرآورده یک سرین به جای سیستئین ۱۷ جایگزین شده است و متیونین ۱ حذف شده است. از طرفی در یک دوز واحد IFN-β-1b در مقایسه با IFN-β-1a حدود ۱۰ برابر پروتئین بیشتر برای رسیدن به سطح فعالیت اختصاصی مناسب وجود دارد که ممکن است آنتی‌ژنسیته‌ی IFN-β-1b را افزایش دهد. هر چند خصوصیات ساختاری در دو اینترفرون متفاوت است، اما به گیرنده‌ی مشابهی متصل می‌شوند و به نظر می‌رسد هر دو فعالیت زیستی مشابهی را اعمال می‌کنند و باعث کاهش سرعت عود بیماری و پیشرفت آن می‌شوند (۵–۷).

IFN-β-1b یا Betaferon (Schering AG, Berlin, Germany) یک روز در میان به میزان ۲۵۰ میکروگرم به روش زیر جلدی تجویز می‌شود. IFN-β-1a به اشکال تجاری Rebif (Serono International, Geneva, Switzerland)، Avonex (Biogen Idec, Canada) و یا CinnoVex (سیناژن، ایران) در دسترس بیماران می‌باشد. CinnoVex داروی مشابه (Biosimilar) Avonex است که در شرکت سیناژن ایران ساخته می‌شود. Avonex و CinnoVex به روش داخل عضلانی هفته‌ای یک بار به میزان ۳۰ میکروگرم تزریق می‌شوند. Rebif به روش زیر جلدی سه بار در هفته به میزان ۲۲ یا ۴۴ میکروگرم تزریق می‌گردد (۸).

زمانی که پروتئین‌های درمانی مثل IFN-β، هورمون رشد، انسولین و غیره تجویز می‌شوند، سیستم ایمنی بیمار ممکن است یک پاسخ ایمنی در برابر پروتئین ایجاد کند. این پاسخ ایمنی ناشی از شناخت پروتئین به عنوان بیگانه و شکست تحمل ایمنی است. آنتی‌بادی‌های ایجاد شده در برابر پروتئین‌های درمانی مانند IFN-β بر اساس اثرشان روی فعالیت زیستی عامل هدف طبقه‌بندی می‌شوند که شامل آنتی‌بادی‌های اتصالی (BAbs یا Bindings antibodies) یا غیر خنثی‌کننده و آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده (Neutralizing antibodies یا NAbs) هستند (۱۰–۹).

NAbs زیر گروهی از BAbs هستند که ممکن است نیمه عمر گردشی اینترفرون بتا را تغییر دهند یا از نظر فضایی مانع اتصال IFN-β به گیرنده‌ی خود بر روی سلول‌های هدف شوند و یا تغییراتی را در شکل فضایی IFN-β ایجاد کنند که خصوصیات اتصالی یا سیگنال‌دهی را تغییر دهند (۱۱، ۹). NAbs فعالیت زیستی IFN-β را کاهش می‌دهد و باعث افزایش عود بیماری، تعداد پلاک‌های بیشتر در MRI (Magnetic resonance imaging)، بدتر شدن بیماری و افزایش ناتوانی‌ها می‌گردد (۱۳–۱۲، ۱۰).

کنترل وضعیت تولید آنتی‌بادی در طول درمان با IFN-β شاخص خوبی جهت ارزیابی موفقیت درمان می‌باشد؛ چرا که BAbs و NAbs به طور معمول ۳ تا ۶ ماه بعد از شروع درمان ایجاد می‌شوند. اما اثرات بالینی BAbs و NAbs پس از ۱۸ ماه از شروع درمان ظاهر می‌گردند. بنابراین به کارگیری یک آزمون مناسب جهت ارزیابی میزان فعالیت زیستی و اثر درمانی IFN-β پس از چند ماه از شروع درمان ضروری به نظر می‌رسد تا از این طریق پزشک قادر به گرفتن تصمیم صحیح در ارتباط با ادامه‌ی درمان یا استفاده از راهکارهای درمانی دیگر باشد. بدین صورت از ادامه‌ی درمان پر هزینه که بدون ایجاد هر گونه بهبودی در بیمار سبب زیان‌های اقتصادی و روحی–روانی به خانواده‌ها می‌گردد، جلوگیری به عمل خواهد

www.mui.ac.ir

آمد و همچنین پزشک روش درمان مناسبی را جایگزین می‌نماید تا روند درمان دچار وقفه نشود (۱۴).

از آن جایی که روش تشخیص NAbs پیچیده و پر زحمت است بسیاری از آزمایشگاه‌ها از آزمون اتصالی ساده (Binding assay) جهت غربالگری استفاده می‌کنند و تنها نمونه‌های BAbs مثبت توسط آزمون NAbs بررسی می‌شوند. تست‌های تشخیصی برای BAbs شامل ELISA، Western blot (WB)، Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) و Affinity chromatography هستند که از این تست‌ها، ELISA مرسوم‌تر است (۵).

از آن جا که تکنیک ELISA به طور مستقیم همه‌ی آنتی‌بادی‌های علیه IFN-β را شناسایی می‌کند، بنابراین یک نتیجه‌ی مثبت به طور قطع نشان دهنده‌ی حضور و پیش‌بینی‌کننده‌ی تولید NAbs نیست و اگر سرم یک بیمار پس از انجام ELISA یک نتیجه‌ی منفی داد، ضرورت انجام یک آزمون پیچیده‌تر و زمان‌بر برای آشکارسازی NAbs منتفی می‌گردد (۱۵).

تاکنون تحقیقات زیادی در ارتباط با تولید آنتی‌بادی‌ها علیه انواع فراورده‌های تجاری IFN-β شامل Avonex، Rebif و Betaferon، که امروزه به طور رایج در جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند، انجام گرفته است که نتایج آن در دسترس می‌باشد، اما در مورد فراورده‌ی جدید کشور ایران یعنی داروی CinnoVex که افراد زیادی در ایران تحت درمان با آن قرار دارند اطلاعاتی موجود نیست. به همین دلیل با توجه به تولید داخلی این محصول انجام مطالعات بالینی در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه هدف طراحی روش ELISA برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های سرمی ضد IFN-β در بیماران مبتلا به MS تحت درمان با CinnoVex و تعیین فراوانی بیماران دارای آنتی‌بادی بود.

روش‌ها

این مطالعه در سال‌های ۹۰-۱۳۸۹ طراحی و اجرا گردید. جمعیت مورد مطالعه بیماران مبتلا به MS عودکننده- بهبودیابنده (Relapsing-remitting MS یا RRMS) بودند که برای حداقل ۶ ماه تحت درمان با CinnoVex قرار داشتند. این بیماران پس از مراجعه به کلینیک MS بیمارستان کاشانی انتخاب و با رضایت کامل وارد مطالعه شدند. بیماران مبتلا به MS درمان شده با سایر داروها شامل سرکوبگر ایمنی و همچنین بیمارانی که پیش از این IFN-β دریافت کرده بودند و درمان آن‌ها قطع شده بود از مطالعه حذف شدند.

لازم به ذکر است تشخیص MS و نوع آن (RRMS) بر اساس معیارهای مک دونالد (McDonald's criteria) توسط یک پزشک متخصص مغز و اعصاب صورت گرفت (۱۶).

از هر بیمار ۵ سی‌سی خون جمع‌آوری شد. سرم جداسازی شده در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد.

هر چاهک میکروپلیت ته صاف ۹۶ تایی (Nulgen, Denmark) با ۱ میکروگرم از CinnoVex در ۱۰۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات سالین (PBS یا Phosphate buffered saline) پوشیده شد و در طول شب در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید.

بعد از خالی کردن محلول فوق، پلیت‌ها ۶ بار با بافر شستشو (بافر فسفات سالین حاوی ۰/۰۵ درصد Tween ۲۰) به مقدار ۳۰۰ میکرولیتر در هر چاهک شسته شدند و با کاغذ جاذب رطوبت‌گیری گردیدند.

www.mui.ac.ir

پلیت‌ها با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر بافر بلاکینگ [فسفات سالین حاوی ۵ درصد سرم آلبومین گاوی (BSA یا Bovine serum albumin)] به هر چاهک بلوکه شدند. سپس پلیت‌ها ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد و یا در طول شب در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. پس از آن پلیت‌ها با بافر شستشو شسته و با کاغذ جاذب رطوبت‌گیری شدند. هر نمونه‌ی سرم در رقت‌های ۱ به ۱۰، ۱ به ۵۰، ۱ به ۱۰۰، ۱ به ۱۰۰۰ و یا ۱ به ۱۰۰۰۰ در حجم ۱۰۰ میکرولیتر بافر انکوباسیون BSA به صورت دوتایی به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید.

پس از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی اختصاصی ضد آنتی‌بادی‌های انسانی کونژوکه شده با آنزیم پراکسیداز (Horseradish peroxidase (conjugated antihuman IgG (Serotec, Germany) با رقت ۱ به ۵۰۰۰، ۱ به ۸۰۰۰ و ۱ به ۱۰۰۰۰ در ۰/۲ درصد BSA در PBS به تمامی چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۶۰ تا ۹۰ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. به طور مجدد پلیت با بافر شستشو شسته شد و با کاغذ جاذب رطوبت‌گیری شد.

۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای اختصاصی آنزیم TMB (Tetramethylbenzidine; Cyto Matin Gene, Iran) به هر چاهک افزود شد. پلیت‌ها برای ۱۰ دقیقه در تاریکی در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند. واکنش با ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده‌ی واکنش (اسید سولفوریک یک نرمال)، برای ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه و متوقف گردید. جذب نوری پلیت‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با ELISA reader (Hyperion, USA) خوانده شد.

برخی چاهک‌ها با BSA ۵ درصد، CinnoVex و BSA-CinnoVex برای بررسی اتصالات غیر اختصاصی آنتی‌بادی ثانویه با این ترکیبات پوشیده شد و در طول شب در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند.

همچنین تعدادی از چاهک‌ها با سرم، سرم-BSA، آنتی‌بادی اختصاصی ضد آنتی‌بادی‌های انسانی کونژوکه شده با آنزیم پراکسیداز (آنتی‌بادی ثانویه) و آنتی‌بادی ثانویه-BSA پوشیده شدند و در طول شب در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. این چاهک‌ها برای بررسی صحت عملکرد آنتی‌بادی ثانویه و این که آنزیم از آنتی‌بادی ثانویه جدا نشده، استفاده شدند. میزان آنتی‌بادی بر علیه این چاهک‌ها با روش ELISA اندازه‌گیری شد (جدول ۱).

جدول ۱. جذب نوری نمونه‌های شاهد

نمونه‌های شاهد	جذب نوری (OD)
آنتی‌بادی	۱/۲۱-۲/۴۰
آنتی‌بادی و سرم آلبومین گاوی	۱/۰۳-۲/۳۰
سرم آلبومین گاوی	۰/۷۸
سرم	۱/۲۹
سرم و سرم آلبومین گاوی	۱/۲۰
چاهک‌های خالی	۰/۲۶
CinnoVex	۰/۸۲-۱
سرم آلبومین گاوی و CinnoVex	۰/۷۹-۰/۹۰

OD: Optical density

پس از تکمیل فرم‌های ثبت اطلاعات بیماران، داده‌ها با استفاده از آزمون‌های Student-t و به کمک نرم‌افزار آماری SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) آنالیز شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۴۲ بیمار مبتلا به RRMS و ۴۰ فرد شاهد

مورد بررسی قرار گرفتند. جدول ۲ خصوصیات بالینی و دموگرافیک افراد مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

جدول ۲. خصوصیات بالینی و دموگرافیک بیماران و افراد شاهد

خصوصیات	گروه شاهد	گروه بیماران
تعداد زنان	۲۶	۳۴
تعداد مردان	۱۴	۸
سن (سال) *	۲۹/۵	۳۲/۲۴ (۱۴-۴۸)
EDSS*	-	۱/۲ (۰-۳)
طول دوره‌ی درمان (ماه) *	-	۳۳/۳۸ (۶-۹۶)

EDSS: Expanded disability status scale

*: میانگین (محدوده)

در این مطالعه برای طراحی روش ELISA مناسب راهکارهایی به منظور کاهش رنگ زمینه‌ای به کار برده شد. اولین راهکاری که برای کاهش رنگ زمینه‌ای به کار برده شد، افزایش تعداد دفعات و مدت زمان شستشو تا ۶ مرتبه بود و همچنین در آخرین مرحله‌ی شستشو، بعد از ریختن بافر شستشو اجازه دادیم این بافر به مدت ۵ دقیقه در پلیت باقی بماند، سپس آن را خالی کردیم. راهکار دیگر برای کاهش رنگ زمینه، کم کردن مدت زمان انکوباسیون در مرحله‌ی افزودن سرم (آنتی‌بادی اولیه) و همچنین مرحله‌ی افزودن آنتی‌بادی ثانویه بود، به این صورت که کاهش مدت زمان از ۹۰ به ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کاهش رنگ زمینه‌ای بهتری را به دنبال داشت.

طبق پروتکل توضیح داده شده زمانی که پلیت‌ها با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر بافر بلاکینگ در مدت زمان ۲ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و یا در طول شب در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد بلوکه شدند، مشاهده شد که بلاکینگ پلیت‌ها در طول شب در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به جای ۲ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کاهش بیشتری در رنگ زمینه‌ای به همراه خواهد داشت.

فریز کردن و آب کردن مرتب نمونه‌ها ممکن بود باعث کاهش فعالیت آنتی‌بادی‌ها شود. بنابراین نمونه‌های سرمی به صورت مقادیر کوچک درآورده شد. از طرفی برای هر بار انجام آزمایش بافر تازه تهیه شد.

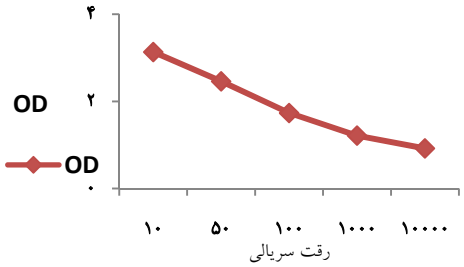
نمونه‌های سرم با رقت‌های ۱ به ۱۰ تا ۱ به ۱۰۰۰۰ با حجم ۱۰۰ میکرولیتر تهیه شدند و در مرحله‌ی آخر میزان جذب نوری با کمک دستگاه ELISA ثبت گردید (شکل ۱).

الف

رقت‌های سریالی	۱:۱۰	۱:۵۰	۱:۱۰۰	۱:۱۰۰۰	۱:۱۰۰۰۰
OD	۳/۱۳۴	۲/۴۶	۱/۷۳۴	۱/۲۱۵	۰/۹۲۱

OD: Optical density

ب



شکل ۱. میزان جذب نوری بر حسب رقت‌های مختلف آنتی‌بادی ضد اینترفرون.

الف) جدول مربوط به سریال رقت‌های مختلف سرم و میزان جذب نوری مربوط به هر رقت

ب) دیاگرام مربوط به سریال رقت‌های مختلف سرم و میزان جذب نوری مربوط به هر رقت

www.mui.ac.ir

رقت مناسب برای اضافه کردن سرم که حداقل رنگ زمینه‌ای را ایجاد کرد و اکثر نمونه‌ها را پوشش داد، رقت ۱ به ۵۰ بود. همچنین برای رقیق‌سازی سرم به جای استفاده از بافر فسفات سالین از فسفات سالین حاوی ۵ درصد سرم آلبومین گاوی استفاده شد. در آخر، رقت مناسب برای آنتی‌بادی ثانویه‌ی ضد آنتی‌بادی‌های انسانی کونژوکه شده با آنزیم پراکسیداز که حداقل رنگ زمینه‌ای را ایجاد کرد، رقت ۱ به ۸۰۰۰ بود.

جذب نوری پلیت‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر برای هر یک نمونه‌های بیمار و شاهد مورد بررسی در جدول ۳ نشان داده شده است.

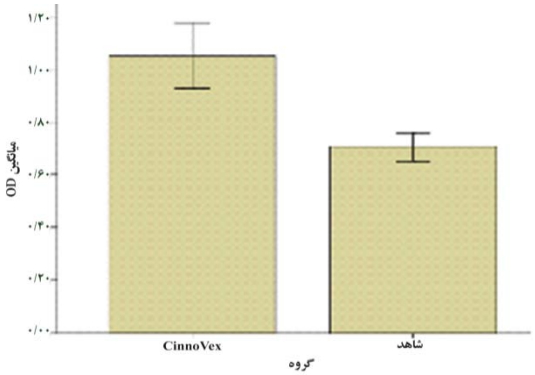
جذب نوری (OD یا Optical density) در چاهک‌های دوتایی (Duplicate) برای نمونه‌های شاهد و بیماران میانگین گرفته شد. میانگین جذب برای CinnoVex ۱/۰۴ و برای گروه شاهد ۰/۷ بود. برای تعیین Cut off، میانگین جذب برای افراد شاهد به اضافه ۳ انحراف معیار (۰/۱۷) در نظر گرفته شد (۱/۲۱ = (۰/۱۷) ۳ + ۰/۷). بنابراین بیمارانی که جذب نوری بالاتر از ۱/۲۱ داشتند، به عنوان موارد مثبت از نظر حضور آنتی‌بادی ضد IFN-β در نظر گرفته شدند (شکل ۲).

جدول ۳. جذب نوری (OD) آنتی‌بادی ضد IFN-β در بیماران و افراد شاهد

شماره‌ی فرد بیمار	OD	شماره‌ی فرد بیمار	OD	شماره‌ی فرد سالم	OD	شماره‌ی فرد سالم	OD
۱	۰/۶۸	۲۲	*۱/۴۰	۱	۰/۵۶	۲۲	۰/۷۱
۲	۰/۴۵	۲۳	۰/۸۷	۲	۰/۵۱	۲۳	۰/۷۳
۳	۰/۷۰	۲۴	۰/۶۴	۳	۰/۵۳	۲۴	۰/۷۵
۴	*۱/۳۰	۲۵	۰/۷۲	۴	۰/۴۸	۲۵	۰/۷۲
۵	۱/۱۰	۲۶	*۱/۲۱	۵	۰/۵۴	۲۶	۰/۶۰
۶	۰/۷۶	۲۷	۱/۰۶	۶	۰/۶۰	۲۷	۰/۹۰
۷	*۱/۵۰	۲۸	*۱/۹۴	۷	۰/۵۷	۲۸	۱/۰۶
۸	*۱/۷۵	۲۹	۱/۳۰	۸	۰/۶۱	۲۹	۰/۷۸
۹	۰/۹۶	۳۰	*۱/۳۵	۹	۰/۶۲	۳۰	۰/۶۵
۱۰	۱/۲۰	۳۱	۱/۱۲	۱۰	۰/۸۲	۳۱	۰/۶۹
۱۱	۰/۶۳	۳۲	۰/۶۰	۱۱	۰/۶۸	۳۲	۰/۶۷
۱۲	۰/۵۲	۳۳	۰/۷۲	۱۲	۰/۹۴	۳۳	۰/۷۲
۱۳	۰/۶۹	۳۴	۱/۱۰	۱۳	۰/۵۹	۳۴	۱/۲۵
۱۴	۰/۷۸	۳۵	۰/۸۹	۱۴	۰/۸۸	۳۵	۰/۵۰
۱۵	۰/۸۰	۳۶	۰/۹۰	۱۵	۰/۵۷	۳۶	۰/۶۰
۱۶	*۱/۷۵	۳۷	*۱/۲۳	۱۶	۰/۵۶	۳۷	۰/۵۵
۱۷	۰/۹۴	۳۸	۰/۸۲	۱۷	۰/۹۲	۳۸	۰/۷۴
۱۸	۰/۵۴	۳۹	۰/۶۶	۱۸	۱/۰۱	۳۹	۰/۶۸
۱۹	۱/۰۵	۴۰	*۱/۷۲	۱۹	۰/۹۸	۴۰	۰/۶۵
۲۰	۱/۱۵	۴۱	۰/۹۰	۲۰	۰/۶۲		
۲۱	*۱/۹۵	۴۲	*۱/۷۵	۲۱	۰/۶۱		

*: افرادی که OD > ۱/۲ داشتند یا افراد BAbs مثبت OD: Optical density IFN-β: Interferon beta

www.mui.ac.ir



شکل ۲. مقایسه‌ی میانگین OD (Optical density) گروه شاهد و گروه بیماران. میانگین جذب برای CinnoVex ۱/۰۴ بود. بیمارانی که جذب نوری بالاتر از ۱/۲ داشتند به عنوان موارد مثبت از نظر حضور آنتی‌بادی ضد IFN-β (Interferon beta) در نظر گرفته می‌شوند. بر اساس آزمون Student-t تفاوت دو گروه معنی‌دار بود (P < ۰/۰۰۱).

از ۴۲ مبتلا MS تحت درمان با CinnoVex، ۱۳ نفر (۳۱ درصد) جذب نوری بالاتر از ۱/۲۱ داشتند.

جهت بررسی تکرارپذیری و تغییرپذیری، تست ELISA برای همه‌ی نمونه‌ها به صورت دوتایی در هر پلیت انجام شد و برای ۱۰ نمونه در سه روز مختلف تکرار گشت. نتایج نشان داد که تغییر چندانی در میزان جذب نوری نمونه‌ها با تکرار آزمایش مشاهده نمی‌شود (جدول ۴).

چاهک‌های پوشیده شده با سرم آلبومین گاوی (BSA) ۵ درصد، CinnoVex و BSA-CinnoVex هیچ گونه اتصالات غیر اختصاصی با آنتی‌بادی ثانویه نشان ندادند.

همچنین چاهک‌های پوشیده شده با سرم، سرم-BSA، آنتی‌بادی اختصاصی ضد آنتی‌بادی‌های انسانی کونژوکه شده با آنزیم پراکسیداز (آنتی‌بادی ثانویه) و آنتی‌بادی ثانویه-BSA نشان دادند، آنتی‌بادی ثانویه به خوبی عمل می‌کند و آنزیم از آنتی‌بادی ثانویه جدا نشده بود و نتایج حاصل از آزمایش مثبت کاذب نبودند.

بحث

تست‌های تشخیص NAbs بسیار گران، وقت‌گیر و روش انجام آن‌ها بسیار سخت هستند و همچنین از این تست‌ها نمی‌توان برای غربالگری استفاده کرد (۱۸-۱۷). از آن جایی که تست‌هایی که برای تشخیص BAbs استفاده می‌شود، ارزان‌تر و سریع‌تر هستند، بهتر است در ابتدا برای غربالگری استفاده شوند (۱۹). بنابراین از روش Indirect ELISA برای بررسی آنتی‌بادی ضد IFN-β در سرم بیماران مبتلا MS تحت درمان با CinnoVex استفاده شد.

جدول ۴. نتایج حاصل از تکرار آزمایش ELISA بر روی نمونه‌ها

شماره‌ی بیمار	جذب نوری تکرار اول	جذب نوری تکرار دوم	جذب نوری تکرار سوم
۲	۰/۵۷	۰/۵۴	۰/۶۰
۵	۱/۲۰	۱/۰۸	۱/۰۵
۶	۰/۶۰	۰/۵۸	۰/۵۹
۱۱	۰/۶۰	۰/۵۴	۰/۵۰
۱۲	۰/۴۸	۰/۴۷	۰/۴۹
۱۸	۰/۵۴	۰/۵۰	۰/۵۵
۳۳	۰/۹۲	۰/۹۷	۰/۹۵
۳۲	۰/۴۲	۰/۴۲	۰/۴۳
۳۵	۰/۶۵	۰/۵۲	۰/۶۰
۳۶	۰/۷۷	۰/۶۸	۰/۷۰

هر آنتی‌بادی که به IFN-β متصل می‌شود می‌تواند منجر به پاک‌سازی دارو از گردش و کاهش Bioavailability دارو شود و در نتیجه مانع از بر هم‌کنش دارو با گیرنده‌اش شود. از طرف دیگر، ممکن است با تشکیل کمپلکس‌های ایمنی باعث آسیب به بافت‌ها بشوند (۲۰).

در این مطالعه برای اولین بار ایمنوژنیسیته‌ی CinnoVex توسط روش ELISA بررسی شد. آنتی‌بادی ضد IFN-β در ۳۱ درصد بیماران مبتلا MS تحت درمان با CinnoVex پیدا شد و در سرم هیچ کدام از افراد شاهد آنتی‌بادی ضد IFN-β یافت نشد.

در مطالعات قبلی فراوانی BAbs برای بیماران مبتلا MS تحت درمان با Avonex، Rebif و Betaferon به ترتیب در محدوده‌ی ۳۰-۵، ۴۵-۲۵ و ۸۰-۵۰ درصد بوده است (۲۴-۲۱).

با وجود این که CinnoVex، داروی مشابه (Biosimilar)، Avonex است اما ۳۱ درصد نمونه‌های BAbs مثبت در گروه CinnoVex در محدوده‌ی فراوانی منتشر شده Avonex در مطالعات قبلی نبود. ممکن است این مسأله به علت تفاوت‌های شیمیایی بین این دو مولکول نوترکیب IFN-β باشد که در درمان بیماران مبتلا به MS استفاده می‌شود. با توجه به این که این دو دارو، دوز و مسیر تجویز مشابه دارند، این تفاوت‌های شیمیایی منجر به تفاوت در ظرفیت ایمنولوژیکی آن‌ها می‌شود.

آزمایش‌های اصولی و پایه که برای تشخیص BAbs استفاده می‌شوند شامل ELISA، Western blot (WB) و Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) یا کروموتوگرافی میل پیوندی می‌باشند. متداول‌ترین روشی که استفاده می‌شود و ما نیز در این مطالعه استفاده کردیم، روش ELISA غیر مستقیم بر اساس روش Fernandez و همکاران با مقداری اصلاحات بود (۲۵)؛ هر چند نتایج مطالعه Fernandez و همکاران در راستای نتایج ما نبود. در روش ELISA غیر مستقیم چاهک‌های پلیت به طور مستقیم با مولکول نوترکیب IFN-β پوشیده می‌شوند (۲۵، ۱۹، ۱۷).

در اکثر مطالعات از روش Capture ELISA که توسط Pachner و همکاران برای تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد IFN-β توصیه شده است، استفاده می‌شود (۲۶). در این روش چاهک‌های پلیت به طور مستقیم با آنتی‌بادی‌های ضد IFN-β پوشیده می‌شوند (۲۶).

روش Western blot نتایج مشابه با ELISA داده است، اما یکی از مضرات این روش آن است که موارد منفی کاذب زیادی دارد (۱۷). به علت استفاده از ایزوتوپ‌های رادیواکتیو، استفاده از روش RIPA محدود شده است؛ هرچند این روش حساسیت بسیار بالایی برای تشخیص BAbs دارد (۲۷).

در نهایت، ایجاد یک ELISA برای تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد IFN-β و بررسی اثر درمانی آن پس از چند ماه از شروع درمان ضروری می‌باشد تا پزشک بتواند در صورت لزوم روش‌های درمانی دیگر را جایگزین کند. بدین ترتیب بیمار از ادامه‌ی درمان پر هزینه که بدون هر گونه بهبودی است و باعث آسیب‌های اقتصادی و روحی- روانی به خانواده‌ها می‌گردد، رهایی می‌یابد و همچنین پزشک می‌تواند روش درمان مناسبی را جایگزین کند تا روند درمان دچار وقفه نشود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد گروه

www.mui.ac.ir

ایمونولوژی دانشکده‌ی پزشکی می‌باشد. بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت تأمین هزینه‌ی مالی اجرای طرح تحقیقاتی به شماره‌ی ۱۸۹۱۱۲ تشکر می‌گردد. از بیماران نیز به دلیل شرکت در این طرح تحقیقاتی تشکر می‌کنیم.

References

1. Hemmer B, Stuve O, Kieseier B, Schellekens H, Hartung HP. Immune response to immunotherapy: the role of neutralising antibodies to interferon beta in the treatment of multiple sclerosis. Lancet Neurol 2005; 4(7): 403-12.
2. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. N Engl J Med 2000; 343(13): 938-52.
3. Oliver B, Orpez T, Mayorga C, Pinto-Medel MJ, Leyva L, Lopez-Gomez C, et al. Neutralizing antibodies against IFN beta in patients with multiple sclerosis: a comparative study of two cytopathic effect tests (CPE) for their detection. J Immunol Methods 2009; 351(1-2): 41-5.
4. Lindberg RL, Kappos L. Transcriptional profiling of multiple sclerosis: towards improved diagnosis and treatment. Expert Rev Mol Diagn 2006; 6(6): 843-55.
5. Sorensen PS, Deisenhammer F, Duda P, Hohlfeld R, Myhr KM, Palace J, 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.
6. Sottini A, Capra R, Serana F, Chiarini M, Caimi L, Imberti L. Interferon-beta therapy monitoring in multiple sclerosis patients. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2009; 9(1): 14-28.
7. Kivisakk P, Alm GV, Tian WZ, Matusevicius D, Fredrikson S, Link H. Neutralising and binding anti-interferon-beta-I b (IFN-beta-I b) antibodies during IFN-beta-I b treatment of multiple sclerosis. Mult Scler 1997; 3(3): 184-90.
8. 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-beta. J Immunol Methods 1999; 227(1-2): 121-35.
9. Cohen BA, Oger J, Gagnon A, Giovannoni G. The implications of immunogenicity for protein-based multiple sclerosis therapies. J Neurol Sci 2008; 275(1-2): 7-17.
10. Gneiss C, Tripp P, Ehling R, Khalil M, Lutterotti A, Egg R, et al. Interferon-beta antibodies have a higher affinity in patients with neutralizing antibodies compared to patients with non-neutralizing antibodies. J Neuroimmunol 2006; 174(1-2): 174-9.
11. McKay F, Schibeci S, Heard R, Stewart G, Booth D. Analysis of neutralizing antibodies to therapeutic interferon-beta in multiple sclerosis patients: a comparison of three methods in a large Australasian cohort. J Immunol Methods 2006; 310(1-2): 20-9.
12. Sominanda A, Hillert J, Fogdell-Hahn A. In vivo bioactivity of interferon-beta in multiple sclerosis patients with neutralising antibodies is titre-dependent. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2008; 79(1): 57-62.
13. Chiu AW, Ehrmantraut M, Richert ND, Ikonomidou VN, Pellegrini S, McFarland HF, et al. A case study on the effect of neutralizing antibodies to interferon beta 1b in multiple sclerosis patients followed for 3 years with monthly imaging. Clin Exp Immunol 2007; 150(1): 61-7.
14. Bertolotto A, Malucchi S, Sala A, Orefice G, Carrieri PB, Capobianco M, et al. Differential effects of three interferon betas on neutralising antibodies in patients with multiple sclerosis: a follow up study in an independent laboratory. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2002; 73(2): 148-53.
15. Deisenhammer F, Schellekens H, Bertolotto A. Measurement of neutralizing antibodies to interferon beta in patients with multiple sclerosis. J Neurol 2004; 251(Suppl 2): II31-II39.
16. Etemadifar M, Mazde M, Torabi H, Ghafaripour M, Azimian M, Salami SH, et al. A report of multiple sclerosis patients treated by CinnoVex™ in Iran. Tehran Univ Med J 2010; 68(1): 30-6.
17. Deisenhammer F, Reindl M, Harvey J, Gasse T, Dilitz E, Berger T. Bioavailability of interferon beta 1b in MS patients with and without neutralizing antibodies. Neurology 1999; 52(6): 1239-43.
18. Rice G. The significance of neutralizing antibodies in patients with multiple sclerosis treated with interferon beta. Arch Neurol 2001; 58(8): 1297-8.
19. Vallittu AM, Halminen M, Peltoniemi J, Ilonen J, Julkunen I, Salmi A, et al. Neutralizing antibodies reduce MxA protein induction in interferon-beta-1a-treated MS patients. Neurology 2002; 58(12): 1786-90.
20. Giantzi V, Lagoudaki R, Poulatsidou KN, Kotta

www.mui.ac.ir

K, Grigoriadis N, Daniilidis M, et al. Assessment of the sensitivity of anti-interferon binding and neutralizing antibody assays in patients with relapsing -remitting multiple sclerosis under interferon- beta treatment-A comparative study. Aristotle University Medical Journal 2011; 38(1): 9-16.

21. Francis GS, Rice GP, Alsop JC. Interferon beta-1a in MS: results following development of neutralizing antibodies in PRISMS. Neurology 2005; 65(1): 48-55.

22. Kivisakk P, Alm GV, Fredrikson S, Link H. Neutralizing and binding anti-interferon-beta (IFN-beta) antibodies. A comparison between IFN-beta-1a and IFN-beta-1b treatment in multiple sclerosis. Eur J Neurol 2000; 7(1): 27-34.

23. Monzani F, Meucci G, Caraccio N, Saviozzi M, Casolaro A, Moscato G, et al. Discordant effect of IFN-beta1a therapy on anti-IFN antibodies and thyroid disease development in patients with multiple sclerosis. J Interferon Cytokine Res 2002; 22(7): 773-81.

24. Perini P, Calabrese M, Biasi G, Gallo P. The clinical impact of interferon beta antibodies in relapsing-remitting MS. J Neurol 2004; 251(3): 305-9.

25. Fernandez O, Mayorga C, Luque G, Guerrero M, Guerrero R, Leyva L, et al. Study of binding and neutralising antibodies to interferon-beta in two groups of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. J Neurol 2001; 248(5): 383-8.

26. Pachner A, Narayan K, Price N, Hurd M, Dail D. MxA gene expression analysis as an interferon-beta bioactivity measurement in patients with multiple sclerosis and the identification of antibody-mediated decreased bioactivity. Mol Diagn 2003; 7(1): 17-25.

27. Lawrence N, Oger J, Aziz T, Palace J, Vincent A. A sensitive radioimmunoprecipitation assay for assessing the clinical relevance of antibodies to IFN beta. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2003; 74(9): 1236-9.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 207, 1st week, December 2012 Received: 15.8.2012 Accepted: 23.10.2012

Designing of an ELISA Method for the Measurement of Serum Antibodies against Interferon-beta and the Study of the Frequency of these Antibodies in Patients with Multiple Sclerosis Treated with CinnoVex

Nasrin Zare[1], Sayyed Hamid Zarkesh Esfahani PhD[2], Vahid Shaygannejad MD[3], Marjan Gharagozloo PhD[4]

Abstract

Background: Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating disease of the central nervous system. Interferon-beta (IFN-β) was the first disease modifying drug to be approved for the treatment of MS. Some MS patients treated with IFN-β develop antibodies to the drug. Anti-IFN-β antibodies can reduce both bioactivity and clinical efficacy of IFN-β. The objective of this study was to develop an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for the measurement of anti-IFN-β antibodies in MS patients treated with CinnoVex (a recombinant Interferon beta 1-a).

Methods: An Indirect ELISA protocol was developed and validated for the measurement of anti-IFN-β antibodies. Sera were studied for anti-IFN-β antibodies from 40 healthy individuals and 42 MS patients treated with CinnoVex for at least 6 months.

Findings: Patients were considered positive for Anti-IFN-β antibodies, if they had a positive sample with an optical density of more than 1.2. Anti-IFN-β antibodies were found in 12 MS patients treated with CinnoVex. 31.1% of MS patients treated with CinnoVex developed anti-IFN-β antibodies.

Conclusion: ELISA is a simple, fast and inexpensive test for the assessment of anti-IFN-β antibodies in MS patients treated with IFN-β.

Keywords: Multiple sclerosis, Interferon beta 1a, Antibodies, Enzyme-linked immunosorbent assay

[1] MSc Student, Department of Immunology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[2] Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine AND Applied Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences AND Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
[3] Associate Professor, Department of Neurology, School of Medicine AND Neuroscience Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Sayyed Hamid Zarkesh Esfahani PhD, Email: s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk