

Marta Strycharz-Żak, *Anna Piekarska

Ilościowa ocena HBsAg jako istotny parametr w monitorowaniu przebiegu naturalnego i terapii PZW B

Quantitative HBsAg assessment as a crucial parameter in monitoring natural course and treatment outcome of chronic hepatitis B infection

Oddział Chorób Zakaźnych, Tropikalnych i Pasożytniczych dla Dorosłych, WSSz im. dr. Wł. Biegańskiego, Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik Kliniki: dr hab. med. Anna Piekarska, prof. UM

Słowa kluczowe

stężenie HBs, PEG-INF, analogi, genotyp HBV, terapia zindywidualizowana, rokowanie

Key words

HBs quantification, PEG-INF, analogues, HBV genotype, personalized therapy, prediction

Streszczenie

Zidentyfikowanie antygenu HBs w 1965 roku przez Blumberga było odkryciem uhonorowanym przyznaniem Nagrody Nobla. Do dziś jest to podstawowy marker infekcji HBV. Wiadomo także, że jego ilościowa ocena jest wartościowym czynnikiem prognostycznym przebiegu naturalnego oraz terapii HBV.

Istotą przewlekłej infekcji HBV jest obecność stanowiącego matrycę transkrypcyjną cccDNA w hepatocytach. Udowodniono korelację pomiędzy qHBs a cccDNA, w związku z czym obecnie uważa się, że qHBs pośrednio odzwierciedla ładunek cccDNA w wątrobie.

Poziom qHBs zmienia się w przebiegu naturalnym PZW B. Najwyższe stężenia qHBs obserwuje się w fazie immunotolerancji, po czym qHBs obniża się stopniowo, osiągając najniższe wartości w fazie niskiej replikacji. Stężenia qHBs są wyższe u pacjentów HBe-dodatnich niż HBe-ujemnych. Ocena qHBs w grupie pacjentów HBe-ujemnych w połączeniu z HBV DNA pozwala na wyodrębnienie osób, u których istnieje ryzyko reaktywacji zakażenia.

Genotyp HBV w istotny sposób wpływa na efektywność leczenia PEG-INF, natomiast w trakcie terapii PEG-INF poziom HBs w 24. tygodniu > 20 000 IU/ml, niezależnie od genotypu HBV, wiąże się z brakiem odpowiedzi na leczenie. Oznaczenie qHBs w 12. tygodniu terapii ma także znaczenie rokownicze, jednak przerywanie leczenia w tym momencie nie jest rekomendowane.

Zastosowanie qHBs w trakcie leczenia analogami nukleoz(t)ydowymi jest zagadnieniem wymagającym dalszych obserwacji. Stężenie qHBs w trakcie terapii AN ulega wolnemu obniżeniu i być może w przyszłości na tej podstawie możliwe będzie określenie momentu zakończenia terapii.

Ilościowa ocena qHBs jest niegenerującym wysokich kosztów badaniem w znakomity sposób uzupełniającym dotychczasowy sposób monitorowania przewlekłego zapalenia wątroby typu B za pomocą HBV DNA i dostarcza istotnych informacji pozwalających na podejmowanie trafniejszych decyzji terapeutycznych.

Summary

Identification of HBsAg in 1965 by Blumberg was the discovery awarded by the Nobel Prize. Until today it remains the fingerprint of HBV infection. Moreover its quantitative assessment is a useful marker of natural course and treatment outcome.

The essence of chronic hepatitis B infection is the presence of cccDNA, which is the transcription template, in hepatocytes. The correlation between qHBs and cccDNA has been proven and it is believed that qHBs indirectly reflects the amount of cccDNA in the liver.

qHBs level changes during natural history of CHB (chronic hepatitis B). The highest titers are observed during immunotolerance phase, then qHBs declines progressively and is the lowest in the low replication phase. qHBs levels are higher in HBe-positive than HBe-negative patients. Moreover qHBs together with HBV DNA helps to identify patients with the high risk of infection reactivation.

HBV genotype has a major influence on PEG-INF treatment effectiveness, however during PEG-INF therapy qHBs > 20 000 IU/ml in 24th week is connected with the lack of sustained treatment response irrespective of HBV genotype. Determining qHBs in 12th week has also a prognostic value however treatment discontinuation at this moment is not recommended.

Adres/address:

*Anna Piekarska
Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii UM
WSSz im. dr. Wł. Biegańskiego
ul. Kniaziewicza 1/5, 91-347 Łódź
tel. +48 (42) 251-62-65
e-mail: marta.strycharz@gmail.com

qHBs application during nucleoside analogue (NAs) therapy is the issue that requires further investigation. qHBs titers declines slowly during NAs. It is possible that in the future it may be the useful indicator of treatment cessation.

Hepatitis B surface antigen quantification is a low cost assay which complements previous way of CHB monitoring with HBV DNA and provides relevant information to make better therapeutic decisions.

Przewlekłe zakażenie HBV stanowi istotny problem kliniczny, dotyczący ok. 350 mln ludzi na świecie. Pomimo spadku częstości zachorowań po wprowadzeniu szczepień ochronnych, powikłania zakażenia w postaci pierwotnego raka wątrobowo-komórkowego i marskości wątroby są przyczyną ok. 500 000 zgonów rocznie. Od momentu zidentyfikowania HBsAg w 1965 roku przez Blumberga marker ten pozostaje podstawą rozpoznania zakażenia HBV (1).

HBV należy do hepadnawirusów i występuje w ośmiu wariantach genotypowych A-H. Genotypem dominującym w Polsce jest genotyp A. Zróżnicowanie genotypowe determinuje aktywność i postęp choroby oraz skuteczność leczenia interferonem.

Cząstki wirusowe o średnicy 42 nm są złożone z częściowo dwuniciowego DNA o długości ok. 3200 nukleotydów, stanowiącego białkowy rdzeń, oraz z dwuwarstwowej otoczki lipoproteinowej HBsAg. Zewnętrzna warstwa otoczki składa się z HBsAg podzielonego na małe, średnie i duże białka (SHBs, MHBs i LHBs), a wewnętrzna otoczka – z białka rdzeniowego, w którym zawarta jest polimeraza DNA i genom HBV. Po wnikięciu do komórki HBV pozbywa się otoczki proteinowej, a częściowo dwuniciowe DNA jest przekształcane we w pełni dwuniciowy łańcuch cccDNA, który, znajdując się w jądrze hepatocytu, stanowi matrycę transkrypcyjną. Stężenie HBsAg stanowi pośredni wskaźnik zawartości aktywnego transkrypcyjnego cccDNA. Interesującą cechą biologii HBV jest fakt, że synteza białek powierzchniowych HBsAg jest zdecydowanie większa niż jest to niezbędne dla utworzenia nowych wirionów.

W surowicy HBsAg oprócz występowania w pełnych wirionach (cząstkach Dane'a), obecne są jako cząsteczki niezakaźne w postaci form sferycznych i filamentowych (tabularnych). Formy sferyczne, składające się głównie z SHBs, występują w nadmiarze, przekraczając 10 000 x pełne zakaźne wiriony. Formy filamentowe są złożone z SHBs, MHBs i LHBs. Stężenie HBsAg w surowicy wynika ze współistnienia pełnych wirionów oraz cząsteczek sferycznych i filamentowych. Wszystkie trzy formy są wykrywane przez testy służące do ilościowej oceny HBsAg. Związek pomiędzy cccDNA a HBs został bezspornie potwierdzony w dwóch badaniach, w których cccDNA oceniano na podstawie badania biopunktatu wątroby za pomocą rtPCR. Ocena ilości cccDNA jest możliwa jedynie za pomocą procedury inwazyjnej (2, 3).

Ilościowa ocena stężenia HBsAg (qHBs) jest dostępna od ponad 20 lat, jednak dopiero od kilku lat dysponujemy testami pozwalającymi na całkowicie zautomatyzowaną, powtarzalną, wystandaryzowaną,

stosunkowo mało kosztowną i dzięki temu łatwo dostępną ocenę tego biomarkera. Najbardziej rozpowszechnionymi testami służącymi do ilościowej oceny HBsAg, a także HBeAg, są Architect HBsAg QT assay (Abbott) oraz Elecsys HBsAg II assay (Roche). Oba testy przedstawiają wyniki w jednostkach międzynarodowych na mililitr (IU/ml). Zakres pierwszego testu wynosi 0,05-250 IU/ml, drugiego – 0,05-52 000 IU/ml. Pomiarzy uzyskiwane w obu testach, niezależnie od genotypów, są zbliżone (2, 3).

Oznaczenie qHBs w połączeniu z oceną HBV DNA i genotypu HBV umożliwia dokładniejsze monitorowanie i ocenę skuteczności stosowanych terapii. Stężenie HBsAg różni się w zależności od fazy zakażenia HBV, statusu w układzie „e”, genotypu HBV, a w trakcie terapii dynamika jego spadku jest całkowicie inna podczas leczenia pegylovanym interferonem (PEG-INF) i analogami nukleoz(t)ydowymi (AN) (4).

ILOŚCIOWA OCENA STĘŻENIA HBsAg JAKO PARAMETR ROKOWNICZY PRZEBIEGU PRZEWLEKŁEGO ZAKAŻENIA HBV

W przebiegu naturalnym zakażenia HBV wyróżniamy pięć następujących po sobie faz: fazę immunotolerancji z wysoką wiremią HBV, prawidłową aktywnością ALT i minimalnym nasileniem zmian zapalnych i martwiczych w wątrobie; fazę immunoeliminacji, w której wzrasta aktywność ALT, zmiany w obrazie histopatologicznym ulegają nasileniu, dochodzi do serokonwersji u wkładzie „e” i spadku HBV DNA; fazę niskiej replikacji HBV DNA oraz stan przewlekłego zakażenia anty-HBeAg(+), z fluktuacjami HBV DNA i aktywności ALT. Ostatnia, piąta faza zakażenia obejmuje pacjentów, u których doszło do eliminacji antygenu HBs, co zdecydowanie poprawia rokowanie, redukując ryzyko powikłań w postaci HCC (rak wątrobowokomórkowy, *hepatocellular carcinoma*) i marskości wątroby. Jednak pomimo utraty HBsAg i niewykrywalnej wirerii HBV w surowicy HBV DNA jest nadal wykrywalne w wątrobie, a replikacja prawdopodobnie odbywa się na bardzo niskim poziomie.

Stężenia qHBs są wyższe w fazie immunotolerancji niż eliminacji (5) i obniżają się stopniowo w przebiegu dalszych etapów zakażenia. W badaniu obejmującym populację azjatycką mediana poziomów qHBsAg w fazie immunotolerancji wynosiła 4,53 log(10)IU/ml, a immunoeliminacji 4,03 log(10)IU/ml (6). Najniższa była w fazie niskiej replikacji – 2,86 log(10)IU/ml (6). W podobnym badaniu, ale obejmującym populację europejską, stężenia HBsAg wynosiły w fazie immunotolerancji 4,96 log(10)IU/ml, a immunoeliminacji 4,37 log(10)IU/ml. Wyraźną zależność pomiędzy stęże-

niem HBsAg a HBV DNA stwierdzono jedynie w ostrej fazie zakażenia (7).

Ilościowe oznaczenie stężenia HBsAg stanowi wartościowe narzędzie służące ocenie rokowania u pacjentów w późnej fazie zakażenia HBV, u których najczęściej stwierdza się HBeAg(-). Pacjenci, u których dokonała się serokonwersja w układzie „e”, mogą być zarówno „nieaktywnymi nosicielami”, jak i osobami, u których występują wyraźne, choć czasami trudne do uchwycenia fluktuacje HBV DNA oraz ALT. Ta druga grupa pacjentów jest narażona na cięższy przebieg choroby i częstszą progresję do marskości wątroby oraz jej powikłania w postaci zdekompensowanej marskości wątroby i raka wątrobowo-komórkowego (8). Z powodu istnienia aktywnej choroby wątroby omawiani pacjenci wymagają leczenia, w przeciwieństwie do chorych z grupy pierwszej, charakteryzujących się dobrym rokowaniem, z niskim ryzykiem następstw zakażenia HBV (8). Według wytycznych EASL 2012 pacjenci HBeAg(-) wymagają monitorowania aktywności ALT co 3 miesiące i HBV DNA co 6-12 miesięcy przez kolejne trzy lata, zanim będzie można ich uznać za nieaktywnych nosicieli HBV. W przypadku HBV DNA 2000-20 000 IU/ml i prawidłowej aktywności aminotransferaz bez objawów choroby wątroby nie wymagają pilnej biopsji wątroby ani leczenia (8).

Powyższe rekomendacje ustalono między innymi na podstawie badania przeprowadzonego przez Chan i wsp., w którym porównano stężenia HBsAg u pacjentów HBeAg(-) przydzielonych do dwóch grup. W pierwszej z nich znajdowały się osoby z okresowo nieprawidłowymi wartościami ALT i HBV DNA > 2000 IU/ml, a w drugiej pacjenci z prawidłowymi wartościami ALT i HBV DNA < 2000 IU/ml. Wśród tych pacjentów ustalono punkt odcięcia dla stężenia HBsAg 1,5 log IU/ml jako poziom charakteryzujący się najwyższą czułością i specyficznością dla choroby aktywnej (5).

Znaczenie stężenia HBsAg w monitorowaniu pacjentów HBeAg(-) z niskim poziomem wirerii HBV DNA < 2000 IU/ml zostało potwierdzone także w innym badaniu obejmującym dużą grupę pacjentów (1068 osób), poddaną 13-letniej obserwacji (9). Tseng i wsp. oceniali związek pomiędzy stężeniem HBsAg a zapaleniem wątroby, nawracającym zapaleniem wątroby, wzrostem aktywności ALT i wystąpieniem marskości wątroby (9). Wykazano, że to głównie stężenie HBsAg (a nie HBV DNA) jest czynnikiem ryzyka rozwoju powyższych zjawisk, przy czym kombinacja stężenia HBsAg < 1000 IU/ml z niską wirerią HBV i prawidłową aktywnością ALT przemawia za minimalnym ryzykiem rozwoju następstw zakażenia HBV(9).

Jednym z najnowszych badań, w którym zdefiniowano poziomy HBsAg i HBV DNA charakteryzujące pacjentów, u których doszło do reaktywacji zakażenia, jest badanie przeprowadzone przez Martinot-Peignoux i wsp. (10), w którym rocznej analizie poddano 129 HBeAg(-) osób o genotypach A-E, z prawidłowymi wyjściowymi wartościami ALT. W rocznej obserwacji okazało się, że poziom HBsAg > 1000 IU/ml oraz

HBV DNA > 200 IU/ml pozwalał na zidentyfikowanie pacjentów, u których doszło do reaktywacji zakażenia z 92% czułością i negatywną wartością predykcyjną (NPV) wynoszącą 96%.

ZNACZENIE ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA HBsAg W PRZEWIDYWANIU SPONTANICZNEJ UTRATY HBsAg

Eliminacja HBsAg jest kluczowym punktem końcowym w przebiegu zakażenia HBV i najtrudniejszym do osiągnięcia efektem leczenia PZW B. Spontaniczna utrata HBsAg dotyczy jedynie 1-3% pacjentów przewlekłe zakażonych HBV.

Obniżanie się stężenia HBsAg w przebiegu zakażenia jest związane ze wzrastającym prawdopodobieństwem eliminacji HBsAg. W okresie poprzedzającym eliminację HBsAg obserwuje się wyraźne spadki jego stężenia w surowicy. Wartości qHBs < 200 IU/ml lub spadek qHBs > 1 log(10) IU/ml na przestrzeni dwóch lat wiążą się z wysoką pozytywną wartością predykcyjną utraty HBsAg (11). W świetle ostatnich doniesień łączna ocena stężenia HBsAg i HBV DNA pozwala na przewidzenie serokonwersji w układzie „s” u nieleczonych pacjentów na podstawie ich wyjściowego stężenia qHBs < 100 IU/ml i wirerii poniżej progu detekcji (12).

ILOŚCIOWE OZNACZENIE STĘŻENIA HBsAg JAKO MARKER ODPOWIEDZI NA LECZENIE PEG-INF

Działanie PEG-INF w terapii PZW B jest związane z indukcją odpowiedzi immunologicznej gospodarza przeciwko HBV. Zaletą leczenia PEG-INF jest określony 48-tygodniowy czas terapii, wadą zaś – ewentualne działania niepożądane i niedogodność związana ze stosowaniem iniekcji.

Skuteczność terapii, definiowana u pacjentów HBe(+) jako trwała serokonwersja w układzie „e” i HBV DNA < 2000 IU/ml oraz prawidłowa aktywność ALT i HBV DNA < 2000 IU/ml u pacjentów HBe(-), oceniana jest w 24. tygodniu po zakończeniu leczenia. Taki efekt terapeutyczny osiąga w wyniku leczenia PEG-INF około 25-30% chorych HBe(+) i 25% HBe(-).

Istnieją czynniki pozwalające już na wstępnie zakwalifikować do terapii interferonem pacjentów z największą szansą odpowiedzi na leczenie. U chorych HBe(+) są to: starszy wiek, płeć żeńska, wyższa aktywność transaminaz, niższe poziomy HBV DNA oraz genotyp A i B, natomiast u HBe(-): młodszy wiek, płeć żeńska, wyższa aktywność transaminaz i niższe poziomy HBV DNA (13). Spośród pacjentów zakażonych genotypem A najlepszymi kandydatami do uzyskania pozytywnej odpowiedzi są osoby z wysokimi poziomami ALT lub niskim HBV DNA, a w przypadku osób zakażonych genotypami B lub C – spełniające obydwa te kryteria (14). Ocena ilościowego stężenia HBsAg w połączeniu z oznaczeniem genotypu HBV oraz oceną HBV DNA zmodyfikowały proces leczenia z użyciem PEG-INF, pozwalając na wyodrębnienie pacjentów nierokujących na uzyskanie odpowiedzi już na wczesnych etapach terapii.

PACJENCI HBe(-) LECZENIE PEG-INF

Dotychczasowe obserwacje wskazują, że spadek stężenia qHBs w trakcie leczenia jest związany z trwałą odpowiedzią na leczenie (ang. *sustained viral response* – SVR). Ustalono, że spadek stężenia HBsAg o 0,5 log(10) w 12. tygodniu i o 1 log(10) IU/ml w 24. tygodniu pozwalają na wyróżnienie pacjentów charakteryzujących się wysokim prawdopodobieństwem osiągnięcia SVR, przy czym wartości predykcyjne qHBs były wyższe dla 24. niż 12. tygodnia leczenia (15). Jednocześnie tylko chorzy, u których obserwowano spadek stężenia qHBs, osiągnęli SVR (15).

Rijckborst i wsp. zaproponowali algorytm identyfikacji pacjentów HBe(-) niemających szansy na uzyskanie trwałej odpowiedzi wirusologicznej. Jednocześnie brak spadku qHBs i HBV DNA w 12. tygodniu leczenia wiązał się z brakiem SVR (16).

Związek pomiędzy wielkością spadku stężenia HBsAg a odpowiedzią na leczenie został potwierdzony w kolejnych badaniach (17). Obniżenie HBsAg > 10% w 12. i 24. tygodniu wiązało się z niską wiremią HBV DNA po roku od zakończenia leczenia. Ten parametr z kolei miał istotny związek z poziomem wiremii, a także, co ważniejsze, z eliminacją HBsAg po 5 latach od zakończenia leczenia.

Nieosiągalne jest zidentyfikowanie w trakcie leczenia chorych trwale odpowiadających na leczenie i tych, u których można spodziewać się nawrotu po terapii PEG-INF na podstawie izolowanej oceny HBV DNA. Różnice w poziomie wiremii podczas leczenia są podobne u chorych odpowiadających i tych z nawrotem choroby. Natomiast dynamika spadku stężenia HBs jest wyższa u osób, które trwale odpowiadają na terapię niż u chorych z nawrotem i nieodpowiadających na leczenie. Powyższą prawidłowość obserwowano zarówno w odniesieniu do monoterapii PEG-INF, jak i leczenia skojarzonego PEG-INF z lamiwudyną (12, 17).

Badania nad stężeniem HBs prowadzone w ostatnich latach wykazały, że qHBs oceniany przed rozpoczęciem leczenia może być predykatorem odpowiedzi na leczenie. Wyjściowy poziom qHBsAg 5000 IU/ml może prognozować trwałą odpowiedź na leczenie (HBV DNA < 2000 IU/ml po roku i po 5 latach leczenia – odpowiednio: PPV 34 i 30%, NPV 78 i 84%) (17).

Interesujące zjawisko opisali w ostatnim czasie Brunetto i wsp. (18). W omawianym badaniu potwierdzono związek pomiędzy HBsAg, HBV DNA i genotypem HBV u HBeAg(-) pacjentów. Stężenia qHBs oceniane przed leczeniem różniły się w zależności od genotypu i były wyższe w genotypie A niż B, C, D oraz wyższe dla genotypu D niż C, podczas gdy wyjściowe HBV DNA i ALT nie różniły się pomiędzy genotypami (18). Ponadto w przypadku zakażeń genotypami A, B, D stwierdzono wyraźniejsze spadki stężenia qHBs w trakcie leczenia PEG-INF u osób, które osiągnęły trwałą odpowiedź, w przeciwieństwie do osób, które na terapię nie odpowiedziały. W przypadku genotypu C spadki stężeń qHBs w trakcie leczenia nie pozwalały na wyróżnienie grupy chorych, którzy ostatecznie osiągnęli odpowiedź

na leczenie. Istotne różnice między odpowiadającymi i nieodpowiadającymi na leczenie w zakresie qHBs obserwowano natomiast u zakażonych genotypem A HBV. Między 12. a 24. tygodniem leczenia u odpowiadających i nieodpowiadających na leczenie w tej grupie chorych obserwowano spadek stężenia HBs odpowiednio 1,85 log(10) IU/ml i 0,03 log(10) IU/ml.

W przypadku zakażonych genotypem B spadek HBs oceniano w pierwszych 12. tygodniach terapii, odpowiednie wartości wynosiły kolejno 2,09 log(10) IU/ml i 0,04 log(10) IU/ml dla nieodpowiadających na leczenie. U pacjentów zakażonych genotypem D, którzy nie odpowiedzieli na leczenie, obserwowano wzrost HBs w okresie do 12. tygodnia terapii.

Omawiane badanie pozwoliło także na określenie stężeń HBs uzyskanych w 48. tygodniu leczenia, związanych z trwałą odpowiedzią wirusologiczną w zakażeniach poszczególnymi genotypami HBV. Dla kolejnych genotypów HBV wartości te wynoszą odpowiednio: genotyp A – 400 IU/ml, B – 50 IU/ml, C – 75 IU/ml, D – 1000 IU/ml. Pacjenci, u których stwierdzono stężenia HBs poniżej wymienionych wartości w momencie zakończenia leczenia, uzyskali odpowiedź na leczenie odpowiednio na poziomie: 75, 47, 71, 75% (18).

PACJENCI HBeAg(+)

Chorzy HBeAg(+) powinni być ostrożnie kwalifikowani do rozpoczęcia leczenia przeciwwirusowego ze względu na częstą w tej grupie immunotolerancję zakażenia HBV. Rozpoczęcie terapii PEG-INF w tej grupie chorych może okazać się skuteczną strategią leczenia w przypadkach niskiej wiremii HBV, znacznej aktywności biochemicznej i zakażenia genotypem A (13). Chorzy z tej grupy wymagają jednak ścisłego monitorowania terapii PEG-INF i określenia szans powodzenia terapii na jej wczesnych etapach. Ustalenie tzw. „stopping rules”, czyli zasad przerywania nieskutecznego leczenia PEG-INF, jest istotnym zagadnieniem. Obecnie wiadomo, że ze względu na znaczne różnice w dynamice obniżania się qHBs w zależności od genotypu HBV, zarówno jeden, jak i drugi parametr jest istotny dla podjęcia decyzji o przerywaniu leczenia PEG-INF.

W badaniu NEPTUNE (19-21) stwierdzono, że dynamika obniżania się qHBs w trakcie leczenia jest związana z uzyskaniem trwałej odpowiedzi na leczenie i obserwacja ta potwierdza się w kolejnych badaniach (12). Powyższe badania pozwoliły na stworzenie algorytmu terapii PEG-INF w tej grupie chorych, modyfikowanej w zależności od odpowiedzi. Pacjenci, którzy w trakcie leczenia osiągnęli stężenia HBsAg < 1500 IU/ml w 12. lub 24. tygodniu mieli największe szanse uzyskania odpowiedzi na leczenie. Stężenie HBsAg > 20 000 IU/ml wiązało się natomiast z brakiem odpowiedzi na leczenie (19).

Pacjenci HBeAg(+), którzy nie doświadczyli spadku HBsAg w 12. tygodniu, mieli niewielką szansę na SVR i nie mieli szansy na eliminację HBsAg. W tej grupie chorych wskazano na celowość zaprzestania terapii PEG-INF (20, 21).

W dwa lata później w badaniu przeprowadzonym przez Sonnevelda i wsp. (22) poddano weryfikacji określone uprzednio „stopping rules”. Oceniano, jakie znaczenie mają stężenia HBs < 1500 IU/ml i > 2000 IU/ml w 12. i 24. tygodniu leczenia w zależności od genotypu HBV.

W omawianym badaniu spadek stężenia qHBs < 1500 IU/ml w 12. tygodniu leczenia wiązał się z 45% prawdopodobieństwem odpowiedzi na leczenie i 15% prawdopodobieństwem utraty HBsAg (22). W zakażeniu genotypami A, B, C qHBs < 1500 IU/ml w 12. tygodniu związany był z wysokim prawdopodobieństwem odpowiedzi (42-86%). Natomiast tak niskie stężenie rzadko było obserwowane u pacjentów zakażonych genotypem D – chorzy ci mają niewielką szansę na pozytywną odpowiedź na leczenie (14). W przypadku genotypów B i C qHBs > 20 000 IU/ml w 12. tygodniu dobrze identyfikowało pacjentów z niskim prawdopodobieństwem odpowiedzi na leczenie (22). W powyższej obserwacji stwierdzono jednak, że qHBsAg > 20 000 IU/ml w 12. tygodniu nie wyklucza eliminacji HBsAg (12). Serokonwersja w układzie „s” w przypadkach zakażonych genotypem A dokonała się u 4 z 38 osób, u których stężenie qHBsAg wynosiło 20 000 IU/ml w 12. tygodniu (20). Na podstawie przytoczonych obserwacji autorzy tej pracy nie rekomendują przerywania terapii PEG-IFN w 12. tygodniu niezależnie od genotypu (22). Stwierdzono natomiast, że qHBsAg w 24. tygodniu > 20 000 identyfikuje pacjentów z niskim prawdopodobieństwem odpowiedzi niezależnie od genotypu (22).

Dołączenie do PEG-IFN lamiwudyny powodowało wyraźniejsze spadki qHBs niż podczas monoterapii INF (20), jednak w obserwacji 6-miesięcznej po leczeniu redukcja qHBs była podobna w obu grupach chorych (22).

ZASTOSOWANIE ILOŚCIOWEJ OCENY HBsAg PODCZAS TERAPII ANALOGAMI NUKLEOZ(T)YDOWYMI

Nie dysponujemy tak dużą liczbą obserwacji dotyczących znaczenia stężenia qHBs podczas terapii analogami nukleoz(t)ydowymi (AN), jak to jest w przypadku PEG-IFN. Celem leczenia AN jest osiągnięcie supresji wirerii HBV. W trakcie terapii AN wzrasta ilość wewnątrzjądrobowego HBV DNA w postaci cccDNA, ponieważ zasoby cccDNA są zasilane przez preferencyjny transport episomalnego HBV DNA do jądra hepatocytów, a nie poza komórkę.

Z powyższych powodów głębokie spadki wirerii w surowicy podczas leczenia AN nie odzwierciedlają sposobu obniżania się stężenia qHBs (23, 24). Wireria HBV DNA podczas leczenia analogami nukleoz(t)ydowymi szybko ulega redukcji w przeciwieństwie do stężenia qHBs, które obniża się powoli, stopniowo i mniej dynamicznie niż podczas leczenia PEG-IFN.

W badaniu porównującym dynamikę redukcji qHBs podczas leczenia interferonem i entekawirem stwier-

dzono głębszy spadek qHBs u pacjentów HBeAg(+) leczonych PEG-IFN niż entekawirem, w 48. tygodniu leczenia wynosił on 0,94 vs. 0,38 IU/ml. Wśród pacjentów HBeAg(-) PEG-IFN także indukował znaczny spadek qHBs, natomiast leczenie entekawirem w niewielkim stopniu wpływało na stężenie qHBs. U osób, u których doszło później do utraty HBsAg, dynamika spadku stężenia tego antygenu była podobna niezależnie od rodzaju stosowanej terapii. Dynamika spadku wirerii HBV w przeciwieństwie do qHBs była większa w przypadku leczenia entekawirem niż PEG-IFN (25).

Odmierna dynamika HBV DNA i HBsAg jest widoczna także podczas przełomów wirusologicznych w trakcie terapii. W grupie 30 pacjentów leczonych lamiwudyną doszło do selekcji szczepów opornych (u 13 z 20 osób wyselekcjonowano szczepy odporne na lamiwudynę, u 5 – wirusy typu dzikiego, u 2 osób – brakuje danych), co w następstwie doprowadziło do zdecydowanego wzrostu HBV DNA, jednak stężenie HBsAg wzrosło jedynie nieznacznie i ponownie obniżyło się po odzyskaniu kontroli wirerii w wyniku modyfikacji terapii (23).

Jedną z przyczyn różnic w dynamice spadku stężenia qHBs podczas leczenia PEG-IFN i AN jest odmienny mechanizm działania tych grup leków. Jedynie niewielka ilość HBsAg powstaje przy udziale *messenger RNAs*, większość pochodzi z cccDNA i sekwencji kodujących zintegrowanych z genomem gospodarza (23). AN w niewielkim stopniu wpływają na zmniejszenie cccDNA, który jest matrycą dla transkrypcji HBs *messenger RNAs*, a w związku z obecnością cccDNA, pomimo terapii, utrzymuje się stała sekrecja HBsAg (26).

W sytuacji dobrej kontroli wirusologicznej zakażone hepatocyty, które ulegają naturalnej śmierci komórkowej, nie są zastępowane przez nowo zakażone hepatocyty. Mogłoby to tłumaczyć bardzo powolny spadek ilości HBsAg w trakcie terapii AN.

Obecnie czas leczenia lekami analogowymi nie jest zdefiniowany, gdyż słaba kontrola immunologiczna obserwowana w trakcie ich stosowania powoduje nawroty zakażenia po zaprzestaniu terapii.

W badaniu przeprowadzonym przez Chevalieza i wsp. (23) podjęto próbę określenia momentu zakończenia terapii NAs. Czas obserwacji wynosił średnio 8,5 roku. W grupie 30 pacjentów zróżnicowanych ze względu na pochodzenie oceniano HBV DNA i qHBs podczas leczenia NAs. Wszystkie osoby osiągnęły niewykrywalną wirerię (< 20 IU/ml), a u 27 z 30 osób qHBsAg obniżało się powoli w trakcie leczenia, ze średnim spadkiem 0,138 +/- 0,171 IU/rok log(10) IU/ml i było nadal wykrywalne po zakończeniu leczenia. U trzech osób wystąpił niewielki wzrost qHBsAg w trakcie obserwacji, przy czym dwie z nich osiągnęły niewykrywalną wirerię.

Tylko u jednej osoby z powyższych 27 dokonała się serokonwersja w układzie „s” po 29 miesiącach niewykrywalnej wirerii. U tego chorego obserwowano szybszy spadek qHBs niż u pozostałych. Spadki HBsAg były wyraźniejsze, gdy HBV DNA osiągnęło wartości < 20 IU/ml. W okresie niewykrywalnej wirerii średnie

stężenie HBsAg wynosiło 3,29 IU/ml, a średni roczny spadek – 0,084 log(10) IU/ml/rok. Na podstawie matematycznego modelu określono, że czas potrzebny do osiągnięcia eliminacji HBsAg wynosiłby 52,2 roku, co oznacza, że nawet przy dobrej adherencji wyeliminowanie HBsAg w trakcie życia pacjenta jest mało prawdopodobne. W badaniu przeprowadzonym kilka lat wcześniej czas potencjalnej eliminacji HBsAg podczas terapii lamiwudyną oszacowano na 10,6 roku. Różnice te mogą wynikać m.in. z zastosowania w powyższych badaniach różnych analogów nukleoz(t)ydowych oraz braku możliwości oznaczenia HBs we wcześniejszym badaniu za pomocą wystandaryzowanych, komercyjnych testów, które wówczas były jeszcze niedostępne (23, 27).

Stężenia wyjściowe i dynamikę spadku qHBs u chorych HBe(+) i HBe(-) w trakcie wieloletniego leczenia lamiwudyną badali Seto i wsp. (26). Autorzy poddali analizie 70-osobową grupę pacjentów (43 osoby HBeAg-dodatnie), leczonych przez okres 10 i 15 lat, u których uzyskano odpowiedź wirusologiczną definiowaną jako HBV DNA < 2000 IU/ml. Stężenia wyjściowe qHBs były wyższe u pacjentów HBeAg(+) niż HBeAg(-) (odpowiednio 10 800 IU/ml i 1590 IU/ml). Nie wykazano natomiast różnic w szybkości redukcji stężenia qHBs pomiędzy pacjentami HBeAg dodatnimi i ujemnymi, zakażonymi genotypami B i C oraz z wiremią wykrywalną i poniżej progu detekcji (52 osoby – 74,3%).

U osób z badanej grupy, u których doszło do serokonwersji w układzie „s”, obserwowano niższe wyjściowe stężenia qHBs niż u osób, które pozostały HBsAg(+) (mediana poziomu wyjściowego qHBs odpowiednio 531 IU/ml vs. 6390 IU/ml) oraz większą dynamiką spadku stężenia qHBsAg podczas leczenia. Na tej podstawie ustalono wartości wyjściowego stężenia qHBs < 1000 IU/ml oraz spadek qHBs > 0,1666 log/IU/ml/rok jako wartości optymalne dla serokonwersji w układzie „s”. Dla porównania, w przebiegu naturalnym zakażenia za wartości związane ze spontaniczną serokonwersją określono wcześniej stężenia HBsAg poniżej 200 IU/ml i redukcję qHBs 0,5 log IU/mL/rok (28). Możliwe jest zatem zwiększenie prawdopodobieństwa eliminacji HBsAg u pacjentów z niskim wyjściowym stężeniem HBsAg w wyniku długotrwałej terapii lamiwudyną (24).

W innym badaniu przeprowadzonym przez tę samą grupę badaczy oceniano kinetykę spadku qHBs u 142 azjatyckich pacjentów leczonych tenofowirem przez okres do 3 lat (grupy złożone ze 142, 123 i 70 chorych otrzymywały tenofowir przez odpowiednio rok, 2 i 3 lata) (29). Obserwacja dotyczyła pacjentów, którzy w przeszłości byli leczeni innymi AN lub ponad 6 miesięcy przed włączeniem tenofowiru otrzymywali PEG-INF. Stwierdzono wolniejszy spadek qHBsAg u osób z niższymi wyjściowymi poziomami qHBsAg. W grupie pacjentów z qHBs ≥ 3 log IU/ml mediana spadku qHBsAg w trakcie leczenia wynosiła 0,155 IU/ml/rok, a w grupie z wyjściowym poziomem qHBs ≤ 3 IU/ml – 0,039 log IU/ml/rok. Stwierdzono tak-

że, że w grupie pacjentów poddanych trzyletniej obserwacji spadek stężenia HBs był największy w pierwszym roku terapii – odpowiednio w 1., 2. i 3. roku mediana spadku wynosiła 0,220; 0,136 i 0,081 log IU/ml/rok.

Wyłumaczeniem dla bardzo dynamicznego spadku qHBs w pierwszym roku leczenia tenofowirem jest mechanizm jego działania, powodujący zdecydowane obniżenie wirerii następujące w pierwszym roku leczenia. Cząsteczki HBV są wydzielane do krążenia obwodowego w postaci wirionów HBV DNA oraz pustych HBsAg *subviral particles*. Za wysokie stężenie qHBs odpowiada wysoka wiremia HBV DNA wraz z wysokim potencjałem replikacyjnym HBV, więc w momencie jej nasilonej redukcji obserwujemy także spadek stężenia qHBs. Natomiast w trakcie dalszego leczenia tenofowirem w minimalnym stopniu wpływa on zarówno na transkrypcję HBsAg z cccDNA lub zintegrowanego HBV DNA, jak i na wydzielanie pustych *subviral particles*. Co więcej, w trakcie terapii AN preferowane jest odtwarzanie cccDNA, a nie obwodowa sekrecja HBV.

W innym badaniu 48-tygodniowej obserwacji poddano 95 HBeAg-dodatnich pacjentów leczonych tenofowirem. Supresja HBV DNA w tym czasie wystąpiła u wszystkich osób, a spadek HBs wynosił 0,92 log(10) IU/ml i był silniej wyrażony u pacjentów, u których doszło do serokonwersji w układzie „s” lub „e” oraz u pacjentów zakażonych genotypem A niż D. Nie zidentyfikowano jednak żadnych czynników wyjściowych w trakcie terapii, które mogłyby zapowiadać utratę antygenu „e” lub „s”. Zgodnie z wynikami poprzednich obserwacji pacjentów leczonych AN nie stwierdzono korelacji pomiędzy qHBs a HBV DNA (24).

Badanie przeprowadzone przez Chena i wsp. (30) wskazuje, że stężenie HBsAg może stanowić marker reaktywacji zakażenia po zakończeniu terapii entekawirem zgodnie z rekomendacjami zaproponowanymi przez APASL 2012 (31). W pracy tej ocenie poddano 126 chorych z PZW B (86 HBeAg-ujemnych i 40 HBeAg-dodatnich), leczonych entekawirem przez okres 78-274 tygodni (mediana 156 tygodni). Wykazano, że stężenie HBsAg 250 IU/mL po zakończeniu leczenia jest niezależnym czynnikiem niepowodzenia wirusologicznego i może być przydatnym predyktorem reaktywacji HBV po zakończeniu leczenia entekawirem.

W przeciwieństwie do leczenia interferonem, w terapii AN nie opracowano dotychczas pewnych reguł pozwalających na wczesną identyfikację pacjentów z niskim prawdopodobieństwem pozytywnej odpowiedzi na leczenie.

PODSUMOWANIE

Stopniowy spadek qHBs jest dobrym wyznacznikiem skuteczności leczenia, podczas gdy jego stabilny poziom sugeruje brak efektywności terapii. Łatwa dostępność pomiaru ilościowego stężenia qHBs i niski koszt badania zapewniają powszechne użycie metody. Możliwość oceny tego parametru zmieniła oblicze terapii interferonem, umożliwiając zindywidualizowaną terapię, dostosowaną do kon-

kretnego pacjenta. Pozwoliła także na wyodrębnienie z grupy HBeAg-ujemnych pacjentów, chorych z aktywnym zapaleniem wątroby wymagających leczenia lub dokładniejszej obserwacji. Z przeprowadzonych badań wynika, że qHBs w połączeniu z wiremią HBV jest przede wszystkim ważnym predyktorem odpowiedzi na leczenie u chorych

HBe(+), leczonych PEG-IFN. Przydatność rokownicza tego parametru u chorych HBeAg(-) leczonych analogami nukleoz(ty)dowymi wymaga natomiast dalszych badań. Być może ilościowa ocena stężenia HBsAg pozwoli także w świetle dalszych badań na określenie momentu zakończenia terapii AN w przyszłości.

PIŚMIENNICTWO

- Brunetto MR, Oliveri F, Coco B et al.: Outcome of anti-HBe positive chronic hepatitis B in alpha-interferon treated and untreated patients: a long term cohort study. *J Hepatol* 2002 Feb; 36(2): 263-270.
- Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S et al.: Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004 Jun; 126(7): 1750-1758.
- Wurstthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M et al.: Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2006 Sep; 44(3): 675-684.
- Reijnders JG, Rijckborst V, Sonneveld MJ et al.: Kinetics of hepatitis B surface antigen differ between treatment with peginterferon and entecavir. *J Hepatol* 2011 Mar; 54(3): 449-454. doi: 10.1016/j.jhep.2010.07.046. Epub 2010 Nov 5.
- Chan HL, Wong VW, Wong GL et al.: A longitudinal study on the natural history of serum hepatitis B surface antigen changes in chronic hepatitis B. *Hepatology* 2010 Oct; 52(4): 1232-1241. doi: 10.1002/hep.23803.
- Nguyen T, Thompson AJ, Bowden S et al.: Hepatitis B surface antigen levels during the natural history of chronic hepatitis B: a perspective on Asia. *J Hepatol* 2010 Apr; 52(4): 508-513. doi: 10.1016/j.jhep.2010.01.007. Epub 2010 Feb 16.
- Jaroszewicz J, Calle Serrano B, Wurstthorn K et al.: Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. *J Hepatol* 2010 Apr; 52(4): 514-522. doi: 10.1016/j.jhep.2010.01.014. Epub 2010 Feb 13.
- EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection 2012.
- Tseng TC, Liu CJ, Yang HC et al.: Serum hepatitis B surface antigen levels help predict disease progression in patients with low hepatitis B virus loads. *Hepatology* 2013 Feb; 57(2): 441-450. doi: 10.1002/hep.26041. Epub 2012 Dec 6.
- Martinot-Peignoux M, Lapalus M, Lauouéan C et al.: Prediction of disease reactivation in asymptomatic hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients using baseline serum measurements of HBsAg and HBV-DNA. *J Clin Virol* 2013 Oct; 58(2): 401-407. doi: 10.1016/j.jcv.2013.08.010. Epub 2013 Aug 16.
- Chen YC, Jeng WJ, Chu CM, Liaw YF: Decreasing levels of HBsAg predict HBsAg seroclearance in patients with inactive chronic hepatitis B virus infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012 Mar; 10(3): 297-302. doi: 10.1016/j.cgh.2011.08.029. Epub 2011 Sep 3.
- Liu J, Lee MH, Batrla-Utermann R et al.: A predictive scoring system for the seroclearance of HBsAg in HBeAg-seronegative chronic hepatitis B patients with genotype B or C infection. *J Hepatol* 2013 May; 58(5): 853-860. doi: 10.1016/j.jhep.2012.12.006. Epub 2012 Dec 13.
- Martinot-Peignoux M, Lapalus M, Asselah T, Marcellin P: HBsAg quantification: useful for monitoring natural history and treatment outcome. *Liver International* 2014.
- Buster EH, Hansen BE, Lau GK et al.: Factors that predict response of patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B to peginterferon-alfa. *Gastroenterology* 2009 Dec; 137(6): 2002-2009. doi: 10.1053/j.gastro.2009.08.061. Epub 2009 Sep 6.
- Moucarri R, Mackiewicz V, Lada O et al.: Early serum HBsAg drop: a strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-negative patients. *Hepatology* 2009 Apr; 49(4): 1151-1157. doi: 10.1002/hep.22744.
- Rijckborst V, Hansen BE, Cakaloglu Y et al.: Early on-treatment prediction of response to peginterferon alfa-2a for HBeAg-negative chronic hepatitis B using HBsAg and HBV DNA levels. *Hepatology* 2010 Aug; 52(2): 454-461. doi: 10.1002/hep.23722.
- Marcellin P, Bonino F, Yurdaydin C et al.: Hepatitis B surface antigen levels: association with 5-year response to peginterferon alfa-2a in hepatitis B e-antigen-negative patients. *Hepatol Int* 2013 Mar; 7(1): 88-97. Epub 2012 Mar 23.
- Brunetto MR, Marcellin P, Cherubini B et al.: Response to peginterferon alfa-2a (40K) in HBeAg-negative CHB: on-treatment kinetics of HBsAg serum levels vary by HBV genotype. *J Hepatol* 2013 Dec; 59(6): 1153-1159. doi: 10.1016/j.jhep.2013.07.017. Epub 2013 Jul 18.
- Gane E, Jia J, Han K et al.: Neptune study: On-treatment HBsAg level analysis confirms prediction of response observed in phase 3 study of peginterferon alfa-2A in HBeAg-positive patients. *EASL 46th Annual Meeting March 30th-April 3rd 2011, Berlin, Germany*.
- Sonneveld MJ, Rijckborst V, Boucher CA et al.: Prediction of sustained response to peginterferon alfa-2b for hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using on-treatment hepatitis B surface antigen decline. *Hepatology* 2010 Oct; 52(4): 1251-1257. doi: 10.1002/hep.23844.
- Piratvisuth T, Marcellin P: Further analysis is required to identify an early stopping rule for peginterferon therapy that is valid for all hepatitis B e antigen-positive patients. *Hepatology* 2011 Mar; 53(3): 1054-1055; author reply: 1055. doi: 10.1002/hep.24136.
- Sonneveld MJ, Hansen BE, Piratvisuth T et al.: Response-guided peginterferon therapy in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using serum hepatitis B surface antigen levels. *Hepatology* 2013 Sep; 58(3): 872-880. doi: 10.1002/hep.26436. Epub 2013 Jul.
- Chevaliez S, Hézode C, Bahrami S et al.: Long-term hepatitis B surface antigen (HBsAg) kinetics during nucleoside/nucleotide analogue therapy: finite treatment duration unlikely. *J Hepatol* 2013 Apr; 58(4): 676-683. doi: 10.1016/j.jhep.2012.11.039. Epub 2012 Dec 3.
- Gish RG, Chang TT, Lai CL et al.: Quantitative hepatitis B surface antigen analysis in hepatitis B e antigen-positive nucleoside-naive patients treated with entecavir. *Antivir Ther* 2013; 18(5): 691-698. doi: 10.3851/IMP2559. Epub 2013 Mar 19.
- Reijnders JG, Rijckborst V, Sonneveld MJ et al.: Kinetics of hepatitis B surface antigen differ between treatment with peginterferon and entecavir. *J Hepatol* 2011 Mar; 54(3): 449-454. doi: 10.1016/j.jhep.2010.07.046. Epub 2010 Nov 5.
- Seto WK, Wong DK, Fung J et al.: Reduction of hepatitis B surface antigen levels and hepatitis B surface antigen seroclearance in chronic hepatitis B patients receiving 10 years of nucleoside analogue therapy. *Hepatology* 2013 Sep; 58(3): 923-931. doi: 10.1002/hep.26376. Epub 2013 Jul 24.
- Manesis EK, Hadziyannis ES, Angelopoulou OP, Hadziyannis SJ: Prediction of treatment-related HBsAg loss in HBeAg-negative chronic hepatitis B: a clue from serum HBsAg levels. *Antivir Ther* 2007; 12(1): 73-82.
- Seto WK, Wong DK, Fung J et al.: A large case-control study on the predictability of hepatitis B surface antigen levels three years before hepatitis B surface antigen seroclearance. *Hepatology* 2012 Sep; 56(3): 812-819. doi: 10.1002/hep.25718. Epub 2012 Jul 10.
- Seto WK, Liu K, Wong DK et al.: Patterns of hepatitis B surface antigen decline and HBV DNA suppression in Asian treatment-experienced chronic hepatitis B patients after three years of tenofovir treatment. *J Hepatol* 2013 22 Oct; 59(4): 709-716. doi: 10.1016/j.jhep.2013.06.007. Epub 2013 Jun 17.
- Chen C, Lee C, Hung C et al.: The role of hepatitis B surface antigen quantification predict HBV reactivation after discontinuation of entecavir treatment. *Journal of Hepatology* 2014 Sept; 61(3): 515-522.
- APASL 2012 – 22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2012).