

Predyktory i wyznaczniki skutecznej terapii zakażeń HBV

Predictors and markers of effective therapy of HBV infections

Waldemar Halota

Katedra Chorób Zakaźnych i Hepatologii CM UMK, Bydgoszcz, Polska

Summary: Currently available options for the treatment chronic hepatitis B include interferon alpha and oral antiviral agents.

Pegylated interferon alpha may offer higher sustained off-therapy responses after one year. In this article were present relatively new predictors of effective therapy (HBsAg and HBeAg concentrations) and molecular aspects of HBV infection.

Słowa kluczowe: HBV • prognozowanie i ocena skuteczności terapii

Key words: HBV • prognosis and evaluation of effective treatment

Adres do korespondencji: Waldemar Halota, Katedra Chorób Zakaźnych i Hepatologii CM UMK, ul. Floriana 12, 85-030 Bydgoszcz, Polska, e-mail: kikchzak@cm.umk.pl

Wraz z postępem biologii molekularnej oraz implikacją jej metod do praktyki klinicznej, wzbogacono możliwości oceny historii naturalnej zakażeń HBV, a też wprowadzono nowe kryteria kwalifikacji do terapii i jej prognozowania. Do rutynowej pracy lekarskiej wprowadzono zupełnie nowy sposób diagnozowania, nie rezygnując z poprzednio stosowanych metod, do których należały ocena morfologiczna, biochemiczna i serologiczna, wymienionych w kolejności, w której wchodziły do praktyki klinicznej. W konsekwencji odnotowano postęp w poznaniu patomechanizmu chorób etiologii HBV oraz uzyskano nowy instrument oceniający przebieg zakażenia i skuteczność terapii. Jej głównym celem zawsze będzie interes zdrowotny pacjenta. Najbardziej obiektywnym kryterium zarówno spontanicznej, jak i farmakologicznej eliminacji zakażenia jest ustąpienie antygeny HBs. Mimo, iż nie musi to oznaczać eradykacji wirerii, jest to stan pożądany z klinicznego i epidemiologicznego punktu widzenia.

Do pośrednich celów terapii należą:

- serokonwersja HBeAg/anty-HBe;
- obniżenie stężenia HBV DNA do poziomów, w których maleje znaczenie chorobotwórcze zakażenia HBV;
- trwała normalizacja aktywności aminotransferaz;
- regresja morfologiczna choroby.

Analiza profilu serologicznego HBV stanowi tradycyjny instrument klinicznego diagnozowania tych zakażeń. Stanowi to ważne kryterium różnicowania ostrego wirusowego zapalenia wątroby od chorób przewlekłych i monitorowania ich historii naturalnej. Jak wyżej wspomniano, wykrycie antygeny

HBs w surowicy krwi, niezależnie od obecności lub braku HBeAg, zawsze jest dowodem zakażenia HBV. Gdy ustępuje, jego długotrwałym znacznikiem są izolowane przeciwciała anty-HBc w klasie IgG. Zbyt często zapominamy, że anty-HBc w klasie IgM mogą długotrwanie występować również w zakażeniach przewlekłych, co prowadzi do błędnej interpretacji ich obecności.

W ostatnich latach systematycznie powiększa się liczba terapeutyków w leczeniu tych schorzeń. Dotyczy to wprowadzonej niedawno pegylowanej postaci interferonu alfa-2a jak i analogów nukleoz(t)ydowych, których liczba systematycznie wzrasta. Uwaga klinicystów koncentruje się przede wszystkim na ustaleniu kryteriów wyboru właściwego leku oraz wczesnego przewidywania skuteczności stosowanej terapii, czyli prognozowania trwałej odpowiedzi wirusologicznej na jej wstępnym etapie. W tym kontekście główną rolę odgrywają wyniki badań molekularnych oraz wprowadzane coraz powszechniej do praktyki klinicznej ilościowe oznaczenia stężeń antygenemii HBs, rzadziej HBe, co przedstawiono poniżej.

Antygenemia HBs

Odkrycie przez Blumberga antygeny HBs (1965 r.) oraz innych, później wykrytych znaczników tego zakażenia, stworzyło możliwość opracowania profilu serologicznego zakażeń ostrych i przewlekłych. Analiza serologiczna przez wiele lat była podstawowym instrumentem rozpoznawania zakażeń HBV i śledzenia ich historii naturalnej. Przydatność kliniczna



tych badań nie straciła na znaczeniu, co więcej ich wartość wydaje się wzrastać. Dotyczy to głównie antygenu HBs, którego ilościowe oznaczenia mogą być wykorzystywane do prognozowania skuteczności terapii.

Przez długi okres uważano, że ustąpienie antygenemii HBs z surowicy krwi jest bezspornym wykładnikiem eliminacji zakażenia HBV. Okazało się, że jest to pogląd często nieuprawniony, gdyż u osób, które przebyły zakażenie HBV (są HBsAg-ujemne) wykrywa się niewielkie ilości materiału genetycznego wirusa w postaci cccDNA. Szacuje się, że liczba kopii cccDNA obniża się w tych przypadkach do około 0,002 na hepatocyt i utrzymuje długotrwale. Stwarza to ryzyko reaktywacji zakażenia HBV u osób powszechnie uważanych za zdrowe [1]. Testem surogatowym pozwalającym na wykrycie tego zagrożenia jest obecność izolowanych przeciwciał anti-HBc, aczkolwiek utajone zakażenia HBV wykrywane są również u osób bez jakichkolwiek markerów tego zakażenia.

Wykazano, że ustępowanie antygenemii HBs jest wynikiem systematycznego, niekiedy długotrwałego zmniejszania się stężeń tego antygenu. Procesy te obserwowane w trakcie i po zakończeniu leczenia mogą prognozować odległą, trwałą eliminację wirusii. Obniżenie się HBsAg poniżej 1500 IU/ml, lub o 10% w 12. lub 24. tygodniu interferonoterapii wyprzedza serokonwersję w układzie HBe. Marcellin wykazał, iż redukcja HBsAg na koniec tego leczenia jest dobrym predyktorem trwałej odpowiedzi wirusologicznej. Odszetek przypadków systematycznie narastał w czasie 5-letniej obserwacji [2,3]. Podobne wnioski wypływają również z badań Brunetto, prowadzonych wśród pacjentów HBeAg-ujemnych leczonych interferonem pegylowanym. Wykazano, że obniżenie się stężeń HBsAg o ponad $1 \log_{10}$ /IU/ml lub jego poziom poniżej 10 IU/ml w 48. tygodniu może zwiastować negatywną HBsAg w ciągu trzech lat od zakończenia terapii [4]. Z badań Moucariego i współpracowników z kolei wynika, że SVR prognozuje obniżenie się surowiczego HBsAg o $0,5 \log_{10}$ IU/ml w 12. tygodniu i o $1 \log_{10}$ w 24. tygodniu terapii. Zarówno negatywna (NPV), jak i pozytywna wartość prognostyczna (PPV) wynosiły około 90% w 12. tygodniu, wzrastając nieco w 24. tygodniu. Autorzy wskazują, że obserwacje te mają dużą przydatność dla przyszłej optymalizacji leczenia interferonem pegylowanym alfa-2a [5].

Wykazano ponadto, że kinetyka stężeń HBsAg w przebiegu leczenia interferonem pegylowanym alfa-2a pozostaje w związku z genotypem HBV; największa redukcja HBsAg występowała w przypadku genotypu A, najniższa w przypadku genotypu C i E [6].

Antygenemia HBe

Ustąpienie antygenu HBe, a zwłaszcza jego serokonwersja do przeciwciał, przez wiele lat było celem i dowodem sukcesu terapeutycznego. Obecnie wiadomo, że dochodzi do niego najczęściej, gdy wirus HBV obniży się, co najmniej do poziomu 10^4 kopii/ml. Podkreśla się jednak, że u osób HBeAg-ujemnych występować mogą zmienne stężenia HBV DNA, stąd niewykrywanie HBeAg w surowicy krwi nie może być jednoznacznym kryterium różnicowania nieaktywnych nosicieli od HBe-ujemnych chorych [7]. U części chorych z nieobecny HBeAg w surowicy krwi utrzymuje się wirus i aktywność biochemiczna choroby. Wśród pozostałych, u 10–20% zdarzają się przypadki reserokonwersji, zwłaszcza wśród leczonych wcześniej „analogami”. Występuje to częściej

w przypadkach wysokiej aktywności aminotransferaz, a też u kobiet i osób w starszym wieku [8–10].

Serokonwersja HBeAg do anti-HBe pociąga za sobą zwolnienie dynamiki choroby. Obniżona replikacja HBV i aktywność biochemiczna wyprzedzają regresję lub spowolnienie progresji zmian histologicznych w wątrobie [11]. Częściej w tych przypadkach dochodzi do ustępowania antygenemii HBs w surowicy krwi, zwłaszcza gdy wystąpi ona przed 32. tygodniem terapii. Utożsamianie serokonwersji HBe z „nosiicielstwem HBsAg” nie wydaje się zawsze uprawnione, gdyż chory może być nadal zagrożony ryzykiem przewlekłych następstw chorobowych.

W ślad za ilościowymi oznaczeniami HBsAg podejmuje się próby analizowania stężeń antygenemii HBe do prognozowania terapii antywirusowej. Jego wysokie stężenia mają być negatywnym predyktorem serokonwersji do anti-HBe. Brakuje jednak wystandaryzowanych technik badawczych, a znaczenie praktyczne tych badań ograniczają choroby HBeAg-minus.

Odrębnym problemem wykraczającym poza powyższe rozważania są mutanty e-minus. Mutanty pre-core stop codon (G1896A) i basal core promotor są główną przyczyną upośledzenia zdolności syntezy antygenu HBe. Występują one w zakażeniach genotypami B, C i D. Genotyp D wirusa HBV dominujący w Basenie Morza Śródziemnego jest odpowiedzialny za 90% wykrywanych tam zakażeń HBV z nieobecnym antygenem HBe [12].

Diagnostyka molekularna

Stężenia HBV DNA mogą się zmieniać w zależności od etapu historii naturalnej zakażenia HBV. Zagrożenia marskości i rakiem wątrobowo-komórkowym narastają równoległe do ich wysokości, stąd pośrednim celem terapii jest obniżenie tych wartości do poziomów niewykrywalnych. HBV DNA jest podstawowym markerem wirusii, stąd badania te są rutynowo wykorzystywane w monitorowaniu terapii. Dodatni wynik badania u leczonych, jest pierwszym zwiastunem lekooporności, dowodem utraty kontroli farmakologicznej nad replikacją HBV. Dopiero później dochodzi do manifestacji biochemicznej, a następnie klinicznej tego „przełomu”. Niewykrywanie kwasów nukleinowych tego wirusa po zakończonej terapii jest podstawowym kryterium trwałej odpowiedzi wirusowej. Niekiedy, zwłaszcza w przypadkach interferonoterapii, badania te prowadzi się przez lata od zakończenia leczenia.

HBV DNA może być również wykorzystywany do prognozowania skuteczności terapii. Gdy był nieobecny w 24. tygodniu terapii pegylowanym interferonem alfa-2a (<1000 k/ml), to u ponad 60% był predyktorem trwałej odpowiedzi wirusowej (SVR) [13,14]. Wykazano, że całkowity wewnątrzwątrobowy ładunek HBV DNA jest skorelowany z wielkością stężeń HBV DNA w surowicy krwi oraz wewnątrzwątrobowym cccDNA [15,16]. Niewykrywanie HBV DNA, podobnie jak nieobecność antygenemii HBs, nie jest pewnym dowodem eliminacji wirusii HBV, gdyż jak wspomniano, u osób po przebytych zakażeniu często pozostaje materiał genetyczny wirusa HBV w hepatocytach. Często pozostaje to w związku ze śladową replikacją.

cccDNA (*covalently, closed, circular DNA* – kolistą, kowalentnie zamkniętą nić DNA) jest stabilną cząstką genomu HBV DNA.

W postaci wolnego minichromosomu lub episomu występuje w jądrze hepatocytu. W przebiegu zakażenia, w pojedynczej komórce może występować do 50 takich kopii, przy czym liczba ich zmniejsza się równoległe do procesu zdrowienia. cccDNA może być wzorcem replikacyjnym, źródłem reaktywacji przebytego zakażenia. Wykazuje też aktywność enzymatyczną i modyfikuje program transkrypcyjny zaburzając replikację HBV. W procesie tym prawdopodobnie biorą udział różnorodne czynniki, przy czym obecnie za najważniejszy z nich uważa się białko p53 (*tumor suppressor protein*) oraz interferon gamma i cytokiny ważne składowe elementy układu odpornościowego. cccDNA jest niezależnym od zintegrowanej postaci HBV DNA czynnikiem ryzyka hepatokarcynogenezy.

Prawdopodobnie minichromosom przyczynia się do podtrzymywania pamięci immunologicznej, chroniąc przed kolejnym zakażeniem HBV.

Utajone zakażenia HBV mogą być niekiedy wynikiem nadkażeń innymi patogenami. Prawdopodobnie do upośledzenia replikacji HBV prowadzą białka rdzeniowe HCV. Podobne zjawisko obserwowano u zakażonych HBV myszy transgenicznych, kiedy nadważono je *Schistosoma mansoni*.

Wykazano, że nawet śladowa replikacja HBV może być źródłem włóknienia oraz przewlekłych reakcji zapalnych w wątrobie. W tych przypadkach szczególnym zagrożeniem jest dołączenie się dodatkowego czynnika hepatotoksycznego, dynamizującego proces chorobowy. Prawdopodobnie takie zjawisko występuje w części przypadków tak zwanych kryptogennych chorób wątroby. Z badań prowadzonych nad zwierzęcymi wirusami Hepadna wynika, że występowanie cccDNA stwarza ryzyko wertykalnej transmisji tych zakażeń. Obecność HBV DNA w surowicy krwi często jest utożsamiana z potencjalną zakaźnością, jednakże może być wykrywana również przy amplifikacji genomów defektywnych, stąd niektórzy uważają go za test surogatowy.

Aspekty terapeutyczne

Powyższe rozważania nie dotyczą w identycznym stopniu wszystkich leków rekomendowanych obecnie do leczenia zakażeń HBV [17,18]. Kryteria prognozowania skuteczności terapii interferonu i grupy „analogów” nie pokrywają się. Wspólne są natomiast zasady rozpoznawania trwałej odpowiedzi wirusowej.

Piśmiennictwo:

1. Hoofnagle JH: Reactivation of hepatitis B. *Hepatology*, 2009; 49: S156-65
2. Marcellin P i wsp.: HBsAg clearance continues to increase after the end of treatment with PEGASYS ± lamivudine: 5-year follow-up study in patients with HBeAg-negative disease. APASL 2009; Hong Kong, China
3. Marcellin P, Pitavtvisuth T, Brunetto M i wsp.: Increasing Rates of HBsAg Clearance and Seroconversion in Patients With HBeAg-Negative Disease Treated With Peginterferon Alfa-2a + Lamivudine: Results of 5-Year Post-Treatment Follow-up. 44th EASL 2009, Copenhagen, 0421
4. Brunetto MR, Moriconi F, Bonino F i wsp.: Hepatitis B virus surface antigen levels: a guide to sustained response to peginterferon alfa-2^o in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2009; 49: 1141-50
5. Moucari R, Mackiewicz V, Lada O i wsp.: Early Serum HBsAg Drop: A Strong Predictor of Sustained Virological Response to Pegylated Interferon Alfa-2^a in HBeAg-negative Patients. *Hepatology*, 2009; 49: 1151-57
6. Mounari R, Martinat-Peignoux M, Mackiewicz V i wsp.: Influence of genotype on hepatitis B surface antigen kinetics in hepatitis B e antigen-negative patients treated with pegylated interferon-alfa-2a. *Antiviral Therapy*, 2009; 14: 1183-88
7. Chu CJ, Hussain M, Lok ASF: Quantitative Serum HBV DNA Levels During Different Stages of Chronic Hepatitis B Infection. *Hepatology*, 2002; 36: 1408-15
8. McMahon BJ, Holck P, Bulkow L, Snowball M: Serologic and clinical outcomes of 1536 Alaska natives chronically infected with hepatitis B virus. *Ann Intern Med.*, 2001; 135: 759-68
9. Yuen MF, Yuan HJ, Hui CK i wsp.: A large population study of spontaneous HBeAg seroconversion and acute exacerbation of chronic hepatitis B infection: implications for antiviral therapy. *Gut*, 2003; 52: 416-19
10. Liaw YF: Hepatitis flares and hepatitis B e antigen seroconversion: implication in anti-hepatitis B virus therapy. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003; 18: 246-52
11. Marcellin P: Management of Patients with Viral Hepatitis. APMAHV, Paris 2004



12. Halota W, Pawłowska M: Strategie leczenia przewlekłych zakażeń etiologii HBV. *Med Sci Rev Hepatologia*, 2005; 5: 91–94
13. Chan HLY, Wong VWS, Chim AML i wsp.: Treatment of patients with chronic hepatitis B who have failed previous antiviral treatment with pegylated interferon alpha2a (40 kda; PEGASYS). *Antivir Ther*, 2008; 13: 555–62
14. Moucari R, Mackiewicz V, Lada O i wsp.: Early serum HBsAg drop: a strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alpha-2a in HBeAg-negative patients. *Hepatology*, 2009; 49: 1151–57
15. Chan HLY, Wong VWS, Tse AM i wsp.: Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007; 5: 1462–68
16. Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S i wsp.: Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology*, 2004; 126: 1750–58
17. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol*, 2009; 50: 227–42
18. Juszczyk J, Boroń-Kaczmarek A, Ciancia J i wsp.: Polska Grupa Ekspertów HBV: Zalecenia terapeutyczne na rok 2009. Leczenie przeciwwirusowe przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B. *Zakażenia*, 2009; 3: 70–72
19. Bonino F, Marcellin P, Lau GK i wsp.: Predicting response to peginterferon alpha-2a, lamivudine and the two combined for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Gut*, 2007; 56: 699–705
20. Wong GLH, Chan HLY: Predictors of Treatment Response In Chronic Hepatitis B. *Drugs*, 2009; 69(16): 2167–77
21. Liaw YF, Leung NW, Kao JH i wsp.: Asian-pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2008 update. *Hepatol Int*, 2008; 2: 263–83
22. Zeuzen S, Game E, Liaw YF i wsp.: Baseline characteristics and early on-treatment response predict the outcomes of 2 year of telbivudine treatment of chronic hepatitis B. *J Hepatol*, 2009; 51: 11–20
23. Lim SG, Marcellin P, Tassopoulos N i wsp.: Clinical trial: Effects of adefovir dipivoxil therapy in Asian and Caucasian patients with chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007; 26: 1419–28