

НОВИ СЕРУМНИ БИОМАРКЕРИ ЗА ОТГОВОР НА ЛЕЧЕНИЕТО С НУКЛЕОЗИДНИ/НУКЛЕОТИДНИ АНАЛОЗИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧЕН ХЕПАТИТ В - ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Йоана Стоянова^{1,2}

¹Клиника по гастроентерология, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна

²Втора катедра по вътрешни болести, Факултет по медицина,
Медицински университет – Варна

NOVEL SERUM BIOMARKERS FOR RESPONSE TO NUCLEOSIDE/NUCLEOTIDE ANALOGUE THERAPY IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B— A LITERATURE REVIEW

Yoana Stoyanova^{1,2}

¹Gastroenterology Clinic, St. Marina University Hospital, Varna

²Second Department of Internal Diseases, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

По данни на СЗО 296 милиона души са живели с хронична инфекция с вируса на хепатит В (HBV) през 2019 г., с около 1,5 милиона нови инфекции всяка година. През 2019 г. HBV е довел до приблизително 820 000 смъртни случая, предимно вследствие на усложнения - цироза и хепатоцелуларен карцином (първичен рак на черния дроб). Продължават да съществуват големи пропуски в откриването и лечението на HBV, като приблизително 10% от хронично заразени лица са диагностицирани в световен мащаб и само 2% от тях са на лечение.

Съвременният подход в лечение на хроничния хепатит В (ХХ-В) е посредством нуклеозидни/нуклеотидни аналози (NUCs), които успешно потискат вирусната репликация, но не водят до пълно излекуване, дефинирано като сероклирънс на повърхностния антиген на HBV (HBsAg), в комбинация с неоткриваема HBV DNA, 24 седмици след спиране на терапията с NUCs. Предвид ниския процент на сероклирънс на HBsAg на фона на дългогодишно лечение с NUCs се смята, че образуването на HBsAg е независимо от вирусната репликация. Източниците на продукция на HbsAg са 1.) ковалентно-свързана кръгла ДНК (ccc DNA) в ядрото на хепатоцита; и 2.) интегрираните в генома на хепатоцитите последователности от HBV DNA.

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), 296 million people were living with chronic hepatitis B virus (HBV) infection in 2019, with about 1.5 million new infections each year. In 2019, HBV caused approximately 820,000 deaths, mostly from complications of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (primary liver cancer). Large gaps in HBV detection and treatment continue to exist, with approximately 10% of chronically infected individuals diagnosed worldwide and only 2% of these receiving treatment.

The current approach in the treatment of chronic hepatitis B (CHB) is with nucleoside/nucleotide analogues (NUCs), which successfully suppress viral replication but do not lead to a complete cure, defined as HBV surface antigen (HBsAg) seroclearance in combination with undetectable HBV DNA, 24 weeks after stopping NUCs therapy. Given the low rate of HBsAg seroclearance during long-term treatment with NUCs, HBsAg formation is considered to be independent of viral replication. The sources of HBsAg production are 1) covalently closed circular DNA (ccc DNA) in the hepatocyte nucleus and 2) HBV DNA sequences integrated into the hepatocyte genome.

In view of this, it is considered that new serum biomarkers are needed to better assess the course of the disease since routine biomarkers, such as HBV DNA load, used in monitoring chronic HBV infection do not

Предвид това се смята, че са необходими нови биомаркери за по-добра оценка на хода на заболяването, тъй като рутинните биомаркери, какъвто е HBV DNA, използвани в мониториране на хроничната HBV инфекция, не дават достатъчна информация по отношение на активността на HBV. Обсъждат се количествен анализ на HBsAg (qHBsAg), HBV RNA и HBcrAg, които са предложени като сурогатни маркери на активността на HBV. Литературният анализ на публикации, свързани с новите сурогатни маркери, показва обещаващи резултати за qHBsAg, HBV RNA и HBcrAg.

Предвид информацията, която новите серумни биомаркери дават за пациенти на дълготрайна терапия с NUCs, се коментира, че с оглед да се постигне „функционално излекуване“, вероятно ще бъде необходима комбинация от агенти, включващи антивирусен агент, агент за потискане на HBsAg и имуномодулатор за засилване на имунния отговор. Те трябва да са безопасни, с ограничена продължителност на лечението и на достъпна цена.

Ключови думи: хроничен хепатит В, нуклеозидни/нуклеотидни аналози, нови серумни биомаркери, qHBsAg, HBV RNA, HBcrAg

ВЪВЕДЕНИЕ

По данни на СЗО 296 милиона души са живели с хронична инфекция с вируса на хепатит В (HBV) през 2019 г., с около 1,5 милиона нови инфекции всяка година. През 2019 г. HBV е довел до приблизително 820 000 смъртни случая, предимно вследствие на усложнения - цироза и хепатоцелуларен карцином (първичен рак на черния дроб). Продължават да съществуват големи пропуски в откриването и лечението на HBV, като приблизително 10% от хронично заразени лица са диагностицирани в световен мащаб и само 2% от тях са на лечение (2). В България разпространението на хроничната инфекция с HBV е 3,9% (12,10). 85% от пациентите са с отрицателен „е“ антиген на HBV (HBeAg), а 100% от пациентите са с генотип D, който се свързва с по-често прогресиране до цироза и хепатоцелуларен карцином (13,8). Съвременният подход в лечение на хроничния хепатит В (ХХ-В) е посредством нуклеозидни/нуклеотидни аналози (NUCs), които успешно потискат вирусната репликация, но не водят до пълно излекуване. Постигането на сероклирънс на повърхностния антиген

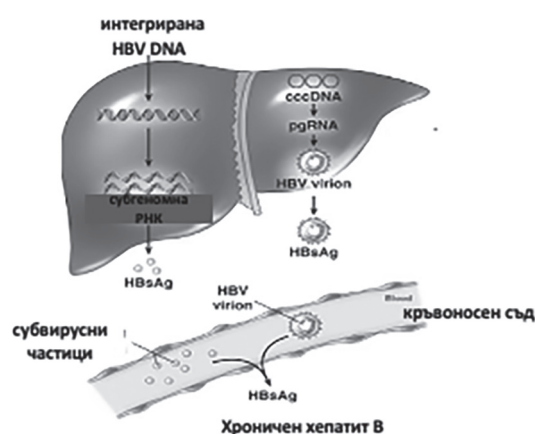
provide sufficient information regarding HBV activity. Quantitative analysis of HBsAg (qHBsAg), HBV RNA, and HBcrAg, which have been proposed as surrogate markers of HBV activity, is discussed. Literature analysis of publications related to the novel surrogate markers showed promising results for qHBsAg, HBV RNA, and HBcrAg.

Given the information that new serum biomarkers provide for patients on long-term NUC therapy, it is being discussed that, in order to achieve a 'functional cure', a combination of agents, including an antiviral agent, an HBsAg-suppressing agent, and an immunomodulator for enhancing the immune response, will be needed. They should be safe, with a limited duration of treatment, and affordable.

Keywords: chronic hepatitis B, nucleoside/nucleotide analogues, novel serum biomarkers, qHBsAg, HBV RNA, HBcrAg

на HBV (HBsAg), в комбинация с неоткриваема HBV DNA, 24 седмици след спиране на терапията с NUCs, се включва в дефиницията на т.нар. функционално излекуване от ХХ-В(17,5). След 48 или 52-седмично лечение на HBeAg (+) пациенти с NUCs с висока бариера на резистентност към вирусни мутации, каквито са ентекавир и тенофовир (ETV и TDF), 2% и 3% са със сероклирънс на HBsAg, съответно, докато за същия период на лечение сред групата на HBeAg (-) пациентите 0% са със сероклирънс на HBsAg. Математически модел е изчислил, че 30–40 години лечение с NUCs ще са необходими за сероклирънс на HBsAg и сероконверсия (4). При остър хепатит В и при HBeAg (+) хронична HBV инфекция равнището на HBsAg (qHBsAg) е пропорционално на нивото на HBV DNA. При HBeAg негативна хронична HBV инфекция и при HDV това съответствие често не се наблюдава, тъй като в тези случаи образуването на HBsAg е независимо от вирусната репликация. Обяснение за това са източниците на продукция на HBsAg: 1.) ковалентно-свързана кръгла ДНК (ccc DNA) в ядрото на хепатоцита; и 2.) интегрираните в генома на хе-

патоцитите последователности от HBV DNA (3) (фиг. 1).



Фиг. 1. Източници на HBsAg

Предвид това и факта, че процентът на сероклирънс на HBsAg на фона на дългогодишна терапия с NUCs е много нисък, се смята, че са необходими нови биомаркери за по-добра оценка на хода на заболяването. Обсъждат се количествен анализ на HBsAg (qHBsAg), HBV RNA и HBcrAg, които са предложени като сурогатни маркери на активността на HBV, различни от HBV DNA.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Извършихме литературен анализ с помощта на PubMed на публикации, свързани с новите сурогатни маркери за оценка активността на HBV в хода на хронична инфекция, каквито са количественият анализ на HBsAg (qHBsAg), HBV RNA и HBcrAg.

РЕЗУЛТАТИ

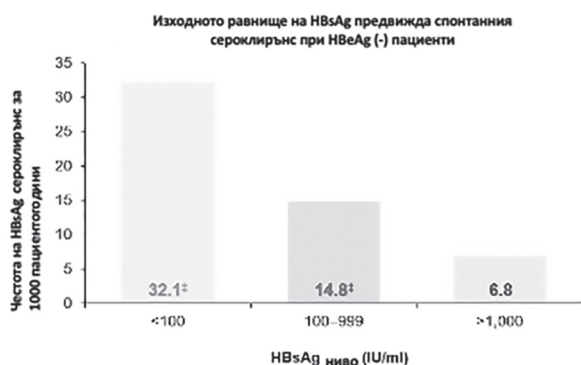
HBsAg е структурен компонент на вириона, както и на субвирусните частици (2 вида - сфери и филаменти). Трите HBV повърхностни протеина - голям, среден и малък повърхностен протеин (LHBs, MHBs и SHBs), се транслират от две различни информационни РНКи (mRNAs): LHBs се транслират от иницираната от preS1 промотор 2,4 kb субгеномна РНК; MHBs и SHBs се транслират от иницираната от preS2 промотор 2.1 kb субгеномна РНК. Субгеномните РНК и от 2,4 и 2,1 kb споделят един и същ 3' край и се различават само по дължина, поради разликите в 5' края, което води до различни аминокиселинни, но идентични карбокси-терминални области на трите повърхностни антигена. Следователно LHBs съдържат preS1+preS2+S (389 или 400 aa ос-

татъка), MHBs съдържат preS2 + S (281 aa остатъка), а SHBs съдържат само S домейна (226 aa остатъка). За зрели/способни да инфектират вириони LHBs, MHBs и SHBs присъстват в обвивките в съотношение приблизително 1:1:4. В допълнение основната част от SHBs образува субвирусни частици (нишки и сфери) заедно с второстепенните части на LHBs и/или MHBs (25). Ниското равнище на M-HBs е предиктор за HBsAg сероклирънс. Pfefferkorn et al. ретроспективно анализират общо 83-ма пациенти. Загуба на HBsAg е постигната при 17/64-има пациенти по време на лечение с NUCs и 3/19 пациенти след лечение с пегилиран интерферон-алфа 2a (PEG-IFN) в продължение на 48 седмици. LHBs, MHBs и SHBs са количествено определени в серумите на пациентите, взети преди и по време на лечението. Преди лечението средните нива на MHBs са значително по-ниски при пациенти с последваща загуба на HBsAg отколкото при тези без ($p=0,005$). По време на лечението пропорциите на MHBs и LHBs показват бърз спад при пациенти със загуба на HBsAg, но не и при пациенти със сероконверсия само на HBeAg или пациенти без серологичен отговор. MHBs са неоткриваеми до 6-ия месец от лечението с NUCs при всички пациенти със сероклирънс на HBsAg, която настъпва средно $12,8 \pm 8,7$ (0–52) месеца преди загубата на общия HBsAg. Равнището на MHBs е най-добрият ранен предиктор за сероклирънс на HBsAg преди лечение с NUCs ($AUC=0,726$, $p=0,019$). При пациенти, постигнали сероклирънс на HBsAg с PEG-IFN, пропорциите на MHBs и LHBs показват сходна кинетика (19).

Количественият общ HBsAg е различен в различните фази на ХХ-В. Meier et al. разглежда 38 пациенти в HBeAg-отрицателна фаза на заболяването. Съгласно настоящите насоки на европейската асоциация за изучаване на черния дроб (EASL) 24 и 14 от тези пациенти са били съответно с HBeAg-отрицателна хронична инфекция и HBeAg-отрицателен ХХ-В. Не се открива корелация ($r=0,248$, $p=0,14$) между вирусния товар и честотата на HBsAg-позитивните хепатоцити в тази група пациенти с HBeAg (-). Всъщност някои пациенти с HBeAg-отрицателна хронична инфекция са имали >90% HBsAg-позитивни хепатоцити въпреки много ниската виремия. Производството на HBsAg е отделено от вирусната репликация при такива пациенти (16). Пациентите с HBeAg (+) ХХ-В са с повече от три пъти по-високи изходни нива на qHBsAg в сравнение с пациентите с HBeAg (-) ХХ-В. Освен това намаляването на равнището на qHBsAg на фона на

терапия с NUCs е по-значително при пациенти с HBeAg (+) XX-B в сравнение с тези с HBeAg (-) XX-B (18). Сред пациентите с HBeAg (+) XX-B, на дълготрайна терапия с NUCs, най-силните предиктори за сероклирънс на HBsAg са бяла раса, генотип A/D, продължителност на инфекцията ≤ 4 години и понижение на qHBsAg от $\geq 1 \log_{10}$ IU/ml на 24-тата седмица от началото на терапията (15).

Изходното изследване на qHBsAg също може да предвиди отговора на антивирусното лечение, когато граничните стойности (cut-off стойности) са от порядъка на 50–100 IU/ml. Гранична стойност на qHBsAg от < 50 IU/mL осигурява 100% чувствителност и 92% специфичност при прогнозиране на HBsAg сероклирънс. Нивото на qHBsAg в единично изследване сред HBeAg-отрицателни пациенти с XX-B с ниски нива на HBV DNA на изходно ниво не е предсказващ маркер за спонтанен сероклирънс при т.нар. неактивни носители. Въпреки това той точно прогнозира спонтанен HBsAg сероклирънс на 24 месеца от начало на терапията (фиг. 2) (22).

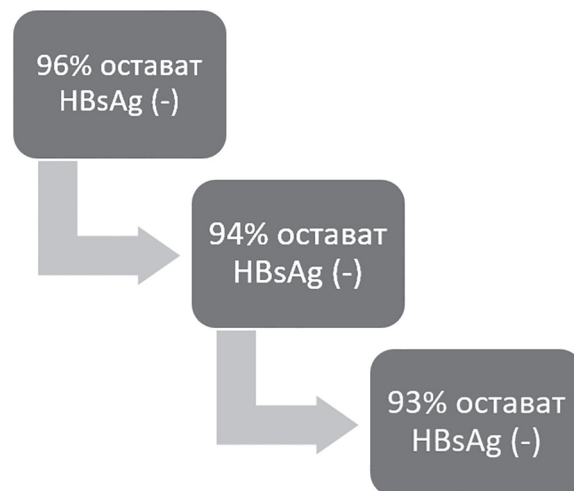


Фиг. 2. Изходно равнище на HBsAg предвижда спонтанен сероклирънс при HBeAg (-) пациенти

Високото равнище на HBsAg подчертава и ролята му на имуномодулатор при HBV инфекция. То е белег за изчерпване на активността на CD4+T-Ly (Т-лимфоцити) и за дисфункция на B-Ly (В-лимфоцити). Хроничното персистиране на високо равнище на HBsAg може да направи HBV-специфичните имунни клетки прекалено активирани и функционално толерантни (11).

Важно е да се обърне внимание, че при регистрирането на еднократно отрицателен HBsAg спонтанно или на фона на лечение с NUCs е необходимо проследяване по отношение на qHBsAg, с разлика от 6 месеца между изследванията. Данните от различни проучвания показват висока трайност на спонтанния и свързания с лечение-

то сероклирънс на HBsAg. На фона на над 5-годишно проследяване след постигнат сероклирънс на HBsAg 93% от пациентите остават с отрицателен HBsAg (26) (фиг. 3).



Фиг. 3. Трайност на сероклирънса на HBsAg на фона на над 5-годишно проследяване

В последно време, предвид ниския процент на пациенти, постигащи сероклирънс на HBsAg, се говори за т.нар. частично излекуване от XX-B-HBsAg < 100 IU/ml и HBV DNA под долната граница на откриване, 24 седмици след спиране на терапията (5). Обсъжда се и какъв би бил ефектът от преустановяване на дългогодишната терапия с NUCs при пациенти с HBeAg (-) XX-B, постигнали вирусна супресия. STOP-NUC, RETRACT B и CREATE отчитат значително по-висок процент на сероклирънс на HBsAg при пациенти с HBeAg (-) XX-B и недоловима HBV DNA, преустановили терапията, в сравнение с пациенти, които продължават лечението с NUCs (табл. 1) (23,6,20).

Фактът, че qHBsAg не дава достатъчна информация по отношение на пула на cccDNA и интегрираната в генома на гостоприемника HBV DNA, наложи търсенето на други серумни биомаркери, каквито са HBV RNA и HBcrAg. Серумният HBcrAg е нов биомаркер за оценка на интрахепаталната вирусна репликация. HBcrAg включва няколко антигена, експресирани от precore/-core гена: HBcAg, HBeAg и прекурсорен протеин preC22. Свързаните с HBcrAg протеини могат също да бъдат открити в частиците на Дейн, както и в HBV DNA отрицателните частици на Дейн, а вероятно също и в прегеном-на РНК (pgRNA), съдържаща вириони. Маркерът не се припокрива с количественото определяне на HBsAg и за разлика от HBsAg количественото определяне на HBcrAg не се влияе от трансла-

Табл. 1. Равнницето на HBsAg може да предскаже вероятността от функционално излекуване при пациенти, които спират терапията с NUCs (резултати от главни проучвания)

qHBsAg може да предскаже вероятността от функционално излекуване при пациенти, които спират терапията с NUCs			
	STOP NUC	RETRACT-B	CREATE
Пациенти	- HBeAg (-) - без цироза	- пациенти с ХХ-В и вирусна супресия - HBeAg (-) в края на лечението	- HBeAg (-) - лекувани с NUCs, но не и с PEG-IFNa - с недоловима HBV DNA
Брой	166	1552	572
Медикамент	ETV или TDF		
Време на проследяване	96 седмици	4 години	48 седмици
Продължителност на терапията с NUCs	≥4 години	не е посочено	средно 295 седмици
Степен на „функционално излекуване“	10% от пациентите, които спират NUCs терапията	очакван 4-годишен процент на сероклирънс на HBsAg 41% при пациенти от бялата раса (HBsAg<1000 IU/ml), 33% от азиатските пациенти (HBsAg<100 IU/ml)	4.2% при пациенти, които спират терапията с NUCs

цията от интегрирани вирусни последователности. Следователно количественото оценка на HBcrAg дава допълнителна информация относно транслационната активност на HBV, различна от количественото определяне на HBsAg (4). Литературен обзор от 2018 г. на всички публикации, свързани с HBcrAg, до март 2017 г. показва, че HBcrAg има добра корелация с количеството интрахепатална cccDNA, интрахепаталната обща HBV DNA, серумната HBV DNA и в по-малка степен с HBsAg. В ситуации, когато серумните нива на HBV DNA станат недоловими или се постигне сероклирънс на HBsAg, HBcrAg все още може да бъде открит. Този маркер е полезен при разграничаване на HBeAg-негативен хроничен хепатит от HBeAg-негативна хронична инфекция, прогнозиране на спонтанна или индуцирана от лечението HBeAg сероконверсия, устойчив отговор към NUCs, риск от реактивиране на HBV при окултна HBV инфекция, в случай на имunosупресия, риск от развитие на HCC, както и следоперативен рецидив на HCC (14). Hwang et al. разглеждат 70 пациенти с HBeAg (+) ХХ-В, получаващи лечение с TDF или ETV, чиито серуми са изследвани за количество на HBcrAg в началото на лечението и 2 години след това. Резултатите показват, че при пациенти с ХХ-В, лекувани с NUCs, нивата на HBcrAg $\leq 6,5 \log_{10}$ U/mL на изходно ниво и $\leq 5,3 \log_{10}$ U/mL на втората година

от антивирусната терапия са полезни предсказуеми фактори за HBeAg сероконверсия (7). Suzuki et al. разглеждат 44-ма пациента с реактивация на HBV. При реактивиране на HBV и/или след това нивата на HBV DNA са изследвани (долна граница $\geq 1,3 \log$ IU/mL) в серума на 27 пациенти и са под долна граница ($< 1,3 \log$ IU/mL) в серума на 17 пациенти. От 27 пациенти с реактивация на HBV и чиято серумна HBV DNA е над нивото на долна граница, серумите на 26 и 24-ма пациенти (96,3% и 88,9%) са положителни за iTACT-HBcrAg и iTACT-HBsAg съответно. HBcrAg се открива чрез iTACT-HBcrAg, преди HBV DNA да стане доловима в серума на 15 от 27-те пациенти. От 11 пациенти с реактивация на HBV и не откриваем HBcrAg чрез iTACT-HBcrAg в момента на реактивация на HBV и/или след това 10 са имали недоловима HBV DNA и нито един не е развил хепатит, свързан с реактивация на HBV (21). HBcrAg е сензитивен биомаркер за cccDNA активност и при HBeAg отрицателни пациенти, постигнали вирусна супресия на фона на дългогодишна терапия с NUCs (1).

Нивото на серумна HBV RNA все по-активно се свързва с ефекта от лечението на хроничния хепатит В в последните няколко години. Проучване от 2016 г. на Wang et al. показва, че дори при пациенти със значително ниски нива на HBV DNA в серумите им присъства обилно ко-

личество HBV RNA. Серия от експерименти демонстрира, че серумната HBV RNA е прегеномна РНК (pgRNA) и присъства във вирусоподобни частици. Нивата на pgRNA във вириона се повишават след блокиране на активността на обратната транскрипция на HBV DNA полимеразата и намаляват след блокиране на капсидацията на pgRNA. Освен това наличието на pgRNA вириони е свързано с риск от вирусен релапс след преустановяване на терапията с NUCs (24). По-скорошно проучване от декември 2022 г. на Jiang et al. проследява 80 пациенти с ХХ-В, нелекувани до момента, от които 30 са проследени 48 седмици след началото на терапията с NUCs, когато 67% от тях имат доловима HBV RNA, а само 37% от тях доловима HBV DNA, което подчертава превъзходството на HBV RNA над HBV DNA по отношение на активността на инфекцията на фона на продължителна терапия с NUCs (9).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рутинните биомаркери, какъвто е HBV DNA, използвани в мониториране на хроничната HBV инфекция, не дават достатъчна информация по отношение на активността на HBV. Въпреки че дългогодишното лечение с NUCs се свързва с добри клинични резултати и успешно потиска вирусната супресия, то не води до т.нар. функционално излекуване, предвид малкия ефект върху cccDNA и интегрираната в генома на гостоприемника HBV DNA. Спирането на терапията без сероклирънс на HBsAg обикновено води до покачване на вирусната репликация и това налага лечението за ХХ-В да продължи на практика доживотно. Имайки предвид глобалното бреме на ХХ-В, има спешна нужда от нови биомаркери, които да дадат по-голяма информация относно активността на хроничната HBV инфекция и да бъдат включени в мониториране лечението на ХХ-В. Обещаващи резултати показват qHBsAg, HBV RNA и HBcrAg. Необходима е и по-ефективна терапия, която да окаже ефект върху cccDNA и интегрираната в генома на гостоприемника HBV DNA. Предвид информацията, която новите серумни биомаркери дават за пациенти на дългогодишна терапия с NUCs, се коментира, че с оглед да се постигне „функционално излекуване“, вероятно ще бъде необходима комбинация от агенти, включващи антивирусен агент, агент за потискане на HBsAg и имуномодулатор за засилване на имунния отговор. Те трябва да са безопасни, с ограничена продължителност на лечението и на достъпна цена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Carey I, Gersch J, Wang B, Moigboi C, Kuhns M, Cloherty G, Dusheiko G, Agarwal K. Pregenomic HBV RNA and Hepatitis B Core-Related Antigen Predict Outcomes in Hepatitis B e Antigen-Negative Chronic Hepatitis B Patients Suppressed on Nucleos(T)ide Analogue Therapy. *Hepatology*. 2020 Jul;72(1):42-57. doi: 10.1002/hep.31026. PMID: 31701544 Kevorkyan A, Teoharov P, Lernout T, Petrova N, Raycheva R, Ivanov I, van Damme P, Kojouharova M. Prevalence of HBV and HCV among outpatients in the plovdiv region of Bulgaria. *J Med Virol*. 2015;87(3):401406.
2. Connors EE, Panagiotakopoulos L, Hofmeister MG, et al. Screening and Testing for Hepatitis B Virus Infection: CDC Recommendations - United States, 2023. *MMWR Recomm Rep*. 2023;72:1-25 Jelev D. Chronic HBV infection: characteristics, natural course and options for treatment [dissertation]. Medical University of Sofia (BG): DMSc; 2010.
3. Dusheiko G, Wang B. Hepatitis B Surface Antigen Loss: Too Little, Too Late and the Challenge for the Future. *Gastroenterology*. 2019 Feb;156(3):548-551. doi: 10.1053/j.gastro.2019.01.015. Epub 2019 Jan 11. PMID: 30641057
4. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu; European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2017 Aug;67(2):370-398. doi: 10.1016/j.jhep.2017.03.021. Epub 2017 Apr 18. PMID: 28427875.
5. Ghany MG, Buti M, Lampertico P, Lee HM; 2022 AASLD-EASL HBV-HDV Treatment Endpoints Conference Faculty. Guidance on treatment endpoints and study design for clinical trials aiming to achieve cure in chronic hepatitis B and D: Report from the 2022 AASLD-EASL HBV-HDV Treatment Endpoints Conference. *J Hepatol*. 2023 Nov;79(5):1254-1269. doi: 10.1016/j.jhep.2023.06.002. Epub 2023 Jun 21. PMID: 37377088
6. Hirode G, Choi HSJ, Chen CH, Su TH, Seto WK, Van Hees S, Papatheodoridi M, Lens S, Wong G, Brakenhoff SM, Chien RN, Feld J, Sonneveld MJ, Chan HLY, Forns X, Papatheodoridis GV, Vanwolleghem T, Yuen MF, Hsu YC, Kao JH, Cornberg M, Hansen BE, Jeng WJ, Janssen HLA; RETRACT-B Study Group. Off-Therapy Response After Nucleos(t)ide Analogue Withdrawal in Patients With Chronic Hepatitis B: An International, Multicenter, Multiethnic Cohort (RETRACT-B Study). *Gastroenterology*. 2022 Mar;162(3):757-771.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2021.11.002. Epub 2021 Nov 9. PMID: 34762906
7. Hwang SY, Yoo SH, Chang HY, Kim S, Lee JI, Lee KS, Cho YY, Joon KH, Lee HW. Baseline and on-

- treatment HBcrAg levels as predictors of HBeAg seroconversion in chronic hepatitis B patients treated with antivirals. *J Viral Hepat.* 2023 Jan;30(1):39-45. doi: 10.1111/jvh.13765. Epub 2022 Nov 11. PMID: 36321949
8. Jelev D. Chronic HBV infection: characteristics, natural course and options for treatment [dissertation]. Medical University of Sofia (BG): DMSc; 2010
9. Jiang B, Dai Q, Liu Y, Yu G, Mi Y. Levels of HBV RNA in chronic HBV infected patients during first-line nucleos(t)ide analogues therapy. *Infect Agent Cancer.* 2022 Dec 7;17(1):61. doi: 10.1186/s13027-022-00473-9. PMID: 36476371; PMCID: PMC9727898
10. Kevorkyan A, Teoharov P, Lernout T, Petrova N, Raycheva R, Ivanov I, van Damme P, Kojouharova M. Prevalence of HBV and HCV among outpatients in the Plovdiv region of Bulgaria. *J Med Virol.* 2015;87(3):401-406
11. Kim JH, Ghosh A, Ayithan N, Romani S, Khanam A, Park JJ, Rijnbrand R, Tang L, Sofia MJ, Kottlilil S, Moore CB, Poonia B. Circulating serum HBsAg level is a biomarker for HBV-specific T and B cell responses in chronic hepatitis B patients. *Sci Rep.* 2020 Feb 4;10(1):1835. doi: 10.1038/s41598-020-58870-2. Erratum in: *Sci Rep.* 2020 Mar 31;10(1):5947. PMID: 32020034; PMCID: PMC7000714
12. Kojouharova M, Kourtchatova A. Surveillance, epidemiology and prevention of hepatitis B in Bulgaria: results of the EUROHEP.net feasibility survey. In: *EUROHEP.net book. Surveillance and prevention of vaccine preventable hepatitis.* [Internet]. Universiteit Antwerpen, CEV/ESOC2004. [cited 22 Dec 2014]. Available from: www.EUROHEP.net2001
13. Krastev Z, Tchernev K, Petrova D, Nikolovska D, Takov D, Marinova I, Chakurski I, Kotsev I, Antonov K, Katsarov K, Krastev N, Stoinov S, Tsvetanska A, Jelev D, Sabeva Z, Ivanova II, Todorova K, Genov J, Simonova M, Tzonev R, Mitova R, Balabanska R, Handjiev S. An open label, multicenter, national non-randomized study to evaluate efficacy and safety of Peginterferon alfa-2a (40 KD) in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B: preliminary results. *Bulgarian Hepatogastroenterol.* 2006;2:9091
14. Mak LY, Wong DK, Cheung KS, Seto WK, Lai CL, Yuen MF. Review article: hepatitis B core-related antigen (HBcrAg): an emerging marker for chronic hepatitis B virus infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018 Jan;47(1):43-54. doi: 10.1111/apt.14376. Epub 2017 Oct 16. PMID: 29035003
15. Marcellin P, Buti M, Krastev Z, de Man RA, Zeuzem S, Lou L, Gaggari A, Flaherty JF, Massetto B, Lin L, Dinh P, Subramanian GM, McHutchison JG, Flisiak R, Gurel S, Dusheiko GM, Heathcote EJ. Kinetics of hepatitis B surface antigen loss in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B treated with tenofovir disoproxil fumarate. *J Hepatol.* 2014 Dec;61(6):1228-37. doi: 10.1016/j.jhep.2014.07.019. Epub 2014 Jul 18. PMID: 25046847; PMCID: PMC5976831
16. Meier MA, Calabrese D, Suslov A, Terracciano LM, Heim MH, Wieland S. Ubiquitous expression of HBsAg from integrated HBV DNA in patients with low viral load. *J Hepatol.* 2021 Oct;75(4):840-847. doi: 10.1016/j.jhep.2021.04.051. Epub 2021 May 15. PMID: 34004216
17. Moini, M.; Fung, S. HBsAg Loss as a Treatment Endpoint for Chronic HBV Infection: HBV Cure. *Viruses* 2022, 14, 657. <https://doi.org/10.3390/v14040657>
18. Nina Nikolova, Deian Jelev, Krasimir Antonov, Lyudmila Mateva & Zahariy Krastev (2015) The decrease of HBsAg during nucleos(t)ide analogues (NUC) therapy in Bulgarian patients, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29:4, 746-752, DOI: 10.1080/13102818.2015.1036773
19. Pfefferkorn M, Schott T, Böhm S, Deichsel D, Felkel C, Gerlich WH, Glebe D, Wat C, Pavlovic V, Heyne R, Berg T, van Bömmel F. Composition of HBsAg is predictive of HBsAg loss during treatment in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2021 Feb;74(2):283-292. doi: 10.1016/j.jhep.2020.08.039. Epub 2020 Sep 12. PMID: 32931877
20. Sonneveld MJ, Park JY, Kaewdech A, Seto WK, Tanaka Y, Carey I, Papatheodoridis M, van Bömmel F, Berg T, Zoulim F, Ahn SH, Dalekos GN, Erler NS, Höner Zu Siederdissen C, Wedemeyer H, Cornberg M, Yuen MF, Agarwal K, Boonstra A, Buti M, Piratvisuth T, Papatheodoridis G, Maasoumy B; CREATE Study Group. Prediction of Sustained Response After Nucleos(t)ide Analogue Cessation Using HBsAg and HBcrAg Levels: A Multicenter Study (CREATE). *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2022 Apr;20(4):e784-e793. doi: 10.1016/j.cgh.2020.12.005. Epub 2020 Dec 10. PMID: 33309804
21. Suzuki T, Inoue T, Matsuura K, Kusumoto S, Hagiwara S, Ogawa S, Yagi S, Kaneko A, Fujiwara K, Watanabe T, Aoyagi K, Urata Y, Tamori A, Kataoka H, Tanaka Y. Clinical usefulness of a novel high-sensitivity hepatitis B core-related antigen assay to determine the initiation of treatment for HBV reactivation. *J Gastroenterol.* 2022 Jul;57(7):486-494. doi: 10.1007/s00535-022-01872-w. Epub 2022 Apr 28. PMID: 35478052.
22. Ungtrakul T, Sriprayoon T, Kusuman P, Chunnuan P, Soonklang K, Sornsamdan G, Auewarakul CU, Tanwandee T. Role of quantitative hepatitis B surface antigen in predicting inactive carriers and HBsAg seroclearance in HBeAg-negative chronic hepatitis B patients. *Medicine (Baltimore).*

- 2017 Mar;96(13):e6554. doi: 10.1097/MD.00000000000006554. PMID: 28353619; PMCID: PMC5380303
23. van Bömmel F, Stein K, Heyne R, Petersen J, Buggisch P, Berg C, Zeuzem S, Stallmach A, Sprinzl M, Schott E, Pathil-Warth A, von Arnim U, Keitel V, Lohmeyer J, Simon KG, Trautwein C, Trein A, Hüppe D, Cornberg M, Lammert F, Ingiliz P, Zachoval R, Hinrichsen H, Zipprich A, Klinker H, Schulze Zur Wiesch J, Schmiedeknecht A, Brosteanu O, Berg T. A multicenter randomized-controlled trial of nucleos(t)ide analogue cessation in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2023 May;78(5):926-936. doi: 10.1016/j.jhep.2022.12.018. Epub 2023 Mar 28. PMID: 37062574
24. Wang J, Shen T, Huang X, Kumar GR, Chen X, Zeng Z, Zhang R, Chen R, Li T, Zhang T, Yuan Q, Li PC, Huang Q, Colonno R, Jia J, Hou J, McCrae MA, Gao Z, Ren H, Xia N, Zhuang H, Lu F. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. *J Hepatol.* 2016 Oct;65(4):700-710. doi: 10.1016/j.jhep.2016.05.029. Epub 2016 May 28. PMID: 27454312
25. Wu CC, Chen YS, Cao L, Chen XW, Lu MJ. Hepatitis B virus infection: Defective surface antigen expression and pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2018 Aug 21;24(31):3488-3499. doi: 10.3748/wjg.v24.i31.3488. PMID: 30131655; PMCID: PMC6102499
26. Yip TC, Lok AS. How Do We Determine Whether a Functional Cure for HBV Infection Has Been Achieved? *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020 Mar;18(3):548-550. doi: 10.1016/j.cgh.2019.08.033. Epub 2019 Aug 22. PMID: 31446185

Адрес за кореспонденция:

Йоана Стоянова

Клиника по гастроентерология

бул. „Христо Смирненски“ 1

Варна, 9000

e-mail: yohann@abv.bg