



UPPSALA
UNIVERSITET


KARBAMAZEPIN-INDUCERAD LEVERTOXICITET – ETT LITTERATURARBETE

Av Ezgi Yilmaz

Examensarbete i toxikologi, 15 hp, Vt. 2017

Handledare: Fredrik Jernerén
Examinator: Eva Brittebo

Toxikologi och läkemedelssäkerhet
Institutionen för farmaceutisk biovetenskap
Farmaceutiska fakulteten
Uppsala universitet

A large, light gray, stylized graphic of a caduceus (a staff with a snake) is positioned in the bottom right corner of the page, partially overlapping the text.

Innehåll

Innehåll	2
1. Introduktion	4
Biverkningar	4
Levern och dess funktioner	5
Läkemedelinducerad levertoxicitet	6
Immunsystemet	6
<i>Ospecifika immunsystemet</i>	6
<i>Specifika immunsystemet</i>	7
Karbamazepin	7
Karbamazepins metabolismväg	8
2. Material och metoder	10
3. Resultat	12
Utvärdering av karbamazepin-utvecklad levertoxicitet	12
Karbamazepin och dess metaboliters betydelse vid levertoxicitet	13
CYP-enzymernas betydelse vid karbamazepin-inducerad levertoxicitet	16
Immunsystemets betydelse vid karbamazepin-inducerad levertoxicitet	18
4. Diskussion	21
Metaboliters betydelse:	21
CYP-enzymernas betydelse:	23
Immunsystemets betydelse:	25
Slutsats	26
Risk/nytta analys	26
Utvärdering av undersökta studier	28
5. Referenslista	28

Karbamazepin-inducerad Levertoxicitet - Ett Litteraturarbete

Ezgi Yilmaz

Fördjupningsprojekt 15 hp, Receptarieprogrammet

Institutionen för Farmaceutisk Biovetenskap/Toxikologi och läkemedelssäkerhet,

Handledare: Fredrik Jernerén, Examinator: Eva Brittebo

Introduktion: Läkemedelsbiverkningar delas in i två grupper; typ A och typ B. Typ A-biverkningar är dosberoende medan typ B-biverkningar är idiosynkrasiska och beroende av immunsystemet. Levern är kroppens huvudsakliga metabola organ, och drabbas ofta av läkemedelinducerad toxicitet. Ibland inducerar läkemedelsmetaboliter levertoxicitet, vilket kan medieras av immunsystemet. Karbamazepin är ett antiepileptikum och orsakar levertoxicitet, men den exakta mekanismen är inte klarlagd. **Syfte:** Syftet med detta arbete är att undersöka om karbamazepins levertoxicitet är beroende av metabolismen av karbamazepin och/eller immunsystemet. **Material och metoder:** En strukturerad litteraturundersökning utfördes med hjälp av databasen PubMed. 7 artiklar inkluderades i sammanställningen. **Resultat:** Resultat från *in vivo*-studier identifierade metaboliter producerade av cytokrom P450-monooxygenaser (CYP450) hos de individer som utvecklade levertoxicitet inducerad av karbamazepin. Samtidigt noterades en ökad nivå CYP3A. Expressionen av en rad immunsystemsmarkörer ökade också vid karbamazepin-inducerad levertoxicitet, exempelvis TNF- α , som leder till apoptos. **Slutsats:** Utifrån inkluderade studier kan slutsatsen dras att karbamazepins levertoxicitet induceras av dess metaboliter via immunsystemet. Undersökningarna var huvudsakligen associationsstudier, vilket försvårar slutsatser kring kausalitet. Därför behöver ytterligare studier göras så att mekanismen helt kan klargöras.

Nyckelord: *karbamazepin, levertoxicitet, toxiska metaboliter, immunsystem*

1. Introduktion

Biverkningar

Biverkningar är ett problem som uppstår vid läkemedelsbehandlingar. De har stor betydelse när det gäller hälsoproblem och sjukvårdsekonomi. Studier gjorda på 2000-talet visar att mer än 10 % av sjukhusinläggningarna beror på biverkningar, och går därmed att i stor utsträckning att förebygga (1). En sammanställning från 2001 visade att 3 % av dödsfallen i Sverige var till följd av biverkningar (2).

Biverkningar delas in i två olika typer, typ A och typ B (1). Typ A biverkningar beror på läkemedlets farmakologiska, fysikaliska eller kemiska egenskaper och går att undvika genom att justera doseringen. Typ B biverkningar idiosynkratiska och beroende av immunsystemet och därmed inte nödvändigtvis relaterade till doseringen. Dessa biverkningar är också ofta irreversibla. I detta arbete fokuseras på typ B biverkningar.

Typ B biverkningar kan delas in i olika kategorier, vilka är immunologiska, pseudoallergiska och metabolitutlösta biverkningar (1). Immunologiska reaktioner uppkommer när antigener reagerar med antikroppar och det finns fyra typer av immunologiska reaktioner; typ I,II,III och IV (1). Typ I reaktioner är anafylaktiska reaktioner där antikroppar av immunglobulin E (IgE) eller immunglobulin G (IgG) binder till mastceller eller granulocyter och när kroppen exponeras för ett läkemedel frisätts till exempel mediatorer som histamin eller prostaglandin. Dessa leder till bronkkonstriktion och i svåra fall anafylaktisk chock. Exempel på läkemedel som sätter igång typ I reaktioner är penicilliner. Typ II reaktioner är cytotoxiska reaktioner och uppkommer när antigener och antikroppar bildar ett komplex på cellytan vilka leder till cytolys, vilket betyder cellupplösning. Typ III reaktioner är immunkomplexreaktioner där antikroppar reagerar med vävnadsantigen eller så binder komplexet antigen-antikropp på cellytan. Typ IV reaktioner är cellbundna reaktioner och uppkommer när lymfocyter reagerar direkt med antigener (1).

Pseudoallergiska reaktioner liknar typ I reaktioner med skillnaden att antikroppar inte kan påvisas (1). Allergiska reaktionen beror på mediatorer som frisätts, men de frisätts inte som följd av en reaktion mellan antigen och antikropp. Exempel på pseudoallergisk reaktion är anafylaxi utlöst av acetylsalicylsyra.

Metabolitutlösta biverkningar uppkommer genom att toxiska metaboliter av läkemedlet ansamlas (1). Vissa läkemedel kan ge metabolitutlösande biverkningar beroende på doseringen, till exempel överdosering av paracetamol. Eller så beror den metabolitutlösta biverkningen på patientspecifika faktorer, till exempel avsaknad av ett enzym som detoxifierar det administrerade läkemedlet.

Levern och dess funktioner

Biverkningar kan påverka flera olika organ i kroppen. Ett av dessa organ är levern. Levern är ett viktigt organ med många och komplexa funktioner. Den är bland annat nödvändig när det gäller metabolism av kroppsegna och främmande ämnen som till exempel läkemedel. Levern består av två huvudlober och väger cirka 1,5 kg (3). Den har både arteriell och venös blodförsörjning. Det arteriella och venösa blodet går samman i ett hålrum mellan levercellerna (hepatocyter). Dessa hålrum är leverns kapillärer och kallas sinusoider. Sinusoiderna ligger intill regelbundet ordnade rader av hepatocyter och tillsammans bildar ett nätverk. Med hjälp av sinusoidernas ofullständiga vägg är levercellerna i direkt kontakt med blodplasma. Därför kan stora molekyler vandra mellan levercellerna och blodet. Intill sinusoidernas vägg hittas makrofager, som kallas Kupfferceller. Blod från sinusoiderna töms i de så kallade centrala venerna (3).

Metabolismen av läkemedel sker i två olika steg, fas I-reaktioner och fas II-reaktioner (4). Fas I-reaktioner innefattar kemiska reaktioner som oxidation, reduktion och hydrolys. Reaktionen är katabolisk och produkten som bildas är oftast mer kemisk reaktiv, ibland även mer toxisk, än modersubstansen. Under fas I-reaktionen kopplas reaktiva funktionella grupper, såsom hydroxylgrupper, på substansen. Den funktionella gruppen fungerar ofta som en angreppspunkt för fas II-reaktioner (se nedan) (4). Fas I-reaktioner katalyseras framförallt av medlemmar av cytokrom P450-enzymsystemet (5). Dessa enzymer delas in i familjer och subfamiljer utifrån sekvenslikheter. Familjerna benämns CYP 1,2 eller 3 och subfamiljerna exempelvis A, B eller C. En viktig funktion hos enzymsystemet är att oskadliggöra kroppsfrämmande ämnen, såsom läkemedelssubstanser.

Fas II-reaktioner är anabola reaktioner och involverar konjugering, vilket i många fall resulterar i inaktiva, mer vattenlösliga produkter (4). Exempel på infogade grupper är

glukuronyl-, sulfat-, metyl- och acetylgrupper. Många av konjugeringsreaktionerna sker i levern, men det förekommer också i andra organ som njurar och lungor.

Läkemedelinducerad levertoxicitet

På grund av att levern är kroppens huvudsakliga metabola organ, och metabolismen av kroppsfrämmande ämnen kan producera toxiska metaboliter, är läkemedelinducerad hepatotoxicitet (levertoxicitet) en vanlig biverkning. Exempelvis är läkemedel den vanligaste orsaken till fulminant leversvikt, både i USA och i Europa (6). För att kunna diagnostisera levertoxicitet kan olika biokemiska markörer mätas. Exempel på sådana är aminotransferaserna alanin- (ALAT) och aspartataminotransferas (ASAT), bilirubin och alkaliska fosfater (ALP, alkaline phosphatase). ALAT och ASAT är enzymer som hjälper till vid aminosyraomsättningen i kroppen, bilirubin är gallfärgämne och ALP är enzymer som förhöjs vid sjukdomar, som till exempel leversjukdomar.

Läkemedelinducerad levertoxicitet klassificeras oftast som idiosynkratiska reaktioner (7). Idiosynkrasi är överkänslighet mot vissa ämnen och är genetiskt betingad. Som det tidigare har beskrivits är den primära funktionen av fas I-reaktioner att omvandla de lipofila och non-joniska läkemedlen till mer hydrofila ämnen för lättare eliminering. Som ett resultat av sådana reaktioner kemiskt reaktiva metaboliter bildas (8). Om bildandet och avgiftningen inte är proportionella mot varandra kan de bilda kovalenta bindningar med cellulära makromolekyler, vilket kan resultera i nekros eller sekundära immunreaktioner (8). Därför kan denna jämvikt vara en viktig faktor för sannolikheten att utveckla idiosynkratisk toxicitet.

Immunsystemet

Läkemedelinducerad leverskada har blivit associerad med ett antal immun- och inflammationsrelaterade faktorer, inklusive cytokiner och kemokiner (7).

Immunsystemet bekämpar allt som det uppfattar som kroppsfrämmande (3).

Immunsystemet delas in i två samarbetande komponenter; det ospecifika (medfödda) immunsystemet och det specifika (förvärvade) immunsystemet.

Ospecifika immunsystemet

Det ospecifika immunsystemet kräver inte att kroppen tidigare ska ha varit i kontakt med det kroppsfrämmande ämnet. Det ospecifika immunsystemet består av ett yttre och ett inre försvar. Det yttre försvaret utgörs av huden och slemhinnorna och det inre består

av celler som exempelvis fagocyter (3). Fagocyterna består av ospecifika receptorer som avgör om ett ämne är främmande eller kroppseget. De mest kända ospecifika receptorerna är toll-liknande receptorer, TLR (5). Det finns två typer av fagocyter: neutrofila granulocyter och makrofager. Både neutrofila granulocyter och makrofager kan fagocytera. Fagocytos går ut på att cellen kapslar in främmande partiklar som exempelvis bakterier och vävnads- och cellrester, tar in genom endocytos för att slutligen bryta ned dem. Vid endocytosen omges bakterierna av neutrofila granulocytens cellmembran som senare smälter samman med lysosomer. Lysosomerna tömmer in sina enzymer i det slutna rum där bakterien finns, vilket i sin tur leder till att den fagocyterade bakterien bryts ned på samma sätt som näringsämnen under matspjälkningsprocessen (3). Under fagocytos utsöndrar cellerna signalämnen, cytokiner, som aktiverar det specifika immunsystemet. Exempel på cytokiner är interleukiner (IL) och tumör nekros faktor (TNF). Det inre försvaret består också av icke-cellulära faktorer som komplementsystemet. Systemet består av 20 bestämda proteiner, varav de flesta bildas i levern. När ett protein aktiveras, till exempel av en infektion, leder det till att nästa protein i kedjan aktiveras, och en kaskadreaktion uppstår (3). De viktigaste enskilda komplementfaktorerna är C3 och C5, som är kemotaktiska proteiner. Deras uppgift är att vägleda lymfocyterna till infekterade och inflammerade områden (5).

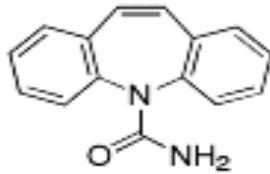
Specifika immunsystemet

Det specifika immunsystemet, kallas även adaptiva immunsvaret, utvecklas efter födelsen och är knuten till lymfocyterna och består av receptorer som är specifika för olika ämnen (3). Lymfocyterna består av två huvudgrupper; B-lymfocyter och T-lymfocyter. B-lymfocyter binder till antigener och bildar ett antigen-antikroppkomplex. T-lymfocyterna hjälper B-lymfocyterna att bli mer aktiva och omfattande. Det bildade komplexet aktiverar komplementsystemet och det främmande ämnet fagocyteras av det ospecifika immunsystemet (3).

Karbamazepin

Det finns en rad olika läkemedel som leder till levertoxicitet och karbamazepin är ett av dessa läkemedel. Karbamazepin är ett antiepileptikum och används även vid behandlingen av trigeminusneuralgi och alkoholabstinensbesvär. Karbamazepin hämmar natriumkanalernas funktion vid nervcellerna och natriumjonerna kan inte flöda

in i dessa celler (5). Natriumjonerna leder till att nervcellerna signalerar med en hög frekvens, vilket i sin tur leder till ett epilepsianfall. Karbamazepin, genom att hämma natriumkanalerna, hindrar natriumjonerna från att påverka nervcellerna, vilket dämpar signalerna. När nervcellerna inte kan kommunicera med hög frekvens hindras patienten från att få ett epileptiskt anfall. Den kemiska strukturen av karbamazepin visas i **Figur 1**.



Figur 1. Kemiska strukturen av karbamazepin. Bilden är hämtad från referens (9).

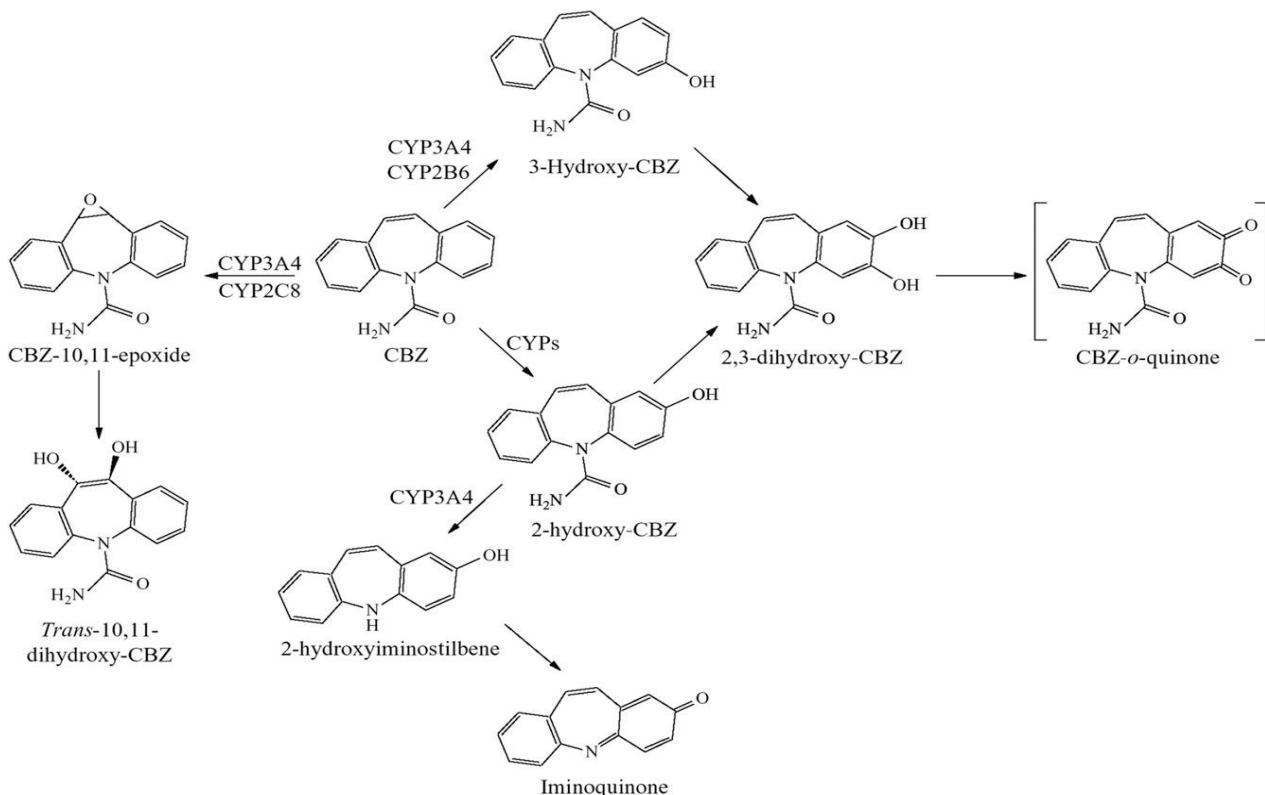
Karbamazepin har en intressant farmakokinetik. Vid en enkeldos är halveringstiden drygt ett dygn. Men halveringstiden blir kortare vid upprepad dosering, vilket beror på att karbamazepin inducerar leverenzymerna och därmed stimulerar sin egen nedbrytning (5). Behandling med karbamazepin kan leda till många biverkningar som till exempel yrsel, dåsighet och synrubbingar. Det kan även förekomma allvarigare biverkningar som Stevens-Johnsons syndrom, mentala och motoriska störningar och leverskador (5). Som nämnts ovan metaboliseras många läkemedel av cytokrom P450-enzymerna i levern, däribland många anti-epileptika. Metabolismen genererar reaktiva arenoxid metaboliter, vars avgiftning katalyseras av epoxidhydrolas-enzymerna. Därför kan en möjlig mekanism för den idiosynkratiska reaktionen vara hämmad epoxidhydrolasaktivitet, vilket leder till ackumulering av toxiska arenoxidmetaboliter i lever (10).

Karbamazepins metabolismväg

Karbamazepin metaboliseras huvudsakligen till den farmakologiskt aktiva metaboliten karbamazepin-10,11-epoxid av enzymerna CYP3A4 och CYP2C8 (11). Metaboliten metaboliseras vidare till trans-10,11-dihydroxy-karbamazepin via enzymet mikrosomalt epoxidhydrolas. Dessutom metaboliseras karbamazepin till metaboliterna 2-hydroxy-karbamazepin och 3-hydroxy-karbamazepin, bland annat med hjälp av enzymerna CYP3A4 och CYP2C9. Metaboliterna 2-hydroxy-karbamazepin och 3-hydroxy-karbamazepin är kandidater till de reaktiva metaboliterna som senare bildas. Det är två observationer som har gjorts, den ena visade att 2-hydroxy-karbamazepin och/eller 3-hydroxy-karbamazepin metaboliseras vidare till 2,3-dihydroxy-karbamazepin, som har

2017-06-20

föreslagits bilda en o-kinon metabolit via en icke-enzymatisk reaktion (11). Den andra observationen visade att 2-hydroxy-karbamazepin, med hjälp av CYP3A4, metaboliseras till 2-hydroxyiminostilben, som lätt kan oxideras till iminoquinon arter. Med hjälp av **Figur 2** kan karbamazepins metabolismväg förtydligas.



Figur 2. Karbamazepins metabolismväg. Metaboliterna som bildas är karbamazepin-10,11-epoxid, *trans*-10,11-dihydroxy-karbamazepin, 3-hydroxy-karbamazepin, 2-hydroxy-karbamazepin, 2,3-dihydroxy-karbamazepin, iminokinin och karbamazepin-*o*-kinon. Figuren är hämtad från referens (11).

Två hypoteser kan hjälpa till att förklara karbamazepins levertoxicitet. Den ena anger att orsaken till levertoxiciteten är karbamazepins metaboliter och sätts igång av kroppens CYP-enzym. Den andra anger att det är immunsystemet som står bakom levertoxiciteten. Syftet med detta arbete är att undersöka anledningarna till karbamazepins levertoxicitet, med följande specifika frågeställningar:

1. Är karbamazepins metaboliter toxiska?
2. Vilken påverkan har CYP-enzymerna när det gäller karbamazepins levertoxicitet?
3. Är levertoxiciteten hos karbamazepin beroende av immunsystemet?

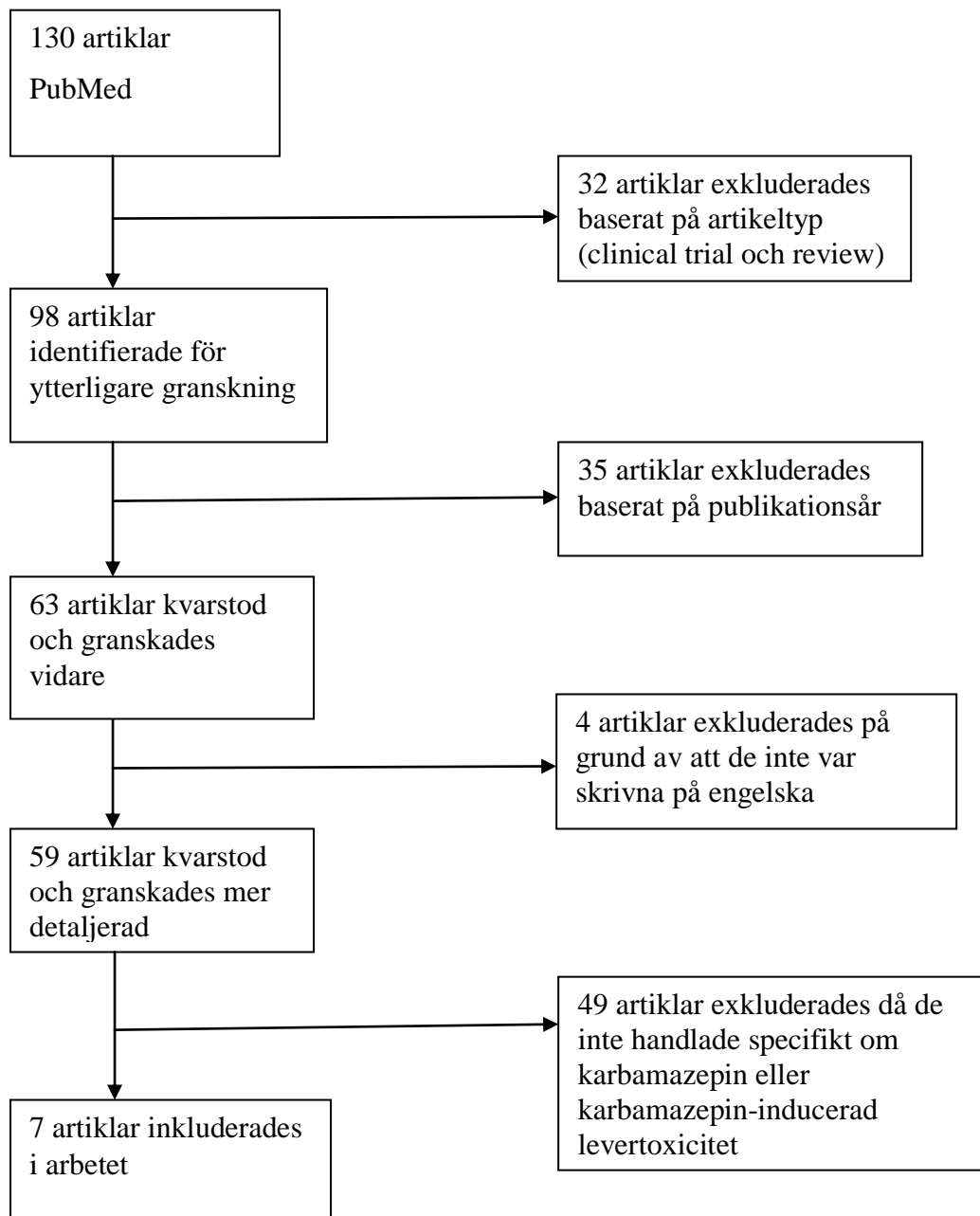
2. Material och metoder

En omfattande litteratursökning genomfördes med hjälp av databasen PubMed.

Följande kriterier användes för att kunna erhålla relevant information:

För att kunna göra en generell sökning angående karbamazepin och dess levertoxicitet användes följande termer: *carbamazepine* och *liver toxicity*. Denna sökning gav tillgång till 130 artiklar. Därefter gjordes en exkludering genom att välja *clinical trial* för att komma åt original artiklar. Denna exkludering gav tillgång till tre artiklar, vilka inte innehöll representativ fakta om karbamazepins levertoxicitet och därför togs de tre artiklarna inte med i undersökningen. En exkludering gjordes av 29 översiktsartiklar (*reviews*) som återkom bland träffarna, och uteslöts från undersökningen. Genom att välja *publication dates* till de senaste tio åren har det fått tillgång till 63 artiklar. Av de 63 artiklarna exkluderades fyra stycken artiklar då de inte var skrivna på engelska. De 59 artiklarna som var kvar efter denna exkludering undersöktes vidare. En manuell exkludering gjordes genom att läsa *abstract* från kvarvarande artiklar och de som inte handlade specifikt om karbamazepin eller karbamazepin-inducerad levertoxicitet exkluderades från arbetet. Resultatet av litteratursökningen visas i **Figur 3**.

2017-06-20



Figur 3. Resultatet av litteratursökningen.

3. Resultat

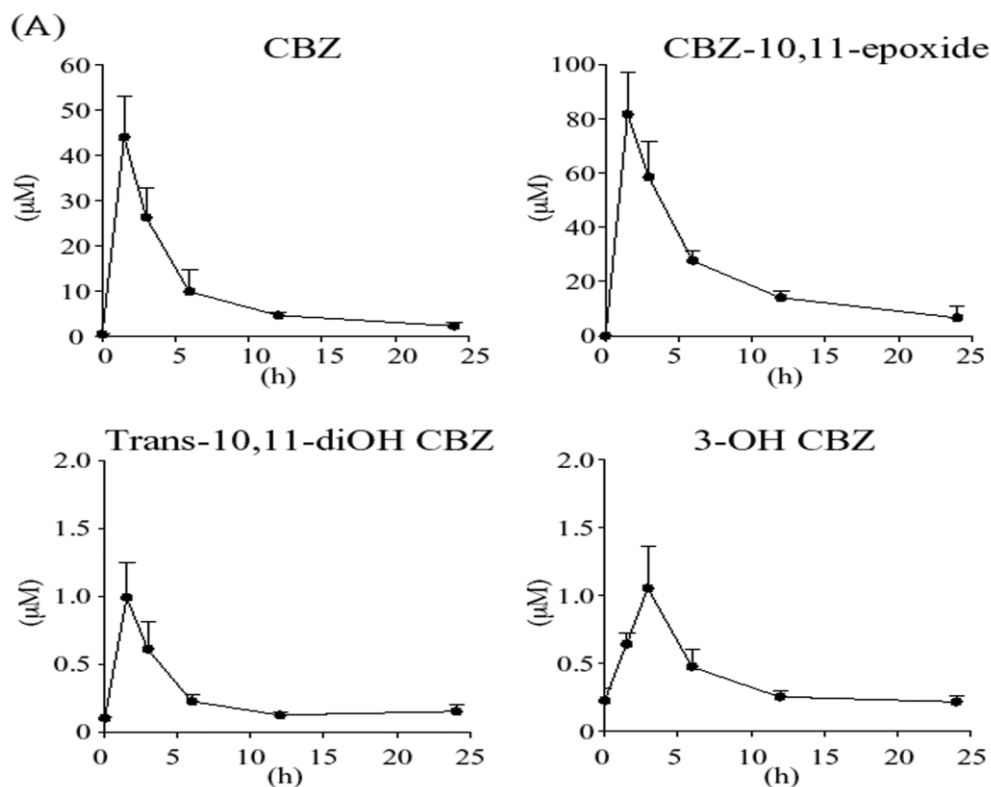
Utvärdering av karbamazepin-utvecklad levertoxicitet

Sasaki et al. utförde *in vivo*-studie på råttor. För att utveckla levertoxicitet hos råttorna administrerade de 400 mg/kg karbamazepin varje dag i fyra dagar och 600 mg/kg på den femte dagen. Två timmar efter sista administreringen av karbamazepin administrerades 700 mg/kg L-buthionine *S,R*-sulfoximine (BSO), en glutation hämmare. Resultatet visade att ALAT-nivån i plasma ökade signifikant (16603 ± 4595 U/l, $n = 6$) 24 timmar efter sista administreringen av karbamazepin (7). Ingen ökning av ALAT observerades hos råttor som var vehikelbehandlade. Tre timmar efter sista karbamazepin administreringen har vissa hepatocyter runt centrala venen visat degenerativa förändringar. Sex timmar efter sista administreringen har det uppstått blåsbildning i hepatocyterna runt centrala venen. Ett dygn efter sista administreringen har nekros i hepatocyterna som finns i centrilobulära regionen observerats. Inga patologiska förändringar har observerats hos icke-behandlade råttor (7). Med hjälp av resultatet kunde författarna påvisa att karbamazepin ger upphov till levertoxicitet.

Peyre et al. utförde en *in vitro*-studie på råttceller och använde fyra oberoende analyser för att utvärdera levertoxicitet utvecklad av bland annat karbamazepin. Testerna som användes under studien var MTT, neutral röd upptaget (NRU, the neutral red uptake), ATP-mätning och real-time cellular impedance monitoring (12). IC_{50} -värdet var beräknat för varje test 24 timmar efter läkemedelsadministreringen. IC_{50} är den halva maximala hämmande koncentrationen som talar om hur effektivt ett ämne hämmar biologiska eller biokemiska funktioner hos organismer. Med hjälp av HCS-analys (high-content screening) bekräftades levertoxicitet. Karbamazepin späddes ut maximalt till 1 mM. IC_{50} -värdet kunde inte beräknas med analyserna MTT och ATP. Resultat erhöles endast från NRU, vilket visade IC_{50} -värdet till 2,2 mM. Real-time cellular impedance monitoring visade att det normaliserade cellindexet var minskad med 30 – 40 % utan celldöd. HCS-testet visade en svag antioxidant effekt av karbamazepin, som minskade parallellt med lysosomalaktivitet. Därför skriver Peyre et al. att en direkt korrelation mellan lysosomalaktivitet och/eller oxidativstress inte kan påvisas och att de endast kan föreslå en icke-toxisk *in vitro*-effekt av karbamazepin på levern (12).

Karbamazepin och dess metaboliters betydelse vid levertoxicitet

Syftet med arbetet utfört av Higuchi et al. var att detektera om några metaboliter kunde hittas vid karbamazepin-inducerad levertoxicitet med en *in vivo*-studie. Författarna började med att inducera levertoxicitet hos mössen och kom fram till att om de tillförde 400 mg/kg karbamazepin under fyra dagar och 800 mg/kg karbamazepin på den femte dagen kunde de framkalla levertoxicitet. Denna administrering av karbamazepin visade en signifikant ökning på ALAT- och ASAT-nivåerna och ökningen kunde observeras 24 respektive 48 timmar efter administreringen (13). Ökningen kunde observeras hos 75 % av mössen. 25 % av de uppvisade ingen levertoxicitet. Kontrollgruppen som hade behandlats med oxkarbazepin visade ingen levertoxicitet. Därefter analyserade författarna metaboliternas plasmakoncentration. Resultatet visade att hos möss som hade utvecklat levertoxicitet identifierades modersubstansen karbamazepin och metaboliterna karbamazepin-10,11-epoxid, trans-10,11-dihydroxy-karbamazepin och 3-hydroxy-karbamazepin, vilket visas i **Figur 4** (13).



Figur 4. Tidsberoende plasmakoncentrationen av karbamazepin och dess metaboliter karbamazepin-10,11-epoxid, trans-10,11-dihydroxy-karbamazepin och 3-hydroxy-karbamazepin. Figuren är hämtad från artikeln skriven av Higuchi et al. (13).

En liknande undersökning utfördes av författarna Iida et al. Undersökningen syftade till att visa vilken roll karbamazepins metaboliter har vid levertoxicitetsutvecklingen (11). För att möjliggöra undersökningen har författarna använt sig av *in vivo*-studie på råttor. Råttorna tillfördes 400 mg/kg karbamazepin i fyra dagar och 600 mg/kg karbamazepin på den femte dagen. En annan grupp gavs karbamazepin i samma administreringsmönster med 700 mg/kg BSO på den femte dagen. En kontrollgrupp fick oxkarbazepin och administreringsmönstret följde karbamazepin administreringen. För att mäta ut plasmakoncentrationen av metaboliterna användes HPLC (high-performance liquid chromatography). Råttorna delades in i två kategorier; känsliga (ALAT \geq 2000 U/l) och okänsliga (ALAT \leq 2000 U/l). Resultatet för den tidsberoende ALAT-ändringen hos känsliga respektive okänsliga råttor visas i **Figur 5** respektive **Figur 6**.

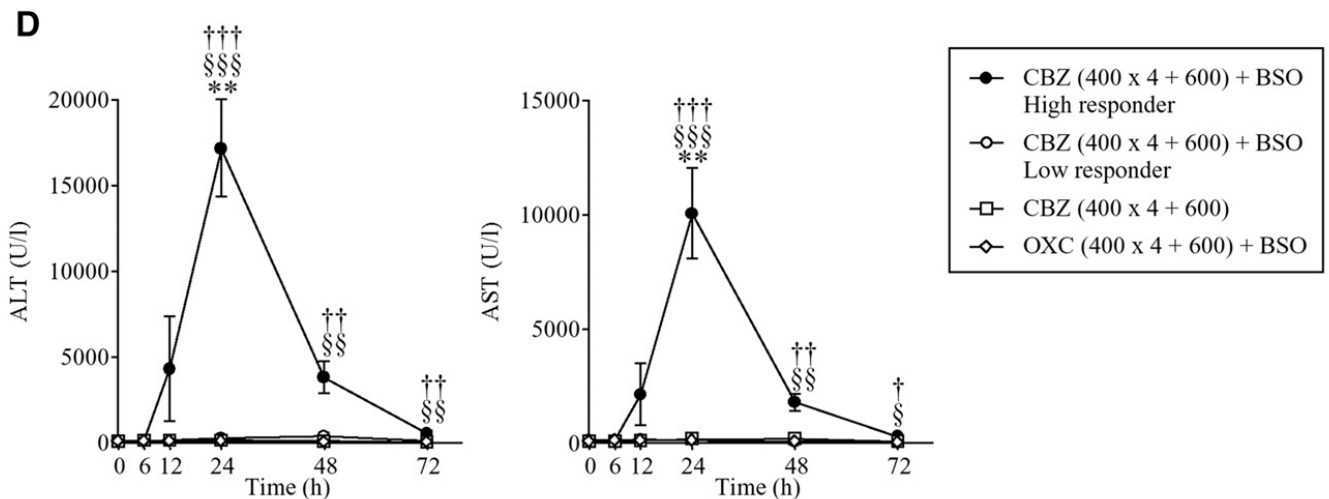
Tid efter sista administrering (timmar)	ALAT-nivån i plasma (U/L)
24	17193 \pm 2818
48	3845 \pm 950
72	579 \pm 124

Figur 5. Visar tidsberoende ALAT-nivån hos känsliga råttor vid tiderna 24, 48 och 72 timmar.

Tid efter sista administrering (timmar)	ALAT-nivån i plasma (U/L)
24	270 \pm 57
48	370 \pm 212
72	99 \pm 33

Figur 6. Visar tidsberoende ALAT-nivån hos okänsliga råttor vid tiderna 24, 48 och 72 timmar.

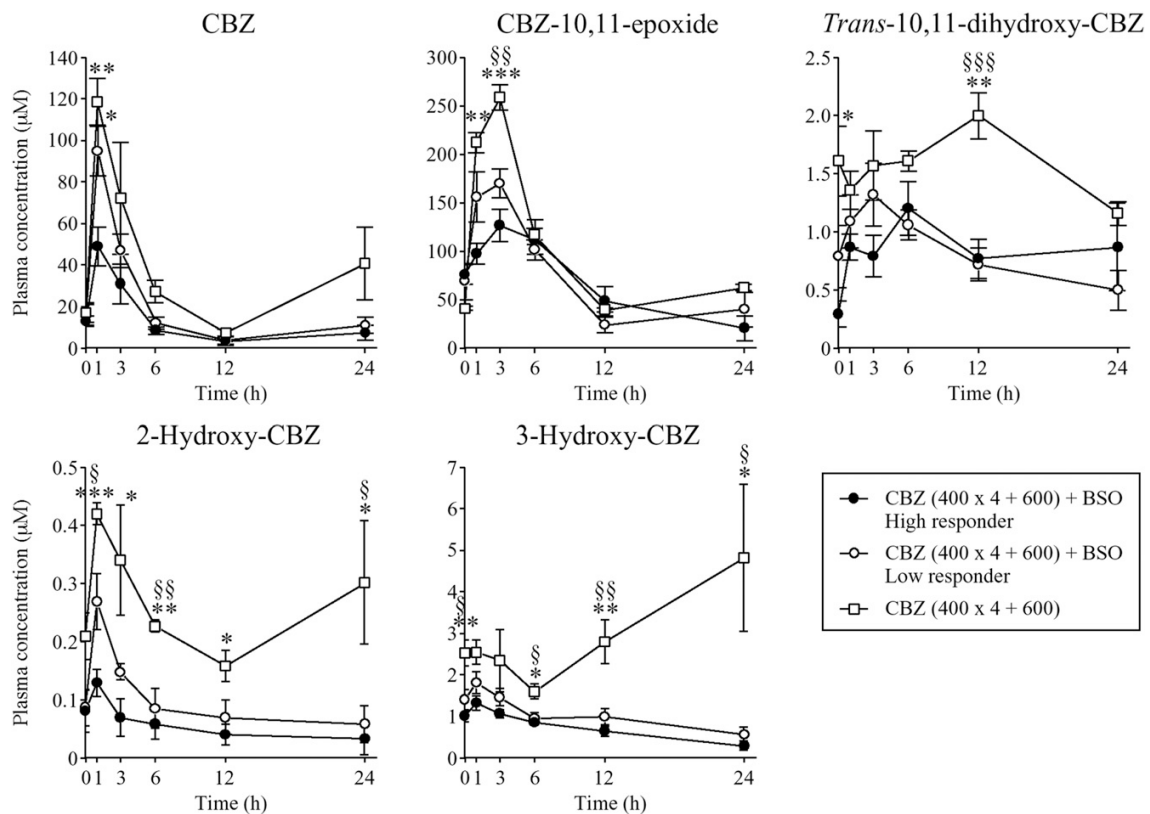
2017-06-20



Figur 7. ALAT- och ASAT-nivåerna hos råttorna. Råttorna är delade i grupper som känsliga, okänsliga, bara karbamazepinbehandlade och oxkarbazepinbehandlade. Känsliga och okänsliga råttorna har fått 400 mg/kg karbamazepin i fyra dagar och 600 mg/kg karbamazepin på femte dagen tillsammans med 700 mg/kg BSO. $**P < 0,01$ jämfört vid 0 timmar för varje grupp. $§P < 0,05$, $§§P < 0,01$, och $§§§P < 0,001$ jämfört med okänsliga försöksdjur. $†P < 0,05$, $††P < 0,01$, och $†††P < 0,001$ jämfört med bara karbamazepin-behandlad grupp. Figuren refereras till (11).

Efter att delat in råttorna i olika grupper har författarna mätt upp plasmakoncentrationen av metaboliterna för att avgöra vilken/vilka av de spelade den viktiga rollen vid levertoxicitetsutveckling (11). Enligt författarna är plasmakoncentrationen av karbamazepin hos känsliga signifikant lägre jämfört med okänsliga och icke-BSO-behandlade försöksdjur 1 timme efter sista karbamazepin administreringen (11). Författarna hävdar att känsliga råttor har större förmåga att metabolisera karbamazepin. De skriver även att plasmakoncentrationen av 2-hydroxy-karbamazepin är lägre hos känsliga jämfört med okänsliga 1 – 24 timmar efter sista karbamazepin administreringen. Plasmakoncentrationen av karbamazepin-10,11-epoxid och 3-hydroxy-karbamazepin hos känsliga tenderade att vara lägre jämfört med okänsliga. Författarna hävdar att enligt jämförelsen mellan känsliga och okänsliga försöksdjur, när det gäller karbamazepin och dess metaboliter, plasmakoncentrationerna av 2-hydroxy-karbamazepin och 3-hydroxy-karbamazepin kan vara relaterad till den uppreglerade metabolismen av dessa metaboliter hos känsliga (11). Resultatet visas i **Figur 8**.

2017-06-20



Figur 8. Plasmakoncentrationen över tid för karbamazepins metaboliter hos känsliga, okänsliga och icke-BSO-behandlade råttorna. Plasmakoncentrationen för karbamazepin, karbamazepin-10,11-epoxid, trans-10,11-dihydroxy-karbamazepin, 2-hydroxy-karbamazepin och 3-hydroxy-karbamazepin är bestämda med hjälp av HPLC. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, och *** $P < 0,001$ jämfört med känsliga gruppen vid enskilda tidpunkter. § $P < 0,05$, §§ $P < 0,01$, och §§§ $P < 0,001$ jämfört med okänsliga gruppen vid enskilda tidpunkter. Figuren refereras till (11)

CYP-enzymernas betydelse vid karbamazepin-inducerad levertoxicitet

Undersökningen utförd av Iida et al. syftade till att påvisa vilken effekt CYP-enzymerna har vid karbamazepin-utvecklad levertoxicitet. **Figur 8** som utgångspunkt skriver författarna att den uppreglerade metabolismen av karbamazepin kan vara involverad i utvecklandet av levertoxicitet (11). Enligt författarna var plasmakoncentrationen av karbamazepin och dess metaboliter lägre hos känsliga råttor och man observerade förändringar på levercellerna. Därför ville författarna kontrollera vad som hände när CYP-enzymerna inducerades. Till att börja med visade undersökarna att karbamazepin inducerar leverns CYP3A-enzym (11). För att kunna påvisa detta har författarna kvantifierat CYP3A2-proteinerna och MDZ-4-hydroxylasaktiviteten i levermikrosomer. MDZ-4-hydroxylasaktiviteten användes som markör för CYP3A-aktiviteten då midazolam (MDZ) katalyseras av detta enzym. Resultatet visade att mikrosomala nivån

på CYP3A2-proteinerna var 1,8 gånger högre hos de karbamazepin-behandlade råttorna jämfört med icke-behandlade. MDZ-4-hydroxylasaktiviteten var 2,7 gånger högre hos karbamazepin-behandlade råttorna. Med hjälp av resultatet drogs slutsatsen att nivån på CYP3A2-proteiner i levern och CYP3A-enzymaktiviteten var inducerade av karbamazepin (11). Därefter studerades vilken effekt ytterligare inducering hade på CYP3A-enzymerna och hur det påverkade karbamazepin-inducerad levertoxicitet. Glukokortikoiden dexametason, en potent CYP3A-inducerare, användes i detta syfte. Råttorna fick dexametason under tre dagar och därefter enkeldosering av karbamazepin på 400 mg/kg tillsammans med BSO. Denna kombination visade signifikant ökning på ALAT-nivån. Observationen visade att CYP3A-inducering är en viktig faktor för utvecklingen av karbamazepin-inducerad levertoxicitet (11).

En liknande studie utfördes av Higuchi et al. för att undersöka vilken effekt CYP3-enzymerna har vid karbamazepin-inducerad levertoxicitet (13). Till skillnad från förra undersökningen har Higuchi et al. provat att hämma CYP-enzymerna för att kunna observera hur detta påverkade levertoxiciteten. Författarna har behandlat mössen med CYP3A-hämmaren ketakonazol (KTZ, ketoconazole) och triacetyloleandomycin (TAO, troleandomycin). Resultatet visade en oväntad ökning på ALAT-nivån i plasma efter administrering av TAO och KTZ. TAO och KTZ behandlingen ökade plasmakoncentrationen av karbamazepin och minskade plasmakoncentrationen av karbamazepin-10,11-epoxid, både metabolitens och moderssubstansens plasmakoncentrationer var ökade när karbamazepin administrerades ensam. TAO ökade plasmakoncentrationen av 3-hydroxy-karbamazepin, vilket var minskad när karbamazepin administrerades ensam. Med hjälp av dessa data drog författarna slutsatsen att CYP3A skulle kunna medverka i avgiftningen vid karbamazepin-inducerad levertoxicitet (13).

Omvandlingen från 3-hydroxy-karbamazepin till 2,3-dihydroxy-karbamazepin, som vidare oxideras till reaktiva o-kinon typer, har föreslagits bidra till karbamazepins idiosynkrasi (14). Pearce et al. utförde en studie där det undersöktes om 3-hydroxy-karbamazepin huvudsakligen metaboliserades vidare till 2,3-dihydroxy-karbamazepin och vilket enzym som medverkar under metabolismen. För att möjliggöra denna *in vitro*-studie användes human lever. Resultatet de har kommit fram till visade att 2,3-dihydroxy-karbamazepin huvudsakligen metaboliserades från 3-hydroxy-karbamazepin

(14). Observationerna visade att enzymet som metaboliserade 3-hydroxy-karbamazepin till 2,3-dihydroxy-karbamazepin var CYP3A4 och CYP2C19. Detta har man kommit fram till genom att jämföra metaboliternas bildningshastighet mot enzymernas aktivitet. Författarna observerade att omvandlingen till 2,3-dihydroxy-karbamazepin av CYP2C19 var proportionellt mot tiden, vilket inte var fallet för CYP3A4. Därför föreslog man att CYP3A4 kunde varit hämmad av en metabolit av 3-hydroxy-karbamazepin. För att styrka deras hypotes preinkuberades rekombinant CYP3A4 och 3-hydroxy-karbamazepin tillsammans med humana levermikrosomer. Resultatet visade att CYP3A4-aktiviteten minskade. Denna observation föreslogs relatera till bildning av 2,3-dihydroxy-karbamazepin (14).

Syftet med studien utförd av Masubuchi et al. var att undersöka vilken effekt karbamazepin har på monooxygenas P450-enzymaktiviteten och om metaboliterna från karbamazepin inaktiverar dessa enzymer (15). Leverceller från människor och råttor användes i denna *in vitro*-studie. Levercellerna från båda organismerna preinkuberades med karbamazepin i närvaro av NADPH (nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat) vilken är en kofaktor till CYP-enzymerna. För att kunna mäta enzymaktiviteten har författarna använt sig av substrat till undersökta enzymer, som till exempel propranolol-4-hydroxylas hos leverceller från människor. Resultatet visade att CYP2D-enzymerna från råttor och CYP1A2-enzymerna från människor metaboliserar karbamazepin till reaktiva metaboliter. Dessa metaboliter binds sedan med kovalenta bindningar till CYP-enzymerna och resulterar till inaktivering av dessa. Med denna observation som grund, har författarna kommit fram till att hypotesen om P450-enzymsystemet som nödvändig för toxicitetsutveckling av karbamazepin stämmer (15). Författarna skriver även att CYP1A2-enzymets bidrag på klinisk observerad toxicitet av karbamazepin är möjlig, men att mekanismen behöver undersökas vidare.

Immunsystemets betydelse vid karbamazepin-inducerad levertoxicitet

För att kunna undersöka vilken betydelse immun- och inflammationsrelaterade faktorer har när det gäller karbamazepin-inducerad levertoxicitet har Sasaki et al. mätt mRNA-expressionen i levern hos F344-råttor (7). Observationerna visade att mRNA-expressionen för kemokinen MCP-1 var signifikant ökad 24 timmar efter den sista administreringen av karbamazepin, jämfört med icke-behandlade råttor. mRNA-expressionen för makrofagkemokinen MIP-2 ökade tidsberoende fram till 24 timmar

efter sista administrering av karbamazepin. Dessa förändringar visade sig vara parallella med ökning av ALAT-nivån (7).

mRNA-expressionen för proinflammatoriska cytokiner och apoptos mediatorer visade i denna studie inga signifikanta skillnader (7). En ökning hos TNF- α och IL-1 β observerades utan statistisk signifikans. En ökning på mRNA-expressionen hos en anti-inflammatorisk cytokin (IL-10) observerades tre timmar efter sista administrering av karbamazepin. Ökningen nådde sin topp vid sex timmar och minskade 24 timmar efter sista administrering av karbamazepin. När det gällde adaptiva immunsystemets mediatorer, såsom ROR- γ t, observerades signifikant minskning tre och sex timmar efter den sista administreringen av karbamazepin och inga signifikanta förändringar observerades på andra faktorer som ingår i adaptiva immunsystemet. Observationer av TLR4, som ingår i det ospecifika immunsystemet, visade inga förändringar på mRNA-expressionen. En tidsberoende ökning under 24 timmar efter sista administreringen av karbamazepin observerades hos TLR4s endogena ligander S100A8 och S100A9. Med hjälp av dessa data i åtanke kunde författarna säga att T-hjälparcellförmedlade förändringar inte var dominanta hos råttor (7). Higuchi et al. gjorde en liknande studie och undersökte om mRNA-expressionen för ospecifika immunsystemets komponenter ökade eller minskade vid karbamazepin-inducerad levertoxicitet. Resultatet visade att mRNA-expressionen för S100A8 och S100A9 ökade signifikant 24 timmar efter sista administreringen av karbamazepin (13). Till skillnad från studien utförd av Sasaki et al. visade denna studie att mRNA-expressionen för TLR4 visade en signifikant ökning. För att undersöka om TLR4 och RAGE är involverade i karbamazepin-inducerad levertoxicitet har undersökarna använt TLR4-antagonist och anti-RAGE antikropp. Resultatet visade att dessa två minskade plasmanivån på ALAT och ASAT. Med hjälp av resultatet kunde författarna säga att både TLR4 och RAGE kan vara involverade i karbamazepin-inducerad levertoxicitet (13).

Under samma undersökning utförd av Sasaki et al. har författarna kollat på förändringar hos makrofagerna M1 och M2 för att utvärdera om dessa hade en koppling till levertoxiciteten (7). M1 uttrycker CD68 som inducerar vävnadsskador genom att producera proinflammatorisk faktor. M2 uttrycker CD163 som hindrar immun- och inflammatorisk respons i cellerna. Resultatet visade att anti-ED1 och anti-ED2 positiva celler var samlade i de skadade centrilobulära områden. Anti-ED1 är råttornas

motsvarade homolog till humant CD68 och anti-ED2 är motsvarande homologen till humant CD163. Dessa celler ökade signifikant i antalet i det centrilobulära området efter sex respektive 24 timmar efter den sista administreringen av karbamazepin (7).

Sasaki et al. ville påvisa vilken effekt en hämning av Kupfferceller, som ingår i det ospecifika immunsystemet, hade på levertoxiciteten. För hämningen har författarna använt sig av GdCl₃-behandling (GdCl₃, Gadolinium (III) chloride). Kontrollgruppen fick saltlösning. Resultatet visade att GdCl₃-behandlingen signifikant dämpade, jämfört med kontrollgruppen, den ökade nivån på ALAT, som hade ökat 24 timmar efter den sista karbamazepin administreringen (7). Även om råttorna var behandlade med GdCl₃ observerades en grad degenerativa förändringar i vissa hepatocyter runt centrala venen. Nekros hos hepatocyter kring centrilobulära området observerades inte. Hos kontrollgruppen observerades nekros hos hepatocyter som fanns runt centrilobulära venen, medföljd av infiltration av lymfocyter till levern. Författarna visade även att GdCl₃-behandlingen signifikant minskade nivån på de antikropparna anti-ED1 och anti-ED2, jämfört med kontrollgruppen. Resultatet påvisade att GdCl₃-behandling använd för att hämma Kupffer cellerna minskade risken för karbamazepin-inducerad levertoxicitet hos F344-råttor (7).

Författarna skriver att anti-inflammatoriska cytokinproduktionen kan spela en roll vid utvecklingen av levertoxiciteten (7). I deras undersökning var IL-10 observerad i plasma sex timmar efter sista administreringen av karbamazepin och minskade 24 timmar efter sista administreringen. För att kunna undersöka hur Kupffer-cell-medierad IL-10 produktion påverkar karbamazepin-inducerad levertoxicitet har Sasaki et al. gjort en neutralisationsstudie, vilket går ut på att hindra antigenen från att binda till cellen med hjälp av en neutraliserande antikropp. Resultatet visade att anti-IL-10 antikropp behandlingen på råttor med karbamazepin-inducerad levertoxicitet uppvisade en tendens att höja plasma ALAT-nivån, jämfört med kontrollgruppen.

En studie utförd i Nederländerna av Fredriksson et al. syftade till att undersöka i vilken utsträckning immunsystemet bidrar till levertoxiciteten inducerad av läkemedel som bland annat karbamazepin. De har i detalj undersökt det proinflammatoriska cytokinet TNF- α som orsakar celldöd hos hepatiska HepG2-celler (16). För att kunna visa effekten av TNF- α på levercellerna vid levertoxicitet har undersökarna behandlat HepG2-celler med karbamazepin under åtta timmar och därefter inkuberat cellerna

både med och utan TNF- α (10 ng/ml) under 16 timmar. Resultatet visade att karbamazepin behandlade celler visade en signifikant apoptos när TNF- α tillsattes (16).

4. Diskussion

I detta arbete har anledningen till karbamazepins levertoxicitet undersökts. För att möjliggöra detta har tre frågeställningar ställts, vilka var om karbamazepins metaboliter är toxiska, om CYP-enzymerna är inblandade i levertoxicitetsutvecklingen och om immunsystemet hade en betydelse vid karbamazepin-inducerad levertoxicitet. Till att börja med kan det, med hjälp av resultatet från Sasaki et al., sägas att karbamazepin inducerar levertoxicitet (7). I den undersökningen har det observerats att när karbamazepin administrerades till råttorna ökade ALAT-nivån signifikant i plasma. För att kunna säga att ett läkemedel inducerar levertoxicitet studeras bland annat nivån på enzymerna ALAT och ASAT i plasma och histopatologiska snitt av levern. Om dessa enzymer är 1,25 gånger högre än referensvärdet för normala nivåer talar man, per definition, om leverskada hos organismen (17). För att kontrollera att det inte var slumpen som var avgörande för resultatet har författarna jämfört resultatet med icke-behandlade råttor och dessa råttor visade ingen ökning på ALAT-nivån. Karbamazepin är alltså ett läkemedel som inducerar levertoxicitet enligt den definition som används här (7).

Metaboliters betydelse:

De huvudsakliga metaboliterna som bildas när karbamazepin metaboliseras av levern är karbamazepin-10,11-epoxid, trans-10,11-dihydroxy-karbamazepin, 2-hydroxy-karbamazepin, 3-hydroxy-karbamazepin, 2,3-dihydroxy-karbamazepin, iminokinon och karbamazepin-o-kinon (11). Dessa metaboliter har varit i intresse när det gäller karbamazepin-inducerad levertoxicitet. Studierna utförda av Higuchi et al. och Iida et al. har använts för att komma fram till ett svar på första frågeställningen som handlade om associationen mellan karbamazepin-inducerad levertoxicitet och karbamazepins metaboliter. Det är två olika undersökningar utförda med samma forskningsgruppsledare. Anledningen till varför de två undersökningarna jämfördes med varandra är att det inte var möjligt att hitta andra undersökningar som studerade just karbamazepins metaboliter med levertoxicitet som grund. Higuchi et al. började med att inducera levertoxicitet hos mössen och därefter mätte nivån på ALAT och ASAT i

plasma. Eftersom resultatet från deras undersökning visade signifikant ökning på ALAT och ASAT, kunde slutsatsen dras i denna litteraturundersökning att karbamazepin inducerar levertoxicitet hos försöksdjuren. Författarna tillägger att eftersom ALAT-nivån är högre än ASAT-nivån visar det att den inducerade skadan är dominant i levern (13). Därefter har de studerat om metaboliterna kunde hittas hos råttor som hade utvecklat levertoxicitet, vilket var 75 % av råttorna. Dessvärre står det inget om kvarvarande 25 % av råttorna hade höga metabolitvärden eller inte. De skriver bara att levertoxicitet inte kunde observeras hos denna andel. Metaboliter som kunde hittas hos råttorna som utvecklade toxicitet var karbamazepin-10,11-epoxid, trans-10,11-dihydroxy-karbamazepin och 3-hydroxy-karbamazepin. Med hjälp av denna studie är det svårt att dra slutsatsen om karbamazepins metaboliter utvecklar levertoxicitet då de inte skriver om dessa metaboliter kunde hittas hos den andel som inte utvecklade toxicitet. Att studien är en associationsstudie gör det ännu svårare att säga att plasma ALAT-nivån har ökat på grund av karbamazepin. För att kunna säga att metaboliterna utvecklar toxicitet behövs betydligt mer omfattande observation än det som presenteras i Higuchi et al.

För att kunna få bättre svar på frågeställningen har vidare undersökning på studien utförd av Iida et al. gjordes. Det är som sagt samma forskningsledare som medverkar i Iida et al. och Higuchi et al. undersökning men det är två olika djurslag som har använts i undersökningarna. Higuchi et al. har använt möss och Iida et al. har använt råttor. När det gäller Iida et al. skriver de att råttor används i högre utsträckning när det gäller studier som görs för läkemedlens farmakokinetik och metabolism. Resultatet Iida et al. presenterade visar att karbamazepins metaboliter kunde hittas hos råttor som utvecklade levertoxicitet (11). De mätte ALAT-nivån hos råttorna och delade in dessa i två grupper; karbamazepin-känsliga och okänsliga. Med hjälp av **Figur 7** och **Figur 8** kan det observeras att känsliga råttor utvecklar levertoxicitet. På **Figur 8** kan det observeras att en skillnad på metabolitnivån mellan känsliga, okänsliga och icke-BSO-behandlade råttor finns, men skillnaderna är inte statistisk signifikanta då de inte är så stora. Enligt Iida et al. koncentrationen av karbamazepin och 2-hydroxy-karbamazepin var lägre hos känsliga försöksdjur jämfört med okänsliga och hävdar därför att vidare metabolism av karbamazepin och/eller 2-hydroxy-karbamazepin är associerad med leverskada (11). Med hjälp av **Figur 8** observeras att författarna har jämfört plasmakoncentrationen av

karbamazepin och dess metaboliter mellan icke-BSO-behandlade – okänsliga och icke-BSO-behandlade – känsliga. På figuren framkommer det inte att en jämförelse har gjorts mellan känsliga och okänsliga. För att räkna ut statistiska värden har de använt sig av ANOVA och detta test jämför alla grupper mot varandra, vilket försvårar att veta mellan vilka två grupper skillnaden finns. Senare har de använt post-hoc test för att kunna mäta signifikanta skillnaden mellan de enskilda grupperna. I resultatet skriver författarna att de har observerat skillnad mellan känsliga och okänsliga när det gäller metaboliterna och drar slutsatsen att 2-hydroxy-karbamazepin är den toxiska metaboliten. Men när figuren studeras kan denna slutsats inte accepteras då det inte finns någon statistisk signifikant skillnad mellan känsliga och okänsliga. Det verkar alltså som om deras slutsats inte har något statistiskt stöd. Om diagrammet som visar till exempel 2-hydroxy-karbamazepin studeras kan en eventuell skillnad ses mellan känsliga och okänsliga vid tiden 1, men eftersom skillnaden inte är statistisk signifikant kan ingen slutsats dras att denna skillnad verkligen finns. Samma gäller för de andra metaboliterna, en skillnad kan observeras, men utan statistisk signifikans. Författarna har fyra stycken känsliga råttor och fem stycken okänsliga råttor när de studerar metabolitkoncentrationen. Antalet försöksdjur därför begränsat vilket försvårar analyserna om eventuella skillnader i metabolitkoncentrationer. Sammanfattningsvis är det svårt att dra slutsatsen, utifrån de två undersökta studier, att karbamazepins metaboliter är toxiska. Higuchi et al. har visat att metaboliterna hittas hos försöksdjur som har utvecklat levertoxicitet, men inte har visat att de som inte har utvecklat toxicitet har dessa metaboliter eller inte. När det gäller Iida et al. har de visat att känsliga råttor utvecklar levertoxicitet (se **Figur 7**), men de kan inte visa en statistisk signifikant skillnad mellan råttor som inte har utvecklat levertoxicitet.

CYP-enzymernas betydelse:

Andra frågeställningen handlade om CYP-enzymernas betydelse när det gäller karbamazepin-inducerad levertoxicitet. Samma studie utförd av Higuchi et al. och Iida et al. har också undersökt om dessa enzymer hjälper till vid utvecklingen av levertoxicitet. Resultatet från Iida et al. visade att om CYP3A-enzymerna, som medverkar i metabolismen av karbamazepin, inducerades ökade ALAT-nivån i plasma (11). Detta kan också kopplas till metaboliternas toxicitet. Ju mer CYP3A-enzym induceras, desto mer metaboliter bildas, som i sin tur leder till ökad nivå av ALAT i

plasma som till slut leder till levertoxicitet. Higuchi et al. testade att hämma CYP3A-enzymerna. Tanken bakom studien kan vara att när de hämmade CYP3A-enzymerna skulle ALAT-nivån i plasma minska och på detta sätt ämnade författarna studera om CYP3A-enzymerna står bakom levertoxicitet utvecklad av karbamazepin. Men resultatet motbevisade deras hypotes. ALAT-nivån i plasma ökade efter CYP3A-enzymhämmningen (13). Istället framlades hypotesen att CYP3A-enzymerna står bakom avgiftningen av karbamazepin-inducerad levertoxicitet. Men det som uppmärksammades vid jämförelsen mellan dessa två undersökningar var att Higuchi et al. tillförde TAO och KTZ efter karbamazepin administreringen och Iida et al. tillförde dessa innan karbamazepin administreringen. Det ledde till att de observerade en minskning på ALAT-nivån, vilket var tvärtom för Higuchi et al. Eftersom enzymerna redan är hämmade kan de inte metabolisera karbamazepin i högre utsträckning, vilket minskade ALAT-nivån. Enzyminducering är något som tar tid att bli av med. Detta skulle kunna vara en anledning till Higuchi et al. resultat.

Studien utförd av Pearce et al. visade att en av karbamazepins metaboliter, 3-hydroxy-karbamazepin, hämmade CYP3A-enzymet (14). Karbamazepin metaboliseras huvudsakligen av enzymerna CYP3A och CYP2C. Metabolismen utförd av CYP2C var proportionell mot tiden, vilket det inte var för CYP3A (14). Därför ville Pearce et al. undersöka om CYP3A var hämmat. När de hade inkuberat enzymet med 3-hydroxy-karbamazepin observerade de att CYP3A-aktiviteten minskade. Dessvärre har dessa undersökare inte studerat ALAT-nivån i plasma. Studien utförd av Masubuchi et al. syftade till att undersöka om karbamazepins metaboliter hämmade CYP-enzymerna och därför utförde de en *in vitro*-studie på leverceller från råttor och människor. Författarna skriver att karbamazepins metaboliter binds med kovalenta bindningar till leverns mikrosomola proteiner, vilket föreslås spela en viktig roll i utvecklandet av överkänslighet mot läkemedlet (15). Resultatet författarna kommit fram till visade att CYP2D-enzym hos råttor och CYP1A2 hos människor metaboliserar karbamazepin till sina reaktiva metaboliter, vilket senare leder till hämning av själva enzymerna. Därefter drog författarna slutsatsen att denna hämning ökar möjligheten att P450-enzymerna är involverade i den toxicitet som är inducerad av karbamazepin (15). Pearce et al. visade också att karbamazepins metabolit hämmar aktiviteten av CYP3A. De två studierna som utgångspunkt dras därför slutsatsen att CYP-enzymerna spelar en viktig

roll vid utvecklandet av levertoxicitet inducerad av karbamazepin. Hur denna slutsats dras är att när CYP-enzymerna som metaboliserar karbamazepin hämmas av vissa metaboliter ökar mängden av karbamazepins andra metaboliter, vilket resulterar till att en metabolitansamling bildas och leder i sin tur till B-biverkning. Varken Pearce et al. eller Masubuchi et al. har undersökt ALAT-nivån i plasma som skulle kunna användas som markör för leverskada och styrka hypotesen om CYP-enzymernas betydelse under toxicitetsutveckling. Studien utförd av Higuchi et al. visar indirekt att CYP3A-hämningen leder till ökad plasmanivå av ALAT. Men studien utförd av Iida et al. motsäger detta. Deras resultat visade att metaboliternas mängd i plasma ökar när CYP3A induceras. Sammanfattningsvis har det inte fåtts ett tydligt svar på frågeställningen gällande om CYP-enzymerna bidrar till levertoxicitetsutvecklingen. Eftersom det är flera CYP-enzymerna som är med och metaboliserar karbamazepin borde någon av dessa stå bakom levertoxiciteten. Arbetet har också tagit upp om metaboliterna utlöser levertoxicitet och fick svaret att karbamazepin ger metabolitlöst biverkningar. Eftersom metaboliterna troligtvis är toxiska är CYP-enzymerna sannolikt inblandade.

Immunsystemets betydelse:

Den sista frågeställningen handlade om det fanns koppling mellan immunsystemet och karbamazepins levertoxicitet. Sasaki et al., som hade samma forskningsgruppsledare som Higuchi et al. och Iida et al, visade att när karbamazepin administrerades ökade mRNA-expressionen för vissa kemokiner och makrofager. De har även noterat att mRNA-expressionsökningen var parallell med ökningen av ALAT-nivån i plasma. De har inte observerat signifikanta ändringar på mRNA-expressionen när det gäller mediatorer som ingår i ospecifika immunsystemet. Studien utförd av Higuchi et al. visade att signifikanta ändringar på mRNA-expressionen hos det ospecifika immunsystemet kunde observeras. Resultatet visade att mRNA-expressionen för ospecifika immunsystemets mediatorer, som till exempel TNF- α ökade vid karbamazepin-inducerad levertoxicitet (13). Studien utförd av Fredrikson et al. undersökte i detalj om TNF- α hade en betydelse vid karbamazepin-inducerad levertoxicitet (16). Resultatet visade att leverceller som var inkuberade med TNF- α uppvisade signifikant apoptos. Med hjälp av dessa studier skulle det kunna sägas att karbamazepin ökar expressionen av immunsystemets komponenter, exempelvis TNF- α ,

vilket leder till apoptos och leverskada. Både Sasaki et al. och Fredrikson et al. studie hjälper till att kunna styrka hypotesen om immunsystemet står bakom karbamazepins levertoxicitet. Ena studien visar att TNF- α mängden ökar vid karbamazepin-inducerad levertoxicitet och den andra visar att TNF- α leder till apoptos hos levercellerna.

En annan observation som utfördes av Sasaki et al. visar att mängden endoliganderna S100A8 och S100A9 ökar vid karbamazepin administrering hos råttor (7). Dessa ligander aktiverar Kupffer-celler som är makrofager i det ospecifika immunsystemet. Denna aktivering leder till leverskada, vilket visas i studien där hämning av dessa celler minskade risken för levertoxicitet. Det som kan fås ut från denna undersökning är att immunsystemets komponenter ökar i mängd vid karbamazepin administrering som följs av ALAT-nivå ökning i plasma, som är tecken på leverskada.

Slutsats

Sammanfattningsvis kan slutsatsen dras att karbamazepins levertoxicitet beror både på metabolismen av läkemedlet och immunsystemet. Immunsystemets komponenter triggas igång av karbamazepins metaboliter. CYP-enzymerna metaboliserar karbamazepin till toxiska metaboliter, som i sin tur ger typ B biverkning.

Risk/nytta analys

Epilepsi förekommer hos 0,6 – 0,7 % av befolkningen i Sverige. Detta innebär att totala andelen som har epilepsi är cirka 60 000 personer (18). Incidensen av epilepsi är 50/100 000, vilket i Sverige innebär cirka 4500 – 5000 nya fall årligen. Långtidsuppföljningar visar att 65 – 85 % av patienter som behandlas mot epilepsi uppnår långvarig anfallsfrihet och 70 % av dessa visat kunna avsluta medicineringen helt (19).

Mortaliteten är ökad vid epilepsi. Överlevnadskvoten, som är kvoten mellan andelen levande i studiepopulation och andelen levande i kontrollgruppen, är 91 % 5 år efter diagnosen, 85 % efter 10 år och 83 % efter 15 år (20). Den ökade dödligheten kan vara direkt relaterad till anfällen men kan också bero på andra saker, såsom olyckor orsakad av anfallet. Det är viktigt att påbörja epilepsibehandlingen omgående (21).

Behandlingen består i förstahand av läkemedel. Antiepileptika, som till exempel karbamazepin, är förebyggande och minskar risken för anfall så länge behandlingen pågår.

Läkemedelinducerad levertoxicitet är en av vanligaste orsakerna till akut leverskada. Undersökningar utförda i Frankrike och Island visade att läkemedelinducerad levertoxicitet uppstår mellan 14 – 19 per 100 000 invånare/år (22).

Både epilepsi och leverskada är två svåra tillstånd. Om epilepsi inte behandlas ökar mortalitetsrisken markant. Epilepsi innebär osäkerhet. Det är inte lätt att veta när anfallet kommer och det kan innebära till exempel risk för olycksfall. Det påverkar också patientens vardagliga liv. Det kan handla från att undvika vissa situationer i vardagen till att behöva byta jobb. Därför är det viktigt att behandla epilepsin. När det gäller utvecklandet av leverskador på grund av läkemedel är det mindre sannolikt att alla anti-epileptikabehandlade ska drabbas av det. Enligt Fass är risken att utveckla leverbiverkningar sällsynt och/eller mycket sällsynt. Sällsynt motsvarar $\geq 1/10\ 000$, $< 1/1000$ och mycket sällsynt motsvarar $< 1/10\ 000$ (23). Med hjälp av studierna som har undersökts skulle det kunna sägas att de som får leverskada av karbamazepin är patienter som har överkänslighet mot läkemedlet.

In vivo-undersökningarna är gjorda på råttor och möss. Doseringen de har fått är ovanligt stora för att levern ska bli påverkad och utveckla toxicitet. Till exempel har mössen på Higuchi et al. undersökning fick 800 mg/kg karbamazepin. Om denna dos skulle översättas till behandling av en människa skulle den bli orimligt hög. Detta kan förtydligas med ett exempel. Om en person väger 70 kg och får 800 mg/kg karbamazepin skulle det motsvara 56 g karbamazepin. Eftersom mängden är orimligt att administrera en karbamazepinbehandlad patient är det svårt att tillämpa resultatet som fås från mössen till patienter, utan sådana studier skall ses som mekanistiska. När en epilepsipatient behandlas med karbamazepin får hen vanligtvis en underhållsdosering på 1200 mg/dag, alltså en dos ungefär 1/45 av den ekvivalenta dos som använts i djurstudierna. Både ALAT-mängderna och metabolitmängderna är uppmätta efter den stora doseringen av karbamazepin i undersökningarna och detta försvårar att dra slutsatsen om att patienten som behandlas med 1200 mg karbamazepin/dag får stormängd av metaboliten som ansamlas och leder till leverskada. Om doseringen från undersökningarna nödvändig för karbamazepin-inducerad levertoxicitet är risken liten för patienter som får en underhållsdos på 1200 mg/dag att utveckla levertoxicitet. Därför överväger nyttan risken.

Utvärdering av undersökta studier

De utförda undersökningarna förlitar sig i hög grad på associationer, vilket försvårar slutsatser kring kausalitet. Till exempel används ALAT-nivån som markör för levertoxicitet i arbetet. Undersökningarna visar att ALAT-nivån ökar när karbamazepin administreras. Eftersom studierna är associationsstudier kan det inte med säkerhet sägas vilken av karbamazepins metaboliter som eventuellt ökar plasmanivån av ALAT. Det kan finnas andra mediatorer bakom nivåökningen. Studierna utförda på immunsystemet är också associationsstudier. För att komma fram till ett resultat mättes mRNA-expressionen och det visade att immunsystemets komponenter ökade i mängd. Det som försvagar resultatens tillförlitlighet är att mRNA-expressionen är första steget i uttrycket av ett aktivt protein. Det är flera andra steg som följs efter mRNA-expression tills ett protein, som är slutprodukten, fås. Det kan inte med säkerhet sägas att den ökade mängden av immunsystemets komponenter kommer att hålla sig till slutet. Därför är det svårt att dra slutsatsen om att den ökade mRNA-expressionen, som orsakas av karbamazepin, leder i slutet till fortsatt ökning av immunsystemets komponenter. Framtida studier som undersöker immunsystemets betydelse vid karbamazepin-inducerad levertoxicitet skulle därför kunna studera proteinnivåer i större utsträckning.

5. Referenslista

1. Persson BB Ingemar. Läkemedelsbiverkningar | Läkemedelsboken. [citerad 30 mars 2017]. Tillgänglig vid:
https://lakemedelsboken.se/kapitel/lakemedelsanvandning/lakemedelsbiverkningar.html#x3_61
2. Wester K, Jönsson AK, Spigset O, Druid H, Hägg S. Incidence of fatal adverse drug reactions: a population based study. *Br J Clin Pharmacol*. April 2008;65(4):573–9.
3. Sand O, Sjaastad ØV, Haug E, 2004, Människans fysiologi, Liber AB, 1:a uppl.
4. Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G, 2016, Rang & Dale's Pharmacology, Elsevier Churchill Livingstone, 8th ed.
5. Norlén P, Lindström E, 2014, Farmakologi, Liber AB, 3:e uppl.

6. Björnsson E, Olsson R. Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology*. 01 augusti 2005;42(2):481–9.
7. Sasaki E, Iida A, Oda S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T. Pathogenetic analyses of carbamazepine-induced liver injury in F344 rats focused on immune- and inflammation-related factors. *Exp Toxicol Pathol*. Januari 2016;68(1):27–38.
8. Pirmohamed M, Kitteringham NR, Guenther TM, Breckenridge AM, Park BK. An investigation of the formation of cytotoxic, protein-reactive and stable metabolites from carbamazepine in vitro. *Biochem Pharmacol*. 15 april 1992;43(8):1675–82.
9. Substans - FASS Vårdpersonal. [citerad 23 maj 2017]. Tillgänglig vid: <http://www.fass.se/LIF/substance?userType=0&substanceId=IDE4POC8U9CHDVERT1>
10. Santos NAG, Medina WSG, Martins NM, Mingatto FE, Curti C, Santos AC. Aromatic antiepileptic drugs and mitochondrial toxicity: Effects on mitochondria isolated from rat liver. *Toxicol In Vitro*. Augusti 2008;22(5):1143–52.
11. Iida A, Sasaki E, Yano A, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T. Carbamazepine-Induced Liver Injury Requires CYP3A-Mediated Metabolism and Glutathione Depletion in Rats. *Drug Metab Dispos*. 01 juli 2015;43(7):958–68.
12. Peyre L, de Sousa G, Barcellini-Couget S, Luzy A-P, Zucchini-Pascal N, Rahmani R. High-content screening imaging and real-time cellular impedance monitoring for the assessment of chemical's bio-activation with regards hepatotoxicity. *Toxicol In Vitro*. Oktober 2015;29(7):1916–31.
13. Higuchi S, Yano A, Takai S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T. Metabolic Activation and Inflammation Reactions Involved in Carbamazepine-Induced Liver Injury. *Toxicol Sci*. 01 november 2012;130(1):4–16.
14. Pearce RE, Lu W, Wang Y, Uetrecht JP, Correia MA, Leeder JS. Pathways of Carbamazepine Bioactivation in Vitro. III. The Role of Human Cytochrome P450

- Enzymes in the Formation of 2,3-Dihydroxycarbamazepine. *Drug Metab Dispos.* 01 augusti 2008;36(8):1637–49.
15. Masubuchi Y, Nakano T, Ose A, Horie T. Differential selectivity in carbamazepine-induced inactivation of cytochrome P450 enzymes in rat and human liver. *Arch Toxicol.* 01 november 2001;75(9):538–43.
 16. Fredriksson L, Wink S, Herpers B, Benedetti G, Hadi M, de Bont H, Groothuis G, Luijten M, Danen E, de Graauw M, Meerman J, van de Water B . Drug-Induced Endoplasmic Reticulum and Oxidative Stress Responses Independently Sensitize Toward TNF α -Mediated Hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 01 juli 2014;140(1):144–59.
 17. Sedky K, Nazir R, Joshi A, Kaur G, Lippmann S. Which psychotropic medications induce hepatotoxicity? *Gen Hosp Psychiatry.* januari 2012;34(1):53–61.
 18. Läkemedelsbehandling av epilepsi - ny rekommendation - Läkemedelsbehandling av epilepsi_bakgrund_2011.pdf. [citerad 08 maj 2017]. Tillgänglig vid: https://lakemedelsverket.se/upload/halso-och-sjukvard/behandlingsrekommendationer/bakg_dok/L%c3%a4kemedelsbehandling%20av%20epilepsi_bakgrund_2011.pdf
 19. Läkemedelsbehandling av epilepsi - ny rekommendation - Läkemedelsbehandling av epilepsi_rek_2011.pdf. [citerad 08 maj 2017]. Tillgänglig vid: https://lakemedelsverket.se/upload/halso-och-sjukvard/behandlingsrekommendationer/L%c3%a4kemedelsbehandling%20av%20epilepsi_rek_2011.pdf
 20. Epilepsi drabbar särskilt små barn och gamla. [citerad 08 maj 2017]. Tillgänglig vid: <http://lakartidningen.se/OldPdfFiles/1997/15780.pdf>
 21. Epilepsi - 1177 Vårdguiden - sjukdomar, undersökningar, hitta vård, e-tjänster. [citerad 08 maj 2017]. Tillgänglig vid: <https://www.1177.se/Fakta-och-rad/Sjukdomar/Epilepsi/>

2017-06-20

22. Kullak-Ublick GA, Andrade RJ, Merz M, End P, Benesic A, Gerbes AL, Aithal GP. Drug-induced liver injury: recent advances in diagnosis and risk assessment. *Gut*. 2017 Jun;66(6):1154-1164

23. Tegretol® - FASS Vårdpersonal. [citerad 23 maj 2017]. Tillgänglig vid:
<http://www.fass.se/LIF/product?userType=0&nplId=19791214000020#side-effects>