

## Морфологические и функциональные изменения сердечно-сосудистой системы при остром отравлении клозапином (экспериментальное исследование)

А. С. Бабкина<sup>1,2</sup>, И. А. Рыжков<sup>1</sup>, В. В. Антонова<sup>1</sup>,  
З. И. Цоколаева<sup>1</sup>, А. Р. Асанов<sup>1</sup>, С. Н. Калабушев<sup>1,2</sup>, Ю. В. Заржецкий<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР,  
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

<sup>2</sup> Российский университет дружбы народов,  
Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

## Morphological and Functional Alterations of the Cardiovascular System during Acute Clozapine Poisoning (Experimental Study)

Anastasiya S. Babkina<sup>1,2</sup>, Ivan A. Ryzhkov<sup>1</sup>, Viktoriya V. Antonova<sup>1</sup>,  
Zoya I. Tsokolaeva<sup>1</sup>, Alan R. Asanov<sup>1</sup>, Sergey N. Kalabushev<sup>1,2</sup>, Yuri V. Zarzhetsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup> V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,  
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,  
25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia  
<sup>2</sup> Peoples' Friendship University of Russia,  
6 Miklukho-Maclaya Str., 117198 Moscow, Russia

**Цель исследования.** Оценить влияние сублетальной дозы клозапина на функциональные и морфологические параметры сердечно-сосудистой системы крысы через 4 ч после введения препарата.

**Материалы и методы.** Эксперименты выполнили на крысах-самцах линии Wistar весом 200–250 г ( $n=14$ ). I группе энтерально через зонд под общей анестезией севофлюраном вводили раствор NaCl 0,9%, II группе — клозапин в дозе 150 мг/кг в растворе NaCl 0,9%, III группе — клозапин в дозе 150 мг/кг в растворе 40% спирта этилового. Через 4 ч после введения препарата оценивали артериальное давление (АД), частоту сердечных сокращений (ЧСС), микроциркуляцию в коже методом лазерной допплеровской флуориметрии (ЛДФ), интенсивность флуоресценции коферментов НАДН, ФАД. После эвтаназии проводили аутопсию с забором внутренних органов крыс для морфологического исследования. Далее изготавливали парафиновые срезы сердец с последующей окраской гематоксилином и эозином, которые исследовали с помощью светового микроскопа.

**Результаты.** В обеих группах с введением клозапина АД и кровоток в коже были ниже, чем в контроле: АД в группе I — на 12%, в группе II — на 15%; кровоток — на 48 и 37%, соответственно. По исследуемым показателям микроциркуляции существенных различий между группами не наблюдали. Выявили повышенную интенсивность флюоресценции кофермента НАДН в коже в группах с введением клозапина по сравнению с контролем (в 2,3 раза в группе I и в 1,9 раза в группе II). При гистологическом исследовании сердец животных, получавших клозапин, выявили неравномерное кровенаполнение, эритроцитарные сладжи, мелкоочаговые кровоизлияния, перпендикулярную базальной мембране ориентацию ядер эндотелиоцитов, неравномерную окраску миокарда с гиперэозинофильными участками, фрагментацию и волнообразную деформацию мышечных волокон.

**Заключение.** При остром отравлении клозапином в сердце выявляются морфологические признаки нарушения кровообращения и повреждения миокарда, что сопровождается развитием дисфункции миокарда с артериальной гипотензией и снижением периферического кровотока, а также нарушениями окислительного метаболизма в периферических тканях.

**Ключевые слова:** клозапин; миокард; гемодинамика; микроциркуляция

**Purpose of the study.** To evaluate the influence of sublethal dose of Clozapine on the functional and morphological parameters of the cardiovascular system in rats 4 hrs. after the drug administration.

**Materials and methods.** The experiments were carried out on male Wistar rats weighing 200–250g ( $n=14$ ). Group I received 0.9% NaCl solution administered via enteral feeding tubing under general anesthesia using Sevoflurane; group II — Clozapine dosed at 150 mg/kg in 0.9% NaCl solution; group III — Clozapine dosed at 150 mg/kg in 40% ethyl alcohol solution. 4 hrs. after drug administration, arterial blood pressure (ABP), heart

**Адресс для корреспонденции:**

Анастасия С. Бабкина  
E-mail: asbabkina@gmail.com

**Correspondence to:**

Anastasiya S. Babkina  
E-mail: asbabkina@gmail.com

rate (HR), microcirculation in the skin using laser Doppler flowmetry (LSF), fluorescence intensity of coenzymes NADH and FAD were evaluated. After euthanasia, autopsy including withdrawal of the internal organs of rats for morphological analysis was performed. Thereafter, paraffin sections of hearts were made and subsequently stained with hematoxylin and eosin, which were later examined with the help of light microscope Nikon Eclipse Ni-U.

**Results.** In both Clozapine groups, ABP and blood flow in the skin were lower than in the control group: ABP — by 12% in group I and by 15% in group II; blood flow — by 48% and 37%, respectively. No significant difference between the groups was observed in respect of the microcirculation indices studied. Increased fluorescence intensity of coenzyme NADH in the skin was found in the Clozapine groups compared to the control group (2.3-fold in group I and 1.9-fold in group II). Histological analysis of the hearts of animals that received Clozapine established uneven blood filling, erythrocyte sludges, fine-focal hemorrhaging, endotheliocyte nuclei oriented perpendicular to the basal membrane, uneven staining of myocardium with hypereosinophilic segments, fragmentation and undulating deformity of muscle fibers.

**Conclusion.** During acute Clozapine poisoning, morphological signs of disturbed circulation and myocardium damage are found in the heart, which are accompanied with development of myocardium dysfunction with arterial hypotension and decreased peripheral blood flow, also disturbed oxidative metabolism in peripheral tissues.

**Keywords:** Clozapine; myocardium; hemodynamics; microcirculation

DOI:10.15360/1813-9779-2019-4-67-75

## Введение

Клозапин — производное дигензодиазепина, атипичный нейролептический препарат, используемый в психиатрической практике преимущественно для лечения резистентных к большинству нейролептиков заболеваний [1, 2]. Выраженное угнетение центральной нервной системы и высокий риск летального исхода при передозировке клозапина обусловливают случаи его использования в криминальных, суицидальных целях [3, 4]. По данным клинических и судебно-медицинских источников, отравления клозапином в большинстве случаев сочетаются с алкогольным опьянением [3–5]. Танатогенез при остром отравлении клозапином до конца не выяснен. Известно, что при приеме высоких доз клозапина причиной летального исхода является острые сердечная недостаточность или паралич дыхательного центра [6]. Возникновение жизнеугрожающих побочных эффектов отмечено также и при приеме терапевтических доз препарата. Среди них значимое место занимают неблагоприятные кардиальные эффекты, такие как миокардиты, кардиомиопатии, перикардиты, сердечная недостаточность, внезапная сердечная смерть [7–11]. A. Al-Wahab и соавт. в экспериментальном исследовании было выявлено повышение уровней норадреналина, адреналина, тропонинов, МВ фракции креатинфосфокиназы, интерлейкинов, фактора некроза опухоли альфа, цитокинов в крови мышей, получавших клозапин [12, 13].

Существует множество гипотез механизмов кардиотоксических эффектов клозапина, сформировавшихся в результате клинических и экспериментальных исследований. Среди них — иммунноопосредованное повреждение кардиомиоцитов реактивными метаболитами клозапина, нитренивыми ионами, повреждение кардио-

## Introduction

Clozapine is a derivative of dibenzodiazepine, an atypical neuroleptic drug used in psychiatric practice mostly for diseases resistant to a majority of neuroleptics [1, 2]. Pronounced suppression of the central nervous system and high risk of lethal outcome in case of Clozapine overdosing explain cases of its use for criminal and suicidal purposes [3, 4]. According to clinical and forensic sources, Clozapine poisoning is combined with alcohol intoxication in most cases [3–5]. The thanatogenesis during acute Clozapine poisoning has not been fully clarified. It is known that in case of intake of high doses of Clozapine, the cause of lethal outcome is acute cardiac failure or respiratory center paralysis [6]. Occurrence of life-threatening side effects was also noted during intake of therapeutic doses of the drug. An important role among them belongs to adverse cardiac effects such as myocarditis, cardiomyopathy, pericarditis, heart failure, sudden cardiac death [7–11]. A. Al-Wahab et al. revealed in an experimental study the increased levels of noradrenaline, adrenaline, troponins, creatine phosphokinase-MB, interleukins, tumor necrosis factor alpha, cytokines in the blood of mice that received Clozapine [12, 13].

There are numerous hypotheses concerning the mechanisms of cardiotoxicity of Clozapine, which have been suggested based on clinical and experimental studies. They include immune mediated damage of cardiomyocytes by reactive metabolites of Clozapine, nitrene ions formation, damage of cardiomyocytes due to accumulation of adrenaline therein, blocking the potassium channels and slow down cell membrane repolarization by the drug, which causes the arrhythmogenic side effects [13–16].

The mechanisms of acute alcohol intoxication are well characterized. The toxic action of ethanol

миоцитов вследствие накопления в них адреналина, а также способность клозапина блокировать калиевые каналы и замедлять реполяризацию мембранны клеток, обусловливая его аритмогенные побочные эффекты [13–16].

Механизмы острой алкогольной интоксикации изучены достаточно хорошо. Токсическое воздействие этанола и продуктов его метаболизма приводит к нарушению сократительной функции миокарда, ритма и проводимости [17, 18]. Однако, пато- и танатогенез при остром комбинированном отравлении клозапином и алкоголем изучены недостаточно.

Цель исследования — оценить влияние сублетальной дозы клозапина на функциональные и морфологические параметры сердечно-сосудистой системы крысы через 4 ч после введения препарата.

## Материал и методы

Эксперименты провели на крысах-самцах линии Wistar массой 200–250 г ( $n=14$ ). За 12 ч до эксперимента животные не получали корм, но имели свободный доступ к воде. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [19].

Под общей ингаляционной анестезией (севофлюран 4 об% с потоком кислорода 2 л/мин в индукционной камере) энтерально через желудочный зонд вводили исследуемые растворы в объеме 10 мл/кг массы животного. В зависимости от состава вводимого раствора выделили следующие группы животных:

I группа (контрольная),  $n=5$  — раствор NaCl 0,9%;  
II группа («клозапин»),  $n=5$  — клозапин в дозе 150 мг/кг в растворе NaCl 0,9%.

III группа («клозапин+алкоголь»),  $n=4$  — клозапин в дозе 150 мг/кг в растворе 40% спирта этилового.

После введения препаратов животные находились под наблюдением в виварии в течение 4 ч в условиях свободного доступа к воде, но без пищи. Через 4 ч проводили повторную индукцию анестезии (севофлюран 4 об% с потоком кислорода 2 л/мин в индукционной камере). Поддержание анестезии осуществляли подачей севофлюрана 1,5–2,5 об% через конусовидную маску с потоком кислорода 1 л/мин. С целью измерения среднего артериального давления (АД) и забора проб артериальной крови катетеризировали левую бедренную артерию полиэтиленовым катетером 23G. Для поддержания проходимости катетер промывали 0,2 мл раствора нефракционированного гепарина (50 ЕД/мл) после установки и повторно при необходимости.

Крысу фиксировали на подогреваемой платформе монитора MouseMonitor S (INDUS Instruments, США). С целью контроля центральной температуры тела устанавливали ректальный термометр. Целевая центральная температура тела животного — 36,5–37°C. Перед началом измерений был период стабилизации животного в течение 20 мин.

Измерение АД проводили с использованием трансдьюсера Deltran DPT-100 (Utah Medical Products, США) прибором BP-100 (CWE, Inc., США). Частоту сер-

и и продуктов ее метаболизма приводят к нарушению сократительной функции миокарда, ритма и проводимости [17, 18]. Однако, пато- и танатогенез при остром комбинированном отравлении клозапином и алкоголем изучены недостаточно.

The purpose of this study is to assess the influence of sublethal dose of Clozapine on the functional and morphological parameters of the cardiovascular system in rats 4 hours after the drug administration.

## Materials and Methods

The experiments were carried out on male Wistar rats weighing 200–250 g ( $n=14$ ). Twelve hrs. before the experiment, the animals did not receive feeding but retained free access to water. The experiments were carried out in compliance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and EU Council on the protection of animals used for scientific purposes [19].

The solutions under study were administered under general inhalation anesthesia (Sevoflurane 4% vol. with oxygen flow at 2 l/min in the induction chamber), via enteral feeding tubing at a dose of 10 ml/kg of the animal weight. The following groups of animals were distinguished depending on the composition of administered solution:

Group I (control),  $n=5$  — 0.9% NaCl solution;

Group II (Clozapine),  $n=5$  — Clozapine at a dose of 150 mg/kg in 0.9% NaCl solution;

Group III (Clozapine+alcohol),  $n=4$  — Clozapine at a dose of 150 mg/kg in 40% ethyl alcohol solution.

After administration of the drugs, the animals were kept in the vivarium under observation for 4 hrs. in the environment of free access to water and no feeding. 4 hours later, the induction anesthesia was repeated (Sevoflurane 4% vol. with oxygen flow at 2 l/min in the induction chamber). Anesthesia was maintained by delivery of Sevoflurane 1.5–2.5% vol. via a tapered mask with oxygen flow at 1 l/min. To measure mean arterial blood pressure (ABP) and harvest arterial blood samples, the left femoral artery was catheterized using polyethylene catheter 23G. To maintain patency, the catheter was washed with 0.2 ml of unfractionated heparin solution (50 U/ml) after catheterization and again as necessary.

The animals were immobilized on the heated platform of MouseMonitor S (INDUS Instruments, USA). For the purpose of monitoring the central temperature of the body, a rectal thermometer was inserted. The target central temperature of the animal body was 36.5–37°C. Prior to commencement of measurements, there was a 20-minute period of animal stabilization.

ABP was measured using transducer Deltran DPT-100 (Utah Medical Products, USA) with the help of instrument BP-100 (CWE, Inc., USA). The heart rate was determined based on ECG using subcutaneous needle electrodes of MouseMonitor S (INDUS Instruments, USA). The microcirculation condition was evaluated using the laser Doppler flowmetry technique (LSF); the condition of tissue oxidative metabolism coenzymes (NADH and FAD) was assessed with the aid of laser fluorescent diagnostics (LFD). The sensor of LASMA MC instrument (LASMA NPP LLC, Russia) was positioned on the ventral surface of proximal part of the tail with a minimal gap. LSF-gramma was recorded during 8 min. The values analyzed were the

дечных сокращений определяли по ЭКГ с применением подкожных игольчатых электродов монитора MouseMonitor S (INDUS Instruments, США). Для оценки состояния микроциркуляции применяли метод лазерной допплеровской флюметрии (ЛДФ), для оценки состояния коферментов окислительного метаболизма тканей (НАДН и ФАД) — метод лазерной флуоресцентной диагностики (ЛФД). Датчик прибора ЛАЗМА МЦ (ООО НПП «ЛАЗМА», Россия) устанавливали на вентральной поверхности проксимального отдела хвоста с минимальным зазором. Регистрацию ЛДФ-граммы проводили в течение 8 мин. Анализировали среднее значение перфузии кожи (или показатель микроциркуляции — M, перфузионные единицы [пф. ед.]), среднее квадратичное отклонение амплитуды колебаний кровотока ( $\sigma$ , пф.ед.); коэффициент вариации перфузии (Kv, %). В последующем методом вейвлет-анализа исследовали колебания микрокровотока в диапазоне 0,01–0,4 Гц. Амплитуды колебаний кровотока в данном частотном диапазоне у крыс несут информацию о состоянии механизмов регуляции микроциркуляции: эндотелиальном (A<sub>e</sub>), нейрогенном (A<sub>n</sub>) и миогенном (A<sub>m</sub>) [20]. Также среди этих амплитуд определяли максимальную амплитуду колебаний микрокровотока (A<sub>max</sub>, пф. ед.) и соответствующую ей частоту (F<sub>max</sub>, Гц). За этот же период времени оценивали интенсивность излучения флуоресценции НАД-Н (UV — длина волны зондирующего излучения 365 нм — «ультрафиолет») и ФАД (B — длина волны зондирующего излучения 450 нм — «синий»), а также так называемое «редокс-отношение» (PO=UV/B).

После регистрации исследуемых функциональных параметров животных подвергали эвтаназии методом шейной дислокации под общей анестезией севофлюраном. Проводили аутопсию с забором внутренних органов крыс для морфологического исследования. Материал фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина. После фиксации проводили вырезку кусочков органов для гистологического исследования по следующей методике. Сердца рассекали через середину во фронтальной плоскости через все отделы на 2 части, в которых содержались оба предсердия, правый и левый желудочки, межжелудочковая перегородка. Затем материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин. Паракинновые срезы для морфологического исследования окрашивали гематоксилином-эозином. Исследование гистологических препаратов проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ni-U (Япония). Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 7.0. Для оценки достоверности различий соответствующих показателей между группами использовали критерий U Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p \leq 0,05$ . Анализируемые величины представили в виде: Me (25%; 75%).

## Результаты и обсуждение

Несмотря на потенциальное аритмогенное действие клозапина [7], по данным ЭКГ не выявили аритмий сердца (экстрасистолы, паузы, желудочковая тахикардия) во всех группах.

В обеих группах с введением клозапина АД было ниже, чем в контроле (на 12% в группе I и

mean skin perfusion (or microcirculation index — M, perfusion units [pf.u.]), mean root square deviation of the amplitude of blood flow oscillations ( $\sigma$ , pf.u.); perfusion variation coefficient (Kv, %). Later, using the wavelet analysis, oscillations of micro blood flow within the range of 0.01–0.4 Hz were analyzed. Amplitudes of blood flow oscillations in this frequency range in rats provide information on the mechanisms of microcirculation regulation: endothelial (A<sub>e</sub>), neurogenic (A<sub>n</sub>), or myogenic (A<sub>m</sub>) one[20]. Also, among these amplitudes, the maximal amplitude of micro blood flow oscillations was determined (A<sub>max</sub>, pf.u.) and corresponding thereto frequency (F<sub>max</sub>, Hz). For the same period of time, fluorescence intensity of NADH (UV — the probing radiation wavelength was 365 nm — ‘ultraviolet’) and FAD (B — the probing radiation wavelength was 450 nm — ‘blue’), as well as the so-called ‘redox relation’ (RR=UV/B).

After the functional parameters were recorded in the study, the animals were subjected to euthanasia by cervical dislocation under general anesthesia with Sevoflurane. Autopsy was performed and internal organs of the rats were harvested for morphological examination. The material was fixed with 10% neutral formaldehyde solution. After fixation, the pieces were cut out from organs for histological analysis according to the following methodology. Hearts were dissected through the middle in the frontal plane through all compartments into two parts containing both atria, right and left ventricles, interventricular septum. Then the material was dehydrated with increasing concentrations of alcohol and embedded into paraffin. Paraffin sections for morphological analysis were stained with hematoxylin-eosin. Histological specimens were examined using microscope Nikon Eclipse Ni-U (Japan). Statistical processing of data was performed using software package Statistica 7.0. To evaluate the significance of differences between the groups, Wilcoxon–Mann–Whitney U-test was used. Differences were considered reliable at  $P \leq 0.05$ . The analyzed values were presented as Me (25%; 75%).

## Results and Discussion

In spite of the potential pro-arrhythmogenic effect of Clozapine [7], ECG did not detect heart arrhythmias (extra-systoles, pauses, ventricular tachycardia) in any group.

In both Clozapine groups, ABP was lower than in the control group (by 12% in group I and by 15% in group II). At the same time, there was no difference between groups II and III as regards this index. HR in group II was 31% lower than in the control group, which was not observed in III (table). Blood flow in the skin (M) of animals in both Clozapine groups was lower compared to the control (by 48% in group I and by 37% in group II). Also, in Clozapine groups, a minor increase of Kv was noted (by 1.5% in group I and by 1.2% in group II), which was due to decreased blood flow in those groups rather than increase of its variability: value  $\sigma$  was not increased but even decreased versus the control by 17% in both groups. In respect of a number of other microcirculation parameters evaluated under the study, such as oscillation amplitudes of blood flow

**Системная гемодинамика, параметры микроциркуляции и показатели окислительного метаболизма через 4 ч после внутрижелудочного введения растворов клозапина или раствора NaCl 0,9%.**  
**Systemic hemodynamics, microcirculation parameters and oxidative metabolism indices 4 hrs. after intragastric administration of Clozapine solutions or 0.9% NaCl solution.**

Parameters	Parameter values in groups		
	0.9% NaCl, n=5	Clozapine + 0.9%NaCl, n=5	Clozapine + Ethyl alcohol, n=4
HR, 1/min	355 (342; 361)	246* (243; 308)	320 (260; 347)
ABP, mm Hg	124.0 (121.0; 129.5)	109.0* (91.5; 110.0)	105.0* (100.5; 108.0)
M, pf.u.	18.2 (16.8; 18.9)	9.5# (9.3; 9.6)	11.5* (9.6; 12.6)
$\sigma$ , pf.u.	0.72 (0.70; 0.85)	0.60* (0.56; 0.60)	0.60* (0.54; 0.60)
Kv, pf.u.	4.5 (4.2; 4.5)	6.0# (5.9; 6.6)	5.7* (5.2; 5.8)
Ae, pf.u.	0.14 (0.11; 0.14)	0.10 (0.09; 0.12)	0.10 (0.09; 0.105)
An, pf.u.	0.18 (0.16; 0.21)	0.12 (0.12; 0.17)	0.14 (0.10; 0.18)
Am, pf.u.	0.17 (0.16; 0.18)	0.10 (0.10; 0.11)	0.10 (0.08; 0.14)
Amax, pf.u.	0.20 (0.18; 0.21)	0.12 (0.12; 0.17)	0.14 (0.10; 0.18)
Fmax, Hz	0.12 (0.11; 0.15)	0.09 (0.09; 0.27)	0.08* (0.07; 0.08)
UV	0.56 (0.44; 0.66)	1.29*(0.82; 2.80)	1.05* (0.84; 2.39)
B	0.71 (0.69; 1.38)	1.60 (1.20; 2.31)	1.21 (0.80; 3.40)
RR	0.62 (0.49; 0.64)	0.72 (0.56; 0.72)	0.93 (0.59; 1.32)

**Note.** # —  $P \leq 0.01$  in comparison with the control group; \* —  $P \leq 0.05$  in comparison with the control group. M is the mean skin perfusion (microcirculation index);  $\sigma$  is the mean root square deviation of blood flow oscillation amplitude; Kv is the perfusion variation coefficient; Ae is the maximal amplitude of oscillations of the micro blood flow of endothelial origin; An is the maximal amplitude of oscillations of the micro blood flow of neurogenic origin; Am is the maximal amplitude of oscillations of the micro blood flow of myogenic origin; Amax is the maximal amplitude of oscillations of the micro blood flow in the range of 0.01–0.4 Hz; Fmax is the frequency corresponding to Amax. UV is the NADH fluorescence intensity; B is the FAD fluorescence intensity; RR is the redox relation.

**Примечание.** Parameters — показатели; ...values in groups — ...значения в группах; HR — ЧСС; АВР — АД; M — среднее значение перфузии кожи (показатель микроциркуляции);  $\sigma$  — среднее квадратичное отклонение амплитуды колебаний кровотока; Kv — коэффициент вариации перфузии; Ae — максимальная амплитуда колебаний микрокровотока эндотелиального происхождения; An — максимальная амплитуда колебаний микрокровотока нейрогенного происхождения; Am — максимальная амплитуда колебаний микрокровотока собственно миогенного происхождения; Amax — максимальная амплитуда колебаний микрокровотока в диапазоне 0,01–0,4 Гц; Fmax — частота, соответствующая Amax; UV — интенсивность излучения флуоресценции НАД-Н; B — интенсивность излучения флуоресценции ФАД; RR — редокс-отношение. # —  $p \leq 0,01$  при сравнении с контрольной группой; \* —  $p \leq 0,05$  при сравнении с контрольной группой.

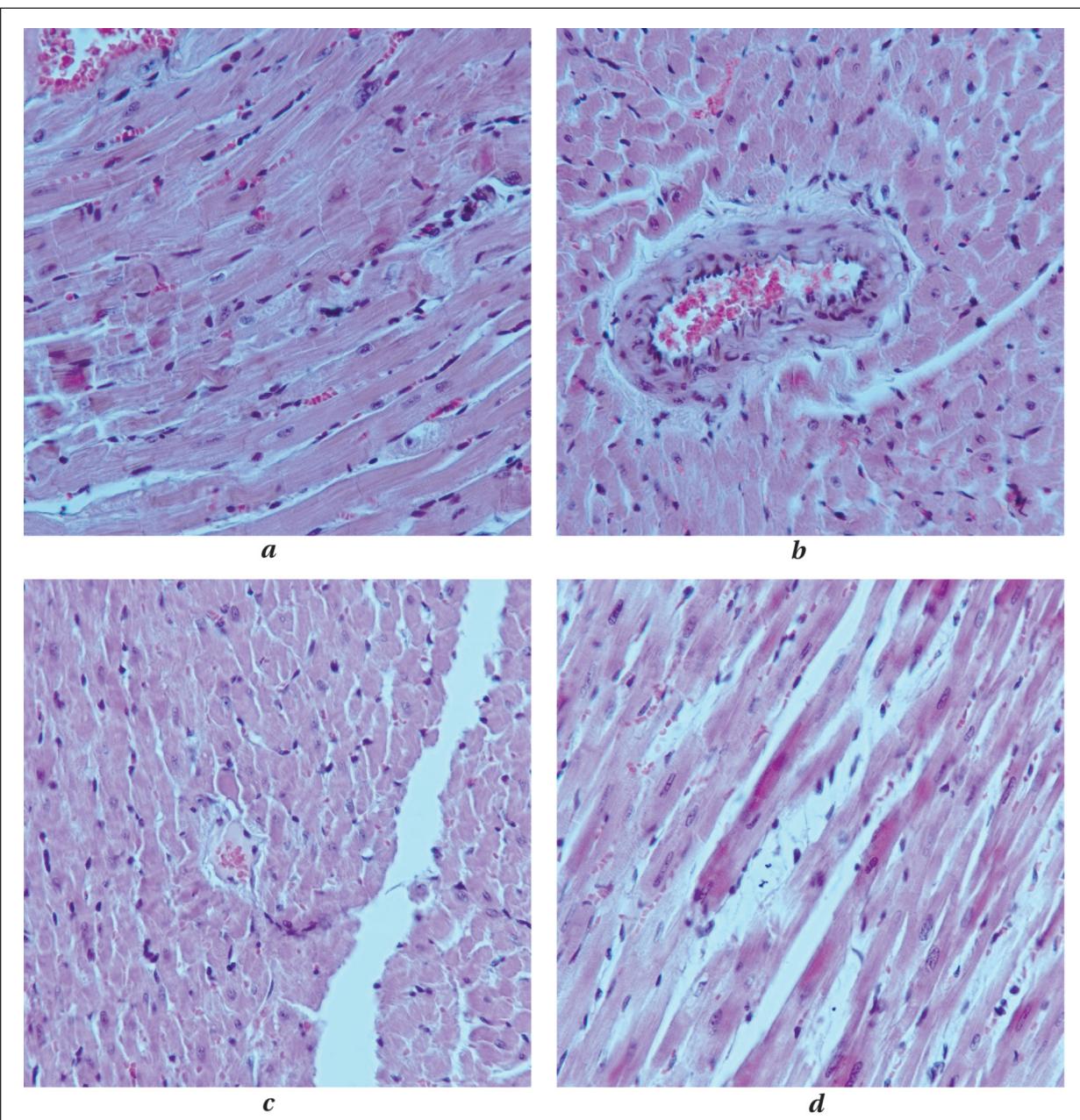
на 15% в группе II). Вместе с тем, группы II и III по этому показателю не различались. ЧСС в группе II была на 31% ниже, чем в контроле, чего не наблюдалось в группе III (таблица). Кровоток в коже (M) у животных обеих групп с введением клозапина был ниже по сравнению с контролем (на 48% в группе I и на 37% в группе II). Также в группах с введением клозапина происходило незначительное увеличение Kv (на 1,5% в группе I и на 1,2% в группе II), что было обусловлено снижением кровотока в этих группах, а не увеличением показателя его изменчивости: величина  $\sigma$  не увеличилась, а даже снижалась по сравнению с контролем на 17% в обеих группах. По ряду других исследуемых параметров микроциркуляции, таких как амплитуды колебаний кровотока эндотелиального, нейрогенного и миогенного происхождения, а также по максимальной амплитуде (Amax) различий между группами не наблюдалось, но доминирующая частота колебаний кровотока (Fmax) в группе III была ниже, чем в контроле. Можно предположить, что выявленное замедление колебаний микрокровотока (флаксмоций) связано с гипоперфузией исследуемого региона ткани, однако обычно данный феномен сопровождается увеличением амплитуды таких колебаний [21], чего не отметили в настоящем исследовании.

of endothelial, neurogenic or myogenic origin, and maximal amplitude (Amax), no difference was noted between the groups. However, the predominant frequency of blood flow oscillations (Fmax) in group III was lower than in the control group. It can be assumed that the observed slowing down of micro blood flow oscillations (flux motions) is related to hypoperfusion of the tissue region under study; however, this phenomenon is usually accompanied by the increase of the amplitude of such oscillations [21], which has not been demonstrated in this study.

Laser fluorescent diagnostics revealed increased fluorescence intensity of coenzyme NADH in the skin in Clozapine groups compared to the control (2.3-fold in group I and 1.9-fold in group II). However, there was no inter-group difference in the FAD fluorescence intensity and RR.

Histological examination of heart sections of Clozapine group animals found uneven blood filling, interstitial edema, sludge, endotheliocyte nuclei oriented perpendicularly to the basal membrane, uneven staining of myocardium with hypereosinophilic areas, fragmentation and undulating deformity of muscle fibers (Fig. 1–4).

All animals of group 'Clozapine + alcohol' displayed uneven blood filling, fine-focal hemorrhaging, uneven staining of myocardium with hypereosinophilic areas, undulating deformity of muscle



**Гистологические препараты сердца крысы через 4 ч после введения клозапина.**

**Histological preparations of rat heart 4 hrs. after Clozapine administration.**

**Note.** Staining with hematoxylin and eosin.  $\times 400$ . *a* — fragmentation of muscle fibers in the rat heart; *b* — endotheliocyte nuclei oriented perpendicularly to the basal membrane; *c* — sludge; *d* — interstitial edema and eosinophilia.

**Примечание.** Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 400$ . *a* — фрагментация мышечных волокон в сердце крысы; *b* — перпендикулярная базальной мембране ориентация ядер эндотелиоцитов; *c* — сладж; *d* — интерстициальный отек и эозинофилия.

Методом лазерной флуоресцентной диагностики выявили повышенную интенсивность флюоресценции кофермента НАДН в коже в группах с введением клозапина по сравнению с контролем (в 2,3 раза в группе I и в 1,9 раза в группе II). Однако межгрупповых различий по интенсивности флюоресценции ФАД и значениям РО не выявили.

При гистологическом исследовании срезов сердец животных группы «клозапин», выявили неравномерное кровенаполнение,

fibers. The morphological alterations found in groups 'Clozapine' and 'Clozapine + alcohol' were not observed in the control group of animals.

As it was mentioned above, in the groups of animals that received Clozapine, the simultaneous decreases of both ABP and peripheral blood flow (in the skin) were observed. At the same time, in those groups there was no significant difference in the microcirculation parameters reflecting the oscillatory component of vessel tone regulation, which evidences absence of a substantial effect of

интерстициальный отек, сладжи, перпендикулярную базальную мембране ориентацию ядер эндотелиоцитов, неравномерную окраску миокарда с гиперэозинофильными участками, фрагментацию и волнообразную деформацию мышечных волокон (рисунок).

У всех животных группы «клозапин+алкоголь» выявили неравномерное кровенаполнение, мелкоочаговые кровоизлияния, неравномерную окраску миокарда с гиперэозинофильными участками, волнообразную деформацию мышечных волокон. Морфологические изменения, выявленные в группах «клозапин» и «клозапин+алкоголь», не наблюдали в контрольной группе животных.

Как указывалось выше, в группах животных с введением клозапина отмечали одновременное снижение как АД, так и периферического кровотока (в коже). При этом в этих группах не выявили существенных различий по параметрам микроциркуляции, отражающим колебательный компонент регуляции тонуса сосудов, что свидетельствует об отсутствии значимого воздействия клозапина на основные активные механизмы его регуляции в коже. Тем не менее, нельзя исключить отрицательное влияние клозапина на реологические показатели крови и гемостаз, которые также в значительной степени определяют состояние микроциркуляции.

Изменения функциональных показателей сердечно-сосудистой системы, выявленные у животных, получавших клозапин, подтверждаются морфологическими признаками нарушения кровообращения в сердце (неравномерное кровенаполнение, сладжи, интерстициальный отек, перпендикулярная базальная мембрана ориентация ядер эндотелиоцитов, мелкоочаговые кровоизлияния) и повреждения миокарда (неравномерная окраска миокарда с гиперэозинофильными участками, фрагментация и волнообразная деформация мышечных волокон).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что действие клозапина на кровообращение обусловлено, прежде всего, повреждением миокарда и снижением сердечного выброса, а не сосудистой недостаточностью. Относительная брадикардия, наблюдавшаяся в группе II, также может указывать на прямое кардиотокическое действие больших доз клозапина.

Повышенная интенсивность флюoresценции кофермента НАДН в группах II и III по сравнению с контролем свидетельствует о снижении скорости окислительного метаболизма в клетках исследуемого региона ткани [22]. Такое нарушение клеточного аэробного метаболизма может быть следствием как циркуля-

Clozapine on the main active mechanisms of its regulation in the skin. Nevertheless, Clozapine's adverse influence on rheological indices of the blood and hemostasis, which also largely determine the condition of microcirculation, cannot be ruled out.

The alterations of functional parameters of the cardiovascular system found in animals that received Clozapine are supported by morphological signs of disturbed circulation in the heart (uneven blood filling, sludge, interstitial edema, endotheliocyte nuclei oriented perpendicularly to the basal membrane, fine-focal hemorrhaging) and myocardium damages (uneven myocardium staining with hypereosinophilic areas, fragmentation, and undulating deformity of muscle fibers).

Hence, the data demonstrate that the effect of Clozapine on blood circulation is, first of all, due to myocardium damage and cardiac output reduction rather than vascular insufficiency. Relative bradycardia observed in group II might also indicate direct cardiotoxic action of large doses of Clozapine.

Increased fluorescence intensity of coenzyme NADH in groups II and III versus the control testifies for the reduced rate of oxidative metabolism in the cells of the tissue region [22]. Such disturbance of the cellular aerobic metabolism might result both from circulatory hypoxia (decreased skin perfusion) and tissue hypoxia (direct influence of Clozapine on the processes of oxidative phosphorylation in the mitochondria). Fluorescence parameters were registered at the background of inhalation anesthesia with delivery of 100% oxygen in all groups of animals. Therefore, it is hardly probable that hypoxemia could be the reason for aerobic metabolism changes observed. Besides, absence of difference between the groups under study in the FAD fluorescence intensity and RR figures makes it somewhat difficult to find out the mechanisms of oxidative metabolism changes in this study [23].

It is also interesting to note that administration of ethyl alcohol combined with Clozapine to animals did not significantly alter the effects of the latter on the functional parameters with the exception of bradycardia in the Clozapine group.

## Conclusion

In case of acute Clozapine poisoning, morphological signs of circulation disturbance and myocardium damage were found in the heart, which is accompanied by the development of myocardium dysfunction with arterial hypotension and peripheral blood flow lessening as well as disturbed oxidative metabolism in peripheral tissues.

**Acknowledgments.** The authors are sincerely grateful to prof. A.M. Golubev, Dr. Med. Sc., for his assistance in performing the study and valuable comments.

торной гипоксии (снижение перфузии кожи), так и тканевой гипоксии (прямое влияние клозапина на процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях). Регистрацию параметров флюоресценции проводили на фоне ингаляционной анестезии с подачей 100% кислорода во всех группах животных. Поэтому маловероятно, что гипоксемия могла стать причиной наблюдаемых изменений аэробного метаболизма. Кроме того, отсутствие различий между исследуемыми группами по интенсивности флюоресценции ФАД и значениям РО, в определенной степени затрудняет выявление механизмов изменения окислительного метаболизма в данном исследовании [23].

Интересно также отметить, что введение животным раствора этилового спирта в сочетании с клозапином существенно не меняло

#### Литература

- Green A., Tohen M., Patel J.K., Banov M., DuRand C., Berman I., Chang H., Zarate C., Posener J., Lee H., Dawson R., Richards C., Cole J.O., Schatzberg A.F. Clozapine in the treatment of refractory psychotic mania. *Am. J. Psychiatry.* 2000; 157 (6): 982–986. DOI: 10.1176/appi.ajp.157.6.982. PMID: 10831480
- Tochilov V.A., Kushnir O.N. Клозапин – препарат выбора для лечения больных с острыми психозами. *Социальная и клиническая психиатрия.* 2011; 21 (2): 37–42.
- Шигеев С.В., Иванова Н.А., Иванов С.В. Отравления клозапином: теоретические аспекты и судебно-медицинская оценка. *Судебно-медицинская экспертиза.* 2013; 6: 41–46.
- Слондин Д.Г., Ливанов А.С., Анучин В.В., Меркин А.Г., Бобринская И.Т., Тутова Е.В. Особенности психопатологических проявлений при криминальных отравлениях клозапином. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика.* 2010; 3: 57–63.
- Flanagan R.J., Spencer E.P., Morgan P.E., Barnes T.R., Dunk L. Suspected clozapine poisoning in the UK/Ire, 1992—2003. *Forens Sci Int.* 2005; 155: 2–3: 91–99. DOI: 10.1016/j.forsciint.2004.10.024. PMID: 16226146
- Слондин Д.Г., Ливанов А.С., Анучин В.В., Бобринская И.Г., Гутова Е.В. Криминальные отравления клозапином. *Анетезиология и реаниматология.* 2007; 4: 61–64. PMID: 17929492.
- Khan A.A., Ashraf A., Baker D., Al-Omary M.S., Savage L., Ekmejian A., Singh R.S.H., Brienesse S., Majeed T., Gordon T., Drinkwater V., Collins N.J. Clozapine and incidence of myocarditis and sudden death — long term Australian experience. *Int. J. Cardiol.* 2017; 238: 136–139. DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.03.013. PMID: 28343762
- Katta N., Balla S., Aggarwal K. Clozapine-induced hypersensitivity myocarditis presenting as sudden cardiac death. *Autops. Case Rep.* 2016; 6 (4): 9–13. DOI: 10.4322/acr.2016.054. PMID: 28210568
- Longhi S., Heres S. Clozapine-induced, dilated cardiomyopathy: a case report. *BMC Res. Notes.* 2017; 10 (1): 338. DOI: 10.1186/s13104-0172679-5. PMID: 28750684
- Woloszyn E., Whig N., Trigoboff E., Grace J.J. Cardiac arrest with clozapine and olanzapine: revealing long QT syndrome. *Clin. Schizophr. Relat. Psychoses.* 2016. [Epub: ahead of print]. DOI: 10.3371/CSRP.WOWH.112316. PMID: 27996317
- Barry A.R., Windram J.D., Graham M.M. Clozapine-associated myocarditis: case report and literature review. *Can. J. Hosp. Pharm.* 2015; 68 (5): 427–429. DOI: 10.4212/cjhp.v68i5.1493. PMID: 26478592
- Abdel-Wahab B.A., Metwally M.E. Clozapine-induced cardiotoxicity: role of oxidative stress, tumour necrosis factor alpha and NF- $\kappa$ B. *Cardiovasc. Toxicol.* 2015; 15 (4): 355–365. DOI: 10.1007/s12012-014-9304-9. PMID: 25539628
- Abdel-Wahab B.A., Metwally M.E. Clozapine-induced cardiotoxicity in rats: involvement of tumour necrosis factor alpha, NF-  $\beta$  and caspase-3. *Toxicol. Rep.* 2014; 1: 1213–1223. DOI: 10.1016/j.toxrep.2014.11.012. PMID: 28962331
- Williams D.P., O'Donnell C.J., Maggs J.L., Leeder J.S., Uetrecht J., Pir-mohamed M., Park B.K. Bioactivation of clozapine by murine cardiac tissue in vivo and in vitro. *Chem. Res. Toxicol.* 2003; 16 (10): 1359–1364. DOI: 10.1021/tx034035z. PMID: 14565776
- Ishiyama S., Hiroe M., Nishikawa T., Abe S., Shimojo T., Ito H., Ozasa S., Yamakawa K., Matsuzaki M., Mohammed M.U., Nakazawa H., Kasajima T., Marumo F. Nitric oxide contributes to the progression of myocardial damage in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation.* 1997; 95 (2): 489–496. DOI: 10.1161/01.CIR.95.2.489. PMID: 9008468

эффекты последнего на исследуемые функциональные показатели, за исключением относительной брадикардии в группе «клозапин».

## Заключение

При остром отравлении клозапином в сердце выявляются морфологические признаки нарушения кровообращения и повреждения миокарда, что сопровождается развитием дисфункции миокарда с артериальной гипотензией и снижением периферического кровотока, а также нарушениями окислительного метаболизма в периферических тканях.

**Благодарность.** Авторы искренне признательны д. м. н., проф. А. М. Голубеву за помощь в проведении исследования и сделанные ценные замечания.

#### References

- Green A., Tohen M., Patel J.K., Banov M., DuRand C., Berman I., Chang H., Zarate C., Posener J., Lee H., Dawson R., Richards C., Cole J.O., Schatzberg A.F. Clozapine in the treatment of refractory psychotic mania. *Am. J. Psychiatry.* 2000; 157 (6): 982–986. DOI: 10.1176/appi.ajp.157.6.982. PMID: 10831480
- Tochilov V.A., Kushnir O.N. Clozapine is the drug of choice for the treatment of patients with acute psychosis. *Socialnaya i klin. psichiatriya.* 2011; 21 (2): 37–42. [In Russ.]
- Shigeev S.V., Ivanova N.A., Ivanov S.V. Clozapine poisoning: theoretical aspects and forensic assessment. *Sud. Med. Expert.* 2013; 6: 41–46. [In Russ.]
- Slyundin D.G., Livanov A.S., Anuchin V.V., Merkin A.G., Bobrinskaya I.T., Tutova E.V. Features of psychopathological manifestations in criminal poisoning with clozapine. *Nevrologiya, nejropsikiatriya, psichosomatika.* 2010; 3: 57–63. [In Russ.]
- Flanagan R.J., Spencer E.P., Morgan P.E., Barnes T.R., Dunk L. Suspected clozapine poisoning in the UK/Ire, 1992—2003. *Forens Sci Int.* 2005; 155: 2–3: 91–99. DOI: 10.1016/j.forsciint.2004.10.024. PMID: 16226146
- Slyundin D.G., Livanov A.S., Anuchin V.V., Bobrinskaya I.G., Gutova E.V. Criminal Clozapine poisonings. *Anastes. i reanimatol.* 2007; 4: 61–64. [In Russ.] PMID: 17929492.
- Khan A.A., Ashraf A., Baker D., Al-Omary M.S., Savage L., Ekmejian A., Singh R.S.H., Brienesse S., Majeed T., Gordon T., Drinkwater V., Collins N.J. Clozapine and incidence of myocarditis and sudden death — long term Australian experience. *Int. J. Cardiol.* 2017; 238: 136–139. DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.03.013. PMID: 28343762
- Katta N., Balla S., Aggarwal K. Clozapine-induced hypersensitivity myocarditis presenting as sudden cardiac death. *Autops. Case Rep.* 2016; 6 (4): 9–13. DOI: 10.4322/acr.2016.054. PMID: 28210568
- Longhi S., Heres S. Clozapine-induced, dilated cardiomyopathy: a case report. *BMC Res. Notes.* 2017; 10 (1): 338. DOI: 10.1186/s13104-0172679-5. PMID: 28750684
- Woloszyn E., Whig N., Trigoboff E., Grace J.J. Cardiac arrest with clozapine and olanzapine: revealing long QT syndrome. *Clin. Schizophr. Relat. Psychoses.* 2016. [Epub: ahead of print]. DOI: 10.3371/CSRP.WOWH.112316. PMID: 27996317
- Barry A.R., Windram J.D., Graham M.M. Clozapine-associated myocarditis: case report and literature review. *Can. J. Hosp. Pharm.* 2015; 68 (5): 427–429. DOI: 10.4212/cjhp.v68i5.1493. PMID: 26478592
- Abdel-Wahab B.A., Metwally M.E. Clozapine-induced cardiotoxicity: role of oxidative stress, tumour necrosis factor alpha and NF- $\kappa$ B. *Cardiovasc. Toxicol.* 2015; 15 (4): 355–365. DOI: 10.1007/s12012-014-9304-9. PMID: 25539628
- Abdel-Wahab B.A., Metwally M.E. Clozapine-induced cardiotoxicity in rats: involvement of tumour necrosis factor alpha, NF-  $\beta$  and caspase-3. *Toxicol. Rep.* 2014; 1: 1213–1223. DOI: 10.1016/j.toxrep.2014.11.012. PMID: 28962331
- Williams D.P., O'Donnell C.J., Maggs J.L., Leeder J.S., Uetrecht J., Pir-mohamed M., Park B.K. Bioactivation of clozapine by murine cardiac tissue in vivo and in vitro. *Chem. Res. Toxicol.* 2003; 16 (10): 1359–1364. DOI: 10.1021/tx034035z. PMID: 14565776
- Ishiyama S., Hiroe M., Nishikawa T., Abe S., Shimojo T., Ito H., Ozasa S., Yamakawa K., Matsuzaki M., Mohammed M.U., Nakazawa H., Kasajima T., Marumo F. Nitric oxide contributes to the progression of myocardial damage in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation.* 1997; 95 (2): 489–496. DOI: 10.1161/01.CIR.95.2.489. PMID: 9008468

16. Lee S.Y., Kim Y.J., Kim K.T., Choe H., Jo S.H. Blockade of HERG human K<sup>+</sup> channels and IKr of guinea-pig cardiomyocytes by the antipsychotic drug clozapine. *Br. J. Pharmacol.* 2006; 148 (4): 499–509. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706744. PMID: 16633353
17. Raheja H., Namana V., Chopra K., Sinha A., Gupta S.S., Kamholz S., Moskovits N., Shani J., Hollander G. Electrocardiogram Changes with Acute Alcohol Intoxication: A Systematic Review. *Open Cardiovasc Med J.* 2018; 12: 1–6. DOI: 10.2174/1874192401812010001. PMID: 29541259
18. Зороастров О.М. Особенности танатогенеза при смерти от острой интоксикации этанолом. *Вестник судебной медицины.* 2016; 3: 42–44.
19. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Санкт-Петербург: Rus-LASA НП «Объединение специалистов по работе с лабораторными животными» Рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы; 2012: 48.
20. Рыжков И.А., Заржецкий Ю.В. Влияние циркуляторной и гемической гипоксии на микроциркуляцию в коже. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* 2018; 17 (2): 64–70. DOI: 10.24884/1682-6655-2018-17-2-64-70
21. Рыжков И.А., Заржецкий Ю.В., Новодержкина И.С. Сравнительные аспекты регуляции кожной и мозговой микроциркуляции при острой кровопотере. *Общая реаниматология.* 2017; 13 (6): 18–27. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-6-18-27
22. Mayevsky A., Rogatsky G.G. Mitochondrial function *in vivo* evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292 (2): 615–640. PMID: 16943239. DOI: 10.1152/ajpcell.00249.2006
23. Крупин А.И., Сидоров В.В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: Колебания, информация, нелинейность (Руководство для врачей). М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ»; 2013: 496. ISBN 978-5-9710-3329-5
16. Lee S.Y., Kim Y.J., Kim K.T., Choe H., Jo S.H. Blockade of HERG human K<sup>+</sup> channels and IKr of guinea-pig cardiomyocytes by the antipsychotic drug clozapine. *Br. J. Pharmacol.* 2006; 148 (4): 499–509. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706744. PMID: 16633353
17. Raheja H., Namana V., Chopra K., Sinha A., Gupta S.S., Kamholz S., Moskovits N., Shani J., Hollander G. Electrocardiogram Changes with Acute Alcohol Intoxication: A Systematic Review. *Open Cardiovasc Med J.* 2018; 12: 1–6. DOI: 10.2174/1874192401812010001. PMID: 29541259
18. Zoroastrov O.M. Features of thanatogenesis upon death from acute ethanol intoxication. *Vestn. Sud. Med.* 2016; 3: 42–44. [In Russ.]
19. Directive 2010/63 / EU of the European Parliament and the Council of the European Union on the Protection of Animals used for scientific purposes. St. Petersburg: Rus-LASA NP «Association of Specialists Working with Laboratory Animals» Working Group on translations and publication of subject literature; 2012: 48. [In Russ.]
20. Ryzhkov I.A., Zarzhecky Yu.V. Effect of circulatory and hemic hypoxia on microcirculation in the skin. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya.* 2018; 17(2): 64–70. [In Russ.] DOI: 10.24884/1682-6655-2018-17-2-64-70
21. Ryzhkov I.A., Zarzhetsky Yu.V., Novoderzhkina I.S. Comparative Aspects of the Regulation of Cutaneous and Cerebral Microcirculation During Acute Blood Loss. *Obshchaya reanimatologiya=General Reanimatology.* 2017; 13 (6): 18–27. [In Russ., In Engl.] DOI: 10.15360/1813-9779-2017-6-18-27
22. Mayevsky A., Rogatsky G.G. Mitochondrial function *in vivo* evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292 (2): 615–640. PMID: 16943239. DOI: 10.1152/ajpcell.00249.2006
23. Krupatin A.I., Sidorov V.V. Functional diagnostics of the state of microcirculatory-tissue systems: Oscillations, information, nonlinearity (A guide for physicians). M.: Book house «LIBROCOM»; 2013: 496. [In Russ.] ISBN 978-5-9710-3329-5

Поступила 30.04.19

Received 30.04.19

## Уважаемые Авторы журнала «Общая реаниматология»!

Обращаем ваше внимание на обновление Правил для авторов.

Обновленные Правила для авторов в редакции 25 сентября 2018 г. содержат разъяснения по оформлению аффилиации авторов, рисунков и таблиц; дополнения в разделах «правовые и этические аспекты публикации рукописи», «отправка материалов для публикации», «структурные разделы статей и рекомендации по их описанию», «библиография».

Обновленные Правила для авторов размещены на сайте журнала:

[www.reanimatology.com](http://www.reanimatology.com)

## МЕЖДУНАРОДНЫЙ КАЛЕНДАРЬ КОНФЕРЕНЦИЙ АНЕСТЕЗИОЛОГОВ-РЕАНИМАТОЛОГОВ 2019

**4–6 октября**

III съезд анестезиологов-реаниматологов северо-запада с участием медицинских сестер анестези-столов

и IX Балтийский форум «Актуальные проблемы анестезиологии и реаниматологии»  
Санкт-Петербург, Россия • [www.anesth.ru](http://www.anesth.ru)

**ноябрь**

XI Euro Neuro

[www.euroneuro2019.org](http://www.euroneuro2019.org)