

Морфометрические изменения клеток коры головного мозга при острых отравлениях клозапином в сочетании с этиловым спиртом

А. Р. Баширова¹, Д. В. Сундуков¹, А. С. Бабкина^{1,2}, М. А. Голубев³, И. Н. Телипов¹

¹ Российский университет дружбы народов,
Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
² НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР,
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2
³ Корпорация «Медицинские электронные данные»,
Россия, 107045, г. Москва, Сретенский тупик, д. 4

Morphometry of Cortical Neurons in Acute Clozapine and Ethanol Poisoning

Asiya R. Bashirova¹, Dmitry V. Sundukov¹, Anastasia S. Babkina^{1,2},
Mikhail A. Golubev³, Islam N. Telipov¹

¹ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow
6 Miklukho-Maclaya Str., 117198 Moscow, Russia
² V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,
25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia
³ Corporation «Medical electronic data»,
4 Sretensky tupik, Moscow 107045, Russia

Для цитирования: А. Р. Баширова, Д. В. Сундуков, А. С. Бабкина, М. А. Голубев, И. Н. Телипов. Морфометрические изменения клеток коры головного мозга при острых отравлениях клозапином в сочетании с этиловым спиртом. *Общая реаниматология*. 2020; 16 (6): 19–30. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2020-6-19-30>. [На русск. и англ.]

For citation: Asiya R. Bashirova, Dmitry V. Sundukov, Anastasia S. Babkina, Mikhail A. Golubev, Islam N. Telipov. Morphometry of Cortical Neurons in Acute Clozapine and Ethanol Poisoning. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2020; 16 (6): 19–30. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2020-6-19-30>. [In Russ. and Engl.]

Резюме

Цель исследования — систематизировать гистоморфологические и морфометрические изменения нейронов коры головного мозга при острых отравлениях клозапином в сочетании с этиловым спиртом.

Материал и методы. Гистологически исследовали кору теменных областей головного мозга 26 умерших в результате острого отравления клозапином в сочетании с этиловым спиртом в течение первых суток, из них 23-х мужчин, 3-х женщин, в возрасте от 22 до 63 лет. Концентрация этилового спирта в крови составляла 1,4–4,1‰. Концентрация клозапина в крови колебалась от 0,24 до 5,8 мг%, в печени — от 0,097 до 6,5 мг%, почке — от 0,03 до 3,5 мг%. Кусочки коры головного мозга для морфометрического исследования фиксировали в 10% нейтральном параформальдегиде, изготавливали гистологические срезы, окрашивали их гематоксилином и эозином и по Нисслю. Анализ морфологических изменений проводили с помощью светового микроскопа с видеосистемой. Подсчитывали число нейронов с повреждениями, выделяли обратимые, промежуточные и необратимые повреждения. Статистическую обработку данных проводили непараметрическим методом.

Результаты. Выявили, что при остром отравлении клозапином в сочетании с этиловым алкоголем доминирующими признаками повреждения нейронов являлись: острое набухание, первичное раздражение, сморщивание, ишемическое изменение нервных клеток, тигролиз, нейронофагия, кариолизис, клетки-тени, сателлитоз. Во всех наблюдениях обнаружили признаки отека головного мозга и нарушения гемодинамики.

Заключение. Признаки повреждения нейронов головного мозга при острых отравлениях клозапином и этиловым спиртом, наряду с результатами судебно-химического анализа, могут быть использованы в обосновании непосредственной причины смерти.

Ключевые слова: головной мозг; морфометрия; отравления; клозапин; этиловый спирт

Summary

The aim of the study is to summarize the histology and morphometry of cortical neurons in acute clozapine and ethanol poisoning.

Адрес для корреспонденции:

Асия Ренатовна Баширова
E-mail: bar_76-76@mail.ru

Correspondence to:

Asiya R. Bashirova
E-mail: bar_76-76@mail.ru

Material and methods. Histological examination of the parietal cortical brain samples of 26 patients died during the Day 1 of acute clozapine and ethanol poisoning (23 males and 3 females aged 22–63 years) was performed. The blood ethanol level was 1.4–4.1‰. The level of clozapine in the blood ranged between 0.24 and 5.8 mg%, in the liver between 0.097 and 6.5 mg%, in kidneys between 0.03 and 3.5 mg%. The cortical samples for morphometric examination were placed in 10% neutral paraformaldehyde, the histological sections were done and stained with hematoxylin and eosin, as well as according to Niessl. The morphological analysis was performed using the video light microscopy. The number of damaged neurons (with separate quantification of reversible, intermediate, and irreversible damage) was assessed. The statistical analysis was done using the non-parametric methods.

Results. The signs of brain neuronal damage in acute clozapine and ethanol poisoning, as well as forensic chemical tests, might be used for establishing the direct cause of death.

Keywords: brain; morphometry; poisoning; clozapine; ethanol

https://doi.org/10.15360/1813-9779-2020-6-19-30

Введение

Клозапин — международное непатентованное наименование действующего вещества широко известных лекарственных средств азалептин и лепонекс. [1, 2]. Клозапин является производным дибензодиазепина, относится к группе так называемых «атипичных» нейролептиков и до недавнего времени широко использовался в клинической практике для лечения всех форм психозов и поведенческих расстройств, что было связано с его широким терапевтическим диапазоном [3–5]. Он оказывает выраженное антипсихотическое и седативное действие вследствие блокады допаминовых D₂-рецепторов в мезолимбических и мезокортикальных структурах головного мозга и блокады α-адренорецепторов ретикулярной формации ствола головного мозга [4, 6]. Достаточно сильным блокирующим действием клозапина на гистаминовые рецепторы первого типа некоторые исследователи объясняют его атипичную антипсихотическую активность, а также такие побочные эффекты, как седация и увеличение массы тела вследствие усиления аппетита [6, 7]. Воздействием на 5-(HT)3 рецепторы, которые согласно современным представлениям являются интерфейсом между моторной и лимбическими структурами мозга, объясняется выраженный анксиолитический эффект препарата [6, 8, 9]. Клозапин обладает противорвотными эффектами вследствие блокады допаминовых D₂-рецепторов триггерной зоны рвотного центра, гипотермическими эффектами вследствие блокады допаминовых рецепторов гипоталамуса и оказывает периферическое и центральное м-холиноблокирующее и α-адреноблокирующее действие [9, 10].

Антипсихотические эффекты клозапина связывают со снижением экспрессии рилина (REELIN) и глутаматдекарбоксилазы-67 (GAD 67) вследствие гиперметилирования их промоторов, его воздействием на гиперметилированные участки ДНК нейронов фронтальной

Introduction

Clozapine is a dibenzodiazepine derivative marketed under the brand names Azaleptin and Leponex [1, 2]. The drug belongs to ‘atypical’ neuroleptics and, up until recently, was widely used in clinical practice for all kinds of psychotic and behavior disorders due to its broad therapeutic range [3–5]. Clozapine exerts a potent antipsychotic and sedative effect by blocking dopamine D₂-receptors in mesolimbic and mesocortical brain structures and inhibiting α-adrenoreceptors in the reticular formation of the brain stem [4, 6]. Rather strong blocking action of clozapine on H1-receptors explains, according to some researchers, its atypical antipsychotic activity as well as its side effects such as sedation and body weight gain as a result of increased appetite [6, 7]. The action on 5-(HT)3-receptors, which, according to contemporary views, serve as an interface between the motor and limbic brain structures, explains its prominent anxiolytic effect [6, 8, 9]. Clozapine has also antiemetic effects through blocking dopamine D₂-receptors of the trigger zone of the vomiting center, hypothermic effects through blocking dopamine receptors of the hypothalamus, and demonstrates properties of peripheral and central M-choline and α-adrenergic blocker [9, 10].

Clozapine’s antipsychotic effects are also associated with downregulation of reelin and glutamic acid decarboxylase-67 (GAD 67) expression through hypermethylation of their promoters, its action on hypermethylated DNA regions of frontal cortical neurons [11, 12]. Clozapine was shown to activate DNA demethylation, restoring normal secretion of gamma-aminobutyric acid in CNS, which explains the positive response of schizophrenia patients to clozapine therapy [5, 13].

In addition to its wide psychopharmacological and therapeutic range, among the major advantages of clozapine are absent interference with the higher intellectual functions, no cataleptogenic effect, and minimal risk of extrapyramidal disorders, because it binds less than 75% of D₂-receptors for a short time only, which is insufficient for the neuroleptic syndrome development [14, 15].

коры [11, 12]. Установлено, что клозапин активирует деметилирование ДНК, что способствует нормализации секреции гамма-аминомасляной кислоты в ЦНС, чем и объясняются положительные эффекты терапии клозапином у больных с шизофренией [5, 13].

Помимо широкого психофармакотерапевтического диапазона, к несомненным преимуществам клозапина относится то, что он не влияет на высшие интеллектуальные функции, не приводит к каталептогенным эффектам, а также обладает минимальным риском развития экстрапирамидных нарушений. Это связано с тем, что он лишь на короткое время связывает менее 75% D₂-рецепторов, чего недостаточно для развития нейролептического синдрома [14, 15].

Психофармакологические эффекты от приема клозапина наступают относительно быстро: купирование беспокойства, психомоторного возбуждения и агрессивности — через 3–6 дней, антипсихотические эффекты — через 1–2 недели, влияние на симптомы негативизма — через 20–40 дней.

Среди нежелательных побочных эффектов клозапина отмечают повышение рисков тромбообразования, развития гипертонии, ТЭЛА, мигрени, гипокинезии желудка, что связано с влиянием клозапина на 5-(HT)2A рецепторы тромбоцитов гладкомышечных клеток кровеносных сосудов, легких, ЖКТ [15–18]. Являясь мощным антагонистом мускариновых холинорецепторов, клозапин, способен вызывать тахикардию, вследствие блокирования эффектов блуждающего нерва, снижать перистальтику кишечника, вплоть до развития непроходимости [19–21]. Также в литературе описаны многочисленные осложнения, связанные с приемом клозапина: судороги [22], кататония [23], кома [24], миокардит [25–27], отсроченные осложнения при тяжелой клозапиновой интоксикации [28, 29], усиление токсичности клозапина при развитии инфекционных осложнений [30–32], агранулоцитоз [33],

До недавнего времени клозапин очень широко использовался в психиатрической практике [1–3, 34], но после появления нейролептических средств нового поколения его терапевтическая актуальность существенно снизилась. В настоящее время он применяется при лечении психических расстройств достаточно редко и обычно только у больных резистентными формами шизофрении после неадекватного терапевтического ответа по крайней мере на два современных антипсихотических средства.

Немаловажное значение в отказе врачей психиатров от использования клозапина в терапии больных психическими расстройства-

The psychopharmacological effects of clozapine therapy develop relatively fast: the relief of anxiety, psychomotor agitation and aggressiveness occurs after 3 to 6 days of administration, antipsychotic effects — after 1–2 weeks, the effect on negativistic symptoms — after 20–40 days.

The observed adverse side effects of clozapine include increased coagulation, hypertension, pulmonary embolism, migraine, gastric motility disorder related to clozapine's effect on 5-(HT)2A receptors in smooth muscle cells of blood vessels, lungs, GIT [15–18]. Being a potent antagonist of muscarinic cholinergic receptors, clozapine can cause tachycardia through blocking the vagal nerve effects, decreasing the intestinal motility up to obstruction [19–21]. Other numerous complications related to clozapine were described in literature including seizures [22], catatonia [23], coma [24], myocarditis [25–27], delayed complications in severe clozapine intoxication [28, 29], increased clozapine toxicity in infectious complications [30–32], granulocytopenia [33].

Until recent times, clozapine was very widely used in psychiatric therapeutic practice [1–3, 34], but after a new generation of neuroleptic agents came into the market, its therapeutic relevance had decreased considerably. At present, it is uncommonly used in the treatment of psychiatric disorders, usually only for resistant schizophrenia or after inadequate response to least two modern antipsychotic agents.

An important reason for limited use of clozapine in psychiatry is its high toxicity when combined with ethanol. This can happen accidentally (unintentional overdosing) and as a result of a suicidal attempt or a criminal incident [35, 36].

Most researchers recognize anticholinergic action of clozapine and ethanol being the key mechanism of poisoning in their combined ingestion [36]. This poisoning is characterized by a short duration of the early phase [37], severe course with psychotic disorders and disturbed consciousness [38], and high mortality (15 to 30%, according to various authors) [39].

Despite the high relevance of clozapine + alcohol intoxication, its pathogenesis and associated pathology changes in the brain have not been adequately investigated. Experimental works exploring the cerebellar damage in clozapine + ethanol poisoning demonstrated severe damage to Purkinje cells with predominantly irreversible changes (shrinkage, karyocytolysis, ghost-like cells, etc.) progressing over time. An experiment lasting 24 hours caused more severe alterations compared to the 3-hour long test [40]. However, for better understanding of mechanisms of these changes we need to examine the other regions of brain. The mechanisms of death in fatal poisoning remain unclear, which hampers timely forensic diagnosis of the immediate cause of death. Despite numerous studies

ми является его высокая токсичность при сочетании приеме с этиловым спиртом (алкоголем). Это наблюдается вследствие случайной и непреднамеренной его передозировки, а также как результат его приема с суицидальной целью или в рамках криминального поведения [35, 36].

Центральным механизмом отравления клозапином в сочетании с этиловым спиртом, по мнению большинства исследователей, является их холинолитическое действие [36]. Данная форма отравлений отличается кратковременностью токсикогенной фазы [37], быстрым течением с развитием психотических нарушений с расстройством сознания [38], высокой летальностью (по данным разных авторов от 15 до 18%) [39].

Несмотря на актуальность проблемы отравлений клозапином на фоне алкогольной интоксикации, патогенез этих состояний и возникающие при этом морфологические изменения головного мозга исследованы недостаточно. Экспериментальная работа, проведенная с целью систематизации повреждений мозжечка при отравлении клозапином в сочетании с этиловым алкоголем, указывает на существенные изменения клеток Пуркинье. Установлено, что наиболее выраженные повреждения клеток Пуркинье с преобладанием необратимых изменений (сморщивание, кариоцитоз, клетчатки и т. д.) наблюдаются при сочетании отравлений клозапином и алкоголем, причем выявляется прогрессирование этих изменений с течением времени. Эксперимент длительностью 24 часа приводит к более выраженным изменениям клеток Пуркинье по сравнению с 3-х часовой продолжительностью опыта [40]. Однако, для полного понимания механизмов развития морфологических изменений необходимо исследование и других отделов головного мозга. Не до конца понятен танатогенез подобных отравлений, что существенно снижает качество судебно-медицинской диагностики непосредственной причины смерти. Несмотря на многочисленные исследования, подробно раскрывающие терапевтические и токсические эффекты острого отравления клозапином, до сих пор остаются не выясненными все факторы патогенеза и ведущая роль какого-либо из механизмов в развитии этого состояния.

Цель исследования — систематизировать гистоморфологические и морфометрические изменения нейронов коры головного мозга при острых отравлениях клозапином в сочетании с этиловым спиртом.

Материал и методы

Провели гистологическое исследование коры теменных областей головного мозга 26 умерших от острого отравления клозапином в сочетании с эти-

detailing its therapeutic and toxic effects, there is no comprehensive understanding of pathogenic factors or leading role of specific mechanisms in acute clozapine poisoning.

The aim of the study is to summarize the histology and morphometry of cortical neurons in acute clozapine and ethanol poisoning.

Materials and Methods

The histological data of parietal cortical brain samples obtained on the scene (within the first 24 hours) from 26 patients (23 males and 3 females), aged between 22 and 63 years, who died of acute poisoning with clozapine and ethanol combination, have been investigated. Both clozapine and ethanol were found in the biological material (blood, urine, stomach, kidneys, liver) on forensic chemical examination. The content of clozapine per 100 g of organ weight was detected using gas chromatography.

Most cases were moderate and mild alcohol intoxication (blood ethanol concentration 1.4–2.5‰); there was one case of severe alcohol poisoning (4.1‰).

The level of clozapine in the blood ranged between 0.24 and 5.8 mg%, in the liver between 0.097 and 6.5 mg%, in kidneys between 0.03 and 3.5 mg%.

The control group ($n=10$) consisted of 7 men and 3 women aged between 22 and 65 years who died of an acute coronary event. There were no significant differences between the study groups in sex (χ^2 criterion = 0.5; $P=0.1$) and age (Student test $t=-0.117$, $P=0.9$) found (table 1).

Cerebral cortex (the parietal lobe) slices were placed in 10% formalin and embedded in paraffin. Histologic sections were stained with hematoxylin and eosin, as well as according to Nissl, then histological examination was done using Olympus BX 41 microscope equipped with the Watc 221S (Japan) camera. Neuronal damage was evaluated according to the classification which included: 1) acute swelling of neurons, 2) primary irritation of nerve cells, 3) hydropic degeneration of neurons, 4) shrinkage of neurons, 5) ischemic alterations of nerve cells, 6) karyocytolysis, 7) 'ghost cells', 8) neuronophagy, 9) satellitosis [41]. At least 100 damaged cells were evaluated in each case.

Statistical analysis was carried out using Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.) and MedCalc 12.5.0.0 (MedCalc Software) software. Mean values are shown as median with the interquartile range. Inter-group differences were assessed using Mann–Whitney U -test and considered statistically significant at $P<0.05$.

Results and Discussion

We studied 6 layers of the cerebral cortex: the molecular layer, the external granular layer and the external pyramidal layer, the internal granular layer and the internal pyramidal layer, and polymorphic, or multiform layer. The nerve cells in the third and fifth layers (the external and internal pyramidal layers, respectively) of the parietal lobes cortex turned out to be the best visualized, making them the most convenient for morphometric examination.

The molecular layer of the cerebral cortex.

The neuronal nuclei were found to be predominantly hyperchromic. Chromatin was dispersed in the nuclei or formed small bodies on the periphery

Таблица 1. Характеристика исследуемых групп.
Table 1. The studied groups parameters.

Parameter	Values in groups	
	Main, <i>n</i> =26	Control, <i>n</i> =10
Sex		
Male, <i>n</i> (%)	23 (88.5)	9 (90.0)
Female, <i>n</i> (%)	3 (11.5)	1 (10.0)
Age (Me, min–max)	39.5 (22–63)	42.0 (22–65)

Note. No significant differences between the study groups in sex (χ^2 criterion = 0.5; $P=0.1$) and age (Student test $t=-0.117$, $P=0.9$) found.

Примечание. Статистически значимых различий по половому составу (критерий $\chi^2=0,5$; $p=0,1$) и возрасту (критерий Стьюдента $t=-0,117$; $p=0,9$) не выявили.

ловым спиртом на месте происшествия в первые сутки, из них — 23-х мужчин, 3-х женщин, в возрасте от 22 до 63 лет. Данные об обнаружении клозапина и этилового спирта были получены при судебно-химическом исследовании биоматериала (кровь, почки, печень). Содержание клозапина в пересчете на 100 г органа определяли газохроматографическим методом.

Большинство случаев соответствовало опьянению средней и легкой степени (содержание этилового спирта в крови 1,4–2,5‰), один случай указывал на тяжелое отравление алкоголем (4,1‰).

Концентрация клозапина в крови колебалась от 0,24 до 5,8 мг%, в печени — от 0,097 до 6,5 мг%, почке — от 0,03 до 3,5 мг %.

Группу контроля ($n=10$) составили 7 мужчин и 3 женщины в возрасте от 22–65 лет, умерших в результате острого нарушения коронарного кровообращения. При сопоставлении групп исследования и контроля статистически значимых различий по половому составу (критерий $\chi^2=0,5$; $P=0,1$) и возрасту (критерий Стьюдента $t=-0,117$, $P=0,9$) не выявили (табл. 1).

Кусочки коры головного мозга (теменная доля) фиксировали в 10% формалине и заливали в парафин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по Нисслю. Анализ морфологических изменений проводили с помощью микроскопа Olympus BX 41 с видеосистемой на основе камеры Watec 221S (Япония). Повреждение нейронов оценивали в соответствии с классификацией, включающей: 1) острое набухание нервных клеток, 2) первичное раздражение нервных клеток, 3) гидропические изменения нейронов, 4) сморщивание нейронов, 5) ишемическое изменение нервных клеток, 6) кариоцитоз, 7) «клетки-тени», 8) нейронофагия, 9) сателлитоз [41]. Оценивали повреждения не менее 100 клеток в каждом наблюдении.

Для статистического анализа использовали программы Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.) и MedCalc 12.5.0.0 (MedCalcSoftwarebvba). Средние значения представили медианой с межквартильным интервалом. Межгрупповые различия показателей оценивали при помощи U -критерия Уитни–Манна и принимали статистически значимыми при уровне $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследовали 6 слоев коры мозга: молекулярный, наружный и внутренний зернистый, слой пирамидных клеток и внутренний пирамидный слой, слой полиморфных клеток. При

of the nuclei. Nucleoli are mainly eccentric, shifted to the periphery of nuclei. Microglia cells are small with hyperchromic, intensively stained nuclei. Nuclei of true glial cells (oligodendrocytes, astrocytes) are light, chromatin bodies are dispersed in nuclei and along their periphery. Around the majority of glial cells, a zone of pericellular edema was revealed. Capillaries are moderately congested (fig. 1).

The outer granular layer of the cerebral cortex. Chromatin granules were found to be dispersed in normal and hyperchromic nuclei of neurons. The nucleoli have been shifted towards nuclear periphery. In some nuclei, no nucleoli were found. Many neurons as well as glial cells were surrounded by a zone of pericellular edema. Pericapillary oedema was observed (fig. 2, *a, b*).

Pyramid cell layer. ‘Light’ neurons were found to be predominant, but ‘dark’ neurons were also detected among the ‘light’ ones. Part of neurons were being phagocytosed: glial cells penetrated their cytoplasm (fig. 3, *a*). The edges of the nerve cells have irregular, dentate surface. In some neurons, the nuclei are shifted towards periphery, while in the nuclei, the nucleoli are eccentric. Cytoplasm looks homogeneous, devoid of tigroid substance, pale and vitreous (representing a type of homogenizing necrosis of nerve cells, fig. 3, *b*).

Swelling of neurons was noticed. Some neurons seen with barely distinguishable nuclei and nucleoli. Ghost cells are found. Pericellular and pericapillary edema was registered.

Internal granular layer of the cerebral cortex. We noticed neuronal swelling, nuclear shifting towards the periphery of cells and nucleolar shifting towards the nuclear membrane. We revealed karyolysis, satellitosis, neuronophagy, and ghost cells (fig. 4). Capillaries and veins are congested, pericapillary edema is remarkable.

Internal pyramidal layer of the cerebral cortex. ‘Light’ neurons were found to be predominant. Among them, ‘dark’ neurons were identified in smaller numbers. Many neurons were swollen, the shift of nuclei towards one of the poles of cells was observed, and the decentralized location of nucleoli was revealed. In some neurons, the nuclei were not stained (karyolysis). Neuronophagy was noted. Pericellular edema was detected both around neurons

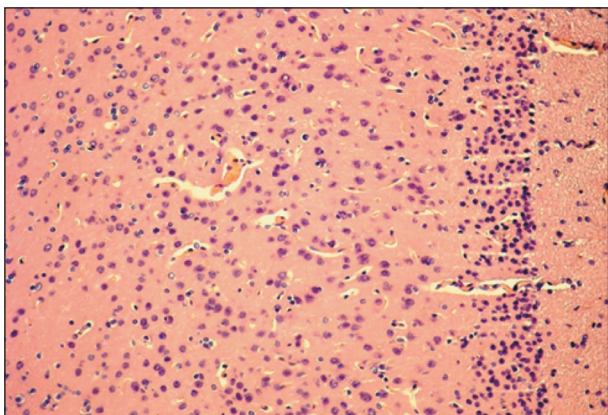


Рис. 1. Молекулярный слой коры мозга.
Fig. 1. The molecular layer of the cerebral cortex.
Note. Hematoxylin and eosin staining. Hyperchromatism. Pericapillary edema. Magnification $\times 200$.
Примечание. Окрасивание гематоксилином и эозином. Гиперхроматоз. Перикапиллярный отек. Ув. 200.

этом оказалось, что наиболее хорошо визуализируются нервные клетки в 3-ем и 5-ом слоях (слой пирамидных клеток, внутренний пирамидный слой, соответственно) коры теменных долей головного мозга, делающие их наиболее удобными для проведения гистоморфометрического исследования.

Молекулярный слой коры мозга. Выявили, что ядра нейронов преимущественно гиперхромные. Хроматин распылен в ядрах или располагается в виде глыбок по периферии ядер. Ядрышки в ядрах располагаются в основном эксцентрично, смещены к периферии ядер. Клетки микроглии небольших размеров с гиперхромными, интенсивно окрашенными ядрами. Ядра истинных клеток глии (олигодендроциты, астроциты) светлые, глыбки хроматина рассеяны в ядрах и по их периферии. Вокруг большинства клеток глии — зона перикапиллярного отека. Капилляры — умеренно полнокровны (рис. 1).

Наружный зернистый слой коры мозга. Выявили, что гранулы хроматина рассеяны в нормо- и гиперхромных ядрах нейронов. Ядрышки ядер смещены к их периферии. В некоторых ядрах ядрышки не выявили. Многие нейроны, а также клетки глии были окружены зоной перикапиллярного отека. Отмечали перикапиллярный отек (рис. 2, *a, b*).

Слой пирамидных клеток. Выявили, что преобладают светлые нейроны, но среди светлых встречаются и темные нейроны. Часть нейронов в состоянии нейрофагии: клетки глии проникают в цитоплазму нейрона (рис. 3, *a*). Края нервных клеток приобретают неровную, «изъеденную» поверхность. В части нейронов ядра смещены к периферии клеток, а в ядрах ядрышки располагаются эксцентрично. Цитоплазма выглядит гомогенной, лишена тигроид-

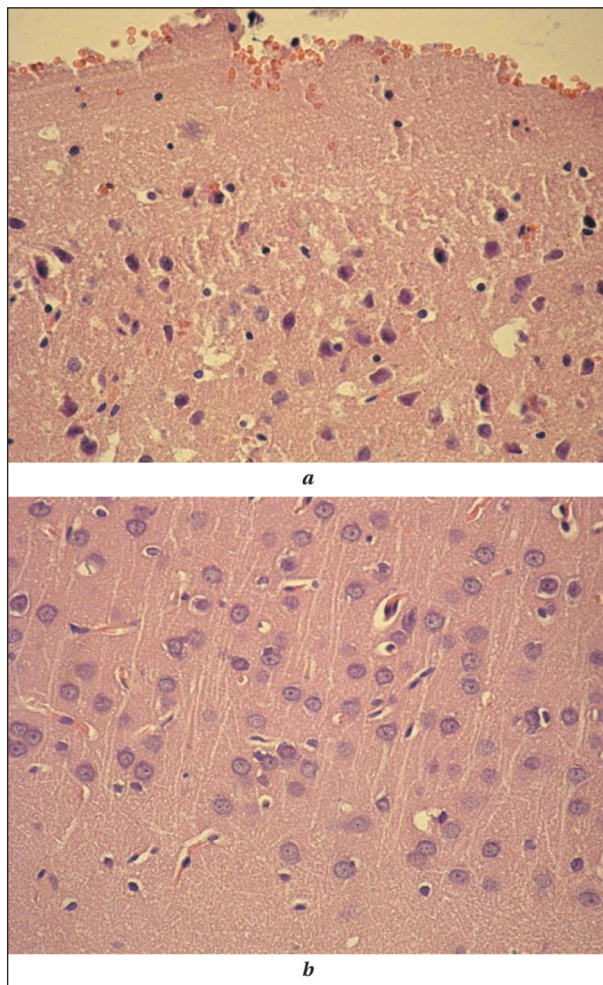


Рис. 2. Наружный зернистый слой коры мозга.
Fig. 2. The outer granular layer of the cerebral cortex.
Note. Hematoxylin and eosin staining. *a* — Hyperchromatism. Pericapillary edema. Magnification $\times 200$. *b* — Primary irritation of nerve cells: nucleolar decentralization in neurons. Pericapillary oedema. Magnification $\times 400$.
Примечание. Окрасивание гематоксилином и эозином. *a* — Гиперхроматоз. Перикапиллярный отек. Ув. 200. *b* — Первичное раздражение нервных клеток: децентрализация ядрышек ядер нейронов. Перикапиллярный отек. Ув. 400.

and glial cells. Capillaries and venules are congested and pericapillary edema is evident (fig. 5, *a, b*).

Layer of polymorphic cortical cells. ‘Light’ neurons also prevailed in this section. Swelling of neurons, peripheral shift of nuclei and decentralized nucleoli were noted. Satellitosis, neuronophagy, karyolysis, pericellular and pericapillary edema were detected (fig. 6).

Circulatory disorders were observed in meninges and different brain regions manifesting as congested capillaries and venules, erythrocyte aggregation, stasis, sludge, marginal leukocyte pooling.

Currently, the pathomorphological brain changes in acute alcohol intoxication have been studied in most detail. Majority of them are related to hemodynamic disorders during dying from alcoholic coma. The brain circulatory disorders causing

да, бледна и стекловидна (разновидность — гомогенизирующий некроз нервных клеток, рис. 3, *b*).

Отметили набухание нейронов. Некоторые нейроны с едва различимыми ядрами и ядрышками. Встречаются клетки-тени. Регистрировали перичеселлюлярный и перикапиллярный отек.

Внутренний зернистый слой коры мозга. Отметили набухание нейронов, смещение ядер на периферию клеток, а в ядрах — смещение ядрышек к ядерной мембране. Выявили кариолизис, сателлитоз, нейронофагию, клетки-тени (рис. 4). Капилляры и вены — полнокровны, выражен перикапиллярный отек.

Внутренний пирамидный слой коры мозга. Выявили, что преобладают светлые нейроны. Среди них в меньшем количестве выявляли темные нейроны. Многие нейроны — набухшие, в них отмечали смещение ядер к одному из полюсов клеток, а в ядрах наблюдали децентрализованное расположение ядрышек. В части нейронов ядра не окрашены (кариолизис). Отмечали нейронофагию. Перичеселлюлярный отек выявили, как вокруг нейронов, так и клеток глии. Капилляры и венулы — полнокровны, выражен перикапиллярный отек (рис. 5, *a, b*).

Слой полиморфных клеток коры головного мозга. В этом отделе также преобладали светлые нейроны. Отмечали набухание нейронов, смещение в них ядер к периферии клеток, а в ядрах — децентрализацию ядрышек. Обнаружили сателлитоз, нейронофагию, кариолизис, перичеселлюлярный и перикапиллярный отеки (рис. 6).

В мягких мозговых оболочках, различных отделах головного мозга отмечали расстройство кровообращения: полнокровные капилляры и венул, агрегация эритроцитов, стазы, сладжи, краевое стояние лейкоцитов.

В настоящее время наиболее подробно изучены патоморфологические изменения головного мозга при острой алкогольной интоксикации. Большинство из них связаны с нарушениями гемодинамики в процессе умирания от алкогольной комы. Циркуляторные расстройства в головном мозге, являющиеся причиной возникновения морфологических изменений нейронов, обнаруживаются при любом смертельном отравлении и указывают на развитие сердечно-сосудистой недостаточности.

Как показали проведенные нами исследования, во всех случаях острых отравлений клозапином в сочетании с этиловым спиртом выявили признаки отека головного мозга и нарушения гемодинамики. Расстройства кровообращения характеризовались выраженным полнокровием капилляров и венул. Кроме

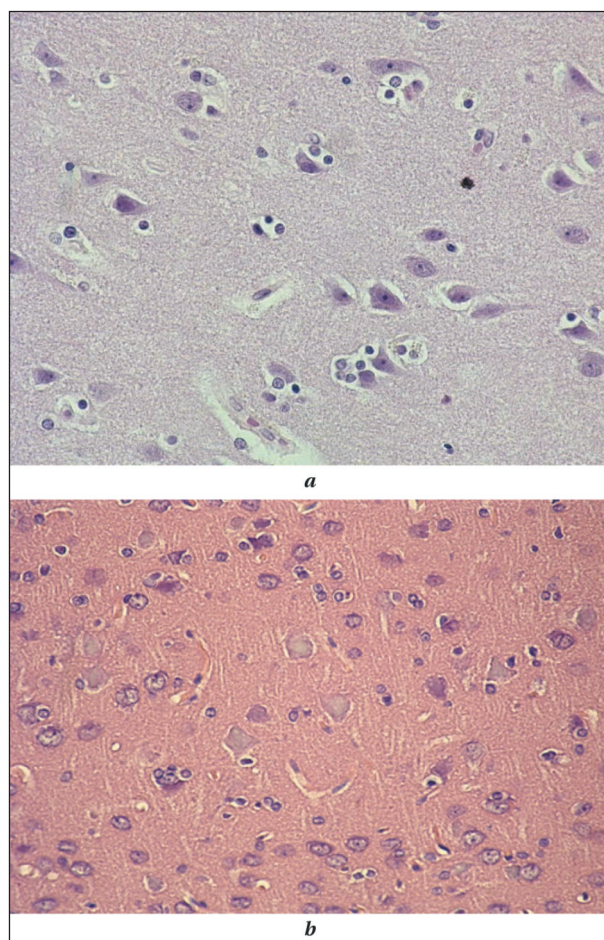


Рис. 3. Слой пирамидных клеток.

Fig. 3. Pyramid cell layer.

Note. Hematoxylin and eosin staining. Magnification $\times 400$. *a* — Hyperchromic neurons. Neuronophagy. *b* — Hyperchromatosis. Homogenizing neuronal necrosis. Satellitosis.

Примечание. Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. 400. *a* — Гиперхромные нейроны. Нейронофагия. *b* — Гиперхроматоз. Гомогенизирующий некроз нейронов. Сателлитоз.

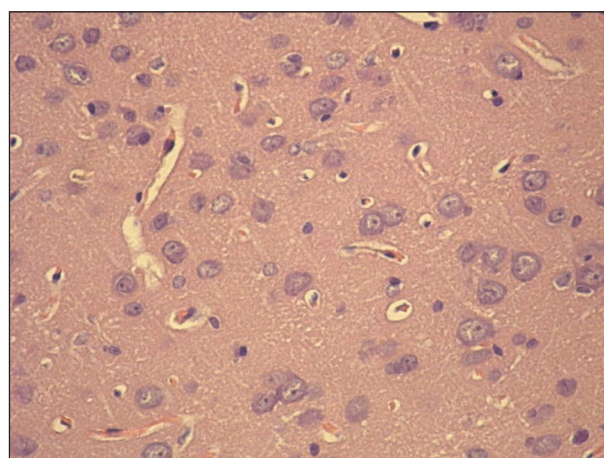


Рис. 4. Внутренний зернистый слой коры мозга.

Fig. 4. Internal granular layer of the cerebral cortex.

Note. Hematoxylin and eosin staining. Magnification $\times 400$. Satellitosis. Neuronophagy. Ghost cells.

Примечание. Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. 400. Сателлитоз. Нейронофагия. Клетки-тени.

полнокровия отмечали агрегацию эритроцитов, формирование стазов и сладжей, краевое стояние лейкоцитов. Ткань мозга была отечной, периваскулярные пространства расширены за счет содержания в них отечной жидкости, вокруг большинства клеток глии и невроцитов обнаруживали зоны перичеселлюлярного отека. Повсеместно присутствовали отечные формы олигодендроцитов и астроцитов. Существенные изменения претерпевали и невроциты, указывали на их раздражение и повреждение.

Одним из морфологических изменений нейронов является острое набухание нервных клеток, которое является обратимым процессом. Оно характеризуется увеличением размеров нейронов, частичным растворением тигроида, ядро нейрона располагается эксцентрично, в ряде случаев становится гиперхромным.

Вариантом изменений нейронов, которое может быть обратимым, является первичное раздражение нервных клеток. Оно характеризуется набуханием и округлением нейронов, перемещением ядра к одному из полюсов клеток, распылением хроматина, которое начинается в центре клеток, сохраняясь в последующем лишь на периферии нейронов. В ряде случаев такие нервные клетки могут подвергнуться необратимым изменениям — вакуолизации или лизису.

Другим видом повреждений являются гидропические изменения нейронов. В увеличенных и округленных нейронах вокруг ядер появляются светлые пространства или вакуоли, а в последующем цитоплазма клеток становится прозрачной, в центре которой распо-

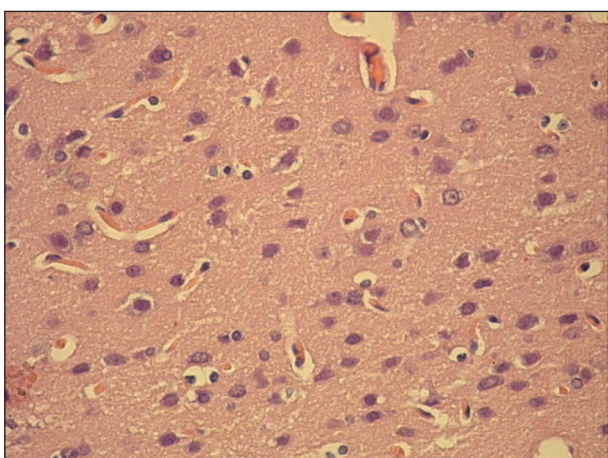
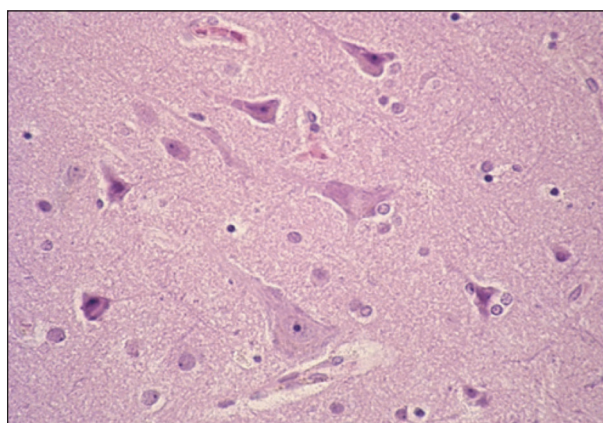


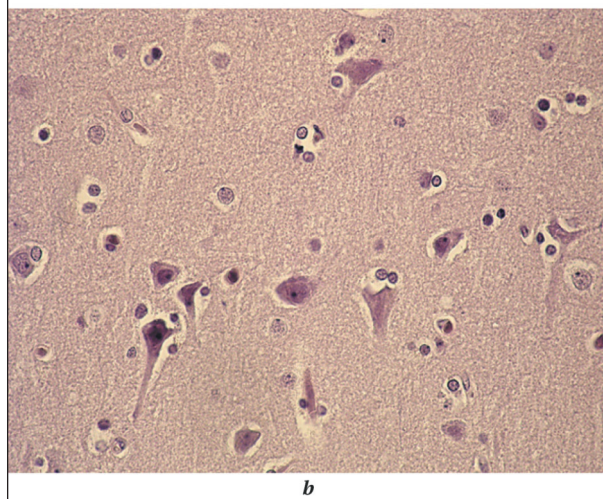
Рис. 6. Слой полиморфных клеток коры головного мозга. Fig. 6. Layer of polymorphic cortical cells.

Note. Hematoxylin and eosin staining. Magnification $\times 400$. Hyperchromatosis. Satellitosis. Ghost cells. Pericellular and pericapillary edema.

Примечание. Окрашивание гематоксилином и эозином Ув. 400. Гиперхроматоз. Сателлитоз. Клетки-тени. Перичеселлюлярный и перикапиллярный отеки.



a



b

Рис. 5. Внутренний пирамидный слой коры мозга. Fig. 5. Inner pyramidal layer of the cerebral cortex.

Note. Hematoxylin and eosin staining. Magnification $\times 400$. *a* — Betz cells. Swelling of neurons. Karyolysis. Neuronophagy. Pericellular edema. *b* — Hyperchromatosis. Satellitosis. Ghost cells. Pericellular oedema.

Примечание. Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. 400. *a* — Клетки Беца. Набухание нейронов. Кариолизис. Нейронофагия. Перичеселлюлярный отек. *b* — Гиперхроматоз. Сателлитоз. Клетки-тени. Перичеселлюлярный отек.

morphological changes in neurons are found in any fatal poisoning and indicate cardiovascular failure.

Our studies have shown that in all cases of acute clozapine + ethanol poisoning the signs of cerebral edema and hemodynamic disorders were found. Circulatory disorders were characterized by intense congestion in capillaries and venules. In addition to congestion, erythrocyte aggregation, stasis and sludge, the marginal pooling of leukocytes were found. Brain tissue was oedematous, perivascular spaces were expanded due to fluid, areas of pericellular edema were identified around most cells of glia and neurocytes. Oedematous oligodendrocytes and astrocytes were present throughout. Neurocytes also underwent significant changes, indicating their irritation and damage.

One of the morphological changes in neurons is the acute reversible swelling characterized by in-

гается светлое ядро, плавающее в отечной жидкости. Данный вид дистрофии обусловлен расстройствами водно-солевого обмена и может быть обратимым, но может трансформироваться в необратимые виды дистрофий.

К повреждению нервных клеток головного мозга относится сморщивание нейронов. Характерные признаки данного вида повреждения — это уменьшение размеров клеток и гиперхроматоз. Глыбки тигроида сливаются в компактную, темно окрашенную массу. В итоге нервные клетки имеют вид интенсивно окрашенных узких, угловатых или палочковидных образований.

Тяжелые изменения нервных клеток касаются грубых нарушений структуры всех компонентов клеток — цитоплазмы ядра и ядрышка: растворение тигроида, набухание нейронов, изменение положения ядра и ядрышка, нечеткость контуров нервных клеток, деформация ядер, их пикноз или рексис, смещение и деформация ядрышка, нередко ядро и ядрышко полностью или почти неразличимы, расплавление цитоплазмы, она становится сотовидной или ячеистой.

Одним из вариантов повреждения нейронов является ишемическое изменение нервных клеток. Оно заключается в лизисе тигроида, просветлении цитоплазмы, гиперхроматозе или просветлении ядра. Цитоплазма выглядит гомогенной, лишена тигроида, бледна и стекловидна. Его разновидность — гомогенизирующий некроз нервных клеток.

К тяжелым необратимым изменениям относятся также кариоцитоз (гипохромное окрашивание цитоплазмы и ядра), превращение нейронов в едва различимые клеточки-тени, проникновение клеток глии в тело погибающего нейрона (нейрофагия), сателлитоз, при котором клетки глии располагаются на поверхности нейрона.

Для объективизации комплекса выявленных качественных изменений коры теменных областей головного мозга использовали методы морфометрического исследования.

Измеряли количество обратимых и необратимых изменений нервных клеток при смерти от острого отравления клозапином на фоне алкогольного опьянения на месте происшествия в первые сутки от приема препарата. Измеряли количество нервных клеток 3-го и 5-го слоев коры теменных долей головного мозга (слой пирамидных клеток, внутренний пирамидный слой, соответственно), находящихся в состоянии острого набухания, первичного раздражения нейронов, сморщивания нейронов, ишемического изменения нервных клеток, кариоцитоза, нейрофагии, сателлитоза, и образования «клеток-теней». Резуль-

creased size of neurons, partial dissolution of the tigroid substance, the eccentric location of the neuronal nucleus, which in some cases becomes hyperchromic.

The primary irritation of nerve cells is a variant of potentially reversible neuronal changes. It is characterized by the swelling and rounding of neurons, nuclear shift towards one of the poles, the chromatin dispersion, which begins in the center of the cells and is then only maintained at the periphery of the neurons. In some cases, such neurons may undergo irreversible changes such as vacuolization or lysis.

Another type of damage is neuronal hydropic changes. In enlarged and rounded neurons, light spaces or vacuoles appear around the nuclei, later the cytoplasm becomes transparent with centrally located light nucleus floating in the oedematous fluid. This type of dystrophy is due to water and electrolyte disorders and can be reversible, but might become irreversible.

Neuronal shrinkage is considered to represent the damage to brain nerve cells. Reduced cell size and hyperchromatosis are typical features of this lesion. The bodies of tigroid substance merge into a compact, dark colored mass. As a result, nerve cells look like intensely stained narrow, angular or stick-shaped structures.

Severe changes in nerve cells are related to gross structural disorders of all cell components including cytoplasm of the nucleus and nucleolus such as the dissolution of the tigroid substance, the swelling of neurons, changes in the position of the nucleus and the nucleolus, the blurring of the outlines of neurons, the deformation of the nuclei, their pycnosis or rupture, nucleolar displacement and deformation, often the nucleus and the nucleolus are completely or almost indistinguishable, the dissolution of the nucleus and the nucleolus, the dissolution of the cytoplasm and its transformation into a honeycomb or cellular structure.

Another variant of neuronal damage is ischemic alteration of nerve cells. It consists of tigroid lysis, brightening of cytoplasm, nuclear hyperchromatosis or brightening. The cytoplasm looks homogeneous, devoid of tigroid substance, pale and vitreous. Homogenizing necrosis of nerve cells is a subtype of this variant.

Severe irreversible changes also include karyocytolysis (hypochromic cytoplasm and nucleus), the transformation of neurons into barely visible ghost cells, the penetration of glial cells into the dying neuron (neuronophagy), satellitosis, in which the glial cells are located on the surface of the neuron.

Morphometric research methods were used to objectify the detected qualitative changes in the parietal cortex.

We quantified the reversible and irreversible changes in nerve cells in patients who died of acute clozapine poisoning combined with alcohol intoxi-

таты проведенных гистоморфометрических исследований позволили определить достоверное увеличение количества нервных клеток, находящихся в состоянии обратимых и необратимых изменений, по сравнению с контрольной группой $p < 0,05$ (табл. 2).

Заключение

Таким образом, в случаях смерти от острого отравления клозапином в сочетании с этиловым спиртом, выявленный комплекс гистоморфологических изменений нейронов коры головного мозга, учитывающий, как качественные, так и количественные признаки острых повреждений нейронов головного мозга, позволяет систематизировать характер морфологических изменений клеток различных слоев коры теменных долей головного мозга. Они характеризуются обратимыми и необратимыми повреждениями нейронов и нарушениями кровообращения, полнокровием сосудов микроциркуляторного русла, развитием периваскулярного и перичеселлюлярного отека, что позволяет использовать эти данные, наряду с результатами судебно-химического анализа, в обосновании непосредственной причины смерти.

Литература

1. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства. 17-е изд. М.: Новая волна; 2019: 73–74.
2. *Khokhar J.Y., Henricks A.M., Sullivan E.D.K., Green A.I.* Unique Effects of Clozapine: A Pharmacological Perspective. *Adv Pharmacol* 2018; 82: 137–162. PMID: 29413518 DOI: 10.1016/
3. *Бабкина А.С., Голубев А.М., Сундуков Д.В., Баширова А.Р., Голубев М.А.* Клозапин: механизмы токсичности и побочных эффектов. *Общая реаниматология.* 2018; 14 (2): 35–45. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-2-35-45
4. *Nucifora F.C. Jr, Mihaljevic M., Lee B.J., Sawa A.* Clozapine as a model for antipsychotic development. *Neurotherapeutics.* 2017; 14 (3): 750–761. DOI: 10.1001/archpsyc.1988.01800330013001. PMID: 3046553.
5. *Lally J., MacCabe J.H.* Antipsychotic medication in schizophrenia: a review. *Br Med Bull.* 2015; 114 (1): 169–179. DOI: 10.1093/bmb/ldv017
6. *Reznik R, Chen RYY, Stanford P.* Clozapine toxicity in a CYP2D6 poor metaboliser: Additive effects of haloperidol and valproate on clozapine metabolism. *Australas Psychiatry.* 2018; 26 (6): 608–611. DOI: 10.1177/1039856218771509.
7. *Lundblad W, Azzam P.N., Gopalan P, Ross C.A.* Medical management of patients on clozapine: A guide for internists. *J. Hosp. Med.* 2015; 10 (8): 537–543. DOI: 10.1002/jhm.2345.

cation on the scene (during the first 24 hours after drug ingestion). We measured the number of nerve cells in the 3 and 5 layers of the parietal cortex (pyramid layer, inner pyramid layer, respectively), which exhibited signs of acute swelling, primary irritation, neuronal shrinkage, ischemia, karyocytolysis, neuronophagy, satellitosis, and «ghost cells». The results of a histomorphometric study allowed determining a significantly increased number of nerve cells with reversible and irreversible changes, in comparison with the control group ($P < 0.05$) (table 2).

Conclusion

In patients who died from acute poisoning with clozapine in combination with ethanol, the detected histological and morphological changes in the cortical neurons, including both qualitative and quantitative features of acute neuronal damage, allow better characterization of morphological alterations in cells of different layers of the parietal cortex. Both reversible and irreversible damage to neurons, circulatory disorders, microcirculatory congestion, perivascular and pericellular edema are typical. These data, along with the results of forensic chemical analysis, can be used for the most precise determining the accurate causes of death.

References

1. *Mashkovsky M.D.* Medicinal products. 17th ed. Moscow: New wave; 2019: 73–74 [In Russ.].
2. *Khokhar J.Y., Henricks A.M., Sullivan E.D.K., Green A.I.* Unique Effects of Clozapine: A Pharmacological Perspective. *Adv Pharmacol* 2018; 82: 137–162. PMID: 29413518 DOI: 10.1016/
3. *Babkina A.S., Golubev A.M., Sundukov D.V., Bashirova A.R., Golubev M.A.* Clozapine: Mechanisms of Toxicity and Side Effects. *General Reanimatology=Obshchaya Reanimatologiya.* 2018; 14 (2): 35–45. [In Russ.]. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-2-35-45
4. *Nucifora F.C. Jr, Mihaljevic M., Lee B.J., Sawa A.* Clozapine as a model for antipsychotic development. *Neurotherapeutics.* 2017; 14 (3): 750–761. DOI: 10.1001/archpsyc.1988.01800330013001. PMID: 3046553.
5. *Lally J., MacCabe J.H.* Antipsychotic medication in schizophrenia: a review. *Br Med Bull.* 2015; 114 (1): 169–179. DOI: 10.1093/bmb/ldv017
6. *Reznik R, Chen RYY, Stanford P.* Clozapine toxicity in a CYP2D6 poor metaboliser: Additive effects of haloperidol and valproate on clozapine metabolism. *Australas Psychiatry.* 2018; 26 (6): 608–611. DOI: 10.1177/1039856218771509.
7. *Lundblad W, Azzam P.N., Gopalan P, Ross C.A.* Medical management of patients on clozapine: A guide for internists. *J. Hosp. Med.* 2015; 10 (8): 537–543. DOI: 10.1002/jhm.2345.

Таблица 2. Показатели повреждения нейронов в группах Me (Hq; LQ).
Table 2. Neuronal damage in the studied groups Me (Hq; LQ).

Groups	Type of damage						
	Reversible	Irreversible	Ischemic changes	Shrinkage	Satellitosis		
	Acute swelling	Hydropic changes	Tigrolysis	Karyocytolysis	Neuronophagy	Ghost cells	Satellitosis
Control	4.0 (2.3; 5.0)	0.0 (0.0; 1.5)	5.0 (3.5; 6.5)	5.0 (3.5; 6.5)	3.0 (1.3; 4.0)	3.0 (1.5; 4.5)	8.5 (5.0; 9.8)
Clozapine + ethanol	23.5* (22.3; 30.0)	29.0* (22.0; 37.5)	33.0* (29.3; 39.0)	23.0* (21.3; 27.8)	19.0* (14.3; 23.0)	32.0* (31.0; 38.3)	37.0* (33.8; 40.3)

Note. * — $P < 0.05$ when comparing with the control. Average values are given based on statistical processing of data from 3 and 5 layers of parietal cortex.

Примечание. * — $p < 0,05$ при сравнении с контролем. Даны средние значения исходя из статистической обработки 3 и 5 слоев коры теменных областей.

8. Seeman P Clozapine, a fast-off-D2 antipsychotic. *ACS Chem. Neurosci.* 2014; 5 (1): 24–29. DOI: 10.1021/cn400189s. PMID: 24219174
9. Hermann B., Wetzel C.H., Pestel E., Zieglgänsberger W., Holsboer F., Rupprecht R. Functional antagonistic properties of clozapine at the 5-HT₃ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 225 (3): 957–960. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1278. PMID: 8780717
10. Dzielwaczapolski G., Menalled L. B., Savino M. T., Mora M., Stefano F.J., Gershanik O. Mechanism of action of clozapine-induced modification of motor behavior in an animal model of the «suor-off» phenomenon. *Mov. Disord.* 1997; 12 (2): 159–166. DOI: 10.1002/mds.870120205. PMID: 9087973
11. Dong E., Grayson D.R., Guidotti A., Costa E. Antipsychotic subtypes can be characterized by differences in their ability to modify GABAergic promoter methylation. *Epigenomics.* 2009; 1 (1): 201–211. DOI: 10.2217/epi.09.2.
12. Guidotti A., Grayson D.R. DNA methylation and demethylation as targets for antipsychotic therapy. *Dialogues Clin Neurosci.* 2014; 16 (3): 419–429. PMID: 25364290 PMCID: PMC4214182 DOI: 10.31887/DCNS.2014.16.3/aguidotti
13. Guidotti A., Dong E., Tueting P., Grayson D.R. Modeling the molecular epigenetic profile of psychosis in prenatally stressed mice. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2014; 128: 89–101. DOI: 10.1016/B978-0-12-800977-2.00004-8. PMID: 25410542
14. Seeman P Clozapine, a fast-off-D2 antipsychotic. *ACS Chem. Neurosci.* 2014; 5 (1): 24–29. DOI: 10.1021/cn400189s. PMID: 24219174
15. Vauquelin G., Bostoen S., Vanderheyden P., Seeman P. Clozapine, atypical antipsychotics, and the benefits of fast-off D2 dopamine receptor antagonism. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 2012; 385 (4): 337–372. DOI: 10.1007/s00210-012-0734-2
16. Gligorijević N., Vasović T., Lević S., Miljević Č., Nedić O., Nikolić M. Atypical antipsychotic clozapine binds fibrinogen and affects fibrin formation. *Int J Biol Macromol.* 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.
17. Wang Y., Gong Y., Liu Z., Fu Z., Xue Y., Huang G. Acute Bilateral Coronary Artery Thrombosis and Myocardial Infarction in a 25-Year-Old Man After Long-Term Oral Clozapine Treatment. *J Clin Psychopharmacol.* 2020; 40 (1): 84–86. DOI: 10.1097/JCP.0000000000001156
18. Poudyal R., Lohani S. Clozapine Associated Pulmonary Embolism: Systematic Review. *J Community Hosp Intern Med Perspect.* 2019; 9 (4): 300–304 PMID: 31528276 PMCID: PMC6735295 DOI: 10.1080/20009666.2019.1627848
19. Kim S.J., Gim M.S. Clozapine-related Paroxysmal Supraventricular Tachycardia: a Case Report. *East Asian Arch Psychiatry.* 2018; 28 (2): 68–70. PMID: 29921744
20. Akkaş M., Demir M.C. Clozapine related Ogilvie syndrome with fatal outcome. *Riv Psichiatr.* 2020; 55 (1): 53–56. DOI: 10.1708/3301.32720.
21. Every-Palmer S., Inns S.J., Grant E., Ellis P.M. Effects of Clozapine on the Gut: Cross-Sectional Study of Delayed Gastric Emptying and Small and Large Intestinal Dysmotility. *CNS Drugs.* 2019; 33 (1): 81–91. DOI: 10.1007/s40263-018-0587-4.
22. Williams A.M., Park S.H. Seizure associated with clozapine: incidence, etiology, and management. *CNS Drugs.* 2015; 29 (2): 101–111. PMID: 25537107 DOI: 10.1007/s40263-014-0222-y
23. Bibily J., McCollum B., de Leon. Catatonia Secondary to Sudden Clozapine Withdrawal: A Case with Three Repeated Episodes a Literature Review. *Case Rep. Psychiatry.* 2017; 240: 27–31. DOI: 10.1155/2017/2402731
24. Reddy S.M., Khairkar P.H., Jajoo U. 70 hours of coma by clozapine intoxication. *J Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 2013; 25 (4): E22–23. DOI: 10.1176/appi.neuropsych.12090221.
25. Bellissima B.L., Tingle M.D., Cicovic A., Alawami M., Kenedi C. A systematic review of clozapine-induced myocarditis. *Int. J. Cardiol.* 2018; 259: 122–129. DOI: 10.1016/j.ijcard.2018.03.091
26. Savvatis K., Mohiddin S.A. Clozapine-induced myocarditis: «Psycho-analysing» drug-induced myocarditis. *Int. J. Cardiol.* 2018; 259: 130–131. DOI: 10.1016/j.ijcard.2018.02.071
27. Datta T., Solomon A.J. Clozapine-induced myocarditis. *Oxf. Med. Case Reports.* 2018; 1: omx080. DOI: 10.1093/omcr/omx080
28. van Hevoort M., van Eijndhoven P., Schellekens A., Pop-Purcelleanu M., Kramers C., Batalla A. Delayed complications after severe clozapine intoxication: a case report. The pharmacokinetic profile of clozapine and its important role in the course of symptoms. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 2019; 34 (5): 269–272. DOI: 10.1097/YIC.0000000000000272.
29. Patteet L., Maudens K., Wille S., Blanckaert P., Neels H., Calle P. When clozapine appears at a dance event... *Acta Clin. Belg.* 2019; 14: 1–5. DOI: 10.1080/17843286.2019.1630068
30. Leung J.G., Nelson S., Takala C.R., Goren J.L. Infection and inflammation leading to clozapine toxicity and intensive case series. *Ann. Pharmacother.* 2014; 48 (6): 801–805. PMID: 24619948 DOI: 10.1177/1060028014526701
31. Ruan C.J., Zhen X.Y., Ge X.L., Wang C.Y., Guo W., Tang Y.L., Li W.B., de Leon J. Pneumonia Can Cause Clozapine Intoxication: A Case Report. *Psychosomatics.* 2017; 58 (6): 652–656. DOI: 10.1016/j.psym.2017.05.003
32. ten Bokum E.M., van de Oever H.L., Radstake D.W., Arbouw M.E. Clozapine intoxication due to cessation of smoking and infection. *Neth. J. Med.* 2015; 73 (7): 345–347. PMID: 26314718
33. Wicinski M., Welewicz M.M. Clozapine-induced agranulocytosis/granulocytopenia: mechanisms and monitoring. *Curr. Opin. Hematol.* 2018; 25 (1): 22–28. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000391
34. Тоцилов В.А., Кушнир О.Н. Клозапин — препарат выбора для лечения больных с острыми психозами. *Социальная и клиническая психиатрия.* 2011; 21 (2): 37–42.
35. Шигеев С.В., Иванова Н.А., Иванов С.В. Отравления клозапином: теоретические аспекты и судебно-медицинская оценка. *Судебно-медицинская экспертиза.* 2013; 6: 41–46
8. Seeman P Clozapine, a fast-off-D2 antipsychotic. *ACS Chem. Neurosci.* 2014; 5 (1): 24–29. DOI: 10.1021/cn400189s. PMID: 24219174
9. Hermann B., Wetzel C.H., Pestel E., Zieglgänsberger W., Holsboer F., Rupprecht R. Functional antagonistic properties of clozapine at the 5-HT₃ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 225 (3): 957–960. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1278. PMID: 8780717
10. Dzielwaczapolski G., Menalled L. B., Savino M. T., Mora M., Stefano F.J., Gershanik O. Mechanism of action of clozapine-induced modification of motor behavior in an animal model of the «suor-off» phenomenon. *Mov. Disord.* 1997; 12 (2): 159–166. DOI: 10.1002/mds.870120205. PMID: 9087973
11. Dong E., Grayson D.R., Guidotti A., Costa E. Antipsychotic subtypes can be characterized by differences in their ability to modify GABAergic promoter methylation. *Epigenomics.* 2009; 1 (1): 201–211. DOI: 10.2217/epi.09.2.
12. Guidotti A., Grayson D.R. DNA methylation and demethylation as targets for antipsychotic therapy. *Dialogues Clin Neurosci.* 2014; 16 (3): 419–429. PMID: 25364290 PMCID: PMC4214182 DOI: 10.31887/DCNS.2014.16.3/aguidotti
13. Guidotti A., Dong E., Tueting P., Grayson D.R. Modeling the molecular epigenetic profile of psychosis in prenatally stressed mice. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2014; 128: 89–101. DOI: 10.1016/B978-0-12-800977-2.00004-8. PMID: 25410542
14. Seeman P Clozapine, a fast-off-D2 antipsychotic. *ACS Chem. Neurosci.* 2014; 5 (1): 24–29. DOI: 10.1021/cn400189s. PMID: 24219174
15. Vauquelin G., Bostoen S., Vanderheyden P., Seeman P. Clozapine, atypical antipsychotics, and the benefits of fast-off D2 dopamine receptor antagonism. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 2012; 385 (4): 337–372. DOI: 10.1007/s00210-012-0734-2
16. Gligorijević N., Vasović T., Lević S., Miljević Č., Nedić O., Nikolić M. Atypical antipsychotic clozapine binds fibrinogen and affects fibrin formation. *Int J Biol Macromol.* 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.
17. Wang Y., Gong Y., Liu Z., Fu Z., Xue Y., Huang G. Acute Bilateral Coronary Artery Thrombosis and Myocardial Infarction in a 25-Year-Old Man After Long-Term Oral Clozapine Treatment. *J Clin Psychopharmacol.* 2020; 40 (1): 84–86. DOI: 10.1097/JCP.0000000000001156
18. Poudyal R., Lohani S. Clozapine Associated Pulmonary Embolism: Systematic Review. *J Community Hosp Intern Med Perspect.* 2019; 9 (4): 300–304 PMID: 31528276 PMCID: PMC6735295 DOI: 10.1080/20009666.2019.1627848
19. Kim S.J., Gim M.S. Clozapine-related Paroxysmal Supraventricular Tachycardia: a Case Report. *East Asian Arch Psychiatry.* 2018; 28 (2): 68–70. PMID: 29921744
20. Akkaş M., Demir M.C. Clozapine related Ogilvie syndrome with fatal outcome. *Riv Psichiatr.* 2020; 55 (1): 53–56. DOI: 10.1708/3301.32720.
21. Every-Palmer S., Inns S.J., Grant E., Ellis P.M. Effects of Clozapine on the Gut: Cross-Sectional Study of Delayed Gastric Emptying and Small and Large Intestinal Dysmotility. *CNS Drugs.* 2019; 33 (1): 81–91. DOI: 10.1007/s40263-018-0587-4.
22. Williams A.M., Park S.H. Seizure associated with clozapine: incidence, etiology, and management. *CNS Drugs.* 2015; 29 (2): 101–111. PMID: 25537107 DOI: 10.1007/s40263-014-0222-y
23. Bibily J., McCollum B., de Leon. Catatonia Secondary to Sudden Clozapine Withdrawal: A Case with Three Repeated Episodes a Literature Review. *Case Rep. Psychiatry.* 2017; 240: 27–30. DOI: 10.1155/2017/2402731
24. Reddy S.M., Khairkar P.H., Jajoo U. 70 hours of coma by clozapine intoxication. *J Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 2013; 25 (4): E22–23. DOI: 10.1176/appi.neuropsych.12090221.
25. Bellissima B.L., Tingle M.D., Cicovic A., Alawami M., Kenedi C. A systematic review of clozapine-induced myocarditis. *Int. J. Cardiol.* 2018; 259: 122–129. DOI: 10.1016/j.ijcard.2018.03.091
26. Savvatis K., Mohiddin S.A. Clozapine-induced myocarditis: «Psycho-analysing» drug-induced myocarditis. *Int. J. Cardiol.* 2018; 259: 130–131. DOI: 10.1016/j.ijcard.2018.02.071
27. Datta T., Solomon A.J. Clozapine-induced myocarditis. *Oxf. Med. Case Reports.* 2018; 1: omx080. DOI: 10.1093/omcr/omx080
28. van Hevoort M., van Eijndhoven P., Schellekens A., Pop-Purcelleanu M., Kramers C., Batalla A. Delayed complications after severe clozapine intoxication: a case report. The pharmacokinetic profile of clozapine and its important role in the course of symptoms. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 2019; 34 (5): 269–272. DOI: 10.1097/YIC.0000000000000272.
29. Patteet L., Maudens K., Wille S., Blanckaert P., Neels H., Calle P. When clozapine appears at a dance event... *Acta Clin. Belg.* 2019; 14: 1–5. DOI: 10.1080/17843286.2019.1630068
30. Leung J.G., Nelson S., Takala C.R., Goren J.L. Infection and inflammation leading to clozapine toxicity and intensive case series. *Ann. Pharmacother.* 2014; 48 (6): 801–805. PMID: 24619948 DOI: 10.1177/1060028014526701
31. Ruan C.J., Zhen X.Y., Ge X.L., Wang C.Y., Guo W., Tang Y.L., Li W.B., de Leon J. Pneumonia Can Cause Clozapine Intoxication: A Case Report. *Psychosomatics.* 2017; 58 (6): 652–656. DOI: 10.1016/j.psym.2017.05.003
32. ten Bokum E.M., van de Oever H.L., Radstake D.W., Arbouw M.E. Clozapine intoxication due to cessation of smoking and infection. *Neth. J. Med.* 2015; 73 (7): 345–347. PMID: 26314718
33. Wicinski M., Welewicz M.M. Clozapine-induced agranulocytosis/granulocytopenia: mechanisms and monitoring. *Curr. Opin. Hematol.* 2018; 25 (1): 22–28. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000391
34. Тоцилов В.А., Кушнир О.Н. Клозапин — препарат выбора для лечения пациентов с острыми психозами. *Социальная и клиническая психиатрия.* 2011; 21 (2): 37–42. [In Russ.]
35. Shigeev S.V., Ivanova N.A., Ivanov S.V. Clozapine poisoning: theoretical aspects and forensic-medical evaluation. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza.* 2013; 56 (6): 41–46. [In Russ.]

36. Лужников Е.А. Медицинская токсикология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012: 528–530
37. Слюндин Д.Г., Ливанов А.С., Анучин В.В., Бобринская И.Г. Криминальные отравления азалептином. *Анестезиология и реаниматология*. 2007; 4: 61–63.
38. Слюндин 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
39. Clozaril (clozapine tablets) [product monograph] Dorval (QC): Novartis Pharmaceuticals Canada Inc; 2014. Aug 19.
40. Толубев А.М., Сундуков Д.В., Чурилов А.А., Ершов А.В., Романова О.Л., Телипов И.Н. Клетки Пуркинье мозжечка при отравлении клозапином в сочетании с алкоголем экспериментальное исследование. *Судебная медицина*. 2019; 5 (4): 9–14. DOI: 10.19048/2411-8729-2019-5-4-9-14.
41. Ермохин П.Н. Гистопатология центральной нервной системы (под ред. А. П. Авцына). М. Медицина. 1969: 245.
36. Luzhnikov E.A. Medical toxicology. National guideline, Moscow: GEOTAR-Media; 2012: 528–530. [In Russ.]
37. Slyundin D. G., Livanov A. S., Anuchin V.V., Bobrinskaya I. G. Criminal poisoning with azaleptin. *Anesthesiol. i reanimatol.* 2007; 4: 61–63. [In Russ.]
38. 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, nejropsikhiatriya, psikhosomatika*. 2010; 3: 57–63. [In Russ.]
39. Clozaril (clozapine tablets) [product monograph] Dorval (QC): Novartis Pharmaceuticals Canada Inc; 2014. Aug 19.
40. Golubev A.M., Sundukov D.V., Churilov A.A., Ershov A.V., Romanova O.L., Telipov I.N. Purkinje cells of the cerebellum in clozapine and clozapine ethanol poisoning (experimental research). *Russian Journal of Forensic Medicine*. 2019; 5 (4): 9–14. [In Russ.] DOI: 10.19048/2411-8729-2019-5-4-9-14.
41. Ermokhin P.N. Histopathology of the Central nervous system (ed. by A. P. Avtsyn). M. Medicine. 1969: 245 [In Russ.]

Поступила 30.08.20

Received 30.08.20