

Патологические изменения в печени при острых отравлениях клозапином и его сочетанием с этанолом (экспериментальное исследование)

О. Л. Романова^{1,2}, Д. В. Сундуков¹, М. А. Голубев³,
М. Л. Благодоров¹, В. В. Гошкеев¹, А. А. Чурилов⁴

¹ Российский университет дружбы народов,
Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

² Институт высшего и дополнительного профессионального образования 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

⁴ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР,
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

Pathologic Changes in the Liver During Acute Exposure to Clozapine and Its Combination with Ethanol (Experimental Study)

Olga L. Romanova^{1,2}, Dmitriy V. Sudukov¹, Mikhail A. Golubev³,
Mikhail L. Blagonravov¹, Vladimir V. Goshkoev¹, Alexey A. Churilov⁴

¹ Peoples' Friendship University of Russia,
6 Miklukho-Maclay Str., 117198 Moscow, Russia

² Institute of Higher and Additional Professional Education,
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

⁴ 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

Цель исследования: выявление патологических изменений в печени на ранних сроках действия клозапина и клозапина в сочетании с этанолом для совершенствования диагностики острых отравлений.

Материалы и методы. Опыты проводили на беспородных крысах-самцах ($n=15$). Животных разделили на 3 группы по 5 особей в каждой: 1) контрольная (интактные крысы); 2) клозапин, 3) клозапин и этанол. Клозапин в дозе 150 мг/кг массы тела животного вводили перорально под наркозом (хлоролаза), клозапин (150 мг/кг) с этанолом в дозе 5 мл/кг — перорально. Крыс выводили из эксперимента через 3 часа путем декапитации. Образцы ткани печени исследовали методом световой микроскопии. При гистологическом исследовании оценивали следующие морфологические признаки: расстройство кровообращения (наличие венозного, капиллярного и артериального полнокровия, появление венозных кровоизлияний), отсутствие окрашивания ядер, глыбчатость цитоплазмы, вакуолизацию цитоплазмы, наличие очагов некроза, появление клеточной реакции (большое количество лейкоцитов в поле зрения). Оценку проводили с применением критерия Фишера. Судебно-химическое исследование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе с масс-детектором. Оценивали содержание клозапина, норклозапина и клозапин-N-оксида в сыворотке крови и гомогенате печени крыс.

Результаты. В контрольной группе в ткани печени патологических изменений не наблюдали. Через 3 часа после введения клозапина выявили венозное полнокровие. Через 3 часа после совместного введения клозапина и этанола наблюдали венозное полнокровие и отсутствие окрашивания ядер гепатоцитов. Выявили, что при совместном введении клозапина и этанола содержание клозапина в сыворотке крови в 1,94, клозапин-N-оксида — в 2,3 раза ниже, чем при введении клозапина как монопрепарата, а содержание норклозапина — не отличается.

Заключение. Изменения, выявленные в печени, в сочетании с изменениями в других органах и результатами судебно-химического анализа позволяют установить факт отравления клозапином. Понимание процессов, происходящих в организме при подобных интоксикациях, помогает более эффективно оказывать помощь пострадавшим.

Ключевые слова: морфологические изменения; печень, криминальные отравления, судебно-химический анализ, клозапин, этанол, метаболиты, норклозапин, клозапин-N-оксид

Адрес для корреспонденции:

Ольга Леонидовна Романова
E-mail: olgpharm@ya.ru

Correspondence to:

Olga L. Romanova
E-mail: olgpharm@ya.ru

Purpose: identification of pathological changes in the liver at early stages of the effect of clozapine and clozapine combined with ethanol to improve the diagnosis of this acute exposure.

Materials and methods. The experiments were carried out on outbred male rats ($n=15$). The animals were split into 3 groups, 5 animals in each: 1) control (intact rats); 2) clozapine, 3) clozapine and ethanol. Clozapine at a dose of 150 mg/kg of the animal's body weight was administered orally under anesthesia (chloralose), clozapine (150 mg/kg) with ethanol at a dose of 5 ml/kg — orally. Rats were removed from the experiment after 3 hours by decapitation. Samples of liver tissue were studied using light microscopy. During histological examination, the following morphological signs were evaluated: blood circulation disorder (presence of venous, capillary, and arterial congestion, appearance of venous hemorrhage), absence of nuclei staining, cytoplasm lumpiness, cytoplasm vacuolation, presence of necrosis foci, appearance of cellular response (a large quantity of leukocytes per power field). The assessment was done using the F-test. Forensic chemical analysis was carried out using a high-performance liquid chromatograph equipped with a mass detector. The content of clozapine, norclozapine, and clozapine-N-oxide in blood serum and liver homogenate of rats was evaluated.

Results. In the control group, no pathological changes in liver tissue were observed. 3 hours after clozapine administration, venous congestion was detected. 3 hours after administration of clozapine and ethanol combination, venous congestion and absence hepatocyte nuclei staining were observed. It was found that after combined administration of clozapine and ethanol, the blood serum clozapine was 1.94-fold and clozapine-N-oxide was 2.3-fold lower than when clozapine was administered as a single drug while the content of norclozapine showed no difference.

Conclusion. Changes detected in the liver, together with changes in other organs and findings of the forensic chemical analysis, allow establishing the fact of clozapine poisoning. Understanding of the processes going on in the body during such intoxications helps rendering medical assistance to victims more effectively.

Keywords: morphological changes; liver, criminal poisoning, forensic chemical analysis, clozapine, ethanol, metabolites, norclozapine, clozapine-N-oxide

DOI:10.15360/1813-9779-2019-2-27-35

Введение

Отравления являются на сегодняшний день одной из лидирующих причин насильственной смерти [1]. Клозапин (лепонекс, азалептин, клозарил) относится к так называемым «атипичным нейролептикам» [2–7]. Он широко применяется для лечения психических заболеваний [5–8]. По химическому строению это трициклическое соединение, молекулы которого имеют элементы сходства с производными 1,4-бензодиазепина [2, 3]. Препарат метаболизируется в печени. В первой фазе метаболизма клозапина происходят: N-окисление, деметилирование, гидроксильрование, S-окисление [9]. Во второй фазе при конъюгации происходит глюкуронизация (присоединение эндогенных молекул, находящихся в организме с образованием глюкуронидов) [9, 10]. Основными метаболитами клозапина являются дезметилклозапин (норклозапин) и клозапин-N-оксид [2, 3, 9, 10]. Дезметилклозапин образуется под воздействием ферментов системы цитохрома P450 (изоформы 1A2 и 2D6 и, возможно, изоформы 3A4, 2C9, 2C19), клозапин-N-оксид — под воздействием цитохрома P450 (возможно, изоформы 3A4 и 1A2) [11].

Метаболизм клозапина представлен на рис. 1 [11].

В головном мозге клозапин метаболизируется за счет каталазного окисления флавиносодержащей монооксигеназой с образованием клозапин-N-оксида [12]. Метаболизм клозапина может происходить посредством миелопероксидазного окисления [13].

В настоящее время достаточно велико число случаев использования клозапина злоумышленни-

Introduction

Poisoning is currently one of the leading reasons of violent death [1]. Clozapine (Leponex, Azaleptin, Clozaril) belong to the so-called 'atypical neuroleptic agents' [2–7]. It is widely used for mental diseases [5–8]. As regards its chemical structure, it is a tricyclic compound, which molecules have some similarity with 1,4-benzodiazepine derivatives [2, 3]. The drug is metabolized in the liver. At the first stage of clozapine metabolism the following takes place: N-oxidation, demethylation, hydroxylation, S-oxidation [9]. At the second stage, during conjugation, glucuronization (addition of endogenous molecules, which are present in the body, to produce glucuronides) takes place [9, 10]. The main metabolites of clozapine are desmethylclozapine (norclozapine) and clozapine-N-oxide [2, 3, 9, 10]. Desmethylclozapine is produced under the action of enzymes of the cytochrome P450 family (isoforms 1A2 and 2D6, and, probably, isoforms 3A4, 2C9, 2C19), clozapine-N-oxide — under the action of cytochrome P450 (probably, isoforms 3A4 and 1A2) [11].

Clozapine metabolism is shown on figure 1 [11].

In the brain, clozapine is metabolized through catalase-mediated oxidation by flavin-containing monooxygenase to produce clozapine-N-oxide [12]. Clozapine metabolism might occur by way of myeloperoxidase oxidation [13].

At present, the number of cases is rather high when clozapine is used by criminals for intentional profound depression of CNS to commit criminal acts in respect of victims. Poisoning by this drug is characterized by severity and high mortality [14, 15].

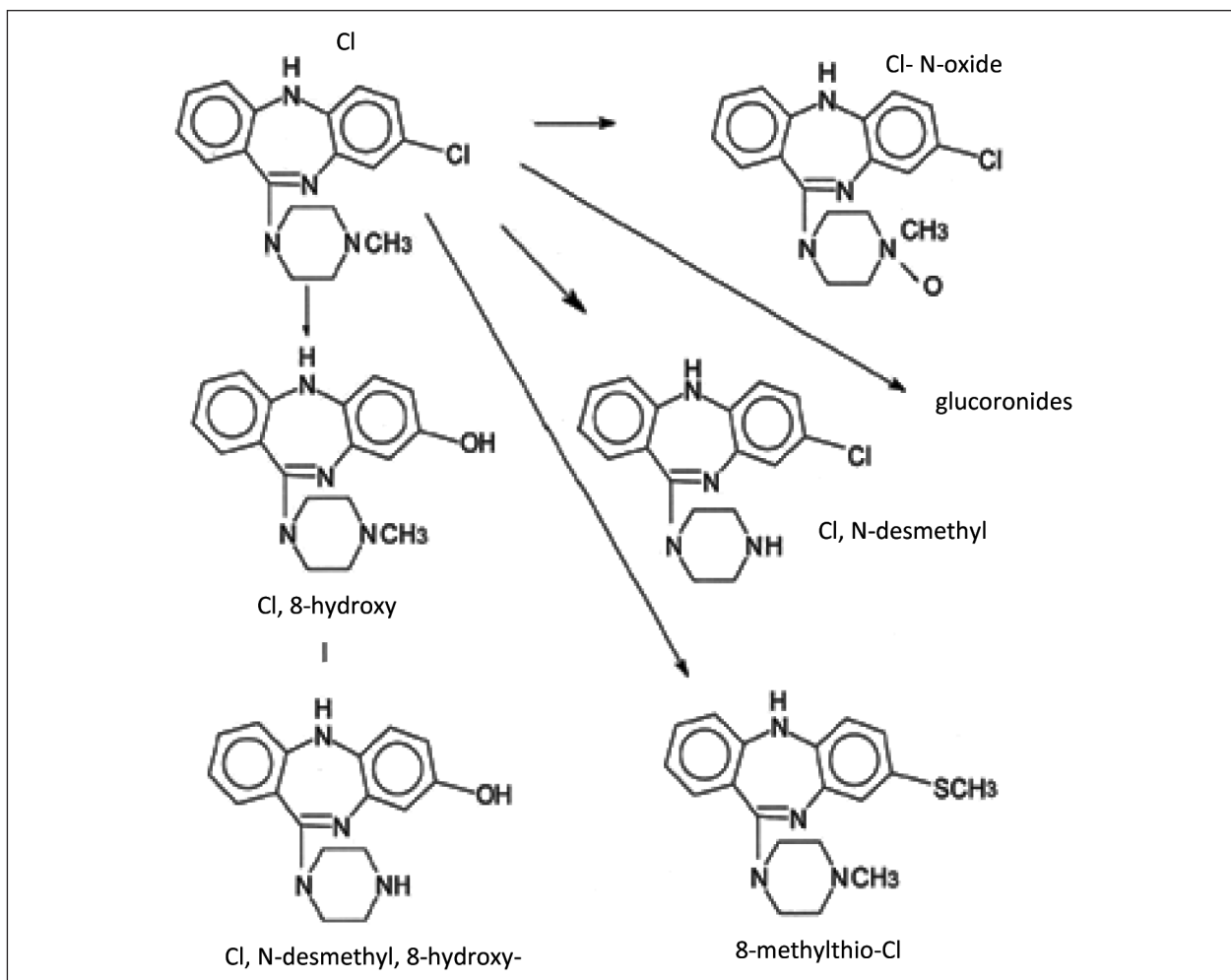


Рис 1. Метаболизм клозапина.

Fig. 1. Clozapine metabolism.

Note. Cl – clozapine.

Примечание. Cl – клозапин.

ками с целью преднамеренного глубокого угнетения ЦНС для осуществления криминальных действий по отношению к пострадавшим. Отравления этим препаратом отличаются тяжелым течением и высокой смертностью [14, 15].

Непосредственной причиной смерти после приема клозапина на 1–2-е сутки является интоксикация. К летальному исходу приводят, прежде всего, грубые нарушения гомеостаза, функций центральной и периферической нервной системы, а также развитие эндотоксикоза. Выделяют два варианта танатогенеза: паралич дыхательного центра и острую сердечно-сосудистую недостаточность [16]. На 3–6-е сутки после отравления (соматогенная фаза), основными причинами смерти являются пневмония и ТЭЛА [16–18].

Наиболее выраженное угнетающее действие на организм человека оказывает комбинация клозапина и этанола, что используется для совершения преступных действий [13].

Клозапин — это функциональный яд. Традиционно, в силу своей неочевидности, все случаи,

The immediate cause of death on day 1-2 after clozapine intake is intoxication. The fatal outcome results, first of all, from severe disorders of homeostasis, central and peripheral nervous system functions, and endotoxemia development. Two variants of thanatogenesis are distinguished: respiratory center paralysis and acute cardiovascular failure [16]. On day 3-6 after poisoning (the somatogenic phase), the main causes of death are pneumonia and PATE [16–18].

The combination of clozapine and ethanol renders the most prominent depressive effect on human body, and this is used to commit criminal acts [13].

Clozapine is a functional poison. Traditionally, due to its non-obviousness, all cases when such poisoning is suspected are subject to forensic medical investigation. At the same time, forensic medical diagnosis of such poisoning is still difficult up to the present day. In similar cases, diagnosis is made comprehensively taking into account all available data: the results of visual examination of cadaver and forensic anatomy, histology and forensic chemical investigation [14, 15].

подозреваемые на подобные отравления, подлежат судебно-медицинскому исследованию. Вместе с тем, судебно-медицинская диагностика таких отравлений до настоящего времени затруднена. Установление диагноза в подобных случаях производится комплексно с учетом всех доступных данных: результатов внешнего осмотра трупа и вскрытия, гистологического и судебно-химического исследования [14, 15].

Судебно-химическое исследование в случаях, подозрительных на отравление клозапином, представляет собой сложную аналитическую задачу, поскольку связано с изолированием небольшого количества вещества, введенного в организм, из достаточно большого объема биоматериала [19–21]. Необходимо отметить, что для клозапина характерен узкий терапевтический индекс (близость терапевтических и токсических концентраций) [2, 3, 22, 23], а это, в свою очередь, может послужить причиной, интоксикаций, в том числе, смертельных, поэтому особое внимание уделяется исследованию биожидкостей (крови, мочи) и внутренних органов.

Одним из органов-мишеней при отравлении клозапином (наряду с мозгом и легкими) является печень [24–28].

Согласно данным, полученным в НИИ им. Н. В. Склифосовского, у всех погибших от отравления клозапином наблюдался очаговый или диффузный стеатоз. Жировая дистрофия в вышеперечисленных случаях носила крупно- и мелкокапельный характер. В части наблюдений изменения печени были отмечены на фоне диагностированного гепатита (в том числе HCV-этиологии). Кроме того, часть пациентов длительно употребляла психотропные препараты с терапевтической целью, часть умерших злоупотребляли алкоголем. Тем не менее, в половине наблюдений мелкокапельный стеатоз печени не был обусловлен ни одной из указанных выше причин, поэтому можно думать, что он развился вследствие однократного употребления высоких доз психотропных препаратов [24].

Анализ источников литературы показал, что число публикаций о патологических изменениях в печени при отравлении клозапином ограничено. Кроме того, такие изменения изучались преимущественно в поздние сроки после интоксикации.

Цель исследования: выявление патологических изменений в печени на ранних сроках действия клозапина и клозапина в сочетании с этанолом для совершенствования диагностики острых отравлений.

Материал и методы

Эксперименты проводили на 15 беспородных крысах-самцах возраста 20 нед. массой 290–350 гр. Животных разделили на 3 группы (по 5 животных в каждой группе): 1) контроль (интактные крысы); 2) клозапин; 3) комбинация клозапина и этанола.

In cases when clozapine poisoning is suspected, the forensic chemical investigation represents a difficult analytical problem as it is related to isolation of a small quantity of the substance administered to the body from a large volume of biological material [19–21]. It should be noted that clozapine is characterized by a narrow therapeutic index (closeness of therapeutic and toxic concentrations) [2, 3, 22, 23], which, in turn, might become a cause of intoxication, including a lethal one, so a particular attention is paid to analysis of biological fluids (blood, urine) and internal organs.

During clozapine poisoning, one of target organs (along with the brain and lungs) is the liver [24–28].

According to the data of N. V. Sklifosovsky Research Institute, all who died from clozapine poisoning exhibited focal or diffuse steatosis. Adipose degeneration in the above cases was macro and micro vesicle steatosis. In some cases, changes in the liver were observed at the background of diagnosed hepatitis (including of HCV etiology). Besides, some patients had used psychotropic medication for therapeutic purposes, some deceased had abused alcohol. Nevertheless, in half cases, microvesicle steatosis of the liver was not caused by any of the afore-mentioned reasons; therefore, it had presumably developed due to a single use of a high dose of psychotropic medication [24].

Analysis of literature has demonstrated that there are few publications concerning pathological changes in the liver during exposure to clozapine. Besides, such changes were studied mostly at a late stage after intoxication.

Purpose: identification of pathological changes in the liver at early stages of the effect of clozapine and clozapine combined with ethanol to improve diagnosis of these acute exposures.

Materials and Methods

The experiments were carried out on 15 outbred male rats of 20-week age and 290–350 g weight. The animals were split into 3 groups (5 animals in each): 1) control (intact rats); 2) clozapine; 3) a combination of clozapine and ethanol.

Clozapine at a dose of 150 mg/kg of the animal's body weight was administered orally under general anesthesia (chloralose); clozapine (150 mg/kg) combined with ethanol at a dose of 5 ml/kg of the animal's body weight was administered orally.

The animals of all groups were removed from the experiment 3 later by way of decapitation. Lung tissue samples were fixed using a standard technique in 4% neutral paraformaldehyde and then treated following the generally accepted method. 5 μ m-thick histological sections were made, applied onto slides, and stained with hematoxylin and eosin. Specimens were studied by light microscopy using Nikon Eclipse E-400 microscope equipped with a video system based on Watec 221S camera (Japan), at 200 \times and 400 \times .

Rat blood serum and liver homogenate were studied by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) using HPLC chromatograph complete with mass detector Agilent Technologies 430 Triple Quad LC/MS (Germany). Chromatograms were processed using Agilent Mass Hunter Quantitative Analysis software vers. B 07.00 build 7.0.457.0.

Клозапин в дозе 150 мг/кг массы тела животного вводили перорально под общим наркозом (хлоролаза); клозапин (150 мг/кг) в сочетании с этанолом в дозе 5 мл/кг массы тела животного — перорально.

Животных всех групп выводили из эксперимента через 3 часа путем декапитации. Образцы ткани легких фиксировали стандартно в 4% нейтральном параформальдегиде и далее обрабатывали по общепринятой методике. Изготавливали гистологические срезы толщиной 5 мкм, наносили на предметные стекла и окрашивали гематоксилином и эозином. Препараты исследовали методом световой микроскопии на микроскопе Nikon Eclipse E-400 с видеосистемой на основе камеры Watec 221S (Япония) при увеличении 200× и 400×.

Исследование сыворотки крови и гомогената печени крыс проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) на высокоэффективном жидкостном хроматографе с масс-детектором Agilent Technologies 430 Triple Quad LC/MS (Германия). Для обработки хроматограмм использовали программу Agilent Mass Hunter Quantitative Analysis vers. B 07.00 build 7.0.457.0.

Содержание животных и работу с ними проводили в соответствии с приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г. и Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18.03.1986 г.).

Судебно-химическое исследование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе с масс-детектором Agilent Technologies 430 Triple Quad LC/MS (Германия). Для получения хроматограмм применяли программу Agilent Mass Hunter Workstation for series tripple Quadrapole vers. B06.00 build 6.0.6.25.4sp.4. Для обработки хроматограмм использовали программу Agilent Mass Hunter Quantitative Analysis vers. B07.00 build 7.0.457.0. Оценивали содержание клозапина и его основных метаболитов — норклозапина и клозапин-N-оксида в сыворотке крови и гомогенате печени крыс согласно валидированной методике [29].

Статистическая обработка данных. При проведении гистологического исследования оценивали наличие следующих морфологических признаков: расстройства кровообращения (наличие венозного, капиллярного и артериального полнокровия, появление венозных кровоизлияний), отсутствие окрашивание ядер, глыбчатость цитоплазмы, вакуолизация цитоплазмы, наличие очагов некроза, появление клеточной реакции (большое количество лейкоцитов в поле зрения). Оценку проводили с применением критерия Фишера. Наличие признака считали достоверными при его появлении в 4–5 случаях в одной группе и полном отсутствии в другой.

Статистическую обработку результатов химического исследования проводили в программе Statistica 10.0.1011x86 для Windows. Нормальность распределения величин проверяли при помощи теста Колмогорова-Смирнова. Достоверность различий проверяли при помощи *U*-критерия Манна-Уитни. Различия между группами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$

Результаты и обсуждение

Морфологическое исследование ткани печени. Выявили, что через 3 часа после введе-

Animals were managed and handled in accordance with Order No.755 of the USSR Ministry of Health dated 12.08.1977 and European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 18.03.1986).

The forensic chemical analysis was performed using high-performance liquid chromatograph equipped with mass-detector Agilent Technologies 430 Triple Quad LC/MS (Germany). Chromatograms were obtained using Agilent Mass Hunter Workstation for series tripple Quadrapole vers. B06.00 build 6.0.6.25.4sp.4. Chromatograms were processed with the help of Agilent Mass Hunter Quantitative Analysis software vers. B07.00 build 7.0.457.0. The content of clozapine and its main metabolites — norclozapine and clozapine-N-oxide in rat blood serum and liver homogenate was evaluated following the validated method [29].

Statistic Processing of Data. During the histological study, presence of the following morphological signs was evaluated: blood circulation disorder (presence of venous, capillary, and arterial congestion, appearance of venous hemorrhage), absence nuclei staining, cytoplasm lumpiness, cytoplasm vacuolation, presence of necrosis foci, occurrence of cellular response (a large quantity of leukocytes per power field). The assessment was done using the F-test. Presence of a sign was considered reliable when it occurred in 4–5 cases in one group and was completely absent in another.

Statistic processing of the chemical analysis findings was performed using Statistica 10.0.1011x86 software for Windows. Normality of distribution was checked using the Kolmogorov-Smirnov test. Reliability of difference was verified using the Mann-Whitney U test. Difference between groups was considered statistically significant at $P \leq 0.05$.

Results and Discussion

Morphological Analysis of Liver Tissue. It was found that 3 hours after clozapine administration, liver veins (including central) were dilated; as regards hepatocytes, nuclei were hypochromic, cytoplasm was lumpy. Minor isolated necrosis foci were detected. In these areas, hepatocyte contours were not distinguished and nuclei were not stained. Presence of hepatocytes with large nuclei was observed. It was established that portal tracts (veins and arteries) were moderately congested, bile duct lumens were free. 3 hours after clozapine administration, statistically significant venous congestion was established (fig. 2, a).

3 hours after combined administration of clozapine and ethanol, portal tract veins were dilated, congested; arteries were moderately congested, bile duct lumens were free. It was found that most cells had hypochromic nuclei. In the liver parenchyma, accumulation of segmental leukocytes was observed. Signs of hepatocyte alteration were detected.

3 hours after combined administration of clozapine and ethanol, the following statistically significant histological changes were established: absence of nucleus staining (fig. 2, b); venous congestion.

Forensic Chemical Analysis. The findings of measurement of clozapine and its main metabolites — norclozapine and clozapine-N-oxide — in blood serum and liver homogenate of experimental animals are given in tables 1 and 2.

ния клоzapина вены печени (включая центральные) были расширены, в части гепатоцитов — ядра гипохромны, цитоплазма — глыбчатая. Обнаружили небольшие отдельные очаги некроза. В этих участках контуры гепатоцитов не определялись, а ядра были не окрашены. Отметим наличие гепатоцитов с крупными ядрами. Установили, что портальные тракты (вены и артерии) умеренно полнокровны, просветы желчных протоков свободны. Через 3 часа после введения клоzapина выявили статистически значимое венозное полнокровие (рис. 2, *a*).

Через 3 часа после совместного введения клоzapина и этанола вены портального тракта были расширены, полнокровны; артерии — умеренно полнокровны, просветы желчных протоков — свободны. Выявили, что большая часть клеток была с гипохромными ядрами. В паренхиме печени наблюдали скопление сегментоядерных лейкоцитов. Обнаружили признаки альтерации гепатоцитов.

Через 3 часа после совместного введения клоzapина и этанола установили следующие статистически значимые гистологические изменения: отсутствие окрашивания ядер (рис. 2, *b*); венозное полнокровие.

Судебно-химическое исследование. Результаты измерения содержания клоzapина и его основных метаболитов — норклоzapина и клоzapин-N-оксида в сыворотке крови и гомогенате печени подопытных животных представили в табл. 1 и 2.

Выявили, что в сыворотке крови крыс при совместном приеме клоzapина и этанола содержание клоzapина в 1,94, клоzapин-N-оксида в 2,3 раза ниже, чем при приеме клоzapина как монопрепарата, а содержание норклоzapина — не отличается (табл. 1).

В гомогенате печени крыс статистически значимых различий в содержании клоzapина, норклоzapина и клоzapин-N-оксида при применении клоzapина и комбинации клоzapина с этанолом не обнаружили (табл. 2).

В основе патологических изменений, появившихся в печени, вероятнее всего, лежит резкое повышение свертываемости крови, связанное с самим механизмом действия клоzapина. Резкое повышение агрегационной активности эритроцитов и тромбоцитов, наблюдаемое при введении клоzapина и его комбинации с этанолом, связано, вероятнее всего, с блокадой 5-HT₃-рецепторов в тромбоцитах, что согласуется с данными других исследований [2, 3]. Известно, что клоzapин вызывает холестаза и зональные некрозы гепатоцитов ввиду нарушения микроциркуляции — образования микротромбов, что объясняется вышеупомянутыми процессами [2, 3, 30]. Кровенаполнение различных отделов микроциркуляторного русла становится неравномерным. Важную роль в развитии поражения печени

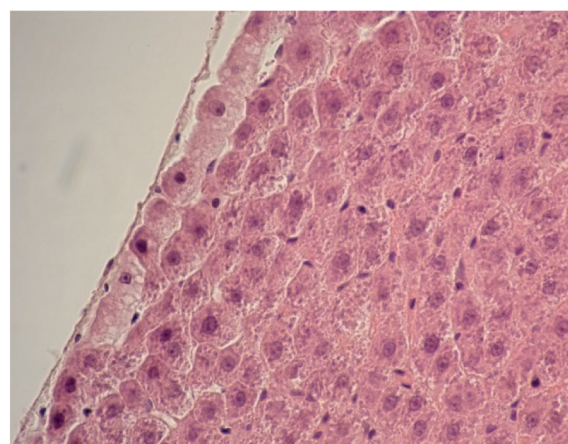
*a**b*

Рис. 2. Патологические изменения в печени крыс через 3 часа после острого отравления (гистологическое исследование).
Fig. 2. Pathological changes in the rat liver 3 hours after acute exposure (histological study).

Note. Staining with hematoxylin and eosin: *a* — group 2 (clozapine); dilated veins, venous congestion, $\times 200$. *b* — group 3 (clozapine and ethanol); hypochromic nuclei, $\times 400$.

Примечание. Окрашивание гематоксилином и эозином: *a* — группа 2 (клоzapин); расширение вен, венозное полнокровие, увеличение $\times 200$. *b* — группа 3 (клоzapин и этанол); гипохромные ядра, увеличение $\times 400$.

It was found that in case of combined administration of clozapine and ethanol to rats, their blood serum content of clozapine was 1.94-fold and clozapine-N-oxide was 2.3-fold lower than when clozapine was administered as a single drug while the content of norclozapine did not differ (table 1).

Statistically significant difference in the content of clozapine, norclozapine and clozapine-N-oxide between clozapine administration and clozapine plus ethanol administration was not found in the rat liver homogenate (table 2).

Drastic increase of blood clotting ability related to clozapine mechanism of action itself most probably underlies the pathological changes manifested in the liver. The jump of aggregative activity of erythrocytes and platelets observed upon administration of clozapine and

Таблица 1. Концентрации клозапина (мкг/мл) и его метаболитов в сыворотке крови крыс ($M \pm m$).
Table 1. Concentrations of clozapine ($\mu\text{g/ml}$) and its metabolites in blood serum of rats ($M \pm m$).

Parameters	Value of parameters in Groups		
	Control	Clozapine	Clozapine and ethanol
Clozapine	Not detected	1.98±0.13	1.02±0.39
Norclozapine	Not detected	0.28±0.05	0.28±0.018
Clozapine-N-oxide	Not detected	0.21±0.076	0.09±0.021
Norclozapine/clozapine ratio	–	0.14	0.27
Clozapine-N-oxide/clozapine ratio	–	0.11	0.088

Note. Differences between the groups are statistically reliable, $P \leq 0.05$.

Примечание. Для табл. 1, 2: parameters – показатели; value of ... in groups – значение ... в группах; control – контроль; clozapine – клозапин; and ethanol – и этанол; norclozapine – норклозапин; oxide – оксид; ratio – соотношение; not detected – не обнаружен. Различия между группами статистически достоверны, $P \leq 0,05$.

Таблица 2. Содержание клозапина и его метаболитов (мкг/г) в гомогенате печени крыс ($M \pm m$).
Table 2. Content of clozapine and its metabolites ($\mu\text{g/g}$) in liver homogenate of rats ($M \pm m$).

Parameters	Value of parameters in Groups		
	Control	Clozapine	Clozapine and ethanol
Clozapine	Not detected	300.73±42.65	274.73±27.63
Norclozapine	Not detected	41.01±17.09	39.25±3.73
Clozapine-N-oxide	Not detected	0.12±0.03	0.13±0.02
Norclozapine/clozapine ratio	–	0.14	0.14
Clozapine-N-oxide/clozapine ratio	–	0.00039	0.00047

Note. Differences between groups are not statistically reliable, $P > 0.05$.

Примечание. Различия между группами статистически недостоверны, $p > 0,05$.

также играет непосредственное повреждение эндотелия сосудов микроциркуляторного русла под действием самого клозапина, что согласуется с существующими исследованиями [30]. Все вышеперечисленные процессы отрицательно сказываются как на микроциркуляции, так и на тканевом метаболизме, что, в свою очередь, приводит к усугублению гипоксии и ацидозу тканей, гибели гепатоцитов [31–33]. Сходную картину гибели гепатоцитов наблюдали через 3 часа после совместного введения клозапина и этанола. Об их гибели свидетельствовало отсутствие окрашивания ядер и глыбчатость цитоплазмы. Кроме того, показано, что клозапин и его основной метаболит – норклозапин накапливаются в митохондриях гепатоцитов и вызывают их повреждение [32].

Таким образом, повреждение и гибель клеток печени связаны с развитием гипоксии, оксидативным стрессом и непосредственным токсическим влиянием клозапина и его метаболитов на гепатоциты.

Заключение

Комплекс изменений, выявленных в печени, в сочетании с изменениями в других органах и результатами судебно-химического анализа позволяет установить факт отравления клозапином. Понимание процессов, происходящих в организме при таких интоксикациях, помогает более эффективно оказывать помощь пострадавшим.

its combination with ethanol is likely to be connected with block of 5-HT₃-receptors in platelets, which concurs with other investigations [2, 3]. It is known that clozapine causes cholestasis and zonal necrosis of hepatocytes due to disturbed microcirculation – formation of microthroms, which is explained by the afore-mentioned processes [2, 3, 30]. Blood filling of different divisions of microvasculature becomes uneven. Direct damage of microvasculature vessel endothelium under the action of clozapine itself also plays an important role in the development of liver lesion, which concurs with existent studies [30]. All afore-mentioned processes adversely affect both microcirculation and tissue metabolism, which, in turn, leads to aggravation of hypoxia and acidosis of tissues, death of hepatocytes [31–33]. A similar picture of the death of hepatocytes was observed 3 hours after combined administration of clozapine and ethanol. Absence of nucleus staining and cytoplasm lumpiness evidenced their death. Besides, it has been shown that clozapine and its main metabolite – norclozapine – accumulate in mitochondrias of hepatocytes and cause their damage [32].

So, damage and death of liver cells are related to development of hypoxia, oxidative stress and direct toxic influence of clozapine and its metabolites on hepatocytes.

Conclusion

The complex of changes found in the liver, together with changes in other organs and forensic chemical findings, allows establishing the fact of clozapine poisoning. Understanding of processes taking place in the body during such intoxications helps rendering assistance to victims more effectively.

Литература

1. Ливанов Г.А., Батоцыренов Б.В., Васильев С.А., Андрианов А.Ю., Баранов Д.В., Неженцева И.В. Окислительный дистресс и его коррекция реамберинном у больных с острым отравлением смесью психотропных веществ. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (5): 18–23. DOI: 10.15360/1813-9779-2013-5-18
2. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России. 21-е изд. М.: АстраФармСервис; 2014. 8. ISBN: 978-5-89892-165-1
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. 16-е изд. М.: Новая волна; 2014. 73–74. ISBN 978-5-7864-0218-7
4. Burns M.J. The pharmacology and toxicology of atypical antipsychotic agents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2001; 39 (1): 1–14. DOI: 10.1081/CLT-100102873. PMID: 11327216
5. Essali A., Al-Haj Haasan N., Li C., Rathbone J. Clozapine versus typical neuroleptic medication for schizophrenia. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2009; 1:CD000059. DOI: 10.1002/14651858.CD000059.pub2. PMID: 19160174
6. Asenjo Lobos C., Komossa K., Rummel-Kluge C., Hunger H., Schmid F., Schwarz S., Leucht S. Clozapine versus other atypical antipsychotics for schizophrenia. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2010; 11: CD006633. DOI: 10.1002/14651858.CD006633.pub2. PMID: 21069690
7. Stroup T.S., Gerhard T., Crystal S., Huang C., Olfson M. Comparative effectiveness of clozapine and standard antipsychotic treatment in adults with schizophrenia. *Am. J. Psychiatry.* 2016; 173 (2): 166–173. DOI: 10.1176/appi.ajp.2015.15030332. PMID: 26541815
8. Barber S., Olotu U., Corsi M., Cipriani A. Clozapine combined with different antipsychotic drugs for treatment-resistant schizophrenia. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017; 3: CD006324. DOI: 10.1002/14651858.CD006324.pub3. PMID: 28333365
9. Dain J.G., Nicoletti J., Ballard F. Biotransformation of clozapine in humans. *Drug Metab. Dispos.* 1997; 25 (5): 603–609. PMID: 9152600
10. Калетина Н.И. (ред.). Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов. М.: ГЕОТАР-Медиа; 2008. 1016. ISBN 978-5-9704-0613-7
11. Zhou S.F., Zhou Z.W., Yang L.P., Cai J.P. Substrates, inducers, inhibitors and structure-activity relationships of human Cytochrome P450 2C9 and implications in drug development. *Curr. Med. Chem.* 2009; 16 (27): 3480–3675. DOI: 10.2174/092986709789057635. PMID: 19515014
12. Fang J. Metabolism of clozapine by rat brain: the role of flavin-containing monooxygenase (FMO) and cytochrome P450 enzymes. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2000; 25 (2): 109–114. DOI: 10.1007/BF03190076. PMID: 11112091
13. Hsuanya Y., Dunford H.B. Oxidation of clozapine and ascorbate by myeloperoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999; 368 (2): 413–420. DOI: 10.1006/abbi.1999.1328. PMID: 10441395
14. Слондин Д.Г., Ливанов А.С., Анучин В.В., Меркин А.Г., Бобринская И.Г., Тутова Е.В. Криминальные отравления клозапином. *Анестезиология и реаниматология*. 2007; 4: 61–64. PMID: 17929492
15. Ильяшенко К.К., Лужников Е.А., Белова М.В., Ермохина Г.В., Лисовик Ж.А., Карева М.В., Ельков А.Н., Зимица Л.Н., Барينو М.В. Особности острых отравлений клозапином. *Токсикол. вестн.* 2009; 2: 2–5.
16. Богомолова И.Н., Богомолов Д.В. Танатогенез при отравлении психофармакологическими средствами. *Суд.-мед. экспертиза*. 2005; 48 (2): 19–22. PMID: 15881137
17. Coodin S., Ballegeer T. Clozapine therapy and pulmonary embolism. *Can. J. Psychiatry.* 2000; 45 (4): 395. PMID: 10813078
18. Hägg S., Spigset O., Söderström T.G. Association of venous thromboembolism and clozapine. *Lancet.* 2000; 355 (9210): 1155–1156. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)02066-3. PMID: 10791380
19. Барсегян С.С., Николаева Н.О., Онищенко М.М., Саломатин Е.М., Сальникова Е.А. Определение клозапина при судебно-химическом исследовании трупной крови, мочи и печени с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Суд.-мед. экспертиза*. 2012; 55 (4): 43–47. PMID: 23008960
20. Соколова О.И., Малкова Т.Л., Неволин Н.И. Обнаружение азалептина при судебно-химическом исследовании трупного материала. *Суд.-мед. экспертиза*. 2007; 50 (2): 35–38. PMID: 17520906
21. Baldessarini R.J., Centorrino F., Flood J.G., Volpicelli S.A., Huston-Lyons D., Cohen B.M. Tissue concentration of clozapine and its metabolites in the rat. *Neuropsychopharmacology.* 1993; 9 (2): 117–124. DOI: 10.1038/npp.1993.50. PMID: 8216694
22. Subramanian S., Völm B.A., Huband N. Clozapine dose for schizophrenia. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017; 6: CD009555. DOI: 10.1002/14651858.CD009555.pub2. PMID: 28613395
23. Repetto M.R., Repetto M. Habitual, toxic, and lethal concentrations of 103 drugs of abuse in humans. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1997; 35 (1): 1–9. DOI: 10.3109/15563659709001158. PMID: 9022645
24. Зимица Л.Н., Михайлова Г.В., Барينو М.В., Павленко Е.Ю., Полозов М.А., Попов С.В., Розумный П.А., Ильяшенко К.К., Ермохина Т.В. Морфологические аспекты острых отравлений азалептином. *Суд.-мед. экспертиза*. 2008; 51 (3): 8–10. PMID: 18589664
25. Brown C.A., Telio S., Warmock C.A., Wong A.H. Clozapine toxicity and hepatitis. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2013; 33 (4): 570–571. DOI: 10.1097/JCP.0b013e3182946586. PMID: 23764687
26. Douros A., Bronder E., Andersohn F., Klimpel A., Thomae M., Sarganas G., Kreutz R., Garbe E. Drug-induced liver injury: results from the hospital-based Berlin Case-Control Surveillance Study. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2015; 79 (6): 988–999. DOI: 10.1111/bcp.12565. PMID: 25444550
27. Zlatković J., Todorović N., Tomanović N., Bošković M., Djurdjević S., Lazarević-Pašti T., Bernardi R.E., Djurdjević A., Filipović D. Chronic ad-

References

1. Livanov G.A., Batotsyrenov B.V., Vasilyev S.A., Andrianov A.Yu., Baranov D.V., Nezhentseva I.V. Oxidative distress and its correction with reamberin in patients with acute poisoning by a mixture of psychotropic substances. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2013; 9 (5): 18–23. DOI: 10.15360/1813-9779-2013-5-18. [In Russ., In Engl.]
2. VIDAL directory. Medicines in Russia. 21-st ed. Moscow: AstraFarm-Servis; 2014. 8. ISBN: 978-5-89892-165-1. [In Russ.]
3. Mashkovsky M.D. Medicinal products. 16-th ed. Moscow: Novaya Volna; 2014. 73–74. ISBN 978-5-7864-0218-7. [In Russ.]
4. Burns M.J. The pharmacology and toxicology of atypical antipsychotic agents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2001; 39 (1): 1–14. DOI: 10.1081/CLT-100102873. PMID: 11327216
5. Essali A., Al-Haj Haasan N., Li C., Rathbone J. Clozapine versus typical neuroleptic medication for schizophrenia. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2009; 1:CD000059. DOI: 10.1002/14651858.CD000059.pub2. PMID: 19160174
6. Asenjo Lobos C., Komossa K., Rummel-Kluge C., Hunger H., Schmid F., Schwarz S., Leucht S. Clozapine versus other atypical antipsychotics for schizophrenia. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2010; 11: CD006633. DOI: 10.1002/14651858.CD006633.pub2. PMID: 21069690
7. Stroup T.S., Gerhard T., Crystal S., Huang C., Olfson M. Comparative effectiveness of clozapine and standard antipsychotic treatment in adults with schizophrenia. *Am. J. Psychiatry.* 2016; 173 (2): 166–173. DOI: 10.1176/appi.ajp.2015.15030332. PMID: 26541815
8. Barber S., Olotu U., Corsi M., Cipriani A. Clozapine combined with different antipsychotic drugs for treatment-resistant schizophrenia. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017; 3: CD006324. DOI: 10.1002/14651858.CD006324.pub3. PMID: 28333365
9. Dain J.G., Nicoletti J., Ballard F. Biotransformation of clozapine in humans. *Drug Metab. Dispos.* 1997; 25 (5): 603–609. PMID: 9152600
10. Kaletina N.I. (ed.). Toxicological chemistry. Metabolism and toxicant analysis. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. 1016. ISBN 978-5-9704-0613-7. [In Russ.]
11. Zhou S.F., Zhou Z.W., Yang L.P., Cai J.P. Substrates, inducers, inhibitors and structure-activity relationships of human Cytochrome P450 2C9 and implications in drug development. *Curr. Med. Chem.* 2009; 16 (27): 3480–3675. DOI: 10.2174/092986709789057635. PMID: 19515014
12. Fang J. Metabolism of clozapine by rat brain: the role of flavin-containing monooxygenase (FMO) and cytochrome P450 enzymes. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2000; 25 (2): 109–114. DOI: 10.1007/BF03190076. PMID: 11112091
13. Hsuanya Y., Dunford H.B. Oxidation of clozapine and ascorbate by myeloperoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999; 368 (2): 413–420. DOI: 10.1006/abbi.1999.1328. PMID: 10441395
14. Slyundin D.G., Livanov A.S., Anuchin V.V., Bobrinskaya I.G., Gutova E.V. Criminal clozapine intoxications. *Anesteziology i Reanimatologiya*. 2007; 4: 61–64. PMID: 17929492. [In Russ.]
15. Ilyashenko K.K., Luzhnikov E.A., Belova M.V., Ermokhina G.V., Lisovik Zh.A., Kareva M.V., Elkov A.N., Zimina L.N., Barinova M.V. Features of acute poisonings by Klozapin. *Toksikologichesky Vestnik*. 2009; 2: 2–5. [In Russ.]
16. Bogomolova I.N., Bogomolov D.V. Thanatogenesis in poisoning with psychic drugs. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertiza*. 2005; 48 (2): 19–22. PMID: 15881137. [In Russ.]
17. Coodin S., Ballegeer T. Clozapine therapy and pulmonary embolism. *Can. J. Psychiatry.* 2000; 45 (4): 395. PMID: 10813078
18. Hägg S., Spigset O., Söderström T.G. Association of venous thromboembolism and clozapine. *Lancet.* 2000; 355 (9210): 1155–1156. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)02066-3. PMID: 10791380
19. Barsегyan S.S., Nikolaeva N.O., Onishchenko M.M., Salomatina E.M., Salsnikova E.A. The determination of clozapine for the forensic chemical study of cadaveric blood, urine, and liver with the use of high performance liquid chromatography. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertiza*. 2012; 55 (4): 43–47. PMID: 23008960. [In Russ.]
20. Sokolova O.I., Malkova T.L., Nevolin N.I. Detection of azaleptine in forensic chemical examination of cadaveric material. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertiza*. 2007; 50 (2): 35–38. PMID: 17520906. [In Russ.]
21. Baldessarini R.J., Centorrino F., Flood J.G., Volpicelli S.A., Huston-Lyons D., Cohen B.M. Tissue concentration of clozapine and its metabolites in the rat. *Neuropsychopharmacology.* 1993; 9 (2): 117–124. DOI: 10.1038/npp.1993.50. PMID: 8216694
22. Subramanian S., Völm B.A., Huband N. Clozapine dose for schizophrenia. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017; 6: CD009555. DOI: 10.1002/14651858.CD009555.pub2. PMID: 28613395
23. Repetto M.R., Repetto M. Habitual, toxic, and lethal concentrations of 103 drugs of abuse in humans. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1997; 35 (1): 1–9. DOI: 10.3109/15563659709001158. PMID: 9022645
24. Zimina L.N., Mikhailova G.V., Barinova M.V., Pavlenko E.Yu., Polozov M.A., Popov S.V., Rozumnyi P.A., Ilyashenko K.K., Ermokhina T.V. Morphological aspects of acute intoxication with Azaleptin. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertiza*. 2008; 51 (3): 8–10. PMID: 18589664. [In Russ.]
25. Brown C.A., Telio S., Warmock C.A., Wong A.H. Clozapine toxicity and hepatitis. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2013; 33 (4): 570–571. DOI: 10.1097/JCP.0b013e3182946586. PMID: 23764687
26. Douros A., Bronder E., Andersohn F., Klimpel A., Thomae M., Sarganas G., Kreutz R., Garbe E. Drug-induced liver injury: results from the hospital-based Berlin Case-Control Surveillance Study. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2015; 79 (6): 988–999. DOI: 10.1111/bcp.12565. PMID: 25444550
27. Zlatković J., Todorović N., Tomanović N., Bošković M., Djurdjević S., Lazarević-Pašti T., Bernardi R.E., Djurdjević A., Filipović D. Chronic ad-

- ministration of fluoxetine or clozapine induces oxidative stress in rat liver: a histopathological study. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2014; 59: 20–30. DOI: 10.1016/j.ejps.2014.04.010. PMID: 24768740
28. Tucker P. Liver toxicity with clozapine. *Aust. N.Z. J. Psychiatry.* 2013; 47 (10): 975–976. DOI: 10.1177/0004867413488224. PMID: 23636912
29. Wu Chou A.I., Lu M.L., Shen W.W. Hepatotoxicity induced by clozapine: a case report and review of literature. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2014; 10: 1585–1587. DOI: 10.2147/NDT.S67654. PMID: 25210451
30. Романова О.Л., Степанова Е.С., Барсегян С.С., Сундуков Д.В., Чистяков В.В. Одновременное обнаружение клоzapина, норклоzapина и клоzapин-N-оксида в сыворотке крови и органах. *Фармация.* 2016; 65 (5): 27–29.
31. Elmorsy E., Elzalabany L.M., Elsheikha H.M., Smith P.A. Adverse effects of antipsychotics on micro-vascular endothelial cells of the human blood-brain barrier. *Brain Res.* 2014; 1583: 255–268. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.08.011. PMID: 25139421
32. Шульпекова Ю.О. Лекарственные поражения печени. *Consilium medicum.* 2006; 8 (7): 5–7.
33. Orhan H. Extrahepatic targets and cellular reactivity of drug metabolites. *Curr. Med. Chem.* 2015; 22 (4): 408–437. DOI: 10.2174/0929867321666140826113716. PMID: 25174932
34. Глушков С.И., Куценко С.А., Карпищенко А.И., Новикова Т.М. Состояние системы глутатиона и процессов перекисного окисления липидов в эритроцитах пациентов в клинике острых отравлений веществами седативно-гипнотического действия. *Токсикол. вестн.* 2003; 5: 6–12.
27. Zlatković J, Todorović N., Tomanović N., Bošković M., Djordjević S., Lazarević-Pašti T., Bernardi R.E., Djurdjević A., Filipović D. Chronic administration of fluoxetine or clozapine induces oxidative stress in rat liver: a histopathological study. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2014; 59: 20–30. DOI: 10.1016/j.ejps.2014.04.010. PMID: 24768740
28. Tucker P. Liver toxicity with clozapine. *Aust. N.Z. J. Psychiatry.* 2013; 47 (10): 975–976. DOI: 10.1177/0004867413488224. PMID: 23636912
29. Wu Chou A.I., Lu M.L., Shen W.W. Hepatotoxicity induced by clozapine: a case report and review of literature. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2014; 10: 1585–1587. DOI: 10.2147/NDT.S67654. PMID: 25210451
30. Romanova O.L., Stepanova E.S., Barsegyan S.S., Sundukov D.V., Chistyakov V.V. Simultaneous determination of clozapine, norclozapine, clozapine-n-oxide in serum and organs. *Farmatsiya.* 2016; 65 (5): 27–29. [In Russ.]
31. Elmorsy E., Elzalabany L.M., Elsheikha H.M., Smith P.A. Adverse effects of antipsychotics on micro-vascular endothelial cells of the human blood-brain barrier. *Brain Res.* 2014; 1583: 255–268. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.08.011. PMID: 25139421
32. Shulpekova Yu.O. Liver drug injury. *Consilium medicum.* 2006; 8 (7): 5–7. [In Russ.]
33. Orhan H. Extrahepatic targets and cellular reactivity of drug metabolites. *Curr. Med. Chem.* 2015; 22 (4): 408–437. DOI: 10.2174/0929867321666140826113716. PMID: 25174932
34. Glushkov S.I., Kutsenko S.A., Karpishchenko A.I., Novikova T.M. Status of glutathione system and lipide peroxidation processes in erythrocytes with patients in the clinic of acute poisonings by substances of sedative and hypnotic action. *Toksikologichesky Vestnik.* 2003; 5: 6–12. [In Russ.]

Поступила 09.08.18

Received 09.08.18