

Морфологические и функциональные характеристики миокарда и микроциркуляторного русла кожи через 24 часа после отравления клозапином (экспериментальное исследование)

И. А. Рыжков¹, А. С. Бабкина^{1,2}, З. И. Цоколаева^{1,3}, С. Н. Калабушев^{1,4}, В. В. Антонова¹, М. В. Сергеева², А. В. Ершов^{1,5}

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

² Российский университет дружбы народов, Россия, 117198, ЮЗАО, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

³ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, Россия, 121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а

⁴ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия, 119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1,

⁵ Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России, Россия, 127994, ГСП-4, г. Москва, Рахмановский пер, д. 3

Morphology and Function of Myocardium and Skin Microcirculation 24 Hours after Clozapine Poisoning (Experimental Study)

Ivan A. Ryzhkov¹, Anastasia S. Babkina^{1,2}, Zoya I. Tsokolaeva^{1,3}, Sergey N. Kalabushev^{1,4}, Viktoriya V. Antonova¹, Mariya V. Sergeeva², Anton V. Ershov^{1,5}

¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, 25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia, 6 Miklukho-Maclaya Str., 117198 Moscow, Russia

³ National Medical Research Center for Cardiology, Ministry of Health of Russia, Russia, 121552, Moscow, st. 3rd Cherepkovskaya, 15a

⁴ M. V. Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskiye gory, 119991 Moscow, Russia

⁵ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia, 3 Rakhmanovsky Lane, 127994 Moscow, Russia

Для цитирования: И. А. Рыжков, А. С. Бабкина, З. И. Цоколаева, С. Н. Калабушев, В. В. Антонова, М. В. Сергеева, А. В. Ершов. Морфологические и функциональные характеристики миокарда и микроциркуляторного русла кожи через 24 часа после отравления клозапином (экспериментальное исследование). *Общая реаниматология*. 2020; 16 (5): 56–64. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2020-5-56-64> [На русск. и англ.]

For citation: Ivan A. Ryzhkov, Anastasia S. Babkina, Zoya I. Tsokolaeva, Sergey N. Kalabushev, Viktoriya V. Antonova, Mariya V. Sergeeva, Anton V. Ershov. Morphology and Function of Myocardium and Skin Microcirculation 24 Hours after Clozapine Poisoning (Experimental Study). *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2020; 16 (5): 56–64. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2020-5-56-64> [In Russ. and Engl.]

Резюме

Цель исследования: оценить влияние сублетальной дозы клозапина на сердечно-сосудистую систему крыс через 24 часа после введения препарата.

Материалы и методы. Эксперименты выполнили на 17 крысах-самцах линии Wistar массой 220–270 г. Под общей анестезией севофлюраном животным I группы энтерально через зонд вводили раствор NaCl 0,9%, II группе — клозапин в дозе 150 мг/кг, разведенный в 2,0 мл раствора NaCl 0,9%, III группе — клозапин в дозе 150 мг/кг, разведенный в 2,0 мл 40% спирта этилового. Через 24 ч после введения препарата оценивали артериальное давление (АД), частоту сердечных сокращений (ЧСС), микроциркуляцию в коже методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ), интенсивность флуоресценции коферментов НАДН, ФАД*. После эвтаназии проводили аутопсию с забором внутренних органов крыс для морфологического исследования. Далее изготавливали парафиновые срезы сердец с последующей окраской гематоксилином и эозином, которые исследовали с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse Ni-U.

Адрес для корреспонденции:

Антон Валерьевич Ершов
E-mail: salavatprof@mail.ru

Correspondence to:

Anton V. Ershov
E-mail: salavatprof@mail.ru

Результаты. Спектральный анализ колебаний локального кожного кровотока показал, что прием клоzapина вызывал уменьшение Аmax и амплитуд всех частотных диапазонов активной регуляции микроциркуляции по сравнению с контролем. Животные всех групп через 24 часа после введения препаратов не различались между собой по основным показателям газового состава и КОС артериальной крови, но в группах клоzapина (II и III) концентрация гемоглобина и показатель гематокрита были ниже, чем в контрольной группе.

При исследовании гистологических препаратов сердец крыс в группах II и III выявили полнокровие венул, диapedезные кровоизлияния, периваскулярный и интерстициальный отек. В просвете сосудов отметили признаки стаза крови, а также краевое стояние гранулоцитов. Выявили неравномерную окраску миокарда за счет кардиомиоцитов с гиперэозинфильной и местами гомогенной цитоплазмой; участки фрагментации и деформации кардиомиоцитов. Ядра кардиомиоцитов были полиморфными и неравномерно окрашенными, отмечали перинуклеарный отек.

Заключение. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о токсическом действии клоzapина, проявившимся прогрессирующим альтерацией миокарда и нарушениями центрального и периферического кровообращения. Тем не менее, купирование брадикардии, восстановление кожной перфузии и нивелирование метаболических нарушений (флуоресценция НАДН, КОС артериальной крови) через 24 часа могут быть обусловлены включением механизмов компенсации нарушенных функций, в частности, за счет изменения нейрогенной и гуморальной регуляции гомеостаза.

Ключевые слова: клоzapин; миокард; гемодинамика; микроциркуляция

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Summary

Aim of the study: to evaluate the effect of sublethal dose of clozapine on the rat cardiovascular system 24 hours after administration of the drug.

Materials and methods. The experiments were carried out on 17 male Wistar rats weighing 220–270 g. Under general anesthesia with sevoflurane, the animals of Group I were enterally given 0.9% NaCl solution, Group II animals received clozapine in a dose of 150 mg/kg diluted in 2.0 ml of NaCl solution 0.9%, Group III animals were given clozapine in a dose of 150 mg/kg diluted in 2.0 ml of 40% ethanol. Blood pressure (BP), heart rate (HR), skin microcirculation using laser Doppler flowmetry (LDF), NADH and FAD⁺ fluorescence were estimated 24 hours after the drug administration. After euthanasia, autopsy with sampling of internal organs for morphological study was done. Then paraffin heart sections with subsequent H&E staining were made, which were studied using the Nikon Eclipse Ni-U light microscope.

Results. Spectral analysis of local skin blood flow fluctuations showed that clozapine reduced Amax and amplitude in all frequency ranges of active microcirculation regulatory system in comparison with the controls. No differences in blood gases and acid-base status were seen between the groups of animals 24 hours after administration of the drugs. However, the animals from clozapine groups (II and III) had lower hemoglobin and hematocrit than in the control group.

Histological examination of rat hearts in groups II and III revealed congested venules, haemorrhages by diapedeses, perivascular and interstitial edema. The signs of blood stasis and marginalization of granulocytes were noted in the vascular lumen. Irregular staining of myocardium due to cardiomyocytes with hypereosinophilic and occasionally homogeneous cytoplasm, fragmentation and deformations of cardiac cells were revealed. Cardiomyocytic nuclei were polymorphic and irregularly stained, and perinuclear edema was observed.

Conclusions. The results of the study demonstrate the toxic effect of clozapine manifesting as progressive myocardial alteration and disordered central and peripheral circulation. However, control of bradycardia, restored skin perfusion and metabolic improvement (diagnosed by NADH fluorescence and blood acid-base status) after 24 hours may be due to the activation of compensatory mechanisms, particularly through changes in neurogenic and humoral regulation of homeostasis.

Keywords: clozapine; myocardium; hemodynamic parameters; microcirculation

Conflict of interests: the authors claim no conflict of interest.

<https://doi.org/10.15360/1813-9779-2020-5-56-64>

Введение

При остром отравлении нейролептиками токсические эффекты проявляются не только угнетением сознания и развитием других неврологических нарушений, но и нарушением функций сердечно-сосудистой системы, печени, легких [1–6]. Мишени токсического действия нейролептиков определяются не только фарма-

Introduction

In acute neuroleptic poisoning, toxic effects manifest as decreased level of consciousness and other neurological defects, as well as cardiovascular, hepatic and pulmonary dysfunction [1–6]. Targets of neuroleptic toxic effect depend not only on pharmacological properties and dose of drugs, but also on the initial condition of the patient [7]. In

кологических свойствами препаратов, их дозой, но и исходным состоянием организма [7]. При острых отравлениях клозапином с летальным исходом возможен как мозговой, так и сердечный вариант танатогенеза. Учитывая высокую вероятность летального исхода, изучение механизмов и особенностей острого отравления клозапином представляет интерес как для клиницистов, так и для судебных медиков [8]. Токсические эффекты клозапина и его метаболитов неспецифичны и включают в себя снижение уровня сознания вплоть до комы, угнетение дыхания и кровообращения [9]. Реже возникают гематологические, тромбоэмболические осложнения и злокачественный нейролептический синдром. Отдельную группу осложнений составляют клозапин-индуцированные кардиотоксические эффекты: миокардит, перикардит, кардиомиопатии, острая сердечно-сосудистая недостаточность, синдром удлиненного QT на ЭКГ с высоким риском развития жизнеугрожающих нарушений ритма [10–12]. Ранее при экспериментальном изучении токсического действия клозапина на сердечно-сосудистую систему крысы нами было показано, что через 4 часа после энтерального введения препарата выявлялись признаки нарушения кровообращения, что проявлялось артериальной гипотензией, снижением кровотока в сосудах кожи и нарушениями окислительного метаболизма в периферических тканях (изменение флуоресценции кофермента НАДН) [6]. При сравнении эффектов клозапина и его комбинации с алкоголем существенных различий не было выявлено, за исключением брадикардии в группе животных, которым клозапин вводили в изотоническом солевом растворе.

Цель исследования — оценить влияние сублетальной дозы клозапина на сердечно-сосудистую систему крыс через 24 часа после введения препарата.

Материал и методы

Эксперименты провели на 17 крысах-самцах линии Wistar массой 220–270 г. За 12 часов до эксперимента животные не получали корм, но имели доступ к воде. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [13].

Под общей ингаляционной анестезией (севофлюран 4 об% с потоком кислорода 2 л/мин в индукционной камере) энтерально через желудочный зонд вводили исследуемые растворы в объеме 10 мл/кг массы животного. В зависимости от состава вводимого раствора выделили следующие группы: животным I группы (контрольной, $n=4$) энтерально вводили 2,0 мл раствора NaCl 0,9%; животным II группы («клозапин», $n=7$) клозапин вводили энте-

acute clozapine poisoning death can be caused by either cerebral or cardiac dysfunction. Taking into account the high probability of fatal outcome, the study of the mechanisms and specific features of acute clozapine poisoning is relevant for both clinicians and forensic physicians [8]. Toxic effects of clozapine and its metabolites are nonspecific and include a decreased level of consciousness (sometimes progressing to coma), depressed respiration and blood circulation [9]. Hematological, thromboembolic complications and malignant neuroleptic syndrome are less frequent. Clozapine-induced cardiotoxic effects represent a standalone group of complications and include myocarditis, pericarditis, cardiomyopathy, acute heart failure, long QT syndrome on ECG with a high risk of life-threatening rhythm disturbances [10–12]. Previously, in the experimental study of the toxic effect of clozapine on the rat cardiovascular system, we showed that 4 hours after the enteric administration of the drug the signs of circulatory disturbance appeared, such as hypotension, reduced blood flow in the skin and abnormal oxidative metabolism in peripheral tissues (changes of NADH fluorescence) [6]. When comparing the effects of clozapine and its combination with alcohol, no significant differences were found, except for bradycardia in the group of animals who were given clozapine in normal saline.

The aim of the study was to evaluate the effect of sublethal dose of clozapine on the rat cardiovascular system 24 hours after administration.

Materials and Methods

The experiments were conducted on 17 male Wistar rats weighing 220–270 g. The animals were not fed for 12 hours before the experiment, but had access to water. The experiments were conducted in accordance with the requirements of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes [13].

Under general inhalation anesthesia (sevoflurane 4 vol.% with oxygen flow of 2 l/min in the induction chamber) the studied solutions in the volume of 10 ml/kg body weight were given enterally through the gastric tube. Depending on the specific solution, the animals were divided into the following groups: Group I (control, $n=4$) were given 2.0 ml of NaCl 0.9% solution enterally; group II («clozapine», $n=7$) were given clozapine enterally in dose of 150 mg/kg dissolved in 2.0 ml of NaCl 0.9%; group III rats («clozapine + alcohol», $n=6$) were given clozapine orally in a dose of 150 mg/kg, dissolved in 2.0 ml of 40% ethanol.

After administration, animals were transferred to a vivarium with ad libitum access to water and food (4 hours later). 24 hours later, anesthesia was carried out (sevoflurane 4 vol.% with oxygen flow of 2 L/min in induction chamber). Anesthesia was maintained with sevoflurane 1.5–2.5 vol.% via cone mask with oxygen flow of 1 L/min. In order to measure the mean blood pressure (BP) and take arterial blood samples, the left femoral artery was catheterized with a 23G polyethylene catheter. To maintain patency, the catheter was flushed with 0.2 ml so-

рально в дозе 150 мг/кг, растворенный в 2,0 мл NaCl 0,9%; крысам III группы («клозапин+алкоголь», $n=6$) клозапин вводили энтерально в дозе 150 мг/кг, растворенный в 2,0 мл 40% этилового спирта.

После введения препаратов животных переносили в виварий с доступом к воде и пище (через 4 часа). Через 24 часа проводили индукцию анестезии (севофлюран 4 об% с потоком кислорода 2 л/мин в индукционной камере). Поддержание анестезии осуществляли подачей севофлюрана 1,5–2,5 об% через конусовидную маску с потоком кислорода 1 л/мин. С целью измерения среднего артериального давления (АД) и забора проб артериальной крови катетеризировали левую бедренную артерию полиэтиленовым катетером 23G. Для поддержания проходимости катетер промывали 0,2 мл раствора нефракционированного гепарина (50 ЕД/мл) после установки и повторно при необходимости.

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

АД измеряли с помощью трансдюсера Deltran DPT-100 (Utah Medical Products, США) прибором BP-100 (CWE, Inc., США). Частоту сердечных сокращений (ЧСС) определяли по ЭКГ с применением подкожных игольчатых электродов монитора MouseMonitor S (INDUS Instruments, США). Для оценки микроциркуляции применяли метод лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ), для оценки состояния коферментов окислительного метаболизма тканей (НАДН и ФАД) — метод лазерной флуоресцентной диагностики (ЛФД). Датчик прибора ЛАЗМА МЦ (ООО НПП «ЛАЗМА», Россия) устанавливали на вентральной поверхности проксимального отдела хвоста с минимальным зазором. ЛДФ-граммы регистрировали в течение 8 минут. Анализировали среднее значение перфузии кожи (или показатель микроциркуляции — М, перфузионные единицы [пф. ед.]), среднее квадратичное отклонение амплитуды колебаний кровотока (σ , пф. ед.); коэффициент вариации перфузии (K_v , %). В последующем методом вейвлет-анализа исследовали колебания микрокровотока в диапазоне 0,01–0,4 Гц. Амплитуды колебаний кровотока в данном частотном диапазоне у крыс несут информацию о механизмах регуляции микроциркуляции: эндотелиальном (Аэ), нейрогенном (Ан) и миогенном (Ам) [14]. Также среди этих амплитуд определяли максимальный уровень колебаний микрокровотока (A_{max} , пф. ед.) и соответствующую ему частоту (F_{max} , Гц). В этот же период времени оценивали интенсивность излучения флуоресценции НАД-Н (UV — длина волны зондирующего излучения 365 нм — «ультрафиолет») и ФАД⁺ (В — длина волны зондирующего излучения 450 нм — «синий»), а также «редокс-отношение» ($PO=UV/B$).

Газовый состав, параметры кислотно-основного состояния (КОС) артериальной крови, концентрацию гемоглобина (Hb) и показатель гематокрита (Ht) определяли на анализаторе i-STAT (Эбботт Поинт оф Кеа Инк., США) с использованием картриджа с реагентом i-STAT CG8+ Cartridge.

lution of unfractionated heparin (50 BP/ml) after installation and then again if necessary.

The rats were fixed on the heated platform of the MouseMonitor S (INDUS Instruments, USA) monitor. Rectal thermometer was installed to control body temperature. The target temperature of the animal was 36.5–37°C. Before the beginning of measurements there was a stabilization period lasting for 20 min.

Blood pressure was measured using the Deltran DPT-100 transducer (Utah Medical Products, USA) with the BP-100 device (CWE, Inc., USA). Heart rate (HR) was determined by ECG using the MouseMonitor S monitor subcutaneous needle electrodes (INDUS Instruments, USA). Laser Doppler flowmetry (LDF) method was used to evaluate microcirculation, laser fluorescence diagnostics (LFD) method was used to evaluate tissue oxidative metabolism coenzymes (NADH and FAD). The sensor of the LAZMA MC device (LLC R&D enterprise LAZMA, Russia) was installed on the ventral surface of the proximal tail section with minimum clearance gap. LDF graphs were recorded during 8 minutes. We analyzed the average value of skin perfusion (or microcirculation index, M, in perfusion units [PU]), the average square deviation of the blood flow oscillation amplitude (σ , PU); perfusion variation coefficient (K_v , %). Subsequently, the wavelet analysis method was used to investigate the oscillations of micro blood flow in the range of 0.01–0.4 Hz. Amplitudes of blood flow oscillations in this frequency range in rats provide information on the mechanisms of endothelial (Ae), neurogenic (An) and myogenic (Am) regulation of microcirculation [14]. Also among these amplitudes, the maximum microcirculatory oscillations (A_{max} , PU) and its corresponding frequency (F_{max} , Hz) were determined. During the same period of time, we estimated the HAD-H fluorescence (wavelength of the probing radiation of 365 nm, «ultraviolet» [UV]) and FAD⁺ (wavelength of the probing radiation of 450 nm, «blue» [B]), as well as the «redox ratio» (UV/B).

The blood gases, acid-base status, hemoglobin (Hb) and hematocrit (Ht) levels were measured by an i-STAT analyser (Abbott Point of Kea Inc., USA) using an i-STAT CG8+ Cartridge.

After registration of the studied parameters, the animals were subjected to euthanasia by cervical dislocation under general anesthesia with sevoflurane. Internal organs were taken for morphological study. The material was fixed in 10% neutral formalin solution. After fixation the heart was dissected in the frontal plane through all sections into 2 parts, each of them containing both atria, right and left ventricles, interventricular septum. After the routine processing the heart was placed into paraffin. Paraffin sections for morphological examination were stained with hematoxylin and eosin. Histological preparations were examined using a Nikon Eclipse Ni-U microscope (Japan). Statistical data analysis was performed using the Statistica 10.0 software package. Mann–Whitney *U*-criterion was used to evaluate the significance of differences between groups. The differences were considered significant at $P \leq 0.05$. The analyzed parameters are presented as *Me* (LQ; HQ).

Results and Discussion

Twenty-four hours after administration of the drug, the studied animal groups did not differ in

Таблица 1. Системная гемодинамика и параметры микроциркуляции через 24 часа после внутрижелудочного введения растворов клозапина или раствора NaCl 0,9%, Me (LQ; HQ).

Table 1. Central hemodynamic and microcirculation parameters 24 hours after gastric administration of clozapine and 0,9% NaCl solution, Me (LQ; HQ).

Parameters	NaCl (control), <i>n</i> =4	Clozapine	
		+ NaCl, <i>n</i> =7	+ Ethanol, <i>n</i> =6
Heart rate, min ⁻¹	346 (318; 380)	353 (338; 361)	377 (338; 399)
Blood pressure, mm Hg	134.5 (127.0; 139.5)	109.5* (100.0; 110.0)	109.0* (106.0; 122.0)
Mean skin perfusion, PU	11.7 (8.6; 15.4)	12.6 (9.1; 13.2)	13.4 (10.1; 14.6)
Mean square deviation of the blood flow oscillations amplitude, PU	0.65 (0.60; 0.66)	0.68 (0.62; 0.71)	0.60 (0.58; 0.61)
Perfusion variation coefficient, PU	5.8 (4.2; 7.6)	5.5 (5.4; 5.9)	5.2 (4.4; 5.8)
Maximal amplitude of microvascular blood flow, endothelial origin, PU	0.18 (0.15; 0.19)	0.11* (0.09; 0.13)	0.10* (0.07; 0.11)
Maximal amplitude of microvascular blood flow, neurogenic origin, PU	0.17 (0.14; 0.21)	0.10* (0.10; 0.13)	0.10* (0.08; 0.11)
Maximal amplitude of microvascular blood flow, muscular origin, PU	0.18 (0.14; 0.22)	0.11* (0.09; 0.14)	0.11* (0.09; 0.13)
Maximal amplitude of microvascular blood flow ranging 0.01–0.4 Hz, PU	0.22 (0.20; 0.24)	0.14* (0.10; 0.14)	0.12* (0.10; 0.13)
Frequency corresponding to Amax, Hz	0.14 (0.05; 0.30)	0.07* (0.05; 0.17)	0.24* (0.05; 0.46)
NADH fluorescence	2.36 (1.27; 2.52)	1.22 (0.76; 1.66)	1.30 (1.18; 1.88)
FAD fluorescence*	1.86 (1.13; 2.85)	0.99 (0.96; 2.10)	1.27 (1.16; 1.40)
Redox ratio	0.76 (0.69; 0.88)	0.96 (0.76; 1.18)	1.12 (1.05; 1.47)

Note. * — $P < 0.05$ vs the control group. NADH — reduced nicotinamide adenine dinucleotide; FAD — flavin adenine dinucleotide.

Примечание. Heart rate — частота сердечных сокращений; blood pressure — АД; mean skin perfusion, PU — среднее значение перфузии кожи, пф. ед.; square deviation of the blood flow oscillations amplitude — квадратичное отклонение амплитуды колебаний кровотока; perfusion variation coefficient — коэффициент вариации перфузии; maximal amplitude of microvascular blood flow — максимальная амплитуда колебаний микрокровотока; endothelial origin — эндотелиального происхождения; neurogenic origin — нейрогенного происхождения; muscular origin — собственно миогенного происхождения; ranging — в диапазоне; frequency corresponding to — частота, соответствующая; redox ratio — редокс-отношение. NADH — никотинамидадениндинуклеотид, FAD — флавинадениндинуклеотид. * — $p \leq 0,05$ при сравнении с контрольной группой.

После регистрации исследуемых функциональных параметров животных подвергли эктаназии методом шейной дислокации под общей анестезией севофлюраном. Забирали внутренние органы для морфологического исследования. Материал фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина. После фиксации сердца пересекали во фронтальной плоскости через все отделы на 2 части, в которых содержались оба предсердия, правый и левый желудочки, межжелудочковая перегородка. После стандартной проводки сердца заливали в парафин. Парафиновые срезы для морфологического исследования окрашивали гематоксилином-эозином. Исследование гистологических препаратов проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ni-U (Япония). Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ Statistica 10.0. Для оценки достоверности различий соответствующих показателей между группами использовали критерий *U* Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$. Анализируемые величины представлены в виде: Me (LQ; HQ).

Результаты и обсуждение

Через 24 часа после введения препаратов исследуемые группы животных не различались по ЧСС, но в то же время АД в группах «клозапина» (II и III) было ниже на 19%, чем в контроле (I). Вместе с тем, несмотря на различия по уровню АД, кровотоков в сосудах кожи хвоста всех групп был одинаков (табл. 1). Также не выявили межгрупповых различий по значениям σ и K_v .

HR, but at the same time, BP in clozapine (II and III) groups was 19% lower than in control (I). Meanwhile, despite the differences in BP, the blood flow in the tail skin vessels of all groups was the same (Table 1). Also, no intergroup differences in the values of σ and K_v were found.

Spectral analysis of oscillations of local cutaneous blood flow showed that in the clozapine groups (II and III) Amax and amplitudes in all frequency ranges of active regulation of microcirculation (A_e , A_n , A_m) were lower compared to the control group. Evaluation of the oxidative metabolism using NADH and FAD+ fluorescence did not reveal any differences between the study groups (Table 1). In comparison with the control, Fmax was lower in Group II and higher in Group III, although interpretation of this parameter is difficult due to its high variability in all groups (large interquartile interval).

Twenty-four hours after the administration of drugs there were no differences in blood gases and acid-base status between groups, however in the clozapine groups (II and III) hemoglobin and hematocrit were lower than in the control group (Table 2).

On histological examination of rat hearts in the groups II and III we found congested venules, diapedetic hemorrhages, perivascular and interstitial edema (Fig. 1, 2). Vascular lumen showed signs of blood stasis (loss of hemoglobin from red blood

Таблица 2. Параметры КОС и газового состава артериальной крови через 24 часа после внутрижелудочного введения растворов клозапина или раствора NaCl 0,9%, Me (LQ; HQ).**Table 2. Blood gases and acid-base status 24 hours after gastric administration of clozapine or 0,9% NaCl solutions, Me (LQ; HQ).**

Parameters	NaCl (control), <i>n</i> =4	Clozapine	
		+ NaCl, <i>n</i> =7	+ Ethanol, <i>n</i> =6
pH	7.42 (7.41; 7.43)	7.41 (7.37; 7.44)	7.44 (7.39; 7.44)
pCO ₂ , mm Hg	45.0 (43.0; 48.5)	52.0 (46.0; 64.0)	51.0 (48.0; 53.0)
pO ₂ , mm Hg	478 (472; 508)	490 (479; 528)	484 (349; 486)
SO ₂ , %	100 (100; 100)	100 (100; 100)	100 (100; 100)
HCO ₃ ⁻ , mmol/l	30.0 (28.2; 31.9)	33.8 (31.2; 35.7)	32.0 (31.9; 32.8)
BE, mmol/l	5.0 (3.5; 6.5)	6.0 (6.0; 9.0)	6.0 (6.0; 8.0)
Na, mmol/l	141 (141; 142)	143 (141; 145)	143 (142; 144)
K, mmol/l	4.03 (4.0; 4.35)	4.0 (3.8; 4.3)	3.9 (3.8; 4.1)
Ca, mmol/l	1.375 (1.36; 1.38)	1.39 (1.36; 1.42)	1.32 (1.26; 1.35)
Glucose, mmol/l	7.8 (6.2; 9.2)	7.4 (6.9; 8.3)	7.8 (7.2; 8.2)
Hemoglobin, g/l	136.0 (134.5; 137.5)	122.0* (119.0; 133.0)	126.0* (126.0; 126)
Hematocrit, %	40.0 (39.5; 40.5)	36.0* (35.0; 39.0)	37.0* (37.0; 37.0)

Note. * — $P < 0.05$ vs the control group.

Примечание. * — $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.

Спектральный анализ колебаний локального кожного кровотока показал, что в группах «клозапина» (II и III) Амах и амплитуды во всех частотных диапазонах активной регуляции микроциркуляции (Аэ, Ан, Ам) были меньше по сравнению с группой контроля. Оценка уровня окислительного метаболизма по величинам флуоресценции НАД-Н и ФАД⁺ не выявила различий между исследуемыми группами (табл. 1). По сравнению с контролем Fmax была ниже в группе II и выше в группе III, хотя интерпретация этого показателя затруднена ввиду его высокой вариабельности во всех группах (большой межквартильный интервал).

cells, plasma separation), as well as marginalization of granulocytes. Irregular myocardial staining due to cardiomyocytes with hypereosinophilic and occasionally homogeneous cytoplasm, fragmentations and deformations of cardiomyocytes were revealed. Cardiomyocyte nuclei were polymorphic with irregular staining, and perinuclear edema was observed.

Comparing the effects of clozapine that occurred 4 hours after its administration [6] with the results of this study (24 hours), we note the following:

1. Both in 4 hours and 24 hours after clozapine administration in animals (groups II and III), moderate hypotension was found. On Day 1 animals of group II had bradycardia, which resolved on the second day.

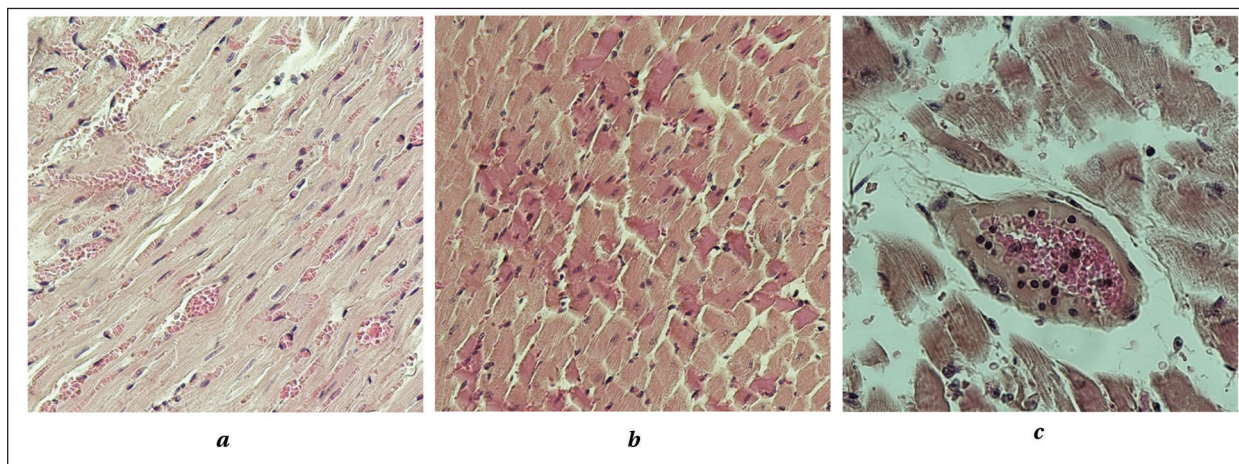


Рис. 1. Гистологические препараты сердца крысы через 24 часа после введения клозапина с этанолом.

Fig. 1. Histological preparations of rat heart 24 hours after administration of clozapine with ethanol.

Note. Staining with hematoxylin and eosin. Magnification, $\times 400$. *a* — congested venules and capillaries, perivascular edema, perinuclear edema; *b* — eosinophilia and homogenization of cardiomyocytes cytoplasm, their fragmentation. Cellular response (clusters of leukocytes around eosinophilic cardiomyocytes); *c* — marginalization of leukocytes in an arteriole. Magnification, $\times 600$.

Примечание. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$. *a* — полнокровие венул и капилляров, периваскулярный отек, перинуклеарный отек; *b* — эозинофилия и гомогенизация цитоплазмы кардиомиоцитов, их фрагментация. Клеточная реакция (небольшие скопления лейкоцитов вокруг эозинофильных кардиомиоцитов); *c* — краевое стояние лейкоцитов в артериоле, ув. $\times 600$.

Животные всех групп через 24 часа после введения препаратов не различались между собой по основным показателям газового состава и КОС артериальной крови, но в группах «клозапина» (II и III) концентрация гемоглобина и показатель гематокрита были ниже, чем в контрольной группе (табл. 2).

При исследовании гистологических препаратов сердец крыс в группах II и III выявили полнокровные венулы, диапедезные кровоизлияния, периваскулярный, интерстициальный отек (рис. 1, 2). В просветах сосудов отмечали признаки стаза крови (потеря эритроцитами гемоглобина, сепарация плазмы), а также краевое стояние гранулоцитов. Выявили неравномерную окраску миокарда за счет кардиомиоцитов с гиперэозинофильной и местами гомогенной цитоплазмой; участки фрагментации и деформации кардиомиоцитов. Ядра кардиомиоцитов были полиморфны и неравномерно окрашены, отмечали перинуклеарный отек.

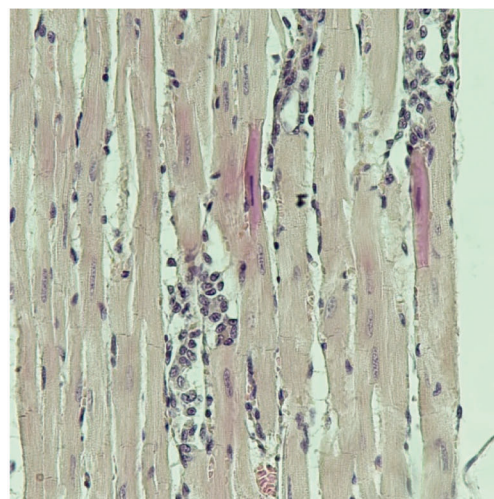
Сопоставляя эффекты клозапина, возникавшие через 4 часа после его введения [6] с результатами настоящего исследования (24 часа), можно отметить следующие особенности:

1. Как через 4 часа, так и через 24 ч у животных, которым вводили клозапин (II и III группы), выявляли умеренную артериальную гипотензию. В первые сутки для животных группы II была характерна брадикардия, которую не регистрировали на вторые сутки.

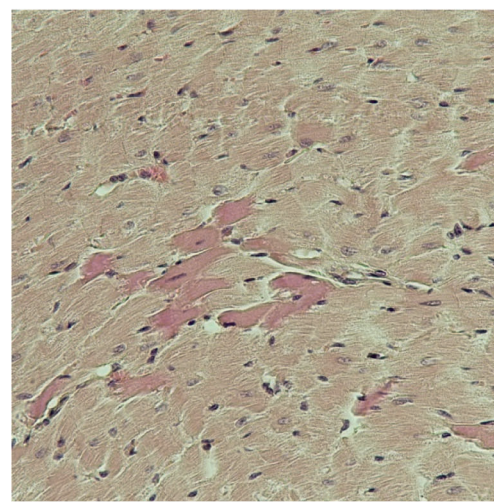
2. Через 4 часа в группах II и III отмечали гипоперфузию кожи, но через 24 часа кожный кровоток у животных этих групп уже не отличался от значений в контрольной группе. Однако к концу первых суток в группах клозапина происходило снижение амплитуд колебаний кровотока в микрососудах кожи (Аmax, Аэ, Аn, Ам), чего не наблюдали в первые сутки.

3. Через 4 часа в коже отмечали увеличение интенсивности флуоресценции кофермента НАДН в группах с введением клозапина. Через 24 часа значения этого показателя не отличались от контрольных значений.

4. Морфологические изменения в сердце через 24 часа после введения сублетальной дозы клозапина, также как и через 4 часа, заключались в появлении признаков нарушения кровообращения (полнокровие сосудов микроциркуляторного русла, диапедезные кровоизлияния, периваскулярный и интерстициальный отек) и альтерации кардиомиоцитов (эозинофилия и гомогенизация цитоплазмы кардиомиоцитов, а также их фрагментация). Обращает на себя внимание тот факт, что при исследовании гистологических препаратов сердец крыс, выведенных из эксперимента через 4 часа после введения токсикантов, не



a



b

Рис. 2. Гистологические препараты сердца крысы через 24 часа после введения клозапина.

Fig. 2. Histological preparations of rat heart 24 hours after clozapine administration.

Note. Staining with hematoxylin and eosin. Magnification, $\times 400$. *a* — cardiomyocyte alteration with cellular response; *b* — eosinophilia and homogenization of cardiomyocyte cytoplasm.

Примечание. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$. *a* — альтерация кардиомиоцитов с клеточной реакцией; *b* — эозинофилия и гомогенизация цитоплазмы кардиомиоцитов.

2. After 4 hours in groups II and III hypoperfusion of the skin was observed, but after 24 hours the skin blood flow parameters in animals of these groups did not differ from the values in the control group. However, by the end of the first day in clozapine groups there was a decrease in amplitudes of blood flow oscillations in microvascular system of skin (Amax, Ae, An, Am), which was not registered during the first day.

3. After 4 hours, an increase in the NADH fluorescence was seen in the clozapine groups. After 24 hours, the values of this parameter did not differ from the control ones.

выявили гомогенизации цитоплазмы и клеточной реакции. Полученные результаты свидетельствуют о прогрессировании процессов альтерации миокарда через 24 часа после токсического воздействия.

Снижение амплитудных характеристик колебаний кожного кровотока в группах «клозапина» к концу первых суток свидетельствует о снижении активности основных факторов регуляции тонуса микрососудов и микроциркуляции [15]. Такое снижение амплитуд колебаний кровотока после введения клозапина при одинаковых значениях кожной перфузии во всех группах, возможно, связано с отсроченным угнетающим влиянием клозапина на вазомоции/флаксмоции, как это было отмечено в работах с оценкой сосудистых эффектов анестетиков [16, 17]. Севофлюран использовали в нашем исследовании краткосрочно и в одинаковых концентрациях во всех группах животных. С учетом минимального влияния стандартных доз этого анестетика на параметры центральной и регионарной гемодинамики [18] маловероятно, чтобы выявленные нами гемодинамические изменения были обусловлены эффектами севофлюрана. Одинаковая направленность и выраженность изменений в группах животных с введением клозапина и комбинации клозапина с алкоголем свидетельствует о том, что клозапин является основным этиологическим фактором развивающихся в организме патологических процессов.

Заключение

Приведенные данные указывают на то, что через 24 часа токсическое действие клозапина проявляется прогрессированием альтерации миокарда и нарушений параметров кровообращения (артериальная гипотензия, угнетение механизмов регуляции периферического кровотока, умеренная анемия). Тем не менее, нормализация ЧСС, восстановление кожной перфузии и нивелирование метаболических нарушений (флуоресценция НАДН, КОС артериальной крови) через 24 часа могут быть обусловлены активацией механизмов компенсации нарушенных функций, в частности за счет изменения нейрогенной и гуморальной регуляции параметров гомеостаза, что подтверждается 100% выживаемостью животных.

Благодарность. Авторы искренне признательны д. м. н., профессору А. М. Голубеву и д. м. н., профессору В. Т. Долгих (НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР) за помощь в написании статьи и сделанные ценные замечания.

4. Morphological changes in the myocardium 24 hours after the administration of a sublethal dose of clozapine, as well as in 4 hours, included signs of disturbed circulation (congestion of microcirculatory blood vessels, diapedetic hemorrhage, perivascular and interstitial edema) and altered cardiac myocytes (eosinophilia and homogenization of cardiomyocyte cytoplasm and their fragmentation). Noteworthy is the fact that histological examination of myocardial samples from rats withdrawn from the experiment 4 hours after the administration of toxicants did not reveal homogenization of cytoplasm and cellular response. The obtained results demonstrate the progression of myocardial alteration 24 hours after toxic exposure.

Reduced amplitude of oscillations in skin blood flow in the clozapine groups by the end of the first day suggests a decrease in the activity of the main regulatory factors of the microvascular tone and microcirculation [15]. Such a decrease in the amplitude of blood flow oscillations after clozapine administration with similar values of skin perfusion in all groups may be due to the delayed depressant effect of clozapine on vasomotions/fluxmotions, as it was pointed out in studies of vascular effects of anesthetics [16, 17]. Sevoflurane was used in our study for a short time and in equal concentrations in all animal groups. Taking into account the minimal effect of standard doses of this anesthetic on the central and regional hemodynamic parameters [18], it is unlikely that the hemodynamic changes we found were due to sevoflurane effects. The same direction and severity of changes in groups of animals who were administered clozapine and combination of clozapine and ethanol suggests that clozapine is the main etiological factor of developing pathological processes.

Conclusion

Our data demonstrate that after 24 hours, the toxic effect of clozapine manifests as progressive myocardial alteration and circulatory disorders (hypotension, depressed peripheral blood flow regulation, moderate anemia). However, the normalization of HR, restoration of skin perfusion and control of metabolic disorders (monitored by NADH fluorescence and blood acid-base status) after 24 hours may be due to the activation of compensatory mechanisms, in particular secondary to changes in neurogenic and humoral regulation of homeostasis parameters, which is confirmed by 100% animal survival.

Acknowledgements. The authors sincerely appreciate the help of Doctor of Medical Sciences, Professor A. M. Golubev and Doctor of Medical Sciences, Professor V. T. Dolgikh (V. A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology) in preparing the paper and valuable comments.

Литература

- Zarghami M., Hoseini S. D., Kazemi A., Elyasi F. Concurrent Hepatotoxicity and Neutropenia Induced by Clozapine. *Arch. Iran Med.* 2020; 23 (2): 141–143. PMID: 31545088 DOI: 10.1177/1039856219848824.
- Takács A., Sollychyn M., Thomas N., Connally E., Pantelis Ch. Clozapine Rechallenge in a Patient with Clozapine-Induced Hepatitis. *Australas Psychiatry.* 2019; 27 (5): 535. PMID: 31545088. DOI: 10.1177/1039856219848824.
- Brown C. A., Telio S., Warnock C. A., Wong A. H. C. Clozapine Toxicity and Hepatitis. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2013; 33 (4): 570–571. PMID: 23764687. DOI: 10.1097/JCP.0b013e3182946586.
- Романова О.Л., Сундуков Д.В., Голубев А.М., Благодаров М.Л., Голубев М.А. Характеристика общепатологических процессов в легких при отравлении клозапином. *Общая реаниматология.* 2017; 13 (4): 22–29. DOI:10.15360/1813-9779-2017-4-22-29.
- Howell S., Yarovova E., Khwanda A., Rosen St. D. Cardiovascular Effects of Psychotic Illnesses and Antipsychotic Therapy. *Heart.* 2019; 105 (24): 1852–1859. PMID: 31439658. DOI: 10.1136/heartjnl-2017-312107.
- Бабкина А.С., Рыжков И.А., Антонова В.В., Цоколаева З.И., Асанов А.Р., Калабушев С.Н., Заржецкий Ю.В. Морфологические и функциональные изменения сердечно-сосудистой системы при остром отравлении клозапином (экспериментальное исследование). *Общая реаниматология.* 2019; 15 (4): 67–75. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-4-67-75.
- Barile F.A. Barile's Clinical Toxicology: Principles and Mechanisms. 3 ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2019.
- Шигеев С.В., Иванова Н.А., Иванов С.В. Отравления клозапином: теоретические аспекты и судебно-медицинская оценка. *Судебно-медицинская экспертиза.* 2013; 6: 41–46.
- Слюндин Д.Г., Ливанов А.С., Анучин В.В., Бобринская И.Г., Гутова Е.В. Криминальные отравления клозапином. *Анестезиология и реаниматология.* 2007; 4: 61–64. PMID:17929492.
- 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.
- Kanniah G., Kumar Sh. Clozapine Associated Cardiotoxicity: Issues, Challenges and Way Forward. *Asian J. Psychiatr.* 2020; 50: 101950. DOI: 10.1016/j.ajp.2020.101950.
- Abdel-Wahab B.A., Metwally M.E. Clozapine-induced cardiotoxicity: role of oxidative stress, tumour necrosis factor alpha and NF- κ B. *Cardiovasc. Toxicol.* 2015; 15 (4): 355–365. DOI: 10.1007/s12012-0149304-9. PMID: 25539628.
- Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Санкт-Петербург: Rus-LASA НП «Объединение специалистов по работе с лабораторными животными» Рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы; 2012: 48.
- Рыжков И.А., Заржецкий Ю.В., Новодержкина И.С. Сравнительные аспекты регуляции кожной и мозговой микроциркуляции при острой кровопотере. *Общая реаниматология.* 2017; 13 (6): 18–27. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-6-18-27.
- Крупаткин А.И. Значение колебательных процессов в диагностике состояния микроциркуляторно-тканевых систем. *Физиология человека.* 2018; 44 (5): 103–114.
- Colantuoni A., Bertuglia S., Intaglietta M. Effects of anesthesia on the spontaneous activity of the microvasculature. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1984; 3 (1): 13–28. PMID: 6480227.
- Aalkjær C., Boedtker D., Matchkov V. Vasomotion — what is currently thought? *Acta Physiol (Oxf).* 2011; 202 (3): 253–269. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2011.02320.x. PMID: 21518271.
- Лихванцев В.В., Скрипкин Ю.В., Ильин Ю.В., Гребенчиков О.А., Шапошников Б.А., МIRONENKO A.B. Механизмы действия и основные эффекты галогенсодержащих анестетиков. *Вестник интенсивной терапии.* 2013; 3: 44–51.

Поступила 25.03.20

References

- Zarghami M., Hoseini S. D., Kazemi A., Elyasi F. Concurrent Hepatotoxicity and Neutropenia Induced by Clozapine. *Arch. Iran Med.* 2020; 23 (2): 141–143. PMID: 31545088. DOI: 10.1177/1039856219848824.
- Takács A., Sollychyn M., Thomas N., Connally E., Pantelis Ch. Clozapine Rechallenge in a Patient with Clozapine-Induced Hepatitis. *Australas Psychiatry.* 2019; 27 (5): 535 PMID: 31545088. DOI: 10.1177/1039856219848824.
- Brown C. A., Telio S., Warnock C. A., Wong A. H. C. Clozapine Toxicity and Hepatitis. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2013; 33 (4): 570–571. PMID: 23764687. DOI: 10.1097/JCP.0b013e3182946586.
- Romanova O.L., Sundukov D.V., Golubev A.M., Blagonravov M.L., Golubev M.A. Characteristics of General Pathological Processes in the Lungs Following Clozapine Poisoning. *General Reanimatology=Obshchaya Reanimatologiya.* 2017; 13 (4): 22–29. DOI:10.15360/1813-9779-2017-4-22-29. [In Russ.].
- Howell S., Yarovova E., Khwanda A., Rosen St. D. Cardiovascular Effects of Psychotic Illnesses and Antipsychotic Therapy. *Heart.* 2019; 105 (24): 1852–1859. PMID: 31439658. DOI: 10.1136/heartjnl-2017-312107.
- Babkina A.S., Ryzhkov I.A., Antonova V.V., Tsokolaeva Z.I., Asanov A.R., Kalabushev S.N., Zarzhetsky Yu. V. Morphological and Functional Alterations of the Cardiovascular System during Acute Clozapine Poisoning (Experimental Study). *General Reanimatology=Obshchaya Reanimatologiya.* 2019; 15 (4): 67–75. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-4-67-75. [In Russ.].
- Barile F.A. Barile's Clinical Toxicology: Principles and Mechanisms. 3 ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2019.
- Shigeev S.V., Ivanova N.A., Ivanov S.V. Clozapine poisoning: theoretical aspects and forensic-medical evaluation. *Sudebno-meditsinskaya expertisa.* 2013; 56 (6): 41–46. [In Russ.].
- Slyundin D.G., Livanov A.S., Anuchin V.V., Bobrinskaya I.G., Gutova E.V. Criminal clozapine poisoning. *Anestesiolog. i reanimatol.* 2007; 4: 61–64. PMID:17929492. [In Russ.].
- 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. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-2-35-45. [In Russ.].
- Kanniah G., Kumar Sh. Clozapine Associated Cardiotoxicity: Issues, Challenges and Way Forward. *Asian J. Psychiatr.* 2020; 50: 101950. DOI: 10.1016/j.ajp.2020.101950.
- Abdel-Wahab B.A., Metwally M.E. Clozapine-induced cardiotoxicity: role of oxidative stress, tumour necrosis factor alpha and NF- κ B. *Cardiovasc. Toxicol.* 2015; 15 (4): 355–365. DOI: 10.1007/s12012-0149304-9. PMID: 25539628.
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes. Saint Petersburg: Rus-LASA NP «Association of specialists in working with laboratory animals» working group on translations and publication of thematic literature; 2012: 48. [In Russ.].
- Ryzhkov I.A., Zarzhetsky Yu.V., Novoderzhkina I.S. Comparative Aspects of the Regulation of Cutaneous and Cerebral Microcirculation During Acute Blood Loss. *General Reanimatology=Obshchaya Reanimatologiya.* 2017; 13 (6): 18–27. DOI:10.15360/1813-9779-2017-6-18-27. [In Russ.].
- Krupatkin A.I. Oscillatory processes in the diagnosis of the state of microvascular-tissue systems. *Physiologiya cheloveka.* 2018; 44 (5): 103 [In Russ.] 114. DOI: 10.1134/S0131164618050077.
- Colantuoni A., Bertuglia S., Intaglietta M. Effects of anesthesia on the spontaneous activity of the microvasculature. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1984; 3 (1): 13–28. PMID: 6480227.
- Aalkjær C., Boedtker D., Matchkov V. Vasomotion — what is currently thought? *Acta Physiol (Oxf).* 2011; 202 (3): 253–269. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2011.02320.x. PMID: 21518271.
- Likhvantsev V.V., Skripkin Yu. V., Ilyin Yu. V., Grebenchikov O. A., Shaposhnikov B. A., Mironenko A.V. Mechanisms of action and main effects of halogen-containing anesthetics. *Vestnik intensivnoj terapii.* 2013; 3: 44–51.

Received 25.03.20