

# Мониторинг концентрации клозапина и норклозапина при терапии шизофрении

Н.В. Баймеева<sup>1</sup>, Л.М. Красных<sup>1</sup>, В.Г. Каледя<sup>1</sup>, Е.Р. Николаева<sup>1</sup>, С.А.Иванова<sup>2</sup>, И.И. Мирошниченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»

<sup>2</sup> НИИ психического здоровья Томского НИМЦ

## РЕЗЮМЕ.

В статье обсуждаются данные терапевтического лекарственного мониторинга клозапина, полученные у 37 пациентов (всего 98 образцов) с различными формами шизофрении, проходящих лечение в условиях стационара. Установлен тип зависимости между концентрацией клозапина, его метаболита норклозапина и дозой препарата.

**Материалы и методы.** Для количественного определения клозапина и норклозапина в крови применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Мониторинг с последующим анализом данных сопровождался необходимой клинической информацией в виде специальных форм запроса – карт мониторинга.

**Результаты и обсуждение.** Полученные данные уровня концентрации распределились следующим образом: 16 % находились в терапевтическом, 51 % – в субтерапевтическом (< 350 нг/мл) и 29 % – в условно токсическом диапазоне (> 600 нг/мл), частота случаев предполагаемой некомплаентности не превышала 3 % при назначении клозапина в дозах от 25 до 350 мг/сут. Средние значения концентрации клозапина и норклозапина были выше у некурящих пациентов по сравнению с курильщиками.

**Выводы.** Распределение по концентрациям для клозапина и норклозапина имеет в основном нормальный характер с небольшой асимметрией в сторону высоких значений. Терапевтический лекарственный мониторинг является необходимым инструментом для индивидуализации и персонализации фармакотерапии при лечении шизофрении.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** шизофрения, терапевтический лекарственный мониторинг, высокоэффективная жидкостная хроматография, тандемная хроматомасс-спектрометрия, клозапин, норклозапин.

**КОНТАКТ:** baymееva\_n@mail.ru

## Введение

Клозапин (КЛЗ) является трициклическим производным дибензодиазепина: 8-хлор-11-(4-метил-1-пиперазинил)-5H-дибензо-[b, e] [1,4]-дiazепин. По фармакологическому действию КЛЗ относится к атипичным антипсихотикам. Основным показанием к применению КЛЗ является резистентная шизофрения [1]. Препарат эффективен у пациентов, резистентных к другим антипсихотическим средствам, он почти не вызывает экстрапирамидальных эффектов,

поздней дискинезии и мало влияет на секрецию пролактина [2]. Вследствие способности вызывать агранулоцитоз – опасное для жизни состояние, которое чаще наступает в первые три месяца лечения, – применение КЛЗ ограничено [3].

Терапевтический диапазон концентраций КЛЗ в плазме крови 350–600 нг/мл [4]. Фармакокинетические параметры КЛЗ имеют большие индивидуальные колебания, которые зависят от возраста, пола и пристрастия к курению табака (табл. 1). КЛЗ в значительной степени метаболизируется в пе-

Таблица 1. Значения параметров фармакокинетики и дозирования клозапина [3]

Параметр	Значение
Лекарственная форма	Таблетки 25 и 100 мг
Дозирование	12,5 мг с постепенным увеличением до 25–100 мг в неделю, затем 300–400 мг в день
Терапевтическая концентрация	350–600 нг/мл
Максимальная концентрация в плазме $C_{max}$	0,14 мг/мл; от 0,07 до 0,34 мг/мл через 1,5 ч (после перорального приема 100 мг)
Максимальная суточная доза	900 мг/сут
Биодоступность	55 ± 12 % (пероральный прием)
Биотрансформация	Выраженный эффект первого прохождения через печень
Экскреция	80 % как метаболиты (50 % с мочой, 30 % с калом)
Связывание с белками плазмы	95 %
Объем распределения	В среднем 5 л/кг
Период полувыведения	4,5–7,5 ч
Клиренс	6,1 ± 1,6 (мл/мин)/кг

чени, только 2–4 % принятой дозы препарата выводятся с мочой в неизменном виде. Основным продуктом окислительного дезалкилирования является *N*-десметильное производное – норклозапин (НКЛЗ), обладающее слабой фармакологической активностью [5]. Реакция катализируется ферментами системы цитохрома P450: CYP1A2 и CYP3A4. В дальнейшем гидроксилированные метаболиты выводятся с мочой в виде конъюгатов.

Измерение концентрации метаболита является необходимым условием при назначении пролекарств [6] или препаратов, при метаболизме которых образуется продукт, обладающий значительной терапевтической активностью [7]. Определение содержания *N*-деметилклозапина (НКЛЗ) может дать полезную информацию относительно побочных реакций КЛЗ.

Отношение концентрации КЛЗ/НКЛЗ в плазме крови может возрастать при одновременном приеме пациентом препаратов, ингибирующих систему цитохрома P450, таких как циметидин и флувоксамин [8].

Целью данного исследования является анализ данных проведенного рутинного терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) концентрации КЛЗ и его метаболита в сыворотке крови больных шизофренией различной степени тяжести, находящихся в условиях стационара.

## Материалы и методы

Терапевтический лекарственный мониторинг КЛЗ проводили у 37 пациентов (33 мужчины и 4 женщины,  $27,6 \pm 6,6$  лет, вес  $78,8 \pm 14,3$  кг), страдающих шизофренией и находившихся на стационарном лечении, по достижении у них периода стационарной концентрации препарата при средней дозе КЛЗ в  $129 \pm 72$  мг.

Во время исследования пациенты подвергались тщательному врачебному контролю с проведением соответствующих лабораторных анализов. На каждого пациента была составлена индивидуальная карта обследования, в которой отмечали демографические показатели, данные лабораторных анализов, сопутствующие побочные явления и терапию.

Пробы отбирали за 20–25 минут до очередного приема препарата в вакуумные пробирки для забора крови с активатором образования сгустка в объеме 5 мл. Кровь центрифугировали в вакуумных пробирках, сыворотку отбирали в полипропиленовые пробирки и до анализа хранили при температуре  $-20$  °С.

Для количественного определения КЛЗ в сыворотке крови взяли за основу валидированный метод в сочетании с тандемным масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ/МС/МС) [9].

**Подготовка проб.** В образцы сыворотки крови объемом 500 мкл добавляли 50 мкл раствора анастразола как внутреннего стандарта  $C = 2500$  нг/мл, в образцах концентрация составляла 250 нг/мл. К калибровочным образцам и образцам контроля качества добавляли 50 мкл стандартного раствора соответствующей концентрации. Для подщелачивания образцов применяли 1,5М NaOH в количестве 25 мкл.

Экстракцию проводили метил-третбутиловым эфиром в количестве 2 мл, затем образцы помещали на горизонтальный встряхиватель и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Экстракт упаривали в токе азота при температуре 40 °С. Сухой остаток растворяли в 250 мкл подвижной фазы. Аликвоту объемом 5 мкл инжестировали в хроматограф.

Для детектирования использовали масс-спектрометрический детектор с тройным квадруполом. Применяли источник со смешанным типом ионизации, сочетающий ионизацию электроспреем и химическую ионизацию при атмосферном давлении. Фиксировались следующие MRM-переходы (MRM – мониторинг множественных реакций): клозапин  $327,0 \rightarrow 270$  норклозапин –  $313,2 \rightarrow 192,1$ ,  $294,2 \rightarrow 225,1$  анастразол.

Колонка – Zorbax Eclipse, размер частиц 5 мкм,  $12,5 \times 4,6$  мм (Agilent, США). Элюент А представлял собой 0,2 % раствор муравьиной кислоты в воде, элюент В – 0,2 % раствор муравьиной кислоты в метаноле. Насос работал в градиентном режиме, скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Время удерживания аналитов было следующим: КЛЗ –  $5,59 \pm 0,02$  мин, НКЛЗ –  $5,27 \pm 0,02$  мин, анастразол –  $6,08 \pm 0,02$  мин.

Предел количественного обнаружения как КЛЗ, так и НКЛЗ составил 0,5 нг/мл.

## Результаты

Всего было измерено 98 образцов (табл. 2). Полученные значения стационарной концентрации препарата в сыворотке крови распределились следующим образом: 16 % находились в терапевтическом, 52 % – в субтерапевтическом ( $< 350$  нг/мл) и 29 % – в условно токсическом диапазоне ( $> 600$  нг/мл) при назначении клозапина в дозах от 25 до 350 мг в день, 3 % приходилось на случаи предполагаемой некомплаентности (в сыворотке крови пациента не обнаруживалось ни препарата, ни метаболита).

**Таблица 2.** Средние значения концентрации КЛЗ и норклозапина НКЛЗ, нг/мл

Диапазон	N	КЛЗ (нг/мл)	НКЛЗ (нг/мл)	Сумма концентраций (КЛЗ+ НКЛЗ)	Распределение (%)
Н	15	$442,4 \pm 67,8$	$111,9 \pm 78,3$	$554,3 \pm 119,4$	16
М	55	$144,1 \pm 107,9$	$43,2 \pm 38,1$	$187,3 \pm 137,8$	52
Т	28	$1019,1 \pm 388,6$	$165,2 \pm 116,8$	$1184,2 \pm 459,4$	29

*Примечание.* Н – в пределах терапевтического коридора (350–600 нг/мл); М – менее 350; Т – более 600 нг/мл.

На рис. 1 представлен график рассеяния зависимости минимальной стационарной концентрации КЛЗ и НКЛЗ от суточной дозы препарата.

В результате статистического анализа была выявлена достаточно значимая корреляционная зависимость между  $C$  (минимальной концентрацией) и дозой клозапина:

$$C_{\text{КЛЗ}} = -63,9 + 3,27D; K = 0,57; P = 0,0017;$$

$$C_{\text{НКЛЗ}} = 5,4 + 0,71D; K = 0,58; P = 0,0016.$$

В дальнейшем для анализа межиндивидуальных различий мы использовали такой взвешенный показатель, как концентрация, нормированная относительно дозы ( $C/D$ ). Как видно на рис. 2 и 3, достаточно информативную картину дает диаграмма частот распределения. Установлено, что данное распределение имеет ассиметричный характер. В случае как клозапина, так и метаболита распределение сдвинуто в сторону высоких значений.

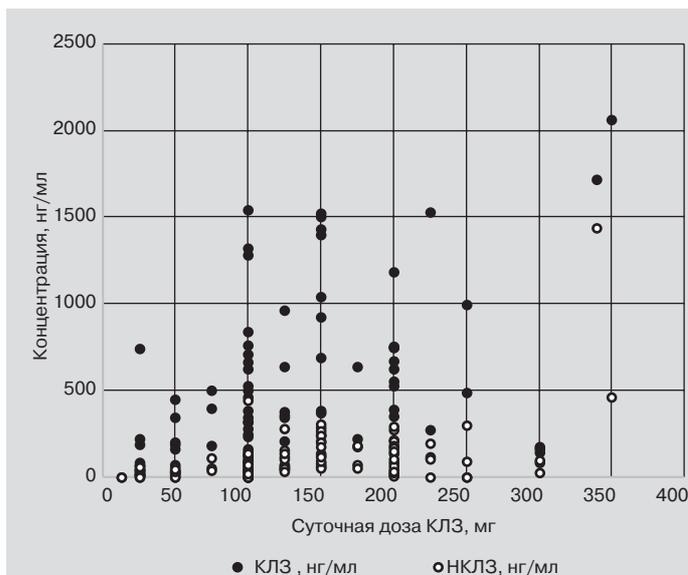
Межиндивидуальная вариабельность может быть частично объяснена влиянием на фармакокинетику таких демографических и физиологических факторов (ковариат), как пол, возраст, раса, пристрастие к курению, состояние почечной и печеночной функции и т. д. При проведении ТЛМ учитываются как фиксированные воздействия (дозы, ковариаты, популяционные параметры), так и случайные величины (интраиндивидуальная изменчивость).

Влияния на фармакокинетику КЛЗ таких параметров, как вес, возраст и пол пациента, нами выявлено не было. Возможно, сказывается то обстоятельство, что исследованная популяция довольно однородна и состоит (за редким исключением) из молодых мужчин репродуктивного возраста.

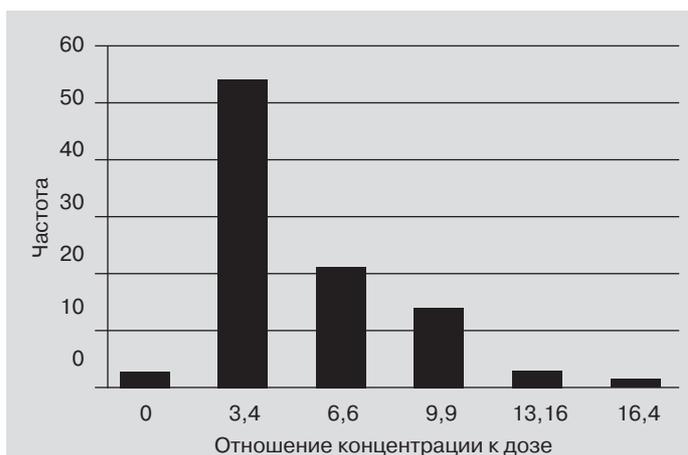
В то же время фактор курения должен быть принят во внимание. Обнаружено снижение концентрации клозапина и его метаболита у курильщиков (248 и 84 нг/мл соответственно) по сравнению с некурящими субъектами (399 и 112 нг/мл соответственно).

Установлено, что НКЛЗ проявляет психофармакологическую активность в экспериментах *in vitro*, однако активность *in vivo* не доказана. Тем не менее отношение концентрации препарата к уровню метаболита (показатель, обратный обороту лекарственного средства, или индекс метаболизма) является полезным показателем эффективности проводимой терапии [10]. Оценка этого параметра позволяет избежать передозировки, отслеживать регулярность приема и переносимость препарата и, наконец, установить характер метаболической активности CYP1A2. Как видно из представленных на рис. 4 данных, в исследованной нами выборке концентрация КЛЗ в основном превосходит концентрацию метаболита в 3 раза (значение медианы 3,05).

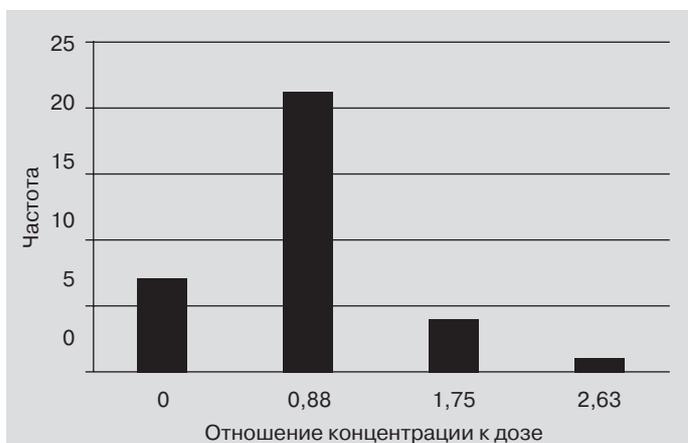
У одного из пациентов уже в начальной стадии при назначении небольшой дозы КЛЗ 25 мг в сутки концентрация препарата достигала 964 нг/мл, в то же время концентрация НКЛЗ составляла всего 49 нг/мл, что приводило к значениям уровня метаболизма КЛЗ/НКЛЗ порядка 20. Кровь данного пациента была направлена на процедуру генотипирования [11], в результате которой был выявлен мононуклеотидный полиморфизм (CC) гена, кодирующего активность изофермента CYP1A2: CYP1A2 \*1F (163C>A) rs762551.



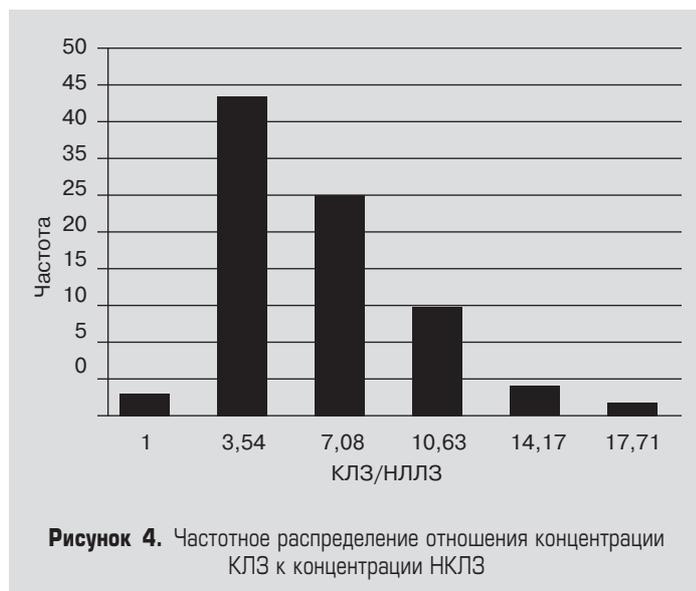
**Рисунок 1.** Стационарные концентрации КЛЗ и его метаболита НКЛЗ после приема препарата в диапазоне доз 25–300 мг



**Рисунок 2.** Частотное распределение концентрации КЛЗ, нормированной относительно дозы



**Рисунок 3.** Частотное распределение концентрации НКЛЗ, нормированной относительно дозы



Носители генотипа AA являются «быстрыми» метаболизерами КЛЗ, а носителей генотипов AC и в особенности гомозигот CC – «медленными» метаболизерами КЛЗ. Таким образом, высокие значения концентрации КЛЗ у данного пациента объясняются особенностями фармакогенетики его печеночного метаболизма.

## Обсуждение

Результаты, полученные в ходе проведения рутинной процедуры ТЛМ КЛЗ и его слабоактивного метаболита, говорят о распределении концентраций, близком к нормальному. Подобным образом данные ТЛМ могут экстраполироваться на популяцию европейской территории России; такое распределение по КЛЗ, НКЛЗ и отношению КЛЗ/НКЛЗ будет характерным для большого числа пациентов, также эти

входные данные могут быть использованы для дальнейшего моделирования, в том числе и в популяционной фармакокинетики.

Генетическая составляющая при индивидуализации фармакотерапии также должна быть учтена, несмотря на то что процедура генотипирования не является рутинной и может стать дорогой необходимостью как для пациента, так и для клиники. Однако экономические затраты можно оправдать тем, что результаты процедуры будут востребованы на протяжении всей жизни пациента. Как показала практика, после процедуры генотипирования пациенту гораздо легче подобрать препарат и индивидуальную дозировку антипсихотиков.

Отечественный опыт определения концентрации КЛЗ и НКЛЗ в крови пациента с различными целями [12], а также поиск прогностических составляющих эффективности и индивидуализации фармакотерапии [13] говорят об эффективной работе в данном направлении. Определение отношения НКЛЗ/КЛЗ и обратного отношения КЛЗ/НКЛЗ (индекс метаболизма) можно рассматривать как предиктор оценки метаболизма препарата и ферментной активности.

В заключение отметим, что непредвиденные реакции пациента на препарат, клиническая нестабильность, а также лекарственное взаимодействие позволяют сделать вывод, что применение ТЛМ является адекватным средством индивидуализации дозирования и повышения эффективности антипсихотической терапии КЛЗ. Кроме того, ТЛМ служит единственным средством обнаружения некомплектности пациента, поскольку субъективными оценками данный факт обнаружить сложно, а отсутствие в сыворотке крови пациента лекарственного средства позволяет объективно зафиксировать нарушение терапевтического режима. Мониторинг концентрации препарата в крови на всех этапах лекарственной терапии (особенно на начальном) позволяет снизить риск побочных эффектов и увеличить шансы на положительный эффект терапии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мосолов С.Н., Цукарзи Э.Э., Алфимов П.В. Алгоритмы биологической терапии шизофрении // Современная терапия психических расстройств. – 2014. – № 1. – С. 27–36.
2. Hazari N., Kate N., Grover S. Clozapine and tardive movement disorders: a review // Asian journal of psychiatry. – 2013. – Vol. 6, No. 6. – P. 439–451.
3. O'Connor D.W. et al. The safety and tolerability of clozapine in aged patients: a retrospective clinical file review // The World Journal of Biological Psychiatry. – 2010. – Vol. 11, No. 6. – P. 788–791.
4. Мирошниченко И.И. Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств. – М.: Медицинское информационное агентство, 2011. – 416 с.
5. Dragovic S. et al. Characterization of human cytochrome P450s involved in the bioactivation of clozapine // Drug Metabolism and Disposition. – 2013. – Vol. 41, No. 3. – P. 651–658.
6. Ortiz de Montellano P.R. Cytochrome P450-activated prodrugs // Future medicinal chemistry. – 2013. – Vol. 5, No. 2. – P. 213–228.
7. Баймеева Н.В., Бондаренко Е.В., Потанин С.С., Мирошниченко И.И. Количественное определение содержания арипипразола, рисперидона и их активных метаболитов в плазме крови человека посредством жидкостной тандемной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ/МС/МС) // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. – Т. 8, № 3. – С. 32–37.
8. Andrade C. Serotonin reuptake inhibitor treatment of obsessive-compulsive symptoms in clozapine-medicated schizophrenia. – 2012. – Vol. 73, No. 11. – P. 1362–1364.
9. Baimeeva N.V., Miroshnichenko I.I. Analytical Methods for the Determination of Atypical Neuroleptics (Review) // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2016. – Vol. 50, No. 5. – P. 339–345.

## REFERENCES

1. Mosolov S.N., Tsukarzi E.E., Alfimov P.V. Algoritmy biologicheskoi terapii shizofrenii // Sovremennaya terapiya psi-khicheskikh rasstroistv. – 2014. – № 1. – S. 27–36.
2. Hazari N., Kate N., Grover S. Clozapine and tardive movement disorders: a review // Asian journal of psychiatry. – 2013. – Vol. 6, No. 6. – P. 439–451.
3. O'Connor D.W. et al. The safety and tolerability of clozapine in aged patients: a retrospective clinical file review // The World Journal of Biological Psychiatry. – 2010. – Vol. 11, No. 6. – P. 788–791.
4. Miroshnichenko I.I. Ratsional'noe do-zirovaniye i monitoring lekarstvennykh sredstv. – M.: Meditsinskoye informatsi-onnoye agentstvo, 2011. – 416 s.
5. Dragovic S. et al. Characterization of human cytochrome P450s involved in the bioactivation of clozapine // Drug Metabolism and Disposition. – 2013. – Vol. 41, No. 3. – P. 651–658.
6. Ortiz de Montellano P.R. Cytochrome P450-activated prodrugs // Future medicinal chemistry. – 2013. – Vol. 5, No. 2. – P. 213–228.
7. Baimeeva N.V., Bondarenko E.V., Potanin S.S., Miroshnichenko I.I. Kolichestvennoye opredeleniye soderzhaniya ari-piprazola, risperidona i ikh aktivnykh metabolitov v plazme krovi cheloveka po-sredstvom zhidkostnoy tandemnoy khroma-tomass-spektrometrii (VEZhKh/MS/MS) // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. – 2014. – T. 8, № 3. – P. 32–37.
8. Andrade C. Serotonin reuptake inhibitor treatment of obsessive-compulsive symptoms in clozapine-medicated schizophrenia. – 2012. – Vol. 73, No. 11. – P. 1362–1364.
9. Baimeeva N.V., Miroshnichenko I.I. Analytical Methods for the Determination of Atypical Neuroleptics (Review) // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2016. – Vol. 50, No. 5. – P. 339–345.

10. Couchman L. et al. Plasma clozapine, norclozapine, and the clozapine: norclozapine ratio in relation to prescribed dose and other factors: data from a therapeutic drug monitoring service, 1993–2007 // *Therapeutic drug monitoring*. – 2010. – Vol. 32, No. 4. – P. 438–447.
11. Ivanova S.A. et al. Cytochrome P450 1A2 co-determines neuroleptic load and may diminish tardive dyskinesia by increased inducibility // *The World Journal of Biological Psychiatry*. – 2015. – Vol. 16, No. 3. – P. 200–205.
12. Барсегян С.С., Максимова Т.В., Морозов Ю.Е., Плетнева Т.В., Саломатин Е.М., Тучик Е.С. Проблемы экспертной оценки результатов судебно-химических исследований клозапина в биологическом материале // *Судебно-медицинская экспертиза*. – 2014. – № 5. – С. 40–46.
13. Алфимов П.В., Оленева Е.В., Мосолов С.Н. Прогностические факторы терапевтической эффективности клозапина при шизофрении [обзор литературы] // *Современная терапия психических расстройств*. – 2013. – № 2. – С. 21–29.
10. Couchman L. et al. Plasma clozapine, norclozapine, and the clozapine: norclozapine ratio in relation to prescribed dose and other factors: data from a therapeutic drug monitoring service, 1993–2007 // *Therapeutic drug monitoring*. – 2010. – Vol. 32, No. 4. – P. 438–447.
11. Ivanova S.A. et al. Cytochrome P450 1A2 co-determines neuroleptic load and may diminish tardive dyskinesia by increased inducibility // *The World Journal of Biological Psychiatry*. – 2015. – Vol. 16, No. 3. – P. 200–205.
12. Barsegyan S.S., Maksimova T.V., Morozov Yu.E., Pletneva T.V., Salomatin E.M., Tuchik E.S. Problemy ekspertnoi otsenki rezul'tatov sudebno-khimicheskikh issledovaniy klozapina v biologicheskom materi-ale // *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. – 2014. – № 5. – S. 40–46.
13. Alfimov P.V., Oleneva E.V., Mosolov S.N. Prognosticheskie faktory terapev-ticheskoi effektivnosti klozapina pri shizofrenii [obzor literatury] // *Sovremennaya terapiya psikhicheskikh rasstroistv*. – 2013. – № 2. – S. 21–29.

## Therapeutic drug monitoring of clozapine and norclozapine in schizophrenia

N.V. Baymееva<sup>1</sup>, L.M. Krasnykh<sup>1</sup>, V.G. Kaleda<sup>1</sup>, E.R. Nikolaeva<sup>1</sup>, S.A. Ivanova<sup>2</sup>, I.I. Miroshnichenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> FSBI "Scientific center of mental health"

<sup>2</sup> Mental Health Research Institute, Tomsk NIMC

### SUMMARY:

The paper discusses are data of the therapeutic drug monitoring of clozapine received from 37 patients (98 samples in the whole), with various forms of schizophrenia undergoing treatment in the conditions of a hospital. The nature of dependence between concentration of clozapine, its metabolite of a norclozapine and a drug dose is established.

**Materials and methods.** The method of a high performance liquid chromatography with mass-spectrometric detection was developed for quantitative determination of clozapine and norclozapine in the blood. Monitoring with the subsequent analysis of data was accompanied with necessary clinical information, in the form of special forms of inquiry – the monitoring cards.

**Results and discussion:** The obtained data of clozapine level were distributed in the following way: 16 % were in the therapeutic, 51 % in sub-therapeutic (< 350 ng/mL) and 29 % conditionally toxic range (> 600 ng/mL), cases of alleged noncompliance did not exceed 3 %, in the appointment of clozapine at doses of 25 to 350 mg per day. Average concentrations of clozapine and norclozapine were higher in non-smoker than in smokers.

**Conclusion.** Distribution on concentrations for clozapine and norclozapine is substantially normal character, slightly offset towards larger values. Therapeutic drug monitoring is a necessary tool for the individualization and personalization of pharmacotherapy in the treatment of schizophrenia.

**KEY WORDS:** schizophrenia, therapeutic drug monitoring, high performance liquid chromatography tandem spectrometry, clozapine, norclozapine.

**CONTACT:** baymееva\_n@mail.ru