

Мониторинг концентрации клозапина и норклозапина при терапии шизофрении

Н. В. Баймеева¹, Л. М. Красных², И. И. Мирошниченко¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научный центр психического здоровья», 115522, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Москва, Россия

Статья поступила 15.01.2016 г. Принята к печати 21.11.2016 г.

Резюме: Получены данные терапевтического лекарственного мониторинга клозапина в исследованиях с участием подписавших информированное согласие пациентов с различными формами шизофрении, проходящих лечение в условиях стационара. Рассмотрены значения концентрации клозапина и его метаболита норклозапина, их отношение к применяемым дозам препарата. 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 терапевтического лекарственного мониторинга. Полученные данные уровня концентрации распределились следующим образом: 38,64 % находились в терапевтическом, 38,64 % в субтерапевтическом (<350 нг/мл) и 22,73 % в условно токсическом диапазоне (>600 нг/мл) при назначении клозапина в дозах от 25 до 350 мг/сутки. Средние значения концентрации клозапина и норклозапина, по сравнению с курильщиками, были выше у некурящих пациентов.

Ключевые слова: терапевтический лекарственный мониторинг; шизофрения; тандемная хроматомасс-спектрометрия; клозапин; норклозапин.

Библиографическое описание: Баймеева НВ, Красных ЛМ, Мирошниченко ИИ. Мониторинг концентрации клозапина и норклозапина при терапии шизофрении. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2016; (4): 53–57.

Клозапин является трициклическим производным дибензодиазепина: 8-хлор-11-(4-метил-1-пиперазинил)-5H-дибензо-[b,e][1,4]-дiazепин.

По фармакологическому действию клозапин относится к «атипичным» нейролептикам (антипсихотикам). Применяется для лечения при острых и хронических формах шизофрении, маниакальных состояниях, маниакально-депрессивном психозе, психомоторном возбуждении. Препарат эффективен у пациентов, резистентных к другим антипсихотическим средствам. Он вызывает минимальные экстрапирамидальные побочные эффекты, не вызывает позднюю дискинезию и в меньшей степени влияет на секрецию пролактина [1]. Из-за способности вызывать агранулоцитоз (опасное для жизни состояние, которое чаще наступает в первые 3 месяца лечения, с увеличением риска возникновения в 10 раз в возрасте от 21 до 50 лет и старше) применение клозапина ограничено [2].

Терапевтический диапазон концентраций клозапина в плазме крови 350–600 нг/мл [3]. Фармакокинетические параметры клозапина имеют большие индивидуальные колебания, которые зависят от возраста, пола и курения табака (табл. 1). Клозапин в значительной степени метаболизируется в печени, только 2–4 % от принятой дозы препарата выводится с мочой в неизменном виде. Основным продуктом окислительного дезалкилирования является N-деметильное производное, обладающее слабой фармакологической активностью [4]. 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 препаратов [5] или препаратов, при метаболизме которых, образуется продукт, обладающий значительной терапевтической активностью [6]. Определение содержания N-деметилклозапина (норклозапина) может дать полезную информацию относительно побочных реакций клозапина.

Отношение концентрации клозапин/норклозапин в плазме крови может возрастать при одновременном приеме пациентом препаратов, ингибирующих систему цитохрома P450, таких как циметидин и флувоксамин.

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) клозапина проводили на базе Научного центра психического здоровья (НЦПЗ) у 28 подписавших информированное согласие пациентов с различными формами шизофрении, по достижении у них периода стационарной концентрации препарата в средней дозе 152±80 мг.

На каждого пациента была составлена индивидуальная карта обследования, в которой отмечали демографические показатели, данные лабораторных

Таблица 1

ЗНАЧЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ ФАРМАКОКИНЕТИКИ И ДОЗИРОВАНИЯ КЛОЗАПИНА [2]

Лекарственная форма	Таблетки 25 мг 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/сутки
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	5 л/кг
Период полувыведения	4,5–7,5 ч
Клиренс	6,1±1,6 мл/мин/кг

анализов, ход лечения, наличие сопутствующих побочных явлений, сопутствующую терапию.

Приведем некоторые показатели, характеризующие исследованную целевую популяцию:

- возраст 27,3±5,8 лет;
- вес 74,4±8,8 кг;
- пол мужской, за исключением 2-х женщин.

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 минус 20 °С.

Для количественного определения клозапина в сыворотке крови применяли валидированный метод ВЭЖХ в сочетании с тандемным масс-спектрометрическим детектором [7].

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

Экстракцию проводили метил-третбутиловым эфиром в количестве 2 мл, затем образцы помещали на горизонтальный встряхиватель в течение 10 мин и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Экстракт упаривали в токе азота при 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 — сочетает ионизацию электроспреем и химическую ионизацию при атмосферном давлении. Фиксировались следующие MRM-переходы: клозапин 327,0 → 270 норклозапин — 313,2 → 192,1, 294,2 → 225,1 анастразол.

Колонка — Zorbax Eclipse, размер частиц 5 мкм, 12,5×4,6 мм («Agilent», США). Элюент А состоял из 0,2 % муравьиной кислоты в воде, элюент В — из 0,2 % муравьиной кислоты в метаноле. Насос работал в градиентном режиме, скорость потока равнялась 0,5 мл/мин. Времена удерживания анализов были

следующие: клозапин — 5,59±0,02 мин, норклозапин — 5,27±0,02 мин, анастразол — 6,08±0,02 мин.

Предел количественного обнаружения как клозапина, так и норклозапина составил 0,5 нг/мл. Методика соответствует критериям точности, прецизионности и правильности, предъявляемым к аналитическим методам ВЭЖХ-МС-МС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Всего было проанализировано 44 образца (табл. 2). Полученные величины стационарной концентрации препарата в сыворотке крови распределились следующим образом: 38,64 % находились в терапевтическом, 38,64 % в субтерапевтическом (<350 нг/мл) и 22,73 % в условно токсическом диапазоне (>600 нг/мл) при назначении клозапина в дозах от 25 до 350 мг в день.

На рисунке 1 представлен график рассеяния зависимости минимальной стационарной концентрации клозапина и норклозапина от величины суточной дозы препарата.

В результате статистического анализа была выявлена достаточно значимая корреляционная зависимость между концентрацией (C_{Cloz} , C_{Nor}) и дозой клозапина:

$$C_{\text{Cloz}} = -63,9 + 3,27D; K_{\text{corr}} = 0,57; P = 0,0017 \quad (1)$$

$$C_{\text{Nor}} = 5,4 + 0,71D; K_{\text{corr}} = 0,58; P = 0,0016 \quad (2)$$

В дальнейшем для анализа межиндивидуальных различий нами использовался такой взвешенный по-

Таблица 2

СРЕДНИЕ ЗНАЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ КЛОЗАПИНА (CLOZ) И НОРКЛОЗАПИНА (NOR), нг/мл

Диапазон	N	Cloz (нг/мл)	Nor (нг/мл)	Сумма концентраций (Cloz+Nor)	Распределение, %
Н	17	344	154	442	38,64
М	17	140	57	197	38,64
Т	10	1038	232	1270	22,73

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

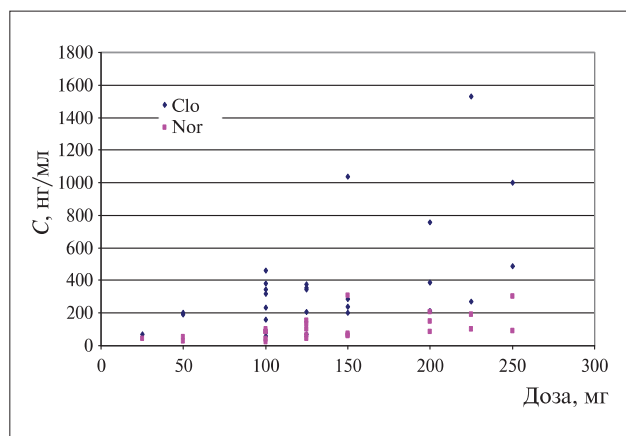


Рис. 1. Стационарные концентрации клозапина (Cloz) и его метаболита (Nor) после приема препарата в диапазоне доз 25–300 мг

казатель, как концентрация, нормированная относительно дозы C/D . Достаточно информативную картину дает диаграмма частот распределения (рис. 2 и 3). Установлено, что данное распределение носит ассиметричный характер. Как в случае клозапина, так и метаболита, распределение сдвинуто в сторону низких значений.

Межиндивидуальная вариабельность может быть частично объяснена влиянием на фармакокинетику таких демографических и физиологических факторов (ковариат), как пол, возраст, раса, курение, 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 и так называемая «необъяснимая» часть межиндивидуальных различий).

При изучении характера воздействия ковариат на фармакокинетику клозапина, влияния 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) против некурящих субъектов (399 и 112 нг/мл соответственно).

Установлено, что норклозапин проявляет психофармакологическую активность в экспериментах *in vitro*. В то же время активность *in vivo* не доказана. Тем не менее отношение концентрации препарата к уровню метаболита Cloz/Nor является полезным показателем эффективности проводимой терапии [8]. Оценка этого параметра позволяет избежать передозировки, отслеживать регулярность приема и переносимость препарата и устанавливать характер метаболической активности CYP1A2. В исследованной нами выборке концентрация клозапина в основном превосходит концентрацию метаболита в 3 раза (значение медианы 3,05 (рис. 4)).

Среди полученных результатов, не представленных на рисунке 4, особенно интересны данные пациента с кодом НИИ86. Уже в начальной стадии при назначении небольшой дозы клозапина 25 мг в сутки концентрация препарата достигала 960 нг/мл. В то же время концентрация норклозапина составляла всего



Рис. 2. Частотное распределение концентрации клозапина, нормированной относительно дозы

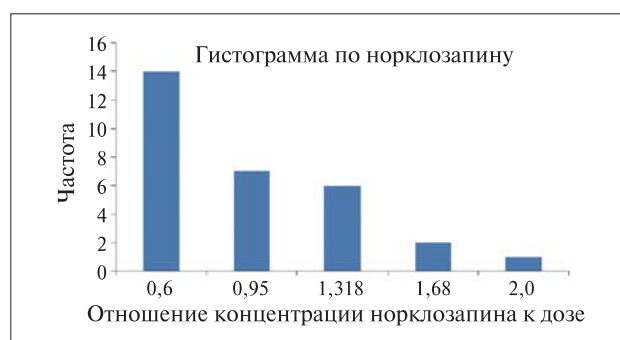


Рис. 3. Частотное распределение концентрации норклозапина, нормированной относительно дозы

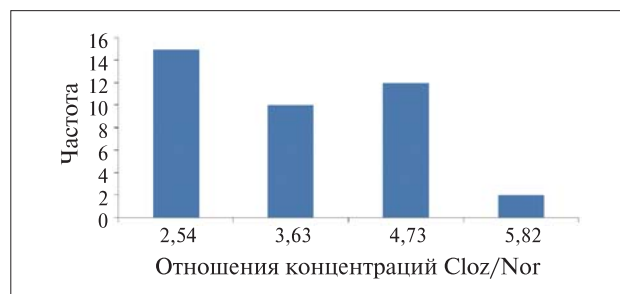


Рис. 4. Частотное распределение отношения концентрации клозапина к концентрации норклозапина

49 нг/мл, что приводило к значениям оборота клозапина Cloz/Nor порядка 20. По-видимому, в этом случае имеет место дефицит активности CYP1A2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод, что применение ТЛМ является адекватным средством индивидуализации дозирования и повышения эффективности антипсихотической терапии посредством применения клозапина. Кроме того, ТЛМ служит единственным средством обнаружения некомплаентности (нарушения режима приема лекарственного средства) пациента, так как субъективными оценками данный факт обнаружить сложно, тогда как отсутствие лекарственного средства в сыворотке крови пациента позволяет подтвер-

дить нарушение режима его приема. Мониторинг количества препарата на всех этапах терапии, особенно на начальном, способствует снижению риска возникновения побочных эффектов и увеличению вероятности положительного отклика на лекарственное средство.

Благодаря высокой чувствительности разработанный метод количественного определения может быть использован для терапевтического мониторинга содержания и обнаружения следовых количеств лекарственного препарата в биологических жидкостях человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hazari N, Kate N, Grover S. Clozapine and tar dive movement disorders: a review. *Asian J Psychiatr.* 2013; (6): 439–51.
2. O'Connor DW, Sierakowski C, Fei Chin L, Singh D. The safety and tolerability of clozapine in aged patients: A retrospective clinical file review. *World J Biol Psychiatry* 2010; (11): 788–91.
3. Мирошниченко ИИ. Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств. М.: Медицинское информационное агентство; 2011.
4. Dragovic S, Gunness P, Ingelman-Sundberg M, Vermeulen NPE, Jan NM. Commandeur characterization of human cytochrome P450s involved in the bioactivation of clozapine. *Drug Metab Dispos.* 2013; 41: 651–8.
5. Родина ТА, Мельников ЕС, Соколов АВ, Белков СВ, Раменская ГВ. Определение эналаприла и его активного метаболита эналаприлата в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС при персонализации фармакотерапии больных артериальной гипертензией. *Экспериментальная и клиническая фармакология* 2015; 78(10): 15–20.
6. Баймеева НВ, Бондаренко ЕВ, Потанин СС, Мирошниченко ИИ. Количественное определение содержания арипипразола, рisperидона и их активных метаболитов в плазме крови человека посредством жидкостной tandemной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ/МС/МС). Разработка и регистрация лекарственных средств 2014; 3(8): 32–7.
7. Красных ЛМ, Платова АИ, Баймеева НВ, Василенко ГФ. Определение содержания клозапина и норклозапина в плазме крови методом tandemной масс-спектрометрии. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения* 2014; (1): 37–41.
8. Couchman L, Morgan PE, Spencer EP, Flanagan RJ. 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. *Ther Drug Monit.* 2010; 32(4): 438–47.

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр психического здоровья» РАМН. Российская Федерация, 115522, Москва, Каширское шоссе, 34.

Баймеева Наталья Викторовна. Младший научный сотрудник лаборатории фармакокинетики. Мирошниченко Игорь Иванович. Заведующий лабораторией фармакокинетики, д-р мед. наук.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

Красных Людмила Михайловна. Начальник отдела клинической фармакокинетики Центра клинической фармакологии, канд. биол. наук.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Красных Людмила Михайловна; lkrasnykhLM59@mail.ru

MONITORING OF CLOZAPINE AND NORCLOZAPINE CONCENTRATIONS IN SCHIZOPHRENIA TREATMENT

N. V. Baymeeva¹, L. M. Krasnykh², I. I. Miroshnichenko¹

¹ Federal State Budgetary Institution «Scientific Center of Mental Health» of the Russian Academy of Medical Sciences, 115522, Moscow, Russia

² Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

Abstract: The article discusses therapeutic drug monitoring (TDM) data for clozapine obtained in patients with various forms of schizophrenia undergoing treatment in hospital. Clozapine and its metabolite norclozapine concentrations and their response to the administered drug doses have been studied. Clozapine and norclozapine assay in human blood has been performed by high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. Monitoring and subsequent data analysis has been supported with necessary clinical information in the form of special requests — TDM cards. The obtained data on concentration levels have been arranged as follows: 38,64 % within therapeutic range, 38,64 % within subtherapeutic range (<350 ng/ml) and 22,73 % within arbitrary toxic range (600 ng/ml) when administering 25 to 30 mg of clozapine daily. Average concentrations of clozapine and norclozapine were higher in non-smokers compared to smokers.

Key words: TDM; schizophrenia; Liquid chromatography tandem-mass spectrometry; clozapine; norclozapine.

For citation: Baymeeva NV, Krasnykh LM, Miroshnichenko II. Monitoring of clozapine and norclozapine concentrations in schizophrenia treatment. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2016; (4): 53–57.

REFERENCES

1. Hazari N, Kate N, Grover S. Clozapine and tar dive movement disorders: a review. *Asian J Psychiatr.* 2013; (6): 439–51.
2. O'Connor DW, Sierakowski C, Fei Chin L, Singh D. The safety and tolerability of clozapine in aged patients: A retrospective clinical file review. *World J Biol Psychiatry* 2010; (11): 788–91.
3. Miroshnichenko II. Rational dosing and monitoring of medicines. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2011 (in Russian).
4. Dragovic S, Gunness P, Ingelman-Sundberg M, Vermeulen NPE, Jan NM. Commandeur characterization of human cytochrome P450s involved in the bioactivation of clozapine. *Drug Metab Dispos.* 2013; 41: 651–8.

5. Rodina TA, Melnikov ES, Sokolov AV, Belkov SV, Ramenskaya GV. Definition of enalapril and enalaprilat, the active metabolite in the blood plasma by HPLC-MS/MS in the personalization of pharmacotherapy of patients with hypertension. *Ekspperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya* 2015; 78(10): 15–20 (in Russian).
6. Baymeeva NV, Bondarenko EV, Potanin SS, Miroshnichenko II. Quantitative determination of aripiprazole, risperidone and its active metabolites in human plasma by liquid chromatography tandem-mass spectrometry (HPLC/MS/MS). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* 2014; 3(8): 32–7 (in Russian).
7. Krasnykh LM, Platova AI, Baymeeva NV, Vasilenko GF. Measurement of clozapine and norclozapine in blood plasma by tandem mass spectrometry. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* 2014; (1): 37–41 (in Russian).
8. Couchman L, Morgan PE, Spencer EP, Flanagan RJ. 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. *Ther Drug Monit.* 2010; 32(4): 438–47.

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Center of Mental Health» of the Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe highway 34, Moscow 115522, Russian Federation.

Baymeeva NV. Junior Researcher of Laboratory of pharmacokinetics.

Miroshnichenko II. Head of Laboratory of pharmacokinetics. Doctor of Medical Sciences.

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Krasnykh LM. Head of Clinical Pharmacokinetics Department of Clinical Pharmacology Center. Candidate of Biological Sciences.