

Aina Gaustad Haugen

Effekter av interagerende legemidler på dannelsen av nitrenium-ion derivater av klozapin *in vivo* og *in vitro*

Masteroppgave i Farmasi

Veileder: Espen Molden og Robert Løvsletten Smith

Mai 2023



Aina Gaustad Haugen

Effekter av interagerende legemidler på dannelsen av nitrenium-ion derivater av klozapin *in vivo* og *in vitro*

Masteroppgave i Farmasi
Veileder: Espen Molden og Robert Løvsletten Smith
Mai 2023

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for medisin og helsevitenskap
Institutt for klinisk og molekylær medisin



Kunnskap for en bedre verden

Sammendrag

Bakgrunn: Schizofreni er en sammensatt psykisk lidelse som kjennetegnes av symptomer som hallusinasjoner, affektavflatning og kognitive forstyrrelser. Selv om det finnes mange antipsykotika på markedet, opplever 20-30% av pasientene manglende respons på behandlingen og får diagnosen terapieresistent schizofreni. Klozapin er et legemiddel som har vist overlegen klinisk effekt hos denne pasientgruppen sammenlignet med andre antipsykotika. Legemidlet er begrenset til bruk ved terapieresistent schizofreni, hovedsakelig på grunn av risiko for alvorlige bivirkninger, og da spesielt agranulocytose. Denne bivirkningen kan i verste fall føre til fatale infeksjoner. Agranulocytose antas å være assosiert med dannelse av en reaktiv nitrenium-ion-metabolitt av klozapin. Denne metabolitten inaktiveres og detoksifiseres ved glutatjon-konjugering, før videre metabolisme til cysteinyl-derivater *in vivo*. Formålet med denne masteroppgaven var å undersøke effekten av ulike cytokrom P450 (CYP)-hemmere og inducere på dannelsen av glutatjon- og cysteinylmetabolitter av klozapin, henholdsvis *in vitro* og *in vivo*.

Metode: *I vivo*-delen av oppgaven var en retrospektiv observasjonsstudie basert på serumkonsentrasjonsanalyser av klozapin og metabolitter utført i forbindelse med terapeutisk legemiddelmonitorering («therapeutic drug monitoring», TDM) ved Senter for Psykofarmakologi, Diakonhjemmet sykehus. Pasienter ble inkludert fra TDM-databasen med følgende kriterium: pasienten skulle ha brukt klozapin med påvist klozapin- og *N*-desmetylklozapinkonsentrasjon i blod i tidsrommet 1. mars 2019 til 20. august 2022. Tilleggsinformasjon som ble hentet ut ved søk i databasen: klozapindose, tidsintervall mellom siste dosering og prøvetidspunkt, alder, kjønn og røykestatus. Testgruppen inkluderte klozapin-pasienter komedisinert med ett legemiddel som hemmer eller inducerer CYP-enzymmer. En tilfeldig gruppe av klozapin-pasienter uten påvist bruk av hemmere/induserere, men lik sammensetning som testgruppen, ble inkludert som kontrollgruppe i et 1:1 forhold. For de inkluderte pasientene ble det hentet ut metabolittspektra av klozapin etter repressering av UHPLC-HRMS-kromatogrammer fra tidligere TDM-analyser. Dannelsen av klozapinmetabolitter, målt som metabolittnivå relatert til klozapin-nivå i samme serumprøve («metabolitt/klozapin ratio», MR), ble sammenlignet mellom pasienter komedisinert med de ulike CYP-hemmerne/induserne og kontrollgruppen. Hovedfokus var på dannelse av cysteinylmetabolitter. Del to av oppgaven hadde til hensikt å undersøke dannelse av klozapinmetabolitter *in vitro*, primært rettet mot klozapin-glutatjon, i humane levermikrosomer med eller uten koinkubasjon med interagerende legemidler.

Resultater: For test- og kontrollgruppen oppfylte henholdsvis 163 og 162 pasienter studiekriteriene. Pasientene komedisinert med valproat eller fluvoksamin viste en henholdsvis 111% økning (95% konfidensintervall: 45.2, 205; $p < 0.001$) og 71% reduksjon (95% konfidensintervall: -87.5, 34.6; $p < 0.001$) i metabolsk ratio av klozapin-*N*-oksid-cysteinyl/klozapin, i forhold til kontrollgruppen. Fluvoksamin viste også en signifikant reduksjon i klozapin-*N*-oksid/klozapin-ratio sammenlignet med kontrollgruppen (-43%; 95% konfidensintervall: -66.2, -3.82; $p = 0.03$). For dannelse av *N*-desmetylklozapin viste både fluvoksamin og valproat en reduksjon i metabolsk ratio for *N*-desmetylklozapin/klozapin med henholdsvis 29% (95% konfidensintervall: -45.9, -6.75; $p = 0.01$) og 41% (95% konfidensintervall: -47.4, 32.7; $p < 0.001$), mens CYP-induserne økte denne ratioen med 75% (95% konfidensintervall: 1.30, 204; $p = 0.04$), sammenlignet med kontroll. I *in vitro*-forsøkene ble glutatjonmetabolitter av klozapin kun påvist i et pilotforsøk med inkubasjon av klozapin og humane levermikrosomer. I de videre forsøkene

ble det ikke mulig å reprodusere de samme funnene, og da heller ikke undersøke mulig påvirkning av CYP-hemmere på dannelsen av glutathionmetabolitter.

Konklusjon: Denne studien viser at valproat øker dannelsen av klozapin-*N*-oksid-cysteinyll hos klozapinbehandlede pasienter, mens fluvoksamin reduserer dannelsen av den samme metabolitten. Disse resultatene gir holdepunkter for at kombinasjonsbehandling med valproat øker dannelsen av nitrenium-ion og dermed risiko for agranulocytose, men fluvoksamin har den motsatte effekten, hvis nivå av cysteinylderivater gjenspeiler nitrenium-ion dannelse. Siden *in vitro*-forsøkene ikke ble vellykket, ga ikke prosjektet informasjon om mulige mekanismer som lå til grunn for effektene av interagerende legemidler på dannelsen av glutathionmetabolitter av klozapin.

Abstract

Background: Schizophrenia is a complex psychiatric disorder characterized by hallucinations, indifference, and cognitive impairment. There are a wide variety of antipsychotic drugs available today, yet 20-30% of patients fail to respond to treatment and are diagnosed with treatment-resistant schizophrenia. Clinical outcomes have been significantly improved with clozapine in this patient group compared to other antipsychotics. Due to the risk of serious side effects, in particular agranulocytosis, the drug is restricted to treating treatment-resistant schizophrenia. This side effect is believed to originate from reactive intermediates of clozapine, especially the nitrenium-ion, and may cause a serious reduction in white blood cells, or even lead to fatal infections. *In vivo*, glutathione inactivates and detoxifies these reactive intermediates into glutathione conjugates, which are further metabolized into cysteinyl derivatives. This master's thesis examined the effects of various drugs, that inhibit or induce various cytochrome P450 (CYP) enzymes, on the formation of clozapine-glutathione and cysteinyl metabolites *in vitro* and *in vivo*, respectively.

Methods: The *in vivo* part of the thesis comprised a retrospective observational study based on data from analysis of serum concentration, as part of routine therapeutic drug monitoring (TDM) at the Center for Psychopharmacology, at Diakonhjemmet Hospital. Patients were included from the TDM database based on the detection of blood concentration of both clozapine and *N*-desmethylclozapine in the period March 1, 2019 to August 20, 2022. In addition, the following parameters were sampled from the database: the patient's clozapine dosage, the time between the last dose and blood sampling, age, gender, and smoking status. The test group in this study consisted of patients who had simultaneously used clozapine and one other drug that either inhibits or induces CYP enzymes. For the control group, a randomized and representative sample distributed in a 1:1 ratio to the test group was selected and consisted of clozapine users who had not previously shown any blood concentrations of interacting drugs. Following retrospective reprocessing of metabolite spectra from UHPLC-HRMS for the included patients, levels of metabolites were compared to clozapine levels in the same sample to determine how the interacting drugs affected the formation of the metabolites ("metabolite/clozapine", MR), with a particular focus on cysteinyl metabolites. Part two of the thesis aimed to investigate how interacting drugs affected the formation of clozapine metabolites *in vitro*, with incubation of human liver microsomes, mainly focusing on clozapine glutathione metabolites.

Results: For the test and control groups 163 and 162 patients met the inclusion criteria, respectively. Patients co-medicated with valproate or fluvoxamine showed a 111% increase (95% confidence interval: 45.2, 205; $p < 0.001$) and a 71% decrease (95% confidence interval: -87.5, 34.6; $p < 0.001$), respectively, in metabolic ratio for clozapine-*N*-oxide-cysteinyl/clozapine, compared to the control group. Moreover, fluvoxamine exhibited a reduction for clozapine-*N*-oxide/clozapine (-43%; 95% confidence interval: -66.2, -3.82; $p = 0.03$), compared to the control group. Both valproate and fluvoxamine showed a reduction in the metabolic ratio for *N*-desmethylclozapine/clozapine by 41% (95% confidence interval: -47.4, 32.7; $p < 0.001$) and 29% (95% confidence interval: -45.9, -6.75; $p = 0.01$), respectively, while CYP inducers increased this ratio by 75% (95% confidence interval: 1.30, 204; $p = 0.04$), compared to controls. The pilot study, consisting of incubation of clozapine and human liver microsomes, resulted in the identification of two metabolites that were interpreted as glutathione metabolites. However, the same

findings could not be replicated in the incubation of clozapine, human liver microsomes, and interacting drugs, and could therefore not interpret the potential effect of CYP inhibitors on the formation of glutathione metabolites.

Conclusion: This study indicated that co-medication with valproate increased the metabolism of clozapine-*N*-oxide-cysteinyl, while fluvoxamine reduced the formation of the same metabolite. The results suggest that additional treatment with valproate may increase the formation of nitrenium ion and therefore the risk of agranulocytosis, whereas co-medication with fluvoxamine may be beneficial in reducing the risk of the side effect if the levels of cysteinyl derivatives reflect nitrenium-ion formation. However, further investigations are needed to fully understand the mechanism and implications of the interactions. The formation of clozapine-glutathione metabolites was identified *in vitro*, but the effect of interacting drugs on the glutathione metabolites remained inconclusive.

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Senter for Psykofarmakologi, Diakonhjemmet Sykehus i perioden august 2022 til mai 2023.

Jeg vil gi en stor takk til mine hovedveiledere Espen Molden og Robert Løvsletten Smith, for god veiledning og fine tilbakemeldinger. Tusen takk til Markus H. Hovd for hjelp med utarbeidelse av protokoll og utførelse av selve *in vitro*-forsøket, i tillegg til gode tilbakemeldinger. Jeg vil også takke Birgit Wollmann for hjelp med repressering av serumprøver, og Hege Haugan for hjelp til analyse av prøvene fra *in vitro*-forsøket. Vil også gi en oppmerksomhet til alle ansatte ved Senter for Psykofarmakologi for et fint år med gode innspill, og et veldig hyggelig miljø!

Videre vil jeg takke venner, familie og samboer for støtte og oppmuntrende ord gjennom hele perioden jeg skrev masteroppgaven. Til slutt må jeg også gi en stor takk til Hilde Tveit, Maiken A. Einvik og Ole H. F. Holt for frustrerende, men også veldig fine dager på vårt felles masterkontor!

Oslo, mai 2023

Aina Gaustad Haugen

Innholdsfortegnelse

1 Introduksjon	1
1.1 Schizofreni	1
1.1.1 Symptomer	1
1.1.2 Diagnostikk	2
1.1.3 Patofysiologi	3
1.2 Behandling av schizofreni	4
1.2.1 Typiske antipsykotika	4
1.2.2 Atypiske antipsykotika	5
1.3 Klozapin	5
1.3.1 Historie	5
1.3.2 Indikasjon	6
1.3.3 Farmakologiske egenskaper	6
1.3.4 Metabolisme	7
1.3.5 Bivirkninger	13
1.3.6 Terapeutisk legemiddelmonitorering	15
1.4 Hensikt	16
2 Metode	17
2.1 Effekt av komedikasjon med interagerende legemidler på dannelse av klozapin-cysteinylnmetabolitter in vivo	17
2.1.1 Pasientpopulasjon	17
2.1.2 Inklusjons- og eksklusjonskriterier	17
2.1.3 Kartlegging av røykevaner	18
2.1.4 Metode for serumkonsentrasjonsbestemmelse av klozapin og metabolitter	18
2.1.5 Statistiske analyser	21
2.2 Effekt av interagerende legemidler på dannelse av klozapin-glutationmetabolitter in vitro	21
2.2.1 Utstyr og instrumenter	22
2.2.2 Kjemikalier	22
2.2.3 Tillaging av stambufferløsning	23
2.2.4 Tillaging av klozapin-GSH-bufferløsning, HLM-fortynning, 1.2 M maursyre og intern standard.	24
2.2.5 Inkubasjon av klozapin og humane levermikrosomer, med og uten interagerende legemidler	25
3 Resultater	27
3.1 Effekt av komedikasjon med interagerende legemidler på dannelse av klozapin-cysteinylnmetabolitter in vivo	27
3.1.1 Inkluderte pasienter	27
3.1.2 Inkludert datamateriale	27
3.1.3 Serumkonsentrasjoner	28
3.1.4 Metabolske ratioer	29
3.2 Effekt av interagerende legemidler på dannelse av klozapin-glutationmetabolitter in vitro	32
3.2.1 Inkubasjon av klozapin og humane levermikrosomer	32

3.2.2 Inkubasjon av klozapin, interagerende legemidler og humane levermikrosomer	33
4. Diskusjon	35
4.1 Effekt av komedikasjon med interagerende legemidler på dannelse av klozapin-cysteinylnmetabolitter in vivo	35
4.2 Effekt av interagerende legemidler på dannelse av klozapin-glutationmetabolitter in vitro.....	37
4.3 Metodologiske vurderinger	38
5. Konklusjon	41
Litteraturliste	42
Vedlegg	50

Forkortelser

AUC	Area under the curve
C/D-ratioer	Dosejusterte serumkonsentrasjoner
CLZ	Klozapin
CYP	Cytokrom P-450
DA	Dopamin
D ₁ , D ₂ , D ₃ , D ₄ , D ₅	Dopamin 1 reseptor, Dopamin 2 reseptor, Dopamin 3 reseptor, Dopamin 4 reseptor, Dopamin 5 reseptor
EPS	Ekstrapyramidale bivirkninger
FLU	Fluvoksamin
GSH	Glutation
GST	Glutation-S-transferase
HCOOH	Maursyre
HLM	Humane levermikrosomer
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
HSD	Honest Significant Test
H ₁	Histamin 1 reseptor
H ₂ SO ₄	Svovelsyre
IQR	InterQuartile Range
LOD	Nedre grense for kvantifisering (limit of detection)
mM	Millimol
MeOH	Metanol
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MPO	Myeloperoksidaser
MR	Metabolsk Ratio
MS	Mass Spectrometry
M ₁ , M ₂	Muskarin 1 reseptor, Muskarin 2 reseptor
NDMC	N-desmetylklozapin
NFIB	Nuclear factor 1 B
NMDA	N-metyl-d-aspartat
N ₂	Nitrogengass
ppm	parts per million
PANSS	Positive and Negative Syndrome Scale
PAR	Paroksetin
REK	Regional Etisk Komite
rpm	Revolutions per minute

SSRI	5-HT reopptakshemmer
SD	Standardavvik
SE	Standard Error
SFP	Senter For Psykofarmakologi
TDM	Terapeutisk legemiddelmonitorering
TRRIP	Treatment Response and Resistance in Psychosis
TRS	Terapi resistent schizofreni
UGT	Uridindifosfat-glukuronosyl-transferase
UHPLC	Ultra-high Performance Liquid Chromatography
VPA	Valproat
5-HT	Serotonin
5-HT _{2A}	Serotonin reseptor 2A

1 Introduksjon

1.1 Schizofreni

Schizofreni er en alvorlig psykiatrisk lidelse og har stor påvirkning på de berørte pasientene og samfunnet (1). Personer med schizofreni har lav forventet levealder, med omtrent 20 år kortere levetid enn befolkningen generelt (2). Lidelsen var lenge ikke differensiert fra andre psykiske tilstander, men i 1911 ble begrepet schizofreni introdusert. Direkte oversatt betyr schizofreni «splittet tankesett» da man så splittelsen i personlighet som hovedtrekk for tilstanden (3). Stigma mot personer med schizofreni er veldig utbredt, noe som forårsaker sosial ekskludering og påvirker deres forhold til andre, inkludert venner og familie (4). Schizofreni har en prevalens på rundt 0.3% og vil kunne ramme omtrent 24 millioner mennesker på verdensbasis. Sykdommen har som regel debut i slutten av ungdomsårene eller i løpet av tjuetårene. Det sees ofte sykdomsdebut tidligere hos menn enn kvinner (4), og insidensen er generelt høyere for menn enn kvinner (5). Årsakene til schizofreni er fortsatt ikke fullstendig klarlagt, men involverer en kombinasjon av miljø- og genetiske faktorer (6).

Studier har identifisert rundt 100 genetiske regioner som er assosiert med risiko for schizofreni (7). Disse viser en klar sammenheng mellom individuelle gener og risiko for sykdommen, men at det ikke ser ut til å være noe enkelt gen med overordnet innflytelse (7). Det er likevel observert at graden av slektskap til personer med schizofreni påvirker risikoen for sykdommen proporsjonalt (5). Forekomsten i befolkningen generelt er under 1%, mens hos andregradslektninger er risikoen økt til 2-6%, og hos førstegradsslektninger til 9-17% (5). I tvillingstudier er det vist at når den ene tvillingen har schizofreni, er sannsynligheten for schizofreni for den andre tvillingen bare rundt 50%, hvilket betyr at miljøet har en vesentlig påvirkning på sykdomsutviklingen (7). Miljøfaktorer assosiert med utvikling av schizofreni er demografiske forhold som urbanisering, sosioøkonomisk status, sosial isolering og stoffmisbruk (8). Stressfaktorer under svangerskap som kan påvirke utviklingen av hjernen kan også spille en rolle, med infeksjoner, ernæringsproblemer, stress hos mor og fødselskomplikasjoner (1). I tillegg ser man at mobbing, misbruk og barndomstraumer kan påvirke risikoen for å utvikle schizofreni (8).

1.1.1 Symptomer

Schizofreni er en sammensatt psykotisk sykdom som varierer i sykdomsuttrykk, behandlingsrespons, forløp og utfall (1, 8). Sammenlignet med andre psykotiske lidelser er det ingen enkeltsymptomer som er spesifikke og unike for schizofreni (1, 5). Sykdommen påvirker både følelser, tanker og realitetsbildet, og mange kan i perioder synes det er vanskelig å skille mellom hva man innbiller seg og hva som er virkelig (9). I tillegg er personer med schizofreni utsatt for angstlidelser, depresjon med dårlig samvittighet og selvskading, noe som ofte fører til selvmordsforsøk i rundt 50% av tilfellene (7).

Schizofreni preges av symptomer i tre kategorier; positive, negative og kognitive symptomer. Positive, også kalt psykotiske symptomer, består av tap av kontakt med

virkeligheten (1), og pasientene kan oppleve hallusinasjoner, tankeforstyrrelser og vrangforestillinger (7). Negative symptomer defineres med innskrenkninger i følelseslivet, med blant annet nedsatt motivasjon, affektavflatning og likegyldighet. Negative og kognitive symptomer er ofte kroniske med langsiktige effekter på sosial funksjon. Positive symptomer kommer derimot ofte mer i perioder, selv om noen pasienter opplever langvarig påvirkning av symptomene (1). Ved kognitive symptomer, sees det at personer med schizofreni generelt presterer dårligere enn andre i et større spekter av kognitive funksjoner, for eksempel med hukommelse, oppmerksomhet og problemløsning (4).



Figur 1: Oversikt over positive-, negative- og kognitive symptomer på schizofreni (1, 4, 7).

1.1.2 Diagnostikk

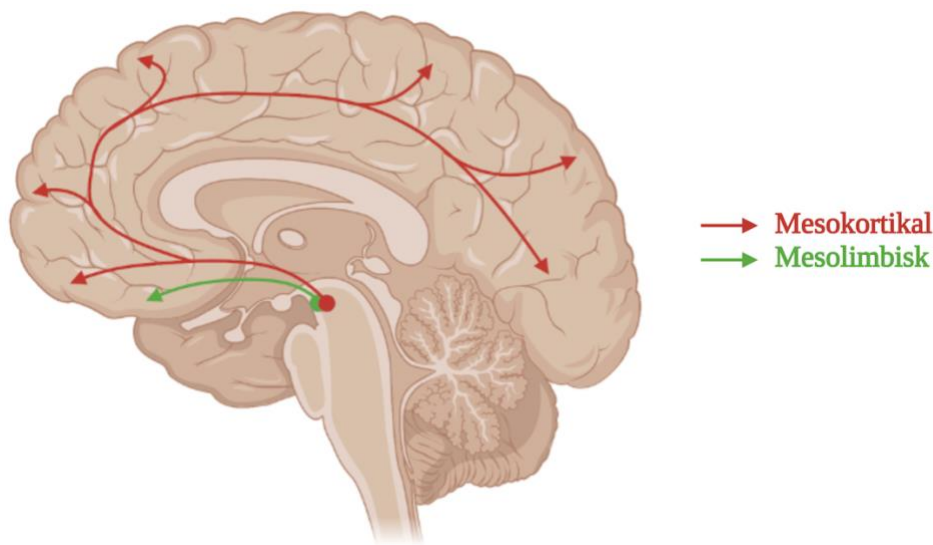
Symptomene på schizofreni overlapper ofte andre psykotiske lidelser, og derfor er det ingen spesifikke tester eller prøver som kan skille tilstanden fra andre lidelser. Ved noen tilfeller sees symptomer som er veldig typiske for schizofreni, mens i andre tilfeller observeres mer utypiske trekk, i tillegg til symptom bilder fra andre tilstander på en gang. Det er i tillegg viktig at man først utelukker somatisk sykdom som grunnen til symptomene (5).

Diagnosen "schizofreni" stilles med hjelp av kombinasjonen av subjektive symptomer, og observert atferd under samtale med lege (5, 10). Det kan også være nødvendig å snakke med familie og nære relasjoner for å undersøke atferden og hvordan denne eventuelt har endret seg. Forutsetningene for å stille diagnosen schizofreni er at man følger visse kriterier for symptomer. I Norge benytter man diagnosesystemene ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases) og DSM (Diagnostic and Statistical Manual) (10). For å vurdere alvorligheten av symptomene for diagnostisering bruker man en kvantitativ skala som kalles Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS). Her inkluderes atferdsdata i tillegg til et pasientintervju som er delt inn i fire faser: ikke-direktiv, semi-strukturert, strukturert og direktiv. 30 symptomer blir vurdert ut ifra en skala fra 1 til 7 (1= fraværende, 7= ekstrem), hvorav syv er positive-, syv er negative- og 16 er generelle symptomer. Poengsummene fra PANSS blir lagt sammen fra alle de vurderte symptomene og resultatet skal være veiledende for å bestemme diagnosen (11).

1.1.3 Patofysiologi

Den underliggende patofysiologien ved schizofreni er uavklart, og det finnes flere teorier som kan forklare symptombildet. Likevel er avvikende neurotransmisjon sentral, både for patofysiologien og farmakologisk effekt av antipsykotika. De fleste hypotesene sentrerer rundt et overskudd eller mangler av neurotransmittere, inkludert dopamin (DA), serotonin (5-HT) og glutamat (12).

Dopaminteorien kommer fra administrering av amfetamin som førte til en økt ekstracellulær konsentrasjon av dopamin i hjernen, som igjen kunne indusere psykotiske symptomer assosiert med schizofreni (13). Det er foreslått at positive symptomer kommer fra en overaktivitet av D₂-reseptorer i den mesolimbiske dopaminerge veien i hjernen. Det er også en sterk korrelasjon mellom reduksjon i D₂-aktivitet og antipsykotikas potens for å bedre positive symptomer (7). De negative symptomene stammer sannsynligvis fra en redusert neurotransmisjon i den mesokortikale banen hvor D₁-reseptorer dominerer (12). En teori foreslår også at kognitiv nedsettelse kan oppstå på grunn av denne underaktiviteten i mesokortikale dopaminerge nervebaner (5).



Figur 2: Mesokortikale- og mesolimbiske dopaminerge baner i hjernen. Redusert dopaminaktivitet i mesokortikal bane vil kunne indusere negative symptomer (12). Økt aktivitet i mesolimbisk bane kan indusere positive symptomer (7). Figur laget i BioRender.

En annen forklaring involverer den viktigste eksitatoriske neurotransmitteren i hjernen, glutamat. Denne teorien oppsto da man så på to glutamat-antagonister, ketamin og fensyklidin, og så at de induserte schizofreni-lignende symptomer (12). Glutamaterge nevroner spiller en kompleks rolle i å kontrollere aktiviteten til nervebaner i hjernen. *N*-metyl-d-aspartat (NMDA)-reseptorer er en type glutamatreseptor, og hypofunksjon her er vurdert å redusere aktiviteten i den mesokortikale nervebanen. Dette kan igjen føre til redusert DA-utslipp i prefrontal cortex, som videre kan indusere negative symptomer ved schizofreni (14). Dette kan forklares med at DA-nevroner kan være følsom for endringer i glutamاتفunksjon, og at dopaminforstyrrelsene da mulig kommer sekundært for endringer i glutamat- og NMDA-neurotransmisjon (13).

En tredje teori omhandler at kortikal hyperfunksjon via 5-HT_{2A}-reseptorer kan føre til positive psykotiske symptomer (15). Hypotesen om serotonin kom fra rapporter om hvordan LSD (lysergsyredietylamid) førte til hallusinasjoner og dets kobling til serotonin (14). Overaktivering av 5-HT_{2A} kan komme av overflødig frigjøring av serotonin eller økt uttrykking av 5-HT_{2A}-reseptorer. Uavhengig av mekanismen fører hyperfunksjonen til økt nedstrøms aktivitet av glutamat, som igjen kan aktivere den mesolimbiske dopaminveien og dermed gi psykotiske symptomer (15).

1.2 Behandling av schizofreni

Antipsykotika er legemidler som påvirker symptomer assosiert med blant annet schizofreni. Medikamentene vil ikke gjøre noe med selve sykdommen, og vil ikke helbrede årsaken til monoaminforstyrrelsen i hjernen, men kan motvirke effekten som kommer av endringer i nevrotransmisjon, og man vil kunne få en symptomatisk bedring (5, 16). Det skilles hovedsakelig mellom typiske og atypiske antipsykotika, og forskjellen mellom disse er først og fremst hvilke reseptorer de påvirker (17).

Behandlingen av schizofreni består også av ikke-medikamentelle tiltak. Pedagogisk opplegg er viktig da man lærer både pasient og familie å håndtere sykdommen. Det er også nyttig å trene på sosiale ferdigheter og mestre de forskjellige oppgavene man har i hverdagen (18). Personer med schizofreni kan delta i et opplæringsprogram om sykdommen, og forskning viser at man har lavere risiko for tilbakefall om man deltar på slike program (9).

1.2.1 Typiske antipsykotika

Typiske antipsykotika har farmakologisk effekt så og si utelukkende på DA-reseptorer, spesielt D₂, og er effektive mot positive symptomer (17, 19). Klorpromazin var det første typiske antipsykotiske legemidlet på markedet og ble oppdaget på 1950-tallet (19, 20). Legemidlet var det første som viste seg å redusere positive symptomer ved schizofreni, men var derimot ikke like god på å forbedre negative og kognitive symptomer, og hadde i tillegg mange alvorlige bivirkninger. I 1958 kom en annen gruppe typiske antipsykotika, blant annet haloperidol, som i dag er et av de mest foreskrevne antipsykotika (17).

Innen typiske antipsykotika skiller man ofte mellom lavdose- og høydose antipsykotika. For legemidlene i gruppen lavdose er som regel doser på 10 mg per døgn tilstrekkelig for effekt. Disse har en sterk virkning på DA-reseptorer, og pasienter er derfor også mer utsatt for ekstrapyramidale bivirkninger (EPS), slik som akatisi (sterk intro uro), akutt dystoni (ufrivillige muskelsammentrekninger) og tardive dyskinesier (ufrivillige bevegelser) (21). Man ser derimot liten sederende og antikolinerge effekter på grunn av lav affinitet på histaminerge og muskarinerge reseptorer. For legemidler i gruppen høydose antipsykotika trenger man oftest doser over 100 mg for å få tilstrekkelig effekt. Disse har derimot i større grad effekt på muskarinerge og histaminerge reseptorer, som igjen fører til økt risiko for sedasjon og antikolinerge effekter, men har demonstrert lavere risiko for EPS (22, 23).

1.2.2 Atypiske antipsykotika

Det første atypiske antipsykotika, klozapin, ble introdusert i klinikken tidlig på 1970-tallet (24), og ble i senere år etterfulgt av blant annet olanzapin, kvetiapin og aripiprazol (17). I motsetning til typiske antipsykotika, har atypiske antipsykotika vist effekt mot positive, negative og kognitive symptomer, og når legemidlene kom på markedet revolusjonerte de behandlingen av schizofreni. Dette kan forklares med at atypiske antipsykotika modulerer mer potent andre reseptorer i tillegg til D₂-reseptorer, spesielt 5-HT-reseptorer, men også noradrenalin og histaminreseptorer (5, 17). Spesielt viktig er antagonisme på 5-HT_{2A} som er forbundet med å lette de negative symptomene ved schizofreni (20). Denne multimodale virkningsmekanismen ligger antatt til grunn for den gunstige kliniske effekten av atypiske antipsykotika (17).

1.3 Klozapin

1.3.1 Historie

Klozapin ble først oppdaget ved Wander Laboratories i 1959 da de screenet for nye trisykliske antidepressiva (25). På den tiden trodde man at grad av antipsykotisk effekt var sammenfallende med ekstrapyramidale effekter. Ettersom ekstrapyramidale bivirkninger var begrenset med klozapin, som følge av lite utpreget dopaminerg blokkade, ble ikke substansen testet videre som et mulig legemiddel mot schizofreni. På 1970-tallet ble denne teorien om korrelasjon mellom ekstrapyramidale og antipsykotisk effekt utfordret av Stille og Hippus, som viste at klozapin hadde god antipsykotisk effekt (25). Dette legemidlet viste ikke bare effekt mot positive symptomer, men også negative symptomer, i tillegg til at det så ut til å hjelpe for mer alvorlig sykdom som ikke responderte godt på annen behandling (26).

Bruken av klozapin ble utbredt i flere deler av Europa, men på midten av 1970-tallet ble det rapportert om flere dødsfall i Finland grunnet agranulocytose (26, 27). Denne bivirkningen ga en drastisk reduksjon nøytrofile granulocytter (< 500 mm³), og medførte økt mottakelighet for infeksjoner, og i verste fall død (28). Klozapin ble derfor i mange land tatt av markedet, og man så med dette at mange pasienter som ikke responderte på annen antipsykotika fikk tilbakefall (29). Følgelig ble klozapin etter hvert reintrodusert i noen få land, men under strengt kontrollerte rammer med obligatorisk, rutinemessig monitorering av hvite blodceller (25). I 1990 ble klozapin godkjent av Food and Drug Administration for terapieresistent schizofreni (TRS) og legemidlet ble etter hvert reintrodusert i flere og flere land (29).

1.3.2 Indikasjon

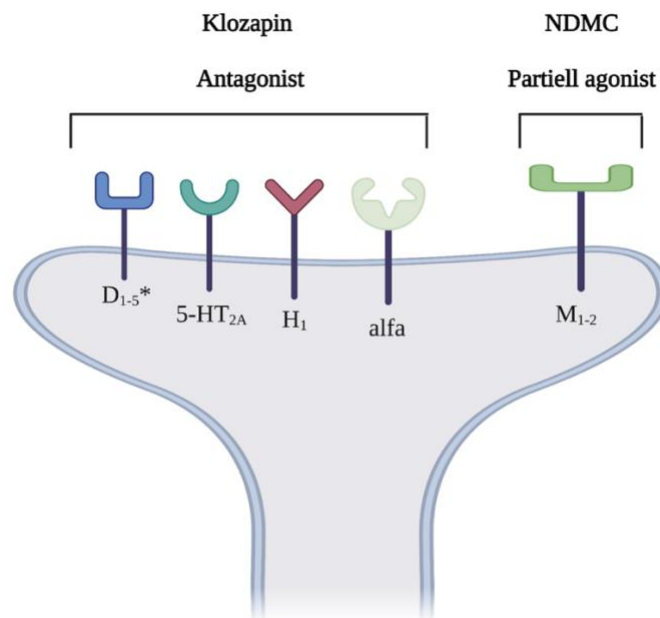
Til tross for at det finnes mange antipsykotika på markedet, utvikler likevel 20-30% av pasienter med schizofreni det som betegnes terapieresistent schizofreni. Definisjonen på TRS er ifølge Treatment Response and Resistance in Psychosis (TRRIP) utilstrekkelig respons på to ulike antipsykotika, hvorav minst ett skal være atypisk. Denne behandlingen skal vare over seks uker med doser ekvivalent til ≥ 600 mg klorpromazin daglig. Det er også viktig at riktig diagnose er konstatert, og at tilstrekkelig etterlevelse følges opp (30). Schatzberg *et al.* beskriver at rundt 30% av ikke-responderende pasienter i henhold til TRRIP, vil respondere på klozapin over en periode på 12 uker. De viser også gjennom studier betydelige forbedringer på livskvalitet, både med tanke på jobbrelatert aktivitet og reinnleggelser (27). Klozapin har altså vist overlegen effekt på å forbedre kliniske utfall for pasienter med TRS (25). En forklaring på hvorfor det ikke brukes tidligere i behandlingsforløpet kan være begrenset erfaring hos klinikere, frykt for alvorlige bivirkninger, dårlig kontroll på etterlevelse eller på grunn av kravet om intensiv blodcellemonitorering (31, 32, 33).

1.3.3 Farmakologiske egenskaper

Farmakodynamikk

Klozapin er et atypisk antipsykotikum, som utøver sin effekt via flere type reseptorer. Årsaken(e) til klozapins overlegne kliniske effekt overfor andre antipsykotika er uklart, men er ulik andre atypiske antipsykotika når det gjelder reseptorantagonisme (20). Legemidlet har blant annet høy affinitet som antagonist på dopamin D₁- og D₃₋₅-reseptorer, mens D₂-blokaden er begrenset (34, 35), noe som skiller seg fra andre antipsykotika. Den lavere antagonismen på D₂ kommer av at klozapin har raskere dissosiasjon fra reseptoren enn andre antipsykotika, noe som gir god antipsykotisk effekt og færre bivirkninger assosiert med D₂-reseptorbinding (36).

I likhet med andre atypiske antipsykotika virker klozapin som en antagonist på serotonerge reseptorer med spesielt høy affinitet for 5-HT_{2A}, men binder seg løsere på reseptoren enn andre atypiske antipsykotika, for eksempel olanzapin og aripiprazol (20). Legemidlet har også potent antagonisme på histaminerge H₁-reseptorer, og alfa-adrenerge reseptorer (27, 37). Klozapin er i tillegg det eneste antipsykotiske legemidlet som ikke er et substrat for efflukstransportøren P-glykoprotein, som blant annet finnes i blod-hjerne-barrieren. Dette kan bidra til økt vevspenetrasjon til hjernen og dermed økt legemiddelkonsentrasjon tilgjengelig ved respektive reseptorer. Den aktive metabolitten *N*-desmetylklozapin (NDMC) har også vist effekt på de muskarinerge reseptorene M₁ og M₂, men da som partiell agonist. Dette kan trolig forklarer den gunstige effekten på de kognitive symptomene (20).



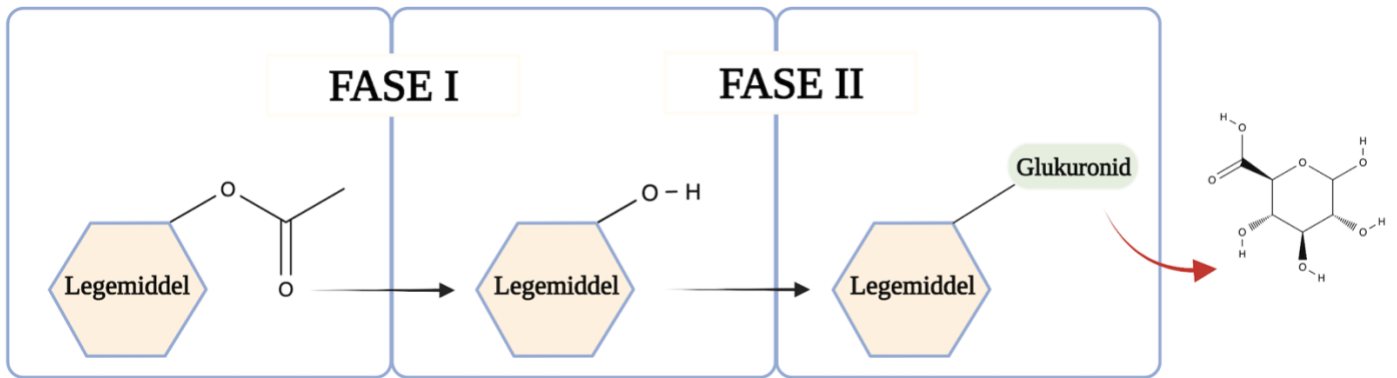
Figur 3: Forenklet illustrasjon av postsynaptisk nevron med reseptorer klozapin har en virkning på. *Klozapin har høy affinitet på D₁ og D₃₋₅, men mer begrenset D₂ antagonisme. NDMC= N-desmetylklozapin. Figur laget i BioRender.

Farmakokinetikk

Etter en oral dose blir klozapin raskt og nesten fullstendig absorbert med en maksimal konsentrasjon etter 1 ½- 2 timer. Klozapin har en oral biotilgjengelighet på 50%, distribusjonsvolum på 1.6 L/kg og halveringstid på 12 timer (6-12 timer) (38, 39). Klozapin blir eliminert via urin og fekalit hvor henholdsvis 50% og 30% som metabolitter (39). På grunn av den korte halveringstiden til legemidlet er det ofte behov for å dosere flere ganger daglig for å holde seg over en terskelverdi rundt 350 ng/ml (39, 40).

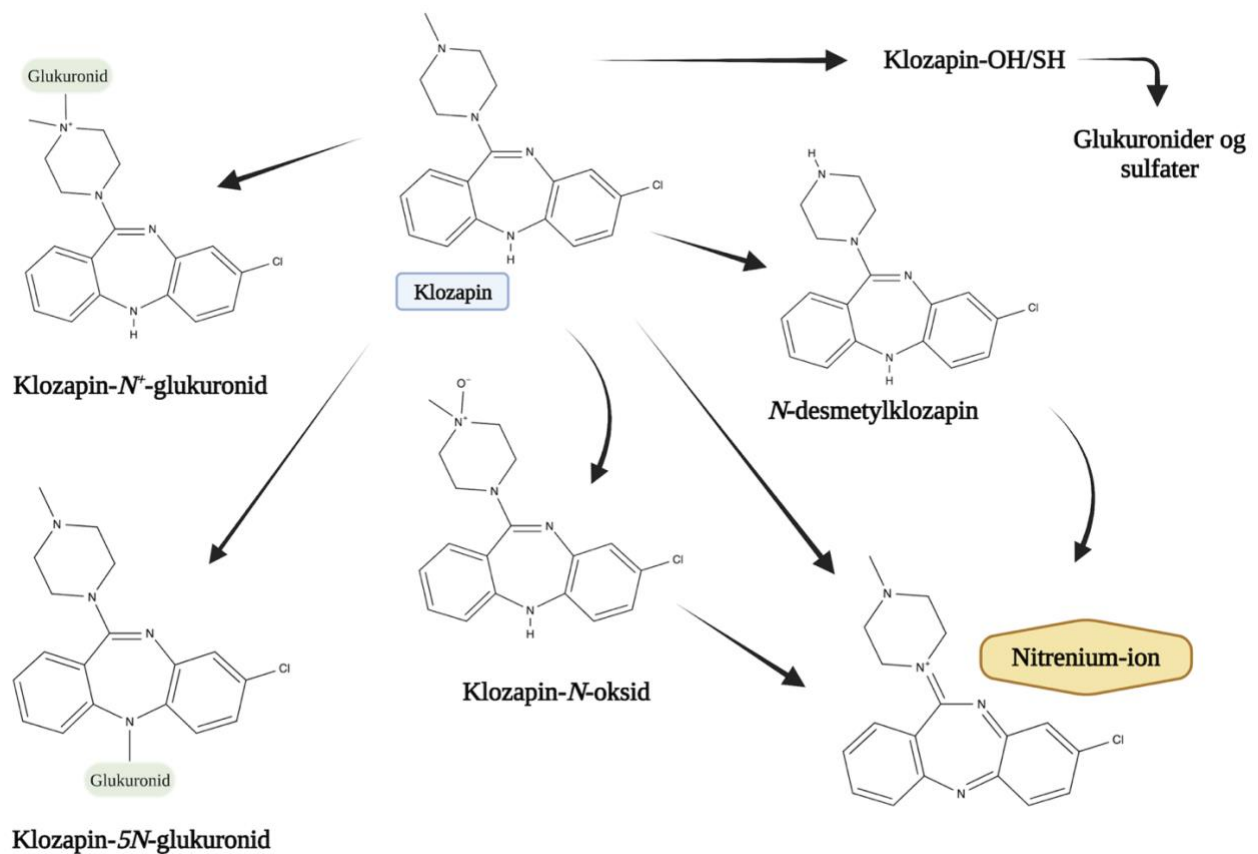
1.3.4 Metabolisme

Legemidler regnes som eksogene og kroppsfremmede stoffer, og vil derfor bli forsøkt skilt ut av kroppen (41). Vannløselige legemidler vil ofte skilles ut uforandret i nyrene, mens fettløselige forbindelser trenger omdanning til mer vannløselige metabolitter for å kunne skilles ut (42). Slik omdanning av legemidler foregår for det meste i leveren, og består i prinsippet av to trinn, såkalte fase-I og -II reaksjoner. Ved fase-I reaksjoner skjer det en kjemisk modifisering som endrer strukturen til legemidlet. Dette skjer normalt ved oksidering, reduksjon og hydrolyse, noe som vil gjøre molekylet mer polart (43). Ofte er ikke dette tilstrekkelig og legemidlet må gjennom videre omdanning for å bli et enda mer vannløselig molekyl. Dette skjer via fase-II reaksjoner, og her blir molekylet konjugert med større polare molekyler, slik som glukuronsyre eller sulfat. De mest sentrale enzymene ved fase-I reaksjoner er cytokrom P450-enzymene (CYP-enzymene), og for fase-II er uridindifosfat-glukuronosyl-transferase (UGT)-systemet viktigst (42).



Figur 4: Eksempel på fase I- og II metabolisme til mer polare legemiddelmolekyler. Figur modifisert fra Ritter et al (7), og laget i BioRender.

Klozapin metaboliseres av flere isoformer av CYP-familien. CYP1A2 er sentral i metabolismen av legemidlet, mens CYP2C9, CYP2D6 og CYP3A4 bidrar i en mindre grad (44). *In vitro* studier foreslår at CYP3A4 og CYP1A2 er enzymene som bidrar mest, med 70% for CYP3A4 og 15% for CYP1A2, og at CYP2D6 spiller en mindre rolle. Studier som er gjort *in vivo* viser derimot at det er CYP1A2 som er det viktigste enzymet som metaboliserer klozapin (45).

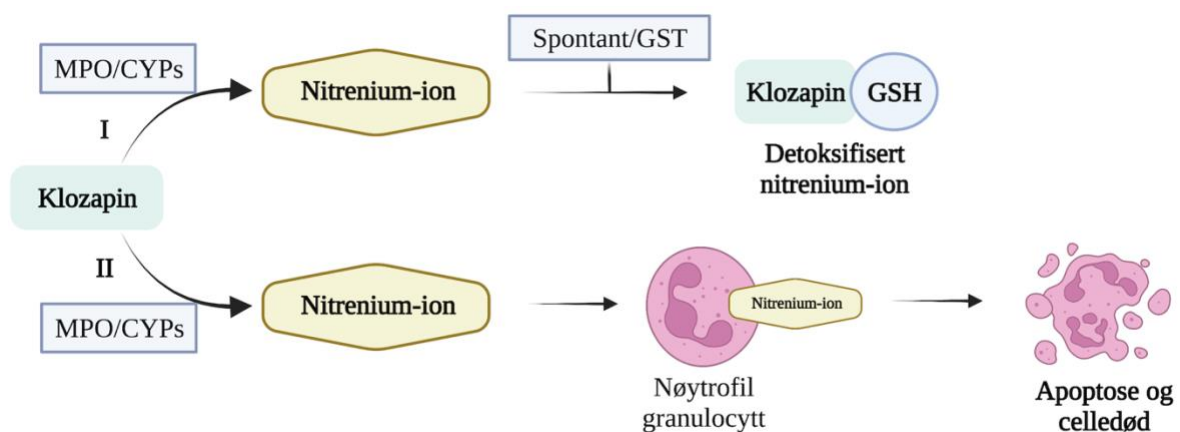


Figur 5: Metabolisme av klozapin til N-desmetylklozapin, klozapin-N-oksid, klozapin-5N-glukuronid, klozapin-N⁺-glukuronid, andre glukuronider og sulfater, og toksisk nitrenium-ion. Forenklet figur modifisert fra Dragovic et al (46). Figur laget i BioRender.

Klozapin gjennomgår omfattende levermetabolisme (45). En av hovedmetabolittene til klozapin er *N*-desmetylklozapin som i hovedsak blir dannet via CYP1A2, og er en aktiv metabolitt med antipsykotisk effekt (47). Denne metabolsimeveien via CYP1A2 er hovedveien for demetylering og er vurdert å kunne forklare rundt 70% av metabolismen til klozapin (48). CYP3A4 og flavin monooksygenase 3 er trolig ansvarlig for dannelse av den andre hovedmetabolitten klozapin-*N*-oksid (47). Denne metabolitten er farmakologisk inaktiv, men kan igjen omdannes tilbake til klozapin (45). Andre metabolsimeveier av klozapin omfatter hydroksylering, sulfatisering og glukuronidering, hvor de to sistnevnte skjer sekundært etter en fase I-reaksjon (46). Klozapin blir glukuronidert via ulike UGTs til blant annet klozapin-5*N*-glukuronid og klozapin-*N*⁺-glukuronid, hvor UGT1A4 er mest sentral i omdanningen (49). Se figur 5 for illustrasjon av metabolsimeveier.

1.3.4.1 Nitrenium-ion og klozapin-glutation

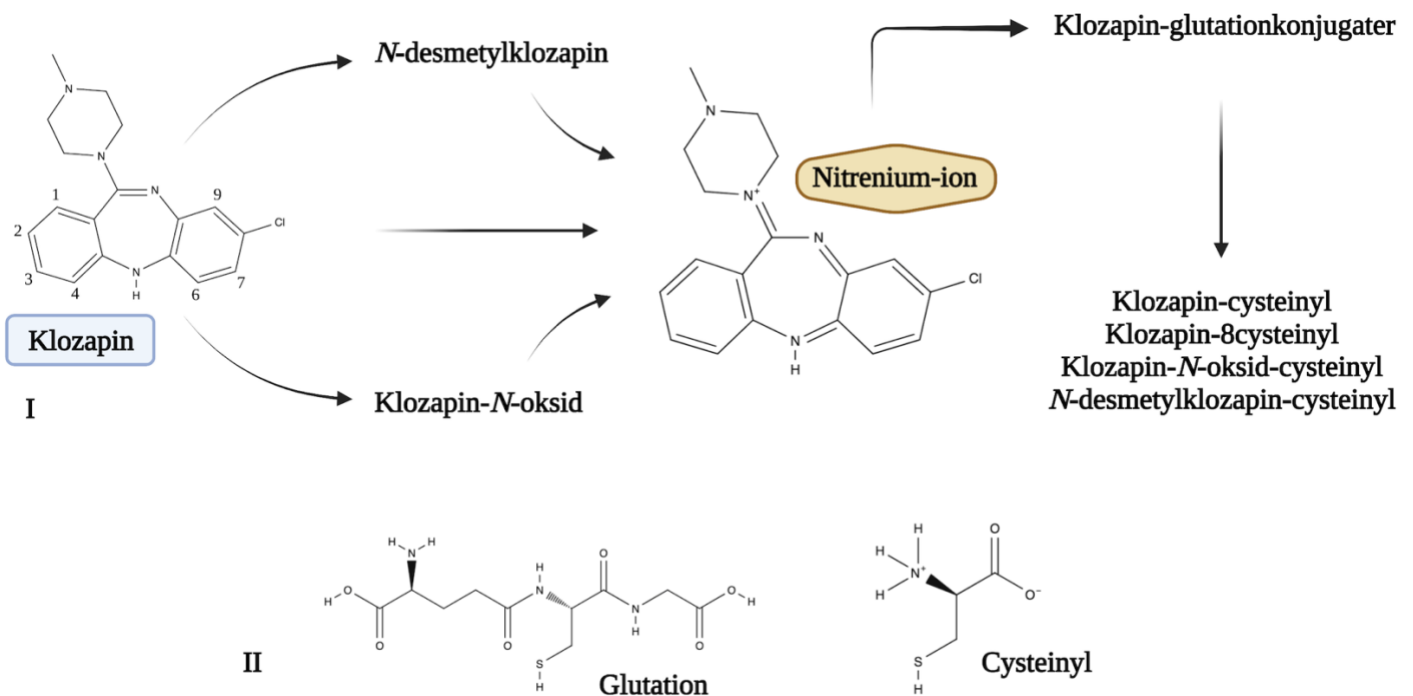
Etter metabolisme til primære metabolitter er det vist at både klozapin, *N*-desmetylklozapin og klozapin-*N*-oksid kan omdannes til reaktive intermediater, før de metaboliseres til andre sekundære metabolitter av legemidlet (50). Et av disse intermediatene er et nitrenium-ion, og er foreslått å kunne forårsake toksisitet på nøytrofile granulocytter ved kovalent, irreversibel binding til immuncellene, som trolig etterfølges av apoptose og celledød (20, 46, 51). Denne bindingen er antatt å ligge til grunn for klozapin-indusert agranulocytose (51). Nitrenium-ion dannes trolig av myeloperoksidaser (MPO) og CYP-enzymmer, antagelig CYP3A4 og CYP2D6, og inaktiveres via glutation (GSH)-konjugering spontant eller via enzymet glutation-S-transferase (GST) (46, 52).



Figur 6: Foreslått mekanisme for **I)** dannelse og detoksifisering av nitrenium-ion, og **II)** klozapin-indusert agranulocytose. MPO= myeloperoksidase, CYP= Cytokrom P450, GST= glutation-S-transferase, GSH= glutation. Figur laget i BioRender.

Glutation er et tripeptid (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycin) som finnes i vev hos alle pattedyr og er en viktig beskytter mot oksidativt stress. Glutation er i tillegg viktig for detoksifisering av xenobiotika og deres metabolitter, regulering av cellyklus og apoptose, og modulering av immunfunksjon (53). Glutation binder seg til xenobiotika, for eksempel nitrenium-ion via tioleter binding spontant, eller katalysert av GST, før glutations-

konjugatet blir omdannet til et cysteinylglycin-konjugat av g-glutamyltransferase. Reaksjonen videreføres med dannelse til cysteinyl-derivater via peptidaser. Disse er mer stabile og vannløselig enn den opprinnelige toksiske substansen, og vil enklere elimineres fra kroppen (54). Nitrenium-ion er så reaktivt og ustabil at det ikke kan påvises *in vivo* (55). Det finnes per dags dato heller ingen metode som kan identifisere klozapin-glutation-konjugater i pasientserum, men cysteinylmetabolitter kan påvises *in vivo* og er en metabolittprofil som i dag kan benyttes i rutinemessig terapeutisk legemiddelmonitorering.



Figur 7: I) Metabolisme av klozapin til *N*-desmetylklozapin og klozapin-*N*-oksid, før videre omdanning til nitrenium-ion, glutation-konjugater og cysteinylmetabolitter. Glutation-konjugeringen skjer vanligvis på posisjon 6-, 7- og 9-posisjon, før videre omdanning til cysteinylmetabolitter på samme posisjoner (46). **II)** struktur for glutation og cysteinyl (56). Figur laget i BioRender.

In vitro inkubasjoner med klozapin, levermikrosomer og GSH har vist dannelse av flere GSH-konjugater, både ved 6-, 7-, og 9-posisjon (figur 7). Disse konjugatene kan komme fra detoksifisering av nitrenium-ion. I mikrosomale inkubasjoner er det også vist at nitrenium-ion kan fanges kjemisk av GSH, som fører til dannelse av flere GSH-konjugater (46). Studier har også vist at pasienter som brukte klozapin hadde lavere nivåer av redusert glutation i nøytrofiler. Det er i tillegg vist at om man tilfører redusert glutation så minsker man cytotoxicitet induisert av den reaktiv metabolitten (52, 57).

1.3.4.2 Farmakologisk variasjon

Klozapin har ved standard doser vist varierende serumkonsentrasjoner hos pasienter på grunn av forskjeller i legemiddelmetabolisme (58). Slik interindividuell farmakologisk variasjon kan skyldes faktorer som kjønn, alder, genetikk, infeksjoner, interagerende legemidler og røykevaner (49, 59). Det er derfor viktig å kartlegge faktorer som fører til farmakologisk variasjon, da klozapin har en klar sammenheng mellom serumkonsentrasjon og klinisk effekt (60).

Interagerende legemidler

En legemiddel-legemiddelinteraksjon oppstår når den farmakologiske effekten av et legemiddel påvirkes av et annet (61). Slik interaksjon inkluderer hemming og indusering av de metaboliserende enzymene, noe som kan føre til henholdsvis reduserte eller økte nivåer av metabolitten(e), og igjen økte eller reduserte nivåer av modersubstans. Konsekvensene av dette avhenger om modersubstansen eller metabolitten er ansvarlig for terapeutisk effekt eller toksisitet, og igjen omfanget av dette. Man kan altså få både økt eller redusert toksisk- eller farmakologisk effekt av enzymhemming og enzyminduksjon (62).

Fluvoksamin, en selektiv 5-HT reopptakshemmer (SSRI) brukt i behandling av depresjon og angst, er et viktig eksempel på en enzymhemmer med et stort interaksjonspotensiale (44). Legemidlet er en potent hemmer av CYP1A2, i tillegg til at det også hemmer CYP3A4 og CYP2D6 i mindre grad. Det betyr at fluvoksamin hemmer metabolismen av klozapin, som da både endrer nivåer av modersubstans og metabolitt(er). Tilleggsbehandling med fluvoksamin benyttes noen ganger som en strategi for å oppnå økt klozapinkonsentrasjon uten å øke dosen (63). Denne interaksjonen fører til en økt klozapin-NDMC-ratio, altså lavere plasmanivåer av NDMC ved å hemme CYP1A2 (44). Paroksetin er et annet eksempel på SSRI som ofte brukes sammen med klozapin. Legemidlet er en potent CYP2D6-hemmer, men ser ikke ut til å ha noen klinisk relevant effekt på metabolismen av klozapin (64), trolig fordi CYP2D6 har en mindre betydning i klozapinmetabolismen (45).

Substanser som induserer legemiddelmetabolisme, virker ved å stimulere produksjonen av nye enzymproteiner. Eksempler på legemidler som induserer metabolismen av klozapin er fenytoin, karbamazepin og fenobarbital (65).

Valproat brukes ofte som profylakse sammen med klozapin for å forebygge epileptiske anfall hos pasienter med psykotiske lidelser (49). Legemidlet brukes også hos pasienter med schizofreni på grunn av stemningsstabiliserende egenskaper i subpopulasjoner med schizoaffektive lidelser. I kombinasjonen med klozapin og valproat er det rapportert flere kasuistikker med økt risiko for reduksjon i antall hvite blodceller, og videre agranulocytose (66, 67). Legemidlet kan påvirke aktiviteten av flere UGT- og CYP-enzymmer involvert i metabolismen av klozapin via hemming og/eller induksjon, da valproat også har en kompleks metabolisme som involvere flere av de samme enzymene. Mekanismen bak valproats påvirkning på klozapins metabolisme er ikke fullstendig klarlagt (68). Det er derimot observert at samtidig bruk av valproat med klozapin har vist å redusere NDMC-nivåer uten å påvirke serumkonsentrasjonen av klozapin (69), men samtidig øke omdanningen til andre metabolitter og nedstrøms NDMC metabolitter (68).

Røyking

En metaanalyse fra 2005 undersøkte røykevaner blant personer med schizofreni, og studien viste at personer med schizofreni hadde opptil fem ganger høyere sannsynlighet for å være røyker sammenlignet med resten av populasjonen (70). Sigarettøyk er en kjent enzyminduser av CYP1A2 (49). Aromatiske hydrokarboner fra sigarettøyken induserer metabolismen av klorzapin ved oppregulering av CYP1A2 ekspresjonen, som gjennomsnittlig reduserer klorzapinkonsentrasjonen med 30-50% (20, 71). Dosebehovet av klorzapin vil dermed være dobbelt så høyt hos en røyker sammenlignet med en ikke-røyker. Det betyr samtidig at man derfor må være forsiktig når en pasient slutter å røyke, da pasienten vil få betydelig økt serumkonsentrasjon av klorzapin, og fare for bivirkninger, hvis man ikke er observant på å redusere dose parallelt (65).

Farmakogenetikk

Interindividuell forskjell i respons og bivirkninger på en legemiddeldose kan også komme av polymorfisme i spesifikke gener, som koder for produkter som er avgjørende i legemiddelmetabolisme. Det er identifisert minst 57 ulike CYP-varianter, som igjen kan klassifiseres i flere familier og subfamilier ut ifra variasjon i gen-sekvenser (72). Disse forskjellene kan gi utslag i forskjellige fenotyper, og basert på genetisk polymorfisme ser man vanligvis fire ulike CYP-profiler: langsom omsetter, intermedier omsetter, normal omsetter og ultra-rask omsetter (44). Mangfoldet i CYP genotyper kan da gi utslag i form av langsommere eller raskere legemiddelmetabolisme, altså høyere eller lavere serumkonsentrasjon av legemidlet. Det kan også resultere i mindre effektiv- eller avvikende aktivering av prodrugs (72). Under er det beskrevet noen eksempler på genetisk variasjon som kan resultere i ulik respons og bivirkninger av klorzapin.

CYP1A2 er som beskrevet tidligere et sentralt og viktig enzym i omsetningen av klorzapin (73). Nylig viste en genomomfattende assosieringsstudie at et allel av CYP1A (*rs2472297*) (CYP1A-T) var assosiert med en reduksjon i klorzapinkonsentrasjon. Reduksjonen var ekvivalent til en nedgang på 50 mg per dag i klorzapindose (74). Denne varianten må imidlertid studeres videre i detalj for å avklare den faktiske kliniske relevansen, og justeres for røykevaner. En studie av Smith *et al.* identifiserte en ny variant av et gen som koder for nuclear factor 1 B (NFIB) (59). Når man justerer for røykevaner viser denne varianten assosiasjoner med økt metabolisme av klorzapin, og dermed redusert serumkonsentrasjon. Heterozygote bærere av NFIB *rs28379954T>C* (NFIB-C) viste 38 % lavere dosejusterte serumkonsentrasjoner av klorzapin sammenlignet med homozygote bærere av allelet (*rs28379954T*). Pasientene med NFIB-C hadde subterapeutiske konsentrasjoner av klorzapin i serum uansett røykestatus. Siden sigarettøyk alene kan føre til lavere serumkonsentrasjoner, vil pasienter som røyker og er bærer av NFIB-C være spesielt utsatt for terapivikt (59).

Vasudev *et al.* undersøkte i en studie hvordan genetiske polymorfisme kan påvirke klorzapin-induserte bivirkninger (75). Ett av funnene var at pasienter som røyker og er bærere av genotypen *CYP1A2*1F A/A* har en 4.6-ganger høyere odds for metabolsk syndrom sammenlignet med bærere av *CYP1A2 C/C*. De beskrev også at høyere blodkonsentrasjoner av klorzapin var klart assosiert med høyere odds for metabolsk syndrom (75). Dette kan tyde på en assosiasjon mellom redusert metabolisme og fare for metabolske bivirkninger.

Det er flere eksempler på genetisk polymorfisme som kan forklare noe av variasjonen i klozapin serumkonsentrasjon og dermed effekt. Over er det beskrevet variasjoner i CYP1A2, men det er også observert polymorfisme blant annet i genetiske varianter av CYP2C19 (76), som igjen kan gi variasjon i konsentrasjon av klozapin i serum. Polymorfisme i UGTs kan også forekomme, og det er beskrevet at to varianter (*rs61750900* og *rs2011425*) kan øke utskillelsen av en av klozapins metabolitter, *N*-desmetylklozapin, og igjen påvirke effekt og bivirkningsprofil (77).

Alder, kjønn og etnisitet

I noen studier var høyere alder assosiert med økte serumkonsentrasjoner av klozapin, men ikke i andre (78). En studie viste derimot en signifikant økning av klozapin i serum hos pasientene over 45 år, sammenlignet med gruppen mellom 18-26 år (79). Dette kan forklares med fysiologiske endringer som følge av alderdom, som igjen kan påvirke evnen til å metabolisere klozapin (80). Det er også vist at kvinner kan få høyere serumkonsentrasjon fordi østrogen hemmer CYP1A2. En studie fra 2017 observerte at alder og kjønn hadde en stor påvirkning på serumkonsentrasjon av klozapin. De beskrev at dosejusterte konsentrasjoner for pasientene på 80 år var dobbelt så høye som for pasientene på 40 år. De beskriver også at kvinnene i studien generelt hadde 20-30% høyere dosejusterte serumkonsentrasjoner enn menn (81). Variasjon i serumkonsentrasjon relatert til etnisitet kan også forekomme (81), og tilhørighet til sør-Asia er et eksempel på hvor man kan få økt klozapin serumnivå på grunn av lavere CYP1A2-aktivitet (82). Forskjeller i metabolisme med bakgrunn i etnisitet kan forklares med ulik kroppssammensetning, variasjon i genetikk og epigenetikk (83), i tillegg til forskjellig matvaner og andre miljøfaktorer (7).

1.3.5 Bivirkninger

Klozapin er vist å være et av de mest effektive antipsykotika mot schizofreni (52). Rundt 20% av pasientene avslutter likevel behandlingen, og av disse terminerer 60% behandlingen på grunn av bivirkninger (47). Klozapin og dets metabolitter bindes uselektivt til mange reseptorer, noe som kan være opphav til flere ulike negative effekter (20), og legemidlet er begrenset i bruk på grunn av faren for de alvorlige bivirkningene (44). Mekanismen bak alle bivirkningene er enda ikke fullstendig klarlagt, men det er foreslått at dannelsen av reaktive nitrenium-ioner er sentral for de alvorlige effektene av klozapin (52).

1.3.5.1 Agranulocytose

Bivirkningen av klozapin som gir størst opphav til bekymring er agranulocytose, og er definert som antall nøytrofile granulocytter $< 500 \text{ mm}^3$ (84). Nøytrofile granulocytter er en type leukocytter (hvite blodceller), er en del av immunsystemet (85) og reduksjon i disse cellene kan føre til alvorlige og fatale infeksjoner (86). Man ser økende insidens med høyere alder og hos kvinner, og risiko for agranulocytose er ikke avhengig av klozapindosen (87). Årsakene til agranulocytose er ikke fullstendig kartlagt, men man har teorier (87). Noen av disse er komplekse immunologiske interaksjoner, genetiske disposisjoner og direkte toksiske effekter (55). Det faktum at risiko for klozapin induert agranulocytose er vist å være assosiert med spesifikke humane leukocyt antigen genotyper, tyder også på at reaksjonen er immunmediert (88).

En studie av Fehsel *et al.* viste at klozapin fører til oksidativt stress i nøytrofile granulocytter hos alle klozapinpasientene i studien, og at legemidlet øker uttrykkning av gener som induserer apoptose hos disse leukocytene (89). En annen studie beskriver at binding til nitrenium-ion trigger apoptose av granulocytter (28). Denne påvirkningen på granulocytene trenger derfor tett oppfølging med hematologisk monitorering (87). Ved bruk av klozapin er prevalensen av agranulocytose omtrent 1%, og insidensen er høyest cirka én måned etter oppstart med klozapinbehandling (90), men tilstanden kan forekomme helt til uke 20 i behandlingen før risikoen avtar (91). Bivirkningen kan heldigvis reverseres uten hematologiske følger om klozapinbehandlingen stoppes i tide (92).

1.3.5.2 Andre bivirkninger

I tillegg til agranulocytose har klozapin flere alvorlige bivirkninger (93). Nøytropeni er som agranulocytose, en reduksjon i hvite blodceller. Denne bivirkningen er ikke fullt like alvorlig, og oppstår når antall nøytrofile granulocytter kommer under 1500 mm^3 , men man må også her følge opp med hematologisk monitorering (20). Myokarditt er en inflammatorisk betennelse i hjertemuskulaturen og kan oppstå i løpet av de første to månedene med klozapinbehandling (93). Kardiomyopati er en mer kronisk hjertetilstand enn myokarditt, men begge er assosiert med alvorlig sykелighet og dødelighet (94). Hjerte-bivirkningene er sjeldne, og mekanismene er ikke fullstendig klar. En teori er hypersensitivitetsreaksjoner fra selve klozapinmolekylet eller eventuelle kardiotoxiske metabolitter (95). Den mest alvorlige doseavhengige bivirkningen er tonisk-kloniske anfall. Risikoen ser ut til å øke med en faktor på fem med serumkonsentrasjoner av klozapin over 750 ng/ml, men det er også observert anfall i området mellom 200-300 ng/mL. Dette viser at man ser klar doseavhengighet, men at det likevel er individuell variasjon i mottakelighet for anfall (20).

Klozapin i seg selv er knyttet til risiko for kognitiv nedsettelse på grunn av antagonisme på muskarinerge reseptorer (M_1 , M_3 , M_5). NDMC er i motsetning en agonist på reseptorene, og kan motvirke disse effektene. Forholdet mellom klozapin og NDMC kan variere mye, noe som gir opphav til stor variasjon i nedsetting av kognitive funksjoner. I tillegg er NDMC forbundet med flere negative effekter forbundet med forstyrrelser i nivåer av lipider og glukose, sedasjon, hypersalvering, forstoppelse og vektøkning (96). Vektøkning av klozapin har man observert i forbindelse med klozapins antagonisme på subtype histamin H_1 og 5-HT_{2C} -reseptorer (75). Oksidativt stress induisert av klozapin er i tillegg assosiert med endringer i lipid og glukosenivåer, hypersalvering, og i en mindre grad kardiotoxisitet (47). Hypersalvering kan forekomme på grunn av agonisme på M_4 av klozapin eller agonisme av NDMC på andre muskarinerge reseptorer, og flere studier at vist at det er i hovedsak NDMC som initierer denne bivirkningen (97).

BIVIRKNINGER AV KLOZAPIN	
Agranulocytose	Kognitiv nedsettelse
Nøytropeni	Metabolske forstyrrelser
Myokarditt	Hypersalvering
Kardiomyopati	Sedasjon
Tonisk-kloniske anfall	Forstoppelse

Figur 8: Oversikt over bivirkninger av klozapin beskrevet i oppgaven.

Forstoppelse er også en vanlig bivirkning av klozapin, da legemidlet nedsetter gastrointestinal motilitet via antikolinerg effekt på muskarinerge M₃ reseptorer i tarmveggen. Perifer serotonerg effekt av klozapin kan også tenkes å forverre denne effekten da serotonin har en sentral effekt på gastrointestinal motilitet (98). Sedasjon er en hyppig observert doseavhengig bivirkning av legemidlet, og effekten kommer trolig av klozapin selv, med binding på histamin H₁-reseptorer i hjernen (99). En bivirkning som forekommer hos de fleste pasientene er metabolsk syndrom, som forbindes med forstyrrelser i glukose, insulin, lipider og kroppsfett (100). Antagonisme på histamin H₁ og 5-HT_{2C/2A} reseptorer har vist effekter på økt appetitt og vektøkning, i tillegg til agonisme på 5-HT_{1A} (101). To metaanalyser så en sammenheng mellom polymorfisme i det serotonerge systemet og klozapinindusert overvekt, noe som kan forklare deler av variasjonen man ser på vektøkning på antipsykotika (102, 103).

1.3.6 Terapeutisk legemiddelmonitorering

Terapeutisk legemiddelmonitorering er tolkning og kvantifisering av blodkonsentrasjoner av legemidler for å optimalisere farmakoterapi (104). På bakgrunn av at klozapin har stort potensiale for toksisitet og varierende respons hos pasienter, har man et behov for å kartlegge plasmakonsentrasjonen av klozapin ved en gitt dose (38). Slik terapeutisk legemiddelmonitorering av klozapin kan hjelpe med å minimere doserelaterte bivirkninger, justere og optimalisere dosen og se på etterlevelsen av behandlingen (83).

Ved røyking kan legemiddelkonsentrasjonen av klozapin i blod reduseres, da sigaretttrøyk induserer CYP1A2. Pasienter som røyker kan derfor ha behov for doseøkning, og dette bør kontrolleres ved hjelp av TDM. Klozapin har et terapeutisk vindu mellom 350-600 ng/mL (104). Dette intervallet er ikke noen fasit for hver enkelt person, men sannsynligheten for effekt er høyere, og sannsynligheten for bivirkninger lavere om man holder seg innenfor dette intervallet (20). Om pasienten da får tilbakefall, alvorlige bivirkninger, symptomforverring eller uønskede legemiddelinteraksjoner, kan man bruke TDM for å se om for eksempel etterlevelse eller farmakokinetiske endringer er grunnen til endringene i behandlingen. Det kan også benyttes blodkonsentrasjonsmålinger når pasienten har oppnådd ønsket klinisk effekt, og denne konsentrasjonen kan sees på som optimal for den enkelte. Når det kommer til klozapin er det en sterk sammenheng mellom klozapinkonsentrasjon i blod, effekt og forekomst av visse bivirkninger, noe som gjør TDM nyttig (104).

1.4 Hensikt

Klozapin har vist overlegen klinisk effekt sammenlignet med andre antipsykotika, og med en unik farmakologisk profil er legemidlet det eneste godkjent for bruk ved terapieresistent schizofreni. Bruken av klozapin er begrenset til indikasjonen terapieresistent schizofreni, blant annet på grunn av risiko for alvorlige bivirkninger, og da spesielt agranulocytose. Studier har vist at dannelse av reaktive nitrenium-ioner kan forårsake granulocyttoxisitet ved bruk av klozapin, og at ulike CYP-enzymmer og myeloperoksidaser medierer denne dannelsen. Disse nitrenium-metabolittene detoksifiseres via glutationkonjugering, og klozapin-glutation metaboliseres videre til klozapin-cysteinylnmetabolitter *in vivo*.

Denne masteroppgaven har som hensikt å undersøke om legemidler som ofte kombineres med klozapin, og som har evnen til å påvirke aktiviteten til en rekke metaboliserende enzymmer, har effekt på omdanning av klozapin til nitrenium-metabolitter. Oppgaven er todelt og har følgende delmål:

1. Studere hvordan ulike legemidler som interagerer med CYP-enzymmer påvirker dannelsen av klozapin-cysteinylnmetabolitter *in vivo*.
2. Studere hvordan ulike legemidler som interagerer med CYP-enzymmer påvirker dannelsen av klozapin-glutationmetabolitter *in vitro*, ved inkubasjon med humane levermikrosomer.

2 Metode

2.1 Effekt av komedikasjon med interagerende legemidler på dannelse av klozapin-cysteinylnmetabolitter *in vivo*

2.1.1 Pasientpopulasjon

Denne delen av masteroppgaven ble gjennomført som en retrospektiv observasjonsstudie basert på data fra rutinemessig terapeutisk legemiddelmonitorering utført ved Senter for Psykofarmakologi (SFP). SFP mottar årlig flere tusen blodprøver til analyse fra primær- og spesialisthelsetjenesten i hele landet, men hovedsakelig innen Helse Sør-Øst. Pasientpopulasjonen besto av pasienter med terapieresistent schizofreni og alle pasientene i studien er norske innbyggere bekreftet med norske personnummer. Sammen med serumprøven følger rekvisisjonsskjema som kan inneholde følgende opplysninger: rekvirert blodkonsentrasjonsanalyse av legemiddel, røykestatus, kjønn, komedikasjon, legemiddeldose og tid mellom siste doseinntak og blodprøvetaking.

Bearbeiding av personsensitive data ble utført i aidentifisert form på sikre stasjonære datamaskiner ved SFP. Masterprosjektet var forhåndsgodkjent av regional etisk komite (REK-nummer: 9393) uten krav om informert samtykke, da oppgaven er basert på historiske data uten risiko eller belastning knyttet til deltagelse hos pasientene.

2.1.2 Inklusjons- og eksklusjonskriterier

Masteroppgaven inkluderte data fra serumkonsentrasjonsanalyser av klozapin utført i perioden 1. mars 2019 til 20. august 2022. For å inkludere pasienter i datamaterialet skulle pasienten ha brukt klozapin med påvist klozapin- og *N*-desmetylklozapinkonsentrasjon i blod i dette tidsrommet. I tillegg ble det innhentet informasjon om alder, kjønn, røykestatus, dosering og tidsintervall mellom dosering og prøvetidspunkt. Om det var flere prøver per pasient, ble den siste prøven inkludert som oppfylte kriteriene.

For å identifisere pasienter som samtidig brukte interagerende legemidler sammen med klozapin, ble det ekstrahert ut filer basert på rekvisisjonsskjema og terapeutisk legemiddelmonitorering av legemidlene fluvoksamin, valproat, bupropion, fluoksetin, levomepromazin, paroksetin, karbamazepin, fenobarbital og fenytoin. Se tabell 1 for oversikt over hvilke CYP-enzymmer disse legemidlene påvirker. Utslag på samtidig bruk av klozapin og ett interagerende legemiddel ble definert som **testgruppen**. Om pasientene brukte flere interagerende legemidler på én gang ble de ekskludert fra studien. **Kontrollgruppen** bestod av klozapinbrukere hvor det tidligere ikke var påvist blodkonsentrasjoner av noen interagerende legemidler. For å få en håndterlig kontrollgruppe ble det valgt ut et utvalg av pasienter basert på 1:1 forhold til testgruppen, og utvalget ble valgt basert på randomisering. For å kvalitetssikre ikke-bruk av interagerende legemidler i kontrollgruppen, ble det i tillegg repressert for deteksjon av fluvoksamin, bupropion, fluoksetin, paroksetin, levomepromazin, karbamazepin,

fenobarbital og fenytoin. Resultater fra analysene til pasienter i test- og kontrollgruppen ble reprocessert som beskrevet nedenfor.

Tabell 1: Oversikt over legemidler inkludert i studien som interagerer med ulike CYP-enzymmer.

Legemiddel	CYP-enzymmer	Kilde
Fluvoksamin	Potent hemmer av CYP1A2. Hemmer også i mindre grad CYP3A4, CYP2D6 og CYP2C19.	(63, 105)
Valproat	Valproats mekanisme for legemiddelinteraksjon med klozapin er fortsatt uklar.	(68)
Bupropion	Potent hemmer av CYP2D6.	(105, 106)
Fluoksetin	Potent hemmer av CYP2D6, moderat hemming CYP2C19 og CYP3A4.	(105, 107)
Levomepromazin	Hemmer av CYP2D6.	(105)
Paroksetin	Potent hemmer av CYP2D6.	(105)
Karbamazepin	Potent induser av CYP3A4. Ses også indusering av CYP1A2, CYP2C19 og CYP2C9.	(105)
Fenobarbital	Induserer CYP3A4 og CYP2C9.	(105)
Fenytoin	Induserer CYP3A4.	(105)

2.1.3 Kartlegging av røykevaner

Sigarettrøyk er vist å påvirke serumkonsentrasjonen av klozapin (49, 65). Følgelig var det viktig å kartlegge røykevanene til de inkluderte pasientene, og på rekvisisjonsskjemaet fra legen kan det oppgis om pasienten røyker eller ikke. Det viste seg derimot at skjema gjentatte ganger ikke inneholdt informasjon om røykestatus, og det sees generelt ofte at korrekt røykestatus blir feil- eller underrapportert (108). Rutineanalysene av serumkonsentrasjonsprøver ved SFP undersøker også nivåer av en av nikotins metabolitter, kotinin, som har lengre halveringstid og bedre stabilitet enn nikotin, og blir derfor ofte brukt for å validere røykestatus hos pasienter (109). Som følge av at informasjon på rekvisisjonsskjemaet ofte ikke samsvarte med kotininverdier hos pasientene, ble røykevaner (røyk, ikke røyk) basert på målte kotininverdier, og grensen for «røyker» ble bestemt å være på kromotografisk toppareal $\geq 1.0 \times 10^7$.

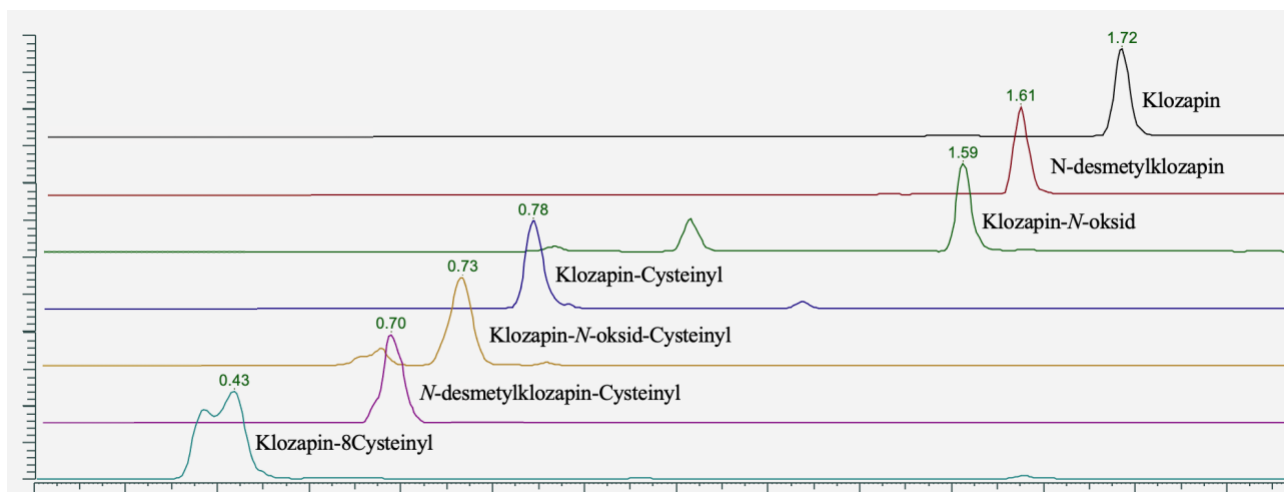
2.1.4 Metode for serumkonsentrasjonsbestemmelse av klozapin og metabolitter

Serumprøvene ble analysert i sammenheng med rutinemessig monitorering av medikamenter brukt i psykiatrien, og prøvene ble opparbeidet og analysert etter standardiserte og validerte metoder ved SFP.

Prøveopparbeidelse

Kalibreringsstandarder og kvalitetskontroller (lav og høy konsentrasjon) ble preparert for å kvantifisere analytt i serum. Hver analyse ble tilsatt metanol-løsninger av klozapin, *N*-desmetylklozapin og klozapin-*N*-oksid i fem ulike konsentrasjoner til legemiddelfritt serum.

Prøvene ble så opparbeidet i en Microlab Star pipetteringsrobot (Hamilton, Reno, NV). 200 µL av prøvemateriale ble pipettert til en vial i en 96-brønn-plate, og videre blandet med 400 µL kald fellingsløsning. Fellingsløsningen ble brukt for å felle proteinene fra resten av serumet, og består av acetonitril, metanol (forhold 90:10) og internstandard (13C-d3-klozapin og d8-desmetylklozapin, Illkirch-Graffenstaden, Frankrike). Internstandardene benyttes for å justere for tap av analytt under prøveopparbeidelsen og variasjon i injeksjonsvolum og deteksjonssignal. Platen ble deretter forseglet med en spesialtilpasset aluminiumsfolie (Porvair Sciences, UK) og ristet i ett minutt (2000 rpm). Platen ble deretter satt i fryser ved -20 °C i ca. 5 minutter, da fellingsløsningen virker best ved lave temperaturer. Videre ble løsningene på nytt ristet i ett minutt, før de ble sentrifugert i 10 minutter (4000 rpm, 4 °C) for at de felte proteinene skal sedimentere til bunnen av brønnene. Deretter overførte roboten 200 µL supernatant som ble blandet med 200 µL vann (forhold 1:1). Når opparbeidelsen var ferdig ble platen forseglet med en silikonmatte (Waters, Milford, MA) og satt inn i analyseinstrumentet, hvorav 4 µL av hver prøve ble injisert.



Figur 9: Eksempel på UHPLC-kromatogram for klozapin, *N*-desmetylklozapin, klozapin-*N*-oksid, klozapin-*N*-oksid-cysteinyll, *N*-desmetylklozapin-cysteinyll, klozapin-cysteinyll og klozapin-8cysteinyll. Kromatografiske topper er merket med navn på analytt og retensjonstid.

Instrumentering

Instrumentet for væskechromatografi som ble benyttet var vanquish ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). For separasjon av analyttene ble analysekolonnene XBridge BEH C18-column (2.6 µm 2.1 x 75 mm; Waters, Milford, MA) brukt. Kolonnetemperaturen ble satt til 35 °C med en ammoniumacetatbuffer med pH= 4.8 Full scan-analyse av prøvene gjøres med QExactive Orbitrap høy oppløselig masse spektrometer (HRMS) med en oppløsning på 70,000 innenfor et masseområde på 100-1500 Da. I tillegg gjøres datterscan med oppløsning på

17,500 hvis en analytt på inklusjonslisten detekteres, for sammenligning mot bibliotek for analytten. Se figur 9 for illustrasjon av eksempler på kromatogrammer for klozapin og utvalgte metabolitter.

Identifisering og konsentrasjonsbestemmelse av klozapin, *N*-desmetylklozapin og klozapin-*N*-oksid

Klozapin og metabolittene ble identifisert ved deteksjon av nøyaktig masse (m/z , +/- 5 ppm), isotopforhold, retensjonstid, men også en matchet datterscan der det ble brukt referansestandard (TLC Pharmaceutical Standards, Newmarket, ON, Canada og Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Canada). Kalibreringskurver ble laget og benyttet for å kvantifisere mengden i serum av klozapin og metabolittene. Dataene ble prosessert ved å bruke programvaren TraceFinder 5.1 (Thermo Fisher Scientific).

Identifisering og semi-kvantitativ konsentrasjonsbestemmelse av klozapin-*N*-oksid-cysteinyll, *N*-desmetylklozapin-cysteinyll, klozapin-cysteinyll og klozapin-8cysteinyll

Retrospektiv analyse og reprosessering av full scan HRMS-data generert fra SFPs rutineanalyse av klozapinprøver ble benyttet som metode for identifisering, og semi-kvantitativ konsentrasjonsbestemmelse av klozapin-*N*-oksid-cysteinyll, *N*-desmetylklozapin-cysteinyll, klozapin-cysteinyll og klozapin-8cysteinyll. Cysteinyll-metabolittene ble identifisert ved nøyaktig masse (m/z , +/- 5 ppm) og isotopforhold, og mengden i serum ble estimert semikvantitativt med utgangspunkt i MS-signalene i kromatogrammene. Det ble utført en semikvantitativ analyse fordi det ikke var tilgang på referansestandarder for disse metabolittene. Molekylformel, nøyaktig m/z ($[M+H]^+$) og gjennomsnittlig retensjonstid av cysteinyll-metabolittene er oppgitt i tabell 2. Upåviselige nivåer av klozapin-metabolittene ble trunkert til minimumsverdier av de gitte metabolittene for å gjøre det mulig å utføre beregninger av metabolske ratioer.

Tabell 2: Oversikt over karakteristika for klozapin-cysteinmetabolitter uten referansestandard.

	Glutation-cystein-metabolitt av klozapin uten referansestandard			
	Klozapin-8cysteinyll	Klozapin-cysteinyll	Klozapin- <i>N</i> -oksid-cysteinyll	<i>N</i> -desmetylklozapin-cysteinyll
Molekylformel	C ₂₁ H ₂₅ N ₅ O ₂ S	C ₂₁ H ₂₄ ClN ₅ O ₂ S	C ₂₁ H ₂₄ ClN ₅ O ₃ S	C ₂₁ H ₂₂ ClN ₅ O ₂ S
M/z [M+H]⁺	412.18	446.14	462.13	432.12
Gjennomsnittlig retensjonstid, min (SD)	0.43 (0.04)	0.78 (0.03)	0.73 (0.03)	0.70 (0.04)

SD= standardavvik.

Ved oppstart av datainnhenting ble det hentet ut data for de fleste av klorzapin sine metabolitter. Da denne oppgaven ser på dannelse av klorzapin-glutation ble det vurdert at det var relevant å inkludere de metabolske veiene som førte til dannelse av cysteinyl-metabolitter i datasettet, da dette er nedbrytningsprodukter av glutatation. Se figur 5 og 7 for illustrasjon av disse metabolismeveiene.

2.1.5 Statistiske analyser

For beregning av forskjeller i demografi ble det utført Kruskal Wallis test for de kontinuerlige variablene og kji-kvadrat test for de kategoriske. Beregning av metabolsk ratio (MR) ble utført ved å dividere kromatografisk toppareal av metabolitt på toppareal av modersubstans ($MR = \text{Metabolitt} / \text{Modersubstans}$). For analyse av metabolske ratioer ble alle toppareal-verdiene ln-transformert, og den statistiske testen ANOVA brukt. Det ble videre utført en Tukey's Honest Significant Difference (HSD)- post hoc test på effektverdiene mellomgruppene. Denne typen analyse ble også gjort for dosejusterte serumkonsentrasjoner (C/D)-ratioer, men med den ikke-parametriske testen Kruskal Wallis-test, etterfulgt av Dunns post hoc test. Det ble til slutt utført en multipl lineær regresjon for å undersøke sammenhenger mellom metabolsk ratio og flere uavhengige variabler, slik som røyking, alder, kjønn, interagerende legemidler, klorzapindose og gyldig prøvetakningstidspunkt etter siste dose klorzapin.

Alle statistiske analyser ble utført i programmet RStudio. Statistiske tester ble gjennomført med et signifikansnivå på 0.05. For å forkaste nullhypotestene og betrakte funnene som statistisk signifikant trengtes det altså en p-verdi < 0.05 . Figurer i oppgaven er laget i diagrams.net, BioRender.com og RStudio.

2.2 Effekt av interagerende legemidler på dannelse av klorzapin-glutationmetabolitter *in vitro*

Formålet med denne delen av masterprosjektet var å undersøke om spesifikke legemidler som interagerer med CYP-enzymet påvirker dannelsen av glutatation-metabolitter av klorzapin *in vitro*. Protokollen ble basert på tidligere forsøk der omsetning av klorzapin til glutatation-metabolitter ble studert ved inkubasjon med humane levermikrosomer (HLM) (46, 110). I denne delen av studien ble også dannelsen av klorzapins hovedmetabolitter N-desmetylklorzapin og klorzapin-N-oksidi studert.

2.2.1 Utstyr og instrumenter

UTSTYR OG INSTRUMENT	PRODUSENT
Finpipette	Thermo Scientific, Waltham, USA
Fryser -20°C/-80°C	Whirlpool, Michigan, USA
	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pipettespisser	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Tyskland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Vannbad Julabo SW22	Julabo gmbH, Seelbach, Tyskland
Semimicro balance CPA225D	Sartorius AG, Goettingen, Tyskland
Meterlab® PHM210	Radiometer analytical, Villeurbanne, Frankrike
Dri-block® DB-3D	Techne, Staffordshire, UK
Cryotube™ Vialer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Eppendorfrør	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland

2.2.2 Kjemikalier

KJEMIKALIER	PRODUSENT
Trismabase (121.2 g/mol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magnesiumsulfat (MgSO ₄) (248.48 g/mol)	Merck, Darmstadt, Tyskland
NADPH (833.3 g/mol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Klozapin stamløsning (326.823 g/mol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Humane levermikrosomer*	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Acetonitril (41.05 g/mol)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Imipramin (280.41 g/mol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glutation redusert (GSH) (307.32 g/mol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Metanol (MeOH) (32.04 g/mol)	Merck, Darmstadt, Tyskland
MilliQ-vann (18.02 g/mol)	Millipore A/S, Oslo, Norge
Nitrogengass (N ₂) (28.01 g/mol)	AGA Progas A/S, Oslo, Norge
Svovelsyre (H ₂ SO ₄) (98.08 g/mol)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Maursyre (HCOOH) (46.03 g/mol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Valproat stamløsning (144.211 g/mol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fluvoksamin stamløsning (318.335 g/mol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Paroksetin stamløsning (329.37 g/mol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

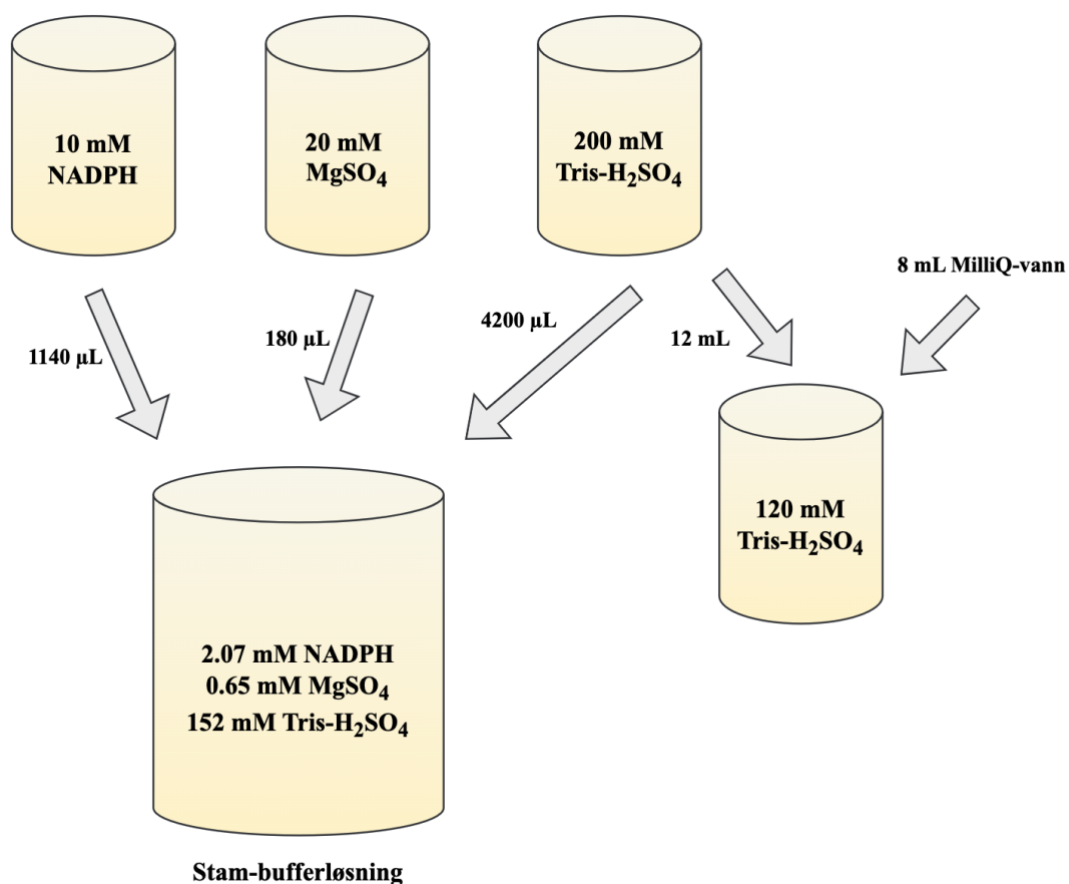
* De humane levermikrosomene inneholdt følgende enzymer: CYP1A2, CYP2A6M CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 og CYP4A11.

2.2.3 Tillaging av stambufferløsning

Det ble laget en stambufferløsning som skulle brukes som inkubasjonsmedium i *in vitro* forsøket med HLM. Før stambufferløsningen kunne lages måtte det lages løsninger av Tris-H₂SO₄, MgSO₄ og NADPH.

Løsningen med Tris-H₂SO₄ (200 mM) ble laget ved å først veie opp 2.21 g Trismabase i et veieskip, som igjen ble løst opp i ca. 40 mL MilliQ-vann. Denne løsningen ble pH-stabilisert til pH 7.4 med bruk av H₂SO₄, før den ble overført til en målekolbe og tilsatt vann opp til merke for 50 mL. MgSO₄ (20 mM) ble tillaget ved å veie opp 0.246 g MgSO₄ i et veieskip for så å løse dette i 40 mL MilliQ-vann. Denne løsningen ble også overført til en målekolbe og tilsatt vann opp til merke for 50 mL. NADPH-løsningen (10 mM) ble laget ved å veie opp ≥ 0.01166 g NADPH direkte i et eppendorfrør. Dette ble gjort på grunn av NADPHs statiske egenskaper som gjør det vanskelig å bruke veieskip. For å finne ut hvor mye vann som trengtes ble denne formelen brukt: $(1000 \mu\text{L} / 8.33 \text{ mg}) * X \text{ mg} = Y \mu\text{L}$ MilliQ-vann.

Da alle løsningene var ferdig ble stambufferløsningen tillaget ved å blande 4200 μL av Tris-H₂SO₄, 180 μL av MgSO₄ og 1140 μL av NADPH løsningene, før løsningen ble ristet på Vortex. Dette dannet en stambufferløsning med 152 mM Tris-H₂SO₄, 0.65 mM MgSO₄ og 2.07 mM NADPH, og tillagingen er vist i figur 10. Det trengtes også 120 mM Tris-H₂SO₄-løsning til senere i forsøket for å lage HLM-suspensjon. Det ble derfor tatt ut 12 mL Tris-H₂SO₄ (200 mM) som ble fortynnet med 8 mL MilliQ-vann, før løsningen ble ristet på Vortex.

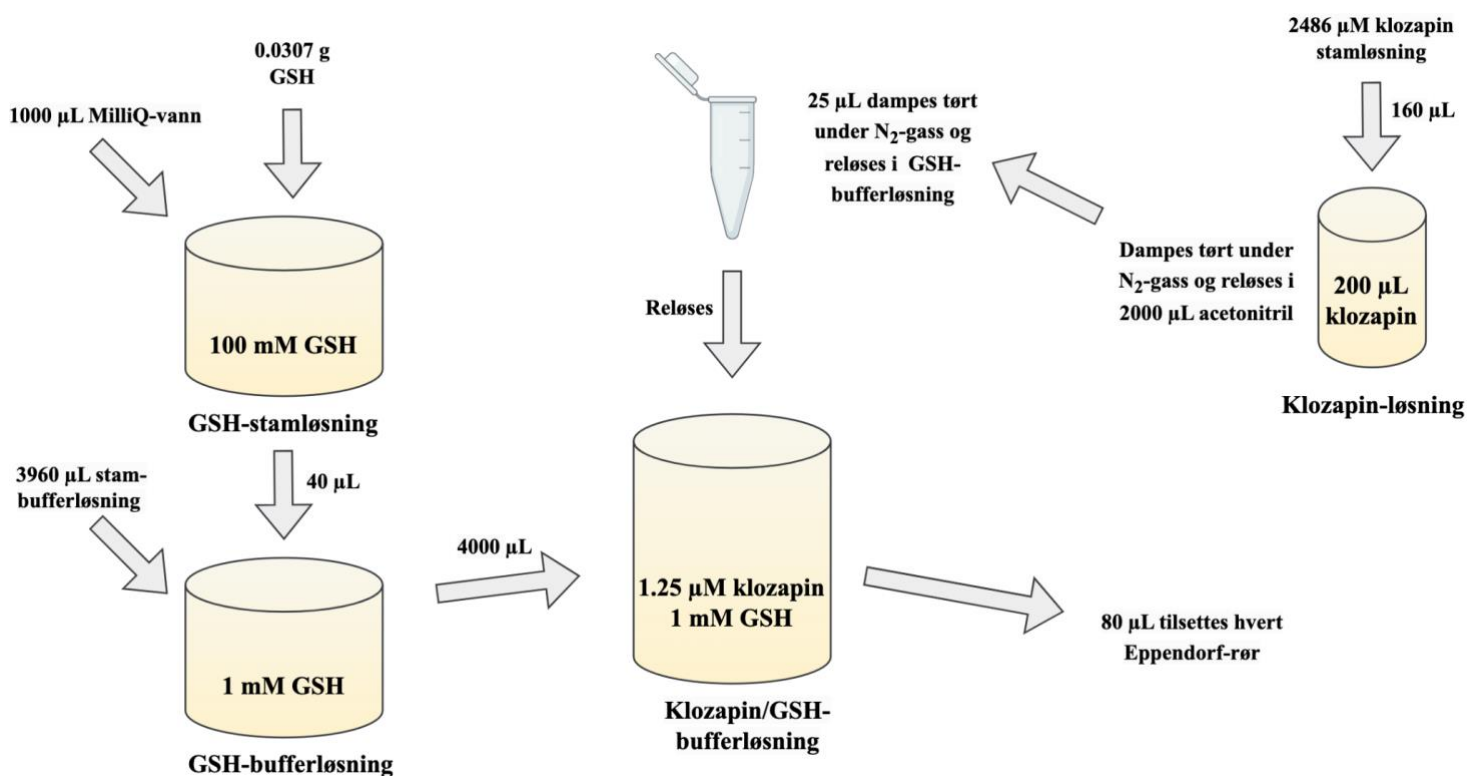


Figur 10: Illustrasjon av tillaging av stambufferløsning.

2.2.4 Tillaging av klozapin-GSH-bufferløsning, HLM-fortynning, 1.2 M maursyre og intern standard.

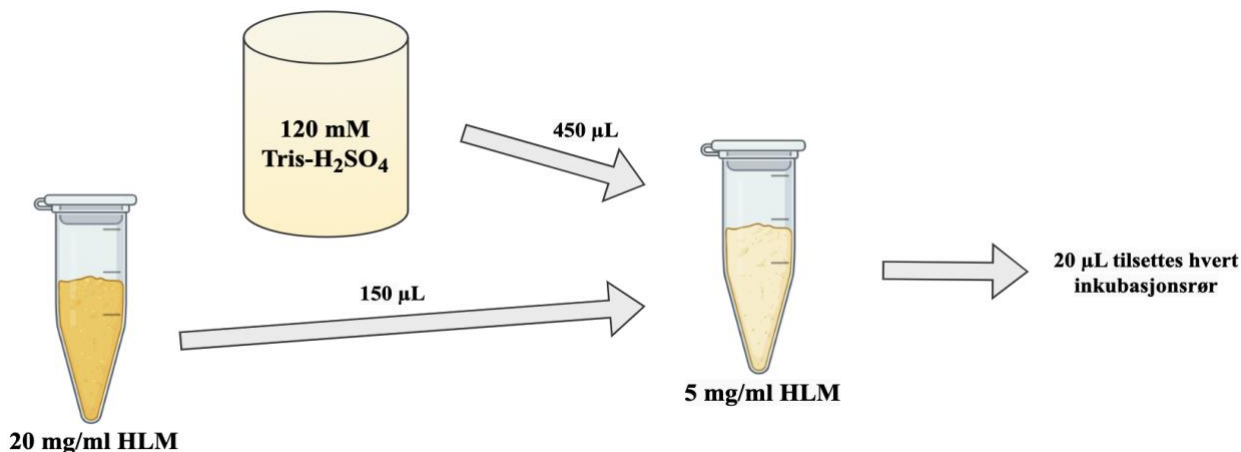
For å lage klozapin-GSH-bufferløsning ble det først laget en GSH stamløsning (100 mM). Her ble det målt opp 0.0307 g GSH som ble løst i 1000 μL MilliQ-vann. 40 μL av denne GSH stamløsningen ble så blandet med 3960 μL av stambufferløsningen, som ga en konsentrasjon av GSH bufferløsning på 1 mM

Videre ble det målt opp 160 μL klozapin stamløsning (2486 μM) løst i metanol. Klozapin stamløsning ble dampet inn under N_2 -gass til tørt. Klozapin ble så reløst i 2000 μL acetonitril og ristet i 5 minutter, noe som ga en konsentrasjon av klozapin på 200 μM . 25 μL av løsningen med klozapin (200 μM) ble deretter pipettert ut og tørrdampet under N_2 -gass, og deretter løst med 4000 μL GSH bufferløsning, og ristet på Vortex noe som ga en konsentrasjon av klozapin på 1.25 μM i en klozapin/GSH-bufferløsning. Se figur 11 for illustrasjon.



Figur 11: Illustrasjon av tillaging av klozapin/GSH-bufferløsning.

For å lage HLM-suspensjonen ble det beregnet mengden Tris og mikrosomer ut ifra at det trengtes 480 μL HLM til forsøket (ble beregnet litt ekstra). Konsentrasjonen på mikrosomene var fra produsent 20 mg/ml, og det var ønsket en konsentrasjon på HLM-suspensjonen på 5 mg/mL. Ligningen brukt: $(5 \text{ mg/mL} * 600 \mu\text{L HLM}) / 20 \text{ mg/mL} = 150 \mu\text{L HLM-suspensjon}$. Det ble derfor målt opp og blandet 150 μL HLM med 450 μL Tris (figur 12).



Figur 12: Illustrasjon av tillaging av HLM-suspensjon.

1.2 M maursyre ble brukt for å stoppe de metabolske reaksjonene i rørene. 2383 µL maursyre (95-99 %) ble fortynnet til 50 mL noe som ga konsentrasjonen på 1.2 M maursyre.

Det trengtes også en fellingsreagens med intern standard. Denne ble laget ved å pipettere ut 50 µL imipramin (1 mM) og fortynne dette til 50 mL med acetonitril, som ga en konsentrasjon på imipramin på 1 µM. Løsningen ble ristet på Vortex etter blanding, og så satt i -20 °C fryser.

2.2.5 Inkubasjon av klozapin og humane levermikrosomer, med og uten interagerende legemidler















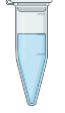










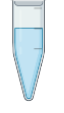
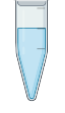
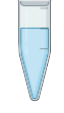

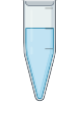






Denne delen av oppgaven var en videreføring av *in vitro*-forsøk beskrevet i en masteroppgave fra 2022 (110). Derfor ble det innledningsvis gjort et pilotforsøk med de samme betingelsene for å verifisere dannelse av glutationmetabolittene. Denne inkubasjonen ble utført med klozapin og humane levermikrosomer. Videre ble det utført forsøk med legemidler som påvirker metabolismen av klozapin, for å undersøke om dette påvirket dannelsen av klozapin-glutationmetabolittene. Alle inkubasjoner ble utført med tre paralleller for å kontrollere for eventuelle avvik.

Det var ønskelig med en 1 µM konsentrasjon av klozapin under inkubasjonen (46). For å øke sjansen for enzymhemming ble konsentrasjonen av de interagerende legemidlene bestemt å være 5 µM under inkubasjonen. Løsningene med interagerende legemidler måtte alle fortynnes før bruk, og etter fortynning var konsentrasjonene som følgende: valproat (20 µM), fluvoksamin (10 µM) og paroksetin (10 µM).

Pilotforsøket ble utført som beskrevet under, men uten tilsetning av interagerende legemidler. Det ble først målt opp og overført interagerende legemidler til eppendorfrør. Det ble målt opp 25 µL valproat (20 µM), 50 µL fluvoksamin (10 µM) og 50 µL paroksetin (10 µM). Disse ble overført til hvert sitt rør, før inndamping til tørt under N₂-gass. Som kontrollprøver ble det også satt fram rør som ikke fikk dampet inn hemmer, men ble ellers behandlet likt. Alle rørene ble så tilsatt 80 µL klozapin/GSH-bufferløsning (1.25 µM

klozapin), og dette ble løst i ca. to minutter, før rørene ble forvarmet på vannbad i fem minutter ved 37 °C. For å initiere metabolisme ble 20 µL HLM-løsning tilsatt rørene med omtrent 30 sekunders mellomrom mellom rørene. Etter tilsetning av HLM var det 1 µM klozapin og 5 µM av interagerende legemiddel, i et totalvolum på 100 µL i rørene. Det ble også utført forsøk uten humane levermikrosomer i 12 rør, ment som kontrollprøver (0 minutter), og for å bestemme hvor mye klozapin man hadde i utgangspunktet. Disse rørene ble tilsatt 20 µM Tris (120 mM), istedenfor 20 µM HLM-suspensjon, for å få tilsvarende konsentrasjon av klozapin som de med HLM (1 µM). Se tabell 3 for oversikt over forsøksoppsettet.

Tabell 5: Oppsett av *in vitro* forsøket, med paralleller og tidspunkt for inkubasjon av klozapin, humane levermikrosomer og interagerende legemidler.

	Klozapin uten interagerende legemiddel			Klozapin med interagerende legemiddel								
Legemiddel	Klozapin			Klozapin + valproat			Klozapin + fluvoksamin			Klozapin + paroksetin		
Varighet på inkubasjon (min):	0	30	60	0	30	60	0	30	60	0	30	60
Parallell 1												
Parallell 2												
Parallell 3												

Reaksjonene i rørene ble stoppet ved å tilsette 20 µL 1.2 M maursyre, også her med 30 sekunders mellomrom. Videre ble det tilsatt 200 µL iskald acetonitril med intern standard (1 µM imipramin). Det ble også lagt av to rør med bare stambuffer for å kunne vurdere støy i prøvene. Rørene ble så pakket og lagt i frys på -80 °C. Prøvene ble analysert over fire labdager ved Senter For Psykofarmakologi som vist i avsnitt 2.1.4, men her ble kalibreringsstandarder og kontroll-løsninger preparert i mobilfase og ikke i serum.

3 Resultater

3.1 Effekt av komedikasjon med interagerende legemidler på dannelse av klozapin-cysteinylnmetabolitter *in vivo*

3.1.1 Inkluderte pasienter

I perioden 01.03.19-20.08.22 ble det funnet totalt 14672 prøver (1546 pasienter). 10 807 prøver (73.7%) hadde pasienter med terapeutisk dose >0-1500 mg, og 9168 prøver (62.5%) hadde pasienter med tidsintervall mellom dosering og prøvetidspunkt mellom 10-30 timer. Etter å ha valgt én prøve som oppfylte kriteriene per pasient i testgruppen, ble det identifisert 173 pasienter som oppfylte studiekriteriene hvorav fulle metabolittspekter av klozapin ble hentet ut etter retrospektiv repressering. Av disse, ble det identifisert 10 pasienter som ble ekskludert fra analysene på bakgrunn av bruk med flere interagerende legemidler. Et randomisert og representativt utvalg fordelt på et 1:1 forhold til testgruppen, ble valgt som kontrollgruppe (n=162).

Tabell 4: Demografiske karakteristika hos de inkluderte studiegruppene.

	Kontroll-gruppe	Testgruppene (n=163)				p
		CYP2D6-hemmere*	Fluvoksamin	Valproat	CYP-indusere**	
Antall i gruppene, n	162	54	13	93	3	-
Kvinner (%)	68 (42)	24 (44)	3 (23)	36 (39)	2 (67)	0.55
Alder, median (IQR)	42 (34-53)	50 (40-61)	39 (34-48)	51 (42-59)	61 (54-64)	0.002
Røykere (%)	78 (48)	32 (59)	7 (54)	52 (56)	2 (67)	0.57
Antall målinger med gyldig dose (>0-1500 mg) (%)	145 (90)	49 (91)	12 (92)	86 (92)	3 (100)	-
Klozapin døgndose (mg), median (IQR)	275 (150-425)	350 (225-475)	112.5 (96.9-163)	300 (200-450)	300 (213- 450)	0.001
Antall målinger tatt ved gyldig tid (10-30 timer), (%)	111 (69)	43 (80)	10 (77)	71 (76)	3 (100)	-
Prøvetakning (timer) etter siste dose CLZ, median (IQR)	13 (12-15)	13 (12-14)	14 (13-16)	13 (12-15)	15 (13-16)	0.34

*Bupropion, fluoksetin, levomepromazin, paroksetin. **Karbamazepin, fenobarbital, fenytoin. IQR= interquartile range. Statistiske analyser ble utført med Kruskal-Wallis test for de kontinuerlige variablene, og Dunns post hoc test. Kji-kvadrattest ble brukt for de kategoriske variablene. p-verdi <0.05 er vurdert som signifikant.

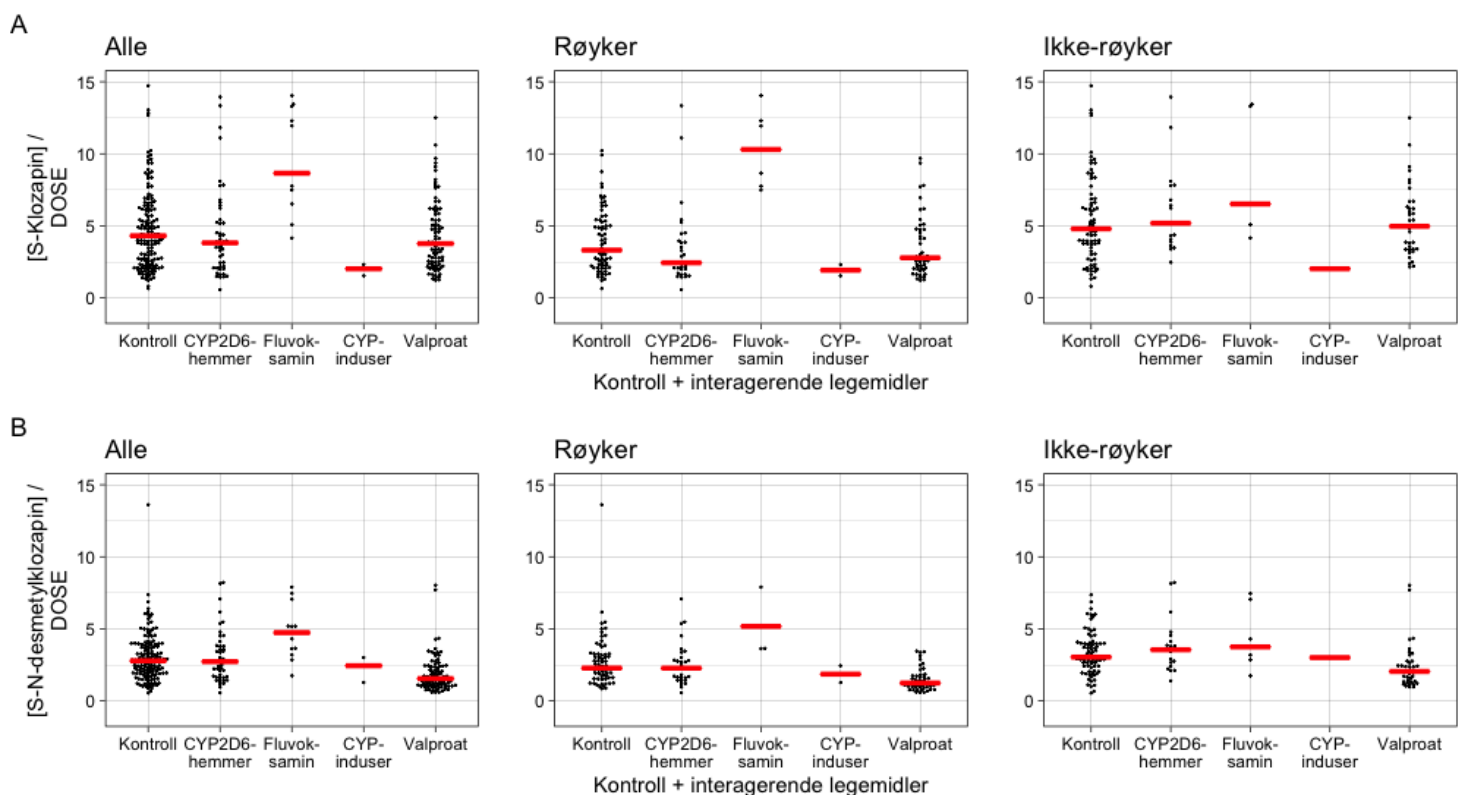
3.1.2 Inkludert datamateriale

Tabell 4 viser demografiske karakteristika hos de inkluderte pasientene i henholdsvis kontrollgruppen og testgruppene. Fordelingen av kjønn var ikke statistisk forskjellig mellom de ulike studiegruppene (p=0.55). Fordeling av alder i gruppene var statistisk forskjellige (p=0.002), hvor post hoc analyse viste en statistisk høyere alder i valproat- enn hos kontrollgruppen (p=0.012). Det er en overvekt av røykere i testgruppene (54-67%), men fordelingen av røykere er ikke statistisk ulike i noen av studiegruppene

($p=0.57$). Majoriteten av pasientene i studiegruppene brukte terapeutisk dose av klozapin ($>90\%$). Fordelingen av døgndose av klozapin var statistisk ulik i de forskjellige studiegruppene ($p= 0.001$), hvor særlig fluvoksamingruppen (mediandose 113 mg; IQR: 96.9-162.5) hadde 59% lavere mediandose enn kontrollgruppen (mediandose 275 mg; IQR: 150-425; $p=0.02$). Blodprøvetakingstid etter siste klozapindose var heller ikke signifikant forskjellig i de ulike studiegruppene ($p=0.34$).

3.1.3 Serumkonsentrasjoner

Innledningsvis ble effekten av interagerende legemidlene på absolutt- og dosejusterte konsentrasjoner av klozapin og *N*-desmetylklozapin studert relatert til røykevaner (figur 13). Det var signifikant forskjell i C/D-ratio mellom røykere og ikke-røykere i alle testgruppene, med lavere ratio for røykere (CYP2D6-hemmer; $p= 0.009$, valproat; $p= 0.001$). Fluvoksamingruppen var derimot et unntak ($p= 0.87$), hvor man så økende C/D-ratio hos røykere, men ikke blant ikke-røykere. Gruppen med CYP-indusere ble ekskludert i denne analysen på grunn av lavt antall pasienter.



Figur 13: Dosejusterte serumkonsentrasjoner (C/D-ratio) for **A)** klozapin, og **B)** *N*-desmetylklozapin, fordelt på kontroll- og testgrupper, røykere og ikke-røykere. S= serum. Rød strek= median.

Median klozapindose for røykerne og ikke-røykere i alle gruppene var henholdsvis 350 mg og 250 mg ($p < 0.001$). Derimot var ikke den absolutte klozapin- og *N*-desmetylklozapinkonsentrasjonene statistisk forskjellig mellom røykere versus ikke-røykere (klozapin: 1108 nM vs. 1182 nM, $p = 0.8$; NDMC: 678 nM vs. 617 nM, $p = 0.2$). Fluvoksamin økte signifikant C/D-ratio av klozapin med omtrent 140% ($p < 0.001$) sammenlignet med kontrollgruppen. C/D-ratio for *N*-desmetylklozapin viste signifikant påvirkning med valproat ($p < 0.001$), med redusert ratio sammenlignet med kontrollgruppen. Absoluttkonsentrasjoner ble signifikant påvirket bare av valproat, som hadde lavere *N*-desmetylklozapinnivåer enn kontrollgruppen ($p = 0.015$).

3.1.4 Metabolske ratioer

Av interagerende legemidler inkludert i studien, viste ingen signifikant effekt på dannelse av *N*-desmetylklozapin-cysteinyll, klozapin-cysteinyll og klozapin-8cysteinyll. For dannelse av klozapin-*N*-oksid-cysteinyll hadde valproat økt metabolsk ratio med 111%, og fluvoksamin redusert metabolsk ratio med 71%. Metabolismen av *N*-desmetylklozapin ble signifikant påvirket av fluvoksamin med negativ 29% effekt, og av CYP-induserne med 76% positiv effekt, og av valproat med negativ 41% effekt på metabolsk ratio. Oversikt over metabolske ratioer er oppgitt i figur 14, og oversikt over signifikans- og effektverdier oppgitt i tabell 5. Fluvoksamin ga i tillegg en 43% reduksjon i metabolsk ratio mellom klozapin-*N*-oksid og klozapin.

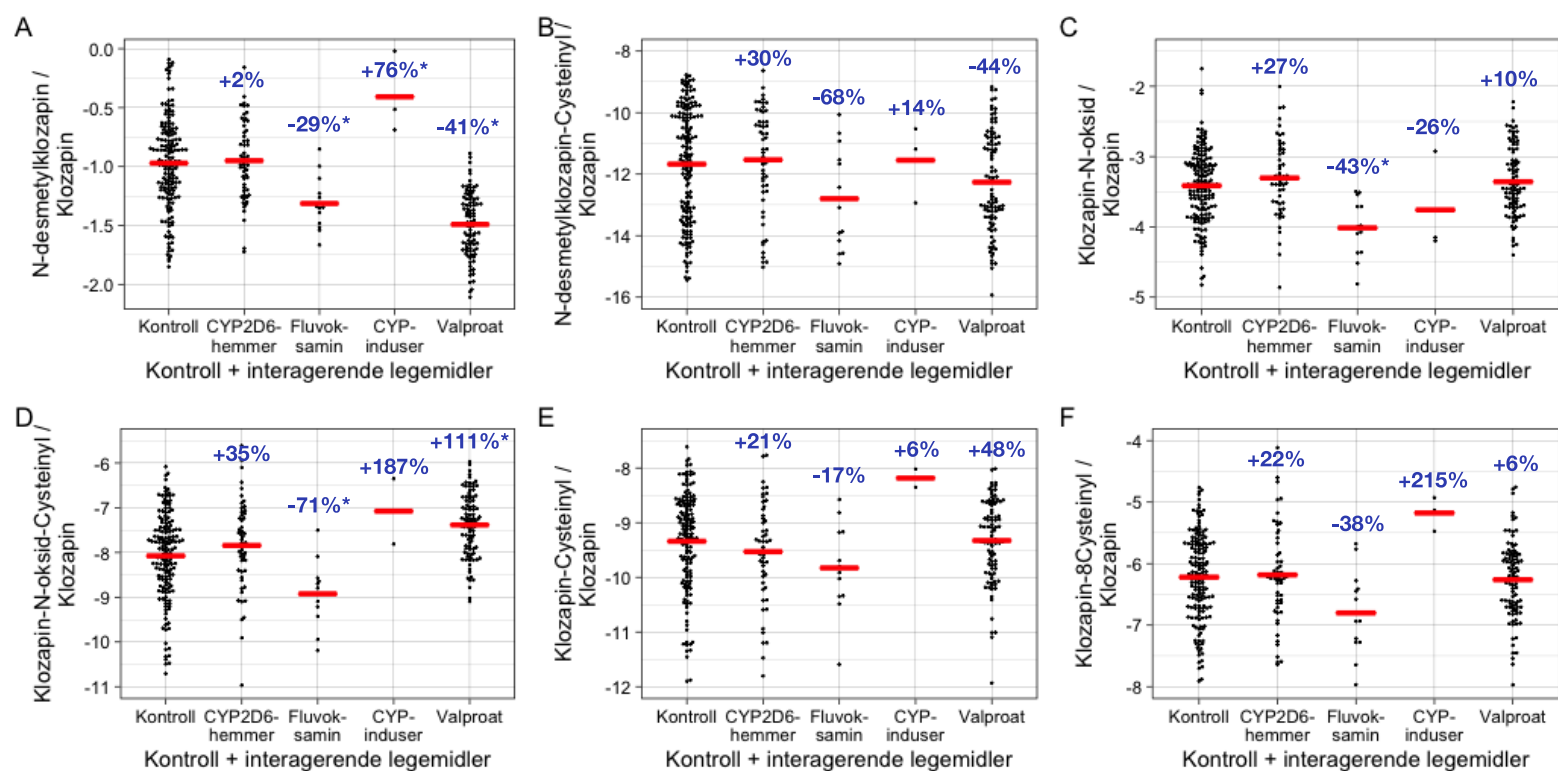
Tabell 5: Effekt av interagerende legemidler på metabolske ratioer, målt som metabolittnivå relatert til klozapin-nivå, sammenlignet med kontrollgruppen. Tabellen viser prosentvis påvirkning av interagerende legemidler, 95% konfidensintervall og *p*-verdier.

Metabolske ratioer	Effekt av CYP2D6-hemmer, % endring (95% KI)	<i>p</i>	Effekt av fluvoksamin, % endring (95 % KI)	<i>p</i>	Effekt av CYP- induser, % endring (95 % KI)	<i>p</i>	Effekt av valproat, % endring (95 % KI)	<i>p</i>
<i>N</i> -demetylklozapin/ Klozapin	2.10 (-12.0, 18.4)	1.00	-28.8 (-45.9, -6.75)	0.01	75.6 (1.30, 204)	0.04	-40.5 (-47.4, 32.7)	<0.001
<i>N</i> -demetylklozapin-cysteinyll/ Klozapin	30.1 (-40.0, 182)	0.88	-67.5 (-92.1, 34.3)	0.19	13.6 (-93.5, 1899)	1.00	-44.4 (-70.7, 5.49)	0.09
Klozapin- <i>N</i> -oksid/ Klozapin	29.1 (-2.92, 71.6)	0.10	-43.0 (-66.2, -3.82)	0.03	-26.3 (-71.4, 112)	0.93	9.97 (-9.06, 39.2)	0.80
Klozapin- <i>N</i> -oksid-cysteinyll/ Klozapin	34.8 (-14.1, 112)	0.36	-71.4 (-87.5, 34.6)	<0.001	187 (-46.0, 1426)	0.42	111 (45.2, 206)	<0.001
Klozapin-cysteinyll/ Klozapin	21.3 (-34.7, 126)	0.91	-16.5 (-73.3, 160)	0.99	6.04 (-89.3, 958)	1.00	48.0 (-11.4, 147)	0.23
Klozapin-8cysteinyll/ Klozapin	21.7 (-15.4, 75.2)	0.58	-38.1 (-68.3, 20.9)	0.29	215 (-18.5, 1115)	0.14	6.30 (-30.4, 27)	0.98

Statistiske tester er utført med ln-transformerte data (ANOVA og tukey HSD), en *p*-verdi < 0.05 er vurdert som signifikant.

Prosent er utregnet med tilbaketransformerte tall, for å enklere kunne lese av betydningen av tallene.

KI= konfidensintervall.



Figur 14: Figuren illustrerer effekt av interagerende legemidler på metabolsk ratio, målt som metabolittnivå (*N*-desmetylklozapin, klozapin-*N*-oksidd, *N*-desmetylklozapin-cysteinyll, klozapin-*N*-oksidd-cysteinyll, klozapin-cysteinyll eller klozapin-8cysteinyll) relatert til klozapin-nivå. Metabolske ratioer på y-aksen (*ln*-transformerte data), fordelt på kontroll- og testgrupper på x-aksen. Rød strek = gjennomsnitt. Prosent endring i metabolsk ratio sammenlignet med kontrollgruppen er oppgitt over punktene for testgruppene, og signifikant endring ($p < 0.05$) er markert med «*», se tabell 5 for konfidensintervall og signifikansverdier. Ekstreme outliers vises ikke i figurene, men er inkludert i de statistiske analysene.

Det ble videre utført en multipl lineær regresjon for metabolske ratioer med signifikante utfall presentert i tabell 5. Analysen ble utført for å anslå hvor mye av variasjonen i metabolsk ratio kunne forklares av andre variabler i tillegg til interagerende legemidler. Analysen ble primært utført med alle kovariater: interagerende legemiddel, alder, kjønn, røykestatus, gyldig klozapindose, og gyldig tidspunkt mellom prøvetakning og siste dose klozapin (se vedlegg 1 for analysene før eliminasjon). Videre ble variablene uten signifikans ekskludert én etter én, dette til analysen besto av signifikante assosiasjoner, se tabell 6 for oppsummering av analysene.

Andelen av den totale variasjon i de ulike metabolske ratioene som kunne forklares av de gjenværende variablene var 37% for *N*-desmetylklozapin/klozapin ($R^2 = 0.37$), 32% for klozapin-*N*-oksidd-cysteinyll/klozapin ($R^2 = 0.32$), og 12% for klozapin-*N*-oksidd/klozapin ($R^2 = 0.12$). Regresjonsanalysen indikerte at kjønn og gyldig klozapindose ikke hadde noen signifikant påvirkning på metabolsk ratio, men at røyking kunne forklare variasjon hos alle tre ratioer. Videre ble det observert at alder kunne forklare variasjon i dannelsen av klozapin-*N*-oksidd-cysteinyll. Prøvetakningstidspunkt i forhold til siste dose klozapin viste assosiasjon med variasjon i metabolsk ratio for metabolisme til *N*-desmetylklozapin og

klozapin-*N*-oksid-cysteinyll. Resultatene indikerte også at både valproat og fluvoksamin kunne forklare variasjon i metabolsk ratio for klozapin-*N*-oksid-cysteinyll/klozapin, fluvoksamin, valproat og CYP-indusere for *N*-desmetylklozapin/klozapin, og at fluvoksamin kunne forklare variasjon i klozapin-*N*-oksid/klozapin-ratio.

Tabell 6: Resultater fra multippel lineær regresjon av *N*-desmetylklozapin/klozapin, klozapin-*N*-oksid-cysteinyll/klozapin og klozapin-*N*-oksid/klozapin.

MR: <i>N</i> -desmetylklozapin / Klozapin			MR: Klozapin- <i>N</i> -oksid-cysteinyll / Klozapin		
Variabler	Estimate (S.E.)	p-verdi	Variabler	Estimate (S.E.)	p-verdi
n	325	-	n	325	-
Intercept	-1.10 (0.04)	<0.001	Intercept	-9.6 (0.23)	<0.001
Fluvoksamin	-0.36 (0.10)	<0.001	Fluvoksamin	-1.25 (0.26)	<0.001
Valproat	-0.54 (0.04)	<0.001	Valproat	0.57 (0.12)	<0.001
CYP-induser	0.51 (0.20)	0.01	Alder	0.02 (0.004)	<0.001
Røyker	0.10 (0.04)	0.02	Røyker	0.38 (0.12)	0.001
Prøvetidspunkt (etter siste dose, 10-30 timer)	0.11 (0.04)	0.02	Prøvetidspunkt (etter siste dose, 10-30 timer)	0.64 (0.12)	<0.001
Adjusted R2	0.37	-	Adjusted R2	0.32	
MR: Klozapin- <i>N</i> -oksid / Klozapin					
Variabler	Estimate (S.E.)	p-verdi			
n	325	-			
Intercept	-3.65 (0.07)	<0.001			
Fluvoksamin	-0.58 (0.20)	0.003			
Røyker	0.41 (0.10)	<0.001			
Adjusted R2	0.12				

MR= metabolsk ratio. S.E= Standard Error. En p-verdi <0.05 er vurdert som signifikant. For interagerende legemidler er kontrollgruppen benyttet som referanse.

3.2 Effekt av interagerende legemidler på dannelsen av klozapin-glutationmetabolitter *in vitro*

3.2.1 Inkubasjon av klozapin og humane levermikrosomer

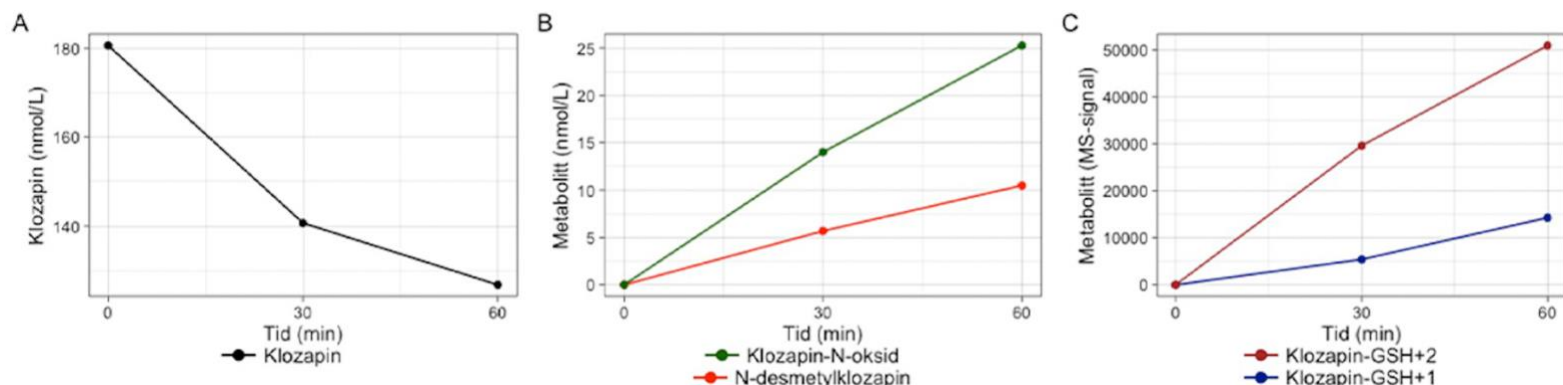
For å undersøke om betingelsene i forsøket ga fornuftige resultater, ble det utført et pilotforsøk med inkubasjon av bare klozapin, uten interagerende legemidler. I dette forsøket ble det observert fra null til 30 minutter en nedgang i klozapinkonsentrasjon på 22%, og videre til 30% etter 60 minutter. Både *N*-desmetylklozapin og klozapin-*N*-oksid økte i konsentrasjon med en faktor på 1.8 fra 30 til 60 minutter inkubasjon.

Tabell 7: Oversikt over konsentrasjon av klozapin, *N*-desmetylklozapin og klozapin-*N*-oksid målt på ulike tidspunkter etter inkubasjon med humane levermikrosomer i pilotforsøket. I tillegg arbitrært nivå (basert på detektorsignal i UHPLC-HRMS-analysene) av klozapin-GSH⁺¹ og klozapin-GSH⁺². Verdien representerer gjennomsnitt av tre paralleller.

Tid (min)	Konsentrasjon (nmol/L)			MS-signal	
	Klozapin	<i>N</i> -desmetylklozapin	Klozapin- <i>N</i> -oksid	Klozapin-GSH ⁺¹	Klozapin-GSH ⁺²
0	180.59	0.00	0.00	0.00	0.00
30	140.68	5.68	14.00	5396.33	29582.67
60	126.78	10.48	25.26	14275.67	50896.67

GSH= glutation. MS= Masse spektrometer.

Det ble også detektert UPLC-HRMS kromatografiske topper som kunne tolkes som klozapin-glutationmetabolitter. Av disse ble det observert en økning i nivåer av både enkeltladet (RT: 0.8, *m/z*: 632.21) og toladet (RT: 0.81, *m/z*: 316.61) klozapin-glutation over tid i dette piloteksperimentet (Figur 15C). Tabell 7 gir en oversikt over kalkulerte konsentrasjoner/nivåer av klozapin og de ulike metabolittene over tid. Under inkubasjonen med klozapin og HLM ble det ikke observert dannelsen av klozapin-cysteinylmetabolitter.

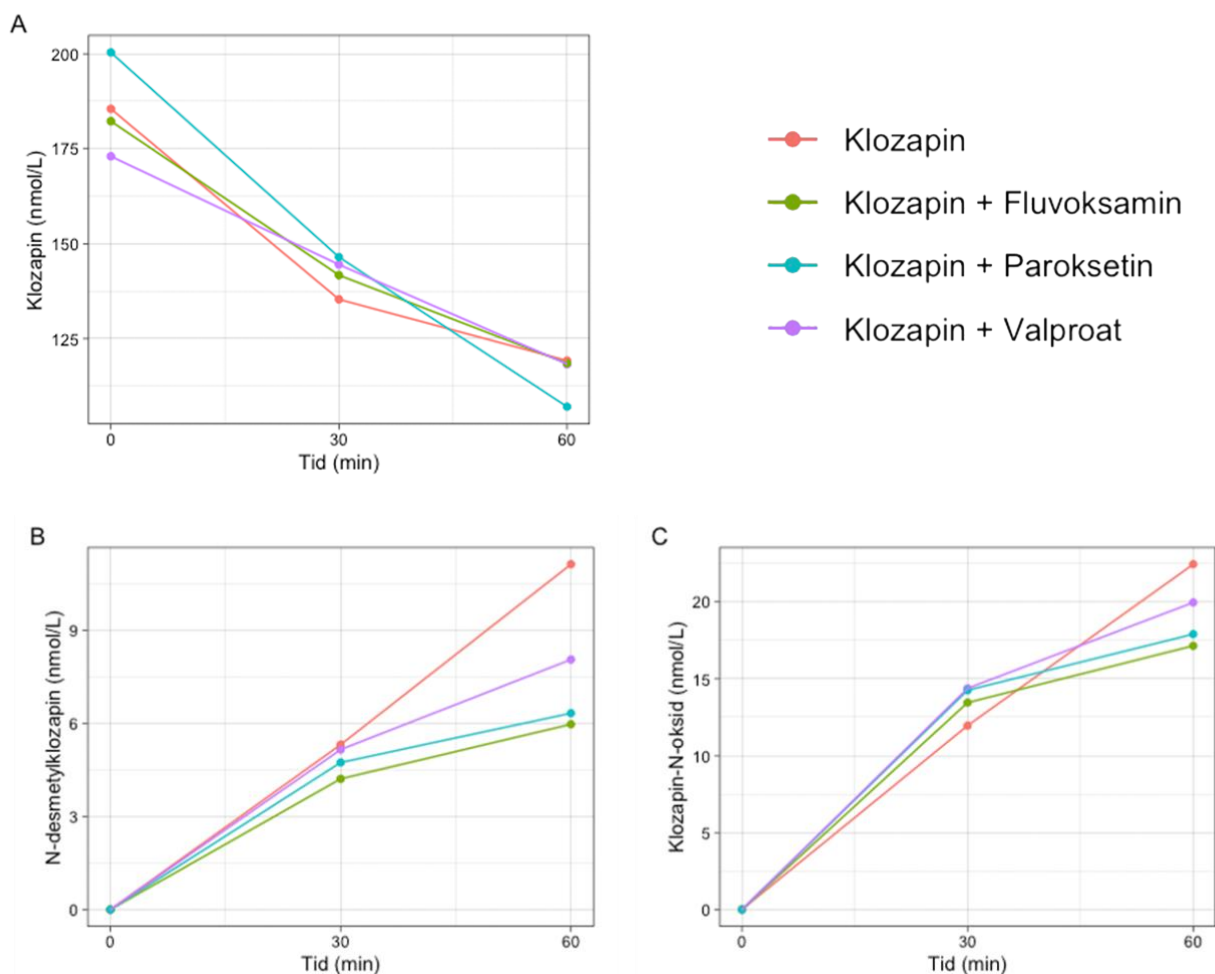


Figur 15: Grafisk fremstilling av metabolisme av klozapin ved inkubasjon med humane levermikrosomer. Konsentrasjon over tid av **A)** klozapin, **B)** *N*-desmetylklozapin og klozapin-*N*-oksid, og **C)** klozapin-glutationmetabolitter. MS= Masse spektrometer.

3.2.2 Inkubasjon av klozapin, interagerende legemidler og humane levermikrosomer

Etter det innledende pilotforsøket, som ga reproducerbare data sammenlignet med en tidligere masteroppgave (110), ble det utført tilsvarende inkubasjoner med spesifikke legemidler som interagerer med ulike CYP-enzymmer. I dette forsøket var det ikke mulig å detektere glutationmetabolitter av klozapin. Forsøket ble utført tre ganger med flere ulike justeringer uten hell i å produsere gode nok kromatografiske topper av klozapin-glutation. Det ble derimot observert metabolittene *N*-desmetylklozapin og klozapin-*N*-oksid.

Med hensyn til klozapin-prøvene ble det etter 60 minutters inkubasjon observert en reduksjon av klozapinkonsentrasjon på 36%. For prøvene også tilsatt valproat, fluvoksamin og paroksetin var det etter 60 minutter en nedgang i klozapinkonsentrasjon på 32%, 35% og 47% respektivt (figur 16). Tabell 8 er en oversikt over metabolske ratioer i de forskjellige gruppene, gruppert etter lengde på inkubasjonen.



Figur 16: Figuren viser **A)** konsentrasjonsnedgang av klozapin, **B)** konsentrasjonsøkning av *N*-desmetylklozapin og **C)** klozapin-*N*-oksid over tid. Figuren er delt inn med farger for kontrollgruppen med bare klozapin, og testgruppene med klozapin og interagerende legemidler.

Det ble under forsøket dannet en av klozapins metabolitter, *N*-desmetylklozapin. Med hensyn til denne ble det etter 30 minutters inkubasjon observert en liten nedgang i metabolsk ratio (NDMC/klozapin) for alle gruppene med interagerende legemiddel, sammenlignet med prøvene med bare klozapin. Etter 60 minutters inkubasjon illustrerte prøvene med fluvoksamin størst differanse sammenlignet med klozapin-prøvene. Under forsøket ble det også observert klozapins andre hovedmetabolitt, klozapin-*N*-oksid. Etter inkubasjon på 60 minutter har prøvene med interagerende legemidler lavere metabolsk ratio enn klozapin-prøvene, hvor fluvoksaminprøvene har størst reduksjon.

Tabell 8: Metabolsk ratio for forholdet mellom *N*-desmetylklozapin/klozapin eller klozapin-*N*-oksid/klozapin i inkubasjoner på 30 og 60 minutter, fordelt på prøver med bare klozapin, og prøver med klozapin og ett interagerende legemiddel.

Metabolsk ratio								
	30 minutter inkubasjon				60 minutter inkubasjon			
	CLZ	CLZ+VAL	CLZ+FLU	CLZ+PAR	CLZ	CLZ+VAL	CLZ+FLU	CLZ+PAR
N-desmetylklozapin / Klozapin	0.039	0.036	0.030	0.032	0.093	0.068	0.050	0.059
Klozapin- <i>N</i> -oksid / Klozapin	0.088	0.099	0.095	0.097	0.188	0.169	0.145	0.167

CLZ= klozapin. VAL= valproat. FLU= fluvoksamin. PAR= paroksetin.

4. Diskusjon

4.1 Effekt av komedikasjon med interagerende legemidler på dannelsen av klozapin-cysteinylnmetabolitter *in vivo*

Det er tidligere vist at forandret klozapinmetabolisme kan være assosiert med klozapintolerabilitet (55, 111). I denne oppgaven ble det identifisert metabolitter av klozapin (cysteinylnmetabolitter) hos pasienter, som antas å være markører for dannelsen av et toksisk nitrenium-ion. Denne metabolitten er svært reaktiv, og er vist å binde nøytrofile granulocytter irreversibelt og er foreslått å kunne forårsake klozapin-indusert nøytropeni og agranulocytose (51). Det er derfor viktig å vite om legemidler som interfererer med metabolismen av klozapin kan påvirke dannelsen til denne nitrenium-metabolitten. I masterprosjektet ble det derfor undersøkt om legemidler som ofte kombineres med klozapin, og som har evnen til å påvirke aktivitet av en rekke metaboliserende enzymer, har effekt på dannelsen av klozapin nitrenium-ion-metabolitten. Ettersom nitrenium-ion er svært reaktivt, kan den ikke måles i serum i sin opprinnelige form, i stedet som deaktivert cysteinylnmetabolitter, som i oppgaven ble brukt som et mål på dannelsen av nitrenium-ion-metabolitten hos pasienter behandlet med klozapin.

Totalt ble effekten av ni legemidler på nivå av cysteinylnmetabolitter undersøkt i denne studien. Av de undersøkte legemidlene var det kun valproat og fluvoksamin som viste signifikant effekt på dannelsen av cysteinyln-metabolitter, henholdsvis økning på 111% med valproat og reduksjon på 71% med fluvoksamin på dannelsen av klozapin-*N*-oksid-cysteinyln. Det økte nivået av klozapin-*N*-oksid-cysteinyln ved kombinasjonsbehandling med klozapin og valproat kan imidlertid potensielt oppstå som følge av to ulike mekanismer, dvs. enten i) økt dannelsen av toksisk nitrenium-ion, og dermed økt mengde tilgjengelig for detoksifisering, eller ii) økt aktivitet av selve detoksifiseringsprosessen. Det er i flere kasuistikkrapporter vist at kombinert bruk av valproat kan gi økt risiko for agranulocytose (66, 67). Dette gir holdepunkter for at valproat øker dannelsen av nitrenium-metabolitter framfor å øke aktiviteten av detoksifiseringsprosessen. Ettersom valproat ofte er aktuell å bruke i kombinasjon med klozapin, er det viktig å studere denne problemstillingen videre.

Mens valproat økte dannelsen av klozapin-*N*-oksid-cysteinyln, førte komedikasjon med fluvoksamin til mindre dannelsen av cysteinyln-metabolitten. Den reduserte dannelsen av cysteinyln-metabolitten kan forekomme av i) redusert dannelsen av klozapin-*N*-oksid som kan resultere i reduksjon i nedstrøms metabolitter, inkludert nitrenium-ion og videre cysteinyln-metabolitt, eller ii) reduksjon i selve detoksifiseringsprosessen av nitrenium-metabolitt via glutation. Denne studien har derimot vist signifikant hemmende effekt av fluvoksamin på metabolismen til klozapin-*N*-oksid, som mulig kan forklare redusert nivå av cysteinyln-metabolitten. En studie av Dursun *et al.* med rotter observerte at dosering med fluvoksamin 50-200 mg/kg reduserte aktiviteten av myeloperoksidaser (112), noe som kan forklare redusert dannelsen av cysteinyln-metabolitten da nitrenium-ion trolig dannes av disse peroksidase-enzymene. En annen studie viste at pasienter som brukte klozapin i monoterapi hadde signifikant høyere granulocyt-tall enn pasientene komedisinert med fluvoksamin (113), mens en annen studie beskrev at tilleggsbehandling med fluvoksamin ikke reduserte selve risikoen for agranulocytose (114). Mer forskning er nødvendig for å kartlegge mekanismen og de faktiske konsekvensene av den reduserte dannelsen av

klozapin-*N*-oksid-cysteinyll ved samtidig bruk av klozapin og fluvoksamin, da en eventuell gunstig effekt på risiko for agranulocytose vil være nyttig for pasientene.

I denne studien ble det observert at fluvoksamin hadde en signifikant hemmende effekt på dannelsen av NDMC, noe som tidligere er beskrevet (47, 63). NDMC har blitt assosiert med mange bivirkninger i flere studier (48, 55), noe som kan indikere at samtidig bruk med fluvoksamin kan være gunstig. Dette har også blitt indirekte vist i en kasuistikkrapport fra 2015 som viste flere reduserte bivirkninger av klozapin ved tilleggsbehandling med fluvoksamin (114). Valproat viste også en signifikant effekt ved å redusere omdanning av klozapin til NDMC sammenlignet med kontrollgruppen. Derimot ble det ikke observert endret klozapinkonsentrasjoner ved samtidig bruk med valproat, som kan indikere at legemiddelet trolig induserer videre metabolisme av NDMC, noe som er i tråd med tidligere funn (68, 115). Nedstrømsmetabolitter av NDMC kan derfor tenkes å være negativt for klozapintolerabilitet (vist med valproat), mens påvirkning via andre NDMC-metabolismeveier kan være gunstig (vist med fluvoksamin). Fenobarbital, fenytoin og karbamazepin viste også signifikante endringer i metabolsk ratio for forholdet mellom NDMC og klozapin, og induserende effekter i denne metabolismeveien er tidligere kjent (65). Selv om effektene samsvarer med tidligere funn, er det vanskelig å trekke konklusjoner ut fra disse resultatene, da studiegruppen besto av tre pasienter, og det var stor spredning i deres metabolske ratioer.

Bruk av CYP2D6-hemmere som bupropion, fluoksetin, paroksetin og levomepromazin viste ingen signifikant effekt på dannelsen av noen av cysteinyllmetabolittene, *N*-desmetylklozapin eller klozapin-*N*-oksid i denne studien. Dette resultatet støttes av tidligere studier som har vist at hemmere av CYP2D6 generelt har begrenset påvirkning på metabolismen av klozapin (45). Dermed kan man anta at hemming av CYP2D6 ikke vil være av betydning i klozapin-glutationmetabolismen og trolig ikke være relevant for å påvirke tolerabiliteten. Det ble derimot observert en mulig paradoksal effekt, med økt metabolsk ratio ved komedikasjon av disse legemidlene. Dette kan skyldes en forskjøvet likevekt mot ikke-CYP2D6-avhengige metabolske veier for NDMC, klozapin-*N*-oksid, og cysteinyllmetabolittene, men dette er en spekulasjon som bør studeres videre.

I denne studien ble det observert en økning i C/D-ratioer av klozapin ved samtidig bruk av fluvoksamin. Klinisk praksis involverer ofte bruk av fluvoksamin som et supplement for å oppnå tilstrekkelig serumkonsentrasjoner av klozapin ved lavere klozapindoser (63). Trenden med redusert dosebehov ble observert i denne studien og samsvarer med tidligere studier (116). Pasientene som røyker hadde høyere daglig dose av klozapin sammenlignet med ikke-røykere, og hadde generelt lavere dosejusterte serumkonsentrasjoner av klozapin. Pasientene som røykte og var komedisinert med fluvoksamin var den eneste testgruppen som hadde lik C/D-ratio av klozapin som pasientene som ikke røykte. Dette kan sannsynligvis forklares med at sigaretttrøyk har en induksjonseffekt på CYP1A2, samtidig som fluvoksamin hemmer det samme enzymet. Sammenlignet med de andre testgruppene kan dette føre til at røyking ikke får like stor påvirkning på serumkonsentrasjonen av klozapin hos pasientene med tilleggsbehandling med fluvoksamin. Denne utlignende effekten samsvarer med en tidligere studie (117).

Regresjonsanalysen indikerte at relevante kovariater kan forklare 12-37% av variasjonen i metabolsk ratio, som er i tråd med andre studier (118, 119). Gyldig dose var ikke en signifikant faktor for variasjon i metabolsk ratio, antagelig på grunn av oppgitte doser som møtte dosekriteriene hos de fleste pasientene i studien. Røyking var derimot assosiert med

endring i metabolsk ratio i alle inkluderte metabolismeveier, men da det var lik fordeling av røykere i alle grupper, ble det antatt at røyking ville påvirke gruppene likt. Økende alder viste en økning i dannelse av klozapin-*N*-oksid-cysteinyll med 2.3% per år. Akkurat hvilke enzymer som påvirkes er ikke klart, men resultatet gir holdepunkter for at denne metabolismeveien forandres med alder. Endringen kan blant annet skyldes redusert nyre- og/eller leverfunksjon, og studier har også vist at aldersrelatert reduksjon i nyrefunksjon sekundært kan påvirke legemiddelmetabolisme i leveren negativt (120).

4.2 Effekt av interagerende legemidler på dannelse av klozapin-glutationmetabolitter *in vitro*

Etter inkubasjon av klozapin med HLM ble det kun påvist dannelse av klozapin-glutationmetabolitter i det første pilotforsøket der formålet var å undersøke inkubasjonsbetingelser for videre forsøk. I forsøkene som ble utført etter pilotforsøket ble det imidlertid målt dannelse av metabolittene *N*-desmetylklozapin og klozapin-*N*-oksid som økte over tid, parallelt med avtagende klozapinkonsentrasjon, noe som indikerer at inkubasjonsbetingelsene la til rette for legemiddelmetabolisme. Etter 60 minutters inkubasjon ble det observert i varierende grad redusert dannelse av både *N*-desmetylklozapin og klozapin-*N*-oksid i alle prøvene med valproat, fluvoksamin og paroksetin, sammenlignet med kontrollprøvene, som indikerer at de interagerende legemidlene har ført til noe hemming av klozapinmetabolismen (tabell 8, figur 11).

Det er kjent fra flere studier at både valproat og fluvoksamin påvirker nivået av NDMC (20). *In vitro* forsøket demonstrerte også enzymhemming av fluvoksamin i denne metabolismeveien, med nesten 50% reduksjon i metabolsk ratio sammenlignet med kontrollprøvene. I *in vivo*-forsøket viste valproat reduserte nivåer av NDMC uten å signifikant påvirke klozapinkonsentrasjonen. *In vitro* forsøket reproduserte ikke disse samme effektene på NDMC. Valproats mekanisme for legemiddelinteraksjon med klozapin er ikke fullstendig klar (68), men *in vivo* forsøket indikerer at valproat ikke hemmer metabolismen av klozapin til NDMC, men induserer metabolismen av NDMC til andre nedstrøms metabolitter. Eventuell enzyminduksjon av valproat ville ikke gitt utslag i en slik *in vitro* studie med levermikrosomer, da mikrosomene ikke inneholder komponenter som kan øke ekspresjonen og uttrykking av flere CYP-enzymmer. For et slikt forsøk vil det vært mer hensiktsmessig å benytte seg av humane hepatocytter fra en cellelinje (121). *In vitro* studien reproduserte også fluvoksamins hemmende effekter *in vivo* på dannelsen av klozapin-*N*-oksid. Dette samsvarer med andre studier som indirekte har vist fluvoksamins hemmende effekter på denne metabolismeveien, men ikke signifikant (116, 122, 123).

4.3 Metodologiske vurderinger

En av styrkene ved den retrospektive *in vivo* studien er muligheten til å bruke utfyllende opplysninger slik som interagerende legemidler og nøyaktige serumkonsentrasjoner av klozapin og metabolitter, for å fastslå effektene av interaksjonen mellom legemidlene på klozapinmetabolismen. Dette gjorde det også mulig å korrigere for konfunderende faktorer som røyking, kjønn, alder, dose og ulike blodtakingstidspunkter i klinisk praksis. Alternativet til denne metodikken ville vært en randomisert og kontrollert klinisk studie (RCT), som for tiden generelt sett er godt korrelert med store observasjonsstudier eller real-world data, slik som i denne studien. En annen styrke ved studien er selve muligheten til å gå retrospektivt tilbake i full-scan UHPLC-HRMS spektre og å semi-kvantifisere interessante metabolitter, som kan gi nyoppdagelse av terapeutiske biomarkører, drive innovasjon og føre til optimalisering av eksisterende legemiddelbehandling. Flere styrker ved studien er inkludering mange pasienter, det er sikret at kontrollgruppen er så komplett som mulig, og testgruppene er screenet for eventuelt andre interagerende legemidler, noe som gjør det sannsynlig at disse pasientene bare går på ett interagerende legemiddel i tillegg til klozapin.

En svakheten i metoden er identifiseringen og semi-kvantifiseringen av cysteinylmetabolittene. For disse metabolittene har man ikke referansestandard da det ikke er kommersielt tilgjengelig. Mangelen på referansestandard gjør det vanskelig å fastslå med sikkerhet om det er et lineært forhold mellom MS-signal og konsentrasjon i analysen, og det ble derfor utført en semi-kvantitativ konsentrasjonsbestemmelse. Det sees derimot linearitet hos analyttene med referansestandard, som gir holdepunkter for at metoden er akseptabel og det foreligger liten grunn til å tro at cysteinylmetabolittene vil opptre annerledes. Den validerte metoden for å detektere og kvantifisere legemiddelkonsentrasjoner i serum hos SFP (ca. 35 analytter) har under 5% analytisk avvik som viser meget god sensitivitet og spesifisitet. En annen begrensning med metoden er at pasientpopulasjonen i kontrollgruppen ikke er kontrollert som i RCT-studier med tanke på etterlevelse og kontroll av andre interagerende legemidler. Imidlertid ble kontrollgruppen screenet for alle interagerende legemidlene (bortsett fra valproat) inkludert i studien. Pasientene skulle ut ifra rekvisisjonsskjema ikke bruke valproat i tillegg til klozapin, men på grunn av analytiske utfordringer ble det ikke undersøkt om de faktisk hadde legemidlet påvist i serum. Dette er en usikkerhet da rekvisisjonsskjema kan være mangelfull eller ukorrekt utfylt, noe som generelt kan resultere i skjevhet i datasettet.

Andelen av den totale variasjonen i forholdet mellom metabolitt og modersubstans som kunne forklares av regresjonsanalysene var mellom 12-37%. Dette indikerer at det er flere ukjente faktorer som kan påvirke forholdet mellom metabolitt og modersubstans, slik som komorbiditet og andre diagnoser, andre interagerende legemidler, etterlevelse av legemidlene, vekt og BMI. En annen svakhet er at denne studien kun brukte én prøve per pasient, og dermed bare gir et øyeblikksbilde av serumkonsentrasjoner av klozapin og metabolittene. En full AUC-kurve ville gitt et mer helhetlig bilde av pasientens medisinbruk over tid, og hadde vært mer hensiktsmessig.

Det kan være utfordrende å få nøyaktig informasjon om pasienters røykestatus basert på selvrapporing, og andre metoder slik som måling av kotinin kan være fordelaktig. Kotinin kan påvises i plasma, urin og spytt i inntil en uke etter siste sigarett, og har en halveringstid på omtrent 20 timer (109). Flere studier har vist at denne metoden er effektiv

for å skille røykere fra ikke-røykere (124). Det må likevel tas i betraktning at denne metoden ikke kan skille mellom ulike former for nikotinbruk, som for eksempel snus, e-sigaretter eller andre nikotinprodukter. Selv om disse produktene også inneholder nikotin, blir ikke pasientene utsatt for sigarettøyk, som er komponenten som interagerer med legemiddelmetabolisme. Denne metoden kan derfor resultere i skjevheter i datasettet, da pasientene kan få feil røykestatus og ikke blir utsatt for den forventede legemiddelinteraksjonen. Metoden vil heller ikke registrere pasienter som røyker sporadisk og i perioder, da kotinin kun kan påvises i blod i litt over en uke etter inntak av nikotin (109). Fordelingen av røykere i kontroll- og testgruppene var statistisk like, og det antas at den potensielle støyen i klassifisering av røykere vil være lik i kontrollgruppen og testgruppene, og dermed ikke påvirke resultatene i stor grad. Til tross for disse svakhetene er kotinin-metoden et mer nøyaktig estimat enn selvrapportert røykestatus for å skille røykere fra ikke-røykere.

Hvorfor klozapin-glutation kun ble identifisert i ett av de fire *in vitro*-forsøkene er ikke klart. Det er forsøkt å belyse noen faktorer som kan ha spilt inn på de varierende resultatene. Selv om klozapin-glutationmetabolitter ikke ble observert i *in vitro* forsøket som inkluderte interagerende legemidler, ble det likevel demonstrert at betingelsene i forsøket la til rette for legemiddelmetabolisme. En potensiell forklaring på varierende resultater i *in vitro* forsøket kan være kvaliteten på levermikrosomene, og en mulighet er at mikrosomene hadde begrenset evne til å danne eller detoksifisere de toksiske og reaktive nitrenium-metabolittene. Dette kan blant annet skyldes farmakogenetisk variasjon hos donor eller utsettelse for temperatursvingninger (125). En studie av Pearce *et al.* beskrev at aktiviteten til flere CYP-enzymmer var stabil opp til 10 sykluser fra -80 °C til romtemperatur (126). Imidlertid er det vanskelig å forutse er hvor mange sykluser med temperatursvingninger mikrosomene har vært utsatt for før de skal brukes i forsøk, og om stabiliteten er bevart (125).

Andre faktorer som kan føre til varierende resultater i *in vitro*-forsøk er buffer, bufferstyrke og pH for inkubasjonen (125). Disse faktorene var derimot like under alle forsøkene, og kan følgelig ikke forklare hvorfor det ble dannet glutation bare i det ene forsøket. Glutation er ustabil i vandig løsning og utsatt for oksidasjon til GSSG (127, 128). For å minimere risikoen for oksidasjon under forsøket, ble GSH-oppløsningen laget like før inkubasjonen. En faktor som har variert mellom forsøkene, er hvordan prøvene ble oppbevart rett etter inkubasjon og under transport fra laboratoriet til SFP hvor prøvene ble analysert. Dette ble justert for å sikre at alle prøvene ble håndtert på samme måte. Prøvene fra *in vitro* forsøket der det ble dannet klozapin-glutation ble analysert på UHPLC-HRMS dagen etter forsøket, og dette ble også etter hvert gjort for prøvene med interagerende legemidler for å eliminere ulikheter i forsøkene og minimere risiko for eventuell oksidasjon.

Spørsmålet om hvorvidt prøveoppbeidelsen og UHPLC-HRMS-metoden som er brukt i denne studien er optimal for å identifisere klozapin-glutation kan diskuteres. Prøveoppbeidelsen var for det meste automatisert, og manuelle trinn ble observert av en erfaren kjemiker og metodespesialist ved SFP, slik at variasjoner i prøveoppbeidelsen burde ikke være utslagsgivende for de varierende resultatene. En hypotese kan imidlertid være at det er klozapin-glutation i prøven, men konsentrasjonen er under nedre grense for kvantifisering (LOD) for metoden. Masterprosjektet fra 2022 (110) utførte glutationsforsøket med og uten GST, og viste klart målbare mengder av klozapin-glutation i begge forsøk. Selv om de kromatografiske signalene var noe høyere i forsøket med GST, ble det

vurdert i denne studien at det var tilstrekkelig å utføre forsøket uten GST, da GSH-konjugering også skjer spontant. Hvis konsentrasjonen av klozapin-glutation i denne studien lå akkurat under LOD, kan det vurderes om tilførsel av GST ville gjort det mulig å påvise analytten. I sammenligning med andre studier (129), ble prøvene analysert i denne studien fortynnet mer, noe som fører til at lavere konsentrasjon blir injisert enn opprinnelig konsentrasjon. Dette ble gjort for å tilpasse prøvene til HPLC-gradienten, og fordi prøvene skulle analyseres på et rutineinstrument, og det ikke er ønskelig å injiseres høye nivåer av ukjent/uren prøve. I tillegg ble det i denne studien på grunn av rutinen på SFP injisert mindre prøve i analyseinstrumentet enn hva som har blitt gjort i andre studier (46), og det kan vurderes om en økning i injeksjonsvolum kunne vært utslagsgivende for deteksjon av klozapin-glutation.

Metoden for full-scan analyse med Orbitrap-MS muliggjør bred identifisering og måling av flere analytter samtidig, noe som er gunstig, men kan samtidig gå på bekostning av spesifisitet og sensitivitet. En alternativ tilnærming ville vært å benytte MS/MS, en scan-metode med noe høyere sensitivitet. Det er også viktig å vurdere at analysemetoden brukt for å analysere prøvene fra *in vitro*-forsøket opprinnelig er optimalisert for å identifisere psykofarmaka i serum. Klozapin-glutation er et større molekyl enn de fleste psykofarmaka, og har andre fysikalsk-kjemiske egenskaper, inkludert både syre- og baseegenskaper. Mens pK_a -verdiene for glutatone og klozapin er kjent (130, 131), er det uklart hvordan disse verdiene påvirkes ved konjugering til klozapin-glutation. Variasjon i bufferløsningens pH kan forekomme, og kan påvirke analytters ionisering. Slik variasjon har ikke innvirkning på rutineanalyser av psykofarmaka ved SFP, men kan være utslagsgivende om pK_a for klozapin-glutation ligger i grensen for om molekylet blir ionisert eller ikke i buffer. Metoden kan derfor bli usikker dersom en forbindelse beveger seg mellom ionisert og ikke-ionisert form som følge av suboptimal pH i buffer. En annen forklaring kan være dag-til-dag variasjon i instrumentet med tanke på respons. Det kan forekomme noe forskjellig respons om man analyserer prøvene på et nyvasket instrumenter sammenlignet med et instrument som har analysert mange prøver. Denne variasjonen spiller igjen ingen rolle for rutineanalysene ved SFP, men kan påvirke ved deteksjon av prøver med analytter i svært lave konsentrasjoner.

En eventuell uønsket interaksjon mellom glutatone og valproat, paroksetin og fluvoksamin kan også være en potensiell forklaring. Konsentrasjonen av de interagerende legemidlene var fem ganger høyere enn klozapin, og det er mulig at glutatone kan ha hatt høyere affinitet for disse legemidlene enn klozapin, som kan ha resultert i mindre konjugering av klozapin, som igjen kan ha ført til konsentrasjoner under LOD.

5. Konklusjon

I denne studien ble flere legemidler undersøkt for deres effekter på metabolisme av klozapin-cysteinylderivatmetabolitter. Resultatene viser at valproat økte dannelsen av klozapin-*N*-oksid-cysteinylderivat, mens fluvoksamin reduserte dannelsen av den samme metabolitten. Det faktum at kombinasjonen med valproat og klozapin har vist tendenser til økt risiko for agranulocytose, indikerer en mulig mekanisme der valproat øker dannelsen av nitreniummetabolitter og dermed øker risikoen for granulocyt-toksisitet. Fluvoksamin er i denne studien i motsetning assosiert med redusert dannelsen av klozapin-*N*-oksid-cysteinylderivat. Resultatene kan gi holdepunkter for at tilleggsbehandling med valproat kan være ugunstig for risikoen for agranulocytose, mens komedikasjon med fluvoksamin kan være gunstig, hvis nivåene av cysteinylderivatene reflekterer nitrenium-ion dannelsen. Imidlertid trengs det ytterligere studier for å undersøke mekanismene og de faktiske konsekvensene av interaksjonene.

In vitro-forsøket med klozapin og humane levermikrosomer viste at inkubasjonsbetingelsene i pilotforsøket la til rette for legemiddelmetabolisme. Imidlertid var resultatene fra forsøkene med interagerende legemidler inkonklusive, og ga ikke informasjon om effekter av valproat, fluvoksamin og paroksetin på dannelsen av glutationmetabolitter av klozapin.

Litteraturliste

1. Owen MJ, Sawa A, Mortensen PB. Schizophrenia. *Lancet*. 2016;388(10039):86-97.
2. Laursen TM, Nordentoft M, Mortensen PB. Excess early mortality in schizophrenia. *Annu Rev Clin Psychol*. 2014;10:425-48.
3. Tueth MJ. Schizophrenia: Emil Kraepelin, Adolph Meyer, and beyond. *J Emerg Med*. 1995;13(6):805-9.
4. World Health Organization. Schizophrenia [Internett]. WHO; 2022 [oppdatert: 10.01.22; hentet 18.09.22]. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>.
5. Andreassen OA, Malt UF, Malt EA. Lærebok i psykiatri. 4. utg. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS; 2018. s. 363, 369-70, 373, 378, 381, 910-11.
6. Orrico-Sánchez A, López-Lacort M, Muñoz-Quiles C, Sanfélix-Gimeno G, Díez-Domingo J. Epidemiology of schizophrenia and its management over 8-years period using real-world data in Spain. *BMC Psychiatry*. 2020;20(1):149.
7. Ritter JM, Flower R, Henderson G, Loke YK, MacEwan D, Rang HP. Rang & Dale's Pharmacology. 9. utg ed. Edinburgh: Elsevier Health Sciences; 2020. s. 153, 592-93.
8. Whittlesea C, Hudson K. Clinical Pharmacy and Therapeutics. 6. utg. London: Elsevier Health Sciences; 2019. s. 513-14.
9. Helsebiblioteket. Schizofreni [Internett]. Helsebiblioteket; 2022 [oppdatert: 22.12.22; hentet: 19.08.22]. Tilgjengelig fra: <https://www.helsebiblioteket.no/innhold/artikler/pasientinformasjon/schizofreni>.
10. Legehåndboka. Diagnostikk av schizofreni [Internett]. Legehåndboka; 2021 [oppdatert: 19.04.21; hentet: 20.03.23]. Tilgjengelig fra: <https://legehandboka.no/handboken/kliniske-kapitler/psykiatri/pasientinformasjon/schizofreni-og-psykose/schizofreni-diagnostikk>.
11. Kay SR. Positive-negative symptom assessment in schizophrenia: psychometric issues and scale comparison. *Psychiatr Q*. 1990;61(3):163-78.
12. Patel KR, Cherian J, Gohil K, Atkinson D. Schizophrenia: overview and treatment options. *P t*. 2014;39(9):638-45.
13. Howes O, McCutcheon R, Stone J. Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century. *J Psychopharmacol*. 2015;29(2):97-115.
14. Stępnicki P, Kondej M, Kaczor AA. Current Concepts and Treatments of Schizophrenia. *Molecules*. 2018;23(8).
15. Stahl SM. Beyond the dopamine hypothesis of schizophrenia to three neural networks of psychosis: dopamine, serotonin, and glutamate. *CNS Spectr*. 2018;23(3):187-91.
16. Legehåndboka. Antipsykotika [Internett]. Legehåndboka; 2022 [oppdatert: 22.07.22; hentet: 23.09.22]. Tilgjengelig fra: <https://legehandboka.no/handboken/legemidler/bruk-av-legemidler/antipsykotika>.
17. Grinchii D, Dremencov E. Mechanism of Action of Atypical Antipsychotic Drugs in Mood Disorders. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24).
18. Legemiddelhandboka. Schizofreni [Internett]. Oslo: Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhandbok; 2021 [oppdatert: 19.01.21; hentet: 05.10.22]. Tilgjengelig fra: <https://www.legemiddelhandboka.no/T5.4.1/Schizofreni>.

19. Dean L, Kane M. Clozapine Therapy and CYP Genotype [Internett]. Rockville Pike: National Library of Medicine; 2016 [oppdatert 26.05.21; hentet 28.09.22]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK367795/#:~:text=Clozapine%20is%20primarily%20metabolized%20in,CYP2D6%20playing%20a%20minor%20role.>
20. Molden E. Therapeutic drug monitoring of clozapine in adults with schizophrenia: a review of challenges and strategies. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2021;17(10):1211-21.
21. Helsebiblioteket. Ekstrapyramidale bivirkninger ved behandling med antidepressiva [Internett]. Helsebiblioteket; 2019 [oppdatert: 18.06.19; hentet 10.11.22]. Tilgjengelig fra: <https://www.helsebiblioteket.no/innhold/artikler/psykisk-helse/psyknytt/ekstrapyramidale-bivirkninger-ved-behandling-med-antidepressiva-relis.no#:~:text=Ekstrapyramidale%20bivirkninger%20er%20en%20fellesbetegnelse,leppene%20spesielt%20ofte%20er%20involvert.>
22. Jibson MD. First-generation antipsychotic medications: Pharmacology, administration, and comparative side effects [Internett]. UpToDate; 2022 [oppdatert: 09.06.22; hentet: 20.03.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.uptodate.com/contents/first-generation-antipsychotic-medications-pharmacology-administration-and-comparative-side-effects.>
23. Legemiddelhåndboka. Antipsykotika [Internett]. Oslo: Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok; 2015 [oppdatert: 01.10.22; hentet: 06.10.22]. Tilgjengelig fra: <https://www.legemiddelhandboka.no/L5.2/Antipsykotika.>
24. Idänpään-Heikkilä J, Alhava E, Olkinuora M, Palva IP. Agranulocytosis during treatment with chlozapine. Eur J Clin Pharmacol. 1977;11(3):193-8.
25. Khokhar JY, Henricks AM, Sullivan EDK, Green AI. Unique Effects of Clozapine: A Pharmacological Perspective. Adv Pharmacol. 2018;82:137-62.
26. Kane J, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. Arch Gen Psychiatry. 1988;45(9):789-96.
27. Nassir GS. Clinical Psychopharmacology. 1. Utg. Oxford: Oxford University Press Inc; 2019. s. 203, 230.
28. Mijovic A, MacCabe JH. Clozapine-induced agranulocytosis. Ann Hematol. 2020;99(11):2477-82.
29. Hippus H. A historical perspective of clozapine. J Clin Psychiatry. 1999;60 Suppl 12:22-3.
30. Correll CU, Howes OD. Treatment-Resistant Schizophrenia: Definition, Predictors, and Therapy Options. J Clin Psychiatry. 2021;82(5).
31. Nielsen J, Dahm M, Lublin H, Taylor D. Psychiatrists' attitude towards and knowledge of clozapine treatment. J Psychopharmacol. 2010;24(7):965-71.
32. Kylesø L, Smith RL, Karlstad Ø, Andreassen OA, Molden E. Undetectable or subtherapeutic serum levels of antipsychotic drugs preceding switch to clozapine. NPJ Schizophr. 2020;6(1):17.
33. Thien K, O'Donoghue B. Delays and barriers to the commencement of clozapine in eligible people with a psychotic disorder: A literature review. Early Interv Psychiatry. 2019;13(1):18-23.
34. Haidary HA, Ranjit KP. Clozapine [internett]. Rockville Pike: National Library of Medicine, StatPearls Publishing; [oppdatert: 06.12.21; hentet 24.20.22]. Tilgjengelig fra: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535399/.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535399/)

35. Miyamoto S, Miyake N, Jarskog LF, Fleischhacker WW, Lieberman JA. Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. *Mol Psychiatry*. 2012;17(12):1206-27.
36. De Berardis D, Rapini G, Olivieri L, Di Nicola D, Tomasetti C, Valchera A, et al. Safety of antipsychotics for the treatment of schizophrenia: a focus on the adverse effects of clozapine. *Ther Adv Drug Saf*. 2018;9(5):237-56.
37. Wenthur CJ, Lindsley CW. Classics in chemical neuroscience: clozapine. *ACS Chem Neurosci*. 2013;4(7):1018-25.
38. Krivoy A, Gaughran F, Weizman A, Breen G, MacCabe JH. Gene polymorphisms potentially related to the pharmacokinetics of clozapine: a systematic review. *Int Clin Psychopharmacol*. 2016;31(4):179-84.
39. Felleskatalogen. Leronex [Internett]. Felleskatalogen; 2020 [oppdatert: 30.11.20; hentet: 07.03.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/leronex-viatris-560891>.
40. Procyshyn RM, Vila-Rodriguez F, Honer WG, Barr AM. Clozapine administered once versus twice daily: does it make a difference? *Med Hypotheses*. 2014;82(2):225-8.
41. Cozza KL, Armstrong SC, Oesterheld JR. Concise Guide to Drug Interaction Principles for Medical Practice: Cytochrome P450s, Ugts, P-Glycoproteins (Concise Guides). 2. utg. Washington: Amer Psychiatric Pub Inc; 2003. s. 13.
42. Spigset O, Slørdal L. Grunnleggende farmakokinetikk – eliminasjon. *Tidsskr Nor Lægeforening*; 2005;125(9):1181-2.
43. Susa ST, Preuss CV. Drug Metabolism [Internett]: Rockville Pike: National Library of Medicine, StatPearls Publishing LLC; 2022 [oppdatert: 21.09.22; hentet 28.10.22]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442023/>.
44. Berel C, Mossé U, Wils J, Cousin L, Imbert L, Gerardin P, et al. Interest of Fluvoxamine as an Add-On to Clozapine in Children With Severe Psychiatric Disorder According to CYP Polymorphisms: Experience From a Case Series. *Front Psychiatry*. 2021;12:669446.
45. Thorn CF, Müller DJ, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: clozapine pathway, pharmacokinetics. *Pharmacogenet Genomics*. 2018;28(9):214-22.
46. Dragovic S, Boerma JS, van Bergen L, Vermeulen NP, Commandeur JN. Role of human glutathione S-transferases in the inactivation of reactive metabolites of clozapine. *Chem Res Toxicol*. 2010;23(9):1467-76.
47. Kylesø L, Smith RL, Wollmann BM, Karlstad Ø, Andreassen OA, Molden E. Metabolite Profiling of Clozapine in Patients Switching Versus Maintaining Treatment: A Retrospective Pilot Study. *J Clin Psychopharmacol*. 2022;42(5):470-4.
48. Schoretsanitis G, Kane JM, Ruan CJ, Spina E, Hiemke C, de Leon J. A comprehensive review of the clinical utility of and a combined analysis of the clozapine/norclozapine ratio in therapeutic drug monitoring for adult patients. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2019;12(7):603-21.
49. Smith RL, Kylesø L, Haslemo T, Andreassen OA, Molden E. Reduction in N-Desmethylclozapine Level Is Determined by Daily Dose But Not Serum Concentration of Valproic Acid-Indications of a Presystemic Interaction Mechanism. *Ther Drug Monit*. 2019;41(4):503-8.
50. Dragovic S, Gunness P, Ingelman-Sundberg M, Vermeulen NP, Commandeur JN. Characterization of human cytochrome P450s involved in the bioactivation of clozapine. *Drug Metab Dispos*. 2013;41(3):651-8.

51. Ng W, Kennar R, Uetrecht J. Effect of clozapine and olanzapine on neutrophil kinetics: implications for drug-induced agranulocytosis. *Chem Res Toxicol*. 2014;27(7):1104-8.
52. Vredenburg G, Vassell KP, Commandeur JN, Vermeulen NP, Vos JC. Reconstitution of the interplay between cytochrome P450 and human glutathione S-transferases in clozapine metabolism in yeast. *Toxicol Lett*. 2013;222(3):247-56.
53. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3143-53.
54. Cooper AJL, Hanigan MH. 10.17 - Metabolism of Glutathione S-Conjugates: Multiple Pathways. In: McQueen CA, editor. *Comprehensive Toxicology (Third Edition)*. Oxford: Elsevier; 2018. p. 363-406.
55. Smith RL, Haslemo T, Andreassen OA, Eliasson E, Dahl ML, Spigset O, et al. Correlation Between Serum Concentrations of N-Desmethylclozapine and Granulocyte Levels in Patients with Schizophrenia: A Retrospective Observational Study. *CNS Drugs*. 2017;31(11):991-7.
56. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 2009;30(1-2):1-12.
57. Torii-Goto A, Yoshimi A, Tashiro Y, Ukigai M, Matsumoto A, Ozaki N, et al. A Reactive Metabolite of Clozapine Induces Hematopoietic Toxicity in HL-60 Cells Undergoing Granulocytic Differentiation through Its Effect on Glutathione Metabolism. *Biol Pharm Bull*. 2022;45(9):1232-7.
58. Murray M, Zhang WV, Edwards RJ. Variation in the Response of Clozapine Biotransformation Pathways in Human Hepatic Microsomes to CYP1A2- and CYP3A4-selective Inhibitors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018;122(4):388-95.
59. Smith RL, O'Connell K, Athanasiu L, Djurovic S, Kringen MK, Andreassen OA, et al. Identification of a novel polymorphism associated with reduced clozapine concentration in schizophrenia patients—a genome-wide association study adjusting for smoking habits. *Translational Psychiatry*. 2020;10(1):198.
60. Siskind D, Sharma M, Pawar M, Pearson E, Wagner E, Warren N, et al. Clozapine levels as a predictor for therapeutic response: A systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand*. 2021;144(5):422-32.
61. Lu Y, Figler B, Huang H, Tu YC, Wang J, Cheng F. Characterization of the mechanism of drug-drug interactions from PubMed using MeSH terms. *PLoS One*. 2017;12(4):e0173548.
62. Boobis A, Watelet J-B, Whomsley R, Benedetti MS, Demoly P, Tipton K. Drug interactions. *Drug Metabolism Reviews*. 2009;41(3):486-527.
63. Leising J, Barr AM, Procyshyn RM, Ainsworth NJ, White RF, Honer W, et al. High-Dose Fluvoxamine Augmentation to Clozapine in Treatment-Resistant Psychosis. *J Clin Psychopharmacol*. 2021;41(2):186-90.
64. de Leon J, Schoretsanitis G, Kane JM, Ruan CJ. Using therapeutic drug monitoring to personalize clozapine dosing in Asians. *Asia Pac Psychiatry*. 2020;12(2):e12384.
65. Greenwood-Smith C, Lubman DI, Castle DJ. Serum clozapine levels: a review of their clinical utility. *J Psychopharmacol*. 2003;17(2):234-8.
66. Malik S, Lally J, Ajnakina O, Pritchard M, Krivoy A, Gaughran F, et al. Sodium valproate and clozapine induced neutropenia: A case control study using register data. *Schizophr Res*. 2018;195:267-73.
67. Pantelis C, Adesanya A. Increased risk of neutropaenia and agranulocytosis with sodium valproate used adjunctively with clozapine. *Aust N Z J Psychiatry*. 2001;35(4):544-5.

68. Smith RL, Wollmann BM, Kylesø L, Tran TTA, Tveito M, Molden E. Effect of Valproic Acid on the Metabolic Spectrum of Clozapine in Patients With Schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol.* 2022;42(1):43-50.
69. Hommers L, Scharl M, Hefner G, Hohner M, Fischer M, Pfuhlmann B, et al. Comedication of Valproic Acid Is Associated With Increased Metabolism of Clozapine. *J Clin Psychopharmacol.* 2018;38(3):188-92.
70. de Leon J, Diaz FJ. A meta-analysis of worldwide studies demonstrates an association between schizophrenia and tobacco smoking behaviors. *Schizophr Res.* 2005;76(2-3):135-57.
71. Wagner E, McMahon L, Falkai P, Hasan A, Siskind D. Impact of smoking behavior on clozapine blood levels - a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand.* 2020;142(6):456-66.
72. Preissner SC, Hoffmann MF, Preissner R, Dunkel M, Gewiess A, Preissner S. Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy. *PLoS One.* 2013;8(12):e82562.
73. Lenk H, Løvstetten Smith R, O'Connell KS, Jukić MM, Kringen MK, Andreassen OA, et al. Impact of NFIB and CYP1A variants on clozapine serum concentration-A retrospective naturalistic cohort study on 526 patients with known smoking habits. *Clin Transl Sci.* 2023;16(1):62-72.
74. Pardiñas AF, Nalmpanti M, Pocklington AJ, Legge SE, Medway C, King A, et al. Pharmacogenomic Variants and Drug Interactions Identified Through the Genetic Analysis of Clozapine Metabolism. *Am J Psychiatry.* 2019;176(6):477-86.
75. Vasudev K, Choi YH, Norman R, Kim RB, Schwarz UI. Genetic Determinants of Clozapine-Induced Metabolic Side Effects. *Can J Psychiatry.* 2017;62(2):138-49.
76. Jaquenoud Sirot E, Knezevic B, Morena GP, Harenberg S, Oneda B, Crettol S, et al. ABCB1 and cytochrome P450 polymorphisms: clinical pharmacogenetics of clozapine. *J Clin Psychopharmacol.* 2009;29(4):319-26.
77. Willcocks IR, Legge SE, Nalmpanti M, Mazzeo L, King A, Jansen J, et al. Clozapine Metabolism is Associated With Absolute Neutrophil Count in Individuals With Treatment-Resistant Schizophrenia. *Front Pharmacol.* 2021;12:658734.
78. Lane HY, Chang YC, Chang WH, Lin SK, Tseng YT, Jann MW. Effects of gender and age on plasma levels of clozapine and its metabolites: analyzed by critical statistics. *J Clin Psychiatry.* 1999;60(1):36-40.
79. Haring C, Meise U, Humpel C, Saria A, Fleischhacker WW, Hinterhuber H. Dose-related plasma levels of clozapine: influence of smoking behaviour, sex and age. *Psychopharmacology (Berl).* 1989;99 Suppl:S38-40.
80. Albitar O, Harun SN, Zainal H, Ibrahim B, Sheikh Ghadzi SM. Population Pharmacokinetics of Clozapine: A Systematic Review. *Biomed Res Int.* 2020;2020:9872936.
81. Castberg I, Westin AA, Skogvoll E, Spigset O. Effects of age and gender on the serum levels of clozapine, olanzapine, risperidone, and quetiapine. *Acta Psychiatr Scand.* 2017;136(5):455-64.
82. de Leon J, Schoretsanitis G, Smith RL, Molden E, Solismaa A, Seppälä N, et al. An International Adult Guideline for Making Clozapine Titration Safer by Using Six Ancestry-Based Personalized Dosing Titrations, CRP, and Clozapine Levels. *Pharmacopsychiatry.* 2022;55(2):73-86.
83. Flanagan RJ, Hunter S, Obee SJ, Reeves S. Clozapine: Dose, Sex, Ethnicity, Smoking Habit, Age, Body Weight, and Plasma Clozapine and N - Desmethylclozapine (Norclozapine) Concentrations in Clinical Practice. *J Clin Psychopharmacol.* 2023;43(2):131-8.

84. Miller DD. Review and management of clozapine side effects. *J Clin Psychiatry*. 2000;61 Suppl 8:14-7; discussion 8-9.
85. Tigner A, Ibrahim SA, Murray IV. Histology, White Blood Cell [Internet]. Rockville Pike: National Library of Medicine; 2022 [oppdatert: 14.11.22; hentet: 26.03.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563148/>.
86. Torp HA, Nystøyl B. Nøytropeni ved behandling med antipsykotika. *Tidsskr Nor Lægeforening*; 2020. Doi: 10.4045/tidsskr.19.0713.
87. Citrome L, McEvoy JP, Saklad SR. Guide to the Management of Clozapine-Related Tolerability and Safety Concerns. *Clin Schizophr Relat Psychoses*. 2016;10(3):163-77.
88. Athanasiou MC, Dettling M, Cascorbi I, Mosyagin I, Salisbury BA, Pierz KA, et al. Candidate gene analysis identifies a polymorphism in HLA-DQB1 associated with clozapine-induced agranulocytosis. *J Clin Psychiatry*. 2011;72(4):458-63.
89. Fehsel K, Loeffler S, Krieger K, Henning U, Agelink M, Kolb-Bachofen V, et al. Clozapine induces oxidative stress and proapoptotic gene expression in neutrophils of schizophrenic patients. *J Clin Psychopharmacol*. 2005;25(5):419-26.
90. Legge SE, Walters JT. Genetics of clozapine-associated neutropenia: recent advances, challenges and future perspective. *Pharmacogenomics*. 2019;20(4):279-90.
91. Wiciński M, Węclewicz MM. Clozapine-induced agranulocytosis/granulocytopenia: mechanisms and monitoring. *Curr Opin Hematol*. 2018;25(1):22-8.
92. Alvir JM, Lieberman JA, Safferman AZ, Schwimmer JL, Schaaf JA. Clozapine-induced agranulocytosis. Incidence and risk factors in the United States. *N Engl J Med*. 1993;329(3):162-7.
93. Nair B, MacCabe JH. Making clozapine safer: current perspectives on improving its tolerability. *Future Neurology*. 2014;9(3):313-22.
94. Alawami M, Wasywich C, Cicovic A, Kenedi C. A systematic review of clozapine induced cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2014;176(2):315-20.
95. Bellissima BL, Tingle MD, Cicović A, Alawami M, Kenedi C. A systematic review of clozapine-induced myocarditis. *Int J Cardiol*. 2018;259:122-9.
96. Rajji TK, Mulsant BH, Davies S, Kalache SM, Tsoutsoulas C, Pollock BG, et al. Prediction of working memory performance in schizophrenia by plasma ratio of clozapine to N-desmethylclozapine. *Am J Psychiatry*. 2015;172(6):579-85.
97. Ishikawa S, Kobayashi M, Hashimoto N, Mikami H, Tanimura A, Narumi K, et al. Association Between N-Desmethylclozapine and Clozapine-Induced Sialorrhea: Involvement of Increased Nocturnal Salivary Secretion via Muscarinic Receptors by N-Desmethylclozapine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2020;375(2):376-84.
98. Shirazi A, Stubbs B, Gomez L, Moore S, Gaughran F, Flanagan RJ, et al. Prevalence and Predictors of Clozapine-Associated Constipation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6).
99. Ramos Perdigués S, Sauras Quecuti R, Mané A, Mann L, Mundell C, Fernandez-Egea E. An observational study of clozapine induced sedation and its pharmacological management. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2016;26(1):156-61.
100. Yuen JWY, Kim DD, Procyshyn RM, Panenka WJ, Honer WG, Barr AM. A Focused Review of the Metabolic Side-Effects of Clozapine. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:609240.
101. Zimbron J, Khandaker GM, Toschi C, Jones PB, Fernandez-Egea E. A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials of treatments for

- clozapine-induced obesity and metabolic syndrome. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2016;26(9):1353-65.
102. De Luca V, Mueller DJ, de Bartolomeis A, Kennedy JL. Association of the HTR2C gene and antipsychotic induced weight gain: a meta-analysis. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2007;10(5):697-704.
 103. Sicard MN, Zai CC, Tiwari AK, Souza RP, Meltzer HY, Lieberman JA, et al. Polymorphisms of the HTR2C gene and antipsychotic-induced weight gain: an update and meta-analysis. *Pharmacogenomics.* 2010;11(11):1561-71.
 104. Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, Conca A, Deckert J, Domschke K, et al. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry.* 2018;51(1-02):9-62.
 105. Flockhart DA, Thacker D, McDonald C, Desta Z. The Flockhart Cytochrome P450 Drug-Drug Interaction Table Division of Clinical Pharmacology [Internet]. Indiana University School of Medicine [oppdatert: 2021; hentet: 25.04.23]. Tilgjengelig fra: <https://drug-interactions.medicine.iu.edu>.
 106. Kotlyar M, Brauer LH, Tracy TS, Hatsukami DK, Harris J, Bronars CA, et al. Inhibition of CYP2D6 activity by bupropion. *J Clin Psychopharmacol.* 2005;25(3):226-9.
 107. Hemeryck A, Belpaire FM. Selective serotonin reuptake inhibitors and cytochrome P-450 mediated drug-drug interactions: an update. *Curr Drug Metab.* 2002;3(1):13-37.
 108. Balhara YP, Jain R, Sundar AS, Sagar R. Use of cotinine urinalysis to verify self-reported tobacco use among male psychiatric out-patients. *Lung India.* 2012;29(3):217-20.
 109. Sharma P, Sane N, Anand SD, Marimutthu P, Benegal V. Assessment of cotinine in urine and saliva of smokers, passive smokers, and nonsmokers: Method validation using liquid chromatography and mass spectrometry. *Indian Journal of Psychiatry.* 2019;61(3):270-6.
 110. Solbakk M. Metabolittspektra av klozapin i relasjon til behandlingsbytte hos schizofrenipasienter, interaksjon med fluvoksamin og påvisning av detoksifiserte metabolitter *in vitro* [Masteroppgave]. Oslo: Universitetet i Oslo; 2022.
 111. Kyllèsø L, Smith RL, Karlstad Ø, Andreassen OA, Molden E. Absolute and Dose-Adjusted Serum Concentrations of Clozapine in Patients Switching vs. Maintaining Treatment: An Observational Study of 1979 Patients. *CNS Drugs.* 2021;35(9):999-1008.
 112. Dursun H, Bilici M, Albayrak F, Ozturk C, Saglam MB, Alp HH, et al. Antiulcer activity of fluvoxamine in rats and its effect on oxidant and antioxidant parameters in stomach tissue. *BMC Gastroenterol.* 2009;9:36.
 113. Hinze-Selch D, Deuschle M, Weber B, Heuser I, Pollmächer T. Effect of coadministration of clozapine and fluvoxamine versus clozapine monotherapy on blood cell counts, plasma levels of cytokines and body weight. *Psychopharmacology (Berl).* 2000;149(2):163-9.
 114. Polcwiartek C, Nielsen J. The clinical potentials of adjunctive fluvoxamine to clozapine treatment: a systematic review. *Psychopharmacology (Berl).* 2016;233(5):741-50.
 115. Marazziti D, Palego L, Betti L, Giannaccini G, Massimetti E, Baroni S, et al. Effect of Valproate and Antidepressant Drugs on Clozapine Metabolism in Patients With Psychotic Mood Disorders. *Ther Drug Monit.* 2018;40(4):443-51.

116. Lu ML, Lane HY, Chen KP, Jann MW, Su MH, Chang WH. Fluvoxamine reduces the clozapine dosage needed in refractory schizophrenic patients. *J Clin Psychiatry*. 2000;61(8):594-9.
117. Augustin M, Schoretsanitis G, Pfeifer P, Gründer G, Liebe C, Paulzen M. Effect of fluvoxamine augmentation and smoking on clozapine serum concentrations. *Schizophr Res*. 2019;210:143-8.
118. Jones R, MacCabe JH, Price MJ, Liu X, Upthegrove R. Effect of age on the relative efficacy of clozapine in schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand*. 2020;142(2):109-20.
119. Hassab Errasoul A, Alarabi MA. Factors predicting serum clozapine levels in Middle Eastern patients: an observational study. *BMC Psychiatry*. 2022;22(1):269.
120. Mangoni AA, Jackson SH. Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. *Br J Clin Pharmacol*. 2004;57(1):6-14.
121. Garcia M, Rager J, Wang Q, Strab R, Hidalgo IJ, Owen A, et al. Cryopreserved human hepatocytes as alternative in vitro model for cytochrome p450 induction studies. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2003;39(7):283-7.
122. Chang WH, Augustin B, Lane HY, ZumBrunnen T, Liu HC, Kazmi Y, et al. In-vitro and in-vivo evaluation of the drug-drug interaction between fluvoxamine and clozapine. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999;145(1):91-8.
123. Olesen OV, Linnet K. Fluvoxamine-Clozapine drug interaction: inhibition in vitro of five cytochrome P450 isoforms involved in clozapine metabolism. *J Clin Psychopharmacol*. 2000;20(1):35-42.
124. Studts JL, Ghate SR, Gill JL, Studts CR, Barnes CN, LaJoie AS, et al. Validity of self-reported smoking status among participants in a lung cancer screening trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(10):1825-8.
125. Nagar S, Argikar UA, Tweedie DJ. Enzyme kinetics in drug metabolism: fundamentals and applications 2014. 1-6 p.
126. Pearce RE, McIntyre CJ, Madan A, Sanzgiri U, Draper AJ, Bullock PL, et al. Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity. *Arch Biochem Biophys*. 1996;331(2):145-69.
127. Yeşiltepe O, Güler Çelik E, Geyik C, Gümüş ZP, Odacı Demirkol D, Coşkunol H, et al. Preparation of glutathione loaded nanoemulsions and testing of hepatoprotective activity on THLE-2 cells. *Turk J Chem*. 2021;45(2):436-51.
128. Khan NU, Ali A, Khan H, Khan ZU, Ahmed Z. Stability Studies and Characterization of Glutathione-Loaded Nanoemulsion. *J Cosmet Sci*. 2018;69(4):257-67.
129. Alelyunas YW, Wrona M, Rainville PD. Direct Detection of Glutathione Conjugates in Human Liver Microsomes using ACQUITY UPLC I-Class, Xevo G2-S QToF, and UNIFI [Application Note]. 2013.
130. Information NCfB. PubChem Compound Summary for CID 135398737, Clozapine [Internet]: PubChem; 2023 [hentet: 03.05.23]. Tilgjengelig fra: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clozapine>.
131. Tummanapelli AK, Vasudevan S. Ab Initio MD Simulations of the Brønsted Acidity of Glutathione in Aqueous Solutions: Predicting pKa Shifts of the Cysteine Residue. *J Phys Chem B*. 2015;119(49):15353-8.

Vedlegg

Vedlegg 1: Multipel lineær regresjon for metabolske ratioer: *N*-desmetylklozapin/klozapin, klozapin-*N*-oksid-cysteinyl/klozapin og klozapin-*N*-oksid/klozapin. Vedlegget inneholder alle kovariater før variablene uten signifikans ble ekskludert.

MR: <i>N</i> -desmetylklozapin / Klozapin			MR: Klozapin- <i>N</i> -oksid-cysteinyl / Klozapin		
Variabler	Estimate (S.E.)	p-verdi	Variabler	Estimate (S.E.)	p-verdi
n	325	-	n	325	-
Intercept	-0.94 (0.10)	<0.001	Intercept	-9.39 (0.28)	<0.001
Kjønn, mann	0.001 (0.04)	0.98	Kjønn, mann	-0.05 (0.11)	0.67
Alder	-0.001 (0.001)	0.35	Alder	0.02 (0.004)	<0.001
Røyker	0.10 (0.04)	0.01	Røyker	0.47 (0.11)	<0.001
Gyldig dose	-0.13 (0.07)	0.06	Gyldig dose	-0.10 (0.20)	0.61
Prøvetidspunkt (etter siste dose, 10-30 timer)	0.13 (0.04)	0.003	Prøvetidspunkt (etter siste dose, 10-30 timer)	0.49 (0.13)	<0.001
CYP2D6-hemmer	0.002 (0.05)	0.97	CYP2D6-hemmer	0.11 (0.16)	0.49
Fluvoksamin	-0.37 (0.10)	<0.001	Fluvoksamin	-1.39 (0.30)	<0.001
Valproat	-0.53 (0.45)	<0.001	Valproat	0.58 (0.13)	<0.001
CYP-induser	0.53 (0.20)	0.01	CYP-induser	0.58 (0.58)	0.32
Adjusted R2	0.36	-	Adjusted R2	0.24	-
MR: Klozapin- <i>N</i> -oksid / Klozapin					
Variabler	Estimate (S.E.)	p-verdi			
n	325	-			
Intercept	-3.72 (0.19)	<0.001			
Kjønn, mann	-0.01 (0.07)	0.88			
Alder	0.001 (0.003)	0.65			
Røyker	0.41 (0.07)	<0.001			
Gyldig dose	-0.07 (0.13)	0.61			
Prøvetidspunkt (etter siste dose, 10-30 timer)	0.12 (0.13)	0.17			
CYP2D6-hemmer	0.19 (0.10)	0.06			
Fluvoksamin	-0.61 (0.19)	0.002			
Valproat	0.05 (0.08)	0.56			
CYP-induser	-0.43 (0.37)	0.25			
Adjusted R2	0.12				

MR= metabolsk ratio. S.E= Standard Error. En p-verdi <0.05 er vurdert som signifikant.

