

ДИАГНОСТИКА АРТИФИЦИАЛЬНОЙ ГИПОГЛИКЕМИИ ВСЛЕДСТВИЕ ПРИЕМА ПЕРОРАЛЬНЫХ САХАРОСНИЖАЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ТАНДЕМНЫМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ



© М.Ю. Юкина^{1*}, Е.А. Трошина¹, Н.Ф. Нуралиева¹, В.А. Иоутси¹, О.Ю. Реброва^{1,2}, Г.А. Мельниченко¹, Н.Г. Мокрышева¹

¹ГНЦ РФ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии», Москва

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

ВВЕДЕНИЕ. Артифициальная гипогликемия (АрГ) — это снижение уровня глюкозы крови менее 3 ммоль/л вследствие умышленного применения сахароснижающих препаратов пациентом вне врачебных назначений. Своевременная диагностика такого рода гипогликемий позволяет избежать излишних многочисленных обследований и госпитализаций. Однако выявление АрГ до сих пор остается крайне сложной задачей как для медицинского учреждения, так и для лечащего врача. В зарубежной литературе описаны случаи успешного выявления преднамеренного приема пероральных сахароснижающих препаратов (ПССП) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Таким образом, актуальна разработка и валидация метода определения ПССП с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Оптимизация диагностики АрГ вследствие приема ПССП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Всего обследовано 92 пациента. Разработка метода ВЭЖХ-МС/МС для обнаружения исследуемых ПССП (иПССП) (n=1-глибенкламид, n=1-гликвидон, n=1-гликлазид, n=1-глимепирид, n=1-глипизид, n=1-натеглинид и n=1-репаглинид) в крови осуществлена на группе пациентов с сахарным диабетом 2 типа (n=7), которые получали иПССП, и группе условно здоровых, не получавших никакие лекарственные препараты (n=7). Для валидации метода определение субстанций иПССП осуществлено на группах пациентов с гиперинсулинемической недиабетической гипогликемией (НДГ) неясного генеза (n=11) и с инсулиномой (n=67).

РЕЗУЛЬТАТЫ. При исследовании образцов крови методом ВЭЖХ-МС/МС в группе пациентов с сахарным диабетом 2 типа в 100% случаев подтвержден прием препарата, который получал больной, в группе условно здоровых — иПССП не выявлены. Ложноположительный результат не получен ни у условно здоровых и ни у одного пациента с инсулиномой. У 5 из 11 пациентов группы с гиперинсулинемической НДГ неясного генеза диагностирована АрГ, метод идентифицировал иПССП глибенкламид и гликлазид в образцах крови пациентов. У остальных 6 пациентов этой группы были продолжены обследования и диагностированы другие причины НДГ. Чувствительность метода составила 100% [74%; 100%], специфичность — 100% [95%; 100%].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Метод ВЭЖХ-МС/МС обладает высокой диагностической точностью в обнаружении и идентификации иПССП (глибенкламид, гликвидон, гликлазид, глимепирид, глипизид, натеглинид и репаглинид) в образцах крови пациентов, получающих данные лекарственные препараты. В настоящее время в силу малой доступности метода данное исследование целесообразно применять у пациентов с гиперинсулинемической гипогликемией при отрицательных результатах методов визуализации инсулиномы первого ряда (компьютерная томография с контрастированием, ультразвуковое исследование и магнитно-резонансная томография органов брюшной полости).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: артифициальная гипогликемия; производные сульфонилмочевины; глиниды; субстанции; высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием.

DIAGNOSIS OF ARTIFICIAL HYPOGLYCEMIA DUE TO ORAL HYPOGLYCEMIC DRUGS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH TANDEM MASS SPECTROMETRIC DETECTION

© Marina Y. Yukina^{1*}, Ekaterina A. Troshina¹, Nurana F. Nuralieva¹, Vitaliy A. Ioutsi¹, Olga Y. Rebrova^{1,2}, Galina A. Mel'nichenko¹, Natalia G. Mokrysheva¹

¹Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

BACKGROUND: Artificial hypoglycemia (ArH) is a decrease of blood glucose levels less than 3 mmol/l due to the deliberate use of hypoglycemic drugs by a patient outside of medical appointments. Timely diagnosis of this kind of hypoglycemia avoids unnecessary numerous examinations and hospitalizations. However, the detection of ArH still remains an extremely difficult task for both the healthcare facility and the attending physician. The foreign literature describes cases of successful detection of deliberate intake of oral hypoglycemic drugs (OHD) using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection (HPLC-MS/MS). Thus, it is relevant to develop and validate a method for determining OHD using HPLC-MS/MS.



AIM: To optimize the diagnosis of ArH due to the use of OHD.

MATERIALS AND METHODS: A total of 92 patients were examined. The development of the HPLC-MS/MS method for the detection of the studied OHD (sOHD; n=1-glibenclamide, n=1-gliquidone, n=1-gliclazide, n=1-glimepiride, n=1-glipizide, n=1-nateglinide and n=1-repaglinide) in the blood was carried out in a group of patients with diabetes mellitus type 2 (n=7) who received sOHD, and a group of conditionally healthy people who did not receive any medications (n= 7). To validate the method, the determination of sOHD substances was carried out on groups of patients with hyperinsulinemic nondiabetic hypoglycemia (NDH) of unknown origin (n=11) and with insulinoma (n=67).

RESULTS: In the study of blood samples by HPLC-MS/MS in the group of patients with diabetes mellitus type 2, was confirmed in 100% of the cases the use of the drug that the patient received, in the group of conditionally healthy — sOHD were not detected. A false positive result was not obtained in any conditionally healthy and in any patient with insulinoma. ArH was diagnosed in 5 out of 11 patients in the group with hyperinsulinemic NDH of unknown origin, the method identified sOHD glibenclamide and gliclazide in the patients' blood samples. In the remaining 6 patients of this group, examinations were continued and other causes of NDH were diagnosed. The sensitivity of the method was 100% [74%; 100%], specificity — 100% [95%; 100%].

CONCLUSION: The HPLC-MS/MS method has high diagnostic accuracy in the detection and identification of sOHD (glibenclamide, gliquidone, gliclazide, glimepiride, glipizide, nateglinide and repaglinide) in blood samples of patients receiving these drugs. Currently, due to the low availability of the method, this study is advisable to use in patients with hyperinsulinemic hypoglycemia with negative results of first-line insulinoma imaging methods (computed tomography with contrast enhancement, ultrasound and magnetic resonance imaging of the abdominal cavity).

KEYWORDS: *artificial hypoglycemia; sulfonylurea derivatives; glinides; substances; high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection.*

АКТУАЛЬНОСТЬ

Синдром Мюнхгаузена (СМ) — это собирательный термин, объединяющий искусственные заболевания («артифициальный» — artificial — искусственный, рукотворный, ненастоящий). При СМ человек умышленно производит или симулирует физические/психические признаки и симптомы определенной патологии с целью признания окружающими его больным без каких-либо внешних стимулов для подобного поведения [1].

Артифициальный гипогликемический синдром или искусственная гипогликемия (АрГ) является одним из самых известных «искусственных заболеваний» [2] и представляет собой преднамеренное применение препаратов инсулина или пероральных сахароснижающих препаратов (ПССП) с целью снижения уровня глюкозы крови [3]. Данное состояние описано как у лиц без нарушений углеводного обмена, так и у пациентов с сахарным диабетом (СД) [2, 4, 5]; нередко встречается у работников в сфере здравоохранения [4], а также у пациентов, родственники которых страдают СД. Часто имеют место коморбидные психиатрические заболевания и социально-психологические проблемы [4, 6, 7, 8]. Для искусственных патологий характерны неадекватные изменения симптомов и течения заболевания, в том числе во время лечения, многократные госпитализации и наблюдение у различных специалистов. Нередко наступает необъяснимая длительная «ремиссия» эпизодов гипогликемии с последующим их возобновлением [9]. Важно отметить, что больные с СМ могут предоставить подделанные результаты лабораторных исследований или иную медицинскую документацию [6].

Как правило, пациенты с АрГ отрицают экзогенное введение сахароснижающих препаратов, не признают данный факт и после предоставления им «доказательств» (например, результатов лабораторных анализов) [2]. Своевременная диагностика СМ — это в первую очередь возможность обсудить с пациентом ситуацию,

рассказать о вероятности необратимого повреждения здоровья, а также летального исхода. Кроме того, при установлении факта «искусственного заболевания» нет необходимости в проведении разнообразных диагностических мероприятий с целью поиска причин снижения гликемии, которые зачастую включают в себя инвазивные и дорогостоящие, в том числе оперативные вмешательства. При ведении таких больных требуется мультидисциплинарный подход с обязательным участием психиатра [3, 6, 7, 8].

Диагностика АрГ сложна, так как лабораторные признаки схожи с другими заболеваниями, ассоциированными с недиабетической гипогликемией (НДГ), например, с инсулиномой. Только при абсолютном круглосуточном наблюдении за пациентом и исключении использования личных вещей удавалось подтвердить АрГ. Но такие мероприятия должны проводиться при согласии пациента, которое он обычно не дает, а также при наличии возможностей стационара обеспечить круглосуточный пост. В итоге до недавнего времени пациенты с АрГ в России в большинстве случаев оставались с неуточненным диагнозом. При этом, по данным зарубежной литературы, описаны случаи успешного выявления преднамеренного приема ПССП с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [10].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Учитывая актуальность проблемы, целью настоящего исследования является оптимизация диагностики АрГ вследствие приема ПССП с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Место и время проведения исследования

ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ, 2017–2022 гг.

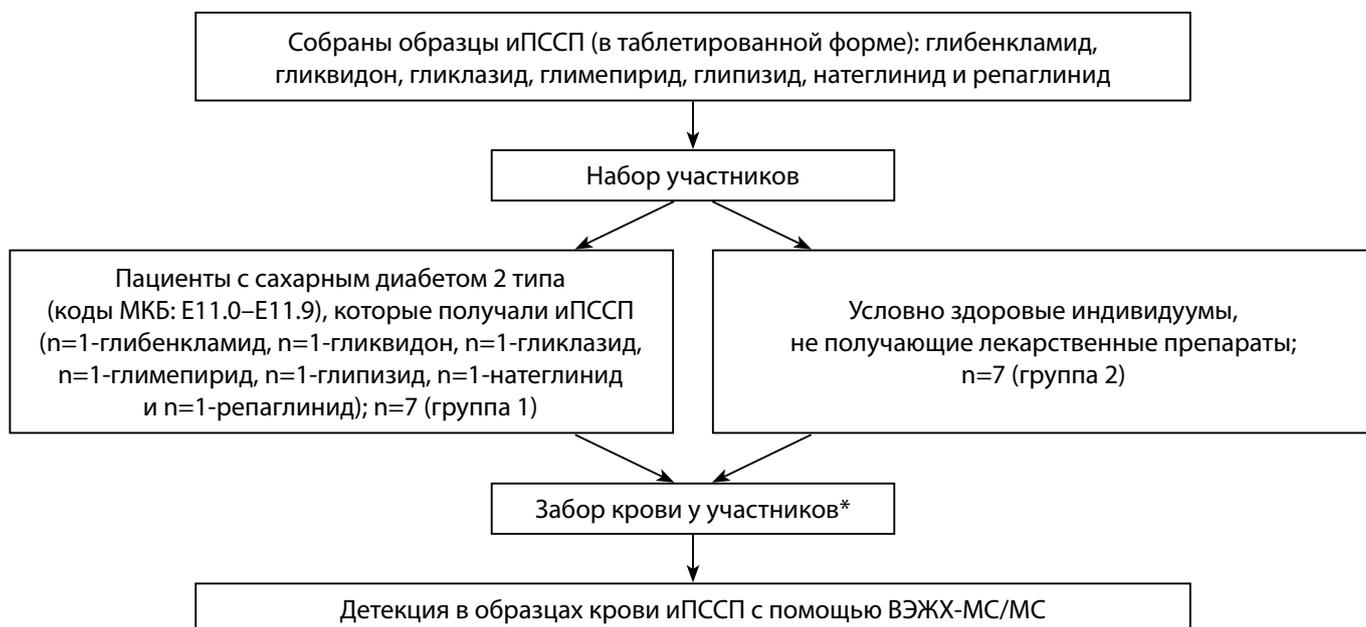


Рисунок 1. Порядок выполнения исследования на этапе 1.

Примечание. иПССП — исследуемые пероральные сахароснижающие препараты; ВЭЖХ-МС/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием;

* в группе 1 забор образца крови производился утром натощак через 1 час после приема препарата, в группе 2 — утром натощак.

Исследуемая популяция

Пациенты, прошедшие обследование в ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ.

Критериями включения для всех групп являлись: мужской или женский пол; возраст — 18 лет и старше. Критериев исключения не было.

Дизайн исследования

Одноцентровое, экспериментальное.

Методы

Работа состояла из двух этапов, на каждом из которых формировались пары групп пациентов.

Этап 1: разработка метода ВЭЖХ-МС/МС для обнаружения иПССП в крови в группе пациентов с СД 2 типа (СД2), которые получали исследуемые ПССП (иПССП), и в группе условно здоровых пациентов.

Порядок выполнения исследования представлен на рисунке 1.

Время забора крови через 1 час после приема иПССП у пациентов группы 1 было выбрано с учетом времени, при котором любой лекарственный препарат, принятый внутрь, уже начал всасываться в ЖКТ и поступать в кровоток [11, 12, 13, 14, 15, 16]. Минимальное количество препарата достаточно для его определения методом ВЭЖХ-МС/МС с учетом его высокой чувствительности — порядка 10 пг/мл по каждому компоненту, что позволяет выявить следы препарата даже спустя неделю после приема.

Этап 2: валидация метода детектирования иПССП с помощью ВЭЖХ-МС/МС в группе пациентов с гиперинсулинемической НДГ.

Порядок выполнения исследования на этапе 2 представлен на рисунке 2.

Лабораторные исследования

Биохимические и гормональные исследования проводились в клинико-диагностической лаборатории ГНЦ РФ

ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. Забор крови производился в вакуумные пробирки с инертным гелем. Полученные пробы центрифугировались не позднее чем через 15 мин после забора с использованием центрифуги Eppendorf 5810R при температуре 4 °С на скорости 3000 оборотов в минуту в течение 15 минут и затем поступали в работу. Исследование инсулина, С-пептида осуществлялось методом усиленной хемилюминесценции на анализаторе COBAS 6000 (Roche Diagnostics, Швейцария). Биохимическое исследование крови выполнялось на анализаторе Architect plus C 4000 (Abbott Diagnostics, США).

Выявление иПССП (глибенкламида, гликвидона, гликлазида, глимепирида, глипизид, натеглинида и репаглинида) в образце крови пациента осуществлялось методом ВЭЖХ-МС/МС. Для этого использовали жидкостный хроматограф Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Германия), оснащенный четырехканальным насосом, автосемплером и термостатом колонок, и гибридный трехквартупольный масс-спектрометр AB Sciex QTrap 5500 (AB Sciex, Сингапур), способный работать в режиме линейной ионной ловушки.

Образцы сыворотки крови готовили методом жидкостной экстракции с высаливанием (SALLE). Для этого к 200 мкл сыворотки добавляли 400 мкл ацетонитрила, перемешивали смесь в шейкере в течение 10 мин., а затем центрифугировали 1 мин. при 14 800 об/мин при 5 °С. К полученному раствору добавляли 200 мкл 5М ацетата аммония (Fluka, >99%, Нидерланды), перемешивали 3 мин. в шейкере и центрифугировали 2 мин. при 14 800 об/мин и 5 °С. После этого отбирали 50 мкл верхнего органического слоя, помещали в 96-луночный планшет, добавляли 50 мкл деионизированной воды и перемешивали пипетированием. В таком виде раствор использовали для хромато-масс-спектрометрического анализа.

Хроматографическое разделение компонентов проводили на колонке Accuscore PFP 2,1x50 мм, 2,6 мкм диаметр частиц (Thermo Scientific, США). В качестве элюентов были применены ацетонитрил (Honeywell, for LC-MS, Германия)



Рисунок 2. Порядок выполнения исследования на этапе 2.

Примечание. иПССП — исследуемые пероральные сахароснижающие препараты; ВЭЖХ-МС/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием; КТ — компьютерная томография; МРТ — магнитно-резонансная томография; УЗИ — ультразвуковое исследование.

* Манифестная гипогликемия констатировалась при условии достижения уровня глюкозы в венозной крови менее 3 ммоль/л; гиперинсулинемический вариант гипогликемии — при уровне С-пептида $\geq 0,6$ нг/мл, а инсулина ≥ 3 мкМЕ/мл; гипoinsулинемический вариант — при уровне С-пептида $< 0,6$ нг/мл, а инсулина < 3 мкМЕ/мл [10]. Забор крови производился на фоне манифестной гипогликемии в ходе пробы с голоданием или при спонтанной гипогликемии. Образцы сыворотки пациентов с гиперинсулинемической гипогликемией направлялись в работу для выявления иПССП. Не дожидаясь результатов данного анализа, пациентам проводилось стандартное визуализирующее обследование.

и деионизированная вода (MilliQ Advantage A10, Millipore, Германия). Разделение проводили в градиентном режиме с градиентом органической фазы от 5 до 60% с 1 по 6 мин., с изократическим участком с 6 по 7 мин. на 60% ацетонитрила и возврат на исходные 5% с 7 по 8 мин. с последующим уравниванием колонки до 11 мин. Поток элюента составлял 0,4 мл/мин., температура колонки — 20 °С, объем ввода образца — 20 мкл.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM), совмещенного с информационно-зависимым мониторингом (IDA), который был реализован на линейной ионной ловушке. Для ионизации использовали источник химической ионизации при атмосферном давлении (APCI) в режиме положительных ионов. MRM-переходы подбирали для каждого компонента индивидуально путем ввода стандартного образца в хроматографическом потоке непосредственно в источник ионизации и последовательного варьирования параметров фрагментации. Для каждого компонента регистрировали по два MRM-перехода.

Критериями идентичности субстанции из образца пациента с субстанцией в образце контроля считается совпадение времен удерживания в пределах 0,2 мин., соотношение площадей под хроматографическими пиками по двум MRM-переходам для определяемой субстанции, а также совпадение спектров фрагментных ионов для компонента образца и контроля.

Управление анализом, сбор и обработку данных проводили с использованием программного пакета Analyst 1.6.3 (AB Sciex, Канада).

Статистический анализ

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью стандартных методов статистического анализа с использованием программного обеспечения: STATISTICA v. 13 (TIBCO Inc., США). Для количественных признаков указаны медиана и интерквартильный интервал, а также в некоторых случаях минимальное и максимальное значения. С целью сравнения количественных данных двух независимых выборок применялся критерий Манна-Уитни. Критический уровень статистической значимости при проверке статистических гипотез был принят равным 0,05. Для коррекции проблемы множественных сравнений применялась поправка Бонферрони. После применения поправки значения Р в диапазоне между рассчитанным и 0,05 интерпретировались как статистическая тенденция.

Этическая экспертиза

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ (протокол №1 от 27.01.2016 г.). Все пациенты подписали информированное согласие для участия в исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Этап 1. В группы 1 и 2 включено по 7 последовательных пациентов. Возраст пациентов группы 1 составил 59 [54; 67] лет, группы 2 — 45 [41; 51] лет. В каждую группу включено по 4 женщины и 3 мужчины.

При исследовании образцов крови пациентов группы 1 методом ВЭЖХ-МС/МС в 100% случаев подтвержден прием препарата, который получал больной: n=1-глибенкламид, n=1-гликвидон, n=1-гликлазид, n=1-глимепирид, n=1-глипизид, n=1-натеглинид и n=1-репаглинид. При исследовании образцов крови группы 2 методом ВЭЖХ-МС/МС и ПССП не выявлены.

Этап 2. Забор крови на фоне манифестной гипогликемии выполнен 116 пациентам, из них у 38 выявлена гипoinsулинемическая гипогликемия, и эти пациенты были исключены из дальнейшего исследования. У оставшихся

78 пациентов было выполнено визуализирующее обследование с целью поиска инсулин-продуцирующей опухоли: компьютерная томография (КТ) с контрастным усилением и/или МРТ — магнитно-резонансная томография (МРТ) и/или ультразвуковое исследование (УЗИ) органов брюшной полости. У 11 пациентов диагностирована гипогликемия неясного генеза (группа 3), а у 67 пациентов — инсулинома (группа 4).

Возраст пациентов группы 3 составил 43 [35; 56] года, группы 4 — 51 [34; 62] год. В группу 3 включено 9 женщин и 2 мужчин, в группу 4 — 52 женщины и 15 мужчин.

Ложноположительный результат не получен ни у одного пациента из группы 4. Метод идентифицировал и ПССП (глибенкламид и гликлазид) в образцах крови 5 из 11 пациентов группы 3 (подгруппа 3а). Хроматограммы двух из таких пациентов представлены на рисунках 3 и 4.

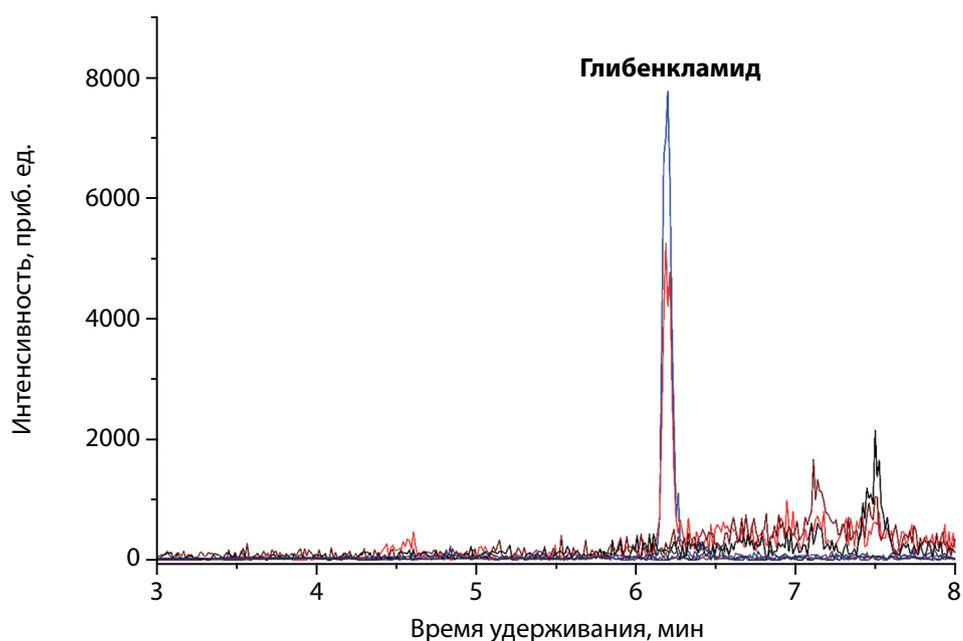


Рисунок 3. Хроматограмма образца крови пациента с искусственной гипогликемией вследствие приема глибенкламида [17].

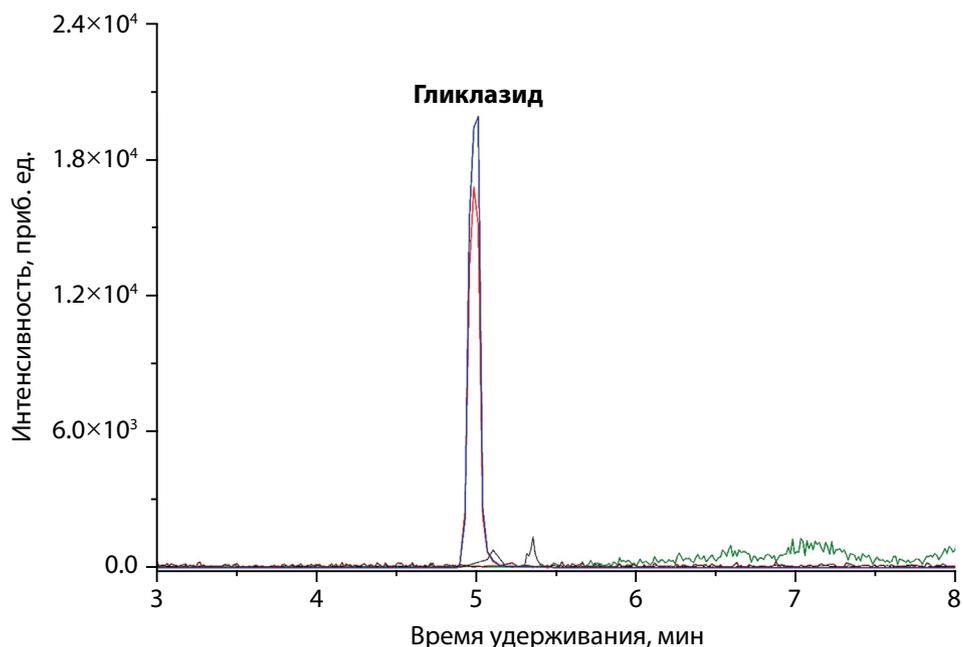


Рисунок 4. Хроматограмма образца крови пациента с искусственной гипогликемией вследствие приема гликлазида.

У 6 пациентов группы 3, у которых не выявлены иПССП (подгруппа 3б), продолжены обследования и диагностированы следующие причины НДГ: инсулинома (всего $n=4$; с помощью сцинтиграфии с ОФЭКТ/КТ с ^{99m}Tc -Текротидом ($n=3$) и эндоскопического УЗИ ($n=1$)), врожденный гиперинсулинизм вследствие мутации в гене *ABCC8* ($n=1$) и неинсулиномная панкреатогенная гипогликемия ($n=1$; подтверждена по результатам артериально-стимулированного венозного забора крови).

Таким образом, у пациентов групп 1 ($n=7$) и 3а ($n=5$) в крови обнаружены препараты иПССП, у пациентов групп 2 ($n=7$), 4 ($n=67$) и 3б ($n=6$) — не обнаружены. Для расчета операционных характеристик метода ВЭЖХ-МС/МС в выявлении иПССП составлена таблица кросс-табуляции частот в объединенных группах: пациенты с СД2, получающие иПССП, и пациенты с НДГ, у которых инсулинома исключена стандартными методами ($n=12$); пациенты с уточненными причинами НДГ и здоровые ($n=80$) (таблица 1). Чувствительность метода составила 100%, 95% ДИ (74%; 100%), специфичность — 100%, 95% ДИ (95%; 100%).

С целью выявления дополнительных серологических маркеров Арг вследствие приема иПССП, которые помогли бы дифференцировать это состояние от лабораторных показателей при инсулиноме, проведен сравнительный анализ показателей инсулина, глюкозы

и С-пептида на фоне манифестной гипогликемии в группе 3а ($n=5$) и в объединенной группе пациентов с инсулиномой (группа 2, $n=67$) и другими причинами неартифициальной гиперинсулинемической НДГ (группа 3б; $n=6$). Уровень инсулина в группе 3а был статистически значимо ниже, чем в группе 2+3б, в то время как уровни глюкозы и С-пептида не различались (таблица 2).

При анализе уровня инсулина на фоне манифестной гипогликемии в группе 3а обращало на себя внимание значительное повышение гормона у пациентов №2 и №3 по сравнению с другими больными (табл. 3). Предположено, что на уровень инсулина может влиять наличие инсулинорезистентности у пациента. Для уточнения этой гипотезы у всех больных группы 3а был рассчитан показатель HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) после ночного голодания на фоне нормогликемии, который не превышал показатели нормы 2,7 (табл. 3).

Значительное повышение инсулина (как и С-пептида) у пациента №2 было обусловлено терминальной стадией хронической болезни почек вследствие замедленной элиминации гормонов (особенно С-пептида) [18]. В связи с этим проведен сравнительный анализ показателей С-пептида на фоне манифестной гипогликемии в группе 3а с исключением пациента №2 и объединенной группы 2+3б. Уровень С-пептида в группе 3а (1,82 [1,18; 2,73]) оказался ниже, чем в группе 2+3б ($p=0,015$, U-тест).

Таблица 1. Кросс-табуляция частот для расчета операционных характеристик высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией в выявлении исследуемых пероральных сахароснижающих препаратов

Результат ВЭЖХ-МС/МС	Группы 1+3а $n=12$	Группы 2+4+3б $n=80$
Минимум один иПССП обнаружен	12 (ИП)	0 (ЛП)
иПССП не обнаружены	0 (ЛО)	80 (ИО)

Примечание. иПССП — исследуемые пероральные сахароснижающие препараты; ВЭЖХ-МС/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием; ИП — истинноположительный результат; ЛП — ложноположительный результат; ЛО — ложноотрицательный результат; ИО — истинноотрицательный результат.

Таблица 2. Показатели глюкозы, инсулина и С-пептида на фоне манифестной гипогликемии в группах 3а и 2+3б (Ме [Q1; Q3], (min, max))

	Группа 3а, $n=5$	Группы 2+3б, $n=73$	P^* , U-тест
Глюкоза, ммоль/л	2,18 [2,13; 2,61], (2,00, 2,72)	2,16 [1,66; 2,41], (0,41, 2,90)	0,289
Инсулин, мкЕ/мл	8,99 [6,05; 16,20], (5,91, 21,39)	24,13 [16,00; 35,00], (4,09, 387,30)	0,009
С-пептид, нг/мл	2,30 [1,33; 3,15], (1,03, 23,91)	4,00 [2,79; 5,52], (0,67, 40,00)	0,153

*Пороговый $P_0=0,05; 3 \approx 0,017$.

Таблица 3. Результаты обследования пациентов группы 3а на фоне гипо- и нормогликемии

Пациент	Манифестная гипогликемия			Нормогликемия (после ночного голодания)
	Глюкоза, ммоль/л	Инсулин, мкЕ/мл	С-пептид, нг/мл	HOMA-IR
№1	2,72	8,99	2,3	1,833
№2	2,18	21,39	23,91	2,321
№3	2,13	16,2	3,15	1,855
№4	2	5,91	1,03	2,041
№5	2,61	6,05	1,33	1,877

Примечание. HOMA-IR – Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты этапа 1 продемонстрировали возможность применения метода ВЭЖХ-МС/МС в детекции и идентификации субстанций ПССП в клинической практике. При валидации метода в группе пациентов с гиперинсулинемической гипогликемией в рамках этапа 2 нами, как и другими авторами [19, 20, 21, 22], подтверждена высокая диагностическая точность ВЭЖХ-МС/МС в выявлении субстанций ПССП, в том числе при Арг. Таким образом, метод может быть применен для диагностики преднамеренного приема данной группы лекарственных средств и дифференциальной диагностики с другими причинами гиперинсулинемического варианта НДГ. Однако с учетом относительно редкой встречаемости Арг среди пациентов без СД (до 3,5%) [23], низкой доступности ВЭЖХ-МС/МС в России (преимущественно в специализированных центрах), рутинное выполнение исследования у всех пациентов с подозрением на НДГ, как предлагается зарубежными экспертами [10], нецелесообразно. Поэтому, по нашему мнению, детекция субстанций ПССП у пациентов с гиперинсулинемической гипогликемией рациональна только при отрицательных результатах стандартных методов визуализации инсулиномы (КТ с контрастным усилением, МРТ, УЗИ органов брюшной полости и забрюшинного пространства).

Отсутствие возможности выполнения данного исследования во всех эндокринологических стационарах определяет необходимость поиска других, более доступных маркеров Арг. Несмотря на то, что в нашем исследовании показано, что при Арг, в отличие других причин гиперинсулинемической гипогликемии, уровень инсулина значимо ниже (8,99 [6,05; 16,20]), с учетом небольшого числа пациентов с Арг эти данные необходимо интерпретировать с осторожностью, требуется дальнейшее накопление материала и проведение исследования на большей группе больных.

Важно отметить, что более низкие показатели инсулина зафиксированы не у всех больных с Арг. Помимо пациента №2, у которого значительное повышение показателей инсулина и С-пептида (21,39 мкЕд/мл и 23,91 нг/мл соответственно) обусловлено терминальной стадией хронической болезни почек, сравнительно высокий уровень инсулина также отмечен у пациента №3 (16,2 мкЕд/мл). Наша версия о возможном влиянии инсулинорезистентности на более высокий показатель инсулина, после подсчета индекса НОМА у всех больных с Арг, была отклонена — инсулинорезистентность не выявлена ни у одного пациента группы 3а. По нашему мнению, разный уровень инсулина, наиболее вероятно, обусловлен дозой принимаемого препарата или различной чувствительностью к ПССП. В отличие от других авторов [22], мы не проводили количественную оценку содержания субстанций ПССП в крови пациентов, так как это не являлось целью нашего исследования, но может быть полезно, например, для оптимизации тактики ведения при купировании гипогликемии.

Вместе с тем в отношении уровня С-пептида после включения пациента №2 выявлена статистически значимая разница в группах пациентов с Арг и другими причинами гиперинсулинемической НДГ (Ме уровня С-пептида в группе пациентов с Арг составила 1,82 [1,18; 2,73]).

Таким образом, С-пептид в перспективе также может рассматриваться как дополнительный показатель при дифференциальной диагностике данных состояний.

Необходимо подчеркнуть, что нами проводилось определение только 7 субстанций, в отличие от других исследователей [19, 21, 22], которые анализировали наличие в сыворотке крови пациентов большего числа ПССП. Выбор ограниченного числа субстанций обусловлен их доступностью в РФ. По мере появления новых зарегистрированных ПССП следует рассмотреть вопрос об их включении в разработанную нами панель иПССП. Также перспективно исследовать другие ПССП (метформин, дапаглифлозин, вилдаглиптин, лираглутид и пр.), которые мы не включили в испытания из-за их маловыраженного влияния на возможность вызвать манифестную гипогликемию. Но не исключается, что такого эффекта можно достичь, например, при приеме чрезмерно высоких доз данных лекарственных препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод ВЭЖХ-МС/МС обладает высокими диагностическими чувствительностью и специфичностью в обнаружении и идентификации иПССП (глибенкламид, гликвидон, гликлазид, глимепирид, глипизид, натеглинид и репаглинид) в образцах крови пациентов, получающих данные лекарственные препараты. В настоящее время, в силу малой доступности метода, данное исследование целесообразно применять у пациентов с гиперинсулинемической гипогликемией при отрицательных результатах методов визуализации инсулиномы первого ряда.

Требуется проведение дальнейших исследований на расширенной группе больных с Арг для подтверждения полученных нами данных о возможности использования показателей инсулина и С-пептида на фоне манифестной гипогликемии в качестве дополнительных маркеров данного состояния.

Перспективным направлением дальнейших исследований также является изучение вопроса о включении в разработанную панель иПССП новых сахароснижающих препаратов по мере их регистрации и появления на российском фармацевтическом рынке, а также доступных в настоящее время лекарственных препаратов, не относящихся к группам производных сульфонилмочевины или глинидов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение №075 — 15 — 2022 — 310 от 20.04.2022).

Участие авторов: Юкина М.Ю. — разработка концепции исследования; проведение обследования участникам исследования; сбор материала; участие в проведении лабораторного обследования; получение, анализ и интерпретация результатов; написание статьи; Трошина Е.А. и Мельниченко Г.А. — согласование концепции исследования; внесение в рукопись существенной (важной) правки с целью повышения научной ценности статьи; Нуралиева Н.Ф. — участие в сборе материала;

подготовка статьи к публикации; Иоутси В.А. — проведение лабораторного обследования участников исследования; Реброва О.Ю. — внесение существенной (важной) правки в анализ и интерпретацию результатов; Мокрышева Н.Г. — одобрение финальной версии рукописи.

Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Kinns H, Housley D, Freedman DB. Review Article Munchausen syndrome and factitious disorder: the role of the laboratory in its detection and diagnosis. *Ann Clin Biochem.* 2013;50:194–203. doi: <https://doi.org/10.1177/0004563212473280>
2. Neal JM, Han W. Insulin Immunoassays in the Detection of Insulin Analogues in Factitious Hypoglycemia. *Endocr Pract.* 2008;14(8):1006–1010
3. Ameh V, Speak N. Factitious hypoglycaemia in a nondiabetic patient. *European Journal of Emergency Medicine.* 2008;15:59–60
4. Bauman V, Sturkey AC, Sherafat-Kazemzadeh R, et al. Factitious Hypoglycemia in Children and Adolescents with Diabetes. *Pediatr Diabetes.* 2019;19(4):823–831. doi: <https://doi.org/10.1111/pedi.12650>
5. Guedes BV, Acosta CS, Cabrera F, et al. Factitious Hypoglycemia in Pregnancy in a Patient With Type 2 Diabetes. *Obstet Gynecol.* 2014;124:456–458. doi: <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000000138>
6. Patel A, Daniels G. Hypoglycemia secondary to factitious hyperinsulinism in a foster care adolescent - a case report of munchausen syndrome in a community hospital emergency department setting. *BMC Emergency Medicine.* 2018;18:53. doi: <https://doi.org/10.1186/s12873-018-0208-z>
7. Akbari M, Soltani A, Mohajeri-tehrani MR, et al. Factitious Hypoglycemia Caused by a Unique Pattern of Drug Use: A Case Report. *Int J Endocrinol Metab.* 2018;16(1):4–7. doi: <https://doi.org/10.5812/ijem.62591>
8. Joshi T, Caswell A, Acharya S. Case Report A difficult case of recurrent hypoglycaemia: role of insulin assays in establishing the diagnosis. *Diabet. Med.* 2016:e36–e39. doi: <https://doi.org/10.1111/dme.13146>
9. Giurgea I, Ulinski T, Touati G, et al. Factitious Hyperinsulinism Leading to Pancreatectomy: Severe Forms of Munchausen Syndrome by Proxy. *Pediatrics.* 2005;116(1). doi: <https://doi.org/10.1542/peds.2004-2331>
10. Cryer PE, Axelrod L, Grossman AB, et al. Evaluation and management of adult hypoglycemic disorders: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(3):709–728. doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1410>
11. Glyburide Tablets Prescribing Information. Доступно по: <https://www.drugs.com/pro/glyburide-tablets.html>. Ссылка активна на 07.01.2024
12. Государственный реестр лекарственных средств. [State register of medicines. (In Russ.)] Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=cb385c5e-5a4f-46a0-a838-500dfff16611. Ссылка активна на 07.01.2024
13. Luna B, Feinglos MN. Oral agents in the management of type 2 diabetes mellitus. *Am Fam Physician.* 2001;63(9):1747–56
14. Guide to Prescribing and Titrating Gliclazide Therapy. Доступно по: <https://www.bucksformulary.nhs.uk/docs/avc/Link%2012a%20Guideline%20for%20Prescribing%20and%20Titrating%20Gliclazide%20Therapy.pdf>. Ссылка активна на 07.01.2024
15. Correa R, Quintanilla Rodriguez BS, Nappe TM. Glipizide. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan AMARYL. Доступно по: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020496s021lbl.pdf. Ссылка активна на 07.01.2024
16. Юкина М.Ю., Нуралиева Н.Ф., Трошина Е.А., Иоутси В.А. Клинический случай искусственной гипогликемии // *Медицинский совет.* 2020;(7):130–136. doi: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2020-7-130-136>
17. Imamura Y, Yokono K, Shii K, et al. Plasma levels of proinsulin, insulin and C-peptide in chronic renal, hepatic and muscular disorders. *Jpn J Med.* 1984;23(1):3–8. doi: <https://doi.org/10.2169/internalmedicine1962.23.3>
18. Hoizey G, Lamiable D, Trenque T, et al. Identification and quantification of 8 sulfonylureas with clinical toxicology interest by liquid chromatography-ion-trap tandem mass spectrometry and library searching. *Clin Chem.* 2005;51(9):1666–72. doi: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.050864>
19. Zhong GP, Bi HC, Zhou S, et al. Simultaneous determination of metformin and gliclazide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study of two formulations in healthy volunteers. *J Mass Spectrom.* 2005;40(11):1462–71. doi: <https://doi.org/10.1002/jms.907>
20. Hess C, Musshoff F, Madea B. Simultaneous identification and validated quantification of 11 oral hypoglycaemic drugs in plasma by electrospray ionisation liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2011;400(1):33–41. doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4698-8>
21. Yang HS, Wu AHB, Johnson-Davis KL, Lynch KL. Development and validation of an LC-MS/MS sulfonylurea assay for hypoglycemia cases in the emergency department. *Clin Chim Acta.* 2016;454:130–4. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.01.007>
22. Yukina M, Nuralieva N, Zelenkova-Zakharchuk T, et al. Factitious hypoglycemia: psychosocial characteristics of patients. *Endocrine Abstracts.* 2023;90:EP1119. doi: <https://doi.org/10.1530/endoabs.90.EP1119>

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ [AUTHORS INFO]

*Юкина Марина Юрьевна, к.м.н. [Marina Yu. Yukina, MD, PhD]; адрес: Россия, 117036, Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11 [address: 11, Dm. Ulyanova street, 117036 Moscow, Russia]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8771-8300>; Researcher ID: P-5181-2015; Scopus Author ID: 57109367700; eLibrary SPIN: 4963-8340; e-mail: yukina.marina@endocrincentr.ru

Трошина Екатерина Анатольевна, д.м.н., профессор, член-корр. РАН [Ekaterina A. Troshina, MD, PhD, Professor]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8520-8702>; eLibrary SPIN: 8821-8990; e-mail: troshina.ekaterina@endocrincentr.ru

Нуралиева Нурана Фейзуллаевна [Nurana F. Nuralieva, MD]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6876-3336>; eLibrary SPIN: 7373-2602; e-mail: nuralieva.nurana@endocrincentr.ru

Иоутси Виталий Алексеевич, к.х.н. [Vitaliy A. Ioutsy, PhD]; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9002-1662>; e-mail: ioutsy.vitalij@endocrincentr.ru

Реброва Ольга Юрьевна, д.м.н. [Olga Yu. Rebrova, MD, PhD]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6733-0958>; eLibrary SPIN: 7360-3254; e-mail: rebrova.olga@endocrincentr.ru

Мельниченко Галина Афанасьевна, д.м.н., профессор, академик РАН [Galina A. Melnichenko, MD, PhD, Professor, Academician of RAS]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5634-7877>; eLibrary SPIN: 8615-0038; e-mail: melnichenko.galina@endocrincentr.ru

Мокрышева Наталья Георгиевна, д.м.н., профессор, член-корр. РАН [Natalia G. Mokrysheva, MD, PhD, Professor]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9717-9742>; eLibrary SPIN: 5624-3875; e-mail: mokrisheva.natalia@endocrincentr.ru

ЦИТИРОВАТЬ:

Юкина М.Ю., Трошина Е.А., Нуралиева Н.Ф., Иоутси В.А., Реброва О.Ю., Мельниченко Г.А., Мокрышева Н.Г. Диагностика искусственной гипогликемии вследствие приема пероральных сахароснижающих препаратов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandem масс-спектрометрическим детектированием // *Сахарный диабет*. — 2024. — Т. 27. — №1. — С. 50-58. doi: <https://doi.org/10.14341/DM13119>

TO CITE THIS ARTICLE:

Yukina MY, Troshina EA, Nuralieva NF, Ioutsi VA, Rebrova OY, Mel'nichenko GA, Mokrysheva NG. Diagnosis of artificial hypoglycemia due to oral hypoglycemic drugs by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Diabetes Mellitus*. 2024;27(1):50-58. doi: <https://doi.org/10.14341/DM13119>