

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»



А.А. Федянин

"28" апреля 2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» на диссертационную работу Дмитриевой Екатерины Владимировны на тему *«Хроматомасс-спектрометрическое определение стероидных гормонов и селективных модуляторов андрогенных рецепторов в биологических жидкостях»*, предоставленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности: 1.4.2 – Аналитическая химия

Актуальность темы диссертационной работы

Стероидные гормоны являются важнейшими эндогенными метаболитами человека. Помимо возможности диагностирования различных заболеваний, анализ биопроб на содержание этих веществ может выявить случаи употребления допинг-препаратов, включая их синтетические аналоги – селективные модуляторы андрогенных рецепторов (САРМ). Расширяющееся применение таких соединений диктует необходимость разработки эффективных и чувствительных методов их обнаружения, идентификации и определения в различных биологических жидкостях, в том числе в слюне. Основными проблемами при определении этих соединений является длительная пробоподготовка, особенно в случае газохроматографического определения, и, в некоторых случаях, низкая эффективность ионизации в источнике электрораспылительной ионизации жидкостных хроматомасс-спектрометров.

Диссертационная работа Дмитриевой Е.В. направлена на решение указанных проблем и посвящена совершенствованию и расширению возможностей метода жидкостной хроматомасс-спектрометрии для определения стероидных гормонов и САРМ. Для достижения поставленной цели соискателем решались задачи по созданию новых способов экспрессной пробоподготовки, включающей дисперсионную жидкость-жидкостную экстракцию, дериватизацию стероидных гормонов гидроксиламином; а также

разработке и валидации методик УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов (в моче и слюне) и САРМ в моче.

По сути, автором проведено оригинальное научное исследование, обеспечивающее комплексное решение поставленной задачи, в том числе на уровне создания готовой системы селективного чувствительного определения стероидных гормонов и САРМ, которая может быть использована для контроля уровня этих соединений в биопробах спортсменов и пациентов, проходящих гормональную заместительную терапию или принимающих иные препараты, влияющие на гормональный фон человека.

Из вышеизложенного следует, что актуальность диссертационной работы **Дмитриевой Е.В.** не вызывает сомнений. Отдельно следует отметить, что в связи с исключительно важной биологической ролью стероидных гормонов работа представляет несомненный практический интерес для клинической практики и антидопинговой индустрии.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 167 страницах машинописного текста, состоит из введения, литературного обзора, 3 глав экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 237 источников.

Во введении дано обоснование актуальности темы исследования, сформулированы цель и задачи работы, ее научная новизна и практическая значимость. Сформулированы положения, выносимые на защиту, дана информация об апробации работы и сделанных публикациях по ее результатам. Дана характеристика личного вклада соискателя в выполнение исследования.

В обзоре литературы описаны методы и подходы, применяемые для определения стероидных гормонов и САРМ в биожидкостях. Показаны преимущества и недостатки хроматографических методов с масс-спектрометрическим детектированием, используемых для этих целей. Описаны способы пробоподготовки, предложенные для извлечения определяемых соединений и устранения мешающего влияния других компонентов биопроб. Представлена исчерпывающая информация о способах дериватизации исследуемых соединений.

В первой главе экспериментальной части и обсуждения результатов перечисляются использованное оборудование, реагенты и материалы и дается их необходимое описание.

Во второй главе раздела «Экспериментальная часть и обсуждение результатов» автором приводятся результаты разработки подхода к УВЭЖХ-МС определению стероидных гормонов в биологических жидкостях. Приведены выбранные условия

детектирования анализов. Приведены результаты и обсуждение экспериментов по выбору условий дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции стероидных гормонов из мочи. Представлены результаты валидации методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче человека. С целью увеличения чувствительности определения стероидных гормонов исследованы возможности проведения дериватизации гидроксиламином. Предложены условия экстракции и дериватизации анализов и проведена валидация методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракцией и дериватизацией гидроксиламином. Получены достаточно низкие пределы обнаружения на уровне 0,1–0,25 нг/мл. Проведена апробация предложенной методики при анализе реальных образцов мочи. Дополнительно исследовано проведение дериватизации стероидных гормонов в условиях твердофазной экстракции. Предложена, валидирована и опробована на реальных образцах методика УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче твердофазной аналитической дериватизацией, применение которой существенно сокращает временные затраты на проведение анализа.

Еще одним объектом исследования стала слюна. Предложены условия жидкость-жидкостной экстракции стероидных гормонов метил-трет-бутиловым эфиром. Приведены результаты оптимизации параметров проведения экстракции с использованием экспериментального плана Бокса-Бенкена. Описана валидация методики УВЭЖХ-МС/МС определения стероидных гормонов в слюне и ее применение в анализе реальных объектов.

Третья глава посвящена разработке методик УВЭЖХ-МС/МС определения селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче человека. Предложен простой и экспрессный способ определения этих анализов в моче человека разбавлением испытуемого образца. Приведено описание подбора условий подготовки проб мочи к анализу. Представлены результаты валидации и апробации методики УВЭЖХ-МС/МС определения САРМ в моче разбавлением испытуемого образца. С целью увеличения чувствительности определения САРМ исследованы возможности проведения твердофазной экстракции и дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции. Приведено сравнение С8, С18 и НЛВ картриджей для экстракции САРМ из мочи. Проведена валидация методики УВЭЖХ-МС/МС определения САРМ в моче твердофазной экстракцией. Продемонстрировано определение андарина, остарина, лигандрола, лаксогенина и ибутаморен в моче, в то время как для обнаружения других анализов (миостоп, радарина, реверола, сармастола и S-23) чувствительность оказалась недостаточной. Для определения производных арил-пропионамида предложена методика

дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции с последующим УВЭЖХ-МС/МС детектированием. С использованием экспериментального плана Бокса-Бенкена изучено влияние объемов экстрагента, диспергента, количества высаливающего агента, времени перемешивания на орбитальном перемешивателе, рН и разбавления образцов на получаемые результаты. Проведена валидация разработанной методики.

В разделе «Выводы» подведен итог выполненных исследований, сформулированы основные выводы, полностью соответствующие поставленным целям и задачам.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна диссертации заключается в разработке новых схем экспрессного и высокочувствительного определения стероидных гормонов и САРМ в биожидкостях человека методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии. В рамках этих схем предложены новые способы дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции для ускорения и упрощения процедуры пробоподготовки, а также продемонстрирована их совместимость как с прямым хроматомасс-спектрометрическим определением аналитов, так и с их дериватизацией, в том числе в условиях твердофазной экстракции. Показана эффективность дериватизации стероидных гормонов гидроксиламином в растворе, обеспечившей высокую чувствительность их определения с пределами обнаружения на уровне 0,10–0,25 нг/мл. Предложена методика определения стероидных гормонов в слюне человека с пределами обнаружения ниже 0,1 нг/мл с высокой степенью извлечения аналитов метил-трет-бутиловым эфиром. С помощью предложенного способа дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции достигнуты пределы обнаружения аналитов на уровне 50 пг/мл при УВЭЖХ-МС/МС определении производных арил-пропионамида.

Значимость для науки и производства (практики) полученных автором диссертации результатов не вызывает сомнений. Полученные результаты имеют большое значение для совершенствования методологии хроматографического и масс-спектрометрического анализа биопроб, развития методов пробоподготовки, совместимых с последующим хроматомасс-спектрометрическим анализом, создания новых подходов к аналитической твердофазной дериватизации эндогенных и экзогенных соединений. Практическое значение работы заключается в разработке комплекса методик и подходов к чувствительному определению стероидных гормонов и САРМ в биожидкостях для контроля уровня этих соединений в клинической и спортивной практике, а также при приеме различных фармацевтических препаратов.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Полученные **Дмитриевой Е.В.** результаты представляют теоретический и практический интерес и могут быть использованы в работе сотрудниками Московского, Санкт-Петербургского, Казанского, Воронежского, Саратовского государственных университетов, Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова, Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева, Первым Московским государственным медицинским университетом имени И.М. Сеченова и др.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Достоверность полученных в диссертации результатов подтверждается их удовлетворительным согласием с данными литературы и не вызывает сомнений. Сделанные выводы и заключения полностью соответствуют приведенным экспериментальным данным и хорошо обоснованы автором диссертационной работы. Работа прошла хорошую апробацию. Опубликованы одиннадцать статей в журналах, рекомендованных ВАК, а также 9 тезисов докладов и 1 патент. Результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на представительных профильных конференциях различного уровня.

Оценка содержания диссертации, её завершенность в целом, замечания по оформлению

Диссертационная работа **Дмитриевой Е.В.** содержит все обязательные составляющие для такого уровня исследований и включает введение, обзор литературы, обсуждения экспериментов и полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Содержание автореферата отражает основное содержание диссертационной работы. Полученные соискателем результаты в полном объеме отражены в сделанных в соавторстве публикациях по теме исследования.

Диссертационная работа Дмитриевой Е.В. не лишена отдельных недостатков:

1. Формулировка вывода 1 работы представляется не совсем удачной. Указано, что были изучены особенности схем определения стероидных гормонов в моче человека, при этом не поясняется, все ли из изученных схем были предложены автором, или некоторые были ранее описаны в литературе. Также неясно, в чем именно заключаются особенности этих схем?

2. В выводе 3 указано, что дериватизация аналитов в случае твердофазной экстракции протекает быстрее по сравнению с их дериватизацией в растворе при тех же параметрах чувствительности методики. Неясно, имеется ли в виду скорость реакции дериватизации или общее время, затрачиваемое на пробоподготовку? Кроме того, чувствительность методики также увеличивалась за счет концентрирования в случае ТФЭ. Учитывали ли это при сравнении скорости дериватизации?
3. В тексте автореферата используются разные названия одних и тех же соединений, например, кортизол и гидрокортизон.
4. В таблице 4 автореферата погрешность измерения массы для производных стероидных гормонов обычно выше, чем для исходных соединений. Связано ли это с разной настройкой прибора в разные дни эксперимента? Почему для эстрогена наблюдается обратное?
5. В списке литературы в некоторых источниках (научных статьях) первый автор вынесен в начало перед названием статьи, а в других нет. С чем связана такая особенность оформления?


Сделанные замечания не снижают общей положительной оценки диссертационного исследования **Дмитриевой Е.В.** и местами носят характер научной дискуссии. Из представленной работы видно, что **Дмитриева Е.В.** в ходе выполнения диссертационной работы продемонстрировала профессионализм в таких областях, как жидкостная хроматография и масс-спектрометрия, пробоподготовка сложных объектов, что свидетельствует о ее высокой квалификации и широком научном кругозоре.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней


В научной квалификационной работе **Дмитриевой Е.В.** решены задачи, имеющие существенное значение для развития теоретических представлений и расширения сферы практического применения жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии в области чувствительного анализа метаболитов человека, развития методологии экспрессной пробоподготовки, совместимой с последующим хроматомасс-спектрометрическим анализом биопроб.

Диссертационная работа **Дмитриевой Е.В.** соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в ред. Постановлений Правительства РФ от 11.09.2021 N 1539 и прочих актуальных редакциях), предъявляемым к кандидатским

диссертациям, а ее автор, **Дмитриева Е.В.**, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.2 – Аналитическая химия.

Отзыв подготовил  Чл.-корр. РАН, д.х.н. проф. О.А. Шпигун

Отзыв заслушан и утвержден на заседании кафедры аналитической химии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, протокол заседания № 8 от 26 апреля 2023 года.

Заведующий кафедрой аналитической химии Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова  М.А. Проскурнин

Почтовый адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3, ГСП-1, МГУ, химический факультет, кафедра аналитической химии.


Телефон: +7 (495) 939-46-75

Электронная почта: kafedra@analyt.chem.msu.ru

Секретарь заседания


В.В. Апяри

Зам. декана Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова по научной работе,
д.х.н.


М.Э. Зверева

26.04.2023 г.