

Отзыв

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук
Дмитриевой Екатерины Владимировны
на тему

«Хроматомасс-спектрометрическое определение стероидных гормонов и селективных модуляторов андрогенных рецепторов в биологических жидкостях»

по специальности – 1.4.2. – **Аналитическая химия** (химические науки)

Актуальность темы исследования

Целью диссертационного исследования Дмитриевой Екатерины Владимировны явилась разработка аналитических схем высокочувствительного и селективного хроматографического определения стероидных гормонов и селективных модуляторов андрогенных рецепторов (САРМ) в биологических жидкостях человека. Стероидные гормоны являются регуляторами биохимических процессов в организме человека. Контроль за их содержанием в биологических жидкостях важен при решении многих задач медицинской диагностики.

Помимо клинической диагностики определение стероидных гормонов в моче используется в допинг-контроле в качестве маркеров для подтверждения факта употребления запрещенных Всемирным антидопинговым агентством соединений, включая и синтетические аналоги этих аналитов – селективные модуляторы андрогенных рецепторов (САРМ), которые обладают анаболическим действием, сниженными побочными эффектами и могут быть использованы в качестве альтернативы стероидным гормонам для гормон-заместительной терапии. При этом полный цикл клинических испытаний они не прошли. На «черном» рынке под видом САРМ распространяют и препараты, относящиеся к другим классам соединений.

Таким образом, разработка высокочувствительных и селективных методик определения стероидных гормонов в биологических жидкостях является широко востребованной и актуальной задачей.

Научная новизна диссертационного исследования.

Методом УВЭЖХ-МС разработаны аналитические схемы экспрессного, высокочувствительного и селективного определения стероидных гормонов в моче и в слюне человека, а также селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче человека. Установлена эффективность дериватизации стероидных гормонов гидроксиламином в растворе при определении их в моче человека после проведения дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции, обеспечившей пределы обнаружения в диапазоне от 0,10 до 0,25 нг/мл. Обнаружено, что дериватизация стероидных гормонов гидроксиламином на патроне для твердофазной экстракции протекает существенно быстрее по сравнению с дериватизацией этих аналитов в растворе при тех же параметрах чувствительности методики.

Практическая значимость. Метрологически аттестована и внесена в Федеральный реестр методик измерений МИ 02067847.10–2022 для практического применения в профильных

лабораториях разработанная методика определения стероидных гормонов в моче человека «Массовая концентрация тестостерона и кортизола в моче человека. Методика измерений методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектированием». Разработанные методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов и САРМ в биологических жидкостях могут быть применены в клиническом анализе и допинг-контроле.

Степень достоверности полученных результатов обеспечивается использованием современных методов физико-химического анализа, научного оборудования для хроматографических и масс-спектрометрических исследований, их согласованностью с литературными данными. Разработанные методики определения стероидных гормонов по метрологическим характеристикам отвечают требованиям Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов и ВАДА.

Соответствие научной специальности

Диссертационная работа Дмитриевой Екатерины Владимировны соответствует пункту 2 «Методы химического анализа» и пункту 10 «Анализ органических веществ и материалов» паспорта специальности 1.4.2. Аналитическая химия (химические науки). Решаемые в диссертационной работе задачи также полностью соответствуют указанной специальности.

Объем и структура работы. Оценка содержания диссертации.

Диссертационная работа изложена на 167 страницах машинописного текста, состоит из введения, литературного обзора, 3 глав экспериментальной части, общих выводов, списка цитируемой литературы из 237 наименований и списка сокращений.

В Литературном обзоре обсуждаются подходы к определению стероидных гормонов и селективных модуляторов андрогенных рецепторов в биологических жидкостях человека, рассмотрены такие вопросы как классификация САРМ, достоинства и ограничения хроматографических методов определения стероидов с масс-спектрометрическим детектированием. Отдельные разделы посвящены определению методом ВЭЖХ-МС селективных модуляторов андрогенных рецепторов в нативном виде и их метаболитов.

В Экспериментальной части описаны объекты исследования, реактивы и материалы, научное оборудование, методы и методики анализа. Представлены результаты УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче человека с применением дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции и твердофазной аналитической дериватизации; обсуждаются аналитические возможности определения САРМ в моче человека и в слюне методом УВЭЖХ-МС/МС с применением различных способов пробоподготовки и особенности проведения дериватизации стероидных гормонов непосредственно на сорбционном патроне для ТФЭ.

Для реализации поставленной цели диссертанту необходимо было обосновать выбор объектов исследования и метод анализа, а также предложить алгоритм пробоподготовки. В качестве объектов убедительно аргументирован выбор образцов мочи и слюны. Важным фактором явилась стабильность образцов мочи, поскольку эндогенные стероидные гормоны могут деградировать под действием микроорганизмов при хранении. Слюна, в отличие от крови, отражает содержание активных стероидных гормонов, не связанных с белками. Привлекает неинвазивность и простота пробоотбора, стабильность образцов при комнатной температуре. Кроме того, применение слюны в качестве альтернативной матрицы обусловлено и

высокими корреляциями между концентрациями некоторых стероидных гормонов в плазме и слюне.

Применение хроматографических методов с масс-спектрометрическим детектированием наиболее перспективно для одновременного определения нескольких соединений в биологических жидкостях человека, и для решения поставленных задач диссертант выбирает и обосновывает метод ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (УВЭЖХ-МС).

Поскольку стероидные гормоны в моче человека, в основном, находятся в конъюгированной форме, перед проведением экстракции диссертантом осуществлена их ферментативная деконъюгацию β -глюкуронидазой *E. Coli*.

При разработке методики определения стероидных гормонов в моче автором работы на стадии пробоподготовки использована дисперсионная жидкость-жидкостная микроэкстракция. С применением многофакторного анализа проведена оптимизация условий элюирования и выявлено влияние на степени извлечения стероидов объема экстрагента и диспергента, времени перемешивания, высаливающего эффекта хлорида натрия. Выполнены требования, предъявляемые к экстрагенту (эффективность извлечения аналитов; более высокая плотность по сравнению с водным образцом; высокая растворимость в диспергенте и низкая – в анализируемом образце), что обеспечило повышение факторов концентрирования в 30 раз. Однако было обнаружено, что для эстрогенов чувствительность методики оказалась недостаточной из-за низкой эффективности ионизации в источнике электрораспылительной ионизации.

С этой проблемой диссертант также успешно справился, приняв решение после дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции аналитов провести их дериватизацию с гидроксиламином. Образующиеся оксимы стероидных гормонов имеют более высокую эффективность ионизации, что обеспечило заметное повышение чувствительности (от 2,5 до 100 раз) определения за счет возможности легкого протонирования атома азота в источнике электрораспылительной ионизации. С учетом эндогенной природы аналитов разработанная методика определения стероидных гормонов в моче была валидирована с использованием синтетической мочи.

Еще одно обстоятельство, мимо которого не прошел диссертант. Применение в качестве реагента дериватизации гидроксиламина приводило к образованию стереоизомеров, что потребовало дополнительной серии экспериментов по оптимизации хроматографического разделения для последующего количественного анализа.

На примере определения ряда селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче человека изучена возможность анализа разбавленного образца. Пробоподготовка является простой, экспрессной и не требует использования большого количества реагентов. Показано, что после разбавления определяются андарин, ибутаморен и лаксогенин на уровне 2,5–25 нг/мл, а при твердофазной экстракции за счет концентрирования аналитов на патроне Waters Oasis HLB (30 мг, 1 мл) достигается определение лигандрола и остарина на уровне 0,10 – 0,5 нг/мл.

Интересной находкой диссертанта является реализованная возможность объединения стадий экстракции и дериватизации. При оптимизации условий дериватизации аналитов на патроне для твердофазной экстракции было изучено влияние концентрации дериватирующего агента, температуры и времени термостатирования. За счет фактора дериватизации на

поверхности сорбента время получения производных сократилось. Кроме того, методика характеризуется высокой чувствительностью и низким матричным эффектом.

В качестве альтернативной матрицы для определения стероидных гормонов в диссертационной работе изучена и слюна. Методом ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (УВЭЖХ-МС/МС) диссертантом разработана методика определения стероидных гормонов в слюне человека в диапазоне концентраций от 0,10–0,5 до 50 нг/мл в условиях их экстракционного извлечения метил-трет-бутиловым эфиром со степенями извлечения аналитов 91–98%.

По тексту диссертации возникли вопросы.

– Одна из заявленных задач диссертационного исследования – *Разработать методики определения селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче человека и установить границы их применимости при анализе реальных образцов.* Что можно сказать о границах применимости?

– Как контролировалась полнота ферментативного гидролиза и одинакова ли степень конверсии при дериватизации гидроксиламином для всех стероидных гормонов?

– Какова воспроизводимость пробоотбора при анализе стероидов в слюне?

– Дериватизация гидроксиламином идет по карбонильной группе, но в эстриоле и эстрадиоле этих структурных фрагментов нет. Чем обусловлено получение производных этих аналитов?

– Отмечено, что использование дериватизации гидроксиламином позволяет существенно повысить чувствительность методики, особенно для эстрона. Почему только для этого аналита? Дигидротестостерон в составе молекулы также содержит не сопряженную карбонильную группу в отличие от большинства других стероидов.

Возникшие по работе вопросы не снизили самого благоприятного впечатления от выполненного диссертационного исследования. Работа глубоко продумана, отличается тщательностью и логической обоснованностью и последовательностью всех проведенных экспериментов, что и обеспечило успешное решение важнейших медико-биологических задач.

Заключение

Диссертация Дмитриевой Е.В. является цельной и завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на актуальную тему, связанную с приоритетными направлениями и программами развития отечественной фундаментальной и прикладной науки с использованием современных концепций и экспериментальных методологий и содержит решение важной задачи: разработка аналитических схем высокочувствительного и селективного хроматографического определения стероидных гормонов и селективных модуляторов андрогенных рецепторов (САРМ) в биологических жидкостях человека. методами хроматомасс-спектрометрии.

По результатам проведенных исследований опубликованы 11 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в Web of Science и Scopus, а также 9 тезисов докладов в материалах научных конференций, получен патент РФ на изобретение.

Положения, выносимые на защиту, выводы, сформулированные в диссертации, строго аргументированы и соответствуют экспериментальным данным. Диссертация и автореферат оформлены согласно требованиям действующих нормативных документов.

Результаты работы доложены на представительных научных конференциях. Содержание автореферата и опубликованных трудов диссертанта полностью отвечает содержанию диссертации.

На основании вышесказанного считаю, что диссертационная работа Дмитриевой Екатерины Владимировны «Хроматомасс-спектрометрическое определение стероидных гормонов и селективных модуляторов андрогенных рецепторов в биологических жидкостях» является завершённым квалификационным научным исследованием, выполненным на актуальную тему на высоком научном уровне, обладает научной новизной и практической значимостью и соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 26.05.2020 г. № 751), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Дмитриева Екатерина Владимировна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности – 1.4.2. – **Аналитическая химия** (химические науки)

Официальный оппонент:

Доктор химических наук,
Профессор кафедры органической химии
Института химии

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский Государственный Университет»

Карцова Людмила Алексеевна

Контактные данные: e-mail: kartsova@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 02.00.02 – Аналитическая химия

Адрес места работы: 198504, Россия, Санкт-Петербург, г. Петергоф, Университетский
просп., д. 26, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский Государственный Университет»

Тел.: +7(812)428-40-44; e-mail: l.kartsova@spbu.ru

Подпись сотрудника

Л.Н. Карцовой
20.04.2023 г.

удостоверяю: *Карцова*



Текст документа размещен
в открытом доступе
на сайте СПбГУ по адресу
<http://spbu.ru/science/expert.html>