

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Подольского Ильи Игоревича на тему:
«Хроматомасс-спектрометрические методы определения «стероидного
профиля» спортсменов» по специальности 1.4.2 – «Аналитическая химия»**

Актуальность избранной темы. По данным Всемирного Антидопингового Агентства (ВАДА) на обнаружение анаболических стероидов приходится более 40% от общего числа положительных проб, из которых порядка 10 % составляют эндогенные стероиды экзогенного происхождения. Основными методами определения экзогенных стероидов и их маркеров в антидопинговых лабораториях являются газовая хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС/МС) и высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). На сегодняшний день не существует стандартизированной методики их определения, в нормативных документах ВАДА описаны требования, предъявляемые к данным методикам, при этом сама организация не занимается созданием методического обеспечения. На сайте ВАДА приведены технические документы, содержащие варианты процедур подготовки проб к анализу, они являются частными разработками лабораторий, приведенными в качестве примера при идентификации и определении отдельных компонентов.

С каждым годом растут требования к точности и надежности представляемых результатов допинг-контроля, что делает актуальным создание новых высокочувствительных селективных методов анализа, которые позволят в ходе одного аналитического цикла решать не только вопросы идентификации и определения запрещенных препаратов и их метаболитов, но и оценивать возможность деградации и фальсификаций исследуемого образца биоматериала спортсмена.

В своей работе диссертант рассмотрел ряд соединений – тестостерон, эпитестостерон, форместан, 5 β -андростандион, 5 α -андростан-3 α , 17 β -диол, 5 β -андростан-3 α , 17 β -диол, дегидроэпиандростерон, андростерон и этиохоланолон, определение которых в моче используется при составлении «стероидного профиля» спортсменов, хранящегося в базе данных ВАДА. Для этих соединений разработана методика их определения в моче с проведением валидации согласно критериям ВАДА. Разработана оригинальная методика установления происхождения 19-норандростерона с использованием газовой хроматографии в варианте изотопной масс-спектрометрии. С использованием хемометрического анализа уточнены популяционные границы соотношений и

маркеров «стероидного профиля» спортсмена по данным их содержаний в более чем 10000 образцах мочи мужчин и женщин. Исследовано влияние селективных модуляторов андрогенных рецепторов на содержание андрогенных стероидов в моче.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна. Диссертация состоит из введения, 2-х глав, поделенных на разделы, заключения и списка используемых источников (179 наименований). Работа изложена на 144 страницах, включает 49 рисунков и 33 таблицы.

В первой главе (аналитический обзор) представлен обзор литературы, касающийся выбранной темы диссертационной работы. Обусловлена важность определения «стероидного профиля» для допинг-контроля. Рассмотрены современные проблемы и подходы к выбору матрицы для приготовления градуировочных растворов. Особое внимание уделено факторам, оказывающим влияние на определение «стероидного профиля» и приводящим к искажению результатов анализа. Описана зависимость «стероидного профиля» от популяционной принадлежности спортсменов. В разделе «Стероидомика» рассмотрен новый вектор развития антидопинговых исследований. В заключении первой главы представлены выводы, из которых вытекают цель и задачи работы, раскрытые далее во второй главе.

Вторая глава (экспериментальная часть и обсуждение результатов) посвящена результатам и обсуждениям экспериментальных исследований соискателя. Приведены данные, полученные в ходе разработки методики определения «стероидного профиля» в моче, важной особенностью которой является контроль правильности проведения каждой стадии пробоподготовки с использованием дейтерированных стандартов, что минимизирует возможность возникновения ошибок. Оценены метрологические характеристики подхода. Обоснован выбор матрицы для проведения градуировки. Рассмотрена проблема деградации мочи и маркеры ее идентификации с использованием статистического анализа. Предложена методика ультра высокоэффективной жидкостной хроматографии тандемной масс-спектрометрии для контроля соединений, искажающих «стероидный профиль» (остарина и экдистерона). Описана уникальная методика установления происхождения 19-норандростерона методом газовой хроматографии в сочетании с изотопной масс-спектрометрией. Исследованы «стероидные профили» спортсменов мужского и женского пола и на их основании предложены критерии для выявления подозрительных проб. Получены данные об изменении «стероидного профиля» при употреблении остарина и экдистерона. В заключении диссертационной

работы представлены выводы, подтверждающие достижения в поставленных целях и задачах исследования.

Диссертация изложена ясным языком и в целом оформлена правильно.

Анализ новизны результатов, обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций. К наиболее важным результатам рассматриваемой работы, характеризующим ее научную новизну, практическую ценность и реализацию, следует отнести следующее:

1. Разработана методика хроматографического разделения и определения эндогенных анаболических стероидов методом ГХ-МС/МС, позволяющая одновременно проводить количественное определение 8-ми маркеров «стероидного профиля» – тестостерона, эпитестостерона, форместана, 5 β -андростандиона (от 1 нг/мл), 5 α -андростан-3 α ,17 β -диола (от 2 нг/мл), 5 β -андростан-3 α ,17 β -диола (от 5 нг/мл), дегидроэпиандростерона (от 10 нг/мл), а эндогенных стероидов с более высокими содержаниями - на нижнем уровне эндогенных концентраций (андростерона и этиохоланолона – от 200 нг/мл). Предложена оптимальная матрица для проведения калибровки, а также способ ее приготовления.

2. Рассмотрено влияние остарина и экдистерона на значимые изменения содержания маркеров «стероидного профиля». Показано, что остарин в большей степени влияет на изменение маркеров «стероидного профиля» женской популяции, чем мужской. Применение экдистерона не оказывает существенного влияния на «стероидный профиль» популяций

3. Разработана методика установления природы происхождения 19-норандростерона с использованием метода газовой хроматографии в сочетании с изотопной масс-спектрометрией. В методике предложен оригинальный хроматографический метод разделения аналитов, позволяющий с высокой селективностью выделить 19-норандростерон и провести его последующий анализ.

4. Проведен хемометрический анализ для выявления наиболее значимых маркеров деградации образцов мочи. Рассчитана значимость каждого отдельного параметра. Установлено, что деградация образцов мочи у женщин происходит чаще, чем в мужских.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов подтверждена использованием современных хроматомасс-спектрометрических методов исследования.

Практическая значимость работы. На основании полученных данных диссертантом разработана хроматомасс-спектрометрическая методика определения эндогенных анаболических стероидом в человеческой моче, которая прошла процедуру валидации согласно критериям ВАДА. Показано

влияние деградации образцов мочи, остарина и экдистерона на содержание стероидных гормонов в моче.

Апробация работы. Результаты работы достаточно широко апробированы: доложены на конференциях разного уровня и опубликованы в 5 рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК для опубликования научных трудов. Основные положения диссертации нашли отражение в опубликованных работах.

Соответствие содержания автореферата и диссертации основным идеям и выводам диссертации, качество оформления автореферата. Содержание автореферата и диссертации соответствует основным положениям, рассмотренным в диссертации и выносимым автором на защиту. Автореферат и диссертация оформлены согласно предъявляемым к ним требованиям.

Замечания по диссертации и автореферату.

1. В работе при описании критериев идентификации и определения целевых соединений автор ссылается на документ ВАДА [21] и приводит на стр. 79 метрологические характеристики, которые оценивали в ходе валидации методик. Однако нет данных о соответствии полученных метрологических характеристик методик критериям ВАДА. Какие критерии применяли для достоверной идентификации присутствия аналитов в пробе? Также не приведены хроматографические критерии идентификации – какова погрешность при установлении времени удерживания в газовой и жидкостной хроматографиях?

2. В обзоре литературы поверхностно описаны существующие методики определения в моче ряда маркеров «стероидного профиля» – тестостерона, эпитестостерона, форместана, 5 β -андростандиона, 5 α -андростан-3 α , 17 β -диола, 5 β -андростан-3 α , 17 β -диола, дегидроэпиандростерона, андростерона и этиохоланолона. Не приведены метрологические характеристики существующих подходов, способов пробоподготовки биоматериалов. Эти данные позволили бы более детально оценить научную новизну представленной работы.

3. В таблице 5 диссертации приведены ионные реакции, которые использовали при идентификации и определении маркеров «стероидного профиля» с использованием ГХ-МС/МС, однако значения m/z для некоторых соединений не соответствует данным на масс-спектрах на рисунках 11, 12, 13, 14, 20, 22, 24, 26 и 28 в диссертации. Так, например, для ди-ТМС-производного тестостерона в таблице 5 приведены ион-продукты 327.1 и 417.1. Однако на рисунке 12 в масс-спектре вторичных ионов присутствуют только ионы с m/z 328 и 418. В итоге остается неясным, какие данные верны – в таблице 5 или на рисунках? Данные приведены некорректно.

4. В разделе 2.4 при выборе ионных реакций в ходе масс-спектрометрического детектирования аналитов исследовали MS и MS/MS спектры и выбирали наиболее селективные и интенсивные ионы-продукты. Поскольку не приведены данные по селективности наиболее интенсивных ионных реакций, непонятно, например, почему в качестве иона-предшественника в ходе определения ди-ТМС производного андростерона не использовали ион с m/z 419 (в 4-раза более интенсивный нежели выбранный ион с m/z 434)?

Также в разделе 2.18 работы автор приводит данные о влиянии экидистерона на маркеры «стероидного профиля» и в таблице 33 приведены ионные реакции, которые использовали при определении экидистерона, при этом при их выборе использовали наиболее интенсивные вторичные ионы. Проводилась ли оценка селективности в данном случае?

5. В разделе 2.12 диссертации автор приводит данные об измерении относительной плотности мочи, при этом значения измеряли с точностью до четвертого знака после запятой, однако на рисунках 32-33 эти значения приведены с точностью до третьего знака. Также, в подписи к этим рисункам указано, что исследовано 8352 образца мужской мочи и 5674 образца женской. В разделе 2.1 (объекты исследования) указаны другие значения – 6418 образцов мужской мочи и 4262 образца женской. Какое из этих значений верно?

6. В разделе 2.6 приведены условия пробоподготовки образцов мочи для последующего газохроматографического анализа, при этом непонятно, каким образом ее разрабатывали. Либо она взята из уже опубликованной работы (отсутствует ссылка на источник)?

7. На стр. 65 в таблице 9 диссертации приведено значение встречного газа источника ионизации – 0. Почему выбрано именно это значение, не приводит ли отсутствие данного газа к загрязнению источника при работе с такой сложной матрицей как моча?

8. Имеются ряд замечаний по оформлению автореферата и диссертации. Например, в названии работе используется термин «хроматомасс-спектрометрические», при этом в тексте часто встречается другое написание «хромато-масс-спектрометрические», необходимо однообразное написание. Сокращение ADAMS представлено на английском языке, необходим перевод на русский язык. По тексту работы изредка встречаются опечатки.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным требованиям присуждения ученых степеней.

Вышеуказанные замечания не умаляют высокий уровень научных исследований, представленных в диссертации.

Диссертационная работа «Хроматомасс-спектрометрические методы определения «стероидного профиля» спортсменов» соответствует паспорту специальности «Аналитическая химия» и 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), а ее автор Подольский Илья Игоревич заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.2 – Аналитическая химия.

Официальный оппонент:

Кандидат химических наук,
старший научный сотрудник 31 НИО Федерального государственного бюджетного учреждения «27 Научный Центр» Министерства обороны Российской Федерации

БРАУН Аркадий Владимирович



«08» июня 2022 г.

Контактные данные:

тел.: 7(915)455-80-09, e-mail: avbraun@yandex.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

02.00.02 – «Аналитическая химия»

Адрес места работы:

111024, г. Москва, проезд Энтузиастов, владение 19,
27 НЦ МО РФ, 31 НИО

Тел.: +7 (499)265-42-90; e-mail: 27nc_4@mil.ru

Подпись Брауна Аркадия Владимировича заверяю.

(фамилия, имя, отчество рецензента)

Заместитель начальника 27 НЦ МО РФ

Кандидат технических наук



М.П. Шаройко