

## 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 выполненного исследования.**

На протяжении десятилетий анаболические андрогенные стероиды являются наиболее часто обнаруживаемыми допинговыми агентами в образцах мочи спортсменов. При этом далеко не всегда антидопинговым лабораториям удается обнаруживать анаболические андрогенные стероиды или их метаболиты в моче спортсменов в рамках целевого анализа. С 2014 года биологический паспорт спортсмена (ABP) используется для выявления фактов употребления спортсменами веществ с анаболической и/или андрогенной активностью. В моче определяют концентрации тестостерона (Т), его изомера эпитестостерона (Е) и метаболитов Т, андростерона (А), этиохоланолона (Этио), 5 $\alpha$ -андростандиола (5 $\alpha$ Адиол) и 5 $\beta$ -андростандиола (5 $\beta$ Адиол). Эти концентрации преобразуются в пять соотношений ABP (Т/Е, А/Етио, 5 $\alpha$ Адиол/Е, 5 $\alpha$ Адиол/5 $\beta$ Адиол и А/Т). Из-за значительной межиндивидуальной изменчивости как концентраций, так и соотношений, популяционные пороговые значения оказались малоприменимыми, что привело к введению стероидного модуля биологического паспорта спортсмена. Паспорт позволил создать индивидуальные референсные диапазоны для параметров стероидного профиля, специфичных для спортсмена. Индивидуальные пороговые величины соотношений рассчитываются с помощью адаптивного байесовского алгоритма. Если установленные соотношения концентраций выходят за пределы индивидуально рассчитанных референсных диапазонов, требуется проведение подтверждающего анализа с применением изотопной масс-спектрометрии для установления эндогенного или экзогенного происхождения стероида.

Помимо повышения открываемости допинга, контроль биологического паспорта спортсмена позволяет установить подмену и иные формы фальсификации биообразцов.

В системе антидопингового контроля преобладают процедуры обнаружения и идентификации запрещенных веществ. Контроль стероидного профиля относится к

области прецизионного количественного анализа, а аналитами являются вещества биогенного происхождения. Биоаналитические исследования в таких областях относятся к наивысшей категории сложности. Анализ научной литературы показывает, что метаболомике спорта, и исследованию стероидного профиля, в частности, уделяется максимальное внимание международного антидопингового сообщества. Рядом авторов отмечается, что существующую методологию установления трактовки атипичного стероидного профиля нельзя считать сложившейся и необходимо модернизировать. Если поставить такие исследования в РФ на паузу, потом дотянуться до международного уровня будет крайне сложно.

Таким образом, цель диссертационного исследования, сформулированная соискателем как «разработка хромато-масс-спектрометрических методик определения маркеров стероидного профиля спортсменов, отвечающих международным требованиям к допинговому контролю», является чрезвычайно актуальной.

### **Структура и содержание диссертации**

Диссертация имеет традиционную структуру для работ по аналитической химии: состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы из 179 наименований, изложена на 144 страницах машинописного текста, содержит 33 таблиц и 49 рисунков. В главе 1 (Аналитический обзор), включающей 8 разделов, представлены общие сведения о стероидных гормонах и методах их определения в биоматрицах. Особое внимание уделено ключевому вопросу в определении биогенных соединений – выбору биоматрицы для градуировки. Рассмотрена проблема интерпретации результатов контроля стероидного профиля с учетом популяционных особенностей. Приведены результаты исследований, посвященных влиянию различных препаратов, как запрещенных в спорте, так и не запрещенных, на стероидный профиль мочи. Обоснованы нецелесообразность консервации проб мочи и обусловленная этим необходимость контроля степени деградации биообразца. Отмечена роль стероидного профиля в выявлении фактов фальсификации образцов. Обоснована актуальность развития стероидомики – наиболее востребованного раздела метаболомики в антидопинговых исследованиях.

Экспериментальная часть (глава 2) содержит 18 разделов. В экспериментальной части представлены объекты исследования (объем выборки впечатляет – более 10 000 проб мочи), реактивы, расходные материалы, оборудование, стандартные образцы определяемых соединений. Подробно представлены этапы оптимизации условий детектирования маркеров стероидного профиля, а также веществ, искажающих стероидный профиль, методом газовой хроматографии в сочетании с тандемной масс-

спектрометрией в режиме ионизации электронами. Обоснована и оптимизирована процедура твердофазной экстракции для удаления стероидов из мочи в целях ее последующего применения в качестве матрицы при построении градуировки. Проведена валидация разработанных методик в соответствии с требованиями ВАДА. Разработаны критерии оценки стероидного профиля и предложены рекомендации для более гибкой трактовки критериев ВАДА с учетом популяционных особенностей. Значительное внимание в работе уделено разработке методики установления экзогенного/эндогенного происхождения 19-норандростерона с применением метода газовой хроматографии в сочетании с изотопной масс-спектрометрией. Проведен системный анализ маркеров деградации мочи. В последней главе представлены результаты влияния запрещенного в спорте остарина и не запрещенного до настоящего времени экидистерона на стероидный профиль мочи. Выводы закономерно отражают итоги работы.

#### **Научная новизна исследования.**

Соискателем предложены критерии трактовки стероидного профиля как атипичного с учетом популяционных особенностей российских спортсменов. Эти критерии существенно отличаются от критериев ВАДА и позволяют обоснованно отобрать «подозрительные» пробы для дальнейшего подробного исследования.

Предложен новый подход для построения градуировочной характеристики с использованием в качестве матрицы мочи, очищенной от стероидов с помощью твердофазной экстракции.

Метод изотопной масс-спектрометрии до настоящего времени в практике антидопингового контроля применялся преимущественно для установления экзогенного тестостерона. В настоящем исследовании разработана оригинальная методика установления эндогенного или экзогенного происхождения 19-норандростерона с использованием газовой хроматографии в сочетании с изотопной масс-спектрометрией.

Выявлены маркеры деградации мочи и проведена статистическая оценка их значимости.

Предложенные автором диссертационной работы методические решения позволили выйти на новый уровень не только исполнения методик контроля стероидного профиля, но и трактовки результатов контроля. Все это позволит повысить эффективность выявления фактов нарушений антидопинговых правил.

### **Теоретическая и практическая значимость.**

Методика контроля стероидного профиля, отвечающая критериям ВАДА, относится к разряду ключевых среди используемых процедур любой антидопинговой лаборатории. В настоящем исследовании методика существенно модернизирована в части более высокой производительности и, в то же время, прецизионности. В процедурах антидопингового контроля особое внимание уделяется контролю качества и стандартизации анализов. Важным этапом анализа является деконъюгация аналитов. Неполное протекание ферментативного гидролиза – одна из наиболее частых причин возможных ошибок. Соискателем предложено полноту протекания ферментативного гидролиза определять с помощью контроля соотношения 2-х маркеров: глюкуронида дейтерированного андростерона и дейтерированного эпиандростерона. Установлена пороговая величина соотношения, что позволяет вынести однозначное суждение о полноте ферментативного гидролиза. Также регламентирован контроль полноты дериватизации аналитов, заключающийся в оценке соотношений моно-ТМС производных андростерона и этиохоланолона к их ди-ТМС производным. Таким образом, соискателем тщательно разработаны все стадии методики контроля стероидного профиля. Методика валидирована и апробирована на практике, ее эффективность и работоспособность убедительно доказаны.

Исчерпывающее обоснование отсутствия влияния экидистерона на параметры биопаспорта спортсмена важно для дискуссии о правомерности включения экидистерона в Запрещенный список ВАДА.

### **Обоснованность сформулированных научных положений, выводов и рекомендаций не вызывает сомнений.**

Предложения по уточнению границ соотношений маркеров стероидного профиля мочи с учетом популяционных особенностей внесены по результатам хемометрического анализа более чем 10000 образцов. Все предложенные процедуры валидированы в соответствии с критериями ВАДА. Выводы о влиянии ряда препаратов на биогенный стероидный профиль или об отсутствии такого влияния подтверждены достаточным количеством экспериментальных данных.

Содержание диссертации соответствует паспорту научной специальности 1.4.2 – Аналитическая химия (пп 2, 4, 10).

Работа поддержана двенадцатью публикациями. По результатам проведенных исследований опубликованы 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в Web of Science и Scopus, а также 7 тезисов докладов в материалах научных конференций.

При общем безусловно положительном впечатлении от работы автору можно адресовать следующие вопросы и замечания:

1. В работе исследовано и проиллюстрировано диаграммами (рисунки 32-33) распределение значений относительной плотности образцов мочи мужчин (более 8 тысяч) и женщин (более 5,5 тысяч). При этом не сообщается, использовались ли эти результаты при нормировании концентраций маркеров стероидного профиля по плотности.

2. В диссертации определению экдистерона в моче и его влиянию на стероидный профиль уделено значительное внимание. Рассмотрению этого вопроса не нашлось места в автореферате. Лишь в выводах отмечено, что влияние отсутствует. В то же время, применение уточненных популяционных границ для оценки влияния остарина и экдистерона на маркеры «стероидного профиля» - одна из сформулированных соискателем научных задач, решение которой отражает теоретическую и практическую значимость работы. Уточним, что данное замечание относится только к автореферату, но не к диссертации.

3. Почему экстракция мочи эфиром позволяет удалить только свободные стероиды, а твердофазная экстракция – также и связанные? Проводились ли подтверждающие эксперименты?

4. Как разработанная автором методика контроля стероидного профиля совместима с ранее разработанной методикой определения 109 допинговых соединений? Эта задача ставилась соискателем в целях рационального использования приборного парка и экономии времени. Видимо, она успешно решена, что, однако, не проиллюстрировано в диссертации.

5. Если на момент проведения исследований некоторые МС/МС спектры исследуемых соединений отсутствовали в открытом доступе, и автору пришлось получить их собственноручно, описывать этот процесс в диссертации, представляемой в 2022 г, возможно, не стоило. В любом случае представление масс-спектров в цифровом виде более приемлемо.

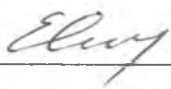
6. Соискатель не поясняет, для каких конкретно задач использовали расширенный скрининг с библиотечным поиском. Остается догадываться, что, помимо целевого скрининга 109 запрещенных субстанций, еще применяли и нецелевой скрининг. Если так, то почему при этом ограничились обращением только к библиотекам NIST?

7. Главу 2.13 правильнее было бы, наверное, назвать не «Метрологическая аттестация методики определения маркеров стероидного профиля», а метрологическая

характеристика или валидация. Аттестацию методики выполняют организации, имеющие на то соответствующую аккредитацию.

Высказанные вопросы и замечания носят исключительно дискуссионный характер и не снижают высокой оценки диссертационной работы.

В диссертации решена важная научная задача, автором внесен значительный вклад в теорию и практику аналитической химии. Содержание автореферата в целом соответствует содержанию работы. Диссертационная работа Подольского Ильи Игоревича на тему: «Хроматомасс-спектрометрические методы определения «стероидного профиля» спортсменов» является завершенным 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, Подольский Илья Игоревич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.2 – Аналитическая химия.



Савельева Елена Игоревна  
заведующая лабораторией аналитической  
токсикологии ФГУП «Научно-исследовательский  
институт гигиены, профпатологии и экологии человека  
Федерального медико-биологического агентства,  
доктор химических наук (20.02.23 – поражающее  
действие специальных видов оружия, средства и  
способы защиты)  
03.06.2022 г.

188663, Ленинградская область, Всеволожский р-н, г.п. Кузьмолловский. ст.  
Капитолово, корп. 93.

Телефон +7(812)606-62-81 доб.240; e-mail [saveleva@gpech.ru](mailto:saveleva@gpech.ru)

Подпись доктора химических наук Савельевой Елены Игоревны заверяю:

Ученый секретарь ФГУП «НИИ ГПЭЧ»

ФМБА России



  
Танюхина Ольга Николаевна