

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Прасолова Ильи Сергеевича «Обнаружение стероидов экзогенной природы, выделенных из мочи человека, методом изотопной хромато-масс-спектрометрии», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 - Аналитическая химия

### **Актуальность темы исследования.**

В настоящее время в практике допинг-контроля существует необходимость выявления случаев употребления допинговых препаратов, являющихся близкими аналогами гормонов, вырабатываемых в организме человека, или их метаболитами: предшественниками: тестостерон, дегидроэпиандростерон, андростендион, андростендиолы. По результатам анализа методом газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией это сделать не всегда удается и отмечаются лишь так называемые атипичические изменения гормонального профиля спортсмена. Как известно, применение синтетического тестостерона в спорте запрещено на протяжении 35 лет. Ранее единственным способом обнаружения использования экзогенного тестостерона было определение отношения концентраций тестостерона (Т) и его неактивного изомера – эпитестостерона (Е) в моче. Однако данный подход имеет ряд существенных ограничений, поскольку отношение Т/Е в популяции спортсменов варьируется в довольно широких пределах (от 0.1 до 4.0 и выше). Кроме этого, в последнее время на рынке спортивного питания широкое распространение получили «прогормоны» – вещества, которые являются предшественниками или метаболитами тестостерона и не определяются традиционными методами допинг-контроля. Установить происхождение стероидных гормонов можно двумя способами – обладая

информацией о стероидном профиле спортсмена или напрямую, посредством изотопной хромато–масс–спектрометрии. Исследование стероидного профиля по программе “Биологический паспорт спортсмена” представляет собой косвенный подход к решению проблемы и ввиду отсутствия специфических метаболитов («маркеров») требует наличия большого количества статистических данных и их последующей индивидуализации. Поскольку подавляющее большинство синтетических стероидов получают из растительного сырья с изотопным составом углерода, отличающимся от эндогенных стероидных гормонов, продуцируемых в организме человека, то факт применения экзогенных стероидов может быть обнаружен с использованием изотопной масс-спектрометрии.

В настоящее время Всемирное антидопинговое агентство (ВАДА) опубликовало технический документ, регламентирующий использование метода ГХ–С–ИМС для анализа стероидных гормонов. Однако ввиду сложности и трудоемкости его реализации единый методический подход у антидопинговых лабораториях пока отсутствует. В свете этого, разработка технологии выделения стероидных гормонов из мочи человека, как наиболее доступного их источника, выявление факторов, определяющих информативность метода, основанного на использовании изотопной масс-спектрометрии в практике допинг-контроля, и оценка достоверности получаемых результатов, являются крайне актуальной задачей.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендации, сформулированных в диссертации.**

Автором проведен детальный анализ современного состояния методов препаративного выделения и количественного определения стероидных препаратов, поступающих в организм человека (рассмотрение этого вопроса представлено на 48 страницах диссертации). Учитывая достоинства и ограничения существующих



методов выделения стероидных препаратов, показано, что наиболее приемлемым способом пробоподготовки образцов для анализа методом изотопной масс-спектрометрии является комбинация твердофазной экстракции и полупрепаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Из анализа литературных данных следовало, что большинство экзогенных аналогов стероидов влияет на биотрансформацию тестостерона и его метаболитов, что может «маскировать» наличие и детекцию искомого вещества. С учетом этого автор приходит к методически важному заключению: для получения однозначных выводов о природе стероидов, обнаруживаемых в моче тестируемых субъектов, необходимо использовать характеристики изотопного состава углерода целевых препаратов (тестостерон и его основные метаболиты).

Таким образом, обоснованность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений, поскольку автор использовал современные теоретические научные положения и схемы интерпретации экспериментальных результатов, надежность которых подтверждена их метрологической оценкой.

#### **Достоверность и новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

В качестве объектов исследования автором были выбраны не простые, с позиций аналитической процедуры, стероиды эндогенной и экзогенной природы, выделяемые из мочи человека. Учитывая особую значимость методов детекции стероидных гормонов, значительную часть диссертационной работы автор посвятил разработке и усовершенствованию технологии выделения и дериватизации стероидных препаратов, а именно: подбор условий выделения стероидов из мочи, включая выбор оптимальных условий сорбционного концентрирования, полупрепаративного разделения стероидов и их производных методом ВЭЖХ, дериватизации целевых соединений; и

оптимизации условий газохроматографического разделения целевых стероидов.

В процессе выполнения работы были изучены хроматографические свойства целевых соединений и выбраны условия их селективного выделения из мочи человека посредством жидкостно-жидкостной и твердофазной экстракции, а также высокоэффективной жидкостной хроматографии, с учетом минимизации эффекта изотопного фракционирования в процессе пробоподготовки, были подобраны условия ацетилирования исследуемых соединений, обеспечивающие полную степень конверсии эндогенного маркера 16-андростенола в ацетильную форму и корректное измерение его изотопного соотношения  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , проведены модификации системы для ГХ-С-ИМС анализа, позволившие существенно повысить эффективность газохроматографического разделения близких по химической структуре целевых соединений (5 $\alpha$ / $\beta$ -андростандиолы, андростерон/ этиохоланолон), и, как следствие, повысить правильность процесса измерения характеристик их изотопного состава углерода.

В экспериментально выбранных условиях методом ГХ-С-ИМС проанализировано более 900 образцов мочи спортсменов и добровольцев и в результате статистической обработки полученных данных впервые определены референтные интервалы разницы значений характеристик изотопного состава в парах «эндогенный маркер – целевое соединение» для российской популяции спортсменов. Использование установленных внутрилабораторных критериев оценки аналитических данных практически полностью исключает вероятность появления ложноположительных результатов анализа.

В соответствии с предложенным способом анализа определены характеристики изотопного состава углерода целевых соединений и эндогенных маркеров в 220 пробах мочи, полученных после употребления тремя добровольцами 6 прогормональных препаратов



экзогенного происхождения. На основании экспериментов по биотрансформации 6 прогормональных препаратов в человеческом организме найдены маркеры употребления, наиболее информативные при выявлении случаев их использования в спорте (для 3 из 6 препаратов – обнаружено впервые).

Таким образом, результаты исследований, представленные в настоящей работе, являются научно-методической основой для совершенствования методов допинг-контроля экзогенных гормональных препаратов в практике специализированных лабораторий в России и мировой практике.

### **Значение полученных автором результатов для науки и практики.**

Результаты диссертационной работы вносят неоценимый вклад в развитие аналитической химии в совершенствование методик инструментальных методов, используемых при выявлении экзогенных стероидных гормонов в организме человека (допинг-контроль). Показана возможность достоверного определения происхождения стероидов, выделенных из мочи человека, методом изотопной хромато–масс–спектрометрии в целях допинг–контроля спортсменов. Предложенная методика обнаружения стероидов экзогенной природы в моче валидирована и аттестована в соответствии с требованиями стандарта ГОСТ ИСО/МЭК 17025 и внесена в область аккредитации Федерального государственного унитарного предприятия «Антидопинговый центр» (ФГУП АДЦ) органом по аккредитации ААЦ «Аналитика». Предложенный способ определения происхождения выделенных из мочи стероидов нашел практическое применение в повседневной работе предприятия «Антидопинговый центр». Опыт успешного применения указанной методики в российском допинг–контроле позволил применить полученные в рамках данного исследования результаты для анализа проб спортсменов во временной Антидопинговой лаборатории г. Сочи в

период проведения Олимпийских и Паралимпийских зимних игр 2014 года.

### **Общая оценка содержания диссертации, ее завершенность.**

Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 167 страницах, содержит 93 рисунка, 69 таблиц и список цитируемой литературы из 96 наименований, в числе которых 4 сообщения на русском языке.

**Глава 1** посвящена критическому обзору литературы по теме диссертации. Диссертантом рассмотрены известные методы анализа синтетических аналогов эндогенных стероидов и их выделения из мочи у тестируемых субъектов. На основе изучения литературных данных установлено, что происхождение стероидных гормонов в моче человека можно определить двумя способами: это использование заранее составленного стероидного профиля или анализ изотопных характеристик углерода регистрируемых стероидных гормонов. Анализируя аналитические возможности этих подходов, автор убедительно доказывает преимущество использования метода анализа характеристик изотопного состава углерода стероидных препаратов и их метаболитов, которые образуются в организме человека и дополнительно поступают в организм. При этом наиболее перспективным способом пробоподготовки анализируемых стероидов является комбинация твердофазной экстракции и полупрепаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Исходя из анализа метаболизма экзогенных стероидных препаратов, влияющих на биотрансформацию эндогенных стероидов, в качестве целевых соединений при измерении изотопного состава углерода стероидов, выделенных из мочи, автором предложено использовать изотопные характеристики углерода тестостерона и его метаболитов.



**Глава 2** диссертации посвящена характеристике объектов исследования, стандартных образцов, реагентов, оборудования для выделения целевых стероидных образцов и основных инструментов исследования – газовый хроматограф с масс-спектрометрическим детектором и комплекс газового хроматографа с изотопным масс-спектрометром и интерфейсом для сжигания пробы. В этой главе представлены эксперименты, нацеленные на отработку условий многоступенчатого процесса пробоподготовки (жидкостно-жидкостная экстракция, твердофазная экстракция, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, иммуноафинная хроматография) и методы масс-спектрометрии (газовая хроматография/масс-спектрометрия), а также анализ образцов мочи с использованием изотопной масс-спектрометрии. Подбор оптимальных условий анализа стероидов методом ГХ-С-ИМС осуществлялся путем вариаций различных параметров в процессе газохроматографического разделения, окислительной конверсии стероидов и масс-спектрометрической идентификации продукта конверсии.

**Глава 3** диссертации посвящена пробоподготовке стероидов в образцах мочи. В этой главе рассмотрены подбор условий жидкостно-жидкостной и газовой экстракции стероидов, выбор условий разделения стероидов методом жидкостной хроматографии, применение реактива Жирара для селективного удаления кетостероидов, от которого в последствии отказались в пользу повторного использования ВЭЖХ-фракционирования. В этой главе важную роль отведено рассмотрению методов дериватизации стероидов при их газохроматографическом и хромато-изотопном масс-спектрометрическом анализе.

**Глава 4** посвящена инструментальному анализу соединений в экстрактах из мочи тестируемых субъектов: выбор условий газохроматографического разделения производных стероидов и изотопный анализ отдельных фракций, масс-спектрометрическая

идентификация целевых соединений, подбор условий окислительной конверсии стероидов и масс-спектрометрической идентификации продуктов конверсии, проведение изотопного анализа углерода тестируемых соединений. Результаты исследований, представленные в этой главе, позволили автору приступить к изучению биотрансформации ряда синтетических аналогов эндогенных стероидов и оценке их влияния на изотопные характеристики углерода целевых соединений.

**Глава 5** представляет данные по изотопным характеристикам углерода целевых соединений, определенных для 923 проб мочи спортсменов и добровольцев. В главе приведены метрологические характеристики разработанной автором методики, определены критерии экзогенной природы стероидов, представлены данные по межлабораторному сравнению результатов масс-спектрометрического анализа происхождения стероидов в образцах мочи, проведенные в 32 аккредитированных ВАДА лабораториях.

**Глава 6** представляет результаты измерения характеристик изотопного состава углерода эндогенных стероидов в моче тестируемых субъектов после употребления синтетических аналогов. В главе представлены результаты, отражающие особенности выделения и анализа активных компонентов прогормональных препаратов (тестостерон, дегидроэпиандростерон, прегнелон, болдион, 5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -диол, 1-андростен-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -диол). На основе экспериментов по биотрансформации 6 синтетических аналогов эндогенных стероидов выявлены закономерности в изменении изотопного состава эндогенных стероидов и определены пары «эндогенный маркер- целевое соединение», являющимися наиболее информативными при выявлении их использования в спорте.

#### **Публикации и апробация.**

По материалам диссертации опубликовано 7 работ, из них 2 - в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Материалы диссертации



представлены в виде главы в монографии «Проблемы аналитической химии» Т. 15, М.: Физматлит. Результаты работы прошли многократную апробацию в результате участия автора во всероссийских и зарубежных научных конференциях, а также научных семинарах МГУ и институтах РАН.

### **Достоинства и недостатки по содержанию и оформлению диссертационной работы.**

Поставленные задачи и использованные методические подходы для их реализации позволили автору получить новые результаты, которые являются важным вкладом в аналитическую химию стероидных гормонов. В результате статистической обработки полученных данных впервые определены референтные интервалы разницы изотопных характеристик углерода в паре «эндогенный маркер – целевое соединение» для российской популяции спортсменов. Использование установленных внутрилабораторных критериев оценки аналитических данных практически полностью исключает вероятность появления ложноположительных результатов анализа..

**По работе имеются замечания:** В литературном обзоре (стр. 17) диссертантом представлены характеристики изотопного состава углерода  $C_3$ -типа растений, находящиеся в диапазоне от -34 до -24 ‰. Здесь следовало указать, что органические компоненты растений неоднородны по изотопному составу углерода: в случае  $C_3$ -типа растений углеводы и белки содержат больше  $^{13}C$  изотопа (около -20‰), по сравнению с лигнином и липидной фракцией (около -30-32 ‰), в том числе и ситостероле и стигмастероле, как исходных продуктов синтеза тестостерона. В случае растительных продуктов  $C_4$ -типа растений изотопные характеристики углерода органических продуктов находятся в диапазоне от -12 до -20‰, а липидная фракция будет характеризоваться величинами менее -20‰. Следовательно, при использовании растительных предшественников тестостерона,

полученных и C<sub>4</sub>-растений их изотопные характеристики будут иметь значениями менее -20‰. Очевидно, что обнаружение экзогенных стероидов в этом случае будет затруднено, а возможно и практически невыполнимо. При постулировании базовой платформы метода, основанной на использовании изотопов углерода, вопрос о возможных ограничениях метода и путях их преодоления было бы желательным обсудить, например, возможность использования дополнительного анализа вариаций распространенностей изотопов других элементов (водород, кислород).

В качестве дополнительных замечаний, касающихся оформления материала диссертации следует указать, что при графическом представлении изотопных характеристик значения на оси ординат (рис. 10, 15, - 22) представлены в обратном порядке. Используются также жаргонные выражения, например «с изотопным составом углерода около минус 30‰ и ниже» (стр.4, 30, 31. 35, 41) вместо «с относительными характеристиками изотопного состава углерода около минус 30‰ и ниже», на рис.13 неверно обозначена ось ординат:  $\delta^{13}\text{C}$ , вместо  $\Delta \delta^{13}\text{C}$ .

Отмеченные недочеты не умаляют достоинств диссертационной работы и не снижают ее общей высокой оценки. Результаты диссертации характеризуются актуальностью, новизной, оригинальностью, практическим значением для науки и практики, полностью соответствуют цели и задачам, поставленным перед диссертантом.

Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации.

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

Диссертация Прасолова Ильи Сергеевича «Обнаружение стероидов экзогенной природы, выделенных из мочи человека, методом изотопной хромато-масс-спектрометрии», представляет собой



самостоятельную законченную научно-квалификационную работу, в которой решены задачи, актуальные для аналитической химии. По объему выполненных исследований, актуальности, новизне, научной и практической ценности, уровню обсуждения результатов, надежности и достоверности основных выводов кандидатская диссертация Прасолова Ильи Сергеевича соответствует требованиям п. 9 постановления Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 - Аналитическая химия, а её автор заслуживает присуждения ему искомой степени по специальности 02.00.02 - Аналитическая химия.

**Официальный оппонент,**

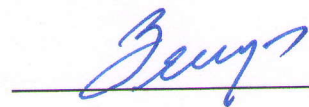
доктор биологических наук,

Заведующий Лабораторией масс-спектрометрии,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина

Российской академии наук



**Зякун Анатолий Маркович**

142290 г. Пущино, Московская область, проспект Науки, д.5.

Тел. (495) 625 7449

Эл-почта: [Zyakun@ibpm.pushchino.ru](mailto:Zyakun@ibpm.pushchino.ru)

07.09.2015

