

РЕЦЕНЗИЯ

На дисертационен труд на тема:

„АНАЛИЗ НА СТЕРОИДНИЯ ПРОФИЛ НА СПОРТУВАЩИ И НЕСПОРТУВАЩИ БЪЛГАРИ”

представен за придобиване на образователната и научна степен „ДОКТОР”

„Теория и методология на спортната наука“, професионално направление 7.6.

с автор **Таня Запрянова Шейтанова** – главен експерт в Лаборатория за допингов контрол, Министерство на младежта и спорта

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: доц. д-р Любомир Петров

РЕЦЕНЗЕНТ: доц. Милка Милева, дф

Департамент по вирусология, Институт по микробиология „Стефан Ангелов”

Българска Академия на Науките, тел. +359 979 3117;

е-mail; milkamileva@gmail.com

Настоящата рецензия е изготвена въз основа на Заповед № ЗП 1837/22.12.2020 год. на Ректора на НСА “Васил Левски” съобразно решение на Факултетния съвет на Факултет “Спорт” по Протокол №10 от 16.12.2020.

ОБЩО ПРЕДСТАВЯНЕ НА ПРОЦЕДУРАТА И СПРАВКА ЗА КАНДИДАТА. Представеният комплект материали е в съответствие с изискванията от Условия и ред за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ от Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени в НСА “Васил Левски” и включва всички необходими документи. Дисертационният труд е обсъден и насочен за откриване на процедура за защита на заседание на Факултетния съвет на Факултет “Спорт” на 16.12.2020 г.

Таня Запрянова Шейтанова е Главен експерт в Лаборатория за допингов контрол, Антидопингов център към Министерство на младежта и спорта. Основни дейности и

отговорности са разработване и валидиране на методи за анализ на забранени субстанции от списъка на САА.

Личното ми впечатление от Таня Шейтанова е, че тя е ерудиран химик със сериозни познания и компетенции в съвременната аналитична практика, микробиология и биотехнологии. Таня Шейтанова е възпитаник на ТИХ "Проф. Д-р Асен Златаров", гр. Димитровград, след това е придобила магистърска степен по органична и аналитична химия в СУ "Св. Климент Охридски". Тези квалификации обясняват отличното владение от докторантката на най-модерните съвременни инструментални аналитични методи.

ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД Е ПОСВЕТЕН НА количествено определяне на ендогенни стероиди от уринни проби на неспортуващи, спортуващи в свободното време и активно спортуващи жени и мъже, с което се демонстрират възможностите на уринния стероиден профил като инструмент за анализ на промени в стероидогенезата, свързани с физическите натоварвания. В научната литература се отбелязва значимостта на стероидния профил на урината относно адаптационните процеси на активно спортуващи, неспортуващи и средно спортуващи хора към степента на физическите натоварвания, както и на стероидните метаболитни промени при тренировъчния процес. Доказаните нежелани странични ефекти от употребата на анаболните андрогенни стероиди, заедно с повишаващите спортните постижения действия, стават причина за включването им в Забранителния списък на WADA. За спортната наука най-голям интерес представлява влиянието на физическите натоварвания върху обмяната на стероидите. Изучаването на този въпрос разкрива процесите на адаптация на хормоналната регулация в различни етапи от подготовката на спортистите.

Проследяването на стероидния профил е сравнително лесен неинвазивен метод за контрол и подпомагане на спортната подготовка, особено на активно спортуващи хора.

Изследванията на докторантката са проведени чрез модерен и прецизен газхроматографски метод с MAC-детекция /GC-MS/, валидиран по изискванията на ISO 17025 и ISL и TD EAAS на WADA. Използването на валидиран метод за анализ на анаболните андрогенни стероиди обезпечава получаването на достоверни и възпроизводими резултати в различни лаборатории и позволява натрупване на голямо количество съпоставими данни.

ДИСЕРТАЦИЯТА е написана на 175 стандартни страници, съдържа 23 таблици и 13 фигури. Библиографията обхваща 380 литературни източника, от които 207 са след 2000 г.

Трудът е структуриран съобразно изискванията и включва: Увод – 2 стр.; Литературен обзор – 68 стр.; Цел, задачи и методи на изследване - 7 страници; Резултати и анализ - 50 страници; Изводи, препоръки и приноси на дисертационния труд - 2 страници; Библиография - 37 страници.

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР. Още от първите редове личи отличната подготовка на докторантката и основното познаване на биохимията и биосинтезата на стероидните хормони и техните метаболити, механизмите на действие на андрогенните и естрогенните хормони. Литературната справка е извършена изключително прецизно, с широки познания и детайлно разбиране, отлично систематизирана и структурирана. Много добро впечатление създава начинът, по който са поднесени структурните формули на холестерол, основните молекулни скелети на стероиди C18, C19, C21 и C27, с включения коментар на зависимостта на мястото и позицията на заместителите към тяхната биологична и фармакологична роля. Докторантката познава в детайли активирането на сигналните пътища и видовете рецепторни механизми на тяхното действие. Специално внимание е отделено на хепаталните и екстрахепатални ензимни системи от суперсемејството на цитохром Р-450 (CYP) за синтез и метаболизъм на стероидите – локализация, експресиране, ензимна видова, типова и полова специфичност на изоформите, каталитична ефективност, участие във Фаза 1 (редуктазна) и Фаза 2 (синтазна) на метаболитните пътища.

Познаването на фармакокинетиката на стероидните хормони при човека е определящ фактор за тълкуване на стероидния профил (стероидния метаболом) в урина, плазма, серум и слюнка. Стероидогенезата в женските и мъжките полови жлези води до специфична експресия на изоформи на CYP с различна субстратна специфичност. В детайли е проследен пътят на метаболитните трансформации и трансмембранный транспорт на андрогенните прекурсори до момента на тяхната екскреция чрез бъбреците. Основен акцент в литературния обзор е поставен върху уринния стероиден метаболом като съвкупност от всички стероиди, получени в биосинтетичните и метаболитните пътища.

В раздел “1.9 Стероиден профил и стероиден паспорт на спортиста” убедително и аргументирано са изтъкнати всички предимства на метода на Донике и съавтори (1983), които адаптират ендокринната методиката за целите на допинг анализа при спортисти. През 1992 г. Донике въвежда показателя “стероиден профил на спортиста” като измерените стойности на

концентрациите на ендогенни стероиди и изчислените техни съотношения в уринни допинг проби. Количествено определяне на ендогенни стероиди чрез GC-MS метод, валидиран по изискванията на ISO 17025 и ISL и TD EAAS на WADA, от уринни проби, е перфектен подход за анализ на стероиди от акредитираните антидопингови лаборатории и важно условие за получаване на сравними резултати от анализирани в различни лаборатории проби, които се използват за индивидуално лонгитудинално проследяване на стероидния модул от биологичния паспорт на спортиста. Прави впечатление, че докторантката се е съобразила с направените препоръки на вътрешната защита. Принципът на метода и Фигура 12 са поместени на подходящо място - в раздел 2.7 Описание на метод.

В РАБОТНАТА ХИПОТЕЗА е заменено понятието “полезна информация” в първоначалния вариант на дисертацията с по-смелата и точна формулировка “биомаркери на адаптационните промени” на организма към физически натоварвания, която да подпомогне управлението на тренировъчния процес. Ясно и конкретно е дефинирана поставена целта: да се направи сравнителен анализ на стероидния профил на неспортуващи, спортуващи в свободното време и активно спортуващи жени и мъже на възраст от 18 до 30 години и да се определят подходящите биомаркери на адаптационните промени в стероидогенезата, свързани с физическите натоварвания.

ФОРМУЛИРАНИТЕ ЗАДАЧИ са адекватни за постигане на набелязаната цел.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИЯТ МАТЕРИАЛ включва 573 жени и мъже неспортуващи, спортуващи в свободното време и активно спортуващи на възраст от 18 до 30 години.

Всички участници в експеримента са попълнили документ за информирано съгласие, съобразно директивите на Европейския съюз.

РЕЗУЛТАТИТЕ са много добре систематизирани в 21 таблици. Считам, че поставената цел и формулираните задачи са прецизно и изчерпателно изпълнени.

ОБСЪЖДАНЕТО на резултатите показва отлична информираност и познаване на проблематиката, както и на данните, публикувани в научната литературата.

Забелязват се някои дребни технически неточности, например в автореферата на английски език на стр. 6 надписите във Фигура 1 са български език.

Изводите, 7 на брой, отразяват логически резултатите от поставените задачи.

Логични и абсолютно адекватни са формулираните препоръки:

1. Да се разшири кръгът на изследваните активно спортуващи с практикуващи различни видове спорт за установяване на референтни стойности специфични за отделни спортове.

2. Да се провежда системно индивидуално лонгитудинално проследяване на промените в стероидния профил през различни етапи от подготовката на спортистите за откриване на процеси на адаптация и дезадаптация на стероидния метаболит.

3. В бъдеще, изследването на стероидния профил да се включи като част от регулярните изследвания на спортистите и интерпретацията на получените резултати да намери приложение в контрола на тренировъчния процес при спорта за високи постижения.

Резултатите от дисертационния труд са отразени в 2 научни статии и доклад в 1 научна конференция, в които докторантката е първи автор.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Представеният ми за рецензия дисертационен труд представлява интересно и оригинално изследване, проведено за първи път в България. Г-жа Таня Шейтанова притежава задълбочени научни и теоретични знания, научна ерудиция и професионални умения по развитото от нея направление.

Процедурата отговаря напълно на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България. Убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване, представено от докторантката в настоящия дисертационен труд, автореферат и съспътстващи документи и препоръчвам на почитаемите членове на Научното жури да присъдят на Главен експерт Таня Запрянова Шейтанова образователната и научна степен "Доктор".

21.01.2021 г.

София

/Доц. Милка Милева, дф/

REVIEW

On the dissertation on the topic:

„ ANALYSIS OF THE STEROID PROFILE OF ATHLETES AND NON-ATHLETES BULGARIANS ”

of a dissertation for acquiring an educational and scientific degree "DOCTOR"

In the scientific specialty "Theory and Methodology of Sports Science",

Professional field 7.6. "Sports"

Author: Tanya Zapryanova Sheytanova – Chief Expert at the Doping Control Laboratory,
Ministry Of Youth And Sports of the Republic of Bulgaria

SCIENTIFIC SUPERVISOR: Assoc. Prof. Lubomir Petrov, PhD

REVIEWER: Assoc. Prof. Milka Mileva, Ph.D.

Departament of Virology, The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of
Sciences

Phon num: +359 979 3117;

E-mail; milkamileva@gmail.com

This review has been prepared on the basis of Order № ZP 1837 / 22.12.2020 of the Rector of NSA “Vasil Levski” according to a decision of the Faculty Council of the Faculty of Sports under Protocol №10 of 16.12.2020.

GENERAL PRESENTATION OF THE PROCEDURE AND REFERENCE TO THE APPLICANT.

The presented set of materials is in accordance with the requirements of the Terms and Conditions for obtaining the educational and scientific degree "Doctor" of the Regulations on the terms and conditions for acquiring scientific degrees in NSA "Vasil Levski" and includes all necessary documents. The dissertation was discussed and directed to the opening of a procedure for defense at a meeting of the Faculty Council of the Faculty of Sports on 16.12.2020.

Tanya Zapryanova Sheytanova is a Chief Expert in the Doping Control Laboratory, Anti-Doping Center at the Ministry of Youth and Sports of the Republic of Bulgaria. Main activities and responsibilities are development and validation of methods for analysis of prohibited substances from the SAA list.

My personal impression of Tanya Sheitanova is that she is an erudite chemist with serious knowledge and competencies in modern analytical practice, microbiology and biotechnology. Mrs. Sheytanova is a graduate of TIH "Prof. Dr. Asen Zlatarov ", Dimitrovgrad, then obtained a master's degree in organic and analytical chemistry at Sofia University "St. Kliment Ohridski". These qualifications explain the doctoral student's excellent mastery of the most modern instrumental analytical methods.

THE DISSERTATION WORK IS DEDICATED TO quantification of endogenous steroids from urine samples of non-sports, leisure and active sports women and men, which demonstrates the capabilities of the urinary steroid profile as a tool for analysis of changes in steroidogenesis associated with exercise. The scientific literature notes the importance of the steroid profile of urine in relation to the adaptation processes of active athletes, non-athletes and moderate athletes to the degree of physical activity, as well as steroid metabolic changes in the training process. Proven side effects from the use of anabolic androgenic steroids, along with performance-enhancing actions, have led to their inclusion in the WADA Prohibited List. Of great interest to sports science is the effect of exercise on steroid metabolism. The study of this issue reveals the processes of adaptation of hormonal regulation at different stages of training athletes.

Steroid profile tracking is a relatively easy non-invasive method for controlling and supporting sports training, especially for active athletes..

The research of the doctoral student was carried out using a modern and precise gas chromatographic method with MS detection /GC-MS/, validated according to the requirements of ISO 17025 and ISL and TD EAAS of WADA. The use of a validated method for the analysis of anabolic androgenic steroids ensures the receipt of reliable and reproducible results in different laboratories and allows the accumulation of a large amount of comparable data..

THE DISSERTATION is written on 175 standard pages, contains 23 tables and 13 figures.

The bibliography covers 380 literature sources, of which 207 are after 2000.

The work is structured according to the requirements and includes: Introduction - 2 pages; Literary review - 68 pages; Purpose, tasks and research methods - 7 pages; Results and

analysis - 50 pages; Conclusions, recommendations and contributions of the dissertation - 2 pages; Bibliography - 37 pages.

LITERATURE REVIEW. From the very first lines the excellent preparation of the doctoral student and the basic knowledge of the biochemistry and biosynthesis of steroid hormones and their metabolites, the mechanisms of action of androgenic and estrogenic hormones are evident. The literary reference is made extremely precisely, with extensive knowledge and detailed understanding, perfectly systematized and structured. A very good impression is made by the way the structural formulas of cholesterol, the main molecular skeletons of steroids C18, C19, C21 and C27, are presented, with the included comment on the dependence of the place and position of the substituents on their biological and pharmacological role. The doctoral student knows in detail the activation of signaling pathways and the types of receptor mechanisms of their action. Special attention is paid to the hepatic and extrahepatic enzyme systems of the cytochrome P-450 (CYP) superfamily for steroid synthesis and metabolism - localization, expression, enzyme species, type and sex specificity of isoforms, catalytic efficiency, participation in Phase 1 (reductase) and Phase 2 (synthase) of metabolic pathways.

Knowledge of the pharmacokinetics of steroid hormones in humans is a determining factor in the interpretation of the steroid profile (steroid metabolism) in urine, plasma, serum and saliva. Steroidogenesis in the female and male gonads results in specific expression of CYP isoforms with different substrate specificity. The path of metabolic transformations and transmembrane transport of androgen precursors to the moment of their excretion by the kidneys is traced in detail. The main focus of the literature review is on urinary steroid metabolism as a set of all steroids obtained in biosynthetic and metabolic pathways.

In section "1.9 Steroid profile and steroid passport of the athlete" all the advantages of the method of Donike and co-authors (1983), who adapt the endocrine methodology for the purposes of doping analysis in athletes, are convincingly and arguably pointed out. In 1992, Donike introduced the "athlete's steroid profile" indicator as the measured values of endogenous steroid concentrations and their calculated ratios in urine doping samples. Quantitative determination of endogenous steroids by GC-MS method, validated according to the requirements of ISO 17025 and ISL and TD EAAS of WADA, from urine samples, is a perfect approach for analysis of steroids by accredited anti-doping laboratories and an important condition for obtaining comparable results from analyzed in various laboratories samples used for

individual longitudinal monitoring of the steroid module from the athlete's biological passport. It is noteworthy that the doctoral student complied with the recommendations made by the internal defense. The principle of the method and Figure 12 are placed in a more appropriate place - in section 2.7 Description of the method.

IN THE WORKING HYPOTHESIS from the first option the notion of “useful information” has been replaced by a bolder wording “biomarkers of the adaptive changes” of the organism to physical activity, which will help to manage the training process. The goal is clearly and concretely defined: to make a comparative analysis of the steroid profile of non-sports, leisure and active sports women and men aged 18 to 30 years and to determine the appropriate biomarkers of adaptive changes in steroidogenesis associated with physical activity loads.

THE FORMULATED TASKS are adequate to achieve the set goal.

THE EXPERIMENTAL MATERIAL includes 573 women and men non-athletes, leisure athletes and active athletes aged 18 to 30 years.

All participants in the experiment have filled in a document for informed consent, in accordance with the directives of the European Union.

RESULTS are very well systematized in 21 tables. I believe that the set goal and the formulated tasks are precisely and exhaustively fulfilled.

DISCUSSION of the results shows excellent information and knowledge of the issue, as well as the data published in the scientific literature.

There are some minor technical inaccuracies, for example in the English abstract on page 6 the inscriptions in Figure 1 are in Bulgarian.

CONCLUSIONS, 7 in number, logically reflect the results of the tasks.

The formulated recommendations are logical and absolutely adequate:

1. To expand the range of active athletes being studied with athletes practicing different sports in order to establish sport-specific reference values.
2. To conduct systematic individual longitudinal monitoring of the steroid profile changes during different stages of athlete's preparation in order to detect steroid metabolism adaptation

and mis-adaptation processes.

3. In the future, the steroid profile study to be included as part of the regular athletes' checks and the interpretation of results so obtained to be applied in the training process controls in the relevant sport to achieve excellence.

The results of the dissertation are reflected in 2 scientific articles and a report in 1 scientific conference, in which the doctoral student is the first author.

MY CONCLUSIONS:

The dissertation presented to me for review is an interesting and original study conducted for the first time in Bulgaria. Mrs. Tanya Sheitanova has in-depth scientific and theoretical knowledge, scientific erudition and professional skills in the field developed by her.

The procedure fully meets the requirements of the Law for the development of the academic staff in the Republic of Bulgaria. I am convinced of my positive assessment of the research presented by the doctoral student in this dissertation, abstract and supporting documents and I recommend the esteemed members of the Scientific Jury to award the Chief Expert Tanya Zapryanova Sheitanova educational and scientific degree "Doctor".

21.01.2021 r.

Sofia

/Assoc. Prof. Milka Mileva, Ph.D./