

РЕЦЕНЗИЯ

от

доц. д-р Милена Георгиева Николова, доктор
Национална Спортна Академия „Васил Левски”, Катедра „Физиология и биохимия”

на дисертационния труд на Таня Запрянова Шейтанова на тема:
„Анализ на стероидния профил на спортуващи и неспортуващи българи“

за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР”
по научна специалност „Теория и методология на спортната наука”,
професионално направление 7.6 Спорт

Научен ръководител: доц. д-р Любомир Асенов Петров, доктор

Обща характеристика на дисертационния труд: Представеният дисертационен труд от Таня Запрянова Шейтанова цели да сравни стероидния профил на неспортуващи и спортуващи в различна степен млади хора и да посочи подходящи биомаркери за адаптационни промени в стероидогенезата при физическо натоварване.

Независимо от натрупания огромен опит в областта на адаптацията на организма към физически натоварвания и ролята на анаболните андрогенни стероиди (AAS) за това, както и и все по-доброто познаване от спортните специалисти на нежеланите странични ефекти, свързани с анаболната стимулация, някои спортуващи прибегват до употребата на стероидсъдържащи препарати за подпомагане на възстановяването и постигане на по-високи спортни постижения. Откриването на екзогенно приложени синтетични аналози на AAS е важно, тъй като много от тях са включени в Забранителния списък на Световната антидопингова агенция (WADA). За целта се следят промените в уринния стероиден профил в т. нар. „Биологичен паспорт на спортиста”. Информативността на данните, въведени за всеки спортист чрез неговия биологичен паспорт, трябва да бъде интерпретирана правилно, проследявана периодично и оценена експертно. Полезно е да се вземат предвид и други фактори (пол, възраст, етническа принадлежност, метаболитни особености, ензимна индукция или инхибиране, циркадни ритми и физическа активност), които могат да повлияят биосинтеза, метаболизма и екскрецията на стероидите.

Физическите натоварвания оказват влияние върху обмяната на стероидите, което се изразява в адаптация на хормоналната регулация при редовно спортуване. Познаването на маркерите за тази адаптация и тяхната достоверност, ще допринесе за използването на общовалиден метод от лабораториите за контрол на спортния статус. Представеният дисертационен труд се базира на количествено определяне на ендогенни стероиди чрез GC-MS метод, валидиран по изискванията на ISO 17025 и ISL и TD EAAS на WADA. Това е негово основно предимство. Анализът на данните от стероидния уринен профил може да даде информация за адаптацията на спортиста към физическите натоварвания и да се използва като неинвазивен метод за контрол на тренировъчния процес. Правилното планиране и контролиране на тренировката е от ключово значение за всеки един спорт. Професионалното използване на AAS маркерите ще допринесе за оптимизиране на

тренировъчния процес и за подобряване на спортните постижения. Това определя актуалността и значимостта на дисертацията.

Дисертационният труд е представен на 175 страници, структуриран е по определените изисквания - често използвани съкращения, увод, литературен обзор, цел, задачи и методи на изследване, резултати и анализ, обсъждане, изводи, препоръки и приноси, библиография. Добре е онагледен с 13 фигури и 24 таблици.

Глава първа „**Литературен обзор**” обхваща 68 страници. Считам, че той е актуален, което се допълва и от факта, че почти 1/2 от цитираната литература (380 заглавия - всичките на латиница) са публикувани през последните 20 години. Той включва съвременните познания по проблема и показва отличната осведоменост на докторанта по тематиката. В този раздел са описани изключително подробно химичната структура, биосинтеза, механизма на действие, екскрецията и т.н. на стероидните хормони. Отделени са специални глави за уринния стероиден метаболит, стероидния профил и паспорт на спортиста. Това дава статут на дисертационния труд на ценно ръководство, което ще се ползва дълго време като стандарт при тестването на спортистите и неинвазивното проследяване на динамиката и/или адаптацията на спортиста в хода на тренировъчния процес. Имам една препоръка относно някои от термините и съкращенията в литературния обзор. Докторантът, който има много опит в терминологията, борава професионално с нея, но често пропуска да обясни в началото на появяването на дадено понятие неговото значение или въведе цялото му изписване при съкращението. Това затруднява четенето и би било добре в бъдещи трудове да бъде съобразено (напр. термина „метаболит”). Като съотношение обзорната част е с превес спрямо останалата част от дисертацията, но това не намалява достоинства на дисертационния труд, а напротив я обогатява. Литературният обзор завършва с формулиране на работна хипотеза, която тематично насочва към извеждане на целта на дисертационния труд.

Вторият раздел е озаглавен „**Цел, задачи и методи на изследване**” и обхваща 7 страници. Целта е: „Да се направи анализ на стероидния профил на неспортуващи, спортуващи в свободното време и активно спортуващи мъже и жени“.

Задачите са правилно формулирани и отговарят на целта. Посочени са обект и предмет на изследването. Тук са описани изследваните лица, които са голям брой (573), от двата пола и на възраст 18-30 години. Те са разделени също така според физическата си активност - неспортуващи, спортуващи в свободното време и активно спортуващи. След валидиране според критериите на WADA, на статистическа обработка са подложени 149 проби на жени и 289 проби на мъже. Включените в изследването активно спортуващи мъже и жени са малко на брой и са само от един вид спорт. Това е обяснимо, тъй като набавянето на изследвани лица, особено такива, които имат натоварен тренировъчен график не е лесно. Но това може да бъде повод за разширяване на този труд в бъдеще.

В тази глава на дисертационния труд е описана и организацията на изследването и самата методика. Смятам, че тя е представена доста бегло. Това, вероятно е оправдано, имайки се предвид факта, че хроматографският метод се използва отдавна в редица лаборатории, стандартизиран е, както и добре познат. Изтъкнато е, че е използван GC-MS метод за количествено определяне на ендогенни стероиди в уринни проби, валидиран по

изискванията на ISO 17025 и ISL и TD EAAS на WADA, който е на разположение на акредитираните антидопингови лаборатории и позволява достоверност и сравнимост на получените резултати.

За статистическата обработка на получените резултати е приложен вариационен анализ чрез използването на специализиран софтуер за фармакологични данни Refval 4.11. и SPSS 26. Трябва да се отбележи, че при анализа на резултатите са използвани адекватни статистически методи, които са приложени правомерно. Направени са вариационен анализ на получените резултати и определяне на референтните граници на концентрациите на стероиди в урината. Проверката за нормалност на разпределението на данните е по метода на Kolmogorov-Smirnov. Разликите в медианите на получените резултати от различните изследвани групи са извършени с непараметрична ANOVA за независими извадки – метод на Kruskal-Wallis чрез post hoc тест на Bonferroni.

Трета глава е озаглавена „**Резултати и анализ**” и е представена на 50 страници от досертацията. Те са добре онагледени чрез 21 таблици. Няколко таблици (3-8) представят отстранени проби, според критериите на WADA. Това показва добрите умения на докторанта за работа с множество експериментални данни, както и познанията ѝ конкретно за валидационните параметри на метода за количествено определяне на стероиди в урина.

Представени са референтните стойности на концентрациите на AAS в урина и техни съотношения (табл. 9 и 10) за пет от групите на изследваните лица, което е полезно за ползване в спортната практика. В табл. 11-22 са дадени вариационен анализ на съотношенията между концентрациите на изследваните стероиди в урина при различните изследвани групи. Таблица 23 има обобщаващ характер като съпоставя доказаните достоверни разлики между концентрациите на AAS в урина и съотношенията между тях с непараметричния тест на Kruskal-Wallis.

Според поставената цел и задачи е направен сравнителен анализ на стероидния профил на лица, с различна степен на физическо натоварване. Главата “Резултати” завършва с обобщителната таблица. Добавянето в края на този раздел на няколко точки за интерпретация на данните би улеснило многократно възприемането на резултатите.

Разделът „**Дискусия**” е предствен на 7 страници. Дискутирани са представените референтни стойности за експерименталните групи от двата пола с различна степен на физическа активност и това, че те са еднородни популации, което несъмнено е полезно. Само групата на активно спортуващите жени е малка, за да бъдат изчислени референтни граници за субстанциите, включени в стероидния профил.

Тъй като не се откриват статистически значими разлики, за който и да е от показателите между групите на неспортуващите и спортуващите в свободното време лица и при двата пола е дискутирано, че регулярната, умерена физическа активност не оказва влияние върху стероидния профил.

Обсъждат се и доказателства за променена скорост на метаболизма на андрогените при активно спортуващите мъже и жени. Докторантката предполага, че това се дължи на вероятно намаляване на периферния и чернодробен метаболизъм на AAS. Освен това, активно спортуващите жени запазват нивото на активен андроген (тестостерон) чрез намален

периферен метаболизъм, докато при мъжете към това намаляване се добавя и понижения чернодробен метаболизъм.

При активно спортуващите лица и от двата пола се задържа периферния метаболизъм на 11-оксигенирани С19-стероиди като приспособителен механизъм за запазване на нивото на андрогените в отговор на намаляване на метаболизма им.

Таня Шейтанова обсъжда намерените статистически разлики и корелации, съпоставя ги с подобни изследвания и обосновава получените резултати, в случаи на разлика с резултатите на други автори. Тук отново личи много добрата осведоменост на докторанта по темата и умелото боравене с материя, която ѝ е добре позната. Това затвърждава убеждението ми, за добрата професионална и обща научна подготовка на Таня Шейтанова.

Проведени са голям брой изследвания, извършена е значителна по обем работа за анализ и статистическа обработка на получените резултати. На базата на това са формулирани интересни и с важна практическа насоченост изводи и приноси.

Главата **„Изводи, препоръки и приноси”** обхваща две страници. Направените 7 извода и 2 приноса напълно отговарят на обобщението на резултатите. В дисертационния труд са дадени три полезни за практиката препоръки за проследяване на стероидния профил на спортистите и по този начин за оптимизиране на тренировъчния процес чрез налагане на утвърдени стандарти в тази област. Първата препоръка беше моя забележка по отношение на бройката изследвани лица и вида спорт и се радвам, че дисертантката си дава сметка за непълността на труда в това отношение, което както отбелязах не е по нейна вина, а въпрос на организация. Това дава оптимизъм за продължаване на изследванията в областта и установяване на референтни стойности на биомаркерите от стероидния профил, специфични за отделните спортове.

Представени са две публикации във връзка с дисертационния труд, като в едната Таня Шейтанова е единствен автор, а в другата - водещ.

Авторефератът точно и ясно представя основните аспекти на дисертационния труд и е добре оформен. Забележката ми е, че е с изключително дребен шрифт и практически не се чете.

Заклучение: Дисертационният труд е написан на добър научен език и представлява важно за съвременния спорт изследване. Той несъмнено допринася към стандартизирания в световната практика подход за определяне на стероидния профил на спортуващи и неспортуващи. Посочените биомаркери като показатели за адаптационни промени в стероидогенезата при физическо натоварване могат да се използват за планиране, контролиране и оптимизиране на тренировъчния процес. Получените знания представляват интерес за специалистите, работещи в областта на спортната физиология, треньори, спортисти и др. спортни специалисти. Темата е актуална, дисертабилна, а получените изводи и приноси са с теоретичен и приложен характер. Считам, че са изпълнени всичките формални изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България и на Правилника за неговото приложение в НСА „Васил Левски”

На базата на гореизложеното давам убедено положителна оценка на дисертационния труд и предлагам на уважаемите членове на научното жури да гласуват на Таня Запрянова Шейтанова присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР” по професионално направление 7.6 Спорт.

21.01.2021 г.
гр. София

Рецензент:
/Доц. д-р Милена Георгиева Николова, доктор/

REVIEW

by

Assoc. prof. Milena Georgieva Nikolova, MD, Ph.D.

National Sports Academy "Vasil Levski", Department of Physiology and Biochemistry

of the dissertation of Tanya Zapryanova Sheitanova on the topic:
"Analysis of the steroid profile of Bulgarians, athletes and non-athletes"

for awarding an educational and scientific degree "DOCTOR"
in the scientific specialty "Theory and methodology of sports science",
professional field 7.6 Sports

Supervisor: Assoc. prof. Lyubomir Assenov Petrov, MD, Ph.D.

General characteristics of the dissertation: The presented dissertation by Tanya Zapryanova Sheitanova aims to compare the steroid profile of athletes and non-athletes and to identify appropriate biomarkers for adaptive changes in steroidogenesis during exercise.

Despite the vast experience in body adaptation to exercise and the role of anabolic androgenic steroids (AAS) in this, as well as the growing knowledge of sports professionals about the side effects associated with anabolic stimulation, some athletes resort to the use of steroid-containing substances to aid recovery and achieve higher athletic performance. The detection of exogenously administered synthetic analogues of AAS is important, since many of them are included in the World Anti-Doping Agency's (WADA) Prohibition List. For this purpose, changes in the urine steroid profile in the so-called "Athlete Biological Passport" are monitored. The informativeness of the data entered for each athlete through their biological passport must be interpreted correctly, monitored periodically and assessed expertly. It is useful to consider other factors (gender, age, ethnicity, metabolic characteristics, enzyme induction or inhibition, circadian rhythms, and physical activity) that may affect steroid biosynthesis, metabolism, and excretion.

Exercise affects the metabolism of steroids, which is expressed in the adaptation of hormonal regulation in regular exercise. Knowledge of the markers for this adaptation and their reliability will contribute to the use of a common method by the laboratories for control of sports status. The presented thesis is based on the quantification of endogenous steroids by GC-MS method, validated according to the requirements of ISO 17025 and ISL and TD EAAS of WADA. This is its main advantage. The analysis of the data from the steroid profile of the urine can provide information about the athlete's adaptation to physical activity and can be used as a non-invasive method to control the training process. Planning and control of the training process in the right way is crucial for any sport. Professional use of AAS markers will contribute to optimize the training process and improve athletic performance. This determines the relevance and significance of the thesis.

The dissertation is presented on 175 pages, structured according to the defined requirements - introduction, frequently used abbreviations, literature review, purpose, tasks and research methods, results and analysis, discussion, conclusions, recommendations and contributions, bibliography. It is well illustrated with 13 figures and 24 tables.

Chapter one "**Literature review**" covers 68 pages. I believe that it is up-to-date, which is indicated by the fact that almost 1/2 of the cited literature (380 titles - all in Latin) have been published in the last 20 years. It includes recent knowledge on the problem and shows an excellent awareness of the PhD student on the subject. This section describes in great detail the chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, excretion, etc. of steroid hormones. The urinary steroid metabolom, the steroid profile and the athlete's passport are presented in separate chapters. This gives the dissertation work the status of a valuable guide, which will be used for a long time as a standard in testing athletes and non-invasive monitoring of the dynamics and/or adaptation of the athlete during the training process. I have one recommendation on some of the terms and abbreviations used in the literature review. The doctoral student, who has a lot of experience in terminology, handles it professionally, however, often fails to explain the meaning of a concept at its first appearance or does not introduce its entire spelling before the abbreviation. This makes it difficult to read and should be considered in future works (eg the term "metabolom"). As a ratio, the review part prevails over the rest of the dissertation, however, this does not reduce the merits of the dissertation, but on the contrary - it enriches it. The literature review concludes with the formulation of a working hypothesis that thematically directed to display the purpose of the thesis.

The second section is entitled "**Purpose, tasks and methods of research**" and covers 7 pages. The aim is: "To analyze the steroid profile of non-athletes, leisure athletes and active sports men and women."

The tasks are correctly formulated and meet the goal. The object and subject of the research are indicated. Described are the subjects, who are a large number (573), of both sexes and aged 18-30 years. They are also divided according to their physical activity - non-athletes, leisure athletes and active athletes. After validation according to WADA criteria, 149 samples of women and 289 samples of men were subjected to statistical processing. The active sports men and women included in the study are few in number and are from only one sport. This is understandable, as it is not easy to get subjects, especially those who have a busy training schedule. But this may be an aspect to expand on in the future.

This chapter of the dissertation describes the organization of the research and the methodology itself. I think it is presented quite vaguely. This is probably acceptable given the fact that the chromatographic method has long been used in a number of laboratories, and thus it is standardized and well-known. It was pointed out that a GC-MS method was used for quantification of endogenous steroids in urine samples, validated according to the requirements of ISO 17025 and ISL and TD EAAS of WADA, which is available to accredited anti-doping laboratories and allows reliability and comparability of the results.

For statistical processing of the obtained results a variation analysis is applied by using specialized pharmacological data software Refval 4.11. and SPSS 26. It should be noted that in the analysis of the obtained results adequate statistical methods were used, which were applied correctly. Variation analysis of the results and determination of the reference limits of steroid

concentrations in urine were performed. The verification of the normality of the data distribution was achieved by the Kolmogorov-Smirnov method. The differences in the medians of the results obtained from the different study groups were performed with nonparametric ANOVA for independent samples - Kruskal-Wallis method by post hoc test of Bonferroni.

The third chapter is entitled "**Results and analysis**" and is presented on 50 pages of the dissertation. They are well illustrated by 21 tables. Several tables (3-8) present removed samples according to WADA criteria. This shows skillful the doctoral student is when working with a lot of experimental data, as well as her knowledge specifically for the validation parameters of the method for quantitative determination of steroids in urine.

The reference values of the concentrations of AAS in urine and their ratios (Tables 9 and 10) for five of the groups of subjects are presented, which is useful in sports practice. In tables 11-22 a variational analysis is shown of the ratios between the concentrations of the tested steroids in urine in the different study groups. Table 23 summarizes the proven significant differences between urinary AAS concentrations and their ratios with the non-parametric Kruskal-Wallis test.

According to the set goal and tasks, a comparative analysis of the steroid profile of persons with different degrees of physical activity was made. The "Results" chapter ends with a summary table. Adding a few points at the end of this section to interpret the data would make it much easier to assimilate the results.

The "**Discussion**" section is presented on 7 pages. The reference values for the experimental groups of both sexes with different degrees of physical activity and the fact that they are homogeneous populations are discussed, which is undoubtedly useful. Only the group of active sports women is too small to calculate reference limits for the substances included in the steroid profile.

As no statistically significant differences were found for either of the indicators between the groups of non-athletes and leisure athletes in both sexes, it was discussed that regular, moderate physical activity did not affect the steroid profile.

Evidence of altered androgen metabolism in active male and female athletes is also discussed. The doctoral student suggests that this is due to a possible decrease in peripheral and hepatic metabolism of AAS. In addition, active women maintain the level of active androgen (testosterone) through reduced peripheral metabolism, while in men this reduction is accompanied by reduced liver metabolism.

In active athletes of both sexes the peripheral metabolism of 11-oxygenated C19-steroids is retained as an adaptive mechanism for maintaining androgen levels in response to a decrease in their metabolism.

Tanya Sheitanova discusses the obtained statistical differences and correlations, compares them with similar studies and motivates the attained results, when difference with the results of other authors is present. The great awareness of the doctoral student on the topic and the skillful handling of a subject that is well known for her again makes an impression. This confirms my conviction for the good professional and general scientific training of Tanya Sheitanova.

A large number of studies have been conducted, a significant amount of work has been done for the analysis and statistical processing of the results. Based on this, interesting conclusions and contributions are formulated with important practical significance.

The chapter "**Conclusions, recommendations and contributions**" covers two pages. The 7 conclusions and 2 contributions fully correspond to the summary of the results. The thesis gives three useful recommendations for monitoring the steroid profile of athletes and thus for optimizing the training process by imposing established standards in this area. The first recommendation was my remark regarding the subjects by number and type of sport and I am glad that the doctoral student is aware of the incompleteness of her work in this regard, which as I noted is not her fault, but a matter of organization. This gives optimism for further research in the field and establishment of reference values of steroid-profile biomarkers specific to different sports.

Two publications in connection with the dissertation are presented, in one Tanya Sheitanova is the sole author, and in the other - the first one.

The abstract accurately and clearly presents the main aspects of the dissertation and is well outlined. My remark is that it has an extremely small font and is practically unreadable.

Conclusion: The doctoral thesis is written in good scientific language and is an important study for contemporary sport. It undoubtedly contributes to the standardizatised global practice for determining the steroid profile of athletes and non-athletes. The AAS biomarkers as indicators of adaptive changes in steroidogenesis during exercise can be used to plan, control and optimize the training process. The acquired knowledge is of interest to specialists working in the field of sports physiology, coaches, athletes and other sports specialists. The topic is of present interest, dissertable, and the obtained conclusions and contributions are of theoretical and applied nature. I believe that the scientific work has the necessary scientific value and meets the requirements of the Law for Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Rules of NSA “Vassil Levski”.

On the ground of all said above, I give a convincing positive assessment of the presented doctoral thesis and propose to the esteemed members of the scientific jury to vote in favour of Tanya Zapryanova Sheitanova, awarding her with the educational and scientific degree "DOCTOR" in the professional field 7.6 Sports.

21.01.2021
Sofia

Reviewed by:
Assoc. prof. Milena Georgieva Nikolova, MD, Ph.D.