

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора фармацевтических наук Калёкина Романа Анатольевича на диссертационную работу Евдокимовой Екатерины Алексеевны на тему «Разработка методики лабораторной диагностики интоксикаций грибами рода *Amanita*: мухомором красным (*Amanita muscaria*) и мухомором пантерным (*Amanita pantherina*)», представленную на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки)

Актуальность выполненного исследования

Повышение качества химико-токсикологических, судебно-химических исследований и в целом результатов судебно-медицинской экспертизы и клинической лабораторной диагностики является серьезной задачей аналитической токсикологии. Употребление мухомора красного (*Amanita muscaria*, *AM*) и мухомора пантерного (*Amanita pantherina*, *AP*) с целью получения галлюциногенного эффекта и их доступность становятся факторами, способствующими росту числа острых отравлений. Понятие «микродозинг» применяется производителями для обозначения факта употребления малых доз мухоморов с целью оказания так называемого «терапевтического эффекта без вреда для организма». Данная продукция представлена мухоморами в виде капсул, высушенных шляпок, экстрактов, настоек, которая до недавнего времени активно реализовывалась индивидуальными предпринимателями на российских платформах электронной коммерции, таких как «OZON», «Wildberries» и через интернет-магазины, такие как «Три мухомора», «Лесной лекарь», «Дух мухомора», «Micronization Lab.». Производители рекомендуют к употреблению данные грибы в целях повышения работоспособности, нормализации сна, улучшения когнитивных функций, однако представленная информация не несет никакого научного обоснования и не содержит ссылок на достоверные источники.

В Российской Федерации хранение, покупка и продажа *AP* и *AM* в различных видах (капсул, высушенных шляпок), экстрактов, настоек из них,

а также психоактивных компонентов в их составе, таких как иботеновая кислота и мусцимол, нормативно не регулируются, что стало причиной их рекреационного использования (то есть использования в немедицинских целях для получения удовольствия) и, как следствие, большого количества отравлений.

До настоящего времени диагноз «Острое пероральное отравление мухоморами» (Токсическое действие других ядовитых веществ, содержащихся в съеденных грибах Т62.0) устанавливался только на основании анамнеза и клинической картины. Однако нужно учитывать, что постановка диагноза становится затруднительной для пациентов, поступающих в медицинское учреждение в состоянии комы. Химико-токсикологический анализ является обязательным элементом клинко-лабораторной диагностики согласно Приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29.04.2025 г. №262н «Об утверждении порядка проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического), включающего определение клинических признаков опьянения и правила химико-токсикологических исследований».

Отсутствие стандартов и методик определения токсичных компонентов *AM* и *AP*, удовлетворяющих требованиям по валидации биоаналитических методик, вызывает существенные затруднения при получении объективных данных для постановки диагноза. Поэтому разработка частных методик и алгоритма проведения лабораторной диагностики биообъектов в случае интоксикации грибами *AM* и *AP* является актуальной темой научного исследования.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках научного направления «Разработка, изучение и стандартизация потенциально активных фармацевтических субстанций и лекарственных средств для лечения различных патологических состояний, в том числе интоксикаций и радиационных поражений» (номер государственной регистрации 124044150002-9).

Новизна исследования и полученных результатов, их достоверность

Впервые разработаны подходы к процедуре валидации биоаналитической методики для целей лабораторной диагностики при отсутствии стандартного образца целевого токсиканта. Установлено, что в соответствии с рекомендациями по валидации биоаналитических методик: ICH M10 (Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis), USP <621> (Хроматография); ОФС.1.2.1.2.0001.15 Хроматография; ЕР 2.2.46 (Хроматографические методы) валидация возможна, но требует использования альтернативных методов оценки параметров: определение пригодности хроматографической системы по показателям: разрешение ($RS \geq 1,5$), сигнал/шум (> 3), совпадение времени удерживания (отклонение $\pm 5\%$), эффективность (> 2000 для ВЭЖХ), симметрия (от 0,8 до 1,5), высота пика, эквивалентная теоретической тарелке, селективности / специфичности, интерференционный эффект матрицы и робастность.

Впервые проведено систематизированное исследование токсических компонентов капсул сырья *AM* и *AP*. Доказано, что содержание мусцимола выше в капсулах, содержащих сырье *AP*, что оказывает влияние на особенности клинической картины отравления именно данным видом мухомора, выражающееся в «пантериновом синдроме».

Впервые экспериментально доказано, что наиболее информативным объектом для лабораторной диагностики отравлений мухоморами является моча. Показано, что в крови возможно только достоверное обнаружение мусцимола. Волосы непригодны для постановки диагноза как острого, так и хронического употребления мухоморов из-за высокой гидрофильности мусцимола и иботеновой кислоты и отсутствия накопления в ткани волоса.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пункту 4. Разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-

фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Положения и выводы диссертационной работы Евдокимом Екатерины Алексеевны основываются на достаточном объеме экспериментальных данных, а достоверность полученных результатов обеспечивается применением комплекса хроматографических (модульном жидкостном хроматографе Nexera XR с тандемным масс-спектрометром LCMS-8050; газовая хроматография масс-спектрометрическим детектированием газовой хроматограф QP 2020, (Shimadzu, Япония) и использованием программного обеспечения для обработки результатов хроматографических исследований (LabSolution (Shimadzu, Япония) и Chemstation Data Analysis, AMDIS (The Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System), MassHunter Quantitative Analysis (США), библиотек масс-спектров (библиотека масс-спектров NIST17, Pmw_TOX3.1, вероятность совпадения не ниже 85 %). Полученные экспериментальные данные обработаны с использованием программного обеспечения MS Office в соответствии с требованиями ГФ РФ XV издания. Экспериментальная часть исследования выполнена на поверенном аналитическом оборудовании.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные автором результаты используются в учебный процесс ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России на фармацевтическом факультете по программе специалитета 33.05.01 «Фармация» по учебной дисциплине «Современные аспекты химико-токсикологического анализа наркотических средств, психотропных и других токсических веществ» и в программу ординатуры по специальности 33.08.03 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» по учебной дисциплине «Организация проведения химико-токсикологической экспертизы» (акт внедрения от 01.09.2025).

Результаты работы в практику работы химико-токсикологических лабораторий Государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени

И.И. Джанелидзе» (акт внедрения от 01.10.2025) и Санкт-Петербургское городское бюджетное учреждение здравоохранения «Городская наркологическая больница» (акт внедрения от 01.10.2025).

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов

Автором лично проведен поиск отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, разработаны и выполнены все стадии эксперимента на базе ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе» (СПбНИИ СП), самостоятельно проанализированы результаты исследования. Основные публикации и доклады по работе подготовлены лично автором и отражены в качестве результатов. Личный вклад автора не менее 90%.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, главы об объектах и методах исследований, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя. Изложена на 151 странице компьютерного набора, иллюстрирована 62 рисунками и 18 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (4 главы), заключения, списка литературы, включающего 123 наименования (в т.ч. 73 источника зарубежной литературы), и приложения.

Во введении диссертант обосновала актуальность выбранной темы исследования, сформулировала цель и задачи, показала научную новизну и отразила теоретическую и практическую значимость, а также представила положения, выносимые на защиту.

В главе 1 проведен обзор литературы, изложена ботаническая, химическая и токсикологическая характеристики грибов рода *Amanita*. Дано понятия «микродозинг» и обзор нормативных документов, регулирующих оборот грибов данного рода в Российской Федерации и ряда стран мира, также обзор методик обнаружения психоактивных соединений мухомора красного (*Amanita muscaria*, АМ) и мухомора пантерного (*Amanita pantherina*, АР).

В главе 2 дана характеристика материалов, методов и объектов исследования, требования по валидационной оценке биоаналитических методик в соответствии с российскими и международными требованиями.

Глава 3 посвящена разработке методики обнаружения мускарина, мусцимола и иботеновой кислоты в плодовых телах и капсулах с порошком плодовых тел *AM* и *AP*. В начале главы представлены данные по статистике отравлений данными грибами в Санкт-Петербурге и Самарской области, что подчеркивает актуальность данного исследования. Основываясь на данный по регулированию оборота грибов рода *Psilocybe*, делается обоснованный вывод о необходимости включения грибов рода *AM* и *AP* в список Постановления Правительства № 681, в частности в список наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, оборот которых в Российской Федерации запрещен в соответствии с законодательством Российской Федерации и международными договорами Российской Федерации (список I).

Разработана селективная методика обнаружения мускарина, мусцимола и иботеновой кислоты методом ВЭЖХ МС/МС и проведена ее валидационная оценка.

В главе 4 показана возможность применения разработанной методики для обнаружения мусцимола и иботеновой кислоты в биологических объектах. Делается вывод, что только анализ мочи позволяет провести обнаружения иботеновой кислоты с применением дериватизации.

На основании полученных результатов разработан алгоритм лабораторной диагностики при отравлениях *AM* и *AP* и представлен фактический материал апробации разработанного алгоритма.

В заключении обобщены основные результаты исследования.

Диссертация завершается общими выводами, списком литературы и приложениями. В приложении представлены результаты анкетирования пациентов и апробации методики в ГБУ «Научно-исследовательского института скорой помощи им. И.И. Джанелидзе», а также акты внедрения.

Автореферат отражает основное содержание диссертации.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, среди которых 1 статья в издании, включенном в международные базы Scopus и PubMed

Достоинства, недостатки по содержанию и оформлению работы, общая оценка диссертации.

Следует отметить хороший научный язык и стиль изложения результатов проведенного исследования. Объем выполненной работы и полнота представленных фактических данных не позволяют усомниться ни в достоверности полученных результатов, ни в личном вкладе диссертанта в выполнение данной работы.

При общей положительной оценке диссертационного исследования в процессе её рецензирования возникли вопросы и замечания:

1. При разработке методики ВЭЖХ МС/МС в п. 3.2.2. изучались ли разные подвижные фазы, в том числе по полярности?
2. Изучали возможность использования при пробоподготовке извлечения дополнительного этапа – очистка от соэкстрактивных веществ?
3. В диссертации представлена разработанная методика в биологических объектах моча и кровь, почему при апробации методики в разделе 4.4. апробировали только мочу?
4. В отношении каких веществ изучалась специфичность разработанной методики?
5. Какая чувствительность методик при ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС на исследуемые вещества?
6. При отсутствии количественного определения предложенных методик как можно установить, что наличие токсикантов в биологических объектах являлось причиной отравления или это были следовые количествами факта ранее употребленных грибов, без влияния на причину отравления? Изучалась Вами возможность разработки «полуколичественного» определения на исследуемые токсиканты, например, по интенсивности пиков на хроматограммах?

Недостатком работы является наличие опечаток, что, однако, не снижает её ценности.

Все высказанные замечания и вопросы носят дискуссионный характер и не снижают научную новизну и практическую значимость диссертации.

Рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования в науке и практике

Предложенные в работе подход к валидации методик в отсутствии стандартного образца целевого токсиканта и разработанный алгоритм лабораторной диагностики отравлений психоактивными компонентами мухоморов могут быть рекомендованы для дальнейшего применения судебно-химической и химико-токсикологической практике.

Заключение

В диссертации решена важная научная задача, состоящая в разработке и валидации селективных методик обнаружения в биообъектах психоактивных компонентов мухомора красного и мухомора пантерного для целей лабораторной диагностики.

Таким образом, учитывая все вышеизложенное, диссертационная работа Евдокимовой Екатерины Алексеевны на тему «Разработка методики лабораторной диагностики интоксикаций грибами рода *Amanita*: мухомором красным (*Amanita muscaria*) и мухомором пантерным (*Amanita pantherina*)» является завершённым квалификационным научным исследованием, выполненным на актуальную тему на достаточно высоком научном уровне, обладает научной новизной, теоретической 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 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 от № 101, от 18.03.2023 № 415, от 26.10.2023 № 1786, от 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 г. № 1382), предъявляемым к кандидатским

диссертациям, а ее автор, Евдокимова Екатерина Алексеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Согласен на сбор, обработку, хранение и размещение в сети «Интернет» моих персональных данных, необходимых для работы диссертационного совета 21.2.063.01.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией судебно-химических
и химико-токсикологических исследований
федерального государственного бюджетного учреждения
«Российский центр судебно-медицинской экспертизы»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
125284, Российская Федерация, г. Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13
тел.: +7 (495) 945 21-69, e-mail: mail@rc-sme.ru
доктор фармацевтических наук
(14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия)



Калёкин Роман Анатольевич

Подпись Калёкина Романа Анатольевича заверяю
Начальник отдела кадров ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России



Кухоль Татьяна Николаевна

«27» мая 2026 г.