

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Георгия Михайловича Игнатьева на диссертационную работу Шведовой Евгении Владимировны на тему: «Совершенствование иммуноферментного метода количественного определения анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh<sub>o</sub>(D)» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология»

### **Актуальность темы диссертации**

Среди иммунологически обусловленных осложнений беременности ведущее место занимает гемолитическая болезнь плода (ГБП), которая развивается вследствие резус-изоиммунизации – наличие в крови матери IgG-антител (анти-Rh (D) антител) как проявление вторичного иммунного ответа у сенсибилизованных пациенток вследствие несовместимости крови матери и плода по антигенам системы Резус. Это вызывает гемолиз резус(D)-положительных эритроцитов плода под воздействием анти-Rh(D) антител матери, проникающих в кровоток плода через плацентарный барьер, при несовместимости крови матери и плода по системе Резус. В РФ ГБП диагностируется у 0,6 % новорожденных, при этом показатели смертности остаются высокими и составляют 15-16%. Эффективных методов медикаментозной терапии резус-иммунизации и ГБП в настоящее время не существует.

На сегодняшний день препараты иммуноглобулина человека (ИГЧ) антирезус Rh<sub>o</sub>(D) являются единственными средствами для профилактики резус-конфликта матери и плода при несовместимости по антигенам (Аг) системы Резус, среди которых наиболее иммуногенным является Аг D, способный даже в минимальном количестве вызывать иммунный ответ матери и являясь причиной тяжелой гемолитической болезни плода. Фармакологическое действие лекарственных препаратов (ЛП) ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D) реализуется посредством количества анти-D антител (Ат), способного к нейтрализации D Аг эритроцитов плода, попавших в кровоток матери, выраженного в МЕ (или мкг) по отношению к Международному стандартному образцу. Клинически установлено, что 10 мкг

(50 МЕ) анти-D Ат в ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D) нейтрализует 0,5 мл резус-положительных эритроцитов плода (или 1 мл цельной крови). Таким образом, надежный метод количественной оценки содержания анти-D Ат является необходимым условием получения безопасных и эффективных ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D). Однако в нашей стране при производстве ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D), до проведенного Шведовой Е.В. исследования, содержание анти-D Ат в препаратах определяли в титрах методом непрямой гемагглютинации без использования стандартного образца, что не позволяло рассчитать адекватную дозу введения препарата, что могло стать причиной нежелательных реакций. Все это свидетельствует об актуальности работы.

Диссертационная работа Шведовой Е.В. посвящена решению задачи, имеющей научно-практическое значение, а именно: соискателем проведены экспериментальные исследования, которые позволили усовершенствовать и сделать доступным иммуноферментный метод количественного определения анти-D Ат в ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D) для внедрения в практику контрольно-аналитических лабораторий, стандартизировать метод позволил разработанный соискателем Фармакопейный стандартный образец, что обеспечивает оценку содержания анти-D Ат при производстве ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D) и позволяет установить их количественную норму в МЕ (или мкг).

### **Достоверность полученных результатов**

Достоверность результатов диссертационной работы обеспечена достаточным объемом экспериментальных исследований, базирующихся на применении иммунологических методов (конкурентного иммуноферментного и гемагглютинации в геле), оптической цифровой микроскопии и компьютерной морфометрией с визуализацией. В работе демонстрируются прецизионность полученных данных при проведении экспериментов с использованием нескольких независимых испытуемых образцов в различных условиях, что свидетельствует о надежности полученных результатов. Результаты экспериментов получены на сертифицированном, калиброванном оборудовании. Экспериментальные данные

обработаны и систематизированы с применением адекватных поставленным задачам методов описательной статистики.

### **Научная новизна диссертационной работы**

Впервые использованы эритроциты фенотипа R1R1 для приготовления иммunoсорбента, а также охарактеризованы сорбционные свойства эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 при их иммобилизации на твердой фазе. Впервые изучена взаимосвязь между сорбционными свойствами эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 при их иммобилизации на твердой фазе и количественным определением анти-D Ат в ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D) иммуноферментным методом, а также раскрыта способность D Аг фенотипа эритроцитов R1R1 к образованию иммунных комплексов в анти-D Ат. Впервые разработаны критерии иммобилизации эритроцитов указанных фенотипов в подготовленном иммunoсорбенте с применением методов оптической цифровой микроскопии и компьютерной морфометрии с визуализацией. Разработаны критерии оценки приемлемости результатов количественного определения анти-D Ат в ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D). Впервые разработан национальный Фармакопейный стандартный образец ГФ РФ для количественного определения анти-D Ат в ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D).

Новизна диссертационной работы подтверждена выдачей Патента на изобретение № 2777845 от 11.08.2022, РФ, МПК: A61K35/12,15; G01N33/53 «Способ количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh<sub>o</sub>(D)» авторов: Шведова Е.В., Кудашева Э.Ю., Лешина С.А., Давыдов Д.С.; заявитель и патентообладатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, заявка № 2021137704 от 20.12.2021.

### **Теоретическая значимость диссертационной работы**

Проведенное Шведовой Е.В. исследование позволило определить способность D Аг фенотипа эритроцитов R1R1 к образованию иммунных комплексов с анти-D Ат при их определении методом ИФА и количественно охарактеризовать особенности распределения эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 на твердой

фазе. В результате исследования предложена модель оценки качества этапа приготовления иммunoсорбента для метода ИФА. Результаты исследования свидетельствуют о том, что иммуноферментный метод, усовершенствованный способом приготовления иммunoсорбента с применением эритроцитов человека фенотипов R1R1 или R2R2 и оценкой качества его приготовления, обеспечивает воспроизводимость и точность количественного определения анти-D Ат в ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D).

Полученные данные позволили сделать вывод о том, что применение усовершенствованной методики ИФА для установления аттестуемой характеристики Фармакопейного стандартного образца в МЕ (или мкг) для определения активности ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D) обеспечивает прослеживаемость количественного определения анти-D Ат в ЛП ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D).

### **Научно-практическая значимость диссертационной работы**

Важным научно-практическим результатом исследования является разработанный диссидентом способ приготовления иммunoсорбента с использованием эритроцитов человека наиболее распространенного в российской популяции фенотипа R1R1 в дополнение к фенотипу R2R2, что обеспечивает большую доступность метода и расширяет возможности его применения.

Созданная автором модель оценки качества приготовленного с применением эритроцитов фенотипов R1R1 или R2R2 иммunoсорбента позволяет обеспечить воспроизводимость методики ИФА и точность результатов, а также сократить расход дорогостоящих реагентов и трудозатрат для проведения последующих этапов постановки метода в случае, если распределение эритроцитов в приготовленном иммunoсорбенте не соответствует критериям иммобилизации.

Применение разработанного диссидентом Фармакопейного стандартного образца обеспечивает приемственность оценки содержания анти-D Ат при производстве ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D) и позволяет установить их количественную норму в МЕ (или мкг) в препарате, что будет способствовать расчету дозы введения препарата в соответствии с клиническими рекомендациями по

специфической перинатальной профилактике резус-иммунизации женщин с резус-отрицательной принадлежностью крови.

Практическое значение результатов исследования заключается в их применении для оценки качества по показателю «Содержание антирезус Rh<sub>o</sub>(D) антител» на этапах производства и обращения ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D).

### **Основные результаты диссертационной работы**

В диссертационной работе задачи исследования сформулированы автором в полном соответствии с целью работы. Целью работы являлось совершенствование иммуноферментного метода количественного определения анти-D At в ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D). В рамках данной цели соискателем решены задачи научного анализа состояния проблемы оценки содержания анти-D At, разработан способ получения иммуносорбента с использованием наиболее распространенного в российской популяции фенотипа эритроцитов – R1R1, разработаны критерии иммобилизации эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2, позволяющие провести визуальную и количественную оценку эффективности распределения эритроцитов в приготовленном иммуносорбенте, а также проведены валидационные испытания, направленные на доказательство пригодности иммуноферментного метода для количественного определения анти-D At в ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D), а также для применения данного усовершенствованного метода при разработке Фармакопейного стандартного образца, который позволяет обеспечить стандартизацию количественного определения. На основании проведенных исследований диссертантом был разработан проект Общей Фармакопейной статьи (ОФС) «Определение антирезус Rh<sub>o</sub>(D) антител в препаратах ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D)» для последующего включения в Государственную Фармакопею Российской Федерации (ГФ РФ). По итогам диссертации сформулировано пять выводов, которые соответствуют поставленным задачам исследования. Выводы четко сформулированы и логично вытекают из результатов исследования.

### **Общая структура и содержание диссертационной работы.**

Диссертация построена по традиционной схеме, изложена на 112 страницах,

и иллюстрирована 12 рисунками, 17 таблицами и 4 приложениями. Список литературы включает 102 работы, в том числе 52 отечественных авторов и 50 зарубежных. Диссертация включает введение, четыре главы, содержащие обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований, их обсуждение, а также содержит заключение, выводы, список сокращений, список литературы и приложения.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, представлена научная новизна и практическая значимость работы. Представленные цель и задачи сформулированы корректно. Положения, выносимые на защиту, отдельно не представлены.

В литературном обзоре содержится компетентное изложение особенностей подходов к оценке содержания анти-D Ат в ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D), проведен научный анализ современного состояния проблемы оценки содержания анти-D Ат, описаны различия фенотипов эритроцитов, обоснована необходимость совершенствования иммуноферментного метода для количественного определения анти-D Ат в ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D).

В главе «Результаты» соискатель последовательно изложил этапы своих исследований, которые включали оценку возможности использования эритроцитов человека фенотипа R1R1 для приготовления иммunoсорбента, изучение особенностей иммобилизации эритроцитов человека фенотипов R1R1 и R2R2 на поверхности твердой фазы, разработку критериев иммобилизации для количественной оценки их распределения, а также валидационные исследования, направленные на доказательство пригодности усовершенствованной методики для количественного определения анти-D Ат. Далее с применением усовершенствованной валидированной методики автором был разработан национальный Фармакопейный стандартный образец, обеспечивающий стандартизацию количественного определения анти-D Ат в ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D).

В главе «Обсуждение» проводится анализ и сопоставление полученных соискателем результатов с имеющимися в мировой научно-методической

литературе данными, что позволило соискателю всесторонне оценить перспективность применения результатов проведенных исследований.

Пять выводов диссертации сформулированы четко и логично вытекают непосредственно из экспериментальных исследований, проведенных автором.

Содержание, изложение и оформление материала диссертационной работы соответствует всем установленных правилам, между разделами существует логическая взаимосвязь. Тема работы раскрыта полностью.

По теме диссертации опубликовано 8 работ в рецензируемых научных изданиях. Результаты диссертации были представлены в материалах 3 конференций, в том числе с международным участием. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

В тексте работы имеется ряд стилистических недочетов, которые не носят принципиального характера и не отражаются на общей положительной оценки диссертационной работы.

### **Заключение**

Диссертационная работа Евгении Владимировны Шведовой «Совершенствование иммуноферментного метода количественного определения анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh<sub>o</sub>(D)» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи, имеющей существенное значение для иммунологии: разработана новая методика приготовления иммуносорбента с использованием эритроцитов фенотипов R1R1 или R2R2, включающая оценку качества его приготовления, для количественного определения анти-D At в ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D) иммуноферментным методом, что позволяет повысить точность измерений с расширением границ применения метода; с применением усовершенствованной методики соискателем разработан Фар-макопейный стандартный образец количественного определения анти-D At в ИГЧ антирезус Rh<sub>o</sub>(D), позволяющий установить точное значение содержания

анти-D Ат в препарате в МЕ (или мкг), от которого зависит дозирование препарата в клинической практике.

Диссертация обладает внутренним единством, содержит новые результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты, выводы, которые свидетельствуют о личном вкладе автора в выполненную работу. По актуальности, сово-купности научных результатов, теоретической и практической значимости, объему проведенных исследований работа полностью соответствует критериям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101 предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сама автор - Евгения Владимировна Шведова заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности «2.3.7. Иммунология».

Официальный оппонент

доктор медицинских наук, профессор,

старший научный сотрудник

лаборатории молекулярной биотехнологии

Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Научно-исследовательский институт

вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

30 октября 2023 г.

Г.М. Игнатьев

105064 г. Москва, ул. Малый Казенный переулок, д. 5А,

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

тел.: +7 495 917-49-00, e-mail: <https://www.mech.inst@mail.ru>

Подпись д.м.н., профессора Г.М. Игнатьева заверяю

Начальник отдела кадров



Лукачева Елена Васильевна