

## ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию Ивановой Ольги Ярославовны «Участие канонического сигнального пути Wnt в регуляции пластичности гиппокампа, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – «Физиология»

Диссертация Ивановой О.Я. посвящена одному из актуальных вопросов нейрофизиологии, а именно, участию белков семейства Wnt в регуляции пластичности гиппокампа. В настоящее время у позвоночных описано 19 генов семейства Wnt. Белки Wnt участвуют в механизмах многих важных физиологических процессов, в том числе и процессов синаптической пластичности, а нарушения в работе каскада Wnt вносят вклад в патогенез психических и неврологических заболеваний.

Вопрос об участии белков Wnt в процессах обучения и памяти не является новым. Это участие было показано разными авторами как в поведенческих, так и в электрофизиологических экспериментах. Последние были проведены *in vitro* на срезах гиппокампа с использованием модели длительной посттетанической потенциации (LTP), которая сегодня считается клеточным аналогом обучения и памяти (Chen et al., 2006; Vargas 2015 и др.). Этими авторами было показано, что фармакологические ингибиторы или активаторы Wnt-каскада соответственно ослабляют или усиливают LTP. В то же время данные о способности Wnt белков влиять на LTP *in vivo* в литературе отсутствуют, что и явилось предпосылкой для проведения настоящей работы.

Диссертация занимает 100 страниц машинописного текста, имеет традиционную структуру, написана хорошим литературным языком, иллюстрирована 22 рисунками, не имеет опечаток. Список цитируемой литературы содержит 172 источника, 33 из которых датированы последними пятью годами. В 1-ой главе («Обзор литературы») автор полно и грамотно описывает канонический, опосредуемый  $\beta$ -катенином, и не канонический механизмы действия Wnt белков, а также участие этих белков в физиологических и патологических процессах. Вторая глава посвящена описанию методов, используемых в работе. Автор использует целый комплекс сложных методов современной нейробиологии, куда входят генетические, биохимические и электрофизиологические методики. Для воздействия на сигнальный путь Wnt крысам линии Вистар в область CA1 гиппокампа инъецировали суспензии лентивирусных конструкций (LV) со вставками специальных генов, экспрессирующих белки, подавляющие либо стимулирующие Wnt каскад. Для ингибирования Wnt каскада был выбран ген усеченного белка Wnt1, так называемый доминантно-негативный Wnt1 (dnWnt1), у которого произведена делеция карбокси-концевой части в размере 71 аминокислотного остатка и который является антагонистом

рецепторов Wnt каскада. Для стимуляции Wnt каскада был выбран ген нормального Wnt3 белка. В качестве контроля использовали лентивирусный вектор с белком GFP (LV-GFP), не несущий генов интереса. Все три вида лентивирусных конструкций были изготовлены в Институте ВНД и НФ РАН. Через 14 дней после инъекции проводили три вида исследований: иммуногистохимический анализ срезов гиппокампа в области введения вируса, электрофизиологические эксперименты *in vivo* и биохимический анализ гомогенатов гиппокампа. Результаты этих исследований изложены в 3-ей главе. С применением метода флуоресцентного иммунохимического окрашивания было показано, что как контрольная конструкция, так и конструкции, несущие гены интереса, вызывают интенсивное свечение белка GFP, что свидетельствует об эффективности лентивирусной трансдукции. Объем заражения в области CA1 гиппокампа составлял около  $1.5 \text{ мм}^3$  (рис.2). Мое замечание по этому разделу состоит в том, что на этом рисунке, а также и в тексте, представлены результаты только для контрольной лентивирусной конструкции, и не показаны результаты, полученные при работе с генами dnWnt1 и Wnt3. Остается предполагать, что существенных различий в интенсивности флуоресценции белка GFP в этих трех группах экспериментов не наблюдается. Далее представлен рисунок 3, на котором показаны результаты Вестерн блоттинга, касающиеся экспрессии белков Wnt1 и Wnt3 через 14 дней после инъекции генов dnWnt1 и Wnt3. У меня по этому рисунку возник вопрос, с которым я обратилась к автору диссертации. Почему после инъекции гена укороченного белка dnWnt1 измеряется уровень не этого белка, а полного белка Wnt1? О.Я Иванова объяснила мне, что на сегодняшний день из-за отсутствия специфических антител к укороченному белку dnWnt1 измерение уровня его иммунореактивности не представляется возможным. Измерение же уровня полного белка Wnt1 производилось с целью проверки возможного влияния активации гена dnWnt1 на экспрессию белка Wnt1. При этом получен отрицательный результат, свидетельствующий об отсутствии такого влияния. Этот ответ автора я считаю удовлетворительным, но также считаю нужным заметить, что отсутствие такого объяснения в диссертации является упущением.

В следующем разделе диссертации описаны результаты электрофизиологических экспериментов. Было обнаружено, что у крыс с повышенной экспрессией белка антагониста Wnt-каскада (dnWnt1) амплитуда LTP в поле CA1 гиппокампа понижена в течение двух часов после тетанизации, а у крыс с повышенной экспрессией белка агониста Wnt-каскада (Wnt3) амплитуда LTP, наоборот, повышена в течение одного часа после тетанизации. Возможный вклад пресинаптических механизмов в наблюдаемые изменения LTP изучали с помощью измерения коэффициента парной фасилитации

фВПСП. Анализ динамики этого коэффициента, а также его корреляции с амплитудой LTP позволил автору заключить, что нарушение сигнального пути Wnt приводит к повреждению пресинаптических функций, а усиление Wnt-каскада - к улучшению работы пресинаптического аппарата. При повышении уровня белка Wnt3 наблюдали также и усиление постсинаптического аппарата, которое выражалось в повышении уровня белка постсинаптической плотности PSD-95.

Третья серия экспериментов посвящена биохимическому анализу (методы вестерн блоттинг и иммуноферментный анализ) гомогенатов гиппокампа крыс, получавших инъекции суспензий, содержащих гены интереса. Было показано, что уровень экспрессии в цитозоле центрального белка канонического Wnt-каскада  $\beta$ -катенина изменяется в соответствии с направленностью действия генов интереса, а именно, снижается при подавлении Wnt-каскада белком dnWnt1 и повышается при активации Wnt-каскада белком Wnt3. Оверэкспрессия Wnt3 также усиливала экспрессию одного из ключевых белков Wnt-каскада Циклина D1.

Т.о. автором выполнены все поставленные задачи и впервые показано, что хроническое подавление или усиление Wnt-каскада с помощью метода лентивирусной трансдукции меняет долговременную потенциацию в гиппокампе крысы *in vivo*. Изучен вклад в механизмы этих изменений как пресинаптического, так и постсинаптического аппарата и определено изменение экспрессии ключевых белков Wnt-каскада. Полученные результаты имеют ценность как в теоретическом, так и прикладном аспектах, поскольку компоненты сигнального пути Wnt могут считаться перспективными мишенями для лекарственных препаратов при лечении неврологических и психических заболеваний.

Полученные результаты могут быть использованы во всех учреждениях, где изучают проблему синаптической пластичности, а именно в Институте ВНД и НФ РАН, на биологическом факультете МГУ им. Ломоносова, в Научном центре неврологии и др.

Диссертация соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, а автор диссертации Иванова О.Я. достойна присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности «Физиология».

Официальный оппонент:

Солнцева Е.И., докт.биол. наук, вед.научн сотр ФГБНУ ИЦН,  
105064 Москва, пер.Обуха, 5; Тел.:+79096427758; e-mail: synaptology@mail.ru

Подпись внс Е.И.Солнцевой заверяю.

Ученый секретарь ФГБНУ ИЦН к.м.н. А.Н.Евдокименко

