

О Т З Ы В
официального оппонента
на диссертационную работу
Ивановой Ольги Ярославовны
«Участие канонического сигнального пути Wnt в регуляции пластичности
гиппокампа»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.03.01 – «Физиология»

Актуальность диссертационной работы

Сигнальный путь Wnt (СП Wnt) в последние годы интенсивно изучается многими лабораториями мира, поскольку он активно участвует в разнообразных процессах в развивающемся и взрослом мозге, а нарушения в его работе приводит к возникновению неврологических и нейродегенеративных заболеваний. Несмотря на это, участие СП Wnt в процессах пластичности, лежащих в основе многих когнитивных функций мозга, изучено недостаточно. В частности, роль канонического СП Wnt в механизмах долговременной потенциации (ДП), являющейся основной моделью для изучения синаптической пластичности в мозге, выяснялась лишь в экспериментах *in vitro* на срезах гиппокампа. Очевидно, что для полного понимания значения СП Wnt для пластических перестроек, необходимо изучение этого сигнального пути на уровне целого мозга. Отсюда понятна актуальность представленной работы, проведенной в условиях *in vivo*.

Основные научные результаты, их новизна

В опытах, проведенных на целом мозге, впервые продемонстрировано влияние хронического подавления и усиления канонического СП Wnt на синаптическую пластичность в гиппокампе. Исследование проведено на анестезированных крысах при использовании метода лентивирусной трансдукции. Данный метод обеспечивал хронические локальные изменения СП Wnt при минимальном оперативном вмешательстве, что, несомненно, является большим достоинством работы. Для исследования роли СП Wnt в регуляции синаптической пластичности были использованы три лентивирусных конструкции: LV-dnWnt1 для подавления каскада, LV-Wnt3 для его усиления, и LV-GFP, контрольная, не несущая гена интереса. Все генно-инженерные конструкции содержали ген зеленого флуоресцентного белка GFP. В работе, кроме электрофизиологического

метода отведения фокальных возбуждающих постсинаптических потенциалов для оценки ДП, также применялся биохимический анализ гомогенатов гиппокампа для выявления влияния лентивирусной трансдукции на ключевые компоненты каскада Wnt. Использован метод иммунохимического окрашивания антителами к GFP-области для визуализации трансдуцированных клеток, показавший, что в экспериментах автору удалось добиться заражения в объеме 1.5 мм³. Таким образом, методический уровень проведенной работы чрезвычайно высок; он не уступает мировому уровню работ подобного плана.

В диссертационной работе убедительно продемонстрировано, что хроническое подавление СП Wnt вызывало нарушение экспрессии ДП через 14 дней после инъекции лентивирусной суспензии, в то время как оверэкспрессия Wnt3 сопровождалась повышением выраженности ДП. Оба эффекта затрагивали только раннюю фазу ДП и практически не влияли на ее поддержание. Последний факт не согласуется с результатами более ранних работ (Chen et al., 2006; Vargas et al., 2014), что, по-видимому, объясняется использованием разных экспериментальных подходов.

В работе Ольги Ярославовны Ивановой показано, что уменьшение ДП при хроническом подавлении СП Wnt сопровождается нарушением облегчения при парной стимуляции, т.е. нарушением работы пресинаптического аппарата. В то же время усилению ДП при оверэкспрессии Wnt3 способствуют постсинаптические перестройки, в частности, повышение уровня экспрессии белка постсинаптической плотности PSD-95.

Впервые детально проанализировано влияние лентивирусной трансдукции на ключевые компоненты СП Wnt. Подавление каскада Wnt приводило к снижению уровней β -катенина и фосфо-GSK-3 β . При усилении СП Wnt выявлено не только возрастание уровня экспрессии белка PSD-95, но и возрастание уровней протеинов β -катенина и циклина B1, а также снижение уровня фосфо-GSK-3 β и повышение GSK-3 β киназной активности. Все эти факты вскрывают механизмы участия каскада Wnt в синаптической пластичности.

Значимость для науки и практики

Данное исследование позволило на новом уровне оценить механизмы и роль

участия сигнального пути Wnt в механизмах синаптической пластичности. Проведенное на целом мозге изучение воздействия сигнального пути Wnt на синаптическую пластичность важно и с точки зрения практического применения. То, что белки семейства Wnt и компоненты каскада являются предполагаемыми мишенями для лечения неврологических и нейродегенеративных заболеваний, дает основание прийти к выводу, что подход, позволяющий хронически изменить их экспрессию в определенной структуре мозга, представляет несомненный интерес для клинических исследований.

Полученные результаты могут быть использованы при чтении лекций в средних специальных (медицинских) и высших учебных заведениях, а также при разработке новых подходов при терапии нейродегенеративных заболеваний. Работу следует продолжить в Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН и лабораториях ведущих научных центров России.

Общие замечания

Серьезных недостатков в диссертационной работе не обнаружено, однако есть некоторые замечания и комментарии.

1. Для большей убедительности результатов работы интересно было бы проверить роль участия сигнального пути Wnt в механизмах синаптической пластичности на другой системе связи в гиппокампе, с несколько иными механизмами LTP: зубчатая фасция – поле CA3 гиппокампа. LTP в синапсах мшистых волокон на пирамидных нейронах поля CA3 имеет ряд особенностей, в частности, она почти не зависит от постсинаптических NMDA рецепторов, а ключевую роль в развитии пластичности играют пресинаптические механизмы, связанные с открытием кальциевых каналов и запуском каскада цАМФ. Такое сравнительное исследование дало бы дополнительные факты, показывающие универсальность участия сигнального пути Wnt в механизмах синаптической пластичности в гиппокампе.

2. Работа проведена на аутбредных крысах Wistar. Хотя они являются стандартизованными лабораторными животными (генетически контролируемой закрытой колонией), они не относятся к *линейным* крысам, как их характеризует автор.

3. В Результатах и Заключение автор ссылается на свою опубликованную в 2016 г статью в журнале "Cellular Molecular Neurobiology". Такая ссылка не вполне корректна, поскольку результаты этой статьи включены в диссертацию.

Заключение

Диссертация представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу на актуальную тему. Литературный обзор и Обсуждение включают необходимые сведения, касающиеся работы, и дают достаточно детальный сравнительный анализ полученных результатов. Полученные в работе данные вносят вклад как в понимание механизмов синаптической пластичности в гиппокампе нормального мозга, так и их нарушений при подавлении сигнального пути Wnt. Выводы достаточно обоснованы.

Работа соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, а ее автор заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата наук по специальности 03.03.01 – «Физиология».

Зав. лаб. Системной организации нейронов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН,

д.б.н., специальность «03.00.15 Физиология человека и животных»

М7 - /В.Ф. Кичигина/

Подпись В.Ф. Кичигиной. Достоверно



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук. 142290, Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, 3, ИТЭБ РАН.