

УТВЕРЖДАЮ
Проректор – начальник
Управления научной политики
и организации научных исследований

МГУ имени М.В.Ломоносова,
А.А.Федянин



« 7 » *Janp* 2017 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию 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

Диссертационная работа Ольги Ярославовны Ивановой посвящена изучению модуляции сигнального пути Wnt в ее влиянии на синаптическую передачу в гиппокампе, т.е. на синаптическую пластичность в этом отделе мозга. Данное направление находится в фокусе интересов специалистов-неврологов, исследующих функции и взаимодействия нервных сетей, молекулярно-биологических основ пластичности, развития ЦНС, а также исследователей, анализирующих процессы патологии мозга на экспериментальных моделях.

Актуальность исследования. Нарушения внутриклеточного сигнального пути Wnt обнаруживают при патологических состояниях мозга человека (болезнь Альцгеймера, большое депрессивное расстройство и др.). Эти факты заставляют подробно исследовать возможность усиления или

ослабления эффективности данного сигнального пути в эксперименте на модели синаптической пластичности гиппокампа. Это означает, что исследование этих процессов в рассматриваемой диссертации О.Я. Ивановой весьма актуально.

Структура и содержание работы. Диссертационная работа Ивановой О.Я. построена по традиционному плану, изложена на 100 страницах текста и состоит из следующих разделов: Введение (с. 7-11), Обзор литературы (с. 12-28), Методы исследования (с. 29-38), Результаты исследования (с. 39-69), Обсуждение результатов (с. 70-79), Заключение (с. 80-81), Выводы (с. 82) и Список литературы (с. 84-100). Работа иллюстрирована 3 таблицами и 22 рисунками.

Во Введении дается обоснование актуальности работы, сформулированы цель и задачи исследования, описаны новизна и значимость полученных результатов, а также сформулированы положения, выносимые на защиту.

Основной целью работы О.Я. Ивановой было исследовать синаптическую пластичность гиппокампа при внесении изменений в функционирование Wnt сигнального пути на примере процессов длительной постсинаптической потенциации. Такая формулировка цели исследования позволила сформулировать такие конкретные задачи исследования, как разработка экспериментальных приемов усиления и ослабления синаптических процессов в поле CA1 гиппокампа крысы путем лентивирусной трансдукции. Для решения такой задачи было использовано «прицельное» подавление и/или усиление активности этого сигнального каскада путем введения животным *in vivo* специальных генно-инженерных конструкций (Wnt-1 или Wnt-3) с последующей оценкой эффектов этого воздействия на показатели долговременной посттетанической потенциации. Отдельной, достаточно большой по объему задачей было исследование внутриклеточных молекулярных механизмов, лежащих в основе влияния сигнального пути Wnt на синаптическую пластичность.

Обзор литературы (172 источников) содержит сведения о роли Wnt сигнального пути у животных разного уровня организации. Экспрессия генов семейства Wnt отмечается на разных стадиях развития в различных клетках ЦНС, а механизмы воздействия Wnt на клетку подразделяются на канонические и неканонические. Хорошо изученный канонический путь или путь Wnt/ β -катенин связан с контролем стабильности β -катенина, участвующего в развитии и дифференцировке, а также канцерогенезе. Описываются также функции основных подсемейств Wnt-каскада и рецепторов, участвующих в этих процессах, в частности, связанных с G-белками (Wnt/ Ca^{2+}). Описание роли сигнального пути Wnt в реализации поведения, точнее в процессах обучения и памяти, реально показывает тот практически важный аспект проблемы, который связан с ролью этих процессов в нейродегенеративных заболеваниях мозга человека. Очевидно, что накопленные знания по влиянию белков Wnt сигнального пути на внутриклеточные процессы, в частности, их роль в пре- и постсинаптических процессах, представляются очень важными.

В главе «Методы исследования» подробно описаны подготовка и проведение экспериментов, создание лентивирусных конструкций, методика электрофизиологического эксперимента с регистрацией фокальных ВПСП (фВПСП) поля CA1 дорзального гиппокампа у наркотизированных животных. Особенно подробно описаны использованные в работе методы биохимического анализа, оценка распространения лентивирусных конструкций по структурам гиппокампа, использованные методы обработки и статистической оценки полученных результатов экспериментов полностью адекватны.

Глава «Результаты исследований» состоит из трех частей. В первой части представлены данные об оценке размеров области мозга, в пределах которой распространялась введенная лентивирусная конструкция. Область эффективного «заражения» гиппокампа после лентивирусной трансдукции определяли методом флуоресцентного иммунохимического окрашивания, а

результаты этого анализа представлены на рис. 2. На рис. 3 представлены данные, убедительно показывающие подавление и усиление каскада Wnt под влиянием использованных в работе лентивирусных конструкций, соответственно LV-dnWnt1 и LV-Wnt3.

В разделах 3.2 и 3.3 (рис. 4–14) представлены данные о влиянии хронического подавления и усиления элементов сигнального пути Wnt на потенциацию эффективности синаптической передачи в синапсах коллатералей Шаффера на нейронах поля CA1 гиппокампа. Ее оценивали по изменению амплитуды фВПСП. В частности, показано подавление длительной потенциации и парной фасилитации фВПСП при снижении активности сигнального пути Wnt и кратковременное усиление фВПСП в начале процесса развития длительной потенциации под влиянием хронического усиления экспрессии конструкции Wnt3.

В разделах 3.4 и 3.5 (рис. 15–21) представлены результаты биохимического анализа постсинаптических изменений в гомогенатах гиппокампа при хроническом подавлении и усилении элементов сигнального пути Wnt. Здесь, в частности, показано двунаправленное изменение уровня важного для функции ЦНС белка - β -катенина, т.е. его повышение или снижение в соответствии с усилением или подавлением функции сигнального пути Wnt.

Диссертация завершается главой «Обсуждение» полученных результатов, Заключение (с обобщающим рисунком 22) и Выводами, в которых подводятся итог проделанной работы.

Содержание диссертации соответствует указанной специальности – 03.03.01 – физиология.

Содержание автореферата соответствует содержанию и выводам диссертации.

Необходимо отметить стройность и цельность представленной работы, логичное и понятное изложение полученных данных, подробное и убедительное обоснование сделанных в работе выводов.

Обоснованность, достоверность основных результатов и выводов.

В диссертационной работе Ивановой О.Я. применялись адекватные электрофизиологические и биохимические методики, результаты корректно обработаны статистически. Достоверность полученных различий позволила автору сделать обоснованные выводы.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах. По теме диссертации автором опубликованы 2 статьи в рецензируемых, рекомендованных ВАК, журналах (Журнал высшей нервной деятельности им. И.П.Павлова, 2015; Cellular and Molecular Neurobiology, 2016), и 5 тезисов докладов. Материалы диссертации доложены на всероссийских и международных конференциях.

Научная новизна полученных результатов и выводов. В работе продемонстрировано двунаправленное влияние хронического подавления и усиления сигнального пути Wnt на величину потенциации фВПСП в процессе развития длительной потенциации синаптической передачи, а также на уровень β -катенина в гиппокампе. Ослабление длительной потенциации под влиянием хронического подавления сигнального пути Wnt коррелировало с угнетением парной фасилитации фВПСП. Получены также данные о влиянии лентивирусной трансдукции на постсинаптическую клеточную экспрессию ряда ключевых компонентов каскада Wnt.

Научно-практическая значимость полученных результатов и выводов. Полученные результаты и выводы расширяют современные представления о молекулярных механизмах функционирования сигнального пути Wnt в нейронах гиппокампа. С учетом того, что сигнальный путь Wnt участвует и в процессах развития, и в регуляции нейрогенеза (в частности, в гиппокампе), а его нарушения отмечены при целом ряде заболеваний мозга человека (в частности, при болезни Альцгеймера), полученные результаты имеют и практическую значимость. Они могут указывать на молекулярные мишени для разработки методов коррекции патологических процессов в ЦНС. Используемый автором метод локальной лентивирусной трансдукции может

стать инструментом для целенаправленного изменения экспрессии белков каскада Wnt.

Обсуждение результатов и замечания по работе. В целом, диссертационная работа Ивановой О.Я. заслуживает высокой оценки.

Однако следует отметить и некоторые недостатки диссертации, не влияющие, впрочем, на общую высокую оценку работы. Значительная часть экспериментальной работы посвящена изучению влияния изменений в каскаде Wnt на функциональную синаптическую пластичность (11 из 18 рисунков в разделе Результаты), вместе с тем в Обзоре литературы соответствующий раздел освещен скупо, т.е. недостаточно подробно (около 2 страниц в разделе 1.5 из 17 страниц Обзора). Автор упоминает только о длительной потенциации синаптической передачи, не затрагивая вопросов длительной депрессии в рамках общего механизма двунаправленной синаптической пластичности и гомеостатической пластичности, которые также находятся под влиянием сигнального пути Wnt (см. напр. Marzo et al. Reversal of synapse degeneration by restoring wnt signaling in the adult hippocampus. *Current Biology*, 2016, 26: 2551–2561; Jang, Chung. Emerging link between Alzheimer's disease and homeostatic synaptic plasticity. *Neural Plasticity*, 2016). В контексте проблемы гомеостатической пластичности в гиппокампе заслуживал внимания и феномен «депривационной потенциации», одним из первооткрывателей которой, получившим существенные результаты, является сотрудник лаборатории нейрофизиологии обучения ФГБУН «Институт ВНД и НФ» В.А. Попов (Попов. Пре- и постсинаптический механизмы депривационной потенциации популяционных ответов нейронов поля CA1 гиппокампа крыс. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2016, 66(2): 209-219), а также близкая по проявлению, но, возможно, не по механизму, кетаминная потенциация (Nosyreva et al. Acute suppression of spontaneous neurotransmission drives synaptic potentiation. *The J. Neurosci.*, 2013. 33(16): 6990–7002).

В работе также не учитывались изменения плотности синаптических связей и, соответственно, величины ВПСП под влиянием изменения экспрессии элементов сигнального пути Wnt (см. например, рис. 2 в статье Marzo et al. *Current Biology*, 2016, 26: 2551–2561). Этим можно было бы объяснить наблюдавшиеся эффекты изменения потенциации без привлечения механизмов синаптической пластичности.

Высказанные замечания носят в основном уточняющий и дискуссионный характер и не умаляют высокой оценки методических подходов и содержания рассматриваемой работы и полученных в ней результатов.

Рекомендации по использованию результатов диссертации.

Результаты, полученные в ходе выполнения работы Ивановой О.Я., могут найти применение в соответствующих исследованиях в институтах физиологического профиля, в частности, в ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН», на кафедре физиологии человека и животных МГУ им. М.В. Ломоносова, в ФГБНУ «Научный центр неврологии».

Перспективными направлениями дальнейших исследований с использованием представленных в диссертации методов и результатов представляется изучение возможности коррекции нарушений синаптической пластичности под влиянием β -амилоидов путем воздействия на элементы сигнального пути Wnt; нейрофизиологическое изучение постсинаптической составляющей - E-C потенциации, популяционного спайка при данном уровне фВПСП; исследование влияния сигнального пути Wnt на длительную депрессию и гомеостатические свойства синаптической передачи, в частности, взаимодействие сигнального пути Wnt с нейронным механизмом депривационной потенциации В.А. Попова, изучаемой в лаборатории нейрофизиологии обучения ФГБУН «Институт ВНД и нейрофизиологии», и/или кетаминовой потенциации.

Заключение. Таким образом, диссертация Ивановой Ольги Ярославовны «Участие канонического сигнального пути Wnt в регуляции пластичности гиппокампа», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология, по актуальности, методическому уровню, научной новизне, теоретической и практической значимости соответствует требованиям ВАК Министерства образования и науки РФ (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24.09.2013 года № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, и ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01. – физиология.

Отзыв на диссертационную работу обсужден и утвержден на заседании кафедры высшей нервной деятельности Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 12 апреля 2017 года, протокол № 4.

Ведущий научный сотрудник
кафедры высшей нервной деятельности
Биологического факультета МГУ,
кандидат биологических наук



В.И. Майоров

Заведующий кафедрой высшей нервной деятельности
Биологического факультета МГУ,
доктор биологических наук, профессор



А.В. Латанов

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Биологический факультет. Адрес: 119234, Россия, г. Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 12. Телефон: 8-495-939-28-37
Адрес электронной почты: info@neurobiology.ru

