

РИППА АЛЕКСАНДРА ЛЕОНИДОВНА

**МОРФОГЕНЕЗ КОЖИ И ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ
МУТАНТНЫХ МЫШЕЙ *WE/WE* *WAL/WAL*
С ПОСТНАТАЛЬНОЙ АЛОПЕЦИЕЙ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва–2015

Работа выполнена в лаборатории проблем клеточной пролиферации
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт
биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук
Воротеляк Екатерина Андреевна
ФГБУН Институт биологии развития имени
Н.К. Кольцова РАН, ведущий научный
сотрудник

Официальные оппоненты: кандидат биологических наук
Пантелеев Андрей Александрович
НИЦ «Курчатовский Институт», Центр
НБИКС Технологий, начальник отдела
«Тканевой Инженерии», начальник
лаборатории «Регенеративной
биомедицины»

доктор биологических наук, профессор
Егоров Егор Евгеньевич
ФГБУН Институт молекулярной биологии
имени В.А. Энгельгардта РАН, ведущий
научный сотрудник лаборатории клеточных
основ развития злокачественных
заболеваний

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Научно-исследовательский
институт морфологии человека» РАН

Защита состоится 17 февраля 2015 г. в 15:30 на заседании диссертационного
совета Д 501.001.52 при Московском государственном университете имени
М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12,
биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Научной библиотеке
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и на
сайте <http://www.bio.msu.ru/dissertations/view.php?ID=661>

Автореферат разослан « » _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е.Н. Калистратова

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЖ – балдж, область локализации стволовых клеток волосяного фолликула; БСА – бычий сывороточный альбумин; ВФ – волосяной фолликул; ДК – дермальный конденсат; ДП – дермальная папилла; К – кератин; ПФА – параформальдегид; СК – стволовая клетка; ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка; AP – щелочная фосфатаза (alkaline phosphatase); BrdU – бромдезоксимуридин (bromodeoxyuridine); DAB – 3,3'-диаминобензидин (3,3'-diaminobenzidine); DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндола (4',6-diamidino-2-phenylindole); DPBS – фосфатно-солевой буфер в модификации Дюльбекко (Dulbecco's phosphate-buffered saline); Е – день эмбрионального развития (embryonic day); EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота (ethylenediaminetetraacetic acid); Р – день постнатального развития (postnatal day); SEM – стандартная ошибка среднего арифметического (standard error of mean).

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Биология кожи и ее придатков интенсивно изучается уже многие годы. Эти исследования дали обширные и интересные результаты, раскрывающие механизмы многих процессов, имеющих общебиологическое значение. Среди них регуляция клеточной пролиферации и дифференцировки, стволовые клетки (СК) и их ниши, поддержание «стволового» статуса и выход из ниши, эпителио-мезенхимные взаимодействия, морфогенез и регенерация (Blanpain, Fuchs, 2009; Sennett, Rendl, 2012; Kulukian, Fuchs, 2013; Vorotelyak et al., 2013). Исследования в этой области имеют также и несомненный практический интерес: известно несколько сот заболеваний кожи, волос и кожных желез (Shimomura, Christiano, 2010; Shimomura 2012).

В «науке о коже» (Investigative Dermatology) особо выделяется область, связанная с биологией волосяного фолликула (ВФ). Этот небольшого размера орган, способный к органотипической регенерации, представляет собой значимую модель для биологии развития, клеточной биологии, а в последнее время и для исследований в области эпигенетики (Botchkarev et al., 2012; Mardaryev et al., 2014). Кроме того, все большее распространение в популяции человека приобретают патологии волос, а в развитых странах растет спрос на их излечение. Среди этих патологий наибольшее социальное значение имеет алопеция – облысение.

Одним из подходов к исследованию механизмов облысения и других патологий кожи является использование модельных лабораторных животных. Наследственные заболевания волос у человека были описаны во многом благодаря изучению мышинных моделей с аналогичными заболеваниями. Накопленные данные отчетливо демонстрируют, что характер роста волос у

людей и у мышей имеет большое сходство (Blume-Peytavi et al., 2008). В частности, в подробностях был изучен морфогенез ВФ в эмбриональном развитии мыши, механизмы, реализующиеся на разных стадиях этого процесса и белки-маркеры, экспрессирующиеся в это время (Schmidt-Ullrich, Paus, 2005; Schneider et al., 2009; Sennett, Rendl, 2012). Поскольку механизмы, отвечающие за развитие фолликула в эмбриогенезе и в цикле постнатальной регенерации, весьма сходны, следует ожидать, что у животных, страдающих алопецией, с высокой вероятностью можно обнаружить аномалии морфогенеза ВФ в эмбриогенезе. По нашему мнению, характеристика эмбрионального развития кожи позволяет наиболее точно сформулировать причины врожденной алопеции и пополнить представления о причинах других типов алопеции.

Цель исследования: сравнительное изучение особенностей постнатального гомеостаза, эмбрионального развития кожи и волосяных фолликулов (ВФ) мутантных мышей генотипа *we/we wal/wal*.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Охарактеризовать структуру шерстного покрова у мутантов *we/we wal/wal* в сравнении с контролем C57Bl/6 и выявить стволовые клетки ВФ у взрослых особей.
2. Проанализировать формирование нового шерстного покрова после депиляции волос первой генерации.
3. Сравнить темпы и стадии заживления кожной раны у взрослых особей.
4. Исследовать паттерн распределения и размеры ВФ в эпидермисе у эмбрионов на стадии E18.5.
5. Охарактеризовать профиль экспрессии маркеров эпителиального и мезенхимного компонента ВФ у эмбрионов на стадии E18.5.
6. Охарактеризовать профиль экспрессии маркеров стратифицированного эпидермиса у эмбрионов на стадии E18.5.
7. Исследовать пролиферацию и дифференциацию первичных эмбриональных кератиноцитов *in vitro*.

Научная новизна работы

Впервые проанализированы особенности эмбрионального развития кожи и ее придатков мутантных мышей *we/we wal/wal*. У мутантных эмбрионов обнаружена значительная задержка формирования ВФ. Выявлено нарушение дифференциации клеток, образующих стержень волоса у мутантов, как в эмбриогенезе, так и постнатально. У мутантных эмбрионов обнаружены нарушения формирования дермального компонента ВФ. Впервые показано отсутствие инвагинации и аномалии плакод ВФ мутантных мышей *we/we wal/wal*. Подобное отсутствие инвагинации плакод в литературе описано только для двух других линий мышей (Yi et al., 2006; Zhang et al., 2011). В эмбриональной коже мутантных мышей *we/we wal/wal* наблюдается дисбаланс обмена сигналами между эпидермисом и дермой, что поднимает ключевые вопросы очередности этапов инструктирования двух компартментов кожи (эпителиального и мезенхимного) при образовании ВФ. Впервые изучена локализация СК ВФ у постнатальных мутантов *we/we wal/wal* с алопецией.

Практическая и теоретическая значимость

В ходе исследования был разработан новый метод изучения эпидермиса с помощью световой микроскопии. Мы впервые применили тотальный препарат эмбрионального эпидермиса спины мыши для изучения и характеристики паттерна ВФ. Данный подход может использоваться для изучения морфометрических параметров ВФ и у других мутантных (трансгенных) мышей с аномальным фенотипом волос и дефектами кожи. Разработанная методика позволяет оценить количество зачатков ВФ уже в эмбриогенезе и выявить аномалии структуры фолликулов, если таковые имеются.

Мы показали, что причины, ведущие к развитию наследственной алопеции, проявляются еще в период эмбриогенеза при закладке кожи. Это может иметь значение для ранней диагностики, лечения, а также изучения механизмов фенотипического проявления подобных заболеваний. Результаты работы могут быть также использованы для разработки тканеинженерных конструкций для лечения алопеции.

Результаты исследования могут быть использованы для изучения механизмов спецификации клеток дермального компонента и индукции формирования ВФ.

Комплексный подход к изучению морфогенеза ВФ, примененный в настоящем исследовании может быть использован специалистами в области кожи в качестве методического пособия. Результаты нашей работы могут быть использованы в курсе лекций по биологии развития и клеточной биологии. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование мутантных мышей *we/we* *wal/wal* для молекулярно-генетических и эмбриологических исследований.

Апробация диссертации

Результаты диссертационной работы были представлены на: VIII Международной конференции «Молекулярная генетика соматических клеток» (Звенигород, 2011); Конференции молодых ученых ИБР РАН (Москва, 2012); III съезде общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2012); Конференции «Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии» (Москва, 2012); XIX и XX Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2012, 2013); Всероссийской конференции с международным участием «Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция» к 135-летию со дня рождения П.П. Иванова (Санкт-Петербург, 2013); Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2014).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них статей в журналах, соответствующих Перечню ВАК – 3, тезисов докладов и материалов конференций – 8.

Личное участие автора

Работа выполнена непосредственно автором. Автором был проведен анализ научной литературы и всех полученных данных. Выводы сделаны на основании собственных оригинальных результатов. Соавторы указаны в соответствующих публикациях.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 143 страницах, содержит 48 рисунков и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 371 цитируемый источник.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. В работе использовали мышей линии C57BL/6, полученных из питомника лабораторных животных «Пушино» и мутантных мышей *we/we^o wal/wal*, полученных из вивария Института общей генетики РАН. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде. Все процедуры были проведены согласно правилам, установленным комиссией по биоэтике ИБР РАН. При работе с животными руководствовались приказом Минздрава РФ №267 от 19.06.2003 г.

Забор материала. Эмбриональную кожу спины заключали в среду ОСТ (Tissue-Tek) и замораживали в жидком азоте.

Иммуногистохимическое исследование. Образцы фиксировали 4% ПФА (криосрезы ткани толщиной 5 мкм в течение 10 мин, культуру клеток в течение 30 мин при комнатной температуре). Промывали DPBS и инкубировали с первыми антителами в блокирующем растворе, содержащем DPBS, 5% БСА (ХИММЕД), 0,1% Triton X-100 (AppliChem), в течение 1 ч при +37°C или 12 ч при +4°C во влажной камере. После этого промывали DPBS. Затем образцы инкубировали со вторыми антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 546 (Molecular Probes) при комнатной температуре в течение 1 ч в темноте. Ядра клеток докрашивали DAPI (Vector Laboratories) или TOTO-3 (Molecular Probes).

Для визуализации антигена с помощью световой микроскопии применяли вторые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена и DAB субстрат пероксидазы (Vector Laboratories).

В качестве контроля использовали окраску без первых антител.

Выявление активности щелочной фосфатазы (AP). Экспрессию AP детектировали с помощью субстрата BCIP. Для этого фиксированные в течение 10 мин в 4% ПФА препараты промывали DPBS, инкубировали в растворе NBT/BCIP (Roche) 20 мин при комнатной температуре в темноте и промывали дистиллированной водой.

Тотальный препарат эмбрионального эпидермиса. Кожу с дорсальной стороны эмбрионов мыши промывали раствором Хенкса (ПанЭко), далее инкубировали в 0,05 % растворе диспазы (GIBCO) в среде DMEM (ПанЭко) в течение 12-14 ч при +4°C. Отделяли эпидермис, фиксировали 4% ПФА в

течение 30 мин, затем промывали DPBS (ПанЭко). Далее препараты подвергали инкубации в растворе детергентов 0,1% TRITON X-100 (AppliChem), 0,1% TWEEN 20 (AppliChem) в DPBS в течение 30 мин и иммуногистохимическому исследованию.

Для световой микроскопии эпидермис фиксировали 2% раствором глутаральдегида (Sigma) в DPBS 30 мин. Далее промывали DPBS и фиксировали 1% OsO₄ (Sigma) 45 мин при комнатной температуре. Вновь промывали DPBS, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и высушивали на воздухе.

Тотальный препарат постнатального эпидермиса хвоста. Кожу с хвоста разрезали на кусочки размером 0,5х0,5 см² и инкубировали в растворе 0,2% диспазы в течение 12-18 ч при +4°C. Пинцетом снимали эпидермис и фиксировали 4% ПФА 2 ч при комнатной температуре, далее промывали DPBS.

Культивирование первичных эмбриональных базальных кератиноцитов мыши. Кожу эмбрионов промывали раствором Хенкса с гентамицином и инкубировали в растворе 0,05% диспазы, как описано выше. Пинцетом отделяли эпидермис, помещали в раствор 0,25% трипсина (GIBCO) и DPBS в соотношении 1:1, инкубировали при +37°C в течение 7-10 мин. Действие трипсина ингибировали добавлением 5% ЭТС (GIBCO). Пипетированием получали суспензию клеток. Клетки осаждали центрифугированием при 1000 об/мин (200g) 5 мин. Осадок ресуспендировали в среде SnT-07 (CELLnTEC) с низким содержанием ионов кальция 0,07мМ Ca²⁺ и пенициллином/стрептомицином (ПанЭко) 50 мкг/мл.

Индукция дифференциации кератиноцитов в культуре. В конфлуентном слое клеток среду SnT-07 меняли на среду DMEM с нормальным содержанием ионов кальция 1,81 мМ Ca²⁺. Клетки культивировали в течение 24 ч. После этого клетки промывали DPBS, фиксировали 4% ПФА и проводили иммуноцитохимический анализ.

Выявление метки бромдезоксимуридина (BrdU). Монослой клеток инкубировали с BrdU (Sigma) в концентрации 10 мМ в течение 2 ч, затем промывали DPBS и фиксировали культуру холодным 70° спиртом 30 мин на холоде. После этого в спирт добавляли равный объем 4N HCl и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Затем промывали клетки DPBS и инкубировали в 0,0125% трипсине 5 мин при +37°C. Промывали DPBS и наносили антитела к BrdU (Abcam) в разведении 1:200 в блокирующем растворе, содержащем 5% БСА, 0,3% Triton X-100 в DPBS.

Инкубацию во вторых антителах проводили по стандартному методу.

Инъекция BrdU новорожденным мышам. Животным в возрасте 6-ти сут проводили подкожную инъекцию 50 мг/кг BrdU (одна инъекция содержит 20 мкл раствора на животное, концентрация BrdU 12,5 мг/мл). Всего провели 4 инъекции через каждые 12 ч (Braun et al., 2003).

Модель заживления кожной раны. Животных наркотизировали внутрибрюшинной инъекцией хлоралгидрата концентрацией 300 мг/кг веса животного, вводили 200 мкл. Между лопаток вырезали кусочек кожи размером

10x10 мм. Далее измеряли ширину раны. На 13 сут иссекли участок раны с захватом здоровой окружающей ткани, с последующей фиксацией и заключением для гистологического исследования.

Индукция стадии роста волосяных фолликулов с помощью депиляции. Для депиляции волос спины использовали воск Beauty Image (Испания). Спустя 10 сут кусочек депилированной кожи иссекли с последующей фиксацией и заключением для гистологического и иммуногистохимического исследования.

Статистическая обработка результатов. При обработке результатов оценивали среднее арифметическое значение и стандартную ошибку среднего (SEM). Статистическую обработку данных проводили по t-критерию Стьюдента и U-критерию Манна-Уитни. Различие считали статистически значимым при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Фенотип шерстного покрова постнатальных мышей *we/we wal/wal*.

I.1. Общая характеристика шерстного покрова. Шерстный покров в первые дни после рождения (P10), когда ВФ пребывают на стадии роста, напоминает замшу (рис. 1а'). Остевые волосы при осмотре не обнаруживаются. На стадии первого катагена (P17) облысение начинается с затылочной части головы и распространяется на весь шерстный покров спины (рис. 1б').

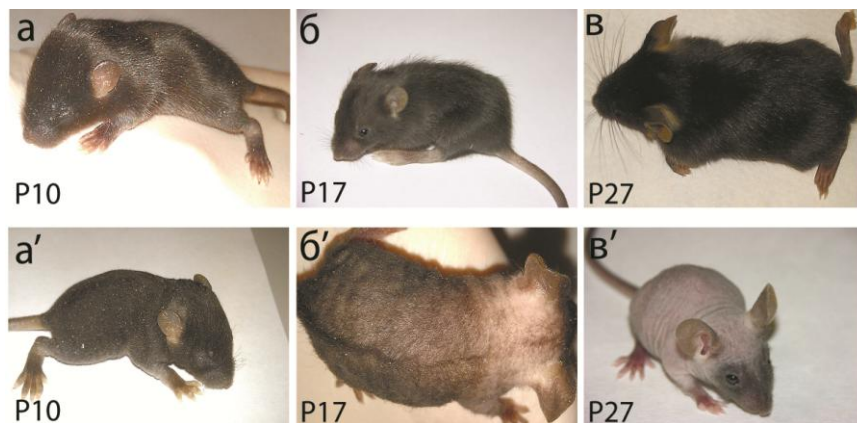


Рис. 1. Фенотип шерстного покрова спины в ходе первого цикла регенерации ВФ. а-в) C57Bl/6; а'-в') *we/we wal/wal*

первого телогена (P27) мыши *we/we wal/wal* окончательно утрачивают нормальный шерстный покров и остаются практически лысыми с редкими, депигментированными миниатюризированными волосами на спине (рис. 1в').

Наши наблюдения согласуются с опубликованными ранее данными (Конюхов и др., 2004; Нестерова, 2010). Также известно, что ВФ мутантов проходят первые два цикла регенерации, но продолжительность стадий цикла сильно отличается от контроля. Было показано, что у мутантов стадии анагена и телогена волос первой и второй генерации сокращены, а катаген наоборот длится дольше (Нестерова, 2010; Нестерова и др., 2012). Характер облысения мутантов *we/we wal/wal* отчасти напоминает циклическую алопецию у мышей, нокаутированных по *Msx2* и *Sox21* (Ma et al., 2003; Kiso et al., 2009).

I.2. Структура стержней волос. У мыши в норме в шерстном покрове спины присутствует 4 типа волос: остевые, шиловидные, пуховые и зиг-заг

(рис. 2а). У мышей *we/we wal/wal* идентифицировали все 4 типа волос (рис. 2а'). Однако имелись также нехарактерные для нормы короткие стержни остевых волос. У мутантов соотношение волос в пределах типов отличалось от нормы (рис. 2б). Шиловидные волосы отличаются от пуховых тем, что имеют прямой стержень без изгиба. У мутантов в стержнях шиловидных, пуховых и зиг-заг волос обнаружены области агрегации пигмента и нарушение его распределения (рис. 2а'). Стержни настолько деформированы, что могут образовывать несколько изгибов, перекруты и «гармошки». Это сильно затрудняет определение типа. Особо сильным деформациям у мутанта подвержены стержни волос типа зиг-заг (рис. 2а').

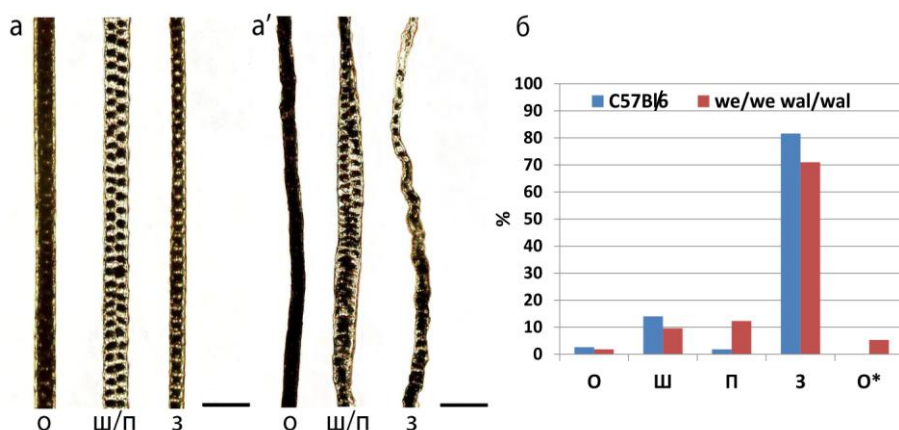


Рис. 2. Типы волос шерстного покрова спины
а) C57Bl/6;
а') *we/we wal/wal*;
б) количественное соотношение стержней волос в пределах типа. Величина шкалы – 50 мкм.

О – остевые, Ш – шиловидные, П – пуховые, З – зиг-заг, О* – короткие остевые.

Известно, что у мутантных гомозигот *we/we* нарушен процесс кератинизации клеток внутреннего корневого влагалища ВФ. Было показано, что слой наружного корневого влагалища ВФ мышей *we/we* тоньше, чем у нормальных мышей, и выдвинуто предположение, что это может быть следствием гипертрофии клеток внутреннего корневого влагалища (Конюхов, Куприянов, 1990). Наблюдаемая деформация стержней волос у мутантных мышей *we/we wal/wal*, вероятно, является проявлением мутантного гена *we*. Усиление дезориентации пигмента стержней волос у двойных гомозигот *we/we wal/wal* происходит при взаимодействии двух мутаций *we* и *wal*. Таким образом, процесс генерации стержней волос *we/we wal/wal* сильно нарушен и алопеция сопровождается серьезными деформациями в структуре стержня волоса.

II. Стволовые клетки волосяных фолликулов мышей *we/we wal/wal*.

Известно, что СК ВФ – резидентные, медленно циклирующие СК, длительно сохраняющие метку ДНК (Cotsarelis et al., 1990).

Чтобы идентифицировать СК ВФ, мы использовали метод мечения BrdU. Новорожденным мышам *we/we wal/wal* и C57Bl/6 инъецировали подкожно BrdU. На P57 у мышей C57Bl/6 и P54 у *we/we wal/wal* забирали эпидермис хвоста, так как известно его преимущество в плотности по сравнению с эпидермисом спины (Braun et al., 2003; Braun, Watt, 2004). У *we/we wal/wal* эпидермис с ВФ забирали на 3 дня раньше, чем у C57Bl/6, так как было известно, что телоген у мутантов короче, чем в норме (Нестерова и др., 2012).

У мышей C57Bl/6, соответственно стадии роста, BrdU+ СК ВФ четко выделяются под сальными железами (рис. 3а, б). В отличие от контрольных ВФ, стадию циклирования мутантных фолликулов было трудно определить, так как ВФ были сильно извитыми. Однако, большинство мутантных ВФ на P54, по всей видимости, находится на стадии телогена, исходя из формы и размера луковиц (рис. 3а', б'). Соответственно стадии телогена, у мутантных ВФ границы области балдж (БЖ) четко не определяются. BrdU + клетки распределяются хаотично по всему ВФ, но преимущественно в верхней его части (рис. 3а', б').

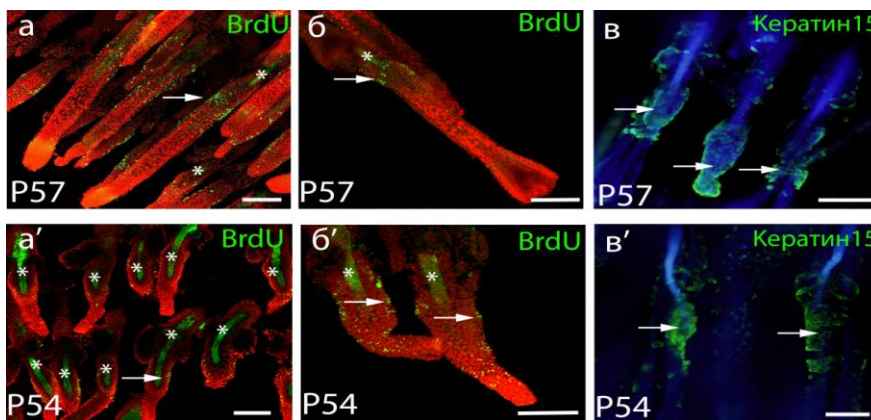


Рис. 3. Стволовые клетки ВФ
а, б, в) C57Bl/6;
а', б', в') *we/we wal/wal*;
а, а', б, б') клетки,
длительно сохраняющие
метку BrdU, ядра клеток
докрашены ТОТ-3
(красный);
в, в') экспрессия кератина
15, ядра клеток докрашены
DAPI (синий).

Иммуногистохимия. * – аутофлуоресценция стержня волоса. P – день постнатального периода. Величина шкалы – 100 мкм.

СК ВФ также характеризуются экспрессией типичных для них молекулярных белков-маркеров, например кератина 15 (K15) (Morris et al., 2004). Экспрессию K15 выявили в области БЖ под сальными железами у ВФ на стадии анагена и по всему ВФ на стадии телогена, как в ВФ C57Bl/6 (рис. 3в), так и в ВФ *we/we wal/wal* (рис. 3в'). Паттерн экспрессии K15 совпадал с областью распределения BrdU+ клеток. Таким образом, популяция СК ВФ у мутантов сохраняется. По всей видимости, алопеция у мышей *we/we wal/wal* не связана с истощением пула СК.

III. Регенерация кожи и волосяных фолликулов мышей *we/we wal/wal*.

III.1. Индукция роста волосяных фолликулов. Чтобы оценить способность мутантных ВФ формировать новый стержень волоса второй генерации мы удалили стержни волос на коже спины мышей *we/we wal/wal* и C57Bl/6 с помощью депиляции. Депиляцию волос на спине у мышей проводили на P23 (ранний телоген первого цикла) (рис. 4а). Мутантных мышей *we/we wal/wal* депилировали на P20 (рис. 4а'). Спустя 10 дней после депиляции (анаген IV), депилированные участки спины контрольных животных были покрыты короткой шерстью (рис. 4б). У мутантов вся кожа спины и место депиляции были равномерно пигментированы (серая кожа), стержней волос на поверхности кожи не обнаружили (рис. 4б'). Гистологический анализ депилированного участка кожи спустя 10 дней показал в норме полноценно развитые, активно растущие ВФ с длинными стержнями волос (рис. 4в), которые, как видно на срезах, выходят на поверхность кожи (рис. 4г). В

дермальной папилле (ДП) контрольных ВФ определяется активность АР (рис. 4д). Экспрессия Ki67 (рис. 4е) и LEF1 (рис. 4ж) указывает на активную пролиферацию клеток луковиц ВФ и реализацию сигнального пути WNT, необходимого для роста ВФ. Е-кадгерин синтезируется в матриксе волоса и наружном корневом влагалище активно растущих ВФ (рис. 4з).

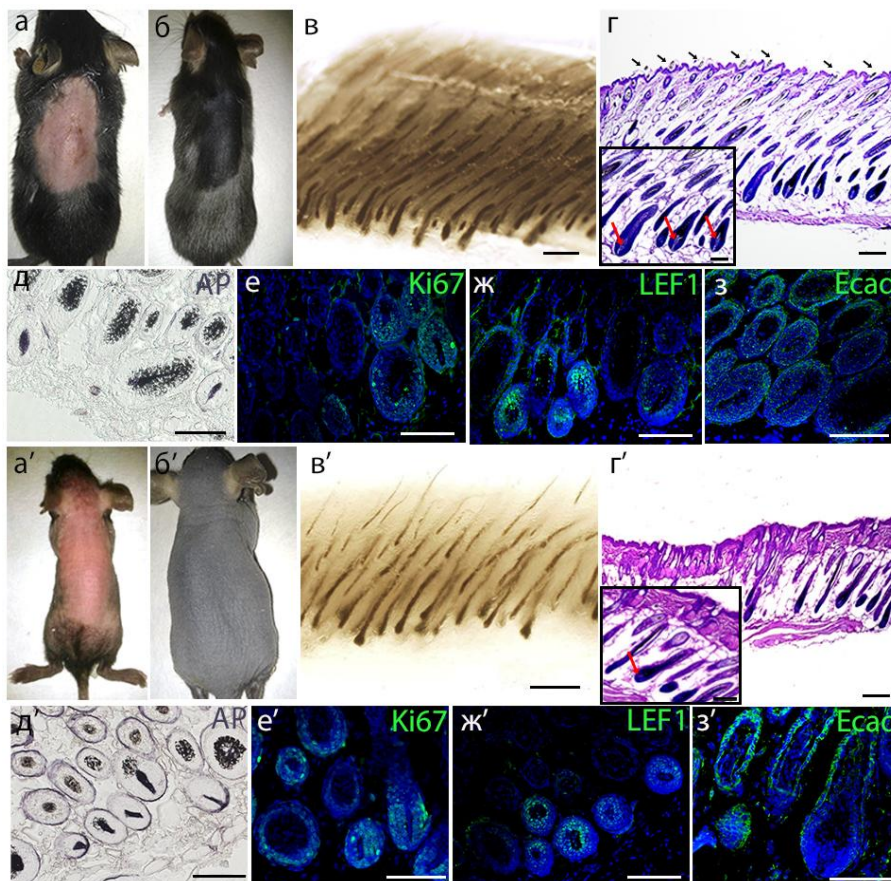


Рис.4. Кожа спины мышей после депиляции воском а-з) C57Bl/6; а'-з') we/we wal/wal. а, а') кожа непосредственно после депиляции волос; б, б') кожа спустя 10 дней после депиляции волос; в, в') парафиновый блок участка кожи спустя 10 дней после депиляции; г, г') срез кожи спустя 10 дней после депиляции. Окраска гематоксилином и эозином; д, д') экспрессия щелочной фосфатазы (АР) (фиолетовый); е, е') экспрессия Ki67 (зеленый); ж, ж') экспрессия LEF1 (зеленый); з, з') экспрессия Е-кадгерина (зеленый); е,е', ж,ж', з,з') ядра клеток докрашены DAPI (синий)

Черные стрелки указывают на стержни волос на поверхности кожи; красные стрелки – ДП внутри луковиц ВФ; Величина шкалы – (в,в',г, г') – 200 мкм, (д-з, д'-з') – 100 мкм.

Плотность фолликулов в депилированном участке кожи мутантов намного ниже, чем в норме, производимые ими стержни волос дистрофичные и короткие (рис. 4в'). На срезе кожи мутантов определяются активно растущие ВФ (рис. 4г'). В ДП и соединительно-тканном чехлике мутантных ВФ определяется активность АР (рис. 4д'). Характер экспрессии белков Ki67 (рис. 29е'), LEF1 (рис. 4ж') и Е-кадгерина (рис. 4з') в мутантных ВФ практически не отличается от контроля. Однако, как при осмотре кожи мутантных мышей (рис. 4б'), так и на гистологических срезах (рис. 4г') видно, что стержни волос не выходят на поверхность кожи. По всей видимости, после депиляции у мутантных ВФ активация роста волоса проходит успешно (рис. 4г'-з'), но дифференциация и формирование стержня волоса крайне нарушены.

Результаты депиляции подтверждают прогрессивный рост ВФ у мутантов, наличие и активность СК ВФ. Однако потенциала СК ВФ не достаточно для формирования полноценного стержня волоса. Вероятно, у мутантных СК ВФ нарушен процесс дифференциации. Это может коррелировать с сокращенным

анагеном (Нестерова и др., 2012), деформацией стержней волос и нарушением ориентации пигмента у взрослых особей *we/we wal/wal*.

III.2. Заживление кожной раны у взрослых особей *we/we wal/wal*.

Известно, что в процессе ранозаживления участвуют и СК эпидермиса и ВФ (Ito et al., 2005; Plikus et al., 2012). Чтобы оценить функциональность зрелой кожи и эпидермальных СК, мы проанализировали характер и темпы закрытия раны у мутантов *we/we wal/wal* в сравнении с контролем C57Bl/6.

При анализе гистологических препаратов обнаружили, что эпителизация раневой поверхности у мутантов проходит успешно. Анализ динамики закрытия раны и срезов кожи на 13 сут после ранения показал, что характер и темпы заживления раны у мутантных мышей соответствовали контролю. Кожа мутантов сохраняет потенциал к регенерации, сопоставимый с нормой. Это не вызывает удивления, учитывая сохраненный компартмент СК ВФ, который, как видно, обеспечивает регенерацию ВФ и гомеостаз кожи. Облысение мышей *we/we wal/wal* не оказывает значительного влияния на процессы заживления кожи при обширном ранении.

IV. Паттерн распределения волосяных фолликулов в эмбриональном эпидермисе мышей *we/we wal/wal* на E18.5. В период эмбрионального развития кожи спины мыши на E18.5 закладываются все 4 типа ВФ. Остевые ВФ закладываются первыми на E14. Шиловидные и пуховые ВФ закладываются во вторую волну морфогенеза на E16-17. ВФ типа зиг-заг закладываются последними в третью волну морфогенеза на E18-P1.

Анализ тотального препарата эпидермиса E18.5, окрашенного антителами против Р-кадгерина, позволяет отчетливо различить все 3 волны закладки ВФ как в норме, так и у мутантов.

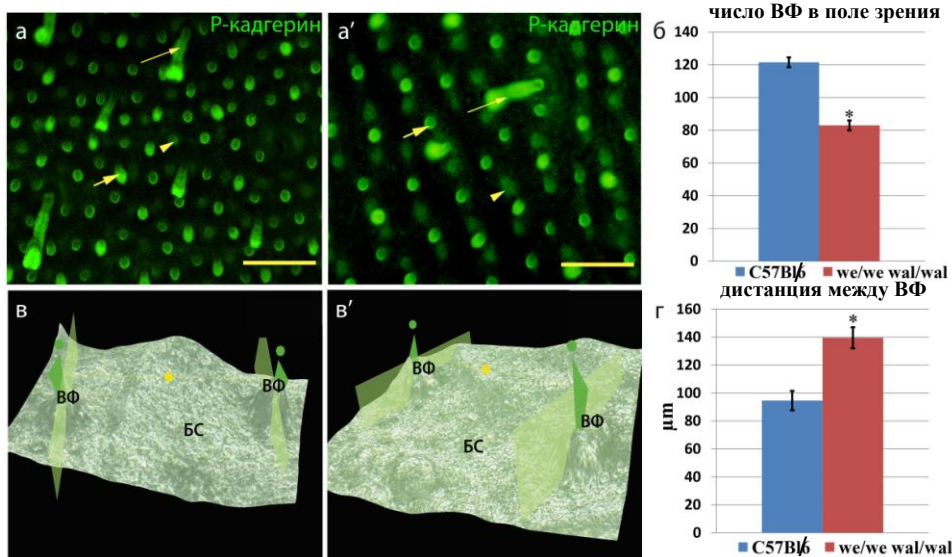


Рис.5. Плотность распределения ВФ в эмбриональном эпидермисе на E18.5 а, в) C57Bl/6; а', в') *we/we wal/wal*; б) подсчет ВФ, среднее значение; г) среднее расстояние между соседними ВФ; а, а') иммуногистохимия, флуоресцентная микроскопия;

в, в') световая микроскопия, фиксированный препарат, контрастированный осмием. Длинная тонкая стрелка – остевые, короткая стрелка – шиловидные/пуховые, наконечник стрелки – зиг-заг; БС – базальный слой; * – статистически значимо, $p < 0,05$. Величина шкалы – 200 мкм.

Остевые ВФ представляют собой самые длинные зачатки на поздних стадиях морфогенеза. Шиловидные и пуховые ВФ определяются в виде «столбиков» средней величины (средние стадии морфогенеза). Зиг-заг ВФ находятся на стадии плакод, которые представляют собой плотно упакованные клетки базального слоя выпуклой формы, ярко экспрессирующие Р-кадгерин (ранние стадии морфогенеза) (рис. 5а, а'). При этом на тотальном препарате эпидермиса мутантов *we/we wal/wal* плакоды были большего размера по сравнению с контролем (рис. 5а'). Подсчет ВФ на тотальном препарате показал, что число ВФ в эпидермисе мутантов *we/we wal/wal* в 1,5 раза меньше по сравнению с контролем ($83 \pm 3,82$ SEM у мутантов по сравнению с $121 \pm 3,36$ SEM в контроле) (рис. 5б).

Чтобы оценить плотность распределения зачатков ВФ мы подсчитали расстояние между верхушками соседних ВФ (самая проксимальная часть растущего фолликула в нативном эпидермисе) на трехмерном изображении тотального препарата эпидермиса, которое получили с помощью светового микроскопа Keyence VHX-1000, используя его программное обеспечение (рис. 5в, в'). Подсчет среднего значения показал, что расстояние между ВФ в эпидермисе мутантов почти в 1,5 раза больше, чем между нормальными фолликулами ($139,51 \pm 7,51$ SEM у мутантов по сравнению с $94,55 \pm 6,94$ SEM в контроле, μm) (рис. 5г). Мы также измерили высоту ВФ и ширину в основании ВФ. Полученные результаты показали, что наименьшие значения высоты (до 4 мкм) практически не обнаруживаются в эпидермисе мутантов *we/we wal/wal*, который, казалось, был лишен фолликулов на ранних стадиях морфогенеза. Сравнительный анализ измерений ширины показал, что в среднем ВФ мутанта шире в основании, чем контрольные ВФ ($39,22 \pm 1,47$ SEM у мутантов по сравнению с $28,96 \pm 1,35$ в контроле, μm).

V. Формирование эпителиального и мезенхимного компонента волосных фолликулов у эмбрионов E18.5 мышей *we/we wal/wal*.

V.1. Утолщения базального слоя у эмбрионов *we/we wal/wal*. Мы провели сравнительный анализ паттерна экспрессии Р-кадгерина и кератина 5 (K5) в эмбриональном эпидермисе *we/we wal/wal* и C57Bl/6. Экспрессия Р-кадгерина и K5 у мутантных мышей была обнаружена в утолщениях базального слоя (рис. 6а', в', г'). Было также видно, что число ВФ у мутантов гораздо меньше, чем в норме (рис. 6а, а'), что подтверждало наши данные, полученные при исследовании тотального препарата эпидермиса (Rippra et al., 2014). Подсчет среднего числа ВФ на гистологических срезах показал, что ВФ у мутантов в 4,6 раз меньше по сравнению с нормой ($3,38 \pm 0,19$ SEM ВФ у мутантов по сравнению с $15,77 \pm 0,54$ SEM ВФ в поле зрения в контроле, $n=48$) (рис. 6б). Различие в результатах подсчета ВФ, полученное на тотальном препарате и гистологических срезах объясняется тем, что на тотальных препаратах плотно упакованные базальные клетки (вид сверху) принимали за плакоды ВФ. На срезах кожи данные плотно упакованные базальные клетки не инвагинировали и не образовывали четкую структуру, напоминающую зачатки ВФ (вид сбоку), поэтому в расчет не принимались. Это несоответствие особенно ясно

проявляется при анализе конфокальных снимков эпидермиса мутантных мышей и сравнения его с контролем (рис. 6д, д').

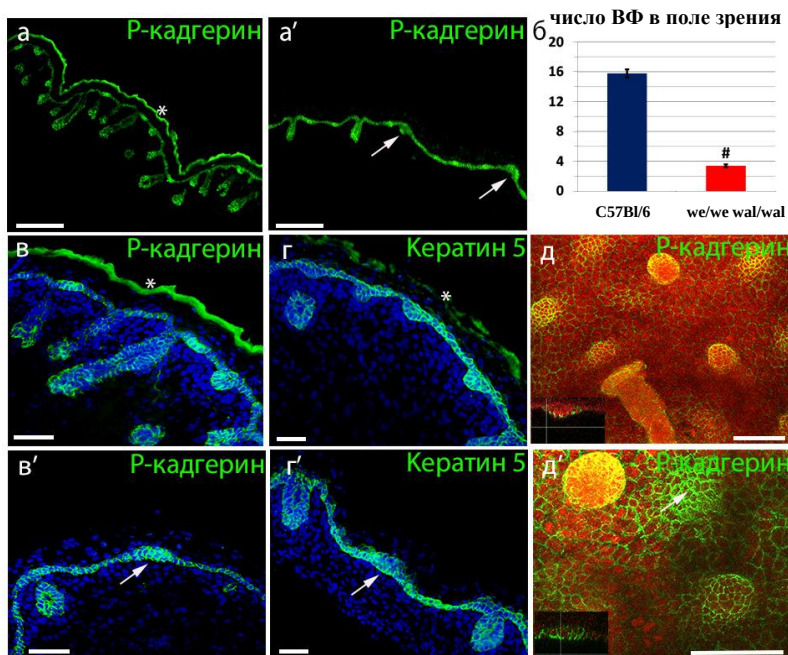


Рис.6. Экспрессия эпителиальных маркеров в эмбриональной коже на E18.5

а, в, з) C57Bl/6;

а', в', з') we/we wal/wal;

б) подсчет ВФ на срезах;

д) C57Bl/6; д') we/we wal/wal;

д, д') максимальная проекция, врезка – оптический срез, конфокальная микроскопия тотального препарата эпидермиса, ядра клеток докрашены TOTO-3;

иммуногистохимия, флуоресцентная микроскопия;

в-з') ядра клеток докрашены DAPI. Стрелка – утолщения базального слоя;

* – аутофлуоресценция рогового слоя; # – статистически значимо, $p < 0,05$.

Величина шкалы – (а, а') – 200 мкм, (в-д') – 50 мкм.

На максимальной проекции эпидермиса C57Bl/6, агрегаты ярко светящихся после окраски антителами против Р-кадгерина клеток принимали за плакоды. На оптических срезах плакод наблюдали четкую инвагинацию базальных кератиноцитов (рис. 6д). На максимальной проекции эпидермиса we/we wal/wal обнаружили скопления ярко светящихся, плотно упакованных клеток, похожих на плакоды. Однако, на оптических срезах инвагинация клеток отсутствовала и Р-кадгерин экспрессировался в нескольких слоях кератиноцитов (рис. 6д').

Обнаружение многослойных эпидермальных структур, не инвагинирующих в дерму, поставило вопрос об их природе: можно ли отнести их к процессу фолликулогенеза?

V.2. Утолщения базального слоя – аномальные плакоды мутантных волосяных фолликулов. Чтобы определить, являются ли утолщения базального слоя мутантов ранней стадией образования ВФ или относятся к межфолликулярному эпидермису, мы проанализировали экспрессию маркера плакод, рецептора к эктодисплазину (EDAR) в эпидермисе у мышей we/we wal/wal в сравнении с C57Bl/6. В норме EDAR экспрессируется в инвагинирующих кератиноцитах плакоды и проксимальной части зачатков ВФ (рис. 4а). У мутантов экспрессия EDAR детектируется в нескольких слоях плотно упакованных кератиноцитов, образующих плакод. При этом видно, что инвагинация кератиноцитов плакоды у мутантов отсутствует (рис. 7а'). Паттерн экспрессии EDAR в эпидермисе мутантов свидетельствует о том, что обнаруженные утолщения базального слоя представляют собой начальные стадии формирования ВФ. Аномальная морфология некоторых мутантных

плакод предполагает, что закладка ВФ у мутантов на E18.5 происходит с нарушением поляризации и инвагинации базальных кератиноцитов на ранних стадиях развития ВФ.

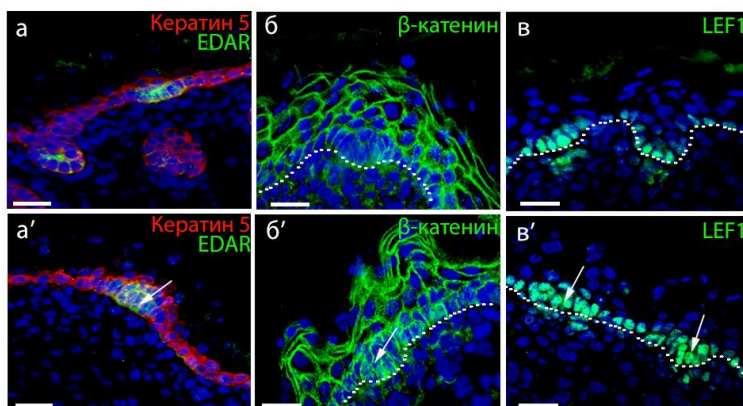


Рис.7. Экспрессия маркера плакод EDAR и белков-мишеней WNT в эмбриональной коже на E18.5 а, б, в) срез кожи C57Bl/6; а', б', в') срез кожи we/we wal/wal. Иммуногистохимия, Ядра докрашены DAPI. Стрелка – утолщения базального слоя. Величина шкалы – 25 мкм.

Определяющим событием инициации фолликулогенеза является активация сигнального пути WNT (Huelsen et al., 2001; Andl et al., 2002; Zhang et al., 2008; Fu, Hsu, 2012). В аномальных, многослойных мутантных плакодах была обнаружена ядерная локализация белков-мишеней WNT: β-катенина и LEF1 (рис. 7б', в'). Характер локализации β-катенина и LEF1 не отличается от нормы (рис. 7б, б' в, в'). По всей видимости, дефекты начальных стадий закладки мутантных ВФ не являются следствием нарушения сигнального пути WNT.

V.3. Характер образования дермального компонента мутантных волосяных фолликулов. Начиная с инициации фолликулогенеза дермальный компонент ВФ преобразуется от дермального конденсата (ДК) до ДП и соединительно-тканного чехлика (Paus et al., 1999). Мы исследовали формирование ДК и ДП у мутантов по сравнению с нормой с помощью анализа

экспрессии их белков-маркеров – AP, рецептора к нейротропину р75 (Botchkareva et al., 1999), транскрипционного фактора SOX2 (Driskell et al., 2009) и LEF1 (DasGupta, Fuchs, 1999).

В норме в эмбриональной

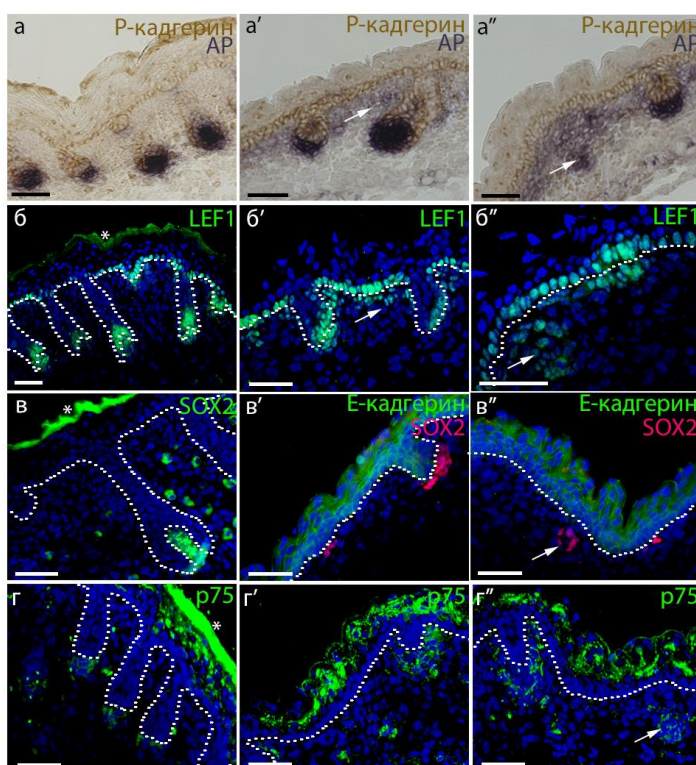
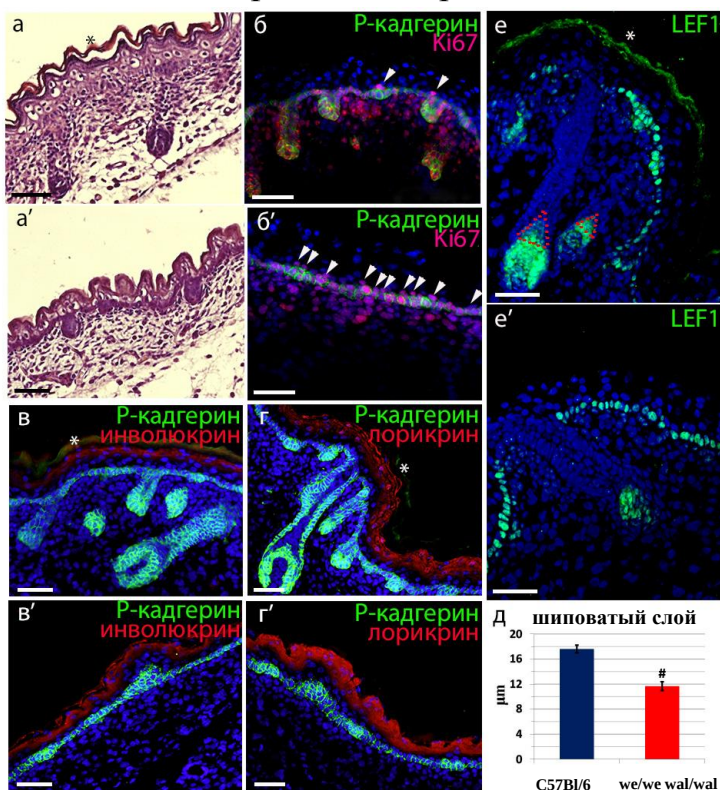


Рис.8. Экспрессия маркеров дермального компонента ВФ в эмбриональной коже на E18.5 а-г) срез кожи C57Bl/6; а'-г') срез кожи we/we wal/wal. Иммуногистохимия. б-г') Флуоресцентная микроскопия. Ядра клеток докрашены DAPI. Стрелка – ДП-подобные агрегаты клеток; пунктир – граница раздела эпидермиса и дермы; * – аутофлуоресценция рогового слоя. Величина шкалы – 50 мкм.

коже AP, SOX2, p75 экспрессируется клетками ДК и ДП (рис. 8а, в, г). LEF1 экспрессируется как в ВФ, так и в ДК и ДП (рис. 8б). В коже мутантов у нормально развитых ВФ наблюдается формирование нормальной AP+ ДП. Однако, также четко детектируется диффузная экспрессия AP во всей папиллярной дерме (рис. 8а'). Обнаруживаются группы ярко окрашенных AP+ клеток, подобных ДП при отсутствии видимых признаков инвагинации базальных кератиноцитов (рис. 8а''). Характер экспрессии LEF1 в коже мутанта был подобен паттерну экспрессии AP (рис. 8б', б''). Экспрессия маркеров ДП SOX2 и p75 у мутанта была аналогичной. Помимо нормальной ДП, рядом с нормально развитым ВФ (рис. 8в', г'), наблюдали SOX2+ и p75+ агрегаты клеток при отсутствии видимых признаков фолликулогенеза (рис. 8в'', г'').

VI. Дифференциация эпидермиса эмбрионов E18.5 мышей *we/we wal/wal*. На гистологических срезах кожи E18.5, окрашенных гематоксилином и эозином, в норме ороговевающий слой определяется в виде слущивающейся «ленты», а при иммуногистохимической окраске – аутофлуоресцирует. Такого рогового слоя в эпидермисе мутантов мы не наблюдали (рис. 9). Известно, что процесс терминальной дифференциации начинается с выхода базальных кератиноцитов из клеточного цикла и утраты адгезии к базальной мембране. Изучив экспрессию маркера пролиферирующих клеток Ki67, мы обнаружили, что в норме Ki67+ кератиноциты обнаруживаются в базальном слое и крайне редко – в супрабазальном (рис. 9б). У мутантов количество Ki67+ супрабазальных кератиноцитов было значительно больше, чем в норме (рис. 9б'). Экспрессия белков-маркеров гранулярного слоя – инволюкрина и лорикрина, у мутантов не отличается от контроля (рис. 9в', г').

Однако, определение среднего значения высоты шиповатого слоя на срезах



показало, что шиповатый слой у мутантов в 1,5 раза тоньше, чем в контроле ($11,66 \pm 0,71$ SEM у мутантов по сравнению с $17,61 \pm 0,61$ SEM в контроле, μm , $n=34$)

Рис.9. Экспрессия маркеров стратификации и прекортекса в эмбриональном эпидермисе на E18.5 а, б, в, г, е) C57Bl/6; а', б', в', г', е') *we/we wal/wal*; а, а') гистология, световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином; б-е') иммуногистохимия, флуоресцентная микроскопия, ядра клеток докрашены DAPI (синий); д) толщина шиповатого слоя в мкм; * – роговой слой; # – статистически значимо, $p < 0,05$. Величина шкалы – 50 мкм.

(рис. 9д). Утончение шиповатого слоя мутантного эпидермиса и отсутствие ороговения на E18.5 указывает на задержку дифференциации. Косвенно этот факт подтверждается усилением пролиферации супрабазальных клеток.

Дифференцированные кератиноциты ВФ формируют внутреннее корневое влагалище и клетки-предшественники стержня волоса – прекортекс в форме треугольника. При этом активируется сигнальный путь WNT. В клетках ДП, матриксе волоса и прекортексе обнаруживается экспрессия компонента этого пути – транскрипционного фактора LEF1 (рис. 9е). Анализ экспрессии LEF1 в коже на E18.5 показал, что в мутантных ВФ, в отличие от контрольных, LEF1+ клетки прекортекса отсутствовали (рис. 9е'). Следовательно, в эмбриональной коже *we/we wal/wal* помимо отсутствия ороговения межфолликулярного эпидермиса, нарушено формирование стержня ВФ на E18.5.

VII. Пролиферация и дифференциация эмбриональных кератиноцитов мышей *we/we wal/wal* в условиях *in vitro*.

VII.1. Пролиферация в культуре первичных кератиноцитов. Анализ пролиферации в культуре первичных кератиноцитов E18.5 по экспрессии Ki67 и включению BrdU показал отсутствие статистически значимого различия в пролиферации между кератиноцитами мутанта и контролем. Сравнительный анализ параметров клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии с включением в культуру клеток пропидий йодида показал, что процентное соотношение клеток в разных фазах клеточного цикла в культуре кератиноцитов *we/we wal/wal* практически не отличается от культуры клеток C57Bl/6. Это может быть обусловлено отсутствием сигнальных факторов ниши, в частности, продуцируемых дермой и адаптацией клеток к условиям культивирования.

VII.2. Индукция дифференциации культуры первичных кератиноцитов.

Отсутствие рогового слоя и увеличение числа пролиферирующих супрабазальных кератиноцитов может быть связано с нарушением способности кератиноцитов к своевременной клеточной дифференциации. Мы исследовали экспрессию маркеров дифференцированных кератиноцитов – кератина 1 (K1) и инволюкрина в ответ на индукцию дифференциации в культуре, повысив концентрацию ионов кальция с 0,07мМ Ca^{2+} до 1,81 мМ Ca^{2+} .

Кератиноциты на среде с низким содержанием ионов кальция не стратифицировались, но продолжали синтезировать K1. Экспрессию инволюкрина в этих условиях практически не детектировали. Клетки на среде с высоким содержанием кальция образовали тесные межклеточные контакты. При окраске антителами против K1 в культуре обнаружили обширные очаги ярко светящихся клеток. При этом были обнаружены единичные ярко светящиеся инволюкрин-положительные клетки. Подсчет инволюкрин-положительных клеток в обеих культурах кератиноцитов показал отсутствие статистически значимого различия в темпах начальных этапов дифференциации между кератиноцитами E18.5 *we/we wal/wal* и C57Bl/6 в условиях *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаруженные в нашей работе многочисленные нарушения органогенеза кожи у лысеющих в постнатальном периоде мышей *we/we* *wal/wal* свидетельствует о том, что причины, ведущие к развитию этого наследственного заболевания, проявляются еще в период эмбриогенеза при закладке органа. В частности, процесс нарушения клеточной дифференциации, приводящий к деформации зрелых стержней волос, обнаруживается при формировании клеток-предшественников стержня волоса в эмбриональной эпидермисе и проявляется также в отсутствии своевременного ороговения. Хотя к моменту рождения шерстный покров мутантных животных выглядит почти нормально, в дальнейшем проявившиеся в эмбриогенезе дефекты развития кожи приводят к серьезным последствиям в виде облысения. Это связано с тем, что в постнатальном периоде ВФ в большой степени сохраняет и воспроизводит регуляторную сеть, сформированную еще в эмбриогенезе, что необходимо для полноценной регенерации в ходе повторяющихся циклов роста фолликулов. Мы обнаружили весьма интересные изменения в эмбриональной дерме мутантных животных. Во-первых, активность белков-маркеров дермального компонента зачатка фолликула проявлялась широко в папиллярной дерме, а не ограничивалась местом формирования фолликула. Во-вторых, наблюдали агрегацию клеток дермы, положительных по белкам-маркерам ДК, в отсутствие видимых признаков фолликулогенеза в эпидермисе. Полученные результаты могут быть использованы для изучения так называемых «первичных сигналов», которые запускают процесс формирования придатков в коже и ограничивают сайты морфогенеза ВФ.

Множество исследований посвящено характеристике формирования придатков кожи, выяснению влияния и взаимодействия сигнальных молекул эпителио-мезенхимного взаимодействия, изменяющихся во времени и пространстве. Проведенное нами исследование вносит вклад в понимание органогенеза ВФ при патологии. Без сомнения, дальнейшие исследования имеющихся в распоряжении мутантов с облысением должны быть сосредоточены на определении молекулярной природы мутаций. Определение мутаций в генах *we* и *wal* и дальнейшее открытие белковых продуктов нормальных аллелей мутантных генов совместно с полученными нами данными расширит понимание не только механизмов органогенеза и регенерации кожи и ВФ, причин развития алопеции, но и процесса клеточной дифференциации.

В данной работе помимо общепринятых в мировой науке методов характеристики «кожного фенотипа» у лабораторных животных были разработаны оригинальные методики. Мы полагаем, что примененный в работе комплексный подход может быть использован специалистами для описания аномалий структуры кожи и волос у мышей с мутациями или у трансгенных животных, если имеются фенотипические проявления исследуемого гена в коже.

ВЫВОДЫ

1. У молодых мышей генотипа *we/we wal/wal* в сопоставлении с контролем C57Bl/6 в шерстном покрове обнаружены все 4 типа волос. Стержни волос мутантов сильно деформированы, и в них нарушено распределение пигмента. Волосяные фолликулы (ВФ) зрелых особей *we/we wal/wal* содержат стволовые клетки.
2. Активация ВФ кожи спины мышей *we/we wal/wal* путем депиляции проходит успешно, но процесс дифференциации фолликулярных кератиноцитов нарушен. Волосы новой генерации дистрофичные и короткие.
3. Заживление кожной раны на спине зрелых особей *we/we wal/wal* соответствует нормальным темпам закрытия раневой поверхности.
4. У эмбрионов *we/we wal/wal* на E18.5 количество зачатков ВФ существенно меньше, чем в норме.
5. В эпидермисе эмбрионов *we/we wal/wal* на E18.5 обнаружены плакоды ВФ, в которых нарушена морфология клеток и инвагинация в дерму. Выявлены нарушения конденсации мезенхимных клеток – предшественников дермальной папиллы ВФ.
6. Обнаружена задержка дифференциации кератиноцитов эмбрионального мутантного эпидермиса и ВФ E18.5.
7. В культуре первичных эмбриональных кератиноцитов не выявлено статистически значимого различия в пролиферации и стратификации клеток *we/we wal/wal* по сравнению с контролем C57Bl/6.
8. Проведенная работа позволяет выдвинуть концепцию о проявлении признаков врожденной алопеции (облысения) уже при закладке кожи и ВФ в эмбриогенезе. Нарушение морфогенеза ВФ в раннем развитии коррелирует с неспособностью к физиологической и стимулированной регенерации во взрослом состоянии. Идентификация механизмов нарушений органогенеза ВФ позволит разрабатывать методы коррекции симптомов алопеции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК:

1. Риппа А.Л., Воротеляк Е.А., Васильев А.В., Терских В.В. Роль интегринов в формировании и гомеостазе эпидермиса и придатков кожи // *Acta Naturae*. – 2013. – Т.4. – №19. – С.24-36.
2. Rippa A., Leonova O., Popenko V., Vasiliev A., Terskikh V., Vorotelyak E. Early stages of *we/we wal/wal* mouse hair morphogenesis: light and fluorescent microscopy of the whole-mount epidermis // *BioMed Res Int*. – 2014. – DOI: 10.1155/2014/856978.
3. Rippa A., Terskikh V., Nesterova A., Vasiliev A., Vorotelyak E. Hair follicle morphogenesis and epidermal homeostasis in *we/we wal/wal* mice with postnatal alopecia // *Histochem Cell Biol*. – 2014. – DOI: 10.1007/s00418-014-1291-1.

Тезисы конференций:

1. Риппа А.Л., Воротеляк Е.А., Терских В.В. Интегрины и белки внеклеточного матрикса в нормальном морфогенезе волосяных фолликулов у мышей линии C57Bl/6. VIII Международная конференция "Молекулярная генетика соматических клеток". Звенигород, 2011 // Сборник тезисов конференции. – 2011. – С. 46-47.
2. Риппа А.Л. Пролиферация и дифференцировка эпидермальных клеток у мутантных мышей с нарушением развития волосяных фолликулов. Конференция молодых ученых ИБР РАН. Москва, 2012 // Онтогенез. – 2013. – 44– №4. – С. 235.
3. Риппа А.Л., Воротеляк Е.А., Терских В.В. Нарушение морфогенеза кожи и её придатков у мутантных мышей *we/we wal/wal* с развивающейся алопецией. III съезд общества клеточной биологии. Санкт-Петербург, 2012 // Сборник тезисов конференции. – 2012. – С. 171.
4. Риппа А.Л., Воротеляк Е.А., Терских В.В. Нарушение базо-апикальной асимметрии эпителия в формирующихся волосяных фолликулах у мутантных мышей *we/we wal/wal* с развивающейся алопецией. Конференция «Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии». Москва, 2012 // Сборник тезисов конференции. – 2012. – С. 39-40.
5. Риппа А.Л. Сравнительный анализ морфогенеза волосяных фолликулов у мышей линии C57Bl/6 и мутантов *we/we wal/wal*. XIX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов". Москва, 2012 // Сборник тезисов конференции. 2012. – С. 16-17.
6. Риппа А.Л. Изучение паттерна закладки волосяных фолликулов и формирования полнослойной структуры эмбрионального эпидермиса у мутантных мышей с развивающейся алопецией. XX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов". Москва, 2013 // Сборник тезисов конференции. –2013. – С. 16-17.
7. Риппа А.Л., Леонова О.Г., Воротеляк Е.А. Идентификация ранних стадий образования волосяных фолликулов мыши методами световой и конфокальной микроскопии. Всероссийской конференции с международным участием "Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция" к 135-летию со дня рождения П.П.Иванова. Санкт-Петербург, 2013 // Сборник тезисов конференции. – 2013. – С. 171.
8. Риппа А.Л., Воротеляк Е.А. Патологии гомеостаза волосяных фолликулов и морфогенеза кожи у мутантных мышей *we/we wal/wal* с развивающимся облысением. Всероссийская научная конференция с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Москва, 2014 // Сборник тезисов конференции. – 2014. – С. 243-245.

Работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований академий наук по теме «Морфогенетические и гистогенетические механизмы дифференцировки» № Госрегистрации 01201351275.