

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА Sox2 В ЭПИТЕЛИИ ЯЗЫКА ЭМБРИОНОВ И ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА

УДК 61–092–053.1:576.315.42
Поступила 1.08.2013 г.

© **А.И. Куртова**, научный сотрудник лаборатории развития нервной системы
Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН, Москва, 117418, ул. Цюрупы, 3

Транскрипционный фактор Sox2 является одним из ключевых факторов развития сенсорных систем млекопитающих. Экспрессия Sox2 обнаружена в развивающихся вкусовых сосочках языка грызунов. Роль данного фактора в морфогенезе вкусовой системы человека остается неизученной.

Цель исследования — изучение особенностей распределения транскрипционного фактора Sox2 в эпителии языка эмбрионов и плодов человека.

Материалы и методы. Проведено иммуногистохимическое исследование эпителии языка 28 плодов и эмбрионов человека с 6-й по 21-ю неделю внутриутробного развития.

Результаты. Иммунопозитивная реакция к Sox2 выявляется в клетках эпителии языка начиная с 10-й недели и на всех последующих стадиях внутриутробного развития. Наибольшее количество иммунопозитивных к Sox2 ядер локализовано в базальном слое эпителии и в местах эвагинаций эпителии, связанных с морфогенезом сосочков. Начиная с 15-й недели внутриутробного развития наблюдается нарастание уровня экспрессии Sox2 в апикальных частях вкусовых сосочков и в клетках вкусовых лукович. Сравнение распределения иммунопозитивных ядер с основными морфогенетическими событиями в эпителии языка плодов человека показало, что Sox2 осуществляет регуляцию морфогенеза сосочков языка и на ранних сроках развития (до 10-й недели) не участвует в дифференцировке клеток вкусовых лукович.

Ключевые слова: Sox2; вкусовые луковичи; вкусовые сосочки; онтогенез человека.

English

Immunohistochemical Study of the Distribution of Transcriptional Factor Sox2 in the Lingual Epithelium of Human Embryos and Fetuses

A.I. Kurtova, Research Worker, the Laboratory of Nervous System Development

Research Institute of Human Morphology of the Russian Academy of Medical Sciences, Tsyurupy St., 3, Moscow, Russian Federation, 117418

Transcriptional factor Sox2 is one of the key factors in the development of mammal sensory system. Sox2 expression was revealed in rodent developing taste buds, while the role of this factor in morphogenesis of human taste system still remains unstudied.

The aim of investigation was to study the character of a transcriptional factor Sox2 distribution in the lingual epithelium of human embryos and fetuses.

Materials and Methods. We carried out an immunohistochemical study of lingual epithelium of 28 human fetuses and embryos from 6th to 21st week of prenatal development.

Results. Immunopositive reaction to Sox2 was revealed in lingual epithelial cells starting from the 10th week of development and in all later stages. The greatest number of Sox2 immunopositive nuclei was localized in a basal layer of lingual epithelium and in epithelial evaginations associated with papillae morphogenesis. Since the 15th week of prenatal development Sox2 expression level increased in apical parts of taste papillae and in taste bud cells. The comparison of immunopositive nuclei distribution with the main morphogenetic events in lingual epithelium of human fetus showed Sox2 to regulate the morphogenesis of human lingual papillae and at early stages (before the 10th week) and not participate in differentiation of taste bud cells.

Key words: Sox2; taste buds; taste papillae; human development.

Для контактов: Куртова Анастасия Игоревна, тел. моб. +7 926-233-21-66; e-mail: reptofly@gmail.com

Вкусовые луковицы млекопитающих представляют собой группы рецепторных клеток, преобразующих химические стимулы в нервный импульс. Вкусовые рецепторные клетки, как и нейроны, способны генерировать потенциалы действия, образовывать синапсы с нервными окончаниями и выделять нейротрансмиттеры в синаптическую щель [1, 2]. Но в отличие от нейронов клетки вкусовых луковиц являются потомками той же клеточной линии, что и эпителиальные клетки, окружающие вкусовую луковицу [3]. Как и другие эпителиальные клетки, они способны к регенерации и обновлению [4]. Благодаря такому уникальному сочетанию свойств вкусовых луковиц изучение их ранней эмбриональной дифференцировки представляет интерес для понимания механизмов морфогенеза как эпителиальных, так и сенсорных органов млекопитающих.

Ранняя дифференцировка эпителия языка на данный момент наиболее полно изучена у грызунов. Формирование вкусовых органов у мышей начинается в середине внутриутробного развития, когда на дорсальной поверхности языка появляются эпителиальные утолщения, называемые плакодами [5]. По мере увеличения сроков развития плакоды эвагинируют и формируют вкусовые сосочки, в эпителии которых к концу внутриутробного развития появляются вкусовые луковицы [5, 6]. В последние годы показано, что развитие эпителиальных плакод и вкусовых сосочков грызунов сопровождается экспрессией эпителиальных и мезенхимальных сигнальных молекул [2, 7]. Однако вопрос о роли эпителиально-мезенхимальной регуляции в инициации морфогенеза вкусовых луковиц во время эмбрионального развития млекопитающих остается дискуссионным. Одни авторы считают, что для начала дифференцировки клеток вкусовых луковиц необходим контакт нервных волокон с эпителием языка [8, 9], другие полагают, что клетки-предшественники вкусовых луковиц определяются еще на ранних стадиях развития вкусовых плакод под контролем локальных сигналов [10–12]. За последние 10 лет в эпителии языка эмбрионов мышей обнаружено множество факторов и сигнальных молекул, участвующих в регулировании процессов дифференцировки вкусовых луковиц и сосочков. Одним из таких факторов является Sox2 [2, 6, 13], или фактор транскрипции SoxB1-HMG-box, который играет важную роль в развитии млекопитающих. Он обильно экспрессируется в зачатках центральной нервной системы млекопитающих, а также необходим для развития сенсорных клеток сетчатки и внутреннего уха [14–16]. В эпителии языка мышей высокий уровень экспрессии Sox2 обнаружен в клетках эпителиальных плакод, в эпителии грибовидных сосочков и в зрелых вкусовых луковицах [6]. При помощи гипоморфных мутаций у мышей показано, что если уровень экспрессии Sox2 достигает только 20% от нормы, эпителиальные плакоды формируются, но зрелые вкусовые сосочки и луковицы отсутствуют [6]. Изложенные факты свидетельствуют, что Sox2 является одним из ключевых факторов регуляции морфогенеза вкусовых сосочков. Однако участие фактора Sox2 в инициации дифференцировки клеток вкусовых луковиц мышей сложно оце-

нить из-за хронологической совмещенности процессов морфогенеза вкусовых луковиц и сосочков у грызунов.

Раннее внутриутробное развитие вкусовых луковиц и сосочков языка у человека отличается от такового у грызунов. Дифференцировка эпителия языка человека начинается с проникновения в эпителий чувствительных нервных окончаний и образования групп удлинённых клеток, называемых вкусовыми примордиями [9]. Отличие вкусовых примордиев от эпителиальных плакод, наблюдаемых при развитии вкусовых сосочков у грызунов, заключается в формировании синапсов между клетками примордиев и проникшими в эпителий нервными окончаниями, что позволяет рассматривать примордии как незрелые вкусовые луковицы, образующиеся еще до формирования вкусовых сосочков [8]. Так как процессы морфогенеза вкусовых луковиц и сосочков на ранних стадиях развития человека разнесены во времени, язык человека является удобным объектом для проверки описанных на грызунах моделей дифференцировки клеток эпителия языка.

Цель исследования — изучение особенностей распределения транскрипционного фактора Sox2 в эпителии языка эмбрионов и плодов человека.

Материалы и методы. Работа выполнена на аутопсийном материале 28 эмбрионов и плодов человека с 6-й по 21-ю неделю внутриутробного развития из коллекции лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека РАМН. Материал был фиксирован в 4% растворе параформальдегида. Определение гестационного возраста осуществлялось по медицинским документам, копчико-теменному размеру, массе тела, рострокаудальной длине и описательным признакам в соответствии с принятыми методиками [17].

На ранних стадиях развития (до 13-й недели) для исследования брали материал головы целиком, на более поздних стадиях выделяли ротовую полость вместе с небными и челюстными костями. При необходимости материал помещали в декальцинирующую смесь на основе азотной кислоты. Материал заливали в парафин и изготавливали серийные срезы толщиной 10 мкм. Далее срезы исследовали иммуногистохимически с первыми антителами к Sox2 (Anti-Sox2 antibody, polyrabbit, Abcam, США). При иммуногистохимической обработке использовали набор UltraVision LP Detection System HRP Polymer (LabVision, Великобритания). В ходе иммуногистохимического исследования депарафинированные, гидратированные срезы обрабатывали 3% раствором H₂O₂ в течение 20 мин для блокировки эндогенной пероксидазы. Затем для демаскирования антигенов проводили высокотемпературную обработку срезов в 0,01 М цитратном буфере (pH=6,0) в течение 5 мин. Для блокировки неспецифического связывания срезы обрабатывали реактивом UltraVBlock из использованного набора в течение 5 мин. Срезы инкубировали с первыми антителами во влажной камере при температуре 37°C в течение 1 ч. В дальнейшем использовали реактивы из набора согласно спецификации фирмы. Негативным контролем служили реакции с заменой первых анти-

тел 0,01 М раствором фосфатно-солевого буфера — PBS (рН=7,3–7,5).

Результаты. Первые вкусовые примордии появляются в эпителии языка эмбрионов человека в начале 7-й недели внутриутробного развития. На ранних гестационных сроках (с 6-й по 9-ю неделю развития) четкая иммунопозитивная реакция на фактор Sox2 в дорсальном эпителии языка отсутствует. Начиная с 8-й недели внутриутробного развития в клетках эпителии языка человека присутствует слабая иммунопозитивная реакция (см. рисунок, а), но поскольку маркер был обнаружен не только в ядрах, но и в цитоплазме клеток, окраска эпителии на данных сроках развития может быть результатом неспецифической перекрестной реакции, что требует дальнейших исследований.

С 10-й недели внутриутробного развития в дорсальном эпителии выявляется четкая и контрастная реакция на Sox2 (см. рисунок, б). По визуальной оценке, наибольшее количество окрашенных ядер наблюдается в базальном слое эпителии. В расположенных выше слоях эпителии обнаружены одиночные рассеянные иммунопозитивные к Sox2 клетки. Число таких клеток возрастает в местах изгибов эпителиального пласта, связанных с образованием и ростом сосочков языка. Никаких различий в экспрессии данного маркера в зависимости от типов сосочков на данной стадии развития не выявлено.

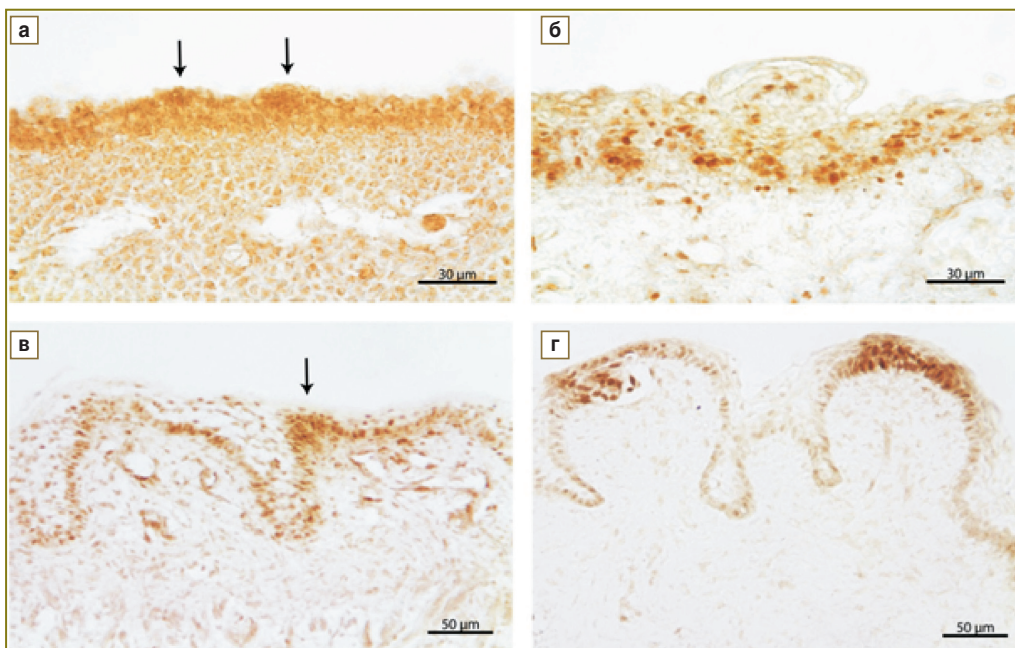
На 12–14-й неделе внутриутробного развития распределение в эпителии иммунопозитивных к Sox2 клеток становится более разреженным (см. рисунок, в). В базальном слое эпителии языка их число уменьшается, в более поверхностных слоях еще встречаются окрашенные ядра, но в заметно меньшем количестве, чем на предыдущих стадиях развития. Большое число

иммунопозитивных ядер сохраняется в эпителии базальной части развивающихся сосочков языка. Также иммунопозитивная реакция на Sox2 обнаружена в ядрах клеток вкусовых лукович.

К 15-й неделе внутриутробного развития интенсивность реакции на Sox2 в базальном слое эпителии языка начинает уменьшаться. На фоне слабой иммунопозитивной реакции в эпителии языка выделяются апикальные части сосочков, на которых расположены вкусовые луковичи. Ядра клеток вкусовых лукович, а также клеток эпителии, окружающих их, ярко окрашены. Также иммунореактивность к Sox2 сохраняется в базальных частях сосочков языка.

С 18-й по 21-ю неделю внутриутробного развития яркая и четкая реакция на Sox2 наблюдается только на вершинах вкусовых сосочков (см. рисунок, г). Иммунопозитивные к Sox2 ядра расположены в клетках вкусовых лукович и клетках эпителии, окружающего их. По мере отдаления от вкусовых лукович реакция в клетках эпителии апикальной части сосочка слабеет.

Обсуждение. Примордии вкусовых лукович появляются в начале 7-й недели внутриутробного развития человека, что согласуется с данными исследований других авторов [8]. На стадии вкусовых примордий (до 10-й недели развития) четкая иммунопозитивная реакция на Sox2 в эпителии языка не обнаружена, что может быть следствием низкого уровня экспрессии данного маркера. После 10-й недели внутриутробного развития начинается активный морфогенез сосочков языка и наблюдается резкое повышение уровня экспрессии Sox2. Наибольшее количество иммунопозитивных к Sox2 ядер локализовано в базальном слое эпителии, а также в растущих базальных частях со-



Эпителий языка человека на 8-й (а), 10-й (б), 14-й (в) и 18-й (г) неделе внутриутробного развития, реакция с антителами к транскрипционному фактору Sox2. Стрелками отмечены вкусовые примордии (а) и вкусовые луковичи (в)

сочков, т.е. в местах активной пролиферации и дифференцировки эпителиальных клеток. Полученные результаты не противоречат данным исследований, проведенных на мышах. У мутантных мышей с сверхэкспрессией Sox2 наблюдается увеличение количества грибовидных сосочков, а не вкусовых луковок [6]. По-видимому, на ранних этапах развития Sox2 осуществляет регуляцию морфогенеза сосочков языка и не участвует в инициации дифференцировки клеток вкусовых луковок. С 15-й недели внутриутробного развития человека сильная экспрессия Sox2 обнаружена в эпителии апикальных частей грибовидных сосочков и в клетках вкусовых луковок. Такое распределение маркера соответствует результатам исследований, проведенных на взрослых мышах, у которых Sox2 экспрессируется только в клетках вкусовых луковок и клетках эпителия, окружающих их [18]. Вероятно, Sox2 принимает участие в процессах созревания, обновления и регенерации вкусовых луковок млечопитающих. Зависимость экспрессии Sox2 от иннервации доказана на взрослых мышах, у которых при деградации вкусовых нервов прекращается экспрессия данного фактора [18]. На ранних стадиях развития, до проникновения нервных окончаний в эпителий языка мышей, экспрессия Sox2 в плакодах сосочков языка контролируется системой сигнального пути Wnt [2]. Активация этой системы — один из неизученных вопросов, так как в эпителии ротовой полости на одних и тех же стадиях эмбрионального развития она приводит к разным последствиям, таким как образование зубов или сосочков языка [2]. Большая часть исследований в данном направлении проведена на грызунах, но результаты немногочисленных работ на эмбрионах человека свидетельствуют о межвидовых различиях в экспрессии факторов и сигнальных молекул. Например, при развитии половых клеток в гонадах у мышиных эмбрионов наблюдается экспрессия Sox2, а у эмбрионов человека она отсутствует [19]. Все вышесказанное свидетельствует, что для понимания процессов морфогенеза человека недостаточно межвидовых экстраполяций и необходимы исследования транскрипционных факторов и сигнальных систем на человеческом эмбриональном материале.

Заключение. Транскрипционный фактор Sox2 обнаружен в эпителии языка всех исследованных плодов человека начиная с 10-й недели внутриутробного развития. Сравнение распределения иммунопозитивных ядер с основными морфогенетическими событиями в эпителии языка плодов человека показало, что Sox2 осуществляет регуляцию морфогенеза сосочков языка и на ранних сроках развития (до 10-й недели) не участвует в дифференцировке клеток вкусовых луковок.

Финансирование исследования. Работа поддержана специализированным фондом управления капиталом для поддержки деятельности научно-исследовательских работ в области биологии и медицины «Фундаментальный».

Конфликт интересов. У автора нет конфликта интересов.

Литература

1. Finger T.E., Danilova V., Barrows J., Bartel D.L., Vigers A.J., Stone L., Hellekant G., Kinnamon S.C. ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 2005; 310: 1495–1499.
2. Lui F., Millar S.E. Wnt/ β -catenin signaling in oral tissue development and disease. *J Dent Res* 2010; 89(4): 318–330, <http://dx.doi.org/10.1177/0022034510363373>.
3. Hirota M., Ito T., Okudela K., Kawabe R., Hayashi H., Yazawa T., Fujita K., Kitamura H. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in taste buds of mouse and hamster. *Tissue Cell* 2001; 33: 25–32.
4. Hamamichi R., Asano-Miyoshi M., Emori Y. Taste buds contains both short-lived and long-lived cell populations. *Neuroscience* 2006; 141: 2129–2138.
5. Mbiene J.P. Taste placodes are primary targets of geniculate but not trigeminal sensory axons in mouse developing tongue. *J Neurocytol* 2004; 33: 617–629.
6. Okubo T., Pevny L.H., Hogan B.L.M. Sox2 is required for development of taste bud sensory cells. *Genes & Development* 2006; 20: 2654–2659, <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1457106>.
7. Hall J.M., Bell M.L., Finger T.E. Disruption of sonic hedgehog signaling alters growth and patterning of lingual taste papillae. *Dev Biol* 2003; 255: 263–277, [http://dx.doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00048-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00048-9).
8. Oakley B., Witt M. Building sensory receptors on the tongue. *J Neurocytol* 2004; 33(6): 631–646, <http://dx.doi.org/10.1007/s11068-005-3332-0>.
9. Tamatsu Y., Gasser R.F. Development of the sensory nerves to the dorsum of the tongue in staged human embryos. *Clinical Anatomy* 2004; 17: 99–106.
10. Mbiene J.P., Roberts J.D. Distribution of keratin 8-containing cell clusters in mouse embryonic tongue: evidence for a prepattern for taste bud development. *J Comp Neurol* 2003; 457(2): 111–122.
11. Zhou Y., Liu H.X., Mistretta C.M. Bone morphogenetic proteins and noggin: inhibiting and inducing fungiform taste papilla development. *Dev Biol* 2006; 297(1): 198–213, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.022>.
12. Thirumangalathu S., Barlow L.A. In vivo fate tracing studies of mammalian. Taste cell progenitors international symposium on olfaction and taste. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1170: 34–38, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04371.x>.
13. Liu F., Thirumangalathu S., Gallant N.M., Yang S.H., Stoick-Cooper C.L., Reddy S.T., Andl T., Taketo M.M., Dlugosz A.A., Moon R.T., Barlow L.A., Millar S.E. Wnt-beta-catenin signaling initiates taste papilla development. *Nature genetics* 2007; 39(1): 106–112, <http://dx.doi.org/10.1038/ng1932>.
14. Van Raay T.J., Moore K.B., Iordanova I., Steele M., Jamrich M., Harris W.A., Vetter M.L. Frizzled 5 signaling governs the neural potential of progenitors in the developing *Xenopus* retina. *Neuron* 2005; 46(1): 23–36, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2005.02.023>.
15. Taranova O.V., Magness S.T., Fagan B.M., Wu Y., Surzenko N., Hutton S.R., Pevny L.H. Sox2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes & Development* 2006; 20: 1187–1202, <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1407906>.
16. Kiernan A.E., Pelling A.L., Leung K.K., Tang A.S., Bell D.M., Tease C., Lovell-Badge R., Steel K.P., Cheah K.S. Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature* 2005; 434(7036): 1031–1035, <http://dx.doi.org/10.1038/nature03487>.
17. Савельев С.В. Стадии эмбрионального развития мозга человека. М: ВЕДИ, 2002; 112 с.
18. Suzuki Y. Expression of Sox2 in mouse taste buds and its relation to innervation. *Cell Tissue Res* 2008; 332: 393–401, <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-008-0600-1>.
19. Perrett R.M., Turnpenny L., Eckert J.J., O'Shea M., Sonne S.B., Cameron I.T., Wilson D.I., Rajpert-De Meyts E., Hanley N.A. The early human germ cell lineage does not express SOX2 during in vivo development or upon in vitro culture. *Biol Reprod* 2008 May; 78(5): 852–858, <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.107.066175>.

References

1. Finger T.E., Danilova V., Barrows J., Bartel D.L., Vigers A.J., Stone L., Hellekant G., Kinnamon S.C. ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 2005; 310: 1495–1499.

2. Lui F., Millar S.E. Wnt/ β -catenin signaling in oral tissue development and disease. *J Dent Res* 2010; 89(4): 318–330, <http://dx.doi.org/10.1177/0022034510363373>.

3. Hirota M., Ito T., Okudela K., Kawabe R., Hayashi H., Yazawa T., Fujita K., Kitamura H. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in taste buds of mouse and hamster. *Tissue Cell* 2001; 33: 25–32.

4. Hamamichi R., Asano-Miyoshi M., Emori Y. Taste buds contains both short-lived and long-lived cell populations. *Neuroscience* 2006; 141: 2129–2138.

5. Mbiene J.P. Taste placodes are primary targets of geniculate but not trigeminal sensory axons in mouse developing tongue. *J Neurocytol* 2004; 33: 617–629.

6. Okubo T., Pevny L.H., Hogan B.L.M. Sox2 is required for development of taste bud sensory cells. *Genes & Development* 2006; 20: 2654–2659, <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1457106>.

7. Hall J.M., Bell M.L., Finger T.E. Disruption of sonic hedgehog signaling alters growth and patterning of lingual taste papillae. *Dev Biol* 2003; 255: 263–277, [http://dx.doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00048-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00048-9).

8. Oakley B., Witt M. Building sensory receptors on the tongue. *J Neurocytol* 2004; 33(6): 631–646, <http://dx.doi.org/10.1007/s11068-005-3332-0>.

9. Tamatsu Y., Gasser R.F. Development of the sensory nerves to the dorsum of the tongue in staged human embryos. *Clinical Anatomy* 2004; 17: 99–106.

10. Mbiene J.P., Roberts J.D. Distribution of keratin 8-containing cell clusters in mouse embryonic tongue: evidence for a prepattern for taste bud development. *J Comp Neurol* 2003; 457(2): 111–122.

11. Zhou Y., Liu H.X., Mistretta C.M. Bone morphogenetic proteins and noggin: inhibiting and inducing fungiform taste papilla

development. *Dev Biol* 2006; 297(1): 198–213, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.022>.

12. Thirumangalathu S., Barlow L.A. In vivo fate tracing studies of mammalian. Taste cell progenitors international symposium on olfaction and taste. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1170: 34–38, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04371.x>.

13. Liu F., Thirumangalathu S., Gallant N.M., Yang S.H., Stoick-Cooper C.L., Reddy S.T., Andl T., Taketo M.M., Dlugosz A.A., Moon R.T., Barlow L.A., Millar S.E. Wnt-beta-catenin signaling initiates taste papilla development. *Nature genetics* 2007; 39(1): 106–112, <http://dx.doi.org/10.1038/ng1932>.

14. Van Raay T.J., Moore K.B., Iordanova I., Steele M., Jamrich M., Harris W.A., Vetter M.L. Frizzled 5 signaling governs the neural potential of progenitors in the developing *Xenopus* retina. *Neuron* 2005; 46(1): 23–36, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2005.02.023>.

15. Taranova O.V., Magness S.T., Fagan B.M., Wu Y., Surzenko N., Hutton S.R., Pevny L.H. Sox2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes & Development* 2006; 20: 1187–1202, <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1407906>.

16. Kiernan A.E., Pelling A.L., Leung K.K., Tang A.S., Bell D.M., Tease C., Lovell-Badge R., Steel K.P., Cheah K.S. Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature* 2005; 434(7036): 1031–1035, <http://dx.doi.org/10.1038/nature03487>.

17. Savel'ev S.V. *Stadii embrional' nogo razvitiya mozga cheloveka* [The stages of human brain embryogenesis]. Moscow: VEDI, 2002; 112 p.

18. Suzuki Y. Expression of Sox2 in mouse taste buds and its relation to innervation. *Cell Tissue Res* 2008; 332: 393–401, <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-008-0600-1>.

19. Perret R.M., Turnpenny L., Eckert J.J., O'Shea M., Sonne S.B., Cameron I.T., Wilson D.I., Rajpert-De Meyts E., Hanley N.A. The early human germ cell lineage does not express SOX2 during in vivo development or upon in vitro culture. *Biol Reprod* 2008 May; 78(5): 852–858, <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.107.066175>.