
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

НЕНЕЙРОНАЛЬНАЯ ГАМК
В НЕОКОРТИКАЛЬНЫХ НЕЙРОТРАНСПЛАНТАТАХ КРЫС

© 2023 г. З. Н. Журавлева^{1, *}, Г. И. Журавлев²

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

²Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

*E-mail: zina_zhur@mail.ru

Поступила в редакцию 21.06.2023 г.

После доработки 10.09.2023 г.

Принята к публикации 01.10.2023 г.

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) играет важную роль в регуляции развития и функционирования мозга. Целью работы было исследование участия ГАМК, содержащейся в ненейрональных клетках, в дифференцировке и созревании неокортикальных трансплантатов крыс. Трансплантировали кусочки фетального соматосенсорного неокортекса в острую полость гомотопической области коры взрослых крыс-самцов. Через 4 мес. после операции проводили гистологическое и электронно-микроскопическое изучение трансплантатов. Трансплантаты были хорошо васкуляризованы и состояли из нейрональных и глиальных клеток. Локализацию ГАМК в ненейрональных клетках исследовали с помощью ультраструктурной иммуноцитохимии с использованием антител, конъюгированных с коллоидным золотом. Наибольшая экспрессия иммунометки в виде электронно-плотных глобул размером от 20 до 60–80 нм была обнаружена в протоплазматических астроцитах и их отростках. Астроцитарные концевые ножки вокруг капилляров также содержали ГАМК-позитивные гранулы. Кроме того, ГАМК-положительные гранулы наблюдались в некоторых миелообразующих клетках и в эндотелиальной стенке кровеносных сосудов. Полученные результаты показали, что в неокортикальных нейротрансплантатах ГАМК-ергическая сигнализация посредством ненейрональных клеток участвует в морфофункциональной дифференцировке трансплантированной ткани.

Ключевые слова: неокортикальные аллотрансплантаты, дифференцировка, гамма-аминомасляная кислота, ультраструктурная иммуноцитохимия, ненейрональные клетки, астроциты, эндотелиальные клетки

DOI: 10.31857/S0869813923120166, EDN: CGWKWZ

ВВЕДЕНИЕ

Мозг млекопитающих обладает очень низкой способностью для регенерации при травмах и нейродегенеративных заболеваниях. Нейротрансплантация является одним из способов, способствующих морфофункциональному восстановлению нервной системы. В экспериментальных работах показано, что пересаженные эмбриональные клетки или кусочки незрелой ткани успешно приживаются, продолжают дифференцировку и участвуют в восстановлении поврежденных нервных сетей головного мозга. Современное состояние исследований и перспектив клинического применения нейротрансплантации фетальных и стволовых клеток обобщено в ряде обзоров [1–6]. Однако даже в долгоживущих нейротрансплантатах сохраня-

ются морфологические показатели неполного созревания некоторых глиоцитов и нейрональных отростков [7, 8]. Обнаружена также задержка экспрессии маркерного белка зрелых нейронов NeuN и пролонгированная пролиферация трансплантированных клеток [9]. Кроме того, недостаточно изучены особенности нейромедиаторной дифференцировки в такой сложной морфофункциональной системе как нейротрансплантат, когда эмбриональная ткань функционирует в необычном для нее гуморальном и тканевом микроокружении зрелого мозга. Так, при иммунохимическом исследовании гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) мы ранее обнаружили значительно меньше ГАМК-содержащих нейронов в неокортикальных трансплантатах по сравнению с соседней интактной областью мозга [10]. Указанные выше аномалии дифференцировки трансплантированной ткани и недостаток ГАМК-ергического синаптического торможения могут приводить к функциональным патологиям и формированию эпилептических очагов в мозге [11].

В условиях естественного онтогенеза ГАМК играет ведущую роль в развитии ЦНС. Она первой из нейромедиаторов появляется в мозге и, деполяризуя клетки-предшественники, управляет их пролиферацией и миграцией, а также созреванием новорожденных нейронов. Когда синаптическая передача еще отсутствует, большинство эффектов ГАМК опосредуются по аутокринному или паракринному механизму. В зрелом мозге ГАМК оказывает гиперполяризующий эффект на нейроны и является основным тормозным медиатором [12–14]. В качестве нейромедиатора ГАМК освобождается из нервных окончаний интернейронов и действует на постсинаптические рецепторы. В то же время современные данные показывают, что ГАМК содержится не только в нейронах, но и в глиальных клетках, и количество ее в астроцитах возрастает в патологических ситуациях [13–16]. Традиционно ГАМК, содержащуюся в ненейрональных клетках, относят к метаболическому пулу, а не к нейротрансмиттерному пулу. В мозге имеется два пула ГАМК, которые синтезируются разными изоформами глутаматдекарбоксилазы (ГДК). ГАМК, синтезированная ГДК-65, рассматривается как синаптический пул и ассоциируется с экзоцитозом нейромедиатора из синаптических везикул, а ГАМК, синтезированная ГДК-67, имеет отношение к метаболическому пулу и локализуется в цитоплазме [17, 18].

Учитывая данные о важной морфогенной роли ГАМК в эмбриогенезе мозга млекопитающих и о нарушении нейрохимической дифференцировки тормозных ГАМКергических нейронов в условиях трансплантации, целью настоящей работы было изучение степени участия ненейрональной ГАМК в развитии и функционировании интрамозговых трансплантатов. Для этого было проведено ультраструктурное иммуноцитохимическое исследование ГАМК, содержащейся в ненейрональных клетках неокортикальных трансплантатов, развивающихся в соматосенсорной области мозга крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для интранеокортикальной трансплантации использовали лабораторных крыс породы Вистар, содержащихся в обычных условиях вивария. Все процедуры с животными проводили под общим нембуталовым наркозом (30–40 мг/кг, внутривенно); использованные в работе реактивы и антитела были производства Sigma-Aldrich. В качестве донорского материала для трансплантации служили кусочки эмбрионального мозга из неокортекса 17-дневных плодов. Выделение закладки соматосенсорной области производили под бинокулярной лупой на основании предварительного сравнения гистологических препаратов эмбрионов разного возраста, новорожденных крыс и стереотаксических координат взрослых животных. Для

этого делали продольные разрезы на расстоянии 1 мм от средней линии полушария и по самой латеральной части неокортекса, затем поперечным разрезом отсекали фрагмент 1.0–1.5 мм на уровне нижележащей закладки подкоркового септального ядра. Гомотопическую аллотрансплантацию производили в острую полость соматосенсорной области коры взрослых крыс-самцов массой 200–250 г ($n = 5$) в соответствии со стереотаксическими координатами ($AP = +2.0$; $L = 5.5$). Трансплантаты развивались в течение 4 мес., что соответствует срокам достижения тканью *in situ* взрослого дифференцированного состояния. После этого животных транскардиально перфузировали фиксатором, состоящим из 2.5%-ного раствора формальдегида и 1.0%-ного раствора глутарового альдегида в 0.1М фосфатном буфере при pH 7.4. Затем выделяли область мозга, содержащую нейротрансплантат, промывали в том же буфере и готовили коронарные срезы толщиной 50 мкм на вибротоме (World Precision Instruments). Часть срезов окрашивали крезилвиолетом по Нисслю для рутинного гистологического изучения нейротрансплантатов.

Выявление ГАМК производили на вибротомных тканевых срезах толщиной 50 мкм с их последующей дофиксацией и обработкой для электронной микроскопии, несколько модифицируя ранее описанные протоколы [19]. Сначала срезы погружали в блокирующий раствор 10%-ного бычьего сывороточного альбумина (БСА) в трис-HCl буфере на 30 мин при комнатной температуре. Затем инкубировали в первичных кроличьих антителах к ГАМК (номер A 2052 по каталогу Sigma – Aldrich), разведенных (1 : 1000) в 10%-ном БСА/трис буфере (1 день, во влажной камере, в холодильнике). После нескольких промывок в 1.0%-ном БСА/трис буфере срезы инкубировали во вторичных антикроличьих антителах, конъюгированных с коллоидным золотом (каталожный номер G 7402 Sigma – Aldrich), при разведении 1 : 100 в течение 4 ч при комнатной температуре. Для выявления реакционного продукта использовали авидин-биотин-пероксидазный комплекс и 0.05%-ный раствор 3,3'-диаминобензидина в 0.1М фосфатном буфере. Контрольные образцы обрабатывали теми же реагентами за исключением инкубации в растворе антител против ГАМК. Для ультраструктурного изучения материал дофиксировали 1%-ным раствором четырехоксида осмия, промывали, обезвоживали в серии спиртов восходящей крепости и ацетоне и заливали в эпоксидную смолу Эпон 812. Ультратонкие срезы, контрастированные уранилацетатом и цитратом свинца, исследовали в электронном микроскопе JEOL JEM-100B (Япония). Корректировку яркости и контраста полученных фотонегативов, а также удаление неспецифического фонового окрашивания производили с помощью компьютерной программы Adobe Photoshop.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Визуальный анализ мозга взрослых реципиентов через 4 мес. после аллотрансплантации фрагментов эмбрионального соматосенсорного неокортекса показал наличие трансплантатов у всех пяти экспериментальных животных. Хорошо васкуляризованная трансплантированная ткань полностью заполняла операционную ямку и иногда несколько выступала над поверхностью мозга. Трансплантаты представляли собой клеточные образования, в которых нервные и глиальные клетки были распределены диффузно без какой-либо ориентации и не формировали сложную организацию, характерную для неокортекса. Однако в некоторых нейротрансплантатах выявлялась отчетливая тенденция к образованию небольших клеточных скоплений. На свето-микроскопическом уровне клетки имели все признаки полностью дифференцированных элементов. Нейроны отличались от глиоцитов более крупными размерами и обширной цитоплазмой, содержащей глыбки нисслевско-

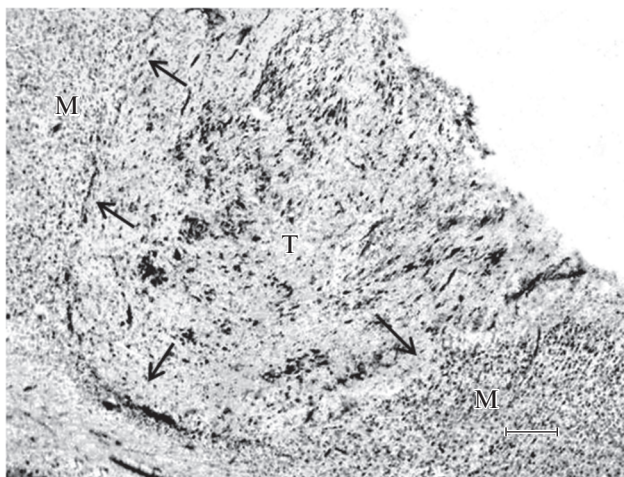


Рис. 1. Общий гистологический вид неокортикального трансплантата (4 месяца после операции) в соматосенсорной области неокортекса реципиента. Граница между трансплантатом (Т) и мозгом (М) обозначена стрелками. Окраска крезилвиолетом по Ниссля. Масштаб: 100 мкм.

го вещества. На гистологических срезах четко распознавались ткани, принадлежащие неокортексу реципиента и неокортикальному трансплантату (рис. 1).

Между трансплантатом и мозгом реципиента прослеживалась отчетливая граница, но в отдельных участках можно было наблюдать полное слияние тканей. Чаше граница формировалась скоплением глиальных клеток, однако иногда в интерфазу проникали крупные кровеносные сосуды из мозговых оболочек. В таких областях скапливались клеточные элементы соединительной ткани, которые никогда не обнаруживались внутри паренхимы нейротрансплантатов. Таким образом, общий морфологический контроль, проведенный в настоящей работе, подтвердил ранее известные данные о хорошей приживаемости трансплантированной ткани, дальнейшей дифференцировке эмбриональных клеточных элементов и приобретении ими типичных для зрелого мозга цитологических форм [3–5, 7].

Электронно-микроскопический анализ трансплантатов после иммуноцитохимической обработки показал, что условия проведения реакции на ГАМК существенно не отразились на сохранности ультраструктуры. В них наблюдали характерное для мозговой ткани соотношение нервных и глиальных клеток, организованный нейропил и разные типы синаптических контактов. По интенсивности иммуномечения на ГАМК среди ненейрональных клеток выделялись протоплазматические астроциты, которые особенно активно взаимодействовали с антителами. Такие астроциты имели крупное ядро, малое количество органелл в цитоплазме и практически не содержали микрофиламентов. Иммунометка в виде отдельных электронно-плотных глобул размером от 20 до 60–80 нм была распределена по цитоплазме астроцитов без выраженной пространственной закономерности и привязки к мембранам. В то же время скопления до 10 и более позитивных гранул наблюдались над некоторыми митохондриями. Астроцитарные ядра были, как правило, иммунонегативны (рис. 2).

В нейропиле трансплантатов, состоящем из переплетения отростков нейрональных и глиальных клеток, многие перерезанные астроцитарные профили также были иммуномечены (рис. 2, 3). Гранулы реакционного продукта в них имели хао-

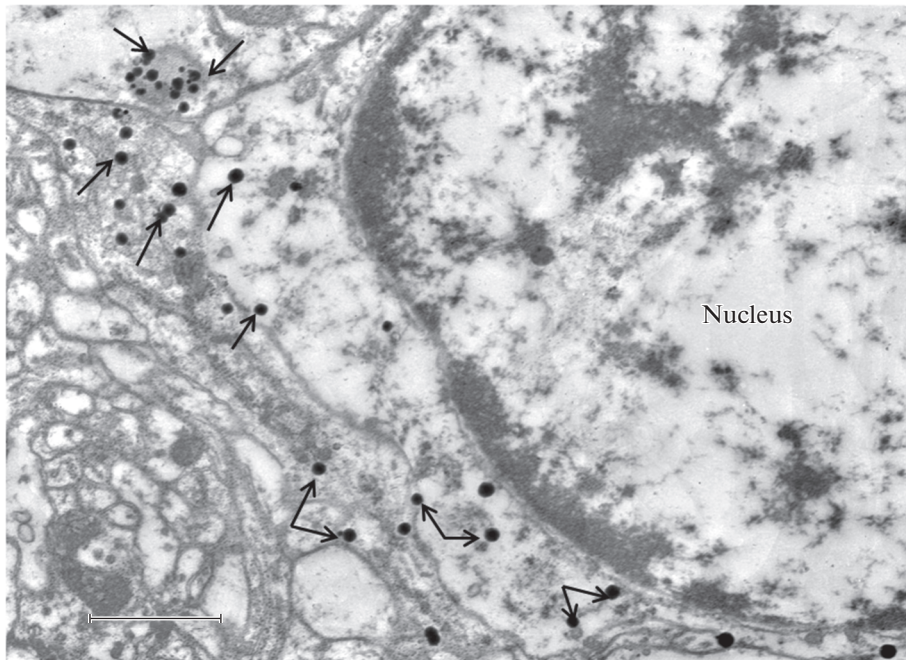


Рис. 2. Иммулокализация ГАМК в цитоплазме астроцита интранеокортикального трансплантата. Nucleus — ядро астроцита. Некоторые ГАМК-позитивные гранулы указаны стрелками. Масштаб: 1 мкм.

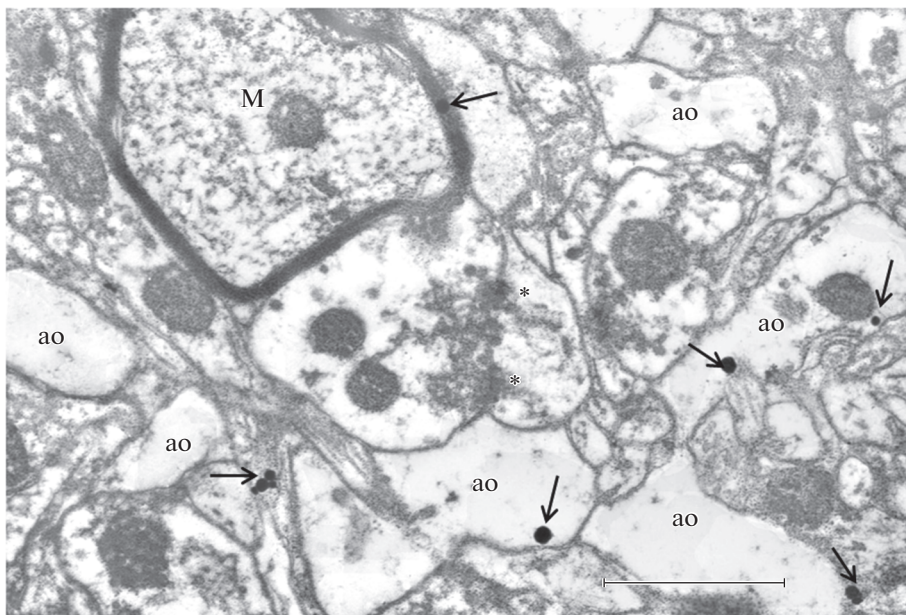


Рис. 3. Нейропил неокортикального трансплантата. М — миелинизированный аксон. Звездочками обозначены активные зоны возбуждающего синаптического контакта; ао — астроцитарные отростки (astrocytic outgrowth). Другие обозначения и масштаб как на рис. 2.

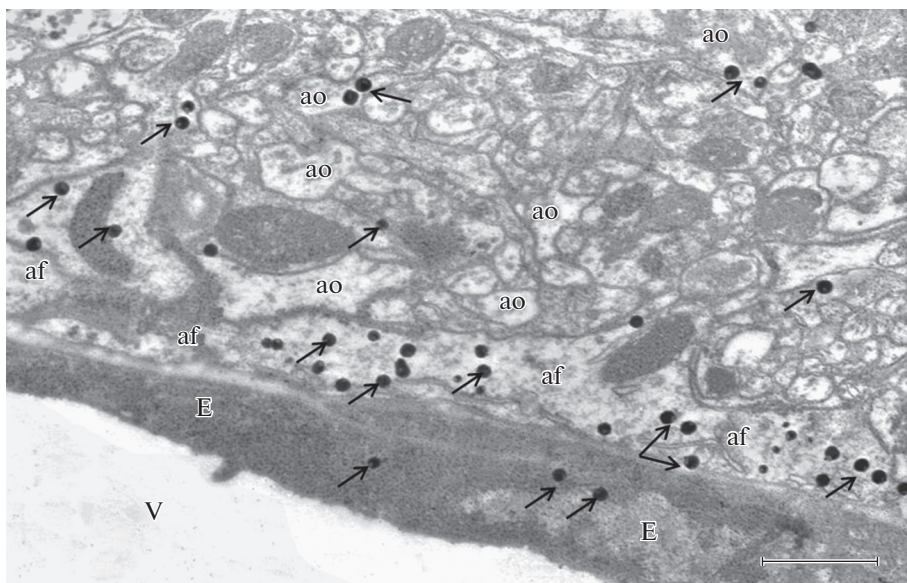


Рис. 4. Кровеносный капилляр в неокортикальном трансплантате. V — просвет сосуда; E — эндотелиальные клетки; af — перикапиллярные астроцитарные ножки (astrocytic foot), ao — астроцитарные отростки (astrocytic outgrowth). Другие обозначения и масштаб как на рис. 2 и 3.

тичное распределение, аналогичное тому, что в телах астроцитов. Перисинаптические астроцитарные отростки, расположенные около асимметричных возбуждающих синаптических контактов и представляющие один из компонентов трехчастных синапсов, также содержали редкие иммунопозитивные гранулы. Кроме того, продукт иммунореакции изредка наблюдали над профилями миелиновой оболочки аксонов (рис. 3). Следует отдельно отметить высокий уровень иммунореактивности в клеточной стенке кровеносных капилляров, что проявлялось не только в большом количестве ГАМК-положительных частиц в перикапиллярных астроцитарных концевых ножках, но и в достаточно выраженной экспрессии иммунометки в эндотелиальных клетках (рис. 4).

Накопление ГАМК в астроцитах и других ненейрональных клетках может происходить разными путями. Какое-то количество аминокислоты поступает за счет излишков нейромедиатора из тормозных синаптических окончаний с помощью специальных мембранных транспортеров [20]. Однако есть данные, что цитоплазматическая ГАМК быстро метаболизируется трансаминазой и одного обратного захвата окружающей аминокислоты недостаточно. Большая часть ГАМК в астроцитах синтезируется посредством декарбоксилирования глутамата, но не поглощением из экстраклеточного пространства. Наши ультраструктурные наблюдения иммунопозитивных гранул в астроцитах и их отростках вблизи возбуждающих глутаматергических (а не тормозных) синапсов свидетельствуют о существовании такого способа синтеза ГАМК в нейротрансплантатах. Кроме того, скопления ГАМК-содержащих глобул над митохондриями позволяют предположить, что в астроцитах неокортикальных трансплантатов реализуется дополнительный способ выработки ГАМК путем деградации путресцина митохондрий. Такой путь синтеза был обнаружен на ранних стадиях дифференцировки нейробластов, в которых активность ГДК, которая синтезирует ГАМК, не определялась [21]. Механизм синтеза

ГАМК из путресцина был также найден в астроцитах взрослых животных при моделировании болезни Альцгеймера и височной эпилепсии [16, 22]. На основании представленных данных литературы можно предположить, что дополнительный путь синтеза метаболитического пула ГАМК из путресцина также участвует в процессе формирования нейрональных связей в нейротрансплантатах.

В изученных нами нейротрансплантатах астроцитарная ГАМК, по-видимому, необходима также для поддержания баланса между возбуждением и торможением. Основанием для такого предположения являются данные о гипервозбудимости нейронов, легкой провокации эпилептиформной активности и о сниженном количестве ГАМК-ергических нейронов в аналогичных нейротрансплантатах [10, 23, 24]. Показано, что астроцитарная ГАМК действует через внесинаптические метаболитические рецепторы, генерирует тоническое торможение и обеспечивает противосудорожный механизм при височной эпилепсии и других неврологических расстройствах [16, 22, 25]. Вместе с тем в патологических ситуациях накопление астроцитарной ГАМК сочетается с гипертрофией глиоцитов и содержанием в них глиального фибриллярного кислого белка GFAP [25, 26]. В нейротрансплантатах ГАМК-содержащие астроциты не имели морфологических признаков реактивного состояния. В связи с этим мы полагаем, что роль астроцитарной ГАМК в условиях нейротрансплантации заключается не только в регулировании дифференцировки трансплантированных клеток и их адаптации к среде зрелого организма, но и в защите нейронов от гипервозбуждения.

Обнаружение в настоящей работе иммунореактивности в миелиновой оболочке некоторых аксонов, по-видимому, связано с продолжающейся дифференцировкой трансплантированных нейронов, миелинизацией аксонов и установлением нервных связей. Хотя в данной работе гистологическое исследование не выявило признаков неполной зрелости клеточных элементов в 4-месячных неокортикальных трансплантатах, ранее на ультраструктурном уровне мы отмечали наличие таких свидетельств даже в более поздний постоперационный период. В частности, в нейротрансплантатах были обнаружены конусы роста аксонов и дендритов, а также незрелые формы олигодендроглии [7, 8]. Существуют данные, что только незрелые олигодендроциты активно экспрессируют метаболитические рецепторы и обладают высокой чувствительностью к ГАМК [27]. Присутствие ГАМК в миелиновой оболочке можно также объяснить исследованиями, проведенными на зрелой нервной системе, в которых показано, что несинаптические сигнальные пути ГАМК участвуют в процессах узнавания аксонов и их миелинизации, способствуя тем самым репаративному восстановлению после повреждения [14, 15, 28]. По-видимому, в исследованных нами нейротрансплантатах также продолжается процесс реорганизации функциональных связей. Параллельно идущие регенеративно-дегенеративные процессы в синаптических окончаниях мы ранее наблюдали в интракортикальных трансплантатах гиппокамповой формации [7].

Представляют интерес полученные нами на неокортикальных нейротрансплантатах данные об иммунохимическом выявлении ГАМК в эндотелиальных клетках кровеносных капилляров. Помимо классической роли сосудистой сети для доставки кислорода и метаболитов, необходимых нервным и глиальным клеткам, сосуды являются мощными сигнальными системами, которые контролируют различные клеточные процессы во время развития. ГАМК, действуя на соседние клетки несинаптическим, паракринным способом, выполняет функцию нейротрофического фактора, регулирует ангиогенез и способствует формированию плотных контактов ГЭБ [29, 30]. Авторы показали, что недостаток сигнализации посредством эндотелиальной ГАМК в эмбриогенезе приводит к нарушениям постнатального развития, неправильной миграции нейрональных предшественников и нейропсихическим заболева-

ниям в будущем. Присутствие ГАМК в эндотелии и астроцитарных концевых ножках капиллярной стенки свидетельствует об участии метаболической формы этой аминокислоты в организации астроцитарно-васкулярных клеточных комплексов в нейротрансплантатах. Известно, что зона интерфейса между кровеносными капиллярами и нервными элементами является функционально важным клеточным компартментом для поддержания гомеостаза ЦНС как в норме, так и при патологии [31, 32].

Таким образом, проведенное иммуноцитохимическое исследование неокортикальных нейротрансплантатов показало высокую экспрессию ГАМК в ненейрональных клетках, выполняющих разные функции. Наибольшая выраженность иммунометки в протоплазматических астроцитах свидетельствует о важности метаболического пула ГАМК не только как нейротрофического фактора, но и как молекулярного субстрата для установления тонических тормозных процессов в нейротрансплантатах. Накопление ГАМК в эндотелиальных клетках и в миелиновой оболочке является дополнительным признаком пролонгированного развития трансплантированной ткани и процесса формирования аксональных связей. В то же время, следует отметить, что в полностью дифференцированном неокортексе зрелых животных (в том числе, и в соматосенсорной области) также присутствуют ГАМК-ергические астроциты, число которых возрастает при травме и в патологических ситуациях [33, 34].

Полученные результаты и данные литературы позволяют предположить, что в интранеокортикальных нейротрансплантатах, как и при естественном развитии мозга, метаболический пул ГАМК, содержащийся в ненейрональных клетках, участвует в дифференцировке и созревании фетальной нервной ткани и в сохранении тормозно-возбуждающего баланса в нейронных сетях.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтического комитета Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, протокол № 7/2022 от 5 марта 2022 г.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН № 075-00381-21-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование работы (З.Н.Ж.), проведение операций по трансплантации и постоперационный уход за животными (Г.И.Ж.), обработка материала для электронной микрокопии (Г.И.Ж.), микроскопические исследования, проведение иммуноцитохимической реакции (З.Н.Ж.), написание и редактирование манускрипта (З.Н.Ж., Г.И.Ж.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Электронно-микроскопические исследования выполнены на оборудовании ЦКП ПНЦБИ РАН (№ 670266).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cendelin J, Mitoma H* (2018) Neurotransplantation therapy. *Handb Clin Neurol* 155: 379–391. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64189-2.00025-1>
2. *Mitoma H, Manto M, Gandini J* (2019) Recent advances in the treatment of cerebellar disorders. *Brain Sci* 10(1): 11. <https://doi.org/10.3390/brainsci10010011>
3. *Gong Z, Xia K, Xu A, Yu C, Wang C, Zhu J, Huang X, Chen Q, Li F, Liang C* (2020) Stem cell transplantation: A promising therapy for spinal cord injury. *Curr Stem Cell Res Ther* 15(4): 321–331. <https://doi.org/10.2174/1574888X14666190823144424>
4. *Namestnikova DD, Cherkashova EA, Sukhinich KK, Gubskiy IL, Leonov GE, Gubsky LV, Majouga AG, Yarygin KN* (2020) Combined cell therapy in the treatment of neurological disorders. *Biomedicines* 8: 613. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8120613>
5. *Björklund A, Parmar M* (2021) Dopamine cell therapy: From cell replacement to circuitry repair. *J Parkinsons Dis* 11(2): 159–165. <https://doi.org/10.3233/JPD-212609>
6. *Li J-Y, Li W* (2021) Postmortem studies of fetal grafts in Parkinson’s disease: What lessons have we learned? *Front Cell Dev Biol* 9: 666675. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.666675>
7. *Zhuravleva ZN* (2005) The hippocampus and neurotransplantation. *Neurosci Behav Physiol* 35(4): 343–354. <https://doi.org/10.1007/s11055-005-0031-3>
8. *Zhuravleva ZN, Khutsian SS* (2014) Structural signs of dynamic state of synaptic contacts between neurotransplant and brain. *Bull Exp Biol Med* 156(4): 448–451. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2371-x>
9. *Sukhinich KK, Podgornyi OV, Aleksandrova MA* (2011) Immunohistochemical analysis of development of suspension and tissue neurotransplants. *Biol Bull*: 563. <https://doi.org/10.1134/S1062359011060136>
10. *Bragin A, Takács J, Vinogradova O, Zhuravleva Z, Hámori J* (1991) Number of GABA-immunopositive and GABA-immunonegative neurons in various types of neocortical transplants. *Exp Brain Res* 85(1): 114–128. <https://doi.org/10.1007/BF00229992>
11. *Buckmaster PS, Abrams E, Wen X* (2017) Seizure frequency correlates with loss of dentate gyrus GABAergic neurons in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 525(11): 2592–2610. <https://doi.org/10.1002/cne24226>
12. *Ben-Ari Y, Khalilov I, Kahle KT, Cherubini E* (2012) The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist* 18(5): 467–486. <https://doi.org/10.1177/1073858412438697>
13. *Kilb W, Kirischuk S, Luhmann HJ* (2013) Role of tonic GABAergic currents during pre- and early postnatal rodent development. *Front Neural Circuits* 7: 139. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00139>
14. *Bolneo E, Chau PYS, Noakes PG, Bellingham MC* (2022) Investigating the role of GABA in neural development and disease using mice lacking GAD67 or VGAT genes. *Int J Mol Sci* 23(14): 7965. <https://doi.org/10.3390/ijms23147965>
15. *Bai X, Kirchhoff F, Scheller A* (2021) Oligodendroglial GABAergic signaling: More than inhibition. *Neurosci Bull* 37(7): 1039–1050. <https://doi.org/10.1007/s12264-021-00693-w>
16. *Müller J, Timmermann A, Henning L, Müller H, Steinhauser C, Bedner P* (2020) Astrocytic GABA accumulation in experimental temporal lobe epilepsy. *Front Neurol* 11 (Article 61). <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.614923>
17. *Obata K, Hirono M, Kume N, Kawaguchi Y, Itohara S, Yanagawa Y* (2008) GABA and synaptic inhibition of mouse cerebellum lacking glutamate decarboxylase 67. *Biochem Biophys Res Commun* 370(3): 429–433. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.03.110>
18. *Kajita Y, Mushiake H* (2021) Heterogeneous GAD65 expression in subtypes of GABAergic neurons across layers of the cerebral cortex and hippocampus. *Front Behav Neurosci* 15 (Article 750869). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.750869>

19. Ormel L, Lauritzen KH, Schreiber R, Kunzelmann K, Gundersen V (2020) GABA, but not bestrophin-1, is localized in astroglial processes in the mouse hippocampus and the cerebellum. *Front Mol Neurosci* 13: 135.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.0013>
20. Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA (2004) Tonically active GABA(A) receptors: Modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* 27(5): 262–269.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.03.005>
21. Sequerra EB, Gardino P, Hedin-Pereira C, de Mello FG (2007) Putrescine as an important source of GABA in the postnatal rat subventricular zone. *Neuroscience* 146(2): 489–493.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.01.062>
22. Jo S, Yarishkin O, Hwang YJ, Chun YE, Park M, Woo DH, Bae JY, Kim T, Lee J, Chun H, Park HJ, Lee DY, Hong J, Kim HY, Oh S-J, Park SJ, Lee H, Yoon B-E, Kim YS, Jeong Y, Shim I, Bae YC, Cho J, Kowall NW, Ryu H, Hwang E, Kim D, Lee CJ (2014) GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Med* 20(8): 886–896.
<https://doi.org/10.1038/nm.3639>
23. Bragin AG, Bohne A, Vinogradova OS (1988) Transplants of the embryonal rat somatosensory neocortex in the barrel field of the adult rat: responses of the grafted neurons to sensory stimulation. *Neuroscience* 25(3): 751–758.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90034-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90034-6)
24. Zhuravleva ZN, Hutsyan SS, Zhuravlev GI (2016) Phenotypic differentiation of neurons in intraocular transplants. *Russ J Develop Biol* 47(3): 147–153.
<https://doi.org/10.7868/S0475145016030083>
25. Heo JY, Nam MH, Yoon HH, Kim J, Hwang YJ, Won W, Woo DH, Lee JA, Park HJ, Jo S, Lee MJ, Kim S, Shim J-E, Jang D-R, Kim KI (2020) Aberrant tonic inhibition of dopaminergic neuronal activity causes motor symptoms in animal models of Parkinson's disease. *Curr Biol* 30: 276–291.e9.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.079>
26. Pandit S, Neupane C, Woo J, Sharma R, Nam MH, Lee GS, Yi MH, Shin N, Kim DW, Cho H, Jeon BH, Kim H-W, Lee CJ, Park JB (2020) Bestrophin1-mediated tonic GABA release from reactive astrocytes prevents the development of seizure-prone network in kainate-injected hippocampi. *Glia* 68: 1065–1080.
<https://doi.org/10.1002/glia.23762>
27. Luyt K, Slade TP, Dorward JJ, Durant CF, Wu Y, Shigemoto R, Mundell S, Váradi A, Molnár E (2007) Developing oligodendrocytes express functional GABA(B) receptors that stimulate cell proliferation and migration. *J Neurochem* 100: 822–840.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04255.x>
28. Serrano-Regal MP, Luengas-Escuza I, Bayón-Cordero L, Ibarra-Aizpurua N, Alberdi E, Pérez-Samartín A, Matute C, Sánchez-Gómez MV (2020) Oligodendrocyte differentiation and myelination is potentiated via GABA. *Neuroscience* 439: 163–180.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.07.014>
29. Li S, Kumar TP, Joshee S, Kirschstein T, Subburaju S, Khalili JS, Kloepper J, Du C, Elkha A, Szabo G, Jain RK, Kohling R, Vasudevan A (2018) Endothelial cell-derived GABA signaling modulates neuronal migration and postnatal behavior. *Cell Res* 28(2): 221–248.
<https://doi.org/10.1038/cr.2017.135>
30. Choi YK, Vasudevan A (2019) Mechanistic insights into autocrine and paracrine roles of endothelial GABA signaling in the embryonic forebrain. *Sci Rep* 9(1): 16256.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-52729-x>
31. Segarra M, Aburto MR, Hefendehl J, Acker-Palmer A (2019) Neurovascular interactions in the nervous system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 35: 615–635.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100818-125142>
32. Peguera B, Segarra M, Acker-Palmer A (2021) Neurovascular crosstalk coordinates the central nervous system development. *Curr Opin Neurobiol* 69: 202–213.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.04.005>
33. Kilb W, Kirischuk S (2022) GABA release from astrocytes in health and disease. *Int J Mol Sci* 23(24): 15859.
<https://doi.org/10.3390/ijms232415859>
34. Ueberbach T, Simacek CA, Tegeder I, Kirischuk S, Mittmann T (2023) Tonic activation of GABAB receptors via GAT-3 mediated GABA release reduces network activity in the developing somatosensory cortex in GAD-GFP mice. *Front Synaptic Neurosci* 15: 1198159.
<https://doi.org/10.3389/fnsyn.2023.1198159>

Non-Neuronal GABA in Neocortical Neurografts of the Rats

Z. N. Zhuravleva^{a, *} and G. I. Zhuravlev^b

^aInstitute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Science, Pushchino, Moscow Region, Russia

^bInstitute of Cell Biophysics, Russian Academy of Science, Pushchino, Moscow Region, Russia

**e-mail: zina_zhur@mail.ru*

Gamma aminobutyric acid (GABA) plays an important role in regulating the development and functioning of the brain. The aim of this work was to study the involvement of GABA contained in non-neuronal cells in the differentiation and maturation of rat neocortical grafts. Pieces of fetal somatosensory neocortex were transplanted into the acute cavity of the homotopic region of the cortex of adult male rats. 4 months after the operation, the histological and electron microscopic examinations of the grafts were performed. The grafts were well vascularized and consisted of neuronal and glial cells. The localization of GABA in non-neuronal cells was studied by an ultrastructural immunocytochemistry using antibodies conjugated with colloidal gold. The highest expression of immunolabels in the form of electron-dense globules ranging in size from 20 to 60–80 nm was found in protoplasmic astrocytes and their processes. The pericapillary astrocytic endfeet also contained GABA-positive granules. In addition, GABA-positive granules have been observed in some myelin-forming cells and in the endothelial wall of blood vessels. The results obtained showed that GABAergic signaling via non-neuronal cells is involved in the morphofunctional differentiation of the transplanted neocortical tissue.

Keywords: neocortical allografts, differentiation, GABA, ultrastructural immunocytochemistry, non-neuronal cells, astrocytes, endothelial cells