

УДК 612.74:57.085.2

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА УГНЕТАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОЦЕСС ОБРАЗОВАНИЯ МИОТРУБОК В КУЛЬТУРЕ

© 2023 г. А. Р. Токмакова^а, Г. В. Сибгатуллина^а, К. Р. Гилиждинова^б, А. И. Маломуж^{а, с, *}

^а Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН,
Казань, 420111 Россия

^б Казанский федеральный университет, Казань, 420008 Россия

^с Казанский национальный исследовательский технический университет
им. А.Н. Туполева — КАИ, Казань, 420111 Россия

*e-mail: artur57@list.ru

Поступила в редакцию 16.04.2023 г.

После доработки 20.05.2023 г.

Принята к публикации 24.05.2023 г.

Гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) принято рассматривать как сигнальную молекулу в синапсах центральной нервной системы, где она играет роль основного тормозного нейромедиатора в зрелом мозге и участвует в процессе нейрогенеза. Недавно были получены данные, указывающие на то, что ГАМК может участвовать и на ранних этапах процесса развития скелетной мышечной ткани. В настоящем исследовании, выполненном на культуре миоцитов крысы, было проанализировано влияние экзогенной ГАМК на процесс слияния миоцитов в миотрубки (по анализу такого морфометрического показателя как “индекс слияния”). Добавление аминокислоты в культуру приводило к значительному концентрационно-зависимому угнетению (вплоть до полной остановки) процесса образования миотрубок. Из возможных белков, способных опосредовать влияние аминокислоты, рассматривались ГАМК_A рецепторы и транспортеры ГАМК (GAT-2). Методами иммуногистохимии были получены доказательства наличия этих белков на культивируемых клетках. Блокада ГАМК_A рецепторов габазином никак не сказывалась на индексе слияния, и ГАМК в его присутствии продолжала оказывать свое угнетающее действие. Ингибирование ГАМК транспортеров никлотиковой кислотой само по себе снижало индекс слияния миоцитов, однако на фоне действия блокатора транспортеров собственный эффект ГАМК уже отсутствовал. Полученные данные согласуются с высказанной гипотезой об участии аминокислоты ГАМК на ранних этапах развития скелетной мускулатуры и предполагают, что угнетающий эффект экзогенной аминокислоты может быть обусловлен увеличением ее концентрации в саркоплазме, поскольку и добавление блокатора ГАМК транспортеров и повышение внеклеточной концентрации ГАМК негативно сказываются на образовании миотрубок.

Ключевые слова: миогенез, миоцит, миотрубка, ГАМК

DOI: 10.31857/S0233475523050134, **EDN:** OMGNCS

ВВЕДЕНИЕ

Изучение процессов миогенеза и сигнальных путей его регуляции имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение, поскольку это позволяет понять причины возникновения ряда заболеваний, связанных с изменениями в мышечном аппарате, и способствует разработке подходов для их лечения. Кроме того, эти знания создают фундамент для направленных исследований в области тканевой инженерии и регенеративной клеточной терапии для лечения атрофии мышц различного генеза и восстановления скелетной мышцы вследствие травматического повреждения.

Процесс образования любой скелетной мышцы из клеток предшественников — миобластов, достаточно сложный, и в нем выделяют несколько стадий, среди которых одной из ключевых является стадия слияния миоцитов в миотрубки (незрелые мышечные волокна) [1].

К настоящему моменту установлен целый ряд генов и сигнальных каскадов, управляющих процессами слияния мышечных клеток в миотрубки [2]. Относительно недавно были получены экспериментальные свидетельства, указывающие на то, что в процессе миогенеза у млекопитающих может участвовать и такая сигнальная молекула как гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), ко-

тору ранее рассматривали исключительно в качестве одного из основных нейромедиаторов центральной нервной системы [3]. Молекулы этой аминокислоты обнаруживаются в цитоплазме как развивающихся миоцитов, так и в образуемых миотрубках. По мере созревания мышечного волокна количество ГАМК снижается, и в зрелых волокнах она не обнаруживается [4]. Это и позволило предположить участие данной аминокислоты на ранних стадиях миогенеза. В пользу данного предположения свидетельствуют экспериментальные данные, демонстрирующие угнетение процесса слияния миоцитов при повышении внеклеточной концентрации ГАМК [5]. Однако каков механизм этого влияния аминокислоты, и какие белки могут опосредовать данный процесс, оставалось до сих пор не выясненным, что и стало целью настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на культуре миоцитов, выделенных из икроножной мышцы 3-дневных крыс, согласно протоколу [6]. Процесс образования миотрубок в культуре оценивался по подсчету “индекса слияния”, который определяется как соотношение числа ядер в миотрубках к общему числу ядер в поле зрения [7]. Для визуализации ядер препараты окрашивали 2% раствором орсеина (Fluka, Испания). При подсчете индекса слияния оценивали не менее 20 полей зрения на каждом препарате.

Иммуноцитохимическое окрашивание препаратов проводили по методике, описанной нами ранее [4]. Наличие в мембранах культивируемых клеток белков-кандидатов, способных опосредовать влияние внеклеточной ГАМК (ГАМК_A рецепторы и ГАМК транспортеры), оценивали с помощью соответствующих специфических антител: для рецепторов — GABAA (1 : 200, Santa Cruz Biotechnology, США), для транспортеров — GAT-2 (1 : 200, Alamone Labs, Израиль). Было проанализировано не менее 500 клеток в каждом образце для каждой из 3 индивидуально полученных клеточных культур.

Добавление в культуру фармакологических препаратов осуществлялось однократно на 3-и сут культивирования, оценку параметров проводили через 24 ч после внесения препаратов. В исследовании использовали: ГАМК (1–100 мМ, Sigma-Aldrich, США), антагонист ионотропных ГАМК_A рецепторов габазин (10 мМ, Sigma-Aldrich) и блокатор ГАМК транспортеров нипекотиновую кислоту (10 мМ, Sigma-Aldrich).

В экспериментах было проанализировано 12 индивидуально полученных культур миоцитов и для каждой серии было использовано от 3 до 6 препаратов. В каждом эксперименте с культурой имел-

ся свой контроль (культура без внесения фармакологических препаратов), при этом достоверной разницы между контрольными значениями обнаружено не было.

Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистическую значимость различий оценивали с помощью ANOVA. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате культивирования высеванных миоцитов первые миотрубки, которые идентифицировались как клеточные элементы, содержащие 3 и более ядер, выявлялись уже на 3-и сут. На 4-е сут в культуре идентифицировалось значительное количество образованных миотрубок, которые имели в среднем по 6 ядер. Индекс слияния составил 0.15, т.е. 15% ядер от всей популяции культивируемых клеток находилось в составе миотрубок.

При добавлении в среду ГАМК в концентрации 1 мМ наблюдалось снижение индекса слияния на 27% ($p < 0.05$, рис. 1). При этом миотрубки содержали в среднем по 7 ядер.

При повышении концентрации аминокислоты до 10 мМ имело место более выраженное снижение индекса слияния, величина которого уменьшалась на 47% ($p < 0.05$, рис. 1). Среднее значение количества ядер составляло 6 и не отличалось от контроля ($p > 0.05$). Однако было отмечено, что, если в контрольных культурах и культурах с добавлением 1 мМ ГАМК обнаруживались миотрубки, содержащие более 20 ядер, то в случае с 10 мМ таких клеточных элементов обнаружено не было.

Дальнейшее повышение концентрации экзогенно добавляемой аминокислоты до 100 мМ привело к выраженному угнетающему эффекту на процесс образования миотрубок. Индекс слияния по сравнению с контролем снизился на 73% ($p < 0.05$, рис. 1). При этом в культуре обнаруживались редкие миотрубки, содержащие максимум 3 ядра.

Таким образом, увеличение концентрации непротеиногенной аминокислоты ГАМК угнетает процесс слияния миоцитов в культуре. При этом снижается не только количество образуемых миотрубок, но и общее количество ядер в них. Эти результаты полностью подтверждают недавно полученные нами данные о негативном влиянии экзогенной аминокислоты на процесс миогенеза [5].

На основании того, что ГАМК присутствует в саркоплазме как миоцитов, так и в образующихся миотрубках, и в развивающихся мышечных волокнах [4], были сделаны следующие предположения: (i) ГАМК играет некую межклеточную сигнальную функцию, которая влияет на процесс

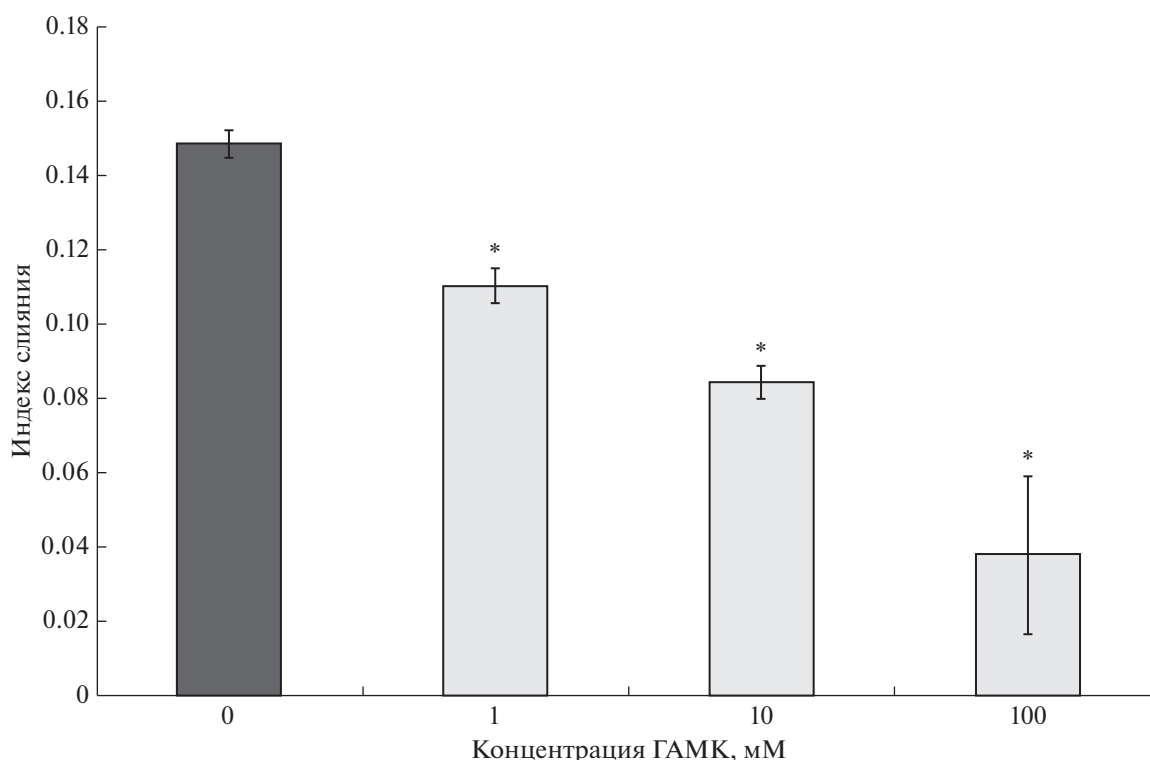


Рис. 1. Угнетающее влияние ГАМК на процесс образования миотрубок из миоцитов крыс: изменения индекса слияния миоцитов на 4-е сут культивирования после 24 ч аппликации различных концентраций аминокислоты. Темно-серый столбик — значение индекса слияния в контрольной группе. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

развития мышечной ткани; (ii) ГАМК тем или иным образом участвует в клеточном метаболизме, сопровождающим процесс миогенеза. Проверка этих предположений и легла в основу дальнейших этапов настоящего исследования, в котором ГАМК использовали в концентрации 10 мМ.

Сигнальная функция ГАМК опосредуется как рецепторами, так и транспортерами [8, 9]. Поскольку на культуре миоцитов *Xenopus* были выявлены ионотропные функциональные ГАМК_A рецепторы, а в нервно-мышечном синапсе крысы обнаружены транспортеры ГАМК GAT-2 [10, 11], то именно на них и решено было сосредоточить внимание в нашем исследовании.

Иммуногистохимическое окрашивание культуры миоцитов на ГАМК_A рецепторы не выявило наличия этих рецепторов на миоцитах. В то же время на поверхности образуемых в культуре миотрубок наблюдалось специфическое окрашивание (рис. 2), свидетельствующее о том, что миотрубки млекопитающих экспрессируют ГАМК_A рецепторы.

При иммуногистохимическом окрашивании культуры на транспортер ГАМК (GAT-2) были получены следующие данные. На 1-е сут иммуноположительную реакцию к антителам имели еди-

ничные миоциты. На 2-е сут их количество увеличивалось. На 3-и сут флуоресцентный сигнал исходил как от миоцитов, так и от миотрубок, демонстрируя достаточно яркую специфическую окраску (рис. 2).

Следовательно, в культуре миоцитов крысы клетки экспрессируют оба мембранных белка ГАМКергической сигнализации, способных опосредовать действие экзогенно добавляемой ГАМК.

Возможность участия ГАМК_A рецепторов в угнетающем влиянии аминокислоты на процесс образования миотрубок оценивали с помощью аппликации блокатора этого типа рецепторов габазина [12]. Добавление только данного антагониста в концентрации 10 мМ не оказало никакого влияния на индекс слияния миоцитов, а в присутствии габазина ГАМК продолжала оказывать свое угнетающее влияние на образование миотрубок в полном объеме и индекс слияния снизился на 50% (рис. 3). Следовательно, механизм ингибирующего действия ГАМК на процесс образования миотрубок никак не затрагивает ионотропные ГАМК_A рецепторы, экспрессирующиеся на сарколемме развивающихся мышечных волокон.

Для оценки роли транспортеров ГАМК в механизме угнетающего миогенез эффекта экзоген-

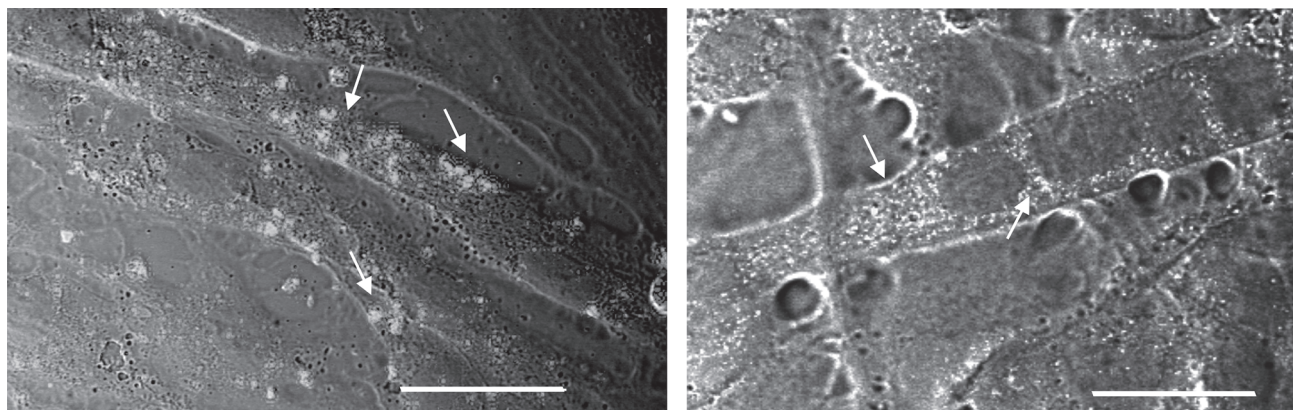


Рис. 2. Иммунопозитивное окрашивание культуры миоцитов и образуемых миотрубок на наличие ГАМК_A рецепторов (слева) и транспортеров ГАМК GAT-2 (справа). Масштаб – 25 мкм. Стрелками указаны примеры паттернов иммунопозитивного окрашивания (светлые участки).

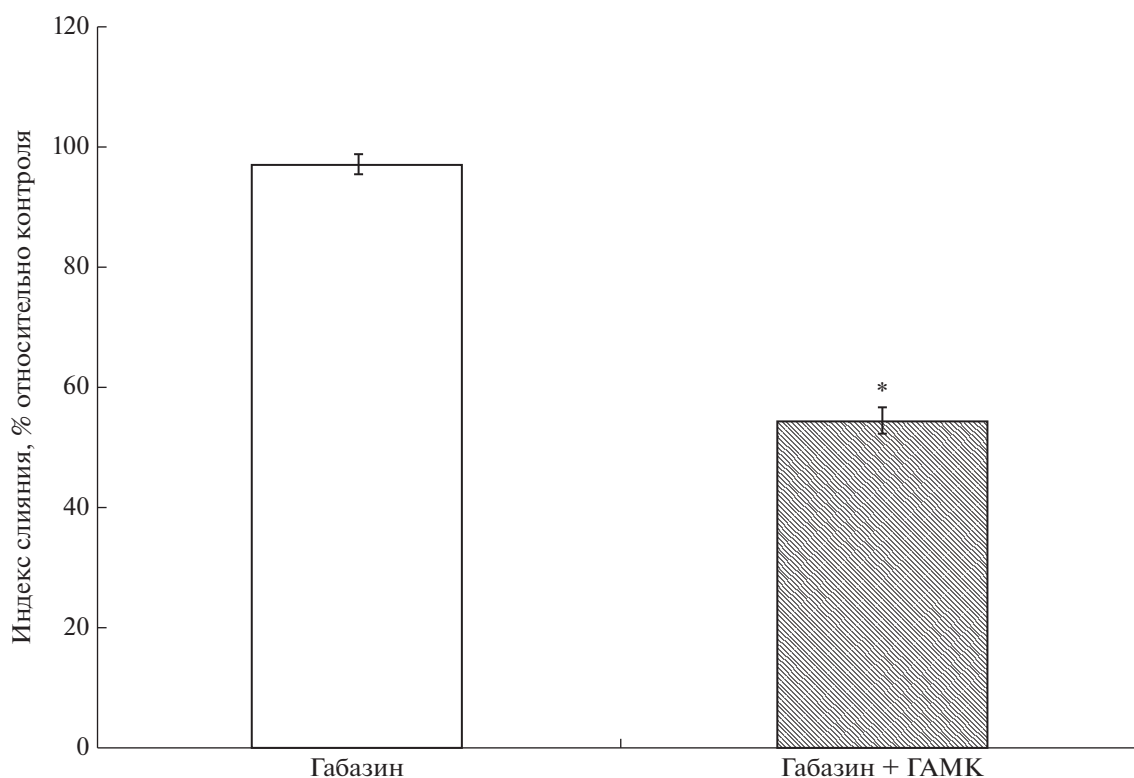


Рис. 3. Отсутствие эффекта блокатора ГАМК_A рецепторов габазина (10 мМ) на индекс слияния миоцитов и наличие угнетающего миогенез действия ГАМК (10 мМ) в присутствии блокатора рецепторов. Изменения индекса слияния миоцитов выражены в % от контрольного значения для образцов без внесения фармакологических агентов, принятого за 100%. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

ной аминокислоты использовали ингибитор этих белков — нипекотиновую кислоту [13]. Аппликация этого фармакологического агента в концентрации 10 мМ привело к снижению индекса слияния на 43% от контроля ($p < 0.05$). В то же время ГАМК в присутствии нипекотиновой кислоты полностью теряла способность оказывать угнета-

ющее влияние на миогенез, и значение индекса слияния при совместной аппликации аминокислоты и блокатора не отличалось от значения, полученного только в присутствии нипекотиновой кислоты (рис. 4).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в исследуемой культуре присутствуют и функ-

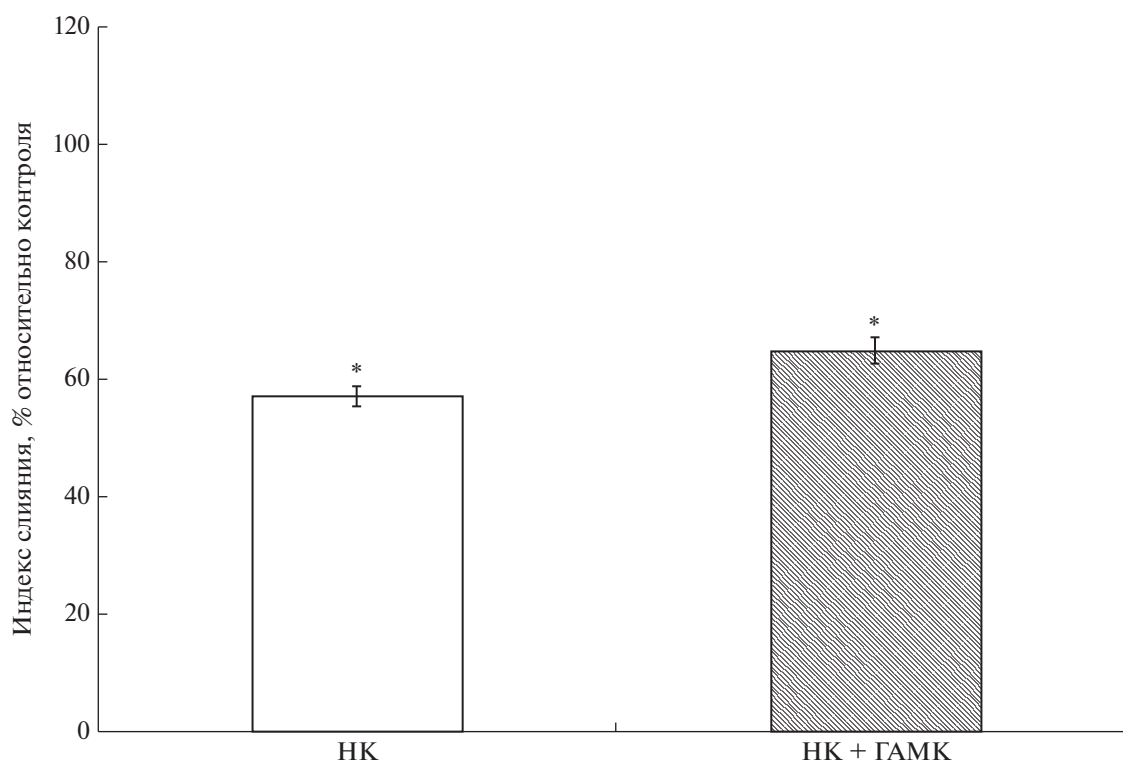


Рис. 4. Угнетающий эффект блокатора ГАМК транспортеров никотиновой кислоты (НК, 10 мМ) на процесс образования миотрубок и отсутствие влияния ГАМК (10 мМ) при совместной аппликации с этим блокатором (НК + ГАМК). Изменения индекса слияния миоцитов выражены в % от контрольного значения для образцов без внесения фармакологических агентов, принятого за 100%. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

ционируют ГАМК транспортеры (как минимум, GAT-2), и их инактивация приводит к ингибированию образования миотрубок.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании на культуре миоцитов млекопитающего получены следующие основные результаты. Во-первых, увеличением концентрации экзогенной ГАМК можно добиться практически полного ингибирования процесса слияния миоцитов в миотрубки. Во-вторых, блокада ГАМК_A рецепторов никак не отражается на процессе слияния миоцитов и не влияет на развитие угнетающего эффекта внеклеточной ГАМК. В-третьих, блокада ГАМК транспортеров миоцитов негативно сказывается на образовании миотрубок в культуре, однако на фоне инактивации этих мембранных белков устраняется собственный угнетающий эффект ГАМК.

Физиологическое действие на клетку экстракционной ГАМК в большинстве своем опосредуется активацией специфических рецепторов к этой аминокислоте: ионотропных ГАМК_A и метаботропных ГАМК_B рецепторов [14, 15]. Относительно недавно особняком выделяли также ионо-

тропные ГАМК_C рецепторы, однако в настоящее время эти белки принято обозначать как ГАМК_ρ рецепторы и относить их к группе ГАМК_A (ГАМК_{A-ρ}) [15, 16]. Доказано непосредственное участие рецепторов ГАМК в регуляции миграции и пролиферации как нейрональных [17], так и не нейрональных клеток [18]. В нашем случае мы получили доказательства отсутствия участия ГАМК_A рецепторов в механизме реализации эффекта экзогенного ГАМК на миогенез. Возможно, что рецепторы ГАМК_B или ГАМК_{A-ρ} (наличие которых на миоцитах и миотрубках, в отличие от ГАМК_A рецепторов, еще не подтверждено) могли бы опосредовать воздействие экзогенной ГАМК, однако это маловероятно, поскольку эффект ГАМК полностью отсутствовал на фоне блокатора ГАМК транспортеров.

Выявленный нами факт снижения индекса слияния миоцитов при ингибировании ГАМК транспортеров и отсутствие на этом фоне эффекта экзогенно апплицируемой ГАМК позволяет предположить значительную роль именно внутриклеточной ГАМК. Согласно классическим представлениям о ГАМКергической сигнализации в нервной системе, функционирование транспортеров аминокислоты направлено на удаление ГАМК из

внутриклеточного пространства [19, 20]. Однако в условиях отсутствия синапса функционирование ГАМКергической системы может кардинально изменяться. Установлено, что в развивающихся нейронах ГАМК_A рецепторы, которые способны пропускать ионы хлора, вызывают не гиперполяризацию, как в зрелых нейронах, а наоборот, деполяризацию [21]. О возможности реверсивной работы ГАМК транспортеров, при которой имеет место выкачивание молекул аминокислоты из клетки во внеклеточное пространство известно достаточно давно [22] и этот феномен уже подтвержден многократно не только в развивающихся, но и в зрелых клетках [23–25], и в частности, для транспортеров GAT-2/3 типа [20, 26]. Оказалось, что различные подтипы транспортеров могут проявлять разные “реверсивные профили” [27].

Одним из объяснений того, что и ингибирование ГАМК транспортеров, и увеличение экстраклеточной концентрации ГАМК приводит к угнетению процесса слияния миоцитов, может быть увеличение внутриклеточного содержания аминокислоты. В пользу этого предположения свидетельствуют экспериментальные данные о том, что транспортер ГАМК обычно работает при некотором “равновесии” в концентрации аминокислоты по обе стороны мембраны, и его (транспортер) можно легко заставить работать в обратном направлении путем увеличения цитозольной ГАМК [25]. Однако, каково в действительности направление переноса ГАМК через ГАМК транспортеры в культуре миоцитов в норме и при повышенной концентрации аминокислоты в экстраклеточной среде, пока остается неизвестным. Ответ на этот вопрос может быть получен в дальнейшем при оценке внутриклеточного уровня ГАМК в условиях ингибирования транспортеров и аппликации в культуру экзогенной ГАМК.

Таким образом, в настоящем исследовании были получены результаты, подтверждающие ранее высказанное предположение об участии ГАМК в ранних этапах развития скелетной мускулатуры [4, 5]. Механизм угнетающего влияния аминокислоты на процесс образования миотрубок реализуется при участии трансмембранных транспортеров ГАМК.

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

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ КазНЦ РАН (122011800137-0) с использованием оборудования ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН.

Соответствие принципам этики. Все эксперименты проведены в строгом соответствии с международными биоэтическими нормами и одобре-

ны комиссией по биоэтике ФИЦ КазНЦ РАН (протокол № 22/6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abmayr S.M., Pavlath G.K. 2012. Myoblast fusion: Lessons from flies and mice. *Development*. **139** (4), 641–656.
<https://doi.org/10.1242/dev.068353>
2. Murphy M., Kardon G. 2011. Origin of vertebrate limb muscle: The role of progenitor and myoblast populations. *Curr. Top. Dev. Biol.* **96**, 1–32.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385940-2.00001-2>
3. Watanabe M., Maemura K., Kanbara K., Tamayama T., Hayasaki H. 2002. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int. Rev. Cytol.* **213**, 1–47.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(02\)13011-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(02)13011-7)
4. Sibgatullina G.V., Malomouzh A.I. 2020. GABA in developing rat skeletal muscle and motor neurons. *Protoplasma*. **257** (3), 1009–1015.
<https://doi.org/10.1007/s00709-020-01485-1>
5. Sibgatullina G., Al Ebrahim R., Gilizhdinova K., Tokmakova A., Malomouzh A. 2023. Differentiation of myoblasts in culture: Focus on serum and GABA. *Cells Tissues Organs*. (In press).
<https://doi.org/10.1159/000529839>
6. Das M., Rumsey J.W., Bhargava N., Stancescu M., Hickman J.J. 2010. A defined long-term in vitro tissue engineered model of neuromuscular junctions. *Biomaterials*. **31** (18), 4880–4888.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.055>
7. Baccam A., Benoni-Svircovich A., Rocchi M., Moresi V., Seelaender M., Li Z., Adamo S., Xue Z., Coletti D. 2019. The mechanical stimulation of myotubes counteracts the effects of tumor-derived factors through the modulation of the activin/follistatin ratio. *Front. Physiol.* **10**: 401.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00401>
8. Wu C., Sun D. 2015. GABA receptors in brain development, function, and injury. *Metab. Brain. Dis.* **30** (2), 367–379.
<https://doi.org/10.1007/s11011-014-9560-1>
9. Zhou Y., Danbolt N.C. 2013. GABA and glutamate transporters in brain. *Front. Endocrinol (Lausanne)*. **4**, 165.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00165>
10. Borodinsky L.N., Spitzer N.C. 2007. Activity-dependent neurotransmitter-receptor matching at the neuromuscular junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104** (1), 335–340.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0607450104>
11. Nurullin L.F., Nikolsky E.E., Malomouzh A.I. 2018. Elements of molecular machinery of GABAergic signaling in the vertebrate cholinergic neuromuscular junction. *Acta. Histochem.* **120** (3), 298–301.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.003>
12. Bai D., Zhu G., Pennefather P., Jackson M.F., MacDonald J.F., Orser B.A. 2001. Distinct functional and

- pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by gamma-aminobutyric acid(A) receptors in hippocampal neurons. *Mol. Pharmacol.* **59** (4), 814–824.
<https://doi.org/10.1124/mol.59.4.814>
13. Moldavan M., Cravetchi O., Allen C.N. 2017. GABA transporters regulate tonic and synaptic GABA_A receptor-mediated currents in the suprachiasmatic nucleus neurons. *J. Neurophysiol.* **118** (6), 3092–3106.
<https://doi.org/10.1152/jn.00194.2017>
 14. Bowery N.G., Bettler B., Froestl W., Gallagher J.P., Marshall F., Raiteri M., Bonner T.I., Enna S.J. 2002. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: Structure and function. *Pharmacol. Rev.* **54**, 247–264.
<https://doi.org/10.1124/pr.54.2.247>
 15. Olsen R.W., Sieghart W., 2008. International union of pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: Classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol. Rev.* **60**, 243–260.
<https://doi.org/10.1124/pr.108.00505>
 16. Naffaa M.M., Hung S., Chebib M., Johnston G.A.R., Hanrahan J.R., 2017. GABA-ρ receptors: Distinctive functions and molecular pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* **174** (13), 1881–1894.
<https://doi.org/10.1111/bph.13768>
 17. Behar T.N., Schaffner A.E., Scott C.A., Greene C.L., Barker J.L., 2000. GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb. Cortex.* **10**, 899–909.
<https://doi.org/10.1093/cercor/10.9.899>
 18. Kleinrok Z., Matuszek M., Jesipowicz J., Matuszek B., Opolski A., Radzikowski C., 1998. GABA content and GAD activity in colon tumors taken from patients with colon cancer or from xenografted human colon cancer cells growing as s.c. tumors in athymic nu/nu mice. *J. Physiol. Pharmacol.* **49**, 303–310.
 19. Moss F.J., Imoukhuede P.I., Scott K., Hu J., Jankowsky J.L., Quick M.W., Lester H.A., 2009. GABA transporter function, oligomerization state, and anchoring: Correlates with subcellularly resolved FRET. *J. Gen. Physiol.* **134** (6), 489–521.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200910314>
 20. Kardos J., Dobolyi Á., Szabó Z., Simon Á., Lourmet G., Palkovits M., Héja L. 2019. Molecular plasticity of the nucleus accumbens revisited—astrocytic waves shall rise. *Mol. Neurobiol.* **56**, 7950–7965.
<https://doi.org/10.1007/s12035-019-1641-z>
 21. Ben-Ari Y., Khalilov I., Kahle K.T., 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>
 22. Attwell D., Barbour B., Szatkowski M., 1993. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron.* **11** (3), 401–407.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90145-h](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90145-h)
 23. Levi G., Raiteri M., 1993. Carrier-mediated release of neurotransmitters. *Trends Neurosci.* **16** (10), 415–419.
[https://doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90010-j](https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90010-j)
 24. Pin J.P., Bockaert J., 1989. Two distinct mechanisms, differentially affected by excitatory amino acids, trigger GABA release from fetal mouse striatal neurons in primary culture. *J. Neurosci.* **9** (2), 648–656.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-02-00648.1989>
 25. Wu Y., Wang W., Richerson G.B. 2001. GABA transaminase inhibition induces spontaneous and enhances depolarization-evoked GABA efflux via reversal of the GABA transporter. *J. Neurosci.* **21** (8), 2630–2639.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-08-02630.2001>
 26. Héja L., Simon Á., Szabó Z., Kardos J. 2019. Feedback adaptation of synaptic excitability via Glutamate: Na⁺ symport driven astrocytic GABA and Gln release. *Neuropharmacology.* **161**, 107629.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.05.006>
 27. Conti F., Minelli A., Melone M., 2004. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: Localization, development and pathological implications. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **45** (3), 196–212.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.03.003>

The Study of the Mechanism of Gamma-Aminobutyric Acid Inhibitory Effect on the Myotube Formation Process in Cell Culture

A. R. Tokmakova¹, G. V. Sibgatullina¹, K. R. Gilizhdinova², A. I. Malomouzh^{1, 3, *}

¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111 Russia

²Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

³Kazan National Research Technical University named after A.N. Tupolev (KAI), Kazan, 420111 Russia

*e-mail: artur57@list.ru

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is commonly regarded as a signaling molecule in CNS synapses, where it plays the role of the main inhibitory neurotransmitter in the mature brain and is involved in the process of neurogenesis. Recently, data have been obtained indicating that GABA can also be involved in the early stages of the skeletal muscle development process. In the present study performed on rat cultured myocytes, we analyzed the effect of exogenous GABA on the process of myocyte fusion into myotubes as assessed by the

morphometric parameter “fusion index”. Addition of GABA to the cell culture resulted in a significant concentration-dependent inhibition, up to complete cessation, of myotube formation. Of possible proteins that can mediate this effect, GABA_A receptors and GABA transporters (GAT-2) have been considered. Evidence of the presence of these proteins on cultured cells was obtained by immunohistochemistry methods. The blockade of GABA_A receptors by gabazine had no effect on the fusion index, and GABA exerted its inhibitory effect in the presence of gabazine. Inhibition of GABA transporters by nipecotic acid, in itself, reduced the myocyte fusion index; however, there was no effect of GABA in the presence of this blocker of GABA transporters. The data obtained are consistent with the hypothesis about the participation of GABA in the early stages of skeletal muscle development. Results suggest that the inhibitory effect of exogenous GABA may be due to an increase in its concentration in the sarcoplasm, since both the addition of a GABA transporter inhibitor and an increase in the extracellular concentration of GABA inhibited the formation of myotubes.

Keywords: myogenesis, myocyte, myotube, GABA