

Влияние L-альфа-аминоадипиновой кислоты на нейроны и глиальные клетки стриатума мозга крыс

Д.Н. Воронков, Р.М. Худоерков, Ю.В. Дикалова, А.В. Ставровская, А.С. Гущина, А.С. Ольшанский

ФГБНУ Научный центр неврологии, Москва, Россия

Введение. Роль взаимодействия нейронов и нейроглии в нейродегенеративном процессе остается до конца не выясненной, и в этом отношении важное значение отводится поиску новых экспериментальных моделей. L-альфа-аминоадипиновая кислота (L-AA), структурный аналог глутамата, обладающая избирательным токсическим действием на астроглию, привлекает к себе все больше внимания исследователей. Однако морфологические и нейрохимические изменения, вызываемые L-AA, изучены недостаточно. Цель исследования – охарактеризовать иммуноморфологические изменения нейроглии и нейронов в стриатуме мозга крыс при стереотаксическом введении токсина L-AA.

Материалы и методы. На 3-й и 12-й день после введения крысам L-AA исследовали иммунофлуоресцентными методами локализацию астроцитарных белков – GFAP, виментина и глутаминсинтетазы, а также олигодендроглии (по экспрессии циклонуклеотидфосфатазы), микроглии (Ca-связывающий белок IBA1) и нейронов (ядерный белок NeuN) и оценивали пролиферативную активность по локализации Ki67.

Результаты. В зоне повреждения обнаружили гибель астроцитов и снижение иммунореактивности к глутаминсинтетазе, но не выявили изменений плотности реактивной микроглии и влияния L-AA на нейроны и олигодендроглию. Погибшие астроциты замещались за счет пролиферации и миграции незрелых астроцитов, и к 12-му дню после операции формировался глиальный рубец.

Заключение. Локальное введение L-AA, вызывающее гибель астроцитов стриатума, может служить удобной моделью для изучения реактивных изменений астроглии и астроцитарной дисфункции при раскрытии патогенетических закономерностей нейродегенеративных процессов.

Ключевые слова: астроциты, стриатум, L-альфа-аминоадипиновая кислота, глиоз, глиальный токсин

Для корреспонденции: Дмитрий Николаевич Воронков. E-mail: voronkov@neurology.ru

Для цитирования: Воронков Д.Н., Худоерков Р.М., Дикалова Ю.В., Ставровская А.В., Гущина А.С., Ольшанский А.С. Влияние L-альфа-аминоадипиновой кислоты на нейроны и глиальные клетки стриатума мозга крыс. Клини. эксп. морфология. 2021;10(3):65–73. DOI: 10.31088/CEM2021.10.3.65-73.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Научного центра неврологии (№ АААА-А19-119091690081-1).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 29.04.2021. Получена после рецензирования 28.05.2021. Принята в печать 15.06.2021.

Effects of L-alpha-aminoadipic acid on neurons and glia of the rat brain striatum

D.N. Voronkov, R.M. Khudoerkov, Yu. V. Dikalova, A.V. Stavrovskaya, A.S. Guschina, A.S. Olshanskiy

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Introduction. Few published studies have examined the role of glia-neuron interactions in neurodegeneration. In this regard, the search for new experimental models is important. L-alpha-aminoadipic acid (L-AA), being a structural analogue of glutamate with a selective toxic effect on astroglia, is of particular interest. However, morphological and neurochemical changes caused by L-AA still remain unclear. The aim of the study was to characterize immunomorphological changes of glia and neurons in the striata of rats after L-AA administration.

Materials and methods. On days 3 and 12 after L-AA stereotaxic administration, we studied astrocytic proteins localization using immunofluorescence methods: GFAP, vimentin, glutamine synthetase, along with oligodendroglia (by cyclonucleotidphosphatase expression), microglia (IBA1 Ca-binding protein), neuronal nuclear protein NeuN, and the astroglia proliferative activity (based on Ki67 localization).

Results. We detected astrocyte death and a decrease in glutamine synthetase immunoreactivity in the lesioned area, but no changes in the microglia reaction and the L-AA effect on neurons and oligodendroglia.

The astrocyte loss was replenished by proliferation and migration of newly formed immature astrocytes, and a glial scar formed on day 12 after the surgery.

Conclusion. L-AA administration, which causes the death of striatum astrocytes in the injection area, can serve as a convenient model for studying reactive changes in astroglia and astrocytic dysfunction while revealing the pathogenetic patterns of neurodegenerative processes.

Keywords: astrocytes, striatum, L-alpha-aminoadipic acid, gliosis, glial toxin

Corresponding author: Dmitry N. Voronkov. E-mail: voronkov@neurology.ru

For citation: Voronkov D.N., Khudoerkov R.M., Dikalova Yu.V., Stavrovskaya A.V., Gushchina A.S., Olshanskiy A.S. Effects of L-alpha-aminoadipic acid on neurons and glia of the rat brain striatum. Clin. exp. morphology. 2021;10(3):65–73. DOI: 10.31088/CEM2021.10.3.65-73 (In Russ.).

Funding. The study was carried out in the framework of state assignment to the Research Center of Neurology (No. AAAA-A19-119091690081-1).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 29.04.2021. **Received in revised form** 28.05.2021. **Accepted** 15.06.2021.

Введение

L-альфа-аминоадипиновая кислота (L-AA) – продукт метаболизма лизина у млекопитающих. Стереоизомер L-AA ввиду структурного сходства с глутаматом взаимодействует с белками, вовлеченными в обмен этого медиатора [1, 2]. Уровень эндогенной L-AA повышен в тканях пациентов с α -кетoadипической ацидурией – редким наследственным нарушением метаболизма лизина, гидроксизина и триптофана, которое сопровождается у части из них широким спектром неврологической и психиатрической симптоматики [3]. В экспериментах показано повреждение астроцитов под влиянием L-AA [4, 5], а действие токсина охарактеризовано как *in vitro*, так и *in vivo* [6–9]. L-AA захватывается астроцитами, ингибирует Na-зависимый транспорт глутамата и нарушает его обмен, вызывая окислительный стресс, снижая синтез белка и приводя к апоптозу астроцитов [8, 10].

В последнее время в связи с ростом интереса к глинейрональным взаимодействиям в норме и при патологии увеличилось число работ с применением L-AA как глиального токсина: для оценки роли астроцитов в эпилептогенезе, развитии депрессии [11–13], исследования нейропротекторных и провоспалительных функций астроглии, при моделировании паркинсонизма и ишемического повреждения мозга [14, 15] и выяснения роли астроглии при когнитивных нарушениях [16, 17]. Было показано повреждение астроцитов при введении L-AA в разные структуры мозга – гиппокамп [9], префронтальную кору [6] и стриатум [7], однако изменения других клеточных популяций описаны неполно и требуют отдельной оценки.

Цель настоящего исследования – охарактеризовать иммуногистохимическими методами реакцию разных типов глии и нейронов в стриатуме мозга крыс Вистар при стереотаксическом введении L-альфа-аминоадипиновой кислоты.

Материалы и методы

В работе использовали крыс Вистар, полученных из питомника «Столбовая», самцов в возрасте 3,5–4 ме-

сяца. Животных содержали в виварии Научного центра неврологии при свободном доступе к пище и воде. Манипуляции с ними осуществляли в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных и международными регламентирующими документами. На исследование получено разрешение локального этического комитета (решение № 2-5/19 от 20 февраля 2019 года).

Стереотаксическая операция. L-альфа-аминоадипиновую кислоту (L-AA, Acros Organics, Бельгия) растворяли в 1М HCl в концентрации 120 мкг/мл и доводили до pH 7,3 с помощью 1М NaOH, после чего разбавляли 0,01М фосфатным солевым буфером (PBS) pH 7,2–7,4 (PBS, MP Biomedicals, США) до итоговой концентрации L-AA 20 мкг/мл. При помощи двойного стереотаксического манипулятора Stoelting (США) в правый стриатум (координаты по атласу Paxinos AP=1,5; L=2,5; V=4,8) вводили микрошприцем 5 мкл раствора L-AA, а в противоположное полушарие – PBS в таком же объеме. Для премедикации применяли атропин (ООО ГНЦЛС, Украина) в дозе 0,04 мг/кг подкожно. Для анестезии животным вводили золетил 100 (Virbac, Франция) в дозе 3 мг/100 г и ксиланит (ООО «НИТА-Фарм», Россия) в дозе 3 мг/кг внутримышечно.

Иммуноморфологическое исследование. Животных разделили на две группы: первая группа (n=6) выводилась из эксперимента через 72 часа (3 дня), вторая (n=5) – через 12 дней после операции. Первый срок соответствует периоду наибольшей пролиферации астроцитов (начало первой недели) при повреждающем воздействии, тогда как к концу второй недели глиальный рубец уже сформирован и пролиферация астроглии замедляется. Крыс декапитировали гильотиной, их мозг фиксировали 24 часа в 10% нейтральном формалине (HistoLine, Россия), затем пропитывали 30% сахарозой, замораживали и раскладывали на фронтальные срезы толщиной 12 мкм на криостате Sakura Cryo 3 (Tissue Tek, США). Для демаскировки антигенов срезы нагревали в пароварке, 12 минут в ЭДТА-буфере (EnVision Flex pH 9,0, Dako, Дания), далее их промывали в PBS с 0,1% Triton X-100 (Sigma, Германия) и инкубировали 18

часов с первичными антителами. Использовали кроличьи или мышинные антитела к белкам астроцитов [18]: глиофибрилярному белку (GFAP, клон G-A-5, Sigma, Германия), глутаминсинтетазе (GS, G2781, Sigma, Германия), виментину (Vim, клон V9, Dako, Дания), к специфическому белку микроглии IBA1 (ERP16589, Abcam, Великобритания), нейрональному ядерному белку NeuN (ERP12763, Abcam, Великобритания), к маркеру олигодендроглии – циклонуклеотидфосфатазе (CNP, CL2871, Sigma, Германия), а также к Ki67 (PA5-19462, Dako, Дания) для локализации делящихся клеток [18]. Для выявления связывания антител срезы инкубировали 4 часа с соответствующими вторичными антителами (Sigma, Германия), конъюгированными с флуорохромами CF488 или CF555. Ядра докрашивали диамидинофенилиндолом (DAPI, Sigma, Германия) и заключали срезы в среду FluoroShield (Sigma, Германия).

Морфометрия и статистическая обработка. Препараты исследовали под микроскопом Eclipse Ni-u (Nikon, Япония), оснащенный цифровой камерой Nikon DS-Qi (Япония). Морфометрический анализ проводили на 10–16 срезах, взятых через 48 мкм, от каждого животного, в области следа от инъекционной иглы. Исследовали не менее 25 полей зрения при увеличении объектива $\times 20$, на удалении не более 800 мкм от трека иглы, не захватывая зону механического повреждения ткани в области трека. Число клеток выражали в единицах на $0,1 \text{ мм}^2$. GFAP⁺ астроциты выделяли на изображениях по пороговому значению яркости и оценивали занимаемый ими процент от площади поля зрения. Интенсивность окрашивания на GS оценивали на изображениях (цветовое разрешение – 8 бит, 256 градаций серого) по средней яркости поля зрения. Измерения проводили при одинаковых настройках микроскопа и камеры.

Для статистической обработки применяли программу GraphPad Prism 7.0, данные по каждому животному усредняли и вычисляли медиану, верхний и нижний квартили или, при соответствии нормальному распределению (по результатам теста Шапиро–Уилка), – среднее и среднее квадратичное отклонение $M \pm SD$. Для сравнения экспериментальных групп использовали непараметрический тест Краскела–Уоллиса, а для сравнения изменений при введении PBS и L-AA в левый и правый стриатум – непараметрический тест Вилкоксона (для связанных выборок).

Результаты

После введения крысам L-AA в их стриатуме через 72 часа обнаруживали зону сниженной GFAP-реактивности вокруг трека иглы (рис. 1). В нижней части ширина этой зоны составляла в среднем 1038 ± 84 мкм. В области введения L-AA тела астроцитов не выявлялись или обнаруживались отдельные клетки со сниженной GFAP-реактивностью, имевшие деформированные отростки. В противоположном полушарии (введение

PBS) трек иглы был окружен валом гипертрофированных GFAP⁺ астроцитов (рис. 1 и 2), а площадь, занимаемая ими, оказалась значимо выше, чем при введении L-AA ($p=0,031$). Наряду с этим отметили и значимое снижение ($p=0,016$) интенсивности окрашивания на глутаминсинтетазу (GS) (рис. 3), которую на стороне введения PBS обнаруживали в отростках GFAP⁺ астроцитов, а в области введения L-AA ее находили преимущественно в GFAP-негативных клетках округлой формы. При выявлении IBA1 как в области введения L-AA, так и на противоположной стороне вокруг трека иглы наблюдали скопление макрофагов (рис. 1), а на удалении от области повреждения определяли активированную, гипертрофированную микроглию, лишенную тонких отростков. Плотность ее распределения в области введения L-AA составила $93,3 \pm 12,5$ клетки на $0,1 \text{ мм}^2$ и значимо не менялась по сравнению с областью введения PBS – $90,9 \pm 6,4$ клетки на $0,1 \text{ мм}^2$. При выявлении олигодендроглии (с помощью антител к CNP) изменения локализации и интенсивности окрашивания не обнаружили (рис. 1). Плотность нейронов в стриатуме через 72 часа после введения PBS составила $68,3 \pm 2,7$ клетки на $0,1 \text{ мм}^2$ и значимо не менялась на стороне введения L-AA.

На 12-й день после операции плотность нейронов по сравнению с контролем значимо не менялась, а IBA1⁺ макрофаги по-прежнему обнаруживались вблизи трека иглы. Площадь, занимаемая GFAP⁺ астроцитами, значимо возрастала на 12-й день в обоих полушариях (Краскел–Уоллис ANOVA $H=16,3$, $p=0,001$; апостериорный тест Данна), а различия между ними на 12-й день нивелировались за счет сформированного отростками астроцитов глиального рубца (рис. 2).

Снижение окрашивания на GFAP и гибель астроцитов при введении L-AA в стриатум отмечали только на раннем сроке после введения L-AA, а к 12-му дню погибшие клетки замещались вновь образованными и мигрировавшими к области повреждения астроцитами. Исследование пролиферативной активности и локализации виментина – маркера незрелой астроглии на 3-й день после введения L-AA показало, что трек иглы через 72 часа после операции был окружен Vim⁺ клетками как в области введения L-AA, так и PBS (из подсчета исключали Vim⁺ эндотелиоциты). Однако на стороне введения L-AA плотность клеток, содержащих виментин, была значимо меньше ($p=0,016$), а сами клетки не имели разветвленных отростков по сравнению с клетками на стороне введения PBS (рис. 3). На 3-й день после операции вблизи области введения L-AA обнаруживали многочисленные Ki67⁺ ядра, принадлежащие как GFAP⁺ астроцитам на границе области повреждения, так и клеткам, не содержащим GFAP (рис. 3). На стороне введения PBS плотность Ki67⁺ ядер была значимо меньше ($p=0,016$) по сравнению со стороной введения L-AA. К 12-му дню пролиферативная активность снижалась и в области повреждения выявляли лишь единичные Ki67⁺ клетки.

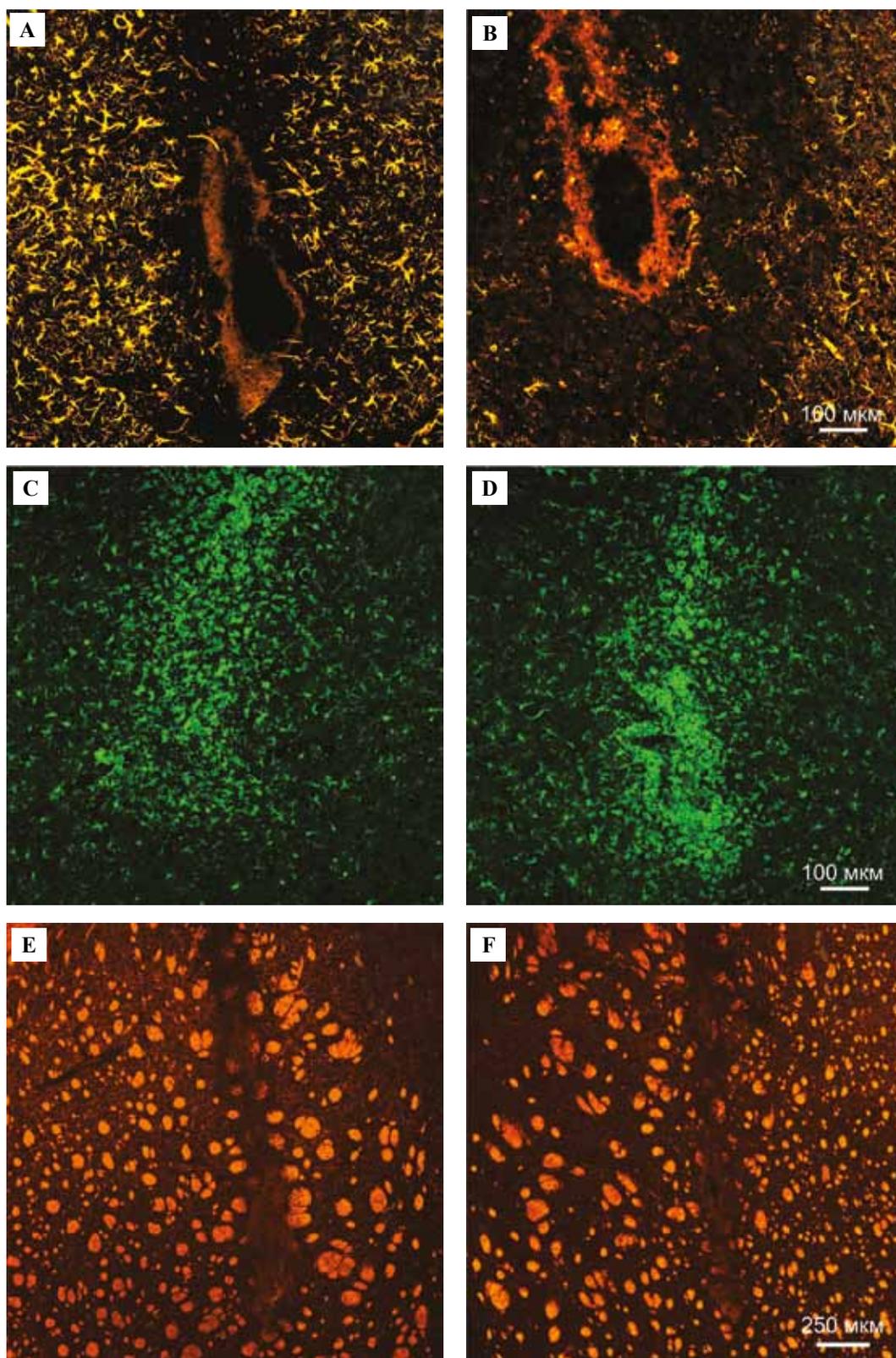


Рис. 1. Изменения глиальных популяций через 72 часа после введения L-AA в стриатум.

A, B – образование GFAP-негативной зоны вокруг области введения. $\times 10$. C, D – активация микроглии (выявление IBA1) $\times 10$. E, F – отсутствие изменений локализации и экспрессии CNP, $\times 4$.

Введение PBS – A, C, E, введение L-AA – B, D, F

Fig. 1. The glial population changes 72 h after intrastriatal L-AA injection.

A, B – GFAP-negative zone formation adjacent to the injection area, $\times 10$. C, D – microglia activation (IBA1 staining), $\times 10$. E, F – no changes in the CNP localization and expression, $\times 4$. PBS administration – A, C, E, L-AA administration – B, D, F

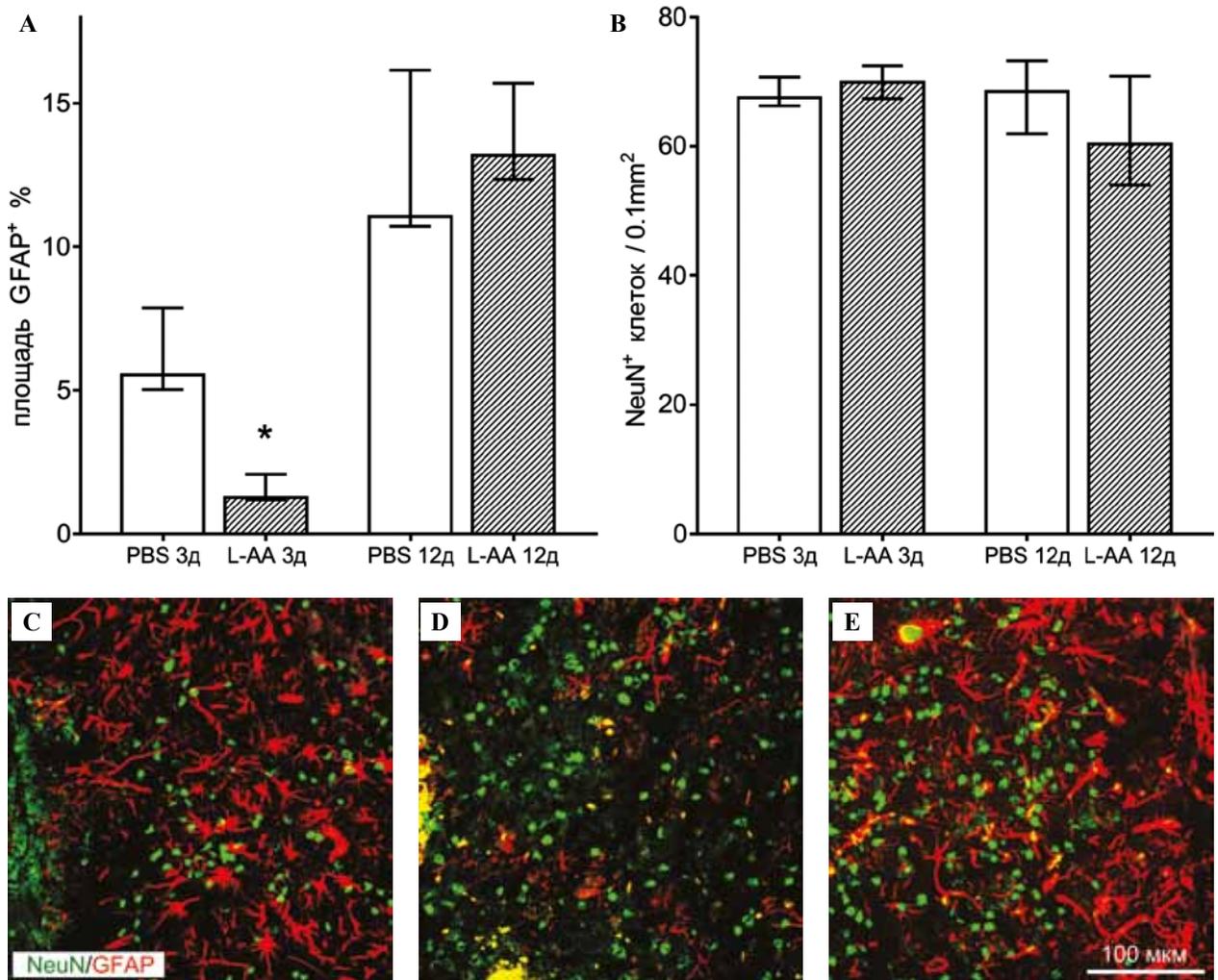


Рис. 2. Изменения иммунореактивности к GFAP и плотности нейронов в стриатуме на 3-й и 12-й день после введения L-AA. А – площадь, занимаемая GFAP-позитивными отростками астроцитов, в % от поля зрения. В – плотность нейронов (NeuN позитивных клеток). С, D, E – выявление астроцитов (GFAP, красным) и нейронов (NeuN, зеленым). С – 3 дня, введение PBS, D – 3 дня, введение L-AA, E – 12 дней, введение L-AA. $\times 20$. Масштабный отрезок – 100 мкм. Данные в виде Me (HQ; LQ).

* $p < 0.05$, по сравнению с противоположным полушарием, тест Вилкоксона

Fig. 2. Changes in GFAP immunoreactivity and neuronal density in the striatum on days 3 and 12 after L-AA intrastriatal injection. A – the area occupied by GFAP-positive processes of astrocytes, in % from the field of view. B – the neuron density (NeuN positive cells). C, D, E – detection of astrocytes (GFAP, red) and neurons (NeuN, green). C – 3 days after PBS administration, D – 3 days after L-AA administration, E – 12 days after L-AA administration. $\times 20$. The scale bar is 100 microns. Data presented as Me (HQ; LQ).

* $p < 0.05$, compared to the contralateral hemisphere, Wilcoxon test

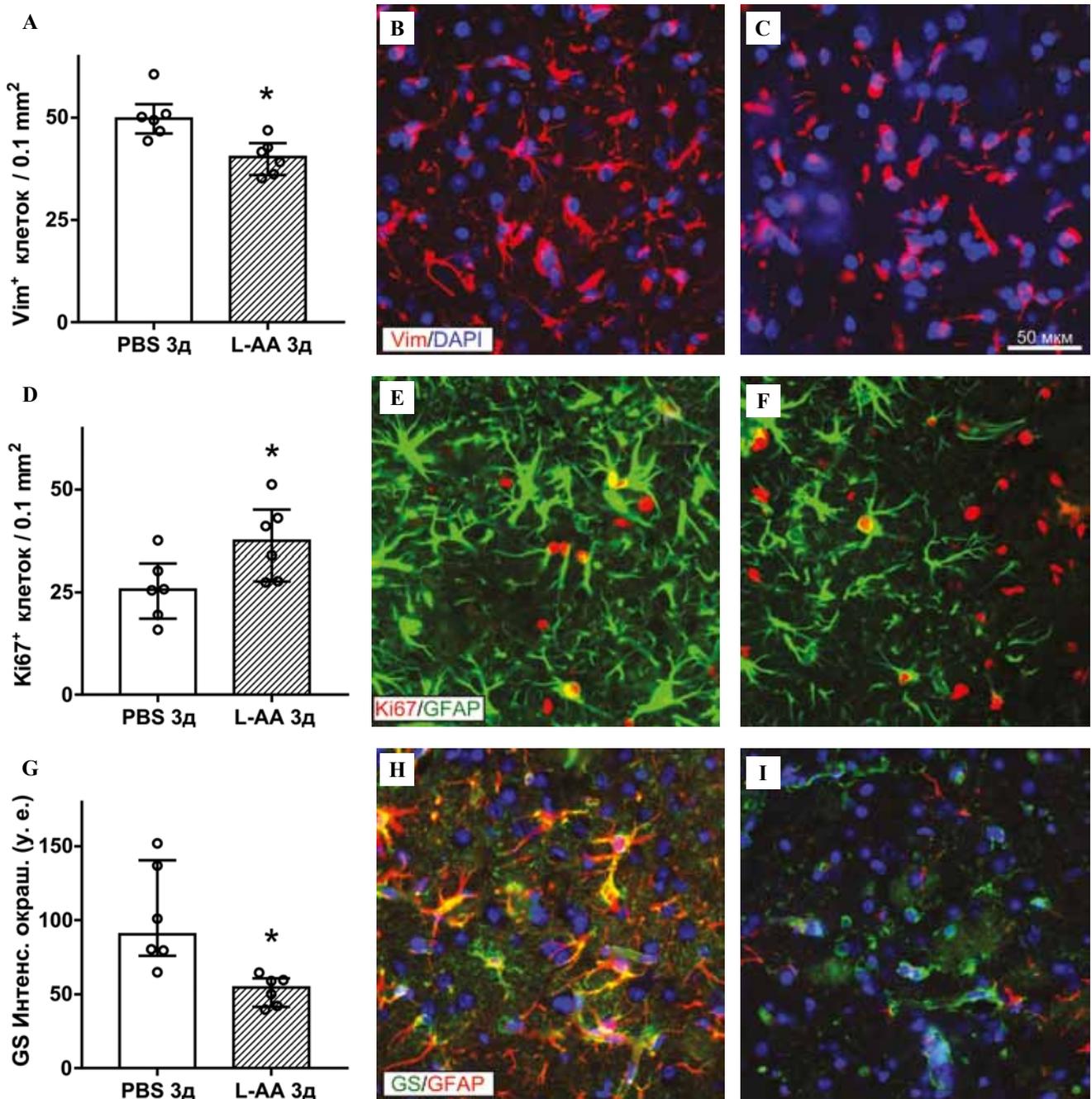


Рис. 3. Реактивные изменения астроглии при введении L-AA в стриатум (72 часа).

A–C – экспрессия виментина и число Vim-положительных клеток в области повреждения (Vim – красным, ядра докрасены DAPI). D–F – пролиферативная активность (плотность Ki67-положительных клеток) в красной зоне вблизи области введения L-AA (GFAP – зеленым, Ki67 – красным). G–I – локализация и интенсивность окрашивания на глутаминсинтетазу (GS – зеленым, GFAP – красным, ядра докрасены DAPI). Введение PBS – B, E, H; введение L-AA – C, F, I. $\times 40$. Масштабный отрезок – 50 мкм, одинаковый для всех изображений.

* $p < 0,05$, по сравнению с противоположным полушарием, тест Вилкоксона. Данные в виде Me (HQ; LQ), точки – средние по животным

Fig. 3. Reactive changes in astroglia after L-AA intra-striatal injection (72 hours).

A–C – vimentin localization and the number of Vim-positive cells in the lesion area (Vim – red, the nuclei are counterstained with DAPI). D–F – proliferative activity (Ki67-positive cell density) in the marginal zone near the L-AA injection site (GFAP – green, Ki67 – red). G–I – localization and intensity of glutamine synthetase staining (GS – green, GFAP – red, DAPI – colored nuclei). PBS administration side – B, E, H, L-AA administration side – C, F, I. $\times 40$. The scale bar – 50 microns, the same for all images.

* $p < 0.05$, compared to the contralateral hemisphere, Wilcoxon test. Data presented as Me (HQ; LQ), dots – the means for each animal

Обсуждение

Стереотаксическая инъекция L-АА в стриатум вызвала локальное повреждение зрелых астроцитов в широкой зоне вокруг области введения, но не влияла на плотность микроглии и олигодендроглии, что согласуется с результатами, полученными как *in vitro*, так и *in vivo*, другими авторами [6–9]. Обнаруженное снижение иммуноокрашивания на GS дополняет данные [7, 19] о влиянии L-АА на активность GS и свидетельствует о нарушении обмена глутамата, что может вести к увеличению его концентрации в области повреждения и усилению токсического действия L-АА. Ранее было показано, что L-АА уменьшает захват глутамата и повышает его внеклеточный уровень [3], и, хотя гибель нейронов стриатума мы не выявили, можно предположить, что более высокие концентрации L-АА могут провоцировать эксайтотоксические реакции и вызывать вторичное повреждение нейронов, что было показано для нейронов мозжечка и гиппокампа [1, 4].

Активация астроглии вокруг зоны поражения, вызываемая механическим повреждением ткани при инъекции и провоспалительным ответом микроглии, со временем приводила к замещению астроцитов, погибших под действием L-АА. В нашем эксперименте введение L-АА не меняло плотность макрофагов и IBA1-позитивной микроглии по сравнению с контролем – областью повреждения ткани без введения токсина, что отличается от данных литературы о снижении реактивности микроглии при введении L-АА на моделях болезни Паркинсона [15, 20] и демиелинизации. По-видимому, отсутствие влияния L-АА на реакцию микроглии в нашем эксперименте в отличие от моделирования нейродегенерации [15, 20] объясняется особенностями механизмов активации микроглии при механическом повреждении.

Пролиферативная активность астроцитов и наличие Vim⁺ клеток в области введения L-АА уже через 72 часа показывает, что L-АА существенно не влияет на незрелую астроглию, мигрирующую к области введения глиального токсина и замещающую поврежденные астроциты. Помимо делящихся *in situ* астроцитов в формировании глиального рубца, по данным литературы [21], участвуют и предшественники, мигрирующие из субвентрикулярной пролиферативной зоны. Большее количество Vim⁺ глии, выявляемое при введении PBS, по сравнению с введением L-АА, вероятно, связано с экспрессией виментина зрелыми реактивными GFAP⁺ астроцитами, тогда как в области введения L-АА обнаруживаются преимущественно незрелые Vim⁺/GFAP⁻ астроциты, что подтверждается их морфологией и отсутствием экспрессии GFAP. Поскольку уровень экспрессии GFAP астроцитами зависит от их функционального состояния, и GFAP не может считаться универсальным маркером астроглии, использование GS как дополнительного астроцитарного маркера [22] в настоящем исследовании позволяет подтвердить токсическое действие L-АА на астроциты,

а не только снижение экспрессии GFAP. Вместе с тем, обнаруживаемые в области повреждения округлые GS⁺ клетки также могут относиться как к незрелым астроцитам, так и, возможно, к олигодендроглии, что описано в литературе [22].

Таким образом, проведенное исследование показало, что интрацеребральное введение L-АА необходимо рассматривать с учетом активации астроцитов при механическом повреждении ткани и динамической реакции астроглии в ответ на действие токсина. В целом, действие L-АА как глиального токсина в эксперименте можно охарактеризовать как модель глиальной дисфункции, сочетающей повреждение и активацию астроцитов, но не полное «отключение» функций астроглии. Поскольку при нейродегенеративных заболеваниях наблюдается сочетание повреждения астроцитов и глиоза [23, 24], использование L-АА в эксперименте в качестве модели глиальной дисфункции представляется обоснованным.

Заключение

Однократное введение L-АА в стриатум крыс вызывает быстрое избирательное повреждение и гибель зрелых GFAP-позитивных астроцитов, но не затрагивает олигодендроглию и нейроны и не влияет на выраженность реакции микроглии. К 12-му дню после введения L-АА погибшие астроциты замещаются за счет пролиферации и миграции незрелых астроцитов, и в области повреждения формируется глиальный рубец. Таким образом, интрацеребральное введение L-АА можно охарактеризовать как перспективную модель для воспроизведения астроцитарной дисфункции, сочетающей и повреждение, и реактивные изменения астроглии.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Д.Н. Воронков, Р.М. Худоевков, А.В. Ставровская.

Сбор и обработка материала – Д.Н. Воронков, А.В. Ставровская, Ю.В. Дикалова, А.С. Гушина, А.С. Ольшанский.

Написание текста – Д.Н. Воронков, Р.М. Худоевков.

Редактирование – Д.Н. Воронков, Р.М. Худоевков.

Author contribution

Conceived the study and designed the experiment – D.N. Voronkov, R.M. Khudoerkov, A.V. Stavrovskaya.

Collected the data – D.N. Voronkov, A.V. Stavrovskaya, Yu.V. Dikalova, A.S. Gushchina, A.S. Olshanskiy.

Wrote the paper – D.N. Voronkov, R.M. Khudoerkov.

Edited the manuscript – D.N. Voronkov, R.M. Khudoerkov.

Литература/References

1. Guidetti P, Schwarcz R. Determination of α -amino adipic acid in brain, peripheral tissues, and body fluids using GC/MS with negative chemical ionization. *Mol Brain Res.* 2003;118(1–2):132–9. DOI: 10.1016/j.molbrainres.2003.08.004.
2. Tsai MJ, Chang YF, Schwarcz R, Brookes N. Characterization of α -amino adipic acid transport in cultured rat astrocytes. *Brain Res.* 1996;741(1–2):166–73. DOI: 10.1016/S0006-8993(96)00910-9.

3. Danhauser K, Sauer SW, Haack TB, Wieland T, Staufner C, Graf E et al. DHTKD1 mutations cause 2-aminoadipic and 2-oxoadipic aciduria. *Am J Hum Genet.* 2012;91(6):1082–7. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.10.006.
4. Jäkel S, Dimou L. Glial cells and their function in the adult brain: A journey through the history of their ablation. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:24. DOI: 10.3389/fncel.2017.00024.
5. Olney JW, de Gubareff T, Collins JF. Stereospecificity of the gliotoxic and anti-neurotoxic actions of alpha-aminoadipate. *Neurosci Lett.* 1980;19(3):277–82. DOI: 10.1016/0304-3940(80)90273-6.
6. Khurgel M, Koo AC, Ivy GO. Selective ablation of astrocytes by intracerebral injections of alpha-aminoadipate. *Glia.* 1996;16(4):351–8. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1136(199604)16:4<351::AID-GLIA7>3.0.CO;2-2.
7. McBean GJ. Inhibition of the glutamate transporter and glial enzymes in rat striatum by the gliotoxin, ocaminoadipate. *Br J Pharmacol.* 1994;113(2):536–40. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1994.tb17022.x.
8. Nishimura RN, Santos D, Fu ST, Dwyer BE. Induction of cell death by L-alpha-aminoadipic acid exposure in cultured rat astrocytes: Relationship to protein synthesis. *Neurotoxicology.* 2000;21(3):313–20. PMID: 10894121.
9. Takada M, Hattori T. Fine structural changes in the rat brain after local injections of gliotoxin, alpha-aminoadipic acid. *Histol Histopathol.* 1986;1(3):271–5. PMID: 2485166.
10. da Silva JC, Amaral AU, Cecatto C, Wajner A, Dos Santos Godoy K, Ribeiro RT et al. α -ketoadipic acid and α -aminoadipic acid cause disturbance of glutamatergic neurotransmission and induction of oxidative stress in vitro in brain of adolescent rats. *Neurotox Res.* 2017;32(2):276–90. DOI: 10.1007/s12640-017-9735-8.
11. Banasr M, Duman RS. Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. *Biol Psychiatry.* 2008;64(10):863–70. DOI: 10.1016/j.biopsych.2008.06.008.
12. David J, Gormley S, McIntosh AL, Kebede V, Thuery G, Varidaki A et al. L-alpha-amino adipic acid provokes depression-like behaviour and a stress related increase in dendritic spine density in the pre-limbic cortex and hippocampus in rodents. *Behav Brain Res.* 2019;362:90–102. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.01.015.
13. Śmiałowska M, Szewczyk B, Woźniak M, Wawrzak-Wleciał A, Domin H. Glial degeneration as a model of depression. *Pharmacol Rep.* 2013;65(6):1572–9. DOI: 10.1016/S1734-1140(13)71518-4.
14. Sun C, Fukushi Y, Wang Y, Yamamoto S. Astrocytes protect neurons in the hippocampal CA3 against ischemia by suppressing the intracellular Ca²⁺ overload. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:280. DOI: 10.3389/fncel.2018.00280.
15. O'Neill E, Chiara Goisis R, Haverty R, Harkin A. L-alpha-aminoadipic acid restricts dopaminergic neurodegeneration and motor deficits in an inflammatory model of Parkinson's disease in male rats. *J Neurosci Res.* 2019;97(7):804–16. DOI: 10.1002/jnr.24420.
16. Brockett AT, Kane GA, Monari PK, Briones BA, Vigneron PA, Barber GA et al. Evidence supporting a role for astrocytes in the regulation of cognitive flexibility and neuronal oscillations through the Ca²⁺ binding protein S100 β . *PLoS One.* 2018;13(4):e0195726. DOI: 10.1371/journal.pone.0195726.
17. Lima A, Sardinha VM, Oliveira AF, Reis M, Mota C, Silva M et al. Astrocyte pathology in the prefrontal cortex impairs the cognitive function of rats. *Mol Psychiatry.* 2014;19(7):834–41. DOI: 10.1038/mp.2013.182.
18. Д.Э. Коржевский (ред.). Иммуногистохимическое исследование головного мозга. Санкт-Петербург: СпецЛит, 2016. 143 с. Доступно по адресу: <https://speclit.ru/image/catalog/978-5-299-00806-7/978-5-299-00806-7.pdf>. DE Korzhevskii (ed.). Immunohistochemical study of the brain. Saint Petersburg: SpecLit, 2016. 143 p. (In Russ.). Available from: <https://speclit.ru/image/catalog/978-5-299-00806-7/978-5-299-00806-7.pdf>.
19. Billet F, Costentin J, Dourmap N. Influence of glial cells in the dopamine releasing effect resulting from the stimulation of striatal δ -opioid receptors. *Neuroscience.* 2007;150(1):131–43. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.004.
20. Madadi S, Pasbakhsh P, Tahmasebi F, Mortezaee K, Khanehzad M, Boroujeni FB et al. Astrocyte ablation induced by L-aminoadipate (L-AAA) potentiates remyelination in a cuprizone demyelinating mouse model. *Metab Brain Dis.* 2019;34(2):593–603. DOI: 10.1007/s11011-019-0385-9.
21. Faiz M, Sachewsky N, Gascón S, Bang KWA, Morshead CM, Nagy A. Adult neural stem cells from the subventricular zone give rise to reactive astrocytes in the cortex after stroke. *Cell Stem Cell.* 2015;17(5):624–34. DOI: 10.1016/j.stem.2015.08.002.
22. Anlauf E, Derouiche A. Glutamine synthetase as an astrocytic marker: Its cell type and vesicle localization. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:144. DOI: 10.3389/fendo.2013.00144.
23. Pekny M, Pekna M. Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(3):483–91. DOI: 10.1016/j.bbadis.2015.11.014.
24. Горяинов С.А., Процкий С.В., Охотин В.Е., Павлова Г.В., Ревущин А.В., Потанов А.А. О роли астроглии в головном мозге в норме и патологии. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2013;7(1):45–51. Goryaynov SA, Protsky SV, Okhotin VE, Pavlova GV, Revishchin AV, Potanov AA. About astroglia in the brain and pathology. *Annals of Clinical and Experimental Neurology.* 2013;7(1):45–51 (In Russ.).

Информация об авторах

Дмитрий Николаевич Воронков – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии.

Рудольф Михайлович Худоерков – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии.

Юлия Владимировна Дикалова – аспирант лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии.

Алла Вадимовна Ставровская – кандидат биологических наук, руководитель лаборатории экспериментальной патологии нервной системы Научного центра неврологии.

Анастасия Сергеевна Гущина – научный сотрудник лаборатории экспериментальной патологии нервной системы Научного центра неврологии.

Артем Сергеевич Ольшанский – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной патологии нервной системы Научного центра неврологии.

Author information

Dmitry N. Voronkov – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Neuromorphology, Research Center of Neurology.
<https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

Rudolf M. Khudoerov – Dr. Sci. (Med.), Chief Researcher, Laboratory of Neuromorphology, Research Center of Neurology.
<https://orcid.org/0000-0002-6951-3918>

Yulia V. Dikalova – Post-graduate Student, Laboratory of Neuromorphology, Research Center of Neurology.
<https://orcid.org/0000-0001-7941-0472>

Alla V. Stavrovskaya – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Experimental Pathology of Nervous System, Research Center of Neurology.
<https://orcid.org/0000-0002-8689-0934>

Anastasia S. Gushchina – Researcher, Laboratory of Experimental Pathology of Nervous System, Research Center of Neurology.
<https://orcid.org/0000-0003-3026-0279>

Artyom S. Olshanskiy – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Experimental Pathology of Nervous System, Research Center of Neurology.
<https://orcid.org/0000-0002-5696-8032>