

МАРКЕРЫ АКТИВАЦИИ АСТРОЦИТОВ

Обзор

© 2022 Я.В. Горина^{1,2*}, А.Б. Салмина^{1,2,3}, А.И. Ерофеев¹, Е.И. Герасимов¹,
А.В. Большакова¹, П.М. Балабан^{1,4}, И.Б. Безпрозванный^{1,5}, О.Л. Власова¹

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
лаборатория молекулярной нейродегенерации, 194021 Санкт-Петербург, Россия

² Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого,
НИИ молекулярной медицины и патобиохимии,
660022 Красноярск, Россия; электронная почта: yapa_20@bk.ru

³ Научный центр неврологии, Институт мозга, лаборатория нейробиологии и тканевой инженерии,
105064 Москва, Россия

⁴ Институт высшей нервной деятельности, лаборатория клеточной нейробиологии обучения,
117485 Москва, Россия

⁵ Юго-Западный медицинский центр Техасского университета, отделение физиологии,
75390 Даллас, США

Поступила в редакцию 18.05.2022

После доработки 27.06.2022

Принята к публикации 28.06.2022

Астроциты являются наиболее распространенным типом глиальных клеток, которые обеспечивают гомеостаз и защиту центральной нервной системы. Важной специфической характеристикой астроцитов является проявление морфологической неоднородности, находящейся в прямой зависимости от локализации в той или иной области мозга. Астроциты могут интегрироваться в нейронные сети и поддерживать активность нейронов в различных областях мозга. Более того, астроциты экспрессируют множество рецепторов, каналов и мембранных переносчиков, что лежит в основе их своеобразной метаболической активности, которая определяет пластичность центральной нервной системы в процессе развития и старения. Столь сложная структурно-функциональная организация астроцитов обуславливает использование современных методов их идентификации и анализа. Учитывая то важное обстоятельство, что определение наиболее подходящего маркера для полиморфных и множественных подгрупп астроцитов имеет решающее значение для исследования их многофункциональности, в этом обзоре представлены маркеры, современные методы визуализации и идентификации астроцитов, которые представляют собой ценный ресурс для изучения структурных и функциональных свойств астроцитов, а также лучшего понимания степени вклада астроцитов в нейрональную активность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: астроциты, маркеры, методы визуализации, микроРНК, оптогенетика.

DOI: 10.31857/S0320972522070119, **EDN:** AWCKOQ

ВВЕДЕНИЕ

Астроциты долгое время считались вспомогательными клетками, которые обеспечи-

вают только трофическую, метаболическую и структурную поддержку нейронов [1]. Однако за последние три десятилетия обширные исследования показали, что они играют

Принятые сокращения: AQP4 – аквапорин 4; CaM – кальмодулин; CB1 – каннабиноидные рецепторы типа 1; ChR2 – каналный родопсин 2; Cx – коннексин; EGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок; FACS – флуоресцентно-активированная сортировка клеток; GFP – зеленый флуоресцентный белок; GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок; GPCR – рецепторы, связанные с G-белком; GPR56 – рецептор 56, связанный с G-белком; GS – глутаминсинтаза; LCN2 – липокалин-2; Mfge8 – фактор роста эпидермальных клеток-8 из жировых глобул молока; NDRG2 – ген 2, регулируемый нижестоящим N-мус; NMDAR – рецептор N-метил-D-аспартата; TRP – канал потенциальных переходных рецепторов.

* Адресат для корреспонденции.

решающую роль в физиологических и патологических функциях мозга. Так, астроциты регулируют ионный гомеостаз, контролируют церебральный кровоток, способствуют образованию новых кровеносных сосудов, защищают нейроны от эксайтотоксического повреждения и гибели, способствуют образованию синапсов, участвуют в энергетическом метаболизме головного мозга и формировании гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [2].

Более этого, вместе с пре- и постсинаптической мембранами астроциты образуют так называемый трехчастный синапс, тем самым обеспечивая эффективную синаптическую передачу [3]. При этом астроциты секретируют глиотрансмиттеры, цитокины, метаболиты, которые участвуют в нейрон-астроглиальном сопряжении и глиоваскулярном контроле [4].

Интересно и то, что астроциты обладают способностью модулировать фенотип микроглии и фагоцитоз за счет перекрестного взаимодействия астроцитов и микроглии. Это подразумевает высвобождение различных сигнальных молекул как микроглией, так и астроцитами, что позволяет устанавливать аутокринную обратную связь для направленной реципрокной модуляции при повреждении центральной нервной системы (ЦНС) [5].

В целом, астроциты являются критически важными участниками в развитии и функционировании головного мозга [6]. Активность астроцитов кодируется динамическими внутри- и межклеточными сигналами, которые регулируют синаптическую пластичность, взаимодействие в нейронных цепях, а также способствуют консолидации памяти [7]. Внутриклеточные колебания уровня свободного Ca^{2+} , представляющие собой важный аспект активности астроцитов, могут происходить спонтанно или в результате активации нейротрансмиттерами NMDAR (рецептор N-метил-D-аспартата, N-methyl-D-aspartate receptors) и TRP (канал потенциальных переходных рецепторов, Transient receptor potential), а также рецепторов, связанных с G-белком (GPCR, G-protein-coupled receptors) [8]. Такая передача сигналов астроцитами посредством повышения цитозольного Ca^{2+} обеспечивает высвобождение глиотрансмиттеров, нейроваскулярное взаимодействие и пресинаптическое структурное ремоделирование [9]. Недавно полученные данные [10] демонстрируют, что астроглиальные каннабиноидные рецепторы типа 1 (CB1, type-1-cannabinoid) определяют доступность D-серина (агонист синаптических NMDAR) в синапсах гиппокампа. Это демонстрирует,

что астроглиальные рецепторы CB1 являются ключевыми детерминантами физиологической консолидации памяти распознавания новых объектов в гиппокампе. Так, делеция гена *CB1* приводит к нарушению связывания D-серина с синаптическими NMDAR в гиппокампе GFAP-*CB1*-нокаутных мышей, что сопряжено с нарушением памяти распознавания объектов, а также снижением долговременной потенциации в синапсах гиппокампа. Это подразумевает существование нового механизма астроглиальной регуляции синаптической пластичности посредством D-серин-зависимой регуляции NMDAR [10].

Необходимо также отметить, что особенностью астроцитов является их неоднородность с точки зрения экспрессии генов, морфологии и функционального взаимодействия с локальными нейронными сетями [11]. Взаимодействие астроцитов с нейронами необходимо для реализации таких процессов, как формирование и функционирование синапсов, высвобождение и повторный захват нейромедиаторов, синтез нейротрофических факторов и контроль выживания нейронов. При этом важно отметить, что функциональная связь, существующая между астроцитами и нейронами, в значительной степени сохраняется как во взрослом, так и стареющем головном мозге здоровых животных, но подвергается существенным изменениям при развитии нейродегенеративных заболеваний [12].

Визуализация и идентификация астроцитов, особенно в препаратах *in situ* и в головном мозге *in vivo*, является, безусловно, нетривиальной задачей. Трудности заключаются в значительной морфологической гетерогенности и в отсутствии универсального маркера, который может маркировать все клетки астроглиальной природы. Существующие методы включают классическое гистологическое окрашивание и иммуноцитохимию (выполняемую на фиксированных тканях), генетически контролируемую экспрессию специфических для астроцитов флуоресцентных маркеров, инкубацию с флуоресцентными зондами, а также внутриглиальную инъекцию флуоресцентных красителей.

В этой статье мы рассматриваем маркеры и современные методы визуализации и идентификации астроцитов, характеризующихся полиморфизмом и многофункциональностью, что даст возможность расширить понимание степени вклада астроцитов в нейрональную активность, модуляцию синаптической передачи и пластичности, а также двунаправленную коммуникацию между астроцитами и нейронами.

РАЗНООБРАЗИЕ МАРКЕРОВ АСТРОЦИТОВ

До настоящего времени не существует универсального маркера, который может окрашивать и идентифицировать все астроциты в ЦНС, что обусловлено специфической морфологической гетерогенностью астроцитов, которая, в свою очередь, сопряжена со значительным разнообразием экспрессии различных молекул [13] (таблица).

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP). Одним из наиболее популярных маркеров астроцитов является глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) – основной белок промежуточных филаментов в зрелых

астроцитах, а также важный компонент цитоскелета астроцитов в период развития [14]. Важно подчеркнуть, что GFAP, как особенно широко используемый астроцитарный маркер, преимущественно экспрессируется в астроцитах белого, а не серого вещества [44]. Более того, GFAP не может маркировать все отростки астроцитов, поскольку до 85% астроцитарных отростков его не содержат [45].

Примечательно, что в патофизиологических условиях повышенная экспрессия GFAP является чувствительным и надежным маркером реактивных астроцитов, тогда как в здоровой ткани многие астроциты не экспрессируют GFAP в количествах, обнаруживаемых

Маркеры астроцитов

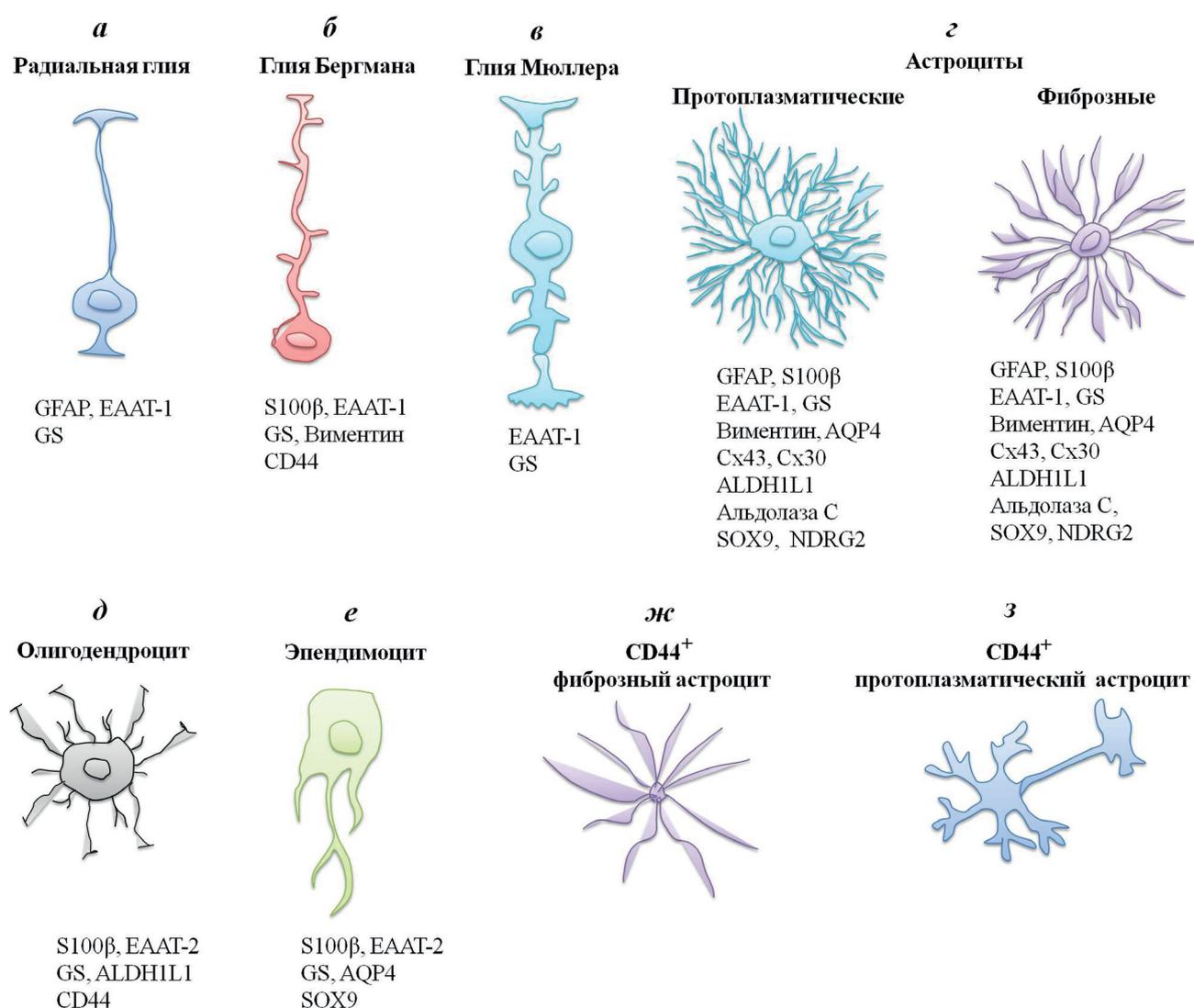
Маркер	Функциональная роль белка	Экспрессия в клетке	Экспрессия в регионе мозга	Изменения в онтогенезе	Изменения при патологии	Ссылки
Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP)	белок промежуточных филаментов; обеспечивает структурную стабильность клеток; регулирует морфологию и функции астроцитов	зрелые астроциты, радиальная глия, нейральные стволовые клетки	кора, гиппокамп, миндалинное тело, гипоталамус, обонятельная луковица, мозжечок	высокий уровень экспрессии после рождения, который снижается по мере старения организма	высокий уровень экспрессии в реактивных астроцитах	[14–16]
S100β	поддержание гомеостаза Ca ²⁺ ; регулирует пролиферацию и дифференцировку клеток; участвует в ремоделировании промежуточных филаментов астроцитов; биомаркер апоптоза	астроциты, глия Бергмана, олигодендроциты, эпендимциты, эпителий сосудистого сплетения, эндотелиальные клетки сосудов, лимфоциты, нейроны	кора, гиппокамп, гипоталамус, миндалинное тело, мозжечок	уровень экспрессии увеличивается в процессе онтогенеза	высокий уровень экспрессии в реактивных астроцитах	[17–19]
Транспортеры глутамата: EAAT-1 (GLAST), EAAT-2 (GLT-1)	астроглиальные специфические переносчики глутамата; участвуют в клиренсе глутамата	EAAT-1 – радиальная глия, фиброзные и протоплазматические астроциты, глия Бергмана, глия Мюллера сетчатки; EAAT-2 – нейроны, глиальные клетки (олигодендроциты, эпендимные клетки, эпителиальные клетки хориоидного сплетения, сателлитные клетки и шванновские клетки)	EAAT-1 – мозжечок; EAAT-2 – гиппокамп, боковая перегородка, кора головного мозга, полосатое тело	уровень экспрессии увеличивается в процессе онтогенеза	низкий уровень экспрессии	[20, 21]
Глутаминсинтетаза (GS)	участвует в реакции образования глутамина из аммиака и глутамата	радиальная глия, глия Бергмана, глия Мюллера сетчатки, астроциты, эпендимные клетки, олигодендроциты, нейроны	повсеместно присутствует в головном мозге	высокая активность, которая снижается по мере старения организма	активность снижается	[22, 23]

Таблица (продолжение)

Маркер	Функциональная роль белка	Экспрессия в клетке	Экспрессия в регионе мозга	Изменения в онтогенезе	Изменения при патологии	Ссылки
Виментин	промежуточный протеин филаментов, участвующий в регуляции клеточной дифференцировки, адгезии, миграции, передаче клеточных сигналов, в клеточном стрессовом ответе в дифференцирующихся клетках	астроциты, глия Бергмана, взрослые нервные стволовые клетки	кора головного мозга, мозжечок, гиппокамп	уровень экспрессии снижается в процессе онтогенеза	высокий уровень экспрессии в гипертрофированных астроцитах, реактивной микроглии, макрофагах	[24–26]
Акваторин 4 (AQP4)	белок, представитель семейства аквапоринов, образующих водопроводящие каналы в клеточных мембранах; контролирует гомеостаз воды и ионов; участвует в миграции астроцитов, проведении нервных сигналов	астроциты, эпендимноциты	гетерогенно экспрессируется по всей ЦНС; в наибольшей степени — в мозжечке; наименее выражено — в гиппокампе и коре головного мозга	уровень экспрессии увеличивается в процессе онтогенеза	низкий уровень экспрессии	[27, 28]
Коннексины: Cx43, Cx30	организуют астроцитарные сети, которые координируют деятельность локальных нейронных сетей, транспортируя глутамат или глутамин; осуществляют трофическую функцию для нейронов, опосредуя доставку глюкозы и молочной кислоты	Cx30 избирательно экспрессируется в астроцитах серого вещества, Cx43 и Cx30 совместно экспрессируются в щелевых контактах астроцитов	кора, гипоталамус, таламус и гиппокамп	высокая активность Cx43 как после рождения, так и по мере старения организма; активность Cx30 увеличивается в течение первых 3 недель после рождения и достигает максимума через 4 недели	высокий уровень экспрессии в реактивных астроцитах	[7, 29, 30]
ALDH1L1	участвует в метаболизме фолиевой кислоты	астроциты, олигодендроциты	широко экспрессируется по всему головному мозгу	уровень экспрессии снижается в процессе онтогенеза	высокий уровень экспрессии в реактивных астроцитах	[31–33]
Альдолаза С	фермент, участвующий в гликолизе в астроцитах с образованием лактата, который является источником энергии для нейронов	астроциты, нейроны мозжечка (клетки Пуркинью)	мозжечок, кора	высокий уровень экспрессии после рождения, который сохраняется в процессе онтогенеза	высокий уровень экспрессии в клетках Пуркинью	[34–36]
SOX9	фактор транскрипции, играющий важную роль в транскрипции зрелых астроцитов и регуляции их функций	астроциты, нейрональные клетки-предшественники, эпендимные клетки	гиппокамп, обонятельная луковица, мозжечок	уровень экспрессии не снижается по мере старения организма	высокий уровень экспрессии в реактивных астроцитах	[37, 38]

Таблица (окончание)

Маркер	Функциональная роль белка	Экспрессия в клетке	Экспрессия в регионе мозга	Изменения в онтогенезе	Изменения при патологии	Ссылки
CD44	трансмембранный гликопротеин, участвующий в адгезии между клетками и матриксом и в опосредованной матриксом передаче сигналов	астроциты, олигодендроциты, нервные стволовые клетки, глия Бергмана, нейроны Пуркиньи	гиппокамп, кора, мозжечок	уровень экспрессии снижается в процессе онтогенеза	высокий уровень экспрессии в реактивных астроцитах	[39–41]
NDRG2	опухолевый супрессор и ген, связанный с клеточным стрессом, пролиферацией и дифференцировкой клеток	зрелые астроциты	кора, обонятельная луковица, гиппокамп, средний мозг и таламус	уровень экспрессии повышается в процессе онтогенеза	высокий уровень экспрессии в реактивных астроцитах	[42, 43]



Типы глиальных клеток и маркеры для их визуализации. *а* – Радialная глия – экспрессия GFAP [77], EAAT-1 [78], GS [77]; *б* – Глия Бергмана – экспрессия S100β [79], EAAT-1 [80], GS [81], Виментин [82], CD44 [41]; *в* – глия Мюллера – экспрессия EAAT-1 [83], GS [84]; *г* – Астроциты – экспрессия GFAP, S100β, EAAT-1, виментин, AQP4, ALDH1L1 [85], GS [86], Cx43 [87], Cx30 [88], Альдолаза С [89], SOX9 [37], NDRG2 [90]; *д* – Олигодендроциты – экспрессия S100β [56], EAAT-2 [91], GS [92], ALDH1L1 [93], CD44 [94]; *е* – Эпендимоцит – экспрессия S100β [95], EAAT-2 [96], GS [77], AQP4 [97], SOX9 [98]; *ж* – CD44⁺ фиброзный астроцит [75]; *з* – CD44⁺ протоплазматический астроцит [75]

иммуногистохимическим методом, что, в свою очередь, указывает на то, что отсутствие детектируемого GFAP не позволяет сделать заключение об отсутствии астроцитов [16].

Интересен и тот факт, что астроциты в разных областях головного мозга могут демонстрировать выраженные различия в уровне экспрессии GFAP, а именно: в гиппокампе выявлен высокий уровень экспрессии данного маркера, тогда как в таламусе этого не наблюдалось [14, 15].

Известно, что в здоровом мозге человека GFAP в основном экспрессируется в зрелых астроцитах [14]. Однако, согласно экспериментальным данным, экспрессия GFAP наблюдалась в радиальной глии развивающегося человеческого мозга и в нейрональных стволовых клетках взрослого мозга [15, 46], тем самым указывая на то, что GFAP экспрессируется также в незрелых недифференцированных клетках ЦНС (рисунок).

Интересным является и то, что в ходе одного из исследований [47], целью которого было изучение клеток соматосенсорной коры и CA1 области гиппокампа мышей путем одноклеточного секвенирования РНК (scRNA-Seq), обнаружено 47 различных подклассов, включающих все известные основные типы клеток коры головного мозга. При этом астроциты принадлежали только к 2 подклассам, в один из которых входили астроциты, экспрессирующие GFAP, а в другой – астроциты, экспрессирующие фактор роста эпидермальных клеток-8 из жировых глобул молока (Mfge8, milk fat globule-EGF-factor 8), что вновь указывает на ограниченное присутствие GFAP в значительной популяции астроглиальных клеток. Кроме того, важно учитывать тот факт, что GFAP экспрессируется клетками радиальной глии (по сути, стволовыми клетками ЦНС), поэтому идентификация этого маркера в участках нейрогенеза не соответствует локализации зрелых астроцитов, что делает необходимым применение протоколов с использованием альтернативных маркеров.

S100β. Гликопротеин S100β представляет собой Ca²⁺-связывающий белок, который регулирует пролиферацию клеток и их дифференцировку [48]. В астроцитах, полученных от S100β-нокаутных мышей, наблюдается выраженное нарушение передачи сигналов Ca²⁺, что указывает на важную роль S100β в поддержании гомеостаза Ca²⁺ в астроцитах [49].

Примечателен и тот факт, что S100β может участвовать в ремоделировании промежуточных филаментов астроцитов путем предотвращения избыточной полимеризации GFAP

в присутствии микромолярных уровней Ca²⁺, что, в свою очередь, подтверждает идею о том, что промежуточные филаменты астроглиальных клеток представляют собой динамические структуры цитоскелета, а также о существовании цитоплазматических факторов, участвующих в регуляции процесса их сборки [50].

Известно, что астроциты синтезируют и экспрессируют S100β, который в зависимости от уровня экспрессии оказывает нейропротекторный или нейротоксический эффект, стимулирует пролиферацию астроглии, способствует ее реактивности в более высоких концентрациях, а также регулирует активацию микроглии в участках воспаления [51]. Более того, согласно экспериментальным данным, S100β является глиальным модулятором нейрональной синаптической пластичности и долговременной потенциации [52].

При патологических состояниях экспрессия S100β существенно изменяется, поэтому, например, повышенные уровни этого белка в сыворотке и спинномозговой жидкости могут иметь определенное диагностическое значение в контексте повреждения клеток астроглиальной природы [53].

Использование S100β в качестве маркера астроцитов обусловлено его высоким уровнем экспрессии, особенно в периваскулярной астроглии. Так, двойное иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием S100β и GFAP показало, что только около 80% S100β-положительных клеток также были и GFAP-положительными, в то время как все GFAP-положительные клетки также экспрессировали и S100β в гиппокампе мышей. При этом уровень экспрессии S100β у астроцитов был значимо больше, чем GFAP. Более того, GFAP-положительные клетки, экспрессирующие S100β, практически не отличались от GFAP-отрицательных по размеру, форме и иммунореактивности к S100β [54] (рисунок).

Более того, в ходе сравнительного анализа распределения и экспрессии трех маркеров астроцитов – NDRG2, GFAP и S100β – в коре, гиппокампе и таламусе установлено, что в отличие от GFAP-иммунопозитивных астроцитов, NDRG2- и S100β-экспрессирующие астроциты распределены более равномерно по всему головному мозгу. При этом высокий уровень экспрессии NDRG2 и S100β наблюдался в коре и таламусе, а GFAP – в гиппокампе [55].

В дополнение к этому S100β экспрессируется в астроцитах серого и белого вещества [56], тогда как GFAP – только в белом веществе головного мозга [57]. Однако клеточная специфичность S100β существенно усту-

пает таковой у GFAP. Так, помимо экспрессии S100 β в астроцитах, выявлено его присутствие в олигодендроцитах [17], эпендимоцитах [18], эндотелии кровеносных сосудов, лимфоцитах [19], а также в нейронах [58] (рисунок).

S100a10 — член семейства белков S100, который экспрессируется во многих органах (сердце, почки, печень, легкие, селезенка, желудочно-кишечный тракт), в том числе и в головном мозге, где он играет важное значение в транспортировке через мембраны, секреции везикул и эндоцитозе [59]. В отличие от S100 β , экспрессия S100a10 была выявлена не только в нейронах, эндотелиальных клетках стенок кровеносных сосудов, астроцитах, микроглии, олигодендроцитах, эпендимных клетках в различных областях головного мозга, но и в перicyтах [60]. При этом экспрессия S100a10 в нейронах даже в пределах одной области головного мозга менее выражена, тогда как астроциты и микроглия отличаются высоким уровнем экспрессии. Кроме того, экспрессия S100a10 выражено усиливается в реактивных астроцитах при повреждении головного мозга у мышей с моделью инсульта и нейровоспаления [61].

EAAT-1 и EAAT-2. Установлено, что транспортеры глутамата EAAT-1 (GLAST) [21] и EAAT-2 (GLT-1) [21] экспрессируются практически исключительно в астроцитах. При этом EAAT-1 является наиболее распространенным маркером, что обусловлено его достаточно широкой локализацией в глии Бергмана, глии Мюллера, радиальной глии [62] (рисунок). В другом исследовании установлено, что GLT-1 в высоких концентрациях экспрессируется в гиппокампе, боковой перегородке, коре головного мозга и полосатом теле, в то время как GLAST преимущественно экспрессируется в мозжечке [21].

Необходимо отметить и тот факт, что EAAT-1 (GLAST) и EAAT-2 (GLT-1) не обладают высокой специфичностью. Так, в результате альтернативного сплайсинга был получен синтетический пептид GLT-1, который преимущественно экспрессировался в нейронах ЦНС и периферической нервной системе (ПНС), а также обнаруживался в глиальных клетках (олигодендроцитах, эпендимных клетках, эпителиальных клетках хориоидного сплетения, сателлитных клетках и шванновских клетках) (рисунок). Более того, при иммуноокрашивании с использованием антитела против синтетического пептида GLT-1 выявлено преимущественно цитоплазматическое окрашивание нейронов и глиальных клеток, что позволяет предположить присутствие GLT-1 в мембранах внутриклеточных везикул [20].

Глутаминсинтетаза (GS). В последнее время в качестве еще одного маркера астроцитов рассматривают глутаминсинтетазу (GS), экспрессия которой зафиксирована во многих регионах головного мозга. При этом GS маркирует различные типы астроцитов, включая радиальную глию, глию Мюллера и глию Бергмана [22] (рисунок). Примечательно, что в результате двойного иммунофлуоресцентного окрашивания гиппокампа крыс GFAP-положительные астроглиальные клетки экспрессировали GS, тем самым составляя GS-положительную субпопуляцию астроцитов, однако в последней около 40% могли нести GFAP-отрицательные клетки [63]. В дополнение к этому, в другом исследовании двойное иммунофлуоресцентное окрашивание энторинальной коры мышей выявило, что 10% клеток совместно экспрессировали GS и GFAP, только GFAP-положительные клетки составляли 12%, тогда как 78% глиальных клеток экспрессировали исключительно GS [64].

GS имеет цитоплазматическую локализацию в астроцитах [65]. Кроме того, в исследовании *in vitro* показано, что GS в астроцитах может быть локализована в мембране везикул [22].

Однако стоит отметить и то, что экспрессия GS наблюдается как в астроцитах, так и в олигодендроцитах, эпендимных клетках и в некоторых нейронах головного мозга человека [23] (рисунок).

Виментин. Виментин является представителем семейства промежуточных филаментов, который принимает участие в регуляции дифференцировки и миграции клеток, а также передаче клеточных сигналов [25]. Виментин экспрессируется в астроцитах (рисунок), при этом в процессе развития уровень его экспрессии постепенно снижается [66].

Установлено, что у мышей, нокаутных по GFAP и гену, кодирующему виментин, наблюдались нарушения в образовании глиальных рубцов в ответ на повреждение ЦНС, а также изменения реактивности церебральных кровеносных сосудов [67]. Последнее может быть вызвано патологическим изменением свойств эндотелиальных или периваскулярных клеток (как следствие отсутствия виментина в данных клетках) [68] и снижением способности окружающей ткани выдерживать расширение кровеносных сосудов (как следствие отсутствия GFAP и виментина в астроглиальных клетках). В целом, это демонстрирует возможное участие виментина в активации астроцитов в результате развития нарушений в ЦНС.

Аквапорин 4 (AQP4). Интересен и другой маркер астроцитов — аквапорин 4 (AQP4),

представляющий собой белок семейства аквапоринов, образующих водопроводящие каналы в клеточных мембранах. Данный белок особенно сильно экспрессируется в концевых ножках, которые находятся в прямом контакте с микрососудами головного мозга [27]. Также установлено, что AQP4 в большей степени сконцентрирован именно в отростках астроцитов [69] (рисунок).

Коннексин (Cx). Стоит отметить, что экспрессия коннексинов (Cx) астроцитами наблюдается по всему головному мозгу с преобладанием Cx43 над Cx30, причем последний, как правило, локализован совместно с Cx43 в щелевых контактах астроцитов [70]. Кроме того, Cx30 экспрессируется исключительно в астроцитах серого вещества, где его распределение весьма неоднородно [70, 71]. Экспрессия коннексинов необходима для формирования астроглиальной сети, способной быстро передавать из клетки в клетку некоторые низкомолекулярные соединения (лактат, АТФ, НАД⁺) или ионы (рисунок).

ALDH1L1, альдолаза С и SOX9. В ходе одного из исследований [33] по изучению генов, экспрессируемых изолированными астроцитами, нейронами и олигодендроцитами, был идентифицирован ALDH1L1, как новый высокоспецифичный астроглиальный маркер, который в отличие от традиционного маркера астроцитов GFAP широко экспрессируется по всему головному мозгу и позволяет выявить сильно разветвленную морфологию астроцитов, включая тело астроцита и его отростки, тогда как GFAP в первую очередь маркирует отростки астроцитов (рисунок). ALDH1L1, также известная как 10-формилтетрагидрофолатдегидрогеназа (FDH) [72], представляет собой фермент метаболизма фолиевой кислоты, который превращает 10-формилтетрагидрофолат (10-формил-ТНФ) в тетрагидрофолат, играющий важную роль во многих реакциях, таких как биосинтез нуклеотидов *de novo* и регенерация метионина, таким образом оказывая большое влияние на деление и рост клеток [31]. Кроме того, существуют данные о потенциальной связи aberrантной экспрессии ALDH1L1 с дефектами нервной трубки во время раннего развития ЦНС [73]. Экспрессия ALDH1L1 изменяется с возрастом, при этом ALDH1L1 также экспрессируется в субпопуляции олигодендроцитов [32]. Кроме того, установлено, что ALDH1L1 маркирует в основном астроциты, локализованные в коре, но при этом отличается довольно слабым окрашиванием астроцитов белого вещества головного мозга [74].

Фермент альдолаза С (фруктозо-1,6-бисфосфатальдолаза) экспрессируется в большей степени в астроцитах, однако ген альдолазы С был выявлен и в нейронах мозжечка (клетки Пуркинье) [35].

Согласно результатам исследования по изучению экспрессии фактора транскрипции SOX9 как в мозге мыши, так и в мозге человека, обнаружено, что SOX9 почти исключительно экспрессируется астроцитами во взрослом мозге за исключением эпендимных клеток и нейрогенной ниши, где SOX9 также экспрессируется нейрональными клетками-предшественниками (рисунок). Примечательно, что экспрессия SOX9 не снижалась во время старения, а напротив, усиливалась реактивными астроцитами при моделировании бокового амиотрофического склероза на мышцах, а также при окклюзии средней мозговой артерии. Необходимо отметить, что SOX9 является ядерным маркером астроцитов, что не позволяет в полной мере выявить морфологию астроцитов [37].

Интересными являются результаты другого исследования [75], согласно которому CD44 – белок плазматической мембраны и рецептор внеклеточного матрикса – позволяет детально изучить морфологию астроцитов, что, в свою очередь, невозможно сделать при использовании GFAP. Так, CD44-иммунопозитивные астроглиальные клетки с длинными отростками были выявлены в гиппокампе и коре, а также рядом с крупными кровеносными сосудами, причем фенотип данных астроцитов имел сходство с фенотипом фиброзных астроцитов белого вещества, но значительно отличался от фенотипа протоплазматических астроцитов. В то же время были обнаружены и CD44-экспрессирующие астроглиальные клетки с короткими отростками в коре, которые имели сходный фенотип как с протоплазматическими, так и с фиброзными астроцитами (рисунок).

В последнее время в качестве еще одного потенциального маркера астроцитов рассматривают *NDRG2* (N-myc downstream-regulated gene 2) – опухолевый супрессор и ген, связанный с клеточным стрессом, пролиферацией и дифференцировкой клеток. Установлено, что *NDRG2* экспрессируется в различных областях головного мозга, включая кору, обонятельную луковицу, гиппокамп, средней мозг и таламус, причем в двух последних областях уровень экспрессии наиболее высокий [42]. Что наиболее важно, *NDRG2* специфически экспрессируется в астроцитах головного мозга [42, 76]. Кроме того, его экспрессия увеличивалась в клет-

ках глиомы, которые дифференцировались в астроциты, тогда как в реактивных астроцитах экспрессия *NDRG2* значительно снижена [42]. Однако в ряде других исследований убедительно продемонстрировано усиление экспрессии *NDRG2* в реактивных астроцитах при развитии нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона [43]. *NDRG2*, возможно, связан с пролиферацией и дифференцировкой глияльных клеток и может рассматриваться как новый астроцитарный маркер, особенно для зрелых, неактивных астроцитов головного мозга (рисунки).

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ КРАСИТЕЛИ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ

Флуоресцентные красители являются важными инструментами для микроскопии, поскольку позволяют изучать структуру и функции нервных клеток без предварительного повреждения или нарушения функций головного мозга [99].

В частности, астроциты можно визуализировать с помощью флуоресцентных красителей, которые можно вводить в интересующие клетки. Для маркировки обычно используют такие красители, как Lucifer yellow, Alexa Fluor, биоцитин, Fura-2 и другие [45, 99]. Так, флуоресцентный краситель Fura-2AM (ацетоксиметилловый эфир Fura-2) используется для измерения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , поскольку имеет высокую чувствительность и специфичность, а также обладает способностью проникать через клеточные мембраны [100].

В качестве альтернативного варианта астроциты могут быть визуализированы с помощью системы Helios Gene Gun для доставки частиц золота и вольфрама, покрытых липофильными красителями, в живые или фиксированные перфузией срезы головного мозга [101]. Данный метод позволяет быстро и дифференцированно маркировать клетки в различных нервных тканях за счет возможности использования смеси красителей, тем самым облегчая оптическое разделение соседних клеток [102].

Большую популярность в экспериментах по визуализации астроцитов получил глиофильный флуоресцентный зонд — катионный краситель сульфородамин 101 и его аналоги, сульфородамин В или G [103]. Сульфородамин избирательно поглощается астроцитами и благодаря цитоплазматической локализации

выявляет клеточную структуру. Более того, сульфородамин легко проникают через гематоэнцефалический барьер, что дает возможность проводить окрашивание астроцитов с помощью внутривенной инъекции сульфородамина В. При этом флуоресценция астроцитов наблюдается уже через 40 мин после инъекции, а окрашивание сохраняется до 5 ч [103]. Такое поглощение сульфородамина 101 астроцитами, по-видимому, опосредуется переносчиками органических анионов, которые экспрессируются в астроцитах в различных областях головного мозга. В результате сульфородамин 101 легко окрашивает астроциты гиппокампа, однако не накапливается в астроцитах, локализованных в вентролатеральном преоптическом ядре [104]. Кроме того, установлено, что в гиппокампе крыс на ранних постнатальных стадиях сульфородамин 101 избирательно маркирует субпопуляцию астроцитов, которая демонстрирует типичные изменения в развитии и характеристики зрелых GFAP-положительных астроцитов [105].

Несмотря на то что сульфородамин 101 успешно маркирует астроциты в острых срезах гиппокампа крыс [105] и в коре головного мозга мышей *in vivo* [103], он также окрашивает и олигодендроциты за счет мультиспецифического переносчика OATP1C1 (*SLCO1C1*), который транспортирует сульфородамин 101 из астроцитов через щелевые контакты панглиальной сети [106].

Аналогичным образом дипептид кумарина, маркер β -Ala-Lys-Nepsilon-Coumarin, специфически маркирует первичные астроциты в культуре клеток, выделенных из ткани головного мозга крысы. Однако при этом данный маркер окрашивает также и клетки-предшественники олигодендроцитов [107].

Интересными являются результаты исследования, согласно которому использование таких флуорофоров, как родамины, цианины и BODIPYs, дает уникальную возможность избирательно и специфично вызывать сильную флуоресценцию астроцитов гиппокампа в головном мозге мыши и крысы, при этом не маркируя нейроны, а также клетки-предшественники микроглии или олигодендроциты [108].

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ МАРКЕРЫ, СПЕЦИФИЧЕСКИ ЭКСПРЕССИРУЕМЫЕ АСТРОЦИТАМИ

Известно, что астроциты можно визуализировать в срезах головного мозга с помощью флуоресцентных белковых зондов,

избирательно экспрессируемых в астроглии под контролем клеточно-специфических промоторов. Так, были получены трансгенные мыши, у которых астроциты были помечены зеленым флуоресцентным белком (GFP, green fluorescent protein) или его аналогом (EGFP, enhanced green fluorescent protein), экспрессируемым под контролем промотора *GFAP* [109] или промотора гена, кодирующего *S100β* мыши [110], таким образом становясь ценным инструментом для подробного изучения динамических изменений морфологии астроцитов во время развития, а также в патофизиологических условиях.

Стоит отметить, что количество используемых астроглиальных промоторов постоянно увеличивается, и в настоящее время применяются несколько флуоресцентных белковых зондов, имеющих различные спектральные характеристики [111, 112]. Так, была получена серия трансгенных мышей, которые экспрессируют различные флуоресцентные белки рифовых кораллов (RCFP, Reef coral fluorescent proteins), характеризующиеся яркой флуоресценцией, охватывающие широкий спектральный диапазон (от голубого до красного) и управляемые различными промоторами [111].

Астроциты также можно визуализировать посредством экспрессии генетически кодируемых индикаторов Ca^{2+} , таких как желтый Cameleon-Nano 50 (YC-Nano50) [113] или зеленый GCaMP, состоящего из GFP, слитого с кальмодулином и пептидной последовательностью киназы легкой цепи миозина [114]. Более того, согласно результатам ряда исследований, несколько вариантов GCaMP были протестированы в астроцитах, включая GCaMP2, GCaMP3, GCaMP5 и красные RCaMP [115, 116]. Так, введение *N*-концевого 35-членного полиHis RSET (лидерная последовательность плазмиды), связанного с кальмодулином и миозином, приводит к повышению яркости и термостабильности GCaMP2 при сравнении с GCaMP1 [117]. Однако значительное улучшение было реализовано созданием GCaMP3, состоящего из циклически пермутированного зеленого флуоресцентного белка (срGFP), кальмодулина (CaM) и Ca^{2+} /CaM-связывающего миозина «M13», который имел более высокую яркость, широкий динамический диапазон и большее сродство к Ca^{2+} , позволяя обнаруживать увеличение уровня Ca^{2+} , вызванное отдельными потенциалами действия *in vitro* [118]. GCaMP5 был получен на основе GCaMP3 с использованием направленного мутагенеза и скрининга, что позволило увеличить динамический диапазон в несколь-

ко раз по сравнению с его предшественником GCaMP3 [119]. Для создания красного RCaMP был использован красный флуоресцентный белок (FP) mRuby вместо срEGFP, который встраивали в каркас GCaMP3, что позволило повысить термодинамическую стабильность [116].

Примечательно, что визуализировать астроциты *in vivo* можно флуоресцентными маркерами с использованием аденоассоциированных вирусных векторов (AAV) и лентивирусных векторов, введение которых позволяет вызвать появление сигналов флуоресценции, специфичных для того или иного типа клеток и локализованных в ядре, что, в свою очередь, дает возможность легко выявлять и различать клетки различной природы. Так, с использованием метода специфической флуоресцентной маркировки нейроны и астроциты были разделены спектрально за счет нейрональной экспрессии красного флуоресцентного белка tdTomato и астроглиальной экспрессии EGFP [120].

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ АСТРОЦИТОВ

Уровни экспрессии мРНК генов характеризуют состояние транскрипции клетки, таким образом обеспечивая понимание ее функции, активности и состояния развития, а также степень патологического ремоделирования при развитии заболевания. Транскриптомный профиль астроцитов головного мозга человека и мыши был охарактеризован с помощью микроматриц и технологий секвенирования РНК в сочетании с такими методами, как флуоресцентно-активированная сортировка клеток (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorting) и клеточный пэннинг трансгенно меченных астроцитов [121, 122].

Так, в ходе исследования [123] транскрипции астроглиальных клеток, выделенных *in vivo* из коры головного мозга взрослых трансгенных мышей линии FVB/N-Tg (GFAPGFP) 14Mes/J, с использованием FACS астроцитов, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок (GFP), обнаружено, что значительная доля экспрессируемых астроцитами генов (около 34%) участвуют в клеточном метаболизме. Вместе с тем в ходе последующего ПЦР-анализа выявлено, что уровень экспрессии ферментов, участвующих в метаболизме гликогена, в астроцитах выше, чем в нейронах. При сравнении относительной экспрессии всех гликолитических ферментов,

участвующих в цепи реакций от фосфорилирования глюкозы до синтеза пирувата, в 7 из 10 стадий гликолиза наблюдалась значительно более высокая экспрессия ферментов в астроцитах по сравнению с нейронами. Более того, в астроцитах наблюдался активный окислительный метаболизм, обусловленный высокой относительной плотностью митохондрий, что указывает на возможность астроцитов вносить значительный вклад в функциональную визуализацию мозга, включая сигналы МРТ, зависящие от уровня кислорода в крови [123].

В другом исследовании [33] у трансгенных мышей линии S100 β -EGFP в возрасте 1–8 и 17–30 дней с помощью FACS были выделены S100 β /EGFP-положительные астроциты, экспрессирующие EGFP под контролем промотора *S100 β* . Сравнение незрелых (1–8 дней) и зрелых (17–30 дней) астроцитов показало, что гены, высокоэкспрессируемые в незрелых астроцитах, участвуют в пролиферации и развитии клеток (например, гены клеточного цикла) и не являются астроцит-специфичными, тогда как гены, экспрессируемые зрелыми астроцитами, специфичны для астроглии. Так, к последним относятся гены, кодирующие такие секретлируемые белки, как ApoE, ApoJ/clusterin, Pla2g7, Sparc, Sparc1 и Mfge, некоторые из которых принимают участие во взаимодействии астроцитов с синапсами или астроцитов с эндотелиальными клетками. Многие из этих генов высоко экспрессируются в астроцитах в возрасте от 1 до 17 дней, что позволяет предположить, что белки, которые они кодируют, играют важную роль в развитии ЦНС во время и после формирования большинства синапсов, что, в свою очередь, согласуется с данными о способности астроцитов регулировать образование синапсов [124]. Более того, в астроцитах был выявлен ряд других генов (*NPAS3*, *MLC1*, *LGII/4* и *GPR56*), которые участвуют в развитии психических заболеваний, таких как шизофрения и биполярное расстройство [125–127]. Так, *NPAS3* – ген фактора транскрипции bHLH (basic helix-loop-helix) домена PAS (Per, Arnt, Sim), кодирующий нейрональный белок 3 домена PAS (*NPAS3*), экспрессируется в глии Бергмана в мозжечке [128]. Белок *NPAS3* принимает участие в регуляции нейрогенеза, циркадного ритма и пролиферации клеток. Мутация гена *NPAS3* является фактором риска психических расстройств [129]. У мышей делеция гена *NPAS3* вызывает развитие нарушений нейрогенеза и синаптической передачи в гиппокампе [130]. Ген *MLC1*, кодирующий мембранный белок *MLC1*, специфически экспрессируется в

дистальных астроглиальных отростках в периваскулярной, субэпендимальной и субпиалярной областях головного мозга и содержит несколько трансмембранных доменов, что предполагает выполнение данным белком транспортной функции [125]. Ген *LGII/4* представляет собой богатый лейцином, инактивированный в глиоме ген, который экспрессируется в астроцитах и играет важную роль в синаптической передаче и миелинизации. Так, *LGII/4* принимает участие в регуляции пролиферации глии в ПНС, а также, связываясь с нейронным рецептором ADAM22, способствует миелинизации аксонов шванновскими клетками [131]. Ген *GPR56* кодирует белки семейства рецепторов, связанных с G-белком адгезии – рецептор 56, связанный с G-белком (*GPR56*). Данный ген экспрессируется как в микроглии, олигодендроцитах и астроцитах, так и в нейрональных клетках-предшественниках и развивающихся нейронах [132, 133], принимает участие в миелинизации, пролиферации [134] и синаптогенезе [135].

Это дает возможность расширить понимание о степени вклада астроцитов в синаптическую регуляцию и развитие неврологических и психических заболеваний [136]. Действительно, согласно недавно полученным данным, астроциты могут принимать непосредственное участие в опосредовании элиминации синапсов в развивающемся и взрослом мозге, что, в свою очередь, играет важную роль в постоянном ремоделировании синаптической архитектуры головного мозга [137].

Интересным явилось исследование по изучению профиля транскрипции реактивной астроглии на астроцитах, выделенных с помощью FACS от взрослых трансгенных мышей линии *Aldh1l1-EGFP* после моделирования травмы головного мозга [61]. Обнаружено, что реактивные астроциты выражено изменяют свой транскрипционный профиль, а именно: основные изменения выявлены в генах, кодирующих белки внеклеточного матрикса – коллаген (*Col12a1*, *Col6a1*) и версикан (*Vcan*), тромбоспондин (*Thbs1*) и фибулин 5 (*Fbln5*), *CD44* и нейрофасцин (*Nfasc*), что указывает о способности реактивных астроцитов изменять внеклеточный матрикс при формировании глиального рубца. Аналогично, гены, кодирующие белки промежуточных филаментов (*GFAP*, виментин и нестин), высоко экспрессировались в реактивных астроцитах, тем самым отражая морфологические изменения, которые происходят при активации. Кроме того, выявлена группа генов, кодирующих цитокины, белки презентации антигена и пути

системы комплемента, экспрессия которых значительно увеличена в реактивных астроцитах, что предполагает регуляторную роль астроцитов при взаимодействии с клетками иммунной системы в результате повреждения [61].

Важно отметить, что при сравнении транскриптомов нескольких популяций астроцитов, экспрессирующих специфические клеточные маркеры, например, GFAP- против GLT-1-положительных астроцитов [123], ALDH1L1- против GLT-1-положительных астроцитов [32] и ALDH1L1- против GlialCAM-иммунопозитивных астроцитов [138], не было обнаружено выраженных различий между этими популяциями клеток, что указывает на то, что маркеры коэкспрессируются в большинстве астроцитов.

Одним из способов определить молекулярную гетерогенность астроцитов является использование транскриптомного анализа одиночных клеток. В ходе проведения нескольких исследований была собрана информация о транскриптоме отдельных астроцитов [47, 139], однако они не включали дальнейшего описания гетерогенности астроцитов. Однако в результате проведения крупномасштабного исследования по секвенированию одноклеточной РНК клеток коры и CA1 области гиппокампа мышей, было идентифицировано два подкласса астроцитов — GFAP и Mfge8. При этом астроциты, экспрессирующие GFAP, составляли пограничную глиальную мембрану — верхний слой нервной ткани головного мозга, лежащий непосредственно под мягкой мозговой оболочкой, тогда как второй подкласс астроцитов располагался более равномерно в коре и характеризовался меньшей разветвленностью отростков [47].

ОПТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ АСТРОЦИТОВ

Оптогенетика представляет собой ценный инструмент для изучения реакции астроцитов на передачу сигналов, специфичных для различных типов нейронов, с помощью светочувствительных белков — опсинов, которые включают микробные ионные каналы и ионные насосы, а также сконструированные GPCR [140]. Поглощение света определенной длины волны опсином вызывает конформационные изменения, которые запускают разнообразные изменения в клетках, экспрессирующих опсин. При этом некоторые опсины (канальный родопсин 2 (ChR2),

галородопсин, археродопсин (Arch), археродопсин-Т (Arch-T)) индуцируют транслокацию ионов [141–143], а другие (меланопсин) — активируют внутриклеточные сигнальные каскады, такие как передача сигналов, опосредованная G-белком [144].

Важно, что оптогенетика позволяет избирательно нацеливаться на определенные клеточные популяции, в частности, астроциты, и оказывать направленное воздействие, что, в свою очередь, дает возможность осуществлять более глубокий и детальный анализ их функций в ЦНС [8]. В ходе проведения ряда исследований было продемонстрировано, что оптогенетическая стимуляция астроцитов посредством экспрессии светочувствительных ионных каналов и рецепторов приводит к выраженным изменениям их функциональной пластичности [145, 146].

Установлено, что стимуляция Opto-a1AR (метаботропный опсин), экспрессируемого в астроцитах гиппокампа, может усиливать долговременную синаптическую пластичность у мышей, тогда как катионный мембранный канал ChR2 (ионотропный опсин) не дает столь выраженного эффекта. Это показывает, что долгосрочную синаптическую пластичность возможно модулировать оптогенетически, что может быть использовано для нормализации синаптической передачи и коррекции нарушений пластичности при некоторых нейродегенеративных заболеваниях, в частности болезни Альцгеймера [147].

Показано, что оптическая активация астроцитов ChR2 может стимулировать высвобождение АТФ, что, в свою очередь, усиливает возбуждающую передачу сигналов в синапсах за счет стимуляции рецепторов P2Y1 и A2A [148]. Однако в недавно проведенном исследовании с использованием оригинального приема, основанного на сочетанном применении генетически кодируемых индикаторов Ca^{2+} — GCaMP6f в астроцитах и селективной экспрессии меланопсина (фотопигмента, связанного с G-белком) в астроцитах для запуска передачи сигналов Ca^{2+} , показано, что меланопсин способен стимулировать инозитол-1,4,5-трифосфат (IP3)-зависимые Ca^{2+} -сигналы в астроцитах и вызывать АТФ-зависимое временное усиление возбуждающей синаптической передачи в гиппокампе посредством пуринергической активации рецепторов P2Y1 и A2A. При этом в отличие от меланопсина астроглиальные сигналы Ca^{2+} , вызванные стимуляцией ChR2, были зафиксированы после более длинных световых импульсов (более 5 секунд). Кроме того, в усло-

виях низкочастотной световой стимуляции астроциты, трансфицированные меланопсином, могут вызывать долговременную потенциацию, что активирует эпизодическую память, тем самым делая меланопсин оптическим инструментом для регуляции широкого спектра действий астроцитов в нейронных сетях *in vivo* [144].

В другом исследовании с использованием взрослых мышей (2–5 месяцев) линии tTAMIC1-tetO-ChR2(C128S)-EYFP (разработка Tanaka et al. [149]) оценивали устойчивый ответ Ca^{2+} в астроцитах при их направленной световой стимуляции в неокортексе. Данная модель трансгенных мышей экспрессирует высокочувствительный к свету мутантный катионный канал ChR2 (C128S) в астроцитах (с промотором *MIC1*), который открывается в синей области спектра и закрывается – в оранжевой, что позволило в данном исследовании использовать комбинированный подход, основанный на оптогенетической стимуляции ChR2 в сочетании с визуализацией активности Ca^{2+} в астроцитах с помощью индикатора Ca^{2+} – Rhod-2 AM (красная область спектра). Это дает возможность оценить активацию/возбудимость астроцитов и определить их роль в патогенезе некоторых заболеваний головного мозга, таких как эпилепсия, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [150].

Более того, изучая влияние стимуляции астроцитов на обработку информации пирамидальными нейронами слоя 5 (L5PN), установлено, что оптогенетическая активация астроцитов вблизи тела клетки L5PN пролонгирует их возбуждение. Выявленные эффекты связаны с высвобождением S100 β – астроцитарного Ca^{2+} -связывающего белка, который снижает концентрацию внеклеточного Ca^{2+} при высвобождении его из клетки во внеклеточное пространство. При этом уменьшение концентрации внеклеточного Ca^{2+} вызывает возбуждение L5PN, опосредованное активацией ионных каналов Nav1.6 [151].

Интересным является и недавно установленный факт того, что вызванная за счет хронической оптогенетической активации ChR2 эксайтотоксичность глии Бергмана вызывает снижение захвата глутамата, проявляющееся удлинением возбуждающих постсинаптических токов в клетках Пуркинье, что согласуется с документально подтвержденным снижением экспрессии транспортера глутамата EAAT-1 [152].

В другом исследовании для оценки роли физиологической активации астроцитов *in vivo* была создана линия трансгенных мы-

шей Opto α 1AR TG, у которых астроциты экспрессируют оптогенетически активируемый Gq-GPCR Opto α 1AR, фотостимуляция которого обеспечивает временное повышение астроцитарного Ca^{2+} , что фиксировали с помощью Rhod-2 AM [153]. Это позволило изучить влияние модуляции активности астроцитов на активность нейронов, опосредованное передачей сигналов Gq в астроцитах. Так, оптогенетическая активация передачи сигналов Gq в астроцитах в коре временно ингибировала активность нейронов через аденозиновый рецептор A1. Кроме того, сенсорная стимуляция в сочетании с активацией астроцитов индуцировала длительную депрессию сенсорно-вызванного ответа. Согласно результатам поведенческого тестирования, активация астроцитов приводила к улучшению долговременной памяти (тест «Распознавание новых объектов»), однако не оказывала значимого влияния на кратковременную память (тест «Y-лабиринт») [153].

Учитывая тот факт, что световая активация астроцитов ChR2 изменяет динамику базального уровня Ca^{2+} [154], использование в исследовании такого подхода, как математическое моделирование, может иметь важное значение для прогнозирования того, как биофизические свойства конструкции ChR2, а также характеристики лазера могут влиять на передачу сигналов Ca^{2+} астроцитами. В этом аспекте создание математической модели даст возможность оптимизировать схему световой стимуляции с целью достижения желаемого уровня Ca^{2+} в астроцитах, а также разработать новые прикладные конструкции, специфически ориентированные на детальное изучение роли астроглиальных клеток в головном мозге [155].

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ АСТРОЦИТОВ В ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

В результате воздействия негативных стимулов, способствующих повреждению нейронов, астроциты претерпевают ряд фенотипических и функциональных изменений, что сопровождается развитием реактивного астроглиоза. При этом наблюдается гипертрофия и повышенная экспрессия GFAP, что и формирует характерный фенотип реактивных астроцитов, которые, в свою очередь, пролиферируют, мигрируют и превращаются в астроциты, образующие рубцы [156]. Как реактивные астроциты, так и астроциты, образу-

щие рубцы, высоко экспрессируют ряд белков-маркеров, а именно: GFAP, β -катенин-1, нестин и N-кадгерин. Однако существуют и специфические маркерные гены, в частности, гены-маркеры реактивных астроцитов – матриксная металлопротеиназа-2 (MMP-2) (кодирует белок MMP-2), *PLAUR* (кодирует белок-рецептор активатора плазминогена урокиназы (suPAR)), матриксная металлопротеиназа-13 (MMP-13, кодирующая белок коллагеназу 3), *Axin-2* (кодирует аксиноподобный белок-2), ген, кодирующий белок промежуточных филаментов – нестин и *CTNNB1* (кодирует белок β -катенин-1), тогда как к генам-маркерам астроцитов, образующих рубцы, относятся *Cdh2* (кодирует белок N-кадгерин), *SOX9* (кодирует белок фактор транскрипции SOX-9), а также гены, связанные с протеогликанами хондроитинсульфата – *CSGALNACT1* (кодирует белок хондроитинсульфат N-ацетилгалактозаминилтрансферазу 1), *CHST11* (кодирует белок карбогидратсульфотрансферазу 11), *ACAN* (кодирует белок агрекан протеогликанов) и *SLIT2* (кодирует белок-гомолог Slit 2) [156]. Таким образом, представленные гены-маркеры в сочетании с морфологическими характеристиками астроцитов могут быть использованы для определения их фенотипа.

Известны два типа реактивных астроцитов – A1 и A2. Реактивные астроциты A1 продуцируют провоспалительные цитокины, которые могут вызывать гибель нейронов, тогда как реактивные астроциты A2 активируют нейротрофические факторы, которые способствуют выживанию и росту нейронов [157]. Важно отметить, что данные типы реактивных астроцитов можно идентифицировать в соответствии с их индивидуальными генетическими характеристиками. Так, в ходе исследования посмертной ткани головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера, болезнью Хантингтона, болезнью Паркинсона, боковым амиотрофическим склерозом и рассеянным склерозом выявлено, что наиболее высоко в астроцитах A1 экспрессируется компонент 3 (C3). При этом в посмертной ткани головного мозга пациентов с рассеянным склерозом в астроцитах A2 экспрессируют единственный маркер – *S100A10* [158]. Это дает возможность использовать данные гены в качестве специфических маркеров астроцитов A1 и A2 соответственно.

Активированная микроглия вызывает трансформацию астроцитов в астроциты A1 путем высвобождения цитокинов IL-1 α , TNF и C1q, каждый из которых важен для индукции

астроцитов A1 [158]. При этом Mfge8 регулирует астроцитарную конверсию A1/A2 посредством активации PI3K/Akt-пути и подавления NF- κ B-пути.

Напротив, астроциты A2 оказывают нейротрофическое действие на нервную ткань, секретировав несколько нейротрофических факторов. Ген *S100a10*, экспрессируемый астроцитами A2, необходим для пролиферации клеток, восстановления мембран и ингибирования апоптоза клеток [158]. Более того, астроциты A2 способствуют экспрессии противовоспалительного цитокина, трансформирующего фактора роста-бета (TGF β , Transforming growth factor-beta), который участвует в синаптогенезе и играет нейротрофическую роль.

Интересными являются результаты одного из исследований по изучению нескольких фенотипов активированных астроцитов и задействованных при этом регуляторных механизмов [159]. Установлено, что активированные астроциты *in vitro* и *in vivo* проявляют два различных функциональных фенотипа в отношении экспрессии про- или противовоспалительных генов, экспрессии глиального фибриллярного кислого белка и нейротоксической или нейротрофической активности. Также показано, что активированные астроциты высвобождают белок липокалин-2 (LCN2), который регулирует как морфологическую трансформацию астроцитов, связанную с реактивным астроглиозом, так миграцию и апоптоз. Более того, LCN2 способствует провоспалительной активации астроцитов, но в то же время ингибирует передачу сигналов по IL-4/STAT6-пути, участвуя в альтернативной противовоспалительной активации. Это дает возможность предполагать, что секретируемый астроцитами белок LCN2 является аутокринным модулятором функциональной поляризации астроцитов при развитии нейровоспаления и может быть направлен на подавление провоспалительной активации астроцитов и связанных с этим нейродегенеративных заболеваний [159, 160].

МикроРНК АСТРОЦИТОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ТЕРАПИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

МикроРНК представляют собой небольшие регуляторные РНК длиной 21–24 нуклеотида, участвующие в посттранскрипционной регуляции генов. МикроРНК связываются с ин-

формационными (матричными) РНК (мРНК) на основе комплементарности, что приводит к деградации последних или подавлению трансляции [161]. Более того, микроРНК обладают потенциалом для регулирования сотен различных транскриптов [162]. Одной из важных особенностей микроРНК является их возможность транспортироваться от одной клетки к другой через экзосомы, что позволяет микроРНК оказывать широкое влияние на уровне тканей и организма в целом [163].

Известно, что практически все клетки секретируют экзосомы [164]. Так, результаты недавно проведенного исследования [165] по изучению молекулярного состава экзосом, выделяемых астроцитами и нейронами во внеклеточное пространство и обеспечивающих межклеточную коммуникацию путем переноса различных молекул (белков, РНК, липидов), показали, что как астроциты, так и нейроны избирательно включают в экзосомы только часть клеточных микроРНК. При этом существование различия в профилях микроРНК между экзосомами и соответствующими им клетками предполагают, что процесс отбора микроРНК в экзосомы четко регулируется и может иметь клеточную специфичность.

Как острое, так и хроническое повреждение ЦНС вызывает реактивные структурно-функциональные изменения в астроцитах, что определяется, как реактивный астроглиоз. Нарушение функций астроцитов может в значительной степени способствовать прогрессированию патологического процесса за счет активации эксайтотоксичности, окислительного стресса и воспалительных реакций [166]. Нейродегенеративные заболевания, а именно: болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и боковой амиотрофический склероз характеризуются нейровоспалением, когнитивной и двигательной дисфункцией. Это связано с необратимой дегенерацией нейронов в головном и спинном мозге и апоптозом. Однако растущее количество экспериментальных данных демонстрирует важную роль астроцитов в патогенезе хронических нейродегенеративных заболеваний [167].

Нарушение регуляции экспрессии генов является характерным признаком как физиологического старения, так и нейродегенеративных заболеваний [168]. Согласно результатам ряда исследований, микроРНК принимают участие в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, регулируя функцию астроцитов за счет различных механизмов, и таким образом, могут выступать в качестве потенциальных терапевтических мишеней.

Так, у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия 3xTg-AD) выявлено увеличение уровня miR-181a, которая подавляет экспрессию некоторых синаптических белков в астроцитах, в частности, GLT-1, осуществляющего регуляцию синаптической пластичности [169]. Более того, наблюдалась активация miR-155 и c-Jun на фоне индуцированного бета-амилоидом увеличения активности микроглии и астроцитов, что способствовало выработке медиаторов воспаления, таких как IL-6 (интерлейкин-6) и IFN- β (интерферон-бета) [170].

Показано, что у мышей с моделью болезни Альцгеймера (линия APP^{swe}/PS1/E9) активация астроглиального SEBPD (ССААТ/энхансер-связывающий белок дельта – ключевой фактор транскрипции при воспалении в ткани головного мозга) приводит к нарушению пространственного обучения и запоминания за счет активации miR-135a, ингибирующей активность нейротропного фактора Thbs1 (тромбоспондин 1), что, в свою очередь, подавляет синаптогенез, а также снижает рост дендритов и прораствание аксонов нейронов [171].

Болезнь Паркинсона связана с различными патологическими факторами, включая токсичность α -синуклеина и другие механизмы. Обнаружено, что сывороточные концентрации miR-153 и miR-223 прогрессивно снижались у мышей дикого типа (WT) и мышей с генетической моделью болезни Паркинсона (линия GFAP.HMOX1) [172]. Кроме того, циркулирующие уровни обеих микроРНК были ниже у трансгенных мышей по сравнению с контрольными мышами WT, в то время как концентрации белка α -синуклеина были повышены у мышей GFAP.HMOX1 по сравнению со значениями для мышей WT. Это дает возможность предполагать, что miR-153 и miR-223 отрицательно регулируют α -синуклеин в базальных ганглиях у мышей GFAP.HMOX1 [172].

Заслуживает внимания и другое проведенное исследование [173] по оценке влияния внеклеточных везикул, секретируемых астроцитами, которые были выделены от пациентов с боковым амиотрофическим склерозом, на выживаемость двигательных нейронов. Обнаружено, что внеклеточные везикулы не только вызывают гибель двигательных нейронов, но и содержат микроРНК, которые негативно регулируют экспрессию генов, в частности, miR-494-3p подавляет различные гены, включая ген, кодирующий семафорин 3A (SEMA3A), участвующий в росте и поддержании аксонов.

Примечательно и то, что микроРНК, выделенная из поврежденных в ходе развития боко-

вого амиотрофического склероза двигательных нейронов, может оказывать непосредственное негативное влияние на структурно-функциональную целостность астроцитов, что в значительной мере интенсифицирует дегенерацию нейронов [174]. В частности, *in vitro* показано, что астроциты способны поглощать нейрональную miR-218, которая, в свою очередь, ингибирует активность транспортера глутамата EAAT-2 в астроцитах за счет прямого воздействия на 3'-UTR EAAT-2, содержащего несколько сайтов связывания miR-218. Однако блокирование miR-218 заметно увеличивает уровень EAAT-2 в астроцитах у мышей с моделью бокового амиотрофического склероза, что делает данную биомолекулу перспективной терапевтической мишенью. Таким образом, дисфункция астроцитов и реактивный астроглиоз, как ответная реакция на повреждение двигательных нейронов при развитии бокового амиотрофического склероза, может быть опосредована повышенной активностью микроРНК, высвобождаемой из поврежденных нейронов [174].

В совокупности, представленные экспериментальные данные *in vivo* и *in vitro* свидетельствуют, что микроРНК вносят существенный вклад в патогенез нейродегенеративных заболеваний, регулируя прямо или опосредованно функции астроцитов, это находит свое отражение в активации провоспалительных цитокинов, подавлении синаптогенеза, гибели нейронов и митохондриальной дисфункции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Астроциты служат фундаментальными регуляторами в развитии и гомеостазе головного мозга, а также при возникновении и прогрессировании нейродегенеративных заболеваний. Важной особенностью и одновременно сложностью для исследователей является гетерогенность астроцитов, которая заключается в

проявлении различных морфологических характеристик в зависимости от локализации в той или иной области головного мозга. В связи с этим детальное изучение экспрессии генов и функциональных особенностей астроцитов в различных областях мозга имеет первостепенное значение. К сожалению, эта задача полностью не решена до сих пор из-за отсутствия универсального маркера астроглиальных клеток, характерных для той или иной области мозга. Более того, не идентифицировано ни одного «идеального» промотора, специфичного для астроглии, обеспечивающего экспрессию репортерных генов исключительно в клетках данного типа.

Поэтому изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе межклеточного взаимодействия между астроцитами и нейронами, а также открытие новых функций астроглиальных клеток является вескими основаниями для поиска новых маркеров активации астроцитов и методов их визуализации. При этом комбинирование методов визуализации с другими современными протоколами (ПЦР-анализ, электрофизиология, оптогенетика) позволит более детально изучить многогранность функций астроцитов, что будет иметь решающее значение для понимания биологии астроглии в здоровой и поврежденной ткани центральной нервной системы.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-65-46004).

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

Соблюдение этических норм. Статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Montgomery, D. L. (1994) Astrocytes: form, functions, and roles in disease, *Vet. Pathol.*, **31**, 145-167, doi: 10.1177/030098589403100201.
2. Montana, V., Flint, D., Waagepetersen, H. S., Schousboe, A., and Pappas, V. (2021) Two metabolic fuels, glucose and lactate, differentially modulate exocytotic glutamate release from cultured astrocytes, *Neurochem. Res.*, **46**, 2551-2579, doi: 10.1007/s11064-021-03340-y.
3. Kumar, R., Huang, Y.-T., Chen, C.-C., Tzeng, S.-F., and Chan, C.-K. (2020) Astrocytic regulation of synchronous bursting in cortical cultures: from local to global, *Cerebral Cortex Commun.*, **1**, tga053, doi: 10.1093/texcom/tga053.
4. Honoré, E., Khlaifia, A., Bosson, A., and Lacaille, J.-C. (2021) Hippocampal somatostatin interneurons, long-term synaptic plasticity and memory, *Front. Neural. Circuits*, **15**, 687558, doi: 10.3389/fncir.2021.687558.
5. Welser-Alves, J. V., Crocker, S. J., and Milner, R. (2011) A dual role for microglia in promoting tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) expression in

- glial cells in response to neuroinflammatory stimuli, *J. Neuroinflamm.*, **8**, 61, doi: 10.1186/1742-2094-8-61.
6. Stackhouse, T. L., and Mishra, A. (2021) Neurovascular coupling in development and disease: focus on astrocytes, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 702832, doi: 10.3389/fcell.2021.702832.
 7. Santello, M., Toni, N., and Volterra, A. (2019) Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment, *Nat. Neurosci.*, **22**, 154-166, doi: 10.1038/s41593-018-0325-8.
 8. McNeill, J., Rudyk, C., Hildebrand, M. E., and Salmaso, N. (2021) Ion channels and electrophysiological properties of astrocytes: implications for emergent stimulation technologies, *Front. Cell. Neurosci.*, **15**, 644126, doi: 10.3389/fncel.2021.644126.
 9. Gómez-Gonzalo, M., Zehnder, T., Requeie, L. M., Bezz, I. P., and Carmignoto, G. (2018) Insights into the release mechanism of astrocytic glutamate evoking in neurons NMDA receptor-mediated slow depolarizing inward currents, *Glia*, **66**, 2188-2199, doi: 10.1002/glia.23473.
 10. Robin, L. M., Oliveira da Cruz, J. F., Langlais, V. C., Martin-Fernandez, M., Metna-Laurent, M., et al. (2018) Astroglial CB1 receptors determine synaptic D-serine availability to enable recognition memory, *Neuron*, **98**, 935-944, doi: 10.1016/j.neuron.2018.04.034.
 11. Sardar, D., Lozzi, B., Woo, J., Huang, T.-W., Cvetkovic, C., et al. (2021) Mapping astrocyte transcriptional signatures in response to neuroactive compounds, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 3975, doi: 10.3390/ijms22083975.
 12. Gómez-Gonzalo, M., Martin-Fernandez, M., Martínez-Murillo, R., Mederos, S., Hernández-Vivanco, A., et al. (2017) Neuron-astrocyte signaling is preserved in the aging brain: neuron-astrocyte signaling in aging brain, *Glia*, **65**, 569-580, doi: 10.1002/glia.23112.
 13. Verkhratsky, A., and Nedergaard, M. (2018) Physiology of astroglia, *Physiol. Rev.*, **98**, 239-389, doi: 10.1152/physrev.00042.2016.
 14. Middeldorp, J., and Hol, E. M. (2011) GFAP in health and disease, *Progr. Neurobiol.*, **93**, 421-443, doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.005.
 15. Nichols, N. R., Day, J. R., Laping, N. J., Johnson, S. A., and Finch, C. E. (1993) GFAP mRNA increases with age in rat and human brain, *Neurobiol. Aging*, **14**, 421-429, doi: 10.1016/0197-4580(93)90100-P.
 16. Garcia, A. D. R., Doan, N. B., Imura, T., Bush, T. G., and Sofroniew, M. V. (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain, *Nat. Neurosci.*, **7**, 1233-1241, doi: 10.1038/nn1340.
 17. Steiner, J., Bernstein, H.-G., Bogerts, B., Gos, T., Richter-Landsberg, C., et al. (2008) S100 β is expressed in, and released from, OLN-93 oligodendrocytes: influence of serum and glucose deprivation, *Neuroscience*, **154**, 496-503, doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.060.
 18. Steiner, J., Bernstein, H.-G., Bielau, H., Berndt, A., Brisch, R., et al. (2007) Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100 β in human brain, *BMC Neurosci.*, **8**, 2, doi: 10.1186/1471-2202-8-2.
 19. Marichal, N., García, G., Radmilovich, M., Trujillo-Cenóz, O., and Russo, R. E. (2012) Spatial domains of progenitor-like cells and functional complexity of a stem cell niche in the neonatal rat spinal cord, *Stem Cells*, **30**, 2020-2031, doi: 10.1002/stem.1175.
 20. Schmitt, A., Asan, E., Lesch, K.-P., and Kugler, P. (2002) A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system, *Neuroscience*, **109**, 45-61, doi: 10.1016/S0306-4522(01)00451-1.
 21. Lehre, K., Levy, L., Ottersen, O., Storm-Mathisen, J., and Danbolt, N. (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations, *J. Neurosci.*, **15**, 1835-1853, doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-03-01835.1995.
 22. Anlauf, E., and Derouiche, A. (2013) Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization, *Front. Endocrinol.*, **4**, 144, doi: 10.3389/fendo.2013.00144.
 23. Bernstein, H.-G., Bannier, J., Meyer-Lotz, G., Steiner, J., Keilhoff, G., et al. (2014) Distribution of immunoreactive glutamine synthetase in the adult human and mouse brain. Qualitative and quantitative observations with special emphasis on extra-astroglial protein localization, *J. Chem. Neuroanatomy*, **61-62**, 33-50, doi: 10.1016/j.jchemneu.2014.07.003.
 24. Morrow, C. S., Porter, T. J., Xu, N., Arndt, Z. P., Ako-Asare, K., et al. (2020) Vimentin coordinates protein turnover at the aggresome during neural stem Cell quiescence exit, *Cell Stem Cell*, **26**, 558-568, doi: 10.1016/j.stem.2020.01.018.
 25. Battaglia, R. A., Delic, S., Herrmann, H., and Snider, N. T. (2018) Vimentin on the move: new developments in cell migration, *F1000Res.*, **7**, 1796, doi: 10.12688/f1000research.15967.1.
 26. Pattabiraman, S., Azad, G. K., Amen, T., Brielle, S., Park, J. E., et al. (2020) Vimentin protects differentiating stem cells from stress, *Sci. Rep.*, **10**, 19525, doi: 10.1038/s41598-020-76076-4.
 27. Lisjak, M., Potokar, M., Zorec, R., and Jorgačevski, J. (2020) Indirect role of AQP4b and AQP4d isoforms in dynamics of astrocyte volume and orthogonal arrays of particles, *Cells*, **9**, 735, doi: 10.3390/cells9030735.
 28. Wen, H., Nagelhus, E. A., Amiry-Moghaddam, M., Agre, P., Ottersen, O. P., et al. (1999) Ontogeny of water transport in rat brain: postnatal expression of the aquaporin-4 water channel: Aquaporin-4 and brain development, *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 935-945, doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00502.x.
 29. Giaume, C., Naus, C. C., Sáez, J. C., and Leybaert, L. (2021) Glial connexins and pannexins in the healthy and diseased brain, *Physiol. Rev.*, **101**, 93-145, doi: 10.1152/physrev.00043.2018.
 30. Griemsmann, S., Höft, S. P., Bedner, P., Zhang, J., von Staden, E., et al. (2015) Characterization of

- Panglial gap junction networks in the thalamus, neocortex, and hippocampus reveals a unique population of glial cells, *Cereb. Cortex*, **25**, 3420-3433, doi: 10.1093/cercor/bhu157.
31. Krupenko, S. A. (2009) FDH: an aldehyde dehydrogenase fusion enzyme in folate metabolism, *Chem. Biol. Interact.*, **178**, 84-93, doi: 10.1016/j.cbi.2008.09.007.
 32. Yang, Y., Vidensky, S., Jin, L., Jie, C., Lorenzini, I., et al. (2011) Molecular comparison of GLT1⁺ and ALDH1L1⁺ astrocytes *in vivo* in astroglial reporter mice, *Glia*, **59**, 200-207, doi: 10.1002/glia.21089.
 33. Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., et al. (2008) A Transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function, *J. Neurosci.*, **28**, 264-278, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008.
 34. Shiokawa, K., Kajita, E., Hara, H., Yatsuki, H., and Hori, K. (2002) A developmental biological study of aldolase gene expression in *Xenopus laevis*, *Cell Res.*, **12**, 85-96, doi: 10.1038/sj.cr.7290114.
 35. Walther, E. U., Dichgans, M., Maricich, S. M., Romito, R. R., Yang, F., et al. (1998) Genomic sequences of aldolase C (Zebrin II) direct lacZ expression exclusively in non-neuronal cells of transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2615-2620, doi: 10.1073/pnas.95.5.2615.
 36. Thompson, R. J., Kynoch, P. A. M., and Willson, V. J. C. (1982) Cellular localization of aldolase C subunits in human brain, *Brain Res.*, **232**, 489-493, doi: 10.1016/0006-8993(82)90294-3.
 37. Sun, W., Cornwell, A., Li, J., Peng, S., Osorio, M. J., et al. (2017) SOX9 is an astrocyte-specific nuclear marker in the adult brain outside the neurogenic regions, *J. Neurosci.*, **37**, 4493-4507, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3199-16.2017.
 38. Neyrinck, K., Van Den Daele, J., Vervliet, T., De Smedt, J., Wierda, K., et al. (2021) SOX9-induced generation of functional astrocytes supporting neuronal maturation in an all-human system, *Stem Cell Rev. Rep.*, **17**, 1855-1873, doi: 10.1007/s12015-021-10179-x.
 39. Moretto, G., Xu, R. Y., and Kim, S. U. (1993) CD44 expression in human astrocytes and oligodendrocytes in culture, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **52**, 419-423, doi: 10.1097/00005072-199307000-00009.
 40. Dzwonek, J., and Wilczynski, G. M. (2015) CD44: molecular interactions, signaling and functions in the nervous system, *Front. Cell. Neurosci.*, **9**, 175, doi: 10.3389/fncel.2015.00175.
 41. Naruse, M., Shibasaki, K., Yokoyama, S., Kurachi, M., and Ishizaki, Y. (2013) Dynamic changes of CD44 expression from progenitors to subpopulations of astrocytes and neurons in developing cerebellum, *PLoS One*, **8**, e53109, doi: 10.1371/journal.pone.0053109.
 42. Shen, L., Zhao, Z.-Y., Wang, Y.-Z., Ji, S.-P., Liu, X.-P., et al. (2008) Immunohistochemical detection of Ndr2 in the mouse nervous system, *NeuroReport*, **19**, 927-931, doi: 10.1097/WNR.0b013e32830163d0.
 43. Tao, L., Zhu, Y., Wang, R., Han, J., Ma, Y., et al. (2020) N-myc downstream-regulated gene 2 deficiency aggravates memory impairment in Alzheimer's disease, *Behavioural Brain Res.*, **379**, 112384, doi: 10.1016/j.bbr.2019.112384.
 44. Pekny, M., Eliasson, C., Chien, C.-L., Kindblom, L. G., Liem, R., et al. (1998) GFAP-deficient astrocytes are capable of stellation *in vitro* when cocultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density, *Exp. Cell Res.*, **239**, 332-343, doi: 10.1006/excr.1997.3922.
 45. Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., and Ellisman, M. H. (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains, *J. Neurosci.*, **22**, 183-192, doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-01-00183.2002.
 46. Van Den Berge, S. A., Middeldorp, J., Zhang, C. E., Curtis, M. A., Leonard, B. W., et al. (2010) Longterm quiescent cells in the aged human subventricular neurogenic system specifically express GFAP- δ : GFAP- δ in aged human SVZ stem cells, *Aging Cell*, **9**, 313-326, doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00556.x.
 47. Zeisel, A., Muñoz-Manchado, A. B., Codeluppi, S., Lönnerberg, P., La Manno, G., et al. (2015) Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq, *Science*, **347**, 1138-1142, doi: 10.1126/science.aaa1934.
 48. Hu, J., and Van Eldik, L. J. (1996) S100 β induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1313**, 239-245, doi: 10.1016/0167-4889(96)00095-X.
 49. Xiong, Z., O'Hanlon, D., Becker, L. E., Roder, J., MacDonald, J. F., et al. (2000) Enhanced calcium transients in glial cells in neonatal cerebellar cultures derived from S100 β null mice, *Exp. Cell Res.*, **257**, 281-289, doi: 10.1006/excr.2000.4902.
 50. Bianchi, R., Verzini, M., Garbuglia, M., Giambanco, I., and Donato, R. (1994) Mechanism of S100 protein-dependent inhibition of glial fibrillary acidic protein (GFAP) polymerization, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1223**, 354-360, doi: 10.1016/0167-4889(94)90095-7.
 51. Villarreal, A., Seoane, R., González Torres, A., Rosciszewski, G., Angelo, M. F., et al. (2014) S100B protein activates a RAGE-dependent autocrine loop in astrocytes: implications for its role in the propagation of reactive gliosis, *J. Neurochem.*, **131**, 190-205, doi: 10.1111/jnc.12790.
 52. Nishiyama, H., Knöpfel, T., Endo, S., and Itohara, S. (2002) Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4037-4042, doi: 10.1073/pnas.052020999.
 53. Heizmann, C. W. (2019) S100 proteins: Diagnostic and prognostic biomarkers in laboratory medicine, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1866**, 1197-1206, doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.10.015.
 54. Ogata, K., and Kosaka, T. (2002) Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hip-

- pocampus, *Neuroscience*, **113**, 221-233, doi: 10.1016/S0306-4522(02)00041-6.
55. Zhang, Z., Ma, Z., Zou, W., Guo, H., Liu, M., et al. (2019) The appropriate marker for astrocytes: comparing the distribution and expression of three astrocytic markers in different mouse cerebral regions, *Biomed. Res. Int.*, **9605265**, doi: 10.1155/2019/9605265.
 56. Hachem, S., Aguirre, A., Vives, V., Marks, A., Gallo, V., et al. (2005) Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage, *Glia*, **51**, 81-97, doi: 10.1002/glia.20184.
 57. Savchenko, V. L., McKanna, J. A., Nikonenko, I. R., and Skibo, G. G. (2000) Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity, *Neuroscience*, **96**, 195-203, doi: 10.1016/S0306-4522(99)00538-2.
 58. Rickmann, M., and Wolff, J. R. (1995) S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain, *Neuroscience*, **67**, 977-991, doi: 10.1016/0306-4522(94)00615-C.
 59. Zimmer, D. B., Chaplin, J., Baldwin, A., and Rast, M. (2005) S100-mediated signal transduction in the nervous system and neurological diseases, *Cell Mol. Biol.*, **51**, 201-214.
 60. Milosevic, A., Liebmann, T., Knudsen, M., Schintu, N., Svenningsson, P., et al. (2017) Cell- and region-specific expression of depression-related protein p11 (S100a10) in the brain, *J. Comp. Neurol.*, **525**, 955-975, doi: 10.1002/cne.24113.
 61. Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., et al. (2012) Genomic analysis of reactive astrogliosis, *J. Neurosci.*, **32**, 6391-6410, doi: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.
 62. Furuta, A., Rothstein, J. D., and Martin, L. J. (1997) Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development, *J. Neurosci.*, **17**, 8363-8375, doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-21-08363.1997.
 63. Walz, W., and Lang, M. K. (1998) Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus, *Neurosci. Lett.*, **257**, 127-130, doi: 10.1016/S0304-3940(98)00813-1.
 64. Yeh, C.-Y., Verkhatsky, A., Terzieva, S., and Rodríguez, J. J. (2013) Glutamine synthetase in astrocytes from entorhinal cortex of the triple transgenic animal model of Alzheimer's disease is not affected by pathological progression, *Biogerontology*, **14**, 777-787, doi: 10.1007/s10522-013-9456-1.
 65. Norenberg, M. D., and Martinez-Hernandez, A. (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain, *Brain Res.*, **161**, 303-310, doi: 10.1016/0006-8993(79)90071-4.
 66. Sancho-Tello, M., Vallés, S., Montoliu, C., Renau-Piqueras, J., and Guerri, C. (1995) Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glial cultures, *Glia*, **15**, 157-166, doi: 10.1002/glia.440150208.
 67. Pekny, M., Johansson, C. B., Eliasson, C., Stakeberg, J., Wallén, Å., et al. (1999) Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin, *J. Cell Biol.*, **145**, 503-514, doi: 10.1083/jcb.145.3.503.
 68. Gabbiani, G., Schmid, E., Winter, S., Chaponnier, C., de Ckhashtonay, C., et al. (1981) Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 298-302, doi: 10.1073/pnas.78.1.298.
 69. Nagelhus, E. A., Veruki, M. L., Torp, R., Haug, F.-M., Laake, J. H., et al. (1998) Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in müller cells and fibrous astrocytes, *J. Neurosci.*, **18**, 2506-2519, doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-07-02506.1998.
 70. Nagy, J. I., Patel, D., Ochalski, P. A. Y., and Stelmack, G. L. (1999) Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance, *Neuroscience*, **88**, 447-468, doi: 10.1016/S0306-4522(98)00191-2.
 71. Theis, M., and Giaume, C. (2012) Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity, *Brain Res.*, **1487**, 88-98, doi: 10.1016/j.brainres.2012.06.045.
 72. Neymeyer, V., Tephly, T. R., and Miller, M. W. (1997) Folate and 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (FDH) expression in the central nervous system of the mature rat, *Brain Res.*, **766**, 195-204, doi: 10.1016/S0006-8993(97)00528-3.
 73. Anthony, T. E., and Heintz, N. (2007) The folate metabolic enzyme ALDH1L1 is restricted to the midline of the early CNS, suggesting a role in human neural tube defects, *J. Comp. Neurol.*, **500**, 368-383, doi: 10.1002/cne.21179.
 74. Waller, R., Woodroffe, M. N., Wharton, S. B., Ince, P. G., Francese, S., et al. (2016) Gene expression profiling of the astrocyte transcriptome in multiple sclerosis normal appearing white matter reveals a neuroprotective role, *J. Neuroimmunol.*, **299**, 139-146, doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.09.010.
 75. Sosunov, A. A., Wu, X., Tsankova, N. M., Guilfoyle, E., McKhann, G. M., et al. (2014) Phenotypic heterogeneity and plasticity of isocortical and hippocampal astrocytes in the human brain, *J. Neurosci.*, **34**, 2285-2298, doi:10.1523/JNEUROSCI.4037-13.2014.
 76. Nichols, N. R. (2003) Ndr2, a novel gene regulated by adrenal steroids and antidepressants, is highly expressed in astrocytes, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1007**, 349-356, doi: 10.1196/annals.1286.034.
 77. Docampo-Seara, A., Santos-Durán, G. N., Candal, E., Ángel, M., and Díaz, R. (2019) Expression of radial glial markers (GFAP, BLBP and GS) during telencephalic development in the catshark (*Scyliorhinus canicula*), *Brain Struct. Funct.*, **224**, 33-56, doi: 10.1007/s00429-018-1758-2.
 78. Shibata, T., Yamada, K., Watanabe, M., Ikenaka, K., Wada, K., et al. (1997) Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of

- developing mouse spinal cord, *J. Neurosci.*, **17**, 9212-9219, doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-23-09212.1997.
79. Belozor, O. S., Yakovleva, D. A., Potapenko, I. V., Shuvaev, A. N., Smolnikova, M. V., et al. (2019) Extracellular S100 disrupts Bergman glia morphology and synaptic transmission in cerebellar Purkinje cells, *Brain Sci.*, **9**, 80, doi: 10.3390/brainsci9040080.
 80. Miyazaki, T., Yamasaki, M., Hashimoto, K., Kohda, K., Yuzaki, M., et al. (2017) Glutamate transporter GLAST controls synaptic wrapping by Bergmann glia and ensures proper wiring of Purkinje cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 7438-7443, doi: 10.1073/pnas.1617330114.
 81. Tiburcio-Félix, R., Escalante-López, M., López-Bayghen, B., Martínez, D., Hernández-Kelly, L. C., et al. (2018) Glutamate-dependent translational control of glutamine synthetase in Bergmann glia cells, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 5202-5209, doi: 10.1007/s12035-017-0756-3.
 82. Kommata, V., and Dermon, C. R. (2018) Transient vimentin expression during the embryonic development of the chicken cerebellum, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **65**, 11-20, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2017.10.003.
 83. Pow, D. V., and Barnett, N. L. (1999) Changing patterns of spatial buffering of glutamate in developing rat retinae are mediated by the Müller cell glutamate transporter GLAST, *Cell Tissue Res.*, **297**, 57-66, doi: 10.1007/s004410051333.
 84. Yu, J., Zhong, Y., Cheng, Y., Shen, X., Wang, J., et al. (2011) Effect of high hydrostatic pressure on the expression of glutamine synthetase in rat retinal Müller cells cultured *in vitro*, *Exp. Ther. Med.*, **2**, 513-516, doi: 10.3892/etm.2011.239.
 85. Voulgaris, D., Nikolakopoulou, P., and Herland, A. (2022) Generation of human iPSC-derived astrocytes with a mature star-shaped phenotype for CNS modeling, *Stem Cell Rev. Rep.*, doi: 10.1007/s12015-022-10376-2.
 86. Verkhatsky, A., Marutle, A., Rodríguez-Arellano, J. J., and Nordberg, A. (2015) Glial asthenia and functional paralysis: a new perspective on neurodegeneration and Alzheimer's disease, *Neuroscientist*, **21**, 552-568, doi: 10.1177/1073858414547132.
 87. Choi, S. R., Roh, D. H., Yoon, S. Y., Kwon, S. G., Choi, H. S., et al. (2016) Astrocyte sigma-1 receptors modulate connexin 43 expression leading to the induction of below-level mechanical allodynia in spinal cord injured mice, *Neuropharmacology*, **111**, 34-46, doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.027.
 88. Çavdar, S., Köse, B., Sur-Erdem, İ., and Özkan, M. (2021) Comparing astrocytic gap junction of genetic absence epileptic rats with control rats: an experimental study, *Brain Struct. Funct.*, **226**, 2113-2123, doi: 10.1007/s00429-021-02310-y.
 89. Sandoval, M., Luarte, A., Herrera-Molina, R., Varas-Godoy, M., Santibáñez, M., et al. (2013) The glycolytic enzyme aldolase C is up-regulated in rat forebrain microsomes and in the cerebrospinal fluid after repetitive fluoxetine treatment, *Brain Res.*, **1520**, 1-14, doi: 10.1016/j.brainres.2013.04.049.
 90. Flügge, G., Araya-Callis, C., Garea-Rodríguez, E., Stadelmann-Nessler, C., and Fuchs, E. (2014) NDRG2 as a marker protein for brain astrocytes, *Cell Tissue Res.*, **357**, 31-41, doi: 10.1007/s00441-014-1837-5.
 91. Desilva, T. M., Billiards, S. S., Borenstein, N. S., Trachtenberg, F. L., Volpe, J. J., et al. (2008) Glutamate transporter EAAT2 expression is up-regulated in reactive astrocytes in human periventricular leukomalacia, *J. Comp. Neurol.*, **508**, 238-248, doi: 10.1002/cne.21667.
 92. Xin, W., Mironova, Y. A., Shen, H., Marino, R. A. M., Waisman, A., et al. (2019) Oligodendrocytes support neuronal glutamatergic transmission via expression of glutamine synthetase, *Cell Rep.*, **27**, 2262-2271.e5, doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.094.
 93. Winchenbach, J., Düking, T., Berghoff, S. A., Stumpf, S. K., Hülsmann, S., et al. (2016) Inducible targeting of CNS astrocytes in Aldh1l1-CreERT2 BAC transgenic mice, *F1000Res.*, **5**, 2934, doi: 10.12688/f1000research.10509.1.
 94. Tuohy, T. M. F., Wallingford, N., Liu, Y., Chan, F. H., Rizvi, T., et al. (2004) CD44 overexpression by oligodendrocytes: a novel mouse model of inflammation-independent demyelination and dysmyelination, *Glia*, **47**, 335-345, doi: 10.1002/glia.20042.
 95. Porlan, E., Martí-Prado, B., Morante-Redolat, J. M., Consiglio, A., Delgado, A. C., et al. (2014) MT5-MMP regulates adult neural stem cell functional quiescence through the cleavage of N-cadherin, *Nat. Cell. Biol.*, **16**, 629-638, doi: 10.1038/ncb2993.
 96. Akanuma, S., Sakurai, T., Tachikawa, M., Kubo, Y., and Hosoya, K. (2015) Transporter-mediated L-glutamate elimination from cerebrospinal fluid: possible involvement of excitatory amino acid transporters expressed in ependymal cells and choroid plexus epithelial cells, *Fluids Barriers CNS*, **12**, 11, doi: 10.1186/s12987-015-0006-x.
 97. Trillo-Contreras, J. L., Toledo-Aral, J. J., Echevarría, M., and Villadiego, J. (2019) AQP1 and AQP4 contribution to cerebrospinal fluid homeostasis, *Cells*, **8**, 197, doi: 10.3390/cells8020197.
 98. Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T. M., Burda, J. E., Bernstein, A. M., et al. (2017) Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury, *Sci. Rep.*, **7**, 41122, doi: 10.1038/srep41122.
 99. Garaschuk, O., Milos, R. I., and Konnerth, A. (2006) Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging *in vivo*, *Nat. Protoc.*, **1**, 380-386, doi: 10.1038/nprot.2006.58.
 100. Hideharu, H., and Haruo, M. (1994) Fluorescence imaging of intracellular Ca²⁺, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **31**, 1-10, doi: 10.1016/1056-8719(94)90023-X.
 101. Benediktsson, A. M., Schachtele, S. J., Green, S. H., and Dailey, M. E. (2005) Ballistic labeling and dynamic imaging of astrocytes in organotypic hippocampal slice cultures, *J. Neurosci. Methods*, **141**, 41-53, doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.05.013.
 102. Gan, W.-B., Grutzendler, J., Wong, W. T., Wong, R. O. L., and Lichtman, J. W. (2000) Multicolor "DiOlistic" labeling of the nervous system using

- lipophilic dye combinations, *Neuron*, **27**, 219-225, doi: 10.1016/S0896-6273(00)00031-3.
103. Nimmerjahn, A., and Helmchen, F. (2012) *In vivo* labeling of cortical astrocytes with sulforhodamine 101 (SR101), *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2012**, 326-334, doi: 10.1101/pdb.prot068155.
104. Schnell, C., Hagos, Y., and Hülsmann, S. (2012) Active sulforhodamine 101 uptake into hippocampal astrocytes, *PLoS One*, **7**, e49398, doi: 10.1371/journal.pone.0049398.
105. Kafitz, K. W., Meier, S. D., Stephan, J., and Rose, C. R. (2008) Developmental profile and properties of sulforhodamine 101 – labeled glial cells in acute brain slices of rat hippocampus, *J. Neurosci. Methods*, **169**, 84-92, doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.11.022.
106. Hagos, L., and Hülsmann, S. (2016) Unspecific labelling of oligodendrocytes by sulforhodamine 101 depends on astrocytic uptake via the thyroid hormone transporter OATP1C1 (SLCO1C1), *Neurosci. Lett.*, **631**, 13-18, doi: 10.1016/j.neulet.2016.08.010.
107. Dieck, S. T., Heuer, H., Ehrchen, J., Otto, C., and Bauer, K. (1999) The peptide transporter PepT2 is expressed in rat brain and mediates the accumulation of the fluorescent dipeptide derivative beta-Ala-Lys-Nepsilon-AMCA in astrocytes, *Glia*, **25**, 10-20, doi: 10.1002/(sici)1098-1136(19990101)25:1<10::aid-glia2>3.0.co;2-y.
108. Preston, A. N., Farr, J. D., O'Neill, B. K., Thompson, K. K., Tsirka, S. E., et al. (2018) Visualizing the brain's astrocytes with diverse chemical scaffolds, *ACS Chem. Biol.*, **13**, 1493-1498, doi: 10.1021/acscchembio.8b00391.
109. Suzuki, R., Watanabe, J., Arata, S., Funahashi, H., Kikuyama, S., et al. (2003) A transgenic mouse model for the detailed morphological study of astrocytes, *Neurosci. Res.*, **47**, 451-454, doi: 10.1016/j.neures.2003.08.008.
110. Vives, V., Alonso, G., Solal, A. C., Joubert, D., and Legraverend, C. (2003) Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice, *J. Comp. Neurol.*, **457**, 404-419, doi: 10.1002/cne.10552.
111. Hirrlinger, P. G., Scheller, A., Braun, C., Quintela-Schneider, M., Fuss, B., et al. (2005) Expression of reef coral fluorescent proteins in the central nervous system of transgenic mice, *Mol. Cell. Neurosci.*, **30**, 291-303, doi: 10.1016/j.mcn.2005.08.011.
112. Nowotschin, S., Eakin, G. S., and Hadjantonakis, A.-K. (2009) Live-imaging fluorescent proteins in mouse embryos: multi-dimensional, multi-spectral perspectives, *Trends Biotechnol.*, **27**, 266-276, doi: 10.1016/j.tibtech.2009.02.006.
113. Kanemaru, K. (2016) Visualization of astrocytic calcium signals in fine process using an ultrasensitive calcium indicator YC-Nano50, *Folia Pharmacol. Japonica*, **147**, 190-193, doi: 10.1254/fpj.147.190.
114. Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., et al. (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin, *Nature*, **388**, 882-887, doi: 10.1038/42264.
115. Akerboom, J., Chen, T.-W., Wardill, T. J., Tian, L., Marvin, J. S., et al. (2012) Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging, *J. Neurosci.*, **32**, 13819-13840, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012.
116. Akerboom, J., Carreras Calderón, N., Tian, L., Wabnig, S., Prigge, M., et al. (2013) Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics, *Front. Mol. Neurosci.*, **6**, 2, doi: 10.3389/fnmol.2013.00002.
117. Tallin, Y. N. (2006) Imaging cellular signals in the heart *in vivo*: cardiac expression of the high-signal Ca²⁺ indicator GCaMP2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 4753-4758, doi: 10.1073/pnas.0509378103.
118. Tian, L., Hires, S. A., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M. E., et al. (2009) Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators, *Nat. Methods*, **6**, 875-881, doi: 10.1038/nmeth.1398.
119. Akerboom, J. (2012) Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging, *J. Neurosci.*, **32**, 13819-13840, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012.
120. Schulze, W., Hayata-Takano, A., Kamo, T., Nakazawa, T., Nagayasu, K., et al. (2015) Simultaneous neuron- and astrocyte-specific fluorescent marking, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **459**, 81-86, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.073.
121. John Lin, C.-C., Yu, K., Hatcher, A., Huang, T.-W., Lee, H. K., et al. (2017) Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs, *Nat. Neurosci.*, **20**, 396-405, doi: 10.1038/nn.4493.
122. Batiuk, M. Y., Martirosyan, A., Wahis, J., de Vin, F., Marneffe, C., et al. (2020) Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution, *Nat. Commun.*, **11**, 1220, doi: 10.1038/s41467-019-14198-8.
123. Lovatt, D., Sonnewald, U., Waagepetersen, H. S., Schousboe, A., He, W., et al. (2007) The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex, *J. Neuroscience*, **27**, 12255-12266, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3404-07.2007.
124. Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C. A., Mullowney, C. E., Hell, J. W., et al. (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis, *Cell*, **120**, 421-433, doi: 10.1016/j.cell.2004.12.020.
125. Ijja Boor, P. K., de Groot, K., Waisfisz, Q., Kamphorst, W., Oudejans, C. B. M., et al. (2005) MLC1: a novel protein in distal astroglial processes, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **64**, 412-419, doi: 10.1093/jnen/64.5.412.
126. Kinboshi, M., Shimizu, S., Mashimo, T., Serikawa, T., Ito, H., et al. (2019) Down-regulation of astrocytic Kir4.1 Channels during the audiogenic epileptogenesis in leucine-rich glioma-inactivated 1 (Lgi1) mutant rats, *IJMS*, **20**, 1013, doi: 10.3390/ijms20051013.

127. Chiou, B., Gao, C., Giera, S., Folts, C. J., Kishore, P., et al. (2021) Cell type-specific evaluation of ADGRG1/GPR56 function in developmental central nervous system myelination, *Glia*, **69**, 413-423, doi: 10.1002/glia.23906.
128. Gould, P., and Kamnasaran, D. (2011) Immunohistochemical analyses of NPAS3 expression in the developing human fetal brain, *Anat. Histol. Embryol.*, **40**, 196-203, doi: 10.1111/j.1439-0264.2010.01059.x.
129. Kamnasaran, D., Muir, W. J., Ferguson-Smith, M. A., and Cox, D. W. (2003) Disruption of the neuronal PAS3 gene in a family affected with schizophrenia, *J. Med. Genet.*, **40**, 325-332, doi: 10.1136/jmg.40.5.325.
130. Pieper, A. A., Wu, X., Han, T. W., Estill, S. J., Dang, Q., et al. (2005) The neuronal PAS domain protein 3 transcription factor controls FGF-mediated adult hippocampal neurogenesis in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 14052-14057, doi: 10.1073/pnas.0506713102.
131. Linde, K., Aunin, E., Meijer, D., and Bermingham, J. R. (2013) LGI proteins in the nervous system, *ASN Neuro*, **5**, 167-181, doi: 10.1042/AN20120095.
132. Bai, Y., Du, L., Shen, L., Zhang, Y., and Zhang, L. (2009) GPR56 is highly expressed in neural stem cells but downregulated during differentiation, *Neuroreport*, **20**, 918-922, doi: 10.1097/WNR.0b013e32832c92d7.
133. Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., et al. (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex, *J. Neurosci.*, **34**, 11929-11947, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014.
134. Giera, S., Luo, R., Ying, Y., Ackerman, S. D., Jeong, S. J., et al. (2018) Microglial transglutaminase-2 drives myelination and myelin repair via GPR56/ADGRG1 in oligodendrocyte precursor cells, *ELife*, **7**, e33385, doi: 10.7554/eLife.33385.
135. Li, T., Chiou, B., Gilman, C. K., Luo, R., Koshi, T., et al. (2020) A splicing isoform of GPR56 mediates microglial synaptic refinement via phosphatidylserine binding, *EMBO J.*, **39**, e104136, doi: 10.15252/embj.2019104136.
136. Chung, W.-S., Welsh, C. A., Barres, B. A., and Stevens, B. (2015) Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease? *Nat. Neurosci.*, **18**, 1539-1545, doi: 10.1038/nn.4142.
137. Chung, W.-S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., et al. (2013) Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways, *Nature*, **504**, 394-400, doi: 10.1038/nature12776.
138. Zhang, Y., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Caneda, C., Plaza, C. A., et al. (2016) Purification and characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse, *Neuron*, **89**, 37-53, doi: 10.1016/j.neuron.2015.11.013.
139. Tasic, B., Menon, V., Nguyen, T. N., Kim, T. K., Jarsky, T., et al. (2016) Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics, *Nat. Neurosci.*, **19**, 335-346, doi: 10.1038/nn.4216.
140. Bang, J., Kim, H. Y., and Lee, H. (2016) Optogenetic and chemogenetic approaches for studying astrocytes and gliotransmitters, *Exp. Neurobiol.*, **25**, 205-221, doi: 10.5607/en.2016.25.5.205.
141. Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., et al. (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13940-13945, doi: 10.1073/pnas.1936192100.
142. Bekar, L. K., and Walz, W. (1999) Evidence for chloride ions as intracellular messenger substances in astrocytes, *J. Neurophysiol.*, **82**, 248-254, doi: 10.1152/jn.1999.82.1.248.
143. El-Gaby, M., Zhang, Y., Wolf, K., Schwiening, C. J., Paulsen, O., et al. (2016) Archaelhodopsin selectively and reversibly silences synaptic transmission through altered pH, *Cell Rep.*, **16**, 2259, doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.057.
144. Mederos, S., Hernández-Vivanco, A., Ramírez-Franco, J., Martín-Fernández, M., Navarrete, M., et al. (2019) Melanopsin for precise optogenetic activation of astrocyte-neuron networks, *Glia*, **67**, 915-934, doi: 10.1002/glia.23580.
145. Van Den Herrewegen, Y., Sanderson, T. M., Sahu, S., De Bundel, D., Bortolotto, Z. A., et al. (2021) Side-by-side comparison of the effects of Gq- and Gi-DREADD-mediated astrocyte modulation on intracellular calcium dynamics and synaptic plasticity in the hippocampal CA1, *Mol. Brain.*, **14**, 144, doi: 10.1186/s13041-021-00856-w.
146. Nam, M. H., Won, W., Han, K. S., and Lee, C. J. (2021) Signaling mechanisms of μ -opioid receptor (MOR) in the hippocampus: disinhibition versus astrocytic glutamate regulation, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 415-426, doi: 10.1007/s00018-020-03595-8.
147. Gerasimov, E., Erofeev, A., Borodinova, A., Bolshakova, A., Balaban, P., et al. (2021) Optogenetic activation of astrocytes-effects on neuronal network function, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9613, doi: 10.3390/ijms22179613.
148. Shen, W., Nikolic, L., Meunier, C., Pfrieger, F., and Audinat, E. (2017) An autocrine purinergic signaling controls astrocyte-induced neuronal excitation, *Sci Rep.*, **7**, 11280, doi: 10.1038/s41598-017-11793-x.
149. Tanaka, K. F., Matsui, K., Sasaki, T., Sano, H., Sugio, S., et al. (2012) Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system, *Cell Rep.*, **2**, 397-406, doi: 10.1016/j.celrep.2012.06.011.
150. Balachandar, L., Montejo, K. A., Castano, E., Perez, M., Moncion, C., et al. (2020) Simultaneous Ca^{2+} imaging and optogenetic stimulation of cortical astrocytes in adult murine brain slices, *Curr. Protoc. Neurosci.*, **94**, e110, doi: 10.1002/cpns.110.
151. Ryczko, D., Hanini-Daoud, M., Condamine, S., Bréant, B. J. B., Fougère, M., et al. (2021) S100 β -mediated astroglial control of firing and input processing in layer 5 pyramidal neurons of the mouse

- visual cortex, *J. Physiol.*, **599**, 677-707, doi: 10.1113/JP280501.
152. Shuvaev, A. N., Belozor, O. S., Mozhei, O., Yakovleva D. A., Potapenko, I. V., et al. (2021) Chronic optogenetic stimulation of Bergman glia leads to dysfunction of EAAT1 and Purkinje cell death, mimicking the events caused by expression of pathogenic ataxin-1, *Neurobiol. Dis.*, **154**, 105340, doi: 10.1016/j.nbd.2021.105340.
153. Iwai, Y., Ozawa, K., Yahagi, K., Mishima, T., Akther, S., et al. (2021) Transient astrocytic Gq signaling underlies remote memory enhancement, *Front. Neural Circuits*, **15**, 658343, doi: 10.3389/fncir.2021.658343.
154. Takata, N., Sugiura, Y., Yoshida, K., Koizumi, M., Hiroshi, N., et al. (2018) Optogenetic astrocyte activation evokes BOLD fMRI response with oxygen consumption without neuronal activity modulation, *Glia*, **66**, 2013-2023, doi: 10.1002/glia.23454.
155. Moshkforoush, A., Lakshmini B., Moncion C., Montejo K. A., and Riera, J. (2021) Unraveling ChR2-driven stochastic Ca²⁺ dynamics in astrocytes: a call for new interventional paradigms, *PLoS Comput. Biol.*, **17**, e1008648, doi: 10.1371/journal.pcbi.1008648.
156. Hara, M., Kobayakawa, K., Ohkawa, Y., Kumamaru, H., Yokota, K., et al. (2017) Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury, *Nat. Med.*, **23**, 818-828, doi: 10.1038/nm.4354.
157. Li, T., Chen, X., Zhang, C., Zhang, Y., and Yao, W. (2019) An update on reactive astrocytes in chronic pain, *J. Neuroinflammation*, **16**, 140, doi: 10.1186/s12974-019-1524-2.
158. Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., et al. (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia, *Nature*, **541**, 481-487, doi: 10.1038/nature21029.
159. Jang, E., Kim, J.-H., Lee, S., Kim, J.-H., Seo, J.-W., et al. (2013) Phenotypic Polarization of activated astrocytes: the critical role of lipocalin-2 in the classical inflammatory activation of astrocytes, *J. Immunol.*, **191**, 5204-5219, doi: 10.4049/jimmunol.1301637.
160. Lee, S., Jha, M. K., and Suk, K. (2015) Lipocalin-2 in THE Inflammatory activation of brain astrocytes, *Crit. Rev. Immunol.*, **35**, 77-84, doi: 10.1615/CritRevImmunol.2015012127.
161. Jonas, S., and Izaurralde, E. (2015) Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing, *Nat. Rev. Genet.*, **16**, 421-433, doi: 10.1038/nrg3965.
162. Bartel, D. P., and Chen, C.-Z. (2004) Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs, *Nat. Rev. Genet.*, **5**, 396-400, doi: 10.1038/nrg1328.
163. Thakur, B. K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., et al. (2014) Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection, *Cell Res.*, **24**, 766-769, doi: 10.1038/cr.2014.44.
164. Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W. P., Amphornrat, J., Thilemann, S., et al. (2013) Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication, *PLoS Biol.*, **11**, e1001604, doi: 10.1371/journal.pbio.1001604.
165. Luo, X., Jean-Toussaint, R., Sacan, A., and Ajit, S. K. (2021) Differential RNA packaging into small extracellular vesicles by neurons and astrocytes, *Cell. Commun. Signal.*, **19**, 75, doi: 10.1186/s12964-021-00757-4.
166. Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., et al. (2021) Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions, *Nat. Neurosci.*, **24**, 312-325, doi: 10.1038/s41593-020-00783-4.
167. Pekny, M., and Pekna, M. (2016) Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 483-491, doi: 10.1016/j.bbadis.2015.11.014.
168. Gangisetty, O, Cabrera, M. A., and Murugan, S. (2018) Impact of epigenetics in aging and age related neurodegenerative diseases, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **23**, 1445-1464, doi: 10.2741/4654.
169. Zumkehr, J., Rodriguez-Ortiz, C. J., Medeiros, R., and Kitazawa, M. (2018) Inflammatory cytokine, IL-1 β , regulates glial glutamate transporter via microRNA-181a *in vitro*, *J. Alzheimer's Dis.*, **63**, 965-975, doi: 10.3233/JAD-170828.
170. Guedes, J. R., Custódia, C. M., Silva, R. J., de Almeida, L. P., Pedroso de Lima, M. C., et al. (2014) Early miR-155 upregulation contributes to neuroinflammation in Alzheimer's disease triple transgenic mouse model, *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 6286-6301, doi: 10.1093/hmg/ddu348.
171. Chu, Y. Y., Ko, C. Y., Wang, W. J., Wang, S. M., Gean, P. W., et al. (2016) Astrocytic CCAAT/enhancer binding protein δ regulates neuronal viability and spatial learning ability via miR-135a, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 4173-4188, doi: 10.1007/s12035-015-9359-z.
172. Cressatti, M., Song, W., Turk, A. Z., Garabed, L. R., Benchaya, J. A., et al. (2019) Glial HMOX1 expression promotes central and peripheral α -synuclein dysregulation and pathogenicity in parkinsonian mice, *Glia*, **67**, 1730-1744, doi: 10.1002/glia.23645.
173. Varcianna, A., Myszczyńska, M. A., Castelli, L. M., O'Neill, B., Kim, Y., et al. (2019) Micro-RNAs secreted through astrocyte-derived extracellular vesicles cause neuronal network degeneration in C9orf72 ALS, *EBioMedicine*, **40**, 626-635, doi: 10.1016/j.ebiom.2018.11.067.
174. Hoye, M. L., Regan, M. R., Jensen, L. A., Lake, A. M., Reddy, L. V., et al. (2018) Motor neuron-derived microRNAs cause astrocyte dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis, *Brain*, **141**, 2561-2575, doi: 10.1093/brain/awy182.

ASTROCYTE ACTIVATION MARKERS**Review**

**Y. V. Gorina^{1,2*}, A. B. Salmina^{1,2,3}, A. I. Erofeev¹, E. I. Gerasimov¹, A. V. Bolshakova¹,
P. M. Balaban^{1,4}, I. B. Bezprozvanny^{1,5}, and O. L. Vlasova¹**

¹ *Laboratory of Molecular Neurodegeneration, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University,
194021 St. Petersburg, Russia*

² *Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry,
Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky,
660022 Krasnoyarsk, Russia; e-mail: yana_20@bk.ru*

³ *Laboratory of Neurobiology and Tissue Engineering,
Brain Institute, Research Center of Neurology, 105064 Moscow, Russia*

⁴ *Laboratory of Cellular Neurobiology of Learning, Institute of Higher Nervous Activity,
117485 Moscow, Russia*

⁵ *Department of Physiology, University of Texas Southwestern Medical Center,
75390 Dallas, USA*

Astrocytes are the most common type of glial cells that provide homeostasis and protection of the central nervous system. Important specific characteristic of astrocytes is the manifestation of morphological heterogeneity, which is directly dependent on the localization in a particular area of the brain. Astrocytes can integrate into neural networks and keep neurons active in various areas of the brain. Moreover, astrocytes express a variety of receptors, channels, and membrane transporters, which underlie their peculiar metabolic activity, which determines the plasticity of the central nervous system during development and aging. Such a complex structural and functional organization of astrocytes determines the use of modern methods for their identification and analysis. Considering the important fact that determining the most appropriate marker for polymorphic and multiple subgroups of astrocytes is of decisive importance for the study of their multifunctionality, this review presents markers, modern imaging techniques and identification of astrocytes. It represents a valuable resource for studying the structural and functional properties of astrocytes, as well as better understanding the extent to which astrocytes contribute to neuronal activity.

Keywords: astrocytes, markers, imaging methods, miRNA, optogenetics