

УДК 57.012.4

ВЕРоятНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ ТРЕХСТОРОННЕГО СИНАПСА В ПЕРВИЧНОЙ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЕ КРЫС И РАЗМЕР АКТИВНОЙ ЗОНЫ СИНАПСА НАХОДИТСЯ В ПРЯМОЙ ЗАВИСИМОСТИ

Филиппова С. Ю., Логвинов А. К., Кириченко Е. Ю.

*Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, ЮФУ, Ростов-на-Дону, Россия
E-mail: filsv@yandex.ru*

Концепция «трехстороннего синапса», в которой химический синапс рассматривается в функциональном единстве с контактирующим с ним периферическим отростком астроцита, прочно укоренилась в современной нейробиологии. Морфологические характеристики трехстороннего синапса в различных структурах мозга имеют свои особенности, которые связаны с особенностями функционирования локальных нейронных цепей. Несмотря на многолетние исследования строения и функции кортикальной колонки первичной соматосенсорной коры крыс, особенности взаимодействия астроцитов и нейронов в данной структуре остаются слабо изученными. В частности, не известно, с какими синапсами астроциты чаще всего устанавливают контакт. В своей работе мы исследовали связь размера синапса с вероятностью образования контакта с астроцитарной мембраной отдельно для каждого слоя кортикальной колонки и обнаружили, что в первичной соматосенсорной коре крыс астроцит достоверно чаще контактирует с более крупными синапсами. Обнаруженная закономерность сохраняется во всех слоях кортикальной колонки.

Ключевые слова: астроцит, трехсторонний синапс, химический синапс, первичная соматосенсорная кора, трансмиссионная электронная микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Астроциты – основные клетки нейроглии, обеспечивающие энергетический и водно-электролитный баланс в мозге, а также участвующие в регуляции синаптической передачи и групповой активности нейронов [1]. Клетки астроглии обладают очень сложной разветвленной формой и высоким отношением поверхности к объему [2]. Астроциты серого вещества имеют относительно небольшую сому и, при этом, значительное количество тончайших периферических отростков, нитевидной или листовидной формы. Поскольку астроцитарные отростки обладают меньшей жесткостью, чем нейроны и другие клетки мозга они могут «просачиваться» между другими объектами нейропилия [3]. Ещё в начале 70-х годов 20-го века было отмечено, что тончайшие периферические отростки астроцитов часто контактируют с химическими синапсами, оплетая их и создавая астроглиальные оболочки [4]. Позже было сформулировано представление о «трехстороннем синапсе», которое получило широкое признание в современной нейронауке [5]. Поскольку в месте непосредственного примыкания перисинаптического астроцитарного отростка к синаптической щели астроцитами выделяются сигнальные молекулы, модулирующие

синаптическую передачу, эти клетки стали рассматривать в качестве полноценного участника синаптической передачи.

Количество контактов, образуемых синапсами и мембранами астроцитов, было изучено для разных областей мозга модельных животных. Процент таких синапсов неодинаков в различных структурах, а также варьирует в одной и той же структуре в зависимости от целого ряда воздействий [6]. При этом, на настоящий момент не установлены какие-либо общие закономерности, определяющие, с каким синапсом астроцит будет образовывать контакт. Так, было обнаружено, что в радиальном слое поля СА1 гиппокампа в контакт с астроцитом чаще вступают более крупные синапсы [7], в то время, как в поле СА3 гиппокампа крыс эта закономерность не сохраняется, и астроцитарные мембраны не достигают синаптических щелей крупных синапсов, образуемых мшистыми волокнами на пирамидальных нейронах [8]. На настоящий момент закономерности формирования трехстороннего синапса в неокортексе остаются не изученными. С учетом известных послонных различий функциональных синаптических связей между нейронами, можно предположить, что и взаимодействие нейронов с астроцитами в области химических синапсов также будет неодинаковым по слоям кортикальной колонки. С целью изучения особенностей формирования трехстороннего синапса в коре млекопитающих мы исследовали связь размера синапса с вероятностью образования контакта с астроцитарной мембраной отдельно для каждого слоя кортикальной колонки. В качестве объекта исследования была выбрана первичная соматосенсорная кора крыс, являющаяся хорошо изученной моделью кортикальных взаимодействий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили образцы коры S1 беспородных белых крыс мужского пола (n=5, Р 60-80). Животным вводили сублетальную дозу нембутала, после чего проводили транскардиальную перфузию сначала фосфатным буфером и далее 4 % раствором параформальдегида. После перфузии мозг извлекали и оставляли для дофиксации в растворе параформальдегида на ночь при 4С⁰. Далее на вибраторе VT 1000E (Leica, Германия) через область первичной соматосенсорной коры изготавливали фронтальные срезы толщиной 40 мкм. После пермеабилзации в парах жидкого азота, проводили иммунное мечение с пероксидазной меткой на плавающих срезах. В исследовании применялись первичные антитела к маркеру астроцитов s100b (PA0900, Leica) и система детекции EnVision System + Peroxidase (DAB) (Dako, Германия). Проявление метки проводили в реакции с 3,3'-диаминобензидином, после чего срезы были зафиксированы в 1 % растворе OsO₄, обезвожены в спиртах восходящей концентрации и заключены в эпоксидную смолу EPON-812 плоскопараллельным методом. Из полученных срезов иссекали участки, захватывающие все 6 слоев первичной соматосенсорной коры, и приполимеризовывали к готовому блоку из эпоксидной смолы. Далее на ультрамикротоме Ultracut-E (Leica, Германия) изготавливали полутонкие и ультратонкие срезы. На первом этапе на полутонких срезах на светооптическом уровне определяли границы всех слоев и ориентация образца. Материалом для дальнейшего анализа служили снимки нейропиля первичной соматосенсорной коры,

сделанные с ультратонких срезов при увеличении X25 000 на трансмиссионном электронном микроскопе Jem 1011 (Jeol, Япония).

Измерение длины синаптической щели проводили в программе ImageJ. Контакт астроцита с химическим синапсом характеризовался тем, что периферический отросток астроцита обнаруживался в пределах 100 нм по обе стороны от плоскости синаптической щели. Мы измерили длину синаптической щели отдельно для синапсов, образующих контакт с астроцитами, и без контакта. Всего было сделано по 300 измерений для каждого слоя и каждого типа синапсов. Для анализа значимости наблюдаемых различий применяли непарный двусторонний тест Стьюдента, расчеты и построение графиков производили при помощи программного обеспечения STATISTICA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенной работы нами было получено по 250 снимков для каждого слоя первичной соматосенсорной коры с увеличением X25000. На полученных снимках электроплотные продукты реакции пероксидазы с 3,3'-диаминобензидином визуализировались только в профилях астроцитов с характерной для них нерегулярной и сильно разветвленной формой (рис. 1А). Разработанный нами протокол иммунной детекции и последующей проводки ткани позволил сохранить характерную ультраструктуру химических синапсов. По данным проведенного электронномикроскопического исследования основная часть трехсторонних синапсов образована возбуждающими асимметричными химическими синапсами (рис. 1Б). Тормозные синапсы, отличающиеся отсутствием постсинаптического осмиофильного уплотнения, встречались на порядок реже.

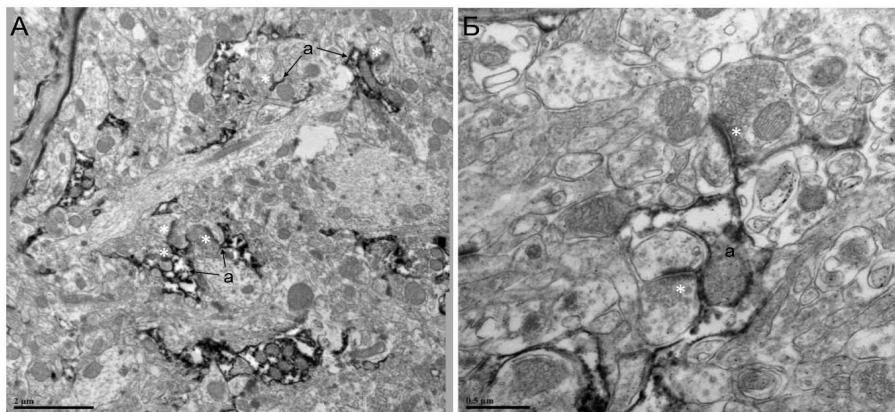


Рис. 1. Распределение глиального белка s100b в нейропиле первичной соматосенсорной коры крыс. А. Общий вид нейропиля 3-го слоя коры. Б. Возбуждающие аксо-шиповые синапсы, контактирующие с астроцитарной мембраной. Четко видны синаптические щели и уплотненные постсинаптические мембраны. Обозначения: а – профиль астроцита; звездочкой отмечены некоторые возбуждающие астро-шиповые синапсы, образующие «трехсторонний синапс» с отростком астроцита. Длина масштабных отрезков указана на электронограммах.

Полученные по результатам исследования распределения длин синаптической щели для синапсов, контактирующих и не контактирующих с астроцитом, имели явно выраженный асимметричный характер. Для обоих типов синапсов наблюдалось явное смещение в сторону более коротких длин активной зоны (рис. 2).

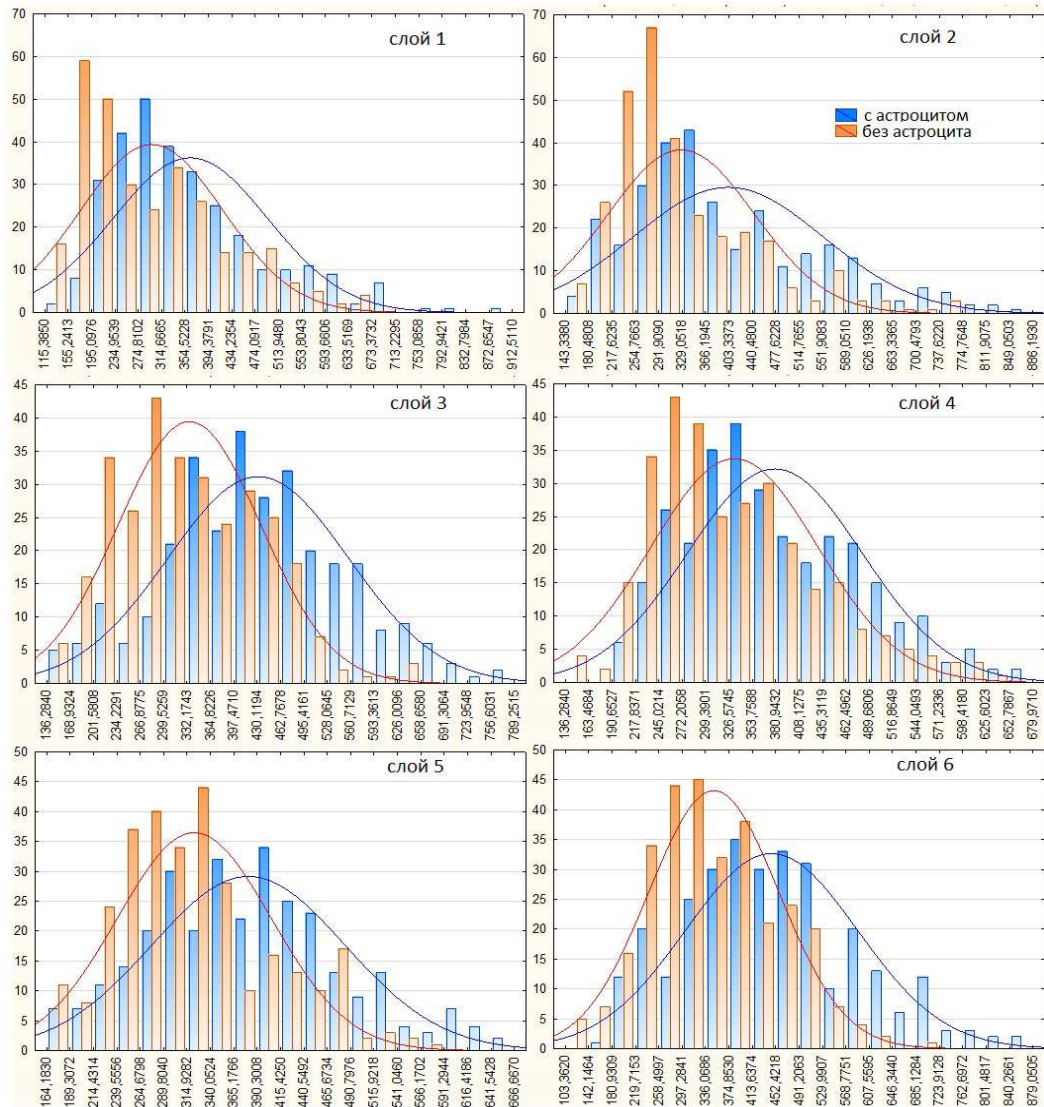


Рис. 2. Распределение длин синаптической щели для химических синапсов, образующих контакт с астроцитом, и без контакта с астроцитом для всех слоёв первичной сомато-сенсорной коры крыс.

Анализ полученных диаграмм позволяет заключить, что распределения длин синаптической щели неодинаковы для контактирующих и не контактирующих с

астроцитом синапсов. Во всех слоях первичной соматосенсорной коры у синапсов, образующих контакт с астроцитом, наблюдается смещение распределения длин синаптической щели в сторону больших значений по сравнению с синапсами, не контактирующими с астроцитом. Разница становится ещё более очевидной на диаграмме распределения длин синаптической щели с суммированием данных для всех слоев колонки (рис. 3).

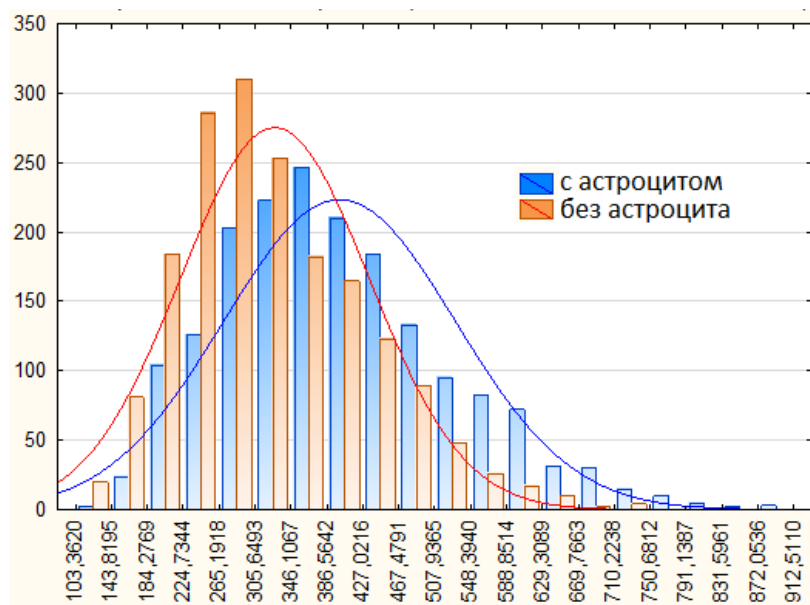


Рис. 3. Распределение длин синаптической щели в зависимости от контакта с астроцитом. Данные объединены для всех слоев первичной соматосенсорной коры крыс.

Несмотря на то, что выборочные распределения обладают выраженной асимметрией, для проверки гипотезы о равенстве генеральных средних мы выбрали параметрический критерий Стьюдента. Выбор основан на том, что при условии достаточно больших выборок ($n > 100$), выборочные средние подчиняются закону нормального распределения, поэтому может быть применен параметрический критерий даже если распределение переменной далеко от нормального [9]. Получившиеся значения критерия Стьюдента представлены в таблице 1.

Значения критерия Стьюдента для всех слоев превышают критическое значение $t_{\text{крит}} = 3.3$ ($f=599$, $\alpha=0.99$). Таким образом, наблюдаемые различия среднего значения длины синаптической щели оказались статистически значимыми, что позволяет предположить наличие прямой связи между вероятностью образования трехстороннего синапса и размером его активной зоны. При этом, данная закономерность сохраняется во всех слоях кортикальной колонки первичной соматосенсорной коры крыс.

Таблица 1
Значения критерия t для сравнения средних значений длины синаптической щели химических синапсов, образующих контакт с астроцитом, и без контакта с астроцитом для всех слоев первичной соматосенсорной коры крыс

Слой первичной соматосенсорной коры	Среднее 1 (с астроцитом)	Среднее 2 (без астроцита)	t	f
Слой 1	362,1095	296,7892	6,32431	598
Слой 2	400,8429	326,4339	6,78797	598
Слой 3	430,0212	334,5202	10,34909	598
Слой 4	378,5622	331,8288	5,79081	598
Слой 5	379,7265	321,8519	7,59126	598
Слой 6	443,6703	348,3916	9,25939	598
Суммарно по слоям	399,1554	326,6359	18,36090	3598

Наши результаты согласуются с данными Witcher и соавт. [7], полученными для поля СА1 гиппокампа крысы, где астроцитарные мембраны также достоверно чаще обнаруживаются возле крупных химических синапсов. При этом в нашем случае, данная закономерность наблюдается во всех слоях коры, в то время как в гиппокампе наблюдаются отклонения от этого правила в поле СА3 [8]. Таким образом, несмотря на то, что синаптические связи в кортикальной колонке являются функционально неодинаковыми в различных цитоархитектонических слоях коры, закономерности «притяжения» астроцита к синапсу являются общими на всём протяжении кортикальных нейронных цепей. Стоит, однако, оговориться, что данный вывод может быть распространён только на возбуждающие синапсы, на долю которых приходится 90–95 % всех кортикальных синапсов [10], и которые составили подавляющее большинство синапсов, вошедших в наше исследование. Для проверки гипотезы о наличии связи между размером активной зоны синапса и вероятностью формирования контакта с астроцитарной мембраной для тормозных синапсов потребуются дополнительные электронно-микроскопические исследования с привлечением методов множественного иммунного мечения.

Обзор исследований, посвященных совместной динамике возбуждательных синапсов и перисинаптических мембран астроцитов позволяет прийти к выводу о том, что именно активность синапсов, прямо связанная с размером активной зоны, и является тем фактором, который увеличивает вероятность образования трехстороннего синапса. Тем не менее, механизм образования такого контакта остаётся дискуссионным. В таких синапсах выделяется большое количество глутамата, и можно было бы предположить, что именно этот нейромедиатор и является своеобразным «аттрактантом» для мембраны астроцита, вызывающим рост астроцитарной мембраны в сторону более крупного возбуждательного синапса. Однако, это предположение не нашло подтверждения в многочисленных исследованиях, посвященных совместной динамике синаптических и астроцитарных мембран. По некоторым сведениям, глутамат действительно

вызывает рост и ветвление астроцитарных мембран в культуре [11]. В тоже время, наблюдения за периферическими астроцитарными отростками *in vivo*, проведенные с использованием лазерного сканирующего микроскопа, показали, что астроцит не обладает направленным ростом в сторону активного синапса. В ответ на локальный рост концентрации глутамата наблюдается лишь общее усиление активности перестройки астроцитарной мембраны [12–14].

На настоящий момент большинство исследователей сходятся во мнении, что образование трехстороннего синапса объясняется наложением двух процессов – случайного ненаправленного роста мембраны, который может стимулироваться увеличением концентрации глутамата, а также внеклеточного калия и другими факторами [6], и процесса закрепления астроцитарной мембраны возле активного синапса после соприкосновения с ним. Действительно, данные оптического имиджинга в высоком разрешении свидетельствуют о том, что как астроцитарные отростки, так и дендриты двигаются без какой-либо видимой системы, не проявляя направленного движения друг к другу [12–14]. При этом подвижность мембраны астроцитов резко падает вблизи тел нейронов, сосудов [15] а также вблизи крупных синапсов [12] и синапсов, имеющих большую площадь контакта с периферическим астроцитарным отростком [14]. При этом стабилизация астроцитарной мембраны вокруг синапсов, сопровождается стабилизацией морфологии самих синапсов [14]. Таким образом, анализ имеющихся данных позволяет заключить, что беспорядочное в целом ветвление астроцитов приводит к случайному контакту с синапсом, и, при совпадении некоторых условий, такой контакт стабилизируется, при этом молекулярные механизмы этого явления ещё не установлены. Среди сигнальных путей, регулирующих поведение астроцита вблизи активной зоны синапса, лучше всего изучены внутриклеточные каскады, запускаемые взаимодействием рецепторов астроцитов с такими регуляторными молекулами, как протеоглики перинервальных сетей [16], SynCAM1 [17], NCAM [18], протокадгерин гамма С5 [19] и нейролигины [20]. Роль этих сигнальных взаимодействий в стабилизации астроцитарной мембраны возле активного синапса ещё предстоит выяснить.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате проведенного исследования впервые были получены распределения длин синаптической щели по слоям первичной соматосенсорной коры крыс отдельно для синапсов, образующих контакт с астроцитом, и не контактирующих с астроцитом.
2. Средняя длина синаптической щели для синапсов, образующих контакт с астроцитом, оказалась достоверно больше, чем для не контактирующих с астроцитом синапсов во всех слоях первичной соматосенсорной коры крыс.
3. Полученные данные позволяют заключить, что вероятность образования трехстороннего синапса в коре головного мозга и размер активной зоны химического синапса находятся в прямой зависимости и данная закономерность сохраняется для всех возбуждающих синапсов, независимо от их положения в функционально различных нейронных цепях кортикальной колонки.

Список литературы

1. Verkhratsky A. Physiology of Astroglia / A. Verkhratsky, M. Nedergaard // *Physiol. Rev.* – 2018. – Vol. 98, No 1. – P. 239-389.
2. Grosche J. Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons / J. Grosche, H. Kettenmann, A. Reichenbach // *J. Neurosci. Res.* – 2002. – Vol. 68, No 2. – P. 138-149.
3. Lu Y. B. Viscoelastic properties of individual glial cells and neurons in the CNS / Y. B. Lu, K. Franze, G. Seifert [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2006. – Vol. 103, No 47. – P. 17759-17764.
4. Wolff J. R. Quantitative aspects of astroglia / J. R. Wolff // In: Masson und Cie eds., *Proc. VIth Intern Congr. Neuropath. Paris.* – 1970. – P. 327-352.
5. Araque A. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner / A. Araque, V. Parpura, R. P. Sanzgiri, P. G. Haydon // *Trends Neurosci.* – 1999. – Vol. 22, No 5. – P. 208-215.
6. Reichenbach A. Morphology and dynamics of perisynaptic glia / A. Reichenbach, A. Derouiche, F. Kirchhoff // *Brain Res. Rev.* – 2010. – Vol. 63, No 1-2. – P. 11-25.
7. Witcher M. R. Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus / M. R. Witcher, S. A. Kirov, K. M. Harris // *Glia.* – 2007. – Vol. 55, No 1. – P. 13-23.
8. Rollenhagen A. Structural determinants of transmission at large hippocampal mossy fiber synapses / A. Rollenhagen, K. Satzler, E. P. Rodriguez [et al.] // *J. Neurosci.* – 2007. – Vol. 27, No 39. – P. 10434-10444.
9. Кендалл М. Статистические выводы и связи. Т2. Статистические выводы и связи / М. Кендалл, А. Стьюарт. – М: «Наука», 1973. – 899 с.
10. Santuy A. Volume electron microscopy of the distribution of synapses in the neuropil of the juvenile rat somatosensory cortex / A. Santuy, J. R. Rodriguez, J. DeFelipe, A. Merchan-Perez // *Brain Struct. Funct.* – 2018. – Vol. 223, No 1. – P. 77-90.
11. Lavielle M. Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin and metabotropic glutamate receptors / M. Lavielle, G. Aumann, E. Anlauf [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2011. – Vol. 108, No 31. – P. 12915-12919.
12. Haber M. Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses / M. Haber, L. Zhou, K.K. Murai // *J. Neurosci.* – 2006. – Vol. 26, No 35. – P. 8881-8891.
13. Perez-Alvarez A. Structural and functional plasticity of astrocyte processes and dendritic spine interactions / A. Perez-Alvarez, M. Navarrete, A. Covelo [et al.] // *J. Neurosci.* – 2014. – Vol. 34, No 38. – P. 12738-12744.
14. Bernardinelli Y. Activity-dependent structural plasticity of perisynaptic astrocytic domains promotes excitatory synapse stability / Y. Bernardinelli, J. Randall, E. Janett [et al.] // *Curr. Biol.* – 2014. – Vol. 24, No 15. – P. 1679-1688.
15. Hirrlinger J. Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ / J. Hirrlinger, S. Hülsmann, F. Kirchhoff // *Eur. J. Neurosci.* – 2004. – Vol. 20, No 8. – P. 2235-2239.
16. Derouiche A. Spatial relationship of lectin-labelled extracellular matrix and glutamine synthetase-immunoreactive astrocytes in rat cortical forebrain regions / A. Derouiche, W. Hartig, K. Brauer, G. Bruckner // *J. Anat.* – 1996. – Vol. 189 (Pt 2). – P. 363-372.
17. Sandau U. S. Astrocyte-specific disruption of SynCAM1 signaling results in ADHD-like behavioral manifestations / U. S. Sandau, Z. Alderman, G. Corfas [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – No 7. – e36424.
18. Theodosis D. T. Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: Functional consequences and role of cell surface and extracellular matrix adhesion molecules / D. T. Theodosis, R. Piet, D. A. Poulain, S. H. Oliet // *Neurochem. Int.* – 2004. – Vol. 45, No 4. – P. 491-501.
19. Li Y. Synaptic and nonsynaptic localization of protocadherin-gammaC5 in the rat brain / Y. Li, D. R. Serwanski, C. P. Miralles [et al.] // *J. Comp. Neurol.* – 2010. – Vol. 518, No 17. – P. 3439-3463.
20. Stogsdill J. A. Astrocytic neuroligins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis / J. A. Stogsdill, J. Ramirez, D. Liu [et al.] // *Nature.* – 2017. – Vol. 551, No 7679. – P. 192-197.

THE PROBABILITY OF THE FORMATION OF A TRIPARTITE SYNAPSE IN THE PRIMARY SOMATOSENSORY CORTEX OF RATS IS DIRECTLY DEPENDENT ON THE SIZE OF THE SYNAPSE ACTIVE ZONE

Filippova S. Yu., Logvinov A. K., Kirichenko E. Yu.

*Academy of Biology and Biotechnology named after D.I. Ivanovsky, SFU, Rostov-on-Don, Russia
E-mail: filsv@yandex.ru*

At present, the patterns of tripartite synapse formation in the neocortex remain unexplored. Given the known layer-by-layer functional differences in synaptic connections between neurons, it can be assumed that the interaction of neurons with astrocytes in the region of chemical synapses will also be unequal across the layers of the cortical column. In order to study the features of tripartite synapse formation in the mammalian neocortex, we investigated the relationship between the size of the synapse active zone and the probability of contact formation with the astrocytic membrane separately for each layer of the cortical column.

The study was carried out on samples of the S1 cortex of white male rats (n = 5, P 60–80). We conducted immune labeling on floating sections with primary antibodies to the astrocyte marker s100b (PA0900, Leica) and secondary antibodies conjugated to HRP. Next, the samples were prepared for transmission electron microscopy. In the course of our work, we obtained 250 images for each layer of the primary somatosensory cortex with X25000 magnification, on which the length of the synaptic cleft was measured. Altogether, 600 synapses were measured in each layer of the somatosensory cortex (300 synapses forming contact with astrocyte and 300 without the contact).

The distribution of synaptic cleft lengths for synapses in contact with astrocyte and without the contact had an evident asymmetric character. For both types of synapses, a clear curve shift towards shorter active zone lengths was observed. An analysis of the obtained data allowed us to conclude that the distribution of synaptic cleft lengths is not the same for synapses forming contact with astrocyte and without the contact: in all layers of the primary somatosensory cortex, synapses that make contact with an astrocyte exhibit a shift in the distribution of synaptic cleft lengths to larger values compared to synapses, not in contact with astrocyte. The Student criterion values for the comparison of the mean values of the synaptic cleft length for the two types of synapses exceed the critical value 3.3 ($f = 599$, $\alpha = 0.99$) for all cortical layers.

Thus, the observed differences in the average value of the length of the synaptic cleft were statistically significant, which suggests a direct relationship between the probability of a tripartite synapse formation and the size of its active zone. Moreover, this pattern is preserved in all layers of the cortical column of the primary somatosensory cortex of rats. Thus, despite the fact that the synaptic connections in the cortical column are functionally unequal in different cytoarchitectonic layers of the cortex, the patterns of “attraction” of astrocyte to the synapse are common throughout the cortical neural chains.

Keywords: astrocyte, tripartite synapse, chemical synapse, primary somatosensory cortex, transmission electron microscopy.

References

1. Verkhratsky A., Nedergaard M., Physiology of Astroglia, *Physiol. Rev.*, **1**, 239 (2018).
2. Grosche J., Kettenmann H., Reichenbach A., Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons, *J. Neurosci. Res.*, **2**, 138 (2002).
3. Lu Y. B., Franze K., Seifert G., Steinhäuser C., Kirchhoff F., Wolburg H., Guck J., Janmey P., Wei E. Q., Käs J., Reichenbach A., Viscoelastic properties of individual glial cells and neurons in the CNS, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **47**, 17759 (2006).
4. Wolff J. R., Quantitative aspects of astroglia, *Proc. Vith Intern. Congr. Neuropath.* (Paris, 1970), p. 327.
5. Araque A., Parpura V., Sanzgiri R. P., Haydon P. G., Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner, *Trends Neurosci.*, **5**, 208 (1999).
6. Reichenbach A., Derouiche A., Kirchhoff F., Morphology and dynamics of perisynaptic glia, *Brain Res. Rev.*, **1-2**, 11 (2010).
7. Witcher M. R., Kirov S. A., Harris K. M., Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus, *Glia*, **1**, 13 (2007).
8. Rollenhagen A., Sätzler K., Rodríguez E. P., Jonas P., Frotscher M., Lübke J. H., Structural determinants of transmission at large hippocampal mossy fiber synapses, *J. Neurosci.*, **39**, 10434 (2007).
9. Kendall M., Stuart A. *The Advanced Theory of Statistics, Vol. 2: Inference and Relationship* (Arnold, 1979).
10. Santuy A., Rodriguez J. R., DeFelipe J., Merchan-Perez A., Volume electron microscopy of the distribution of synapses in the neuropil of the juvenile rat somatosensory cortex, *Brain Struct. Funct.*, **1**, 77 (2018).
11. Laviaille M., Aumann G., Anlauf E., Pröls F., Arpin M., Derouiche A. Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin and metabotropic glutamate receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **31**, 12915 (2011).
12. Haber M., Zhou L., Murai K. K., Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses, *J. Neurosci.*, **35**, 8881 (2006).
13. Perez-Alvarez A., Navarrete M., Covelo A., Martin E. D., Araque A., Structural and functional plasticity of astrocyte processes and dendritic spine interactions, *J. Neurosci.*, **38**, 12738 (2014).
14. Bernardinelli Y., Randall J., Janett E., Nikonenko I., König S., Jones E. V., Flores C. E., Murai K. K., Bochet C. G., Holtmaat A., Muller D., Activity-dependent structural plasticity of perisynaptic astrocytic domains promotes excitatory synapse stability, *Curr. Biol.*, **15**, 1679 (2014).
15. Hirrlinger J., Hülsmann S., Kirchhoff F., Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ, *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 2235 (2004).
16. Derouiche A., Hartig W., Brauer K., Bruckner G., Spatial relationship of lectin-labelled extracellular matrix and glutamine synthetase-immunoreactive astrocytes in rat cortical forebrain regions, *J. Anat.*, **189**, 363 (1996).
17. Sandau U. S., Alderman Z., Corfas G., Ojeda S. R., Raber J., Astrocyte-specific disruption of SynCAM1 signaling results in ADHD-like behavioral manifestations, *PLoS One*, **7**:e36424 (2012).
18. Theodosis D. T., Piet R., Poulain D. A., Oliet S. H., Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: Functional consequences and role of cell surface and extracellular matrix adhesion molecules, *Neurochem. Int.*, **4**, 491 (2004).
19. Li Y., Serwanski D. R., Miralles C. P., Fiondella C. G., Loturco J. J., Rubio M. E., De Blas A. L., Synaptic and nonsynaptic localization of protocadherin-gammaC5 in the rat brain, *J. Comp. Neurol.*, **17**, 3439 (2010).
20. Stogsdill J. A., Ramirez J., Liu D., Kim Y. H., Baldwin K. T., Enustun E., Ejikeme T., Ji R. R., Eroglu C., Astrocytic neurologins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis, *Nature*, **7679**, 192 (2017).