

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОГЛИИ (ОБЗОР)

DOI: 10.17691/stm2021.13.6.10

УДК 611.81:611.018.21

Поступила 31.01.2021 г.

© **Н.А. Малиновская**, д.м.н., профессор кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии;
О.В. Фролова, старший лаборант НИИ молекулярной медицины и патобиохимии;
К.О. Шिशелова, аспирант кафедры биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии;
Ю.А. Панина, к.м.н., доцент кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии

Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, ул. Партизана Железняка, 1, Красноярск, 660022

Описаны роль и морфологические особенности микроглии (M1-, M2-микроглии, «звездчатой», «амебоидной», гигантской, шаровидной, стержневой, дисфункциональной и т.д.) *in vivo* в физиологических условиях и при развитии нейродегенеративных заболеваний. Рассмотрены различные технологии и способы выделения микроглии от взрослых (выделение на градиенте плотности, с помощью «магнитных бус», из мезенхимальных клеток-предшественников костного мозга) и новорожденных (получение из смешанной глиальной культуры, на градиенте плотности) животных, включая выделение микроглии из коры головного мозга или гиппокампа. Показаны различные способы культивирования клеток, в том числе получение двухмерных и трехмерных клеточных культур (на скаффолдах, гидрогеле, нановолокнах), сокультур на слайс-культурах гиппокампа, а также изменения микроглии в процессе культивирования.

Ключевые слова: микроглия; морфотипы микроглии; нейродегенерация; градиент плотности; 2D- и 3D-культуры; скаффолды; слайс-культуры; сокультуры.

Как цитировать: Malinovskaya N.A., Frolova O.V., Shishelova K.O., Panina Yu.A. Current methods for the isolation and cultivation of microglia (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2021; 13(6): 89–102, <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.6.10>

English

Current Methods for the Isolation and Cultivation of Microglia (Review)

N.A. Malinovskaya, MD, DSc, Professor, Department of Biological Chemistry with Courses in Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry;

O.V. Frolova, Senior Laboratory Assistant, Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry;

K.O. Shishelova, PhD Student, Department of Biological Chemistry with Courses in Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry;

Yu.A. Panina, MD, PhD, Associate Professor, Department of Biological Chemistry with Courses in Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry

Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky, 1 Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk, 660022, Russia

The role and morphological features of microglia (M1 and M2 microglia, “stellate”, “amoeboid”, giant, round-shaped, rod-shaped, dysfunctional, etc.) *in vivo* under physiological conditions and during the development of neurodegenerative diseases have been described. Various methods and techniques of microglia isolation from adult (density gradient isolation, use of “magnetic beads”, from mesenchymal bone marrow progenitor cells) and newborn (obtaining from a mixed glial culture, density gradient isolation) animals have been considered, including microglia isolation from the cerebral cortex or hippocampus. Various methods of cell cultivation have been shown, including obtaining two-dimensional and three-dimensional cell cultures (on scaffolds, hydrogels, nanofibers), co-cultures on slice cultures of the hippocampus, as well as changes in microglia during cultivation.

Для контактов: Малиновская Наталия Александровна, e-mail: malinovskaya-na@mail.ru

Key words: microglia; microglia morphotypes; neurodegeneration; density gradient; 2D and 3D cultures; scaffolds; slice cultures; co-cultures.

Введение

Микроглия представляет собой основные резидентные иммунные клетки и основные клетки нейроиммунной системы головного мозга, участвующей в развитии, нормальном функционировании, старении и повреждении клеток нервной системы [1]. Клетки микроглии были обнаружены еще в 1918 г. испанским нейробиологом Р. Рió Hortega, который разработал метод окраски микроглии и описал отличия этих клеток от других клеток ЦНС [2]. Однако в течение длительного периода времени микроглиальные клетки не привлекали внимания исследователей, пока группа G.W. Kreutzberg в 1968 г. не описала процесс активации микроглии при поражении лицевого нерва [3]. Новые методы выделения микроглии (например, с помощью градиента плотности или «магнитных бус») позволили провести сравнительный геномный, транскриптомный и протеомный анализ у взрослых организмов и в период эмбрионального развития, а получение линии мышей с GFP-меченой микроглией дало возможность визуализировать изменения ее клеток *in vivo* с помощью двухфотонной микроскопии [1], что способствовало пересмотру взглядов на функционирование микроглии.

Микроглия — клетки мезодермального происхождения (мезенхимальные и миелоидные), составляющие в зависимости от региона головного мозга от 5 до 12% клеток ЦНС [1, 4]. До недавнего времени маркерами микроглии являлись только антигены CD11b, CX3CR1, Iba1, F4/80. Благодаря РНК-секвенированию были выявлены новые микроглия-специфические маркеры: S100A8, S100A9, HEXB, TMEM119, GPR34, P2RY12, Siglec-H, TREM2, OLFML3 [1].

Микроглиальные клетки происходят из пула примитивных макрофагов желточного мешка. Они зарождаются в период эмбрионального развития: у зародышей мышей — на 8,5-й день, у человека — на 13-й неделе беременности, при этом разветвленная микроглия — на 21-й неделе. Примерно на 8,5–9-й день в нейроэпителии впервые обнаруживаются «амебоидные» клетки [3].

Выживание и поддержание пролиферации микроглии зависит от цитокинов (например, CSF1 и IL-34) и транскрипционных факторов (например, IRF8). Есть дискуссионные данные [1, 3] о том, что при дефиците микроглии у взрослых популяция этих клеток может пополняться мезенхимальными стволовыми клетками из костного мозга, особенно в условиях патологии. Сообщается также [3] о пролиферации и затем дифференцировке в микроглию нестин-позитивных клеток головного мозга. Кроме того, возможно перепрограммирование моноцитов в клетки, подобные микроглии (в зависимости от микроокружения моноцитов) [1, 3].

Клетки микроглии у человека весьма гетерогенны по морфологии, экспрессии рецепторов к нейротрансмиттерам (ГАМК, дофамину, серотонину, гистамину, никотину, нейротензинам, галанину, эндотелину, соматостатину, веществу P, вазопрессину), TLR4-сигнальной трансдукции, по высвобождению макрофагального воспалительного белка (MIP-1 α), по экспрессии CD80 и CD86. Кроме того, обнаружены различия микроглии, зависящие от возраста пациентов и области головного мозга [3].

В настоящее время недооцененной терапевтической стратегией при нейродегенерации является воздействие на функции клеток глии [5]. Многие авторы [6–10] рассматривают микроглию как «обоюдоострый клинок», проявляющий и нейропротективные, и нейродеструктивные свойства. Она играет роль в патогенезе различных заболеваний, а в некоторых случаях оказывает нейропротекторные эффекты. Микроглия также является перспективной мишенью для коррекции нейродегенерации [6–8]. Например, в качестве терапевтической стратегии при заболеваниях ЦНС предложено воздействие на фагоцитирующую функцию микроглии [9]. Показано, что перспективно блокировать хемокиновый лиганд/рецептор-1 (CX3CL1/CX3CR1) или его сигнальные пути для активации M2-фенотипа микроглии и снижения экспансии M1-фенотипа микроглии. Это приводит к уменьшению неврологического дефицита при ишемии–реперфузии, как показано на CX3CR1-нокаутных мышах [10]. Поэтому весьма актуально проводить выделение и культивирование микроглии с возможностью дальнейшего воссоздания моделей заболеваний на животных с участием данных клеток.

Большая часть работ по изучению микроглиальных клеток проводится на грызунах, микроглия которых имеет более высокий пролиферативный потенциал *in vitro* в сравнении с микроглией человека. Кроме того, микроглии грызунов и человека различаются по выработке медиаторов воспаления (например, фактор TGF- β 1 важен для мышей, но не столь важен для микроглии взрослого человека); по экспрессии рецепторов (например, липополисахаридный рецептор TLR4 сильно экспрессируется и вызывает активацию клеток микроглии у мышей, но он менее значим для микроглии человека в связи с наличием у последнего более высокого разнообразия генов, кодирующих иммуноглобулин-подобные лектины (siglecs), которые связывают сialовую кислоту); по генерации оксида азота (активность индуцибельной NO-синтазы, а следовательно, и выработки оксида азота намного ниже у человеческой микроглии). Все это необходимо учитывать при экстраполяции на человека результатов, полученных при исследовании микроглии грызунов [3].

В настоящее время разработаны протоколы для генерации микроглии из эмбриональных стволовых клеток мышей и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Однако предлагаемые в них способы очень дорогостоящие и пока не до конца известно, насколько хорошо полученные таким образом клетки представляют свойства резидентной микроглии головного мозга [3, 11–13]. Поэтому, несмотря на появление индуцированных плюрипотентных клеток человека и животных как потенциального инструмента для изучения микроглии, до сих пор самое важное значение имеют более простые протоколы выделения и культивирования клеток микроглии от грызунов.

В связи с этим **цель настоящего исследования** — обзор основных методов выделения и культивирования клеток микроглии у грызунов.

Основные функции микроглии. Виды микроглии

Микроглия менее распространена в головном мозге, чем другие виды глии, однако она участвует в гомеостазе взрослого и развивающегося мозга, выполняя ряд функций, из которых можно выделить три наиболее важные [1, 3, 14–16]:

«патрулирующую» — постоянный контроль изменений «окружающей среды» (клетки микроглии непрерывно «сканируют» длинными разветвленными отростками свое микроокружение — сенсом);

«обслуживающую» — обильно разветвленные клетки, взаимодействующие с нейронами и астроцитами, участвуют в синаптическом ремоделировании, гомеостазе миелина и очистке от поврежденных клеток и их фрагментов, обеспечивают нормальное функционирование нейронов;

«защитную» — «воинами» являются активированные клетки микроглии с более крупным телом и менее разветвленными отростками; они вызывают нейровоспаление и обуславливают ответ на резкие повреждающие агенты, реже — обеспечивают нейропротекцию в этих условиях.

В целом клетки микроглии обеспечивают [1, 3, 14–16]: гомеостаз взрослого мозга — удаляют поврежден-

ные и/или зараженные клетки при воспалении, в том числе при асептическом и инфекционном процессах, а также при травмах и нейродегенеративных заболеваниях; участвуют в метаболизме нейротрансмиттеров и поддержании гомеостаза внеклеточных ионов;

гомеостаз развивающегося мозга — выполняют функцию запрограммированного уничтожения нервных клеток в период эмбриогенеза;

высвобождение нейроактивных субстанций — эйкозаноидов, цитокинов;

реализацию нейровоспалительного ответа — массивное высвобождение эйкозаноидов, цитокинов, хемокинов, активных форм кислорода, азота и других медиаторов воспаления;

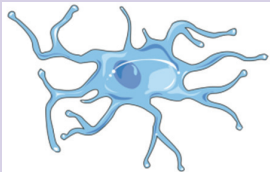
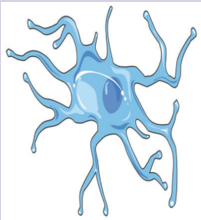
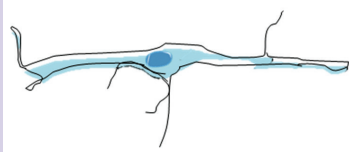
регуляцию нейрогенеза — являются структурной частью нейрогенной ниши, могут усиливать или блокировать нейрогенез в зависимости от особенностей стимула и вида патологического процесса в ЦНС: например, «пронейрогенная» микроглия при апоптозе и/или ишемии высвобождает IGF-1, TGF- β и усиливает нейрогенез в зубчатой извилине гиппокампа и/или субвентрикулярной зоне, а нейровоспалительная микроглия при хронической нейродегенерации продуцирует IL-6, IL-1 β и TNF- α и чаще всего ингибирует гиппокампальный нейрогенез;



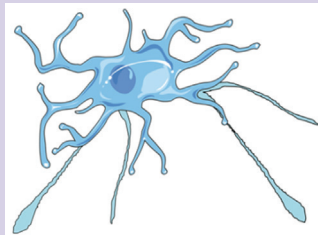
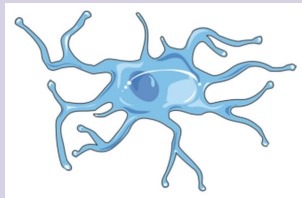
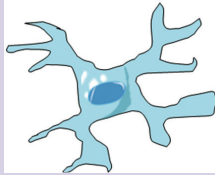
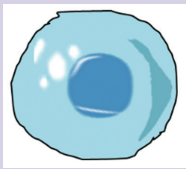

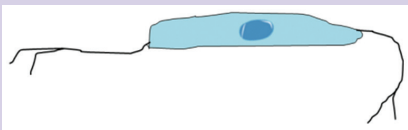
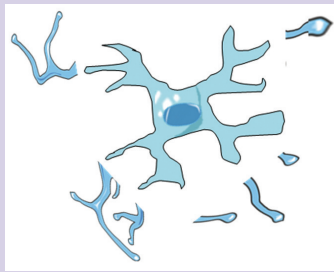
(ре)миелинизацию и демиелинизацию нейрональных аксонов.

В физиологических условиях в головном мозге находятся такие виды фагоцитов, как «покоящаяся» (малоактивная, M0-фенотип) микроглия, периваскулярные макрофаги, перициты, небольшое количество так называемых патрулирующих макрофагов. «Покоящаяся» микроглия характеризуется низкой экспрессией антигенов на клеточной поверхности, минимальным высвобождением хемокинов и цитокинов. Она принимает участие в гомеостазе, исправлении поврежденных клеток, но не участвует в фагоцитозе [17]. В физиологических условиях обнаружено три основных морфотипа микроглии: «звездчатая» микроглия, «расширенные» клетки, «веретеновидные» микроглияциты. При острой и хронической нейродегенерации описаны новые морфотипы, образование которых во многом зависит от сигналов микроокружения (табл. 1) [18–26].

Таблица 1

Морфологические типы микроглии *in vivo* в норме и при патологии [18–26]

Морфологические типы микроглии в физиологических условиях		
«Звездчатая» микроглия — небольшие клетки с овальным или круглым ядром и небольшими ветвящимися отростками (большинство микроглияцитов содержатся в интактном гиппокампе крыс)	«Расширенные» клетки, расположенные рядом с сосудами (небольшой процент)	«Веретеновидные» микроглияциты (небольшой процент)
		

Морфологические типы микроглии при нейродегенерации (активированная, «реактивная» микроглия)*		
<p>«Амебоидные» клетки (типичные клетки, характерные для повреждения — M1, DAM, «плохая» микроглия) округлой макрофагоподобной формы, без отростков или с небольшим количеством отростков; данные клетки характеризуются генерацией свободных радикалов и апоптозом, а также максимальной провоспалительной активностью</p> 	<p>Микроглия неправильной формы с короткими отростками (M1, DAM, «плохая» микроглия) — чаще всего этот тип описывают как микроглию яйцеобразной формы</p> 	<p>Гигантские микроглиоциты (гиперактивированная микроглия) с большими, расширенными отростками (обнаружены в гиппокампе при ишемии, высокая провоспалительная активация) — M2, «хорошая» микроглия</p> 
<p>«Разветвленные» клетки (CD68-позитивные клетки; описаны при ишемии) — M2, «хорошая» микроглия</p> 	<p>Микроглия с «кустовой» морфологией — промежуточная активация, характеризуется «усеченными» отростками и увеличенными телами клеток</p> 	<p>Шаровидная микроглия (CD11b-, CD68-, YM1- и CD206-позитивные клетки; описаны при ишемии)</p> 
<p>«Веретеновидные»/биполярные клетки без боковых отростков (обнаружены в радиальном слое гиппокампа при ишемии) — промежуточные между M1 и M2 (хорошо пролиферируют, «выстраиваются» в очаге повреждения, экспрессируют различные маркеры M1/M2)</p> 	<p>«Веретенообразная» («стержневая») микроглия — клетки «колбасовидной» формы с длинными тонкими отростками, контактирующими с нейронами; могут взаимодействовать друг с другом, формируя «цепочки», окружающие нейроны; описаны при хронической нейродегенерации</p> 	<p>«Дистрофическая» микроглия — клетки с прерывистым окрашиванием отростков (псевдофрагментированы); описаны при хронической нейродегенерации (болезни Альцгеймера); в некоторых случаях на концах отростков клеток могут наблюдаться расширения</p> 

Примечания: часть рисунков выполнена с использованием готовых векторных объектов с сайта <https://smart.servier.com>; * — активированная микроглия, в сравнении с покоящейся в целом имеет уменьшенное ветвление и увеличенное тело клетки.

Увеличение абсолютного количества и/или активности клеток микроглии в ответ на повреждение («реактивный» микроглиоз) характеризуется усилением пролиферации, активации, «рекрутингом» (дальнейшим привлечением) микроглии, увеличением числа отростков и связей с другими клетками.

Ряд авторов выделяют два основных вида (варианта) поляризации микроглии при ее активации: M1 и M2 [27–34]. Установлено, что по морфологии и функциональным особенностям клетки M1- и M2-

микроглии существенно отличаются друг от друга и играют разную роль в норме и при различных заболеваниях ЦНС. Классический (провоспалительный, деструктивный) M1-фенотип (M1-вариант поляризации) вызывает сильный воспалительный ответ, отличается усиленным синтезом провоспалительных цитокинов, активных форм кислорода и азота, выраженной антиген-презентирующей способностью. Основная функция M1-фенотипа — уничтожение любых повреждающих агентов, в том числе микро-

организмов и опухолевых клеток. Альтернативный (антивоспалительный, протективный, «защитный») M2-фенотип участвует в более «тонких» процессах — очистке от клеточного детрита, активации ангиогенеза, процессах ремоделирования тканей и их репарации, в синаптическом прунинге [27] и синаптическом ремоделировании [28, 29]. M2-фенотип чаще оказывает антивоспалительный эффект за счет продукции противовоспалительных цитокинов (IL-3, -4, -10), глюкокортикоидов, TGF- β . Однако эффекты при преобладании M2-фенотипа могут быть не только «полезными», но и «вредными»: способствовать, например, хронизации воспаления [30–34]. Существует несколько подтипов M2-варианта поляризации: M2a (для фагоцитоза и последующего восстановления тканей); M2b (для «рекрутинга» иммунорегуляторных T-лимфоцитов); M2c (с противовоспалительными свойствами) [8].

Другие авторы [35] выделяют такие виды микроглии, как «хорошая» (good) и «плохая» (bad). «Хорошая» (чаще всего речь идет о M2-варианте поляризации) имеет разветвленное строение; обладает выраженным фагоцитозом; продуцирует IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , оксид азота, не приводя к развитию нейровоспаления; экспрессирует на своей поверхности антигены CD45, CX3CR1. «Плохая» микроглия, которую некоторые исследователи называют DAM — disease-associated microglia (микроглия, ассоциированная с заболеванием), наоборот, образует мало отростков, чаще всего имеет яйцевидную форму, обладает низкой способностью к фагоцитозу, способствует развитию нейровоспаления, экспрессирует антигены Cx3cr1, CD40L, S100B, Cdk5/p25. Некоторые исследователи выделяют дисрегуляторную и «уродливую» (ugly) микроглию [36, 37].

Общим механизмом патогенеза многих неврологических заболеваний, включая нейродегенеративные, является активация глии. Однако региональная специфичность ее активации связана с локализацией не только непосредственного приложения повреждающего агента, но и его видов (экзогенный или эндогенный агент, патоген или повреждающий агент и т.д.), а также от особенностей их действия [38]. Активированная микроглия играет ключевую роль в патогенезе нейровоспаления, участвуя также в нейродегенерации (гибели нейронов), оказывает как деструктивный (повреждение собственных нейронов различными цитотоксическими молекулами, что вызывает нейродегенерацию), так и протективный (такие же цитотоксические молекулы убивают патогены, мутировавшие или инфицированные вирусами или другими микроорганизмами нейроны) эффекты на организм в зависимости от преобладания тех или иных хемокинов, цитокинов, ростовых/нейротрофических факторов, нейрогенных транскрипционных факторов. Дальнейшую судьбу нейронов при поражении нервной системы определяет баланс между этими механизмами [15, 38–40].

Так, активация микроглии при острой нейродегенерации, возникающей вследствие ишемии или травмы головного мозга, оказывает в основном деструктивный эффект за счет продукции активных форм кислорода и азота, провоспалительных цитокинов, активации матриксных металлопротеиназ для деструкции межклеточного матрикса [39, 41]. Однако эффекты микроглии зависят и от вида ишемии головного мозга. При глобальной ишемии у крыс отмечаются: выраженный провоспалительный ответ и активация M1-микроглии [40], индукция микроглиальных NLRP3-инфламмасом [42], как это наблюдается при многих других видах хронической нейродегенерации [43]; микроглиальный пироптоз и последующая воспалительная инфильтрация [42]. При фокальной ишемии на ранних этапах повреждения активация M2-фенотипа действует как защитный механизм, а далее тоже в основном происходит активация M1-фенотипа микроглии [15]. Кроме того, микроглия M2-фенотипа фагоцитирует мигрирующие нейтрофилы, убирает излишки токсинов и глутамата, препятствует вторжению нейтрофилов в очаг повреждения (за счет TNF- α), способствует регенерации тканей в пост-ишемической восстановительной фазе [17, 30, 39].

При классической хронической нейродегенерации, например при болезни Альцгеймера, происходят выраженный микроглиоз [44, 45], нарушение механизмов клеточной детоксикации и обмена веществ, увеличение отложения β -амилоида, дисфункция митохондрий и, как следствие, энергодефицит и окислительный стресс, нарушение гомеостаза кальция и индукция апоптоза [46, 47]. На ранних этапах болезни Альцгеймера «хорошая» (M2) микроглия может оказывать нейропротективное действие [35]: например, вызывая поглощение и деградацию β -амилоида до его накопления [17]. Активация же «плохой» (главным образом M1) микроглии может приводить к дисфункции фагоцитоза [48], выраженной продукции нейротоксических хемокинов, цитокинов, активных форм кислорода и азота [17]. Данный вид микроглии за счет повреждения клеток может, напротив, способствовать накоплению β -амилоида. Также этому благоприятствуют инсулинорезистентность головного мозга, перенесенные ранее локальные или системные инфекции, вероятнее всего обуславливающие «истощение» фагоцитов, в том числе микроглии [18, 49]. Поэтому одной из потенциальных стратегий для профилактики или ранней терапии нейродегенерации у пожилых людей может быть коррекция системного воспаления и/или инсулинорезистентности [50]. Интересно, что предшествовать развитию болезни Альцгеймера могут и «возрастные» изменения микроглии: повышение количества/плотности микроглиальных клеток; снижение регуляции их распределения; транслокация в новые участки головного мозга; старческие изменения внутри них (накопление липофусцина и мутаций митохондриальной ДНК, укорочение теломер, усиление депонирования железа),

приводящие к патологической активации микроглии, окислительному стрессу, нарушению способности клеток к пролиферации. Возрастными изменениями морфологии микроглиальных клеток являются перинуклеарная цитоплазматическая гипертрофия, дистрофия, утрата отростков; изменениями их функций — снижение скорости движения, миграции, ингибирование нейрогенеза [51]. Такие измененные клетки называют дисфункциональной (дисрегуляторной) микроглией [17].

Технологии и способы выделения микроглии

Человеческую микроглию можно получить тремя путями [3, 11, 13, 52]:

при удалении опухолевой ткани или резекции эпилептогенного очага (однако, к примеру, в глиоме присутствует много клеток моноцитарного происхождения, по сути это смесь клеток микроглии и проникших моноцитов; ткань из очага эпилепсии является аномальной средой развития клеток);

из посмертной ткани головного мозга (однако возможность выделения клеток из данной ткани регламентируется внутренними правовыми нормами государства, а сохранность клеток очень сильно зависит

от причины смерти и продолжительности временного промежутка после нее);

из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

Получить жизнеспособные и хорошо сохранные клетки микроглии можно напрямую из любого региона головного мозга грызунов (чаще всего их выделяют из коры головного мозга, гиппокампа, мозжечка, спинного мозга) [53–60] после умерщвления анестезированных животных [61, 62] либо выделить костномозговые клетки-предшественники и дифференцировать их в культуре клеток в микроглию [63, 64] (табл. 2).

Достаточно трудоемким является способ получения первичной (смешанной) глиальной культуры, из которой потом выделяется микроглия путем центрифугирования на прерывистом градиенте плотности. При данной технологии используется несколько растворов с различной плотностью, на границе некоторых из них формируется «облачко» клеток микроглии [54, 56, 57].

К современным и быстрым способам можно отнести выделение микроглии с помощью магнитных наночастиц или специализированных приборов (например, проточного цитометра с функцией сортировки

Таблица 2

Основные методы выделения и/или культивирования микроглии от грызунов

От каких грызунов выделяли	Метод	Особенности выделенных клеток	Сферы применения выделенных клеток
Новорожденные мыши P0–P2 (неонатальная микроглия) [53]	Метод «истощения» микроглии (путем воздействия макрофагальным токсином — клодронатом) и повторного заселения органотипических слайс-культур гиппокампа толщиной 375 мкм культурой микроглии.	В слайс-культуре клетки имеют разветвленную морфологию, схожую с морфологией микроглии <i>in vivo</i> , образуют межклеточные контакты с другими типами клеток	Изучение микроглии, приближенное к ситуации <i>in vivo</i> , оценка межклеточных взаимодействий
Мыши в возрасте 8–16 нед (взрослая микроглия) [53]	Методика достаточно трудоемка: приготовление срезов занимает около 3,5 ч; смешанных глиальных культур — 4 ч; выделение взрослой микроглии — 3,5 ч; восполнение культуры — 30 мин		
Новорожденные мыши P0–P2 как дикого типа, так и генномодифицированные (неонатальная микроглия) [53]	Получение первичной смешанной глиальной культуры путем трипсинизации коры головного мозга; смешанная культура культивируется в течение 2 нед с заменой 50% среды каждые 3–4 дня (через 2 нед микроглия должна быть поверх монослоя астроцитов); микроглию отделяют путем шейкирования (15 мин при частоте 120 rpm), в полученном растворе с питательной средой находятся клетки микроглии. Через неделю таким же способом можно собрать новую партию микроглии, сбор возможен в течение не более 4 нед с момента начала культивирования смешанной культуры	Клеточность обычно составляет 4–8·10 ⁵ живых клеток из 5–6 мышей	Последующее культивирование и сбор пролиферирующей микроглии в течение 2–4 нед
Крысы линии Wistar в возрасте P3–P5 (неонатальная микроглия) [54]	Выделение микроглии на градиенте Histodenz («облачко» со смешанной культурой микроглии и астроцитов между слоями 20 и 10% Histodenz)	Гомогенная популяция однородных округлых «амебоидных» клеток с экспрессией Iba-1, CD68, CD11b/c, CD45 и нестина, без экспрессии антигенов GFAP и NF200; из 1 особи получали не менее 1 млн. жизнеспособных клеток микроглии	Последующее культивирование и сбор пролиферирующей микроглии клеточностью 2–2,5·10 ⁵ еженедельно в течение 2–8 нед

От каких грызунов выделяли	Метод	Особенности выделенных клеток	Сферы применения выделенных клеток
Крысята линии Sprague Dawley в возрасте P1 (неонатальная микроглия) [55]	Выделение микроглии из коры головного мозга с получением смешанной глиальной культуры, из которой через 2 нед собирают микроглию и воссоздают 3D-модель в гидрогеле, проводя инкапсуляцию клеток в гидрогеле	Популяция клеток формирует не монослой, а трехмерную модель; клетки могут иметь разветвленную морфологию, схожую с морфологией микроглии <i>in vivo</i> , формировать межклеточные контакты с другими типами клеток	Последующее изучение межклеточных взаимодействий, формирование и изучение микроокружения нейрогенных ниш, воссоздание патологических процессов
Мыши в возрасте 8–16 нед (взрослая микроглия) [53]	Выделение микроглии на градиенте перколл (нижний слой — 75% перколл — смешивают с гомогенатом, далее слой 25% перколл, а затем PBS): толстое и вязкое верхнее «облако» между слоями PBS и 50% перколлом содержало все остальные элементы ЦНС, кроме микроглии; нижнее «облачко» между слоями 75 и 25% перколл содержало клетки микроглии	Клеточность обычно составляет $1-3 \cdot 10^5$ клеток из мозга одной взрослой мыши. Гомогенная популяция однородных округлых клеток с экспрессией Iba-1 без антигена для астроцитов GFAP, жизнеспособность выделенных клеток — более 98%	Последующий анализ функциональной активности/экспрессии антигенов или культивирование
Самцы крыс Sprague Dawley в возрасте 2–3 мес (взрослая микроглия) [56]	Выделение микроглии на градиенте перколл (нижний слой — 70% перколл — смешивают с гомогенатом, далее слой 50% перколл, а затем PBS): верхнее «облако», толстое и вязкое, между слоями PBS и 50% перколлом, содержало все остальные элементы ЦНС, кроме микроглии; нижнее слабое «облачко» между слоями 70 и 50% перколл содержало высокообогащенную микроглию, лишённую макрофагов ЦНС	Гомогенная популяция однородных округлых клеток с экспрессией Iba-1 без антигена для астроцитов GFAP, жизнеспособность выделенных клеток — более 98%	Последующий анализ функциональной активности/экспрессии антигенов или культивирование
Мыши в возрасте старше 8 нед (взрослая микроглия) [57]	Выделение микроглии на градиенте перколл (нижний слой — 70% перколл — смешивают с гомогенатом, далее слои 37 и 30% перколл, а затем PBS): верхнее «облако» с миелином между слоями PBS и 30% перколлом; нижнее «облачко» между слоями 70 и 37% перколл содержало клетки микроглии	Популяция однородных округлых клеток с экспрессией CD68 с единичными астроцитами (экспрессия GFAP)	Последующий анализ функциональной активности/экспрессии антигенов или культивирование
Мыши в возрасте 20–30 дней и старше (взрослая микроглия) [58–60]	После отделения миелина путем центрифугирования на градиенте перколл проводится выделение микроглии методом позитивной магнитной сепарации с помощью «магнитных бус», соединённых с антителами против CD11b	Популяция гомогенных округлых клеток с экспрессией CD11b	Последующий анализ функциональной активности/экспрессии антигенов или культивирование; в некоторых случаях «магнитные бусы», оставшиеся на поверхности клеток, могут мешать проведению исследования
Мыши C57BL/6 в возрасте 2–3 мес (взрослая микроглия) [63, 64]	Выделение клеток микроглии при их дифференцировке из костномозговых предшественников	Дифференцированные клетки имеют разнообразную морфологию («амебодные» и округлые, т.е. активированные; только у нескольких клеток были четко видны ветви, типичные для первичной покоящейся микроглии); чистота выделения — свыше 90%	Последующий анализ функциональной активности/экспрессии антигенов или культивирование

клеток). Наиболее доступными по стоимости наночастицами являются «магнитные бусы» [1, 65, 66], однако их использование в некоторых вариантах (особенно при негативном способе выделения клеток микроглии) требует довольно дорогостоящих расходных материалов.

При любом способе выделения микроглии из голов-

ного мозга можно определить следующие этапы [54, 56, 57, 67–69]:

1) транскардиальная прижизненная перфузия анестезированного животного холодным (4°C) раствором PBS/DPBS с гепарином для удаления мононуклеарных клеток крови с целью недопущения в дальнейшем контаминации микроглиальной культуры;

2) декапитация животного, быстрое вскрытие черепной коробки на льду, извлечение головного мозга, помещение его в чашку Петри с раствором без сыворотки (DMEM без сыворотки, раствор DPBS с глюкозой или другие бессывороточные растворы/среды);

3) извлечение необходимых структур головного мозга (коры полушарий, гиппокампа и т.д.) при удалении других структур (например, обонятельных луковичек, мозжечка, зрительного тракта, мозговых оболочек) в чашке Петри на льду;

4) измельчение извлеченных структур механическим (нарезка скальпелем кусочков размером 1 мм³ и/или измельчение структур в специальных гомогенизаторах; тритурация/пипетирование через пипетку Пастера, дозаторы или шприцы с наконечниками/иглами с меньшим диаметром и т.д.) и/или ферментативным (ферменты папаин, ДНК-аза, диспаза — в смеси или по отдельности) способами;

5) отмывка от ферментов, если они использовались, пропускание гомогената через нейлоновые или иные фильтры с размером пор 40–100 мкм (чтобы убрать не отделившиеся кусочки ткани); осаждение клеток путем центрифугирования (5–10 мин при 200–700 g);

6) специфический метод выделения клеток: в ходе использования «магнитных бус» для отделения клеток микроглии выполняют центрифугирование 30–45 мин при 4°C и 300–1200 g без резкого ускорения и торможения на градиенте плотности (перколл, Histodenz и т.п.) в физиологическом растворе;

7) 1–2-кратная отмывка собранных клеток (сбор осадка клеток микроглии, связанных с «бусами») и осажденных на дно магнитного штатива при позитивном методе выделения клеток; сбор надосадочной жидкости с микроглией при осаждении других типов клеток при негативном методе выделения клеток с помощью «магнитных бус»; сбор кольца выделенных клеток на градиенте плотности с помощью пипетки Пастера/дозатора с тонким наконечником или спинальной иглы) в растворе буфера/среды с последующим центрифугированием клеток и добавлением на заключительном этапе необходимого объема буфера/питательной среды;

8) посев клеток на питательную среду с последующим культивированием или использование клеток микроглии для дальнейших исследований (если выделение клеток микроглии не предполагает их последующего культивирования).

Довольно трудно выделить микроглию из материала, полученного от взрослой особи. Большинство исследований выполнено на неонатальной микроглии, так как выход взрослых клеток микроглии является низким. В микроглию способны дифференцироваться моноциты крови и фибробластоподобные клетки костного мозга (дифференцировку провоцируют цитокины, гипоксия и иммунные клетки). Трансплантированные в головной мозг мезенхимальные стволовые клетки, которые получены из костного мозга, приводят к уменьшению амилоидных бляшек — вероятнее всего, это происходит благодаря активации резидентной микро-

глии до амебоидного и фагоцитирующего состояния. Кроме того, мезенхимальные стволовые клетки оказывают положительное влияние на нейродегенерацию путем регуляции микроокружения и самих клеток, в частности микроглии [63, 64, 70].

Мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (BMCs, BM-MSCs) представляют собой популяцию клеток, которая формирует скелетные мышцы и кроветворную строму *in vivo* и обладает остеогенным потенциалом. BM-MSCs отвечают строгим критериям стволовых клеток *in vivo*: размножаются как неадгезивные мезенсферы, а не как адгезированные культивируемые клетки.

Технология выделения клеток микроглии при их дифференцировке из костномозговых предшественников BMCs включает следующие этапы [63, 64, 70–82].

1. Выделение костей бедра/голеней от этаназированных животных, вскрытие костей и их центрифугирование (при $\geq 10\,000\text{ g}$ в течение 15 с) во вложенных друг в друга микроцентрифужных пробирках объемом 0,5 мл с отверстием и 1,5 мл — без отверстия для получения костного мозга; ресуспендирование выделенного костного мозга в растворе (например, PBS, в питательной среде, буфере FACS).

2. При клеточности 10^7 — культивирование клеток костного мозга в течение 24 ч в чашке Петри в среде DMEM с низким содержанием глюкозы с 10% FCS, 10^{-8} M дексаметазона и 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина.

3. Смывание неадгезированных клеток через 24 ч и их перенос в новую чашку Петри. 24-часовой период адгезии повторяется 4 раза для получения неадгезированных NA-BMC-клеток.

4. Ресуспендирование неадгезированных клеток 1-го дня (классический протокол посева для получения макрофагов или микроглии) и NA-BMCs 4-го дня в остеогенной (DMEM, 10% FCS, 10^{-8} M дексаметазон, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты) или в кондиционированной среде: астроцит-кондиционированную среду как источник M-CSF получают путем роста первичной культуры астроцитов в течение 24 ч; можно также использовать 20% (по объему) фибробласт-кондиционированную среду, эндотелиоцит-кондиционированную среду или кондиционированную среду из интактного либо травмированного спинного мозга крысы; можно вносить готовый M-CSF в концентрации 10 нг/мл. Среда заменяется каждые 3 дня, клетки анализируются на 10-й день роста.

В одном из вариантов протокола выделения клеток микроглии при их дифференцировке из костномозговых предшественников было показано, что микроглия дифференцируется на 3-и и 6-е сутки культивирования, а макрофаги — на 3-и и 4-е сутки [82].

Технологии культивирования микроглии

Среди технологий культивирования клеток микроглии (см. табл. 2) можно выделить 2D- (в специальных

пластиковых планшетах/чашках Петри, флаконах со специальным покрытием — коллагеном, ламинином, полилизинном и другими — или без него) и 3D- (в матригеле или на скаффолдах) культивирование, а также культивирование микроглии на гиппокампаальных слайс-культурах [53, 54].

Среда для культивирования микроглии обычно включает DMEM/F12 или DMEM в качестве основы; обогащена 10% фетальной бычьей сывороткой и L-глутамином; содержит пенициллин-стрептомицин или другие антибиотики для исключения контаминации среды микроорганизмами. Также для обогащения, выбора направления дифференцировки и получения осажженной культуры клеток (иначе большая часть клеток продолжает находиться суспензионно и не адгезируется к поверхности пластика) в среду для культивирования может добавляться один из ростовых/дифференцировочных факторов (например, митогенами для микроглии являются мультипотенциальный CSF/multiCSF и гранулоцитарный/макрофагальный CSF/G/M-CSF, поэтому гранулоцитарный колоние-стимулирующий фактор G-CSF может использоваться для стимуляции пролиферации и биологической активности амебодной микроглии) или раствор липополисахарида/интерферона и других реактивов для поляризации микроглии в нужный фенотип. Так, превращение микроглии в M1-фенотип обычно происходит под действием липополисахарида, IL-1 β или TNF- α . При этом могут определяться такие маркеры M1-микроглии, как iNOS, COX-2 и IL-6, и отмечаться потеря маркеров M2a. На макрофагах можно наблюдать молекулы CD38, Gpr18 и Fpr2, которые являются маркерами M1-поляризации, а также маркеры Egr2 и c-Myc — как «эксклюзивные» для M2-фенотипа. Маркеры M2b-иммунномодулирующей микроглии — IL-1RA, SOCS3 (M2b-поляризация происходит при действии IL-10). Маркерами M2a-репарации и регенерации можно считать аргиназу-1, CD206 и потерю маркеров M1- и M2b-микроглии (M2a-поляризация происходит при действии IL-4) [54, 57–60, 83–85].

Для длительного (6–8 нед) культивирования и пролиферации микроглии необходимо использование ростовых/дифференцировочных факторов (например, G-CSF), проведение 2 раза в неделю неполной смены среды (обычно заменяется 1/3–1/2 среды на свежую), а также ко-культивирование с астроцитами [54, 57]. Ежедневный выход клеток с одного флакона T75 может составлять 2,0–2,5·10⁵; после 8 нед культивирования пролиферация микроглии практически прекращается, необходим пересев клеточной культуры или сбор и замораживание клеток на будущее, если это необходимо.

Гидрогелевые культуры нервных клеток, например с использованием матригеля, были созданы, чтобы преодолеть проблемы, связанные с двумерными культурами клеток: формирование только монослоя клеток; отличие морфологии таких клеток от морфологии клеток *in vivo*; плохая репрезентативность

моделей поражения ЦНС, особенно когда речь идет о формировании биологических барьеров, в том числе гематоэнцефалического. Гидрогелевые культуры имеют широкий спектр применения, включая фармакологические исследования; изучение управления процессами дифференцировки нервных клеток; использование для понимания этиопатогенеза заболевания; совместное культивирование с другими типами клеток (модели нейрогенных ниш); применение для моделирования процесса миграции клеток, нейропротекции/нейродегенерации или для моделирования тканевого микроокружения. 3D-технологии позволяют формировать гидрогели разных размеров и форм. Эти культуры можно легко анализировать с помощью широко используемых методов исследования, таких как флуоресцентная и конфокальная микроскопия [55]. 3D-культивирование, в отличие от 2D-, имеет ряд преимуществ [86]:

клетки обладают более естественной формой;

они могут быстрее или медленнее пролиферировать в зависимости от необходимых условий;

3D-модели содержат клетки на различных стадиях клеточного цикла, включают пролиферирующие, покоящиеся клетки, клетки в состоянии гипоксии, апоптоза и/или некроза;

3D-модели отображают различную скорость проникновения питательных веществ или лекарственных препаратов к клеткам, в том числе могут имитировать резистентность к действию лекарственных препаратов, что ближе к ситуации *in vivo* и актуально при изучении потенциального действия лекарственного препарата;

такие модели демонстрируют профили генной и белковой экспрессии, аналогичные клеткам *in vivo*.

Таким образом, практически для всех типов клеток 3D-модели *in vitro* больше похожи на модели *in vivo*, чем 2D-модели и, следовательно, биологически также более значимы [75]. В связи с этим в последние годы увеличивается использование скаффолдов («каркасов», имитирующих межклеточный матрикс), различных «твердых платформ», агрегатов, микро- и нановолокон для культивирования клеток в трехмерном микроокружении [86, 87].

В отличие от астроцитов, для которых протестировано довольно много различных вариантов 3D-культивирования (культивирование в коллагеновом гидрогеле, в гидрогелевых матрицах с коллагеном или нановолокнами, на скаффолдах из различных нановолокон и т.д.) [87–102], для микроглии исследованы только модели, выращенные в гидрогеле наподобие матригеля, в пептидном гидрогеле PuraMatrix, на графеновых скаффолдах и на коллагеновых матрицах [103–105].

Изменение микроглии в процессе культивирования

При выделении микроглии грызунов можно получить клетки двух основных морфологических типов:

«амебоидная» микроглия перинатального периода, характерная также для новорожденных животных, численность которой у крыс и мышей начинает резко уменьшаться примерно со второй недели жизни, и постепенно она заменяется «ветвистой»;

«ветвистая» — покоящаяся «взрослая» микроглия, численность которой возрастает со второй недели жизни [19–21, 54].

При получении микроглии из головного мозга клетки чаще всего исходно имеют «амебоидную» морфологию (округлую форму и диаметр 8–10 мкм с сильно вакуолизированной цитоплазмой). Первые 1–2 сут (по другим данным — 3–4 сут) культивирования их большая часть взвешена суспензионно и хорошо осаждается на 2–5-е сутки культивирования в пластиковой лабораторной посуде. Единичные выделенные астроциты образуют монослой на поверхности пластика, поверх них располагаются сначала единичные клетки микроглии, формирующие затем островки, из которых периодически идет отделение клеток в среду в виде суспензионной культуры. Наиболее активное отделение микроглии происходит главным образом со 2-й по 6-ю недели культивирования клеток, при этом отделившиеся клетки также имеют «амебоидную» морфологию, а адгезированные клетки на 5–6-й день культивирования начинают образовывать по 1–2 отростка; изредка встречаются клетки «ветвистой» морфологии [22–26, 54].

В 3D-культурах клетки микроглии равномернее распределены по ширине геля, имеют преимущественно разветвленную морфологию с длинными и разнонаправленными ветвями в различных проекциях и меньшее по площади цитоплазмы тело клетки, в отличие от двухмерных культур. За счет этого они более приближены к покоящейся микроглии *in vivo* [106].

Заключение

Микроглия — это полифункциональные мезодермальные клетки нервной системы, среди которых можно выделить два самых важных морфофенотипа — M1 («плохая», DAM) и M2 («хорошая») микроглия. Микроглиальные клетки участвуют в поддержании гомеостаза развивающегося и взрослого мозга в физиологических условиях, а также в развитии острой и хронической нейродегенерации. Из рассмотренных нами технологий наиболее простыми и менее трудоемкими являются выделение микроглии на градиенте плотности и/или с помощью «магнитных бус» (хотя клеточность при этих способах не всегда высокая) и культивирование в трехмерном микроокружении культуры с использованием гидрогелей, скаффолдов, агрегатов и волокон. Выкрашенные таким образом микроглиальные клетки приближены к микроглии *in vivo* по морфотипу, экспрессии антигенов и степени активации.

Вклад авторов: Н.А. Малиновская — поиск материала, анализ публикаций и написание текста обзора,

систематизация и редактирование текста; О.В. Фролова — поиск материала, анализ публикаций и написание текста обзора; К.О. Шишелова — поиск материала, анализ публикаций и редактирование статьи; Ю.А. Панина — поиск материала, анализ публикаций и написание текста обзора.

Источники финансирования. Работа выполнена за счет средств гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — докторов наук (проект №МД-3923.2019.7, соглашение №075-15-2019-177).

Конфликт интересов. У авторов отсутствует конфликт интересов.

Литература/References

- Hickman S., Izzy S., Sen P., Morsett L., El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 2018; 21(10): 1359–1369, <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>.
- Río Hortega P. Noticia de un nuevo y fácil método para la coloración de la neuroglia y el tejido conjuntivo. *Trab Lab Invest Biol* 1918; 15: 367–378.
- Wolf S.A., Boddeke H.W.G.M., Kettenmann H. Microglia in physiology and disease. *Annu Rev Physiol* 2017; 79: 619–643, <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>.
- Lawson L.J., Perry V.H., Dri P., Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1990; 39: 151–170.
- Hamby M.E., Sofroniew M.V. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics* 2010; 7(4): 494–506, <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.07.003>.
- Garden G.A., Möller T.J. Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006; 1(2): 127–137, <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9015-5>.
- Rock R.B., Gekker G., Hu S., Sheng W.S., Cheeran M., Lokensgard J.R., Peterson P.K. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17(4): 942–964, <https://doi.org/10.1128/cmr.17.4.942-964.2004>.
- Subramaniam S.R., Federoff H.J. Targeting microglial activation states as a therapeutic avenue in Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* 2017; 9: 176, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00176>.
- Fu R., Shen Q., Xu P., Luo J.J., Tang Y. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol Neurobiol* 2014; 49(3): 1422–1434, <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8620-6>.
- Tang Z., Gan Y., Lui Q., Yin J.X., Liu Q., Shi J., Shi F.D. CX3CR1 deficiency suppresses activation and neurotoxicity of microglia/macrophage in experimental ischemic stroke. *J Neuroinflammation* 2014; 11: 26, <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-26>.
- Beins E., Ulas T., Ternes S., Neumann H., Schultze J.L., Zimmer A. Characterization of inflammatory markers and transcriptome profiles of differentially activated embryonic stem cell-derived microglia. *Glia* 2016; 64(6): 1007–1020, <https://doi.org/10.1002/glia.22979>.
- Ghazanfari R., Zacharaki D., Li H., Ching Lim H., Soneji S., Scheduling S. Human primary bone marrow mesenchymal stromal cells and their *in vitro* progenies display distinct transcriptional profile signatures. *Sci Rep* 2017; 7(1): 10338, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09449-x>.

13. Muffat J., Li Y., Yuan B., Mitalipova M., Omer A., Corcoran S., Bakiasi G., Tsai L.H., Aubourg P., Ransohoff R.M., Jaenisch R. Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat Med* 2016; 22(11): 1358–1367, <https://doi.org/10.1038/nm.4189>.
14. Hanisch U.K. Functional diversity of microglia — how heterogeneous are they to begin with? *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 65, <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00065>.
15. Taylor R.A., Sansing L.H. Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 746068, <https://doi.org/10.1155/2013/746068>.
16. Luo C., Jian C., Liao Y., Huang Q., Wu Y., Liu X., Zou D., Wu Y. The role of microglia in multiple sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2017; 13: 1661–1667, <https://doi.org/10.2147/ndt.s140634>.
17. Luo X.G., Chen S.D. The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *Transl Neurodegener* 2012; 1(1): 9, <https://doi.org/10.1186/2047-9158-1-9>.
18. Jones A., Kulozik P., Ostertag A., Herzig S. Common pathological processes and transcriptional pathways in Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *J Alzheimers Dis* 2009; 16(4): 787–808, <https://doi.org/10.3233/jad-2009-0973>.
19. Shen Y., Sun A., Wang Y., Cha D., Wang H., Wang F., Feng L., Fang S., Shen Y. Upregulation of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in glial cells is associated with ischemia-induced glial activation. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 254, <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-254>.
20. Adeluyi A., Guerin L., Fisher M.L., Galloway A., Cole R.D., Chan S.S.L., Wyatt M.D., Davis S.W., Freeman L.R., Ortinski P.I., Turner J.R. Microglia morphology and proinflammatory signaling in the nucleus accumbens during nicotine withdrawal. *Sci Adv* 2019; 5(10): eaax7031, <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax7031>.
21. Paasila P.J., Davies D.S., Kril J.J., Goldsbury C., Sutherland G.T. The relationship between the morphological subtypes of microglia and Alzheimer's disease neuropathology. *Brain Pathol* 2019; 29(6): 726–740, <https://doi.org/10.1111/bpa.12717>.
22. Tam W.Y., Au N.P., Ma C.H. The association between laminin and microglial morphology in vitro. *Sci Rep* 2016; 6: 28580, <https://doi.org/10.1038/srep28580>.
23. Tam W.Y., Ma C.H. Bipolar/rod-shaped microglia are proliferating microglia with distinct M1/M2 phenotypes. *Sci Rep* 2014; 4: 7279, <https://doi.org/10.1038/srep07279>.
24. Колос Е.А., Коржевский Д.Э. Микроглия спинного мозга в норме и при патологии. *Acta Naturae* 2020; 12(1): 4–17, <https://doi.org/10.32607/actanaturae.10934>.
- Kolos E., Korzhevsky D. Spinal cord microglia in health and disease. *Acta Naturae* 2020; 12(1): 4–17, <https://doi.org/10.32607/actanaturae.10934>.
25. Walker F.R., Beynon S.B., Jones K.A., Zhao Z., Kongsui R., Cairns M., Nilsson M. Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: a review of the models, the signals and the mechanisms. *Brain Behav Immun* 2014; 37: 1–14, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.010>.
26. Holloway O.G., Canty A.J., King A.E., Ziebell J.M. Rod microglia and their role in neurological diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2019; 94: 96–103, <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2019.02.005>.
27. Paolicelli R.C., Bolasco G., Pagani F., Maggi L., Scianni M., Panzanelli P., Giustetto M., Ferreira T.A., Guiducci E., Dumas L., Ragozzino D., Gross C.T. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 2011; 333(6048): 1456–1458, <https://doi.org/10.1126/science.1202529>.
28. Parkhurst C.N., Yang G., Ninan I., Savas J.N., Yates J.R. III, Lafaille J.J., Hempstead B.L., Littman D.R., Gan W.B. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 2013; 155(7): 1596–1609, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.030>.
29. Гоголева В.С., Друцкая М.С., Атретханы К.С.Н. Микроглия в гомеостазе центральной нервной системы и нейровоспалении. *Молекулярная биология* 2019; 53(5): 790–798, <https://doi.org/10.34/s0026898419050057>.
- Gogoleva V.S., Drutskaya M.S., Atrekhany K.S.N. The role of microglia in the homeostasis of the central nervous system and neuroinflammation. *Molekularnaa biologia* 2019; 53(5): 790–798, <https://doi.org/10.1134/s0026898419050057>.
30. Guruswamy R., ElAli A. Complex roles of microglial cells in ischemic stroke pathobiology: new insights and future directions. *Int J Mol Sci* 2017; 18(3): 496, <https://doi.org/10.3390/ijms18030496>.
31. Tang Y., Li T., Li J., Yang J., Liu H., Zhang X.J., Le W. Jmjd3 is essential for the epigenetic modulation of microglia phenotypes in the immune pathogenesis of Parkinson's disease. *Cell Death Differ* 2014; 21(3): 369–380, <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.159>.
32. Patel A.R., Ritzel R., McCullough L.D., Liu F. Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2013; 5(2): 73–90.
33. Sanchez-Guajardo V., Barnum C.J., Tansey M.G., Romero-Ramos M. Neuroimmunological processes in Parkinson's disease and their relation to α -synuclein: microglia as the referee between neuronal processes and peripheral immunity. *ASN Neuro* 2013; 5(2): 113–139, <https://doi.org/10.1042/an20120066>.
34. Perego C., Fumagalli S., De Simoni M.G. Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 174, <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-174>.
35. Weitz T.M., Town T. Microglia in Alzheimer's disease: it's all about context. *Int J Alzheimers Dis* 2012; 2012: 314185, <https://doi.org/10.1155/2012/314185>.
36. Doring A., Yong V.W. The good, the bad and the ugly. Macrophages/microglia with a focus on myelin repair. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011; 3: 846–856, <https://doi.org/10.2741/191>.
37. Tejera D., Heneka M.T. Microglia in Alzheimer's disease: the good, the bad and the ugly. *Curr Alzheimer Res* 2016; 13(4): 370–380, <https://doi.org/10.2174/1567205013666151116125012>.
38. Block M.L., Hong J.S. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 2005; 76(2): 77–98, <https://doi.org/10.1155/2012/314185>.
39. Jin R., Yang G., Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol* 2010; 87(5): 779–789, <https://doi.org/10.1189/jlb.1109766>.
40. Marks L., Carswell H.V., Peters E.E., Graham D.I., Patterson J., Dominiczak A.F., Macrae I.M. Characterization of the microglial response to cerebral ischemia in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 2001; 38(1): 116–122, <https://doi.org/10.1161/01.hyp.38.1.116>.
41. Norden D.M., Muccigrosso M.M., Godbout J.P.

- Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* 2015; 96(Pt A): 29–41, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.028>.
42. Chang Y., Zhu J., Wang D., Li H., He Y., Liu K., Wang X., Peng Y., Pan S., Huang K. NLRP3 inflammasome-mediated microglial pyroptosis is critically involved in the development of post-cardiac arrest brain injury. *J Neuroinflammation* 2020; 17(1): 219, <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01879-1>.
43. Кувачева Н.В., Моргун А.В., Хилажева Е.Д., Малиновская Н.А., Горина Я.В., Пожиленкова Е.А., Фролова О.В., Труфанова Л.В., Мартынова Г.П., Салмина А.Б. Формирование инфламмосом: новые механизмы регуляции межклеточных взаимодействий и секреторной активности клеток. *Сибирское медицинское обозрение* 2013; 5: 3–10.
- Kuvacheva N.V., Morgun A.V., Hilazheva E.D., Malinovskaya N.A., Gorina Y.V., Pozhilenkova E.A., Frolova O.V., Trufanova L.V., Martynova G.P., Salmina A.B. Inflammasomes forming: new mechanisms of intercellular interactions regulation and secretory activity of the cells. *Sibirskoe medicinskoe obozrenie* 2013; 5: 3–10.
44. Kabba J.A., Xu Y., Christian H., Ruan W., Chenai K., Xiang Y., Zhang L., Saavedra J.M., Pang T. Microglia: housekeeper of the central nervous system. *Cell Mol Neurobiol* 2018; 38(1): 53–71, <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0504-2>.
45. Tejera D., Heneka M.T. Microglia in neurodegenerative disorders. *Methods Mol Biol* 2019; 2034: 57–67, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9658-2_5.
46. Ricci G., Volpi L., Pasquali L., Petrozzi L., Siciliano G. Astrocyte-neuron interactions in neurological disorders. *J Biol Phys* 2009; 35(4): 317–336, <https://doi.org/10.1007/s10867-009-9157-9>.
47. Scuderi C., Stecca C., Iacomino A., Steardo L. Role of astrocytes in major neurological disorders: the evidence and implications. *IUBMB Life* 2013; 65(12): 957–961, <https://doi.org/10.1002/iub.1223>.
48. Lucin K.M., O'Brien C.E., Bieri G., Czirr E., Mosher K.I., Abbey R.J., Mastroeni D.F., Rogers J., Spencer B., Masliah E., Wyss-Coray T. Microglial beclin 1 regulates retromer trafficking and phagocytosis and is impaired in Alzheimer's disease. *Neuron* 2013; 79(5): 873–886, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.046>.
49. Saijo K., Glass C.K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(11): 775–787, <https://doi.org/10.1038/nri3086>.
50. Perry V.H., Holmes C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2014; 10(4): 217–224, <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.38>.
51. Wong W.T. Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 22, <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00022>.
52. Mizze M.R., Miedema S.S., van der Poel M., Adelia, Schuurman K.G., van Strien M.E., Melief J., Smolders J., Hendrickx D.A., Heutinck K.M., Hamann J., Huitinga I. Isolation of primary microglia from the human post-mortem brain: effects of ante- and post-mortem variables. *Acta Neuropathol Commun* 2017; 5(1): 16, <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0418-8>.
53. Masuch A., Biber K. Replenishment of organotypic hippocampal slice cultures with neonatal or adult microglia. *Methods Mol Biol* 2019; 2034: 127–147, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9658-2_10.
54. Журавлева М.Н., Мухамедшина Я.О., Архипова С.С., Санатова Э.Р., Ризванов А.А. Морфофенотипические характеристики микроглии на разных сроках культивирования и при трансплантации в область травмы спинного мозга крыс. *Гены и клетки* 2015; 10(4): 34–39.
- Zhuravleva M.N., Mukhamedshina Y.O., Arkhipova S.S., Sanatova E.R., Rizvanov A.A. The morphological and phenotypic characteristics of microglia at different stages of cultivation and transplantation in the area of spinal cord injury in rats. *Geny i kletki* 2015; 10(4): 34–39.
55. Koss K.M., Churchward M.A., Jeffery A.F., Mushahwar V.K., Elias A.L., Todd K.G. Improved 3D hydrogel cultures of primary glial cells for in vitro modelling of neuroinflammation. *J Vis Exp* 2017; 130: 56615, <https://doi.org/10.3791/56615>.
56. Frank M.G., Wieseler-Frank J.L., Watkins L.R., Maier S.F. Rapid isolation of highly enriched and quiescent microglia from adult rat hippocampus: immunophenotypic and functional characteristics. *J Neurosci Methods* 2006; 151(2): 121–130, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.06.026>.
57. Lee J.K., Tansey M.G. Microglia isolation from adult mouse brain. *Methods Mol Biol* 2013; 1041: 17–23, https://doi.org/10.1007/978-1-62703-520-0_3.
58. Hickman S.E., El Khoury J. Analysis of the microglial sensome. *Methods Mol Biol* 2019; 2034: 305–323, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9658-2_23.
59. Grabert K., McColl B.W. Isolation and phenotyping of adult mouse microglial cells. *Methods Mol Biol* 2018; 1784: 77–86, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_7.
60. Holt L.M., Stoyanof S.T., Olsen M.L. Magnetic cell sorting for in vivo and in vitro astrocyte, neuron, and microglia analysis. *Curr Protoc Neurosci* 2019; 88(1): e71, <https://doi.org/10.1002/cpns.71>.
61. Timmerman R., Burm S.M., Bajramovic J.J. An overview of in vitro methods to study microglia. *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 242, <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00242>.
62. Appel J.R., Ye S., Tang F., Sun D., Zhang H., Mei L., Xiong W.C. Increased microglial activity, impaired adult hippocampal neurogenesis, and depressive-like behavior in microglial VPS35-depleted mice. *J Neurosci* 2018; 38(26): 5949–5968, <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3621-17.2018>.
63. Hinze A., Stolzing A. Microglia differentiation using a culture system for the expansion of mice non-adherent bone marrow stem cells. *J Inflamm (Lond)* 2012; 9(1): 12, <https://doi.org/10.1186/1476-9255-9-12>.
64. Amend S.R., Valkenburg K.C., Pienta K.J. Murine hind limb long bone dissection and bone marrow isolation. *J Vis Exp* 2016; 110: 53936, <https://doi.org/10.3791/53936>.
65. Tanti G.K., Srivastava R., Kalluri S.R., Nowak C., Hemmer B. Isolation, culture and functional characterization of glia and endothelial cells from adult pig brain. *Front Cell Neurosci* 2019; 13: 333, <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00333>.
66. Stark J.C., Wallace E., Lim R., Leaw B. Characterization and isolation of mouse primary microglia by density gradient centrifugation. *J Vis Exp* 2018; 132: 57065, <https://doi.org/10.3791/57065>.
67. Akhmetzyanova E.R., Mukhamedshina Y.O., Zhuravleva M.N., Galieva L.R., Kostennikov A.A., Garanina E.E., Rizvanov A.A. Transplantation of microglia in the area of spinal cord injury in an acute period increases tissue sparing, but not functional recovery. *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 507, <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00507>.
68. Gage G.J., Kipke D.R., Shain W. Whole animal

perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp* 2012; 65: 3564, <https://doi.org/10.3791/3564>.

69. Cunningham C.L., Martínez-Cerdeño V., Noctor S.C. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 2013; 33(10): 4216–4233, <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3441-12.2013>.

70. Swamydas M., Lionakis M.S. Isolation, purification and labeling of mouse bone marrow neutrophils for functional studies and adoptive transfer experiments. *J Vis Exp* 2013; 77: e50586, <https://doi.org/10.3791/50586>.

71. Zhang X., Goncalves R., Mosser D.M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol* 2008; 83: 14.1, <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1401s83>.

72. Cizkova D., Devaux S., Le Marrec-Croq F., Franck J., Slovinska L., Blasko J., Rosocha J., Spakova T., Lefebvre C., Fournier I., Salzet M. Modulation properties of factors released by bone marrow stromal cells on activated microglia: an in vitro study. *Sci Rep* 2014; 4: 7514, <https://doi.org/10.1038/srep07514>.

73. Wang F., Zhang S., Jeon R., Vuckovic I., Jiang X., Lerman A., Folmes C.D., Dzeja P.D., Herrmann J. Interferon gamma induces reversible metabolic reprogramming of M1 macrophages to sustain cell viability and pro-inflammatory activity. *EBioMedicine* 2018; 30: 303–316, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.02.009>.

74. Huynh H.K., Dorovini-Zis K. Effects of interferon-gamma on primary cultures of human brain microvessel endothelial cells. *Am J Pathol* 1993; 142(4): 1265–1278.

75. Fixe P., Praloran V. M-CSF: haematopoietic growth factor or inflammatory cytokine? *Cytokine* 1998; 10(1): 32–37, <https://doi.org/10.1006/cyto.1997.0249>.

76. Ushach I., Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol* 2016; 100(3): 481–489, <https://doi.org/10.1189/jlb.3ru0316-144r>.

77. Gottipamula S., Ashwin K.M., Muttigi M.S., Kannan S., Kolkundkar U., Seetharam R.N. Isolation, expansion and characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Cell Tissue Res* 2014; 356(1): 123–135, <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1783-7>.

78. Gottipamula S., Muttigi M.S., Chaansa S., Ashwin K.M., Priya N., Kolkundkar U., Sundar Raj S., Majumdar A.S., Seetharam R.N. Large-scale expansion of pre-isolated bone marrow mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *J Tissue Eng Regen Med* 2016; 10(2): 108–119, <https://doi.org/10.1002/term.1713>.

79. Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F., Hazzi C., Stedeford T., Willing A., Freeman T.B., Saporta S., Janssen W., Patel N., Cooper D.R., Sanberg P.R. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000; 164(2): 247–256, <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7389>.

80. Vogel D.Y., Glim J.E., Stavenuiter A.W., Breur M., Heijnen P., Amor S., Dijkstra C.D., Beelen R.H. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology* 2014; 219(9): 695–703, <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.05.002>.

81. Maridas D.E., Rendina-Ruedy E., Le P.T., Rosen C.J. Isolation, culture, and differentiation of bone marrow stromal cells and osteoclast progenitors from mice. *J Vis Exp* 2018; 131: 56750, <https://doi.org/10.3791/56750>.

82. Servet-Delprat C., Arnaud S., Jurdic P., Nataf S., Grasset M.F., Soulas C., Domenget C., Destaing O., Rivollier A., Perret M., Dumontel C., Hanau D., Gilmore G.L., Belin M.F., Rabourdin-Combe C., Mouchiroud G. Flt3⁺ macrophage precursors commit sequentially to osteoclasts, dendritic cells and microglia. *BMC Immunol* 2002; 3: 15, <https://doi.org/10.1186/1471-2172-3-15>.

83. Giulian D., Ingeman J.E. Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *J Neurosci* 1988; 8(12): 4707–4717, <https://doi.org/10.1523/jneurosci.08-12-04707.1988>.

84. Chhor V., Le Charpentier T., Lebon S., Oré M.V., Celador I.L., Josserand J., Degos V., Jacotot E., Hagberg H., Sävman K., Mallard C., Gressens P., Fleiss B. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun* 2013; 32: 70–85, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.02.005>.

85. Jablonski K.A., Amici S.A., Webb L.M., Ruiz-Rosado Jde D., Popovich P.G., Partida-Sanchez S., Guerau-de-Arellano M. Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. *PLoS One* 2015; 10(12): e0145342, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145342>.

86. Галимова Э.С., Галагудза М.М. Двухмерные и трехмерные модели культур клеток опухолей in vitro: преимущества и недостатки. *Бюллетень сибирской медицины* 2018; 17(3): 188–196, <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-3-188-196>.

Galimova E.S., Galagudza M.M. Two-dimensional and three-dimensional cell culture models in vitro: pros and cons. *Bulleten' sibirskoj mediciny* 2018; 17(3): 188–196, <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-3-188-196>.

87. Watson P.M.D., Kavanagh E., Allenby G., Vasse M. Bioengineered 3D glial cell culture systems and applications for neurodegeneration and neuroinflammation. *SLAS Discov* 2017; 22(5): 583–601, <https://doi.org/10.1177/2472555217691450>.

88. Zhu J. Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 2010; 31(17): 4639–4656, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.044>.

89. Alves M.H., Jensen B.E., Smith A.A., Zelikin A.N. Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: new vista on a long serving biomaterial. *Macromol Biosci* 2011; 11(10): 1293–1313, <https://doi.org/10.1002/mabi.201100145>.

90. Andersen T., Auk-Emblem P., Dornish M. 3D cell culture in alginate hydrogels. *Microarrays (Basel)* 2015; 4(2): 133–161, <https://doi.org/10.3390/microarrays4020133>.

91. Dash T.K., Konkimalla V.B. Polymeric modification and its implication in drug delivery: poly-ε-caprolactone (PCL) as a model polymer. *Mol Pharm* 2012; 9(9): 2365–2379, <https://doi.org/10.1021/mp3001952>.

92. East E., Golding J.P., Phillips J.B. A versatile 3D culture model facilitates monitoring of astrocytes undergoing reactive gliosis. *J Tissue Eng Regen Med* 2009; 3(8): 634–646, <https://doi.org/10.1002/term.209>.

93. Hawkins B.T., Grego S., Sellgren K.L. Three-dimensional culture conditions differentially affect astrocyte modulation of brain endothelial barrier function in response to transforming growth factor β1. *Brain Res* 2015; 1608: 167–176, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.02.025>.

94. Sun Y., Li W., Wu X., Zhang N., Zhang Y., Ouyang S., Song X., Fang X., Seeram R., Xue W., He L., Wu W. Functional self-assembling peptide nanofiber hydrogels designed for nerve degeneration. *ACS Appl Mater Interf* 2016; 8(3): 2348–2359, <https://doi.org/10.1021/acsami.5b11473>.

95. Rocha D.N., Ferraz-Nogueira J.P., Barrias C.C., Relvas J.B., Pêgo A.P. Extracellular environment contribution to astrogliosis: lessons learned from a tissue engineered 3D Model of the glial scar. *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 377, <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00377>.
96. Min S.K., Jung S.M., Ju J.H., Kwon Y.S., Yoon G.H., Shin H.S. Regulation of astrocyte activity via control over stiffness of cellulose acetate electrospun nanofiber. *In Vitro Cell Devel Biol Anim* 2015; 51(9): 933–940, <https://doi.org/10.1007/s11626-015-9925-8>.
97. Tiryaki V.M., Ayres V.M., Khan A.A., Ahmed I., Shreiber D.I., Meiners S. Nanofibrillar scaffolds induce preferential activation of Rho GTPases in cerebral cortical astrocytes. *Intl J Nanom* 2012; 7: 3891–3905, <https://doi.org/10.2147/ijn.s32681>.
98. Smith I., Haag M., Ugbode C., Tams D., Rattray M., Przyborski S., Bithell A., Whalley B.J. Neuronal-glia populations form functional networks in a biocompatible 3D scaffold. *Neuroscience Lett* 2015; 609: 198–202, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.10.044>.
99. Ugbode C.I., Hirst W.D., Rattray M. Astrocytes grown in Alvetex® three dimensional scaffolds retain a non-reactive phenotype. *Neurochem Res* 2016; 41(8): 1857–1867, <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1911-3>.
100. Zhou K., Motamed S., Thouas G.A., Bernard C.C., Li D., Parkington H.C., Coleman H.A., Finkelstein D.I., Forsythe J.S. Graphene functionalized scaffolds reduce the inflammatory response and supports endogenous neuroblast migration when implanted in the adult brain. *PLoS One* 2016; 11(3): e0151589, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151589>.
101. Crews F.T., Vetreno R.P. Mechanisms of neuroimmune gene induction in alcoholism. *Psychopharmacology (Berl)* 2016; 233(9): 1543–1557, <https://doi.org/10.1007/s00213-015-3906-1>.
102. Fernández-Arjona M.D.M., Grondona J.M., Granados-Durán P., Fernández-Llebrez P., López-Ávalos M.D. Microglia morphological categorization in a rat model of neuroinflammation by hierarchical cluster and principal components analysis. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 235, <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00235>.
103. Kettenmann H., Hanisch U.K., Noda M., Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 2011; 91(2): 461–553, <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>.
104. Pöttler M., Zierler S., Kerschbaum H.H. An artificial three-dimensional matrix promotes ramification in the microglial cell-line, BV-2. *Neurosci Lett* 2006; 410(2): 137–140, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.09.082>.
105. Song Q., Jiang Z., Li N., Liu P., Liu L., Tang M., Cheng G. Anti-inflammatory effects of three-dimensional graphene foams cultured with microglial cells. *Biomaterials* 2014; 35(25): 6930–6940, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.05.002>.
106. Haw R.T., Tong C.K., Yew A., Lee H.C., Phillips J.B., Vidyadaran S. A three-dimensional collagen construct to model lipopolysaccharide-induced activation of BV2 microglia. *J Neuroinflammation* 2014; 11: 134, <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-134>.