

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計畫名稱：利用進階擴散磁共振造影來研究正常人大腦膠淋巴系統之變化

報告類別：成果報告
執行計畫學生：段玟卉
學生計畫編號：MOST 110-2813-C-040-091-E
研究期間：110年07月01日至111年02月28日止，計8個月
指導教授：蔡炳輝

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學影像暨放射科學系(所)

中華民國 111年03月27日

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* 計畫 *
* : 利用進階擴散磁振造影來研究正常人大腦膠淋巴系統之變化 *
* 名稱 *

執行計畫學生：段政卉

學生計畫編號：110-2813-C-040-091-E

研究期間：2021年7月1日至2022年2月底止，計8個月

指導教授：蔡炳輝

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學影像暨放射科學系(所)

中華民國 111年 02月 28日

摘要

腦部膠淋巴系統(glymphatic system)為大腦廢物清除的途徑，此系統活化的程度在腦神經退化疾病中扮演相當重要之角色。近年的研究大多藉由藥物注射顯影的方式來觀察動物腦部膠淋巴系統的流動變化，但此方法需額外注射顯影劑不利臨床研究使用。擴散張量及擴散峰度造影(diffusion tensor and diffusion kurtosis imaging, DTI/DKI)為一非侵入方式用以評估生物組織內水分子的擴散程度，主要透過不同的數學模型來量化水分子擴散程度。在神經組織中水分子會以非等向性流動，其擴散能力會受到神經組織微結構變化影響，因此這類方法常用於臨床觀察神經退化相關疾病。先前已有研究提出使用 DTI 技術來計算大腦中沿著血管周圍空間(along the perivascular space, ALPS)水分子擴散變化來評估阿茲海默氏症(AD)病人腦部膠淋巴系統之活性，雖然較低的 ALPS 擴散能力在 AD 病人被觀察到，但目前尚未有研究針對健康受試者建立 ALPS 的變化以及比較 ALPS 與年齡和性別之關係，因此本研究希望透過進階磁振擴散造影技術來研究正常人、輕度認知功能障礙受試者以及阿茲海默氏症患者之 ALPS，及其在不同年齡、性別是否存在顯著相關性，並期望此研究結果能對臨床神經退化病人評估腦部膠淋巴系統活性變化有所助益。

關鍵字：腦部膠淋巴系統、擴散張量及擴散峰度造影、神經退化、ALPS

目錄

摘要	1
目錄	2
第一章 緒論.....	3
第一節 研究動機與研究問題.....	3
第二節 文獻回顧與探討.....	4
第二章 研究方法與步驟.....	7
第三章 研究結果與討論.....	10
第四章 結論.....	15
參考文獻.....	16

第一章 緒論

第一節 研究動機與研究問題

腦部膠淋巴系統(glymphatic system)為近年被提出之大腦廢物清除的途徑，該途徑透過動脈搏動(arterial wall pulsatility)將蛛網膜下腔腦脊髓液(cerebrospinal fluid, CSF)流入大腦動脈血管周圍空間，並由中樞神經系統內特化的星狀細胞末端上的水通道蛋白(AQP4)促進其與組織間隙液(interstitial fluid, ISF)的對流流動。透過此驅動腦脊髓液與組織間隙液互相混合累積流向靜脈周圍組織，最終藉由腦膜與頸部淋巴管流出腦部組織達到清除腦內的廢棄產物、可溶性蛋白以及多餘的細胞外液。其中類澱粉蛋白(amyloid- β)等可溶性蛋白的累積是造成神經退化性疾病的重要因素，若無法透過腦部膠淋巴系統有效排這些有毒蛋白，將會使大腦內積滿神經毒素，突顯了腦部膠淋巴系統的重要性。

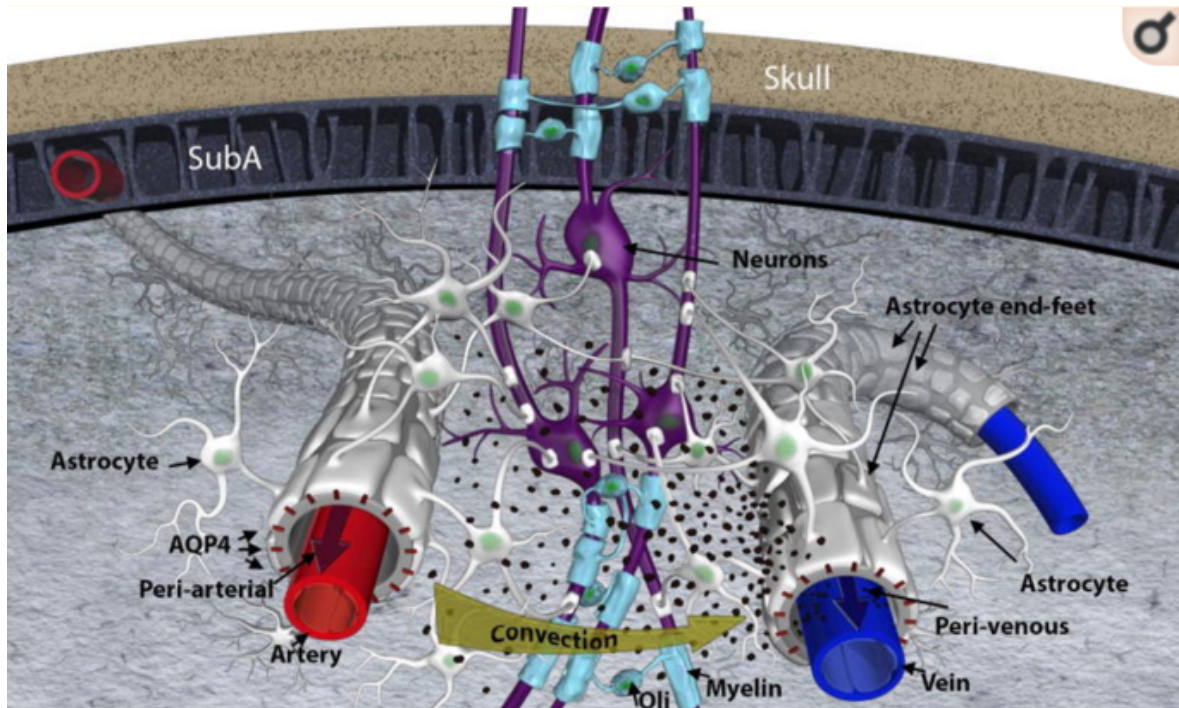


Figure 1. 腦部膠淋巴系統排除廢物示意圖[1]

研究指出，腦部膠淋巴系統的活性隨著年齡增長將有所變化。在健康年輕人中 CSF 通過腦實質並從 ASPL、靜脈排出廢物；而在老年人中，因星狀膠細胞與 AQP4 去極化而減少了廢物排出，由上述兩例可知與年齡相關的淋巴清除率促使了腦部類澱粉蛋白的聚集累積，在老年時大腦將有更多的廢物聚集。另一方面，在阿茲海默氏症病人，因其腦部膠淋巴系統的損害嚴重，造成可溶性蛋白無法透過 CSF 與組織間隙液的流動移除，腦部 ALPS 區域則發現有更大量的類便粉蛋白累積，進而造成腦部神經功能退化發生。

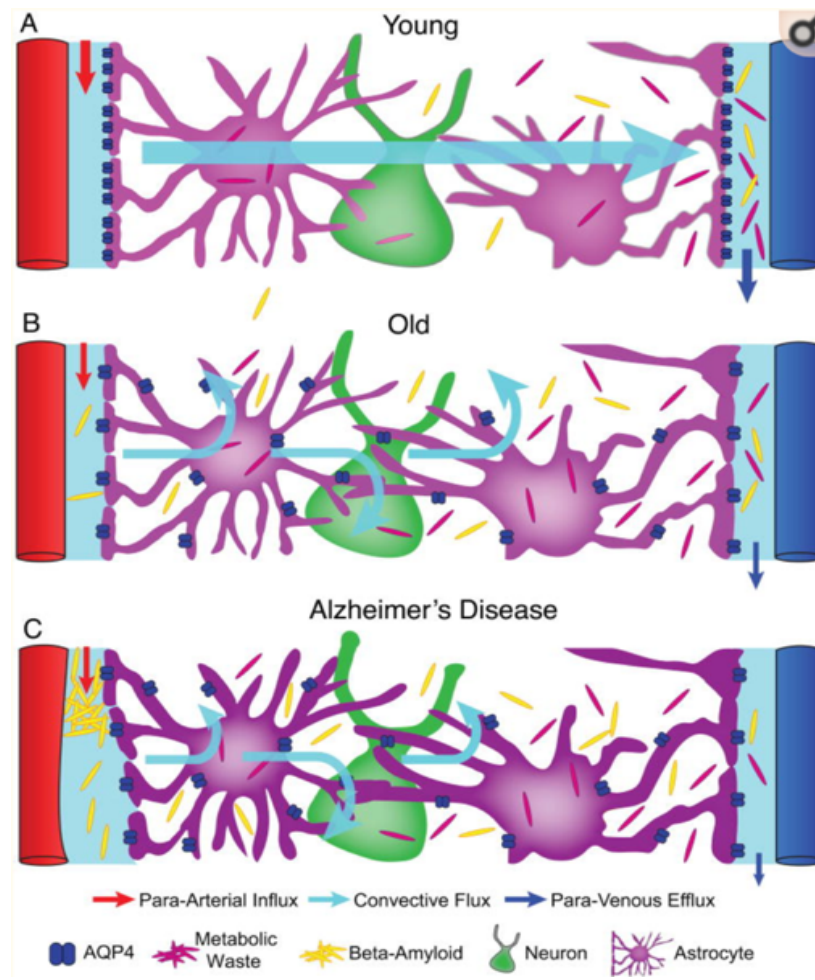


Figure 2. 年輕人、老年人與 AD 患者淋巴功能之模型[2]

擴散張量及擴散峰度造影(diffusion tensor and diffusion kurtosis imaging, DTI/DKI)為一非侵入方式用以評估生物組織內水分子的擴散程度，先前已有研究提出使用 DTI 技術來計算大腦中沿著血管周圍空間(along the perivascular space, ALPS)水分子擴散變化來評估阿茲海默氏症病人腦部膠淋巴系統之活性，雖然較低的 ALPS 擴散能力在 AD 病人被觀察到，但目前尚未有研究針對健康受試者建立 ALPS 的擴散變化以及比較 ALPS 與年齡和性別之關係，因此本研究目的在於”透過進階磁振擴散造影技術來研究正常人、輕度認知功能障礙受試者以及阿茲海默氏症患者之 ALPS 擴散變化，與其在不同年齡、性別間之關係”，相信此研究結果能對臨床神經退化病人評估腦部膠淋巴系統活性變化有所助益。

第二節 文獻回顧與探討

● 藥物注射顯影

過去多利用藥物注射顯影的方式來觀察動物腦部膠淋巴系統的流動變化，將多種示蹤物充當大腦廢物施入小鼠腦脊髓液中，利用不同成像

方式觀察其流動路徑及流入量[3]。Helene 等人提出將感興趣物質-類澱粉蛋白($\text{amyloid-}\beta$)注入 CSF 或直接打入腦實質，經過已知的示蹤劑循環時間後對動物進行安樂死，最後利用福馬林進行組織固定並搭配光學顯微鏡觀察淋巴排除途徑，觀察到示蹤劑在毛細血管與中央靜脈累積，但不沿動脈聚集，證實腦部膠淋巴系統的主要引流為靜脈[1]。而在 Jeffrey 等人的研究下，亦透過放射性示蹤劑觀察到缺乏水通道蛋白(AQP4)的小鼠，其清除率下降了 70%之多，確定了 AQP4 可促進腦部清除廢物[4]。除了動物層面，目前也有對人類非活體腦部膠淋巴系統作研究，Eva Mezey 等人利用 LYVE1 和 PDPN 抗體標記淋巴管內的內皮細胞，稱作淋巴標記陽性細胞(lymphatic marker-positive cells, LMPCs)，在 ALPS、大小動脈壁以及靜脈，且在蛛網膜、靜脈竇和硬腦膜層之間、顱神經內膜皆可觀察到染色的 LMPCs，證實淋巴經過上述管道，且透過此路徑排除大腦廢物[5]。但上述例子皆為利用非活體做研究，忽略了動脈搏動造成的影響，因此仍須作進一步的活體研究。

為了實際觀察到 CSF 在腦部膠淋巴系統扮演之角色，2020 年 Ringst 等人進行了長達 48 小時的 multi-phase MRI，並分別在 3、6、24、48 小時做紀錄，在 T1 梯度回訊及 3D T2 FLAIR 的配合下，在矢狀硬腦膜、蛛網膜下腔、顱神經出口發現帶有造影劑的高訊號。另外，在晚期掃描時(24、48 小時)，發現 CSF 的殘留物大多聚集在鄰近矢狀硬腦膜的區域。上述結果證實 CSF 直接引流至人體矢狀旁硬膜，確認其可作為腦組織與硬腦膜淋巴結之間 CSF 交換的橋樑[6]。

● DTI 研究腦部膠淋巴系統

近年有許多利用不同種磁振造影方式測量腦部膠淋巴系統[7, 8]，Taoka 等學者提出使用 DTI 技術來計算沿著血管周圍空間(along the perivascular space, ALPS)水分子擴散變化來評估阿茲海默氏症(AD)病人腦部膠淋巴系統之活性。作為一非侵入性之測量方法，DTI 可評估流體 ALPS 之 x、y、z 方向擴散性，藉由各方向的灌注量高低得知神經纖維是否受到損害或萎縮，進而確認淋巴系統之功能性。研究結果顯示，以 ALPS 方向作為 z 軸之基準，其灌注性與垂直於 ALPS 之 x、y 軸方向的纖維具有顯著負相關，並且透過運算的 ALPS-index 與 MMSE score 有顯著正相關，顯示 AD 患者在 ALPS 有較低的水灌注量，其淋巴系統受到損傷。另外，研究亦說明較低的 b value 有較高的訊雜比(signal to noise ratio, SNR)，因在 b value 較低時有較高的水分子原動力作為訊號來源[9]。

- 性別與腦部膠淋巴系統之關係

根據數據顯示，女性罹患阿茲海默氏症的機率為男性的兩倍，腦萎縮的發生率也較高。在 Michael 等人的研究下，紀錄了雄性與雌性小鼠在不同時間點腦部淋巴的流入量，測試是否因遺傳或是性別不同的潛在因子而有不同的發現，研究結果顯示雄、雌性小鼠的 CSF 示蹤劑分佈並無明顯差異，且與時間點、大腦區域、年齡無關[10]。但在另一篇研究中，發現雄鼠和雌鼠在中大腦動脈(middle cerebral artery, MCA)中風後，星狀細胞上的 AQP4 有不同的反應，不同性別之間缺血後的星狀膠質細胞鈣離子動力學不同，且雄鼠的星狀膠質細胞變異很大[11]，因此性別對腦部神經膠細胞的活性變化之影響仍未知，須透過研究深入探討其影響。

第二章 研究方法與步驟

1. 磁振造影 (MR Imaging)

本研究將使用 ADNI 資料庫的資料，分別對 66 名健康受試者(80 歲以下受試者 37 位、80 歲以上受試者 29 位；其中男性受試者 22 位、女性受試者 44 位)、32 名輕度認知功能障礙(MCI)受試者(80 歲以下受試者 18 位、80 歲以上受試者 14 位；其中男性受試者 19 位、女性受試者 13 位)以及 45 名阿茲海默氏症患者(80 歲以下受試者 33 位、80 歲以上受試者 12 位；其中男性受試者 27 位、女性受試者 18 位)進行收案與相關造影分析，使用的磁振造影機器為 Siemens 3T MR 掃描儀(MAGNETOM Skyra clinical scanner)，搭配 32 通道的頭頸部線圈來搜集訊號。在一般的定位、結構性造影之後，以擴散權重影像造影技術來研究正常人、輕度認知功能障礙受試者以及阿茲海默氏症患者之 ALPS。其餘參數如下: b value=0/1000, TR= 7200~16700ms, TE=56~105ms, No. of diffusion direction=30、54 directions, 矩陣大小 = 1152×1152、1044×1044, 切片厚度=2 mm。

2. DTI-ALPS 擴散評估

取得受試者 MR 影像並透過後處理重建計算出腦部水分子擴散分布後，利用顏色編碼的擴散不等向性影像(Fractional anisotropy, FA)及 diffusivity map 計算 ALPS 之 x、y、z 三個方向之擴散量，其中 x 軸為平行 ALPS 之方向(Subcortical area)、y 軸為垂直 ALPS 之前後方向(Association area)、z 軸亦為垂直 ALPS 之上下方向(Projection area)。以側腦室旁的 projection fibers(上下走向)為例，若受試者因年紀增長或阿茲海默氏症之演進時，伴隨之腦部膠淋巴系統流動量下降理論上量測到的 D_x 將變慢，但神經退化同時微結構變化產生神經去髓鞘化則會使 D_x 上升，因此只單獨計算 D_x 會導致結果誤判，需做修正，此時會以 projection fiber 擴散橢圓球的另一短軸方向: D_y 當作基準。反之，若是 projection fiber 旁的 association area，因其神經為前後走向，故以 D_z 當作基準。取得上述數據後將透過以下公式進行數據校正，其中數值愈接近 1，代表沿著 ALPS 之水分子擴散影響愈小，且數值愈大、代表 ALPS 有愈大的擴散量：

$$\text{ALPS index} = \text{mean}(D_{x_{\text{proj}}}, D_{x_{\text{assoc}}}) / \text{mean}(D_{y_{\text{proj}}}, D_{z_{\text{assoc}}})$$

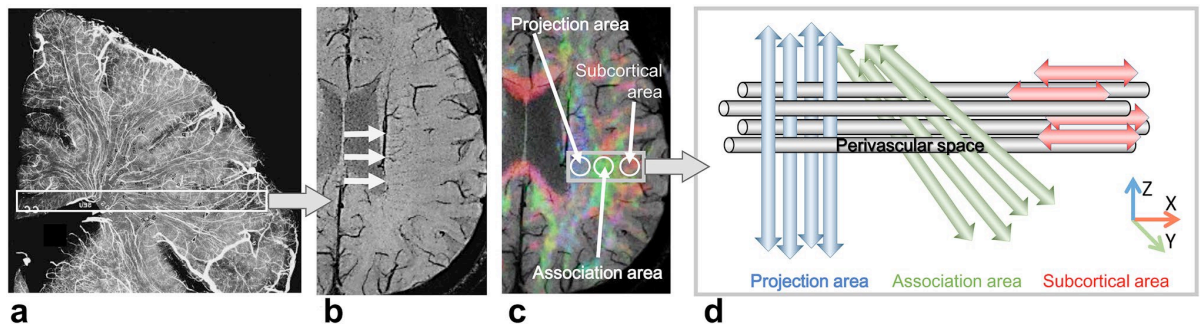


Figure 3. 使用 DTI 技術來計算沿著血管周圍空間(along the perivascular space, ALPS)水分子擴散變化反映出腦部膠淋巴系統之活化程度[9]

接著利用 Matlab 2019b 軟件平台，在臨床醫師的指導下依據結構性影像與顏色編碼的擴散不等向性影像對照在三個方向上的纖維，分別圈選直徑為 5mm 之感興趣區域，並計算不同圈選區域(projection area and association area)中 x、y、z 軸之水分子擴散量(Dx、Dy、Dz)。

3. 計算 DTI-ALPS 變化與年齡、性別之關係

經計算後的 DTI-ALPS 擴散數據使用 Microsoft Excel、SAS 軟件來進行統計分析，首先利用 Mann-Whitney U test 與 Spearman correlation 的運算來評估受試者在正常人、輕度認知功能障礙受試者以及阿茲海默氏症患者 DTI-ALPS 變化之相關性，再利用單因子獨立變異數分析 (Analysis of Variance, ANOVA)比較不同年齡層及性別間之差異與關係。

第三章 研究結果及討論

	正常人	MCI	AD
總人數	66	32	45
女性人數	44	13	18
男性人數	22	19	27
性別比	2	0.684210526	0.666666667
平均年齡	79.2755905	76.92537313	74.70909091
ALPS 平均值	1.32907587	1.331208	1.18682
標準差	0.235059698	0.243474796	0.167886419

Table 1. 正常人、MCI、AD 數據比較圖

本研究受試者正常人共 66 位，其中女性人數 44 位、男性人數 22 位，性別比為 2，年齡在 60~93 歲之間，平均年齡 79 歲，ALPS 平均值為 1.330953，標準差為 0.235059698；MCI 受試者共 32 位，其中女性人數 13 位、男性人數 19 位，性別比為 0.684210526，年齡在 57~94 歲之間，平均年齡 76 歲，ALPS 平均值為 1.331208，標準差為 0.243474796；而 AD 患者共 45 位，其中女性人數 18 位、男性人數 27 位，性別比為 0.666666667，年齡在 55~88 歲之間，平均年齡 74 歲，ALPS 平均值為 1.18682，標準差為 0.167886419。

首先，經計算後的 DTI-ALPS 擴散數據使用 Excel 軟件來評估正常人、輕度認知功能障礙受試者以及阿茲海默氏症患者的 DTI-ALPS 變化，統計數據結果如下：

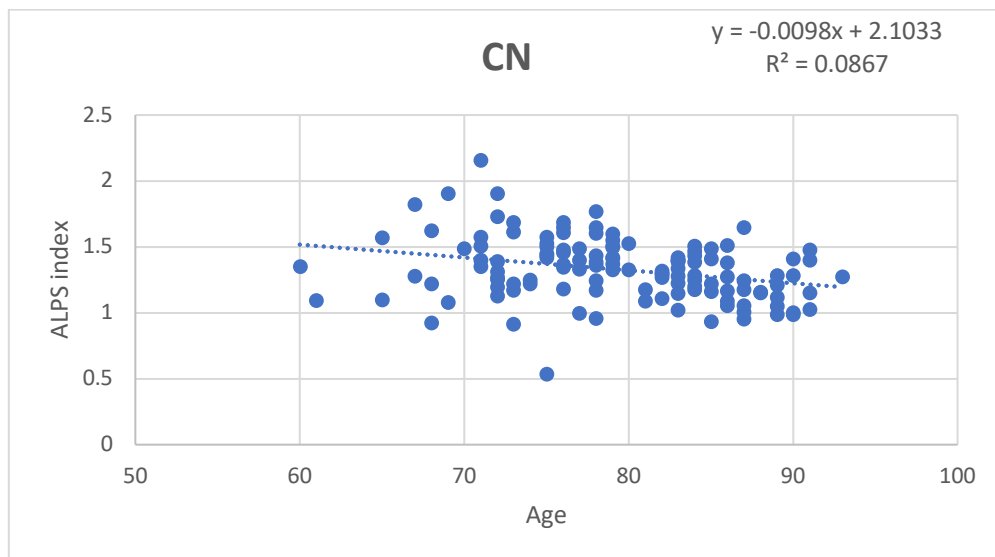


Fig 4. 正常人之 ALPS 數據散佈圖

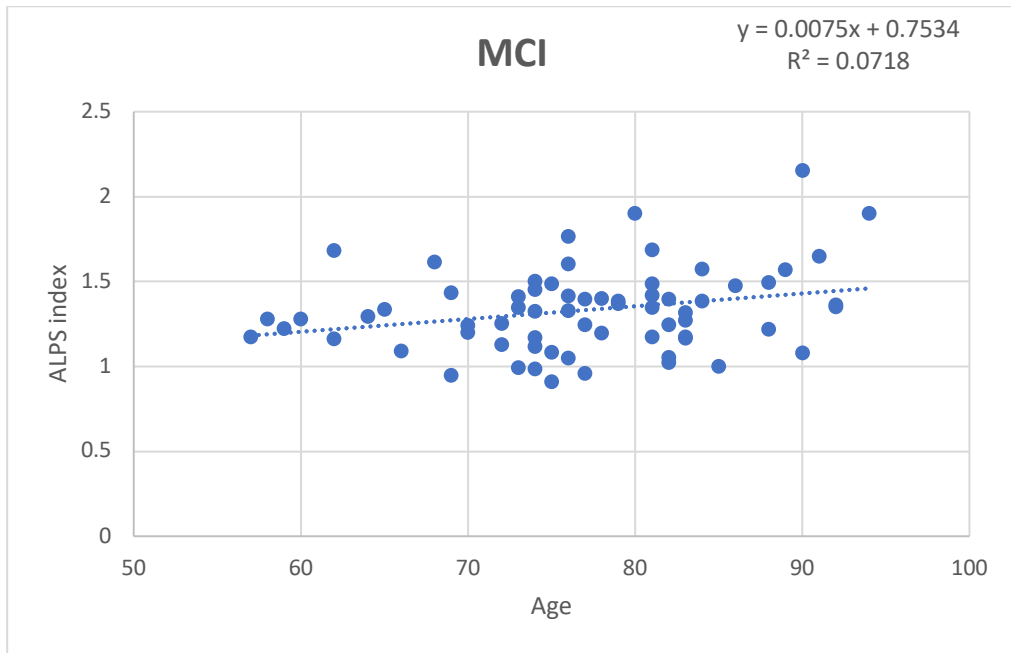


Fig 5. MCI 患者之 ALPS 數據散佈圖

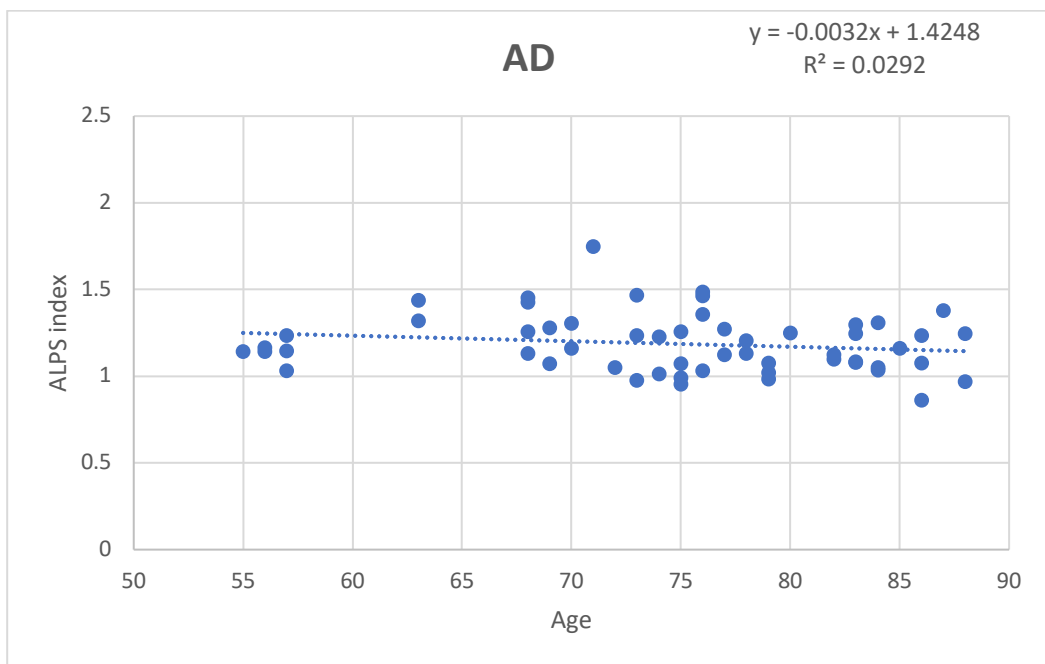


Fig 6. AD 患者之 ALPS 數據散佈圖

由上述數據可知在正常人之 ALPS 數據中，數值分佈介於 0.5~2.2 之間，決定係數 (Coefficient of determination) =0.0867，ALPS 數值隨年齡有下降的趨勢，呈負相關；在 MCI 患者的 ALPS 數據中，數值分佈介於 0.92~2.2 之間，決定係數=0.0718，ALPS 數值隨年齡有上升的趨勢，呈正相關；而在 AD 患者之 ALPS 數據中，數值分佈介於 0.86~1.8 之間，決定係數=0.0292，為三者數據中較低的一組，且 ALPS 數值隨年齡有下降的趨勢，呈負相關。對於 MCI 患者的 ALPS 數值隨年齡上升之結果，有研究指出 ALPS index 數值與 MCI 之間患者並無明顯的關聯[12]，可解釋為

何在此研究中與正常人、AD 患者的數據曲線有差異。過去研究也指出，與正常人相比，MCI 患者與 AD 患者之 ALPS 數據是較低的[9]，在此研究中則是 MCI 為最高、正常人 ALPS index 數據次之，這可能與取樣的年齡範圍、個數以及發病狀況相關，正常受試者之平均年齡為 79 歲，而 MCI 受試者平均年齡為 77 歲，極有可能是因此造成此結果。另外我們利用了獨立樣本 T test 運算來評估受試者在正常人、輕度認知功能障礙受試者以及阿茲海默氏症患者 DTI-ALPS 變化之相關性，數據結果如下：

	CN	MCI
平均數	1.329075874	1.331208091
變異數	0.055253062	0.059279976
觀察值個數	127	67
t 統計	-0.059336026	
P(T<=t) 單尾	0.47637309	
臨界值：單尾	1.652828589	
P(T<=t) 雙尾	0.952746179	
臨界值：雙尾	1.972396491	

Table 2. 正常人與 MCI 受試者之 T test 結果

	CN	AD
平均數	1.32907587	1.18682405
變異數	0.05525306	0.02818585
觀察值個數	127	55
t 統計	4.05922645	
P(T<=t) 單尾	3.6667E-05	
臨界值：單尾	1.65336301	
P(T<=t) 雙尾	7.3334E-05	
臨界值：雙尾	1.97323082	

Table 3. 正常人與 AD 受試者之 T test 結果

	MCI	AD
平均數	1.331208091	1.18682405
變異數	0.059279976	0.02818585
觀察值個數	67	55
t 統計	3.728792996	
P(T<=t) 單尾	0.000147532	
臨界值：單尾	1.657650899	
P(T<=t) 雙尾	0.000295064	
臨界值：雙尾	1.979930405	

Table 4. MCI 與 AD 受試者之 T test 結果

本研究中發現，在正常人與 MCI 受試者之間並無顯著性，p 值 (0.47637309)>0.05，而在正常人與 AD 受試者以及 MCI 與 AD 受試者中 p 值(0.000036667、0.000147532)<0.05，具有顯著性。

接著利用單因子獨立變異數分析 (Analysis of Variance, ANOVA)比較在各組別中(正常人、MCI 受試者、AD 受試者)不同年齡層及性別間之差異與關係，我們將年齡分作兩組，分別是小於等於 80 歲為一組以及大於 80 歲為一組；而性別分作男女兩組，數據結果如下：

組	個數	總和	平均	變異數
≤ 80 歲	70	98.2169867	1.40309981	0.0664084
>80 歲	57	70.5756493	1.23816929	0.02723374

ANOVA

變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	0.85461647	1	0.85461647	17.4917878	5.3873E-05	3.91693224
組內	6.1072693	125	0.04885815			
總和	6.96188576	126				

Table 5. 正常人不同年齡間之 ANOVA 數據

組	個數	總和	平均	變異數
≤ 80 歲	41	53.1893163	1.2973004	0.04959067
>80 歲	26	36.0016258	1.38467792	0.07229513

ANOVA

變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	0.12147358	1	0.12147358	2.08276774	0.15377204	3.98855983
組內	3.79100486	65	0.05832315			
總和	3.91247844	66				

Table 6. MCI 受試者不同年齡間之 ANOVA 數據

組	個數	總和	平均	變異數
≤ 80 歲	39	47.0476745	1.20635063	0.03132108
>80 歲	16	18.2276483	1.13922802	0.01871457

ANOVA

變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	0.05111632	1	0.05111632	1.84181713	0.1804898	4.023017
組內	1.47091956	53	0.0277532			
總和	1.52203588	54				

Table 7. AD 受試者不同年齡間之 ANOVA 數據

由上述數據發現在三組數據中，除 MCI 患者是大於 80 歲的 ALPS 數據較高外，其餘皆較年老的組別 ALPS 數據較低，雖然現今研究指出年齡較大並不會導致阿茲海默氏症，但隨著年齡的增長、大腦細胞的退化，目前科學家也在研究人類大腦中與年齡相關的變化，如神經元的損傷進而造成影響腦細胞，而年齡也只是造成退化的危險因素之一，並不是絕對造成阿茲海默氏症的因素。另外，在顯著性數據分析上發現，正常人之 ALPS 在不同年齡間具有顯著性， p 值=0.000053873，而在 MCI 和 AD 患者間則沒有顯著性， p 值分別為 0.15377204、0.1804898。

組	個數	總和	平均	變異數
F	86	116.578878	1.35556835	0.06732103
M	41	52.213758	1.27350629	0.02631581

ANOVA

變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	0.18696632	1	0.18696632	3.44960409	0.06562041	3.91693224
組內	6.77491944	125	0.05419936			
總和	6.96188576	126				

Table 8. 正常人不同性別間之 ANOVA 數據

組	個數	總和	平均	變異數
F	29	37.6152147	1.29707637	0.03697446
M	38	51.5757274	1.35725598	0.07615207

ANOVA

變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	0.05956698	1	0.05956698	1.0049164	0.31984114	3.98855983
組內	3.85291145	65	0.05927556			
總和	3.91247844	66				

Table 9. MCI 受試者不同性別間之 ANOVA 數據

組	個數	總和	平均	變異數
F	22	27.8111673	1.26414397	0.03142459
M	33	37.4641555	1.13527744	0.02009102

ANOVA						
變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	0.21920689	1	0.21920689	8.91749043	0.00426901	4.023017
組內	1.30282899	53	0.02458168			
總和	1.52203588	54				

Table 10. AD 受試者不同性別間之 ANOVA 數據

而在各組不同性別之 ANOVA 數據中可發現，在正常人與 AD 兩組數據中，皆是女性之 ALPS index 數據大於男性，而在 MCI 患者中則是男性之 ALPS index 數據大於女性，性別在此研究中無法證實為影響人類大腦膠淋巴系統之因素之一，雖然根據研究指出，女性因為特殊的性別基因、遺傳學因而罹患阿茲海默氏症的機率較高，但在此研究中 AD 與正常人之 ALPS index 數據皆為女性較高，因此性別這項因素是否為影像 ALPS 數據仍有待其實驗來證實。另外，在顯著性數據分析上發現只有 AD 受試者這組具有顯著性，p 值 = 0.00426901。在另外兩組正常人以及 MCI 受試者則較無顯著性，p 值分別為 0.06562041 及 0.31984114。

第四章 結論

本研究旨為透過進階磁振擴散造影技術來研究正常人、輕度認知功能障礙受試者以及阿茲海默氏症患者之 ALPS，及其在不同年齡、性別是否存在顯著相關性，並期望此研究結果能對臨床神經退化病人評估腦部膠淋巴系統活性變化有所助益，以下將列點介紹本研究之發現：

一、MCI 患者之 ALPS index 數據與年齡較無關係

在本計畫中發現，正常受試者與 AD 受試者之 ALPS index 數據皆隨年齡的上升而下降，唯 MCI 受試者之 ALPS 數據和年齡呈現正相關。雖然現今研究指出年齡較大並不會直接導致阿茲海默氏症，但隨著年齡的增長、大腦細胞的退化，也是會造成 Glymphatic system 的功能下降，進而導致 ALPS 的流動量變低，而年齡也只是造成退化的危險因素之一，並不是絕對造成阿茲海默氏症的因素。

二、性別是否為影響人類腦部膠淋巴系統退化之因素仍有待商榷

依本研究數據得知，正常受試者與 AD 受試者之 ALPS index 數據皆為女性大於男性，而在 MCI 受試者中則相反。雖已確認 MCI 患者之 ALPS index 數據與年齡較無關，然而在性別這塊仍需有更多研究來支持並證實其與人類腦部膠淋巴系統退化之關係。

三、數據誤差

在此研究中仍有一些搜集數據時未考慮的誤差，例如年齡、性別之間採用的個案數、在三組數據中採用的年齡分佈以及圈 ROI 時造成的人為誤差.....等，都可能是造成數據誤差的原因，在後續的實驗中需更注意。

(六) 參考文獻

1. Benveniste H, Liu X, Koundal S, Sanggaard S, Lee H, Wardlaw J: **The Glymphatic System and Waste Clearance with Brain Aging: A Review.** *Gerontology* 2019, **65**:106-119.
2. Jessen NA, Munk AS, Lundgaard I, Nedergaard M: **The Glymphatic System: A Beginner's Guide.** *Neurochem Res* 2015, **40**:2583-2599.
3. Mestre H, Mori Y, Nedergaard M: **The Brain's Glymphatic System: Current Controversies.** *Trends Neurosci* 2020, **43**:458-466.
4. Iliff JJ, Nedergaard M: **Is there a cerebral lymphatic system?** *Stroke* 2013, **44**:S93-95.
5. Mezey E, Szalayova I, Hogden CT, Brady A, Dosa A, Sotonyi P, Palkovits M: **An immunohistochemical study of lymphatic elements in the human brain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021, **118**.
6. Ringstad G, Eide PK: **Cerebrospinal fluid tracer efflux to parasagittal dura in humans.** *Nat Commun* 2020, **11**:354.
7. Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS: **Diffusion tensor imaging of the brain.** *Neurotherapeutics* 2007, **4**:316-329.
8. Soares JM, Marques P, Alves V, Sousa N: **A hitchhiker's guide to diffusion tensor imaging.** *Front Neurosci* 2013, **7**:31.
9. Taoka T, Masutani Y, Kawai H, Nakane T, Matsuoka K, Yasuno F, Kishimoto T, Naganawa S: **Evaluation of glymphatic system activity with the diffusion MR technique: diffusion tensor image analysis along the perivascular space (DTI-ALPS) in Alzheimer's disease cases.** *Jpn J Radiol* 2017, **35**:172-178.
10. Giannetto M, Xia M, Staeger FF, Metcalfe T, Vinitsky HS, Dang J, Xavier ALR, Kress BT, Nedergaard M, Hablitz LM: **Biological sex does not predict glymphatic influx in healthy young, middle aged or old mice.** *Sci Rep* 2020, **10**:16073.
11. Morrison HW, Filosa JA: **Sex differences in astrocyte and microglia responses immediately following middle cerebral artery occlusion in adult mice.** *Neuroscience* 2016, **339**:85-99.
12. McKnight CD, Trujillo P, Lopez AM, Petersen K, Considine C, Lin YC, Yan Y, Kang H, Donahue MJ, Claassen DO: **Diffusion along perivascular spaces reveals evidence supportive of glymphatic function impairment in Parkinson disease.** *Parkinsonism Relat Disord* 2021, **89**:98-104.