



УДК 612.825

## Изучение лимфодренажной функции мозга после открытия гематоэнцефалического барьера и во время медикаментозного сна



Е. М. Зинченко, М. М. Климова, А. П. Хороводов, И. М. Агранович, А. Е. Шариф, А. В. Терсков, А. И. Дубровский, А. А. Широков, А. Т. Мамедова, И. А. Блохина, Н. Д. Лежнев, А. В. Ромащенко, В. В. Тучин, О. В. Семячкина-Глушковская

Зинченко Екатерина Михайловна, кандидат биологических наук, доцент кафедры консультативной психологии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Odonata1108@yandex.ru

Климова Мария Максимовна, студент кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, mari-1997@mail.ru

Хороводов Александр Петрович, аспирант кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, khorovodov2012@yandex.ru

Агранович Илана Михайловна, аспирант кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, ilana.agranovich@yandex.ru

Шариф Али Есмат, аспирант кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, esmtshareef@yahoo.co.uk

Терсков Андрей Витальевич, аспирант кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, terskow.andrey@gmail.com

Дубровский Александр Ильич, лаборант кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, paskalkamal@mail.ru

Широков Александр Александрович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии, руководитель ЦКП «Симбиоз», Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, shirokov\_a@ibppm.ru

Мамедова Айсель Тофик-кызы, аспирант кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, mamedovaysel95@gmail.com

Блохина Инна Андреевна, студент кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, inna-474@yandex.ru

Лежнев Никита Дмитриевич, студент кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, nik.lezhnev.2018@mail.ru

Ромащенко Александр Витальевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук «Центр генетических ресурсов лабораторных животных», Новосибирск, yuter2006@yandex.ru

Тучин Валерий Викторович, доктор физико-математических наук, профессор кафедры оптики и биофотоники, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, tuchinvv@mail.ru

Семячкина-Глушковская Оксана Валерьевна, доктор биологических наук, заведующий кафедрой физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, glushkovskaya@mail.ru

На самцах половозрелых крыс исследовали активацию функций лимфатической системы мозга (ЛСМ) во время медикаментозного сна и после открытия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) звуком. Очистительную и дренажную функции ЛСМ изучали по выведению контрастных веществ из мозга в режиме реального времени с применением магнитно-резонансной томографии (МРТ) и оптической когерентной томографии (ОКТ). Установлено, что открытие ГЭБ сопровождается немедленной активацией лимфодренажной функции мозга, что проявляется в более быстром выведении из его тканей гадолиния (МРТ данные) и золотых наностержней (ОКТ результаты). Впервые выявлено, что медикаментозный сон и открытие ГЭБ имеют схожую динамику изменений паттернов, отраженных в электрической активности мозга. Полученные результаты являются пионерскими и открывают новые физиологические закономерности в изучении функций ЛСМ, что способствует появлению инновационных стратегий в развитии прорывных технологий в терапевтических модуляциях лимфодренажных процессов мозга.

**Ключевые слова:** церебральная лимфатическая система, гематоэнцефалический барьер, магнитно-резонансная томография, электроэнцефалография, оптическая когерентная томография, крысы.

Поступила в редакцию: 01.05.2020 / Принята: 14.05.2020 / Опубликовано: 31.08.2020

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0)

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-3-339-351>



## Введение

Сон является ключевым защитным фактором здоровья центральной нервной системы (ЦНС). Хорошо известно, что нарушение сна сопровождается резким снижением работоспособности, ухудшением памяти, внимания и когнитивных возможностей [1, 2]. Депривация сна в течение нескольких дней приводит к смерти [3]. Обще-признанным фактом является то, что во время сна мозг работает на себя и на восстановление своих ресурсов. Однако механизмы, лежащие в основе восстановительных способностей сна, остаются за пределами понимания ученых.

В периферических тканях очистительную функцию играет лимфатическая система, которая выводит из тканей токсины, вирусы, бактерии, тем самым повышая регенеративные процессы после инфекции, сосудистых и метаболических заболеваний. Какую роль играет лимфатическая система мозга (ЛСМ), остается неизвестным и актуальным вопросом в нейрофизиологии. В пионерских результатах коллектива было показано, что ЛСМ является «туннелем» для выведения из тканей мозга токсинов, например бета-амилоида [4, 5], и молекул, которые пересекают открытый гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [6–8]. Предварительные исследования коллектива также свидетельствуют о вовлечении ЛСМ в очищении тканей мозга от продуктов крови. На основании многочисленных экспериментальных данных выдвигается гипотеза о феномене активации дренажной и очистительной функций мозга во время сна [9–12].

Целью данных исследований явилось изучение активации дренажной функции лимфатической системы мозга после открытия ГЭБ во время медикаментозного сна.

## Материалы и методы

**Объекты исследования.** Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с установленными правилами проведения исследований на животных (Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies, National Research Council of the National Academies, Guide for the care and use of laboratory animals. 8th edition. Washington: The National Academies Press; 2011. <http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guide.pdf>. [Accessed 28 Feb 2012]) и в соответствии с международными стандартами GLP.

Животные содержались в стандартных условиях вивария Саратовского национального исследовательского государственного универси-

тета им. Н. Г. Чернышевского при температуре  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ , влажности 55% и 12/12-часовом цикле свет / темнота. Экспериментальные протоколы утверждены локальной этической комиссией ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского».

Объектами исследования были половозрелые самцы крыс Wistar (250–280 г).

**Методика открытия ГЭБ.** В наших ранних исследованиях было показано, что открытие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) является стимулом для активации дренажной и очистительной функций мозга с целью сохранения гомеостаза ЦНС [6, 7].

Для открытия ГЭБ у крыс была использована оригинальная методика коллектива, основанная на применении громкого звука или музыки, что сопровождается обратимым повышением проницаемости ГЭБ в здоровых сосудах [7, 13].

Для индуцирования громкой музыки (70–90–100 дБ и 11–10,000 Гц) использовали источник звука, воспроизводящий интенсивность звука в диапазоне 0–130 дБ, частота – 63–15000 Гц; 100 Вт, размер: 450×640×330 мм, Ярослав Music Corporation, Санкт-Петербург, Россия). Частота звука контролировалась с помощью программного обеспечения (Audacity®), интенсивность – с помощью измерителя звука (Megeon 92130, Россия). Для воспроизведения громкого звука использовали источник (7А, 12 Вт, Auto VAZ PJSC, Тольятти, Россия). На основании наших предварительных данных об эффективных звуковых параметрах для открытия ГЭБ звук применяли в диапазоне 70–90–100 дБ, 370 Гц. Алгоритм воздействия: 60 с – звук/музыка; 60 с – пауза на протяжении 2 ч.

**Анализ проницаемости ГЭБ.** Для оценки проницаемости ГЭБ использовали методы *in vivo* (магнитно-резонансная томография (МРТ), флуоресцентный анализ) и *ex vivo* (спектрофлуориметрический анализ).

Проницаемость ГЭБ для альбуминового комплекса Evans Blue (ЕВАС) изучали в опытах *ex vivo* и *in vivo* в двух основных группах, где крысы подвергались воздействию: 1 – громкой музыки (70–90–100 дБ), Scorpions «Still Loving You» с разным диапазоном частот (100–10000 Гц) и 2 – громкого звука (70–90–100 дБ) с фиксированной частотой 370 Гц. Эти две группы были разделены на четыре подгруппы: I – контроль, нет музыки / звука; II, III и IV – через 1, 4 и 24 ч после воздействия музыки / звука соответственно,  $n = 15$  в каждой группе. За три дня до экспериментов полиэтиленовый катетер (PE-10, Scientific Commodities Inc., Лейк-Хавасу-Сити, Аризона)

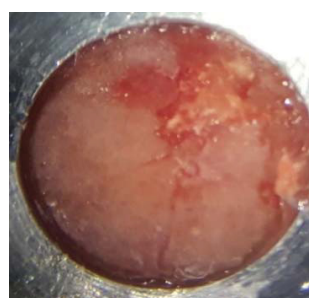


был имплантирован в бедренную вену для внутривенного введения красителя Evans Blue у бодрствующих крыс. Имплантация катетера была выполнена под наркозом (2% изофлурана при 1 л/мин  $N_2O/O_2 - 70 : 30$ ). До и через 1, 4 и 24 ч после воздействий музыки / звука вводили краситель в дозе 2 мг/25 г крысы, 1% раствор в физиологическом растворе, который циркулировал в крови в течение 30 мин. Для изучения времени эффективной экстравазации ЕВАС проводили опыты *in vivo* с применением неинвазивного метода флуорес-

центной микроскопии у крыс с использованием оптических просветлителей черепа [14] (рис. 1). Далее крыс декапитировали, их мозг быстро извлекали и помещали на лед (во время сбора крови антикоагуляция не использовалась). Перед этим головной мозг перфузировали физиологическим раствором. Подробный протокол применения красителя Evans Blue для изучения проницаемости ГЭБ опубликован Wang et al. [15]. Для расчета концентрации ЕВАС (мкг/г ткани мозга) была построена стандартная калибровочная кривая.



а/а



До просветления черепа /  
Before skull optical clearing



После просветления черепа /  
After skull optical clearing

б/б

Рис. 1. Изображение подготовки оптического окна с применением технологии оптического просветления черепа FDISCO для проведения неинвазивных *in vivo* исследований проницаемости ГЭБ: а – подготовка животного; б – изображение поверхности мозга крысы в оптическом микроскопе до и после применения оптического просветления черепа [14]

Fig. 1. Preparation of optical skull window by optical skull clearing technique FDISCO for non invasive *in vivo* assessment of BBB permeability: a – animal preparation; b – the optical microscopy images of rat's brain surface before and after optical skull clearing [14]

Магнитно-резонансную томографию проницаемости ГЭБ проводили на крысах в разные промежутки времени до и через 1, 4 и 24 ч после воздействия звука (100 дБ, 370 Гц) на томографе (7Т, Bruker Biospin; Billerica, MA, USA) под ингаляционной анестезией (2% изофлурана 1л/мин  $N_2O/O_2 - 70 : 30$ ) с использованием модифицированного динамического контраст-усиления

и графического анализа данных изображения [16, 17]. Крысам вводили 0,1 мМ/кг гадолиний-диэтилентриамин-пентауксусной кислоты (Gd-DTPA, MW = 938 Да; Bayer Healthcare) в виде болюсной инъекции в хвостовую вену с последующей визуализацией. Количественную оценку накопления Gd-DTPA в тканях мозга проводили на основе динамического контрастирования с использованием



специально созданной компьютерной программы в MATLAB (Mathworks, Массачусетс, США), основанной на графическом анализе нарастания контраста Gd-DTPA в тканях мозга по принципу линейной алгоритмической зависимости, применяемой в фармакокинетических исследованиях на основе Patlak plots анализа и построения карт (Ki) скорости нарастания сигнала Gd-DTPA [18].

Для МРТ-изучения лимфодренажной функции мозга исследовали динамику (через 10 и 120 мин) выведения контраста (Omniscan®) из мозга при его введении в кору больших полушарий (1 мм влево и вниз от брегмы) до и после открытия ГЭБ звуком с применением сверхвысокопольного томографа BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тесла. За 3 мин до исследования крыс C57 Black/6j обездвигивали газовой смесью 2% изофлюрана (1л/мин N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> – 70 : 30, Baxter Healthcare Corp., США) при помощи наркотического аппарата (The Univentor 400 Anaesthesia Unit, Univentor, Malta). Температуру животных поддерживали с помощью водного контура в томографическом столике-кроватьке, имевшем температуру поверхности 30° С. Под нижнюю часть туловища помещали пневматический датчик дыхания (SA Instruments, Stony Brook, N.Y., USA), что позволяло контролировать глубину наркоза.

Распределение контраста по структурам мозга крысы (коре больших полушарий, боковому и четвертому желудочкам, зрительному нерву) исследовали с помощью T1-взвешенных изображений, полученных с использованием метода RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement). Параметры импульсной последовательности метода (TE = 10 мс, TR = 400 мс), параметры изображения (размер 1,8 × 1,8 см; матрица 256 × 256 точек; толщина среза 0,5 мм; размеры вокселя 75 μм × 75 μм × 0,5 мм; расстоя-

ние между срезами 0,5 мм; количество срезов 9; ориентация срезов – коронарная) общее время сканирования составляло 7 мин.

Накопление МРТ-контраста выражали как отношение уровня МРТ-сигнала в исследуемых структурах к уровню МРТ-сигнала в референсе, которым служила микропробирка с фосфатным буфером (0,5 мл), помещенная вдоль головы крысы. Контролем служили МРТ-данные, полученные от интактных крыс без введения контраста. Обработку МРТ-сканов проводили в программе ImageJ. Исследования проводили в следующих группах: 1 и 2) МРТ-сканы, снятые с интактных крыс на 10 и 120 мин без введения контраста; 3 и 4) МРТ-анализ через 10 и 120 мин после введения контраста в кору больших полушарий до открытия ГЭБ; 5 и 6) МРТ-анализ через 10 и 120 мин после введения контраста в кору больших полушарий после открытия ГЭБ (1 ч после воздействия звуком 100 дБ, 370 Гц), *n* = 5 для каждой группы.

#### Оценка лимфодренажной функции мозга.

На финальном этапе для оценки лимфодренажной функции мозга был разработан дизайн эксперимента, включающий мониторинг в реальном режиме времени лимфатического очищения тканей мозга от золотых наностержней и их динамическое накопление в глубоких шейных лимфатических узлах с применением оптической когерентной томографии (ОКТ) и анализа электроэнцефалограммы (ЭЭГ) изменений электрической активности мозга до и после открытия ГЭБ у бодрствующих половозрелых самцов крыс Wistar (250–280 г) и во время медикаментозного сна, вызванного анестезией (золетил 100 и ксиланит, дозировка – 0,1 мл ксиланита + 0,1 мл р-ра золетила на 100 г веса животного) (рис. 2). Исследования проводили на 10 крысах в следующей последовательности: 1) ОКТ+ЭЭГ мониторинг

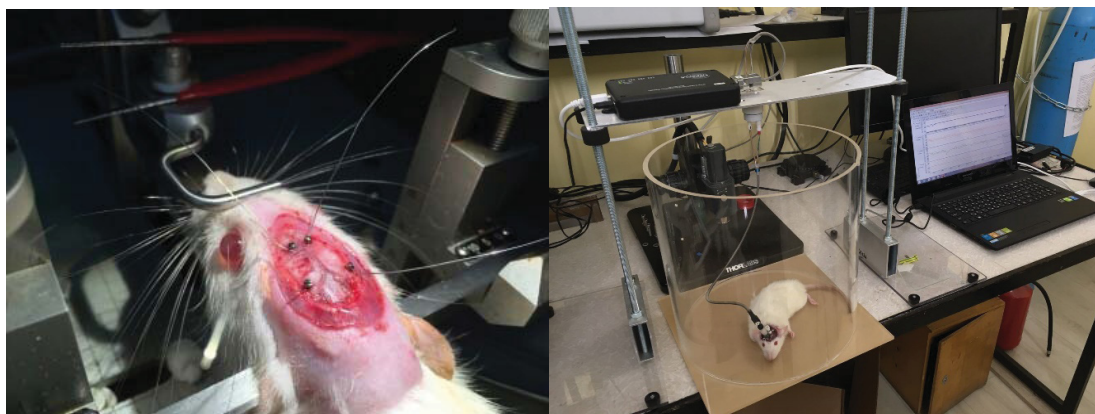


Рис. 2. Вживление электродов и регистрация ЭЭГ у бодрствующей крысы  
Fig. 2. Electrodes' inserting and EEG registration of awake rat



до открытия ГЭБ в состоянии бодрствования; 2) ОКТ+ЭЭГ мониторинг до открытия ГЭБ во время медикаментозного сна; 3) ОКТ+ЭЭГ мониторинг после открытия ГЭБ во время медикаментозного сна; 4) ОКТ+ЭЭГ мониторинг после открытия ГЭБ в состоянии бодрствования.

Золотые наностержни применяли в качестве контрастных агентов, поскольку лимфатические сосуды прозрачные. Пигелированные золотые наностержни (диаметр –  $16 \pm 3$  нм, длина –  $92 \pm 17$  нм) вводили внутривенно в объеме 5 мкл со скоростью 0.1 мкл/мин, концентрация Au 500 мкг/мл). Мониторинг накопления золотых наностержней в глубоких лимфатических узлах проводили в течение 1 ч после введения. В исследованиях использовали коммерческий спектральный оптический когерентный томограф Thorlabs GANYMEDE (центральная длина волны 930 нм, ширина спектра 150 нм, продольное разрешение 4.4 мкм в водной среде, максимальная глубина зондирования 2,7 мм). Объектив LSM02 применяли для достижения пространственного оптического разрешения в 13 мкм. Частота следования А-сканов томографа была равна 30 кГц. 2048 А-сканов использовались для построения одного Б-скана для достижения необходимой плотности пространственной выборки. 150 Б-сканов были отсняты в одной и той же области объекта, затем данный набор Б-сканов подвергался цифровой стабилизации, в качестве референтных участков использовались пустоты в лимфатическом узле. После стабилизации каждое изображение исследовали на предмет артефактов, вызванных движениями объекта. Изображения с ненадлежащим качеством исключали из анализа. Данная проблема возникала в связи с тем, что глубокий лимфатический узел не может быть полностью изолированным от близлежащих органов и тканей, поэтому любое движение или сокращение мышц приводило к существенному снижению качества ОКТ-изображения.

Золотые наностержни тиолированным полиэтиленгликолем получали путем опосредованного роста «зерен» в бинарной смеси поверхностно-активных веществ, как описано в работе [19]. Спектры экстинкции измеряли на спектрофотометре Specord 250 (Analytik, Jena, Germany). Изображения получали методом просвечивающей электронной микроскопии на просвечивающем электронном микроскопе Libra-120 (Carl Zeiss, Jena, Германия) на базе ЦКП «СИМБИОЗ» ИБФРМ РАН (Саратов).

У крыс кортикальная ЭЭГ (Pinnacle Technology, Inc., 2 EEG, 1 EMG, 1 BIO, Тайвань, 2019) регистрировалась путем введения электродов

(диаметр наконечника 2–3 мкм) по координатам от брегмы (L 2.5 mm; D 2 mm) на глубину 150 мкм. ЭЭГ-активность одновременно регистрировалась и сравнивалась у бодрствующих, спящих и анестезированных крыс (см. рис. 2). Сигналы оценивались с помощью программного обеспечения (Sirenia, Тайвань, 2019) в 5-минутные периоды без артефактов. Эти периоды далее разбивали на диапазоны мощности Delta (0–4 Гц), Theta (4–7 Гц), Alpha (8–13 Гц) и Beta (13–20 Гц). Бодрствование определяли как десинхронизированную ЭЭГ с низкой амплитудой, в то время как состояния сна определяли как синхронизированную активность с высокой амплитудой, в которой преобладали низкочастотные волны (0–4 Гц).

**Статистическая обработка экспериментальных данных.** Во всех исследованиях результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM). Отличия от исходного уровня в той же группе были оценены с помощью теста Вилкоксона. Межгрупповые различия оценивались с использованием критерия Манна – Уитни и ANOVA-2 (последующий анализ с ранговым тестом Дункана). Уровни значимости были установлены на  $p < 0,05$ – $0,001$  для всех анализов.

## Результаты и их обсуждение

**Результаты спектрофлуориметрического анализа.** Первый этап исследований был посвящен изучению параметров воздействия звука, эффективных для повышения проницаемости ГЭБ у самцов крыс. Для достижения поставленной задачи применяли спектрофлуориметрическое определение концентрации EBAC в тканях мозга при воздействии звука и музыки разной продолжительности, интенсивности и частоты (табл. 1).

Предварительно для выявления эффективного времени экстравазации EBAC из церебральных сосудов в ткани мозга использовали *in vivo* флуоресцентную микроскопию у 10 крыс для звука и у 10 крыс для музыки. Результаты представлены на рис. 3. Как видно из рис. 3, экстравазация EBAC увеличивалась во времени, начиная проявляться с 1 мин введения с максимальным выходом EBAC в ткани мозга через 30 мин после его введения в кровь.

Результаты спектрофлуориметрического анализа показали, что через 1 ч после воздействия музыки / звука (100 дБ) концентрация EBAC в тканях мозга у всех крыс (100%) была увеличена в 17,3 раза (музыка),  $p < 0,001$ , и в 18,6 раза (звук),  $p < 0,001$ , по сравнению с контрольной группой (см. рис. 3). Аналогичные результаты были выявлены у крыс, подвергшихся воздействию музыки / звука (90 дБ): уровень EBAC был увеличен в 18,0 раз (музыка),  $p < 0,001$ , и 14,6 раза (звук),



Таблица 1 / Table 1

**Эффекты воздействия громкого звука и музыки на проницаемость ГЭБ к ЕВАС, мг/г ткани мозга**  
**Loud sound and music effects on BBB permeability for EBAC, mg/gof brain tissue**

Интенсивность, дБ / время воздей- ствия звука / му- зыки, ч / Intensity, dB / time of sound / music exposure, h	Содержание ЕВАС, мг/г ткани мозга / EBAC content, mg/gof brain tissue					
	0,15±0,01					
Контрольная группа (без звука) / Control group (without sound)	Музыка Длительность 2 ч / Music Duration 2 hours	Звук Длительность 2 ч / Sound Duration 2 hours	Музыка Длительность 1 ч / Music Duration 1 hour	Звук Длительность 1 ч Sound Duration 1 hour	Музыка Длительность 0,25 ч / Music Duration 0,25 hour	Звук Длительность 0,25 ч / Sound Duration 0,25 hour
<b>100 дБ / 100 dB</b>						
1 ч / 1 hour	<b>2,60±0,06 ***</b>	<b>2,80±0,08 ***</b>	0,12±0,03	0,15±0,02	0,17±0,01	0,16±0,07
4 ч / 4 hours	0,19±0,03	0,17±0,07	0,15±0,07	0,12±0,05	0,15±0,05	0,12±0,01
24 ч / 24 hours	0,16±0,03	0,14±0,02	0,11±0,09	0,14±0,01	0,17±0,02	0,15±0,01
<b>90 дБ / 90 dB</b>						
1 ч / 1 hour	<b>2,70±0,04 ***(n=11)</b>	<b>2,20±0,09 ***(n=9)</b>	0,16±0,03	0,16±0,03	0,16±0,08	0,11±0,02
	0,18±0,06 (n=4)#	0,15±0,04 (n=6)#				
4 ч / 4 hours	0,15±0,03	0,18±0,07	0,14±0,03	0,16±0,07	0,14±0,05	0,13±0,01
24 ч / 24 hours	0,19±0,07	0,16±0,09	0,17±0,02	0,14±0,08	0,18±0,01	0,11±0,06
<b>70 дБ / 70 dB</b>						
1 ч / 1 hour	0,17±0,08	0,16±0,06	0,11±0,04	0,11±0,02	0,14±0,09	0,15±0,03
4 ч / 4 hours	0,19±0,06	0,18±0,04	0,13±0,02	0,18±0,08	0,14±0,02	0,18±0,03
24 ч / 24 hours	0,19±0,09	0,15±0,08	0,18±0,02	0,15±0,06	0,11±0,01	0,13±0,02

Примечание. \*\*\* – по сравнению с контрольной группой,  $p < 0,001$ ;  $n = 15$  для всех групп с продолжительностью прослушивания музыки / звука 2 ч и  $n = 10$  для каждой группы с продолжительностью прослушивания музыки / звука 0,25–1 ч; # – число животных без открытого ГЭБ.

Note. \*\*\* – compared to the control group,  $p < 0.001$ ;  $n = 15$  for each group with music/sound exposure 2 hours, and  $n = 10$  for each group with music/sound exposure 0,25–1 hour; # – number of animals without BBB opening.

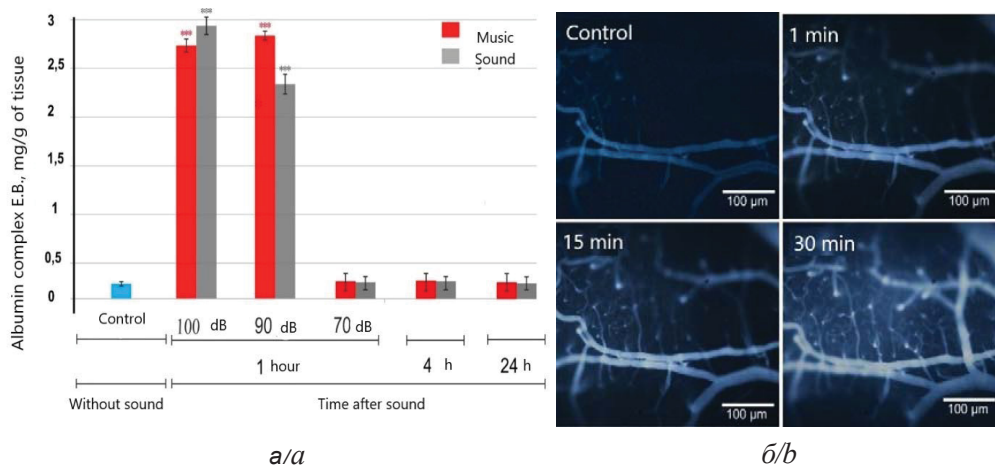


Рис. 3. Данные спектрофлуориметрического анализа (а) и флуоресцентной микроскопии (б) проницаемости ГЭБ для ЕВАС:  $n = 15$  в каждой группе для а и  $n = 10$  в каждой группе для б  
 Fig. 3. Results of spectrofluorimetric analysis (a) and fluorescent microscopy (b) BBB permeability for EBAC:  $n = 15$  in each group for a and  $n = 10$  in each group for b



$p < 0,001$ , по сравнению с контрольной группой у 73% крыс (11 из 15, музыка) и 60% крыс (9 из 15, звук). При воздействии музыки / звука (70 дБ) не наблюдалось изменений в проницаемости ГЭБ.

Наиболее важным результатом явился факт, что через 4 и 24 ч после прослушивания музыки / звука вне зависимости от интенсивности воздействия не отмечалось повышения проницаемости ГЭБ для ЕВАС, что говорит о восстановлении барьерной функции мозга.

Изучение влияния эффективного времени воздействия музыки / звука на ГЭБ показало, что только при 2-часовом прослушивании отмечалось статистически значимое повышение проницаемости ГЭБ, в то время как при длительности воздействия 15 мин и 1 ч не было выявлено таковых изменений в ГЭБ (см. табл. 1).

Таким образом, данная серия экспериментов демонстрирует, что воздействие громкой музыки и звука силой 100 дБ и продолжительностью 2 ч эффективно повышает проницаемость ГЭБ для ЕВАС у всех крыс вне зависимости от частоты звука. В связи с этим для сохранения стандартных условий эксперимента в дальнейших исследованиях использовали звук только с заданными параметрами (100 дБ, 370 Гц).

**Очищение мозга после звуко-индуцированного открытия ГЭБ.** Следующим этапом исследований явилось изучение активации лимфодренажной функции мозга после звукового открытия ГЭБ. Данные МРТ-анализа активации лимфодренажной функции на фоне открытого ГЭБ представлены в табл. 2 и на рис. 4.

Таблица 2 / Table 2

**Анализ очищения тканей мозга от контраста Omniscan® до и после открытия ГЭБ звуком у крыс на основе оценки уровня МРТ-сигнала (усл. ед.) от контраста в разных областях мозга**  
**Analysis of brain tissues clearing from Omniscan® contrast before and after sound induced opening of BBB on rats based on assessment of MRI signal rate (std. unit) from contrast in different brain regions**

Воздействие / Exposure	Кора больших полушарий / Cerebral cortex		Левый боковой желудочек / Left lateral ventricle		Четвертый желудочек / Forth ventricle		Зрительный нерв / Ophthalmic nerve	
	10	120	10	120	10	120	10	120
До открытия ГЭБ, $n = 5$ / Before BBB opening, $n = 5$	3,55±0,07	2,85±0,02 *	6,60±0,09	4,33±0,06 ***	6,78±0,07	3,65±0,02 ***	3,03±0,01	2,29±0,05 *
После открытия ГЭБ, $n = 5$ / After BBB opening, $n = 5$	1,92±0,05 ###	2,80±0,04 ***	4,83±0,08 ##	3,62±0,01 * ##	4,83±0,03 ##	3,62±0,01 *	1,89±0,06 ###	1,95±0,05 #

Примечание. \*\*\* – по сравнению с начальной точкой (10 мин сканирования),  $p \leq 0,001$ ; \* – по сравнению с начальной точкой (10 мин сканирования),  $p \leq 0,05$ ; ### – по сравнению с контролем (до открытия ГЭБ),  $p \leq 0,001$ ; ## – по сравнению с контролем (до открытия ГЭБ),  $p \leq 0,01$ ; # – по сравнению с контролем (до открытия ГЭБ),  $p \leq 0,05$ .

Note. \*\*\* – Compared to start point (10 min of scanning),  $p \leq 0.001$ ; \* – compared to start point (10 min of scanning),  $p \leq 0.05$ ; ### – compared to the control (before BBB opening),  $p \leq 0.001$ ; ## – compared to the control (before BBB opening),  $p \leq 0.01$ ; # – compared to the control (before BBB opening),  $p \leq 0.05$ .

Результаты выявили, что введение контраста в кору больших полушарий крысы сопровождается его постепенным выведением из тканей мозга, что оценивалось через 10 и 120 мин МРТ-сканирования. Действительно, к 120 мин наблюдения МРТ-сигнал уменьшался на 20% ( $p < 0,05$ ) в коре больших полушарий, на 35% ( $p < 0,001$ ) и на 47% ( $p < 0,001$ ) в левом боковом и четвертом желудочках, на 25% ( $p < 0,05$ ) в районе выхода зрительного нерва. На фоне открытого ГЭБ процесс очищения тканей мозга от контраста был

существенно усилен по сравнению с нормой. Так, МРТ-сигнал от контраста уже на 10 мин сканирования в группе с открытым ГЭБ был меньше в 1,8 раза ( $p < 0,001$ ) в коре больших полушарий, в 1,4 раза ( $p < 0,01$ ) в левом боковом и четвертом желудочках, в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ) в районе выхода зрительного нерва (см. рис. 4). При этом в группе отмечался высокий сигнал от контраста в коже головы, что дополнительно свидетельствует о более быстром его выведении из тканей мозга на фоне открытого ГЭБ. К 120 мин наблюдения

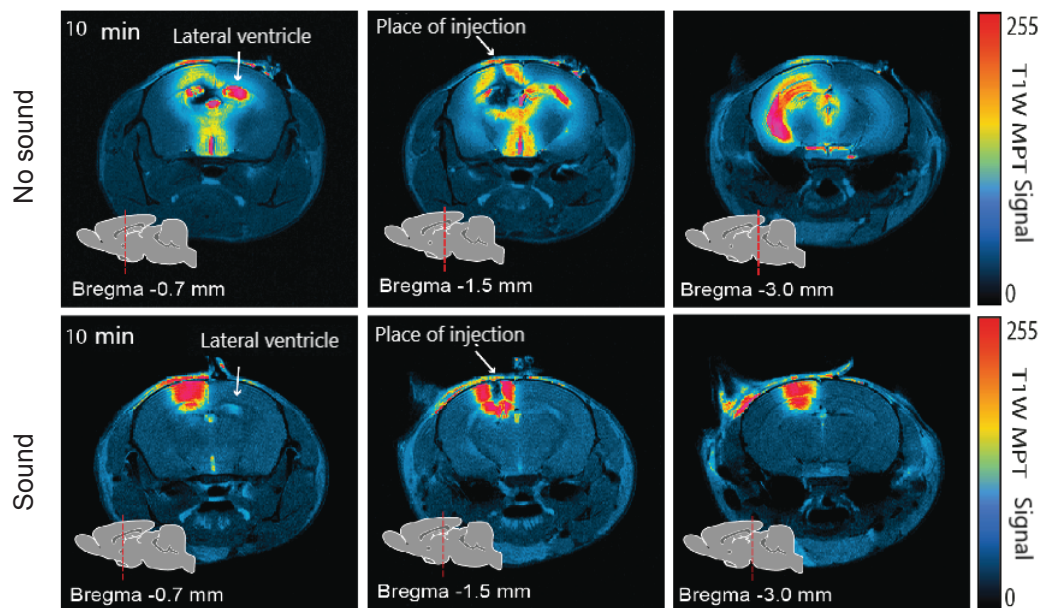


Рис. 4. МРТ-анализ очищения тканей мозга от контраста, введенного в кору больших полушарий крысы до и после открытия ГЭБ звуком (100 дБ, 370 Гц)

Fig. 4. MRI analysis of brain tissues clearance from the contrast injected in the cerebral cortex of a rat before and after sound induced opening of BBB (100 dB, 370 Hz)

данные МРТ-сканирования приближались к нормальным показателям, что свидетельствует об обратимости звуко-индуцированных изменений со стороны ГЭБ и связанных с этим усилением лимфодренажной и очистительной функций мозга. Таким образом, МРТ-визуализация очищения тканей мозга от гадолиния свидетельствует о том, что звуковое открытие ГЭБ сопровождается активацией очистительной и дренажной функций церебральной лимфатической системы. Данные факты явились основанием применить модель обратимого открытия ГЭБ с помощью слышимого звука для последующего детального изучения отражения активации дренажной функции церебральной лимфатической системы на электрической активности мозга и ЭЭГ-сигналах. Задача поставлена с целью выявления специальных ЭЭГ-паттернов, ассоциированных с активацией лимфотока во время сна и лимфатического очищения от токсинов и макромолекул тканей мозга.

Результаты ОКТ-мониторинга накопления золотых наностержней в глубоких шейных лимфатических узлах, введенных внутривенно в момент открытия ГЭБ, выявили, что повышение проницаемости ГЭБ является стимулирующим фактором для активации лимфодренажной и очистительной функций мозга, что выразалось в высокой скорости накопления контраста в зоне исследования (рис. 5).

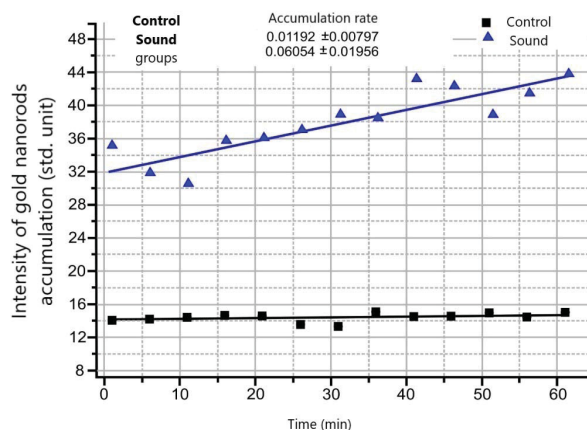


Рис. 5. Данные ОКТ-мониторинга в реальном режиме времени динамики накопления золотых наностержней в глубоком шейном лимфатическом узле крысы до и после звукового открытия ГЭБ

Fig. 5. Real time OCT monitoring of gold nanorods accumulation in the rat's deep cervical lymph node before and after sound induced opening of BBB

Поскольку глубокие шейные лимфатические узлы являются первой анатомической станцией для выхода спинно-мозговой жидкости из мозга, накопление контраста в этой области после его прохождения через открытый ГЭБ свидетельствует о лимфатическом пути его выведения из тканей мозга [8, 20, 21]. На рис. 6 показана схема лимфатического выведения контраста после его прохождения ГЭБ.





ЭЭГ-мониторинг электрической активности мозга у крыс до и после открытия ГЭБ выявил, что активация лимфодренажной и очистительной функций мозга во время повышения проницаемо-

сти ГЭБ характеризуется существенным преобладанием процента появления медленных волн сна (0,5–4 Гц), что согласуется с данными Xie et al., 2013 [22] (рис. 7).

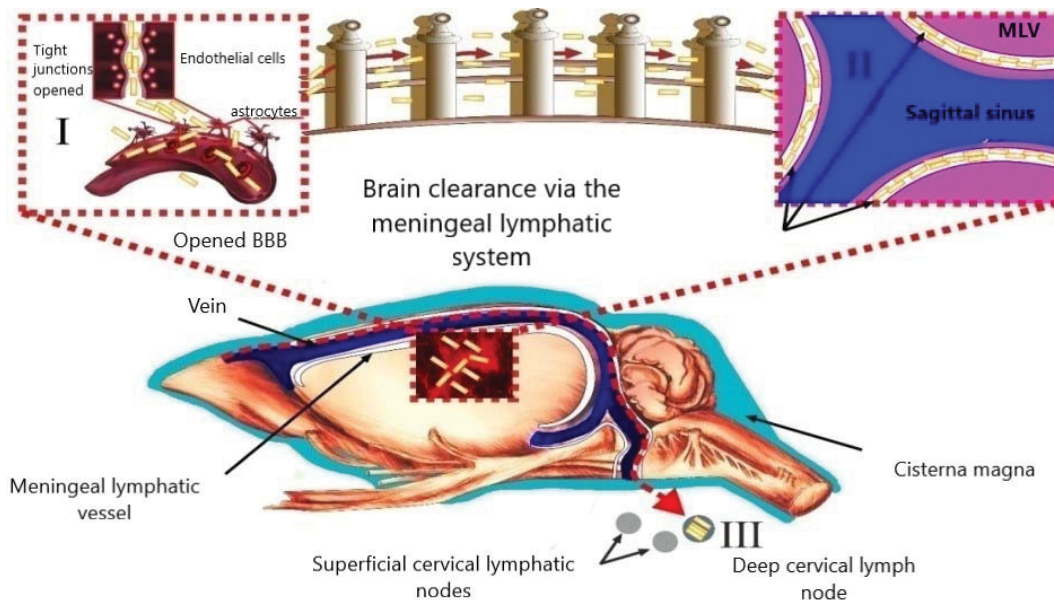


Рис. 6. Схема лимфатического очищения тканей мозга от золотых наностержней после их прохождения через открытый ГЭБ и последующего накопления в глубоких шейных лимфатических узлах. Открытие ГЭБ (I) сопровождается очищением тканей мозга от молекул, пересекающих ГЭБ, по менингеальным лимфатическим сосудам (II) с их последующим накоплением в глубоких шейных лимфатических узлах (III)

Fig. 6. Schematic lymphatic clearance of brain tissues from gold nanorods after their crossing opened BBB and following accumulation in the deep cervical lymph nodes. BBB opening (I) is accompanied with brain tissues clearance from molecules crossing opened BBB via the meningeal lymphatic vessels (II) with their following accumulation in the deep cervical lymph nodes (III)

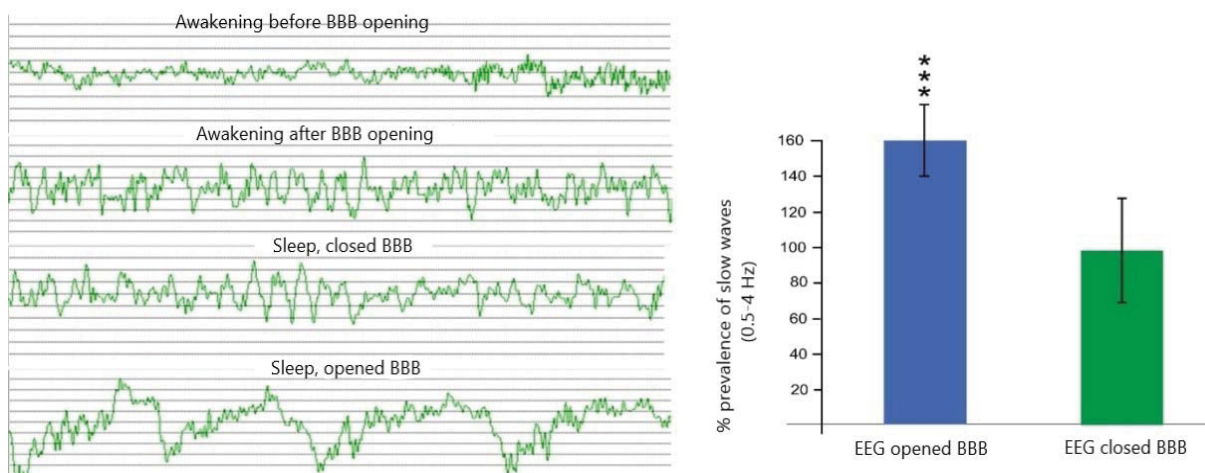


Рис. 7. ЭЭГ-анализ у крыс до и после звукового открытия ГЭБ, ассоциированного с повышением лимфодренажной и очистительной функций во время медикаментозного сна и бодрствования: \*\*\* – по сравнению с ЭЭГ (закрытый ГЭБ),  $p \leq 0,001$

Fig. 7. EEG analysis of rats before and after sound induced opening of BBB, associated with augmentation of lymphatic drainage and clearing function during medication sleep and awakening: \*\*\* – compared to EEG (closed BBB),  $p \leq 0.001$



## Заключение

Пионерские результаты, представленные в данном исследовании, свидетельствуют об активации менингеальной лимфатической системы после неинвазивного звукового открытия ГЭБ по результатам МРТ- и ОКТ-мониторинга в реальном режиме времени очищения тканей мозга от контрастных агентов. Сон является естественным фактором очищения тканей мозга от токсинов и метаболитов. В данном исследовании показаны общие характеристики динамики изменения ЭЭГ во время открытия ГЭБ и медикаментозного сна. Полученные результаты являются важной информативной платформой для развития неинвазивных прорывных технологий стимуляции лимфодренажной функции мозга во время сна, что согласуется с данными других исследователей, установивших активацию диффузии макромолекул и движения спинно-мозговой жидкости в мозге во время глубокого сна [22, 23].

## Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-015-00308, 18-75-10033 и 18-15-00172) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 075-15-2019-1885).

## Список литературы

1. *Gildner Th., Salinas-Rodríguez A., Manrique-Espinoza B., Moreno-Tamayo K., Kowal P.* Does poor sleep impair cognition during aging? Longitudinal associations between changes in sleep duration and cognitive performance among older Mexican adults // *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2019. Vol. 83. P. 161–168. DOI:10.1016/j.archger.2019.04.014
2. *Lin J., Li F. D., Chen X. G., He F., Zhai Y. J., Pan X. Q., Wang X. Y., Zhang T., Yu M.* Association of postlunch napping duration and night-time sleep duration with cognitive impairment in Chinese elderly : a cross-sectional study // *BMJ Open.* 2018. Vol. 12. P. e023188. DOI: 10.1136/bmjopen-2018-023188
3. *Rechtschaffen A., Bergmann B. M.* Sleep deprivation in the rat by the disk-over-water method // *Behav. Brain Res.* 1995. Vol. 69. P. 55–63. DOI: 10.1016/0166-4328(95)00020-T
4. *Da Mesquita S., Louveau A., Vaccari A., Smirnov I., Cornelison R. C., Kingsmore K. M., Contarino C., Onengut-Gumuscu S., Farber E., Raper D., Viar K. E., Powell R. D., Baker W., Dabhi N., Bai R., Cao R., Hu S., Rich S. S., Munson J. M., Lopes M. B., Overall C. C., Acton S. T., Kipnis J.* Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer's disease // *Nature.* 2018. Vol. 560, № 7717. P. 185. DOI: 10.1038/s41586-018-0689-7
5. *Zinchenko E., Navolokin N., Shirokov A., Khlebtsov B., Dubrovsky A., Saranceva E., Abdurashitov A., Khorovodov A., Terskov A., Mamedova A., Klimova M., Agranovich I., Martinov D., Tuchin V., Semyachkina-Glushkovskaya O., Kurts J.* Pilot study of transcranial photobiomodulation of lymphatic clearance of beta-amyloid from the mouse brain: breakthrough strategies for non-pharmacologic therapy of Alzheimer's disease // *Biomed. Opt. Express.* 2019. Vol. 10. P. 4003–4017. DOI: 10.1364/BOE.10.004003
6. *Semyachkina-Glushkovskaya O., Chehonin V., Borisova E., Fedosov I., Namykin A., Abdurashitov A., Shirokov A., Khlebtsov B., Lyubun Y., Navolokin N., Ulanova M., Shushunova N., Khorovodov A., Agranovich I., Bodrova A., Sagatova M., Shareef A. E., Saranceva E., Iskra T., Dvoryatkina M., Zhinchenko E., Sindeeva O., Tuchin V., Kurths J.* Photodynamic opening of the blood-brain barrier and pathways of brain clearing // *J. Biophotonics.* 2018. Vol. 11. P. e201700287. DOI: 10.1002/jbio.201700287
7. *Semyachkina-Glushkovskaya O., Abdurashitov A., Dubrovsky A., Bragin D., Bragina O., Shushunova N., Maslyakova G., Navolokin N., Bucharskaya A., Tuchin V., Kurths J., Shirokov A.* Application of optical coherence tomography for in vivo monitoring of the meningeal lymphatic vessels during opening of blood-brain barrier: mechanisms of brain clearing // *J. Biomed. Opt.* 2017. Vol. 22. P. 121719. DOI: 10.1117/1.JBO.22.12.121719
8. *Semyachkina-Glushkovskaya O., Postnov D., Kurths J.* Blood-brain barrier, lymphatic clearance, and recovery: Ariadne's thread in labyrinths of hypotheses // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 12. P. 3818. DOI: 10.3390/ijms19123818
9. *Achariyar T., Li B., Peng W., Verghese P. B., Shi Y., McConnell E., Benraiss A., Kasper T., Song W., Takano T., Holtzman D.M., Nedergaard M., Deane R.* Glymphatic distribution of CSF-derived apoE into brain is isoform specific and suppressed during sleep deprivation // *Mol. Neurodegener.* 2016. Vol. 11, № 1. P. 74. DOI: 10.1186/s13024-016-0138-8
10. *Robinson R.* When it comes to glymphatic clearance, not all anesthetics, or sleep stages, are equal // *Neurology today.* 2019. Vol. 19, № 7. P. 1–15. DOI: 10.1097/01.NT.0000557712.74473.83
11. *Hablitz L. M., Vinitzky H. S., Sun Q., Stæger F. F., Sigurdsson B., Mortensen K. N., Lilius T. O., Nedergaard M.* Increased glymphatic influx is correlated with high EEG delta power and low heart rate in mice under anesthesia // *Sci. Adv.* 2019. Vol. 5, № 2. P. eaav5447. DOI: 10.1126/sciadv.aav5447
12. *Benveniste H.* Glymphatic System Function in Relation to Anesthesia and Sleep States // *Anesth. Analg.* 2019. Vol. 128, № 4. P. 747–758. DOI: 10.1213/ANE.0000000000004069
13. *Semyachkina-Glushkovskaya O., Chekhonin V., Bragin D., Bragina O., Vodovozova E., Alekseeva A., Salmin V., Morgun A., Malinovskaya N., Osipova E., Boytsova E., Tohidpour A., Shirokov A., Navolokin N., Yang Y., Zhang C., Feng W., Abdurashitov A., Ulanova M., Shushunova N., Khorovodov A., Terskov A., Esmat Shareef A., Pavlov A., Luo Q., Zhu D., Tuchin V., Kurths J.* Loud music and the specific sound stress open the blood-brain barrier: new fundamental, biomedical, and



- social aspects // bioRxiv. 2018. URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/509042v1.article-info>. DOI: 10.1101/509042 (дата обращения: 01.03.2020).
14. Qi Y., Yu T., Xu J., Wan P., Ma Y., Zhu J., Li Y., Gong H., Luo Q., Zhu D. FDISCO: Advanced solvent-based clearing method for imaging whole organs // *Sci. Adv.* 2019. Vol. 5, № 1. P. eaau8355. DOI: 10.1126 / sciadv.aau8355
  15. Wang H. L., Lai T. W. Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples // *Sci. Rep.* 2014. Vol. 4. P. 6588. DOI: 10.1038 / srep06588
  16. Bragina D., Kameneva M., Bragina O., Thomson S., Statom G., Lara D., Yang Y., Nemoto E. Rheological effects of drag-reducing polymers improve cerebral blood flow and oxygenation after traumatic brain injury in rats // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2017. Vol. 37, № 3. P. 762–775. DOI: 10.1007 / 978-3-319-91287-5\_7
  17. Patlak C. S., Blasberg R. G., Fenstermacher J. D. Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1983. Vol. 3, № 1. P. 1–7. DOI: 10.1038 / jcbfm.1983.1
  18. Ewing J., Knight R. A., Nagaraja T. N., Yee J. S., Nagesh V., Whitton P. A., Li L., Fenstermacher J. D. Patlak plots of Gd-DTPA MRI data yield blood-brain transfer constants concordant with those of <sup>14</sup>C – sucrose in areas of blood-brain opening // *Magn. Reson. Med.* 2003. Vol. 50, № 2. P. 283–292. DOI: 10.1002 / mrm.10524
  19. Khlebtsov B., Khanadeev V., Sukhorukov G., Khlebtsov N. Overgrowth of gold nanorods by using a binary surfactant mixture // *Langmuir.* 2014. Vol. 30, № 6. P. 1696–1703. DOI: 10.1021 / la404399n
  20. Louveau A., Smirnov I., Keyes T. J., Eccles J. D., Rouhani S. J., Peske J. D., Derecki N. C., Castle D., Mandell J. W., Lee K. S., Harris T. H., Kipnis J. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels // *Nature.* 2015. Vol. 523, № 7560. P. 337. DOI: 10.1038 / nature14432
  21. Aspelund A., Anttila S., Proulx S. T., Karlsen T. V., Karaman S., Detmar M., Wiig H., Alitalo K. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules // *J. Exp. Med.* 2015. Vol. 212, № 7. P. 991–999. DOI: 10.1084/jem.20142290
  22. Xie L., Kang H., Xu Q., Chen M. J., Liao Y., Thiyagaraja M., O'Donnell J., Christensen D. J., Nicholson C., Iliff J. J. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain // *Science.* 2013. Vol. 342. P. 373–377. DOI: 10.1126/science.1241224
  23. Fultz N. E., Bonmassar G., Setsompop K., Stickgold R. A., Rosen B. R., Polimeni J. R., Lewis L. D. Coupled electrophysiological, hemodynamic, and cerebrospinal fluid oscillations in human sleep // *Science.* 2019. Vol. 366. P. 628–663. DOI: 10.1126 / science.aax5440

#### Образец для цитирования:

Зинченко Е. М., Климова М. М., Хороводов А. П., Агранович И. М., Шариф А. Е., Терсков А. В., Дубровский А. И., Широков А. А., Мамедова А. Т., Блохина И. А., Лежнев Н. Д., Ромащенко А. В., Тучин В. В., Семячкина-Глушковская О. В. Изучение лимфодренажной функции мозга после открытия гематоэнцефалического барьера и во время медикаментозного сна // *Изв. сер. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* 2020. Т. 20, вып. 3. С. 339–351. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-3-339-351>

#### The Study of Lymphatic Drainage Function of the Brain After Opening the Blood-Brain Barrier and During Drugged Sleep

**E. M. Zinchenko, M. M. Klimova, A. P. Khorovodov, I. M. Agranovich, A. E. Sharif, A. V. Terskov, A. I. Dubrovsky, A. A. Shirokov, A. T. Mamedova, I. A. Blokhina, N. D. Lezhnev, A. V. Romashchenko, V. V. Tuchin, O. V. Semyachkina-Glushkovskaya**

Ekaterina M. Zinchenko, <https://orcid.org/0000-0001-7926-1681>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, Odonata1108@yandex.ru

Mariya M. Klimova, <https://orcid.org/0000-0002-2606-8797>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, mari-1997@mail.ru

Alexander P. Khorovodov, <https://orcid.org/0000-0002-5318-5200>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, khorovodov2012@yandex.ru

Ilana M. Agranovich, <https://orcid.org/0000-0002-7903-3897>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, ilana.agranovich@yandex.ru

Ali E. Sharif, <https://orcid.org/0000-0001-6540-0310>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, esmtshareef@yahoo.co.uk

Andrey V. Terskov, <https://orcid.org/0000-0003-1111-9990>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, terskov.andrey@gmail.com

Alexander I. Dubrovsky, <https://orcid.org/0000-0002-5897-9229>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, paskalkamal@mail.ru

Alexander A. Shirokov, <https://orcid.org/0000-0003-4321-735X>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms Russian Academy of Sciences, 13 Entusiastov St., Saratov 410049, Russia, shirokov\_a@ibppm.ru

Aysel T. Mamedova, <https://orcid.org/0000-0002-0229-0801>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, mamedovaysel95@gmail.com

Inna A. Blohina, <https://orcid.org/0000-0003-1517-0857>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, inna-474@yandex.ru



Nikita D. Lezhnev, <https://orcid.org/0000-0002-6079-1401>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, [nik.lezhnev.2018@mail.ru](mailto:nik.lezhnev.2018@mail.ru)

Alexander V. Romashchenko, <https://orcid.org/0000-0002-0674-0574>, ICG SB RAS Center for Genetic Resources of Laboratory Animals, 2 Academician Koptuyug Ave., Sovetsky District, Akademgorodok Microdistrict, Novosibirsk 630090, Russia, [yuter2006@yandex.ru](mailto:yuter2006@yandex.ru)

Valery V. Tuchin, <https://orcid.org/0000-0001-7479-2694>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, [tuchinvv@mail.ru](mailto:tuchinvv@mail.ru)

Oxana V. Semyachkina-Glushkovskaya, <https://orcid.org/0000-0001-6753-7513>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, [glushkovskaya@mail.ru](mailto:glushkovskaya@mail.ru)

In studies on male adult rats, the activation of the functions of the lymphatic system of the brain (LSM) was studied during drugged sleep and after the opening of the blood-brain barrier (BBB) by sound. The cleaning and drainage functions of LSM were studied by removing contrast agents from the brain in real time using magnetic resonance imaging (MRI) and optical coherence tomography (OCT). It was found that the opening of the BBB is accompanied by an immediate activation of the lymphatic drainage function of the brain, which is manifested in a faster elimination of gadolinium (MRI data) and gold nanorods (OCT results) from its tissues. For the first time, it was revealed that drug sleep and the opening of BBB have similar dynamics of changes in patterns reflected in the electrical activity of the brain. The results are pioneering and open up new physiological patterns in the study of the functions of LSM, which contribute to the appearance of innovative strategies in the development of breakthrough technologies in therapeutic modulations of the lymphatic drainage processes of the brain.

**Keywords:** cerebral lymphatic system, blood-brain barrier, magnetic resonance imaging, electroencephalography, optical coherence tomography, rats.

Received: 01.05.2020 / Accepted: 14.05.2020 /

Published: 31.08.2020

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0)

**Acknowledgements:** This work was supported by the Russian Science Foundation (projects No. 20-015-00308, 18-75-10033, 18-15-00172) and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. 075-15-2019-1885).

## References

1. Gildner Th., Salinas-Rodríguez A., Manrique-Espinoza B., Moreno-Tamayo K., Kowal P. Does poor sleep impair cognition during aging? Longitudinal associations between changes in sleep duration and cognitive performance among older Mexican adults. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 2019, vol. 83, pp. 161–168. DOI: 10.1016/j.archger.2019.04.014
2. Lin J., Li F. D., Chen X. G., He F., Zhai Y. J., Pan X. Q., Wang X. Y., Zhang T., Yu M. Association of postlunch napping duration and night-time sleep duration with cognitive impairment in Chinese elderly: a cross-sectional study. *BMJ Open*, 2018, vol. 12, pp. e023188. DOI: 10.1136/bmjopen-2018-023188
3. Rechtschaffen A., Bergmann B. M. Sleep deprivation in the rat by the disk-over-water method. *Behav. Brain Res.*, 1995, vol. 69, pp. 55–63. DOI: 10.1016/0166-4328(95)00020-T
4. Da Mesquita S., Louveau A., Vaccari A., Smirnov I., Cornelison R. C., Kingsmore K. M., Contarino C., Onengut-Gumuscu S., Farber E., Raper D., Viar K. E., Powell R. D., Baker W., Dabhi N., Bai R., Cao R., Hu S., Rich S. S., Munson J. M., Lopes M. B., Overall C. C., Acton S. T., Kipnis J. Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*, 2018, vol. 560, no. 7717, pp. 185. DOI: 10.1038/s41586-018-0689-7
5. Zinchenko E., Navolokin N., Shirokov A., Khlebtsov B., Dubrovsky A., Saranceva E., Abdurashitov A., Khorovodov A., Terskov A., Mamedova A., Klimova M., Agranovich I., Martinov D., Tuchin V., Semyachkina-Glushkovskaya O., Kurths J. Pilot study of transcranial photobiomodulation of lymphatic clearance of beta-amyloid from the mouse brain: breakthrough strategies for non-pharmacologic therapy of Alzheimer's disease. *Biomed. Opt. express*, 2019, vol. 10, pp. 4003–4017. DOI: 10.1364/BOE.10.004003
6. Semyachkina-Glushkovskaya O., Chehonin V., Borisova E., Fedosov I., Namykin A., Abdurashitov A., Shirokov A., Khlebtsov B., Lyubun Y., Navolokin N., Ulanova M., Shushunova N., Khorovodov A., Agranovich I., Bodrova A., Sagatova M., Shareef A. E., Saranceva E., Iskra T., Dvoryatkina M., Zhinchenko E., Sindeeva O., Tuchin V., Kurths J. Photodynamic opening of the blood-brain barrier and pathways of brain clearing. *J. Biophotonics*, 2018, vol. 11, pp. e201700287. DOI: 10.1002/jbio.201700287
7. Semyachkina-Glushkovskaya O., Abdurashitov A., Dubrovsky A., Bragin D., Bragina O., Shushunova N., Maslyakova G., Navolokin N., Bucharskaya A., Tuchin V., Kurths J., Shirokov A. Application of optical coherence tomography for in vivo monitoring of the meningeal lymphatic vessels during opening of blood-brain barrier: mechanisms of brain clearing. *J. Biomed. Opt.*, 2017, vol. 22, pp. 121719. DOI: 10.1117/1.JBO.22.12.121719
8. Semyachkina-Glushkovskaya O., Postnov D., Kurths J. Blood-brain barrier, lymphatic clearance, and recovery: Ariadne's thread in labyrinths of hypotheses. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, vol. 19, no. 12, pp. 3818. DOI: 10.3390/ijms19123818
9. Achariyar T., Li B., Peng W., Verghese P. B., Shi Y., McConnell E., Benraiss A., Kasper T., Song W., Takano T., Holtzman D. M., Nedergaard M., Deane R. Glymphatic distribution of CSF-derived apoE into brain is isoform specific and suppressed during sleep deprivation. *Mol. Neurodegener.*, 2016, vol. 11, no. 1, pp. 74. DOI: 10.1186/s13024-016-0138-8
10. Robinson R. When it comes to glymphatic clearance, not all anesthetics, or sleep stages, are equal. *Neurology today*, 2019, vol. 19, no. 7, pp. 1–15. DOI: 10.1097/01.NT.000057712.74473.83



11. Hablitz L. M., Vinitzky H. S., Sun Q., Stæger F. F., Sigurdsson B., Mortensen K. N., Lilius T.O., Nedergaard M. Increased glymphatic influx is correlated with high EEG delta power and low heart rate in mice under anesthesia. *Sci. Adv.*, 2019, vol. 5, no. 2, pp. eaav5447. DOI: 10.1126/sciadv.aav5447
12. Benveniste H. Glymphatic System Function in Relation to Anesthesia and Sleep States. *Anesth. Analg.*, 2019, vol. 128, no. 4, pp. 747–758. DOI: 10.1213/ANE.0000000000004069
13. Semyachkina-Glushkovskaya O., Chekhonin V., Bragin D., Bragina O., Vodovozova E., Alekseeva A., Salmin V., Morgun A., Malinovskaya N., Osipova E., Boytsova E., Tohidpour A., Shirokov A., Navolokin N., Yang Y., Zhang C., Feng W., Abdurashitov A., Ulanova M., Shushunova N., Khorovodov A., Terskov A., Esmat Shareef A., Pavlov A., Luo Q., Zhu D., Tuchin V., Kurths J. Loud music and the specific sound stress open the blood-brain barrier: new fundamental, biomedical, and social aspects. *bioRxiv*, 2018. Available at: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/509042v1.article-info> DOI: 10.1101/509042 (accessed 1 March 2020).
14. Qi Y., Yu T., Xu J., Wan P., Ma Y., Zhu J., Li Y., Gong H., Luo Q., Zhu D. FDISCO: Advanced solvent-based clearing method for imaging whole organs. *Sci. Adv.*, 2019, vol. 5, no.1, pp. eaau8355. DOI: 10.1126/sciadv.aau8355
15. Wang H. L., Lai T. W. Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples. *Sci. Rep.*, 2014, vol. 4, pp. 6588. DOI: 10.1038/srep06588
16. Bragin D., Kameneva M., Bragina O., Thomson S., Statom G., Lara D., Yang Y., Nemoto E. Rheological effects of drag-reducing polymers improve cerebral blood flow and oxygenation after traumatic brain injury in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2017, vol. 37, no. 3, pp. 762–775. DOI: 10.1007/978-3-319-91287-5\_7
17. Patlak C. S., Blasberg R. G., Fenstermacher J. D. Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1983, vol. 3, no. 1, pp. 1–7. DOI:10.1038/jcbfm.1983.1
18. Ewing J., Knight R. A., Nagaraja T. N., Yee J. S., Nagesh V., Whitton P. A., Li L., Fenstermacher J. D. Patlak plots of Gd-DTPA MRI data yield blood-brain transfer constants concordant with those of 14C-sucrose in areas of blood-brain opening. *Magn. Reson. Med.*, 2003, vol. 50, no. 2, pp. 283–292. DOI: 10.1002/mrm.10524
19. Khlebtsov B., Khanadeev V., Sukhorukov G., Khlebtsov N. Overgrowth of gold nanorods by using a binary surfactant mixture. *Langmuir*, 2014, vol. 30, no. 6, pp. 1696–1703. DOI: 10.1021/la404399n
20. Louveau A., Smirnov I., Keyes T. J., Eccles J. D., Rouhani S. J., Peske J.D., Derecki N. C., Castle D., Mandell J. W., Lee K. S., Harris T. H., Kipnis J. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, 2015, vol. 523, no. 7560, pp. 337. DOI: 10.1038/nature14432
21. Aspelund A., Antila S., Proulx S. T., Karlsen T. V., Karaman S., Detmar M., Wiig H., Alitalo K. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J. Exp. Med.*, 2015, vol. 212, no. 7, pp. 991–999. DOI: 10.1084/jem.20142290
22. Xie L., Kang H., Xu Q., Chen M. J., Liao Y., Thiyagaraja M., O'Donnell J., Christensen D.J., Nicholson C., Iliff J. J. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science*, 2013, vol. 342, pp. 373–377. DOI: 10.1126/science.1241224
23. Fultz N. E., Bonmassar G., Setsompop K., Stickgold R. A., Rosen B. R., Polimeni J. R., Lewis L. D. Coupled electrophysiological, hemodynamic, and cerebrospinal fluid oscillations in human sleep. *Science*, 2019, vol. 366, pp. 628–663. DOI: 10.1126/science.aax5440

**Cite this article as:**

Zinchenko E. M., Klimova M. M., Khorovodov A. P., Agranovich I. M., Sharif A. E., Terskov A. V., Dubrovsky A. I., Shirokov A. A., Mamedova A. T., Blokhina I. A., Lezhnev N. D., Romashchenko A. V., Tuchin V. V., Semyachkina-Glushkovskaya O. V. The Study of Lymphatic Drainage Function of the Brain After Opening the Blood-Brain Barrier and During Drugged Sleep. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2020, vol. 20, iss. 3, pp. 339–351 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-3-339-351>