



Клеточные и молекулярные механизмы транскраниальной магнитной стимуляции: экспериментальные данные в оценке изменений нервной ткани

А.П. Красильникова¹, А.В. Егорова^{2,3}, Д.Н. Воронков², А.Г. Пойдашева², В.В. Глинкина³, В.С. Сухоруков^{2,3}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²Научный центр неврологии, Москва, Россия;

³Российский научно-исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Аннотация

Транскраниальная магнитная стимуляция (ТМС) – неинвазивный метод направленного воздействия на электрическую активность нейронов головного мозга магнитным полем. Несмотря на доказанную эффективность в лечении ряда неврологических и психических заболеваний, изменения в нервной ткани на клеточном и молекулярном уровнях при разной длительности и интенсивности стимуляции мало изучены методами клеточной нейробиологии. Целью работы явился анализ и обобщение новых экспериментальных данных о фундаментальных механизмах действия ТМС и потенциальных возможностях данного метода в модуляции структурно-функциональных изменений в нервной ткани. В работе систематизированы современные сведения о влиянии разных протоколов ТМС на механизмы синаптической пластичности, нейрогенез и дифференцировку нейронов. Отдельные разделы посвящены нейропротективным эффектам данного метода, а также ответной реакции глияльного микроокружения. Исследования механизмов ТМС будут способствовать разработке более результативных и надёжных протоколов лечения.

Ключевые слова: транскраниальная магнитная стимуляция; нейропластичность; глия; нейрогенез; нейропротекция; синаптогенез

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

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

Адрес для корреспонденции: Россия, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80. Научный центр неврологии.
E-mail: av_egorova@bk.ru. Егорова А.В.

Для цитирования: Красильникова А.П., Егорова А.В., Воронков Д.Н., Пойдашева А.Г., Глинкина В.В., Сухоруков В.С. Клеточные и молекулярные механизмы транскраниальной магнитной стимуляции: экспериментальные данные в оценке изменений нервной ткани. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2024;18(4):96–109.

DOI: <https://doi.org/10.17816/ACEN.1152>

Поступила 20.06.2024 / Принята в печать 09.09.2024 / Опубликовано 25.12.2024

Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Transcranial Magnetic Stimulation: Experimental Data for Evaluating Changes in Nervous Tissue

Anna P. Krasilnikova¹, Anna V. Egorova^{2,3}, Dmitry N. Voronkov²,
Alexandra G. Poydasheva², Valeria V. Glinkina³, Vladimir S. Sukhorukov^{2,3}

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

²Research Center of Neurology, Moscow, Russia;

³Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Abstract

Transcranial magnetic stimulation (TMS) is a non-invasive method for targeted modulation of the electrical activity of brain neurons with a magnetic field. Although TMS efficacy was demonstrated in the treatment of several neurological and mental disorders, changes in nervous tissue at the cellular and molecular levels with different duration and intensity of stimulation have been relatively understudied by cellular neurobiology methods. Aim. The aim of this review was to evaluate and summarize new experimental data on the fundamental mechanisms underlying the action of TMS and its potential in modulating structural and functional changes in nervous tissue. This article summarizes recent data on the effects of different TMS protocols on the mechanisms underlying synaptic plasticity, neurogenesis, and neuronal differentiation. Separate sections summarize the neuroprotective effects of this method and glial microenvironment response. Studies to investigate the mechanisms of TMS will contribute to the development of more effective and reliable treatment protocols.

Keywords: transcranial magnetic stimulation; neuroplasticity; glia; neurogenesis; neuroprotection; synaptogenesis

Source of funding. The study was carried out within the framework of state budget funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For correspondence: 80 Volokolamskoye shosse, Moscow, 125367, Russia. Research Center of Neurology.

E-mail: av_egorova@bk.ru. Egorova A.V.

For citation: Krasilnikova A.P., Egorova A.V., Voronkov D.N., Poydasheva A.G., Glinkina V.V., Sukhorukov V.S. Cellular and molecular mechanisms underlying transcranial magnetic stimulation: experimental data for evaluating changes in nervous tissue. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2024;18(4):96–109.

DOI: <https://doi.org/10.17816/ACEN.1152>

Received 20.06.2024 / Accepted 09.09.2024 / Published 25.12.2024

Введение

Транскраниальная магнитная стимуляция (ТМС) – это метод направленного неинвазивного воздействия на электрическую активность нейронов. Суть его заключается в стимуляции нервных клеток короткими магнитными импульсами, вызывающими деполяризацию пре- и постсинаптической мембраны. В головном мозге магнитное поле индуцирует электрический ток, влияющий на электрофизиологические параметры нейронов стимулируемой области [1–3].

В настоящее время ТМС широко применяется в клинической практике с целью диагностики, лечения и реабилитации ряда неврологических и психических заболеваний. Согласно европейским рекомендациям [4], на сегодняшний день установлена эффективность данного метода в лечении клинической депрессии, резистентной к медикаментозной терапии [5–7], нейропатической боли [8–10] (уровень доказательности А), при реабилитации пациентов с дви-

гательным постинсультным дефицитом [11, 12] (уровень доказательности В). Статистически значимая положительная динамика прослеживалась в случае болезни Паркинсона [13, 14], спастичности при рассеянном склерозе [15], мигрени [16] и др.

В исследовательской практике ТМС используется для оценки возбудимости моторной коры, динамики когнитивных процессов, функционального картирования мозга [3].

Данный метод, как правило, хорошо переносится пациентами. Соблюдение рекомендаций по безопасности минимизирует появление таких серьезных неблагоприятных эффектов, как развитие эпилептических приступов (частота возникновения менее 1 на 60 000 сеансов) [17, 18]. Другие побочные эффекты, такие, например, как болевые ощущения в месте стимуляции, возникают чаще, но в большинстве случаев не влияют на переносимость процедуры [19].

Особая сложность изучения влияния ТМС на структуры головного мозга состоит в оценке направленности воздействия на немоторные зоны коры. В связи с этим затруднительно прогнозировать и интерпретировать результаты, полученные активацией совокупности нейронных сетей. Одновременное проведение электроэнцефалографии [20], функциональной магнитно-резонансной томографии, когнитивного тестирования и других методов [21] может решить проблемы детекции лишь частично.

Хотя клинические эффекты ТМС признаны, изменения в нервной ткани на клеточном и молекулярном уровнях при разной длительности и интенсивности стимуляции мало изучены методами клеточной нейробиологии. Проведение экспериментов на лабораторных животных осложняется несоответствием размеров катушки и стимулируемой области головного мозга. Направленное воздействие и сопоставление экспериментальных данных с клиническими результатами затруднено.

Фундаментальные исследования морфологии и функциональной активности нейронов и их клеточного окружения в ответ на воздействие магнитным полем с разными параметрами позволят существенно повысить эффективность данного метода.

Целью работы явился анализ и обобщение новых экспериментальных данных о фундаментальных механизмах действия ТМС и потенциальных возможностях данного метода в модуляции структурно-функциональных изменений в нервной ткани.

В настоящее исследование были включены экспериментальные работы преимущественно последних 5–7 лет, дающие оценку структурно-функциональным изменениям клеточных элементов нервной ткани под действием ТМС при помощи методов нейроморфологии и нейровизуализации. Поиск осуществлялся в базах данных PubMed и Google Scholar.

Общие аспекты ТМС

Подавляющее большинство исследований клеточных механизмов ТМС на лабораторных животных выполнено при стимуляции полушария или целого мозга крыс и мышей. Ввиду малых размеров грызунов фокальная стимуляция затруднительна, однако может быть достигнута либо применением миниатюрных катушек разной конструкции, в том числе с использованием ферромагнитного сердечника либо экранирующих материалов [22, 23]. В ранних работах было показано, что локальная стимуляция достижима у крыс при использовании применяемых в клинической практике 8-образных катушек. Разработка подобных катушек для крыс позволила генерировать односторонние двигательные вызванные потенциалы отдельной конечности, что указывает на возможность достаточно локального воздействия без существенного изменения конструкции катушки [22]. Другой подход в достижении локального воздействия состоит в снижении интенсивности магнитного поля [24], что, однако, встречает критику в связи с трудностями переноса получаемых в эксперименте результатов на человека.

Различия в размере мозга, интенсивности магнитной индукции и взаимодействии электрического поля с нервной тканью затрудняют трансляцию доклинических результатов, хотя компьютерное моделирование может облегчить подбор сходных условий стимуляции [25] и анализ электрических полей, возникающих в культурах клеток [26]. Кроме того, в ограничения исследований ТМС в эксперименте на животных входит в ряде случаев использование анестезии.

Вместе с тем очевидны и преимущества исследований эффектов ТМС на экспериментальных моделях: это контролируемые условия эксперимента, обеспечение однородности исследуемой выборки, использование генетических моделей заболеваний, применение всего арсенала современных методов нейровизуализации, включая *in vivo* микроскопию, а также возможность проведения нейроморфологических исследований для оценки off-line-эффекта (табл. 1).

Различают ТМС однократными стимулами, парными стимулами и ритмическую ТМС (рТМС). В этом случае генерируется серия импульсов с различными параметрами частоты и интенсивности. В случае рТМС условно выделяют низкочастотную стимуляцию (0,2–1,0 Гц), которая снижает нейрональную возбудимость, и высокочастотную стимуляцию (5 Гц или более), оказывающую возбуждающий эффект [2].

При низкочастотной рТМС чаще всего используется непрерывное нанесение одиночных импульсов, тогда как при высокочастотной рТМС обычно используются серии стимулов продолжительностью 2–10 с, разделённые паузами 20–50 с.

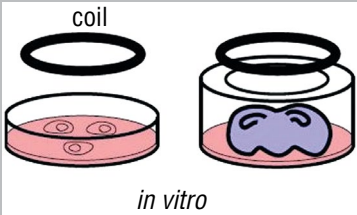
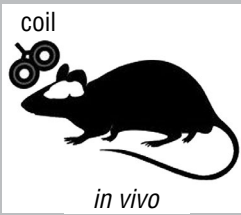

В дополнение к этим традиционным формам рТМС существуют некоторые другие подходы, один из которых реализуется в форме θ -паттерна – стимуляция интермиттирующими θ -вспышками (intermittent theta-burst stimulation, iTBS) или постоянными θ -вспышками (continuous theta-burst stimulation, cTBS) [3]. Было показано, что iTBS увеличивает, тогда как cTBS снижает возбудимость коры головного мозга в течение 1 ч после воздействия [27, 28].

Регистрируемые эффекты ТМС делятся на две группы: онлайн – в момент стимуляции и офлайн – после её окончания.

Наиболее частым онлайн-эффектом однократных стимулов ТМС на уровне нейронов является появление всплеска потенциалов действия. Переменное магнитное поле катушки стимулятора генерирует индуцированное электрическое поле в головном мозге с последующим возникновением электрического тока [29], при этом некоторые нейроны проявляют комбинированную активность. В этом случае после начального возбуждения наблюдается длительная фаза, сочетающая периоды торможения и возбуждения [30]. Этот феномен, вероятно, вызван запаздывающей активацией соседних тормозных интернейронов. Не все нейроны даже в центре стимуляции отвечают на ТМС. Эта неоднородность

Таблица 1. Возможности экспериментальных методов для оценки эффектов ТМС

Table 1. Summary of experimental methods to assess TMS effects

	 <i>in vitro</i>	 <i>in vivo</i>	 <i>in silico</i>	
Объект, оцениваемые эффекты, уровень организации Object, assessed effects, level of organization	Cultures of cells; online, offline effects; cell, intercellular interactions	Acute slices, online; cell, individual brain structures	Animal, online, offline; structures and systems	Mathematical model, online; structures and systems
Основные методы исследования Key study methods	Электрофизиология, флуоресцентная визуализация, иммуноморфология, биохимия, молекулярные и биохимические методы Electrophysiology, fluorescence imaging, immunomorphology, biochemistry, molecular and biochemical methods	Электрофизиология, флуоресцентная визуализация быстрых процессов Electrophysiology, fluorescence imaging of fast processes	Электрофизиология, поведение (двигательные и когнитивные тесты), микроскопия <i>in vivo</i> , иммуноморфология, молекулярные и биохимические методы Electrophysiology, behavior (motor and cognitive tests), <i>in vivo</i> microscopy, immunomorphology, molecular and biochemical methods	Моделирование условий и анализ магнитных и электрических полей в объекте при стимуляции Simulation of conditions and analysis of magnetic and electric fields in an object during stimulation
Возбуждение и синаптическая передача Excitation and synaptic transmission	+	+	+/-	
Пролиферация, дифференцировка и миграция Proliferation, differentiation, and migration	+	-	+	
Межклеточные, глионейрональные взаимодействия Intercellular, glioneuronal interactions	+	+/-	+	
Синаптогенез Synaptogenesis	+	-	+	
Разработка новых клинических протоколов стимуляции Development of new clinical stimulation protocols	-	-	+/-	+

в восприимчивости к магнитным импульсам может быть связана с различиями в локальной ориентации нервных клеток относительно индуцированного электрического поля. Эффект на уровне организма также варьирует в зависимости от ориентации катушки, при этом нейронные популяции рекрутируются по-разному [31, 32].

Согласно современным представлениям, эффекты ТМС чаще всего связаны с нейропротективным действием, стимуляцией нейро- и синаптогенеза, оптимизацией процессов синаптической передачи в структурах центральной нервной системы [33, 34]. Для индукции офлайн-эффекта используются паттерновые протоколы стимуляции и rTMS [35, 36].

В ответ на рТМС возбудимость нейронов изменяется из-за сдвига в ионном балансе вокруг популяции стимулируемых клеток. Деполяризация доминирует в механизме модуляции возбудимости, который напоминает индукцию синаптической пластичности. Однако гиперполяризация также играет важную роль, влияя на мембранный потенциал [37, 38].

Влияние ТМС на синаптогенез и механизмы синаптической передачи

Функциональные эффекты, вызванные рТМС, продолжают определять время после стимуляции [39]. При этом рТМС, помимо влияния на метаболический профиль клеток и синаптическую передачу, вызывает изменения синаптоархитектоники. Наиболее распространённая теория предполагает, что этот феномен сходен с такими механизмами синаптической пластичности, как долговременная депрессия или потенциация, индуцируемые в результате стимуляции нейрональной активности с разной частотой [40, 41]. Согласно современным представлениям, молекулярные механизмы структурно-функциональных перестроек нейронных сетей под действием ТМС ассоциированы с NMDA-рецепторами на постсинаптической мембране. Например, благодаря феноменам, схожим с долговременной потенциацией, вызванным рТМС, запускается перестройка актинового цитоскелета, что в конечном итоге приводит к модификации дендритов [42]. При долговременной потенциации сначала быстро увеличиваются и деформируются дендритные шипики за счёт усиления полимеризации и ветвления в них актина, а на последующих этапах в область синапса привлекаются белки, ответственные за функционирование постсинаптических уплотнений и кластеризацию рецепторов [43].

Влияние ТМС на синаптогенез и процессы синаптической передачи лучше всего исследованы в моторных областях коры головного мозга и гиппокампе.

A.D. Tang и соавт. использовали двухфотонную визуализацию для отслеживания пластичности дендритных шипиков в 5-м слое моторной коры у мышей разного возраста. Исследование показало, что однократный сеанс подпороговой ТМС с применением протокола стимуляции интермиттирующими θ -вспышками для моторной коры головного мозга увеличивает скорость потери дендритных шипиков через 21 ч после воздействия вне зависимости от возраста мыши, что приводит к значимому снижению плотности данных структур через 45 ч после сеанса [44].

В то же время недавние исследования обнаружили, что 5 ежедневных сеансов высокочастотной рТМС частотой 15 Гц увеличивали плотность апикальных и базальных дендритных шипиков на пирамидных нейронах 2-го и 3-го слоев моторной коры молодых мышей при измерении через 24 ч после стимуляции [45].

Сообщалось, что рТМС культур клеток гиппокампа индуцирует кластеризацию постсинаптических AMPA-рецепторов [42]. Данные M. Lenz и соавт. свидетель-

ствуют о том, что высокочастотная рТМС (10 Гц) *in vitro* влияет на синаптическую передачу преимущественно возбуждающих синапсов, расположенных на проксимальных отделах дендритах культивируемых пирамидных нейронов CA1. Стимуляция AMPA-рецепторов и ретроградная деполяризация мембраны активируют потенциалзависимые натриевые и кальциевые каналы и удаляют магниевый блок, временно блокирующий NMDA-рецепторы [46]. Это приводит к локальному увеличению концентрации кальция, быстрой деполяризации дендритов, генерации так называемой проксимальной зоны дендритной пластичности и кальцийзависимому увеличению концентрации AMPA на постсинаптической мембране дендритного шипика. Причём селективное фармакологическое ингибирование NMDA-рецепторов или α -1-субъединицы кальциевых каналов (L-VGCC) угнетает влияние рТМС на проксимальные отделы дендритов [47].

В основе дисфункции нейронных сетей предположительно лежит дисбаланс возбуждения и торможения, поэтому следует рассмотреть и влияние ТМС на ингибирующие синапсы нейрональных контуров. По результатам исследования M. Lenz и соавт. магнитная стимуляция частотой 10 Гц влияла на Ca^{2+} /кальциневрин-зависимую олигомеризацию гефирина [48] – постсинаптического каркасного белка, обеспечивающего стабилизацию и кластеризацию ионотропных рецепторов глицина и γ -аминомасляной кислоты (ГАМК-А). Основное скопление ГАМК-А-рецепторов располагается на соме и аксональных холмиках нейронов гиппокампа [49]. При долговременной потенциации возбуждающих синапсов (описанной выше) происходит гефирин-опосредованная Ca^{2+} /кальциневрин-зависимая перестройка тормозных синапсов. Эти структурные и функциональные изменения требуют активации потенциал-зависимых натриевых и кальциевых каналов L-типа, а также NMDA-рецепторов и не наблюдаются, когда фармакологически блокируются кальциневриновые протеинфосфатазы [50]. Соответственно, воздействие стимуляции 10 Гц сопровождается дестабилизацией кластеров гефирина, ГАМК-А и глициновых рецепторов и снижением активности тормозных синапсов.

В статье A. Thomson и соавт., иллюстрирующей возбуждающий эффект iTBS, в качестве модели синаптической пластичности были использованы клетки SH-SY5Y (клеточная линия нейробластомы человека), предварительно инкубированные с Fluo-4 AM – флуоресцентным индикатором уровня кальция. Выявлено увеличение флуоресцентного ответа на добавление KCl («вызванная» посредством деполяризации активация нейронов) при использовании протокола, подобного iTBS, и уменьшение его в результате воздействия протокола, подобного cTBS, по сравнению с контролем [51].

Известно, что фосфорилирование рибосомального S6 в нейронах является маркером активации NMDA-зависимых сигнальных путей и индуцирует синаптические и клеточные изменения, лежащие в основе пластичности. Установлено, что под воздействием высокочастотной ТМС (400 Гц) происходит активация сигнального пути

mTORC1, который фосфорилирует треонин в 389-м положении белка S6, тем самым активируя киназу rpS6. Наблюдалось более чем 3-кратное увеличение фосфорилирования rpS6 через 15 мин, 2 ч и 4 ч после высокочастотной ТМС. Эти эффекты были устранены обработкой рапамицином, блокирующим активацию данного сигнального пути [52].

В эксперименте с воздействием высокочастотной (400 Гц) ТМС на мышцах выявлено увеличение содержания фосфорилированного рибосомального белка S6 в островках Кальеха и паравентрикулярном ядре гипоталамуса, в вентромедиально-латеральных задних ядрах таламуса, грушевидной коре и центральном ядре миндалевидного тела [53]. В группе мышей с изменёнными сайтами фосфорилирования S6 белка после воздействия высокочастотной ТМС (100 Гц) индукция долговременной потенциации и возбуждающих постсинаптических токов не происходила [54].

В культурах клеток гиппокампа низкоинтенсивная ТМС (1,14 Тл, 1 Гц) вызывала прорастание дендритов и увеличение плотности синаптических контактов, в то время как высокоинтенсивная ТМС (1,55 Тл, 1 Гц) оказывала разрушительное воздействие, приводящее к уменьшению количества отростков и синапсов. Авторы статьи показали, что низкоинтенсивная низкочастотная ТМС

(1,14 Тл, 1 Гц) может индуцировать рост дендритов и аксонов в культивируемых нейронах гиппокампа путём активации сигнального пути нейротрофического фактора мозга (BDNF)/киназы, регулируемые внеклеточными сигналами (ERK), результатом чего является увеличение экспрессии белка постсинаптической плотности (PSD95) и синаптофизина [55], а также утолщение постсинаптической мембраны [56].

По другим данным, протокол, подобный iTBS (2-секундные серии стимулов каждые 10 с, суммарное время воздействия – 180 с), стимулировал транскрипцию PSD95 и синаптофизина, тогда как низкочастотная ТМС не оказывала подобного эффекта [57].

Под воздействием низкоинтенсивной ТМС происходит ремоделирование аномальных нейронных связей в топографически более подходящее положение. Так, у мышей с нокаутом ephrin-A2A5^{-/-} отсутствуют ключевые сигналы для аксоногенеза и, как следствие, нарушена топография зрительных путей. Двухнедельная низкоинтенсивная рТМС (10 мТ; 10 мин/день) уменьшала количество аномальных проекций в подкорковых [58] и кортикальных зрительных цепях [59].

В ходе изучения метаболического состава нейронов, предварительно подвергнутых ТМС, выявлено истощение

Таблица 2. Влияние ТМС на синаптогенез и механизмы синаптической передачи

Table 2. Effects of TMS on synaptogenesis and synaptic transmission mechanisms

Влияние ТМС Effects of TMS	Вид ТМС TMS type	Частота, Гц Frequency, Hz	Эффект Effect	Источник Reference
Позитивное Positive	Низкоинтенсивная Low intensity	15	Увеличивалась плотность дендритных шипиков на пирамидных нейронах Density of dendritic spines on pyramidal neurons increased	[45]
		1	Увеличивались прорастание дендритов и плотность синаптических контактов путём активации BDNF/ERK пути Dendritic sprouting and synaptic contact density increased through activation of BDNF/ERK pathway	[55, 56]
		10	Индуктировалась синаптическая потенция преимущественно возбуждающих синапсов, расположенных на проксимальных дендритах культивируемых пирамидных нейронов CA1 Synaptic potentiation of predominantly excitatory synapses on proximal dendrites of cultured CA1 pyramidal neurons induced	[46]
		10	Индуктировалась структурная и функциональная пластичность тормозных синапсов Structural and functional plasticity of inhibitory synapses induced	[48]
		400	Активировались NMDA-зависимые пути через mTORC1-путь NMDA-dependent pathways upregulated via mTORC1 pathway	[52]
		400	Активировались NMDA-зависимые пути через увеличение S6 NMDA-dependent pathways upregulated through S6 increased	[53]
		6,67/10	Происходило ремоделирование нейронных связей Neuron connections remodelled	[58, 59]
Негативное Negative	Низкоинтенсивная Low intensity	50	Снижалась плотность дендритных шипиков через 45 ч, увеличена скорость потери через 21 ч Density of dendritic spines decreased after 45 h; loss rate increased after 21 h	[44]
		Высокоинтенсивная High intensity	1	Уменьшалось количество отростков и синапсов Number of processes and synapses decreased

пула аспартата, фенилаланина и изолейцина, что авторы связывают с необходимостью пополнения цикла трикарбоновых кислот. Низкочастотная ТМС вызывает увеличение синтеза и усиление спонтанного высвобождения ГАМК (с чем может быть связано снижение содержания пироглутамата и аланина). Содержание аминокислот серина и глицина также значительно снижалось после 1 Гц и 10 Гц стимуляции, что, вероятно, связано с усилением синтеза белков, таких как BDNF, c-fos и различных рецепторов нейромедиаторов [60].

Сопровождающие синаптическую пластичность клеточные и молекулярные изменения, возникающие под влиянием ТМС, проиллюстрированы весьма немногочисленными исследованиями на животных и клеточных культурах, и результаты, полученные при этом, противоречивы (табл. 2). Наиболее значимые положительные изменения синаптической пластичности были обнаружены в случае использования высокочастотной ТМС (10 Гц) в экспериментах на клеточных культурах, но нет общепринятой позиции относительно интенсивности воздействия. Низкоинтенсивная ТМС с использованием различных протоколов приводила к позитивным эффектам на культурах нейронов, но не улучшала синаптогенез на организменном уровне. Требуются дополнительные исследования для уточнения эффектов протоколов ТМС, особенно в отношении интенсивности магнитного воздействия. Анализ литературных источников последних лет показал, что фундаментальные экспериментальные исследования в целом подтверждают тезис об индукции одними протоколами ТМС процессов, сходных с долговременной депрессией, другими – с долговременной потенциацией. Однако отсроченные эффекты ТМС зачастую вариабельны и зависят не только от параметров воздействия, но и от предшествующей нейрональной активности и некоторых других факторов. Не исключено, что долгосрочные эффекты ТМС могут быть опосредо-

ваны сочетанием разных видов пластичности, включая метапластичность [61].

Нейропротекторные и регенераторные эффекты ТМС

На экспериментальных моделях неврологических заболеваний в ряде экспериментов показаны антиапоптотические и восстановительные эффекты низкоинтенсивной ТМС, опосредуемые глубокими изменениями регуляторных каскадов в нейронах. Так, под действием ТМС (10 Гц по 10 мин в день в течение 14 дней) у мышей с перерезкой спинного мозга на уровне Т9–Т11 с помощью протеомного анализа выявляли снижение содержания ряда проапоптотических белков, например, аннексина А2, что способствовало выживаемости нейронов и ремиелинизации. Та же работа демонстрирует увеличение под влиянием ТМС с данными параметрами пролиферации прогениторных нервных клеток спинного мозга, а также повышение содержания белков NEUM, CDC42, RHOG, вызывающих усиление роста и ветвления аксонов [62].

В другом эксперименте показано, что при окклюзии среднелобной артерии ТМС снижала гибель нейронов кровоснабжаемой области, воздействуя на белки – регуляторы апоптоза, усиливая экспрессию антиапоптотического Bcl-2 и подавляя экспрессию проапоптотического Bax [63]. На генетической модели болезни Альцгеймера показано, что высокочастотная ТМС (25 Гц) уменьшала потерю нейронов и апоптоз клеток гиппокампа за счёт активации пути PI3K/Akt/GLT-1, связанного со снижением эксайтотоксичности [64].

Вместе с тем ТМС может оказать и пагубное влияние на клетки. В экспериментах на первичной культуре нейронов было показано увеличение числа апоптотических клеток в режимах 10 и 100 Гц при непрерывной стимуляции [65].

Таблица 3. Влияние ТМС на механизмы нейропротекции и регенерации

Table 3. Effects of TMS on mechanisms underlying neuroprotection and regeneration

Влияние ТМС Effects of TMS	Вид ТМС TMS type	Частота, Гц Frequency, Hz	Эффект Effect	Источник Reference
Позитивное Positive	Низкоинтенсивная Low intensity	10	Снизилось содержание ряда проапоптотических белков, увеличилось число белков, влияющих на аксоногенез, и антиоксидантных ферментов Levels of several pro-apoptotic proteins decreased, those of proteins affecting axonogenesis and antioxidant enzymes increased	[62]
		10	Усиливалась экспрессия антиапоптотического Bcl-2 и подавлялась экспрессия проапоптотического Bax Expression of anti-apoptotic Bcl-2 increased and expression of pro-apoptotic Bax suppressed	[63]
		25	Уменьшались потеря нейронов и апоптоз клеток гиппокампа Neuronal loss and apoptosis of hippocampal cells reduced	[64]
		Не указана	Увеличивалась экспрессия аконитазы и каталазы, вовлечённых в антиоксидантную защиту Expression of aconitase and catalase, which are involved in antioxidant defense, increased	[66]
Негативное Negative	Высокоинтенсивная High intensity	10/100	Увеличивалось число апоптотических клеток Number of apoptotic cells increased	[65]

В эксперименте на культуре первичных нейронов гиппокампа рТМС увеличивала экспрессию железосодержащих белков каталазы и аконитазы, вовлечённых в антиоксидантную защиту, и повышала выживаемость нейронов при мощности 40 и 60% от максимальной мощности стимулятора. Интересно, что высокоинтенсивная ТМС ускоряла их повреждение [66].

Таким образом, на разных экспериментальных моделях продемонстрировано подавление при помощи определённых режимов ТМС молекулярных механизмов повреждения и гибели нейронов: апоптоза, эксайтотоксичности, окислительного стресса. Непрерывная и высокоинтенсивная ТМС усугубляет повреждение клеток (табл. 3).

Влияние ТМС на нейрогенез и дифференцировку нейронов

В работе E. Ueyama и соавт. с помощью оценки включения BrdU в пролиферирующие клетки показано, что рТМС частотой 25 Гц в течение 14 дней усиливает нейрогенез в гиппокампе интактных мышей [67]. Также в исследованиях на моделях повреждения спинного мозга выявлена дифференцировка покоящихся вблизи центрального канала спинного мозга нейральных стволовых клеток в астроциты [68, 69] и олигодендроглию под влиянием ТМС [62]. Влияние ТМС на пролиферацию, дифференцировку и миграцию нейрональных предшественников в нейрогенных нишах лучше всего изучены *in vivo* на моделях инсульта, что связано с попыткой обоснования применения метода в целях реабилитации пациентов.

На модели ишемического повреждения мозга рТМС (10 Гц) способствовала пролиферации нейрональных предшественников в субгранулярной зоне гиппокампа экспериментальных грызунов. Уровень экспрессии BDNF, TrkB, p-AKT и антиапоптотического Bcl-2 повышался у животных, получавших ТМС, в то время как экспрессия проапоптотического Bax значительно снижалась [63]. BDNF играет решающую роль в обеспечении выживания нейронов путём специфического связывания с рецептором киназы B на тропомиозине (TrkB). Это связывание приводит к аутофосфорилированию и димеризации рецептора TrkB, запускающего активацию фосфатидилинозитол-3-киназы PI3K. Сигнальный путь PI3K/Akt является основным TrkB-опосредованным путём выживания, который и защищает от апоптоза [70]. В сходном эксперименте при аналогичной частоте стимуляции было показано значительное увеличение экспрессии miR-25 – микроРНК, играющих роль в дифференцировке и пролиферации нейральных стволовых клеток, в субвентрикулярной зоне [71]. Высокочастотная рТМС (20 Гц) также стимулирует экспрессию BDNF и экспрессию pERK1/2, что подтверждает влияние сигнального пути BDNF/ERK на усиление пролиферации нейральных стволовых клеток в гиппокампе [72, 73], причём авторы отмечают сходство выявленных изменений с действием антидепрессантов и электросудорожной терапии.

Таким образом, вероятно, что одним из механизмов действия ТМС является усиление нейрогенеза и репара-

тивных процессов в результате стимуляции выработки BDNF, способствующего выживанию стволовых клеток и дифференцировке нейронов, а также формированию новых синапсов. Нейропротекторный эффект BDNF показан, например, на животных моделях болезни Альцгеймера [74, 75].

Однако, помимо эффектов BDNF, исследователи рассматривают и другие вовлечённые механизмы. Так, H. Liu и соавт. выявили, что пролиферация нейральных стволовых клеток *in vitro* после высокочастотной рТМС связана с увеличением экспрессии микроРНК кластера miR-106b ~25 (miR-106b, miR-93, miR-25), участвующих в регуляции клеточного цикла, причём выраженность эффекта была пропорциональна количеству импульсов [76].

Помимо усиления нейрогенеза в нейрогенных нишах показано влияние ТМС на миграцию нейронов в область повреждения. Так, в эксперименте на модели геморрагического инсульта количество DCX-позитивных нейрональных предшественников в коре увеличивалось под действием рТМС (10 Гц каждые 24 ч в течение 5 дней). В эксперименте *in vitro* с нейросферами те же авторы выявили увеличение процентного соотношения Sox2 и Ki67⁺-клеток, свидетельствующее об усилении пролиферации нейральных стволовых клеток при ТМС (10 Гц каждые 24 ч в течение 72 ч) [77].

Показаны не только увеличение пролиферации, но и роль хемокиновых рецепторов во влиянии рТМС (частота 10 Гц) на миграцию нейральных стволовых клеток из субвентрикулярной зоны в перифокальную область ишемического инфаркта. Поведенческие показатели крыс в этом эксперименте также улучшались под воздействием ТМС [78].

Похожие выводы были сделаны с использованием окрашивания на Nestin/SOX2, Nestin/бета3-тубулин: рТМС увеличивала пул нейрональных предшественников в перинфарктной области коры головного мозга после перенесённого инсульта. Количество незрелых нейронов в перинфарктной области было выше у животных, получавших рТМС, а по направлению β3-тубулин⁺-отростков авторы сделали вывод о миграции клеток в перинфарктную область [79].

Вместе с тем, хотя в большинстве работ показано снижение неврологического дефицита под действием ТМС на моделях инсульта, остаётся открытым вопрос, способствует ли ТМС интеграции вновь образованных нервных клеток в перифокальной области инфаркта или восстановление происходит за счёт других стимулируемых ТМС механизмов – снижения гибели нейронов, реорганизации и восстановления их связей.

Данных о влиянии ТМС на дифференцировку нейронов человека немного, хотя они представляют особый интерес в свете развития методов клеточной терапии. Например, на нейронах человека, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, *in vitro* было показано влияние разных протоколов ТМС на дифференцировку и созревание нейронов: так, высокочастотная

ТМС способствовала дифференцировке нейрональных предшественников в глутаматергические нейроны, а iTBS усиливает синаптогенез, что свидетельствует о её влиянии на созревание нейронов [57].

Практически не изученным является аспект влияния ТМС на особенности дифференцировки трансплантированных нейрональных стволовых клеток. J.J. Peng и соавт. было установлено, что животные с трансплантированными нейрональными стволовыми клетками человека под действием ТМС (10 Гц) демонстрировали лучшее функциональное восстановление после ишемического инсульта по сравнению с животными без воздействия ТМС, что авторы связывают с ранее обсуждавшейся нами активацией сигнального пути BDNF/TrkB [80].

Как следует из приведённых работ, влияние ТМС на нейрогенез как для области зубчатой извины гиппокампа, так и для субвентрикулярной зоны неоднократно проиллюстрировано с использованием иммуногистохимических маркёров пролиферации нейрональных предшественников и дифференцировки нейронов. В большинстве статей использовали высокочастотные протоколы ТМС, чаще всего 10 и 20 Гц. Неоднократно было показано и стимулирующее влияние высокочастотной ТМС на миграцию клеток-предшественников в перинфарктные области. Следует полагать, что на нейрогенез ТМС оказывает влияние в основном благодаря активации BDNF/TrkB-пути и эффектам на уровне транскриптов генов, регулирующих клеточный цикл.

Влияние ТМС на глиальные клетки

Хотя в ряде экспериментов непосредственного влияния рТМС на культуры глиальных клеток не выявлено, при моделировании патологических условий неоднократно были показаны изменения всех типов нейроглии. Растёт число свидетельств того, что глиальные клетки могут активно участвовать в нейропротекторном эффекте ТМС [81].

Помимо непосредственного ответа глиоцитов на ТМС, остающегося дискуссионным, изменения глии в смешанных культурах или в ткани объясняются также возрастающей электрической активностью нейронов, вызывающей реакцию глиальных клеток.

Астроциты, тесно взаимодействуя с нейронами, участвуют в регуляции синаптогенеза. Добавление кондиционированной астроцитами среды или совместная их культивация с нервными клетками увеличивают количество функциональных возбуждающих синапсов, образующихся в культуре, в то время как удаление астроцитов имеет обратный эффект [82]. Одним из секретируемых астроцитарной глией факторов, связанных с регуляцией синаптогенеза, служат тромбоспондины (TSP) [83]. Например, передача сигналов TSP1/ β -интегрин контролирует баланс возбуждения и торможения в спинном мозге путём усиления регуляции глицинергических рецепторов и снижения поверхностной экспрессии AMPA-рецепторов. Опосредованная астроцитами передача сигналов TSP1/ α 2 δ -1 в полосатом теле изменяет активность возбуждающих синапсов [84].

Астроглия также контролирует количество синапсов путём фагоцитоза. Синаптическая элиминация опосредуется трансмембранным белком Megf10, экспрессируемым астроцитами [85]. Показано, что астроциты фагоцитируют синапсы через пути Megf10 и Mertk как в развивающемся, так и во взрослом мозге [86]. J. Lee и соавт. также подтвердили, что астроцитарный Megf10 опосредует элиминацию возбуждающих синапсов в области CA1 гиппокампа взрослого человека [87].

Одним из механизмов синаптической пластичности, реализующихся и при ТМС, является кластеризация AMPA-рецепторов постсинаптических терминалей возбуждающих синапсов, вероятно, являющаяся астроцит-зависимой. Один из механизмов регуляции процесса кластеризации опосредован эфрином А3 астроцитарных отростков и его рецептором EphA4, который экспрессируется дендритными шипиками [88, 89]. В подтверждение связи нейропластичности с ответом астроцитов можно упомянуть работу Н. Monai и соавт., в которой показано, что при стимуляции постоянным током реакция астроцитов влияет на долговременную потенциацию нейротрансмиссии, связана с колебаниями уровня Ca^{2+} и зависит от адренергических рецепторов [90].

ТМС на частоте 1 Гц в течение 10 мин повышала экспрессию белков STIM1 и ORA13 астроцитов (белок STIM1 функционирует как детектор снижения запасов Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме, а ORA13 является каналом обратного поступления Ca^{2+}). Эта же работа продемонстрировала снижение экспрессии ряда генов воспалительного ответа в астроцитах на частотах 1 и 10 Гц [91].

В недавних исследованиях было показано, что в культуре, подвергавшейся воздействию высокочастотной ТМС, астроциты высвобождают нейротрофный фактор. Он индуцирует экспрессию нейронами ERK1/2 и *c-fos*, связанных с синаптической пластичностью и активацией нейроцитов. Это подтверждает двунаправленное взаимодействие астроглии и нейронов при стимуляции [92].

Магнитное поле очень низкой интенсивности (0,5 мТл) при высокочастотной ТМС индуцирует временное повышение экспрессии астроцитарного маркёра GFAP *in vivo* у мышей после ишемического повреждения и реперфузии, что может косвенно свидетельствовать о привлечении астроцитов в зону повреждения (непрерывное воздействие частотой 50 Гц в течение 7 дней) [93]. Подобные данные были получены и на модели поражения спинного мозга мышей. При режиме ТМС с частотой 1 Гц в течение 5 мин в день продолжительностью 14 дней происходила индукция магнитным полем экспрессии GFAP астроцитами и ERK1/2-зависимой миграции к области повреждения [94].

Аналогично, на основании выявления PDGFR β и GFAP, увеличивалась активация астроцитов и ревазуляризация в группе мышей, получавших рТМС, по сравнению с контролем, через 15 и 90 дней после пересечения спинного мозга, что свидетельствует об активации астроглии и влиянии ТМС на формирование астроцитарного рубца [62].

В ряде статей подчёркивается роль микроглии в формировании ответа нервной ткани на ТМС. Установлено, что в пирамидных нейронах CA1 в тканевых культурах, обеднённых микроглией, под влиянием ТМС (10 Гц) локальная деполяризация постсинаптической мембраны не возникала. Истощение микроглии *in vivo* не оказывало существенного влияния на исходную синаптическую передачу. В экспериментах с ТМС у контрольных мышей с сохранённой микроглией отмечалось возникновение спонтанных деполяризаций постсинаптических мембран (mEPSCs) возбуждающих синапсов в медиальной префронтальной коре, хотя у мышей с обеднённой микроглией подобных потенциалов не фиксировалось [95].

C. Chen и соавт. обнаружили улучшение когнитивных функций мышей на 28-е сутки после временной окклюзии средней мозговой артерии при воздействии высокочастотной ТМС (20 Гц). При этом также уменьшался объём поражения белого вещества, снижался уровень провоспалительных цитокинов, происходило переключение микроглии на M2 фенотип [96].

В ряде экспериментов оценивали пролиферацию олигодендроцитов. Данные, полученные при этом, противоречивы. G. Liu и соавт. сообщают о стимуляции пролиферативной способности олигодендроцитов [57], а также об индукции дифференцировки клеток-предшественников в олигодендроциты под воздействием высокочастотной рТМС. Исследования C.L. Cullen и соавт. данные эффекты не подтвердили [97]. Воздействие iTBS и cTBS на олигодендроциты было изучено на трансгенных мышах Plp-CreER:Tau-mGFP и Pdgfra-CreERT2. Доказано, что iTBS увеличивала количество новообразованных олигодендроцитов [98].

Информации об эффектах ТМС на глию на данный момент недостаточно, данный аспект проблемы требует дальнейшего изучения. Косвенно было показано нейротрофическое влияние глиальных клеток на ишемизированных и повреждённых тканях. Установлено, что

глия под воздействием ТМС моделирует противовоспалительный фон, переключая микроглию и астроциты на провоспалительный фенотип. Особенную роль занимает ТМС-индуцированное высвобождение нейротрофического фактора глиальных клеток из астроцитов, приводящее к увеличению экспрессии ERK1/2 в нейронах. Активация ERK1/2 необходима для BDNF-каскада, приводящего к увеличению плотности дендритов и пролиферации нейрональных предшественников. Однако следует отметить, что работы, посвящённые влиянию рТМС на глиальные клетки, крайне немногочисленны, что подчёркивает необходимость дополнительных исследований в этой области.

Заключение

Рассмотренные в обзоре эффекты ТМС, связанные с регенерацией и восстановлением функций нервной системы, влиянием на дифференцировку клеток и стимуляцией синаптической пластичности, создают предпосылки для применения данного метода в клеточной терапии нервно-психических заболеваний. Однако многие вопросы остаются нерешёнными. Практически не изучено влияние ТМС на дифференцировку и созревание нейрональных предшественников. Дискуссионным вопросом является существование изолированных эффектов ТМС на клетки глии.

Большое количество исследований на клеточных культурах проводятся с использованием частот, не применимых в клинике. Отдельное внимание должно быть уделено стандартизации интенсивности проведения стимуляции, так как от нее зависят глиальный и нейрональный ответы. Необходимо помнить, что результаты, полученные на клеточных культурах, не всегда коррелируют с ответом на организменном уровне.

Дальнейшие исследования механизмов ТМС будут способствовать разработке более эффективных протоколов лечения с использованием данного метода.

Список источников / References

1. Zhong G., Yang Z., Jiang T. Precise modulation strategies for transcranial magnetic stimulation: advances and future directions. *Neurosci. Bull.* 2021;37(12):1718–1734. DOI: 10.1007/s12264-021-00781-x
2. Hallett M. Transcranial magnetic stimulation: a primer. *Neuron.* 2007;55(2):187–199. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.06.026
3. Burke M.J., Fried P.J., Pascual-Leone A. Transcranial magnetic stimulation: neurophysiological and clinical applications. *Handb. Clin. Neurol.* 2019;163:73–92. DOI: 10.1016/B978-0-12-804281-6.00005-7
4. Lefaucheur J.P., Aleman A., Baeken C. et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): an update (2014–2018). *Clin. Neurophysiol.* 2020;131(2):474–528. DOI: 10.1016/j.clinph.2019.11.002
5. De Risio L., Borgi M., Pettorruso M. et al. Recovering from depression with repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): a systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Transl. Psychiatry.* 2020;10(1):393. DOI: 10.1038/s41398-020-01055-2
6. Croarkin P.E., Elmaadawi A.Z., Aaronson S.T. et al. Left prefrontal transcranial magnetic stimulation for treatment-resistant depression in adolescents: a double-blind, randomized, sham-controlled trial. *Neuropsychopharmacology.* 2021;46(2):462–469. DOI: 10.1038/s41386-020-00829-y
7. Blumberger D.M., Mulsant B.H., Thorpe K.E. et al. Effectiveness of standard sequential bilateral repetitive transcranial magnetic stimulation vs bilateral theta burst stimulation in older adults with depression: the FOUR-D randomized noninferiority clinical trial. *JAMA Psychiatry.* 2022;79(11):1065–1073. DOI: 10.1001/jamapsychiatry.2022.2862
8. Yang S., Chang M.C. Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on pain management: a systematic narrative review. *Front. Neurol.* 2020;11:114. DOI: 10.3389/fneur.2020.00114
9. Pei Q., Wu B., Tang Y. et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation at different frequencies for postherpetic neuralgia: a double-blind, sham-controlled, randomized trial. *Pain Physician.* 2019;22(4):E303–E313.
10. Фоменко О.Ю., Шельгин Ю.А., Аполихина И.А. и др. Междисциплинарный консенсус по использованию высокоинтенсивной импульсной магнитной терапии для лечения нейрогенной тазовой боли при пудендальной нейропатии. *Акушерство и гинекология.* 2023;(10):160–176.
11. Fomenko O.Yu., Shelygin Yu.A., Apolihina I.A. et al. Interdisciplinary consensus on the use of high-intensity pulsed electromagnetic field therapy in the treatment of neurogenic pelvic pain. *Obstetrics and Gynecology.* 2023;(10):160–176. DOI: 10.18565/aig.2023.117
12. Khedr E.M., Etraby A.E., Hemeda M. et al. Long-term effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on motor function recovery after acute ischemic stroke: rTMS in acute ischemic stroke. *Acta Neurol. Scand.* 2010;121(1):30–37. DOI: 10.1111/j.1600-0404.2009.01195.x
13. Бакулин И.С., Пойдашева А.Г., Супонева Н.А., Пирадов М.А. Транскраниальная магнитная стимуляция в прогнозировании восстановления двигательной функции руки при инсульте. *Нервные болезни.* 2023;(3):3–8.
14. Bakulin I.S., Poydasheva A.G., Suponeva N.A., Piradov M.A. Transcranial magnetic stimulation in the prognosis of recovery for hand motor function after stroke. *Nervnye bolezni.* 2023;(3):3–8. DOI: 10.24412/2226-0757-2023-13000
15. Mi T.M., Garg S., Ba F. et al. High-frequency rTMS over the supplementary motor area improves freezing of gait in Parkinson's disease: a randomized controlled trial. *Parkinsonism. Relat. Disord.* 2019;68:85–90. DOI: 10.1016/j.parkreidis.2019.10.009
16. Khedr E.M., Mohamed K.O., Soliman R.K. et al. The effect of high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on advancing Parkinson's disease with dysphagia: double blind randomized clinical trial. *Neurorehabil. Neural Repair.* 2019;33(6):442–452. DOI: 10.1177/1545968319847968
17. Korzhova J., Bakulin I., Sinityn D. et al. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation and intermittent theta-burst stimulation for spasticity management in secondary progressive multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 2019;26(4):680–e44. DOI: 10.1111/ene.13877
18. Starling A.J., Tepper S.J., Marmura M.J. et al. A multicenter, prospective, single arm, open label, observational study of sTMS for migraine prevention (ESPOUSE Study). *Cephalalgia.* 2018;38(6):1038–1048. DOI: 10.1177/0333102418762525
19. Zhong J., Lan W., Feng Y. et al. Efficacy of repetitive transcranial magnetic stimulation on chronic migraine: a meta-analysis. *Front. Neurol.* 2022;13:1050090. DOI: 10.3389/fneur.2022.1050090
20. Lerner A.J., Wassermann E.M., Tamir D.I. Seizures from transcranial magnetic stimulation 2012–2016: Results of a survey of active laboratories and clinics. *Clin. Neurophysiol.* 2019;130(8):1409–1416. DOI: 10.1016/j.clinph.2019.03.016
21. Rossi S., Hallett M., Rossini P.M. et al. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin. Neurophysiol.* 2009;120(12):2008–2039. DOI: 10.1016/j.clinph.2009.08.016
22. Cruciani A., Mancuso M., Sveva V. et al. Using TMS-EEG to assess the effects of neuromodulation techniques: a narrative review. *Front. Hum. Neurosci.* 2023;17:1247104. DOI: 10.3389/fnhum.2023.1247104
23. Bergmann T.O., Karabanov A., Hartwigsen G. et al. Combining non-invasive transcranial brain stimulation with neuroimaging and electrophysiology: current approaches and future perspectives. *Neuroimage.* 2016;140:4–19. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2016.02.012
24. Boonzaier J., Petrov P.I., Otte W.M. et al. Design and evaluation of a rodent-specific transcranial magnetic stimulation coil: an in silico and in vivo validation study. *Neuromodulation.* 2020;23(3):324–334. DOI: 10.1111/ner.13025
25. Jiang W., Isenhardt R., Liu C.Y. et al. A C-shaped miniaturized coil for transcranial magnetic stimulation in rodents. *J. Neural Eng.* 2023;20(2):026022. DOI: 10.1088/1741-2552/acc097
26. Liu L., Ding M., Wu J. et al. Design and evaluation of a rodent-specific focal transcranial magnetic stimulation coil with the custom shielding application in rats. *Front. Neurosci.* 2023;17:1129590. DOI: 10.3389/fnins.2023.1129590
27. Bolland S.J., Goryachev M., Opitz A. et al. Translational modelling of low and medium intensity transcranial magnetic stimulation from rodents to humans. 2024. (Pre-print). DOI: 10.1101/2024.04.27.591424
28. Shirinpour S., Hananeia N., Rosado J. et al. Multi-scale modeling toolbox for single neuron and subcellular activity under Transcranial Magnetic Stimulation. *Brain Stimul.* 2021;14(6):1470–1482. DOI: 10.1016/j.brs.2021.09.004
29. Huang Y.Z., Edwards M.J., Rounis E. et al. Theta burst stimulation of the human motor cortex. *Neuron.* 2005;45(2):201–206. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.12.033
30. Li C., Huang Y., Bai Y. et al. Critical role of glutamatergic and GABAergic neurotransmission in the central mechanisms of theta-burst stimulation. *Hum. Brain Mapp.* 2019;40(6):2001–2009. DOI: 10.1002/hbm.24485
31. Siebner H.R., Funke K., Aberra A.S. et al. Transcranial magnetic stimulation of the brain: what is stimulated? – A consensus and critical position paper. *Clin. Neurophysiol.* 2022;140:59–97. DOI: 10.1016/j.clinph.2022.04.022
32. Romero M.C., Davare M., Armendariz M., Janssen P. Neural effects of transcranial magnetic stimulation at the single-cell level. *Nat. Commun.* 2019;10(1):2642. DOI: 10.1038/s41467-019-10638-7
33. Sasaki R., Liao W., Opie G.M., Semmler J.G. Effect of current direction and muscle activation on motor cortex neuroplasticity induced by repetitive paired-pulse transcranial magnetic stimulation. *Eur. J. Neurosci.* 2023;58(5):3270–3285. DOI: 10.1111/ejn.16099
34. Gomez-Feria J., Fernandez-Corazza M., Martin-Rodriguez J.F., Mir P. TMS intensity and focality correlation with coil orientation at three non-motor regions. *Phys. Med. Biol.* 2022;67(5):055002. DOI: 10.1088/1361-6560/ac4ef9
35. Chervyakov A.V., Chernyavsky A.Yu., Sinityn D.O., Piradov M.A. Possible mechanisms underlying the therapeutic effects of transcranial magnetic stimulation. *Front. Hum. Neurosci.* 2015;9:303. DOI: 10.3389/fnhum.2015.00303
36. Xing Y., Zhang Y., Li C. et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation of the brain after ischemic stroke: mechanisms from animal models. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2023;43(4):1487–1497. DOI: 10.1007/s10571-022-01264-x
37. Deng X., Chen X., Li Y. et al. Online and offline effects of parietal 10 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation on working memory in healthy controls. *Hum. Brain Mapp.* 2024;45:e26636. DOI: 10.1002/hbm.26636
38. Valero-Cabré A., Amengual J.L., Stengel C. et al. Transcranial magnetic stimulation in basic and clinical neuroscience: a comprehensive review of fundamental principles and novel insights. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2017;83:381–404. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2017.10.006
39. Chan J.H.L., Lin C.S.-Y., Pierrot-Deseilligny E., Burke D. Excitability changes in human peripheral nerve axons in a paradigm mimicking paired-pulse transcranial magnetic stimulation. *J. Physiol.* 2002;542(Pt 3):951–961. DOI: 10.1113/jphysiol.2002.018937
40. Pell G.S., Roth Y., Zangen A. Modulation of cortical excitability induced by repetitive transcranial magnetic stimulation: Influence of timing and geometrical parameters and underlying mechanisms. *Prog. Neurobiol.* 2011;93(1):59–98. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2010.10.003

39. Бакулин И.С., Пойдашева А.Г., Медынцев А.А. и др. Транскраниальная магнитная стимуляция в когнитивной нейронауке: методологические основы и безопасность. *Российский журнал когнитивной науки*. 2020;7(3):25–44.
- Bakulin I.S., Poydasheva A.G., Medyntsev A.A. et al. Transcranial magnetic stimulation in cognitive neuroscience: methodological basis and safety. *Russ. J. Cogn. Sci.* 2020;7(3):25–44. DOI: 10.47010/20.3.2
40. Hoogendam J.M., Ramakers G.M.J., Di Lazzaro V. Physiology of repetitive transcranial magnetic stimulation of the human brain. *Brain Stimul.* 2010;3(2):95–118. DOI: 10.1016/j.brs.2009.10.005
41. Belardinelli P., König F., Liang C. et al. TMS-EEG signatures of glutamatergic neurotransmission in human cortex. *Sci. Rep.* 2021;11(1):8159. DOI: 10.1038/s41598-021-87533-z
42. Vlachos A., Müller-Dahlhaus F., Roszkopp J. et al. Repetitive magnetic stimulation induces functional and structural plasticity of excitatory postsynapses in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J. Neurosci.* 2012;32(48):17514–17523. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0409-12.2012
43. Bonilla-Quintana M., Wörgötter F. Exploring new roles for actin upon LTP induction in dendritic spines. *Sci. Rep.* 2021;11(1):7072. DOI: 10.1038/s41598-021-86367-z
44. Tang A.D., Bennett W., Bindoff A.D. et al. Subthreshold repetitive transcranial magnetic stimulation drives structural synaptic plasticity in the young and aged motor cortex. *Brain Stimul.* 2021;14(6):1498–1507. DOI: 10.1016/j.brs.2021.10.001
45. Cambiaghi M., Cherchi L., Masin L. et al. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation enhances layer II/III morphological dendritic plasticity in mouse primary motor cortex. *Behav. Brain Res.* 2021;410:113352. DOI: 10.1016/j.bbr.2021.113352
46. Lenz M., Platschek S., Priesemann V. et al. Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of excitatory postsynapses on proximal dendrites of cultured mouse CA1 pyramidal neurons. *Brain Struct. Funct.* 2015;220(6):3323–3337. DOI: 10.1007/s00429-014-0859-9
47. Rogasch N.C., Zipser C., Darmani G. et al. The effects of NMDA receptor blockade on TMS-evoked EEG potentials from prefrontal and parietal cortex. *Sci. Rep.* 2020;10(1):3168. DOI: 10.1038/s41598-020-59911-6
48. Lenz M., Galanis C., Müller-Dahlhaus F. et al. Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of inhibitory synapses. *Nat. Commun.* 2016;7:10020. DOI: 10.1038/ncomms10020
49. Contreras A., Hines DJ., Hines R.M. Molecular specialization of GABAergic synapses on the soma and axon in cortical and hippocampal circuit function and dysfunction. *Front. Mol. Neurosci.* 2019;12:154. DOI: 10.3389/fnmol.2019.00154
50. Bannai H., Lévi S., Schweizer C. et al. Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABAAR diffusion dynamics. *Neuron.* 2009;62(5):670–682. DOI: 10.1016/j.neuron.2009.04.023
51. Thomson A.C., De Graaf T.A., Schuhmann T. et al. Transcranial Magnetic stimulation (TMS) modulates functional activity of SH-SY5Y cells: an in vitro model provides support for assumed excitability changes. *bioRxiv*. 2020. DOI: 10.1101/2020.08.19.257295
52. Panja D., Dayte G., Bidinosti M. et al. Novel translational control in arc-dependent long term potentiation consolidation in vivo. *J. Biol. Chem.* 2009;284(46):31498–31511. DOI: 10.1074/jbc.M109.056077
53. Fujiki M., Yee K.M., Steward O. Non-invasive high frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (hrTMS) robustly activates molecular pathways implicated in neuronal growth and synaptic plasticity in select populations of neurons. *Front. Neurosci.* 2020;14:558. DOI: 10.3389/fnins.2020.00558
54. Puighermanal E., Biever A., Pascoli V. et al. Ribosomal protein S6 phosphorylation is involved in novelty-induced locomotion, synaptic plasticity and mRNA translation. *Front. Mol. Neurosci.* 2017;10:419. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00419
55. Ma J., Zhang Z., Su Y. et al. Magnetic stimulation modulates structural synaptic plasticity and regulates BDNF–TrkB signal pathway in cultured hippocampal neurons. *Neurochem. Int.* 2013;62(1):84–91. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.11.010
56. Ma S.M., Ni J.X., Li X.Y. et al. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation reduces pain in postherpetic neuralgia. *Pain. Med.* 2015;16(11):2162–2170. DOI: 10.1111/pme.12832
57. Liu G., Li X.M., Tian S. et al. The effect of magnetic stimulation on differentiation of human induced pluripotent stem cells into neuron. *J. Cell. Biochem.* 2020;121(10):4130–4141. DOI: 10.1002/jcb.29647
58. Rodger J., Mo C., Wilks T. et al. Transcranial pulsed magnetic field stimulation facilitates reorganization of abnormal neural circuits and corrects behavioral deficits without disrupting normal connectivity. *FASEB J.* 2012;26(4):1593–1606. DOI: 10.1096/fj.11-194878
59. Makowiecki K., Harvey A.R., Sherrard R.M., Rodger J. Low-intensity repetitive transcranial magnetic stimulation improves abnormal visual cortical circuit topography and upregulates BDNF in mice. *J. Neurosci.* 2014;34(32):10780–10792. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0723-14.2014
60. Hong I., Garrett A., Maker G. et al. Repetitive low intensity magnetic field stimulation in a neuronal cell line: a metabolomics study. *PeerJ.* 2018;6:e4501. DOI: 10.7717/peerj.4501
61. Funke K. Transcranial magnetic stimulation of rodents. In: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier; 2019:365–387. DOI: 10.1016/B978-0-12-812028-6.00020-3
62. Chalfouh C., Guillou C., Hardouin J. et al. The regenerative effect of trans-spinal magnetic stimulation after spinal cord injury: mechanisms and pathways underlying the effect. *Neurotherapeutics.* 2020;17(4):2069–2088. DOI: 10.1007/s13311-020-00915-5
63. Guo F., Lou J., Han X. et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation ameliorates cognitive impairment by enhancing neurogenesis and suppressing apoptosis in the hippocampus in rats with ischemic stroke. *Front. Physiol.* 2017;8:559. DOI: 10.3389/fphys.2017.00559
64. Cao H., Zuo C., Gu Z. et al. High frequency repetitive transcranial magnetic stimulation alleviates cognitive deficits in 3xTg-AD mice by modulating the PI3K/Akt/GLT-1 axis. *Redox. Biol.* 2022;54:102354. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102354
65. Grehl S., Viola H.M., Fuller-Carter P.I. et al. Cellular and molecular changes to cortical neurons following low intensity repetitive magnetic stimulation at different frequencies. *Brain Stimul.* 2015;8(1):114–123. DOI: 10.1016/j.brs.2014.09.012
66. Wang Y., Fang K., He S. et al. Effects of repetitive magnetic stimulation on the growth of primarily cultured hippocampus neurons in vitro and their expression of iron-containing enzymes. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2019;15:927–934. DOI: 10.2147/NDT.S199328
67. Ueyama E., Ukai S., Ogawa A. et al. Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation increases hippocampal neurogenesis in rats. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2011;65(1):77–81. DOI: 10.1111/j.1440-1819.2010.02170.x
68. Sabelström H., Stenudd M., Réu P. et al. Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science.* 2013;342(6158):637–640. DOI: 10.1126/science.1242576
69. Robac A., Neveu P., Hugede A. et al. Repetitive trans spinal magnetic stimulation improves functional recovery and tissue repair in contusive and penetrating spinal cord injury models in rats. *Biomedicine.* 2021;9(12):1827. DOI: 10.3390/biomedicine9121827
70. Wu C.H., Chen C.C., Hung T.H. et al. Activation of TrkB/Akt signaling by a TrkB receptor agonist improves long-term histological and functional outcomes in experimental intracerebral hemorrhage. *J. Biomed. Sci.* 2019;26(1):53. DOI: 10.1186/s12929-019-0543-8
71. Guo F., Han X., Zhang J. et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation promotes neural stem cell proliferation via the regulation of MiR-25 in a rat model of focal cerebral ischemia. *PLoS One.* 2014;9(10):e109267. DOI: 10.1371/journal.pone.0109267
72. Müller M.B., Toschi N., Kresse A.E. et al. Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystokinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain. *Neuropsychopharmacology.* 2000;23(2):205–215. DOI: 10.1016/S0893-133X(00)00999-3
73. Chen Y., Zhang R., Xue F. et al. Quetiapine and repetitive transcranial magnetic stimulation ameliorate depression-like behaviors and up-regulate the proliferation of hippocampal-derived neural stem cells in a rat model of depression: the involvement of the BDNF/ERK signal pathway. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2015;136:39–46. DOI: 10.1016/j.pbb.2015.07.005
74. Chen C., Ahn E.H., Liu X. et al. Optimized TrkB agonist ameliorates Alzheimer's disease pathologies and improves cognitive functions via inhibiting delta-secretase. *ACS Chem. Neurosci.* 2021;12(13):2448–2461. DOI: 10.1021/acscchemneuro.1c00181
75. Liao J., Chen C., Ahn E.H. et al. Targeting both BDNF/TrkB pathway and delta-secretase for treating Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 2021;197:108737. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2021.108737
76. Liu H., Han X., Chen H. et al. Repetitive magnetic stimulation promotes neural stem cells proliferation by upregulating MiR-106b in vitro. *J. Huazhong. Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 2015;35(5):766–772. DOI: 10.1007/s11596-015-1505-3

77. Cui M., Ge H., Zeng H. et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation promotes neural stem cell proliferation and differentiation after intracerebral hemorrhage in mice. *Cell Transplant.* 2019;28(5):568–584. DOI: 10.1177/0963689719834870
78. Deng Y., Guo F., Han X., Huang X. Repetitive transcranial magnetic stimulation increases neurological function and endogenous neural stem cell migration via the SDF-1 α /CXCR4 axis after cerebral infarction in rats. *Exp. Ther. Med.* 2021;22(3):1037. DOI: 10.3892/etm.2021.10469
79. Zong X., Gu J., Zhou S. et al. Continuous theta-burst stimulation enhances and sustains neurogenesis following ischemic stroke. *Theranostics.* 2022;12(13):5710–5726. DOI: 10.7150/thno.71832
80. Peng J.-J., Sha R., Li M.-X. et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation promotes functional recovery and differentiation of human neural stem cells in rats after ischemic stroke. *Exp. Neurol.* 2019;313:1–9. DOI: 10.1016/j.expneurol.2018.12.002
81. Ferreira S.A., Pinto N., Serrenho I. et al. Contribution of glial cells to the neuroprotective effects triggered by repetitive magnetic stimulation: a systematic review. *Neural Regen. Res.* 2024;19(1):116–123. DOI: 10.4103/1673-5374.374140
82. Ullian E.M., Sapperstein S.K., Christopherson K.S., Barres B.A. Control of synapse number by glia. *Science.* 2001;291(5504):657–661. DOI: 10.1126/science.291.5504.657
83. Tucker R.P., Adams J.C. Molecular evolution of the Thrombospondin superfamily. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2024;155(Pt B):12–21. DOI: 10.1016/j.semcdb.2023.05.004
84. Nagai J., Rajbhandari A.K., Gangwani M.R. et al. Hyperactivity with disrupted attention by activation of an astrocyte synaptogenic cue. *Cell.* 2019;177(5):1280–1292.e20. DOI: 10.1016/j.cell.2019.03.019
85. Zhuang Y., Xu X., Li H. et al. Megf10-related engulfment of excitatory postsynapses by astrocytes following severe brain injury. *CNS Neurosci. Ther.* 2023;29(10):2873–2883. DOI: 10.1111/cns.14223
86. Chung W.-S., Clarke L.E., Wang G.X. et al. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature.* 2013;504(7480):394–400. DOI: 10.1038/nature12776
87. Lee J.-H., Kim J., Noh S. et al. Astrocytes phagocytose adult hippocampal synapses for circuit homeostasis. *Nature.* 2021;590(7847):612–617. DOI: 10.1038/s41586-020-03060-3.
88. Murai K.K., Nguyen L.N., Irie F. et al. Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat. Neurosci.* 2003;6(2):153–160. DOI: 10.1038/nn994
89. Filosa A., Paixão S., Honsek S.D. et al. Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport. *Nat. Neurosci.* 2009;12(10):1285–1292. DOI: 10.1038/nn.2394
90. Monai H., Hirase H. Astrocytes as a target of transcranial direct current stimulation (tDCS) to treat depression. *Neurosci. Res.* 2018;126:15–21. DOI: 10.1016/j.neures.2017.08.012
91. Clarke D., Beros J., Bates K.A. et al. Low intensity repetitive magnetic stimulation reduces expression of genes related to inflammation and calcium signalling in cultured mouse cortical astrocytes. *Brain Stimul.* 2021;14(1):183–191. DOI: 10.1016/j.brs.2020.12.007
92. Roque C., Pinto N., Vaz Patto M., Baltazar G. Astrocytes contribute to the neuronal recovery promoted by high-frequency repetitive magnetic stimulation in *in vitro* models of ischemia. *J. Neurosci. Res.* 2021;99:1414–1432. DOI: 10.1002/jnr.24792
93. Raus S., Selakovic V., Manojlovic-Stojanoski M. et al. Response of hippocampal neurons and glial cells to alternating magnetic field in gerbils submitted to global cerebral ischemia. *Neurotox. Res.* 2013;23(1):79–91. DOI: 10.1007/s12640-012-9333-8
94. Fang Z.-Y., Li Z., Xiong L. et al. Magnetic stimulation influences injury-induced migration of white matter astrocytes. *Electromagn. Biol. Med.* 2010;29(3):113–121. DOI: 10.3109/15368378.2010.500568
95. Eichler A., Kleidonas D., Turi Z. et al. Microglial cytokines mediate plasticity induced by 10 Hz repetitive magnetic stimulation. *J. Neurosci.* 2023;43(17):3042–3060. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2226-22.2023
96. Chen J., Zeng Y., Hong J. et al. Effects of HF-rTMS on microglial polarization and white matter integrity in rats with poststroke cognitive impairment. *Behav. Brain Res.* 2023;439:114242. DOI: 10.1016/j.bbr.2022.114242.
97. Cullen C.L., Senesi M., Tang A.D. et al. Low-intensity transcranial magnetic stimulation promotes the survival and maturation of newborn oligodendrocytes in the adult mouse brain. *Glia.* 2019;67(8):1462–1477. DOI: 10.1002/glia.23620
98. Cullen C.L., Pepper R.E., Clutterbuck M.T. et al. Periaxonal and nodal plasticities modulate action potential conduction in the adult mouse brain. *Cell. Rep.* 2021;34(3):108641. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108641

Информация об авторах

Красильникова Анна Павловна – студент МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0006-2258-6155>

Егорова Анна Валериевна – канд. мед. наук, доцент, н. с. лаб. нейроморфологии Института мозга Научного центра неврологии, Москва, Россия; доцент каф. гистологии, эмбриологии и цитологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7112-2556>

Воронков Дмитрий Николаевич – канд. мед. наук, с. н. с. лаб. нейроморфологии Института мозга Научного центра неврологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

Пойдашева Александра Георгиевна – канд. мед. наук, н. с. группы неинвазивной нейромодуляции Института нейрореабилитации и восстановительных технологий Научного центра неврологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1841-1177>

Глинкина Валерия Владимировна – д-р мед. наук, профессор, зав. каф. гистологии, эмбриологии и цитологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8708-6940>

Сухоруков Владимир Сергеевич – д-р мед. наук, профессор, зав. лаб. нейроморфологии Института мозга Научного центра неврологии, Москва, Россия; профессор каф. гистологии, эмбриологии и цитологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0552-6939>

Вклад авторов: *Красильникова А.П.* – анализ и обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи; *Егорова А.В.* – определение общей концепции статьи, работа с текстом, редактирование статьи; *Воронков Д.Н.* – определение общей концепции статьи, руководство, работа с текстом; *Пойдашева А.Г.* – работа с текстом, редактирование статьи; *Глинкина В.В., Сухоруков В.С.* – работа с текстом, редактирование статьи, руководство и координация работы.

Information about the authors

Anna P. Krasilnikova – student, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0006-2258-6155>

Anna V. Egorova – Cand. Sci. (Med.), Assistant professor, researcher, Laboratory of neuromorphology, Brain Institute, Research Center of Neurology; Assistant professor, Department of histology, embryology and cytology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7112-2556>

Dmitry N. Voronkov – Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of neuromorphology, Brain Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

Alexandra G. Poydasheva – Cand. Sci. (Med.), researcher, Non-invasive neuromodulation group, Institute of Neurorehabilitation and Rehabilitation Technologies, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1841-1177>

Valeria V. Glinkina – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of histology, embryology and cytology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8708-6940>

Vladimir S. Sukhorukov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of neuromorphology, Brain Institute, Research Center of Neurology; Professor, Department of histology, embryology and cytology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0552-6939>

Authors' contribution. *Krasilnikova A.P.* – analysis and review of publications on the theme of the article, article writing; *Egorova A.V.* – definition of the general concept of the article, working with the text, editing the article; *Voronkov D.N.* – definition of the general concept of the article, guidance, working with the text; *Poydasheva A.G.* – working with the text, editing the article; *Glinkina V.V., Sukhorukov V.S.* – working with the text, editing the article, guidance and coordination of work.