

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი
ბიოქიმიის კათედრა

ნიკოლოზ ჟღენტი

სადოქტორო პროგრამა „ბიოლოგია“

**BDNF/PI3K/AKT/NRF2 სასიგნალო გზის როლი ნიკოტინის
ნეიროპროტექციის მოლეკულურ მექანიზმში MPTP-ით
გამოწვეული პარკინსონის დაავადების წინააღმდეგ
სამეცნიერო კვლევითი პროექტი I**

ხელმძღვანელი: პროფ. ნანა კოშორიძე
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
თსუ-ს ბიოქიმიის კათედრის გამგე

თბილისი
2025 წ.

სარჩევი

ანოტაცია.....	3
შესავალი.....	4
კვლევის მასალა და მეთოდები.....	5
შედეგები.....	10
შედეგების განხილვა.....	16
გამოყენებული ლიტერატურა.....	18

ანოტაცია

პარკინსონის დაავადება (PD) რიგით მეორე ნეიროდეგენერაციული დაავადებაა, რომელიც ხასიათდება შუა ტვინის შავი სუბსტანციის დოფამინერგული ნეირონების პროგრესირებადი კარგვით. ამ პროცესში ცენტრალურ როლს თამაშობს ოქსიდაციური სტრესი და აპოპტოზი. ეპიდემიოლოგიური მტკიცებულებები მიუთითებს, რომ ნიკოტინი ავლენს ნეიროპროტექტორულ ეფექტებს პარკინსონის დაავადების მიმართ და იგი ასოცირებულია პარკინსონის დაავადების განვითარების ალბათობასთან უკუპროპორციულად, მაგრამ, თუ რა მოლეკულური მექანიზმები უდევს აღნიშნულ ეფექტს საფუძვლად გაურკვეველია. აღნიშნული კვლევის მიზანია, შევისწავლოთ ამცირებს თუ არა ნიკოტინი MPTP-ით გამოწვეულ ნეიროტოქსიკურობას თავგებში BDNF/PI3K/AKT/Nrf2 სიგნალიზაციის გზის მოდულაციის გზით.

ამისათვის, BALB/c ხაზის მამრი თაგვები დაიყო საკონტროლო, ნიკოტინის, MPTP და MPTP+ნიკოტინის ჯგუფებად. ჰისტოლოგიურმა ანალიზმა აჩვენა, რომ ნიკოტინმა მნიშვნელოვნად შეამცირა MPTP-ით გამოწვეული ნეირონული პიკნოზი და შეინარჩუნა თიროზინ ჰიდროქსილაზა-დადებითი დოფამინერგული ნეირონების რაოდენობა. ბიოქიმიურმა ანალიზმა აჩვენა, რომ ნიკოტინმა შეამცირა MPTP-ით გამოწვეული მალონის დიალდეჰიდის, ლაქტატდეჰიდროგენაზასა და ლაქტატის/პირუვატის თანაფარდობის ზრდა, ხოლო აღადგინა კომპლექსი I აქტივობა და ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობები (SOD, CAT, GPx, GR). ვესტერნ ბლოტინგმა აჩვენა, რომ ნიკოტინმა აღმოფხვრა MPTP-ით გამოწვეული ფოსფორილირებული PI3K, AKT და Nrf2-ის დათრგუნვა და აპოპტოზური სიგნალიზაცია გადახარა გადარჩენისკენ Bcl-2-ის გაზრდით და Bax-ისა და Bad-ის შემცირებით.

მნიშვნელოვანია, რომ ნიკოტინმა აღადგინა BDNF-ის დონე შავ სუბსტანციაში და ex vivo ექსპერიმენტებმა დაადასტურა, რომ ნიკოტინი ზრდის BDNF-ს $\alpha 7$ ნიკოტინური აცეტილქოლინის რეცეპტორის გააქტიურების გზით. ეს შედეგები მიუთითებს, რომ ნიკოტინი უზრუნველყოფს ნეიროპროტექციას PI3K/AKT/Nrf2 ღერძის BDNF-ით განპირობებული გააქტიურების გაძლიერებით, რაც იწვევს ანტიოქსიდანტური დაცვისა და ანთიაპოპტოზური სიგნალიზაციის გაუმჯობესებას.

დასასრულს, ნიკოტინი ამცირებს MPTP-ით გამოწვეულ დოფამინერგულ ნეიროდეგენერაციას BDNF/PI3K/AKT/Nrf2 სიგნალიზაციის გზით. მიუხედავად იმისა, რომ ნიკოტინის დამოკიდებულების თვისებები ზღუდავს მის თერაპიულ გამოყენებას, ნიკოტინური გზების შერჩევითი მიზანში ამოღება შეიძლება წარმოადგენდეს დაავადების მოდიფიცირების პერსპექტიულ სტრატეგიას PD-ში. ჩვენი შედეგები აჩვენებს, რომ ნიკოტინი იცავს დოფამინერგულ ნეირონებს BDNF-დამოკიდებული PI3K/AKT/Nrf2 სიგნალიზაციის გააქტიურებით.

საკვანძო სიტყვები: პარკინსონის დაავადება, ნიკოტინი, BDNF, PI3K/AKT, NRF2, ოქსიდაციური სტრესი, ნეიროპროტექცია.

1. შესავალი

პარკინსონის დაავადება (PD), გავრცელებით რიგით მეორე, პროგრესირებადი ნეიროდეგენერაციული აშლილობა, რომელიც ხასიათდება ძირითადად შავი სუბსტანციის კომპაქტური ნაწილის დოფამინერგული ნეირონების შერჩევითი დეგენერაციით, რაც იწვევს სტრიატალური დოფამინის ღრმა დაქვეითებას და ბაზალური განგლიების სისტემის შემდგომ დისფუნქციას [1,2]. კლინიკურად, PD ვლინდება მოტორული სიმპტომებით, რომელიც ცნობილია პარკინსონის ტეტრადის სახელწოდებით და მოიცავს ბრადიკინეზიას, მოსვენების ტრემორს, კუნთების რიგიდულობასა და პოსტურალურ არასტაბილურობას, ასევე მთელი რიგი არამოტორული დარღვევებით, როგორებიცაა კოგნიტური დარღვევა, აფექტური აშლილობები და ავტონომიური დისფუნქცია [3–5]. უჯრედულ დონეზე, ალფა-სინუკლეინის პათოლოგიური აგრეგაცია ლევის სხეულებში ითვლება დაავადების განმსაზღვრელ მახასიათებლად. ითვლება, რომ ეს აგრეგატები იწყებენ პროცესების კასკადს, რომელიც მოიცავს მიტოქონდრიულ დისფუნქციას, ოქსიდაციურ დაზიანებას, აუტოფაგიის დარღვევას და ნეიროანთებით გააქტიურებას, რაც სინერგიულად ხელს უწყობს ნეირონების სიკვდილს [6–8].

მიუხედავად იმისა, რომ დოფამინის ჩანაცვლებითი თერაპია L-3,4-დიჰიდროქსიფენილალანინით (L-DOPA) რჩება PD მართვის ქვაკუთხედად, მისი თერაპიული ეფექტურობა შემოიფარგლება სიმპტომური შემსუბუქებით. დოფამინის დაქვეითებული დონის შევსებით, L-DOPA უზრუნველყოფს გარდამავალ ფუნქციურ აღდგენას. თუმცა, ის არ ცვლის ნეიროდეგენერაციის გამომწვევ მიზეზებს, ისეთ

პათოგენუ მექანიზმების, როგორცაა ოქსიდაციური სტრესი, ლიპიდების ზეჟანგვითი დაჟანგვა, აპოპტოზი და ნეიროტრანსმიტერების დისბალანსი, მათ შორის სტრიატალური ჰიპერქოლინერგია [9, 10, 11]. შესაბამისად, კვლავ არსებობს გადაუდებელი საჭიროება იმგვარი ინტერვენციებისა, რომლებიც მიმართული იქნება ნეირონების გადარჩენის მოლეკულურ დეტერმინანტებზე.

ეპიდემიოლოგიურმა კვლევებმა აჩვენა მჭიდრო უკუკავშირი თამბაქოს მოწევისა და PD-ის განვითარების რისკს შორის, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ ნიკოტინს, თამბაქოს მთავარ ალკალოიდს, შესაძლოა ჰქონდეს ნეიროპროტექტორული თვისებები [12-15]. ექსპერიმენტულმა კვლევებმა სხვადასხვა *in vitro* და *in vivo* მოდელებზე წარმოადგინა ამ ჰიპოთეზის მხარდამჭერი მტკიცებულება, რომელიც მოიცავს მრავალ მექანიზმს, მათ შორის ნიკოტინური აცეტილქოლინის რეცეპტორების (nAChRs) მოდულაციას, ანთებითი პასუხების რეგულირებას და უჯრედშიდა სიგნალიზაციის გზების გააქტიურებას, რომლებიც მნიშვნელოვანია ნეიროპროტექციისთვის [16–20].

მათ შორის, PI3K/AKT სიგნალიზაციის კასკადმა განსაკუთრებული ყურადღება მიიპყრო ნეირონების გადარჩენის ხელშეწყობაში მისი გადამწყვეტი როლის გამო [21, 22]. იმის გათვალისწინებით, რომ BDNF არის PI3K/AKT სასიგნალო გზის აქტივატორია, საინტერესო იყო ნიკოტინის ნეიროპროტექტორულ ეფექტსა და პარკინსონის დაავადების დროს BDNF დონის ცვლილებებს შორის ურთიერთობის შესწავლა [23, 24]. გარდა ამისა, საინტერესო იყო ნიკოტინის ანტიოქსიდანტურ ეფექტსა და Nrf2-ს შორის ურთიერთობის შესწავლა, რომელიც არის PI3K/AKT სიგნალიზაციის გზის სამიზნე. როგორც ცნობილია, Nrf2, თავის მხრივ, არის ტრანსკრიფციის ფაქტორი, რომელიც დაკავშირებულია ანტიოქსიდანტური ფერმენტების სინთეზის გზით ანტიოქსიდანტური უჯრედული პასუხის გაძლიერებასთან [25, 26].

2. კვლევის მასალა და მეთოდები

2.1 საკვლევი ობიექტი

კვლევა ჩატარდა 180 BALB/c ხაზის, 8 კვირის ასაკის, წონით 23 ± 2 გ მამრ ლაბორატორიულ თაგვზე. ცხოველების განთავსება, მოვლა და ტესტირება

განხორციელდა "ლაბორატორიული ცხოველების მოვლისა და გამოყენების სახელმძღვანელოს" [27] მიხედვით, ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის ბიოლოგიის დეპარტამენტში და მის ვივარიუმში. კვლევის განმავლობაში თაგვებს შეუზღუდავი წვდომა ჰქონდათ როგორც წყალზე, ასევე სტანდარტული ლაბორატორიული ხარისხის საკვებზე. ოთახის ტემპერატურა მკაცრად შენარჩუნებული იყო $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ -ზე, რათა უზრუნველყოფილი ყოფილიყო სტაბილური და კომფორტული გარემო ცხოველებისთვის. გარდა ამისა, თაგვები იმყოფებოდნენ კონტროლირებად 12-საათიან სინათლე-სიბნელის ციკლში, მათი ბუნებრივი ცირკადული რიტმის იმიტირებისთვის.

2.2 კვლევის დიზაინი

ექსპერიმენტული პროცედურის დაწყებამდე თაგვებს მიეცათ 7 დღიანი პერიოდი ვივარიუმის პირობებთან აკლიმატიზაციისთვის (ჰაბიტუაცია). ამ ადაპტაციის ფაზის შემდეგ, ისინი შემთხვევითად დაიყო ოთხ განსხვავებულ ექსპერიმენტულ ჯგუფად, თითოეული 45 თაგვის შემადგენლობით:

- ჯგუფი 1 (G1): თაგვებს უკეთდებოდათ ოთხი ინექცია სტერილური ფიზიოლოგიური ხსნარით (0.9% NaCl) 2-საათიანი ინტერვალებით, 10მლ/კგ მოცულობით, კანქვეშ.
- ჯგუფი 2 (G2): თაგვებს უკეთდებოდათ ოთხი ინექცია სტერილური ფიზიოლოგიური ხსნარით (0.9% NaCl) 2-საათიანი ინტერვალებით, 10მლ/კგ მოცულობით, კანქვეშ. ინექციიდან 72 საათის შემდეგ კი იღებდნენ სასმელ წყალს, რომელიც შეიცავდა ნიკოტინის ბიტარტრატს 14მგ/კგ დოზით, ad libitum 14 დღის განმავლობაში.
- ჯგუფი 3 (G3): თაგვებს უკეთდებოდათ ოთხი ინტრადერმული ინექცია MPTP-ით 2-საათიანი ინტერვალებით, 12მგ/კგ დოზით, 10მლ/კგ მოცულობით.
- ჯგუფი 4 (G4): თაგვებს ინტრადერმულად უკეთდებოდათ MPTP იმავე პროტოკოლით, როგორც G3 ჯგუფში, ხოლო ინექციიდან 72 საათის შემდეგ მათ მიეცათ ნიკოტინის წყალხსნარი 14 დღის განმავლობაში, G2 ჯგუფის მსგავსად.

როგორც ნეიროტოქსინის, ასევე ნიკოტინის დოზა განისაზღვრა არსებული ლიტერატურული მონაცემების საფუძველზე [28, 29]. გასათვალისწინებელია, რომ ნიკოტინი პოლარიზებულია პერორალურად მიღებისას და მხოლოდ დაახლოებით

20-30% შეიწოვება. შესაბამისად, 10 მგ/კგ დოზა (თავისუფალი ფუძის ნიკოტინი) უდრის 0.3-0.4 მგ/კგ ტრანსდერმული ან ინტრავენური შეყვანისას [30]. ეს მნიშვნელოვანია, რადგან ეს დოზა პრაქტიკულად უსაფრთხოა გამოსაყენებლად და უტოლდება იმ თერაპიულ დოზას, რომელიც მიღებულია ფარმაკოლოგიაში ჩანაცვლებითი თერაპიების შემთხვევაში (მაგ. დერმალური პატჩები და ა.შ). ნიკოტინის ხსნარი მზადდებოდა ყოველდღიურად. კვლევის მეჩვიდმეტე დღეს, თითოეული ჯგუფის ცხოველები დაექვემდებარნენ ევთანაზიას საერთაშორისო გაიდლაინების შესაბამისად (ცხოველთა ევთანაზიის AVMA გაიდლაინები: 2020 წლის გამოცემა). ცხოველების ევთანაზიის შემდეგ მოვახდინეთ მათი დეკაპიტაცია. შემდეგ ამოვიღეთ ტვინების ნაწილი ($n = 35$ / ჯგუფზე). მღრღნელების ტვინის კორონალური მატრიცის (RBMS-200C), სტერეომიკროსკოპის (Laxco LMS-Z230PMZS33) და თავის ტვინის ატლასის [31] გამოყენებით, ამოვკვეთეთ შავი სუბსტანცია და გავყინეთ -40°C -ზე.

ტვინების დანარჩენი ნაწილი ($n = 10$ / ჯგუფზე) ამოვიღეთ და დავაფიქსირეთ 4%-იან პარაფორმალდეჰიდის ხსნარში, რომელიც დამზადებული იყო 0.1 M ფოსფატის ბუფერულ ხსნარზე (pH 7.4) 48 საათის განმავლობაში 4°C -ზე, შემდეგ კი მოვახდინეთ დეჰიდრატაცია იყო სპირტებსა და ქსილოლში.

2.3 ჰისტოლოგიური და იმუნოჰისტოლოგიური შეღებვა

ფიქსირებული ტვინის ქსოვილები ჩავაყალიბეთ პარაპლასტში და დავჭერით 5 მკმ სისქის ანათლებად.

ნისლის შეღებვისთვის, მონაკვეთები გაიწმინდა პარაფინისგან, რეჰიდრირდა, შეიღება 0.1% კრეზილის იისფერით 30 წუთის განმავლობაში და დიფერენცირდა მმარმჟავა/სპირტში (pH 3.0). პიკნოზური ინდექსი (PI) გამოითვალა შემდეგნაირად: $PI = (\text{პიკნოზური ნეირონების რაოდენობა} / \text{ნეირონების ჯამური რაოდენობა}) \times 100$, substantia nigra-ს ხუთი უბნის დათვლის საფუძველზე (100×10 გადიდება) [32].

იმუნოჰისტოქიმიისთვის ანტიგენის აღდგენა ჩატარდა 0.1M ციტრატულ ბუფერში (pH 6.0). ანათლები გაირეცხა PBS-ში და ინკუბირებული იყო 10 წუთის განმავლობაში 3% H_2O_2 -ში, რასაც მოჰყვა ბლოკირება 2% BSA-ით (Sigma A9647) 37°C -ზე (30 წთ), ანტისხეულთან - თიროზინ ჰიდროქსილაზა-HRP (1:50; Santa Cruz Biotechnology)

ინკუბაციამდე 1.5 სთ. შეღებვა ვიზუალიზებული იყო 3,3'-დიამინობენზიდინით (DAB) (SIGMAFAST™ DAB (D4418)) და კონტრასტისთვის შეიღება მეიერის ჰემატოქსილინით. TH-დადებითი ნეირონები დავითვალეთ 100×10 გადიდებით.

2.4 ოქსიდაციური სტრესის მარკერების განსაზღვრა

ოქსიდაციური სტრესი შეფასდა მალონდიალდეჰიდის (MDA) კონცენტრაციის განსაზღვრით (Cat# MBS822354), ლაქტატდეჰიდროგენაზას (LDH) აქტივობით (Cat# MBS822351), ლაქტატი/პირუვატის თანაფარდობით (Cat# MBS9718968, Cat# MBS8243217) და მიტოქონდრიული კომპლექსი I-ის აქტივობით (Cat# MBS4504360). ყველა ცდა ჩატარდა კომერციული ნაკრების გამოყენებით მწარმოებლების პროტოკოლების შესაბამისად.

2.5 ანტიოქსიდანტური ფერმენტების განსაზღვრა

ანტიოქსიდანტური დაცვის სისტემის შესასწავლად, ჩვენ განვსაზღვრეთ სუპეროქსიდ დისმუტაზას (SOD), კატალაზას (CAT), გლუტათიონ პეროქსიდაზას (GPx) და გლუტათიონ რედუქტაზას (GR) აქტივობები. ამ მიზნით გამოვიყენეთ შემდეგი ტესტ-სისტემები: MBS2540402; MBS8243260; MBS8309603; MBS032418.

2.6 ნიმუშების მომზადება, გელ ელექტროფორეზი და იმუნობლოტინგი

Substantia nigra-ს ქსოვილის ნიმუშები ჰომოგენიზირებული იყო ბუფერში, რომელიც შეიცავდა: 20 მმ ტრის-HCl (pH 7.4), 0.32M საქაროზაში, 1mM EDTA-ში და პროტეაზას ინჰიბიტორების ნაკრებს (Sigma, Cat# P8340). ცენტრიფუგირების შემდეგ 1000 × გ-ზე 10 წუთის განმავლობაში, შეგროვდა ბირთვებისაგან თავისუფალი სუპერნატანტი. მოცულობები, რომლებიც შეიცავდა მთლიანი ცილის 30 მკგ-ს, დაიყო SDS-PAGE-ის საშუალებით, რის შემდეგაც გადავიტანეთ მემბრანებზე სტანდარტული ელექტრობლოტინგის პროცედურების გამოყენებით [33]. მემბრანები დაიბლოკა 5% BSA-ით და ინკუბირებული იყო ღამით 4 °C-ზე პირველად ანტისხეულებთან, რომლებიც განზავებული იყო TBST + 3% BSA-ში. TBST-ით გარეცხვის შემდეგ, გამოყენებული იყო HRP-კონიუგირებული მეორადი ანტისხეულები და დეტექცია ჩატარდა SuperSignal West Pico ქემილუმინესცენტური სუბსტრატის გამოყენებით. გამოყენებული პირველადი ანტისხეულები იყო: PI3K p85 (#4292), phosphor-PI3K p85

(Tyr458, #4228), AKT (#9272) და phospho-AKT (Ser473, #9271) Cell Signaling Technology-დან; NRF2 (sc-365949 HRP), Bcl-2 (sc-509 HRP), Bax (sc-8044 HRP) და Bad (sc-23959 HRP) Santa Cruz Biotechnology-დან. β - α ქტინი გამოიყენებოდა როგორც ჩატვითვის კონტროლი (Santa Cruz, sc-81760, 1:1000), HRP-კონიუგირებულ მეორად ანტისხეულთან ერთად (Santa Cruz, 1:2000). ზოლები ვიზუალიზებული იყო რენტგენის ფირზე და დენსიტომეტრიული ანალიზი ჩატარდა ImageJ-ის გამოყენებით (v1.53k, NIH), ადრე აღწერილი დადგენილი კალიბრაციისა და რაოდენობრივი განსაზღვრის პროტოკოლების მიხედვით [34]. ყველა ნიმუში გაშვებული იყო პარალელურად და ნორმალიზებული იყო 30 მკგ ცილის სტანდარტის მიმართ.

2.7 BDNF დონის შესწავლა *in vitro* და *in vivo*

ტვინიდან მიღებული ნეიროტროფიული ფაქტორის (BDNF) კონცენტრაცია გაიზომა ELISA ნაკრების გამოყენებით (MBS8420386). ნიკოტინის მოქმედების უშუალო მექანიზმის შესასწავლად, *Ex vivo* ექსპერიმენტები ჩატარდა 300 მკმ სისქის კორონალური ტვინის ნაჭრების გამოყენებით. ნაჭრები შენარჩუნებული იყო ხელოვნურ ცერებროსპინალურ სითხეში (aCSF), რომელიც შედგებოდა 124 მმ NaCl, 3 მმ KCl, 1.25 მმ NaH_2PO_4 , 1 მმ MgSO_4 , 2 მმ CaCl_2 , 26 მმ NaHCO_3 და 10 მმ D-გლუკოზისგან, დარეგულირებული pH 7.4-მდე [35-37].

გამოყენებული იყო ხუთი ექსპერიმენტული ჯგუფი: საკონტროლო ანათლები დამუშავებული მხოლოდ aCSF-ით; ანათლები დამუშავებული ნიკოტინით (10 მკმ); ანათლები დამუშავებული ნიკოტინით მეთილიაკაკონიტინის (MLA, 50nM) თანაობისას, რომელიც $\alpha 7$ ნიკოტინური აცეტილქოლინის რეცეპტორის შერჩევითი ანტაგონისტია; ანათლები დამუშავებული აცეტილქოლინით (50 მკმ); და ანათლები დამუშავებული აცეტილქოლინით ატროპინის თანაობისას (5 მკმ), რომელიც მუსკარინული რეცეპტორის ანტაგონისტია.

ერთსაათიანი ინკუბაციის შემდეგ (4°C), ნაჭრები ხუთჯერ გადაირეცხა ცივი aCSF-ით. შემდეგ substantia nigra ამოიკვეთა, ჰომოგენიზირდა და განისაზღვრა BDNF -ის დონე.

2.8 სტატისტიკური ანალიზი

ყველა მონაცემი წარმოდგენილია, როგორც საშუალო მონაცემი $\pm$ საშუალო არითმეტიკულის სტანდარტული ცდომილება (SEM). სტატისტიკური ანალიზი ჩატარდა GraphPad Prism 9.0-ის გამოყენებით (GraphPad Software, USA). Shapiro–Wilk-ის ტესტი გამოყენებულ იქნა მონაცემთა განაწილების ნორმალურობის შესაფასებლად. ორმხრივი დისპერსიული ანალიზი (two-way ANOVA) გამოყენებულ იქნა MPTP-ისა და ნიკოტინის მკურნალობის ძირითადი ეფექტების, ისევე როგორც მათი ურთიერთქმედების შესაფასებლად. Tukey-ის post hoc ტესტი გამოყენებულ იქნა ჯგუფებს შორის შედარებისთვის. განსხვავებები სტატისტიკურად მნიშვნელოვნად ითვლებოდა, როცა $P \leq 0.05$.

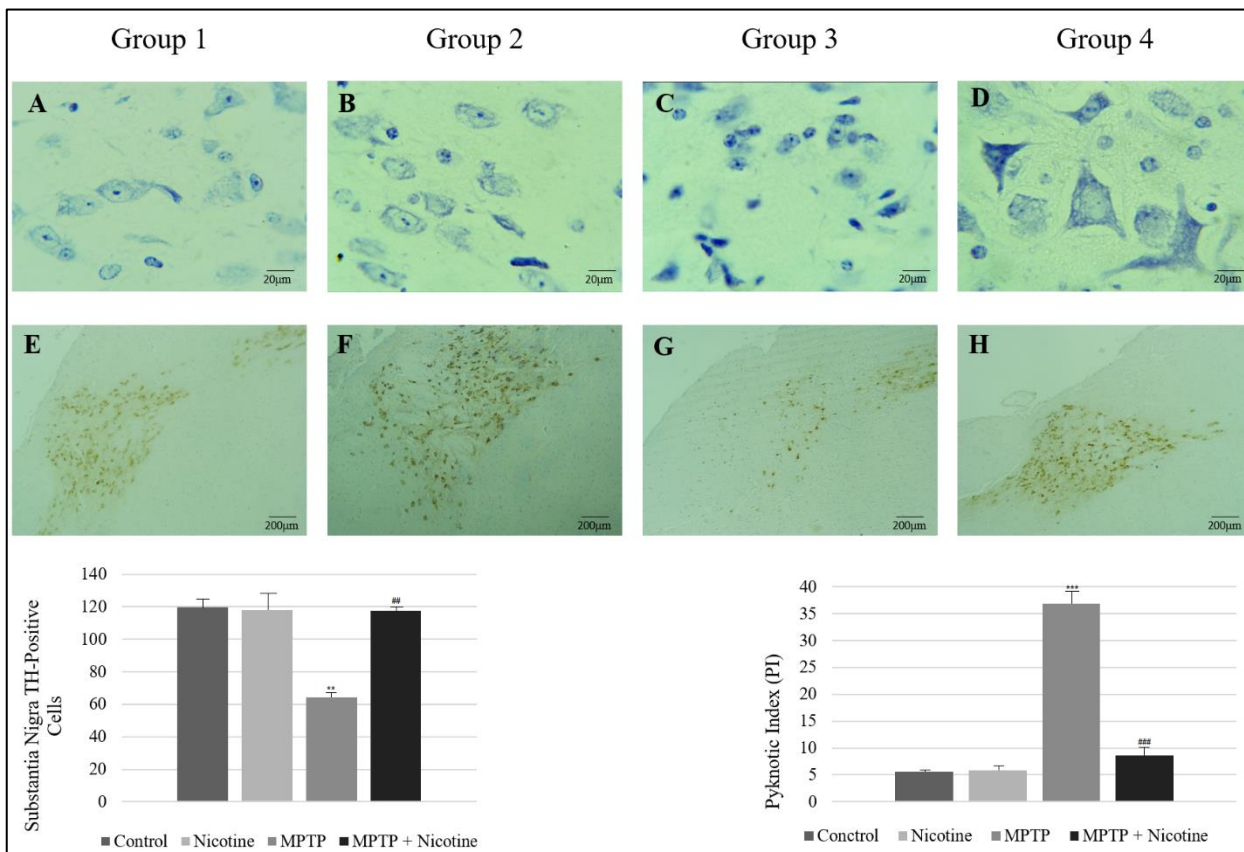
3. შედეგები

3.1 ჰისტოლოგიური და იმუნოჰისტოქიმიური შედეგა

იმის დასადგენად, ახდენს თუ არა ნიკოტინი ნეიროპროტექტორულ ეფექტს პარკინსონის დაავადების წინააღმდეგ და იცავს თუ არა ნეირონებს აპოპტოზისგან, ჩვენ შევისწავლეთ შავი სუბსტანციის ჰისტოლოგია. ჰისტოლოგიური ანალიზი ჩატარდა ნისლის შედეგის გამოყენებით, ხოლო დოფამინერგული ნეირონების გადარჩენა შეფასდა თიროზინ ჰიდროქსილაზას (TH) იმუნოჰისტოქიმიით (სურათი 1).

პიკნოზური ინდექსი, რომელიც ასახავს ბირთვული კონდენსაციის ქვეშ მყოფი ნეირონების პროპორციას, მნიშვნელოვნად გაიზარდა MPTP-ით ზემოქმედების შედეგად ($F_{1,36} = 42.17$, $P < 0.001$), რაც მიუთითებს გამოხატულ ნეიროდეგენერაციაზე. ნიკოტინმა გამოავლინა მნიშვნელოვანი დამცველობითი ეფექტი ($F_{1,36} = 26.40$, $P < 0.001$). რაც აჩვენებს, რომ ნიკოტინმა დიდწილად აღკვეთა MPTP-ით გამოწვეული ნეირონული პიკნოზი ($F_{1,36} = 21.12$, $P < 0.001$). MPTP+ნიკოტინის ჯგუფში პიკნოზურობის ინდექსი დაუბრუნდა ნორმის ფარგალს. პარალელურად, TH-დადებითი ნეირონების რაოდენობა, რომელიც წარმოადგენს დოფამინერგულ უჯრედებს, მნიშვნელოვნად შემცირდა MPTP-ის შეყვანის შემდეგ ($F_{1,36} = 16.96$, $P < 0.001$). ნიკოტინს ჰქონდა მნიშვნელოვანი ძირითადი ეფექტი ($F_{1,36} = 19.25$, $P < 0.001$), რაც მიუთითებს, რომ ნიკოტინმა აღადგინა TH იმუნორეაქტიულობა და

დოფამინერგული უჯრედების რაოდენობა კონტროლის დონემდე ($F_{1,36} = 10.32$, $P < 0.01$). ეს შედეგები აჩვენებს, რომ ნიკოტინი ამცირებს MPTP-ით გამოწვეულ ნეიროტოქსიკურობას, რაც აისახება როგორც სტრუქტურულ მთლიანობაში (ნისლის შეღებვა), ასევე დოფამინერგული ნეირონების შენარჩუნებაში (TH იმუნოშეღებვა).

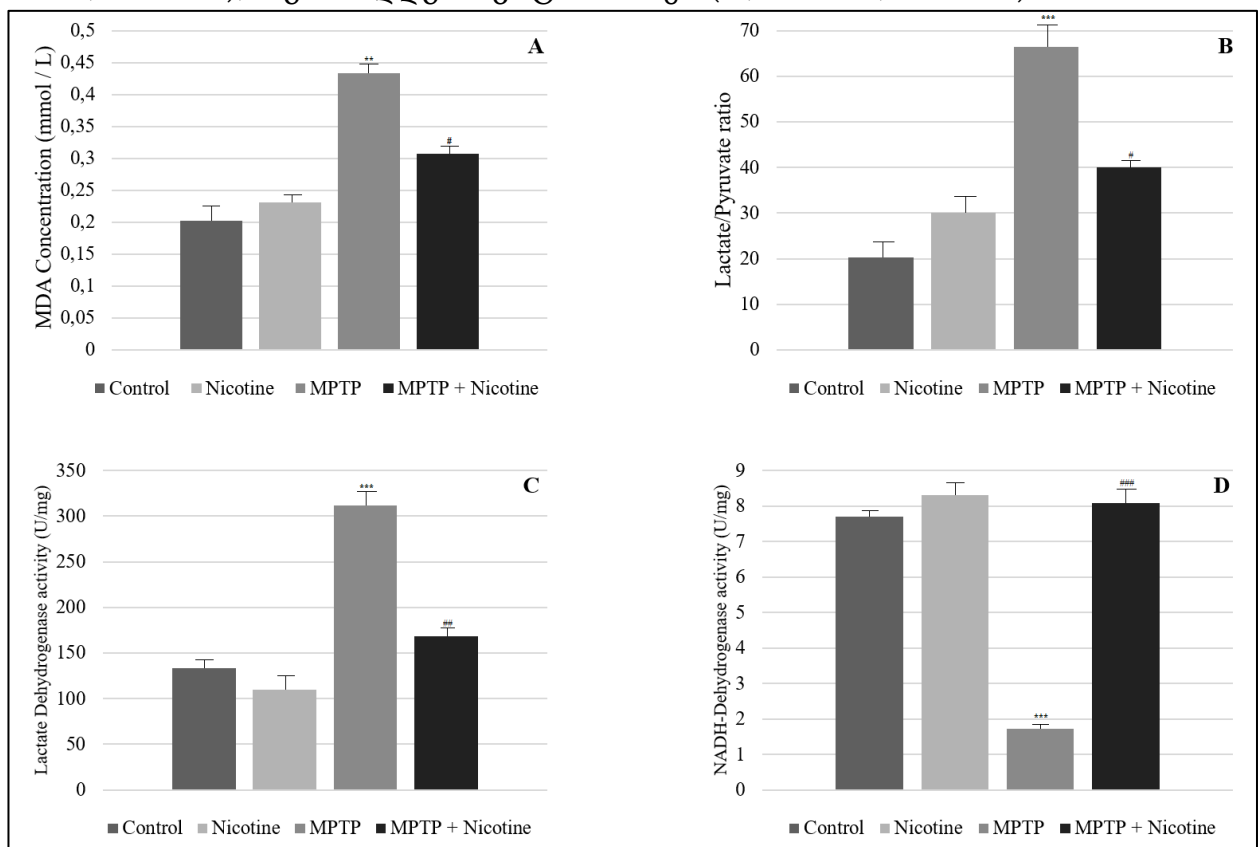


სურათი 1. ნიკოტინის ეფექტი MPTP-ით გამოწვეულ ნეიროდეგენერაციაზე შავი სუბსტანციის ნეირონებში. შავი სუბსტანციის უბნის ჰისტოლოგიური ანალიზი ნისლის შეღებვის გამოყენებით $100\times$ გადიდებაზე (A–D) და თიროზინ ჰიდროქსილაზას (TH) იმუნოჰისტოქიმია $10\times$ გადიდებაზე (E–H). (a) სვეტოვანი დიაგრამა, რომელიც წარმოადგენს TH-დადებითი ნეირონების საერთო რაოდენობას. (b) სვეტოვანი დიაგრამა, რომელიც წარმოადგენს პიკნოზურობის ინდექსს. მონაცემები წარმოადგენს საშუალოს $\pm$ SEM. ანოტაციები: $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$ შედარებულია საკონტროლო ჯგუფთან (ჯგუფი I); $^{\#}P \leq 0.05$, $^{\#\#}P \leq 0.01$, $^{\#\#\#}P \leq 0.001$ შედარებულია MPTP ჯგუფთან (ჯგუფი III).

3.2 ოქსიდაციური სტრესი და ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობა

პარკინსონის დაავადების პათოგენეზში ოქსიდაციური სტრესის ცენტრალური როლისა და ნიკოტინის დაკვირვებული ნეიროპროტექტორული ეფექტის გათვალისწინებით, შემდეგ შევაფასეთ ოქსიდაციური დაზიანება (სურათი 2). მალონის დიალდეჰიდი (MDA), ლიპიდების ზეჟანგვითი დაჟანგვის პროდუქტი, მნიშვნელოვნად იყო მომატებული MPTP ჯგუფში ($F_{1,56} = 56.54$; $P < 0.001$). ხოლო

ნიკოტინმა შეამცირა MDA-ს დონე ($F_{1,56} = 6.41$; $P < 0.05$). ლაქტატის/პირუვატის თანაფარდობა ასევე მნიშვნელოვნად იყო მომატებული MPTP-ით დამუშავებულ ცხოველებში ($F_{1,56} = 95.08$; $P < 0.001$), ნიკოტინი კი ავლენდა ძლიერ აღმდგენ ეფექტს ($F_{1,56} = 28.67$; $P < 0.001$). ლაქტატდეჰიდროგენაზას (LDH) აქტივობა მნიშვნელოვნად გაიზარდა MPTP ჯგუფში ($F_{1,56} = 147.71$; $P < 0.001$), ხოლო ნიკოტინმა მნიშვნელოვნად შეასუსტა ეს მატება ($F_{1,56} = 53.89$; $P < 0.001$). NADH დეჰიდროგენაზას (კომპლექსი I) აქტივობა, MPTP-ის პირდაპირი სამიზნე, მნიშვნელოვნად შემცირდა MPTP-ით ($F_{1,56} = 70.12$; $P < 0.001$), მაგრამ აღდგა ნიკოტინის მიერ ($F_{1,56} = 85.77$; $P < 0.001$).

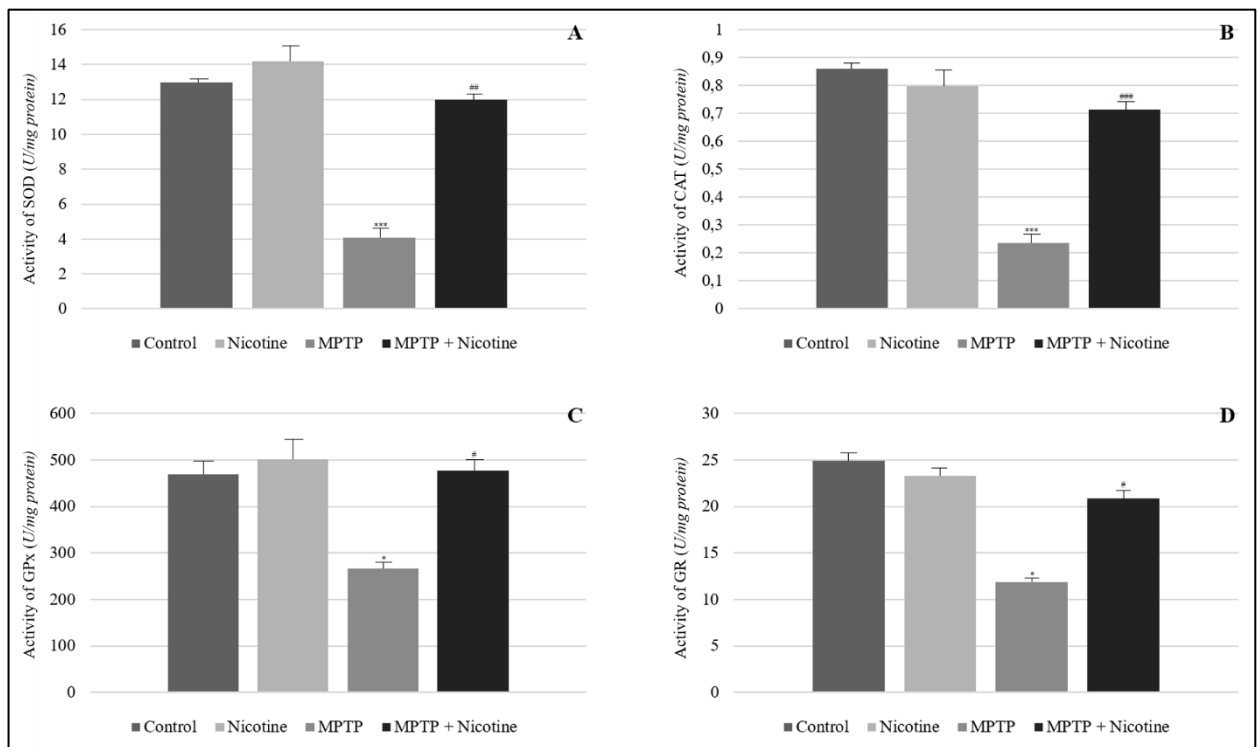


სურათი 2. ოქსიდაციური სტრესის მარკერები (A) და ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობა (U/მგ ცილაზე): მალონდიალდეჰიდის კონცენტრაცია (A); ლაქტატის/პირუვატის თანაფარდობა (B); ლაქტატდეჰიდროგენაზას (LDH) აქტივობა (C); NADH დეჰიდროგენაზას (კომპლექსი I) აქტივობა (D). მონაცემები წარმოადგენს საშუალოს $\pm$ SEM თითო ჯგუფში 15 ცხოველიდან. სტატისტიკური ანალიზი ჩატარდა ორმხრივი ANOVA-ს გამოყენებით, რასაც მოჰყვა Tukey-ის post hoc ტესტები. მნიშვნელოვნების აღნიშვნები: $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, $P \leq 0.001$ საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (ჯგუფი I); $\#P \leq 0.05$, $\#P \leq 0.01$, $\#P \leq 0.001$ MPTP ჯგუფთან შედარებით (ჯგუფი III). მხოლოდ ნიკოტინით მკურნალობა (ჯგუფი II) მნიშვნელოვნად არ განსხვავდებოდა კონტროლისგან (ჯგუფი I).

ამ შედეგების დასადასტურებლად გაიზომა ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობები (სურათი 3). სუპეროქსიდ დისმუტაზას (SOD) აქტივობა შემცირდა MPTP-

ით ($F_{1,56} = 130.70$; $P < 0.001$), ხოლო ნიკოტინმა შეცვალა ეს ეფექტი ($F_{1,56} = 67.71$; $P < 0.001$). კატალაზამ აჩვენა მსგავსი სურათი (MPTP: $F_{1,56} = 78.54$; $P < 0.001$; ნიკოტინი: $F_{1,56} = 36.51$, $P < 0.001$). გლუტათიონ პეროქსიდაზას (GPx) აქტივობა მნიშვნელოვნად შემცირდა MPTP-ით ($F_{1,56} = 25.00$; $P < 0.001$) და გაუმჯობესდა ნიკოტინის მიერ ($F_{1,56} = 24.42$; $P < 0.001$). გლუტათიონ რედუქტაზას (GR) აქტივობა ანალოგიურად დათრგუნა MPTP-მ ($F_{1,56} = 121.57$; $P < 0.001$) და აღადგინა ნიკოტინმა ($F_{1,56} = 16.22$; $P < 0.001$; ურთიერთქმედება: $F_{1,56} = 57.46$; $P < 0.001$).

მნიშვნელოვანი განსხვავებები არ გამოვლენილა საკონტროლო და მხოლოდ ნიკოტინის ჯგუფებს შორის.



სურათი 3. ოქსიდაციური სტრესის მარკერები (A) და ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობა (U/მგ ცილაზე): მალონდიალდეჰიდის კონცენტრაცია (A); ლაქტატის/პირუვატის თანაფარდობა (B); ლაქტატდეჰიდროგენაზას (LDH) აქტივობა (C); NADH დეჰიდროგენაზას (კომპლექსი I) აქტივობა (D); სუპეროქსიდდისმუტაზა (E); კატალაზა (F); გლუტათიონ პეროქსიდაზა (G); გლუტათიონ რედუქტაზა (H). მონაცემები წარმოადგენს საშუალოს $\pm$ SEM თითო ჯგუფში 15 ცხოველიდან. სტატისტიკური ანალიზი ჩატარდა ორმხრივი ANOVA-ს გამოყენებით, რასაც მოჰყვა Tukey-ის post hoc ტესტები. მნიშვნელოვნების აღნიშვნები: $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, $P \leq 0.001$ საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (ჯგუფი I); # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$, ### $P \leq 0.001$ MPTP ჯგუფთან შედარებით (ჯგუფი III). მხოლოდ ნიკოტინით მკურნალობა (ჯგუფი II) მნიშვნელოვნად არ განსხვავდებოდა კონტროლისგან (ჯგუფი I).

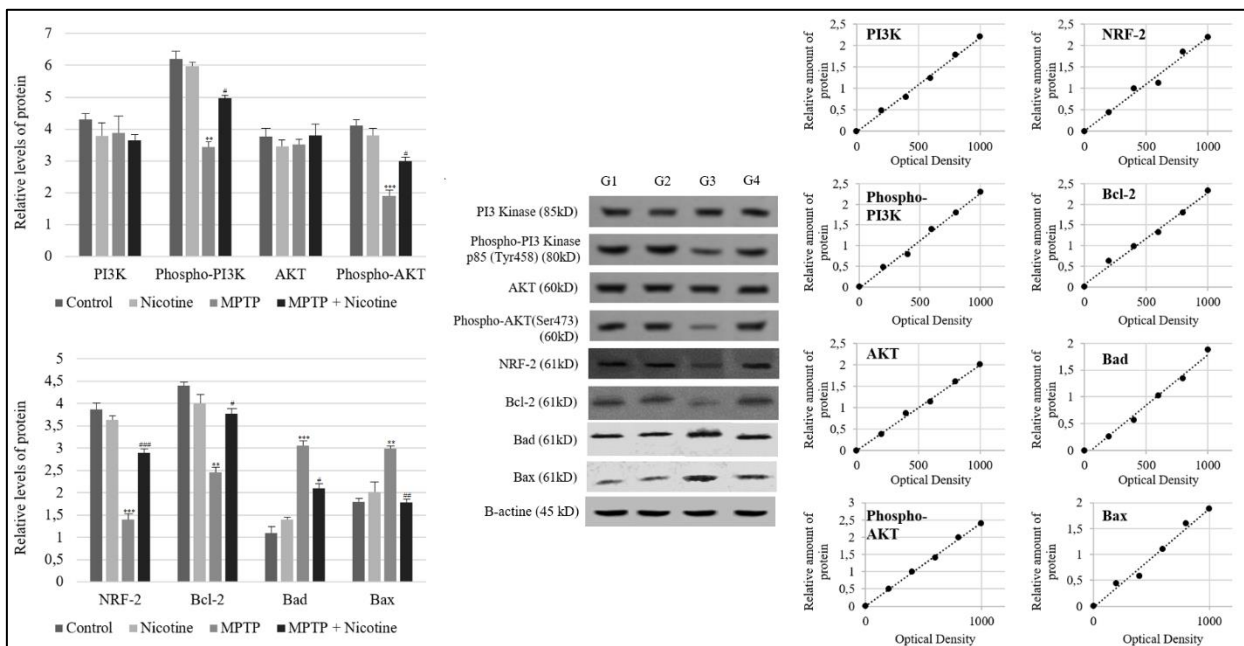
3.3 სიგნალინგის გზები

იმის გათვალისწინებით, რომ ნიკოტინი აძლიერებდა ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობას, ხოლო NRF2 არის ამ გზის ძირითადი ტრანსკრიპციული რეგულატორი, ჩვენ შევისწავლეთ PI3K/AKT/NRF2 სასიგნალო კასკადი (სურათი 4).

ჯამური PI3K-ისა და AKT-ის ექსპრესიის დონე მნიშვნელოვნად არ შეცვლილა MPTP-ით ან ნიკოტინით მკურნალობის შედეგად (PI3K: $F_{1,76} = 1.68$, $P = 0.198$; AKT: $F_{1,76} = 0.001$, $P = 0.974$), რაც მიუთითებს, რომ არცერთს არ მოუხდენია გავლენა ჯამური ცილის რაოდენობაზე. თუმცა, ფოსფორილირებული PI3K (p-PI3K) მნიშვნელოვნად შემცირდა MPTP-ით დამუშავებულ ჯგუფში ($F_{1,76} = 235.89$, $P < 0.001$) და მნიშვნელოვნად გაიზარდა ნიკოტინის მიერ ($F_{1,76} = 5.26$, $P < 0.05$), რაც მიუთითებს, რომ ნიკოტინმა ნაწილობრივ შეცვალა MPTP-ით გამოწვეული PI3K-ის ფოსფორილირების დათრგუნვა. ანალოგიურად, p-AKT-ის დონე მნიშვნელოვნად შემცირდა MPTP-ით ზემოქმედების შედეგად ($F_{1,76} = 20.29$, $P < 0.001$) და მნიშვნელოვნად გაიზარდა ნიკოტინის მიერ ($F_{1,76} = 4.89$, $P < 0.05$), რაც მიუთითებს იმაზე, რომ ნიკოტინმა შეასუსტა MPTP-ით გამოწვეული AKT-ის ფოსფორილირების შემცირება. როგორც AKT-ის სამიზნე, NRF2 მნიშვნელოვნად დათრგუნა MPTP ($F_{1,76} = 114.69$, $P < 0.001$) და მნიშვნელოვნად გაზარდა ნიკოტინმა ($F_{1,76} = 24.11$, $P < 0.001$), რაც მიუთითებს NRF2-ით განპირობებული ანტიოქსიდანტური სიგნალინგის აღდგენაზე MPTP+ნიკოტინის ჯგუფში.

კვლევის შემდეგ ეტაპზე შევაფასეთ მიტოქონდრიულ აპოპტოზთან დაკავშირებული ცილების ექსპრესია. ანტიაპოპტოზური ცილა Bcl-2 მნიშვნელოვნად შემცირდა MPTP-ის ადმინისტრაციის შემდეგ ($F_{1,76} = 87.62$, $P < 0.001$) და მნიშვნელოვნად გაიზარდა ნიკოტინის მიერ ($F_{1,76} = 6.23$, $P < 0.05$), რაც იმის მაჩვენებელია, რომ ნიკოტინის მიღებამ დიდწილად შეცვალა MPTP-ით გამოწვეული Bcl-2-ის დათრგუნვა. ამის საპირისპიროდ, პროაპოპტოზური ცილა Bad ძლიერ გააქტიურდა MPTP-ით ($F_{1,76} = 176.62$, $P < 0.001$), ხოლო ნიკოტინის გავლენით კი მნიშვნელოვნად შემცირდა ($F_{1,76} = 6.10$, $P < 0.05$), რაც აჩვენებს ნიკოტინის დამცავ, ანტიაპოპტოზურ მოქმედებას. Bax-ის ექსპრესია ასევე მნიშვნელოვნად გაიზარდა MPTP-ით ($F_{1,76} = 61.67$, $P < 0.001$), ხოლო ნიკოტინმა მოახდინა ძლიერი დამარეგულირებელი ეფექტი ($F_{1,76} = 8.93$, $P < 0.01$).

მნიშვნელოვანია, რომ არ გამოვლენილა მნიშვნელოვანი განსხვავებები მხოლოდ ნიკოტინის ჯგუფს (II ჯგუფი) და საკონტროლო ჯგუფს (I ჯგუფი) შორის არცერთ შესწავლილ ცილაში, რაც მიუთითებს, რომ მხოლოდ ნიკოტინს არ შეუცვლია PI3K/AKT აქტივობა, ანტიოქსიდანტური პასუხისა ან აპოპტოზური მარკერების ექსპრესია ჯანმრთელ ცხოველებში.



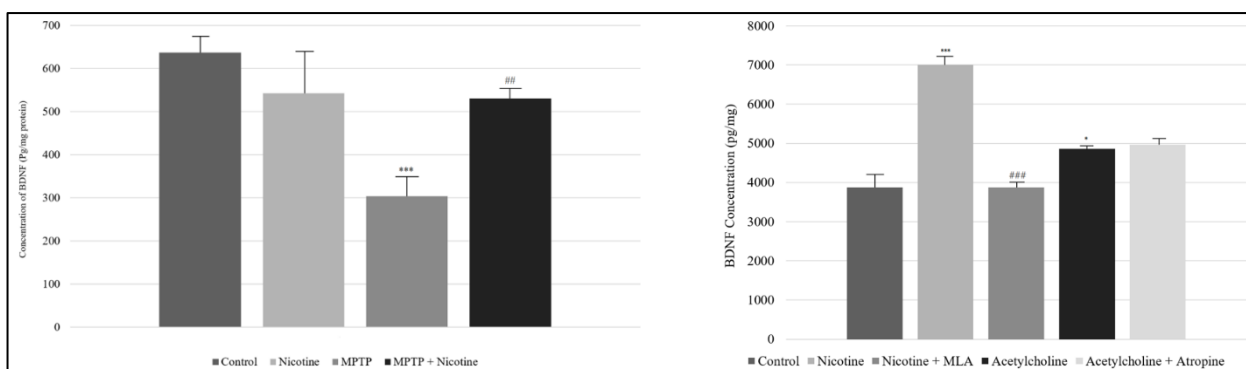
სურათი 4. PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, NRF-2, Bcl-2, Bad და Bax-ის საშუალო მნიშვნელობები და წარმომადგენლობითი ვესტერნ ბლოტები SN უჯრედებში. ნაჩვენები მონაცემები წარმოადგენს სამი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის შედეგებს. β -აქტინი ასევე ვიზუალიზებულ იქნა ვესტერნ ბლოტინგით ფრაქციების თანაბარი დატვირთვის დასადასტურებლად. მონაცემები წარმოადგენს საშუალოს $\pm$ SEM. ანოტაციები: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (I ჯგუფი); # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$, ### $P \leq 0.001$ MPTP ჯგუფთან შედარებით (III ჯგუფი).

3.4 BDNF-ის კონცენტრაციის ცვლილებები

ჰისტოლოგიური და ბიოქიმიური კვლევის შედეგებმა აჩვენა, რომ ნიკოტინი ავლენს ნეიროპროტექციას, პოტენციურად PI3K/AKT/NRF2 გზის მეშვეობით. რადგან BDNF PI3K-ის ცნობილი აქტივატორია, ჩვენ შევაფასეთ მისი დონეები შავ სუბსტანციაში (სურათი 4A).

MPTP-მ მნიშვნელოვნად შეამცირა BDNF-ის კონცენტრაცია ($F_{1,56} = 32.52$; $P < 0.001$). ნიკოტინმა კი აღადგინა BDNF-ის დონეები ($F_{1,56} = 17.76$; $P < 0.001$). BDNF-ის დონე MPTP+ნიკოტინის ჯგუფში კონტროლის დონეს მიუახლოვდა. ნიკოტინს ცალკე არ ჰქონია გავლენა BDNF-ზე ჯანმრთელ ცხოველებში.

იმისათვის, რომ უშუალოდ შეგვეფასებინა ქოლინერგული გზების როლი BDNF-ის რეგულირებაში, ჩვენ ჩავატარეთ *ex vivo* ექსპერიმენტები ტვინის კორონალური ანათომების გამოყენებით, რომლებიც ინკუბირებული იყო ხუთ განსხვავებულ არეში (სურათი 4B). ნიკოტინის (10 მკM) ზემოქმედებამ ერთი საათის განმავლობაში მნიშვნელოვნად გაზარდა BDNF-ის დონე შავ სუბსტანციაში aCSF-ში ინკუბირებულ საკონტროლო ანათომებთან შედარებით ($F_{4,45} = 16.87$; $P < 0.001$). ეს ეფექტი გაქრა $\alpha 7$ ნიკოტინური რეცეპტორის ანტაგონისტ მეთილლიკაკონიტინთან (50 nM) თანა-დამუშავებისას ($F_{4,45} = 22.19$; $P < 0.001$), რაც მიუთითებს რეცეპტორ-სპეციფიკურ ჩართულობაზე. ანალოგიურად, აცეტილქოლინით (50 მკM) ინკუბაციამ მნიშვნელოვნად გაზარდა BDNF-ის დონე ($F_{4,45} = 3.42$; $P < 0.05$). ამ რეაქციაზე გავლენა არ მოუხდენია მუსკარინული რეცეპტორის ანტაგონისტ ატროპინს (5 მკM), რაც მიუთითებს, რომ აცეტილქოლინის გავლენა BDNF-ის დონეზე არ არის განპირობებული მუსკარინული რეცეპტორებით.



სურათი 5. (A) *In vivo* BDNF-ის დონეები ($n=15/ჯგუფი$); (B) *Ex vivo* BDNF-ის დონეები ნიკოტინით, ნიკოტინი + MLA-ით, აცეტილქოლინით და აცეტილქოლინი + ატროპინით დამუშავების შემდეგ ($n=10/ჯგუფი$). მონაცემები წარმოადგენს საშუალოს $\pm$ SEM. სტატისტიკური ანალიზი ჩატარდა ორმხრივი ANOVA-ს გამოყენებით, რასაც მოჰყვა Tukey-ის *post hoc* ტესტები. მნიშვნელოვნების ანოტაციები: $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, $P \leq 0.001$ საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (ჯგუფი I); $\#P \leq 0.05$, $\##P \leq 0.01$, $\###P \leq 0.001$ MPTP ჯგუფთან შედარებით (ჯგუფი III).

4. შედეგების განხილვა

წინამდებარე კვლევამ შეისწავლა ნიკოტინის ნეიროპროტექტორული ეფექტები პარკინსონის დაავადების (PD) MPTP-ით ინდუცირებულ თაგვის მოდელში, BDNF/PI3K/AKT/Nrf2 სასიგნალო გზაზე ფოკუსირებით. ნიკოტინით მკურნალობამ შეამსუბუქა დოფამინერგული ნეიროდეგენერაცია, ოქსიდაციური სტრესი და აპოპტოზური სიგნალიზაცია ამ მოდელში. MPTP თაგვის მოდელი შეირჩა PD-ის

ძირითადი მახასიათებლების რეპროდუცირების უნარის გამო, მათ შორის substantia nigra pars compacta-ში დოფამინერგული ნეირონების სელექციური დაკარგვა და სტრიატალური დოფამინის დაქვეითება. MPTP მეტაბოლიზდება MPP⁺-ად გლიაში, რომელიც შემდეგ გადადის და გროვდება დოფამინერგულ ნეირონებში დოფამინის გადამტანის მეშვეობით და აინჰიბირებს მიტოქონდრიულ კომპლექს I-ს, რაც იწვევს ოქსიდაციურ სტრესს, ATP-ის დაქვეითებას და ნეირონების სიკვდილს [38, 39]. როგორც წინა კვლევებში [40, 41], ჩვენმა მონაცემებმა აჩვენა კომპლექს I-ის აქტივობის შემცირება, ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის პროდუქტის - მალონის დიალდეჰიდის კონცენტრაციის მომატება (MDA) და ანტიოქსიდანტური ფერმენტების (SOD, CAT, GPx, GR) დათრგუნვა MPTP-ით დამუშავებულ ცხოველებში (სურ. 1-3). ჰისტოლოგიურმა და იმუნოჰისტოქიმიურმა კვლევამ დაადასტურა TH-დადებითი ნეირონების კარგვა და პიკნოზური ბირთვების არსებობა substantia nigra-ში. მიუხედავად იმისა, რომ MPTP მოდელი ღირებული და ოქროს სტანდარტად მიჩნეული მოდელია, მას გააჩნია გარკვეული შეზღუდვებიც: ის იწვევს სწრაფ დეგენერაციას, რომელშიც არაა გამოხატული α -სინუკლეინის აგრეგაცია და უგულვებელყოფილია ასაკობრივი ფაქტორი [42].

ნიკოტინმა მნიშვნელოვნად შეამცირა ნეირონების დაკარგვა, რაც ნაჩვენებია შენარჩუნებული TH იმუნორეაქტიულობით და აპოპტოზური მორფოლოგიის შემცირებით (სურ. 1), რაც კორელირებს ლიტერატურულ მონაცემებთან [43]. ნიკოტინი ურთიერთქმედებს ნიკოტინური აცეტილქოლინის რეცეპტორების (nAChR) მრავალ ქვეტიპთან, მათ შორის $\alpha 7$ -თან, რომელიც დაკავშირებულია ნეიროტროფიულ და ანტიაპოპტოზურ სიგნალიზაციასთან [44, 45]. ნიკოტინით მკურნალობამ გაზარდა BDNF-ის დონე (სურ. 5), ნეიროტროფინი, რომელიც მხარს უჭერს გადარჩენას და სინაფსურ პლასტიურობას PI3K/AKT აქტივაციის გზით [46, 47]. ჩვენმა Ex vivo მონაცემებმა აჩვენა, რომ ნიკოტინით ინდუცირებული BDNF-ის ზემოქმედება დათრგუნული იყო $\alpha 7$ nAChR-ის ბლოკადით. აცეტილქოლინმა ასევე გაზარდა BDNF, მაგრამ ნაკლებად ეფექტურად, რაც შეესაბამება შერეულ ნიკოტინურ და მუსკარინულ სიგნალიზაციას. ატროპინს არ ჰქონდა ეფექტი, რაც მხარს უჭერს $\alpha 7$ -ით განპირობებულ რეგულაციას. ეს შეიძლება იყოს რელევანტური PD-სთვის, რომელსაც

ხშირად ახასიათებს ქოლინერგული ჰიპერაქტივობა, რაც პოტენციურად დამცავია დაავადების ადრეულ სტადიაზე [48].

ვესტერნ ბლოტებმა გამოავლინა PI3K-ისა და AKT-ის ფოსფორილირების გაძლიერება ნიკოტინით დამუშავებულ ცხოველებში (სურ. 4), შემდგომი Nrf2-ის ზემოქმედებით და ანტოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობის აღდგენით (სურ.3) [49, 50]. ნიკოტინმა ასევე გაზარდა Bcl-2 და შეამცირა Bad/Bax (ნახ. 4), რაც ხელს უწყობს გადარჩენას და შეესაბამება დოფამინერგული ნეირონების მორფოლოგიურ შენარჩუნებას (სურ. 1).

საერთო ჯამში, ეს შედეგები მიუთითებს, რომ ნიკოტინი ახორციელებს ნეიროპროტექციას MPTP მოდელში ოქსიდაციური სტრესის მოდულაციის, ანტიაპოპტოზური სიგნალიზაციისა და ნეიროტროფიული მხარდაჭერის გზით. ნიკოტინის თერაპიული პერსპექტივის მიუხედავად, მისი დამოკიდებულების გამოძწვევი და ტოქსიკური თვისებები ზღუდავს კლინიკურ სარგებლიანობას. მიუხედავად ამისა, ნიკოტინური გზების სელექციური მიზანში ამოღება, შესაძლოა სპეციფიკური აგონისტების ან დადებითი ალოტერიული მოდულატორების მეშვეობით, შეიძლება წარმოადგენდეს PD-ის პერსპექტიულ თერაპიას. ასევე გასათვალისწინებელია, რომ კვლევაში გამოყენებული ნიკოტინის დოზა საკმაოდ მცირე და ფარმაკოლოგიურად უსაფრთხოა.

დასასრულს, ნიკოტინმა აჩვენა ნეიროპროტექტორული პოტენციალი PD-ის MPTP თავის მოდელში, სავარაუდოდ BDNF/PI3K/AKT/Nrf2 სიგნალიზაციის გზით. ეს შედეგები აუმჯობესებს ნიკოტინური მოდულაციის გაგებას ნეიროდეგენერაციაში, ამავდროულად ხაზს უსვამს დამატებითი ტრანსლაციური კვლევების საჭიროებას.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Bloem, B. R., Okun, M. S., Klein, C. (2021). Parkinson's disease. *Lancet*, 397(10291), 2284–2303. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00218-X)
2. Dong-Chen, X., Yong, C., Yang, X. et al. Signaling pathways in Parkinson's disease: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Sig Transduct Target Ther* 8, 73 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01353-3>

3. Chen, R., Berardelli, A., Bhattacharya, A., Bologna, M., Chen, K. S., Fasano, A., Helmich, R. C., Hutchison, W. D., Kamble, N., Kühn, A. A., Macerollo, A., Neumann, W. J., Pal, P. K., Paparella, G., Suppa, A., Udupa, K. (2022). Clinical neurophysiology of Parkinson's disease and parkinsonism. *Clin. Neurophysiol. Pract.*, 7, 201–227.
<https://doi.org/10.1016/j.cnp.2022.06.002>
4. Poewe W. (2008). Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur. J. Neurol.*, 15 Suppl 1, 14–20. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2008.02056.xv>
5. Roheger M, Kalbe E, Liepelt-Scarfone I. Progression of Cognitive Decline in Parkinson's Disease. *J. Parkinsons Dis.* 2018;8(2):183-193. <https://doi.org/10.3233/JPD-181306>
6. Henrich, M.T., Oertel, W.H., Surmeier, D.J. et al. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease – a key disease hallmark with therapeutic potential. *Mol Neurodegeneration* 18, 83 (2023). <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00676-7>
7. Minakaki, G., Krainc, D., Burbulla, L. F. (2020). The Convergence of Alpha-Synuclein, Mitochondrial, and Lysosomal Pathways in Vulnerability of Midbrain Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease. *Front. Cell Dev. Biol.*, 8, 580634.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.580634>
8. Lin, K. J., Lin, K. L., Chen, S. D., Liou, C. W., Chuang, Y. C., Lin, H. Y., Lin, T. K. (2019). The Overcrowded Crossroads: Mitochondria, Alpha-Synuclein, and the Endo-Lysosomal System Interaction in Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(21), 5312.
<https://doi.org/10.3390/ijms20215312>
9. Martignoni, E., Blandini, F., Godi, L., Desideri, S., Pacchetti, C., Mancini, F., Nappi, G. (1999). Peripheral markers of oxidative stress in Parkinson's disease. The role of L-DOPA. *Free Radic. Biol. Med.*, 27(3-4), 428–437. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00075-1](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00075-1)
10. Chakrabarti, S., Bisaglia, M. (2023). Oxidative Stress and Neuroinflammation in Parkinson's Disease: The Role of Dopamine Oxidation Products. *Antioxidants*, 12(4), 955.
<https://doi.org/10.3390/antiox12040955>
11. Demailly, A., Moreau, C., Devos, D. (2024). Effectiveness of Continuous Dopaminergic Therapies in Parkinson's Disease: A Review of L-DOPA Pharmacokinetics/Pharmacodynamics. *Journal of Parkinson's disease*, 14(5), 925–939.
<https://doi.org/10.3233/JPD-230372>

12. Mappin-Kasirer, B., Pan, H., Lewington, S., Kizza, J., Gray, R., Clarke, R., Peto, R. (2020). Tobacco smoking and the risk of Parkinson disease: A 65-year follow-up of 30,000 male British doctors. *Neurology*, 94(20), e2132–e2138.
<https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000009437>
13. di Biase, L., Pecoraro, P. M., Carbone, S. P., Alessi, F., Di Lazzaro, V. (2024). Smoking exposure and Parkinson's disease: A UK Brain Bank pathology-validated case-control study. *Parkinsonism, related disorders*, 125, 107022.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2024.107022>
14. Liang, C.-H., Huang, T.-W., Chiu, W.-T., Chung, C.-C., Hong, C.-T. (2025). Nicotine Therapy for Parkinson's Disease: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Biomedicines*, 13(8), 1814. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13081814>
15. Quik, M., O'Leary, K., Tanner, C. M. (2008). Nicotine and Parkinson's disease: implications for therapy. *Mov. Disord.*, 23(12), 1641–1652.
<https://doi.org/10.1002/mds.21900>
16. Mouhape, C., Costa, G., Ferreira, M., Abin-Carriquiry, J. A., Dajas, F., Prunell, G. (2019). Nicotine-Induced Neuroprotection in Rotenone In Vivo and In Vitro Models of Parkinson's Disease: Evidences for the Involvement of the Labile Iron Pool Level as the Underlying Mechanism. *Neurotox. Res.*, 35(1), 71–82. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9931-1>
17. Lu, J. Y. D., Su, P., Barber, J. E. M., Nash, J. E., Le, A. D., Liu, F., Wong, A. H. C. (2017). The neuroprotective effect of nicotine in Parkinson's disease models is associated with inhibiting PARP-1 and caspase-3 cleavage. *PeerJ*, 5, e3933.
<https://doi.org/10.7717/peerj.3933>
18. Carvajal-Oliveros, A., Domínguez-Baleón, C., Zárate, R.V. et al. Nicotine suppresses Parkinson's disease like phenotypes induced by Synphilin-1 overexpression in *Drosophila melanogaster* by increasing tyrosine hydroxylase and dopamine levels. *Sci Rep* 11, 9579 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88910-4>
19. Fares, M. B., Alijevic, O., Johne, S., Overk, C., Hashimoto, M., Kondylis, A., Adame, A., Dulize, R., Peric, D., Nury, C., Battey, J., Guedj, E., Sierro, N., Mc Hugh, D., Rockenstein, E., Kim, C., Rissman, R. A., Hoeng, J., Peitsch, M. C., Masliah, E., ... Mathis, C. (2023).

- Nicotine-mediated effects in neuronal and mouse models of synucleinopathy. *Front. Neurosci.*, 17, 1239009. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1239009>
20. Muñoz, P., Huenchuguala, S., Paris, I., Cuevas, C., Villa, M., Caviedes, P., Segura-Aguilar, J., Tizabi, Y. (2012). Protective effects of nicotine against aminochrome-induced toxicity in substantia nigra derived cells: implications for Parkinson's disease. *Neurotox. Res.*, 22(2), 177–180. <https://doi.org/10.1007/s12640-012-9326-7>
 21. Zhgenti, N., Bibilashvili, O., Shengelia, M., Burjanadze, G., Koshoridze, M., Davitashvili, E. and Koshoridze, N. (2025). Effect of nicotine on the energy metabolism of substantia nigra cells in mptp-induced Parkinson's disease. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 28(10), 1417-1427. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2025.84754.18338>
 22. Goyal, A., Agrawal, A., Verma, A., Dubey, N. (2023). The PI3K-AKT pathway: A plausible therapeutic target in Parkinson's disease. *Experimental and molecular pathology*, 129, 104846. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2022.104846>
 23. Peng, Y., Sun, H., Xu, F., Ye, H., Wang, Y., Zhou, X., Chang, D., Wang, N., Huang, P. (2025). Activation of BDNF-TrkB-PI3K-AKT signaling pathway by Tong-Qiao-Huo-Xue Decoction facilitates nerve regeneration and mitigates cerebral ischemia-reperfusion injury. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 145, 156966. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2025.156966>
 24. Xu, D., Lian, D., Wu, J., Liu, Y., Zhu, M., Sun, J., He, D., Li, L. (2017). Brain-derived neurotrophic factor reduces inflammation and hippocampal apoptosis in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Journal of neuroinflammation*, 14(1), 156. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0930-6>
 25. Wen, X., Tang, S., Wan, F., Zhong, R., Chen, L., Zhang, H. (2024). The PI3K/Akt-Nrf2 Signaling Pathway and Mitophagy Synergistically Mediate Hydroxytyrosol to Alleviate Intestinal Oxidative Damage. *Int. J. Biol. Sci.*, 20(11), 4258–4276. <https://doi.org/10.7150/ijbs.97263>
 26. Yoon, J. H., Youn, K., Jun, M. (2021). Protective effect of sargahydroquinoic acid against A β 25-35-evoked damage via PI3K/Akt mediated Nrf2 antioxidant defense system. *Biomedicine, pharmacotherapy = Biomedecine, pharmacotherapie*, 144, 112271. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112271>

27. "Front Matter." National Research Council. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12910>.
28. Matta, S. G., Balfour, D. J., Benowitz, N. L., Boyd, R. T., Buccafusco, J. J., Caggiula, A. R., Craig, C. R., Collins, A. C., Damaj, M. I., Donny, E. C., Gardiner, P. S., Grady, S. R., Heberlein, U., Leonard, S. S., Levin, E. D., Lukas, R. J., Markou, A., Marks, M. J., McCallum, S. E., Parameswaran, N., ... Zirger, J. M. (2007). Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology*, 190(3), 269–319. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0441-0>
29. Meredith, G. E., Rademacher, D. J. (2011). MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. *Journal of Parkinson's disease*, 1(1), 19–33. <https://doi.org/10.3233/JPD-2011-11023>
30. Benowitz, N. L., Hukkanen, J., Jacob, P., 3rd (2009). Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb. Exp. Pharmacol.*, (192), 29–60. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69248-5_2
31. Paxinos G., Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second Edition. Academic Press, 2001.
32. Taveira, K. V., Carraro, K. T., Catalão, C. H., Lopes, L.daS. (2012). Morphological and morphometric analysis of the hippocampus in Wistar rats with experimental hydrocephalus. *Pediatric neurosurgery*, 48(3), 163–167. <https://doi.org/10.1159/000345959>
33. Kharlamov, E. A., Lepsveridze, E., Meparishvili, M., Solomonias, R. O., Lu, B., Miller, E. R., Kelly, K. M., Mtchedlishvili, Z. (2011). Alterations of GABA(A) and glutamate receptor subunits and heat shock protein in rat hippocampus following traumatic brain injury and in posttraumatic epilepsy. *Epilepsy research*, 95(1-2), 20–34. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.02.008>
34. Solomonias, R. O., Kotorashvili, A., Kiguradze, T., McCabe, B. J., Horn, G. (2005). Ca²⁺/calmodulin protein kinase II and memory: learning-related changes in a localized region of the domestic chick brain. *The Journal of physiology*, 569(Pt 2), 643–653. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.098012>

35. Lein, P. J., Barnhart, C. D., Pessah, I. N. (2011). Acute hippocampal slice preparation and hippocampal slice cultures. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 758, 115–134. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-170-3_8
36. Stein, L. R., Zorumski, C. F., Izumi, Y. (2017). Hippocampal slice preparation in rats acutely suppresses immunoreactivity of microtubule-associated protein (Map2) and glycogen levels without affecting numbers of glia or levels of the glutamate transporter VGlut1. *Brain and behavior*, 7(7), e00736. <https://doi.org/10.1002/brb3.736>
37. Burjanadze, G., Shengelia, M., Dachanidze, N., Mikadze, M., Menabde, K., Koshoridze, N. (2017). Creatine-facilitated protection of stress caused by disrupted circadian rhythm. *Biol. Rhythm Res.*, 49(1), 61–75. <https://doi.org/10.1080/09291016.2017.1333198>
38. Mondal, S., Firdous, S.M. Unrevealing the molecular mechanisms of MPTP-induced Parkinson's in experimental animals. *Med Chem Res* (2025). <https://doi.org/10.1007/s00044-025-03409-1>
39. Rehman, I. U., Khan, A., Ahmad, R., Choe, K., Park, H. Y., Lee, H. J., Atiq, A., Park, J., Hahm, J. R., Kim, M. O. (2022). Neuroprotective Effects of Nicotinamide against MPTP-Induced Parkinson's Disease in Mice: Impact on Oxidative Stress, Neuroinflammation, Nrf2/HO-1 and TLR4 Signaling Pathways. *Biomedicines*, 10(11), 2929. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112929>
40. Wen, S., Aki, T., Unuma, K., Uemura, K. (2020). Chemically Induced Models of Parkinson's Disease: History and Perspectives for the Involvement of Ferroptosis. *Front. Cell. Neurosci.*, 14, 581191. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.581191>
41. Zhgenti, N., Bibilashvili, O., Burjanadze, G., Shengelia, M., Koshoridze, N. (2023). Exploring the neuroprotective effects of nicotine against mptp-induced neuronal damage in mice: insights into antioxidant system. *IJBB*, 11(3), 27–34.
42. AlShimemeri, S., Di Luca, D. G., Fox, S. H. (2021). MPTP Parkinsonism and Implications for Understanding Parkinson's Disease. *Movement disorders clinical practice*, 9(1), 42–47. <https://doi.org/10.1002/mdc3.13344>
43. Ruan, S., Xie, J., Wang, L., Guo, L., Li, Y., Fan, W., Ji, R., Gong, Z., Xu, Y., Mao, J., Xie, J. (2023). Nicotine alleviates MPTP-induced nigrostriatal damage through modulation of

- JNK and ERK signaling pathways in the mice model of Parkinson's disease. *Front. Pharmacol.*, 14, 1088957. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1088957>
44. Nara, S., Yamaguti, Y., Tsuda, I. (2023). Review: Nicotinic acetylcholine receptors to regulate important brain activity-what occurs at the molecular level?. *Cognitive neurodynamics*, 18(3), 1–6. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s11571-023-09975-7>
 45. Mugayar, A. A., da Silva Guimarães, G., de Oliveira, P. H. T., Miranda, R. L., Dos Santos, A. A. (2023). Apoptosis in the neuroprotective effect of $\alpha 7$ nicotinic receptor in neurodegenerative models. *J. Neurosci. Res.*, 101(12), 1795–1802. <https://doi.org/10.1002/jnr.25239>
 46. Zhong, Y., Zhu, Y., He, T., Li, W., Li, Q., Miao, Y. (2019). Brain-derived neurotrophic factor inhibits hyperglycemia-induced apoptosis and downregulation of synaptic plasticity-related proteins in hippocampal neurons via the PI3K/Akt pathway. *Int. J. Mol. Med.*, 43(1), 294–304. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3933>
 47. Wang, C. S., Kavalali, E. T., Monteggia, L. M. (2022). BDNF signaling in context: From synaptic regulation to psychiatric disorders. *Cell*, 185(1), 62–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.003>
 48. Bohnen, N. I., Albin, R. L. (2011). The cholinergic system and Parkinson disease. *Behav. Brain Res.*, 221(2), 564–573. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.048>
 49. He, F., Ru, X., Wen, T. (2020). NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(13), 4777. <https://doi.org/10.3390/ijms21134777>
 50. Mayer, C., Riera-Ponsati, L., Kauppinen, S., Klitgaard, H., Erler, J. T., Hansen, S. N. (2024). Targeting the NRF2 pathway for disease modification in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic implications. *Front. Pharmacol.*, 15, 1437939. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1437939>