

POTENSI KOMBINASI AMIDO-BRIDGED NUCLEIC ACID MODIFIED ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES DENGAN POLYAMIDOAMINE DENDRIMER GENERASI 4 TERTARGET A-SYNUCLEIN SEBAGAI TERAPI PARKINSON

Putu Aprilyanti Aristadewi¹, Adrian Wiryanata Gorintha², Andrea Ivena³

Abstrak

Parkinson adalah penyakit neurodegeneratif yang meningkat lebih cepat daripada gangguan neurologis lainnya. Saat ini pengobatan Parkinson menggunakan *dopamine agonist* dan levodopa, namun pengobatan ini memiliki efek samping seperti menurunkan nafsu makan dan tidak berfokus pada pencegahan kematian neuron. Salah satu protein yang berperan dalam patogenesis dari Parkinson adalah protein α -synuclein, di mana agregasi dan *misfolding* dari protein ini bersifat toksik pada neuron sehingga mendukung progresi Parkinson. *Antisense oligonucleotide* (ASO) yang dikombinasikan dengan *amido-bridge nucleic acid* (AmNA) diketahui memiliki efek untuk menekan ekspresi mRNA α -synuclein namun hanya sebagian kecil dosis yang terdistribusi ke jaringan target sehingga diperlukan karier yang stabil. *Polyamidoamine* (PAMAM) Dendrimer menjadi pilihan dengan kemampuan menembus *Blood Brain Barrier* dan menarget organ secara spesifik. Secara khusus, *PAMAM Dendrimer* Generasi 4 (PAMAM G4) dapat menghambat agregasi protein α -synuclein. Oleh karena itu, menggabungkan potensi yang dimiliki oleh AmNA-ASO dengan *PAMAM Dendrimer* Generasi 4 menggunakan larutan HEPES *buffer* diharapkan mampu menjadi terapi Parkinson yang menjanjikan.

Kata kunci: AmNA-ASO, *PAMAM Dendrimer*, Parkinson

Abstract

Parkinson's is a neurodegenerative disease that progresses faster than other neurological disorders. Currently Parkinson's treatment uses dopamine agonists and levodopa, but these treatments have side effects such as decreased appetite and do not focus on preventing neuronal death. One of the proteins that play a role in the pathogenesis of Parkinson's is the α -synuclein protein, in which the aggregation and misfolding of this protein is toxic to neurons and thus supports Parkinson's progression. Antisense oligonucleotide (ASO) combined with amido-bridge nucleic acid (AmNA) is known to have the effect of suppressing α -synuclein mRNA expression, but only a small dose is distributed to the target tissue so that a stable carrier is needed. Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimer is the choice with the ability to penetrate the Blood Brain Barrier and target specific organs. In particular, PAMAM Dendrimer Generation 4 (PAMAM G4) can inhibit α -synuclein protein aggregation. Therefore, combining the potential possessed by AmNA-ASO with PAMAM Dendrimer Generation 4 using HEPES buffer solution is expected to be a promising Parkinson's therapy.

Kata kunci: AmNA-ASO, *PAMAM Dendrimer*, Parkinson

1. PENDAHULUAN

Kondisi neurologis adalah sumber utama kecacatan di seluruh dunia, dan prevalensi penyakit Parkinson Disease (PD) meningkat lebih cepat daripada gangguan neurologis lainnya. PD adalah penyakit neurodegeneratif kronis dan progresif yang ditandai oleh fitur motorik. Penyakit ini memiliki dampak klinis

yang signifikan pada pengidapnya melalui efek degeneratif progresifnya pada mobilitas dan kontrol otot. Gejala motorik PD dikaitkan dengan hilangnya neuron dopaminergik striatal. Istilah parkinsonisme adalah gejala kompleks yang digunakan untuk menggambarkan bagian motorik PD, yang meliputi *tremor*, *bradykinesia*, dan kekakuan otot.

PD adalah penyakit neurodegeneratif kedua paling umum setelah penyakit Alzheimer, dengan prevalensi 0,5-1% di antara mereka yang berusia 65-69 tahun, naik menjadi 1-3% pada orang yang berusia 80 tahun ke atas. Dengan populasi yang menua, prevalensi PD diperkirakan akan meningkat lebih dari 30% pada tahun 2030. Diperkirakan 6,1 juta orang secara global didiagnosis PD pada tahun 2016, sekitar 2,4 kali lebih tinggi dari pada tahun 1990. Penyakit Parkinson lebih umum pada pria (3 : 2 rasio pria-wanita) dengan *late onset* pada wanita yang dikaitkan adanya efek neuroprotektif estrogen PD ditandai dengan kematian neuron dopaminergik di substantia nigra. Ciri patologis PD adalah berkembangnya *Lewy Body*, suatu neuron yang sebagian besar terdiri sistem dopaminergik nigrostriatal.

Sebagian besar kasus PD berkaitan dengan idiopatik, tetapi ada pula yang berkaitan dengan genetik dan pengaruh lingkungan. Pengaruh lingkungan penyakit ini termasuk stres oksidatif yang dipicu oleh polusi lingkungan. Penemuan beberapa mutasi gen diidentifikasi mendukung asosiasi genetik dengan PD salah satunya mutasi SNCA (PARK1) sebagai pembentuk PD dominan autosom.

PD ditandai dengan kematian neuron dopaminergik di substantia nigra. Ciri patologis PD adalah berkembangnya *Lewy Body*, suatu neuron yang sebagian besar terdiri dari agregasi protein α -synuclein.

Dopamine agonist dan levodopa merupakan obat-obatan yang kerap dianjurkan untuk pengidap PD. *Dopamine agonist* pada umumnya kurang ditoleransi dibandingkan levodopa karena menyebabkan efek samping seperti edema, sembelit, pusing, halusinasi, dan mual. Oleh karena itu, orang yang menggunakan *dopamine agonist* cenderung menghentikan pengobatan atau tidak minum obat secara teratur. Sementara itu, efek samping levodopa termasuk mual, kehilangan nafsu makan, pusing, dan depresi. Karena gejala PD semakin buruk pada tahap lebih lanjut, dosis akan meningkat seiring waktu kemudian menyebabkan lebih banyak efek samping.

Seiring dengan berkembangnya dunia kedokteran, hal terkait terapi pun mengalami kemajuan yaitu terapi berbasis *antisense oligonucleotide* (ASO). ASO adalah terapi gen potensial tertarget α -synuclein. ASO dengan amido bridged nucleic acid (AmNA) menunjukkan resistensi nuklease tinggi, afinitas pengikatan terhadap *complementary strand*, dan efisiensi yang lebih tinggi.

Namun, hanya sebagian kecil dari AmNA-ASO yang diberikan terdistribusi pada jaringan target; sebagian besar dosis terendap secara subseluler. Dengan demikian, mengatasi tantangan farmakokinetik AmNA-ASO diperlukan untuk meningkatkan potensinya. Oleh karena itu, pemilihan *carrier* sangat penting. Salah satu nanomolekul yang dikenal untuk mengantar gen adalah *Polyamidoamine* (PAMAM) Dendrimer.

Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimer adalah salah satu nanomolekul terkecil yang tersedia saat ini. Setiap aspek *dendrimer* (inti, generasi, ukuran rongga, dan kelompok fungsional permukaan) dapat secara tepat dimodulasi untuk menghasilkan nanokarier untuk pengiriman obat dan gen ke sel-sel otak. *PAMAM Dendrimer* memiliki kelebihan yaitu sangat stabil dan permukaan yang dapat dengan mudah dimodifikasi menjadi amina untuk pengiriman DNA atau RNA. *PAMAM Dendrimer* dapat disintesis menghasilkan beberapa generasi, di mana *PAMAM Dendrimer* Generasi 4 (PAMAM G4) memiliki aplikasi yang menjanjikan untuk terapi penyakit neurologis.

Berdasarkan penjelasan data di atas, kombinasi *amino-bridge nucleic acid antisense oligonucleotide* (AmNA-ASO) tertarget α -synuclein dengan nanomolekul *Polyamidoamine* (PAMAM) Dendrimer Generasi 4 diharapkan dapat menjadi inovasi terapi mutakhir untuk PD.

2. METODE

Penulisan menggunakan metode kajian pustaka dengan kata kunci Parkinson, AmNA-ASO dan PAMAM serta menggunakan logika

Boolean operator untuk mendapatkan sumber-sumber yang dipakai. Pencarian dilakukan pada laman *database* jurnal yaitu Pubmed, Nature, ScienceDirect, Google Scholar dan jurnal molekular lainnya. Data diproses secara sistematis dan kritis dalam penyusunan karya.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Patogenesis *Parkinson Disease* PD terjadi karena penurunan kadar *dopamine* pada bagian *substansia nigra* di otak. Penurunan kadar *dopamine* tersebut disebabkan oleh kematian sel-sel neuron dopaminergik. PD memiliki ciri patologis di mana ditemukan akumulasi “*lewy bodies*” dalam terdiri dari protein bernama α -synuclein (SNCA) yang berperan penting dalam patogenesis PD. Protein α -synuclein ini mengalami agregasi akibat mutasi dari gen SNCA yang bersifat *autosomal* dominan.

Protein α -synuclein terdiri dari 140 asam amino dan dibagi menjadi 3 domain yaitu N-terminal domain, NAC domain, dan C-terminal domain. Dalam keadaan normal, α -synuclein berperan dalam regulasi neurotransmitter. Namun, terjadinya mutasi pada gen SNCA dapat menyebabkan agregasi dan *misfolding* dari α -synuclein. Hal ini juga menyebabkan proses oligomerisasi dan fibrilasi dari α -synuclein secara patologis. Bentuk amiloid dari fibril lalu membentuk struktur dari *lewy bodies*. Oligomer dan protofibril dari α -synuclein bersifat toksik pada neuron seperti mengganggu fungsi mitokondria dan homeostasis retikulum endoplasma, permeabilisasi membran, fragmentasi badan golgi.

Ubiquitin proteasome system (UPS) dan *chaperone-mediated autophagy* (CMA) memiliki peran untuk degradasi protein α -synuclein. Sistem degradasi ini mengalami disfungsi sehingga mendukung terjadinya agregasi dari α -synuclein dan proses fibrilasinya. Hal ini mendukung terbentuknya fibril dan *lewy bodies* yang mengganggu homeostasis neuron dan mendukung progresi dari PD.

PD dimulai (tahap 1 dan 2) di medula dan *olfactory bulb*. Patologi awal dikaitkan dengan

gejala yang terjadi sebelum onset gangguan motorik, seperti *rapid eye movement sleep behavior disorder* (RBD) dan penurunan penciuman. Pada tahap 3 dan 4, patologi berkembang ke *substansia nigra pars compacta* dan struktur otak depan, otak tengah dan basal lainnya. Patologi di daerah ini dikaitkan dengan gejala motorik PD. PD biasanya didiagnosis pada tahap ini. Pada PD lanjut, patologi berkembang ke korteks serebral dengan timbulnya gangguan kognitif dan halusinasi.

Potensi *Amido-Bridged Nucleic Acid* (AmNA) Modified *Antisense Oligonucleotides* (ASO)

Antisense oligonucleotide (ASO) adalah struktur pendek *single-stranded* DNA yang akan berinteraksi dengan mRNA gen target sesuai dengan perpasangan Watson-Crick untuk mencegah translasi protein gen target. ASO dapat mengatur ekspresi gen dalam sel hidup dengan mengatur fungsi dan pembelahan sel, serta memodulasi respons seluler terhadap tekanan serta rangsangan internal dan eksternal. ASO dapat digunakan untuk terapi manusia karena ASO dapat menghambat secara spesifik gen target terutama yang sulit untuk ditargetkan dengan *neutralizing antibodies*.

Amido-bridge nucleic acid (AmNA) adalah analog dari *Locked Nucleic Acid* (LNA), nukleotida yang dimodifikasi secara kovalen untuk membatasi konformasi disebut sebagai *constrained* atau *locked*. AmNA memiliki gugus amida yang menghubungkan karbon 2' dan 4' pada gula ribosa. Keunggulan dari AmNA berupa tingkat resistensinya yang tinggi terhadap *nuclease* dan meningkatkan spesifitas target. AmNA dapat membentuk *double-helix duplexes* yang sangat stabil.

Pada uji *in vitro*, terdapat 50 varian AmNA-ASO yang diujicobakan dan berhasil menurunkan kadar mRNA SNCA sebesar 81%. AmNA-ASO diujicobakan pada *human embryonic kidney* 293 (HEK293) pada konsentrasi tunggal (50 nM). HEK293 tersebut mengekspresikan mRNA hSNCA secara endogen kemudian kuantifikasi tingkat mRNA

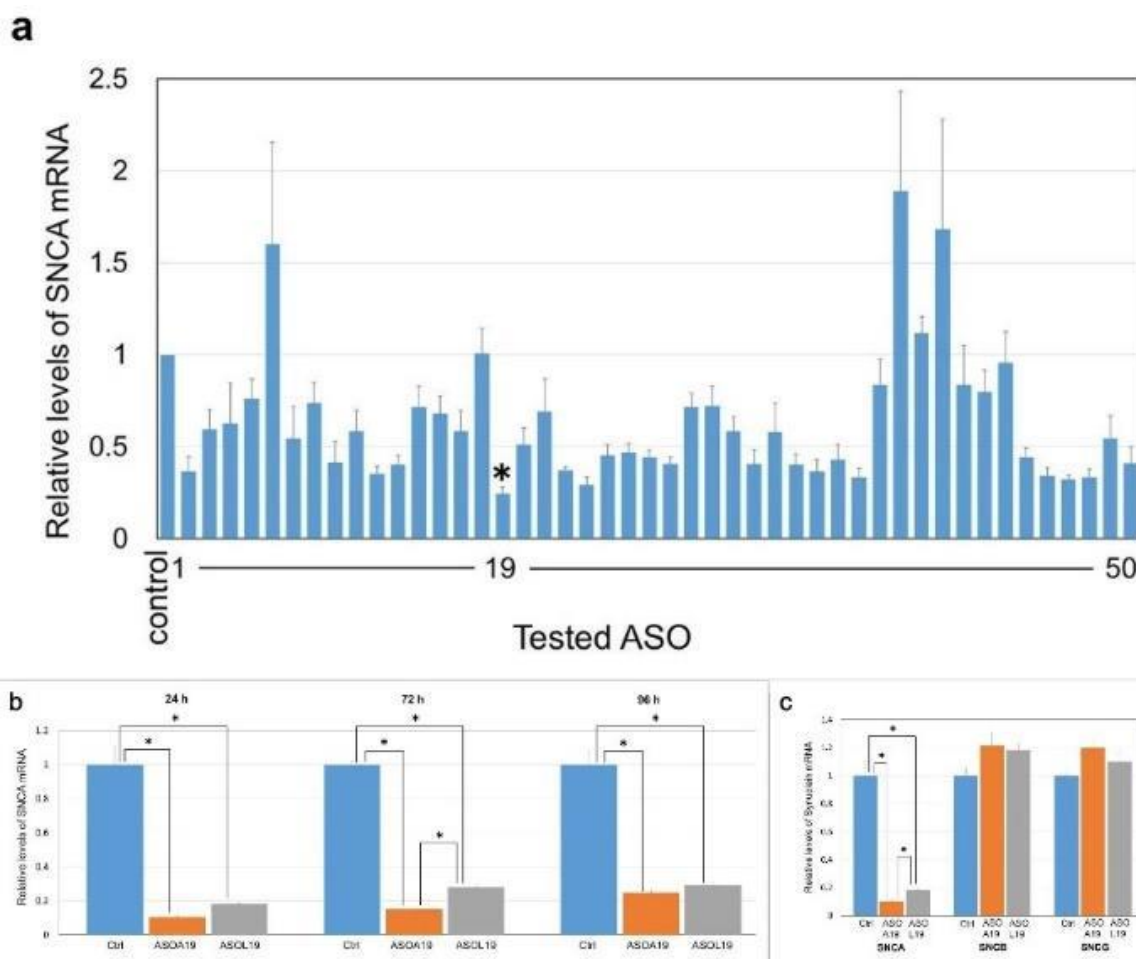
SNCA dilakukan menggunakan *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR) 24 jam setelah transfeksi. Semua AmNA-ASO yang diuji signifikan mengurangi mRNA.

SNCA. AmNA-ASO No. 19 dengan motif gapmer 3AmNA-9DNA- 2AmNA-1DNA (3-9-2-1) adalah yang paling efisien dan menurunkan mRNA SNCA menjadi 19.0% dari ekspresi normal sel *mock-transfected*.

Untuk membandingkan efisiensi *knockdown* dari AmNA- ASO dan LNA-ASO, dilakukan sintesis LNA-ASO No. 19 3-9-2-1 (selanjutnya disebut ASOL19) yang membawa urutan target yang sama dengan ASO^{A19}. Setelah ASO^{A19} dan ASOL19 ditransfusikan ke dalam sel HEK293 dan diukur level ekspresi mRNA SNCA dengan qPCR 24, 72, dan 96 jam,

ditemukan bahwa ASO^{A19} mengurangi tingkat mRNA SNCA menjadi 10,3% (24 jam) dan 15,2% (72 jam), sedangkan ASOL19 mengurangi menjadi 18,3% (24 jam) dan 28,1% (72 jam). Hasil ini menunjukkan bahwa AmNA-ASO menurunkan mRNA SNCA lebih efisien daripada LNA-ASO.

Untuk mengevaluasi efek off-^{A19} target ASO , dilakukan pengukuran kadar β -synuclein (SNCB) dan γ -synuclein (SNCG), yang merupakan keluarga synuclein. Tidak terdapat perbedaan signifikan dalam tingkat mRNA antara kontrol dan sel yang diintervensi oleh ASO^{A19}, menunjukkan tidak ada efek *off-target* ASO^{A19} pada SNCB dan SNCG



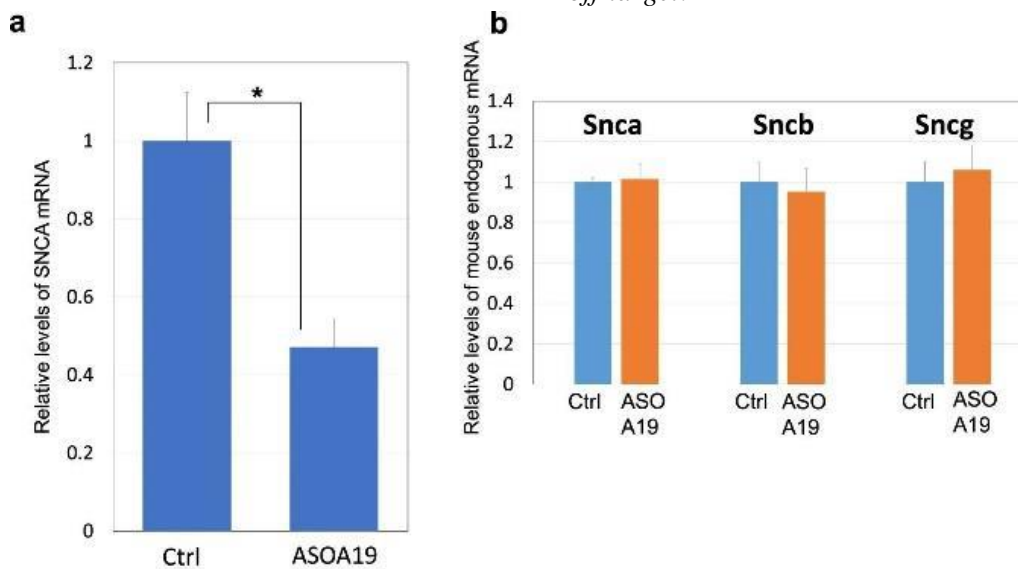
Gambar 1. ASO Lebih Efisien daripada ASO dalam Sel HEK293.

Pada uji *in vivo*, AmNA-ASO terbukti memiliki toksisitas yang lebih rendah pada hewan dibandingkan LNA-ASO. Uji AmNA-ASO pada tikus PD melalui injeksi *intracerebroventricular* tanpa bantuan dari karier dapat menurunkan produksi α -synuclein tikus sehingga mengurangi keparahan gejala PD setelah 27 hari pemberian suntikan tunggal.

Distribusi ASO^{A19} meluas ke seluruh otak tikus termasuk korteks, *olfactory bulb*, hipokampus, *dentate gyrus*, striatum, substantia nigra, serebelum, dan batang otak. Hasil ini menunjukkan bahwa ASO didistribusikan ke berbagai jenis sel dan area pada otak.

Dua minggu setelah injeksi 100 μ g kontrol ASO (ASO yang mengandung urutan acak) dan ASO^{A19}, ekstraksi mRNA dari belahan otak kiri oleh qPCR menunjukkan bahwa ASO^{A19} signifikan menurunkan level mRNA hSNCA dibandingkan dengan kontrol ASO (100% kontrol vs 47,2% ASO^{A19}).

Untuk mengevaluasi efek off-^{A19} target ASO, dilakukan pengukuran kadar α -synuclein (SNCA) endogen, β -synuclein (SNCB), dan γ -synuclein (SNCG) pada tikus. Tidak terdapat perbedaan signifikan mRNA zat-zat ini antara kontrol dan tikus yang diobati ASO^{A19}, menunjukkan bahwa ASO^{A19} tidak memiliki off-target.



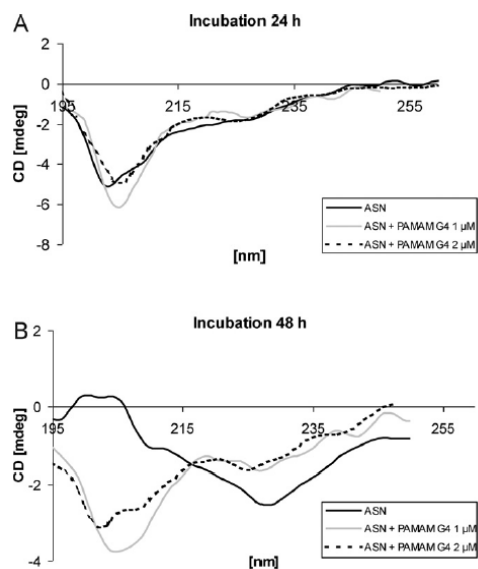
Gambar 2. Efisiensi ASO pada Penelitian *In Vivo* Menggunakan Tikus.

Potensi *Polyamidoamine Dendrimers* Generasi 4 (PAMAM G4)

Penelitian lokalisasi *PAMAM Dendrimer* menunjukkan bahwa injeksi intrakarotid efisien untuk menggantikan injeksi intrakranial yang bersifat invasif. PAMAM G4 ditemukan di sekitar pembuluh darah dan jaringan otak di sekitarnya, menunjukkan kemampuan *PAMAM Dendrimers* untuk melewati *Blood Brain Barrier* dan mampu menginfeksi sel. Selain itu, tidak ada *dendrimer* yang terdeteksi di hati, paru-paru, dan bagian jaringan limpa.

Pada penelitian lainnya, *PAMAM Dendrimer* berefek pada agregasi α -synuclein. Pada spektrum *circular dichroism* (CD) SNCA,

keberadaan sinyal positif pada kisaran 195-206 nm setelah 48 jam inkubasi menunjukkan bahwa SNCA telah berkembang. Efek signifikan PAMAM G4 dengan tidak adanya sinyal positif dalam kisaran 195-206 nm setelah 48 jam mengindikasikan penghambatan agregasi protein (Gambar 4 Lampiran B). PAMAM G4 juga menghambat pembentukan *beta-sheet*.



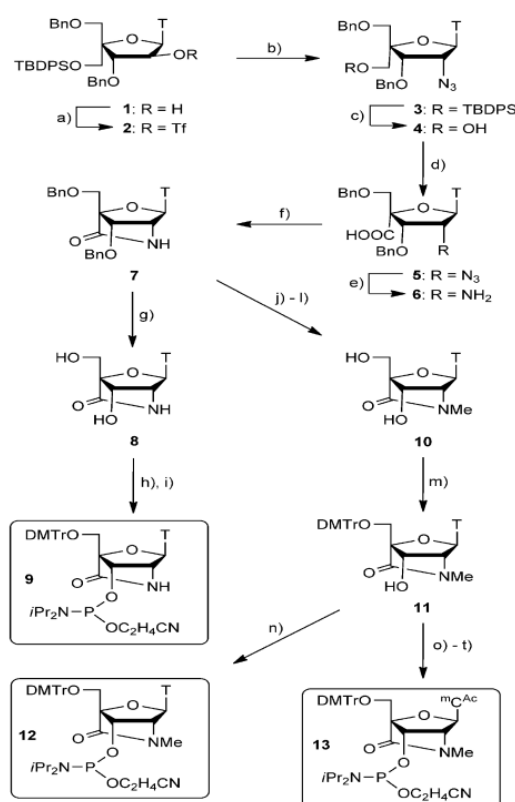
Gambar 4. Perbandingan Spektrum CD α -synuclein dengan Spektrum CD α -synuclein yang

Pembentukan fibril dipelajari menggunakan uji fluoresensi thioflavin T (ThT), di mana peningkatan intensitas fluoresensi ThT merupakan indikasi proses ini. Durasi fase lag SNCA lebih pendek daripada SNCA dengan adanya PAMAM G4. *Dendrimer* ini mengurangi laju perpanjangan (diukur sebagai kemiringan bagian eksponensial dari kurva sigmoid), khususnya pada konsentrasi 2 μ M, dan menyebabkan pengurangan signifikan jumlah akhir fibril yang terbentuk (Gambar 5 Lampiran B). Hal ini terjadi karena gugus amino kationik PAMAM G4 memengaruhi daerah asam amino N-terminal region SNCA.

Mekanisme Kombinasi AmNA- ASO dengan PAMAM G4

Sintesis AmNA dimulai dengan senyawa 1 yang melewati proses trifilasi dan diikuti reaksi SN2 dengan nan3 dan menghasilkan senyawa 3. Gugus silyl yang melindungi senyawa 3 dilepas dengan *tributylammonium fluoride* (TBAF) untuk menghasilkan 4 dengan bagian bebas hidroksi yang dioksidasi menggunakan *pyridinium dichromate* (PDC) dalam *Dimethylformamide* (DMF) untuk menghasilkan asam karboksilat pada 5. Gugus

azida pada posisi 2' lalu dikonversi menjadi gugus amino melalui reaksi Straudinger (penambahan pbu3 dalam THF pada senyawa 5) untuk menghasilkan senyawa 6. Kemudian gugus karboksilat pada posisi 4' dan gugus amino pada posisi 2' disambung menggunakan reaksi konsensasi yang diaktivasi oleh N'-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide (EDCI) untuk menghasilkan produk siklik 7. Senyawa 7 lalu mengalami debenzilasi oleh *catalytic hydrogenolysis* dan menghasilkan monomer 8 yang memiliki gugus fungsi karbonil.



Gambar 3. Sintesis AmNA

Monomer yang diinginkan dengan gugus karbonil berhasil disintesis. Gugus fungsional nitrogen pada posisi 2' memungkinkan sintesis dari berbagai derivat N- substitute monomer. Proteksi dengan *benzyloxymethyl* (BOM) pada bagian timin dilakukan agar bagian tidak terjadi N-metilasi pada bagian timin. Lalu N-metilasi dilakukan pada gugus fungsi nitrogen diikuti dengan debenzilasi dengan *catalytic hydrogenolysis* untuk mendapatkan N-metilasi

monomer 10. Untuk menjadikan monomer 8 dan 10 menjadi oligonukleotida, hidroksi primer dari masing-masing monomer 8 dan 10 di trilasi secara selektif dengan 4,4'-*dimethoxytrityl chloride* (dmtrcl). Lalu gugus hidroksi sekunder mengalami fosfitilasi dengan 2-*cianoethyl-N, N, N', N'-tetrakisopropylphosphordiamidite* untuk menghasilkan fosforamidit timin 9 dan 12. Untuk interkonversi nukleobase (yaitu, timin menjadi sitosin), gugus hidroksi sekunder dari nukleosida tritylated 11 dilindungi dengan kelompok trietilsilil (TES), dan perlakuan selanjutnya dengan 2,4,6-*triiisopropilbenzulfonil* klorida (iPr₃ArSO₂Cl) dengan adanya 4-*dimethylaminopyridine* (DMAP) dan *triethylamine* (TEA) mensulfonasi gugus 4-okso gugus timin. Nukleosida yang telah tersulfonilasi diberi substitusi dengan amonia untuk menghasilkan turunan 5-*metilsitidin*. Bagian amino eksosiklik dari 5-methylcytidine dilindungi dengan gugus asetil, diikuti oleh desililasi dan fosforilasi gugus hidroksi sekunder bebas oleh 2-*cianoethyl-N, N, N', N'-tetrakisopropylphosphordiamidite* untuk menghasilkan 5-*methylcytidine phosphordiamidite* yang dilindungi N₄-asetil. Monomer AmNA yang telah disintesis lalu diinkorporasikan ke oligonukleotida sesuai dengan protokol phosphoramidite standar pada *automated DNA synthesizer*.

Sementara itu, PAMAM Dendrimer menggunakan teknik divergen di mana sintesis berawal dari inti *dendrimer* dan bercabang keluar. Inti yang digunakan untuk PAMAM Dendrimer adalah molekul ammonia atau *ethylenediamine* (EDA). Ammonia memiliki tiga situs pengikatan untuk unit amidoamine sementara EDA memiliki empat situs. Konstruksi dari inti EDA dimulai dengan penambahan EDA sebagai amina primer dengan *methyl acrylate* yang membentuk tetraester. Tetraester yang terbentuk lalu mengalami proses amidasi dengan EDA dan membentuk generasi 0 (G₀) dari PAMAM Dendrimer yang memiliki 4 cabang amino. Tetraester yang terbentuk merupakan PAMAM

Dendrimer generasi -0.5 (G_{-0.5}), sementara EDA itu sendiri merupakan generasi -1 (G₋₁). Untuk cabang *dendrimer* disintesis dengan *methyl acrylate* dan EDA. Monomer *methyl acrylate* ditambahkan pada cabang amino G₀ untuk membentuk *half-generation* (G_{0.5}). Untuk membentuk sebuah *full-generation* (G₁), EDA ditambahkan dan dilakukan seterusnya sampai mencapai generasi *dendrimer* yang diinginkan yaitu PAMAM G₄.

PAMAM G₄ yang sudah disintesis dicampur AmNA-ASO dalam larutan HEPES *buffer* (pH 7.4) dan diinkubasi pada suhu ruangan selama satu jam.

Jalur Administrasi AmNA-ASO dan PAMAM Dendrimer

Jalur administrasi kombinasi AmNA-ASO dan PAMAM G₄ melalui jalur *intracarotid delivery drug* memiliki keuntungan seperti meningkatkan efektivitas obat untuk mencapai target spesifik seperti *blood brain barrier*. Selain itu perbandingan berat otak pada manusia dengan berat tubuh yang cukup besar memungkinkan manusia untuk menoleransi pemberian obat dalam dosis yang cukup besar. Secara teori keuntungan lain dari metode ini juga meliputi penurunan *systemic toxicity* dan *rapid onset* dari obat yang dimasukkan. Hal ini tentu sangat bermanfaat dalam pengobatan yang menyangar organ spesifik yakni otak.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan *literature review* terhadap pengambilan beberapa studi pustaka didapatkan kesimpulan bahwa terapi gen menggunakan AmNA-ASO dapat menekan ekspresi *α-synuclein* yang berperan dalam patogenesis PD. AmNA-ASO diadministrasikan menggunakan teknologi nano yaitu PAMAM G₄ yang efektif dalam mengantarkan AmNA-ASO, serta ikut menghambat agregasi protein *α-synuclein*.

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai uji klinis dan jumlah dosis yang diberikan dari potensi kombinasi AmNA-ASO dengan

PAMAM G4 tertarget α -synuclein agar dapat menjadi pilihan terapi Parkinson yang lebih efektif.

5. REFERENSI

1. Twelves D, Perkins KS, Counsell C. *Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. Mov Disord.* 2010;18:19–31.
2. *National Institute for Health and Care Excellence (NICE) Parkinson's disease: diagnosis and management in primary and secondary care.* NICE clinical guidelines 35. Jun, 2016.
3. Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, et al. *Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030.* *Neurology* 2010;68:384–6.
4. de Lau LML, Breteler MMB. *Epidemiology of Parkinson's disease.* *Lancet Neurol* 2016;5:525–35.
5. *Scope (prevalence and incidence) of neurological conditions.* In: *Mapping connections: an understanding of neurological conditions in Canada.* Ottawa: Public Health Agency of Canada; 2014.
6. Miller IN, Cronin-Golomb A. *Gender differences in Parkinson's disease: clinical characteristics and cognition.* *Mov Disord.* 2010;25:2695–2703.
7. Ascherio A. dan Schwarzschild MA. *The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention.* *The Lancet Neurology.* 2016;15(12), 1257–1272.
8. Klein C, Westenberger A. *Genetics of Parkinson's disease.* *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Jan;2(1):a008888.
9. Siderowf A, Lang AE. *Premotor Parkinson's disease: concepts and definitions.* *Mov Disord.* 2012;27(5):608–616. doi:10.1002/mds.24954
10. Connolly BS, Lang AE. *Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review.* *JAMA.* 2014; 311(16): 1670- 1683.
11. Yamamoto T., Yahara A., Waki, R., Yasuhara, H., Wada, F., Harada-Shiba, M., & Obika, S. *Amido-bridged nucleic acids with small hydrophobic residues enhance hepatic tropism of antisense oligonucleotides in vivo.* *Organic & Biomolecular Chemistry.* 2015; 13(12), 3757–3765.
12. Caminade A.-M., Laurent R., Majoral J.-P. *Characterization of dendrimers.* *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015;57:2130–2146.
13. Florendo M, Figacz A, Srinageshwar B, et al. *Use of Polyamidoamine Dendrimers in Brain Diseases.* *Molecules.* 2018;23(9):223–8.
14. Mishra MK, Beaty CA, Lesniak WG, et al. *Dendrimer brain uptake and targeted therapy for brain injury in a large animal model of hypothermic circulatory arrest.* *ACS Nano.* 2014;8(3):2134–2147. doi:10.1021/nn404872e
15. Xu L, Pu J. *Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: From Pathogenetic Dysfunction to Potential Clinical Application.* *Parkinson's Disease.* 2016;2016:1–10.
16. Stefanis L. *α -Synuclein in Parkinson's Disease.* *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2011;2(2):a009399–a009399.
17. Antony P, Diederich N, Krüger R, Balling R. *The hallmarks of Parkinson's disease.* *FEBS Journal.* 2013;280(23):5981–5993.
18. Michel P, Hirsch E, Hunot S. *Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease.* *Neuron.* 2016;90(4):675–691.
19. Uehara, T., Choong, C., Nakamori, M. et al. *Amido-bridged nucleic acid (AmNA)-modified antisense oligonucleotides targeting α -synuclein as a novel therapy for Parkinson's disease.* *Sci Rep* 9, 7567 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43772-9>.
20. Uehara, T., Choong, C., Hayakawa, H. et al. *Antisense oligonucleotides containing amido-bridged nucleic acid reduce SNCA expression and improve motor function in*

- Parkinson's disease animal models.* Journal of the Neurological Sciences. 2017; 945–1128.
21. Srinageshwar B, Peruzzaro S, Andrews M, et al. *PAMAM Dendrimers Cross the Blood- Brain Barrier When Administered through the Carotid Artery in C57BL/6J Mice.* Int J Mol Sci. 2017;18(3):628. Published 2017 Mar 14. doi:10.3390/ijms18030628.
 22. Milowska, K., Malachowska, M., & Gabryelak, T.. *PAMAM G4 dendrimers affect the aggregation of α -synuclein.* International Journal of Biological Macromolecules. 2011;48(5), 742–746. doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.02. 021.
 23. Rekas, V. Lo, G.E. Gadd, R. Cappai, S.I. Yun, *Macromol. Biosci.* 9. 2010; 230–238.
 24. Yahara A, Shrestha AR, Yamamoto T, Hari Y, Osawa T, Yamaguchi M, et al. *Amido- Bridged Nucleic Acids (AmNAs): Synthesis, Duplex Stability, Nuclease Resistance, and in Vitro Antisense Potency.* ChemBioChem. 2012;13(17):2513–6.
 25. Peterson J, Ebber A, Allikmaa V, Lopp M. *SYNTHESIS AND CZE ANALYSIS OF PAMAMDENDRIMERS WITH AN ETHYLENEDIAMINE CORE.* Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Chemistry. 2010;50(3):156-166.
 26. Ziemba B, Matuszko G, Bryszewska M, Klajnert B. *Influence of dendrimers on red blood cells.* Cellular and Molecular Biology Letters. 2012;17(1).
 27. Nourazarian A, Najar A, Farajnia S, Khosroushahi A, Pashaei-Asl R, Omidi Y. *Combined EGFR and c-Src Antisense Oligodeoxynucleotides Encapsulated with PAMAM Denderimers Inhibit HT-29 Colon Cancer Cell Proliferation.* Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2012;13(9):4751- 4756.
 28. Shailendra Joshi, Philip M. Meyers, Eugene Ornstein. *Intracarotid Delivery of Drugs : The Potential and the Pitfalls.*2018; 109(3): 543-564