


PENILAIAN PERANAN NEUROPROTEKTIF  
METALOTIONIN DALAM MODEL  
PENYAKIT PARKINSON  
ARUHAN ROTENONE PADA  
*DANIO RERIO*:  
KAJIAN *IN VIVO*



UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA

 <b>UNIVERSITI</b> <b>KEBANGSAAN</b> <b>MALAYSIA</b> <i>The National University of Malaysia</i>	<b>UKM-SPKPPP-PT(PdP)-05-AK04-BO07</b>	<b>No. Semakan: 02</b>	<b>Tarikh Kuat Kuasa:</b> <b>27/01/2026</b>
	<b>BORANG DAN SENARAI SEMAK PENYERAHAN TESIS/DISERTASI</b> <b>SELEPAS PEMBETULAN</b> <b>FORM AND CHECKLIST OF AMENDED THESIS/DISSERTATION</b> <b>SUBMISSION</b>		

**F. KELULUSAN DEKAN/PENGARAH / APPROVAL FROM DEAN/DIRECTOR**

Tandatangan: Signature		Tarikh: 4/6/26 Date
Nama dan Cap Rasmi: Name and Official Stamp	<b>PROFESOR DATO' DR MARINA MAT BAKI</b> <b>MD (UKM), MS ORL-HNS (UKM), PhD (UCL)</b> Dekan Fakulti Perubatan Pakar Perunding Kanan ORL-HNS Universiti Kebangsaan Malaysia	


**G. PERAKUAN TESIS/ DISERTASI SARJANA / DOKTOR FALSAFAH (CERTIFICATION OF MASTER'S / DOCTORAL THESIS / DISSERTATION)**

Nama penuh pengarang (Author's Full Name)	NIES YONG HUI		
No. Pendaftaran Pelajar (Student's Registration No.)	P100341	Sesi Akademik (Academic Session)	20252026
Tajuk Tesis / Disertasi (Thesis / Dissertation Title)	Penilaian Peranan Neuroprotektif Metalotionin dalam Model Penyakit Parkinson Aruhan Rotenone pada Danio rerio: Kajian in vivo		

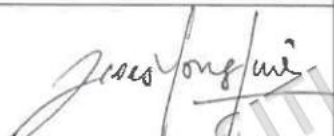
Semua tesis/disertasi dan penerbitan berkaitan hasil penyelidikan pelajar adalah tertakluk kepada Dasar Harta Intelek Universiti Kebangsaan Malaysia.  
*All theses/ dissertations and publications relating to the research work of a student are subject to the Intellectual Property Policy of Universiti Kebangsaan Malaysia.*

Saya mengaku bahawa tahap akses tesis/disertasi ini sebagai (\*Tandakan ✓ dalam kotak bagi maklumat yang berkaitan; tandakan satu (1) kotak di bawah sahaja):  
*I hereby declare the level of access for this thesis/dissertation as follows (tick ✓ the relevant box below; tick only one option).*

Pilihan Tahap Akses Access Level Selection		Tafsiran Tahap Akses Tesis/Disertasi Definition of Thesis/Dissertation Access Level
<input type="checkbox"/>	<b>RAHSIA (CONFIDENTIAL)</b>	Mengandungi maklumat rahsia sepertimana yang diperuntukan bawah Akta Rahsia Rasmi 1972. <i>Contains classified information as stipulated under the Official Secrets Act 1972.</i>
<input type="checkbox"/>	<b>TERHAD (RESTRICTED)</b>	Mengandungi maklumat yang hanya boleh diakses oleh pihak yang mempunyai kebenaran atau keperluan tertentu untuk mengetahuinya yang ditentukan oleh organisasi/ badan di mana penyelidikan dijalankan. <i>Contains information that may only be accessed by parties with specific authorization</i>

 <b>UNIVERSITI</b> <b>KEBANGSAAN</b> <b>MALAYSIA</b> <i>The National University of Malaysia</i>	<b>UKM-SPKPPP-PT(PdP)-05-AK04-BO07</b>	<b>No. Semakan: 02</b>	<b>Tarikh Kuat Kuasa:</b> <b>27/01/2026</b>
	<b>BORANG DAN SENARAI SEMAK PENYERAHAN TESIS/DISERTASI SELEPAS PEMBETULAN</b> <b>FORM AND CHECKLIST OF AMENDED THESIS/DISSERTATION SUBMISSION</b>		

		<i>or a defined need to know, as determined by the organization or body where the research is conducted.</i>
<input checked="" type="checkbox"/>	<b>AKSES TERBUKA (OPEN ACCESS)</b>	<p>Tesis/disertasi versi akhir dalam format PDF yang boleh diakses secara percuma secara dalam talian dan bebas dari isu hak cipta dan pelesenan  <i>The final version of the thesis/dissertation in PDF format that is freely accessible online and free from copyright and licensing issues.</i></p> <p>Kementerian Pendidikan Tinggi melalui surat bertarikh 27 Mac 2025 memutuskan bahawa kebenaran akses tesis / disertasi dalam borang serahan akses terbuka ditentukan oleh penyelia (bukan pelajar).  <i>The Ministry of Higher Education, through a letter dated 27 March 2025, has decided that permission for thesis / dissertation access in the open access submission form shall be determined by the supervisor (not the student).</i></p>
<input type="checkbox"/>	<b>EMBARGO</b>	<p>Tempoh masa di mana akses kepada tesis/disertasi disekat (ditutup) selama dua (2) tahun atas sebab-sebab tertentu sebagai contoh kerahsiaan atau hak cipta. Tesis/disertasi akan berstatus akses terbuka selepas tamat tempoh embargo.  <i>The period during which access to the thesis/dissertation is restricted for two (2) years due to specific reasons, such as confidentiality or copyright. The thesis/dissertation will be granted open-access status upon the expiry of the embargo period.</i></p>

<b>PENGESAHAN PELAJAR (STUDENT VERIFICATION)</b>	<b>PENGESAHAN PENYELIA (SUPERVISOR VERIFICATION)</b>
 <b>TANDATANGAN PELAJAR (STUDENT'S SIGNATURE)</b>	 <b>TANDATANGAN PENYELIA / Pengerusi JK SISWAZAH (SUPERVISOR'S / CHAIRPERSON SUPERVISION COMMITTEE SIGNATURE)</b>
Nama Pelajar (Student name): <b>NIES YONG HUI</b> No. Pendaftaran Pelajar (Student's Registration No.) <b>P100341</b>  Tarikh: <b>18 - 5 - 2026</b> (Date)	Nama Penyelia / Pengerusi JK Siswazah : <b>PROF. MADYA DR. TEOH SEONG LIN</b> (Supervisor's / Chairperson Supervision Committee Name) B. Biomed (Hons)(UKM), M. Med Sc(Anat)(UKM), Ph.D (Monash) Penolong Dekan (Kualiti & Strategi) Pensyarah, Jabatan Anatomi Fakulti Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia Tarikh: <b>19 Mei 2026</b> (Date)

PENILAIAN PERANAN NEUROPROTEKTIF METALOTIONIN DALAM  
MODEL PENYAKIT PARKINSON ARUHAN ROTENONE PADA  
*DANIO RERIO*: KAJIAN *IN VIVO*



TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH  
IJAZAH DOKTOR FALSAFAH

FAKULTI PERUBATAN  
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA  
KUALA LUMPUR

2026

**PENGAKUAN**

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

19 Mei 2026

NIES YONG HUI  
P100341

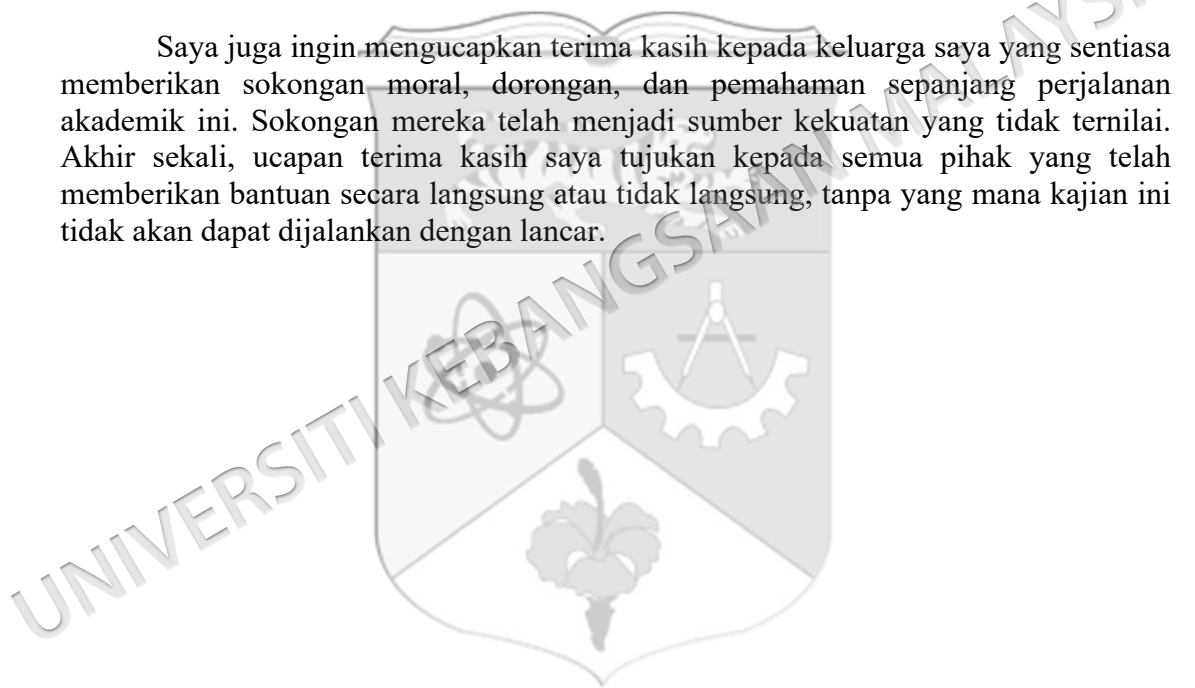


## PENGHARGAAN

Saya ingin merakamkan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Prof. Madya Dr. Teoh Seong Lin, penyelia utama kajian ini, atas bimbingan, sokongan, dan teguran yang amat bernilai sepanjang proses penyelidikan ini. Kepakaran dan pandangan beliau telah memberi impak besar dalam membentuk hala tuju kajian ini. Saya juga ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada Dr. Mohamad Fairuz Yahaya dan Dr. Norwahidah Abdul Karim, penyelia bersama, atas nasihat, pandangan dan kritikan yang diberikan dalam memperkaya hasil kajian ini.

Seterusnya, saya ingin merakamkan penghargaan kepada pegawai penyelidikan dan juruteknologi makmal perubatan di Jabatan Anatomi, Fakulti Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), atas kerjasama, dedikasi, dan komitmen mereka yang telah banyak membantu dalam memastikan kelancaran penyelidikan ini.

Saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada keluarga saya yang sentiasa memberikan sokongan moral, dorongan, dan pemahaman sepanjang perjalanan akademik ini. Sokongan mereka telah menjadi sumber kekuatan yang tidak ternilai. Akhir sekali, ucapan terima kasih saya tujukan kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan secara langsung atau tidak langsung, tanpa yang mana kajian ini tidak akan dapat dijalankan dengan lancar.



## ABSTRAK

Penyakit Parkinson (PD) ialah gangguan neurodegeneratif progresif yang dikaitkan dengan degenerasi neuron dopaminergik (DA) secara selektif dalam *substantia nigra pars compacta* akibat tekanan oksidatif, disfungsi mitokondria, dan disregulasi imun. Kajian ini bertujuan untuk menyiasat kesan rawatan Metalotionin-2 manusia (hMT2) dalam model PD zebrafish (*Danio rerio*) yang dicetuskan oleh rotenone. Sejumlah 228 ekor zebrafish dewasa telah dibahagikan kepada empat kumpulan eksperimen: kawalan (n = 58), rotenone (n = 60), prarawatan hMT2 (n = 55), dan pascarawatan hMT2 (n = 55). Zebrafish didedahkan kepada rotenone pada kepekatan 5 µg/L di dalam air selama 28 hari untuk mencetuskan fenotip PD. Protein hMT2 eksogen (0.2 µg/ikan) kemudiannya disuntik secara intrakranium ke dalam zebrafish satu hari sebelum pendedahan kepada rotenone bagi intervensi profilaksis (prarawatan hMT2) dan 28 hari selepas pendedahan kepada rotenone bagi intervensi terapeutik (pascarawatan hMT2). Parameter analisis yang dinilai secara holistik termasuklah analisis aktiviti lokomotor, analisis biokimia bagi tekanan oksidatif (TBARS), penilaian respirasi mitokondria menggunakan MitoPlate I-1, pewarnaan imunohisto-kimia pada neuron DA, serta analisis mikrosusunan yang disahkan melalui qPCR. Hasil kajian menunjukkan bahawa pendedahan kepada rotenone berjaya memanifestasikan ciri-ciri patologi klinikal PD melalui penurunan aktiviti lokomotor ( $p < 0.05$ ), peningkatan fenotip keresahan ( $p < 0.001$ ), dan ketahanan terhadap perencat kompleks II rantai pengangkutan elektron (ETC) serta meklizin mitokondria yang membawa kepada peningkatan dalam tekanan oksidatif (TBARS,  $p < 0.001$ ). Pada peringkat sel, neurotoksisiti rotenone mengganggu homeostasis DA (*dat, th1, th2*;  $p < 0.001$ ), mengurangkan sokongan neurotropik (*bdnf*,  $p < 0.001$ ), dan mencetuskan neuroinflamasi progresif melalui pencetusan sitokin pro-keradangan (*il-1a, il-1b, cox-2, tnf-α*;  $p < 0.001$ ), mikrogliosis reaktif (*tyrobp*;  $p < 0.001$ ), dan pengaktifan agresif sistem imun adaptif yang dikawal perantara oleh sel T sitotoksik CD8<sup>+</sup> (*gzm3, cd8a, themis, lck*;  $p < 0.001$ ). Kerosakan neuron ini dikawal perantara oleh peningkatan regulasi gen pro-apoptosis (*dedd1*;  $p < 0.001$ ) yang mencetuskan pelaksanaan apoptosis melalui laluan ekstrinsik. Walau bagaimanapun, intervensi menggunakan hMT2 telah terbukti menunjukkan neuroprotector multiasaran yang berkesan. hMT2 berjaya menstabilkan semula aktiviti lokomotor, melemahkan mikropersekitaran CNS yang meradang melalui penindasan lala sitokin, menyekat pengaktifan mikroglia (*tyrobp*;  $p < 0.001$ ), dan menormalkan pengekspresan gen pengaktifan sel T patogenik (*gzm3, cd8a, themis, lck*;  $p < 0.05$ ). Dapatan paling berimpak menyimpulkan bahawa kecekapan hMT2 adalah dinamik dan bersandarkan masa. Pendekatan profilaksis didapati unggul dalam perlindungan struktur sel hulu melalui pemeliharaan populasi neuron DA ( $p < 0.05$ ), penstabilan mitokondria ( $p < 0.001$ ), dan rintangan terhadap fasa pelaksanaan apoptosis melalui penindasan genetik bagi gen *dedd1* ( $p < 0.05$ ). Sebaliknya, pendekatan terapeutik menunjukkan keunggulan dalam pemulihan berfungsi hilir dengan menyediakan pengurangan maksimum bagi beban tekanan oksidatif sistemik (TBARS;  $p < 0.001$ ), meringankan keradangan akut (*il-1a, il-1b, cox-2, tnf-α*;  $p < 0.001$ ), dan mengaktifkan gen pertahanan endogenus zebrafish (*mt2 dan smtb*;  $p < 0.001$ ) untuk pemulihan motor yang lebih cekap. Secara keseluruhan, data daripada kajian ini menyediakan asas praklinikal yang kukuh untuk mencadangkan hMT2 sebagai modaliti rawatan dwifungsi (profilaksis dan terapeutik) yang berpotensi dalam menghentikan atau memperlambatkan perkembangan neurodegenerasi untuk pengurusan PD pada masa hadapan.

**EVALUATION OF THE NEUROPROTECTIVE ROLE OF METALLOTHIONEIN IN  
ROTENONE-INDUCED PARKINSON'S DISEASE MODEL IN DANIO RERIO:  
AN IN VIVO STUDY**

**ABSTRACT**

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder associated with selective degeneration of dopaminergic (DA) neurons in the *substantia nigra pars compacta* due to oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and immune dysregulation. This study aimed to investigate the effects of human Metallothionein-2 (hMT2) treatment in a zebrafish (*Danio rerio*) model of PD induced by rotenone. A total of 228 adult zebrafish were divided into four experimental groups: control (n = 58), rotenone (n = 60), hMT2 pretreatment (n = 55), and hMT2 posttreatment (n = 55). Zebrafish were exposed to rotenone at a concentration of 5 µg/L in water for 28 days to induce the PD phenotype. Exogenous hMT2 protein (0.2 µg/fish) was then injected intracranially into zebrafish one day before exposure to rotenone for prophylactic intervention (hMT2 pretreatment) and 28 days after exposure to rotenone for therapeutic intervention (hMT2 posttreatment). Analytical parameters evaluated included locomotor activity analysis, biochemical analysis of oxidative stress (TBARS), assessment of mitochondrial respiration using MitoPlate I-1, immunohistochemical staining of DA neurons, and microarray analysis validated by qPCR. The results showed that exposure to rotenone successfully manifested the clinical pathological features of PD through decreased locomotor activity ( $p < 0.05$ ), increased anxiety phenotype ( $p < 0.001$ ), and resistance to complex II inhibitors and meclizine in mitochondrial electron transport chain (ETC) leading to increased oxidative stress (TBARS,  $p < 0.001$ ). At the cellular level, rotenone neurotoxicity disrupts DA homeostasis (*dat*, *th1*, *th2*;  $p < 0.001$ ), reduces neurotrophic support (*bdnf*,  $p < 0.001$ ), and triggers progressive neuroinflammation through the induction of pro-inflammatory cytokines ( $p < 0.001$ ), reactive microgliosis (*tyrobp*;  $p < 0.001$ ), and aggressive activation of the adaptive immune system mediated by CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells ( $p < 0.001$ ). This neuronal damage is mediated by the upregulation of pro-apoptotic genes (*dedd1*;  $p < 0.001$ ) that trigger the execution of apoptosis via the extrinsic pathway. However, hMT2 successfully restored locomotor activity, attenuated the inflammatory CNS microenvironment through suppression of cytokine cascades, blocked microglial activation (*tyrobp*;  $p < 0.001$ ), and normalized the expression of pathogenic T cell activation genes (*gzm3*, *cd8a*, *themis*, *lck*;  $p < 0.05$ ). The findings concluded that the efficacy of hMT2 was dynamic and time-dependent. The prophylactic approach was found to be superior in the protection of upstream cellular structures through preservation of DA neuronal populations ( $p < 0.05$ ), stabilization of mitochondria ( $p < 0.001$ ), and resistance to the execution phase of apoptosis through genetic suppression of the *dedd1* gene ( $p < 0.05$ ). In contrast, the therapeutic approach demonstrated superiority in downstream functional recovery by providing maximal reduction of systemic oxidative stress burden (TBARS;  $p < 0.001$ ), alleviating acute inflammation (*il-1a*, *il-1b*, *cox-2*, *tnf-α*;  $p < 0.001$ ), and activating endogenous zebrafish defense genes (*mt2* and *smtb*;  $p < 0.001$ ) for more efficient motor recovery. Overall, the data from this study provide a strong preclinical basis to propose hMT2 as a dual-purpose (prophylactic and therapeutic) treatment modality with potential in halting or slowing the progression of neurodegeneration for the future management of PD.

## KANDUNGAN

		Halaman
<b>PENGAKUAN</b>		<b>ii</b>
<b>PENGHARGAAN</b>		<b>iii</b>
<b>ABSTRAK</b>		<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>		<b>v</b>
<b>KANDUNGAN</b>		<b>vi</b>
<b>SENARAI JADUAL</b>		<b>x</b>
<b>SENARAI ILUSTRASI</b>		<b>xii</b>
<b>SENARAI SINGKATAN</b>		<b>xvi</b>
<b>BAB I</b>	<b>PENGENALAN</b>	
1.1	Latar Belakang	1
1.2	Kepentingan Kajian	4
1.3	Permasalahan Kajian	5
1.4	Hipotesis Kajian	6
1.5	Objektif Kajian	6
	1.5.1 Objektif Umum	6
	1.5.2 Objektif Khusus	7
<b>BAB II</b>	<b>KAJIAN LITERASI</b>	
2.1	Penyakit Parkinson	8
	2.1.1 Statistik PD	9
	2.1.2 Tanda dan Gejala Klinikal PD	10
	2.1.3 Peringkat PD	13
	2.1.4 Etiologi dan Faktor Risiko PD	14
	2.1.5 Patogenesis PD	22
2.2	Rotenone	54
	2.2.1 Perkaitan Rotenone dengan PD	55
	2.2.2 Penggunaan Rotenone dalam Model PD	56
2.3	Zebrafish	60
2.4	Rawatan PD	63
2.5	Metalotionin	68
	2.5.1 Fungsi MT dalam Otak	71

	2.5.2	Kesan Neuroprotektif MT dalam PD	74
2.6		Kerangka Konsep Kajian	84
<b>BAB III KAEDAH KAJIAN</b>			
3.1		HAIWAN KAJIAN	86
3.2		BAHAN KIMIA	86
	3.2.1	Rawatan Zebrafish	86
	3.2.2	Agen Pelali	87
	3.2.3	Analisis Lokomotor	87
	3.2.4	Analisis Mikrosusun ( <i>Microarray</i> )	87
	3.2.5	Kajian Analisa Tindakbalas Berantai Polimerase Kuantitatif Kadar Semasa (qPCR)	87
	3.2.6	Kajian Immunohistokimia	88
	3.2.7	Kajian Pemperoksidaan Lipid	88
	3.2.8	Asai Imunojerapan Berpaut Enzim (ELISA) untuk Dopamin	88
	3.2.9	Ujian Respirasi Mitokondria	88
3.3		Alat Radas	89
	3.3.1	Rawatan rotenone	89
	3.3.2	Rawatan hMT2	89
	3.3.3	Pengorbanan Zebrafish	89
	3.3.4	Analisis Lokomotor	89
	3.3.5	Analisis Mikrosusun	89
	3.3.6	Kajian Analisa PCR	90
	3.3.7	Kajian Immunohistokimia	90
	3.3.8	Kajian Pemperoksidaan Lipid	90
	3.3.9	Ujian ELISA untuk Dopamin	91
	3.3.10	Ujian Respirasi Mitokondria	91
3.4		KAEDAH	91
	3.4.1	Haiwan Kajian	91
	3.4.2	Analisis Lokomotor	95
	3.4.3	Analisis Mikrosusun	96
	3.4.4	Kajian Analisa qPCR	99
	3.4.5	Kajian Immunohistokimia	102
	3.4.6	Kajian Pemperoksidaan Lipid	105
	3.4.7	Ujian ELISA untuk Dopamin	107
	3.4.8	Ujian Respirasi Mitokondria	111
	3.4.9	Analisis Statistik	115
<b>BAB IV DAPATAN KAJIAN</b>			
4.1		Analisis Mikrosusun Otak Zebrafish Aruhan Rotenone	116
	4.1.1	Profil Pengekspresan Gen Pembezaan ( <i>Differentially Expressed Gene, DEG</i> )	116

	4.1.2	Kajian Pengesahan qPCR bagi DEGs	120
4.2		Pencirian Model PD Aruhan Rotenone pada Zebrafish	123
	4.2.1	Gangguan Aktiviti Lokomotor dan Manifestasi Fenotip Keresahan akibat Pendedahan Rotenone	123
	4.2.2	Tindak Balas Gen Pertahanan Endogen ( <i>mt2</i> dan <i>smtb</i> ) akibat Pendedahan Rotenone	125
	4.2.3	Induksi Lata Sitokin Pro-keradangan ( <i>il-1a</i> , <i>il-1b</i> , <i>cox-2</i> dan <i>tnf-<math>\alpha</math></i> ) akibat Pendedahan Rotenone	126
	4.2.4	Kemerosotan Sokongan Neurotropik ( <i>bdnf</i> ) akibat Pendedahan Rotenone	127
	4.2.5	Disregulasi Sistem Dopaminergik ( <i>dat</i> , <i>th1</i> dan <i>th2</i> ) dan Kemerosotan Populasi Neuron DA akibat Pendedahan Rotenone	128
	4.2.6	Peningkatan Tekanan Oksidatif dan Disfungsi Respirasi Mitokondria akibat Pendedahan Rotenone	132
4.3		Potensi Neuroprotektif Protein hMT2 terhadap Model PD pada Zebrafish	136
	4.3.1	Pemulihan Aktiviti Lokomotor dan Pengurangan Fenotip Keresahan oleh hMT2	136
	4.3.2	Modulasi Gen Pertahanan Endogen ( <i>mt2</i> dan <i>smtb</i> ) oleh hMT2	138
	4.3.3	Efikasi Anti-keradangan hMT2 melalui Penindasan Sitokin Pro-keradangan ( <i>il-1a</i> , <i>il-1b</i> , <i>cox-2</i> dan <i>tnf-<math>\alpha</math></i> ) oleh hMT2	139
	4.3.4	Pemulihan Sokongan Neurotropik ( <i>bdnf</i> ) melalui Intervensi hMT2	140
	4.3.5	Pemulihan Sistem Dopaminergik ( <i>dat</i> , <i>th1</i> dan <i>th2</i> ) dan Populasi Neuron DA oleh hMT2	141
	4.3.6	Penurunan Tekanan Oksidatif dan Pemulihan Respirasi Mitokondria oleh hMT2	145
	4.3.7	Modulasi Pengisyaratkan Sel T dan Pengawalaturan Limfosit T Sitotoksik oleh hMT2	151
	4.3.8	Penindasan Mikrogliosis dan Pengawalaturan Tindak Balas Sitokin oleh hMT2	152
	4.3.9	Perintangn Proses Apoptosis dan Perlindungan Terhadap Neurodegenerasi oleh hMT2	153
	4.3.10	Perbandingan Efikasi Antara Intervensi Profilaksis dan Terapeutik hMT2	154

## **BAB V PERBINCANGAN**

## **BAB VI RUMUSAN DAN CADANGAN**

6.1	Rumusan	187
-----	---------	-----

6.2	Limitasi Kajian	189
6.3	Cadangan Kajian Lanjutan	190
<b>RUJUKAN</b>		<b>191</b>
<b>PENERBITAN BERDASARKAN KAJIAN</b>		<b>263</b>
<b>LAMPIRAN A</b>		<b>264</b>
<b>LAMPIRAN B</b>		<b>266</b>



## SENARAI JADUAL

<b>No. Jadual</b>		<b>Halaman</b>
Jadual 2.1	Kesan toksik dan epigenetik logam yang berbeza dalam PD	18
Jadual 2.2	Mutasi gen yang telah dilaporkan menyebabkan PD	19
Jadual 2.3	Ringkasan perkembangan model PD dengan pemberian rotenone dan keupayaannya menghasilkan ciri-ciri patologi PD	58
Jadual 2.4	Kesan sampingan umum ubat PD	64
Jadual 2.5	Perbandingan isoform metalotionin manusia	70
Jadual 3.1	Ringkasan proses menjalankan pengekstrakan RNA	97
Jadual 3.2	Isipadu komponen-komponen yang diperlukan untuk transkripsi terbalik	99
Jadual 3.3	Maklumat DEGs yang terperinci	100
Jadual 3.4	Maklumat gen yang terperinci	101
Jadual 3.5	Isipadu komponen-komponen yang diperlukan untuk analisis qPCR	101
Jadual 3.6	Ringkasan proses menjalankan qPCR	102
Jadual 3.7	Ringkasan prosedur pewarnaan immunohistokimia	104
Jadual 3.8	Penyediaan pencairan bersiri MDA	106
Jadual 3.9	Penyediaan pencairan bersiri piawai BSA	112
Jadual 3.10	Isipadu komponen-komponen yang diperlukan untuk telaga kawalan negatif	115
Jadual 3.11	Isipadu komponen-komponen yang diperlukan untuk semua telaga lain	115
Jadual 4.1	Ekspresi DEGs yang disregulasi dengan signifikan dalam kumpulan PD aruhan rotenone	117
Jadual 4.2	Senarai <i>Gene Ontology</i> (GO) yang signifikan yang dihasilkan daripada analisis	117
Jadual 4.3	Analisis laluan melibatkan penentuan laluan biologi yang signifikan berdasarkan ekspresi DEGs dalam model PD	120

Jadual 4.4 Perbandingan efikasi antara intervensi profilaksis dan terapeutik hMT2 dalam model PD zebrafish

155



## SENARAI ILUSTRASI

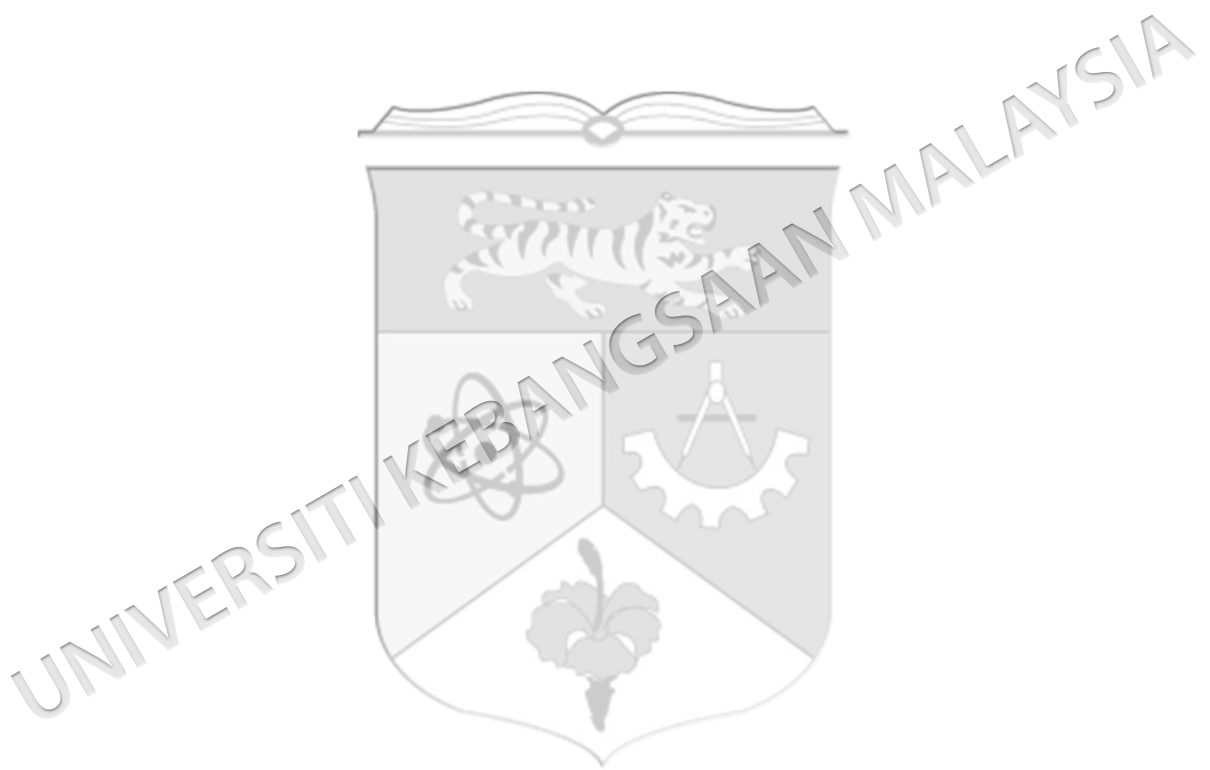
<b>No. Rajah</b>		<b>Halaman</b>
Rajah 2.1	Anatomi dan fisiologi otak yang memanifestasi aktiviti motor PD	11
Rajah 2.2	Patologi otak bagi peringkat Braak dalam PD	14
Rajah 2.3	Patogenesis PD melibatkan interaksi faktor penuaan, genetik, dan persekitaran, yang menyebabkan kehilangan neuron DA dan gejala motor kardinal PD	24
Rajah 2.4	Rantaian pengangkutan elektron	25
Rajah 2.5	Keadaan konformasi $\alpha$ -sinuklein	29
Rajah 2.6	Pengawalaturan dinamik sitokin pro-keradangan	36
Rajah 2.7	Jenis pengisyaratan IL-6	39
Rajah 2.8	Laluan pengisyaratan antara ROS dan mitofagi	43
Rajah 2.9	Litar fronto-basal terlibat dalam modulasi pergerakan voluntari dan kesalinghubungan terjejas yang disebabkan oleh degenerasi DA dalam PD	50
Rajah 2.10	Struktur kimia rotenone	55
Rajah 2.11	Kawasan otak zebrafish dan manusia yang menonjolkan kawasan homolog utama	62
Rajah 2.12	Tapak pengikatan ion logam dalam molekul metalotionin	71
Rajah 2.13	Kerangka Konsep Mekanisme Neuroprotektif hMT2 terhadap Model PD aruhan rotenone pada <i>Danio rerio</i>	85
Rajah 3.1	Aliran kerja keseluruhan kajian	93
Rajah 3.2	Cara suntikan intrakranium pada tengkorak zebrafish yang telah dibius dan diapit dalam span	95
Rajah 3.3	Graf $\Delta OD_{535 \text{ nm}}$ terhadap kepekatan piawai	107
Rajah 3.4	Graf $\Delta OD_{450 \text{ nm}}$ terhadap kepekatan piawai dopamin	110
Rajah 3.5	Graf Log $\Delta OD_{450 \text{ nm}}$ terhadap Log (kepekatan piawai dopamin)	110
Rajah 3.6	Graf $\Delta OD_{562 \text{ nm}}$ yang diperbetulkan terhadap kepekatan piawai protein	114

Rajah 4.1	Analisis visual profil DEGs dalam otak zebrafish yang mendedah kepada rotenone	119
Rajah 4.2	Kesan pendedahan rotenone terhadap ekspresi gen yang terlibat dalam pengisyarahan sel T dan limfosit T sitotoksik	121
Rajah 4.3	Kesan pendedahan rotenone terhadap ekspresi gen berkaitan mikrogliosis dan tindak balas sitokin	122
Rajah 4.4	Kesan pendedahan rotenone terhadap ekspresi gen pengawal selia apoptosis ( <i>dedd1</i> )	123
Rajah 4.5	Analisis jumlah jarak berenang keseluruhan zebrafish selama lima minit	124
Rajah 4.6	Perbandingan masa berenang (s) antara Zon Atas dan Zon Bawah dalam ujian tangki baharu	124
Rajah 4.7	Penjejakan video berkomputer yang menunjukkan trajektori pergerakan zebrafish dalam tangki selama lima minit	125
Rajah 4.8	Kesan pendedahan rotenone terhadap ekspresi gen <i>mt2</i> dan <i>smtb</i> pada otak zebrafish	126
Rajah 4.9	Kesan pendedahan rotenone terhadap ekspresi gen sitokin pro-keradangan dalam otak zebrafish	127
Rajah 4.10	Kesan pendedahan rotenone terhadap ekspresi gen perlindungan neuron ( <i>bdnf</i> ) pada otak zebrafish	128
Rajah 4.11	Kesan pendedahan rotenone terhadap ekspresi gen berkaitan dopamin ( <i>dat</i> , <i>th1</i> , dan <i>th2</i> ) pada otak zebrafish	129
Rajah 4.12	Kesan pendedahan rotenone terhadap populasi neuron DA di pelbagai bahagian otak zebrafish	130
Rajah 4.13	Perbandingan bilangan sel TH+ pada semua populasi neuron di dalam otak zebrafish antara kumpulan kawalan dan rotenone	132
Rajah 4.14	Kesan pendedahan rotenone terhadap tahap pemperoksidaan lipid (TBARS) dalam otak zebrafish	133
Rajah 4.15	Peta fenetik tindak balas respirasi mitokondria terhadap pelbagai perencat mitokondria yang disasarkan kepada mitokondria antara kumpulan kawalan dan rotenone	134
Rajah 4.16	Kesan rotenone terhadap kinetik penurunan pewarna dalam mitokondria dengan kehadiran perencat kompleks II (malonat dan karboksil) dan meklizin	134

Rajah 4.17	Kesan rawatan hMT2 terhadap jumlah jarak berenang keseluruhan zebrafish dalam tempoh lima minit	137
Rajah 4.18	Kesan rawatan hMT2 terhadap taburan masa berenang di Zon Atas dan Zon Bawah	137
Rajah 4.19	Penjejakan video berkomputer yang menunjukkan trajektori pergerakan zebrafish selepas rawatan hMT2	138
Rajah 4.20	Kesan rawatan hMT2 terhadap ekspresi gen <i>mt2</i> dan <i>smtb</i> pada otak zebrafish	139
Rajah 4.21	Kesan rawatan hMT2 terhadap ekspresi gen sitokin pro-keradangan	140
Rajah 4.22	Kesan rawatan hMT2 terhadap ekspresi gen perlindungan neuron ( <i>bdnf</i> )	141
Rajah 4.23	Kesan rawatan hMT2 terhadap ekspresi gen berkaitan dopamin ( <i>dat</i> , <i>th1</i> , dan <i>th2</i> )	142
Rajah 4.24	Kesan rawatan hMT2 terhadap populasi neuron DA di pelbagai bahagian otak zebrafish	143
Rajah 4.25	Perbandingan bilangan sel TH <sup>+</sup> pada semua populasi neuron di dalam otak zebrafish antara kumpulan kawalan, rotenone dan rawatan hMT2	144
Rajah 4.26	Kesan rawatan hMT2 terhadap tahap pemperoksidaan lipid (TBARS) dalam otak zebrafish	146
Rajah 4.27	Peta fenetik kesan rawatan hMT2 terhadap tindak balas respirasi mitokondria	148
Rajah 4.28	Ujian respirasi mitokondria dilaksanakan dengan menggunakan Mitoplate I-1 yang mengandungi 22 perencat mitokondria yang berbeza	149
Rajah 4.29	Kesan rawatan hMT2 terhadap kinetik penurunan pewarna dalam mitokondria dengan kehadiran perencat kompleks II (malonat dan karboksil) dan meklizin	150
Rajah 4.30	Kesan rawatan hMT2 terhadap ekspresi gen yang terlibat dalam limfosit T sitotoksik dan pengisyratan sel T ( <i>gzm3</i> , <i>cd8a</i> , <i>lck</i> , dan <i>themis</i> )	152
Rajah 4.31	Kesan rawatan hMT2 terhadap ekspresi gen yang terlibat dalam mikrogliosis dan tindak balas sel terhadap IL-1 ( <i>tyrobp</i> , <i>il2rb</i> , dan <i>ccl34b.4</i> )	153

Rajah 4.32 Kesan rawatan hMT2 terhadap ekspresi gen pengawal selia apoptosis (*dedd1*)

154



## SENARAI SINGKATAN

AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> Sel penyaji antigen
ARE	<i>Antioxidant response element</i> Unsur gerak balas antioksidan
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
Bad	<i>Bcl-2-associated agonist of cell death</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X-protein</i>
BBB	<i>Blood-brain barrier</i> Rintangan darah-otak
BCB	<i>Blood-cerebrospinal fluid barrier</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BNIP3	<i>BCL2 interacting protein 3</i>
BSF-2	<i>B-cell differentiation factor</i> faktor pembezaan sel B
Ca <sup>2+</sup>	Ion kalsium
CAT	<i>Catalase</i> Katalase
ccl34b.4	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 34b, duplicate 4</i>
Cd	<i>Cadmium</i> Kadmium
cd8a	<i>Cluster of differentiation 8A</i>
CDK2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>

CDP-etn	<i>CDP-ethanolamine</i>
ciao1	<i>Cytosolic iron-sulfur assembly component 1</i>
CNS	<i>Central nervous system</i> Sistem saraf pusat
COMT	<i>Catechol-O-methyl-transferase</i> katekol-O-metil-transferase
CoQ10	Ubiquinon
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
CREB	<i>cAMP-response element binding protein</i>
CRP	<i>C-reactive protein</i> Protein C-reaktif
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i> Cecair serebrospina
CTX	<i>Cerebral cortex</i> Korteks serebrum
Cu	<i>Copper</i> Tembaga
CytC	<i>Cytochrome C</i>
DA	Dopamin
DAT	<i>Dopamine transporter</i> Pengangkut dopamin
Dc	<i>Central zone of dorsal telencephalic area</i> Zon tengah kawasan telensefalik dorsal
DD	<i>Death domain</i> Domain kematian
DED	<i>Death effector domain</i> Domain efektor kematian
dedd1	<i>Death effector domain-containing 1</i>
DEG	<i>Differentially expressed gene</i> Ekspresi gen pembezaan
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>

DNP	<i>2,4-Dinitrophenol</i>
EAAT	<i>Excitatory amino acid transporter</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i> Retikulum endoplasma
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
ETC	<i>Electron transport chain</i> Rantaian pengangkutan elektron
FADD	<i>Fas-Associated Death Domain</i>
FADH <sub>2</sub>	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>
FCCP	<i>Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone</i>
Fe <sup>2+</sup>	<i>Ferrous ion</i> Ion ferus
Fe <sup>3+</sup>	<i>Ferric ion</i> Ion ferik
GI	<i>Gastrointestinal</i> Salur gastrousus
GIF	<i>Growth inhibitory factor</i> Faktor perencat pertumbuhan
GO	<i>Gene ontology</i>
gp130	<i>Glycoprotein 130</i>
Gpe	<i>External segment of the globus pallidus</i> Segmen eksternal globus pallidus
Gpi	<i>Internal segment of the globus pallidus</i> Segmen internal globus pallidus
GPx	<i>Glutathione peroxidase</i> Glutation peroksidase
GSH	<i>Glutathione</i> Glutation
GST	<i>Glutathione S-transferase</i> Glutation S-transferase

GWAS	<i>Genome-wide association studies</i>
gzm3	<i>Granzyme 3</i>
G3P	<i>Glycerol-3-phosphate</i> Gliserol-3-fosfat
hMT2	<i>Recombinant human metallothionein protein</i> Protein metalotionin manusia rekombinan
HNE	4-hidroksi-2-nonenal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrogen peroksida
hpf	<i>Hours post-fertilization</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of <math>\kappa</math>B</i> Perencat $\kappa$ B
IL-1 $\alpha$	Interleukin-1 $\alpha$
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-1RacP	<i>IL-1 receptor accessory protein</i> Protein aksesori reseptor IL-1
IL-1RI	<i>Type I IL-1 receptor</i> Reseptor IL-1 jenis I
IL-1RII	<i>Type II IL-1 receptor</i> Reseptor IL-1 jenis II
IL-2	Interleukin-2
il2rb	<i>Interleukin 2 receptor, beta</i>
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	<i>IL-6 receptor</i> Reseptor IL-6
IL-8	Interleukin-8
IL-11	Interleukin-11

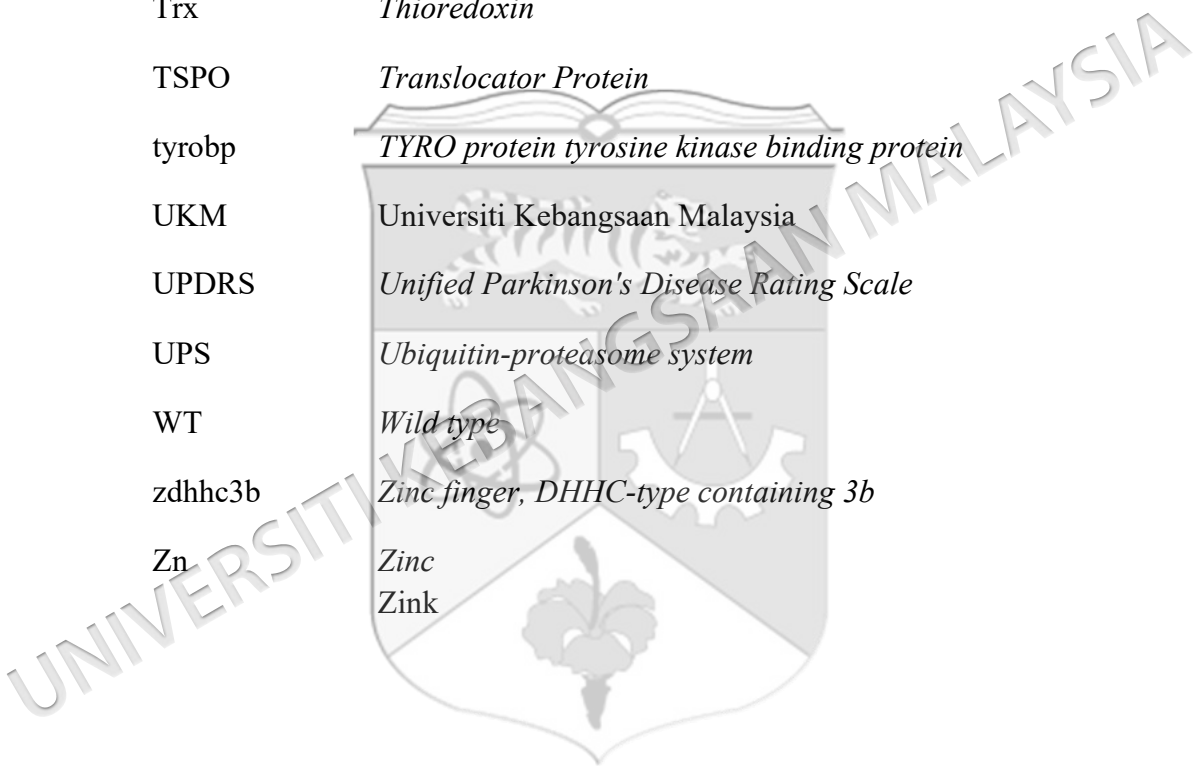
IL-27	Interleukin-27
IL-31	Interleukin-31
IMS	<i>Intermembrane space</i> Ruang antara membran mitokondria
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cell</i> Sel induk pluripoten teraruh
JAK	<i>Janus kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
K <sup>+</sup>	Ion kalium
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LC	<i>Locus coeruleus</i> Lokus seruleus
lck	<i>LCK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase</i>
lgals911	<i>Lectin, galactoside-binding, soluble, 9 (galectin 9)-like 1</i>
LRRK2	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
MAO-B	<i>Monoamine oxidase-B</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> Protein kinase diaktifkan-mitogen
mat2ab	<i>Methionine adenosyltransferase II, alpha b</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDA	Malondialdehid
mgp	<i>Membrane-bound glycoprotein</i>
MKP-1	<i>Mitogen-activated protein kinase-1</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> Metaloproteinase matriks
MPP <sup>+</sup>	<i>1-methyl-4-phenylpyridinium</i>
MPTP	<i>1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine</i>

MRC	<i>Mitochondrial respiratory chain</i> Rantaian pernafasan mitokondria
MT	<i>Metallothionein</i> Metalotionin
mt2	<i>Metallothionein 2</i>
mtDNA	<i>Mitochondrial DNA</i> DNA mitokondria
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
Na <sup>+</sup>	Ion natrium
NAD <sup>+</sup>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide and hydrogen</i>
NASH	<i>Non-alcoholic steatohepatitis</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-kappaB</i> Faktor nukleus-kappaB
NGF	<i>Nerve growth factor</i> Faktor pertumbuhan saraf
NK cell	<i>Natural killer cell</i>
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>
NO	Nitrik oksida
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i> Faktor 2 berkaitan faktor nuklear eritroid 2
NSAIDs	<i>Non-steroidal anti-inflammatory drugs</i> Ubat anti-keradangan bukan steroid
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oksigen singlet
O <sup>2•-</sup>	Radikal anion superoksida
OB	<i>Olfactory bulb</i> Bulba olfaktori
OCT	<i>Optimal cutting temperature</i>
OD	<i>Optical density</i> Ketumpatan optik

6-OHDA	<i>6-hydroxydopamine</i>
OxPhos	<i>Oxidative phosphorylation</i> Fosforilasi oksidatif
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCYT2	<i>Phosphate cytidylyltransferase 2</i>
PD	<i>Parkinson's Disease</i> Penyakit Parkinson
PE	<i>Phosphatidylethanolamine</i> Fosfatidiletanolamina
PET	<i>Positron emission tomography</i> Tomografi pelepasan Positron
PEtn	<i>Phosphoethanolamine</i>
PGAM5	<i>Phosphoglycerate mutase family member 5</i>
PGC-1 $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i> <i>coactivator 1- <math>\alpha</math></i>
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PINK1	<i>PTEN-induced kinase 1</i>
PPa	<i>Anterior part of parvocellular preoptic nucleus</i> Bahagian anterior nukleus praoptik parvoselular
PPp	<i>Posterior part of parvocellular preoptic nucleus</i> Bahagian posterior nukleus praoptik parvoselular
PPv	<i>Ventral part of periventricular pretecal nucleus</i> Bahagian ventral nukleus pratektal periventrikular
PPE	<i>Porcine pancreatic elastase</i>
PS	<i>Phosphatidylserine</i>
Psd1	<i>Phosphatidylserine decarboxylase</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i> Asid lemak politaktepu
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>

Rbx1	<i>Ring-box protein 1</i>
RET	<i>Reverse electron transport</i> Pengangkutan elektron terbalik
RIPK1	<i>Receptor-interacting protein kinase 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i> Spesies nitrogen reaktif
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> Spesies oksigen reaktif
SDH	<i>Succinate dehydrogenase</i>
sgp	<i>Soluble glycoprotein</i>
SIRT	Sirtuin
smtb	<i>Similar to metallothionein-B</i>
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SOD	Superoksida dismutase
SPECT	<i>Single-photon emission computed tomography</i> Tomografi berkomputer pancaran foton tunggal
SPN	<i>Spiny projection neuron</i> Neuron projeksi berduri
SSRI	<i>Selective serotonin reuptake inhibitor</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STN	<i>Subthalamic nucleus</i> Nukleus subtalamus
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> Reseptor sel T
TH	<i>Tyrosine hydroxylase</i> Tirosina hidroksilase
th1	<i>Tyrosine hydroxylase 1</i>
th2	<i>Tyrosine hydroxylase 2</i>

themis	<i>Thymocyte selection associated</i>
TNF	<i>Tumour necrosis factor</i> Faktor nekrosis tumor
TNF- $\alpha$	<i>Tumour necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
TREM2	<i>Triggering receptors expressed on myeloid cells 2</i>
TrkB	<i>Tyrosine receptor kinase B</i> Reseptor tirosina kinase B
Trx	<i>Thioredoxin</i>
TSPO	<i>Translocator Protein</i>
tyrobp	<i>TYRO protein tyrosine kinase binding protein</i>
UKM	Universiti Kebangsaan Malaysia
UPDRS	<i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale</i>
UPS	<i>Ubiquitin-proteasome system</i>
WT	<i>Wild type</i>
zdhhc3b	<i>Zinc finger, DHHC-type containing 3b</i>
Zn	Zinc Zink



## BAB I

### PENGENALAN

#### 1.1 LATAR BELAKANG

Penyakit Parkinson (*Parkinson's disease*, PD) ialah penyakit neurodegeneratif kedua paling lazim di dunia selepas penyakit Alzheimer, yang menjejaskan 2-3 % populasi yang berusia melebihi 65 tahun (Poewe et al. 2017). Manifestasi klinikal utama PD dicirikan oleh gangguan motor seperti pergerakan badan yang perlahan (*bradykinesia*), kaku pada anggota badan (*rigidity*), ketidakstabilan postur dan gegaran rehat (Jellinger 2015). Secara patofisiologi, gejala pergerakan ini berpunca daripada kemerosotan neuron dopamin (DA) di bahagian *substantia nigra pars compacta* (SNpc), yang sering dikaitkan dengan pembentukan inklusi intrasel yang mengandungi agregat  $\alpha$ -sinuklein (Poewe et al. 2017). Kehilangan neuron DA secara progresif mungkin disebabkan oleh agregasi  $\alpha$ -sinuklein, gangguan sistem autofagi-lisosom, kegagalan fungsi mitokondria, tekanan retikulum endoplasma atau kegagalan pengawalaturan kalsium (Michel et al. 2016). Selain daripada gejala pergerakan, pesakit PD juga mengalami gejala bukan pergerakan seperti perubahan deria bau, autonomik (gastrosus, urogenital, kardia, pernafasan), deria kulit, kualiti tidur, visual, dan kegagalan fungsi neuropsikiatrik (kognitif, mood, demensia) (Jellinger 2015).

Pengurusan klinikal semasa masih bersifat simptomatik yang berasaskan terapi penggantian dopamin dengan levodopa kekal sebagai ubat piawai emas untuk PD. Levodopa adalah prekursor kepada dopamin yang dapat meningkatkan kualiti hidup pesakit PD melalui keberkesannya dalam menambahbaik gejala pergerakan pesakit PD (Antonini et al. 2017; Kalia & Lang 2015; Poewe et al. 2017). Walau bagaimanapun, penggunaan levodopa jangka panjang boleh menyebabkan komplikasi pergerakan seperti diskinesia (Gershanik 2015). Tambahan pula, agonis dopamin atau perencat enzim, termasuk perencat katekol-O-metil-transferase (*catechol-O-methyl-transferase*,

COMT) dan perencat monoamine oxidase-B (MAO-B), biasanya digunakan sebagai bahan pembantu kepada levodopa untuk mengurangkan komplikasi pergerakan. Perencat COMT yang biasa digunakan, seperti entacapone dan opicapone, dapat menghalang degradasi levodopa dalam tisu periferi manakala perencat MAO-B melintasi rintangan darah-otak (*blood-brain barrier*, BBB) untuk menghalang aktiviti MAO dalam sistem saraf pusat (*central nervous system*, CNS) dan seterusnya mengurangkan degradasi dopamin (Gershanik 2015). Perencat MAO-B telah terbukti mempunyai keberkesanan dan keselamatan yang sangat baik pada peringkat awal PD serta apabila digunakan sebagai terapi tambahan dalam penyakit lanjut (Chang et al. 2017; Parkinson Study Group 2002, 2005). Di samping itu, kajian klinikal telah menunjukkan bahawa tempoh pendedahan perencat MAO-B yang lebih panjang dapat mengurangkan penggunaan levodopa dan kadar penurunan klinikal dengan lebih perlahan (Cereda et al. 2017; Hauser et al. 2017).

Sehingga kini, punca dan mekanisme sebenar PD masih belum difahami, walaupun interaksi antara faktor genetik, agen farmakologi, dan toksin persekitaran telah dikenal pasti sebagai penyumbang utama kepada patogenesis PD (Betarbet et al. 2000; Mcnaught et al. 2004; Schober 2004). Data epidemiologi menunjukkan bahawa pendedahan kronik terhadap toksin tertentu, racun perosak, dan logam berat berkorelasi dengan peningkatan risiko neurodegenerasi secara signifikan (Ball et al. 2019; Ullah et al. 2021). Tambahan pula, terdapat banyak penyelidikan genetik dalam PD dijalankan sejak dua dekad yang lalu telah memberikan sumbangan besar dalam memahami asas genetik PD seperti mutasi pelbagai gen dan lokus genetik yang dikaitkan dengan PD varian kekeluargaan (*familial*) serta mempengaruhi risiko perkembangan PD (Deng et al. 2018). Dianggarkan 15 % pesakit PD mempunyai sejarah keluarga, dengan 5 – 10 % daripadanya mengalami PD berbentuk monogenik dengan warisan Mendelian akibat mutasi tunggal pada gen dominan atau resesif (Kalinder et al. 2016; Tambasco et al. 2016). Di samping itu, terdapat beberapa jenis ubat-ubatan telah dikenal pasti berpotensi dalam peningkatan faktor risiko terhadap PD idiopatik, termasuk ubat anti-keradangan bukan steroid (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs), pil pencegah kehamilan gabungan estrogen-progestin, statin serta modulator  $\beta$ -adrenoceptor (Driver et al. 2011; Gao et al. 2011; Gronich et al. 2018; Huang et al. 2015; Koren et al. 2019; Mittal et al. 2017). Namun begitu, kajian sepakat menunjukkan

bahawa ibuprofen dan agonis  $\beta$ -adrenoceptor berpotensi memberikan kesan neuroprotektif (Fyfe 2020; Saengphatrachai et al. 2021; Singh et al. 2022; Singh et al. 2021), manakala antagonis  $\beta$ -adrenoceptor dikaitkan dengan risiko perkembangan PD yang lebih tinggi (Belvisi et al. 2020). Sebaliknya, perkaitan antara penggunaan statin serta terapi hormon estrogen-progestin dengan risiko PD masih kekal kontroversial dan masih belum dapat disimpulkan setakat ini (Belvisi et al. 2020).

Pembangunan model haiwan PD melalui intervensi neurotoksin merupakan komponen asas dalam penyelidikan praklinikal untuk mengkaji mekanisme patologi dan menilai potensi terapeutik PD (Khan et al. 2023). Secara amnya, model haiwan PD dibahagikan kepada dua kategori utama, iaitu model genetik dan model neurotoksik (Blandini & Armentero 2012; Khan et al. 2023). Pelbagai agen neurotoksin seperti 6-hydroxydopamine (6-OHDA), 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), paraquat dan rotenone telah digunakan secara meluas untuk mengaruh degenerasi neuron DA yang ketara (Betarbet et al. 2000; McCormack et al. 2002; Mcnaught et al. 2004). Model-model ini berupaya memanifestasikan ciri-ciri klinikal dan patologi utama PD, termasuklah kecacatan motor, kehilangan neuron DA secara progresif dalam SNpc, dan pembentukan badan Lewy (*Lewy body*) (Zeng et al. 2018). Sehubungan dengan itu, rotenone merupakan racun perosak bersifat lipofilik telah digunakan secara meluas untuk membangunkan model PD kerana keupayaannya merentasi BBB dan menyekat kompleks I pada rantai pengangkutan elektron (*Electron Transport Chain*, ETC) mitokondria (Pereira et al. 2023). Perencatan ini mensimulasikan kegagalan bioenergetik dan tekanan oksidatif yang diperhatikan dalam pesakit PD (Rubio et al. 2025). Spektrum organisma yang digunakan merangkumi spesies invertebrat (*Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* dan siput) sehingga ke vertebrat (zebrafish, mencit, tikus dan monyet) (Aryal & Lee 2019; Chia et al. 2020; Cooper & Van Raamsdonk 2018; Joers et al. 2020; Kalyn et al. 2019; Vehovszky et al. 2007). Dalam penyelidikan praklinikal, penggunaan zebrafish (*Danio rerio*) telah muncul sebagai model vertebrat yang ideal disebabkan oleh homologi genetik yang tinggi sebanyak 70 % dengan manusia, serta pemuliharaan sistem dopaminergik yang signifikan (Mohamed 2024). Selain itu, keupayaan untuk melakukan pemerhatian dinamik secara *in vivo* membolehkan penilaian terhadap perubahan fungsi motor dan integriti neuron DA dilakukan dengan ketepatan yang tinggi (Sieber et al. 2017). Oleh itu, pembangunan

model haiwan PD ini memberikan sumbangan kritikal dalam memperdalam pemahaman terhadap proses penyakit dan mengenal pasti sasaran terapeutik baharu bagi rawatan PD (Khan et al. 2023; Metzger & Emborg 2019).

Metalotionin (*Metallothioneins*, MTs) ialah protein pengikat logam yang kaya dengan sistein dan berfungsi secara kritikal dalam mengekalkan homeostasis logam seperti zink (Zn), tembaga (Cu) dan kadmium (Cd) (Ziller & Fraissinet-Tachet 2018). Selain peranannya dalam pengawalaturan logam, MT bertindak sebagai modulator redoks yang kuat, agen anti-keradangan yang menindas pengaktifan mikroglia, serta berupaya menambah baik fungsi mitokondria (Álvarez-Barrios et al. 2021; Cai et al. 2004; Chung et al. 2008; Dutsch-Wicherek et al. 2008; Krezel & Maret 2021; Penkowa 2006; Wang et al. 2023). Memandangkan MTs memiliki afiniti pengikatan yang lebih tinggi terhadap Cu, MTs berpotensi menjadi sasaran terapi untuk melemahkan pengagregatan  $\alpha$ -sinuklein yang disebabkan oleh Cu (Okita et al. 2017). Kepentingan fungsi ini diperkukuh oleh laporan peningkatan ekspresi MT dan reseptornya dalam otak pesakit PD sebagai mekanisme tindak balas sel (Dumitriu et al. 2015; Glaab & Schneider 2015; Michael et al. 2011; Miyazaki & Asanuma 2023). Sinergi antara keupayaan modulasi homeostasis logam, keseimbangan redoks, dan perlindungan mitokondria ini mencadangkan MT sebagai sasaran molekul yang strategik dalam usaha memperbaiki lara neurodegenerasi, khususnya yang dicituskan oleh neurotoksin seperti rotenone.

## 1.2 KEPENTINGAN KAJIAN

PD merupakan gangguan neurodegeneratif yang memberikan beban sosioekonomi yang signifikan disebabkan oleh kemerosotan kualiti hidup pesakit secara progresif. Walaupun regimen rawatan konvensional PD seperti levodopa, agonis dopamin, dan perencat MAO-B berkesan dalam mengurangkan manifestasi klinikal, tetapi agen-agen ini masih gagal menangani patologi asas atau memperlambatkan perkembangan PD. Oleh itu, terdapat keperluan mendesak untuk meneroka sasaran terapeutik baharu yang

mampu memberikan perlindungan neuron secara holistik bagi menganjukkan paradigma rawatan daripada pengurusan simptomatik kepada terapi yang berkesan.

Oleh itu, MT muncul sebagai protein sasaran yang penting memandangkan keupayaannya dalam perlindungan neuron dengan mengurangkan tekanan oksidatif, menindas keradangan neuron, memulihkan kegagalan fungsi mitokondria dan mengurangkan ketoksikan  $\alpha$ -sinuklein, yang kesemuanya merupakan faktor penyumbang utama kepada patogenesis PD. Sehubungan dengan itu, kajian ini memperincikan impak MT terhadap sifat antioksidannya dan pemulihan fungsi neuron melalui restorasi ETC mitokondria, khususnya pada kompleks I dan II, yang merupakan prasyarat utama untuk mengekalkan kelangsungan hidup neuron DA. Selain itu, kajian ini menilai efikasi hMT2 melalui dua pendekatan temporal yang berbeza, iaitu intervensi profilaksis dan intervensi terapeutik. Pendekatan profilaksis diandaikan untuk mensasarkan perlindungan neuron DA sebelum lara kerosakan oksidatif bermula, manakala intervensi terapeutik memfokuskan kepada keupayaan MT untuk merencat kemajuan PD serta mempromosikan pemulihan neuron DA yang telah terjejas. Oleh itu, kajian ini dijangka akan memberikan perspektif baharu dalam strategi intervensi PD, sama ada sebagai langkah pencegahan bagi populasi berisiko tinggi atau sebagai rawatan alternatif bagi pesakit yang telah didiagnosis. Dengan membuktikan mekanisme restorasi respirasi mitokondria oleh hMT2, kajian ini menyediakan asas saintifik yang tegas bagi pembangunan terapi berasaskan sasaran bioenergetik pada masa hadapan.

### 1.3 PERMASALAHAN KAJIAN

1. Apakah perubahan dalam profil pengekspresan gen secara signifikan pada otak zebrafish yang mencetuskan proses neurodegenerasi selepas pendedahan rotenone?
2. Apakah kesan pendedahan rotenone terhadap aktiviti lokomotor, tahap dopamin, dan mekanisme disregulasi sel dalam model zebrafish?
3. Apakah keberkesanan protein hMT2 dalam memulihkan fungsi motor serta mengekalkan integriti sistem dopaminergik, dan bagaimanakah efikasinya

berbeza antara pendekatan intervensi profilaksis dan terapeutik dalam model zebrafish aruhan rotenone?

#### 1.4 HIPOTESIS KAJIAN

1. Terdapat perubahan dalam profil pengekspresan gen secara signifikan pada otak zebrafish selepas pendedahan rotenone, yang mendedahkan pengawalatur molekul utama yang bertanggungjawab terhadap proses neurodegenerasi.
2. Pendedahan kepada rotenone akan mencetuskan patogenesis PD dalam model zebrafish melalui gangguan aktiviti lokomotor, kemerosotan populasi neuron DA, dan ketidakseimbangan profil molekul yang melibatkan peningkatan tekanan oksidatif serta disfungsi mitokondria.
3. Rawatan dengan protein hMT2 mampu memberikan kesan neuroprotektif yang signifikan ke atas model zebrafish aruhan rotenone dengan memulihkan fungsi motor dan mengekalkan integriti sistem dopaminergik melalui modulasi mekanisme perlindungan sel, di mana keberkesanannya berbeza antara pendekatan intervensi profilaksis dan terapeutik.

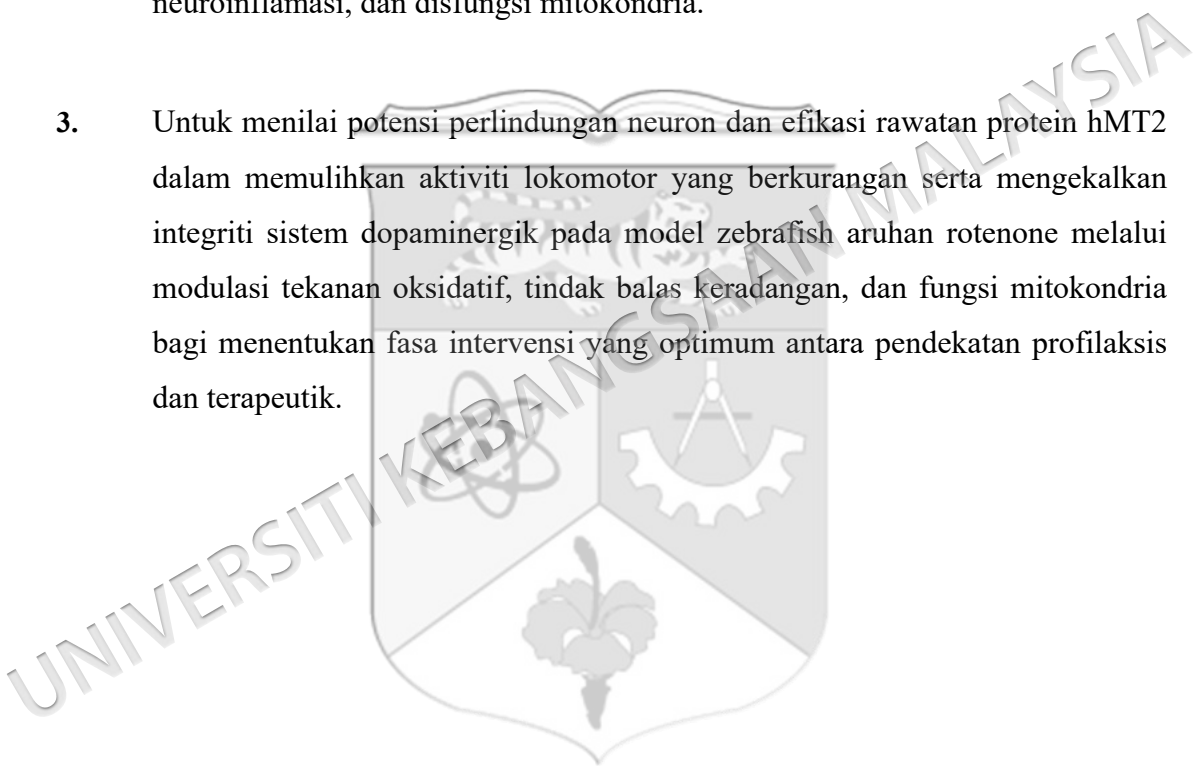
#### 1.5 OBJEKTIF KAJIAN

##### 1.5.1 Objektif Umum

Untuk menentukan kesan perlindungan neuron oleh protein metalotionin manusia rekombinan (*recombinant human metallothionein protein*, hMT2) dalam merencat perkembangan patogenesis PD menggunakan model zebrafish aruhan rotenone.

### 1.5.2 Objektif Khusus

1. Untuk mengenal pasti pengawal selia molekul yang terlibat dalam neurodegenerasi melalui analisis mikrosusun pada otak model zebrafish selepas pendedahan rotenone.
2. Untuk menilai kesan rotenone terhadap model zebrafish dengan menghubungkaitkan perubahan aktiviti lokomotor dengan kemerosotan sistem dopaminergik serta gangguan mekanisme sel yang melibatkan tekanan oksidatif, neuroinflamasi, dan disfungsi mitokondria.
3. Untuk menilai potensi perlindungan neuron dan efikasi rawatan protein hMT2 dalam memulihkan aktiviti lokomotor yang berkurangan serta mengekalkan integriti sistem dopaminergik pada model zebrafish aruhan rotenone melalui modulasi tekanan oksidatif, tindak balas keradangan, dan fungsi mitokondria bagi menentukan fasa intervensi yang optimum antara pendekatan profilaksis dan terapeutik.



## BAB II

### KAJIAN LITERASI

#### 2.1 PENYAKIT PARKINSON

Penyakit Parkinson (*Parkinson's disease*, PD) pertama kali diperkenalkan oleh seorang pakar bedah, James Parkinson dalam penerbitannya "*An Essay on the Shaking Palsy*" pada tahun 1817 yang melaporkan enam pesakit yang mempunyai ciri "*shaking palsy*" (Parkinson 2002). Parkinson juga menyebut bahawa gejala-gejala tersebut bermula secara beransur-ansur dengan memberi kesan yang ketara menjejaskan pergerakan harian pesakit dan berkembang secara berterusan dari semasa ke semasa. Gejala bukan motor yang dikenali hari ini sebahagiannya diperhatikan oleh Parkinson seperti gangguan tidur dan "usus kusut (*torpid bowels*)", tetapi beliau terlepas dalam menyenaraikan gejala demensia kerana mereka yang menghadapi PD biasanya tidak hidup hingga ke dekad ke-lapan apabila penurunan kognitif biasanya dimanifestasikan, walaupun PD juga wujud pada individu yang lebih muda berumur antara 21 hingga 40 tahun iaitu 3 – 5 % daripada jumlah keseluruhan PD di dunia barat (Kempster et al. 2007; Mehanna & Jankovic 2019; Post et al. 2020).

PD adalah penyakit gangguan pergerakan secara progresif yang melibatkan multisistemik, multifaktorial dan multietiologi yang kebanyakannya menjejaskan populasi warga tua terutamanya dalam beberapa tahun terakhir kehidupan. Insiden PD biasanya meningkat dengan usia, terutamanya semasa umur mencapai kemuncak antara 70 dan 79 tahun (Hirsch et al. 2016). PD dicirikan oleh degeneratif sekelompok neuron DA dalam SNpc secara berfasa dan juga kehadiran badan Lewy dalam neuron yang masih hidup, tetapi punca sebenarnya masih tidak diketahui dengan jelas (Antony et al. 2013; Li et al. 2020b; Raza & Anjum 2019). Penyakit progresif ini boleh melemahkan sistem motor somatik dan seterusnya menyebabkan gangguan pergerakan dalam pesakit

PD, seperti sukar untuk menggerakkan tangan mereka atau berjalan secara normal (Cerri et al. 2019b; Hayes 2019; Schneider et al. 2017). Selain itu, pesakit PD juga mungkin menunjukkan pelbagai gejala bukan pergerakan, termasuk penurunan kognitif, kemurungan, kebimbangan dan gangguan tidur yang boleh menjejaskan kualiti hidup mereka (Reich & Savitt 2019).

### 2.1.1 Statistik PD

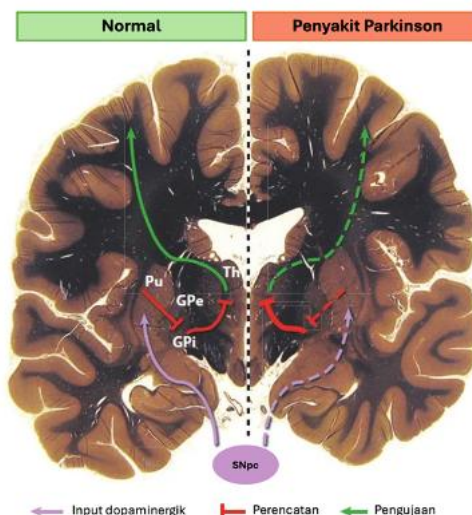
PD merupakan penyakit neurodegeneratif kedua paling lazim selepas penyakit Alzheimer. Insiden PD dilaporkan semakin meningkat, terutamanya di negara-negara Barat (Willis et al. 2022). Jumlah kes PD dianggarkan akan melebihi 12 juta individu menjelang tahun 2040 (De Araujo et al. 2022). Walau bagaimanapun, sebahagian besar kes PD, iaitu kira-kira 90 %, diklasifikasikan sebagai idiopatik atau sporadik akibat punca penyakit yang tidak dapat dikenal pasti. Sebaliknya, kes PD yang berkaitan dengan mutasi genetik kekeluargaan yang jarang berlaku dikenal pasti sebagai penyebab PD dalam kira-kira 10 % daripada keseluruhan kes PD (Klein & Schlossmacher 2007). Sehubungan dengan itu, kajian Beban Penyakit Global (*Global Burden of Disease*, GBD) melaporkan bahawa jumlah kes insiden dan prevalen PD di seluruh dunia pada tahun 2017 masing-masing adalah sebanyak 1.03 juta dan 8.53 juta kes (James et al. 2018). Selain itu, prevalen PD di negara maju dianggarkan sekitar 0.3 % dalam populasi umum, manakala kadar insiden PD dilaporkan antara 8 hingga 18 kes bagi setiap 100 000 individu berdasarkan kajian prospektif berasaskan populasi (Lee & Gilbert 2016). Individu yang berumur di bawah 40 tahun jarang menghadapi PD, tetapi risiko menghidapinya meningkat dengan usia. Dengan ini, PD lebih biasa berlaku dalam populasi warga emas dengan kebanyakan kes berlaku selepas berumur 50 tahun, di mana dua peratus daripada populasi yang berumur 65 tahun ke atas dan empat peratus daripada mereka yang berumur lebih dari 85 tahun didiagnosis dengan PD (Opara et al. 2017). Selain daripada faktor usia, jantina lelaki lebih berkemungkinan menghidap PD berbanding dengan wanita, di mana PD adalah 1.5 kali lebih biasa pada lelaki berbanding dengan wanita (Elbaz et al. 2016; Georgiev et al. 2017; Haaxma et al. 2007; Kovács et al. 2016; Lee & Gilbert 2016). Walau bagaimanapun, terdapat pelbagai kajian menunjukkan bahawa permulaan PD berlaku kira-kira dua tahun lebih awal pada lelaki berbanding dengan wanita secara purata (Haaxma et al. 2007; Martínez-Rumayor et al. 2009; Van Den Eeden et al. 2003; Wooten et al. 2004). Namun begitu, data penyelidikan

mengenai permulaan PD lebih awal pada lelaki berbanding wanita masih terhad dan tidak dapat membuktikan secara konklusif setakat ini.

Kementerian Kesihatan Malaysia mengumumkan terdapat 30 000 pesakit PD pada tahun 2019, dan bilangan tersebut dijangka terus meningkat dalam tempoh 20 tahun yang akan datang berikutan peningkatan populasi warga emas (Vasanthi & Ying 2021). Di samping itu, Jabatan Statistik Malaysia juga telah menunjukkan bahawa pesakit PD di Malaysia dijangka meningkat sebanyak lima kali ganda menjelang tahun 2040, iaitu daripada anggaran 20 000 kepada 120 000 kes (Hassandarvish 2019). Dalam meniti arus pemodenan ini yang mendorong peningkatan jangka hayat, negara-negara Asia dijangka mencatat peningkatan yang lebih tinggi dalam insiden PD berbanding negara-negara Barat (Dorsey et al. 2007; Lim et al. 2021). Ini adalah disebabkan peningkatan populasi warga emas, di mana lebih daripada tujuh peratus penduduk Malaysia terdiri daripada warga emas yang berumur 65 tahun ke atas mengikut anggaran Bank dunia pada tahun 2020 (Schmillen et al. 2020). Keadaan ini dapat menimbulkan beban kesihatan yang ketara bagi kerajaan Malaysia, organisasi pesakit PD, penyelidik dan juga doktor (Bexci & Subramani 2018).

### **2.1.2 Tanda dan Gejala Klinikal PD**

Dalam keadaan normal, litar striato–thalamo–kortikal memainkan peranan penting dalam pengawalan fungsi motor dan modulasi aktiviti korteks. Ganglia basal, yang merangkumi struktur seperti striatum (putamen dan nukleus kaudat), globus pallidus, nukleus subtalamus dan substantia nigra, membentuk rangkaian neuron yang kompleks berfungsi untuk memproses dan menyelaraskan isyarat motor sebelum dihantar ke korteks serebrum. Rangkaian ini mengekalkan keseimbangan dinamik antara laluan secara langsung dan laluan secara tidak langsung bagi memastikan pengawalan pergerakan voluntari yang tepat dan terkoordinat. Laluan secara langsung berfungsi untuk memudahkan pergerakan dengan mengurangkan perencatan terhadap talamus yang ditunjukkan dalam bahagian kiri rajah, namun dalam PD, output laluan secara langsung ini menjadi berkurangan yang ditunjukkan dalam bahagian kanan rajah (Rajah 2.1). Sebaliknya, laluan secara tidak langsung berfungsi untuk menekan pergerakan yang tidak diinginkan.



Rajah 2.1 Anatomi dan fisiologi otak yang memmanifestasi aktiviti motor PD (Shulman et al. 2011)

SNpc yang terletak di otak tengah membekalkan input dopaminergik kepada putamen (Pu), yang seterusnya merangsang aktiviti dalam laluan secara langsung. Putamen merencat (ditunjukkan dengan warna merah) segmen internal globus pallidus (GPi), yang kemudiannya merencat talamus (Th). Talamus seterusnya menghantar input rangsangan (ditunjukkan dengan warna hijau) kepada korteks motor untuk memudahkan pelaksanaan pergerakan (Rajah 2.1). Sebaliknya, dalam PD, degenerasi neuron DA secara progresif dalam SNpc menyebabkan pengurangan input dopaminergik dengan ketara kepada striatum. Kehilangan dopamin ini mengganggu keseimbangan antara laluan secara langsung dan laluan secara tidak langsung, yang seterusnya mengakibatkan perencatan output daripada globus pallidus terhadap talamus serta pengurangan pengaktifan talamokortikal (Fifel 2013). Perencatan berlebihan terhadap unjuran talamokortikal ini dipercayai menyumbang secara langsung kepada manifestasi motor utama PD, termasuk perlambatan gerakan tubuh, ketegaran otot dan gegaran anggota ketika berehat. Oleh itu, perubahan dalam litar striato–thalamo–kortikal bukan sahaja menerangkan asas neurobiologi kepada gejala motor klasik PD, tetapi turut memberikan pemahaman yang lebih menyeluruh mengenai spektrum gejala pergerakan dan bukan pergerakan yang diperhatikan dalam pesakit PD (Shulman et al. 2011). Dengan ini, gejala PD boleh dikelaskan kepada gejala pergerakan dan gejala bukan pergerakan. Manifestasi gejala motor PD termasuk perlambatan gerakan tubuh (*bradykinesia*), gegaran anggota ketika berehat, ketegaran otot, dan kesukaran berjalan bergandingan dengan ketidakstabilan postur badan (*postural instability gait difficulty*)

(Stebbins et al. 2013; Sveinbjornsdottir 2016; Thenganatt & Jankovic 2014). Sebenarnya, pengelasan Braak dan kajian lain telah menunjukkan bahawa banyak kawasan otak terjejas dalam pesakit PD, tetapi substantia nigra yang paling terdedah kepada kerosakan dengan manifestasi yang jelas (Braak et al. 2006; Braak et al. 2003) di mana ciri gejala motor PD adalah utama yang disebabkan oleh aktiviti neuron yang tidak normal dalam ganglia basal melalui degenerasi neuron DA SNpc dan diperluaskan pada ganglia basal/neuron pangkal otak dengan tahap yang lebih rendah (Fearnley & Lees 1991; Obeso et al. 2008).

Selain daripada aspek pergerakan, tumpuan penyelidikan klinikal telah beralih daripada gejala pergerakan kepada gejala bukan pergerakan PD sejak beberapa tahun kebelakangan ini, terutamanya perubahan dari segi mental dan tingkah laku. Selain dopamin, neurotransmitter lain seperti glutamat, asid gamma-aminobutirik (GABA), asetilkolina dan serotonin turut memainkan peranan penting dalam modulasi fungsi ganglia basal. Gangguan dalam keseimbangan neurotransmitter ini dipercayai menyumbang kepada pelbagai manifestasi bukan pergerakan PD, termasuk gangguan kognitif, gangguan tidur dan perubahan emosi. Gejala bukan pergerakan ini biasanya dilaporkan lebih menjejaskan kualiti hidup pesakit PD daripada kegagalan fungsi motor.

Keadaan hipodopaminergik dapat mendorong manifestasi neuropsikiatrik intrinsik terjadi seperti kemurungan, kebimbangan dan sikap tidak peduli. Manakala keadaan hiperdopaminergik dapat mendorong manifestasi neuropsikiatrik iatrogenik terjadi seperti psikosis, sindrom disregulasi dopamin dan gangguan kawalan impuls (Cavanna 2018). Gejala bukan pergerakan adalah ciri asas PD yang dikenal pasti sebagai salah satu peramal kualiti hidup yang paling penting (Martinez - Martin et al. 2011). Kajian lepas telah menunjukkan bahawa beban keseluruhan gejala bukan pergerakan adalah lebih teruk daripada kumpulan yang menghadapi kerosakan motor (*motor impairment*) (Ba et al. 2016; Jost et al. 2023; Wu et al. 2016) di mana kumpulan ini dikaitkan dengan gejala neuropsikologi, psikiatri, anosmia (kehilangan deria bau), dan gangguan tidur (Ren et al. 2020; Wu et al. 2016).

Kemurungan adalah salah satu gejala bukan pergerakan yang paling kerap dan membebakan dalam PD merentasi semua peringkat (Duncan et al. 2014; Martinez -

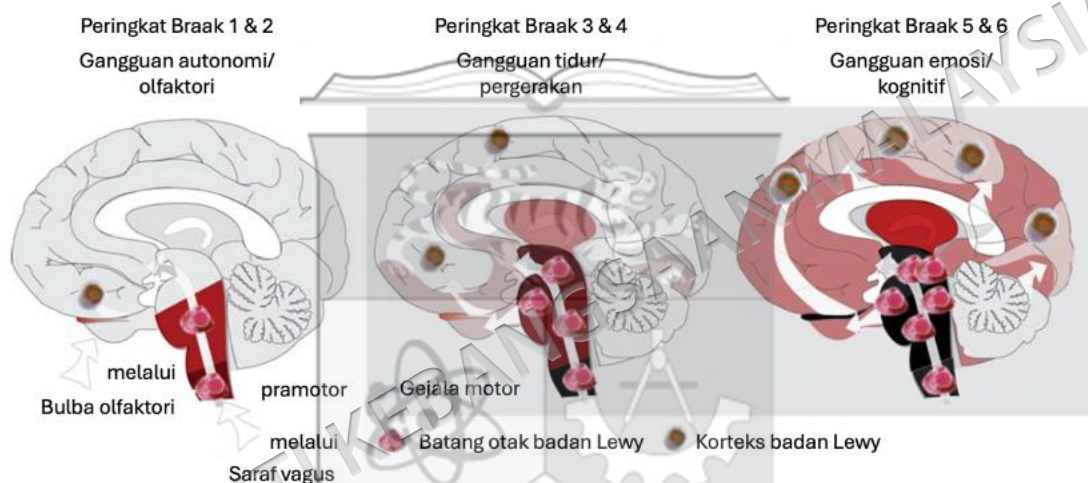
Martin et al. 2011). Kebarangkalian mengalami kemurungan adalah empat kali ganda lebih tinggi dalam pesakit PD, berbanding dengan populasi umum yang dipadankan dari segi umur, jantina dan komorbiditi (Hsu et al. 2015). Kemurungan pada pesakit PD kebanyakannya dicirikan dengan kehilangan keseronokan, termasuk rasa tidak puas hati dan kehilangan selera makan. Namun begitu, pesakit PD jarang mempunyai perasaan bersalah, benci diri, dan kehilangan libido (Kritzinger et al. 2015) seperti yang dihadapi oleh populasi umum yang mengalami kemurungan (Schrag & Taddei 2017). Walaupun tahap penyakit adalah ringan, kemurungan dalam PD boleh mempengaruhi kualiti hidup bagi pesakit PD dan juga penjaga mereka (Prange et al. 2022).

Secara keseluruhannya, interaksi antara kemurungan menandakan permulaan PD dan kemurungan yang dicetus akibat daripada diagnosis PD adalah kompleks dan mekanisma patofisiologi PD yang berkaitan kemurungan masih tidak jelas sehingga kini. Di samping itu, perubahan patofisiologi yang terlibat dalam patogenesis PD (termasuk ketidaknormalan neurotransmisi sistem DA, serotonergik, noradrenergik atau kolinergik; kegagalan fungsi litar striato-thalamo-kortikal; perubahan struktur dan fungsi kortikal frontal dan limbik; keradangan, dan kegagalan fungsi mitokondria) memainkan peranan yang penting terhadap kemurungan dalam populasi umum, selain daripada perubahan neuroendokrin seperti yang dilaporkan sebelum ini (Ferrari & Villa 2017; Krishnan & Nestler 2008).

### **2.1.3 Peringkat PD**

Ciri patologi PD dimanifestasikan dengan kehadiran badan Lewy, inklusi neuron yang sebahagian besarnya terdiri daripada pengagregatan protein  $\alpha$ -sinuklein. Hipotesis Braak mencadangkan bahawa patologi Lewy dalam PD berkembang secara progresif melalui mekanisme penyebaran dari sel ke sel yang melibatkan agregasi protein  $\alpha$ -sinuklein (Braak et al. 2003). Proses ini dipercayai bermula di sistem saraf periferi sebelum merebak ke CNS. Pada peringkat awal, patologi ini melibatkan struktur seperti medula oblongata dan sistem olfaktori, yang seterusnya membawa kepada kemunculan gejala prodromal seperti gangguan fungsi autonomi dan kehilangan deria bau (peringkat satu dan dua) (Rajah 2.2). Patologi awal ini dikaitkan dengan gejala yang berlaku sebelum permulaan gangguan pergerakan, seperti gangguan tingkah laku tidur fasa pergerakan mata cepat (di mana individu kehilangan kelumpuhan tidur fasa pergerakan

mata cepat yang normal dan melakonkan mimpi mereka secara fizikal semasa tidur) dan pengurangan deria bau. Penyebaran patologi seterusnya ke bahagian SNpc dan struktur otak tengah dan batang otak yang dikaitkan dengan gejala motor klasik dan gangguan tidur serta pergerakan (peringkat tiga dan empat) (Rajah 2.2). Oleh itu, PD biasanya dikesan pada peringkat tiga dan empat ini. Apabila penyakit berkembang, penglibatan sistem limbik boleh menyebabkan perubahan dalam fungsi emosi dan tingkah laku, manakala penyebaran patologi ke kawasan korteks dengan permulaan gangguan kognitif dan halusinasi menjadi biasa pada peringkat lima dan enam (Rajah 2.2) (Armstrong & Okun 2020; Halliday et al. 2011).



Rajah 2.2 Patologi otak bagi peringkat Braak dalam PD (Halliday et al. 2011)

#### 2.1.4 Etiologi dan Faktor Risiko PD

PD berlaku akibat degeneratif neuron DA secara selektif dalam laluan nigrostriatal (Shimohama et al. 2003). Namun begitu, terdapat banyak kajian telah memberikan penerangan tentang pelbagai proses sel dan molekul yang menyebabkan degeneratif sistem DA nigrostriatal, seperti kegagalan fungsi mitokondria (Pienaar & Chinnery 2013; Vives-Bauza et al. 2010), penghasilan spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species*, ROS) yang berlebihan (Mattson 2006), pembentukan agregat protein yang dipanggil badan Lewy (terdiri daripada  $\alpha$ -sinuklein dan ubiquitin) dalam neuron DA yang masih hidup dan keradangan sel mikroglia (Halliday & Stevens 2011). Dengan itu, PD boleh dianggap sebagai penyakit yang kompleks dengan etiologi yang terdiri

daripada interaksi pelbagai faktor seperti genetik, persekitaran, sistem imun dan penuaan (Jenner et al. 2013; Klein & Schlossmacher 2007; Yahya & Meramat 2022).

#### a. Penuaan

PD ialah penyakit degeneratif neuron yang paling cepat berkembang akibat penduduk dunia semakin menua dengan peningkatan purata jangka hayat. Oleh itu, penuaan adalah faktor risiko utama untuk PD dan bilangan individu yang terjejas dijangka meningkat dengan pesat (Hou et al. 2019). Dengan itu, bilangan pesakit PD diramalkan meningkat dua kali ganda daripada 6.9 juta pada 2015 kepada 14.2 juta pada 2040 (Dorsey & Bloem 2018). Memandangkan penuaan adalah faktor risiko terbesar untuk penyakit degeneratif neuron, dan penuaan sistem imun adalah faktor penyumbang kepada PD (Vavilova et al. 2021). Penuaan imun (*immunosenescence*) dicetuskan akibat daripada proses penuaan dan dicirikan oleh penurunan fungsi sistem imun secara progresif yang menyebabkan tindak balas sistem pertahanan tubuh yang lemah terhadap antigen baru (Kouli & Williams-Gray 2022). Penuaan imun boleh dikategorikan kepada dua ciri utama, iaitu perolehan kekurangan imun berkaitan umur (*age-acquired immunodeficiency*) dan radang penuaan (*inflammaging*). Radang penuaan dicirikan oleh penghasilan perantara keradangan atau sitokin yang beredar (terutamanya protein C-reaktif (CRP), IL-6 dan faktor nekrosis tumor (TNF)) pada tahap yang rendah daripada sel imun semulajadi dan adaptif yang dirangsang secara kronik (Franceschi et al. 2000; Franceschi et al. 1999; Goronzy et al. 2013). Oleh itu, kedua-dua sistem imun semulajadi dan adaptif menjadi semakin lemah dengan penuaan yang berkemungkinan menyebabkan PD.

Di samping itu, penuaan sering dikaitkan dengan perkembangan PD yang biasanya dilaporkan dalam kajian epidemiologi, jadi kedua-dua keadaan ini berkemungkinan besar berkongsi laluan biologi yang sama seterusnya menyebabkan perubahan dalam sistem dopamin untuk parkinsonisme (Collier et al. 2017). Penuaan adalah proses semulajadi yang melibatkan disregulasi beberapa laluan, seperti tekanan oksidatif, disfungsi mitokondria, autofagi dan keradangan pada neuron. Kebanyakan disregulasi laluan tersebut terlibat dalam keadaan degeneratif neuron (Vanni et al. 2020). Otak mengalami pelbagai perubahan morfologi dengan penuaan, seperti atrofi serebrum, perubahan jirim kelabu dan putih (*gray matter* dan *white matter*), kehilangan isipadu,

pembesaran ventrikel, dan pelebaran sulci (Blinkouskaya & Weickenmeier 2021). Dengan pelbagai perubahan tersebut, isipadu otak dan beratnya semakin berkurangan dengan usia. Untuk pengetahuan umum, berat otak manusia yang sihat paling besar adalah pada awal remaja dan kekal stabil sehingga dekad ke-lima (Stark & Pakkenberg 2004). Dari dekad ke-lima hingga dekad ke-sembilan, kehilangan berat otak adalah kira-kira 2-3 % setiap dekad. Sehubungan dengan itu, perkaitan antara pengurangan jumlah neuron dalam substantia nigra dan penuaan juga telah dilaporkan pada manusia dan monyet yang sihat (Chen et al. 2000; Chu et al. 2002). Oleh itu, penuaan otak dapat dikaitkan dengan degeneratif fungsi dan perubahan anatomi yang boleh mengakibatkan penyakit degeneratif neuron apabila bilangan neuron substantia nigra menurun sebanyak 7 - 9.8 % setiap dekad pada individu yang sihat tanpa gangguan neurologi (Lee & Kim 2022; Mcgeer et al. 1977; Røytt et al. 1999).

#### **b. Pendedahan terhadap toksin persekitaran**

1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) telah dikenal pasti terlibat dalam degenerasi sistem DA nigrostriatal apabila tujuh orang dilaporkan menunjukkan tanda-tanda PD selepas menyuntik diri mereka dengan ubat yang tercemar dengan MPTP pada tahun 1983. MPTP dimetabolismekan menjadi neurotoksin, MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridinium) yang merupakan perencat kompleks-I secara selektif dalam rantai pengangkutan elektron mitokondria untuk merosakkan sel DA dalam substantia nigra (Langston et al. 1983; Xu et al. 2006). Pengenalpastian MPTP sebagai punca degenerasi sistem DA nigrostriatal membawa kepada rumusan bahawa PD boleh disebabkan oleh pendedahan toksin alam sekitar.

Walaupun racun perosak dikenal pasti sebagai salah satu pencemar alam sekitar utama pada peringkat global, tetapi racun perosak masih digunakan secara meluas untuk mengawal perosak dan vektor tanaman, terutamanya dalam industri pertanian (Costa et al. 2017). Beberapa kajian lepas telah menunjukkan perkaitan antara pendedahan racun perosak dan PD. Satu kajian kawalan kes menunjukkan perkaitan antara langkah penggunaan racun perosak dengan selamat dan perkembangan PD secara lewat (Elbaz et al. 2009). Perkaitan positif antara pendedahan kepada racun perosak dan risiko PD dengan menjejaskan fungsi mitokondria dan meningkatkan tekanan oksidatif juga telah ditunjukkan dalam kajian epidemiologi jenis kawalan kes yang melibatkan 468 peserta

(Tanner et al. 2011). Oleh sebab demikian, pelbagai racun perosak dikenal pasti dapat mengaruh PD dalam haiwan makmal. Pendedahan kepada paraquat (sejenis racun rumpai yang strukturnya hampir sama dengan MPP+) dan rotenone (sejenis racun perosak yang merupakan perencat kompleks-I secara selektif) mengakibatkan penurunan bilangan neuron DA dalam model haiwan PD (Betarbet et al. 2000; Di Monte et al. 1986). Walaupun terdapat banyak faktor risiko yang terlibat dalam kejadian PD, tetapi masih terdapat kekurangan agen penyebab yang tepat sebagai risiko PD dengan penemuan yang mengesahkan sehingga kini.

Logam penting (*essential metal*) seperti besi dan mangan memainkan peranan penting dalam homeostasis sel dalam tubuh manusia. Pendedahan berlebihan kepada logam penting dan logam tak penting (*nonessential metal*, seperti merkuri dan aluminium) mendorong ketidakseimbangan homeostasis, dan boleh menyebabkan peningkatan kadar PD (Ullah et al. 2021). Hal ini demikian kerana pendedahan berlebihan kepada logam boleh mengakibatkan tekanan oksidatif, kerosakan DNA, disfungsi mitokondria, dan apoptosis (Vellingiri et al. 2022). Di samping itu, logam juga terlibat dalam pengawalaturan epigenetik PD. Mekanisme pengawalaturan epigenetik utama dalam PD termasuk metilasi DNA (*DNA methylation*), pengubahsuaian histon (*histone modification*), pembentukan semula kromatin (*chromatin remodeling*) dan RNA bukan pengekodan (*non-coding RNAs*, ncRNAs), didapati dikaitkan dengan faktor persekitaran dan genetik dengan mengubah ekspresi gen dan fungsi kromosom tanpa mengubah urutan DNA (Rasheed et al. 2021). Sehubungan dengan itu, mekanisme epigenetik boleh menjejaskan perubahan dalam ekspresi gen dan tahap protein. Perbezaan asas dalam corak ekspresi gen antara pesakit PD dan individu yang sihat telah ditemui melalui kajian tatasusunan ekspresi (*expression arrays*) dan penjujukan RNA (*RNA sequencing*) (Labbé et al. 2016). Tambahan pula, tahap ekspresi gen dalam substantia nigra PD adalah berbeza berbanding dengan kawasan otak yang tidak terjejas (Lewis & Cookson 2012). Walau bagaimanapun, terdapat kekurangan penyelidikan yang berkaitannya setakat ini. Kandungan yang berkaitan tentang logam dapat dirujukan dalam Jadual 2.1.

Jadual 2.1 Kesan toksik dan epigenetik logam yang berbeza dalam PD

Logam	Epigenetik	Sasaran utama ketoksikan yang disebabkan oleh logam	Patofisiologi
Plumbum (Pb)	Menyebabkan hipermetilasi promoter LINE1 ( <i>long interspersed nuclear element 1</i> )	LINE1/ sistem saraf	Tekanan oksidatif, disfungsi mitokondria, gangguan homeostasis Ca <sup>2+</sup> (Chen et al. 2016b)
Merkuri (Hg)	Tau fosforilasi	Protein Tau/ mitokondria	Kehilangan reseptor dopamin, degenerasi tubulin, degenerasi akson dan pengurangan glutation, tahap amiloid- $\beta$ yang lebih tinggi (yang menggalakkan pengagregatan $\alpha$ -sinuklein) (Bjorklund et al. 2018)
Aluminium (Al)	Al memudahkan pembentukan fibril $\alpha$ -sinuklein dengan mengaktifkan monoamine oxidase B	Monoamine oxidase 1	Calcineurin $\beta$ melindungi otak selepas kecederaan dengan mengaktifkan tindak balas membuka lipatan protein (Chen et al. 2016c)
Tembaga (Cu)	Mekanisme tekanan oksidatif, oligomerisasi $\alpha$ -sinuklein dan pembentukan badan Lewy, serta GABA-A dan modulasi neurotransmisi reseptor NMDA	Sitokrom/ mitokondria/ otak	Peningkatan penghasilan ROS, DNA dan disfungsi mitokondria (Cheignon et al. 2018; Ruiz et al. 2021)
Mangan (Mn)		Globus pallidus dalam ganglia basal	Kemerosotan transmisi DA, glutamatergik dan GABAergik, serta disfungsi mitokondria, tekanan oksidatif dan keradangan saraf yang ketara (Cicero et al. 2017)
Besi (Fe)	Peningkatan pengangkut logam divalen 1 (Zhang et al. 2009)	Reseptor glutamat (Lau & Tymianski 2010), protein Cu, ceruloplasmin (Jiang et al. 2015)	Besi merangsang pembentukan agregat $\alpha$ -sinuklein intrasel dan mempromosikan kerosakan oksidatif
Zink (Zn)	Pengumpulan $\alpha$ -sinuklein	Laluan autofagi-lisosom (Cicero et al. 2017)	Tsunemi and Krainc (2014) melaporkan bahawa kehilangan PARK9 menyebabkan ketidakseimbangan tahap zink intrasel, yang mengakibatkan disfungsi lisosom yang kemudiannya menyebabkan pengumpulan $\alpha$ -sinuklein

### c. Genetik

Mutasi dalam beberapa gen telah dikenal pasti sebagai faktor penyebab kepada PD jenis genetik kekeluargaan. Kajian terdahulu melaporkan bahawa sehingga 15 % pesakit PD

membawa varian patogen dalam gen yang berkaitan dengan PD, yang seterusnya meningkatkan risiko mereka untuk menghidap PD (Trevisan et al. 2024).

Terdapat sekurang-kurangnya 20 gen dikaitkan dengan PD varian kekeluargaan, manakala lebih daripada 20 lokus yang mempunyai risiko genetik telah dilaporkan daripada kajian persatuan seluruh genom PD (*PD genome-wide association studies*, GWAS) (Houlden & Singleton 2012). Gen yang paling kerap diperhatikan dalam PD ialah pengekodan gen terhadap  $\alpha$ -sinuklein (*SNCA*), glukoseribrosidase (*GBA*), parkin (*PARK2*), kinase 1 yang diinduksi oleh PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*, *PTEN-induced kinase 1*, *PINK1*), protein Tau yang berkaitan dengan mikrotubul (*microtubule-associated protein tau*, *MAPT*) dan kinase 2 berulang kaya dengan leusine (*leucine-rich repeat kinase 2*, *LRRK2*) (Houlden & Singleton 2012). Mutasi dalam gen *LRRK2* menyumbang 5 – 13 % daripada PD varian kekeluargaan dan 1 – 5 % daripada PD jenis sporadik (Drolet et al. 2011; Mata et al. 2006). Struktur *LRRK2* mengandungi gabungan guanosis trifosfatase (*guanosine triphosphatase*, GTPase), kinase, dan domain perancah (*scaffolding domains*) (Jaleel et al. 2007), dan fungsi patologi *LRRK2* terutamanya dikaitkan dengan aktiviti kinase yang luar biasa. Secara kolektif dan aktiviti kinase yang tinggi dalam mutan patogen *LRRK2* telah dikaitkan dengan ciri patologi PD, seperti kematian sel neuron DA, gangguan neurotransmisi dopamin, kecacatan dalam sintesis dan degradasi protein, tindak balas keradangan, dan kerosakan oksidatif (Mata et al. 2006; Tsika & Moore 2012). Varian gen yang sama ada kerap dan jarang diperhatikan dalam PD dapat dirujukan dalam Jadual 2.2.

Jadual 2.2 Mutasi gen yang telah dilaporkan menyebabkan PD

Simbol Gen	Jenis Mutasi	Mod Pewarisan	Mekanisme Penyakit	Kesan
<i>SNCA</i>	Salah erti ( <i>missense</i> ), titik	Dominan	Ekspresi gen yang berlebihan	Selalu bergejala demensia (Guella et al. 2016)
<i>PRKN</i>	Salah erti, anjakan rangka ( <i>frame shift</i> ), tapak sambat ( <i>splice site</i> ), titik, tak bererti ( <i>nonsense</i> )	Resesif	Kehilangan aktiviti parkin	Permulaan PD dengan awal (Castelo Rueda et al. 2021)
<i>UCHL1</i>	Salah erti	Dominan	Pengikatan ubiquitin dan aktiviti	Permulaan PD

			hidrolase terjejas (Bilguvar et al. 2013)	dengan awal (Nawaz et al. 2020)
<i>PARK7</i>	Salah erti	Resesif	Pembentukan heliks bercelaru dan perubahan bilangan ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik	Permulaan PD dengan awal (Singleton et al. 2013; Taipa et al. 2016)
<i>LRRK2</i>	Salah erti	Dominan	Lebih fosforilasi protein kinase diaktifkan-mitogen (MAPK) yang menyebabkan peningkatan penghasilan TNF- $\alpha$ dan mencetuskan lata isyarat keradangan (Chen et al. 2012; Lee et al. 2017; Li et al. 2021b)	Permulaan PD lewat (Paisán-Ruiz et al. 2013)
<i>PINK1</i>	Salah erti, anjakan rangka, tapak sambat, titik	Resesif	Pengaktifan parkin dan ubiquitinasi pada membran mitokondria luar merangsang pusing ganti ( <i>turnover</i> ) organel yang rosak melalui laluan endolisosom, termasuk mitofagi (Trempe & Gehring 2023)	Permulaan PD dengan awal (Gan et al. 2022)
<i>POLG</i>	Salah erti	Dominan	Replikasi dan pembaikan DNA mitokondria terjejas (Miguel et al. 2014)	Mutasi gen ini jarang berlaku pada pesakit PD yang tipikal, jadi ia dianggap berkaitan dengan manifestasi CNS selain daripada PD yang tipikal (Hsieh et al. 2019)
<i>HTRA2</i>	Salah erti	Dominan	Homeostasis mitokondria terganggu, pengumpulan protein tersalah lipat atau terkumpul, disregulasi apoptosis (Li et al. 2010)	Mutasi ini menyebabkan kerosakan DNA mitokondria dan akibatnya mencetuskan kematian sel saraf secara tidak normal (Goo et al. 2013)
<i>ATP13A2</i>	Salah erti, anjakan rangka	Resesif	Perubahan dalam proses homeostasis makroautofagi yang menjejaskan autofagi dalam sel dan seterusnya menyebabkan pengumpulan molekul $\alpha$ -sinuklein secara tidak normal (Zhang et al. 2022a)	Permulaan PD dengan awal (Park et al. 2014)
<i>FBXO7</i>	Salah erti, tapak sambat	Resesif	Perencatan proses mitofagi berlaku dan menyebabkan pengumpulan mitokondria yang tidak berfungsi dan seterusnya mengakibatkan degenerasi neuron dalam PD (Zhou et al. 2015)	Permulaan PD varian kekeluargaan dengan awal (Lee et al. 2021)
<i>GIGYF2</i>	Salah erti	Dominan	Disregulasi dalam isyarat insulin dan laluan isyarat abnormal	Permulaan PD lewat (Ruiz-

			reseptor insulin/IGF-1 yang dapat mengakibatkan rintangan insulin meningkat menyumbang kepada pengagregatan $\alpha$ -sinuklein (Ruiz-Pozo et al. 2023)	Martinez et al. 2015)
<i>GBA</i>	Salah erti	Dominan	Mutasi dalam gen <i>GBA</i> boleh menyebabkan kehilangan aktiviti glucocerebrosidase, yang menjejaskan kemerosotan laluan autofagi-lisosom dan peningkatan pengumpulan $\alpha$ -sinuklein (Smith et al. 2023)	Permulaan PD dengan awal (Malek et al. 2018)
<i>PLA2G6</i>	Salah erti	Resesif	Sintesis membran fosfolipid terjejas yang seterusnya menyebabkan kerosakan lisosom dan mitokondria di mana dapat mengakibatkan pengeluaran ROS (Hinarejos et al. 2020)	Permulaan PD dengan awal (Gao et al. 2022a)
<i>VPS35</i>	Salah erti	Dominan	Mutasi dalam gen <i>VPS35</i> dapat menyebabkan fungsi endolisosom dan autofagi terjejas; di samping berlaku pemecahan mitokondria yang mengakibatkan disfungsi mitokondria dan kematian neuron (Sassone et al. 2021)	Permulaan PD varian kekeluargaan dengan lewat (Sassone et al. 2021)
<i>DNAJC6</i>	Salah erti	Resesif	Auxilin tidak dapat berfungsi dan mengakibatkan pengumpulan vesikel bersalut clathrin pada hujung saraf, di mana mengganggu kitar semula vesikel dalam sinaps yang dapat menjejaskan pembebasan neurotransmitter dan mengganggu komunikasi antara neuron. Selain itu, kecacatan autofagi dan pengumpulan $\alpha$ -sinuklein berlaku disebabkan oleh degradasi mekanisme autofagi-lisosom (Wulansari et al. 2021)	Permulaan PD dengan awal (Li et al. 2020a)
<i>SYNJ1</i>	Salah erti	Resesif	Mutasi dalam gen <i>SYNJ1</i> dapat menjejaskan aktiviti fosfatase dan endositosis vesikel dalam sinaps yang kemudiannya dapat mengganggu dinamik vesikel pada hujung presinaptik serta pembebasan neurotransmitter (Zou et al. 2021)	Permulaan PD dengan awal (Lesage et al. 2021)
<i>DNAJC13</i>	Salah erti	Dominan	Pengangkutan protein endosom terjejas yang mempengaruhi degradasi protein. Pengangkutan endosom yang terganggu dapat mengakibatkan pengumpulan $\alpha$ -sinuklein (Besemer et al. 2021)	Permulaan PD lewat (Vilariño-Güell et al. 2014)
<i>TMEM230</i>	Salah erti	Dominan	Pengangkutan vesikel dan pelepasan neurotransmitter terjejas yang boleh menyebabkan kegagalan degradasi $\alpha$ -sinuklein dan pengumpulan $\alpha$ -sinuklein	Permulaan PD lewat (Wang et al. 2021a)

<i>VPS13C</i>	Salah erti	Resesif	dalam sel (Olszewska et al. 2016) Fungsi endolisosom terjejas dan seterusnya menyebabkan homeostasis lisosom terganggu serta meningkatkan kerentanan mitokondria kepada tekanan yang mengakibatkan penurunan potensial membran mitokondria (Lesage et al. 2016)	Permulaan PD dengan awal (Lesage et al. 2016; Schormair et al. 2018)
---------------	------------	---------	--	--

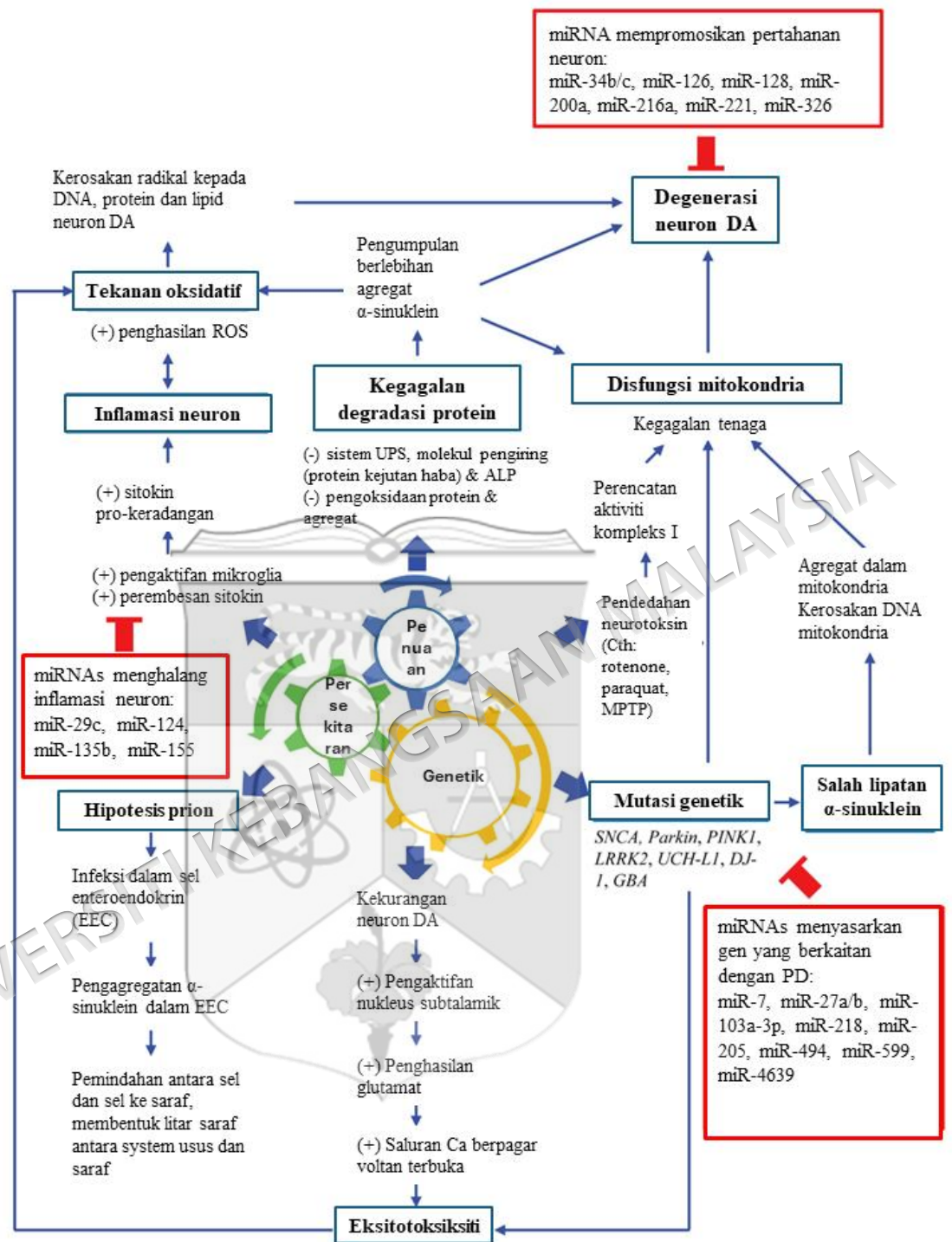
Terdapat variasi silang budaya dengan kebolehdjian yang lebih tinggi dilaporkan di Eropah, Amerika Utara dan Amerika Selatan berbanding dengan Afrika, Asia dan Arab (Kalia & Lang 2015). Di samping itu, terdapat perkaitan antara jantina dan profil ekspresi gen neuron DA normal yang menunjukkan kecenderungan lelaki terhadap perkembangan PD (Gillies et al. 2014). Mekanisme adaptif neuron DA yang terselamat daripada kecederaan yang dimediasi oleh proses yang berbeza pada lelaki dan wanita menunjukkan bahawa jantina juga memainkan peranan yang mempunyai kesan yang meluas kepada ekspresi gen neuron DA (Cantuti-Castelvetri et al. 2007). Peningkatan ekspresi gen yang terlibat dalam patogenesis PD seperti  $\alpha$ -sinuklein dan PINK1 dikesan pada lelaki, manakala peningkatan ekspresi gen yang terlibat dalam transduksi isyarat dan pematangan neuron yang dikesan pada wanita semasa terdapat mutasi tertentu dalam otak neurotipikal (Gillies et al. 2014). Perubahan dalam ekspresi gen yang dikaitkan dengan proteolisis dan laluan pengisyaratan Wnt, serta pengekodan gen kepada kinase protein yang mengawal aktiviti dalam neuron DA dapat diperhatikan lebih kerap pada wanita PD berbanding dengan lelaki PD; sebaliknya, perubahan besar dalam ekspresi gen yang terlibat dalam pengikatan kepada protein dan tembaga hanya ditemui pada lelaki PD (Simunovic et al. 2010). Tambahan pula, mutasi genetik pada pengangkut dopamin (*dopamine transporter*, DAT) yang mempengaruhi sistem pengangkutan nigrostriatal pada wanita dan lelaki secara berbeza boleh menunjukkan perbezaan jantina dalam insiden dan perkembangan PD (Ji et al. 2009).

### 2.1.5 Patogenesis PD

Mekanisme kematian neuron, terutamanya neuron DA, dalam PD melibatkan pelbagai laluan patogenik, seperti pembentukan  $\alpha$ -sinuklein, laluan berkaitan mitokondria dan laluan degradasi protein. Tekanan oksidatif juga dikaitkan rapat dengan pelbagai mekanisme seperti pengoksidaan asid nukleik, protein dan lipid, pengaktifan sel glia,

pengagregatan protein dan kerosakan mitokondria, yang dikaitkan dengan patologi PD (Mule & Singh 2018; Yaribeygi et al. 2018). Ciri patologi utama PD adalah agregasi  $\alpha$ -sinuklein dalam bentuk inklusi sel badan neuron, iaitu badan Lewy, dan degenerasi sistem nigrostriatal secara progresif, yang mengakibatkan kematian neuron DA dalam SNpc. Ini akhirnya membawa kepada persembahan gejala pergerakan dan gejala bukan pergerakan dalam pesakit PD. Walaupun mekanisme yang mengakibatkan kematian neuron DA dan pembentukan badan Lewy masih tidak jelas, namun mekanisme seperti salah lipatan dan agregasi  $\alpha$ -sinuklein, kegagalan fungsi mitokondria, tekanan oksidatif, neuroinflamasi, eksitotoksikiti dan jangkitan protein seperti prion telah dicadangkan (Rajah 2.3).

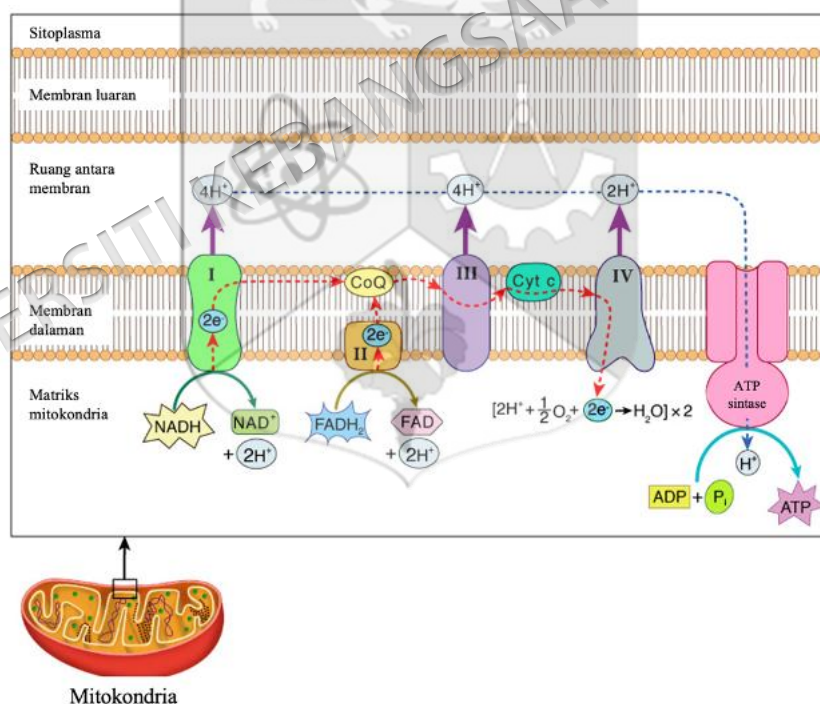




Rajah 2.3 Patogenesis PD melibatkan interaksi faktor penuaan, genetik, dan persekitaran, yang menyebabkan kehilangan neuron DA dan gejala motor kardinal PD

### a. Fungsi mitokondria terjejas dalam PD

Mitokondria merupakan organel yang mempunyai pelbagai fungsi dalam sel eukariot, merangkumi penghasilan tenaga, pengawalan proses metabolik, dan penyampaian isyarat sel (*cellular signaling*). Mitokondria boleh dianggap sebagai loji tenaga sel yang bertanggungjawab dalam penghasilan tenaga melalui rantai pernafasan mitokondria (*mitochondrial respiratory chain, MRC*), selain terlibat dalam pengawalan kematian sel, homeostasis kalsium dan penghasilan ROS (Spinazzi et al. 2012). Matriks mitokondria membawa kira-kira 10 - 100 salinan DNA mitokondria (mtDNA) yang sangat rentan terhadap kerosakan oksidatif. Selain itu, mitokondria mengalami perubahan morfologi secara berterusan melalui proses kitaran gabungan dan pembelahan (*fusion and fission*). Keseimbangan antara kedua-dua proses ini dapat menentukan fungsi bioenergetik organel, mengawal pusing ganti mitokondria (*mitochondrial turnover*), dan melindungi integriti mtDNA (Franco-Iborra et al. 2016).



Rajah 2.4 Rantaian pengangkutan elektron  
(Sumber: <https://www.sciencefacts.net/electron-transport-chain.html>)

Sistem bioenergetik mitokondria ini beroperasi melalui rantaian pengangkutan elektron (*electron transport chain, ETC*) yang terdiri daripada empat kompleks enzim utama (kompleks I-IV) yang tertanam pada membran dalaman mitokondria (Rajah 2.4).

ETC memungkinkan pemindahan elektron melalui tindak balas redoks yang berurutan. Kompleks I (NADH-ubiquinon oksidoreduktase) dan kompleks II (suksinat dehidrogenase) bertindak sebagai pintu masuk elektron daripada molekul penderma NADH dan FADH<sub>2</sub>, yang kemudiannya disalurkan kepada ubiquinon (CoQ). Elektron tersebut diteruskan ke kompleks III (sitokrom *c* reduktase) dan akhirnya ke kompleks IV (sitokrom *c* oksidase) di mana oksigen diturunkan menjadi molekul air. Sepanjang proses pemindahan elektron ini, tenaga yang dibebaskan digunakan untuk mengepam proton (H<sup>+</sup>) dari matriks ke ruang antara membran, yang seterusnya mewujudkan kecerunan proton elektrokimia yang merentasi membran dalaman. Proses pengepaman proton merentasi membran ini dimanfaatkan oleh ATP sintase (kompleks V) untuk menghasilkan ATP daripada ADP melalui proses fosforilasi oksidatif (*oxidative phosphorylation*, OxPhos) (Spinazzi et al. 2012). Walau bagaimanapun, rantaian ini juga merupakan tapak utama kebocoran elektron, terutamanya pada pusat redoks penderma dalam kompleks I dan III. Elektron yang bocor ini bertindak balas dengan molekul oksigen untuk membentuk superoksida atau hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Fridovich 1999; Malkus et al. 2009). Dalam konteks patogenesis PD, kegagalan fungsi ETC mempunyai impak yang ketara terhadap homeostasis oksidatif sel. Gangguan pada aliran elektron bukan sahaja mengurangkan penghasilan ATP yang membawa kepada krisis tenaga neuron, tetapi juga mencetuskan penghasilan ROS secara mendadak yang melangkaui kapasiti sistem pertahanan antioksidan sel. Bagi melindungi sel daripada kerosakan ini, rangkaian enzim antioksidan seperti tembaga-zink superoksida dismutase (SOD) dalam sitosol, mangan SOD dalam mitokondria, peroksidase, dan katalase berfungsi untuk menukarkan spesies reaktif kepada air bagi menghalang pengoksidaan makromolekul sel (Malkus et al. 2009).

Terdapat beberapa kajian yang lepas telah menghubungkan kegagalan fungsi mitokondria sebagai unsur utama dalam patogenesis PD (Bose & Beal 2016; Guzman et al. 2010; Mizuno et al. 1989; Schapira et al. 1990; Sterky et al. 2011). Penemuan kecacatan kompleks rantai pernafasan mitokondria, iaitu kekurangan kompleks I, dalam otak bedah siasat daripada pesakit PD sporadik (Parker Jr et al. 2008; Schapira et al. 1990) menunjukkan peranan penting mitokondria dalam patogenesis PD (Vos 2022). Penemuan ini kemudiannya dibuktikan dengan pengenalpastian mutasi dalam beberapa gen berkaitan PD yang telah ditunjukkan membawa kepada kerosakan mitokondria.

Disfungsi mitokondria telah diperhatikan secara konsisten merentas model berbeza PD yang diwarisi secara resesif autosom yang disebabkan oleh mutasi dalam pengekodan gen untuk protein PINK1, Parkin dan DJ-1 (Bonifati et al. 2003; Lücking et al. 2000; Valente et al. 2004). Kemerosotan mitokondria mengakibatkan penghasilan ROS yang berlebihan telah dikaitkan sebagai mekanisme asas penyakit degeneratif neuron (Cenini et al. 2019). Penghasilan ROS yang berlebihan ini dalam otak memburukkan keadaan tekanan oksidatif disebabkan otak lebih mudah terdedah kepada degeneratif neuron dalam keadaan tekanan oksidatif. Otak mudah terdedah kepada tekanan oksidatif kerana ianya memerlukan oksigen dengan kadar yang tinggi. Kira-kira 20 – 30 % daripada oksigen yang diperolehi menerusi pernafasan adalah digunakan oleh otak. Tahap asid lemak tidak tepu yang tinggi (García-Flores et al. 2016), bersama dengan sistem pertahanan antioksidan yang lemah (Foret et al. 2019) menjadikan otak lebih mudah terdedah kepada tekanan oksidatif, disamping terlibat dalam pelbagai gangguan neurodegeneratif dan penurunan kognitif yang berkaitan dengan usia (Teleanu et al. 2022).

Penemuan kebanyakan protein yang terlibat dalam fungsi mitokondria telah dikaitkan dengan kes PD varian kekeluargaan, khususnya sejak laporan postmortem pertama yang menunjukkan kekurangan kompleks I dalam substantia nigra (Mann et al. 1992; Schapira et al. 1990), serta dalam platelet dan otot rangka (Bindoff et al. 1989; Mann et al. 1992; Mizuno et al. 1989; Parker Jr et al. 1989) pesakit PD. Antara protein yang dikenal pasti berkaitan dengan gangguan fungsi mitokondria ini termasuklah *PARKIN*, *PINK1*, *DJ-1*, dan *HtrA2/Omi* (Abou-Sleiman et al. 2006). Walaupun banyak kajian menunjukkan bahawa kecacatan kompleks I dapat menyebabkan degeneratif neuron DA, tetapi ada juga kajian yang melaporkan bahawa perubahan struktur dalam kompleks I menjadikan neuron DA lebih sensitif kepada neurotoksin (Perier et al. 2010). Tambahan pula, toksin yang digunakan untuk menghasilkan model PD dalam haiwan adalah serupa dengan pesakit PD di mana mitokondria disasarkan untuk menyebabkan neuropatologi PD (Bezard & Przedborski 2011; Bose & Beal 2016; Dawson et al. 2010; Martinez & Greenamyre 2012; Schapira 2007). Apabila faktor transkripsi mitokondria A yang memainkan peranan penting untuk ekspresi mtDNA berkurangan secara selektif dalam neuron DA tikus (dinamakan tikus MitoPark), ETC terjejas dalam neuron DA

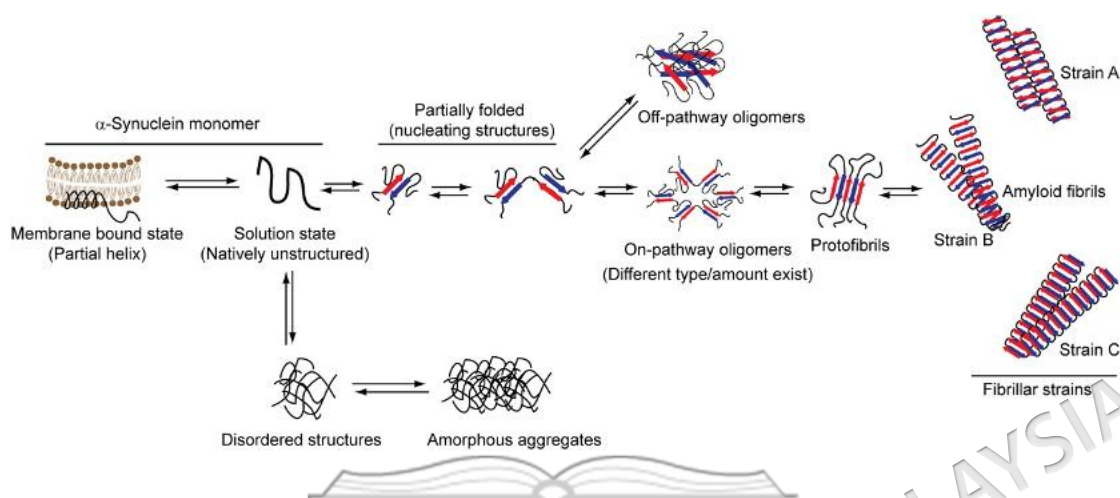
pada otak tengah. Keadaan ini seterusnya mendorong manifestasi fenotip PD dan seterusnya menyebabkan degeneratif neuron dalam tikus (Ekstrand et al. 2007).

Mekanisme patogenik sebahagian pesakit PD menunjukkan perubahan abnormal dalam fungsi mitokondria. Gangguan fungsi mitokondria ini biasanya menyebabkan peningkatan tekanan oksidatif, yang kemudiannya menjejaskan pelbagai laluan sel yang mengakibatkan kerosakan komponen intrasel dan kematian sel. Tekanan oksidatif merupakan salah satu mekanisme patogenik utama yang menyebabkan kematian neuron DA SNpc dalam pesakit PD (Moon & Paek 2015).

#### **b. Salah lipatan dan agregasi $\alpha$ -sinuklein**

$\alpha$ -sinuklein ialah protein sitosolik kecil yang mengandungi 140 asid amino yang berkurang kedua-dua sistein dan triptofan. Protein ini diekspresikan dalam kepekatan tinggi pada terminal presinaps, di mana ia berinteraksi dengan protein yang terlibat dalam proses pelepasan dan pengambilan semula neurotransmitter (Marino et al. 2022). Selain itu,  $\alpha$ -sinuklein juga terlibat dalam pengesanan dan penstabilan membran yang melengkung (*curved membranes*) (Shen et al. 2012), serta dalam pengawalan kolam vesikel (*vesicle pool*) sinaps dan pengangkutannya (Bridi & Hirth 2018). Pelbagai kajian *in vitro* dan *in vivo* mencadangkan bahawa salah lipatan dan pengagregatan  $\alpha$ -sinuklein adalah mekanisme patogenik penting dalam PD (Chu et al. 2019; Ghosh et al. 2013). Proses ini melibatkan pembentukan bukan-fibril luar laluan (*formation of non-fibrillar off-pathway*) dan oligomer larut, yang akhirnya bertukar menjadi agregat fibril tidak larut dengan konformasi lembaran  $\beta$  silang (*insoluble fibrillar aggregates with cross  $\beta$ -sheet conformation*) yang berbeza (Mehra et al. 2019). Pertama sekali, monomer  $\alpha$ -sinuklein wujud dalam dua keadaan, iaitu larutan (tidak berstruktur secara asli) dan keadaan terikat membran (konformasi heliks separa). Monomer tidak berstruktur secara asli bertukar kepada oligomer (*on-pathway* atau *off-pathway*) selepas pengeraman melalui struktur nukleus yang dilipat separa. Oligomer *on-pathway* akhirnya bertukar menjadi fibril amiloid lembaran  $\beta$  silang yang teratur manakala nasib oligomer luar laluan yang seterusnya tidak jelas pada setakat ini. Kemudiannya, protein tidak berstruktur secara asli juga boleh membentuk struktur yang tidak teratur, yang mengakibatkan pembentukan agregat amorfus. Dalam keadaan pemasangan/larutan

yang berbeza, protein asli boleh membentuk pelbagai jenis fibril amiloid, termasuk strain fibril (Rajah 2.5).



Rajah 2.5 Keadaan konformasi  $\alpha$ -sinuklein (Mehra et al. 2019)

Pengumpulan  $\alpha$ -sinuklein mula-mula berlaku dalam bulba olfaktori atau nukleus motor dorsal saraf dan vagus (peringkat 1), dan kemudiannya berkembang di medula oblongata dan (peringkat 2), diikuti oleh amygdala dan SN (peringkat 3). Pada peringkat 3, manifestasi motor PD mula muncul.  $\alpha$ -sinuklein merebak ke korteks temporal (peringkat 4) di mana pataloginya bertambah buruk. Neokorteks terjejas pada peringkat akhir PD yang menyebabkan masalah kognitif dengan kehilangan 30 % neuron DA dalam SN dan 50 – 60 % terminal akson pesakit PD (Goedert et al. 2017).  $\alpha$ -sinuklein boleh merebak ke sel lain secara langsung atau tidak langsung sebaik sahaja pengagregatan bermula. Pengagregatan  $\alpha$ -sinuklein timbul daripada mutasi gen, tekanan oksidatif atau  $\alpha$ -sinuklein tersalah lipat ke dalam bentuk amiloid (Srinivasan et al. 2021).  $\alpha$ -sinuklein ialah protein 14 kDa yang dikodkan oleh gen SNCA, yang terletak di lengan panjang kromosom 4 (Chr 4q22.1) dan mutasinya menyumbang kepada peningkatan risiko untuk mengembangkan PD (Srinivasan et al. 2021). Pelbagai mutasi salah erti dan amplifikasi genomik SNCA telah ditunjukkan terlibat dalam PD, seperti genotip GG rs356182 dikaitkan dengan fenotip PD gegaran yang dominan (Cooper et al. 2017; Pihlström et al. 2018).

Agregat  $\alpha$ -sinuklein terbentuk daripada  $\alpha$ -sinuklein salah lipatan, yang merupakan konstituen utama inklusi intraneuron, iaitu badan Lewy dan neurit Lewy, yang manifestasikan ciri patologi PD yang dapat memacu tindak balas neuroinflamasi

akibat pengaktifan mikroglia dalam otak pesakit PD (Zhang et al. 2005). Penghasilan radikal bebas yang berlebihan dapat diperhatikan dalam triplikasi SNCA pesakit yang diperolehi dari sel induk pluripoten teraruh (*induced pluripotent stem cell*, iPSC) (Deas et al. 2016). Di samping itu, pendedahan kepada agregat  $\alpha$ -sinuklein, terutamanya dalam bentuk oligomer dapat meningkatkan penghasilan ROS dalam neuron yang diperolehi daripada iPSC dalam kedua-dua kawalan dan sel triplikasi SNCA (Deas et al. 2016). Neuroinflamasi yang tidak terkawal secara kronik adalah salah satu proses penting yang terlibat dalam patogenesis PD. Tambahan pula, peningkatan ekspresi *translocator protein* (TSPO) dapat diperhatikan dalam oksipital, temporal dan korteks parietal pesakit PD berbanding dengan kumpulan kawalan, dan tahap neuroinflamasi menjadi semakin tinggi pada tahun berikutnya (Terada et al. 2016). Pada masa yang sama, pengaktifan mikroglia dalam otak tengah lebih tinggi pada pesakit PD berbanding individu yang sihat, di mana tahap pengaktifan mikroglia berkorelasi songsang dengan ketumpatan pengangkut dopamin dalam putamen pesakit PD (Ouchi et al. 2005).

### c. **Keradangan Neuron**

Keradangan neuron boleh dijelaskan sebagai tindak balas imunologi otak terhadap sebarang kecederaan atau tindak balas keradangan yang berlaku di dalam otak atau saraf tunjang (Ravichandran & Heneka 2023). Dalam keadaan akut, keradangan berfungsi sebagai tingkah laku neuroprotektif tetapi neuroinflamasi secara kronik dapat menunjukkan fenotip yang memudaratkan seperti dalam penyakit neurodegeneratif (Thakur et al. 2023). Keradangan neuron adalah salah satu proses terpenting yang terlibat dalam patogenesis PD. Neuromelanin (hasil sampingan katabolisme katekolamin) dirembeskan di luar neuron yang seterusnya dikesan dan difagositosis oleh sel mikroglia apabila neuron pesakit PD merosot. Fenomena ini telah ditunjukkan dalam pelbagai kajian *in vitro* dan *in vivo* bahawa neuromelanin dapat mencetuskan pengaktifan sel glia (mikroglia dan astrosit) (Niranjan 2014; Sun et al. 2016; Wang et al. 2015). Mikroglia adalah fagosit yang sangat motil dan terdiri daripada 10 % hingga 15 % daripada jumlah sel dalam otak yang terlibat dalam tindak balas keradangan dalam CNS (Li & Barres 2018; Saijo et al. 2009). Mikroglia ialah sel imun yang terletak dalam CNS yang memainkan peranan penting untuk berfungsi normal, mengekalkan integriti tisu, penghapusan patogen dan neuron yang mati (Jayaram & Krishnamurthy 2021). Pada tahun 1988, Mcgeer et al. (1988) menunjukkan kehadiran mikroglia yang reaktif

dalam SNpc tisu otak bedah siasat manusia, yang membuktikan penglibatan neuroinflamasi dalam patogenesis PD. Mikroglia yang diaktifkan juga merupakan sumber penting tekanan oksidatif (Li & Barres 2018) yang seterusnya menghasilkan glutamat dan faktor pro-keradangan termasuk TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  dan IL-6 untuk mempromosikan neurodegenerasi (Hickman et al. 2018). Selepas itu, neuron yang mati melepaskan lipid yang teroksida, protein dan DNA, yang merangsang pengaktifan mikroglia dan membentuk kitaran neurotoksik (Wang et al. 2015). Oleh sebab otak tengah mengandungi lebih banyak mikroglia, pengaktifan mikroglia yang berterusan atau secara kronik boleh menyebabkan kerosakan CNS yang tidak dapat dipulihkan. Sesungguhnya, keradangan berterusan di otak dapat menjejaskan keplastikan neuron (*neural plasticity*), menjejaskan ingatan, dan secara amnya dianggap sebagai pemacu kerosakan tisu dalam gangguan neurodegeneratif (Muzio et al. 2021; Qian et al. 2010). Kajian tomografi pelepasan Positron (*Positron emission tomography*, PET) juga menunjukkan bahawa terdapat pengaktifan mikroglia yang ketara di pelbagai kawasan otak PD (Bartels et al. 2010; Gerhard et al. 2006; Lecours et al. 2018). Tambahan pula, pengaktifan mikroglia dalam SNpc dan striatum juga didapati dalam pelbagai jenis model haiwan PD (Benner et al. 2008; Joers et al. 2017; Leal et al. 2013; Tansey et al. 2007). Di samping itu, analisis biokimia selanjutnya menunjukkan tahap pengantara pro-keradangan yang lebih tinggi termasuk faktor nekrosis tumor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) dan interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) dalam otak tengah pesakit PD (El-Kattan et al. 2022; Ferrari et al. 2021; Tansey et al. 2022). Selain daripada sel glia, sel endotelial dan limfosit T juga dapat dikesan dalam spesimen otak manusia bedah siasat pesakit PD (Brochard et al. 2008; Faucheux et al. 1999). Terdapat pelbagai kajian juga mendapati paras IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> yang lebih tinggi dalam serum dan cecair serebrospina pesakit PD, menunjukkan pengaktifan limfosit periferi (Chung & Benveniste 1990; Dufek et al. 2009; Galiano-Landeira et al. 2020; Mogi et al. 1996; Scalzo et al. 2009). Selepas jangkitan atau kerosakan tisu, monosit darah dan makrofaj pemastautin-tisu (*tissue-resident macrophages*) merembeskan sitokin dan kemokin keradangan, yang boleh melintasi BBB kompromi dengan mudah dan mengaktifkan proses neuroinflamasi dengan merangsang mikroglia pemastautin (Brochard et al. 2008; Faucheux et al. 1999; Wang et al. 2015). BBB biasanya tidak terjejas dalam individu yang sihat, sebaliknya peningkatan ketelapan BBB yang terjejas dapat diperhatikan dalam kes penyakit neurodegeneratif seperti PD, membawa kepada

peningkatan resapan sel imun periferi ke dalam CNS, yang dianggap sebagai salah satu faktor penyebab utama penyakit neurodegeneratif (Hirsch & Hunot 2009).

Sitokin adalah sekumpulan protein kecil atau glikoprotein dengan berat molekul yang rendah (biasanya < 30 kDa). Analisis struktur telah membolehkan klasifikasi protein ini ke dalam kelas struktur yang berbeza seperti sitokin heliks, keluarga faktor nekrosis tumor, faktor pertumbuhan sistina-knot (*cystine-knot growth factors*) dan faktor pertumbuhan  $\beta$ -trefoil ( *$\beta$ -trefoil growth factors*) (Wang et al. 2009). Sitokin juga boleh dikategorikan berdasarkan jenis reseptor yang diikat dengan sitokin, di mana kategori tersebut terdiri daripada enam keluarga utama, iaitu reseptor sitokin kelas I, reseptor sitokin kelas II, reseptor TNF, reseptor tirosina kinase dan reseptor kemokin (Wang et al. 2009). Sitokin biasanya dikaitkan dengan keradangan, pengaktifan imun, dan pembezaan atau kematian sel (Allan & Rothwell 2001; Gulati et al. 2016). Sitokin termasuk interleukin (IL) (sitokin dilepaskan oleh satu leukosit dan bertindak pada leukosit yang berlainan), interferon (IFN), faktor nekrosis tumor (TNF), kemokin (sitokin yang bertindak aktiviti kemotaktik), monokin (sitokin yang dibuat oleh monosit), dan faktor pertumbuhan (Allan & Rothwell 2001; Zhang & An 2007). Kesemua sitokin ini mempunyai fungsi masing-masing untuk bertindak balas kepada keradangan, infeksi atau kecederaan tisu (Allan & Rothwell 2001). Secara amnya, kebanyakan sel bernukleus boleh menghasilkan sitokin, seperti makrofaj, limfosit T, limfosit B, sel mast, fibroblas, sel endothelium, dan pelbagai sel stroma (Dinarello 2000). Namun begitu, sel pembantu T (Th) dan makrofaj adalah perembes sitokin utama dalam sel imun (Zhang & An 2007). Sitokin ini memainkan peranan penting dalam pembezaan, pematangan, dan pengaktifan pelbagai sel imun. Sitokin ini dapat memberi kesan pro-keradangan atau anti-keradangan atau kedua-dua kesan sekali, bergantung kepada mikrop persekitaran tempatan tertentu. Sitokin anti-keradangan terutamanya bertindak untuk merendahkan proses keradangan yang intensif dan mengekalkan homeostasis supaya organ badan dapat berfungsi dengan baik, tetapi tindak balas sitokin anti-keradangan yang tidak perlu juga boleh menindas fungsi imun badan (Bone 1996; Ng et al. 2003). Sebaliknya, sitokin pro-keradangan mempromosi keradangan dan bertanggungjawab untuk bertindak balas terhadap zarah (*particles*) atau patogen asing. Walau bagaimanapun, perembesan sitokin pro-keradangan yang berlebihan boleh

memudaratkan dan akhirnya boleh menyebabkan pelbagai kegagalan organ, kejutan, dan kematian (Pinsky et al. 1993).

**i. Faktor nekrosis tumor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )**

Faktor nekrosis tumor ialah sitokin pengawalseliaan kritikal yang terlibat dalam keradangan sistemik dan merupakan salah satu sitokin yang menyumbang kepada tindak balas fasa akut. Sitokin ini terutamanya disintesis oleh sel mikroglia dan astrosit dalam CNS, dan juga makrofaj, limfosit T, limfosit B, sel pemusnah semula jadi (*natural killer cell*, *NK cell*), sel dendrit, granulosit, sel endothelium bukan imun, osteoblas, sel otot licin, fibroblas, keratinosit, sel mast, dan neuron (Gahring et al. 1996; Montgomery & Bowers 2012; Semenzato 1990; Serbina et al. 2003). Pada zaman ini, TNF- $\alpha$  dianggap sebagai sitokin pro-keradangan yang terlibat dalam tindak balas keimunan semula jadi (Serbina et al. 2003). Dalam CNS, TNF- $\alpha$  dirembeskan untuk bertindak balas terhadap pelbagai faktor seperti kecederaan dan rangsangan imunologi dalam CNS seperti sitokin, faktor pelengkap, kompleks imun, pendedahan kepada toksin, protein bakteria dan virus (Lokensgard et al. 2001; Montgomery & Bowers 2012). Dalam PD, TNF- $\alpha$  terutamanya dirembeskan oleh sel mikroglia dan astrosit. Kejadian sitokin keradangan ini dalam cecair serebrospina (*cerebrospinal fluid*, CSF) pesakit PD telah dijelaskan oleh Mogi dan rakan sekerjanya. Beliau mendapati bahawa tahap TNF- $\alpha$  telah dipertingkatkan dalam CSF pesakit PD (Mogi et al. 1994).

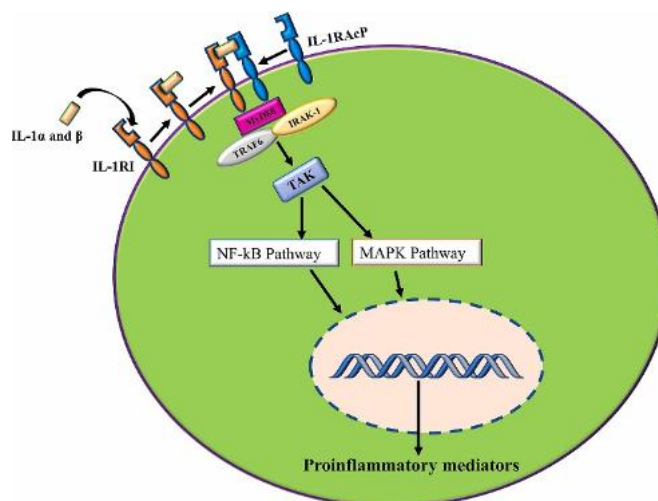
Dalam kes neuroinflamasi, TNF- $\alpha$  dapat meningkatkan ekspresi sitokin pro-keradangan, seperti IL6 dan IL-1 $\beta$ . Selain daripada penghasilan sitokin perantara TNF- $\alpha$ , ekspresi seterusnya molekul pelekatan intrasel 1 (*intracellular adhesion molecule 1*, ICAM-1), protein pelekatan sel vaskular 1 (*vascular cell adhesion protein 1*, VCAM-1), E-selectin, dan P-selectin boleh mengakibatkan penyusupan sel dan keradangan. TNF- $\alpha$  juga boleh mengaktifkan matriks metaloproteinase-9 (*matrix metalloproteinase 9*, MMP-9), yang menyebabkan gangguan BBB dan mendorong gangguan neurodegeneratif (Subedi et al. 2020). Tahap TNF- $\alpha$  yang tinggi, terutamanya di kawasan yang manifestasi kehilangan neuron DA yang ketara telah dilaporkan selepas analisis CSF dan sampel tisu pesakit PD serta otak PD bedah siasat telah dilakukan. Selain itu, polimorfisme di kawasan penggalak TNF- $\alpha$  juga dapat meningkatkan aktiviti

transkrip yang telah dikenal pasti sebagai faktor penyumbang kepada perkembangan PD (Mccoy & Tansey 2008; Nishimura et al. 2001).

## ii. Interleukin-1 (IL-1)

IL-1 ialah pengawal selia utama keradangan yang mengawal pelbagai proses keimunan semula jadi. IL-1 merupakan interleukin pertama yang ditemui dan mempunyai banyak aktiviti biologi. Sebagai contoh, IL-1 mengganggu ekspresi molekul pelekatan pada sel endothelium, yang membolehkan sel imun seperti fagosit, dan limfosit berhijrah ke tapak infeksi. Selain itu, IL-1 bertindak pada pusat pentermokawalaturan dalam hipotalamus, yang menyebabkan peningkatan suhu badan dan mengakibatkan demam. Oleh itu, IL-1 juga dikenali sebagai pirogen endogenus. Selain daripada tindak balas demam, IL-1 juga mendorong hiperalgesia, vasodilatasi, hipotensi, dan mengaktifkan pelbagai komponen tindak balas fasa akut dan faktor pengaktifan limfosit (*lymphocyte-activating factor*, LAF) (Contassot et al. 2012; Kaneko et al. 2019). IL-1 disintesis oleh monosit, makrofaj tisu, dan sel dendrit; walau bagaimanapun, IL-1 juga dihasilkan oleh neuron, astrocit, oligodendrosit, limfosit, sel NK, dan sel epitelium (Basu et al. 2004; Contassot et al. 2012). IL-1 $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  adalah sitokin yang paling banyak dikaji sejak kedua-dua sitokin ini dikenal pasti terlebih dahulu dan mempunyai kesan pro-keradangan yang jelas. IL-1 $\alpha$  didapati sebagai protein terikat membran yang terlibat dalam pengisyaratan parakrin dan autokrin, manakala IL-1 $\beta$  biasanya ditemui dalam bentuk larut dan rembesan. Kedua-dua IL-1 $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  disintesis sebagai protein prekursor (bentuk tidak aktif), yang mesti dibelah oleh protease (caspase-1 untuk IL-1) untuk pengaktifan (Netea et al. 2010). IL-1 $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  mengikat dengan molekul reseptor yang sama bernama reseptor IL-1 jenis I (*type I IL-1 receptor*, IL-1RI). Selain daripada kedua-dua sitokin ini, molekul lain juga bersaing untuk mengikat dengan reseptor ini, dan bertindak sebagai perencat pengisyaratan IL-1 $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ , yang dinamakan sebagai antagonis reseptor IL-1 (IL-1Ra) (Bourke et al. 2003; Dinarello 2011). Manakala reseptor IL-1 jenis II (*type II IL-1 receptor*, IL-1RII) bertindak sebagai reseptor umpan (*decoy receptor*) yang tidak terlibat dalam pengisyaratan IL-1 (Bourke et al. 2003). Selepas pengikatan ligan, perubahan konformasi berlaku dalam IL-1RI yang membenarkan pengikatannya dengan protein reseptor aksesori yang dikenali sebagai protein aksesori reseptor IL-1 (*IL-1 receptor accessory protein*, IL-1RAcP), dan pengikatan IL-1RI bersama dengan IL-1RAcP ini dikenali sebagai kompleks

reseptor heterodimer (*heterodimeric receptor complex*). IL-1RAcP berfungsi sebagai ko-reseptor dan diperlukan untuk transduksi isyarat. Setelah mengikat dengan IL-1 $\alpha$  atau IL-1 $\beta$ , kompleks reseptor heterodimer ini merekrut beberapa protein adaptor ke tapak reseptor melalui kawasan sitosol yang dikekalkan (*conserved cytosolic regions*) yang dipanggil *Toll- and IL-1R-like (TIR) domains* (Weber et al. 2010). Protein adaptor ini ialah *tumour necrosis factor-associated factor 6* (TRAF6) dan *myeloid differentiation response gene 88* (MyD88) yang membawa kepada pengaktifan beberapa kinase yang berbeza termasuk *IL-1 receptor associated kinases 1* (IRAK1) dan *IL-1 receptor associated kinases 4* (IRAK4), *transforming growth factor activated kinase* (TAK), dan anggota *mitogen activated protein kinase* (MAPK) lata 1 (p38, JNK, dan ERK1/2) dan NF- $\kappa$ B (Rajah 2.6) (Davis et al. 2006; Smith et al. 2012; Weber et al. 2010). Selepas tindakan kinase ini, transkripsi pelbagai jenis gen responsif IL-1 (*IL-1-responsive genes*) (seperti IL-6, IL-8, MCP-1, COX-2, I $\kappa$ B, IL-1, MKP-1) bermula melalui tindakan NF- $\kappa$ B dan kompleks faktor transkripsi AP-1, yang terdiri daripada faktor transkripsi anggota keluarga Fos, Jun dan ATF. IL-1RI juga boleh mempromosikan hidrolisis sfingomielin oleh sfingomielinase neutral (*neutral sphingomyelinase*, nSMase) dalam membran neuron untuk menghasilkan seramida yang mengaktifkan aktiviti kinase laluan apoptosis, dan perubahan dalam elektrofisiologi neuron (Davis et al. 2006; Hirsch et al. 2012; Weber et al. 2010).



Rajah 2.6 Pengawalaturan dinamik sitokin pro-keradangan (Sharma et al. 2023)

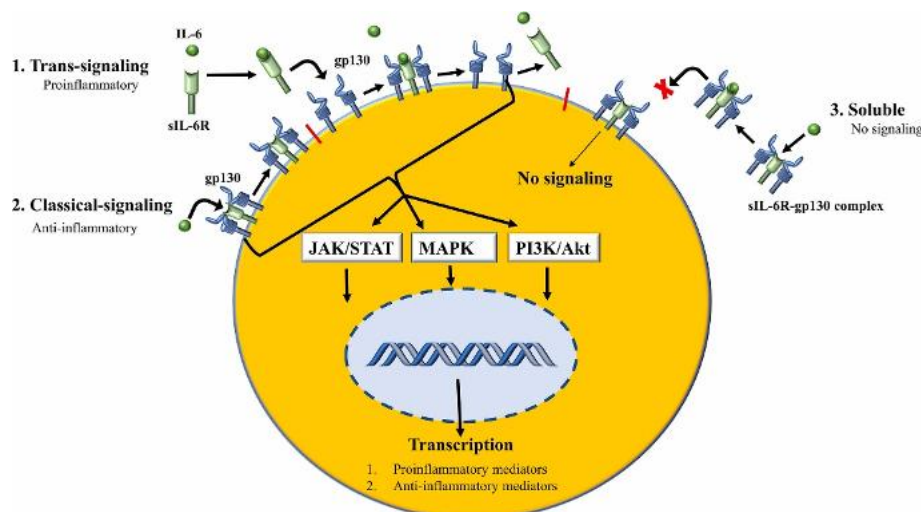
Terdapat beberapa kajian telah melaporkan bahawa IL-1 memainkan peranan penting dalam merangsang ekspresi pelbagai mediator keradangan seperti fosfolipase A2, siklooksigenase-2 (*cyclooxygenase-2*, Cox-2), TNF- $\alpha$ , dan interleukin-6 (IL-6) (Basu et al. 2004). Tambahan pula, kajian tersebut menunjukkan bahawa IL-1 memberi kesan kepada pelbagai jenis sel dalam CNS, termasuk neuron, mikroglia, astrosit, oligodendrosit, dan sel endotelium. IL-1 meningkatkan ekspresi pelbagai gen dalam sel-sel ini, seperti kemokin, metaloproteinase matriks (*matrix metalloproteinase*, MMP), sitokin pro-keradangan termasuk IL-6 dan TNF- $\alpha$ , serta faktor penggalak kelangsungan hidup seperti faktor pertumbuhan saraf (*nerve growth factor*, NGF) dalam astrosit. Dalam sel mikroglia, IL-1 mengimbangi ekspresi IL-1, IL-6, nitrik oksida (NO), prostaglandin E2 (PGE2), dan TNF- $\alpha$ . Selain itu, IL-1 juga meningkatkan ekspresi molekul lekatan endotelium seperti *E-selectin*, *P-selectin*, kemokin CCL2, dan *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), serta NO, yang menyebabkan keruntuhan BBB dalam sel endotelium (Simi et al. 2007). Selain itu, sel mikroglia yang menghasilkan tahap IL-1 $\beta$  dan IL-1 $\alpha$  yang tinggi didapati terlibat dalam patogenesis PD (Koprach et al. 2008; Leal et al. 2013; McGeer et al. 2002).

### iii. Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 (IL-6) ialah sitokin yang dikenal pasti sebagai faktor pembezaan sel B (*B-cell differentiation factor*, BSF-2) pada tahun 1985 (Hirano et al. 1985). Faktor pembezaan sel B ini dianggap sebagai faktor yang mendorong kematangan sel B

menjadi sel penghasil antibodi. Pada awal 1990-an, IL-6 didapati bukan sahaja penting dalam pengawalan sel imun lain seperti sel T, tetapi IL-6 juga penting dalam pengawalaturan hepatosit, sel progenitor hematopoietik, rangka, sistem kardiovaskular, plasenta serta sistem saraf dan endokrin (Caracciolo et al. 1989; Gijbels & Billiau 1992; Gu et al. 2022; Lerner 2020; Lukowski et al. 2015; Makris et al. 2023; Zhao et al. 2008). IL-6 ialah sitokin berkas empat heliks (*four-helix bundle cytokine*) yang merupakan ahli pengasas neuropoietin, iaitu sekumpulan sitokin berkaitan struktur, termasuk IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, faktor perencat leukemia, onkostatin M, kardiotropin-1, neuropoietin dan sitokin bak kardiotropin (*cytokine cardiotrophin-like*) [juga dikenali sebagai neurotrofin 1 baru dan faktor rangsangan sel B-3 (*B cell stimulatory factor-3*)], dan dua analog virus IL-6 (Bauer et al. 2007; Erta et al. 2012; Heinrich et al. 2003; Wang et al. 2009). Sitokin ini mengikat kepada reseptor sitokin kelas I, protein membran dengan ciri seni bina bermodul yang tidak mempunyai aktiviti enzim intrinsik, oleh itu sitokin IL-6 selalunya perlu merekrut protein reseptor tambahan yang dikongsi oleh sitokin yang berbeza, seperti gp130,  $\beta c$  atau  $\gamma c$ , untuk pengisyaratan sel. Keluarga sitokin IL-6 merekrut gp130, juga dikenali sebagai keluarga sitokin gp130 untuk pengisyaratan sel. Namun begitu, pengisyaratan IL-6 boleh menghasilkan kedua-dua lara keradangan dan anti-keradangan bergantung pada kehadiran reseptor IL-6 (*IL-6 receptor*, IL-6R) atau transduser isyarat gp130 terikat membran (Rajah 2.7). Pengisyaratan IL-6 dianggap sebagai tindak balas anti-keradangan melalui pengikatan IL-6 pada reseptor permukaan sel terikat membran. Pengisyaratan IL-6 biasanya hanya berlaku pada beberapa subset sel T, hepatosit, megakariosit, neutrofil dan monosit. Walau bagaimanapun, IL-6R juga didapati sebagai protein larut (*soluble IL-6R*, sIL-6R), yang dihasilkan melalui hiris-cantum alternatif (*alternative splicing*) atau proteolisis oleh enzim metaloprotease termasuk *disintegrin* dan anggota keluarga Metaloproteinase. Pengisyaratan-trans IL-6 yang terlibat dalam pengisyaratan pro-keradangan berlaku dengan IL-6 terikat kepada sIL-6R dan diangkut ke permukaan sel yang mempamerkan gp130. gp130 terikat membran (*membrane-bound gp130*, mgp130) ini biasanya dapat ditemui di seluruh badan. Kompleks IL-6-sIL-6R sepatutnya dapat mengaktifkan kebanyakan sel dalam tubuh, termasuk sel T, hepatosit, megakariosit, neutrofil, monosit, serta sel otak seperti neuron, mikroglia, dan astrosit. Pengisyaratan-trans ini kebanyakannya dikawal oleh gp130 larut (*soluble gp130*, sgp130), dengan kehadirannya secara kepekatan yang lebih tinggi dalam darah yang beredar. Sgp dapat merencat pengisyaratan-trans IL-6 melalui

persaingan dengan mgp untuk mengikat dengan kompleks IL-6-sIL-6R dan menghalang kompleks IL-6-sIL-6R daripada mengikat dengan mgp130 (Berg et al. 2021; Hodes et al. 2016; Mcgeer et al. 2002). Kompleks IL-6/IL-6R/gp130 mengaktifkan pengisyaratan intrasel melalui laluan *Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT) dan MAPK dalam kedua-dua pengisyaratan klasik dan trans. Dalam laluan pengisyaratan JAK, homo-pendimeran (*homodimerization*) gp130 dapat mengaktifkan anggota keluarga JAK, termasuk JAK1, JAK2, dan TYK2. Kinase ini kemudiannya boleh memfosforilasi transduser isyarat dan pengaktif protein transkripsi (STAT), terutamanya STAT1 dan STAT3 (Hodes et al. 2016; Rothaug et al. 2016). Fosforilasi STAT1 dan STAT3 menyebabkan translokasi nukleus dan merangsang transkripsi gen sasaran mereka. STAT1 memainkan peranan sebagai pengawal atur utama dalam pengisyaratan melalui interferon (IFN) jenis I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , dan IFN- $\omega$ ) dan jenis II (IFN- $\gamma$ ) yang terlibat dalam tindak balas imun semula jadi. Manakala STAT3 memainkan peranan dalam kelangsungan hidup sel dengan mengubah suai ekspresi gen yang terlibat dalam pembahagian sel/ perkembangan kitaran sel (cyclin D1, c-myc, c-fos) dan perencatan protein apoptosis (survivin, c-IAP2, Bcl-xL, Bcl-2). Kompleks reseptor IL-6R-gp130 yang diaktifkan juga boleh memulakan pengisyaratan melalui MAPK. Akhirnya, IL-6 juga boleh mempromosikan pengisyaratan PI3K/Akt. Akt dapat mempromosikan kelangsungan hidup sel dengan bertindak pada beberapa substrat, termasuk faktor transkripsi (forkhead/FOXO), pengawal atur kitaran sel (CDK2), dan protein pro-apoptosis (Bax, Bad, caspase-9) dan anti-apoptosis (Bcl-2) protein (Smith et al. 2012). Terdapat beberapa kajian telah dilaporkan bahawa peningkatan sitokin IL-6 dalam CSF dan serum pesakit PD (Diaz et al. 2022; Gruden et al. 2012; Müller et al. 1998; Scalzo et al. 2010; Tang et al. 2014). Namun begitu, Fu et al. (2023) mendapati bahawa tahap IL-6 dikaitkan dengan gejala bukan motor dan disfungsi kognitif; oleh itu, IL-6 mungkin memainkan peranan dalam patofisiologi gejala bukan motor dalam PD.



Rajah 2.7 Jenis pengisyratan IL-6 (Sharma et al. 2023)

#### d. Spesies oksigen reaktif (ROS)

Radikal bebas adalah molekul yang reaktif yang dihasilkan sebagai hasil sampingan respirasi sel. Walaupun otak hanya merangkumi sekitar 2 % daripada jumlah berat badan, tetapi otak memerlukan hampir 20 % daripada keseluruhan oksigen yang digunakan oleh tubuh (Lau-Cam 2020). Keperluan oksigen yang tinggi ini menjadikan otak sangat terdedah kepada tekanan oksidatif yang disebabkan oleh spesies oksigen reaktif (ROS) (Kim et al. 2020). Selain faktor utama ini, terdapat beberapa faktor lain yang turut menyumbang kepada sensitiviti otak terhadap ROS. Kehadiran logam aktif redoks seperti ferum dan kuprum di dalam otak berperanan sebagai pemangkin dalam penghasilan ROS, manakala kekurangan dalam sistem pertahanan antioksidan yang berfungsi menurunkan tahap ROS boleh meningkatkan lagi kerentanan otak terhadap tekanan oksidatif (Kim et al. 2020). Tambahan pula, kandungan asid lemak polidaktepung (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) yang tinggi dalam membran sel juga memberi kesan kepada otak (Berg et al. 2004). Neuron DA di SNpc adalah antara pelbagai jenis neuron yang terdapat di kawasan otak yang paling terdedah terhadap tekanan oksidatif (Burbulla & Krainc 2019; Dias et al. 2013; Dolgacheva et al. 2019). Peningkatan penghasilan ROS secara berlebihan boleh mencetuskan pelbagai perubahan biokimia yang akhirnya menyumbang kepada perkembangan penyakit neurodegeneratif, termasuk PD, penyakit Alzheimer, penyakit Huntington, sklerosis berbilang (*multiple*

*sclerosis*) dan sklerosis lateral amiotrofik (*amyotrophic lateral sclerosis*) (Singh et al. 2019).

ROS yang biasa ditemui termasuk oksigen singlet ( $^1\text{O}_2$ ), radikal anion superoksida ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), radikal hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ), dan hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). ROS biasanya dikekalkan pada tahap rendah di bawah keadaan homeostasis redoks (Rahal et al. 2014). Namun begitu, pengawalan ROS dalam keadaan yang seimbang memerlukan sokongan daripada sistem antioksidan bersama dengan antioksidan berenzim endogen termasuk SOD (Van Raamsdonk & Hekimi 2012), katalase (CAT) (Singhal et al. 2013; Vetrano et al. 2005), glutathion peroksidase (GPx) (Mason et al. 2013) serta thioredoxin (Trx) (Yang et al. 2020), dan antioksidan bukan enzim termasuk vitamin C dan E yang bertindak secara kolektif untuk menentang penghasilan ROS yang berlebihan dalam sel secara langsung atau tidak langsung (He et al. 2017; Liu et al. 2020b; Nor Azman et al. 2018). ROS kebanyakannya adalah hasil daripada interaksi molekul oksigen dengan elektron yang dikeluarkan dari ETC melebihi kapasiti penyingkiran sistem antioksidan, yang seterusnya mengoksidakan molekul lain (protein, DNA dan lipid) dan mengakibatkan pelbagai kesan (Azzouz et al. 2021; Chang et al. 2020; Yusupov et al. 2017). Kesan pengoksidaan ROS pada protein seperti karbonilasi protein, di mana rantai sisi protein disasarkan yang menyebabkan kehilangan fungsi protein (Chang et al. 2020). ROS ialah agen perosak endogen utama terhadap DNA melalui pengoksidaan bes DNA (Azzouz et al. 2021). Selain itu, ROS dapat menjejaskan sifat struktur dan dinamik membran lipid dengan mengubah kebendaliran (*fluidity*) dan kebolehtelapannya (*permeability*). Pemperoksidaan lipid merujuk kepada tindak balas rantai yang disebabkan oleh ROS yang secara khusus menyasarkan lipid yang mengakibatkan pemecahan molekul malondialdehid (MDA) dan 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) (Ayala et al. 2014). Sebatian perantaraan ini boleh bertindak balas dengan DNA dan protein untuk membentuk aduk (*adducts*) dalam tetapan neurodegeneratif (Citron et al. 2016; Wataya et al. 2002). Hasil sampingan pemperoksidaan lipid, HNE ini dapat mencetuskan tapak jalan AMPK/mTORC (Dolinsky et al. 2009) dan tapak jalan transduksi isyarat JNK (Haberzettl & Hill 2013) yang seterusnya mengaktifkan autofagi (Kim et al. 2011; Klein et al. 2015). Kardioliipin, suatu fosfolipid dan pengantara mitofagi penting dalam membran dalaman dwilapisan lipid mitokondria, yang telah dikenal pasti sangat rentan secara khusus kepada pemperoksidaan lipid (Liu et al. 2011;

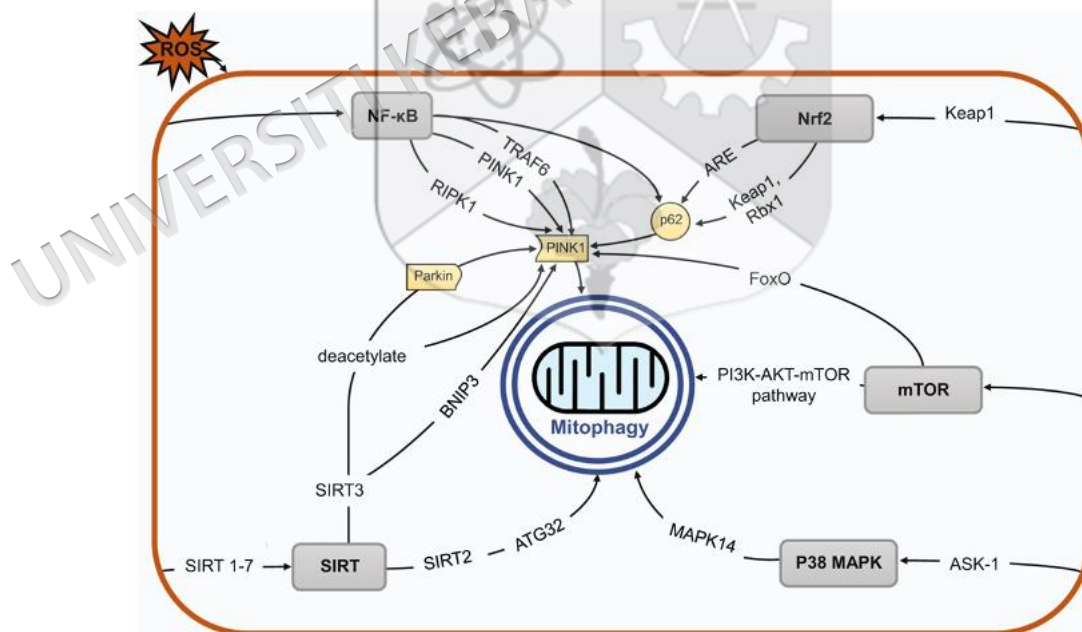
Zhong et al. 2014). Pengoksidaan kardioliipin mengakibatkan penjanaan pengantara lipid reaktif, termasuk HNE dan kardioliipin yang mengandungi epoksida (Liu et al. 2011; Zhong et al. 2014). Secara keseluruhan, rangkaian mitokondria adalah sasaran kritikal 4-HNE, bersama dengan fluks autofagi neuron dimodulasi oleh 4-HNE dalam perilaku bersandar kepekatan (*concentration-dependent manner*) melalui pengubahsuaian protein autofagi secara langsung (Dodson et al. 2017). Memandangkan kesan pemperoksidaan lipid pada autofagi, kardioliipin dan kualiti protein mitokondria, spekulasi yang munasabah ditimbulkan bahawa pemperoksidaan lipid teraruh ROS mungkin dapat mengawal atur mitofagi pada akhirnya. Walaupun dogma klasik ROS dan spesies nitrogen reaktif (*reactive nitrogen species*, RNS) dianggap secara meluas berbahaya kepada struktur sel, tetapi peranan mereka adalah dinamik dan berfungsi sebagai transduser isyarat intrasel pleiotropik yang terlibat dalam proses pembangunan (Bazopoulou et al. 2019; Han et al. 2018), rangkaian metabolik (Peralta et al. 2015) dan autofagi (Chen et al. 2009a).

ROS berfungsi sebagai molekul pengisyarat yang memainkan peranan penting dalam mengekalkan pelbagai fungsi fisiologi dalam badan, termasuk peranan kritikal dalam sistem imun, rangsangan faktor pertumbuhan, dan perkembangan tindak balas keradangan (Brieger et al. 2012; Krause & Bedard 2008). Walau bagaimanapun, apabila mekanisme pampasan intrinsik gagal mengawal tahap ROS dengan berkesan, ketidakseimbangan ini membawa kepada tekanan oksidatif. Tekanan oksidatif yang terhasil mempunyai kesan yang memudaratkan, menyebabkan kerosakan pada makromolekul sel dan mencetuskan kematian sel, akhirnya menyumbang kepada proses neurodegenerasi (Sies & Jones 2020). Walaupun tahap ROS yang rendah telah dilaporkan dapat menggalakkan kelangsungan hidup dan percambahan sel, pengumpulan ROS juga dapat mendorong apoptosis pengantara mitokondria dengan pengeluaran *cytochrome C* (CytC) dan faktor-merangsang apoptosis (Fleury et al. 2002; Fruehauf & Meyskens Jr 2007; Simon et al. 2000). Namun begitu, penghasilan ROS yang berlebihan dapat mempromosikan pengagregatan protein patologi dan disfungsi mitokondria yang menyumbang kepada perkembangan PD (Dias et al. 2013; Dorszewska et al. 2021; Gill & Tuteja 2010; Musgrove et al. 2019; Subramaniam & Chesselet 2013). Pelbagai kajian *in vitro* dan *in vivo* yang dijalankan ke atas model PD telah menunjukkan induksi ROS adalah kritikal dalam mekanisme patofisiologi yang

berkaitan dengan mutasi genetik PD (*PINK1* dan *Parkin*, *DJ-1*, *LRRK2* dll) dan disfungsi mitokondria (Ahn et al. 2021; Angeles et al. 2011; Joselin et al. 2012; Xiao et al. 2017b). Hubungan antara disfungsi mitokondria dan PD pertama kali dimanifestasikan dalam parkinsonisme yang disebabkan oleh MPTP di kalangan penyalahguna dadah (Langston et al. 1983). MPTP dimetabolismekan menjadi 1-metil-4-fenilpiritinium ( $MPP^+$ ) di dalam otak, dan memasuki neuron DA oleh pengangkut dopamin melalui sistem pengambilan semula DA (Javitch et al. 1985). Seterusnya,  $MPP^+$  menghalang enzim kompleks I secara selektif dan mengakibatkan aktiviti kompleks MRC terhalang dan menyebabkan peningkatan kebocoran elektron dengan menyekat ETC dan seterusnya mempertingkatkan penjana ROS dalam mitokondria (Dias & Bailly 2005; Langston et al. 1983; Li et al. 2003; Vila & Przedborski 2003). Penurunan protein pengawal antioksidatif mengurangkan penyingkiran ROS dan menyebabkan pengumpulan ROS (Islam et al. 1997). Penurunan aktiviti kompleks I dan peningkatan ROS intrasel juga telah disahkan dalam SN otak bedah siasat pesakit PD (Parker Jr et al. 2008; Schapira et al. 1990). Tambahan pula, auto-pengoksidaan dopamin dapat mendorong neurotoksisiti dalam neuron DA (Burbulla et al. 2017). Penyiasatan bedah siasat telah menunjukkan bahawa pengurangan aktiviti ETC dalam mitokondria, dan peningkatan paras besi dalam SN berbanding kawalan yang dipadankan dengan umur (Genoud et al. 2017; Schapira 2008). Besi diketahui boleh meningkatkan penghasilan ROS melalui penjana radikal hidroksil, yang membawa kepada pembentukan spesies reaktif akibat  $\alpha$ -sinuklein dalam SN melalui tindak balas Fenton dan pengumpulan besi redoks-aktif dalam granula neuromelanin dalam SN (Jin et al. 2010). Neuron DA dalam SN lebih mudah terdedah kepada penjana ROS yang berlebihan akibat daripada struktur selnya yang berbeza (saiz dan kekompleksan yang meningkat secara relatif) dan aktiviti biokimia [aktiviti perentak  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$  *pacemaking activity*)] yang unik (Poewe et al. 2017; Trist et al. 2019).

Kebanyakan kajian melaporkan bahawa penglibatan utama ROS dalam proses mitofagi. Pengaktifan fotosensitizer yang menyasarkan mitokondria melalui pendedahan kepada cahaya dapat menyebabkan kerosakan mitokondria akibat ROS secara selektif, dan seterusnya mengakibatkan mitofagi dalam kedua-dua tuisan sel (*cell line*) dan neuron dalam model tikus (Ashrafi et al. 2014; Wang et al. 2012). Kajian *in vitro* telah melaporkan bahawa tekanan oksidatif sederhana dan sementara boleh

berfungsi sebagai pencetus untuk mitofagi (Frank et al. 2012). Sebagai sumber utama ROS sel dan titik fokus kepada mitofagi, yang mengakibatkan beberapa tapak jalan pengisyaratan yang menghubungkan ROS dan mitofagi (Qu et al. 2020; Xiao et al. 2017a). Secara umum, tahap ROS yang terlalu tinggi biasanya membawa kepada permulaan autofagi umum berbanding mitofagi (Frank et al. 2012). Di sebalik itu, ROS boleh mengaktifkan laluan pengisyaratan tertentu dan terlibat dalam pengisyaratan redoks yang mencetuskan mitofagi apabila ROS mencapai pada tahap sederhana (Frank et al. 2012; Zhang et al. 2021). Walau bagaimanapun, mitofagi dikaitkan dengan kesan perlindungan neuron terhadap perkembangan penyakit (Gao et al. 2012; Koentjoro et al. 2017). Meskipun ROS berfungsi sebagai molekul pengisyaratan yang penting dan mitofagi mempunyai kesan perlindungan neuron, tetapi nyahpengawalaturan fluks mitofagi yang berpanjangan dan tahap ROS yang berlebihan boleh memberi kesan buruk kepada kesihatan neuron, terutamanya dalam konteks penyakit seperti PD (Hsieh et al. 2016; Shaltouki et al. 2018). Oleh itu, pengenalanpastian tapak jalan pengisyaratan antara ROS dan mitofagi adalah penting untuk lebih memahami peranan mereka dalam patogenesis PD (Rajah 2.8).



Rajah 2.8 Laluan pengisyaratan antara ROS dan mitofagi (Xiao et al. 2022)

### i. NF- $\kappa$ B

Faktor nukleus-kappaB (*nuclear factor-kappaB*, NF- $\kappa$ B) mewakili keluarga yang mempunyai lima faktor transkripsi, termasuk NF- $\kappa$ B1 (p50/p105), NF- $\kappa$ B2 (p100/p52), RelA (p65), RelB dan c-Rel (Oeckinghaus & Ghosh 2009). NF- $\kappa$ B memainkan peranan penting dalam keradangan, dengan faktor-faktor transkripsinya berpindah dengan pantas ke nukleus selepas pengaktifan melalui laluan berkanun (*canonical pathway*) atau bukan berkanun (*non-canonical pathway*), seterusnya mengantara transkripsi gen yang disasarkan dengan mengikat kepada penggalak  $\kappa$ B ( *$\kappa$ B enhancer*) (Morgan & Liu 2011; Sun et al. 2013). Terdapat banyak kajian yang menunjukkan bahawa ROS, khususnya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bertindak pada hulu pengawal atur keseimbangan redoks ini yang seterusnya mengakibatkan rembesan perencat NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) melalui pengoksidaan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang membawa kepada pengaktifan NF- $\kappa$ B (Sies et al. 2017). Zhong et al. (2016) melaporkan bahawa NF- $\kappa$ B boleh merangsang mitofagi dengan mendorong ekspresi p62 untuk mengurangkan kerosakan mitokondria yang dicetuskan oleh pengaktif NLRP3-inflamasom (*NLRP3-inflammasome activator*). Tambahan pula, perencatan mitofagi melalui ablasi p62 atau laluan 'NF- $\kappa$ B-p62-mitofagi' yang dikompromi secara patologi memburukkan lagi kematian makrofaj. Kajian ini juga mencadangkan bahawa NF- $\kappa$ B dapat mempengaruhi mitofagi berantaraan Parkin secara langsung melalui laluan anti-keradangan ini (Zhong et al. 2016). Selain itu, Duan et al. (2014) telah mengenal pasti beberapa tapak pengikat NF- $\kappa$ B dalam promoter PINK1 dan menunjukkan bahawa ekspresi berlebihan NF- $\kappa$ B atau pemberian pengaktif NF- $\kappa$ B dapat meningkatkan PINK1 pada tahap transkripsi. TRAF6 merupakan ligase E3 yang bertindak sebagai transduser dalam laluan NF- $\kappa$ B, dan pengaktifan NF- $\kappa$ B ini boleh mengaktifkan bentuk sitosolik PINK1 untuk mempromosikan mitofagi bukan selektif melalui penstabilan dalam peningkatan ubiquitinasi berkaitan Lys-63 (Lim et al. 2015). Di samping itu, NF- $\kappa$ B boleh mempromosikan translokasi RIPK1 ke mitokondria, di mana membentuk kompleks dengan PINK1 dan ahli keluarga mutase phosphoglycerate 5 (*phosphoglycerate mutase family member 5*, PGAM5). Kompleks ini dapat menstabilkan dan mengaktifkan PINK1, yang akhirnya mendorong mitofagi (Hawk et al. 2018).

## ii. P38 MAPK

p38 MAPK ialah ahli keluarga protein kinase diaktifkan mitogen (*mitogen-activated protein kinases*, MAPKs) dan bertindak balas kepada pelbagai rangsangan tekanan, termasuk sitokin keradangan dan tekanan oksidatif (Cuadrado & Nebreda 2010). Semasa pengaktifan dalam laluan berkanun, tekanan oksidatif mendorong pengisyaratan ROS, yang membawa kepada pengoksidaan protein antioksidan Trx. Pengoksidaan ini mengakibatkan pemisahan Trx daripada komponen kritikal ASK-1 (*critical component ASK-1*) untuk membolehkan pendimeran (*dimerization*) dan autofosforilasi (*autophosphorylation*) ASK-1, yang seterusnya mengaktifkan laluan p38 (Cuadrado & Nebreda 2010). Antara empat isoform p38, MAPK14 dan laluan pengisyaratan huluannya (*upstream signaling pathways*) telah dikenal pasti diperlukan dalam sel mamalia untuk kedua-dua mitofagi aruhan kebuluran nutrien dan hipoksia (Hirota et al. 2015). Di samping itu, Qu et al. (2020) melaporkan bahawa perencatan MAPK/p38 menjejaskan pengagihan semula Parkin dalam mitofagi bersandar Parkin/PINK1, di samping ROS juga dikenal pasti sebagai pengantara kritikal di hulu laluan mitofagi ini. Dalam hal ini juga, Xiao et al. (2017a) melaporkan bahawa perencatan laluan pengisyaratan p38 menghentikan perkembangan mitofagi yang didorong oleh ROS, walaupun selepas Parkin dilokasikan semula ke mitokondria. Pemerhatian ini selanjutnya menyokong hipotesis bahawa MAPK berpotensi untuk meningkatkan mitofagi berantaraan ROS secara signifikan (Qu et al. 2020).

## iii. mTOR

Sasaran mamalia rapamycin (*mammalian target of rapamycin*, mTOR) ialah protein kinase serina/treonina yang merencat autofagi melalui interaksi yang kompleks. Disfungsi mTOR boleh mengakibatkan apoptosis neuron DA dalam model haiwan PD (Zhou et al. 2016). ROS boleh mengawal atur autofagi/mitofagi melalui laluan pengisyaratan PI3K/AKT/mTOR (Ding et al. 2017; Kim et al. 2018). Penglibatan MTORC1 dalam penyingkiran mitokondria melalui autofagi, di mana TSC/MTORC1 dikenal pasti sebagai pengawal atur penting untuk induksi mitofagi hiliran (*downstream mitophagy induction*) (Ebrahimi-Fakhari et al. 2017).

#### iv. Laluan berkaitan Nrf2

Faktor 2 berkaitan faktor nuklear eritroid 2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, Nrf2) beroperasi sebagai faktor transkripsi terkawal redoks dan berfungsi sebagai unsur teras (*core element*) dalam laluan berkaitan unsur gerak balas antioksidan-Nrf2 (*Antioxidant Response Element*, ARE). Pengawalaturannya boleh berlaku sama ada melalui mekanisme protein 1 berkaitan ECH bak Kelch (*Kelch-like ECH-associated protein 1*, Keap1) bersandar atau Keap1 tidak bersandar (Fao et al. 2019). Laluan ini dicetuskan untuk bertindak balas kepada tekanan oksidatif yang terlibat dalam nyahpengawalaturan penuaan dan penyakit neurodegeneratif, termasuk PD (Fao et al. 2019). Oleh itu, pengaktifan laluan Nrf2 secara sistemik dalam PD dapat diperhatikan untuk mengatasi tekanan oksidatif. Tekanan oksidatif boleh menjejaskan keupayaan Keap1 dalam ubiquitinasi Nrf2 dengan mengubah suai sisa sisteinil utama, mengakibatkan translokasi Nrf2 ke nukleus. Nrf2 yang terkumpul ini kemudiannya mengaktifkan enzim antioksidan yang berfungsi sebagai pengawal atur yang penting untuk bertindak balas terhadap tekanan oksidatif (Sies et al. 2017). Seterusnya, Nrf2 yang dirangsang oleh tekanan oksidatif ini akan mengikat kepada ARE yang terletak di promoter p62. Reaksi ini dapat mencetuskan kitaran maklum balas positif (*positive feedback cycle*) dengan p62 berperanan untuk mengaktifkan Nrf2 dan memacu transkripsinya sendiri (Jain et al. 2010). Namun begitu, pengaruh mitofagi berpengantara p62 (*p62-mediated mitophagy inducer*, PMI) berpotensi untuk mendorong mitofagi berpengantara Parkin/PINK1 melalui gangguan terhadap interaksi Nrf2-Keap1 (East et al. 2014). Sebaliknya, Yamada et al. (2018) mencadangkan bahawa p62 merekrut dua subunit cullin-RING ubiquitin (Keap1 dan Rbx1) dahulu kepada mitokondria untuk mempromosikan degradasi mitokondria berpengantara ubiquitin melalui pengaktifan Nrf2, diikuti dengan mitofagi yang tidak melibatkan Parkin.

#### v. SIRT

Sirtuin (SIRT) terutamanya bertindak sebagai deasetilase bersandar NAD<sup>+</sup> terhadap pelbagai jenis protein sasaran yang penting dalam pelbagai proses biologi. Mamalia mempunyai tujuh protein SIRT, dinamakan sebagai SIRT1 sehingga SIRT7, yang menunjukkan penyetempatan subsel (*subcellular localization*) yang berbeza dan fungsi yang tertentu masing-masing. Kesemua tujuh SIRT mamalia ini mengawal atur

pelbagai proses fisiologi dari segi metabolisme kepada pengubahsuaian epigenetik dalam banyak tisu (Chang & Guarente 2014; Finkel et al. 2009; Imai & Guarente 2016; Van De Ven et al. 2017). SIRT1 dan SIRT2 dapat ditemui dalam kedua-dua nukleus dan sitoplasma. Manakala SIRT1, SIRT6, dan SIRT7 kebanyakannya ditempatkan dalam nukleus, di mana fungsi utamanya melibatkan deasetilasi histon dan seterusnya mempengaruhi ekspresi gen secara epigenetik (Guarente 2013). SIRT2 boleh bertindak sebagai protein nukleus dan mengawal atur kitaran sel, walaupun SIRT2 terutamanya ditempatkan dalam sitoplasma (Chang & Guarente 2014; Dryden et al. 2003; Serrano et al. 2013). Selain itu, SIRT3, SIRT4, dan SIRT5 ditempatkan secara eksklusif dalam mitokondria dan mengawal atur metabolisme tenaga untuk bertindak balas kepada tekanan mitokondria (Choi & Mostoslavsky 2014; Van De Ven et al. 2017; Yang et al. 2016).

Perkaitan SIRT dalam konteks PD merangkumi pelbagai SIRT yang ditunjukkan dapat mengakibatkan mitofagi dalam model PD, bersama dengan nyahpengawalan ekspresi yang diperhatikan dalam sampel daripada pesakit PD. Sebagai contoh, penurunan SIRT3 didapati dalam fibroblas pesakit PD, dan SIRT5 didapati terkumpul dalam sel fibroblas PD idiopatik (Yakhine-Diop et al. 2019). Sepanjang pengetahuan kami, hubungan antara SIRT1-7 dan ROS agak kompleks dan kontroversi, dengan bukti semasa menunjukkan bahawa SIRT4 dapat meningkatkan atau menindas ROS secara bersyarat; SIRT1, SIRT3, dan SIRT5 meningkatkan perlindungan terhadap ROS; dan SIRT2, SIRT6, dan SIRT7 berperanan dalam modulasi gen dan mekanisme tekanan oksidatif (Singh et al. 2018). SIRT1 mempengaruhi translokasi Parkin ke mitokondria akibat daripada perubahan dalam nisbah  $NAD^+/NADH$ , seperti yang diperhatikan dalam kajian yang menyiasat kesan SIRT1 terhadap mitofagi (Di Sante et al. 2015). Selain itu, mitofagi berantarkan SIRT2, dikawal atur melalui ATG32 telah dikenal pasti penting dalam ketoksikan  $\alpha$ -sinuklein dalam sampel yis yang dapat dijelaskan dalam konteks PD akibat daripada interaksi ROS-mitofagi ini (Sampaio-Marques et al. 2012). Manakala SIRT3 berperanan untuk menindas ROS melalui modulasi beberapa enzim penting untuk mendorong mitofagi berantarkan Parkin/PINK1 melalui keupayaan SIRT3 untuk berinteraksi dan deasetilasi kedua-dua PINK1 dan Parkin secara langsung atau tidak langsung melalui FOXO3a (Zhou & Tan 2020). Namun begitu, Li et al. (2018) melaporkan bahawa kesan

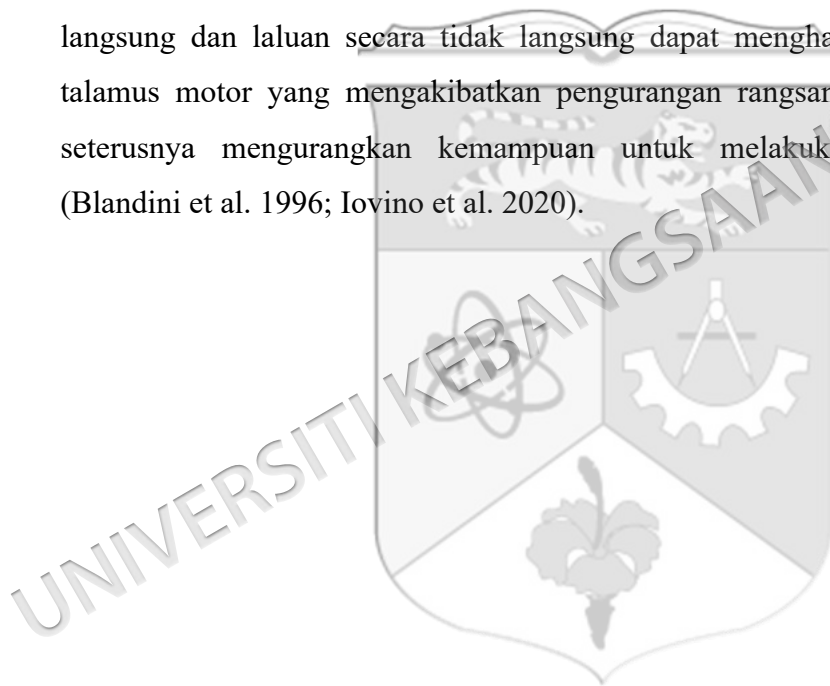
SIRT3 yang mendorong mitofagi akibat daripada peningkatan ekspresi BNIP3. Aktiviti memodulasi mitofagi ini selanjutnya dikaitkan dengan laluan pengisyratan ERK-CREB (Li et al. 2018).

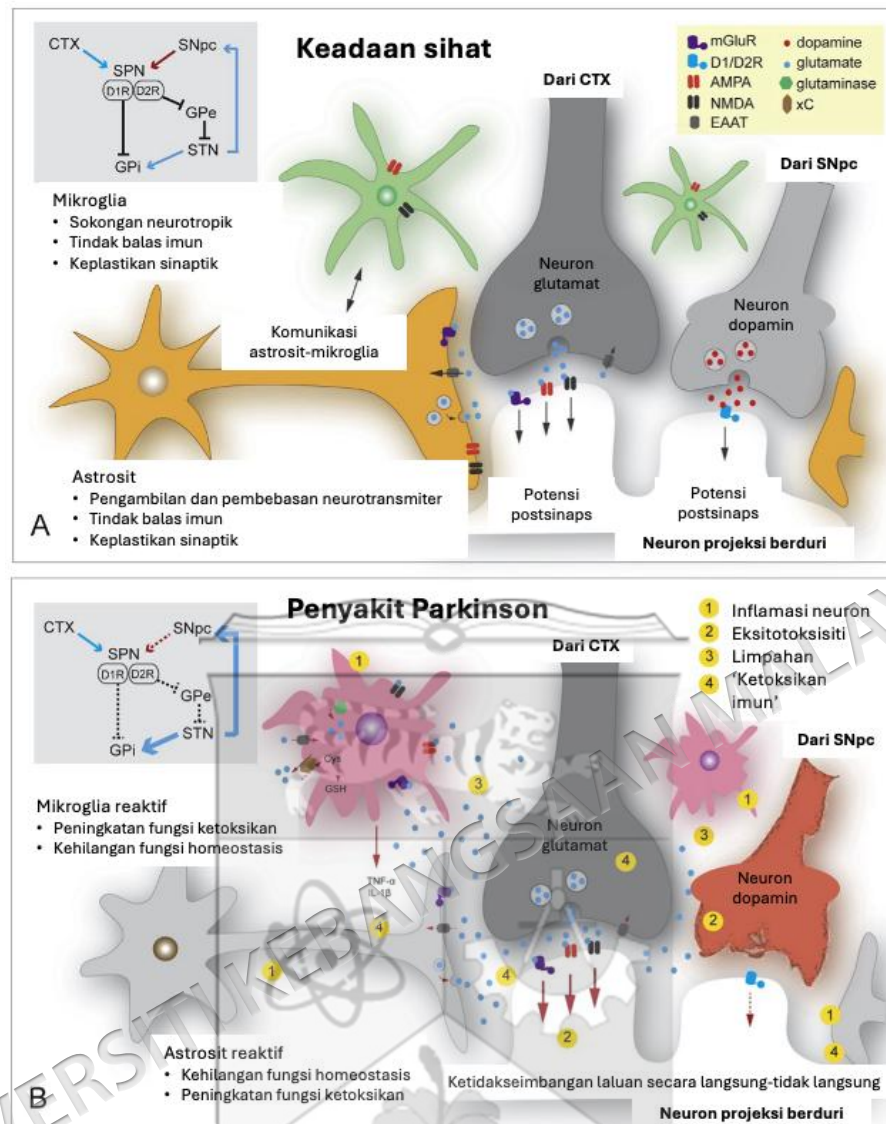
**e. Eksitotoksikiti**

PD biasanya dimanifestasikan sebagai keadaan sporadik, tetapi penemuan terkini mengesahkan bahawa sebahagian besar risiko PD berkaitan dengan variasi genetik yang mencetuskan perkembangan penyakit ini (Billingsley et al. 2018). Bentuk PD varian kekeluargaan telah dikaitkan dengan mutasi jarang jumpa dengan ketembusan tinggi (*highly-penetrant rare mutations*) dalam gen seperti *SNCA*, *LRRK2*, *VPS35*, *PRKN*, *PINK1*, dan *DJ-1* (Hernandez et al. 2016). Walaupun PD selalu dikaitkan dengan kekurangan DA di otak, perubahan dalam neurotransmisi glutamat merupakan salah satu faktor dalam patogenesis PD (Blandini et al. 1996; Pagonabarraga et al. 2021). Neurotransmisi glutamat dimulakan dengan pembebasan glutamat ke dalam lekah sinaps melalui influks kalsium sinaps, yang menyebabkan peningkatan tahap glutamat sinaps secara mendadak (~1,000 kali ganda). Selepas itu, pengikatan glutamat pada reseptor terminal postsinaps merangsang influks ion  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Ca}^{2+}$ , yang menyumbang kepada aktiviti depolarisasi dan tindakan potensi (*action potential*) (Danbolt 2001).

Dalam keadaan fisiologi normal, pengawalaturan neuron (*neuro-regulatory*) yang berkesan adalah mandatori bagi mengekalkan homeostasis sinaptik dan mencegah ketoksikan. Mekanisme ini bergantung sepenuhnya kepada kitaran glutamat-glutamina yang melibatkan kerjasama antara neuron dan sel glia, terutamanya astrosit (Niciu et al. 2012). Glutamat disingkirkan dari lekah sinaps oleh astrosit peri-sinaps melalui pengangkut asid amino ujaan (*excitatory amino acid transporters*, EAATs) untuk ditukar kepada glutamina oleh enzim glutamina sintetase (Danbolt 2001; Mei et al. 2018). Glutamina yang tidak aktif ini kemudiannya diangkut semula ke dalam neuron, di mana enzim glutaminase menukarkannya kembali kepada glutamat untuk dibungkus ke dalam vesikel sinaps (Walton & Dodd 2007). Kitaran ini berfungsi sebagai mekanisme perlindungan bagi mengelakkan rangsangan reseptor glutamat secara berlebihan.

Kepentingan glutamat dalam litar fronto-basal adalah untuk mengawal pergerakan voluntari (Rajah 2.9A). Litar striatum menerima input DA dari SNpc dan input glutamat dari korteks serebrum (*cerebral cortex*, CTX) serta talamus (Blandini et al. 1996; Kreitzer 2009). Penurunan neuron DA secara progresif dalam PD menjejaskan keseimbangan antara laluan secara langsung dan laluan secara tidak langsung. Kekurangan rangsangan pada reseptor DA D1 (D1R) menjejaskan laluan secara langsung, manakala kekurangan rangsangan pada reseptor DA D2 (D2R) dalam laluan secara tidak langsung mengakibatkan penyahrencatan pada nukleus subthalmus (*subthalamic nucleus*, STN) (Du & Graves 2019). Keadaan ini membawa kepada rangsangan glutamat yang berlebihan pada pengisyaratan output (Rajah 2.9B) (Blandini et al. 1996; Iovino et al. 2020). Dengan ini, ketidakseimbangan antara laluan secara langsung dan laluan secara tidak langsung dapat menghalang pengaktifan nukleus talamus motor yang mengakibatkan pengurangan rangsangan korteks motor, yang seterusnya mengurangkan kemampuan untuk melakukan pergerakan voluntari (Blandini et al. 1996; Iovino et al. 2020).





Rajah 2.9 Litar fronto-basal terlibat dalam modulasi pergerakan voluntari dan kesalinghubungan terjejas yang disebabkan oleh degenerasi DA dalam PD (kotak kelabu) (Iovino et al. 2020).  
(A) Pengawalaturan glutamat dalam striatum dan penglibatan astrofit dan sel mikroglia diperincikan dalam keadaan sihat.  
(B) Impak kehilangan atau keuntungan fungsi astrofit dan mikroglia dalam pengambilan glutamat, limpahan dan keradangan yang memburukkan lagi neurodegenerasi.

Pengaktifan reseptor glutamat secara berlebihan ini mencetuskan lita eksitotoksikiti (Bergman et al. 1994), yang dicirikan oleh kematian sel akibat tindakan toksik asid amino ujaan (*excitatory amino acid*). Namun begitu, terdapat beberapa kajian juga telah menunjukkan bahawa eksitotoksikiti glutamat boleh menyebabkan degenerasi neuron DA bersamaan dengan disfungsi motor dalam PD (Meredith et al. 2009). Memandangkan glutamat berfungsi sebagai neurotransmitter ujaan utama dalam

CNS mamalia, eksitotoksikiti neuron biasanya merujuk kepada kecederaan dan kematian neuron akibat daripada pendedahan yang berpanjangan kepada glutamat dan influks ion yang berlebihan ke dalam sel yang seterusnya membawa kepada peningkatan tahap kalsium, di mana mencetuskan neurotoksik dan pengaktifan enzim yang mendegradasi protein, membran dan asid nukleik (Berliocchi et al. 2005). Dalam keadaan patologi PD, pengawalan neuron mengalami kegagalan apabila mikroglia teraktif dan astrosit reaktif menyebabkan pelepasan glutamat secara besar-besaran ke dalam lekah sinaps (Lin et al. 2012; Takeuchi et al. 2006; Wetherington et al. 2008). Oleh itu, tahap glutamat ekstrasel yang tinggi boleh mengakibatkan pengaktifan reseptor *N-methyl-D-aspartic acid*, NMDA secara berlebihan dan influks  $\text{Ca}^{2+}$  intrasel yang tinggi. Tahap  $\text{Ca}^{2+}$  intrasel yang tinggi mencetuskan siri enzim bersandar kalsium dan perubahan patofisiologi yang mendegradasi protein, membran, dan asid nukleik, yang akhirnya menyebabkan kerosakan neuron dan kematian sel secara langsung (Dutta & Trapp 2011; Wang et al. 2020). Selain itu, ketelapan reseptor  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*, AMPA adalah lebih lemah kepada  $\text{Ca}^{2+}$  eksternal. Reseptor AMPA adalah salah satu jenis utama saluran ion bergerak balas glutamat (*glutamate-responsive ion channels*). Pengikatan reseptor AMPA dengan glutamat menyebabkan saluran pagar terbuka untuk membolehkan efluks ion  $\text{K}^+$  dan influks ion  $\text{Na}^+$  mengalir ke dalam neuron postsinaps. Di samping itu, pengaktifan reseptor AMPA juga dapat meningkatkan influks ion  $\text{Zn}^{2+}$  ekstrasel ke dalam neuron DA, yang memburukkan lagi gangguan pergerakan (Tamano et al. 2018).

Kegagalan mekanisme pengawalan neuron ini memberikan implikasi klinikal yang luas terhadap PD. Terdapat beberapa kajian klinikal menunjukkan bahawa peningkatan neurotransmisi glutamat akibat daripada perubahan dalam kandungan glutamat otak pesakit PD melalui ujian pengimejan resonans magnet (*magnetic resonance imaging*, MRI), tomografi pancaran positron (*positron emission tomography*, PET), dan tomografi berkomputer pancaran foton tunggal (*single-photon emission computed tomography*, SPECT) (Gröger et al. 2014; O'gorman Tuura et al. 2018; Weingarten et al. 2015). Di samping itu, Figura et al. (2018) dan Iwasaki et al. (1992) mendapati bahawa peningkatan tahap glutamat dalam plasma pesakit PD berbanding dengan kawalan, selanjutnya mencerminkan peningkatan dalam aktiviti glutamat serebrum. Perubahan dalam neurotransmisi glutamat ini menyumbang kepada

patofisiologi diskinesia, koordinasi motor terjejas dan turun naik motor (*motor fluctuations*) (Carrillo-Mora et al. 2013; Cenci 2014; Chase et al. 2000; Kucheryanu & Kryzhanovskii 2000; Nandhu et al. 2011; Sgambato-Faure & Cenci 2012). Oleh yang demikian, pengawalan neuron dalam PD dapat menimbulkan implikasi secara langsung terhadap manifestasi klinikalnya. Disfungsi motor dalam patologi neurodegeneratif ini berpunca daripada disregulasi sistem neurotransmitter dalam CNS. Secara khusus, pengurangan input DA dalam ganglia basal mencetuskan hiperaktiviti laluan glutamatergik yang seterusnya membawa kepada eksitotoksiti. Ketidakseimbangan ini mengganggu homeostasis pemprosesan dalam gelung motor (*motor loops*), yang menghasilkan fenotip motor seperti pergerakan badan yang perlahan, kaku pada anggota badan, ketidakstabilan postur dan gegaran rehat (Gautam et al. 2023; Jin et al. 2024). Selain itu, gangguan neurotransmisi glutamat dalam korteks dan sistem limbik turut dikaitkan dengan gejala bukan pergerakan, termasuk kemurungan dan kemerosotan kognitif (Zhang et al. 2016). Tambahan pula, gangguan pengawalan neuron ini menyumbang kepada komplikasi terapi jangka panjang seperti diskinesia yang dirawat dengan levodopa akibat daripada keplastikan sinaptik maladaptif pada reseptor NMDA dan AMPA yang hipersensitif (Di Biase et al. 2023). Oleh itu, disregulasi sistem pengawalan neuron mempercepat proses neurodegenerasi melalui laluan eksitotoksiti yang memperluas spektrum manifestasi klinikal PD.

**f. Jangkitan protein seperti prion**

Terdapat banyak kajian penyelidikan baru-baru ini muncul menyerlahkan bahawa banyak penyakit neurodegeneratif berkongsi persamaan “jangkitan protein seperti prion” dengan perkembangan penyakit prion.  $\alpha$ -sinuklein ialah agen patogen biasa untuk PD dan mempamerkan sifat pengagregatan dan perambatan diri, serupa dengan penyakit prion (Ma et al. 2019b) dengan manifestasi  $\alpha$ -sinuklein terkumpul dalam neuron dan merambat dari satu sel ke sel yang lain dengan cara seperti prion (Vargas et al. 2019). Walaupun pengagregatan  $\alpha$ -sinuklein dalam substantia nigra adalah penemuan patologi utama dalam PD, tetapi  $\alpha$ -sinuklein juga dapat dijumpai dalam pelbagai bahagian badan yang lain. Kepekatan  $\alpha$ -sinuklein yang tinggi dapat dikesan dalam terminal prasinaps, di mana berkait rapat dengan membran vesikel. Kebanyakan kajian menunjukkan bahawa fungsi fisiologi normal  $\alpha$ -sinuklein seperti interaksi dengan fosfolipid membran

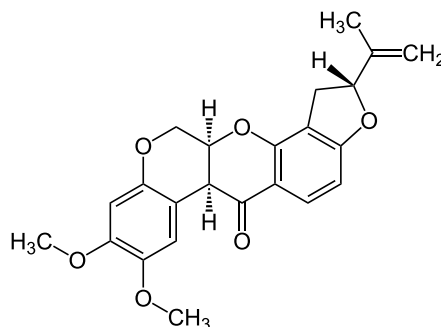
sel secara langsung (terutamanya merujuk kepada vesikel), pelepasan neurotransmitter, dan peningkatan pembentukan mikrotubul (Burré et al. 2018; Hasegawa et al. 2016; Recasens & Dehay 2014). Dengan ini, kajian yang dilakukan oleh Cali et al. (2012), telah menggunakan prob aequorin yang menyasarkan organel yang sensitif kepada  $Ca^{2+}$ , menunjukkan bahawa tahap fisiologi  $\alpha$ -sinuklein diperlukan untuk mengekalkan fungsi mitokondria secara normal dan kesempurnaan morfologinya. Sebaliknya dalam keadaan patologi,  $\alpha$ -sinuklein mengalami salah lipatan dan pengagregatan, yang seterusnya membentuk spesies oligomer dan fibril tidak boleh larut, yang menyumbang kepada disfungsi dan kematian neuron (Casella et al. 2021). Selain itu, ekspresi  $\alpha$ -sinuklein yang berlebihan dan/atau perubahan dalam sifat pengagregatannya dapat mendorong pengagihan semula  $\alpha$ -sinuklein dan kehilangan modulasi pada fungsi mitokondria (Cali et al. 2012). Di samping itu, pengumpulan  $\alpha$ -sinuklein juga boleh menjejaskan pelepasan dopamin sinaptik dan menyebabkan kematian neuron nigrostriatal (Longhena et al. 2017).

Hipotesis Braak menunjukkan bahawa  $\alpha$ -sinuklein pada mulanya terbentuk di kawasan periferi dan kemudiannya merebak ke CNS, yang akhirnya membawa kepada perkembangan PD (Li et al. 2021c; Montalbán-Rodríguez et al. 2024; Zhu et al. 2022). Dengan ini, salur gastrousus (*gastrointestinal*, GI) dianggap sebagai sistem periferi yang menyokong hipotesis Braak, kerana terdapat komunikasi malar antara CNS dan salur GI dalam badan melalui paksi otak-usus (*brain-gut axis*) (Mulak & Bonaz 2015). Oleh itu, Van Den Berge et al. (2019) telah mengenal pasti penyebaran  $\alpha$ -sinuklein secara dua hala dari duodenum ke batang otak dan seterusnya ke perut selepas suntikan  $\alpha$ -sinuklein pada tikus. Di samping itu, Kim et al. (2019) juga menyokong kesahihan teori Braak dengan menggunakan model mencit di mana fibril  $\alpha$ -sinuklein patologi disuntik ke dalam lapisan otot duodenum dan pilorus, yang seterusnya menunjukkan penyebaran fibril ke pelbagai kawasan otak yang berbeza. Tambahan pula, terdapat banyak kajian secara *in vitro* dan *in vivo* juga menunjukkan bahawa  $\alpha$ -sinuklein yang tidak normal boleh merebak ke kawasan otak jiran dan menimbulkan pengagregatan  $\alpha$ -sinuklein endogen di kawasan tersebut sebagai benih, yang bertindak sebagai protein "seperti prion" (*prion-like protein*), dan akhirnya menyebabkan degenerasi neuron dalam substantia nigra dan striatum (Ma et al. 2019a).

Berdasarkan perubahan patologi yang melibatkan pengagregatan  $\alpha$ -sinuklein dan degenerasi neuron seperti yang telah dibincangkan, pelbagai pendekatan eksperimen telah dibangunkan bagi memperincikan mekanisme asas PD. Dengan ini, penggunaan model *in vitro* dan *in vivo* berasaskan agen neurotoksik telah digunakan secara meluas untuk memanifestasikan ciri-ciri utama patofisiologi PD ini (Amaral et al. 2025). Pendekatan ini membolehkan penilaian yang lebih sistematik terhadap perubahan pada peringkat molekul dan sel, di samping memberikan pemahaman yang lebih mendalam mengenai faktor-faktor yang menyumbang kepada perkembangan PD. Walau bagaimanapun, kesahihan model neurotoksik ini dalam mencerminkan keseluruhan spektrum patologi PD masih menjadi perbincangan dalam karya ilmiah. Antara agen neurotoksik yang sering digunakan dalam perkembangan PD ialah rotenone, yang dilaporkan berupaya menyebabkan disfungsi mitokondria melalui perencatan kompleks I ETC, seterusnya mencetuskan tekanan oksidatif, dan pengagregatan  $\alpha$ -sinuklein yang menyerupai ciri neuropatologi utama yang diperhatikan dalam PD (Ibarra-Gutiérrez et al. 2023).

## 2.2 ROTENONE

Rotenone ialah alkaloid (rotenoid) semula jadi yang dapat diekstrak daripada akar, daun, biji dan kulit pokok tumbuhan tropika tertentu, seperti spesies *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia*, dan *Mundulea* (Gupta et al. 2019). Rotenone mempunyai formula molekul  $C_{23}H_{22}O_6$  dan berat molekul 394.42 (Gupta et al. 2019). Struktur kimianya ditunjukkan dalam Rajah 2.10. Rotenone mempunyai sifat sitotoksik dan digunakan sebagai racun ikan, serangga dan perosak organik dalam pertanian selama bertahun-tahun (Horst et al. 2018; Li et al. 2022a). Dengan ini, terdapat banyak kajian telah melaporkan hubungan yang rapat antara pendedahan terhadap rotenone dalam tempoh berpanjangan kepada manusia dan perkembangan PD sejak beberapa dekad yang lalu (Pearson et al. 2016; Radad et al. 2019).



Rajah 2.10 Struktur kimia rotenone

### 2.2.1 Perkaitan Rotenone dengan PD

Johnson dan Bobrovskaya (2015) telah membuktikan bahawa pendedahan terhadap rotenone telah dikaitkan dengan peningkatan risiko PD (Johnson & Bobrovskaya 2015). Pendedahan terhadap rotenone melalui oral, dermis dan pernafasan adalah merbahaya kepada kesihatan manusia. Rotenone berpotensi sederhana toksik kepada manusia, dengan dos maut oral dianggarkan dari 300 hingga 500 mg/kg (Lazo et al. 2014). Selain itu, toksisiti rotenone dapat memudaratkan kesihatan manusia dengan lebih teruk apabila dihidu dan telah dilaporkan menyebabkan dermatitis, ulser di hidung, dan iritasi membran mukus. Pendedahan terhadap rotenone pada tikus secara kronik boleh mengakibatkan pelambatan pertumbuhan (*growth retardation*) dan muntah serta boleh menyebabkan perubahan dalam hati, di mana rotenone dimetabolismekan (Lazo et al. 2014). Kajian yang melibatkan pendedahan terhadap rotenone pada rodent juga telah selanjutnya menunjukkan bahawa pendedahan rotenone boleh memanifestasikan ciri-ciri patologi kritikal dan neuro-kelakuan (*neurobehavioral*) PD, seperti neurodegenerasi neuron DA dalam laluan nigrostriatal, pembentukan badan Lewy, dan defisit motor (Sun et al. 2024; Ujvári et al. 2022; Van Laar et al. 2023).

Rotenone adalah salah satu neurotoksin utama yang terutamanya merosakkan fosforilasi oksidatif dengan merencat kompleks I mitokondria dengan mengurangkan sintesis ATP, mengakibatkan kematian neuron DA dan meningkatkan pembentukan badan Lewy (Schuler & Casida 2001; Thirugnanam & Santhakumar 2022). Rotenone mengikat kompleks I secara khusus dengan afiniti 10 – 20 nM (Higgins Jr & Greenamyre 1996), yang seterusnya mengurangkan aliran elektron kepada ubiquinone dan menyebabkan kebocoran elektron pada tapak kompleks I (Feng 2006). Keadaan ini

mengakibatkan banyak elektron yang bebas tersedia untuk bertindak balas dengan molekul oksigen bagi menghasilkan ion oxide,  $O^{2-}$ . Penjanaan  $O^{2-}$  dan ROS selanjutnya boleh merosakkan kompleks I, serta kompleks lain dalam ETC, terutamanya yang mengandungi kluster besi-sulfur (García-García et al. 2005). Di samping itu, ROS juga boleh merosakkan protein lain dalam mitokondria, serta makromolekul lain (Sanders & Greenamyre 2013). Oleh itu, penurunan aktiviti kompleks I mitokondria dapat diperhatikan dalam otak pesakit PD (Borsche et al. 2021).

Rotenone yang bersifat lipofilik membolehkan rotenone bebas melintasi BBB yang kemudiannya menyebabkan pembentukan fibril  $\alpha$ -sinuklein (Bisbal & Sanchez 2019; Inden et al. 2011). Dengan ini, rotenone merupakan toksin yang biasa digunakan untuk mengembangkan model PD dengan merencat kompleks I ETC dan menyebabkan degenerasi neuron melalui pelbagai mekanisme patofisiologi, termasuk tekanan oksidatif, pengaktifan mikroglia, pembentukan ubiquitin serta inklusi badan Lewy intrasel dalam pelbagai kawasan otak (Abdul Wahid & Ahmad Khan 2010; Ahn et al. 2021; Askar et al. 2019; Jiang et al. 2019; Khotimah et al. 2015; Tapias et al. 2019). Oleh itu, model PD ini mampu memanifestasikan ciri klinikal PD dengan laluan DA nigrostriatal terjejas yang diakibatkan oleh perencatan kompleks-I secara sistemik (Alam & Schmidt 2002; Betarbet et al. 2000; Bisbal & Sanchez 2019; Degli Esposti et al. 1983).

### **2.2.2 Penggunaan Rotenone dalam Model PD**

Model haiwan memainkan peranan yang amat penting dalam eksperimen untuk menjelaskan mekanisme fisiologi dan patologi, serta dapat memanifestasikan patogenesis penyakit. Selain itu, ianya dapat menjadi alat penyaring dalam mencari strategi terapeutik novel untuk mendiagnos dan merawat penyakit PD pada manusia (Bové et al. 2005). Oleh itu, penggunaan model PD dalam eksperimen yang memanifestasikan fenotip PD tertentu dapat diteroka agar terapi dan rawatan yang berpotensi dapat ditemui, dan seterusnya untuk memahami lebih lanjut mengenai perkembangan PD. Analisis kritikal mesti dilakukan terlebih dahulu sebelum memilih model haiwan untuk menentukan nilai penemuan berkenaan dengan penyakit manusia yang disasarkan (Doyle & Croll 2022). Salah satu aspek yang paling penting ialah model kajian tertentu mempunyai tahap keupayaan replikat yang tinggi (Caramillo &

Echevarria 2017). Hal ini penting kerana terdapat kajian meta-analisis menunjukkan gen ekspresi model mencit transgenik Penyakit Alzheimer mendapati bahawa kebanyakan model mencit tersebut tidak serupa dengan model Penyakit Alzheimer manusia. Oleh itu, hasil kajian ini menunjukkan keupayaan replikat yang rendah dalam model mencit dan penemuan ini mungkin dijangkakan akan relevan dengan model PD (Hargis & Blalock 2017). Sehubungan dengan itu, banyak terapi yang dibangunkan dengan penggunaan model haiwan tidak dapat diterjemahkan dengan baik secara langsung kepada ujian klinikal manusia atas pelbagai sebab seperti jenis perumah yang berbeza (Van Der Worp et al. 2010). Oleh itu, cabaran ini mesti ditangani apabila mengembangkan model haiwan untuk penyakit manusia.

Bagi mengkaji patogenesis PD, dua pendekatan utama yang biasa digunakan untuk model PD dalam spesies haiwan yang berbeza ialah neurotoksin dan genetik (Konnova & Swanberg 2018). Namun begitu, model neurotoksin ialah model haiwan yang paling biasa digunakan secara meluas dalam penyaringan dan pengesahsahihan (*validation*) terapi baru yang menyasarkan gejala motor PD. Oleh sebab pemilihan neurotoksin boleh dilakukan berdasarkan kesan neurotoksin yang membawa kepada fungsi tertentu atau pada populasi neuron tertentu. Oleh itu, neurotoksin boleh diberikan melalui suntikan stereotaktik (*stereotactic injection*) ke dalam kawasan otak tertentu secara berkesan untuk mengaji kesan yang mengakibatkan kehilangan populasi neuron tertentu (Bové & Perier 2012; Cannon & Greenamyre 2010). Dengan ini, neurotoksin boleh memodelkan degeneratif neuron DA yang dicetuskan oleh faktor persekitaran yang terlibat dalam PD. Pendedahan kepada neurotoksin biasanya boleh menyebabkan kehilangan sel dalam SNpc, menimbulkan gejala motor dan perubahan tingkah laku, tetapi terdapat berkemungkinan juga dalam pembentukan badan Lewy (Blesa & Przedborski 2014). Sebaliknya, model berasaskan genetik dapat memfokuskan kepada perubahan bentuk genetik dan menunjukkan kehilangan sel serta gejala motor, mahupun juga boleh memanifestasikan patologi  $\alpha$ -sinuklein bergantung pada model tertentu. Mutasi genetik atau perubahan dalam ekspresi gen boleh dilaksanakan dengan menggunakan haiwan transgenik atau melalui pentransjangkitan (*transfection*) daripada virus (Konnova & Swanberg 2018). Tambahan pula, model haiwan genetik bukan roden seperti zebrafish, drosophila dan *Caenorhabditis elegans* telah dibangunkan baru-baru ini akibat kemudahan modifikasi genetik, persamaan genetik dengan genom manusia

dan penyaringan ubat terapeutik yang pantas (Lal & Chopra 2024). Kajian-kajian yang membangunkan model PD dengan menggunakan rotenone dapat dirujukan dalam Jadual 2.3.

Jadual 2.3 Ringkasan perkembangan model PD dengan pemberian rotenone dan keupayaannya menghasilkan ciri-ciri patologi PD

Model	Cara Pemberian	Dos Rotenone	Tanda/gejala	Rujukan
Mencit	Suntikan intraperitoneal (21 hari)	1.5 mg/kg/hari	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓ aktiviti lokomotor</li> <li>▪ ↓ TH-positif neuron, ↑ <math>\alpha</math>-sinuklein, ↑ tekanan oksidatif</li> <li>▪ ↑ NLRP3, ↑ TNF-<math>\alpha</math>, ↑ IL-1<math>\beta</math>, ↑ IL-6</li> </ul>	Shah et al. (2024)
	Suntikan intraperitoneal (14 hari)	2.5 mg/kg/hari	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓ TH-positif neuron, ↑ <math>\alpha</math>-sinuklein, ↑ reaktiviti mikroglia</li> </ul>	Latham et al. (2024)
	Suntikan intraperitoneal (14 kali/28 hari)	2.5 mg/kg/hari	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓ sensorimotor, ↓ neuromuskular</li> <li>▪ ↓ TH-positif neuron, ↑ <math>\alpha</math>-sinuklein, ↑ tekanan oksidatif</li> <li>▪ ↑ TNF-<math>\alpha</math>, ↑ IL-6, ↑ COX-2</li> <li>▪ ↓ ketumpatan sel neuron striatum</li> </ul>	Adebayo et al. (2024)
Tikus	Suntikan stereotaktik ke dalam substantia nigra dan kawasan tegmental ventral (28 hari)	2.0 $\mu$ L setiap tempat	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓ aktiviti lokomotor</li> <li>▪ ↓ TH-positif neuron</li> </ul>	Yang et al. (2024a)
	Suntikan intraperitoneal (11 kali/21 hari)	1.5 mg/kg/hari	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓ aktiviti lokomotor</li> <li>▪ ↑ masa tak mobiliti</li> <li>▪ ↓ tahap dopamin striatum, ↓ kereaktifan imun TH dalam SN</li> <li>▪ ↓ p-AMPK, ↓ SIRT1, ↓ PGC1<math>\alpha</math></li> <li>▪ ↑ Bax, ↓ Bcl2</li> </ul>	Elesawy et al. (2024)
	Suntikan subkutaneus (28 hari)	2.0 mg/kg/hari	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓ jarak perjalanan, ↓ purata kelajuan, ↑ masa tak mobiliti, ↑ jumlah masa tidak aktif</li> <li>▪ ↑ <math>\alpha</math>-sinuklein, ↓ TH</li> <li>▪ ↓ tahap dopamin striatum, ↑ metabolit dopamin, ↑ kadar peralihan (<i>turnover</i>) dopamin</li> <li>▪ ↑ penanda inflamasi</li> </ul>	Salama et al. (2024)

			(IL-1 $\beta$ , iNOS, TNF $\alpha$ )	
			<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\uparrow</math> astrosit dalam striatum dan SNpc, sel neuron mengecut secara tidak teratur</li> </ul>	
<i>C. elegans</i>	Didedahkan kepada rotenone (48 jam)	1.0 $\mu$ M	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\uparrow</math> pembocoran proton (<i>proton leak</i>)</li> <li>▪ <math>\uparrow</math> tahap <i>isocitrate lyase</i>, <math>\uparrow</math> tahap subunit kompleks II (<i>succinate dehydrogenase subunit A</i> dan sitokrom b560)</li> <li>▪ <math>\uparrow</math> kitaran <i>glyoxylate</i>, <math>\uparrow</math> <i>glycolysis</i>, <math>\uparrow</math> pengoksidaan asid lemak</li> </ul>	Gonzalez-Hunt et al. (2021)
	Pendedahan secara kronik	2.0-4.0 $\mu$ M/hari	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\downarrow</math> DNA mitokondria</li> </ul>	Zhou et al. (2013)
<i>Drosophila</i>	Didedahkan kepada medium rotenone (7 hari)	250 $\mu$ M/hari	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\downarrow</math> keupayaan mendaki</li> <li>▪ <math>\downarrow</math> TH-positif neuron</li> <li>▪ <math>\uparrow</math> tekanan oksidatif, <math>\uparrow</math> apoptosis</li> </ul>	Li et al. (2023)
	Didedahkan kepada medium rotenone (7 hari)	250 $\mu$ M/hari	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\downarrow</math> keupayaan mendaki, <math>\downarrow</math> frekuensi melompat, <math>\downarrow</math> kadar kemandirian (<i>survival rate</i>)</li> <li>▪ <math>\downarrow</math> TH-positif neuron</li> <li>▪ <math>\downarrow</math> aktiviti kompleks I, <math>\downarrow</math> tahap ATP, <math>\uparrow</math> tekanan oksidatif</li> <li>▪ <math>\uparrow</math> aktiviti SOD, <math>\uparrow</math> aktiviti CAT</li> </ul>	Xue et al. (2020)
	Didedahkan kepada medium rotenone (7 hari)	500 $\mu$ M/hari	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\downarrow</math> keupayaan mendaki</li> <li>▪ <math>\uparrow</math> tekanan oksidatif</li> <li>▪ <math>\uparrow</math> SOD</li> </ul>	Siima et al. (2020)
Zebrafish	Didedahkan kepada air rotenone (21 hari)	2.5 $\mu$ g/L/hari	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\downarrow</math> aktiviti lokomotor</li> <li>▪ <math>\downarrow</math> SOD, <math>\downarrow</math> glutation, <math>\uparrow</math> tekanan oksidatif</li> </ul>	Babu et al. (2024)
	Didedahkan kepada air rotenone (28 hari)	3.0 $\mu$ g/L/hari	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\downarrow</math> frekuensi gerak silangan antara zon berbeza, <math>\downarrow</math> masa yang digunakan di kawasan zon atas</li> <li>▪ <math>\uparrow</math> penanda inflamasi (TNF<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, COX-2)</li> <li>▪ <math>\uparrow</math> tekanan oksidatif</li> <li>▪ <math>\downarrow</math> SOD, <math>\downarrow</math> CAT, <math>\downarrow</math> glutation</li> </ul>	Li et al. (2024a)
	Didedahkan kepada air rotenone (30 hari)	5.0 $\mu$ g/L/hari	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\downarrow</math> aktiviti lokomotor, <math>\downarrow</math> jarak perjalanan</li> <li>▪ <math>\uparrow</math> tekanan oksidatif, <math>\downarrow</math> SOD, <math>\uparrow</math> glutation S-transferase</li> <li>▪ <math>\downarrow</math> tahap dopamin</li> </ul>	Cansiz et al. (2023)

Didedahkan kepada air rotenone (28 hari)	2.0 $\mu\text{g/L/hari}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓ TH-positif neuron</li> <li>▪ ↓ aktiviti lokomotor</li> <li>▪ ↓ DJ-1, ↑ LRRK2</li> <li>▪ ↓ tahap dopamin</li> <li>▪ ↓ TH</li> </ul>	Wang et al. (2017)
--	--------------------------	---	--------------------

Walaupun penggunaan model haiwan seperti yang telah dibincangkan sebelum ini telah banyak menyumbang kepada pemahaman mengenai patogenesis PD, tetapi beberapa kekangan utama masih perlu dipertimbangkan. Antaranya termasuk kos penyelenggaraan yang tinggi, isu kebolehulangan (*reproducibility*), serta keterbatasan model tersebut dalam mencerminkan kekompleksan patofisiologi PD manusia dengan sepenuhnya (Mukherjee et al. 2022). Kekangan-kekangan ini menimbulkan cabaran dalam mentafsir dan menterjemahkan hasil kajian kepada aplikasi klinikal (Konnoya & Swanberg 2018). Sehubungan dengan itu, pemilihan model eksperimen yang sesuai menjadi semakin kritikal bagi memastikan kebolehpercayaan serta kerelevanan hasil penyelidikan. Dalam beberapa tahun kebelakangan ini, penyelidik telah mula meneroka penggunaan model alternatif yang lebih efisien dan ekonomik, termasuk organisma bukan mamalia seperti zebrafish (Hunter 2023). Model ini semakin mendapat perhatian dalam kajian penyakit neurodegeneratif kerana zebrafish dapat menawarkan pelbagai kelebihan, seperti ketelusan embrio, kadar pembiakan yang tinggi, serta kesesuaian untuk analisis genetik dan saringan ubat secara berskala besar (Ruzicka et al. 2019; Wang et al. 2021b).

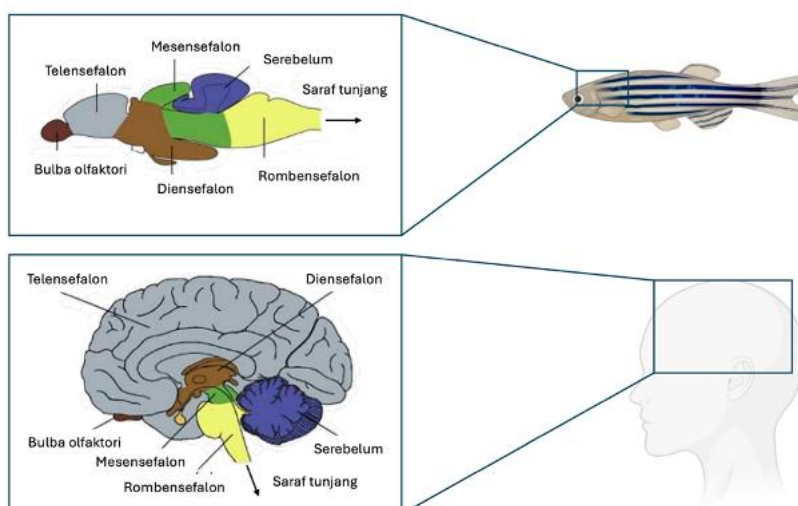
### 2.3 ZEBRAFISH

Mencit dan tikus merupakan model haiwan yang paling lazim digunakan dalam kajian penyakit manusia (Jucker 2010). Penggunaan ini didorong oleh persamaan anatomi dan fisiologi antara mamalia dan manusia, di samping pelbagai strain transgenik mencit yang telah dibangunkan. Walau bagaimanapun, kos penggunaan mencit masih dianggap tinggi untuk kajian berskala besar, meskipun saiznya kecil. Tambahan pula, penghasilan strain transgenik memerlukan tenaga kerja mahir yang signifikan (Jucker 2010). Sebaliknya, invertebrat seperti *Drosophila melanogaster* dan *Caenorhabditis elegans* telah lama digunakan sebagai model dalam penyelidikan perubatan. Invertebrat ini menunjukkan tahap homologi gen dan laluan intrasel yang tinggi dengan manusia, menjadikannya model yang sesuai untuk kajian saintifik (Doyle & Croll 2022). Selain

itu, invertebrat ini menawarkan kelebihan kos yang rendah serta kemudahan untuk menjalankan eksperimen berskala besar, menjadikannya model yang berpotensi untuk pembangunan pendekatan terapeutik baharu (Ségalat 2007).

Namun begitu, zebrafish telah muncul sebagai model bioperubatan yang unggul dalam beberapa tahun kebelakangan ini kerana keupayaannya untuk menggabungkan kelebihan kepelbagaian vertebrat dengan ciri-ciri anatomi yang menyerupai mamalia (Spence et al. 2008). Antara faktor yang menyumbang kepada penggunaan zebrafish termasuklah saiz yang kompak, kitaran hayat yang singkat, tahap fekunditi yang tinggi, serta homologi gen yang mencecah 70 % dengan manusia. Ciri-ciri ini menjadikan zebrafish sebagai model vertebrat kedua paling dominan dalam penyelidikan bioperubatan selepas tikus dan mencit (Howe et al. 2013; Kalueff et al. 2014; Kinter et al. 2021). Oleh itu, zebrafish sering digunakan sebagai organisma model dalam kajian pelbagai penyakit manusia, termasuk penyakit neuropsikiatri dan neurodegeneratif, berikutan persamaannya dengan fisiologi dan anatomi otak manusia (Aleström et al. 2006; Allen & Neely 2010; Cassar et al. 2019; Fontana et al. 2018; Lin et al. 2016; Murray et al. 2022; Naert & Vleminckx 2018; Phillips & Westerfield 2014; Santoriello & Zon 2012; Xi et al. 2011).

Sehubungan dengan itu, penggunaan zebrafish sebagai model PD diperkukuhkan oleh persamaan organisasi anatomi CNS antara spesies ini dengan mamalia. Secara neuroanatomi, otak zebrafish mempamerkan pembahagian struktur yang setanding dengan otak manusia, merangkumi komponen otak hadapan (telensefalon dan diensefalon), otak tengah (mesensefalon), serta otak belakang (rombensefalon) (Rajah 2.11). Walaupun zebrafish tidak memiliki organisasi mesensefalon yang berstrata secara diskret seperti SNpc pada manusia, tetapi peranannya berfungsi tersebut diambil alih secara homolog oleh kelompok neuron DA di kawasan diensefalon ventral (Wasel & Freeman 2020).



Rajah 2.11 Kawasan otak zebrafish dan manusia yang menonjolkan kawasan homolog utama (Ahmed et al. 2023)

Sistem dopaminergik yang merupakan lokasi utama patologi PD, telah dikaji secara meluas dalam zebrafish. Kajian pengesanan retrograde (*retrograde tracing*) pada otak zebrafish dewasa menunjukkan bahawa neuron DA yang terletak di posterior tuberkulum dalam diensefalon ventral menonjol ke telensefalon ventral (*subpallium*) membentuk litar berfungsi yang menyerupai sistem ganglia basal manusia (Brinez-Gallego et al. 2023; Xi et al. 2011). Litar ini bertindak sebagai analog kepada laluan nigrostriatal yang kritikal dalam mengawal atur fungsi motor dan integrasi sensorimotor (Tay et al. 2011). Sehubungan dengan itu, sistem dopaminergik pada zebrafish, khususnya dalam diensefalon ventral telah dikenal pasti sebagai homolog berfungsi kepada laluan nigrostriatal otak tengah manusia (Tay et al. 2011). Persamaan ini sangat kritikal kerana degenerasi neuron dalam laluan nigrostriatal merupakan ciri utama yang menyebabkan gangguan motor dalam pesakit PD (Doyle & Croll 2022; Holzschuh et al. 2001; Rink & Wullimann 2002a; Sallinen et al. 2009).

Sistem dopaminergik dalam embrio zebrafish juga telah dikaji dan dicirikan secara ekstensif melalui kajian neuroperkembangan. Ontogeni neuron DA bermula seawal 18 jam selepas persenyawaan (*hours post fertilization, hpf*) yang tertumpu di kawasan diensefalon ventral. Menjelang 72 hpf, organisasi CNS telah lengkap sepenuhnya, di mana fasa perkembangan seterusnya mengutamakan proliferasi bilangan neuron (Kimmel et al. 1995; Wullimann & Rink 2001). Kecekapan temporal

ini membolehkan sistem dopaminergik zebrafish terbentuk sepenuhnya dalam tempoh 3-4 hari selepas persenyawaan (Du et al. 2016; Fleming et al. 2013), jauh lebih pantas berbanding model roden seperti mencit (E12.5) dan tikus (E20) (Santana et al. 1992; Sillitoe & Vogel 2008). Selain daripada diensefalon ventral, neuron DA juga dapat ditemui di bulba olfaktori, kawasan preoptik, retina, dan pretektum (Rink & Wullimann 2002a).

Kemajuan dalam teknologi transgenik dan transkriptomik sel-tunggal baru-baru ini telah mengesahkan bahawa telensefalon ventral zebrafish bukan sahaja homolog secara anatomi, mahupun berkongsi identiti molekul dengan sistem ganglia basal mamalia, yang memainkan peranan penting dalam kawalan pergerakan dan merupakan tapak utama degenerasi PD (Tanimoto et al. 2024). Selain itu, neuron DA dalam zebrafish menunjukkan sensitiviti terhadap tekanan oksidatif, yang merupakan salah satu punca utama kematian neuron dalam penyakit PD (McCormack et al. 2006; Rappold et al. 2011). Di samping itu, zebrafish juga dilengkapi dengan BBB yang menunjukkan kesepadanan ciri fisiologi dan profil kebolehtelapan dengan mamalia (Cuoghi & Mola 2007; Wager & Russell 2013). Persamaan ini meluas kepada fungsi neurotransmitter primer seperti glutamat, GABA, dan DA, yang secara umumnya adalah selari dengan sistem manusia (Caramillo & Echevarria 2017; Stoyek et al. 2015; Toledo-Ibarra et al. 2013). Oleh itu, persamaan struktur dan litar neuroanatomi tersebut, yang bersinergi dengan kecekapan kejuruteraan genetik, kos penyelenggaraan yang rendah, serta ketelusan optik semasa embriogenesis (Flinn et al. 2013; Macrae & Peterson 2015; Matsui et al. 2013; Wittbrodt et al. 2002), mengukuhkan zebrafish sebagai platform *in vivo* yang ideal bagi memodelkan mekanisme penyakit neurodegeneratif seperti PD dan saringan agen farmakologi berskala besar.

#### 2.4 RAWATAN PD

Terdapat pelbagai rawatan tersedia untuk menguruskan gejala PD yang menasarkkan kedua-dua gejala pergerakan dan bukan pergerakan. Walaupun rawatan yang berkesan untuk PD masih belum ditemui, beberapa rawatan telah dibangunkan dengan tumpuan utama kepada penambahbaikan gejala pergerakan melalui peningkatan tahap dopamin di striatum atau rangsangan reseptor dopamin. Gejala pergerakan berpunca daripada kehilangan neuron DA di ganglia basal, menjadikan terapi penggantian dopamin

sebagai rawatan utama. Namun begitu, ketiga-tiga kelas terapi DA, iaitu levodopa, agonis dopamin dan perencat MAO-B (seperti *rasagiline*, *selegiline*, dan *safinamide*), berpotensi menyebabkan kesan sampingan seperti sedasi, hipotensi, halusinasi, diskinesia, dan gangguan kawalan impuls (Jadual 2.4) (Connolly & Lang 2014; Delgado - Alvarado et al. 2020; Goldstein et al. 2016; Jankovic & Tan 2020; Poewe & Antonini 2015; Schapira 2011). Walaupun rawatan farmakologi ini sangat berkesan pada peringkat awal PD, jendela terapeutik (*therapeutic window*) semakin mengecil seiring dengan perkembangan penyakit (Haworth & Henderson 2024).

Jadual 2.4 Kesan sampingan umum ubat PD

Kelas	Contoh	Kesan sampingan
Levodopa	Madopar, Sinemet	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hipotensi: Boleh mencetuskan atau memburukkan hipotensi ortostatik.</li> <li>▪ Mengantuk: Perhatian khusus perlu diberikan semasa memandu.</li> <li>▪ Keletihan dan loya: Lazim berlaku pada permulaan rawatan tetapi biasanya berkurangan dalam tempoh 1–2 minggu pertama.</li> <li>▪ Halusinasi dan/atau kekeliruan: Lebih cenderung berlaku apabila penyakit semakin berkembang atau pada dos yang lebih tinggi.</li> <li>▪ Penghentian ubat: Penghentian levodopa secara tiba-tiba boleh menyebabkan kesan penarikan (<i>withdrawal effects</i>).</li> </ul>
	Duodopa	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Kesukaran pengurusan pam: Masalah seperti yang dihadapi dengan pam apomorfin; sesaran (<i>displacement</i>) atau penyumbatan tiub boleh mengganggu fungsi peranti.</li> <li>▪ Prosedur invasif: Penempatan tiub gastrostomi diperlukan.</li> </ul>
Agonis dopamin	Pramipexole, ropinirole, rotigotine	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Halusinasi: Boleh dicetuskan atau diperburuk.</li> <li>▪ Kemerostotan kognitif: Boleh menyebabkan penurunan fungsi kognitif.</li> <li>▪ Gangguan kawalan impuls: Dos yang lebih tinggi boleh mencetuskan atau memburukkan gangguan ini.</li> <li>▪ Tidur secara tiba-tiba: Episod tidur secara tiba-tiba boleh berlaku.</li> <li>▪ Hipotensi: Boleh berkembang atau menjadi lebih teruk.</li> </ul>
	Apomorfin	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Kesukaran pengurusan pam: Pengurusan pam boleh menjadi sukar bagi individu yang mengalami gangguan kognitif.</li> <li>▪ Kesan sampingan: Kesan sampingan yang serupa dengan agonis dopamin lain mungkin berlaku.</li> </ul>
	Amantadine	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Buku lali (<i>ankle</i>) bengkak: Penggunaan stoking mampatan dapat membantu meredakan keadaan ini.</li> <li>▪ Loya dan gangguan gastrousus: Gejala ini mungkin berkurangan dari semasa ke semasa.</li> <li>▪ Kekeliruan: Elakkan penggunaan ubat ini pada pesakit yang sedia ada gangguan kognitif pada peringkat lanjut PD.</li> </ul>
Perencat MAO-B	Rasagiline, selegiline, safinamide	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Sindrom serotonin: Risiko yang ketara pada individu yang mengambil SSRIs atau ubat antidepresan lain.</li> <li>▪ Kesan sampingan: Boleh meningkatkan intensiti kesan</li> </ul>

Perencat COMT	Entacapone, opicapone	<p>sampingan yang berkaitan dengan levodopa.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hipotensi: Masalah lazim yang perlu dipantau.</li> <li>▪ Gangguan gastrousus: Masalah yang lazim tetapi boleh berkurangan dengan masa.</li> <li>▪ Kesan entacapone: Boleh menyebabkan perubahan warna kuning atau jingga pada cecair badan seperti air mata dan air kencing.</li> </ul>
------------------	--------------------------	---

Malangnya, tiada satu rawatan daripada ubat-ubatan tersebut yang mampu memperlahan perkembangan PD secara berkesan dalam jangka panjang. Di samping itu, kebanyakan rawatan PD dikaitkan dengan kesan sampingan yang ringan hingga teruk. Sebagai contoh, penggunaan levodopa, iaitu ubat yang dianggap paling berkesan untuk menguruskan PD dengan meningkatkan kepekatan dopamin dalam ganglia basal. Ubat ini perlu diambil beberapa kali sehari disebabkan separuh hayatnya yang agak pendek, iaitu sekitar 90 minit (Haworth & Henderson 2024). Kebiasaannya, rawatan dimulakan dengan dos tiga kali sehari, tetapi frekuensi serta dos akan ditingkatkan berdasarkan keparahan gejala seiring dengan perkembangan PD. Namun begitu, penggunaan levodopa dalam jangka masa panjang sering membawa kepada kesan sampingan yang ketara dan berpotensi melemahkan pesakit (Knez et al. 2024). Akibatnya, pesakit sering mengalami turun naik motor, di mana pesakit beralih antara keadaan ubat berkesan yang dikenali sebagai keadaan 'on' dan keadaan 'off'. Keadaan 'off' ini boleh disertai dengan gejala seperti tremor, ketidakupayaan bergerak, kesakitan, kesukaran bernafas, dan fenomena *freezing of gait*, iaitu keadaan di mana kaki seolah-olah melekat pada lantai (Stocchi & Olanow 2013). Sebaliknya, pergerakan menggeliat koreiform yang dikenali sebagai 'diskinesia' lazimnya berlaku apabila kepekatan dopamin berada pada tahap yang tinggi. Terdapat dua kelas ubat PD telah terbukti berkesan dalam pengurusan turun naik motor. Perencat *catechol-O-methyltransferase* (COMT) termasuk *entacapone* dan *opicapone*, menghalang pemecahan levodopa, seterusnya meningkatkan keberkesanan levodopa sebanyak kira-kira 25 % dan memanjangkan tempoh tindakannya (Haworth & Henderson 2024). *Opicapone* diberikan sekali sehari, manakala *entacapone* perlu diambil bersama setiap dos ubat dengan formulasi gabungan yang sedia ada. Selain itu, *amantadin* digunakan untuk pengurusan diskinesia tetapi harus diberikan dengan berhati-hati, terutamanya kepada pesakit warga emas, kerana *amantadin* berpotensi memperburuk kekeliruan dan menyebabkan sembelit (Connolly & Lang 2014).

Di samping itu, perencat MAO-B sering digunakan untuk menguruskan gejala pergerakan dan kognitif dalam PD serta telah memmanifestasi tahap keselamatan dan keberkesanan yang tinggi pada kedua-dua peringkat awal dan lanjut PD (Armstrong & Okun 2020). Peranan utama perencat MAO-B adalah meningkatkan kawalan motor dan juga berpotensi dalam menangani penurunan kognitif pada peringkat lanjut PD dan mengurangkan diskinesia yang disebabkan oleh penggunaan levodopa. Pada peringkat awal PD, perencat MAO-B biasanya digabungkan dengan levodopa untuk memperlambatkan metabolisme dopamin, sekali gus mengurangkan penggunaan levodopa, meminimumkan turun naik motor, dan mengurangkan tekanan oksidatif yang dikaitkan dengan PD tanpa meningkatkan kadar mortaliti (Ives et al. 2004). Perencat MAO-B yang lazim digunakan dalam rawatan PD termasuk *selegiline*, *rasagiline*, *sebragiline*, dan *safinamide*. *Selegiline* dan *rasagiline* ialah perencat MAO-B selektif yang tidak boleh diubah balik (*irreversible*), manakala *safinamide* dan *sebragiline* merupakan perencat yang boleh diubah balik (*reversible*) serta mempunyai kesan sampingan yang kurang berbanding dengan *selegiline* dan *rasagiline*. Selain itu, *safinamide* memiliki mekanisme tindakan yang lebih kompleks, melibatkan aktiviti DA dan anti-glutamatergik (Dezsi & Vecsei 2017).

Walaupun PD secara tradisionalnya dianggap sebagai jenis penyakit gangguan pergerakan yang mempengaruhi hampir setiap sistem organ dalam tubuh, penyelidikan sepanjang dekad yang lalu menunjukkan bahawa gejala bukan pergerakan dalam PD wujud sepanjang perkembangan PD dan menyebabkan kualiti hidup terjejas lebih serius berbanding gejala pergerakan (Martinez - Martin et al. 2011). Sebagai contoh, gejala bukan pergerakan merangkumi gangguan neuropsikiatri, gangguan gastrousus, kesakitan dan deria, serta gangguan tidur pergerakan mata cepat, dan anosmia secara beransur-ansur muncul seiring dengan perkembangan PD (Jankovic & Tan 2020). Keadaan ini biasanya menjadi lebih ketara pada peringkat lanjut (Menza et al. 2010). Tambahan pula, gejala bukan pergerakan ini sering kurang responsif terhadap rawatan DA, jarang dilaporkan dan kerap diabaikan oleh pengamal klinikal. Akibatnya, terdapat kekurangan pilihan rawatan berasaskan bukti untuk menangani isu-isu ini (Haworth & Henderson 2024).

Di samping itu, terapi fizikal diakui sebagai bentuk penjagaan kesihatan bersekutu yang paling banyak digunakan dalam pengurusan PD dan dianggap sebagai komponen penting dalam rawatan PD (Keus et al. 2009). Bukti menunjukkan bahawa terapi fizikal konvensional memberikan manfaat yang ketara kepada pesakit PD (Gobbi et al. 2009), walaupun keberkesanannya dalam memperlahan perkembangan penyakit masih terhad. Kajian yang lepas juga menunjukkan bahawa terapi fizikal terutamanya memberi tumpuan kepada gangguan pergerakan yang biasa dialami oleh pesakit PD, termasuk pergerakan badan, postur, fungsi anggota atas (mencapai dan menggenggam), masalah keseimbangan (termasuk pencegahan jatuh), gaya berjalan, dan kapasiti fizikal keseluruhan (Digiacoimo et al. 2010; Tambosco et al. 2014; Tomlinson et al. 2014). Walau bagaimanapun, kesan positif daripada senaman menjadi lebih ketara apabila digabungkan dengan terapi minda-tubuh seperti Tai Chi, Qigong, Yoga, dan Pilates yang kini semakin popular sebagai pendekatan perubatan pelengkap dan alternatif untuk pengurusan PD (Jahnke et al. 2010; Lee et al. 2015). Senaman telah terbukti memberikan manfaat kepada pesakit PD dengan meningkatkan kualiti hidup mereka dan mencegah daripada kehilangan upaya sepenuhnya. Pesakit PD sering dinasihatkan untuk mengamalkan senaman sebagai rawatan pelengkap bersama pengurusan perubatan dan pembedahan bagi memperlancarkan perkembangan penyakit ini. Walau bagaimanapun, kajian menunjukkan bahawa pesakit PD cenderung untuk kurang aktif secara fizikal berbanding dengan populasi umum, walaupun manfaat intervensi senaman telah dibuktikan secara meluas. Ketidaktifan fizikal dalam kalangan pesakit PD ini dikaitkan dengan pelbagai faktor, termasuk keletihan, ketakutan untuk jatuh, keadaan persekitaran seperti cuaca yang tidak mengizinkan, serta kekurangan kemudahan pengangkutan (Vasanthi & Ying 2021).

Walaupun pendekatan rawatan farmakologi yang sedia ada hanya berkesan dalam mengawal gejala PD untuk tempoh yang terhad, tetapi rawatan ini tidak dapat mengubah balik proses neurodegeneratif yang progresif ini (Sequeira et al. 2024). Tambahan pula, keberkesanan rawatan simptomatik ini semakin berkurangan dari semasa ke semasa serta disertai dengan pelbagai kesan sampingan (Müller 2025). Sehubungan dengan itu, terdapat keperluan mendesak untuk meneroka strategi terapi alternatif yang bukan sahaja memfokuskan kepada pengawalan gejala, tetapi juga berupaya memberikan kesan perlindungan saraf dan mensasarkan mekanisme asas PD

ini. Dalam konteks ini, perhatian telah diberikan kepada molekul endogen yang mempunyai sifat antioksidatif dan anti-keradangan, seperti MT.

## 2.5 METALOTIONIN

Metalotionin (MT) pada asalnya dikenali sebagai protein utama dalam proses detoksifikasi logam berat kerana afinitinya yang tinggi terhadap logam perlu. Namun begitu, penyelidikan terkini menunjukkan bahawa MT juga memainkan peranan penting dalam pelbagai proses sel, termasuk mekanisme antioksidasi, proliferasi sel, migrasi, dan apoptosis (Hübner & Haase 2021; Monteith & Skaar 2021). Oleh itu, MT berfungsi sebagai agen anti-apoptosis, anti-keradangan, anti-piroptosis, anti-nekrosis, serta bertindak sebagai antagonis TNF- $\alpha$ . Kepelbagaian fungsi farmakologi ini berperanan penting dalam memberikan perlindungan mitokondria yang dimediasi oleh ubikuinon (CoQ), terutamanya dalam menangani penyakit degeneratif neuron secara progresif seperti PD, penyakit Alzheimer, ketagihan dadah, dan proses penuaan (Sharma 2024). Protein ini pertama kali ditemui pada tahun 1950-an dan dinamakan berdasarkan kandungan logamnya yang berubah (10 – 30 % w/w) dan tahap tiolnya yang tinggi (Si & Lang 2018). Kandungan tiol yang tinggi dalam residu sistein memberikan sifat antioksidasi kepada MT (Krezel & Maret 2021). MT juga diekspresikan secara meluas dalam pelbagai spesies organisma, manakala MT dalam mamalia terdiri daripada empat protein dengan berat molekul rendah (~7 kDa). Setiap protein ini mempunyai ciri pengikatan logam dan corak ekspresi tisu yang berbeza (Jadual 2.5) (Parameswari et al. 2021).

Pada manusia, MT dikodkan oleh gen yang terletak pada kromosom 16q13 (Palmiter et al. 1992), dengan empat isoform utama, iaitu MT-1 hingga MT-4. Sebanyak tujuh gen MT-1 yang berfungsi telah dikenal pasti, iaitu A, B, C, D, E, F, G, H dan X yang menyumbang kepada mikroheterogenan (*microheterogeneity*) protein MT-1 (Juárez-Rebollar et al. 2017). Selain itu, terdapat juga isoform lain yang dikodkan oleh gen tunggal seperti MT-2 (MT-IIA), MT-3 dan MT-4 (Juárez-Rebollar et al. 2017). Isoform MT-1 dan MT-2 diekspresikan secara meluas dalam hampir semua tisu manusia, termasuk otak (Chung et al. 2004; Coyle et al. 2002; Miyazaki et al. 2011; Moffatt & Denizeau 1997; Pedersen et al. 2009). Walaupun MT-1 dan MT-2 biasanya tidak diekspresikan dalam mikroglia, oligodendrosit, atau neuron, ekspresi protein ini

meningkat sebagai tindak balas terhadap kecederaan otak (Shamsi & Fatima 2014; Thirumorthy et al. 2011). Pelbagai rangsangan seperti tekanan, sitokin, glukokortikoid, ROS, zink, dan kuprum boleh merangsang sintesis MT-1 dan MT-2 dalam korteks serebrum, batang otak, saraf tunjang, talamus, hipokampus, otak depan basal (*basal forebrain*), neokorteks, nukleus saraf kranium, bebuli olfaktori, dan serebelum (Penkowa et al. 2006; Santos et al. 2012). Sementara itu, MT-3 yang juga dikenali sebagai faktor perencat pertumbuhan (*growth inhibitory factor*, GIF), ialah isoform spesifik otak yang diekspresikan terutamanya dalam neuron, khususnya neuron yang mengandungi zink di hipokampus, amigdala, dan korteks serebrum (Lee & Koh 2010; Nordberg 1998). Oleh itu, isoform utama MT dalam otak ialah MT-1, MT-2, dan MT-3, masing-masing mempunyai fungsi khusus yang menyumbang kepada integriti dan fungsi sistem saraf pusat. Sebaliknya, MT-4 pula diekspresikan secara terhad dalam epitelium skuamus berlintang (*stratified squamous epithelium*) (Miyazaki & Asanuma 2023). Terdapat dua isoform MT telah dikenal pasti dalam zebrafish, iaitu *mt2* dan *similar to mtb (smtb)*. Kedua-dua gen ini diekspresi dalam kawasan yang mengalami proliferasi sel di otak zebrafish dewasa, terutamanya di lapisan ventrikel dalam telensefalon, diensefalon, mesensefalon, dan rombensefalon. Ekspresi kedua-dua gen ini menunjukkan bahawa MT berperanan dalam neurogenesis dan perlindungan neuron (Teoh et al. 2015).

Kajian terdahulu menunjukkan bahawa MT-1 dan MT-2 turut berperanan dalam pengawalan aktiviti neuron. Lebih menarik, hubungan antara MT dan perlindungan saraf dalam otak telah dilaporkan baru-baru ini (Isooka et al. 2020; Miyazaki & Asanuma 2023; Murakami et al. 2014; Navarro-Sempere et al. 2023). Berdasarkan laporan Nakazato et al. (2014), kepekatan darah MT-1/2 dalam kalangan 200 individu yang sihat adalah dalam julat 10 – 90 ng/mL, di mana julat normal yang dianggarkan sekitar 27 – 48 ng/mL. Dalam dekad yang lalu, MT-2 telah dikenal pasti memainkan peranan penting dalam penyakit keradangan yang melibatkan sistem pernafasan dan saraf, serta beberapa jenis kanser (Kwak et al. 2021; Liu et al. 2022a; Sekovanić et al. 2020; Yin et al. 2018). Penemuan ini mencadangkan bahawa MT-2 berpotensi sebagai sasaran terapeutik baharu dalam rawatan penyakit berkaitan.

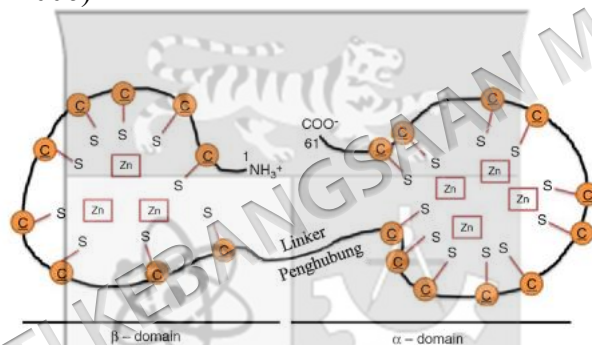
Jadual 2.5 Perbandingan isoform metalotionin manusia

Isoform	Panjang (asid amino)	Pengikatan logam utama	Identiti kepada MT-2	Ekspresi tisu utama	Rujukan
MT-2	61	Zn	100 %	Diekspresikan secara meluas	Koh and Lee (2020)
MT-1A	61	Cd	91 %	Diekspresikan secara meluas	Krezel and Maret (2021)
MT-3	68	Cu	74 %	Sistem saraf	Koh and Lee (2020)
MT-4	62	Cu	62 %	Sel epitelium skuamosa	Koh and Lee (2020)

MT-2 memainkan peranan penting dalam mencegah pembentukan agregat protein patologi dalam penyakit neurodegeneratif dengan bersaing untuk pengikatan logam ion logam seperti  $\text{Cu}^{2+}$  daripada protein patologi. Kajian menunjukkan bahawa rawatan menggunakan  $\text{Cu}^{2+}$  pada kepekatan  $100 \mu\text{M}$  selama 6 jam mengakibatkan penurunan tahap MT-2 dalam sel neuroblastoma manusia SHSY-5Y, disertai dengan peningkatan tahap  $\alpha$ -sinuklein, iaitu protein patologi yang terlibat dalam PD (Mcleary et al. 2018). Namun begitu, transfeksi plasmid MT-2 didapati mampu menurunkan tahap  $\alpha$ -sinuklein sehingga  $\sim 4$  kali ganda, mencadangkan bahawa MT-2 berpotensi menghalang perkembangan PD secara langsung (Mcleary et al. 2018). Selain peranannya dalam PD, ekspresi MT-2 yang tinggi juga dikaitkan dengan kesan terapeutik dalam mengurangkan kesakitan neuropatik melalui perencatan laluan keradangan dan faktor keradangan. Dalam model tikus neuropati periferi yang disebabkan oleh pemberian oksaliplatin, tahap ekspresi MT-2 dalam neuron saraf tunjang menurun sebanyak  $\sim 2.5$  kali ganda, yang seterusnya mengaktifkan laluan NF- $\kappa$ B. Walau bagaimanapun, pemberian MT-2 rekombinan secara intraspinal melalui suntikan virus terkait adeno (*adeno-associated virus*) 21 hari sebelum rawatan oksaliplatin didapati mampu menghalang kesakitan neuropatik dengan meningkatkan ekspresi I $\kappa$ B- $\alpha$  sebanyak  $\sim 2$  kali ganda serta merencat laluan NF- $\kappa$ B (Huang et al. 2021). Tambahan pula, pemberian MT-2 juga menunjukkan keberkesanan dalam menurunkan tahap IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  aruhan oksaliplatin sebanyak  $\sim 2$  kali ganda (Huang et al. 2021). Penemuan ini mencadangkan bahawa MT-2 berpotensi untuk mencegah perkembangan penyakit sistem saraf melalui mekanisme pengikatan ion logam dan pengawalan tindak balas keradangan (Huang et al. 2021).

### 2.5.1 Fungsi MT dalam Otak

MT merupakan sekumpulan protein berat molekul rendah yang kaya dengan residu sistein, membolehkannya mempunyai keupayaan tinggi untuk mengikat ion logam melalui ikatan tiolat (*thiolate*), iaitu domain  $\alpha$  dan  $\beta$  (Rajah 2.12) (Koh & Lee 2020; Nielsen et al. 2006). Kedua-dua domain pengikatan logam ini dipisahkan oleh jujukan tanpa sistein yang dikenali sebagai jujukan 'linker' atau penghubung (Babula et al. 2012; Zangger et al. 2001). Domain  $\alpha$  merangkumi 31–68 asid amino pada terminal-C, manakala domain  $\beta$  pada terminal-N terdiri daripada 1–30 asid amino (Dziegiel 2004; Zangger et al. 2001). Keupayaan stoikiometri domain ini telah dibuktikan di mana domain  $\alpha$  mampu mengikat sehingga empat ion logam bivalen, manakala domain  $\beta$  mengikat sehingga tiga ion logam seperti zink, kadmium, merkuri, atau plumbum (Duncan & Stillman 2006).



Rajah 2.12 Tapak pengikatan ion logam dalam molekul metalotionin (Nielsen et al. 2006)

Oleh itu, MT berperanan penting dalam mengekalkan homeostasis logam dalam sel dengan mengawal tahap logam perlu ini yang penting dalam pelbagai proses biokimia (Butnaru et al. 2008). MT bertindak sebagai sistem penimbun logam yang berkesan membolehkannya mengikat logam berlebihan bagi mengekalkan kestabilan sel serta melepaskan logam ini apabila diperlukan dalam proses biologi tertentu. Sebagai contoh, zink berfungsi sebagai kofaktor dalam pelbagai tindak balas enzim, replikasi DNA, pembaikan sel, serta pertumbuhan sel (Costa et al. 2023). Sementara itu, kuprum adalah elemen penting dalam enzim redoks seperti sitokrom c oksidase (*cytochrome c oxidase*) dan dismutase superoksida yang membantu dalam penghasilan tenaga sel dan pengawalan tekanan oksidatif (Satish 2017). Tambahan pula, MT juga terlibat dalam pelbagai proses neurofisiologi, termasuk perlindungan daripada tekanan

oksidatif, serta pengawalan pertumbuhan dan kelangsungan hidup neuron (Koh & Lee 2020; Si & Lang 2018; Xu et al. 2022).

Salah satu fungsi utama MT ialah keupayaannya dalam mendetoksikan logam berat yang toksik seperti kadmium, merkuri, dan plumbum yang berpotensi mengganggu fungsi biologi dan menyebabkan kerosakan sel sekiranya tidak dikawal dengan baik (Jomova et al. 2024). Sebagai contoh, kadmium ialah logam berat yang sangat toksik dan sering dijumpai dalam asap rokok dan pencemaran industri (Khan et al. 2022; Kim et al. 2010). Aktiviti antropogenik menyumbang kepada pelepasan sekitar 4,000 hingga 13,000 tan kadmium ke dalam persekitaran setiap tahun, di mana penyebarannya ke atmosfera melalui proses semula jadi dan aktiviti perindustrian seperti pembakaran bijih yang mengandungi kadmium serta letusan gunung berapi (Jomova et al. 2024). Dengan ini, pendedahan secara kronik kepada kadmium dikaitkan dengan peningkatan risiko penyakit buah pinggang dan kanser (Amadou et al. 2021; Chen et al. 2016a; Tsai et al. 2021). Struktur tiol dalam MT membolehkannya berinteraksi dengan ion logam toksik untuk membentuk kompleks logam-protein yang stabil, seterusnya mengurangkan kebolehterimaan logam dalam sel dan meminimumkan ketoksikannya (Sabolić et al. 2010). Sebagai tindak balas terhadap pendedahan kadmium, MT dapat menyerap ion kadmium bagi menghalang gangguan terhadap aktiviti enzim sel serta mengurangkan pembentukan ROS yang boleh menyebabkan kerosakan sel (Nordberg & Nordberg 2022). Selain itu, MT juga membantu dalam pengangkutan logam toksik ke lisosom untuk proses penguraian atau menyingkirkannya melalui sistem perkumuhan tubuh, seperti urin (Nordberg & Nordberg 2022).

Selain fungsi detoksifikasi logam berat, MT juga merupakan protein utama dalam sistem pertahanan antioksidan sel. Peranannya dalam melindungi sistem biologi daripada kerosakan akibat tekanan oksidatif telah banyak dilaporkan. Penjanaan radikal bebas yang berlebihan boleh mencetuskan tekanan oksidatif, yang seterusnya menyebabkan pengoksidaan serta kerosakan makromolekul penting dalam sel, seterusnya mengganggu laluan transduksi isyarat dan keseimbangan sistem antioksidan (Sadiq 2023). Kajian menunjukkan bahawa ligan tiolat pada residu sistein memainkan peranan penting dalam aktiviti redoks MT, di mana residu ini boleh dioksidakan oleh

agen pengoksida dalam sel, mengakibatkan pembebasan ion zink. Mekanisme ini dapat mengurangi tahap pemperoksidaan lipid dan seterusnya mengurangkan kerosakan akibat tekanan oksidatif (Kang 2006). Oleh itu, MT berfungsi sebagai agen pelindung yang berkesan terhadap tekanan oksidatif yang berpunca daripada pengumpulan ROS (McLeary et al. 2019). MT juga berupaya meneutralkan pelbagai jenis ROS, termasuk radikal hidroksil, anion superoksida, hidrogen peroksida, radikal RNS, serta radikal nitrik oksida melalui kumpulan tiolnya. Mekanisme ini menjadi semakin penting apabila tahap tekanan oksidatif meningkat, dalam usaha mengurangkan kerosakan sel (Juárez-Rebollar et al. 2017; Kumari et al. 1998; Pedersen et al. 2009; Thirumoorthy et al. 2011; Yang et al. 2024b). Keupayaan antioksidan MT amat penting dalam sistem saraf pusat memandangkan neuron sangat terdedah kepada tekanan oksidatif yang boleh mengakibatkan kematian sel serta gangguan fungsi neurologi.

Selain itu, MT juga berperanan dalam pengawalan laluan apoptosis, iaitu mekanisme kematian sel terprogram (Dai et al. 2021). Apoptosis berfungsi sebagai mekanisme pengawalan dalam pertumbuhan sel normal, perkembangan serta fungsi sistem imun, dan kematian sel akibat rangsangan kimia (Elmore 2007). Proses apoptosis boleh dicetuskan oleh kecederaan sel atau pengikatan ligan ekstrasel melalui dua laluan utama, iaitu laluan intrinsik (berperantaraan mitokondria) dan laluan ekstrinsik (berperantaraan reseptor kematian). Laluan intrinsik dikawal oleh protein keluarga B-sel limfoma 2 (Bcl-2), seperti Bcl-2, Bax, dan Bad. Dalam keadaan normal, pelepasan sitokrom c dari mitokondria ke dalam sitoplasma mengaktifkan lanta kaspase, satu mekanisme yang melibatkan sekumpulan protein pengisyarat yang mempunyai fungsi proteolisis untuk mencetuskan apoptosis melalui rantaian peristiwa sigaran (*cleavage event*). Oleh itu, protein Bcl-2 sebagai pengawal selia negatif apoptosis dapat menghalang pelepasan sitokrom c ini dan merencat pengaktifan kaspase (Kuwana & Newmeyer 2003). Selain itu, *second mitochondria-derived activator of caspase* (Smac) dalam sitosol berperanan dalam mempromosikan apoptosis dengan mengaktifkan kaspase melalui pengikatan dan penyingkiran dengan *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP) daripada kompleks apoptosom, yang membolehkan pengaktifan kaspase berlaku secara optimum (Du et al. 2000; Wahyudi et al. 2022). Sebaliknya, laluan ekstrinsik melibatkan interaksi berperantaraan-reseptor transmembran yang dimulakan apabila ligan sitokin seperti *Fas ligand* (FasL) dan TNF berikatan dengan reseptor

masing-masing (Elmore 2007; Wahyudi et al. 2022). Proses ini menyebabkan pengaktifan kaspase-8 yang kemudiannya mengaktifkan kaspase-3 secara langsung atau berinteraksi dengan laluan intrinsik (Elmore 2007; Wahyudi et al. 2022). Kedua-dua laluan apoptosis ini akhirnya bertumpu kepada pengaktifan kaspase-3, yang diikuti oleh pembahagian *poly(ADP-ribose) polymerase-1* (PARP-1), seterusnya membawa kepada kematian sel terprogram (Fulda et al. 2001; Wahyudi et al. 2022). Hasil kajian Wahyudi et al. (2022) menunjukkan bahawa MT berupaya mengurangkan apoptosis yang berpunca daripada pendedahan berlebihan kepada logam berat. Keupayaan MT untuk mengikat ion logam melalui kumpulan sulfhidril (-SH) dipercayai menyumbang kepada kesan perlindungan ini dengan mengurangkan ketoksikan logam serta mengekalkan homeostasis sel. Dalam keadaan tekanan oksidatif yang tinggi, MT juga dapat berinteraksi dengan protein supresor tumor p53 dan protein anti-apoptosis Bcl-2 untuk memodulasi tindak balas apoptosis. Mekanisme ini seterusnya berupaya mengurangkan kematian neuron dan mengekalkan kelangsungan hidup sel dalam persekitaran tekanan oksidatif (Luo et al. 2022; Marshall et al. 1997).

### **2.5.2 Kesan Neuroprotektif MT dalam PD**

PD merupakan salah satu jenis penyakit degeneratif neuron secara beransur-ansur yang dicirikan oleh kehilangan neuron DA dalam *substantia nigra* serta pengumpulan agregat  $\alpha$ -sinuklein yang membentuk jasad Lewy. Tekanan oksidatif, keradangan neuron, dan gangguan homeostasis logam adalah faktor utama yang menyumbang kepada patogenesis PD (Al-Abdulrasul et al. 2025; Won et al. 2022; Zhang et al. 2023). MT, terutamanya MT-1, MT-2 dan MT-3 telah dikenal pasti sebagai agen perlindungan neuron penting dalam mengurangkan mekanisme patologi ini, sekali gus menawarkan potensi manfaat terapeutik dalam PD (Koh & Lee 2020; Liu et al. 2020a; Navarro-Sempere et al. 2023; Stankovic et al. 2007).

#### **a. Pengurangan Tekanan Oksidatif dalam PD**

Tekanan oksidatif ialah fenomena biologi yang kompleks yang berpunca daripada ketidakseimbangan antara penghasilan dan peneutralan ROS dalam sel dan tisu. ROS dihasilkan semula jadi sebagai hasil sampingan proses metabolisme normal dan memainkan peranan penting dalam pengisyaratan sel serta homeostasis pada tahap

fisiologi (Hajam et al. 2022; Pizzino et al. 2017). Oleh itu, keseimbangan antara tahap pengoksida dan bahan antioksidan dikekalkan bagi memastikan kelangsungan fungsi sel (Jung & Kim 2018; Luk 2019). Namun begitu, penghasilan ROS yang berlebihan atau kekurangan bahan antioksidan boleh mencetuskan tekanan oksidatif yang seterusnya mengakibatkan kerosakan biomolekul penting seperti DNA, protein, dan lipid (Mccord 2000; Paithankar et al. 2021). Ketidaknormalan ini telah dikaitkan dengan perkembangan penyakit degeneratif neuron, termasuk PD (Sies & Jones 2020). Dalam konteks PD, tekanan oksidatif memainkan peranan utama dalam disfungsi dan degenerasi neuron DA di substansia nigra (Chakrabarti & Bisaglia 2023; Jenner 2003; Puspita et al. 2017).

MT merupakan salah satu sumber tiol dalam sel yang mengandungi residu sistein dan berperanan dalam mengurangkan tekanan oksidatif dengan menghalang pembentukan dan meneutralkan ROS secara *in vivo* (Eibl et al. 2010; Patankar et al. 2019). Selain itu, MT juga berfungsi sebagai pembekal kofaktor logam kepada enzim antioksidan tertentu bagi meningkatkan keberkesanan aktiviti antioksidan dalam sel (Lazo & Pitt 1995). Keupayaan antioksidan MT yang tinggi membolehkannya bertindak sebagai penyingkir radikal bebas yang berkesan, khususnya terhadap radikal hidroksil dan superoksida. Tindak balas MT terhadap radikal hidroksil didapati kira-kira 300 kali ganda lebih tinggi berbanding glutathione (Miyazaki & Asanuma 2023). Tambahan pula, MT menunjukkan aktiviti antioksidan kira-kira 50 kali ganda lebih tinggi dalam melindungi DNA daripada kerosakan oksidatif serta 10 kali ganda lebih berkesan dalam menghalang pemperoksidaan lipid berbanding glutathione (Bensellam et al. 2021). Tanaka et al. (2022) mendapati bahawa kecederaan paru-paru yang disebabkan oleh *porcine pancreatic elastase* (PPE) menunjukkan keterukan yang lebih tinggi dalam mencit tanpa gen MT (MT-KO) berbanding mencit jenis liar (*wild type*, WT). Selain itu, peningkatan jumlah sel keradangan, sitokin pro-keradangan, dan kadar kematian sel dalam tisu paru-paru akibat pemberian PPE didapati lebih ketara dalam kumpulan MT-KO berbanding WT. Hasil sistem pengimejan secara *in vivo* kajian tersebut juga menunjukkan bahawa penghasilan ROS dalam paru-paru akibat PPE meningkat dengan signifikan dalam kumpulan MT-KO berbanding WT. Penemuan ini mencadangkan bahawa MT berpotensi bertindak untuk mengurangkan penghasilan ROS terhadap kecederaan paru-paru yang

disebabkan oleh elastase. Tambahan pula, peranan MT-3 dalam pengawalan penghasilan ROS telah dikaji semasa proses pembezaan osteoblas dalam sel C2C12 (Li et al. 2021a). Hasil kajian tersebut menunjukkan bahawa ekspresi berlebihan MT-3 berupaya mengurangkan penghasilan ROS, manakala penindasan ekspresi MT-3 menyebabkan peningkatan yang signifikan dalam penghasilan ROS. Penemuan ini mengukuhkan lagi peranan MT sebagai komponen penting dalam mekanisme perlindungan sel terhadap tekanan oksidatif.

#### **b. Pengawalaturan Homeostasis Logam**

Ion logam wujud secara meluas dalam otak dan memainkan peranan penting dalam pelbagai proses fisiologi dalam CNS, termasuk metabolisme tenaga, sintesis protein, replikasi DNA, pembentukan protein membran, serta sintesis mielin dan neurotransmitter (Devos et al. 2022; Díaz et al. 2022; Gromadzka et al. 2020; Jia et al. 2023). Namun begitu, ketoksikan logam boleh berlaku akibat pengumpulan berlebihan sama ada daripada logam perlu (*essential metals*), seperti ferum, kuprum, dan zink, mahupun logam tidak perlu (*non-essential metals*), seperti kadmium, plumbum, dan merkuri. Walaupun logam tidak perlu ini tidak terlibat dalam proses biologi manusia, tetapi kehadiran berlebihan dalam tubuh boleh mencetuskan neurotoksisiti dan menjejaskan fungsi neurologi (Crichton 2016). Ketidakseimbangan homeostasis logam turut dikaitkan dengan gangguan terhadap rintangan darah-bendalir serebrospina (*blood-cerebrospinal fluid barrier*, BCB) yang seterusnya menyebabkan ketidakseimbangan logam dalam bendalir serebrospina (*cerebrospinal fluid*, CSF) yang berpotensi mencetuskan keradangan neuron berperantaraan-mikroglia di kawasan otak berhampiran ventrikel serebrum (Nakagawa & Chiba 2016). Oleh itu, pendedahan kepada logam berat secara kronik dikaitkan dengan pengaktifan sitokin pro-keradangan, yang menyumbang kepada degeneratif neuron akibat proses keradangan neuron. Logam berat juga mengganggu homeostasis redoks dengan merangsang penghasilan radikal bebas dan menurunkan tahap antioksidan dalam sel (Jomova et al. 2010). Peningkatan tekanan oksidatif secara mendadak boleh menyebabkan pengumpulan protein akibat perubahan dalam fungsi sistem *ubiquitin-proteasome* (UPS). Kegagalan fungsi UPS menyebabkan pengumpulan agregat protein yang mengganggu proses sel dan akhirnya mengakibatkan kematian sel (Dias et al. 2013). Selain itu, logam berat turut merencat

sintesis ATP dalam mitokondria, yang seterusnya menyebabkan gangguan metabolisme dan kematian neuron DA (Raj et al. 2021).

Homeostasis ferum dalam otak memainkan peranan penting dalam perkembangan otak serta pengawalan fungsi neuron dalam keadaan fisiologi normal. Kepekatan ferum lebih tinggi di substantia nigra (SN) dan ganglia basal yang sihat berbanding kawasan otak lain kerana ferum berfungsi sebagai kofaktor kepada tirosina hidroksilase (TH), iaitu kadar pengehad enzim dalam sintesis dopamin (Garza-Lombó et al. 2018; Ghassaban et al. 2019; Götz et al. 2004). Sebaliknya, pengumpulan ferum dalam SN pesakit PD meningkat secara tidak normal dan didapati berkorelasi dengan tahap keterukan penyakit (Genoud et al. 2017; Wise et al. 2022). Ferum berlebihan boleh mencetuskan tekanan oksidatif dan kematian sel melalui mekanisme pemangkinan penghasilan radikal hidroksil yang sangat toksik menerusi tindak balas Fenton serta pengoksidaan tanpa enzim dopamin dalam sitosol untuk membentuk sebatian kuinon dopamin (Stokes et al. 1999). Selain itu, pengumpulan ferum turut mencetuskan ferroptosis, iaitu laluan kematian sel unik yang bergantung kepada ferum melalui mekanisme pemperoksidaan fosfolipid (Stockwell et al. 2020). Tambahan pula, kehadiran ferum bebas dapat meningkatkan pengagregatan  $\alpha$ -sinuklein dengan memangkinkan pembentukan oligomer (Jansen Van Rensburg et al. 2021). Oleh itu, neuron DA mudah terdedah kepada kerosakan akibat kandungan ferum yang tinggi dalam SN.

Memandangkan pelbagai kajian telah menunjukkan bahawa ketidakseimbangan homeostasis ferum dalam otak mempunyai hubungan rapat dengan patogenesis penyakit degeneratif neuron seperti penyakit Alzheimer dan PD (Li et al. 2024b; Peng et al. 2021; Wise et al. 2022). Oleh yang demikian, peningkatan tahap ferum dan kuprum, telah dikenal pasti sebagai faktor utama yang mendorong pengagregatan  $\alpha$ -sinuklein, iaitu ciri utama PD. Strategi pengkelatan logam berpotensi menjadi pendekatan terapeutik yang berkesan dalam mengurangkan kesan degeneratif neuron ini (Gonzalez-Alcocer et al. 2023). Kajian yang menggunakan model PD menunjukkan bahawa pengkelatan ferum dapat mengurangkan pengagregatan patologi  $\alpha$ -sinuklein serta tekanan oksidatif (Dexter et al. 2011; Febbraro et al. 2013; Kaur et al. 2003). Dalam konteks ini, MT dikenal pasti sebagai protein yang mampu berinteraksi dengan

$\text{Fe}^{2+}$ , meskipun dengan afinitas yang lebih rendah berbanding zink dan kuprum. Oleh itu, mekanisme perlindungan yang melibatkan keupayaan MT untuk menghalang ferroptosis dan mengurangkan pengagregatan  $\alpha$ -sinuklein melalui sifat pengikatan ferum serta aktiviti anti-pengoksidaannya (McLeary et al. 2019; Zhang et al. 2022b). Orihuela et al. (2011) melaporkan bahawa kompleks Zn-MT boleh berfungsi sebagai penderma elektron bagi boleh menurunkan  $\text{Fe}^{3+}$  dalam ferritin kepada  $\text{Fe}^{2+}$ , kemudiannya membebaskan  $\text{Fe}^{2+}$  dari ferritin. Dalam proses ini, tiolat dalam MT mengalami pengoksidaan sepenuhnya kepada disulfida, yang seterusnya menyebabkan pembebasan  $\text{Zn}^{2+}$ . Penemuan ini mencadangkan bahawa pembebasan  $\text{Fe}^{2+}$  dari ferritin yang dimediasi oleh kompleks Zn-MT boleh berlaku dalam keadaan tekanan oksidatif. Namun begitu, sehingga kini, peranan pelepasan  $\text{Fe}^{2+}$  dan  $\text{Zn}^{2+}$  dalam keadaan fisiologi masih belum dapat dipastikan secara muktamad, sama ada bertindak sebagai mekanisme perlindungan atau sebaliknya mencetuskan ketoksikan sel. Hal ini demikian kerana  $\text{Fe}^{2+}$  bebas yang berlebihan bersifat sangat reaktif dan berupaya mencetuskan tekanan oksidatif melalui tindak balas Fenton serta mendorong ferroptosis (Han et al. 2022). Sebaliknya,  $\text{Fe}^{2+}$  pada kepekatan sederhana berpotensi memberikan kesan perlindungan dengan menyokong aktiviti enzim antioksidan utama, seperti katalase dan peroksidase, yang dapat memecahkan  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Ren et al. 2026). Begitu juga,  $\text{Zn}^{2+}$  berperanan sebagai antioksidan dan menyokong pertahanan sel melalui induksi MT dan enzim antioksidan (Kreżel & Maret 2007; Yang et al. 2024c). Namun  $\text{Zn}^{2+}$  yang berlebihan dalam sitoplasma boleh mengaktifkan laluan kematian sel, termasuk apoptosis dan autofagi (Schoofs et al. 2024).

### c. Peranan Anti-Keradangan MT

Sebarang tindak balas fisiologi yang menyebabkan kerosakan kepada tubuh akan mencetuskan proses keradangan. Walaupun keradangan akut secara semula jadi bersifat autopengawalan, tetapi intervensi tetap diperlukan bagi mengawal tindak balas ini serta mengembalikan sistem imun kepada keadaan homeostasis normal (Yang et al. 2021). Keradangan neuron kronik secara konsisten dikaitkan dengan patofisiologi PD. Sel glia yang diaktifkan, terutamanya mikroglia, memainkan peranan utama dalam mekanisme keradangan neuron. Sebagai tindak balas terhadap rangsangan, mikroglia merembeskan sitokin pro-keradangan seperti IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  dan prostaglandin, yang kemudiannya memperkukuh pengaktifan mikroglia melalui

pengisyaratan autokrin (*autocrine signalling*) (Collins et al. 2012). Kajian terdahulu melaporkan bahawa pengaktifan mikroglia dan peningkatan tahap sitokin IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, dan TNF- $\alpha$  dikesan dalam substansia nigra pesakit PD (Collins et al. 2012; McGeer et al. 1988). Selain itu, tahap IL-1 $\beta$  dalam plasma menunjukkan korelasi positif dengan skala pementasan Hoehn dan Yahr serta skor Bahagian III *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS), yang mencerminkan tahap keterukan PD (Fan et al. 2020). Mikroglia juga diaktifkan sebagai tindak balas terhadap kerosakan neuron, dan pengaktifan ini dipercepatkan oleh suap balik positif daripada degenerasi neuron. Oleh itu, perencatan kitar berulang pengaktifan mikroglia akibat neurotoksik adalah penting bagi melindungi sistem saraf, khususnya dalam PD, kerana neuron DA dalam SNpc sangat rentan terhadap ketoksikan akibat kepadatan mikroglia yang tinggi dalam kawasan ini (Kim et al. 2000).

MT memainkan peranan penting dalam mekanisme anti-keradangan dengan mengurangkan tahap IL-1, IL-6, IL-12 and TNF- $\alpha$  melalui keupayaannya menyingkir ROS, yang kemudiannya mengurangkan tekanan oksidatif dalam sel (Penkowa 2006; Penkowa et al. 2005). Penkowa (2006) melaporkan bahawa ekspresi MT-1 yang berlebihan dapat mengurangkan tahap IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , serta enzim *matrix metalloproteinases* (MMP-3, MMP-9), di samping meningkatkan tahap sitokin anti-keradangan IL-10 dalam hipokampus mencit transgenik berbanding mencit jenis liar. Terdapat beberapa kajian telah menunjukkan bahawa IL-1, IL-6, dan TNF- $\alpha$  boleh mencetuskan ekspresi MT melalui laluan pengisyaratan STAT (Kitamura et al. 2017; Lee et al. 1999; Mori et al. 2011). Oleh itu, peningkatan ekspresi MT yang disebabkan oleh sitokin ini dipercayai memiliki mekanisme perlindungan terhadap keradangan. MT menunjukkan sifat anti-keradangan dengan menghalang laluan pengisyaratan PI3K/AKT, seterusnya menekan pengaktifan faktor transkripsi NF- $\kappa$ B, yang terlibat dalam penghasilan mediator pro-keradangan seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  (Guan et al. 2025; Kim et al. 2009). Kajian menunjukkan bahawa peningkatan ekspresi MT-1 dan MT-2 dalam astrosit serta mikroglia yang diaktifkan dapat mengurangkan tindak balas keradangan, sekali gus melindungi neuron DA daripada degenerasi lanjut (Dai et al. 2021; Inoue et al. 2009). Pengurangan sitokin pro-keradangan oleh MT berkemungkinan berlaku melalui penindasan pengaktifan mikroglia serta mekanisme yang dimediasi oleh zink. Kajian Gu et al. (2021) mendapati bahawa pengaktifan MT-1 dapat menghalang

pengaktifan mikroglia yang disebabkan oleh lipopolisakarida melalui pengawalan pemrograman semula metabolisme mikroglia. Kajian Giralt et al. (2002) pula menunjukkan bahawa mencit transgenik dengan ekspresi berlebihan MT-1 mengalami pengaktifan mikroglia yang lebih rendah serta penurunan sitokin pro-keradangan IL-1 $\beta$ , IL-6, dan TNF- $\alpha$  selepas kecederaan otak trauma. Sebaliknya, mencit dengan penyingkiran gen MT (MT-KO) menunjukkan peningkatan pengaktifan mikroglia selepas kecederaan otak (Giralt et al. 2002). Penemuan ini mencadangkan bahawa MT mampu merencat pengaktifan mikroglia, yang seterusnya mengurangkan kesan keradangan neuron. Selain itu, MT berfungsi sebagai pengiring zink (*zinc chaperone*) yang berperanan dalam pengaktifan enzim *matrix metalloproteinases* (MMP) bagi memperbaiki dan menjana semula tisu dalam keadaan keradangan (Jose et al. 2021). Dengan ini, zink diketahui penting dalam modulasi tindak balas keradangan (Jarosz et al. 2017). Kajian Hongxia et al. (2019) melaporkan bahawa zink dapat mengurangkan tindak balas keradangan yang terlibat mikroglia melalui pengawalan protein *Zn finger protein A20* (TNF- $\alpha$  induced protein-3, TNFAIP3), yang merupakan perencat keradangan bergantung kepada transkripsi NF- $\kappa$ B yang dicetuskan oleh TNF- $\alpha$ . Walau bagaimanapun, tahap zink yang berlebihan boleh membawa kesan neurotoksik jika tidak dikawal dengan baik. Oleh itu, MT memainkan peranan penting dalam mengekalkan homeostasis zink, memastikan keseimbangan antara kesan perlindungan dan ketoksikan zink, serta menyokong perlindungan saraf daripada keradangan.

Kajian terhadap sel sinovial yang dipencilkan daripada pesakit osteoarthritis mendapati bahawa ekspresi MT-1 dapat mengurangkan tahap sitokin pro-keradangan TNF- $\alpha$  dan IL-6 $\beta$  secara signifikan, sekali gus menunjukkan keupayaan MT dalam perencatan keradangan (Wang et al. 2019). Selain itu, ekspresi berlebihan MT-1 dalam hati model mencit CDAHFD menyebabkan penurunan ekspresi gen berkaitan keradangan dan fibrosis, termasuk *timp-1*, *coll1*, *ten- $\alpha$* , dan *mcp-1*. Penemuan ini menunjukkan bahawa MT-1 berpotensi dalam mengurangkan fibrosis hati dan meningkatkan pemulihan penyakit *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) (Li et al. 2022b). Tambahan pula, *naringenin* didapati dapat menurunkan ekspresi sitokin pro-keradangan dengan menggalakkan ekspresi MT-1G serta menghalang pengaktifan NF- $\kappa$ B. Sebaliknya, penyahfungsian (*knockdown*) gen MT-1G meningkatkan tahap sitokin pro-keradangan secara signifikan (Yang et al. 2021). Peningkatan ekspresi MT-1 dan

MT-2 dalam model mencit hepatitis alkoholik telah terbukti berkesan dalam mengurangkan tahap peroksida lipid, seperti 4-hidroksinonenal dan malondialdehid, serta menghalang pengaktifan tekanan kinase (Ma et al. 2020). Selain itu, MT-1 dan MT-2 juga mampu menghalang pembentukan osteoklas untuk mencegah osteoporosis serta kerosakan akibat artritis reumatoid (Royzman et al. 2022). MT-1 turut bertindak sebagai agen imunomodulator dengan mengawal proliferasi dan pembezaan sel imun, bertindak sebagai pengkemotarik (*chemoattractant*) untuk mengawal penyusupan sel, dan berkesan dalam mengurangkan tindak balas keradangan (Subramanian Vignesh & Deepe Jr 2017; Yin et al. 2005).

#### d. Perlindungan Terhadap Disfungsi Mitokondria

Disfungsi mitokondria mempunyai perkaitan rapat dengan patogenesis PD, yang merupakan ciri umum bagi PD sporadik dan kekeluargaan. Neuron DA dalam SNpc memerlukan jumlah ATP yang lebih tinggi berbanding sel lain kerana setiap neuron DA mempunyai sejumlah besar unjuran ke dalam striatum (Ni & Ernst 2022). Neuron DA di nigra juga didapati mempunyai kepadatan mitokondria yang lebih tinggi dalam akson serta peningkatan tahap *peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$*  (PGC-1 $\alpha$ ), iaitu pengawal utama bagi biogenesis mitokondria dan kadar penggunaan oksigen basal (Ni & Ernst 2022; Pacelli et al. 2015; Piccinin et al. 2021). Oleh itu, disfungsi mitokondria merupakan faktor utama yang menyumbang kepada kerentanan neuron DA. Mitofagi, iaitu degradasi selektif terhadap mitokondria yang rosak, merupakan mekanisme penting dalam mengekalkan kesihatan mitokondria. Terdapat banyak bukti menunjukkan bahawa degenerasi neuron dikaitkan dengan gangguan mitofagi. Mutasi gen Parkin dan PINK1 yang dikaitkan dengan PD autosomal resesif awal, berfungsi secara sinergistik untuk menyingkirkan mitokondria yang rosak melalui mekanisme mitofagi (Lazarou et al. 2015; Shiba-Fukushima et al. 2014; Springer & Kahle 2011).

Kehadiran MT dalam sel bergantung pada jenis sel tertentu, di mana MT biasanya ditemui dalam sitosol, nukleus, dan mitokondria (Ye et al. 2001). Namun begitu, kehadiran MT dalam lisosom juga telah dilaporkan (Hahn et al. 2001). MT bersaiz molekul yang kecil, iaitu kurang daripada 10 kDa, berupaya memasuki nukleus secara resapan pasif melalui bahagian larut air kompleks liang nukleus (Woo et al.

2000). MT berfungsi dalam pengawalan sel dengan meningkatkan ekspresi faktor transkripsi yang terlibat dalam pelbagai fungsi intrasel, termasuk pengawalan kitaran sel, pertumbuhan sel, pembezaan sel, serta pengawalaturan ROS setelah berada dalam nukleus (Lindeque et al. 2010). Dalam mitokondria, MT ditemui di ruang antara membran mitokondria (*intermembrane space*, IMS) (Ye et al. 2001). Kajian menunjukkan bahawa Apo-MT (thionein T), iaitu bentuk MT yang tidak berikatan dengan ion logam, berperanan dalam pemulihan fungsi respirasi sel yang terjejas akibat influks ion zink yang tidak normal (Ye et al. 2001). Sebaliknya, ion zink bebas atau MT yang berikatan dengan zink boleh menjejaskan fungsi mitokondria dengan merencat aktiviti sistem pengangkutan elektron mitokondria (Ye et al. 2001). Perencatan ini menjadi lebih ketara apabila residu lisin pada  $\beta$ -domain n-hujung MT mengalami proses karbamilasi (*carbamylation*), yang dikenal pasti sebagai faktor penting dalam penghantaran MT ke dalam mitokondria melalui membran luar mitokondria (Koh & Lee 2020).

Tambahan pula, terdapat beberapa kajian telah melaporkan peranan MT dalam melindungi fungsi mitokondria. Salah satu fungsi utama MT adalah mengekalkan homeostasis logam dan keseimbangan redoks yang dipercayai berkait rapat dengan kestabilan dan aktiviti mitokondria secara langsung. Mitokondria memerlukan ion kuprum untuk menjalankan fungsi kompleks pernafasan IV, sitokrom c oksidase dan enzim antioksidan Cu/Zn-SOD (Ruiz et al. 2021). Kuprum berperanan penting dalam mekanisme mitokondria, termasuk bioenergetik, dinamik mitokondria, serta proses mitofagi (Ruiz et al. 2021). Oleh sebab MT berfungsi sebagai pengiring kuprum (*Cu chaperone*), yang berpotensi dalam mengekalkan atau memulihkan aktiviti mitokondria. Terdapat kajian menunjukkan bahawa peningkatan ekspresi MT melalui penghasilan berlebihan *metal-responsive transcription factor-1* (MTF-1) berjaya memulihkan fungsi mitokondria dalam model lalat mutan parkin (Saini et al. 2011). Selain itu, kajian yang dilakukan oleh Kang et al. (2018) mendapati bahawa penghantaran antioksidan MT ke mitokondria melalui penggunaan *cell-penetrating artificial mitochondria-targeting peptide-conjugated human MT1A* (CAMP-hMT1A) dapat meningkatkan fungsi mitokondria serta memulihkan ekspresi TH dan aktiviti mitokondria dalam kultur sel. Suntikan CAMP-hMT1A secara stereotaktik ke dalam substantia nigra

mencit model parkinsonian juga dilaporkan dapat merencatkan degenerasi neuron DA serta memulihkan gangguan pergerakan (Kang et al. 2018).

Di samping itu, ion zink dalam sitosol boleh memasuki mitokondria dan mencetuskan kehilangan potensial membran mitokondria, bengkak mitokondria, peningkatan penghasilan ROS, serta penurunan tahap ATP dalam sel (Ji & Weiss 2018). Mitokondria juga berfungsi sebagai penerima utama ion ferum (Cerri et al. 2019a). Hasil analisis post-mortem menunjukkan bahawa pengumpulan ferum dalam mitokondria berlaku secara ketara. Pengumpulan ferum yang berlebihan ini boleh mengakibatkan gangguan bioenergetik serta peningkatan tekanan oksidatif akibat penghasilan ROS yang tinggi (Pizarro-Galleguillos et al. 2022). Kajian Prasuhn et al. (2022) mendapati bahawa tahap pengendapan ferum dalam otak mempunyai korelasi tinggi dengan tahap disfungsi mitokondria dalam pesakit PD idiopatik. Penemuan ini menekankan kepentingan penggunaan agen pengkelatan dalam pengurusan PD ini. Oleh itu, MT berpotensi mengurangkan disfungsi mitokondria dengan mengikat lebihan logam yang boleh menyebabkan tekanan oksidatif dan kerosakan sel.

Fungsi MT dalam pengawalan aktiviti mitokondria telah dibuktikan melalui pelbagai mekanisme. Sebagai contoh, kebolehidupan (*viability*) sel HeLa menunjukkan peningkatan yang signifikan apabila ekspresi MT-2A dipertingkatkan dalam keadaan di mana kompleks I sistem pengangkutan elektron mitokondria direncat oleh rotenone (Reinecke et al. 2006). Selain itu, kajian menggunakan mencit dengan penyingkiran gen MT (MT-KO) menunjukkan penurunan yang signifikan dalam tahap ATP hepar semasa pemberian diet kekurangan zink (Coyle et al. 2002). MT dalam mitokondria juga didapati mengawal ekspresi pelbagai gen yang terlibat dalam metabolisme tenaga, termasuk Gck (glukokinase), Elovl3 (elongase asid lemak rantai yang sangat panjang), Atp5a1 (ATP sintase), Pdxk (piridoksal kinase), serta Entpd5 (ektonukleosida trifosfat difosfohidrolase 5) (Miura & Koizumi 2005). Namun begitu, mekanisme neuroprotektif MT terhadap integriti sistem dopaminergik dalam model penyakit neurodegeneratif masih belum diterokai sepenuhnya. Perbezaannya dengan kajian ini adalah penggunaan protein hMT2 eksogen sebagai rawatan dalam model PD aruhan rotenone pada zebrafish. Penggunaan zebrafish juga berbeza dengan model sel

yang membolehkan penilaian dilakukan terhadap litar motor berfungsi yang homolog dengan ganglia basal manusia.

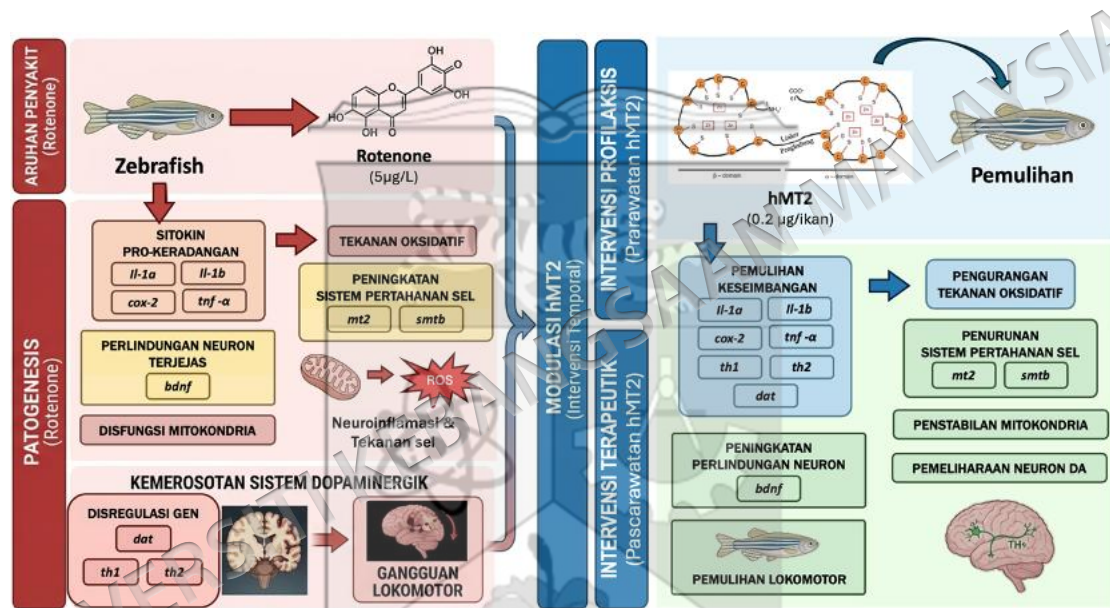
Secara keseluruhannya, kajian literasi dalam bab ini secara komprehensif merumuskan landskap patofisiologi PD sebagai gangguan neurodegeneratif kompleks yang memerlukan anjakan paradigma daripada sekadar pengurusan simptomatik kepada strategi rawatan yang dapat menyembuhkan punca PD dengan lebih berkesan. Sehubungan dengan itu, penggunaan rotenone sebagai agen neurotoksin dalam model zebrafish bertujuan untuk membangunkan model PD yang menyerupai ciri utama PD manusia, yang seterusnya membolehkan penilaian efikasi molekul terapeutik baharu dijalankan. Walau bagaimanapun, jurang literasi semasa menekankan keperluan kritikal untuk meninjau protein MT, khususnya varian hMT2, yang mempunyai keupayaan untuk bertindak secara neuroprotektif melalui modulasi homeostasis logam, keseimbangan redoks, dan penstabilan bioenergetik mitokondria. Hal ini penting bagi mengenal pasti intervensi sama ada pendekatan profilaksis atau terapeutik yang mampu membalikkan kesan kemerosotan neuron DA secara holistik.

## 2.6 KERANGKA KONSEP KAJIAN

Kajian ini disepadukan melalui kerangka konsep yang menghubungkan punca neurotoksisiti akibat pendedahan rotenone dengan keupayaan hMT2 sebagai modaliti rawatan alternatif untuk membalikkan kesan neurodegeneratif dalam model PD pada zebrafish. Kerangka ini berteraskan postulasi bahawa penggunaan rotenone untuk membangunkan model PD yang memanifestasikan kemerosotan aktiviti lokomotor yang disebabkan oleh kemerosotan populasi neuron DA berlabel TH<sup>+</sup>. Pembangunan model tersebut dicirikan oleh gangguan sistemik yang merangkumi penurunan ekspresi gen berkaitan DA (*dat*, *th1*, *th2*), gen perlindungan neuron (*bdnf*), serta pelemahan sistem pertahanan sel (*mt2*, *smtb*). Selain itu, model ini juga mempamerkan kerosakan molekul melalui peningkatan tekanan oksidatif, pengaktifan gen sitokin pro-keradangan (*il-1a*, *il-1b*, *cox-2*, *tnf- $\alpha$* ), dan kerosakan pada profil respirasi mitokondria.

Dalam konteks ini, protein hMT2 bertindak sebagai modulator yang berupaya memulihkan keseimbangan sistem dopaminergik merentas kesemua parameter tersebut. Keupayaan hMT2 dalam mengikat logam toksik dan menyingkirkan radikal bebas

dilihat sebagai mekanisme asas yang membolehkan pemulihan fungsi mitokondria dan penindasan lata keradangan. Kajian ini menilai efikasi rawatan hMT2 menerusi dua pendekatan temporal, iaitu intervensi profilaksis dan intervensi terapeutik. Intervensi profilaksis yang bertujuan membina rintangan neurobiologi sebelum permulaan kerosakan, manakala intervensi terapeutik yang memfokuskan kepada pemulihan fungsi neuron yang telah terjejas. Integrasi parameter biokimia, genetik, dan imunohistokimia ini membentuk satu naratif mekanistik yang komprehensif bagi menentukan paradigma rawatan hMT2 yang paling optimum untuk merencat perkembangan patogenesis PD secara holistik.



Rajah 2.13 Kerangka konsep mekanisme neuroprotektif hMT2 terhadap model PD aruhan rotenone pada zebrafish

## **BAB III**

### **KAEDAH KAJIAN**

#### **3.1 HAIWAN KAJIAN**

Semua protokol kajian ini telah dilaksanakan dengan mematuhi mengikut garis panduan dan piawaian etika yang diluluskan oleh Jawatankuasa Etika Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia (Nombor Rujukan: ANAT/FP/2020/SEONG LIN/16-JAN./1076-JAN.-2020-DEC.-2020).

Sebanyak 228 ekor zebrafish yang berumur empat bulan dibeli dari kedai akuarium tempatan telah digunakan dalam kajian ini. Semua ikan zebrafish ditempatkan di dalam makmal zebrafish Jabatan Anatomi, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia berdasarkan protokol piawai (Westerfield 1995). Ikan ditempatkan dalam tangki ikan yang berisipadu 3 L dengan kepadatan lima ekor per L yang disyorkan oleh Institusi Jawatankuasa Penjagaan dan Penggunaan Haiwan, Universiti California San Francisco (Institutional Animal Care and Use Program 2019). Ikan ditempatkan dalam air yang dinyahklorinan pada  $27 \pm 1$  °C dengan kawalan kitaran siang dan malam menggunakan cahaya lampu (14 jam siang – 10 jam malam). Ikan diberi makan dua kali sehari dengan makanan kering komersial (New Life Spectrum Thera+A, USA). Tempoh penyesuaian ikan selama dua minggu kepada keadaan makmal sebelum menjalankan aktiviti eksperimen.

#### **3.2 BAHAN KIMIA**

##### **3.2.1 Rawatan Zebrafish**

Ikan didedahkan kepada larutan rotenone (Cat #R8875, Sigma-Aldrich, USA) dengan kepekatan pada 5 µg/L selama 28 hari untuk mengaruhkan model PD (Ünal et al. 2020). Semua ikan tersebut diasingkan daripada sistem perumahan ikan zebrafish (*Zebrafish housing system*) untuk mengelakkan pencemaran ke persekitaran yang sedia ada.

Medium ditukar setiap dua hari untuk mengekalkan kebersihan persekitaran. Protein MT manusia (hMT2, Cat #AB112324, Abcam, USA) digunakan sebagai agen terapi dan pencegahan kepada model PD dalam kajian ini. Larutan stok hMT2 ini disediakan dengan melarutkan 66.67  $\mu\text{L}$  PBS ke dalam tiub ependorf yang mengandungi liofilisasi hMT2 untuk menghasilkan larutan stok pada kepekatan 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Kemudiannya, larutan kerja yang berkepekatan pada 0.2  $\mu\text{g}$  disediakan dengan mencairkan 2  $\mu\text{L}$  larutan stok dalam 98  $\mu\text{L}$  PBS.

### 3.2.2 Agen Pelali

Etil 4-aminobenzoat, 98 % (benzokaina, Acros, USA) digunakan sebagai agen pelali kepada ikan sebelum rawatan hMT2 melalui suntikan intrakranial. Larutan stok ini disediakan dengan melarutkan 25 g etil 4-aminobenzoat dalam 75 % etanol yang berisipadu 250 mL untuk menghasilkan larutan stok pada kepekatan 100 mg/mL. Kemudiannya, larutan kerja yang berkepekatan pada 70 mg/L disediakan dengan mencairkan 140  $\mu\text{L}$  larutan stok dalam 199.86 mL air sistem.

### 3.2.3 Analisis Lokomotor

Cecair yang digunakan dalam analisis lokomotor ialah air sistem bersuhu pada  $27 \pm 1$  °C.

### 3.2.4 Analisis Mikrosusun (*Microarray*)

Bahan yang digunakan dalam analisis mikrosusun termasuk reagen TRIzol (Invitrogen, USA), klorofom, isopropil alkohol, 75 % etanol, air suling yang bebas daripada RNase, *Once-Colour Low Input Quick Amp Labelling Kit* (Agilent, Valencia, CA), dan Kit Mini RNeasy (Qiagen, Valencia, CA).

### 3.2.5 Kajian Analisa Tindakbalas Berantai Polimerase Kuantitatif Kadar Semasa (qPCR)

Bahan yang digunakan untuk untuk mengekstrak RNA dari sampel otak zebrafish termasuk reagen TRIzol (Invitrogen, USA), klorofom, isopropil alkohol, 75 % etanol dan air suling yang bebas daripada RNase. cDNA dihasilkan daripada 500 ng RNA dengan menggunakan *ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit* mengikut garis

panduan pengilang (New England BioLabs<sup>®</sup> Inc., USA). Kemudiannya, qPCR dilakukan dengan menggunakan Luna<sup>®</sup> Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs<sup>®</sup> Inc., USA).

### 3.2.6 Kajian Immunohistokimia

Bahan yang digunakan untuk kajian immunohistokimia termasuk 4 % paraformaldehid (Sigma-Aldrich, USA), 20 % sukrosa (Fisher Chemical, USA), sebatian suhu pemotongan optimal Tisu-Tek (OCT, Sakura Finetek, USA), antibodi tirosina hidroksilase (Cat #22941, Immunostar, USA), Dako ARK<sup>™</sup> Peroksida untuk antibodi primer tikus (Cat #K3954, Dako, USA) yang mengandungi blok peroksida, reagen biotilasi, reagen penghalang, streptavidin-peroksida, DAB<sup>+</sup> penimbal substrat dan DAB<sup>+</sup> kromogen, pencair antibodi (Cat #S0809, Dako, USA), larutan penimbal fosfat (PBS, 1<sup>st</sup> Base, Singapura), xilena, pelekap DPX (Fisher Chemical, USA).

### 3.2.7 Kajian Pemperoksidaan Lipid

Bahan yang digunakan untuk kajian pemperoksidaan lipid termasuk PBS dan *TBARS Quantichrom<sup>™</sup> Assay Kit* (BioAssay Systems, USA) yang mengandungi 25 mL reagen asid thiobarbiturik (TBA), 6 M malondialdehid (MDA) dan 25 mL 10 % asid trikloroasetik (TCA).

### 3.2.8 Asai Imunojerapan Berpaut Enzim (ELISA) untuk Dopamin

Bahan yang digunakan untuk ujian ELISA termasuk PBS dan kit ELISA Dopamin Ikan (Cat #SL0046FI, Sunlong Biotech, China) yang mengandungi larutan piawai dengan kepekatan pada 225 pg/mL, pelarut piawai, pelarut sampel, reagen konjugat enzim HRP, larutan kromogen A, larutan kromogen B, larutan berhenti dan larutan pencuci.

### 3.2.9 Ujian Respirasi Mitokondria

Bahan yang digunakan untuk pemencilan mitokondria termasuk air suling, koktel perencat protease (Cat #ab271306, Abcam, USA) dan *Mitochondria Isolation Kit for Tissue* (Cat #ab110169, Abcam, USA) yang mengandungi 30 mL penimbal pencuci dan 100 mL larutan penimbal pengasingan mitokondria. Kepekatan mitokondria seterusnya dikenal pasti dengan menggunakan *Bicinchoninic acid (BCA) Protein Quantification*

*Kit* (Cat #ab102536, Abcam, USA) yang mengandungi 100 mL reagen BCA, 2 mL reagen tembaga dan 1 mL larutan piawai BSA dengan kepekatan pada 10 mg/mL. Bahan yang digunakan untuk ujian respirasi mitokondria termasuk MitoPlate™ I-1 (Cat #14104, Biolog, USA), *Mitochondria Assay Solution* (Cat #72303, Biolog, USA), *Redox Dye MC* (Cat #74353, Biolog, USA), sodium L-malate (Cat #M1125, Sigma-Aldrich, USA) dan air milliQ.

### **3.3 ALAT RADAS**

#### **3.3.1 Rawatan rotenone**

Alat radas yang diperlukan semasa rawatan rotenone termasuk mikro pipet 200  $\mu$ L (Eppendorf, Jerman) dan tip pipet yang sesuai dengan isipadu 200  $\mu$ L.

#### **3.3.2 Rawatan hMT2**

Alat radas yang diperlukan semasa rawatan hMT2 termasuk jarum Neolus 26 G (Terumo, Jepun), tiub kapilari mikro (Hirschmann, Jerman), mikro pipet 1  $\mu$ L (Eppendorf, Jerman) dan tip pipet yang sesuai dengan isipadu 1  $\mu$ L, stereomikroskop Stemi 305 Trino (Carl Zeiss, Jerman), alat suntikan mikro (IM-9B, Narishige, Jepun).

#### **3.3.3 Pengorbanan Zebrafish**

Alat radas yang diperlukan semasa pengorbanan zebrafish termasuk stereomikroskop Stemi 305 Trino (Carl Zeiss, Jerman), forcep, bikar berisipadu 500 mL dan piring petri.

#### **3.3.4 Analisis Lokomotor**

Alat radas yang diperlukan dalam analisis lokomotor termasuk tangki akrilik lutsinar (panjang 242 mm, lebar 92 mm, ketinggian 100 mm), kamera web model C920 Pro HD (Logitech, Lausanne, Switzerland), perisian pengesanan video digital (SMART 3.0.02, Panlab Harvard Apparatus®).

#### **3.3.5 Analisis Mikrosusun**

Alat radas yang diperlukan dalam analisis mikrosusun termasuk mikropipet 1000  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 10  $\mu$ L dan 2  $\mu$ L (Eppendorf, Jerman), tip pipet yang sesuai dengan isipadu

1000  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  dan 2  $\mu\text{L}$ , Fisherbrand™ alu penggiling tisu (Thermo Fisher Scientific, USA), tiub eppendorf yang berisipadu 1.5 mL (Eppendorf, Jerman), mesin pengembar model 5810 R (Eppendorf, Jerman), spektrofotometer NanoVue™ Plus (GE Healthcare, UK), ketuhar hibridisasi mikrosusun (Agilent, USA), pengimbas mikrosusun SureScan (Agilent, USA), perisian *Agilent Feature Extraction* (Agilent, USA), dan Perisian Analisis GeneSpring Agilent (Agilent, USA).

### 3.3.6 Kajian Analisa PCR

Alat radas yang diperlukan untuk kajian qPCR termasuk mikropipet 1000  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  dan 2  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Jerman), tip pipet yang sesuai dengan isipadu 1000  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  dan 2  $\mu\text{L}$ , Fisherbrand™ alu penggiling tisu (Thermo Fisher Scientific, USA), tiub eppendorf yang berisipadu 1.5 mL (Eppendorf, Jerman), plát telaga 96 PCR (Bio-Rad Laboratories, United Kingdom), tiub jalur PCR (Bio-Rad Laboratories, United Kingdom), mesin pengembar model 5810 R (Eppendorf, Jerman), mesin pengempar mikro (Jouan, USA), mesin vortex PV-1 plus (Biosan, Latvia), mesin spektrofotometer Nanodrop (DeNovix, USA) dan mesin PCR Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, USA).

### 3.3.7 Kajian Immunohistokimia

Alat radas yang diperlukan untuk kajian immunohistokimia termasuk bekas plastik bertutup, jar Schifferdecker, slaid kaca bersalut 3-aminopropilsilane (APS, Muto Pure Chemicals, Jepun), slip penutup kaca bersaiz 24  $\times$  60 mm (Hirschmann®, Jerman), pen Dako (Cat #S2002, Dako, Denmark), dan mesin kriostat Microm HM550 VP (Thermoscientific, USA).

### 3.3.8 Kajian Pemperoksidaan Lipid

Alat radas yang diperlukan untuk kajian antioksidan termasuk Fisherbrand™ alu penggiling tisu (Thermo Fisher Scientific, USA), tiub eppendorf yang berisipadu 1.5 mL (Eppendorf, Jerman), mesin pengempar model 5810 R (Eppendorf, Jerman), alat mandian air (Memmert, Jerman), mesin vortex PV-1 plus (Biosan, Latvia) dan Multiskan Go monochromator microplate reader (Thermo Fisher Scientific, USA).

### 3.3.9 Ujian ELISA untuk Dopamin

Alat radas yang diperlukan untuk ujian ELISA ini termasuk Fisherbrand™ alu penggiling tisu (Thermo Fisher Scientific, USA), tiub ependorf yang berisipadu 1.5 mL (Eppendorf, Jerman), mesin pengempar model 5810 R (Eppendorf, Jerman), inkubator jenis BE500 yang ditetapkan pada suhu 37 °C (Mettler GmbH + Co. KG, Jerman) dan Multiskan Go monochromator microplate reader (Thermo Fisher Scientific, USA).

### 3.3.10 Ujian Respirasi Mitokondria

Alat radas yang diperlukan untuk ujian respirasi mitokondria ini termasuk penghomon Dounce (bersaiz 2 mL) dengan alu A dan B, forsep, tiub ependorf yang berisipadu 2.0 mL, mesin pengempar model 5810 R (Eppendorf, Jerman) dan Multiskan Go monochromator microplate reader (Thermo Fisher Scientific, USA).

## 3.4 KAEDAH

### 3.4.1 Haiwan Kajian

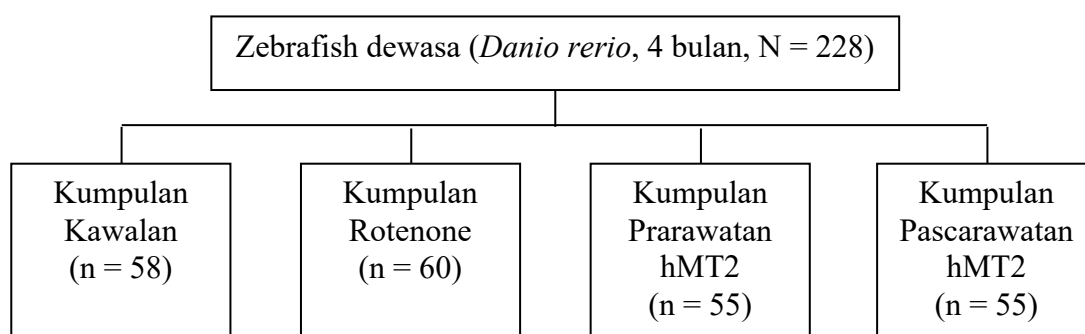
#### a. Pemeliharaan Zebrafish

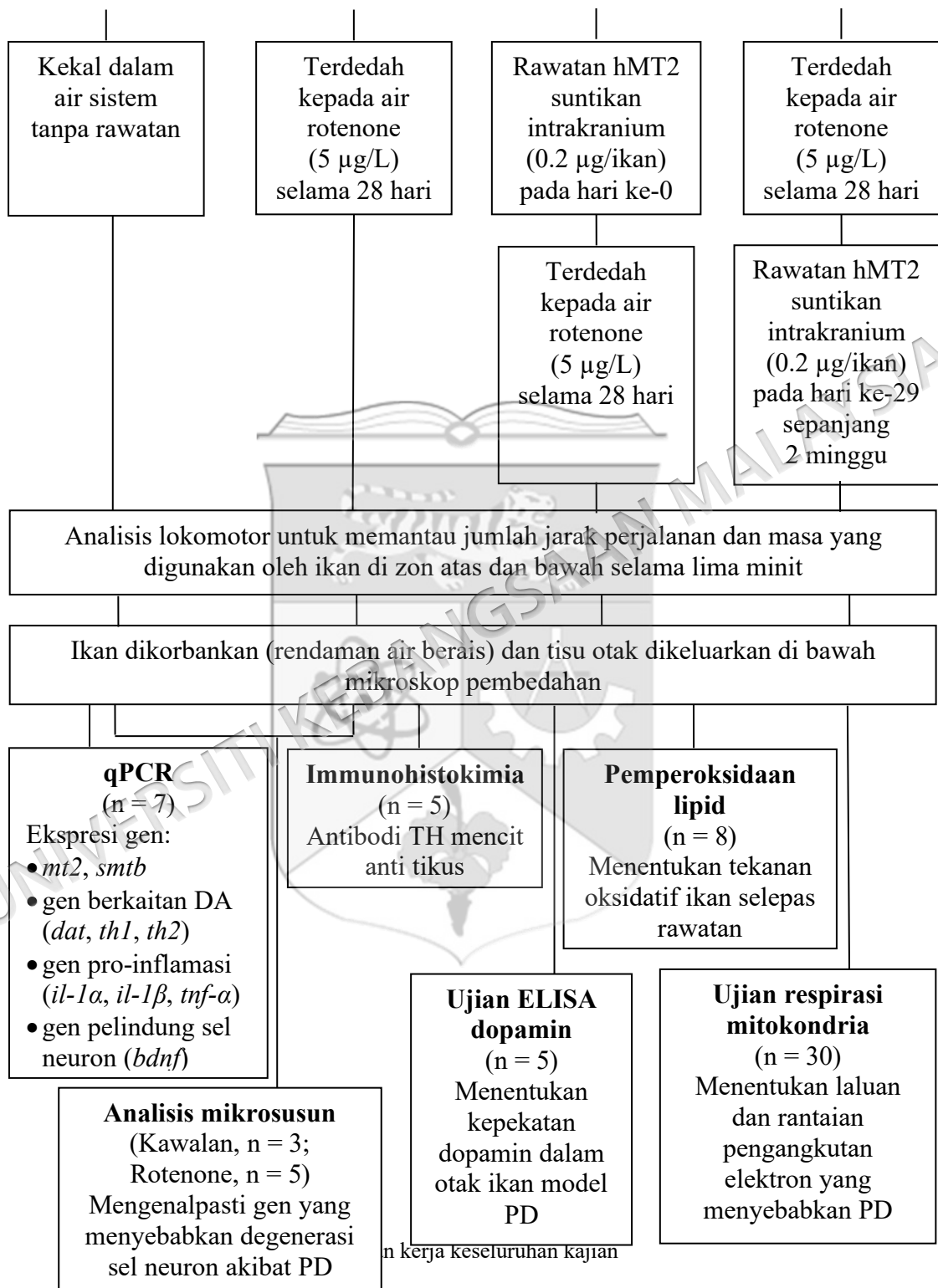
Sebanyak 228 ekor ikan telah digunakan dalam kajian ini, di mana 220 ekor ikan dibahagikan kepada empat kumpulan ( $n = 55$  setiap kumpulan), manakala lapan ekor ikan tambahan (kumpulan kawalan,  $n = 3$ ; kumpulan rotenone,  $n = 5$ ) diperuntukkan untuk analisis mikrosusun bagi mengenal pasti pengawal atur yang terlibat dalam proses neurodegenerasi. Kumpulan kawalan berperanan sebagai kawalan negatif dan tidak diberikan sebarang rawatan. Kumpulan rotenone diberikan rawatan rotenone sahaja sepanjang tempoh 28 hari. Kumpulan prarawatan hMT2 diberikan rawatan hMT2 terlebih dahulu pada hari ke-0, diikuti dengan pemberian rotenone bermula dari hari pertama hingga hari ke-28. Manakala kumpulan pascarawatan hMT2 diberikan rawatan rotenone terlebih dahulu dari hari pertama hingga hari ke-28, sebelum diberikan rawatan hMT2 bermula pada hari ke-29 selama dua minggu, iaitu sehingga hari ke-42.

Bagi membangunkan model PD pada ikan, ikan didedahkan kepada larutan rotenone pada kepekatan 5  $\mu\text{g/L}$  selama 28 hari. Medium tersebut ditukar setiap dua hari untuk mengekalkan kebersihan persekitarannya. Sementara itu, rawatan hMT2

diberikan melalui suntikan intrakranium pada dos 0.2  $\mu\text{g}$  bagi setiap ikan. Dos tersebut digunakan berdasarkan kajian terdahulu yang telah menentukan kepekatan optimum pemberian eksogen hMT2 kepada ikan yang mengalami kecederaan mekanikal otak, yang didapati berupaya meningkatkan ekspresi *mt2* dalam otak ikan (Teoh 2016). Peningkatan ekspresi *mt2* ini dikaitkan dengan pengaktifan mekanisme perlindungan sel, termasuk peningkatan proliferasi sel dan kapasiti antioksidan, pengurangan kadar apoptosis, serta penurunan tekanan oksidatif (Teoh 2016).

Ikan dibius dalam larutan benzokaina dengan kepekatan pada 70 mg/L sebelum rawatan hMT2 dengan melaksanakan suntikan intrakranium. Manakala ikan dikorbankan dengan direndamkan dalam air sejuk berair sebelum pengambilan tisu otak. Pengambilan tisu otak ikan dilakukan dengan menggunakan forcep di bawah mikroskop pembedahan. Tisu otak kemudiannya digunakan untuk kajian qPCR, immunohistokimia, pengoksidaan lipid, kandungan dopamin dan laluan pemindahan elektron respirasi. Semua ujian yang dilakukan dalam kajian ini dapat dirujukan pada Rajah 3.1.





**b. Rawatan Ikan****i. Rawatan Rotenone**

Penyediaan larutan rotenone perlu dilaksanakan dalam kebuk wasap. Pakaian baju makmal, sarung tangan, dan pelitup muka perlu dipakai semasa proses penyediaan. Permukaan ruang kerja juga perlu dinyahcemarkan terlebih dahulu dengan menggunakan larutan 75 % alkohol.

Untuk mengaruh PD pada zebrafish, ikan didedah kepada air rotenone dengan kepekatan pada 5  $\mu\text{g/L}$  selama 28 hari berdasarkan protokol kajian lepas (Ünal et al. 2020). Larutan stok rotenone disediakan dengan melarutkan 0.1 g serbuk rotenone ke dalam 200 mL air ultra tulen. Selepas itu, 25  $\mu\text{L}$  larutan stok rotenone dilarutkan ke dalam 2.5 L air sistem untuk menyediakan air rotenone yang berkepekatan pada 5  $\mu\text{g/L}$ . Medium tersebut ditukar setiap dua hari untuk mengekalkan kebersihan persekitaran ikan.

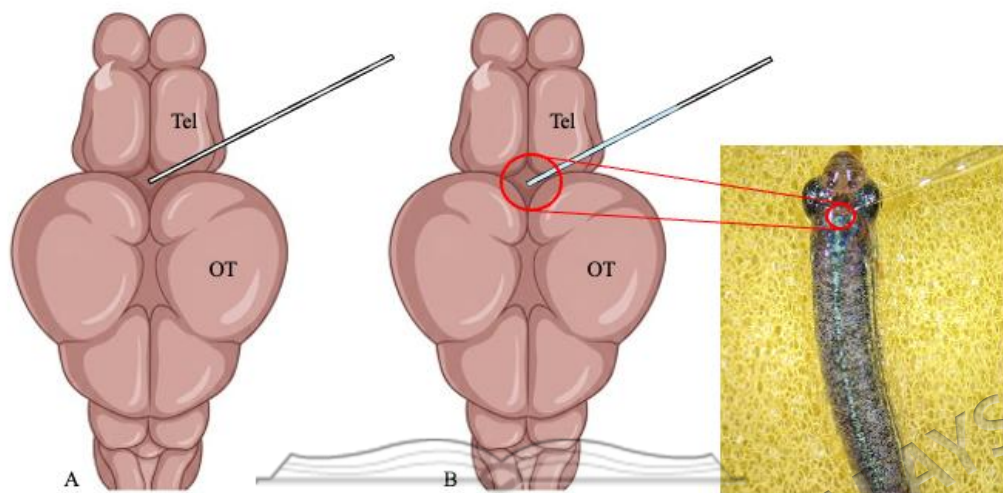
**ii. Agen Pelali**

Agen pelali yang digunakan dalam kajian ini ialah benzokaina. Sebelum rawatan MT secara suntikan intrakranium, ikan dibius dengan merendamkannya ke dalam larutan benzokaina yang berkepekatan pada 70 mg/L selepas beberapa kali mencuba julat kepekatan yang boleh diterima dari 25 mg/L hingga 100 mg/L berdasarkan Collymore (2020). Larutan stok benzokaina disediakan dengan melarutkan 25 g serbuk benzokaina ke dalam 250 mL 70 % etanol. Kemudian, sebanyak 140  $\mu\text{L}$  larutan stok benzokaina dicairkan di dalam 199.86 mL air sistem untuk menghasilkan 200 mL larutan benzokaina yang berkepekatan pada 70 mg/L.

**iii. Rawatan hMT2**

Ikan menerima suntikan 1  $\mu\text{L}$  yang mengandungi 0.2  $\mu\text{g}$  hMT2 secara intrakranium sehari sebelum dan selepas rawatan rotenone. Ikan yang telah dibius diapit dalam span yang direndam larutan benzokaina (Rajah 3.2). Jarum bersaiz 26 G digunakan untuk menggerudi lubang yang kecil pada tengkorak ikan (Rajah 3.2A). Selepas itu, larutan

hMT2 disuntik ke dalam tengkorak ikan melalui lubang yang telah buat menggunakan tiub kapilari mikro yang disambungkan pada alat suntikan mikro (Rajah 3.2B).



Rajah 3.2 Cara suntikan intrakranium pada tengkorak zebrafish yang telah dibius dan diapit dalam span

#### iv. Pengorbanan Zebrafish

Ikan dikorbankan selepas selesai rawatan rotenone dan hMT2 masing-masing. Ikan direndamkan dalam air ber ais ( $2 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) selama 10 minit selepas pemberhentian pergerakan operkular (iaitu, insang).

#### v. Pengambilan Tisu Otak

Ikan diletakkan dalam pinggan petri di bawah mikroskop pembedahan dan tisu otak dikeluarkan dengan berhati-hati menggunakan forseps.

#### 3.4.2 Analisis Lokomotor

Analisis lokomotor dinilai selepas selesai rawatan ikan masing-masing. Aktiviti lokomotor ikan dilakukan berdasarkan protokol yang diubah suai daripada Teoh (2016). Ikan diletakkan dalam tangki akrilik lutsinar (panjang 242 mm, lebar 92 mm, ketinggian 100 mm) yang mengandungi 2.5 L air dinyahklorin pada suhu yang sama dengan air dalam sistem perumahan ikan. Tingkah laku berenang bagi setiap ikan dirakam secara berasingan dengan menggunakan kamera web yang diletakkan kira-kira 0.5 m dari

depan tangki. Tangki itu dibahagikan sama rata kepada dua zon atas dan bawah. Sebelum sesi rakaman bermula, setiap ikan diletakkan di dalam tangki tersebut selama lima minit bagi tujuan aklimatisasi (penyesuaian diri). Setelah tempoh bertenang tamat, aktiviti lokomotor ikan dirakam selama lima minit bagi setiap sesi. Prosedur ini diulangi bagi setiap ikan mengikut giliran dengan menggunakan tangki rakaman yang sama. Video tersebut dianalisis dengan menggunakan perisian pengesanan video digital (SMART 3.0.02, Panlab Harvard Apparatus®, Holliston, MA, Amerika Syarikat).

### 3.4.3 Analisis Mikrosusun

#### a. Ekstraksi RNA dan Penghasilan cRNA

Ikan kumpulan kawalan ( $n = 3$ ) dan ikan yang dirawat dengan rotenone ( $n = 5$ ) dikorbankan untuk analisis mikrosusun. RNA diekstrak dari tisu otak menggunakan kaedah pemisahan fenol-kloroform. Pertama sekali, tisu otak dihomogenkan dalam tiub Ependorf yang mengandungi 400  $\mu\text{L}$  reagen TRIzol dengan menggunakan alu penggiling tisu secara manual.

Tisu yang telah dihomogenkan seterusnya dieramkan selama lima minit pada suhu bilik. Sebanyak 80  $\mu\text{L}$  kloroform dimasukkan ke dalam homogenat tersebut dan tiub Ependorf digoncang dengan perlahan selama 15 saat. Sampel tisu tersebut dieramkan sekali lagi pada suhu bilik selama tiga minit. Seterusnya, sampel tisu diemparkan pada kelajuan  $12,000 \times g$  pada suhu  $4^\circ\text{C}$  selama 15 minit. Hasilnya, campuran larutan tersebut terbahagi kepada tiga lapisan yang berbeza. Fasa akueus yang jernih di bahagian atas mengandungi RNA; interfasa yang berwarna putih di bahagian tengah dan fasa organik yang berwarna merah jambu di bahagian bawah mengandungi DNA, protein dan lipid.

Fasa akueus yang mengandungi RNA diekstrak dengan berhati-hati menggunakan mikropipet ke dalam tiub Ependorf yang baru. Sebanyak 180  $\mu\text{L}$  isopropil alkohol dimasukkan ke dalam tiub Ependorf yang mengandungi larutan akueus dan mengadunkannya dengan menyongsangkan 4 – 6 kali, diikuti dengan pengeraman pada suhu bilik selama 10 minit. Kemudiannya, larutan tersebut

diemparkan pada kelajuan  $12,000 \times g$  pada suhu  $4^\circ\text{C}$  selama 15 minit. Pemendakan RNA dapat dilihat di bahagian tepi dan bawah tiub dalam bentuk gel seperti pelet.

Dalam fasa pencucian pelet RNA, supernatan dikeluarkan dan meninggalkan pelet RNA di dalam tiub Ependorf. Pelet RNA dibasuh dengan menggunakan  $500 \mu\text{L}$  75 % etanol. Larutan pelet RNA seterusnya divortex dan diemparkan pada kelajuan  $12,000 \times g$  pada suhu  $4^\circ\text{C}$  selama 5 minit. Supernatan dibuang sekali lagi dan pelet RNA dibiarkan kering. Sebanyak  $20 \mu\text{L}$  air suling bebas RNase dimasukkan ke dalam tiub Ependorf yang telah kering dan disebatkan dengan mesin vortex. Akhirnya, kandungan RNA sampel tisu otak dikesan dengan menggunakan mesin spektrofotometer Nanodrop (Jadual 3.1).

Sejumlah 50 ng dari sampel RNA digunakan untuk penghasilan cRNA berlabel Cyanine-3 (Cy3) menggunakan *Once-Colour Low Input Quick Amp Labelling Kit* (Agilent, Valencia, CA) berdasarkan protokol pengilang. cRNA berlabel Cy3 disucikan dengan menggunakan *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA). Kualiti dan kuantiti hasil cRNA diperiksa menggunakan spektrofotometer NanoVue™ Plus (GE Healthcare, UK).

Jadual 3.1 Ringkasan proses menjalankan pengekstrakan RNA

Proses	Langkah	Reagen	Masa	Suhu
Lisis sel	Tisu otak dihomogenkan	$400 \mu\text{L}$ reagen TRIzol	5 minit	Suhu bilik
Homogenisasi	Homogenat digoncang dengan perlahan	$80 \mu\text{L}$ kloroform	15 saat	Suhu bilik
	Pengeraman homogenat	-	3 minit	Suhu bilik
Pemisahan fasa	Pengemparan sampel tisu pada kelajuan $12,000 \times g$	-	15 minit	$4^\circ\text{C}$
Pengekstrakan RNA	Fasa akueus dipindahkan ke tiub baru	-	-	Suhu bilik
Precipitasi RNA	Larutan akueus diadunkan dan disongsangkan 4 – 6 kali	$180 \mu\text{L}$ isopropil alkohol	-	Suhu bilik
	Pengeraman larutan akueus	-	10 minit	Suhu bilik
	Pengemparan larutan akueus pada kelajuan $12,000 \times g$	-	15 minit	$4^\circ\text{C}$
Pencucian pelet RNA	Supernatan larutan dikeluarkan dan pelet RNA dicuci dengan etanol	$500 \mu\text{L}$ 75 % etanol	-	$4^\circ\text{C}$
	Larutan pelet RNA divortex dan diemparkan pada kelajuan $12,000 \times g$	-	5 minit	$4^\circ\text{C}$
	Supernatan dibuang sekali lagi	-	10 minit	Suhu bilik

	dan pelet RNA dibiarkan kering			
Ampaian semula ( <i>resuspension</i> ) RNA	Kandungan RNA disebatikan dengan mesin vortex	20 $\mu$ L air suling bebas RNase		4 °C
Pengukuran RNA	Pengesanan kepekatan kandungan RNA	-	-	4 °C
Penyimpanan RNA	RNA disimpan untuk kegunaan selanjutnya	-	-	-80 °C

### b. Hibridisasi dan Pengimbasan Mikrosusun

Analisis mikrosusun dilaksanakan oleh Neoscience Sdn Bhd, Malaysia berdasarkan protokol pengilang (Agilent, USA). Sejumlah 0.825  $\mu$ g cRNA berlabel Cy3 dengan aktiviti khusus  $\geq 6$  pmol Cy3/ $\mu$ g cRNA dipecahkan pada suhu 60 °C selama 30 minit sebelum dihibridkan dengan segera kepada Agilent SurePrint G3 Human Gene Expression v3 8 $\times$ 60K (ID Reka Bentuk: 072363) selama 17 jam pada suhu 65 °C dalam ketuhar hibridisasi mikrosusun berputar Agilent. Selepas penghibridan, slaid mikrosusun dibasuh dan diimbas dengan menggunakan Pengimbas Mikrosusun SureScan Agilent (G4900DA) dengan resolusi 3  $\mu$ m pada panjang gelombang 532 nm (Cy3) menggunakan tetapan julat dinamik lanjutan (10 – 100 %). Keamatan yang dinormalkan diekstrak menggunakan Perisian Pengekstrakan Ciri Agilent, dan kemudiannya dimuat naik dalam Perisian Analisis GeneSpring Agilent untuk analisis selanjutnya.

### c. Analisis Data Bioinformatik

Analisis data dilakukan dengan menggunakan Perisian Analisis GeneSpring Agilent versi 14.9.1. Ekspresi gen pembezaan (*differentially expressed genes*, DEG) kemudiannya dikenal pasti melalui perubahan kali ganda serta nilai  $p$  yang dikira menggunakan ujian-t. Gen dengan nilai  $p$  yang diperbetulkan  $\leq 0.05$  dan perubahan kali ganda  $\geq 2$  dianggap sebagai DEG yang ketara. Selepas itu, analisis GO (<http://www.geneontology.org/>) dan analisis KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg>) digunakan untuk menentukan peranan DEG. Analisis pengelompokan (*clustering analysis*) dilakukan dengan menggunakan algoritma pengelompokan Hierarki pada nilai keamatan yang dinormalkan (*normalized intensity value*) dalam kalangan sampel.

### 3.4.4 Kajian Analisa qPCR

#### a. Ekstraksi RNA

RNA diekstrak dari tisu otak menggunakan kaedah pemisahan fenol-kloroform seperti yang dinyatakan dalam Rajah 3.1. Sebanyak tujuh tisu otak daripada setiap kumpulan digunakan untuk kajian qPCR.

#### b. Transkripsi Terbalik (*Reverse Transcription*)

Sebanyak 500 ng dari sampel RNA diekstrak digunakan untuk sintesis cDNA dengan proses transkripsi terbalik menggunakan ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit seperti Jadual 3.2.

Jadual 3.2 Isipadu komponen-komponen yang diperlukan untuk transkripsi terbalik

Komponen	Isipadu
Jumlah RNA	pelbagai
Campuran primer rawak	2 $\mu$ L
Air suling bebas RNase	sehingga jumlah isipadu mencapai 8 $\mu$ L

Sampel RNA dieramkan pada suhu 65 °C selama 5 minit untuk proses denaturasi. Selepas itu, sampel RNA diemparkan sekejap dan diletakkan di atas ais dengan segera. Sebanyak 10  $\mu$ L ProtoScript II Reaction Mix (2X) dan 2  $\mu$ L ProtoScript II Enzyme Mix (10X) ditambahkan ke dalam sampel RNA tersebut. Reaksi sintesis 20  $\mu$ L cDNA dieramkan pada suhu 25 °C selama lima minit diikuti oleh pengeraman pada suhu 42 °C selama satu jam dan proses ketidakaktifan enzim pada suhu 80 °C selama lima minit. Produk cDNA ini disimpan pada suhu -20 °C untuk kegunaan seterusnya.

#### c. Reka Bentuk Primer

Pertama sekali, pemilihan jujukan gen dilaksanakan di pautan pada <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Selepas itu, reka bentuk primer telah dilakukan di pautan <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Bagi mengesahkan keputusan analisis mikrosusun, sampel RNA kumpulan kawalan dan kumpulan yang dirawat dengan rotenone juga digunakan untuk menentukan tahap

ekspresi DEGs dengan menggunakan kajian qPCR. Maklumat primer DEGs dapat dirujukan dalam Jadual 3.3.

Di samping itu, gen-gen sasaran untuk menguji mekanisme PD dalam kajian ini termasuk *mt2*, *smtb*, gen berkaitan aktiviti dan penghasilan dopamin (*dat*, *th1*, *th2*), sitokin pro-keradangan (*il-1 $\alpha$* , *il-1 $\beta$* , *tnf- $\alpha$* ) dan perlindungan neuron (*bdnf*). Gen rujukan yang digunakan dalam kajian ini adalah  $\beta$ -aktin untuk normalisasi tahap ekspresi gen sasaran. Maklumat primer gen-gen sasaran dapat dirujukan dalam Jadual 3.4.

Jadual 3.3 Maklumat DEGs yang terperinci

Gen	Nombor akses	Jujukan primer (5'→3')	Saiz produk (bp)
<i>mat2ab</i>	NM_001014296.2	F: CGGCTATGACGACTCAACCA R: AGCCGAACATCAAACCCTGA	152
<i>lgals9l1</i>	NM_200072.1	F: TACCTCCAGGATGTGGGTTTC R: AGTCCCCCATTCATGACCGT	82
<i>gzm3</i>	NM_001128550.1	F: GCAGTTGAAGACTGAGCCA R: CTATCCATCCCACCAGCCAA	77
<i>themis</i>	NM_001346242.1	F: CAGGAGTTCACACACGCTCT R: TCATACACACAGCCCTGGTAG	89
<i>zdhhc3b</i>	NM_001077757.1	F: GTTCCAAAGGGAAACGCCAC R: CAGCGCTTACACACACTGC	134
<i>ccl34b.4</i>	NM_001115049.2	F: AGCTGACCATCACAAACAC R: GGGCGACGATAGTTGGCT	131
<i>lck</i>	NM_001001596.1	F: AGACGCAGCCAGGTAGTTTC R: AATCCACCTGCGTCCATGTT	103
<i>ciaol</i>	NM_200147.2	F: AGCGACGATCGAACCGTAAA R: GTCAGGCGACACCATGCAAT	137
<i>cd8a</i>	NM_001040049.1	F: ATCCCTCTTCTATGGATGCTCA R: GGTGCCTGACGTTTTAGGGT	85
<i>dedd1</i>	NM_131602.2	F: ATCATCATTGGAGAGCTGGTTC R: GCACGTCACTTTGTTGGGTG	146
<i>tyrobp</i>	NM_001100103.2	F: TCAACGGACTGTTTGGCTTTG R: AGCAATGAGGAGCGTGACAA	119
<i>il2rb</i>	NM_001128267.1	F: ACATACAAGCTGGGAGATGGC R: AGTTTTCGGCTCAACTGGCT	133
<i>LOC560232</i>	NM_001123254.1	F: CACAACCTGCTGTCAGTGTGGA R: TCTGGTTGGAGTGAATCCTGC	70
<i>LOC100331689</i>	NM_001199372.1	F: CAACTATGTGTAGATGGGCTTTCA R: TCTTGCCTCTGCACACTTCAT	70
<i><math>\beta</math>-actin</i>	NM_131031.2	F: CACGCTCAGCATTGTGAGTT R: CAACCATCACTCCCTGATGTC	218

Jadual 3.4 Maklumat gen yang terperinci

Gen	Nombor akses	Jujukan primer (5'→3')	Saiz produk (bp)
<i>mt2</i>	NM_001131053.2	F: TGC GAATGTGCCAAGACTGG R: CACTTGCAGGTAGCACCACA	50
<i>smtb</i>	NM_001201469.1	F: GACCAGTGTGACTGCTCCAA R: TGCCGCAACTTTTCTTGTCG	97
<i>dat</i>	AF318177.1	F: GAGTCGGGTTTGGTGTGCTA R: GGCCTCTCTGTAGCAGTTGT	71
<i>th1</i>	NM_131149.1	F: GAACATGGCGGGAGGTCTAC R: TCCAGTAACCGGAAAGCCTC	88
<i>th2</i>	NM_001001829.1	F: TTAGCGTTCGGGTTTTCCA R: CAGCAATCTGGTTCAGGGGA	80
<i>il-1<math>\alpha</math></i>	NM_001290418.1	F: AGCACCATGTCAGCACCAAT R: GGAACACCTGGATTGTCCACT	68
<i>il-1<math>\beta</math></i>	NM_212844.2	F: TTTGTGGGAGACAGACGGTG R: TG TAGCTCATTGCAAGCGGA	77
<i>tnf-<math>\alpha</math></i>	NM_212859.2	F: CTCCATAAGACCCAGGGCAA R: TGGCAGCCTTGGAAGTGAAA	97
<i>bdnf</i>	NM_131595.2	F: AGTTGCGCGGAGGTCTTATC R: GTTGGAACTTTACTGTCCAGTCG	87
<i><math>\beta</math>-aktin</i>	NM_131031.1	F: GCCTTCCTTCCTGGGTATGG R: ATGTCCACGTCGCACTTCAT	78

#### d. Penyediaan Reagen qPCR

Analisis qPCR dijalankan dengan menggunakan Luna<sup>®</sup> Universal qPCR Master Mix. Sebanyak 10  $\mu$ L 1X Luna Universal qPCR Mix, 1  $\mu$ L primer ke hadapan, 1  $\mu$ L ke belakang, 7  $\mu$ L air suling bebas RNase dan 1  $\mu$ L sampel cDNA diperlukan untuk analisis qPCR yang ditunjukkan dalam Jadual 3.5.

Jadual 3.5 Isipadu komponen-komponen yang diperlukan untuk analisis qPCR

Komponen	20 $\mu$ L reaksi
Luna Universal qPCR Mix	10 $\mu$ L
Primer ke hadapan	1 $\mu$ L
Primer ke belakang	1 $\mu$ L
DNA templat	1 $\mu$ L
Air suling bebas RNase	7 $\mu$ L

### e. qPCR

Analisis qPCR dilaksanakan dengan menggunakan mesin PCR Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler. Profil qPCR ditetapkan pada suhu 95 °C selama 60 saat untuk denaturasi awal, diikuti oleh 45 kitaran denaturasi pada suhu 95 °C selama 15 saat dan pemanjangan pada suhu 60 °C selama 30 saat. Akhirnya, lengkung lebur dapat diperolehi dalam julat suhu 65 °C dan 95 °C dengan kenaikan suhu 0.5 °C setiap lima saat selama 30 saat. Ringkasan proses menjalankan qPCR dapat dirujuk dalam Jadual 3.6. Analisis data berpandukan ekspresi relatif gen dikira dengan menggunakan formula  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .

Jadual 3.6 Ringkasan proses menjalankan qPCR

Proses	Suhu	Masa	Kitaran
Denaturasi awal	95 °C	60 saat	1
Denaturasi	95 °C	15 saat	40
Pemanjangan	60 °C	30 saat (+ bacaan plat)	
Lengkung lebur	60 – 95 °C	0.5 °C setiap 5 saat	1

### 3.4.5 Kajian Immunohistokimia

#### a. Penyediaan Tisu

Sebanyak lima tisu otak daripada setiap kumpulan diperlukan untuk kajian immunohistokimia dalam pengesanan neuron DA menggunakan antibodi TH. Tiga daripadanya digunakan untuk keratan koronal, manakala dua daripadanya digunakan untuk keratan sagital.

#### i. Penyediaan Paraformaldehid

Larutan stok 8 % paraformaldehid disediakan dengan mencampurkan 84.2 g serbuk paraformaldehid dan dua biji natrium hidroksida ke dalam 1 L air milliQ. Larutan tersebut kemudiannya dikacau dengan menggunakan pengacau magnet selama satu jam. Selepas itu, nilai pH larutan tersebut dilaraskan pada 7.2 – 7.4. Bagi menyediakan larutan kerja 4 % paraformaldehid, sebanyak 1 mL 8 % paraformadehid dicampurkan dengan 1 mL 2N PB yang bersamaan dengan nisbah 1:1.

**ii. Penyediaan 2N PB**

Sebanyak 31.2 g 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (monobasik) dan 35.1 g 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (dibasik) dicampurkan ke dalam 1 L air milliQ. Larutan tersebut kemudiannya dikacau dengan menggunakan pengacau magnet sehingga sebati dan kesemua campuran serbuk larut sepenuhnya.

**iii. Penyediaan Sukrosa**

Bagi menyediakan 20 % larutan sukrosa, sebanyak 5 g serbuk sukrosa dan 12.5 mL 2N PB dicampurkan ke dalam 25 mL air milliQ. Larutan tersebut dikacau sehingga kesemua serbuk larut sepenuhnya.

**iv. Penetapan Tisu Otak Zebrafish**

Selepas ikan dikorbankan dan tisu otak diekstrak, tisu otak direndam ke dalam larutan 4 % paraformaldehid pada suhu 4 °C selama enam jam, diikuti dengan 20 % larutan sukrosa pada suhu 4 °C semalaman. Tisu otak tersebut kemudiannya dibenamkan ke dalam sebatian OCT di atas air kering supaya OCT dapat dibeku dengan segera dalam bentuk blok. Seterusnya, blok tisu disimpan dalam peti sejuk beku pada suhu -80 °C sehingga proses keratan tisu dilakukan. Keratan koronal dan sagital yang berukuran 14  $\mu\text{m}$  dalam ketebalannya dilakukan dengan menggunakan mesin kriostat. Keratan tisu diletakkan di atas slaid kaca bersalut APS dan disimpan dalam peti sejuk beku pada suhu -80 °C sebelum proses imunohistokimia dilaksanakan.

**b. Penyediaan Slaid Tisu Kriostat**

Slaid tisu dinyahbeku selama lima minit dan dicelupkan ke dalam larutan penimbal PBS sebanyak tiga kali sebelum direndamkan ke dalam larutan penimbal PBS pada suhu bilik selama lima minit. Ulangi prosedur yang sama dengan merendamkan slaid tisu ke dalam larutan penimbal PBS pada suhu bilik selama lima minit satu kali lagi. Seterusnya, slaid tisu direndamkan ke dalam air milliQ pada suhu bilik selama lima minit juga. Kemudiannya, slaid tisu dikeringkan dengan menggunakan pengering. Garisan sempadan di antara keratan tisu dilukis dengan menggunakan pen Dako. Slaid tisu

kemudiannya direndamkan ke dalam air milliQ selama minit diikuti dengan larutan penimbal PBS selama lima minit juga.

### c. Pewarnaan Immunohistokimia

Kesemua reagen diseimbangkan untuk mencapai suhu bilik sebelum pewarnaan immunohistokimia dilaksanakan. Pewarnaan immunohistokimia dimulakan dengan membuang lebihan larutan penimbal PBS sebelum blok peroksida diletakkan di atas keratan tisu pada slaid. Kemudiannya, slaid tisu dieramkan pada suhu bilik selama lima minit. Seterusnya, slaid tisu dicelupkan ke dalam larutan penimbal PBS sebanyak tiga kali sebelum direndamkan ke dalam larutan penimbal PBS selama lima minit berterusan dua kali.

Larutan kerja antibodi primer TH dicairkan dengan faktor pencairan pada nisbah 1 : 500 dengan menambah reagen biotinilasi, reagen penghalang dan pencair antibodi. Biotinilasi antibodi primer ini diletakkan di atas keratan tisu pada slaid dan dieramkan dalam bekas bertutup yang lembap pada suhu 4 °C semalaman. Slaid tisu kemudiannya dicelupkan ke dalam larutan penimbal PBS sebanyak tiga kali sebelum direndamkan ke dalam larutan penimbal PBS selama lima minit berterusan dua kali.

Streptavidin-peroksida diletakkan di atas keratan tisu pada slaid dan dieramkan pada suhu bilik selama 15 minit. Slaid tisu kemudiannya dicelupkan ke dalam larutan penimbal PBS sebanyak tiga kali sebelum direndamkan ke dalam larutan penimbal PBS selama lima minit berterusan dua kali.

DAB<sup>+</sup> substrat-kromogen diletakkan di atas keratan tisu pada slaid dan dieramkan pada suhu bilik selama 10 minit sebelum dicelupkan ke dalam air milliQ sebanyak tiga kali diikuti dengan merendamkannya ke dalam air milliQ selama 10 minit. Ringkasan prosedur pewarnaan immunohistokimia dapat dirujuk dalam Jadual 3.7.

Jadual 3.7 Ringkasan prosedur pewarnaan immunohistokimia

Langkah	Cecair	Masa	Suhu
1	Blok peroksida	5 minit	Suhu bilik
	Larutan penimbal PBS	5 minit	Suhu bilik
	Larutan penimbal PBS	5 minit	Suhu bilik

2	Biotinilasi antibodi primer	Semalaman	4 °C
	Larutan penimbal PBS	5 minit	Suhu bilik
	Larutan penimbal PBS	5 minit	Suhu bilik
3	Streptavidin-peroksida	15 minit	Suhu bilik
	Larutan penimbal PBS	5 minit	Suhu bilik
	Larutan penimbal PBS	5 minit	Suhu bilik
4	DAB <sup>+</sup> substrat-kromogen	10 minit	Suhu bilik
	Air milliQ	10 minit	Suhu bilik

Slaid tisu dibiarkan kering dalam kebuk wasap pada suhu 37 °C semalaman. Kemudiannya, slaid tisu dibersihkan dengan merendamkannya ke dalam xilena selama satu hingga dua minit pada hari berikutnya. Penutup slaid dilekatkan ke atas slaid tisu dengan menggunakan pelekap DPX dan kemudiannya dibiarkan kering pada suhu bilik semalaman. Akhir sekali, sel imunoreaktif tirosina hidroksilase (TH<sup>+</sup>) dikira pada setiap 14 µm keratan tisu secara individu yang dijarakkan sekitar 50 µm dengan sekurang-kurangnya tiga keratan setiap otak dan dua otak untuk setiap kumpulan kajian.

### 3.4.6 Kajian Pemperoksidaan Lipid

Kajian pemperoksidaan lipid dilaksanakan dengan menggunakan TBARS Quantichrom™ Assay Kit. Bahan reaktif asid thiobarbiturik (TBARS) adalah produk akhir (terutamanya malondialdehid, MDA) yang terbentuk semasa penguraian produk pemperoksidaan lipid. Peningkatan tahap TBARS dapat ditunjukkan dalam serangan oksidatif komponen sel daripada ROS.

#### a. Penyediaan Sampel

Sekitar 20 mg tisu otak diletakkan ke dalam tiub Ependorf yang mengandungi 200 µL larutan penimbal PBS yang sejuk. Tisu otak tersebut kemudiannya dihomogenkan dengan menggunakan alu penggiling tisu secara manual. Sebanyak 100 µL tisu lisat dimasukkan ke dalam tiub ependorf yang berisipadu 1.5 mL. Seterusnya, sebanyak 200 µL 10 % TCA yang sejuk ditambah ke dalam 100 µL tisu lisat tadi. Campuran tersebut dieramkan di atas ais selama lima minit sebelum diemparkan pada kelajuan 14 000 rpm selama lima minit. Sebanyak 200 µL supernatan dipindahkan ke tiub Ependorf yang baru untuk prosedur seterusnya.

## b. Prosedur Asai Kolorimetrik

Mandian air disediakan dengan menetapkan suhu pada 100 °C. Kesemua reagen diseimbangkan untuk mencapai suhu bilik.

### i. Piawai

Tiub piawai diemparkan sekejap untuk menyebatkan sebarang MDA yang mungkin tersangkut pada penutup atau di sis tiub. Sebanyak 4  $\mu\text{L}$  6 M MDA dicampurkan dengan 2396  $\mu\text{L}$  air milliQ untuk mendapatkan 10 mM MDA. Seterusnya, 30  $\mu\text{M}$  MDA disediakan dengan mencampurkan 3  $\mu\text{L}$  10 mM MDA dengan 997  $\mu\text{L}$  air milliQ. Piawaian seterusnya dicairkan seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 3.8. Sebanyak 200  $\mu\text{L}$  setiap piawai dipindahkan ke dalam tiub ependorf yang berlabel masing-masing.

Jadual 3.8 Penyediaan pencairan bersiri MDA

No.	30 $\mu\text{M}$ MDA + H <sub>2</sub> O	Isipadu ( $\mu\text{L}$ )	MDA ( $\mu\text{M}$ )
1	300 $\mu\text{L}$ + 0 $\mu\text{L}$	300	30.0
2	180 $\mu\text{L}$ + 120 $\mu\text{L}$	300	18.0
3	90 $\mu\text{L}$ + 210 $\mu\text{L}$	300	9.0
4	0 $\mu\text{L}$ + 300 $\mu\text{L}$	300	0.0

### ii. Sampel

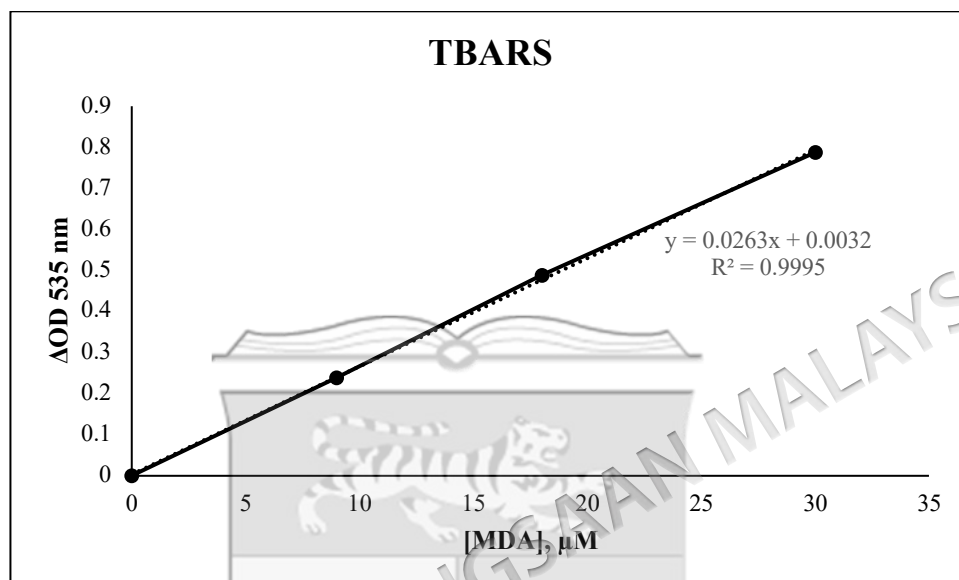
Sebanyak 200  $\mu\text{L}$  setiap sampel dipindahkan ke dalam tiub Ependorf secara berasingan.

### iii. Reaksi warna

Sebanyak 200  $\mu\text{L}$  reagen TBA ditambahkan ke dalam setiap piawai dan sampel masing-masing. Tiub-tiub tersebut divortexkan supaya campuran dapat digaul sebati. Kemudiannya, kesemua tiub dieramkan dalam mandian air pada suhu 100 °C selama 60 minit. Selepas itu, kesemua tiub diambil keluar dari mandian air dan dibiarkan menyejuk sehingga suhunya sama dengan suhu bilik. Tiub-tiub tersebut divortexkan semula sekejap untuk memastikan campuran dapat digaul sebati. Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  piawai dan sampel dari setiap tiub dipindahkan secara duplikat ke dalam plat telaga 96. Bacaan OD kemudiannya dibaca pada 535 nm (525 hingga 545 nm) dengan menggunakan Multiskan Go monochromator microplate reader.

#### iv. Penentuan kepekatan TBARS

OD kosong (bacaan dari piawai bernombor empat) ditolak daripada semua nilai piawai dan sampel. Graf  $\Delta OD_{535 \text{ nm}}$  terhadap kepekatan piawai diplotkan dan kecerunan lengkung piawai dapat ditentukan seperti dalam Rajah 3.3.



Rajah 3.3 Graf  $\Delta OD_{535 \text{ nm}}$  terhadap kepekatan piawai

Pengiraan kepekatan TBARS dalam setiap sampel dapat dilakukan dengan menggunakan formula yang berikut:

$$[\text{TBARS}] = \frac{R \text{ sampel} - R \text{ kosong}}{\text{Cerun } (\mu\text{M}^{-1})} \times n \text{ (bersamaan } \mu\text{M MDA)}$$

#### 3.4.7 Ujian ELISA untuk Dopamin

Ujian ELISA untuk dopamin dilaksanakan dengan menggunakan kit ELISA Dopamin Ikan.

##### a. Penyediaan sampel

Sekitar 10 mg tisu otak diletakkan ke dalam tiub Ependorf yang mengandungi 90  $\mu\text{L}$  larutan penimbal PBS yang sejuk. Tisu otak tersebut kemudiannya dihomogenkan dengan menggunakan alu penggiling tisu secara manual. Sampel tisu hendaklah

dikendalikan pada suhu 4 °C. Supernatan dikumpulkan dengan berhati-hati untuk prosedur ujian ELISA seterusnya selepas sampel tisu diemparkan pada kelajuan 2500 rpm selama 20 minit.

**b. Prosedur ujian ELISA**

**i. Pencairan piawaian**

Sebanyak 10 telaga diperlukan untuk piawaian dalam plat jalur mikroelisa. Pertama sekali, sebanyak 100 µL larutan piawai dan 50 µL penimbal pencairan piawai ditambahkan ke dalam telaga 1 dan telaga 2 masing-masing dan memastikan campuran tersebut dapat digaul sebati. Kemudiannya, sebanyak 100 µL larutan dari setiap telaga 1 dan telaga 2 dipindahkan ke dalam telaga 3 dan telaga 4 masing-masing. Pada masa yang sama, sebanyak 50 µL larutan piawai ditambahkan ke dalam telaga 3 dan telaga 4 dan memastikan campuran tersebut dapat digaul sebati. Selepas itu, sebanyak 50 µL larutan dibuang dari telaga 3 dan telaga 4. Sementara itu, sebanyak 50 µL larutan dipindahkan dari telaga 3 dan telaga 4 ke dalam telaga 5 dan telaga 6 masing-masing. Kemudiannya, sebanyak 50 µL larutan piawai ditambahkan ke dalam telaga 5 dan telaga 6 dan memastikan campuran tersebut dapat digaul sebati. Sebanyak 50 µL larutan dipindahkan dari telaga 5 dan telaga 6 ke dalam telaga 7 dan telaga 8 masing-masing. Pada ketika itu, sebanyak 50 µL larutan piawai ditambahkan ke dalam telaga 7 dan telaga 8 dan memastikan campuran tersebut dapat digaul sebati. Sebanyak 50 µL larutan dipindahkan dari telaga 7 dan telaga 8 ke dalam telaga 9 dan telaga 10 masing-masing. Sementara itu, sebanyak 50 µL larutan piawai ditambahkan ke dalam telaga 9 dan telaga 10 dan memastikan campuran tersebut dapat digaul sebati. Akhirnya, sebanyak 50 µL larutan dibuang dari telaga 9 dan telaga 10. Selepas pencairan piawaian, jumlah isipadu dalam setiap telaga ialah 50 µL dan kepekataannya ialah 150 pg/mL, 100 pg/mL, 50 pg/mL, 25 pg/mL, dan 12.5 pg/mL masing-masing.

**ii. Sampel**

Salah satu telaga dalam plat jalur mikroelisa dibiarkan kosong sebagai kawalan. Sementara itu, sebanyak 40 µL penimbal pencairan sampel dan 10 µL sampel ditambahkan ke dalam setiap telaga sampel. Perkara yang paling penting ialah sampel hendaklah dimasukkan terus ke bahagian bawah telaga tanpa menyentuh dinding telaga.

Kemudiannya, campuran tersebut dicampurkan dengan menggoncang perlahan plat jalur mikroelisa. Seterusnya, plat jalur mikroelisa ditutup dengan membran penutup plat dan dieramkan dalam ketuhar pada suhu 37 °C selama 30 minit.

### iii. Prosedur mencuci

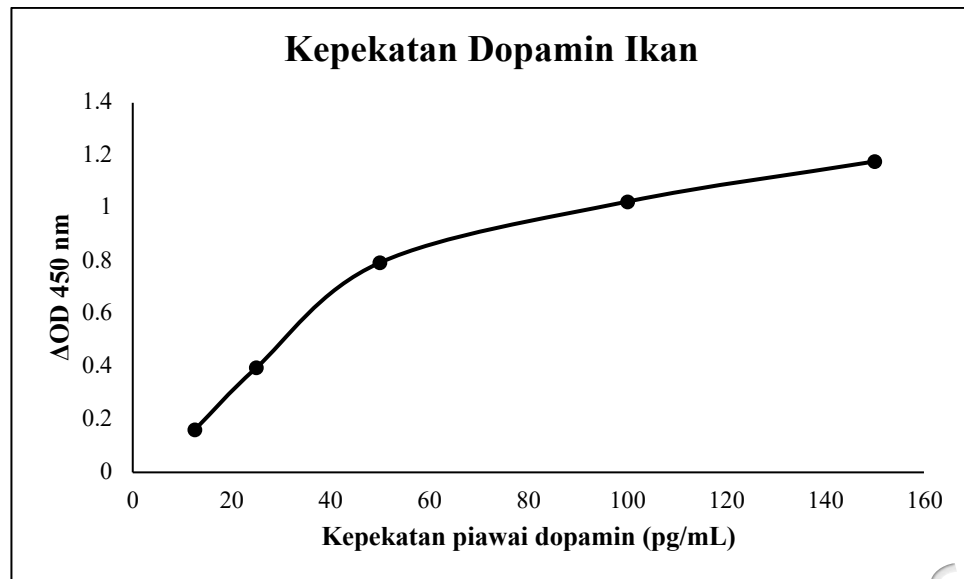
Penimbal pencuci pekat dicairkan dengan air suling yang bersamaan dengan nisbah 1:30. Membran penutup plat ditanggalkan dengan berhati-hati, campuran diaspirasikan dari setiap telaga dan diisi semula dengan larutan pencuci yang telah siap dicairkan. Larutan pencuci dibuangkan selepas meninggalkannya selama 30 saat. Prosedur mencuci ini diulangi sebanyak lima kali. Sebanyak 50 µL reagen konjugat enzim HRP ditambahkan ke dalam setiap telaga kecuali telaga kawalan kosong. Selepas itu, plat jalur mikroelisa ditutup dengan membran penutup plat dan dieramkan dalam ketuhar pada suhu 37°C selama 30 minit, diikuti dengan prosedur mencuci lagi sebanyak lima kali.

### iv. Reaksi warna

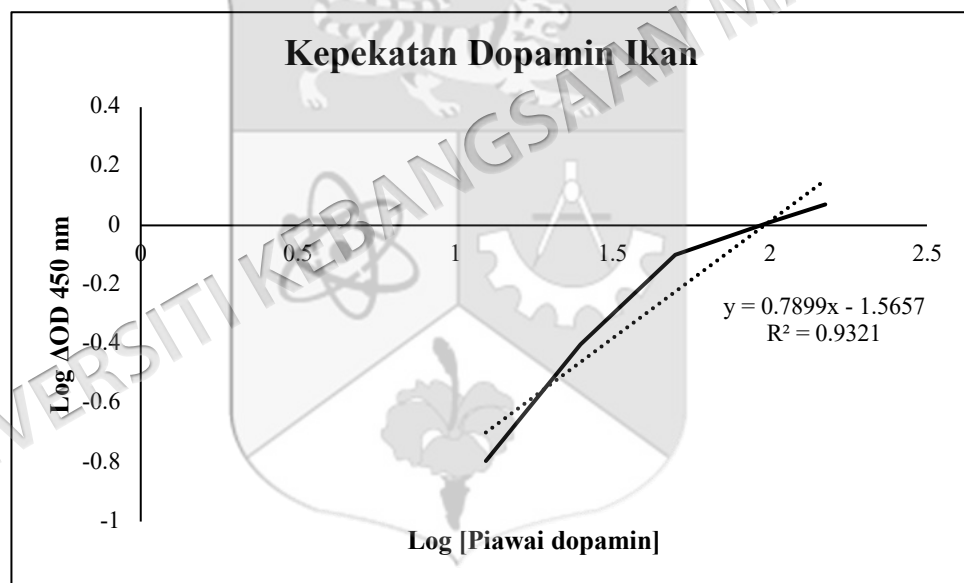
Prosedur mewarna ini perlu dilaksanakan dengan melindunginya daripada cahaya. Sebanyak 50 µL larutan kromogen A dan 50 µL larutan kromogen B ditambahkan ke dalam setiap telaga, campuran tersebut kemudiannya dicampurkan dengan menggoncang perlahan plat jalur mikroelisa dan dieramkan dalam ketuhar pada suhu 37 °C selama 15 minit. Akhirnya, sebanyak 50 µL larutan berhenti ditambahkan ke dalam setiap telaga untuk menamatkan tindak balas reagen-reagen dalamnya. Sementara itu, warna larutan dalam telaga berubah dari biru kepada kuning. Bacaan OD kemudiannya dibaca dalam masa 15 minit selepas menambah larutan berhenti pada 450 nm dengan menggunakan Multiskan Go monochromator microplate reader.

### v. Penentuan kepekatan dopamin

Graf  $\Delta OD_{450\text{ nm}}$  terhadap kepekatan piawai dopamin diplotkan seperti dalam Rajah 3.4. Sementara itu, kepekatan piawai dopamin ikan yang diketahui dan bacaan OD yang sepadan diplot pada skala log (paksi-x) dan skala log (paksi-y) masing-masing seperti dalam Rajah 3.5. Kepekatan dopamin ikan dalam sampel dapat ditentukan dengan memplotkan OD sampel pada paksi-y.



Rajah 3.4 Graf  $\Delta OD_{450 \text{ nm}}$  terhadap kepekatan piawai dopamin



Rajah 3.5 Graf Log  $\Delta OD_{450 \text{ nm}}$  terhadap Log (kepekatan piawai dopamin)

Pengiraan kepekatan dopamin ikan dalam setiap sampel dapat dilakukan dengan menggunakan formula yang berikut:

$$\text{Log [Dopamin Ikan]} = \frac{\text{Log } \Delta OD + 1.5657}{\text{Cerun}}$$

### 3.4.8 Ujian Respirasi Mitokondria

Ujian respirasi mitokondria ini dilaksanakan dengan menggunakan MitoPlate™ I-1.

#### a. Penyediaan mitokondria terencil

Sekitar 300 mg tisu otak diletakkan ke dalam tiub Ependorf yang mengandungi 1.5 mL larutan penimbal pencuci. Tisu otak tersebut kemudiannya dicincang dan diletakkan ke dalam penghomogen Dounce yang telah disejukkan. Larutan penimbal pengasingan mitokondria ditambahkan ke dalam penghomogen yang mengandungi tisu otak tersebut sehingga isipadu larutan mencapai 2 mL. Alu A yang disertakan dalam *Mitochondria Isolation Kit for Tissue* digunakan untuk mencincang tisu otak pada permulaan selama 20 kali, diikuti dengan alu B untuk mencincang tisu otak dengan lebih halus selama 15 kali. Homogenat tersebut kemudiannya dituangkan ke dalam tiub ependorf yang berisipadu 2 mL dan diemparkan pada  $1,000 \times g$  selama 10 minit pada suhu  $4^\circ\text{C}$ . Supernatan dikumpulkan dengan berhati-hati dan dipisahkan ke dalam dua tiub Ependorf yang berbeza secara sama rata. Larutan penimbal pengasingan mitokondria ditambahkan ke dalam kedua-dua tiub ependorf tadi yang mengandungi supernatan tersebut sehingga isipadu larutan mencapai 2.0 mL. Supernatan tersebut diemparkan pada  $12,000 \times g$  selama 15 minit pada suhu  $4^\circ\text{C}$ . Pellet dikumpulkan dan dicuci dalam 1 mL larutan penimbal pengasingan mitokondria yang ditambah dengan 10  $\mu\text{L}$  koktel perencat protease. Campuran tersebut diemparkan pada  $12,000 \times g$  selama 15 minit pada suhu  $4^\circ\text{C}$ . Pellet dalam campuran tersebut dikumpulkan dan dicuci semula dengan ulangi langkah membasuh tadi. Campuran baharu ini diemparkan pada  $12,000 \times g$  selama 15 minit pada suhu  $4^\circ\text{C}$ . Pellet dalam campuran tersebut dikumpulkan dan dituangkan ke dalam 500  $\mu\text{L}$  larutan penimbal pengasingan mitokondria yang ditambah dengan 5  $\mu\text{L}$  koktel perencat protease. Mitokondria terencil ini disimpan dalam peti sejuk beku pada suhu  $-80^\circ\text{C}$  sebelum digunakan untuk kajian seterusnya.

**b. Prosedur kuantifikasi kepekatan mitokondria terpencil**

**i. Penyediaan reagen**

Bagi menyediakan larutan kerja untuk plat telaga 96, sebanyak 192  $\mu\text{L}$  reagen tembaga dicampurkan dengan 9408  $\mu\text{L}$  reagen BCA yang bersamaan dengan nisbah 1 : 50. Larutan kerja ini stabil selama beberapa hari setelah dibuat.

**ii. Penyediaan lengkuk piawai**

Sebanyak 8 tiub Ependorf diperlukan untuk melakukan pencairan bersiri bagi menyediakan larutan piawai yang berkepekatan 32  $\mu\text{g}$ , 16  $\mu\text{g}$ , 8  $\mu\text{g}$ , 4  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 0.5  $\mu\text{g}$  dan 0  $\mu\text{g}$ . Pertama sekali, sebanyak 256  $\mu\text{L}$  larutan stok piawai BSA dengan kepekatan pada 10 mg/mL dan 144  $\mu\text{L}$  penimbal pencairan piawai ditambahkan ke dalam tiub ependorf yang berlabel '8' dan memastikan campuran tersebut dapat digaul sebati. Kemudiannya, sebanyak 200  $\mu\text{L}$  larutan dari tiub ependorf yang berlabel '8' dan 200  $\mu\text{L}$  penimbal pencairan piawai ditambahkan ke dalam tiub ependorf yang berlabel '7'. Pencairan bersiri larutan piawai seterusnya dicairkan seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 3.9.

Jadual 3.9 Penyediaan pencairan bersiri piawai BSA

Tiub	Larutan BSA ( $\mu\text{L}$ )	Penimbal pencairan piawai ( $\mu\text{L}$ )	50 $\mu\text{L}$
8	Larutan stok (256)	144	32.0 $\mu\text{g}$
7	Tiub 8 (200)	200	16.0 $\mu\text{g}$
6	Tiub 7 (200)	200	8.0 $\mu\text{g}$
5	Tiub 6 (200)	200	4.0 $\mu\text{g}$
4	Tiub 5 (200)	200	2.0 $\mu\text{g}$
3	Tiub 4 (200)	200	1.0 $\mu\text{g}$
2	Tiub 3 (200)	200	0.5 $\mu\text{g}$
1	-	200	0 $\mu\text{g}$

**iii. Sampel**

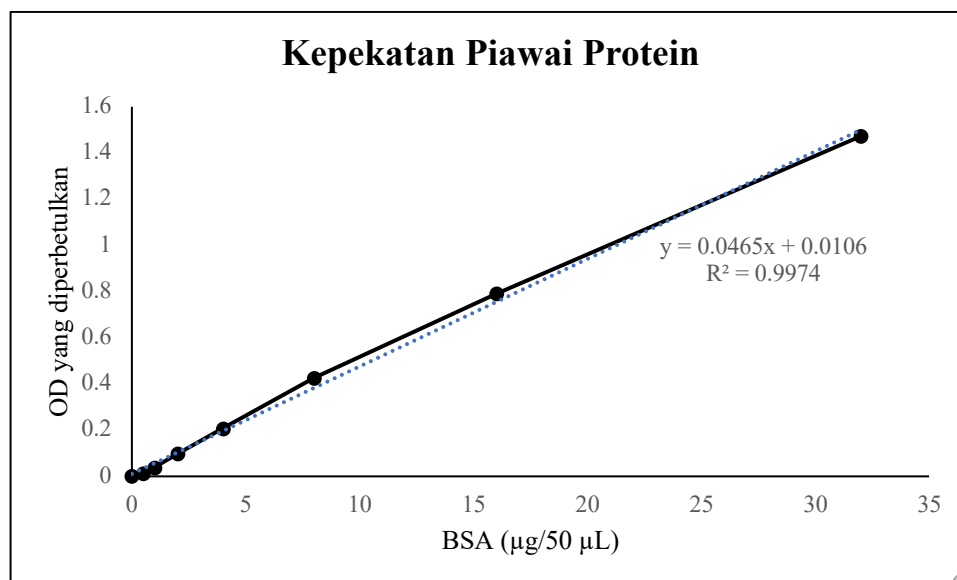
Sampel dicairkan supaya kepekataannya berada dalam julat 0.01 – 0.6 mg/mL. Sebanyak 50  $\mu\text{L}$  larutan piawai atau sampel dipipet ke dalam telaga secara duplikat pada plat telaga 96. Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  larutan kerja ditambahkan ke dalam setiap telaga yang mengandungi larutan piawai atau sampel. Plat telaga 96 digoncang dengan perlahan untuk memastikan campuran tersebut dapat digaul sebati. Selepas itu, plat telaga 96

tersebut dieramkan dalam ketuhar pada suhu 37 °C selama 30 minit. Akhirnya, plat telaga 96 dibiarkan di luar sehingga suhunya mencapai suhu bilik sebelum membaca OD pada 562 nm dengan menggunakan Multiskan Go monochromator microplate reader.

#### iv. Penentuan kepekatan mitokondria

Pengkuantitian mitokondria ditentukan secara tidak langsung melalui analisis kepekatan protein keseluruhan dengan menggunakan *Bicinchoninic acid (BCA) Protein Quantification Kit* (Cat #ab102536, Abcam, USA). Pendekatan ini diaplikasikan berdasarkan protokol piawai dan syor teknikal daripada pihak pengilang, yang menetapkan penggunaan kepekatan protein sebagai parameter penentu bagi kuantiti mitokondria dalam sampel biologi. Dalam konteks ini, kepekatan protein keseluruhan berfungsi sebagai proksi bagi densiti mitokondria, memandangkan biojisim mitokondria secara dominannya terdiri daripada 70 % protein dalam membran dalaman mitokondria (Cooper 2000). Oleh itu, tahap kepekatan protein yang dikesan adalah berkadaran terus dengan kepekatan mitokondria di dalam sampel.

Prosedur ini dimulakan dengan menolak nilai OD kosong (*zero standard*) daripada semua nilai OD piawai dan sampel. Graf  $\Delta OD_{562 \text{ nm}}$  yang diperbetulkan terhadap kepekatan piawai protein diplotkan seperti dalam Rajah 3.6. Kepekatan protein sampel ditentukan melalui interpolasi daripada lengkung piawai tersebut. Sebagai alternatif, persamaan untuk garisan terbaik yang sesuai dengan piawai boleh digunakan untuk menentukan kepekatan protein sampel.



Rajah 3.6 Graf  $\Delta OD_{562 \text{ nm}}$  yang diperbetulkan terhadap kepekatan piawai protein

**c. Asai MitoPlate I-1**

MitoPlate I-1 digunakan dalam kajian ini untuk menguji fungsi mitokondria daripada sel menggunakan perencat mitokondria sebagai probe. Oleh itu, fungsi mitokondria boleh diuji dengan mengukur sensitiviti mitokondria daripada 22 set perencat yang berbeza. Asai ini boleh dilakukan dengan menggunakan substrat metabolik berbeza yang menghasilkan NADH (sebagai contoh, L-malate,  $\alpha$ -ketoglutarat, D-isocitrate, L-glutamat, D- $\beta$ -hydroxy-butyrat) atau  $FADH_2$  (sebagai contoh, succinate,  $\alpha$ -glycerol- $PO_4$ ). Setiap substrat melepaskan elektron ke dalam rantaian pengangkutan elektron mengikut laluan yang berbeza. Elektron bergerak dari permulaan (kompleks 1 atau 2) ke bahagian distal rantaian pengangkutan elektron di mana pewarna redoks tetrazolium (MC) bertindak sebagai penerima elektron terminal yang bertukar menjadi ungu selepas proses penurunan berlaku.

**i. Penyediaan reagen**

Bagi menyediakan campuran tanpa substrat, sebanyak 84  $\mu\text{L}$   $2\times$  Biolog MAS, 56  $\mu\text{L}$   $6\times$  pewarna redoks tetrazolium dan 28  $\mu\text{L}$  air steril diperlukan untuk telaga kawalan negatif yang ditunjukkan dalam Jadual 3.10.

Jadual 3.10 Isipadu komponen-komponen yang diperlukan untuk telaga kawalan negatif

Komponen	Isipadu setiap telaga	Isipadu setiap plat	1.4× tambahan untuk mempipet
2× Biolog MAS	15 µL	60 µL	84 µL
6× Pewarna redoks tetrazolium	10 µL	40 µL	56 µL
Air steril	5 µL	20 µL	28 µL

Manakala bagi menyediakan campuran dengan substrat, sebanyak 2100 µL 2× Biolog MAS, 1400 µL 6× pewarna redoks tetrazolium 350 µL 24× sodium L-malate dan 350 µL air steril diperlukan untuk semua telaga lain yang ditunjukkan dalam Jadual 3.11.

Jadual 3.11 Isipadu komponen-komponen yang diperlukan untuk semua telaga lain

Komponen	Isipadu setiap telaga	Isipadu setiap plat	1.4× tambahan untuk mempipet
2× Biolog MAS	15.0 µL	1500 µL	2100 µL
6× Pewarna redoks tetrazolium	10.0 µL	1000 µL	1400 µL
24× Sodium L-malate	2.5 µL	250 µL	350 µL
Air steril	2.5 µL	250 µL	350 µL

## ii. Reaksi warna

Sebanyak 30 µL campuran tanpa substrat dipipetkan ke dalam telaga kawalan negatif dan sebanyak 30 µL campuran dengan substrat dipipetkan ke dalam semua telaga yang lain pada MitoPlate I-1. Selepas itu, sebanyak 30 µL mitokondria terpercil ditambahkan ke setiap telaga MitoPlate I-1 di mana kepekatan akhir mitokondria diperolehi pada 25 µg dalam setiap telaga. Akhirnya, bacaan OD pada 590 nm berterusan selama enam jam dengan selang lima minit atas pembentukan warna ungu dengan menggunakan Multiskan Go monochromator microplate reader.

### 3.4.9 Analisis Statistik

Semua data dicatat dalam bentuk purata ± ralat piawai min (SEM). Pakej Statistik untuk Sains Sosial (SPSS) versi 26.0 digunakan untuk analisis statistik. Analisis data dilaksanakan dengan menggunakan *independent T-test* dan/atau ANOVA diikuti dengan *post hoc Tukey's test*. Aras keyakinan 95 peratus ( $p < 0.05$ ) digunakan untuk menentukan aras kesignifikanan statistik.

## BAB IV

### DAPATAN KAJIAN

#### 4.1 ANALISIS MIKROSUSUN OTAK ZEBRAFISH ARUHAN ROTENONE

##### 4.1.1 Profil Pengekspresan Gen Pembezaan (*Differentially Expressed Gene*, DEG)

Analisis mikrosusun telah dilakukan bagi mengenal pasti profil pengekspresan gen pembezaan dalam otak zebrafish susulan pendedahan kepada rotenone. Berdasarkan kriteria pemilihan yang ditetapkan, sebanyak 14 gen telah dikenal pasti mengalami pengekspresan secara berbeza yang signifikan. Daripada jumlah tersebut, sebanyak 13 gen menunjukkan peningkatan pengekspresan yang signifikan dalam kumpulan rotenone berbanding kumpulan kawalan, merangkumi gen *mat2ab*, *lgals9l1*, *gzm3*, *themis*, *zdhhc3b*, *ccl34b.4*, *lck*, *ctao1*, *cd8a*, *dedd1*, *tyrobp*, *il2rb*, dan *LOC100331689* (Rajah 4.1, Jadual 4.1). Sebaliknya, hanya gen *LOC560232* yang menunjukkan penurunan pengekspresan yang signifikan dalam kumpulan rotenone (Jadual 4.1). Pemisahan profil transkriptom yang jelas melalui plot volkano dan peta haba mencerminkan impak neurotoksisiti rotenone yang mendalam terhadap langskap genetik otak antara kumpulan rotenone dan kawalan (Rajah 4.1).

Bagi memahami implikasi fungsi bagi DEG tersebut, analisis *Gene Ontology* (GO) dan analisis laluan biologi telah dijalankan. Keputusan menunjukkan bahawa gen-gen yang dikesan terlibat dalam proses imunologi, merangkumi laluan pengisyaratan reseptor permukaan sel, pengaktifan dan pembezaan limfosit serta sel T, dan laluan pengisyaratan yang dimediasi oleh reseptor antigen (Jadual 4.2). Seterusnya, pemetaan laluan melalui pangkalan data *WikiPathways* mengenal pasti beberapa laluan biologi kritikal yang berkaitan dengan patogenesis PD. Laluan pengisyaratan IL-2 dan laluan pengisyaratan reseptor sel T dikesan sebagai laluan yang paling terjejas (Jadual 4.3). Oleh itu, data transkriptomik ini membuktikan bahawa pendedahan rotenone

mencetuskan gangguan meluas pada sistem imun neuron dan integriti pengisyratan sel dalam otak zebrafish.

Jadual 4.1 Senarai DEG yang menunjukkan pengekspresan secara berbeza dalam otak zebrafish susulan pendedahan rotenone

Gen	Nama gen	Pengawalaturan berbanding dengan kumpulan kawalan	Nilai <i>p</i>
<i>il2rb</i>	<i>interleukin 2 receptor, beta</i>	↑	$3.14 \times 10^{-7}$
<i>lck</i>	<i>LCK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase</i>	↑	$4.96 \times 10^{-6}$
<i>mat2ab</i>	<i>methionine adenosyltransferase II, alpha b</i>	↑	$1.25 \times 10^{-5}$
<i>lgals9l1</i>	<i>lectin, galactoside-binding, soluble, 9 (galectin 9)-like 1</i>	↑	$6.85 \times 10^{-6}$
<i>gzm3</i>	<i>granzyme 3</i>	↑	$6.10 \times 10^{-6}$
<i>themis</i>	<i>thymocyte selection associated</i>	↑	$5.71 \times 10^{-6}$
<i>zdhhc3b</i>	<i>zinc finger, DHHC-type containing 3b</i>	↑	$6.77 \times 10^{-6}$
<i>ccl34b.4</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 34b, duplicate 4</i>	↑	$1.76 \times 10^{-5}$
<i>ciaol</i>	<i>cytosolic iron-sulfur assembly component 1</i>	↑	$5.84 \times 10^{-6}$
<i>cd8a</i>	<i>Cluster of Differentiation 8A</i>	↑	$1.35 \times 10^{-6}$
<i>dedd1</i>	<i>death effector domain-containing 1</i>	↑	$2.84 \times 10^{-5}$
<i>tyrobp</i>	<i>TYRO protein tyrosine kinase binding protein</i>	↑	$2.90 \times 10^{-5}$
<i>LOC100331689</i>	<i>trac-like</i>	↑	$1.82 \times 10^{-5}$
<i>LOC560232</i>	<i>novel nacht domain containing protein</i>	↓	$2.04 \times 10^{-5}$

Jadual 4.2 Senarai Gene Ontology (GO) yang signifikan terkesan dalam model PD aruhan rotenone

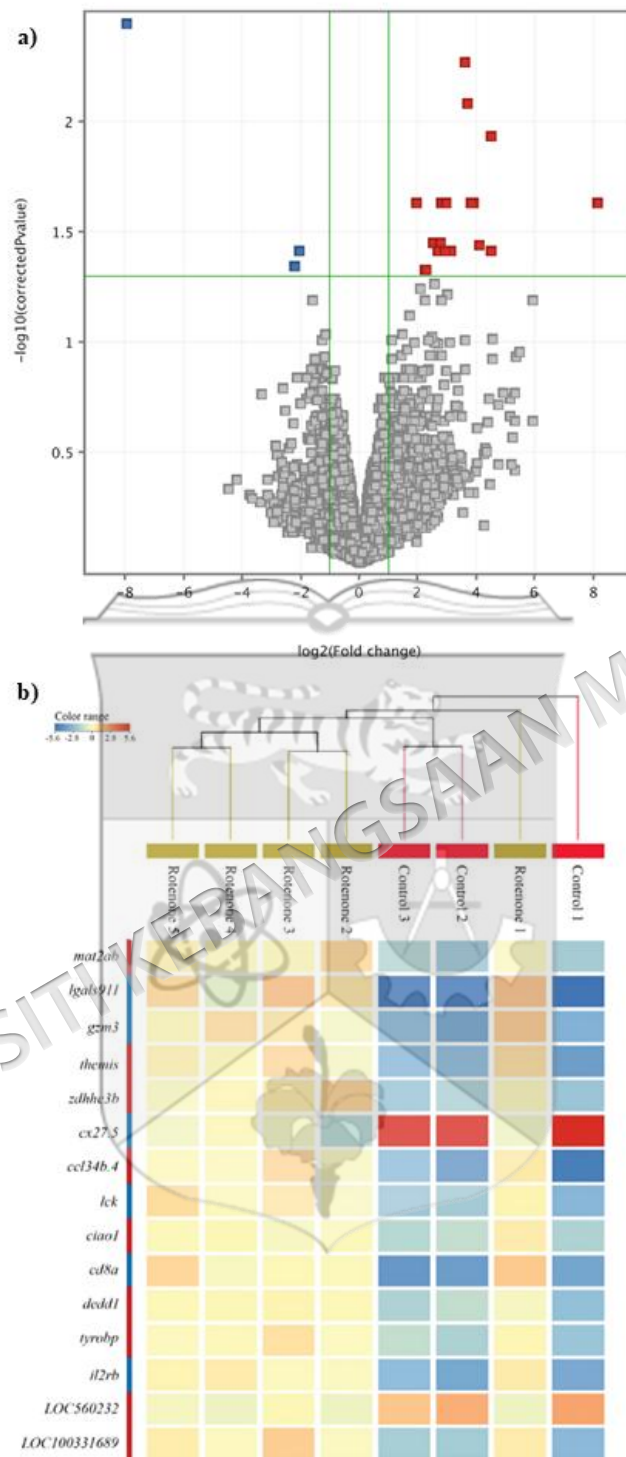
Akresi GO	Istilah GO	Bilangan	Nilai <i>p</i>
GO:0007166	<i>Cell surface receptor signaling pathway</i>	921	$8.47 \times 10^{-4}$
GO:0046649	<i>Lymphocyte activation</i>	44	$6.62 \times 10^{-4}$
GO:0002768	<i>Immune response-regulating cell surface receptor signaling pathway</i>	34	$3.95 \times 10^{-4}$
GO:0030098	<i>Lymphocyte differentiation</i>	33	$3.72 \times 10^{-4}$
GO:0046650			
GO:0002429	<i>Immune response-activated cell surface receptor signaling pathway</i>	32	$3.49 \times 10^{-4}$
GO:0042110	<i>T cell activation</i>	32	$3.49 \times 10^{-4}$

---

GO:0050851	<i>Antigen receptor-mediated signaling pathway</i>	27	$2.48 \times 10^{-4}$
GO:0030217 GO:0042112 GO:0046652	<i>T cell differentiation</i>	22	$1.64 \times 10^{-4}$

---





Rajah 4.1 Analisis visual profil DEGs dalam otak zebrafish yang mendedah kepada rotenone.

(a) Plot volkano yang menunjukkan variasi dalam ekspresi miRNA. Garis mendatar menunjukkan perubahan lipatan sebanyak 2 kali ganda (upregulasi dan downregulasi), manakala garis menegak mewakili nilai p sebanyak 0.05. (b) Peta haba (*heat map*) menunjukkan pengawalan DEGs (gen dengan nilai p yang diperbetulkan  $< 0.05$  dan perubahan lipatan mutlak melebihi 2)

Jadual 4.3 Analisis laluan melibatkan penentuan laluan biologi yang signifikan berdasarkan ekspresi DEGs dalam model PD

Nama laluan	Nilai $p$	Entiti yang sempadan	Jumlah entiti dalam laluan
Laluan pengisyaratan IL-2	$3.34 \times 10^{-4}$	2	63
Laluan pengisyaratan reseptor sel T	$6.99 \times 10^{-4}$	2	97
Pemetilan ( <i>Methylation</i> )	$4.64 \times 10^{-3}$	1	10
Laluan pengisyaratan IL-5	$2.16 \times 10^{-2}$	1	54
Laluan pengisyaratan IL-4	$2.07 \times 10^{-2}$	1	49
Laluan pengisyaratan IL-3	$3.34 \times 10^{-2}$	1	83
Laluan pengisyaratan Id	$2.12 \times 10^{-2}$	1	47
Laluan pengisyaratan Delta-Notch	$2.98 \times 10^{-2}$	1	71
Laluan pengisyaratan reseptor sel B	$5.08 \times 10^{-2}$	1	127

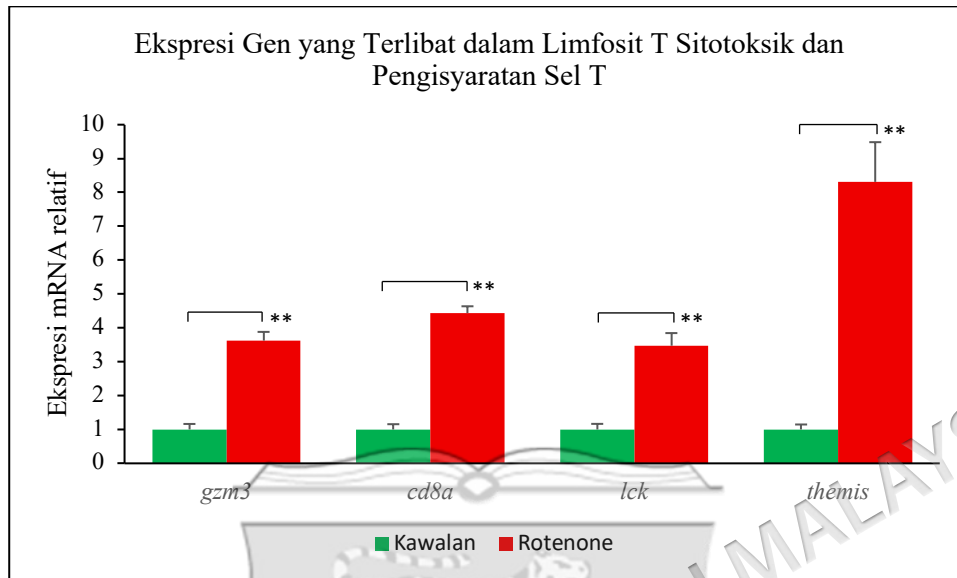
#### 4.1.2 Kajian Pengesahan qPCR bagi DEGs

Tahap ekspresi 13 DEGs telah dianalisis menggunakan ujian qPCR bagi mengesahkan ketepatan data analisis mikrosusun. mRNA yang diekstrak daripada otak zebrafish dalam kumpulan kawalan dan kumpulan rotenone digunakan untuk menjalankan ujian qPCR. Hasil analisis qPCR menunjukkan trend pengekspresan yang selari dengan dapatan analisis mikrosusun (Rajah 4.1). Kajian qPCR menunjukkan peningkatan ekspresi *mat2ab*, *lgals911*, *gzm3*, *themis*, *zdhhc3b*, *ccl34b.4*, *lck*, *ciao1*, *cd8a*, *dedd1*, *tyrobp*, *il2rb*, dan *LOC100331689* yang signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding dengan kumpulan kawalan, manakala ekspresi *LOC560232* menurun berbanding dengan kumpulan kawalan.

##### a. Pengawal Selia Molekul dalam Pengisyaratan Sel T dan Limfosit T Sitotoksik

Analisis profil transkriptomik menunjukkan bahawa pendedahan kepada rotenone mencetuskan pengaktifan ketara terhadap komponen imun sel dalam otak zebrafish. Kumpulan rotenone menunjukkan peningkatan pengekspresan yang signifikan bagi gen yang terlibat dalam fungsi limfosit T sitotoksik, iaitu *gzm3* dan *cd8a*, berbanding kumpulan kawalan ( $p < 0.001$ , Rajah 4.2). Selain itu, gen pengawal selia yang kritikal dalam laluan pengisyaratan reseptor sel T (TCR), iaitu *themis* dan *lck*, turut menunjukkan peningkatan yang signifikan berbanding kumpulan kawalan ( $p < 0.001$ , Rajah 4.2). Peningkatan ekspresi gen-gen ini mencerminkan permulaan neuroinflamasi

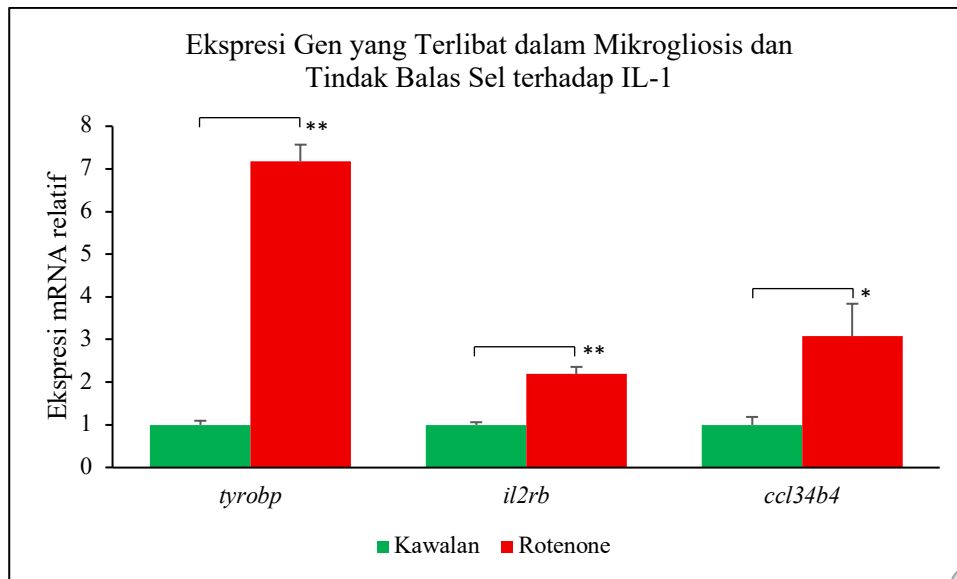
yang agresif, di mana penglibatan sel T sitotoksik menyumbang kepada kemerosotan integriti neuron dalam model PD ini.



Rajah 4.2 **Kesan pendedahan rotenone terhadap ekspresi gen yang terlibat dalam pengisyaratan sel T dan limfosit T sitotoksik.** Kumpulan rotenone (5 µg/L) menunjukkan peningkatan pengekspresan yang signifikan bagi gen yang terlibat dalam Limfosit T sitotoksik (*gzm3* dan *cd8a*) serta gen pengawal selia pengisyaratan reseptor sel T (*lck* dan *themis*) berbanding kumpulan kawalan. (n = 7 setiap kumpulan; \*\*  $p < 0.001$ )

#### b. Pengawalaturan Mikrogliosis dan Tindak Balas Sitokin (IL-1)

Pendedahan rotenone didapati mengganggu pengawalaturan mikrogliosis dan lala pengisyaratan sitokin pro-keradangan. Kumpulan rotenone menunjukkan peningkatan pengekspresan yang signifikan pada *tyrobp* ( $p < 0.001$ , Rajah 4.3), iaitu penanda molekul kritikal yang mengawal selia pengaktifan mikrogliia. Selari dengan mikrogliosis tersebut, gen-gen yang dikaitkan dengan tindak balas sel terhadap interleukin-1 (IL-1), iaitu *il2rb* ( $p < 0.001$ ) dan *ccl34b.4* ( $p < 0.05$ ), turut menunjukkan peningkatan pengekspresan yang signifikan berbanding kumpulan kawalan (Rajah 4.3). Penemuan ini menunjukkan bahawa rotenone mencetuskan persekitaran neuroinflamasi yang progresif melalui pengaktifan sel glia dan modulasi laluan pengisyaratan sitokin IL-1.

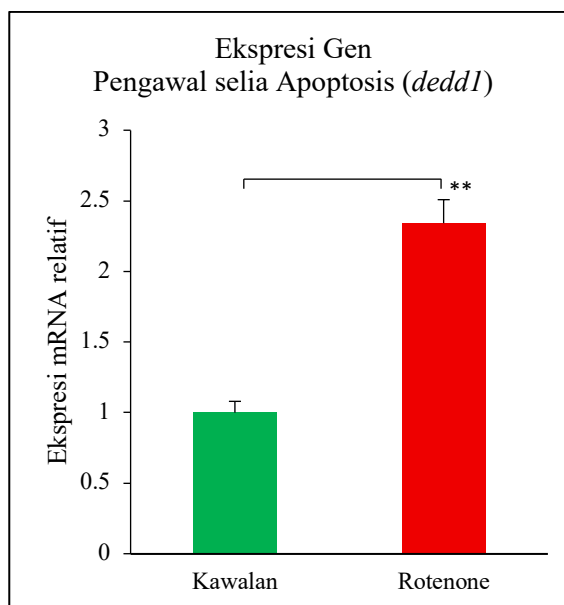


Rajah 4.3 **Kesan pendedahan rotenone terhadap ekspresi gen berkaitan mikrogliosis dan tindak balas sitokin.**

Peningkatan pengekspresan gen *tyrobp* menunjukkan pengaktifan mikrogliosis, manakala peningkatan gen *il2rb* dan *ccl34b.4* menandakan pengaktifan lara pengisyaratan interleukin dalam otak zebrafish aruhan rotenone (5 µg/L) berbanding kumpulan kawalan. (n = 7 setiap kumpulan; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ )

#### c. Pengawalaturan Proses Apoptosis dalam Neurodegenerasi

Bagi menilai impak rotenone terhadap kemandirian sel, pengekspresan gen yang terlibat dalam mekanisme apoptosis telah dianalisis. Hasil kajian ini menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam ekspresi gen *dedd1* berbanding kumpulan kawalan ( $p < 0.001$ , Rajah 4.4). Memandangkan *dedd1* berperanan sebagai pengawal selia penting yang berinteraksi secara langsung dengan kaspase dalam fasa pelaksanaan apoptosis, peningkatan ekspresi ini mengesahkan bahawa kemerosotan populasi neuron dalam model zebrafish adalah didorong oleh pengaktifan laluan apoptosis susulan pendedahan rotenone.

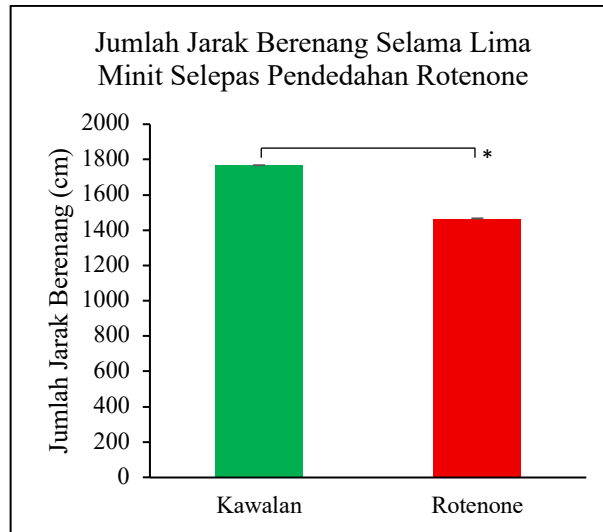


Rajah 4.4 Kesan pendedahan rotenone terhadap ekspresi gen pengawal selia apoptosis (*dedd1*). Kumpulan rotenone (5 µg/L) menunjukkan peningkatan ekspresi gen *dedd1* yang signifikan berbanding kumpulan kawalan, yang memberikan indikasi terhadap induksi apoptosis dalam otak zebrafish aruhan rotenone. (n = 7 setiap kumpulan; \*\*  $p < 0.001$ )

## 4.2 PENCIRIAN MODEL PD ARUHAN ROTENONE PADA ZEBRAFISH

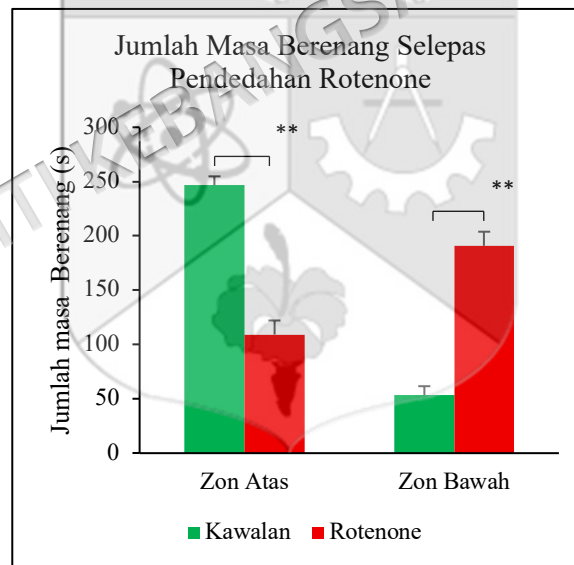
### 4.2.1 Gangguan Aktiviti Lokomotor dan Manifestasi Fenotip Keresahan akibat Pendedahan Rotenone

Penilaian aktiviti lokomotor melalui ujian tangki baharu dilakukan bagi mengkaji impak pendedahan rotenone (5 µg/L) secara kronik selama 28 hari terhadap profil tingkah laku zebrafish. Hasil kajian ini mendapati kumpulan rotenone mengalami penurunan jumlah jarak berenang keseluruhan secara signifikan berbanding kumpulan kawalan ( $p < 0.05$ , Rajah 4.5), yang menandakan bermulanya disfungsi motor yang menyerupai gejala PD. Selain itu, kumpulan rotenone menghabiskan masa yang lebih lama di zon bawah tangki secara signifikan berbanding kumpulan kawalan ( $p < 0.001$ , Rajah 4.6). Kecenderungan kumpulan rotenone terhadap zon bawah tangki ini (Rajah 4.7), bukan sahaja mencerminkan kemerosotan fungsi lokomotor, tetapi juga merupakan manifestasi jelas terhadap peningkatan tingkah laku menyerupai keresahan (*anxiety-like behavior*) akibat kesan neurotoksisiti rotenone.



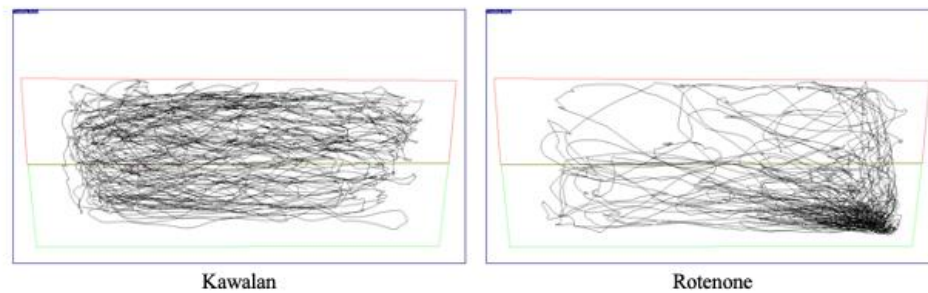
Rajah 4.5 **Analisis jumlah jarak berenang keseluruhan zebrafish selama lima minit.**

Pendedahan kepada rotenone ( $5 \mu\text{g/L}$ ) secara kronik mengakibatkan penurunan jarak renang yang signifikan berbanding kumpulan kawalan, yang menandakan gangguan pada aktiviti lokomotor. ( $n = 55$  setiap kumpulan;  $* p < 0.05$ )



Rajah 4.6 **Perbandingan masa berenang (s) antara Zon Atas dan Zon Bawah dalam ujian tangki baharu.**

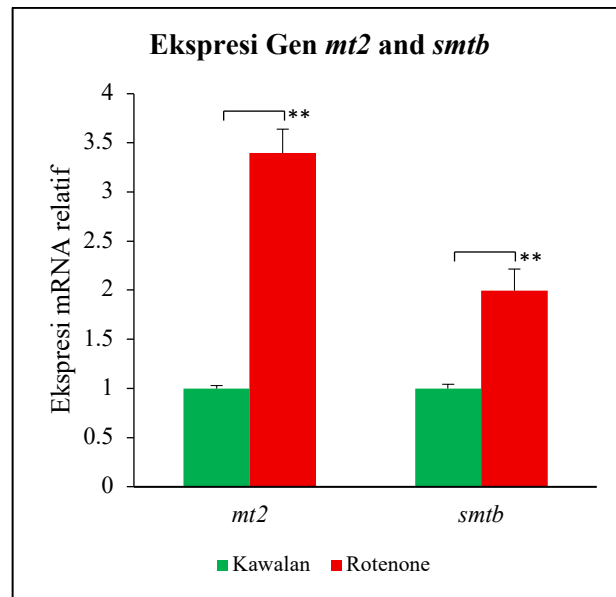
Kumpulan rotenone ( $5 \mu\text{g/L}$ ) memanifestasikan tingkah laku keresahan yang signifikan dengan menghabiskan masa yang lebih lama di zon bawah tangki berbanding kumpulan kawalan. ( $n = 55$  setiap kumpulan;  $** p < 0.001$ )



Rajah 4.7 **Penjejakan video berkomputer yang menunjukkan trajektori pergerakan zebrafish dalam tangki selama lima minit.** Kumpulan kawalan menunjukkan corak renang aktif yang merangkumi keseluruhan ruang tangki, berbanding kumpulan rotenone ( $5 \mu\text{g/L}$ ) yang menunjukkan trajektori yang terhad dan cenderung tertumpu di zon bawah tangki, yang mencerminkan kesan gabungan antara disfungsi motor dan peningkatan tingkah laku keresahan. (Zon atas tangki = kotak berwarna merah, zon bawah tangki = kotak berwarna hijau;  $n = 55$  setiap kumpulan)

#### 4.2.2 Tindak Balas Gen Pertahanan Endogen (*mt2* dan *smtb*) akibat Pendedahan Rotenone

Analisis qPCR dilakukan bagi menilai tindak balas pertahanan sel terhadap tekanan sitotoksik yang dicetuskan oleh pendedahan kepada rotenone. Hasil kajian ini menunjukkan kumpulan rotenone meningkatkan ekspresi gen *mt2* dan *smtb* yang signifikan berbanding kumpulan kawalan ( $p < 0.001$ , Rajah 4.8). Peningkatan ekspresi yang ketara ini mencerminkan pengaktifan mekanisme perlindungan endogen sebagai tindak balas pampasan terhadap beban toksik serta kerosakan sel yang dicetuskan oleh tekanan oksidatif dan keradangan dalam sistem neuron.

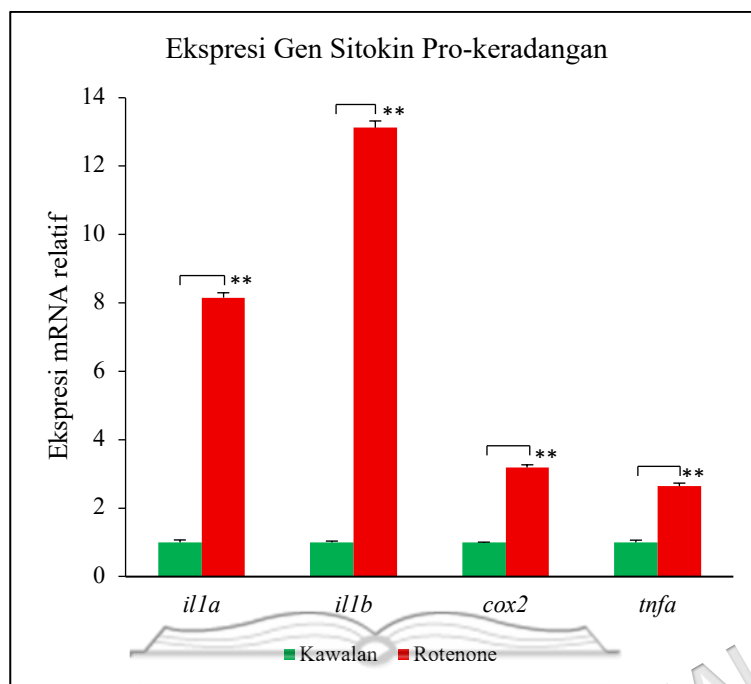


Rajah 4.8 **Kesan pendedahan rotenone terhadap ekspresi gen *mt2* dan *smb* pada otak zebrafish.**

Kumpulan rotenone (5 µg/L) menunjukkan peningkatan pengekspresan gen yang signifikan berbanding kumpulan kawalan (n = 7 setiap kumpulan; \*\*  $p < 0,001$ )

#### 4.2.3 Induksi Lata Sitokin Pro-keradangan (*il-1a*, *il-1b*, *cox-2* dan *tnf-α*) akibat Pendedahan Rotenone

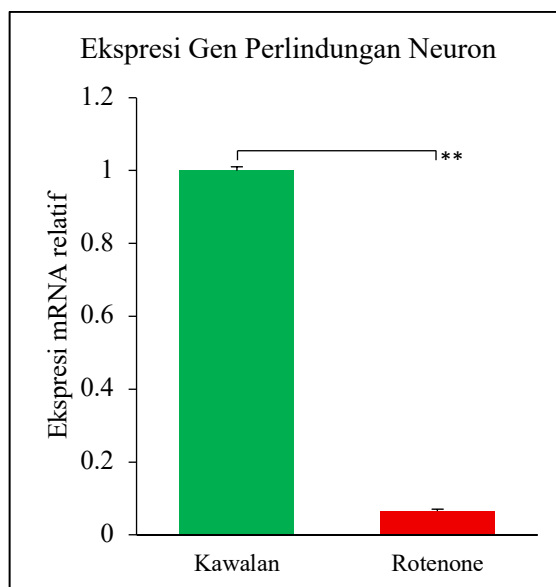
Analisis qPCR ini dilakukan bagi menilai tahap tindak balas keradangan dalam otak zebrafish susulan pendedahan kepada rotenone. Berdasarkan hasil yang diperoleh, kumpulan rotenone menunjukkan peningkatan pengekspresan yang signifikan bagi kesemua gen sitokin pro-keradangan yang dikaji, iaitu *il-1a*, *il-1b*, *cox-2* dan *tnf-α*, berbanding kumpulan kawalan ( $p < 0,001$ , Rajah 4.9). Peningkatan tahap ekspresi yang paling ketara diperhatikan pada gen *il-1b* dan *il-1a*, yang menunjukkan perbezaan lipatan (*fold change*) yang tinggi berbanding kumpulan kawalan. Data ini mengesahkan bahawa model ini berjaya mensimulasikan lata keradangan yang merupakan pemacu utama neurodegenerasi dalam patogenesis PD.



Rajah 4.9 **Kesan pendedahan rotenone terhadap ekspresi gen sitokin pro-keradangan dalam otak zebrafish.** Kumpulan rotenone (5  $\mu\text{g/L}$ ) menunjukkan peningkatan ekspresi gen *il-1a*, *il-1b*, *cox-2* dan *tnf- $\alpha$*  yang signifikan berbanding kumpulan kawalan sebagai indikasi tindak balas neuroinflamasi. (n = 7 setiap kumpulan; \*\*  $p < 0.001$ )

#### 4.2.4 Kemerosotan Sokongan Neurotropik (*bdnf*) akibat Pendedahan Rotenone

Analisis terhadap pengekspresan gen perlindungan neuron (*bdnf*) dilakukan bagi menilai kesan pendedahan rotenone terhadap sokongan kemandirian neuron dalam otak zebrafish. Hasil kajian ini mendapati kumpulan rotenone mengalami penurunan pengekspresan gen *bdnf* yang signifikan berbanding kumpulan kawalan ( $p < 0.001$ , Rajah 4.10). Kemerosotan sokongan neurotropik ini meningkatkan kerentanan neuron terhadap kerosakan oksidatif dan apoptosis, yang seterusnya menyumbang kepada kemerosotan integriti neuron secara progresif.



Rajah 4.10 **Kesan pendedahan rotenone terhadap ekspresi gen perlindungan neuron (*bdnf*) pada otak zebrafish.**

Kumpulan rotenone (5 µg/L) menunjukkan kemerosotan pengekspresan gen *bdnf* yang signifikan berbanding kumpulan kawalan, yang menandakan pengurangan sokongan neurotropik akibat pendedahan rotenone.

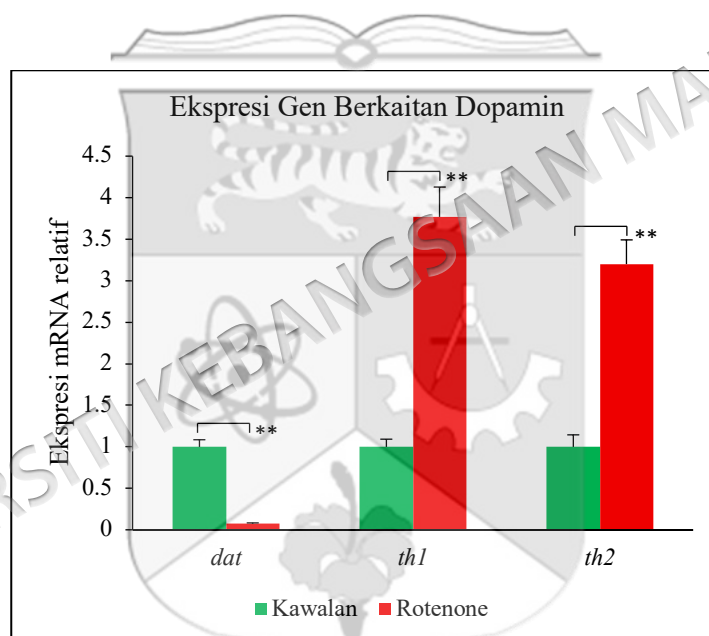
(n = 7 setiap kumpulan; \*\*  $p < 0.001$ )

#### 4.2.5 Disregulasi Sistem Dopaminergik (*dat*, *th1* dan *th2*) dan Kemerosotan Populasi Neuron DA akibat Pendedahan Rotenone

Analisis qPCR dan immunohistokimia terhadap sistem dopaminergik mendedahkan kerosakan sistem dopaminergik yang ketara dalam otak zebrafish susulan pendedahan rotenone. Hasil kajian mendapati pengekspresan gen pengangkut DA (*dat*), mengalami penurunan yang signifikan berbanding kumpulan kawalan ( $p < 0.001$ , Rajah 4.11), menandakan kehilangan DA terminal sinaps. Sebaliknya, pengekspresan gen yang terlibat dalam biosintesis dopamin, iaitu *th1* dan *th2*, menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam kumpulan rotenone berbanding kumpulan kawalan ( $p < 0.001$ , Rajah 4.11) dianggap sebagai mekanisme pampasan bagi mengatasi defisit dopamin.

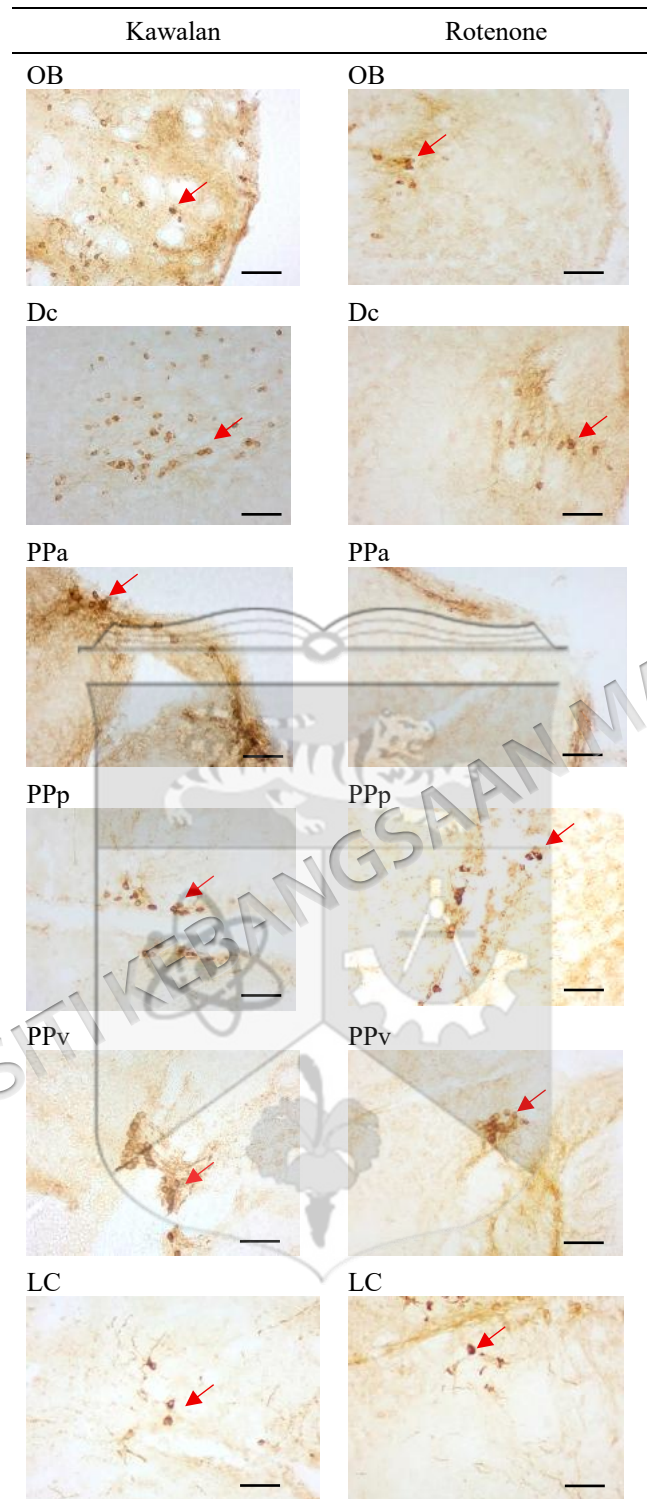
Sehubungan dengan itu, bukti kerosakan sistem dopaminergik ini diperkukuhkan melalui analisis immunohistokimia terhadap populasi neuron DA dilabelkan dengan antibodi TH (sel TH<sup>+</sup>). Sel TH<sup>+</sup> dapat diperhatikan dalam lima bahagian otak zebrafish yang berbeza termasuk telensefalon, praoptik, diensefalon, pratektal dan rombensefalon. Secara umumnya, saiz dan bentuk sel TH<sup>+</sup> adalah berbeza,

di mana saiz neuron yang kecil dan berbentuk bulat ditemui dalam bulba olfaktori manakala saiz neuron yang lebih besar dengan unjuran dendritik dapat ditemui dalam lokus seruleus (LC) (Rajah 4.12). Penurunan bilangan sel TH<sup>+</sup> yang signifikan diperhatikan secara meluas di kesemua populasi neuron DA di dalam otak zebrafish berbanding kumpulan kawalan (Rajah 4.13). Analisis ini mendapati bahawa peratusan kemerosotan sel TH<sup>+</sup> tertinggi berlaku di bahagian telensefalon (71 %,  $p < 0.001$ ), diikuti oleh pratektal (47 %,  $p < 0.001$ ), praoptik (43 %,  $p < 0.001$ ), rombensefalon (34 %,  $p < 0.05$ ), dan diensefalon (32 %,  $p < 0.001$ ). Data penurunan bilangan neuron ini selari dengan disregulasi ekspresi gen berkaitan DA yang diperhatikan (Rajah 4.7), turut mencerminkan impak neurotoksik rotenone yang bersifat meluas terhadap sistem dopaminergik dalam model ini.



Rajah 4.11 **Kesan pendedahan rotenone terhadap ekspresi gen berkaitan dopamin (*dat*, *th1*, dan *th2*) pada otak zebrafish.**

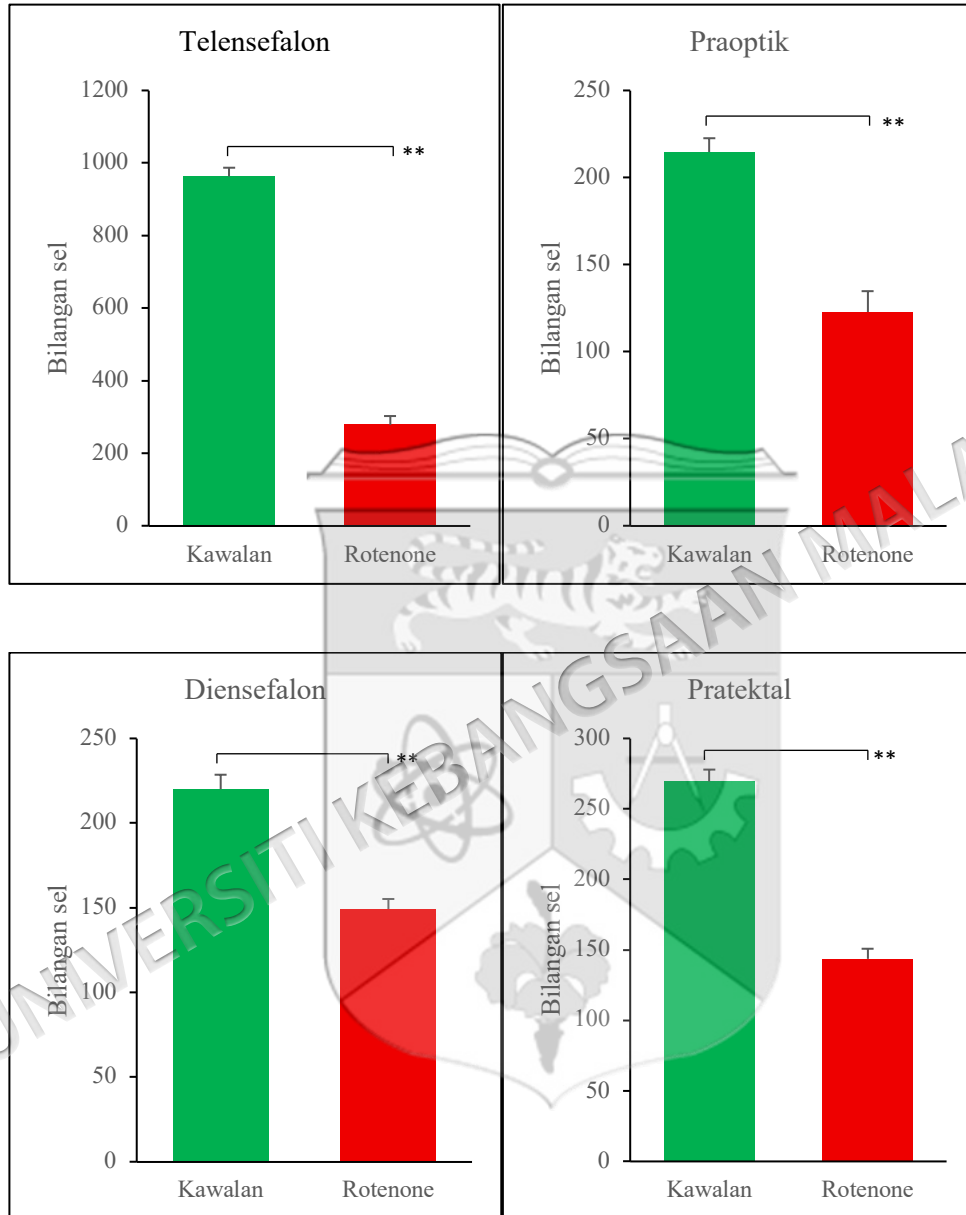
Kumpulan rotenone (5 µg/L) menunjukkan kemerosotan pengekspresan gen *dat* yang signifikan, namun menunjukkan peningkatan ekspresi gen *th1* dan *th2* berbanding kumpulan kawalan sebagai indikasi disregulasi sistem dopaminergik. (n = 7 setiap kumpulan; \*\*  $p < 0.001$ )

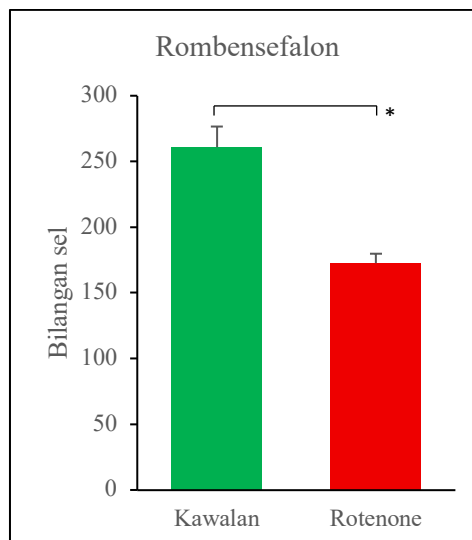


Rajah 4.12 **Kesan pendedahan rotenone terhadap populasi neuron DA di pelbagai bahagian otak zebrafish.**

Fotomikrograf keratan koronal pada pelbagai aras rostro-kaudal menunjukkan taburan neuron yang dilabel dengan antibodi tirosina hidroksilase (TH) dalam kumpulan kawalan dan kumpulan rotenone (5  $\mu\text{g/L}$ ). Kumpulan rotenone menunjukkan pengurangan kepadatan sel  $\text{TH}^+$  yang ketara di semua kawasan yang dikaji berbanding kumpulan kawalan. Bahagian otak yang dikenal pasti merangkumi: OB, bulba olfaktori; Dc, zon tengah kawasan telensefalik dorsal; PPa, bahagian

anterior nukleus praoptik parvoselular; Ppp, bahagian posterior nukleus praoptik parvoselular; PPv, bahagian ventral nukleus pratektal periventrikular; dan LC, lokus seruleus. Bar skala = 50  $\mu$ m (n = 5 setiap kumpulan)

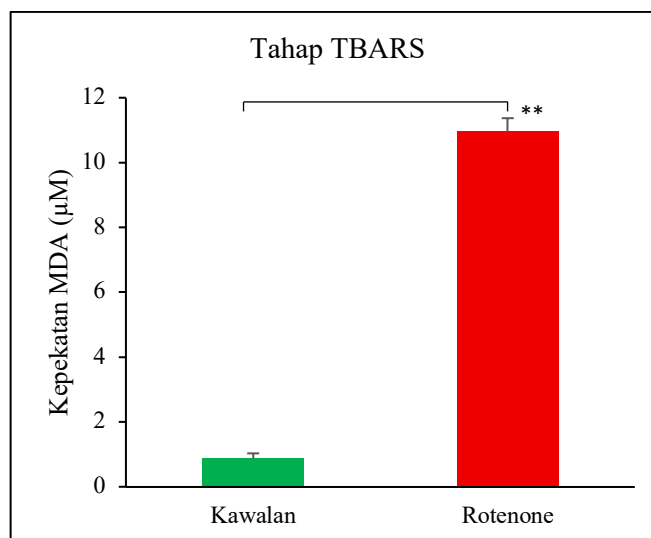




Rajah 4.13 **Perbandingan bilangan sel TH<sup>+</sup> pada semua populasi neuron di dalam otak zebrafish antara kumpulan kawalan dan rotenone.** Kumpulan rotenone (5 µg/L) menunjukkan pengurangan bilangan sel TH<sup>+</sup> yang signifikan di telensefalon, praoptik, diensefalon, pratektal, dan rombensefalon berbanding kumpulan kawalan. (n = 5 setiap kumpulan; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ )

#### 4.2.6 Peningkatan Tekanan Oksidatif dan Disfungsi Respirasi Mitokondria akibat Pendedahan Rotenone

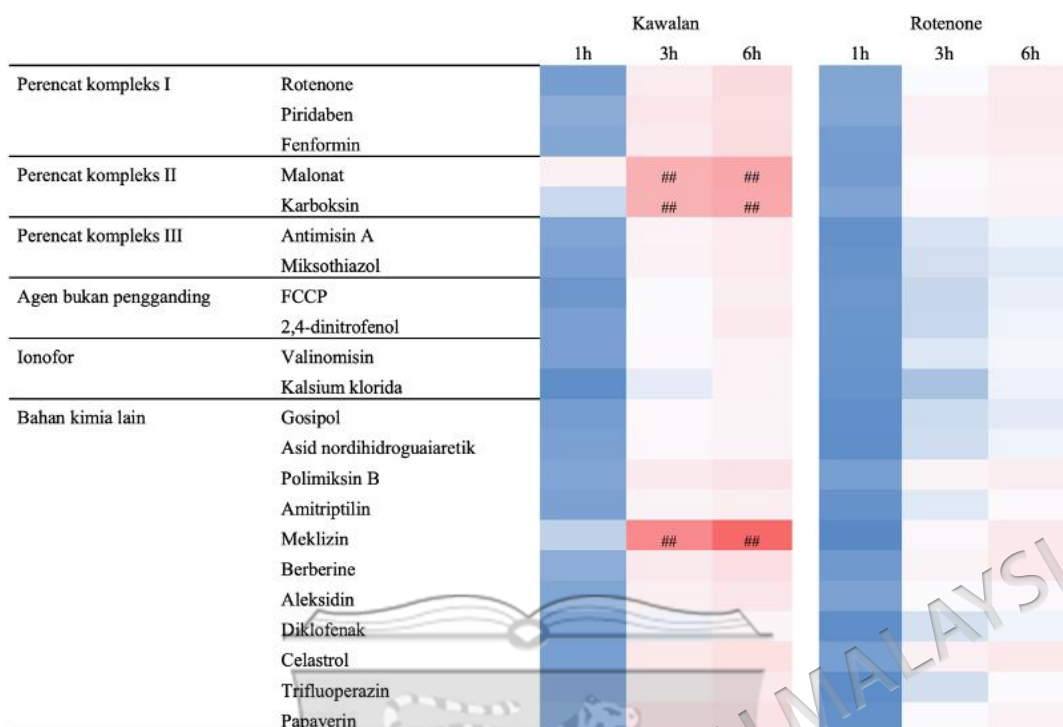
Analisis terhadap tahap pemperoksidaan lipid dalam otak zebrafish dilakukan melalui pengukuran bahan tindak balas TBARS. Kaedah ini digunakan sebagai penanda piawai untuk mengukur kepekatan MDA, iaitu hasil akhir pemperoksidaan lipid yang bertindak balas dengan asid tiobarbiturik (TBA) bagi menentukan tahap tekanan oksidatif sel. Hasil kajian ini mendapati bahawa kumpulan rotenone mencetuskan peningkatan tahap TBARS yang signifikan berbanding kumpulan kawalan ( $p < 0.001$ , Rajah 4.14). Kumpulan rotenone mencatatkan kepekatan MDA sebanyak  $10.95 \pm 0.42 \mu\text{M}$ , iaitu peningkatan sebanyak 1157% berbanding kumpulan kawalan ( $0.87 \pm 0.17 \mu\text{M}$ ). Peningkatan nilai TBARS yang drastik ini dapat mencerminkan kegagalan sistem pertahanan antioksidan endogen dalam mengimbangi penghasilan ROS akibat pendedahan rotenone, yang seterusnya menyebabkan kerosakan oksidatif meluas pada membran lipid sel neuron.



Rajah 4.14 **Kesan pendedahan rotenone terhadap tahap pemperoksidaan lipid (TBARS) dalam otak zebrafish.**

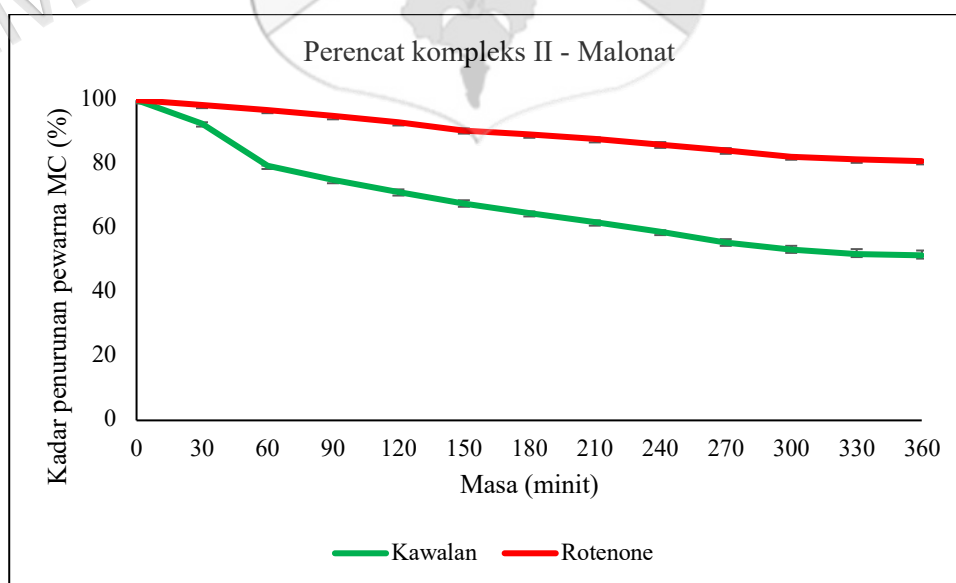
Kumpulan rotenone (5 µg/L) menunjukkan peningkatan kepekatan MDA yang signifikan berbanding kumpulan kawalan, yang menandakan penghasilan tekanan oksidatif yang tinggi. (n = 8 setiap kumpulan; \*\*  $p < 0.001$ )

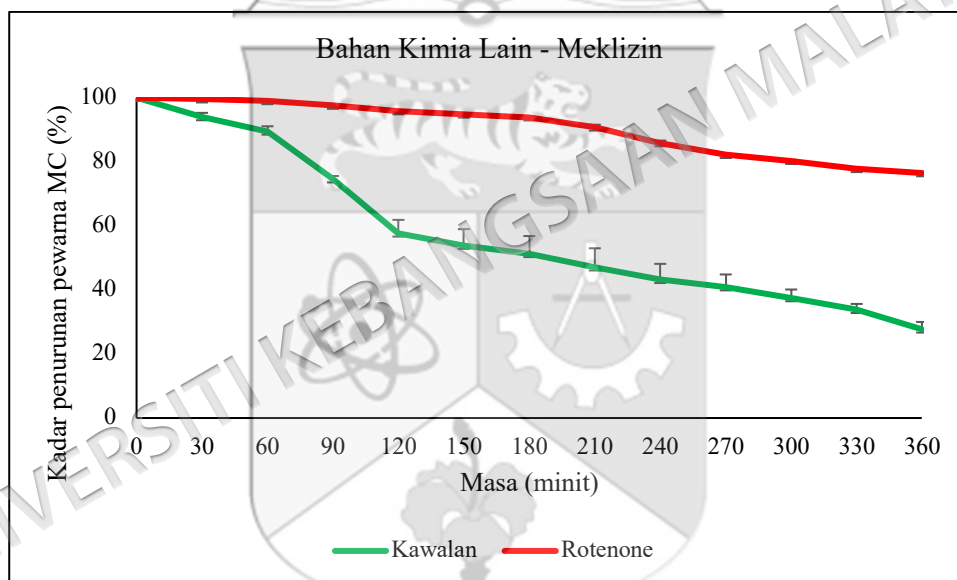
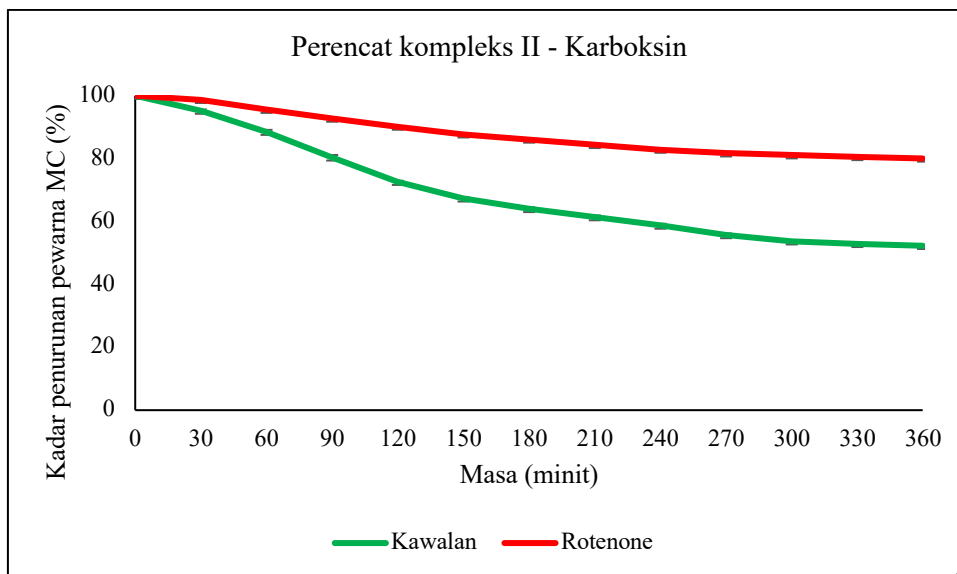
Selari dengan kerosakan oksidatif, profil respirasi mitokondria melalui plat MitoPlate I-1 menunjukkan kegagalan bioenergetik yang nyata pada kumpulan yang didedahkan kepada rotenone. Kumpulan rotenone mempamerkan sifat ketahanan (*resistant*) yang signifikan terhadap perencat kompleks II (malonat dan karboksil) serta meklizin berbanding kumpulan kawalan (Rajah 4.15). Secara kuantitatif, kadar penurunan pewarna redoks tetrazolium dalam kumpulan rotenone menunjukkan penurunan sebanyak 60 % dan 58 % dalam kadar penurunan pewarna secara signifikan apabila masing-masing didedahkan kepada perencat malonat dan karboksil berbanding dengan kumpulan kawalan ( $p < 0.001$ , Rajah 4.28). Sehubungan dengan itu, kumpulan rotenone hanya mencatatkan kadar penurunan pewarna sekitar 20 % bagi kedua-dua perencat tersebut (Rajah 4.16). Trend yang serupa diperhatikan pada perencat meklizin, di mana kumpulan rotenone mempamerkan penurunan sebanyak 67 % dalam kadar penurunan pewarna secara signifikan berbanding dengan kumpulan kawalan ( $p < 0.001$ , Rajah 4.28). Sehubungan dengan itu, kumpulan rotenone hanya mencatatkan kadar penurunan pewarna sekitar 23 % bagi perencat meklizin (Rajah 4.16). Dapatan ini mengukuhkan peranan disfungsi ETC sebagai salah satu mekanisme asas dalam model PD zebrafish ini.



Rajah 4.15 **Peta fenetik tindak balas respirasi mitokondria terhadap pelbagai perencat mitokondria yang disasarkan kepada mitokondria antara kumpulan kawalan dan rotenone.**

Peta ini menunjukkan perbezaan perubahan lipatan (*fold change*) aktiviti mitokondria antara kumpulan kawalan dan rotenone (5 µg/L) selama 6 jam. Penormalan nilai ketumpatan optik (*optical density, OD*) bagi setiap kepekatan perencat pada panjang gelombang 590 nm (warna ungu) terhadap nilai kawalan positif menggunakan plat MitoPlate™ I-1. (n = 30 setiap kumpulan; #p < 0.05, ##p < 0.001 berbanding rotenone)





Rajah 4.16 **Kesan rotenone terhadap kinetik penurunan pewarna dalam mitokondria dengan kehadiran perencat kompleks II (malonat dan karboksिन) dan meklizin.**

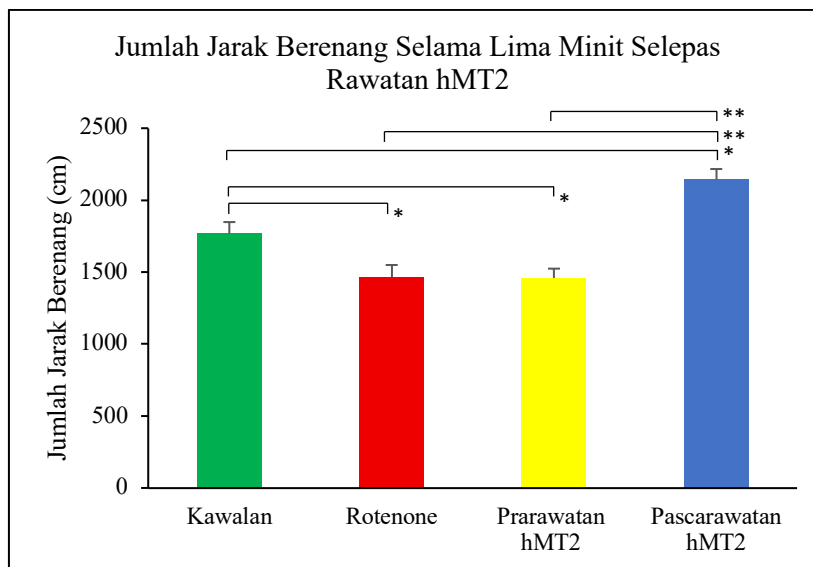
Kumpulan rotenone ( $5 \mu\text{g/L}$ ) menunjukkan profil rintangan yang lebih tinggi terhadap perencat tersebut berbanding kumpulan kawalan, yang menandakan gangguan sedia ada pada fungsi respirasi mitokondria ( $n = 30$  setiap kumpulan)

### 4.3 POTENSI NEUROPROTEKTIF PROTEIN HMT2 TERHADAP MODEL PD PADA ZEBRAFISH

#### 4.3.1 Pemulihan Aktiviti Lokomotor dan Pengurangan Fenotip Keresahan oleh hMT2

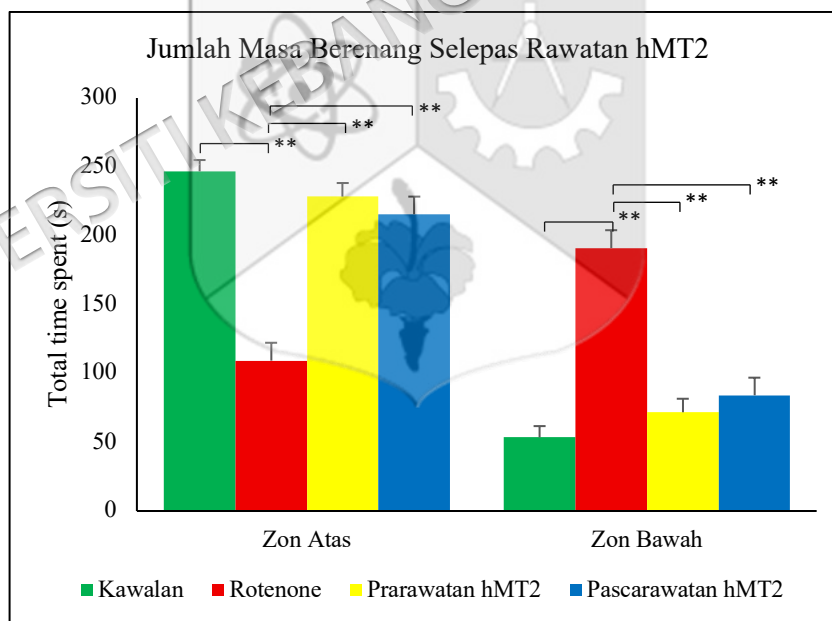
Penilaian aktiviti lokomotor dilakukan bagi mengkaji potensi rawatan hMT2 dalam memulihkan disfungsi motor yang dicetuskan oleh pendedahan rotenone (5 µg/L). Hasil kajian mendapati bahawa intervensi melalui pendekatan pascarawatan hMT2 berjaya meningkatkan jumlah jarak berenang secara signifikan berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.17). Sebaliknya, kumpulan prarawatan hMT2 tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan dalam aktiviti lokomotor berbanding kumpulan rotenone, mencadangkan bahawa kesan pemulihan motor adalah lebih berkesan melalui pendekatan pascarawatan hMT2 selepas permulaan kerosakan sel.

Bagi profil keresahan, kedua-dua pendekatan prarawatan dan pascarawatan hMT2 menunjukkan keupayaan untuk mengurangkan tingkah laku keresahan tersebut dengan ketara. Kedua-dua kumpulan prarawatan dan pascarawatan hMT2 menghabiskan masa yang lebih lama meneroka zon atas tangki berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.18). Penemuan ini turut disokong oleh data penjejakan video berkomputer (Rajah 4.19), di mana kumpulan yang menerima rawatan hMT2 menunjukkan corak penerokaan ruang yang meluas, berbeza dengan trajektori renangan kumpulan rotenone yang terhad dan tertumpu di zon bawah tangki.



Rajah 4.17 **Kesan rawatan hMT2 terhadap jumlah jarak berenang keseluruhan zebrafish dalam tempoh lima minit.**

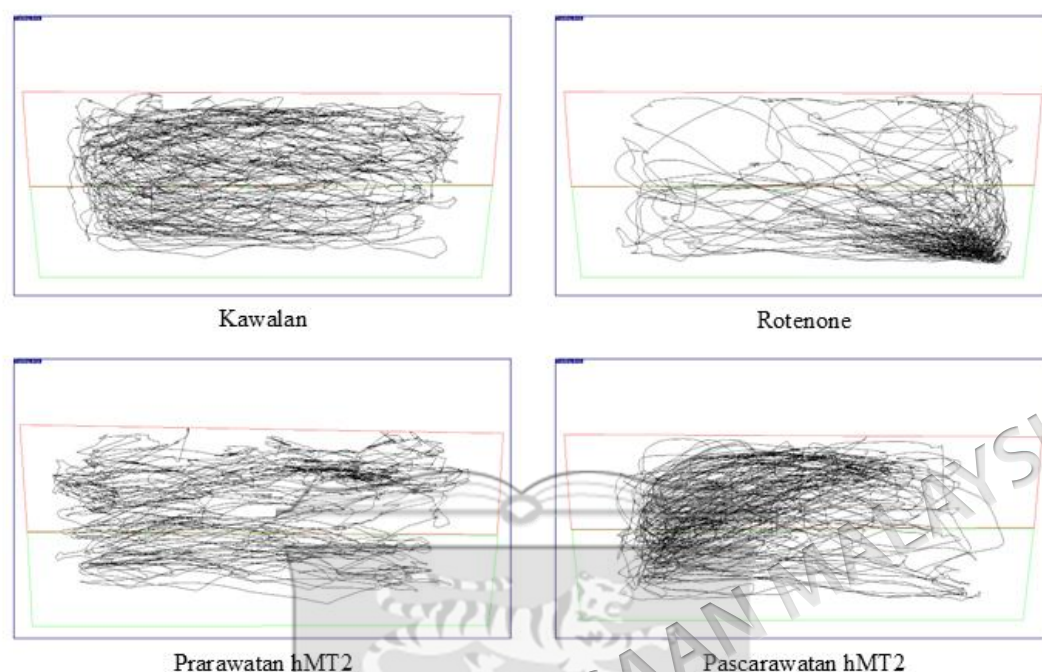
Kumpulan pascarawatan hMT2 menunjukkan peningkatan aktiviti lokomotor yang signifikan berbanding kumpulan rotenone, manakala tiada perbezaan signifikan diperhatikan bagi kumpulan prarawatan hMT2 (0.2 µg/ikan). (n = 55 setiap kumpulan, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ )



Rajah 4.18 **Kesan rawatan hMT2 terhadap taburan masa berenang di Zon Atas dan Zon Bawah.**

Kedua-dua kumpulan prarawatan dan pascarawatan hMT2 (0.2 µg/ikan) menunjukkan pengurangan tingkah laku keresahan yang signifikan, dibuktikan dengan peningkatan masa yang dihabiskan di zon atas serta

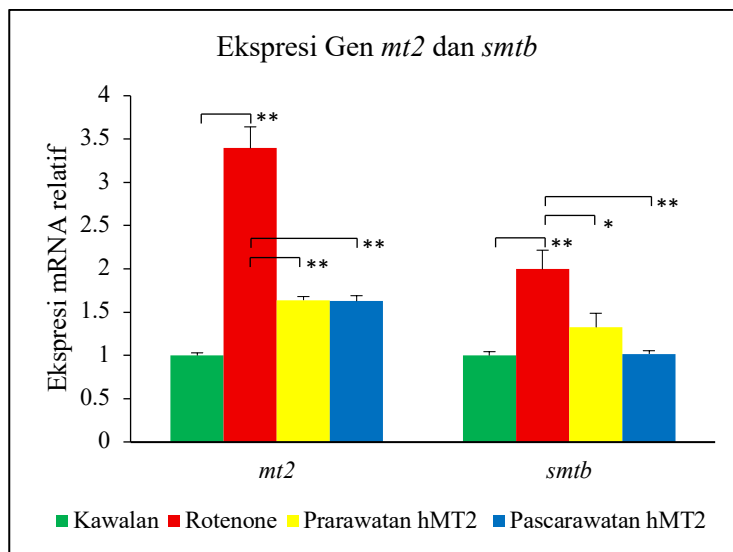
pengurangan masa di zon bawah berbanding kumpulan rotenone ( $n = 55$  setiap kumpulan,  $** p < 0.001$ ).



Rajah 4.19 **Penjejakan video berkomputer yang menunjukkan trajektori pergerakan zebrafish selepas rawatan hMT2.** Kumpulan rawatan hMT2 ( $0.2 \mu\text{g}/\text{ikan}$ ) menunjukkan corak renangan yang lebih meluas dan aktif di zon atas tangki berbanding kumpulan rotenone yang menunjukkan pergerakan terhad di zon bawah tangki (Zon atas tangki = kotak berwarna merah, zon bawah tangki = kotak berwarna hijau;  $n = 55$  setiap kumpulan)

#### 4.3.2 Modulasi Gen Pertahanan Endogen (*mt2* dan *smtb*) oleh hMT2

Analisis qPCR dilakukan bagi menilai impak intervensi hMT2 terhadap pengawalan gen MT, iaitu *mt2* dan *smtb*, yang bertindak sebagai sistem pertahanan endogen terhadap tekanan oksidatif dan ketoksikan logam. Hasil kajian ini mendapati bahawa kedua-dua pendekatan prarawatan dan pascarawatan hMT2 menunjukkan penurunan ekspresi gen *mt2* dan *smtb* secara signifikan berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.05$ , Rajah 4.20). Penurunan ini menunjukkan bahawa pemberian hMT2 eksogen telah berjaya menstabilkan homeostasis redoks dan mengurangkan sitotoksik, yang seterusnya mengurangkan keperluan sel untuk mengekspresikan gen perlindungan endogen secara berlebihan.

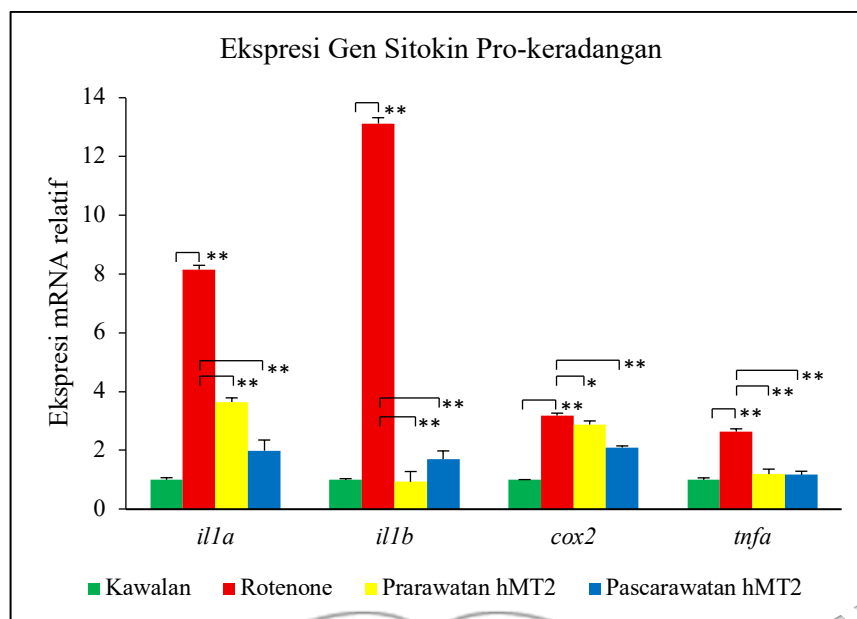


Rajah 4.20 **Kesan rawatan hMT2 terhadap ekspresi gen *mt2* dan *smtb* pada otak zebrafish.**

Kumpulan prarawatan dan pascarawatan hMT2 (0.2 µg/ikan) menunjukkan penurunan pengekspresan gen yang signifikan berbanding kumpulan rotenone (n = 7 setiap kumpulan; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ )

#### 4.3.3 Efikasi Anti-keradangan hMT2 melalui Penindasan Sitokin Pro-keradangan (*il-1a*, *il-1b*, *cox-2* dan *tnf-α*) oleh hMT2

Potensi anti-keradangan hMT2 dinilai melalui analisis qPCR terhadap sitokin pro-keradangan dalam otak zebrafish. Kedua-dua pendekatan prarawatan dan pascarawatan hMT2 menunjukkan keupayaan dalam penurunan ekspresi gen bagi kesemua sitokin yang dikaji secara signifikan berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.05$ , Rajah 4.21). Penemuan ini mengukuhkan peranan hMT2 sebagai modulator imun yang berkesan dalam mengurangkan tindak balas keradangan akibat pendedahan rotenone dalam model PD ini.

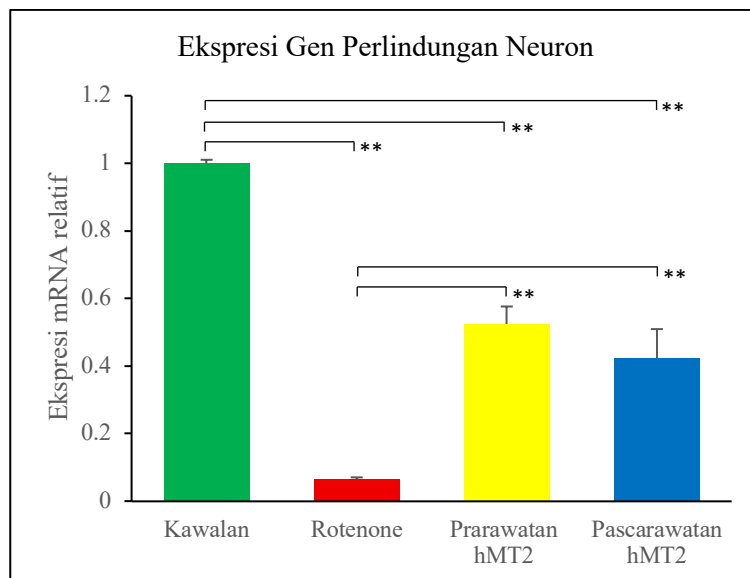


Rajah 4.21 **Kesan rawatan hMT2 terhadap ekspresi gen sitokin pro-keradangan.**

Peningkatan ekspresi gen *il-1a*, *il-1b*, *cox-2*, dan *tnf- $\alpha$*  akibat pendedahan rotenone berjaya diturunkan secara signifikan melalui intervensi prarawatan dan pascarawatan hMT2 (0.2  $\mu$ g/ikan) (n = 7 setiap kumpulan; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ )

#### 4.3.4 Pemulihan Sokongan Neurotropik (*bdnf*) melalui Intervensi hMT2

BDNF merupakan protein penting yang menyokong kemandirian, pembezaan, dan keplastikan neuron. Hasil analisis qPCR menunjukkan bahawa intervensi hMT2 berupaya memulihkan pengekspresan gen *bdnf* yang terjejas akibat rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.22). Menariknya, strategi prarawatan hMT2 menunjukkan trend pemulihan yang lebih tinggi berbanding pascarawatan hMT2. Keadaan ini mencadangkan bahawa hMT2 bertindak bukan sahaja sebagai agen anti-apoptosis, tetapi juga mampu mengaktifkan semula laluan faktor pertumbuhan neuron untuk mengekalkan keplastikan sinaptik daripada kerosakan secara progresif akibat pendedahan kepada rotenone.



Rajah 4.22 **Kesan rawatan hMT2 terhadap ekspresi gen perlindungan neuron (*bdnf*).**

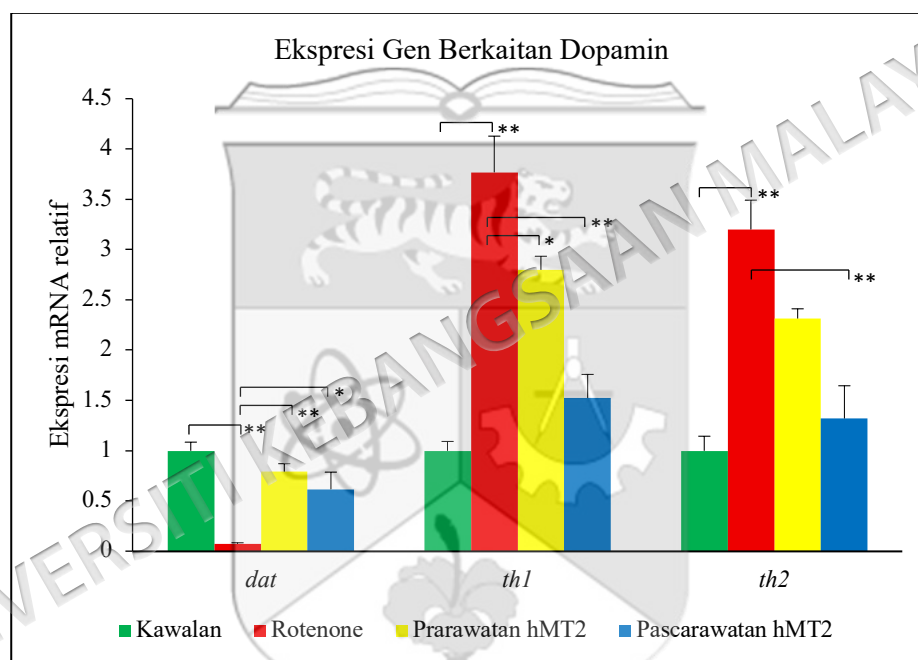
Kerosakan neuron akibat pendedahan rotenone berjaya dipulihkan melalui peningkatan ekspresi gen *bdnf* dalam kumpulan prarawatan dan pascarawatan hMT2 (0.2 µg/ikan) (n = 7 setiap kumpulan; \*\*  $p < 0.001$ )

#### 4.3.5 Pemulihan Sistem Dopaminergik (*dat*, *th1* dan *th2*) dan Populasi Neuron DA oleh hMT2

Integriti sistem dopaminergik merupakan parameter kritikal dalam menilai keberkesanan hMT2 sebagai agen neuroprotektif terhadap kerosakan neuron akibat pendedahan kepada rotenone. Intervensi hMT2 didapati berjaya memulihkan semula ekspresi gen pengangkut DA (*dat*) ke tahap basal yang setara dengan kumpulan kawalan, yang menandakan pemulihan fungsi pengangkutan DA yang terjejas. Bagi gen biosintesis DA (*th1* dan *th2*), rawatan hMT2, khususnya pascarawatan, didapati berupaya menstabilkan semula ekspresi gen *th1* dan *th2* secara signifikan berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.23). Keadaan ini mencadangkan bahawa hMT2 bukan sahaja melindungi neuron daripada kematian, tetapi juga menstabilkan semula fluks dopaminergik sehingga keperluan untuk sintesis DA yang berlebihan menerusi *th1/th2* tidak lagi diperlukan bagi mengekalkan tahap neurotransmitter yang optimum.

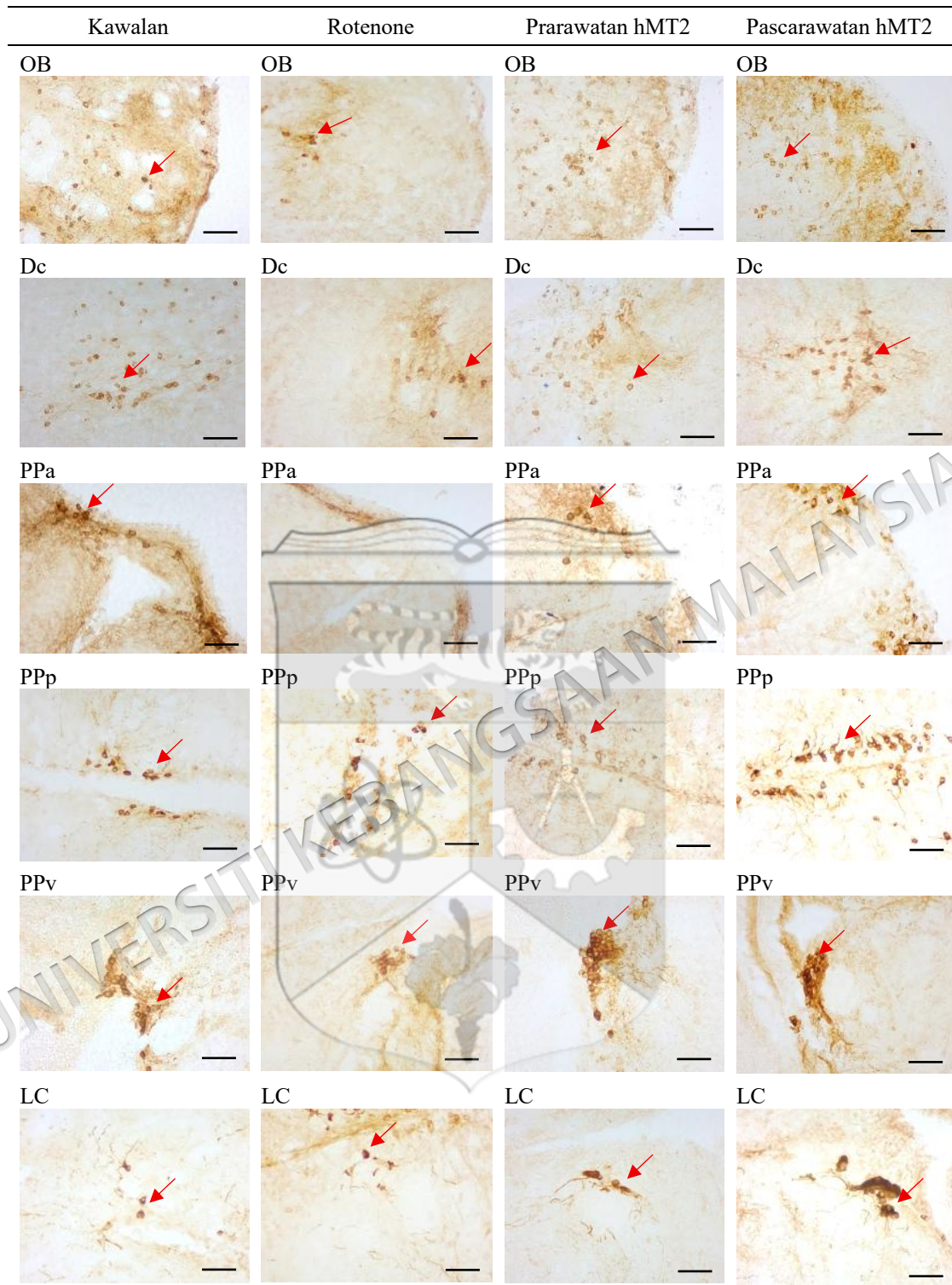
Analisis imunohistokimia ini mengesahkan keberkesanan hMT2 dalam melindungi populasi neuron DA yang dikenal pasti melalui pelabelan antibodi TH (Rajah 4.24). Peningkatan bilangan sel TH<sup>+</sup> yang signifikan dikesan merentasi semua

bahagian otak, dengan pemulihan neuron tertinggi diperhatikan pada bahagian telensefalon (125%,  $p < 0.001$ ), diikuti oleh bahagian praoptik (62%,  $p < 0.001$ ), rombensefalon (50%,  $p < 0.05$ ), diensefalon (40%,  $p < 0.001$ ), dan pratektal (39%,  $p < 0.001$ ) apabila dibandingkan dengan kumpulan rotenone (Rajah 4.25). Secara keseluruhannya, dapatan ini menunjukkan prarawatan hMT2 menunjukkan kecekapan yang lebih tinggi dalam mengekalkan kepadatan populasi neuron DA berbanding pascarawatan. Fenomena ini memperkukuhkan peranan MT sebagai agen profilaksis yang berkesan dalam mengekalkan integriti struktur neuron daripada kesan neurotoksisiti rotenone.



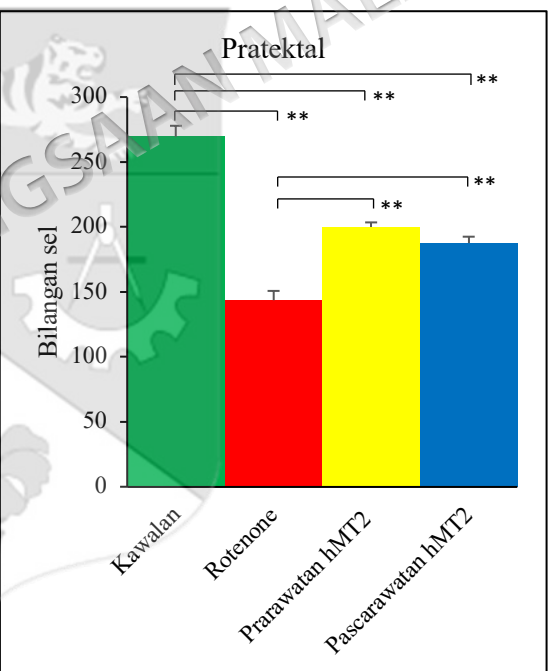
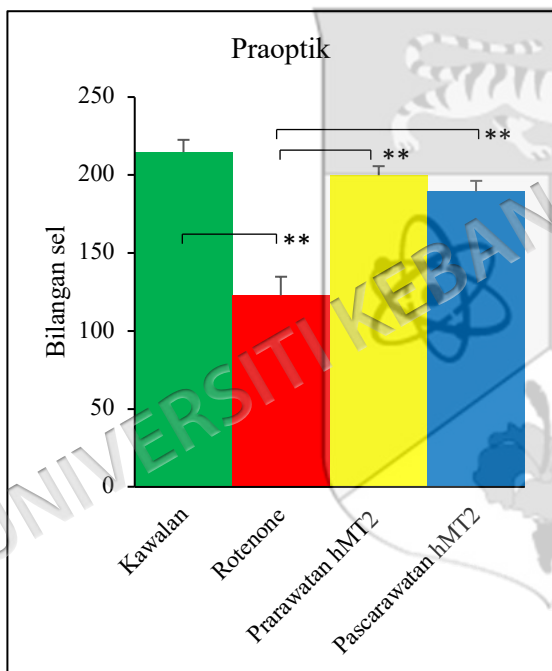
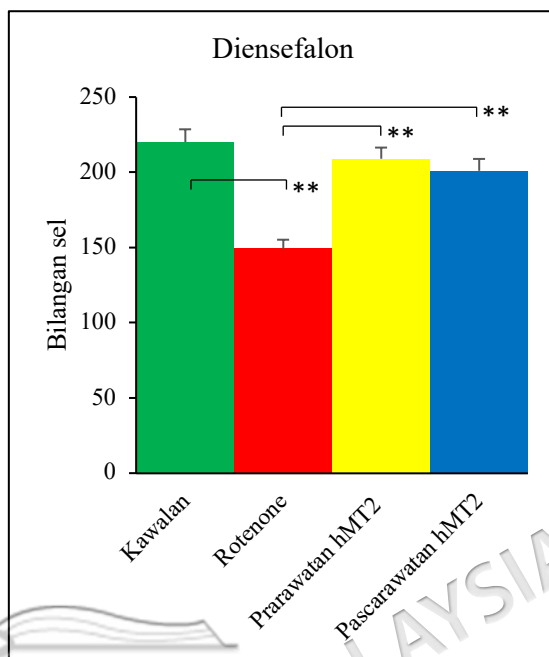
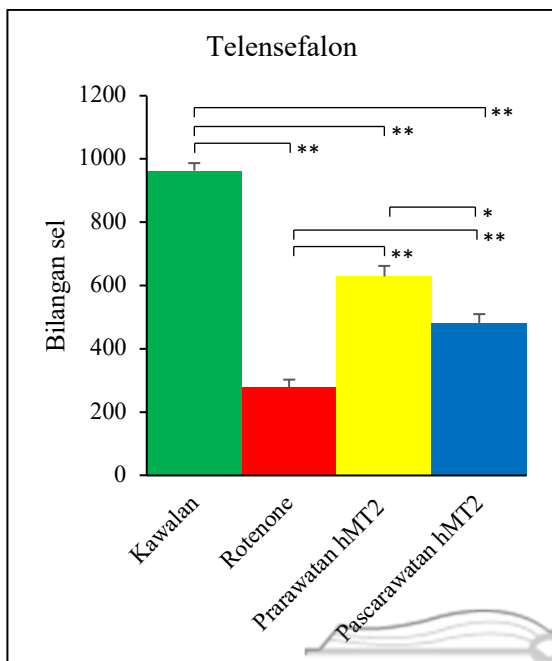
Rajah 4.23 **Kesan rawatan hMT2 terhadap ekspresi gen berkaitan dopamin (*dat*, *th1*, dan *th2*).**

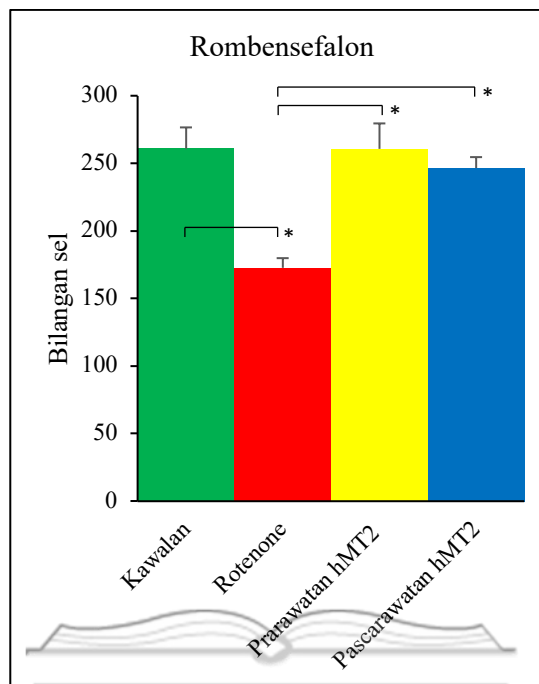
Pemulihan ekspresi gen *dat* dan penstabilan semula ekspresi gen *th1* serta *th2* menunjukkan pemulihan sistem dopaminergik oleh hMT2 (0.2 µg/ikan) (n = 7 setiap kumpulan; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ )



Rajah 4.24 **Kesan rawatan hMT2 terhadap populasi neuron DA di pelbagai bahagian otak zebrafish.**

Fotomikrograf menunjukkan perbezaan morfologi sel TH<sup>+</sup> antara kumpulan kawalan, rotenone, dan kumpulan prarawatan serta pascarawatan hMT2 (0.2 µg/ikan). Bahagian otak yang dikenal pasti merangkumi: OB, bulba olfaktori; Dc, zon tengah kawasan telensefalik dorsal; PPa, bahagian anterior nukleus praoptik parvoselular; PPp, bahagian posterior nukleus praoptik parvoselular; PPv, bahagian ventral nukleus pratektal periventrikular; dan LC, lokus seruleus. Bar skala = 50 µm (n = 5 setiap kumpulan)



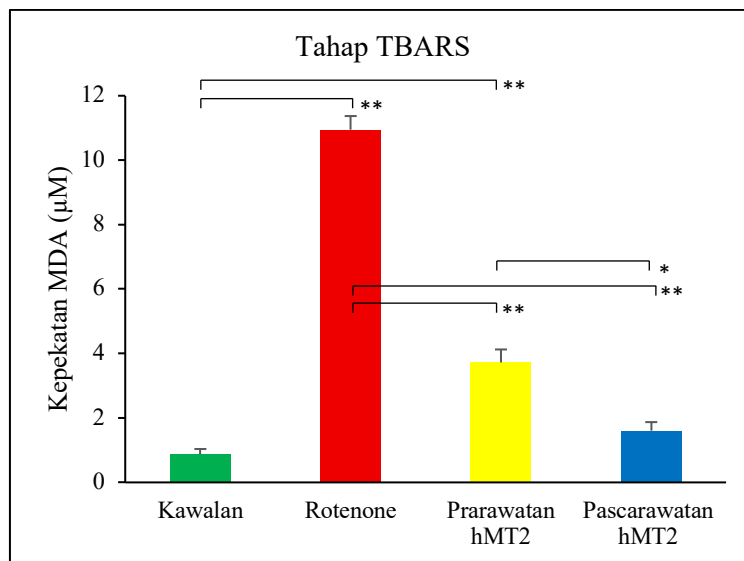


Rajah 4.25 **Perbandingan bilangan sel TH<sup>+</sup> pada semua populasi neuron di dalam otak zebrafish antara kumpulan kawalan, rotenone dan rawatan hMT2**

Rawatan hMT2 (0.2 µg/ikan) meningkatkan kemandirian neuron DA secara signifikan berbanding kumpulan rotenone (n = 5 setiap kumpulan; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ )

#### 4.3.6 Penurunan Tekanan Oksidatif dan Pemulihan Respirasi Mitokondria oleh hMT2

Penilaian tahap pemperoksidaan lipid melalui pengukuran TBARS dilakukan bagi mengkaji keberkesanan rawatan hMT2 dalam melindungi sel otak zebrafish daripada tekanan oksidatif. Hasil kajian ini mendapati bahawa rawatan hMT2, terutamanya melalui intervensi pascarawatan, menunjukkan keupayaan neuroprotektif dalam menurunkan tekanan oksidatif akibat pendedahan rotenone. Rawatan hMT2 menurunkan tahap TBARS secara signifikan, dengan penurunan sebanyak 66 % bagi prarawatan dan 85 % bagi pascarawatan berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.26). Keupayaan hMT2 mengekalkan tahap MDA yang rendah membuktikan peranannya dalam menstabilkan integriti membran sel daripada serangan radikal bebas.



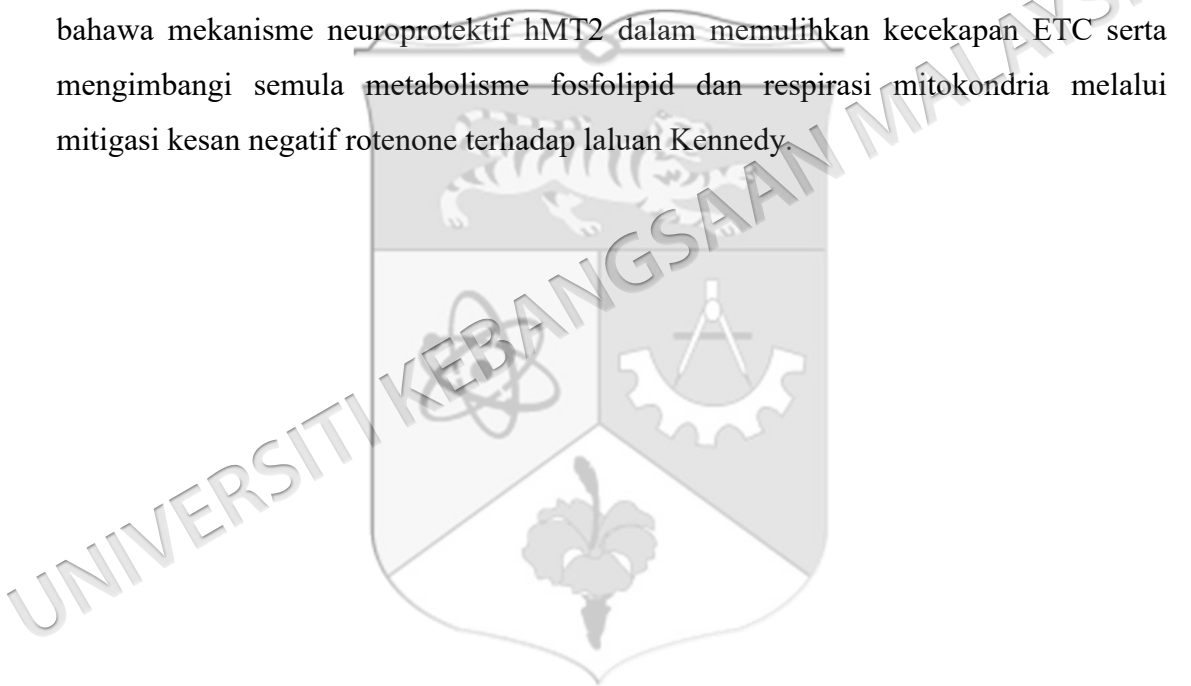
Rajah 4.26 **Kesan rawatan hMT2 terhadap tahap pemperoksidaan lipid (TBARS) dalam otak zebrafish.**

Kedua-dua intervensi prarawatan dan pascarawatan hMT2 (0.2 µg/ikan) berjaya menurunkan tekanan oksidatif yang disebabkan oleh pendedahan kepada rotenone (n = 8 setiap kumpulan; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ )

Dari aspek bioenergetik, rawatan hMT2 berjaya memulihkan respirasi mitokondria yang terjejas secara signifikan akibat pendedahan kepada rotenone. Analisis kolorimetri ini menunjukkan pemulihan sensitiviti ETC terhadap perencat kompleks II dan meklizin ( $p < 0.001$ , Rajah 4.27). Sejajar dengan pemulihan keseimbangan redoks, rawatan hMT2 didapati berupaya mengaktifkan semula fungsi respirasi mitokondria melalui peningkatan aktiviti metabolik yang dinilai menggunakan plat MitoPlate I-1 melalui kadar penurunan pewarna redoks tetrazolium. Penemuan ini menunjukkan bahawa rawatan hMT2 meningkatkan semula aktiviti mitokondria secara signifikan merentas hampir kesemua perencat yang diuji ( $p < 0.001$ , Rajah 4.28). Rawatan hMT2 meningkatkan kadar penurunan pewarna redoks tetrazolium secara signifikan, dengan peningkatan sebanyak 2.4 kali ganda bagi prarawatan dan 2.2 kali ganda bagi pascarawatan apabila didedahkan kepada perencat malonat dan karboksil berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.28). Sehubungan dengan itu, rawatan hMT2 mencatatkan kadar penurunan pewarna sekitar 50 % bagi kedua-dua perencat tersebut, dengan peningkatan semula aktiviti mitokondria sekitar 30 % daripada kumpulan rotenone (Rajah 4.29). Trend yang serupa diperhatikan pada perencat meklizin, di mana rawatan hMT2 meningkatkan kadar penurunan pewarna redoks tetrazolium secara signifikan, dengan peningkatan sebanyak 2.9 kali ganda bagi

prarawatan dan 2.3 kali ganda bagi pascarawatan berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.28). Sehubungan dengan itu, rawatan hMT2 mencatatkan kadar penurunan pewarna sekitar 62 % bagi kedua-dua perencat tersebut, dengan peningkatan semula aktiviti mitokondria sekitar 30 % daripada kumpulan rotenone (Rajah 4.29).

Intervensi prarawatan dan pascarawatan hMT2 masing-masing menunjukkan peningkatan secara signifikan sebanyak 2.88 kali ganda dan 2.25 kali ganda dalam kadar penurunan warna berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.28). Pemulihan ini turut melibatkan meklizin yang merupakan perencat bagi laluan Kennedy, di mana hMT2 mengekalkan aktiviti respirasi sehingga 68 % berbanding hanya 23 % dalam kumpulan rotenone (Rajah 4.29). Penemuan ini mencadangkan bahawa mekanisme neuroprotektif hMT2 dalam memulihkan kecekapan ETC serta mengimbangi semula metabolisme fosfolipid dan respirasi mitokondria melalui mitigasi kesan negatif rotenone terhadap laluan Kennedy.

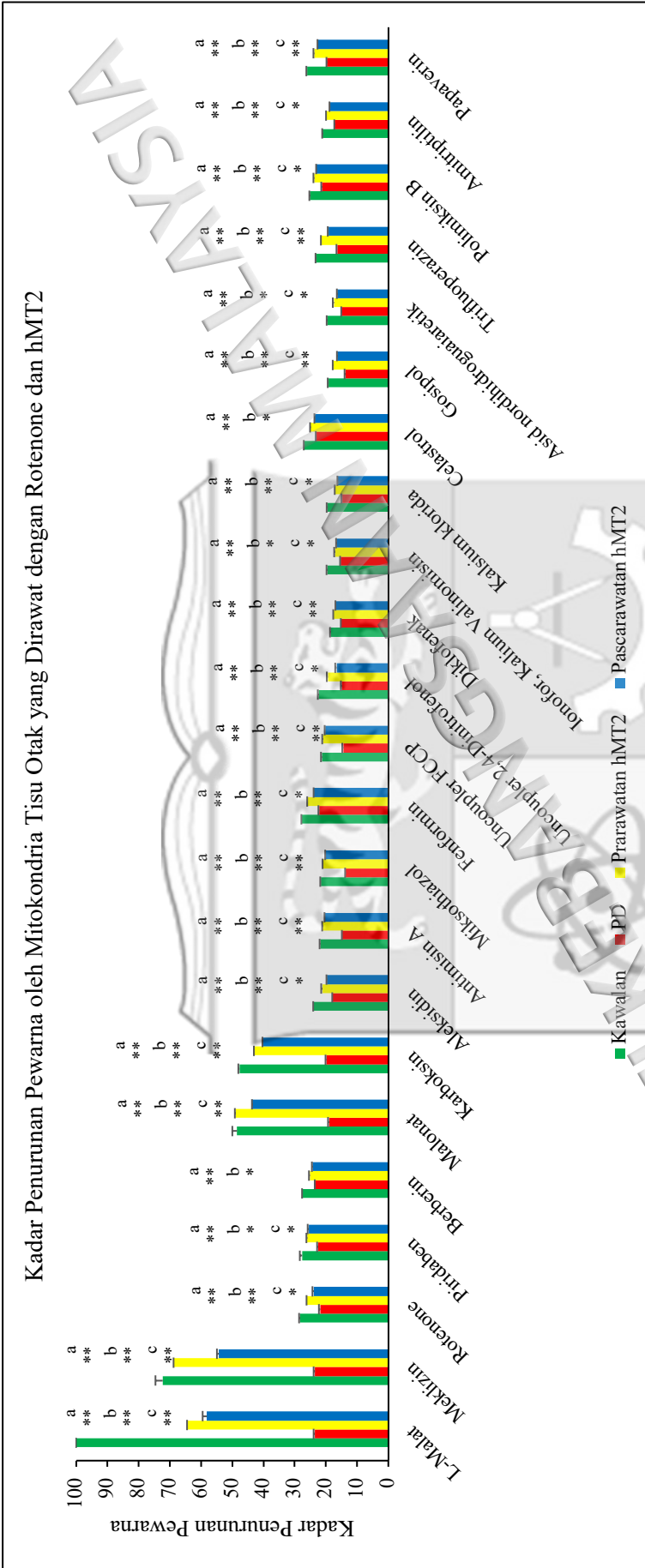




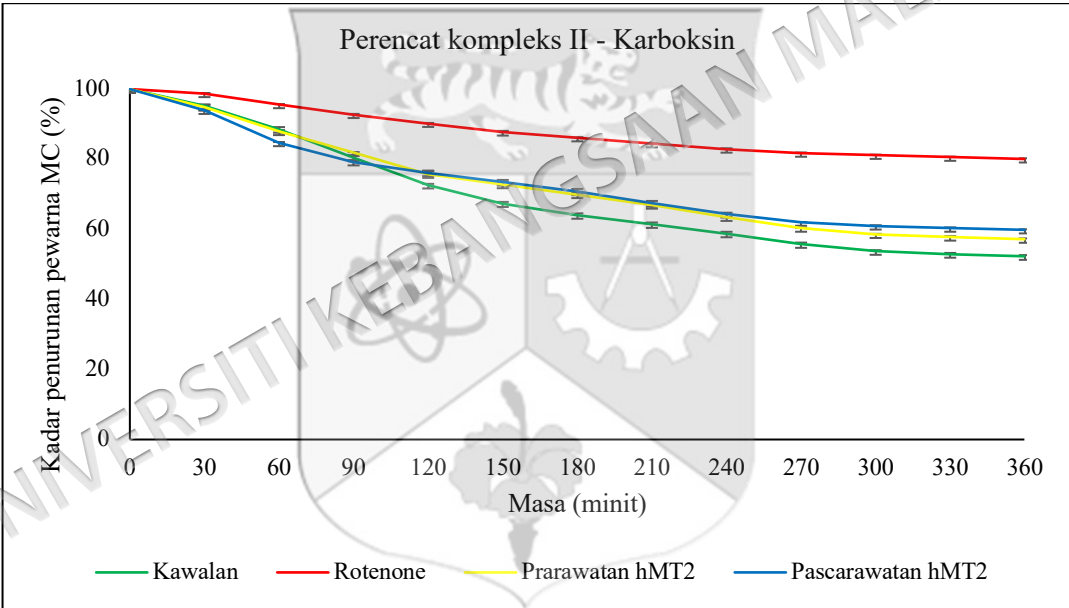
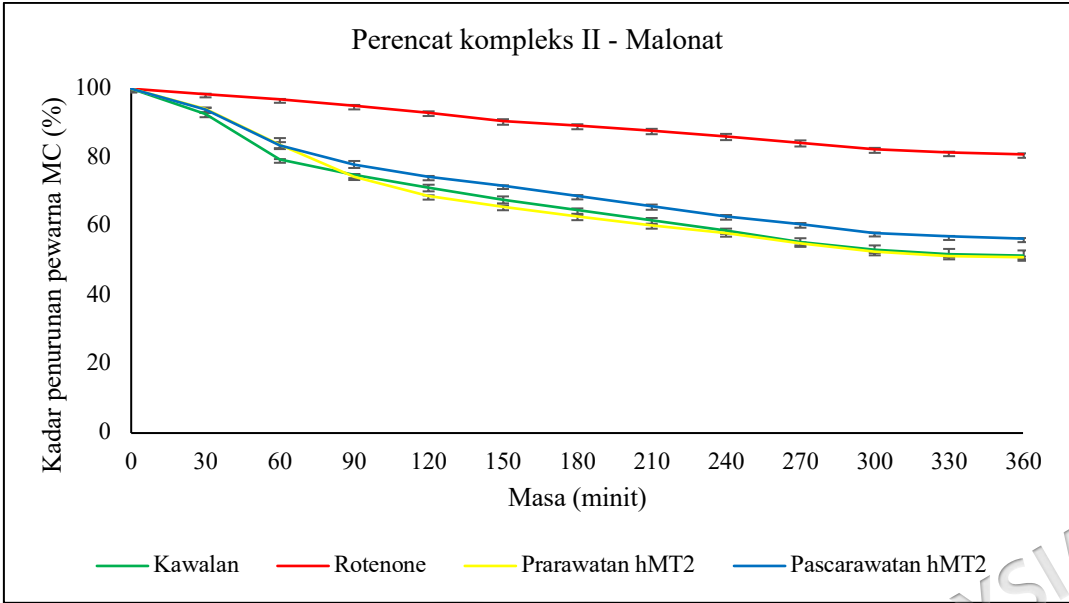
Rajah 4.27 Peta fenetik kesan rawatan hMT2 terhadap tindak balas respirasi mitokondria.

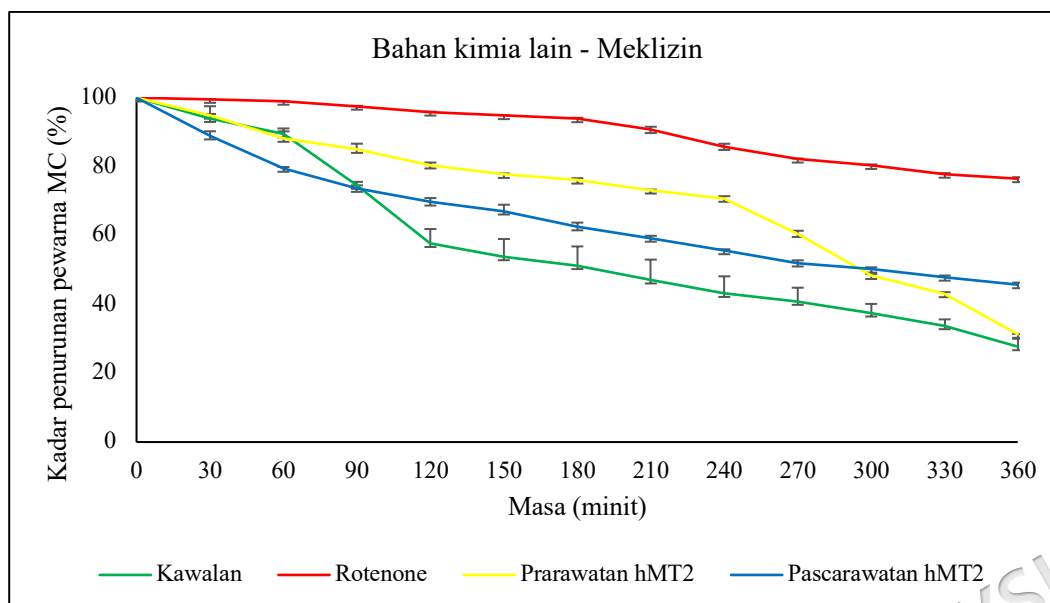
Peta ini menunjukkan perbezaan tindak balas respirasi mitokondria kumpulan kawalan, rotenone, prarawatan, dan pascarawatan hMT2 (0.2  $\mu\text{g}/\text{ikan}$ ) dalam kehadiran perencat mitokondria yang disasarkan kepada mitokondria selama 6 jam telah dihasilkan selepas penormalan nilai OD bagi setiap kepekatan perencat pada panjang gelombang 590 nm (warna ungu) terhadap nilai kawalan positif yang disertakan dalam plat MitoPlate™ I-1.

( $n = 30$  setiap kumpulan;  $\#p < 0.05$ ,  $\#\#p < 0.001$  berbanding rotenone)



Rajah 4.28 Ujian respirasi mitokondria dilaksanakan dengan menggunakan Mitoplaste I-1 yang mengandungi 22 perencat mitokondria yang berbeza. Graf bar yang menggambarkan kadar penurunan pewarna oleh mitokondria tisu otak yang dirawat dengan rotenone dan hMT2 (0.2 µg/ikan). Paksi-y menunjukkan kadar penurunan pewarna redoks tetrazolium, manakala paksi-x memaparkan substrat yang tersedia dalam Mitoplaste I-1. <sup>a</sup>bandingan antara kawalan dan PD, <sup>b</sup> bandingan antara PD dan prarawatan hMT2, <sup>c</sup> bandingan antara PD dan pascarawatan hMT2, (n = 30 setiap kumpulan; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ )



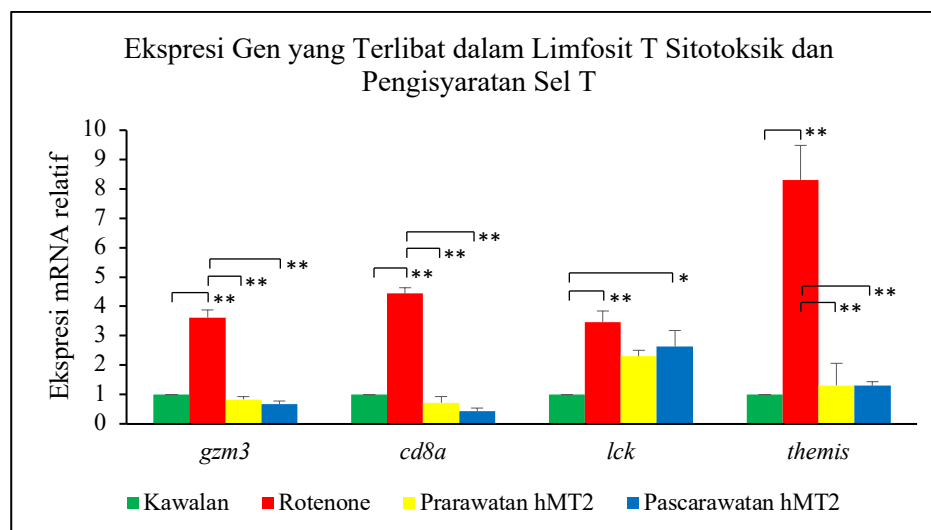


Rajah 4.29 **Kesan rawatan hMT2 terhadap kinetik penurunan pewarna dalam mitokondria dengan kehadiran perencat kompleks II (malonat dan karboksil) dan meklizin.**

Rawatan hMT2 (0.2 µg/ikan) berjaya membalikkan profil rintangan tinggi yang ditunjukkan oleh kumpulan rotenone terhadap perencat malonat, karboksil, dan meklizin (n = 30 setiap kumpulan)

#### 4.3.7 Modulasi Pengisyaran Sel T dan Pengawalan Limfosit T Sitotoksik oleh hMT2

Impak rawatan hMT2 terbukti apabila analisis profil transkriptomik menunjukkan pengurangan terhadap sebahagian besar komponen imun sel yang dicetuskan oleh rotenone. Melalui rawatan hMT2, peningkatan ekspresi gen *gzm3* dan *cd8a* yang mengawal selia fungsi limfosit T sitotoksik telah ditindas secara signifikan berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.30). Selain itu, trend penurunan yang signifikan turut diperhatikan pada gen pengawal selia laluan pengisyaran TCR, iaitu *themis* ( $p < 0.001$ , Rajah 4.30). Walau bagaimanapun, rawatan hMT2 didapati tidak mengurangkan ekspresi gen *lck* secara signifikan berbanding kumpulan rotenone. Walaupun kesan modulasi terhadap *lck* adalah terhad, penurunan ketara pada gen *gzm3*, *cd8a*, dan *themis* secara keseluruhannya masih mencerminkan potensi hMT2 dalam meredakan sebahagian tindak balas neuroinflamasi yang agresif, sekali gus mengekang impak buruk sel T sitotoksik terhadap integriti neuron dalam model PD ini.



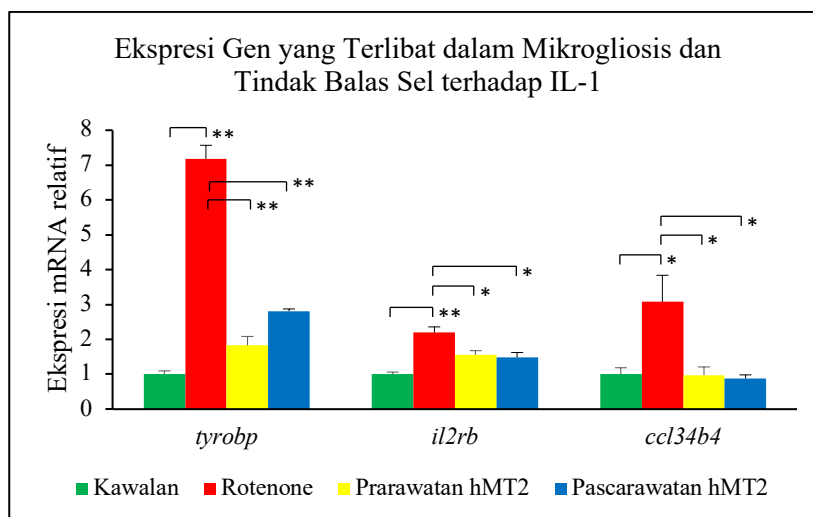
Rajah 4.30 **Kesan rawatan hMT2 terhadap ekspresi gen yang terlibat dalam limfosit T sitotoksik dan pengisyaratan sel T (*gzm3*, *cd8a*, *lck*, dan *themis*).**

Peningkatan ekspresi gen bagi komponen pengaktifan sel T akibat neurotoksisiti rotenone berjaya ditindas secara signifikan melalui rawatan hMT2 (0.2 µg/ikan). Penurunan ketara diperhatikan pada gen *gzm3*, *cd8a*, dan *themis*, yang memberikan indikasi terhadap pengurangan pengaktifan limfosit T sitotoksik dan modulasi laluan pengisyaratan reseptor sel T (TCR).

(n = 7 setiap kumpulan; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ ).

#### 4.3.8 Penindasan Mikrogliosis dan Pengawalaturan Tindak Balas Sitokin oleh hMT2

Rawatan menggunakan protein hMT2 didapati berjaya mengekang gangguan pengawalaturan mikrogliosis dan laluan pengisyaratan sitokin pro-keradangan yang dicetuskan oleh rotenone. Kumpulan yang menerima rawatan hMT2 menunjukkan penurunan ekspresi gen *tyrobp* secara signifikan berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.31), sekali gus menandakan penyekatan terhadap pengaktifan mikroglia reaktif. Selari dengan penindasan mikrogliosis tersebut, gen-gen yang dikaitkan dengan tindak balas sel terhadap interleukin-1 (IL-1), iaitu *il2rb* ( $p < 0.05$ ) dan *ccl34b.4* ( $p < 0.05$ ), turut menunjukkan penurunan ekspresi yang signifikan berbanding kumpulan rotenone (Rajah 4.31). Penemuan ini menunjukkan bahawa hMT2 berupaya meredakan persekitaran neuroinflamasi yang progresif melalui penindasan pengaktifan sel glia dan pelemahan laluan pengisyaratan sitokin IL-1.

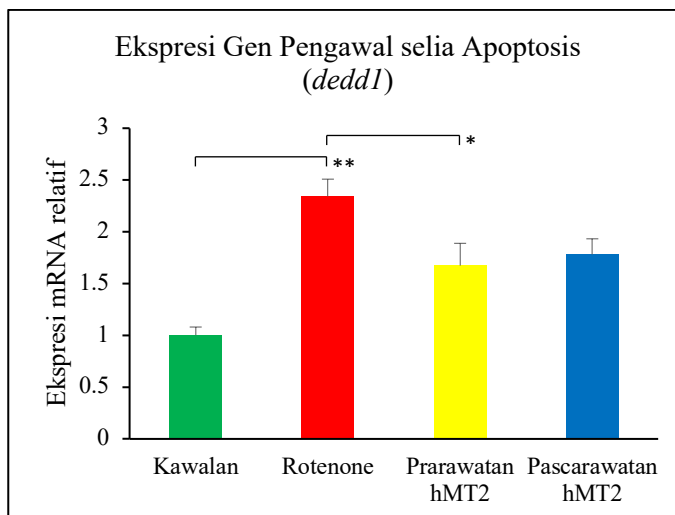


Rajah 4.31 **Kesan rawatan hMT2 terhadap ekspresi gen yang terlibat dalam mikrogliosis dan tindak balas sel terhadap IL-1 (*tyrobp*, *il2rb*, dan *ccl34b.4*).**

Rawatan hMT2 (0.2 µg/ikan) berjaya menindas ekspresi gen bagi penanda pengaktifan mikroglia (*tyrobp*) dan pengisyaratan sitokin (*il2rb* dan *ccl34b.4*) secara signifikan dalam meredakan tindak balas neuroinflamasi melalui penyekatan pengaktifan mikroglia reaktif dan lata pengisyaratan interleukin. (n = 7 setiap kumpulan; \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ )

#### 4.3.9 Perintang Proses Apoptosis dan Perlindungan Terhadap Neurodegenerasi oleh hMT2

Analisis transkriptomik seterusnya menunjukkan bahawa impak rawatan hMT2 terhadap parameter apoptosis adalah bergantung kepada strategi masa rawatan yang diberikan. Hasil kajian ini menunjukkan bahawa hanya intervensi prarawatan hMT2 berjaya menurunkan ekspresi gen pro-apoptosis *dedd1* secara signifikan berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.05$ , Rajah 4.32). Memandangkan *dedd1* berperanan sebagai pengawal selia penting yang berinteraksi secara langsung dengan kaspase dalam fasa pelaksanaan apoptosis, penindasan awal melalui pendekatan profilaksis ini membuktikan bahawa prarawatan hMT2 mampu menyekat lata kematian sel sebelum kerosakan kekal berlaku. Sebaliknya, intervensi pascarawatan hMT2 (terapeutik) didapati tidak menunjukkan penurunan ekspresi *dedd1* yang signifikan berbanding kumpulan rotenone (Rajah 4.32). Penemuan ini mengesahkan bahawa hMT2 menunjukkan potensi neuroprotektif yang lebih berkesan dalam memelihara kemandirian populasi neuron sebagai agen pencegahan (profilaksis) berbanding terapeutik melalui perintang laluan apoptosis dalam model zebrafish ini.



Rajah 4.32 **Kesan rawatan hMT2 terhadap ekspresi gen pengawal selia apoptosis (*dedd1*).**

Intervensi prarawatan hMT2 (0.2  $\mu\text{g}/\text{ikan}$ ) menunjukkan kemampuan untuk menindas ekspresi gen *dedd1* secara signifikan dalam menyekat lara kematian sel sebelum kerosakan kekal berlaku. (n = 7 setiap kumpulan; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ ).

#### 4.3.10 Perbandingan Efikasi Antara Intervensi Profilaksis dan Terapeutik hMT2

Penentuan fasa intervensi rawatan hMT2 yang optimum memerlukan penilaian integratif merentas pelbagai parameter, merangkumi analisis lokomotor, profil biokimia dan molekul, serta analisis imunohistokimia untuk memastikan kebolehpercayaan serta kesahan dapatan kajian. Hasil kajian ini membuktikan bahawa hMT2 menunjukkan efikasi neuroprotektif yang dinamik, berfungsi sama ada sebagai tindakan pencegahan pada fasa awal atau sebagai agen pemulihan fungsi susulan kecederaan neuron. Secara khusus, intervensi terapeutik (pascarawatan hMT2) didapati lebih unggul dalam pemulihan aktiviti lokomotor, pengurangan tekanan oksidatif dan keradangan. Sebaliknya, intervensi profilaksis (prarawatan hMT2) menunjukkan keberkesanan dalam mengekalkan integriti struktur neuron dan kecekapan respirasi mitokondria.

Jadual 4.4 Perbandingan efikasi antara intervensi profilaksis dan terapeutik hMT2 dalam model PD zebrafish

Parameter Penilaian	Intervensi Profilaksis (Prarawatan)	Intervensi Terapeutik (Pascarawatan)	Efikasi Dominan
Aktiviti Lokomotor	++	+++	Terapeutik
Tekanan Oksidatif	++	+++	Terapeutik
Neuroinflamasi	++	+++	Terapeutik
Populasi Neuron DA	+++	++	Profilaksis
Ekspresi Gen ( <i>bdnf</i> & <i>dat</i> )	+++	++	Profilaksis
Respirasi Mitokondria	+++	++	Profilaksis
Gen Pertahanan ( <i>mt2</i> & <i>smtb</i> )	++	+++	Terapeutik

+++ Prestasi sangat tinggi (unggul), ++ Prestasi tinggi (berkesan)

Keupayaan intervensi terapeutik dapat diperhatikan melalui pemulihan aktiviti lokomotor secara signifikan, di mana jumlah jarak berenang diperbaiki sehingga menghampiri profil kumpulan kawalan (Rajah 4.17). Keberkesanan ini selari dengan modulasi profil molekul yang menunjukkan bahawa intervensi terapeutik lebih berkesan dalam menindas sitokin pro-keradangan (*il-1a*, *cox-2*, dan *tnf- $\alpha$* ) (Rajah 4.21) dan mengurangkan tekanan oksidatif melalui penurunan tahap TBARS (Rajah 4.26) yang lebih drastik. Impak sistemik ini seterusnya mengurangkan keperluan sel untuk mengekspresikan gen pertahanan endogen (*mt2* dan *smtb*) (Rajah 4.20) secara berlebihan.

Sebaliknya, intervensi profilaksis menunjukkan keupayaan dalam perlindungan populasi neuron daripada degradasi yang berterusan. Kelebihan intervensi profilaksis dalam mengekalkan kepadatan neuron ini berkait rapat dengan peningkatan ekspresi gen neuroprotektif (*bdnf*) (Rajah 4.22) dan gen pengangkut DA (*dat*) (Rajah 4.23) yang lebih tinggi berbanding intervensi terapeutik. Keadaan ini dapat disokong secara konsisten oleh kepadatan populasi neuron DA yang lebih tinggi di kesemua lima bahagian anatomi otak utama, iaitu telensefalon, diensefalon, praoptik, pratektal, dan rombensefalon dalam intervensi profilaksis (Rajah 4.25). Dari aspek bioenergetik, intervensi profilaksis didapati lebih berkesan dalam mengekalkan fungsi respirasi mitokondria melalui tindak balas kinetik yang lebih stabil terhadap perencat kompleks II (malonat dan karboksil) dan meklizin (Rajah 4.29). Keadaan ini mencerminkan

bahawa kehadiran awal hMT2 mampu mengekalkan integriti ETC dan laluan Kennedy daripada gangguan metabolisme awal akibat pendedahan rotenone.

Walaupun intervensi terapeutik menawarkan pemulihan yang lebih pantas terhadap gejala motor dan tekanan oksidatif, manakala intervensi profilaksis dikenal pasti sebagai fasa yang paling optimum bagi kelestarian neuroprotektif jangka panjang. Keupayaan prarawatan hMT2 dalam meminimumkan kehilangan neuron DA dan menstabilkan fungsi respirasi mitokondria dengan kehadiran hMT2 sebelum permulaan perkembangan patologi amat penting dalam menyekat lara kerosakan neuron dengan lebih berkesan. Oleh itu, penemuan ini memberikan perspektif baharu terhadap potensi fungsi hMT2 yang bukan sahaja bertindak sebagai agen penyelamat (*rescue agent*) dalam intervensi terapeutik, tetapi juga sebagai agen neuroprofilaksis yang unggul dalam mengekalkan integriti sistem dopaminergik secara holistik.



## BAB V

### PERBINCANGAN

PD adalah penyakit degeneratif neuron kedua paling lazim yang menjejaskan kira-kira 0.3 % individu di negara maju. PD kerap berlaku di kalangan warga emas. Keadaan ini meningkat secara mendadak kepada 3 % untuk individu yang berusia lebih daripada 65 tahun, dan menunjukkan bahawa usia lanjut merupakan salah satu faktor risiko utama PD (Dexter & Jenner 2013). Keadaan ini menyerlahkan peningkatan beban yang disebabkan oleh rawatan PD dalam sistem penjagaan kesihatan di seluruh dunia, apabila purata jangka hayat manusia semakin meningkat. Gangguan neurologi ini didapati memberi kesan ketara terhadap kualiti hidup berkaitan kesihatan (*health-related quality of life*, HRQoL), di mana menjadi punca utama yang boleh menjejaskan keupayaan seseorang untuk menjalani aktiviti kehidupan harian mereka.

Sistem neuron DA dalam zebrafish telah dikaji secara meluas, dengan perkembangan lengkap organisma ini yang berlaku dalam tempoh 96 jam selepas persenyawaan (Rink & Wullimann 2002b). Pengenalpastian populasi neuron DA dalam larva zebrafish yang mempamerkan homologi berfungsi dengan SNpc manusia telah memperkukuh penggunaannya sebagai model kajian yang berwibawa bagi mengkaji perkembangan fenotip PD. Tambahan pula, zebrafish merupakan model vertebrat alternatif yang berpotensi tinggi untuk kajian berkaitan gangguan pergerakan. Pengkhususan sel dalam sistem DA zebrafish dewasa adalah sangat tinggi. Terdapat 17 nukleus otak DA dan noradrenergik yang berbeza dapat dikenal pasti oleh kajian imunohistokimia untuk TH sitoplasmik dan TH2 yang berkaitan enzim pengehad kadar dalam sintesis DA dan noradrenalin (Chen et al. 2009b; Tay et al. 2011). Unjuran nukleus otak TH<sup>+</sup> dapat ditemui sepanjang unjuran DA yang panjang ke saraf tunjang daripada populasi 12 dalam diensefalon dan juga unjuran noradrenergik dari LC dalam batang otak. Unjuran DA dan noradrenergik dalam saraf tunjang (*spinal cord*) ini dapat dikenal pasti dengan menggunakan antibodi TH (Kuscha et al. 2012; Mclean & Fetcho

2004; Tay et al. 2011). Ciri-ciri unik ini menjadikan zebrafish sebagai model yang relevan untuk mengkaji mekanisme patologi PD serta menjalankan saringan ubat-ubatan baharu dengan lebih berkesan (Dongjie et al. 2022).

### **Kesan rotenone kepada zebrafish**

Penggunaan model haiwan eksperimen dalam penyelidikan PD bertujuan untuk meneroka mekanisme patofisiologi penyakit serta mengenal pasti modaliti terapeutik yang berpotensi, selain memperoleh pemahaman yang lebih mendalam mengenai perkembangan PD (Khan et al. 2023). Dalam kajian ini, rotenone telah digunakan sebagai agen neurotoksik utama berbanding neurotoksin lain seperti 6-OHDA, MPTP, dan paraquat, bagi menghasilkan model PD pada zebrafish dewasa. Pemilihan rotenone adalah berasaskan keupayaannya untuk merencat kompleks I mitokondria secara spesifik, yang terbukti berkesan dalam mensimulasikan ciri-ciri utama PD dalam model zebrafish (Hettiarachchi et al. 2022; Khotimah et al. 2015; Wang et al. 2017).

Meskipun pengumpulan  $\alpha$ -sinuklein merupakan petanda patologi utama dalam PD manusia, penilaian protein tersebut dikecualikan daripada reka bentuk kajian ini memandangkan zebrafish tidak memiliki ortolog langsung bagi gen *SNCA* manusia secara semula jadi (Kodera & Matsui 2022; Lopez et al. 2022; Noor & Norazit 2022). Walaupun ekspresi  $\alpha$ -sinuklein manusia melalui model transgenik (sama ada jenis liar atau mutan A53T) merupakan pendekatan lazim dalam kajian sinukleinopati (Wadan & Mohamed 2025), model aruhan rotenone memanifestasikan patologi melalui mekanisme bioenergetik yang berbeza. Rotenone mencetuskan degenerasi neuron DA secara langsung menerusi peningkatan tekanan oksidatif yang berlebihan dan kegagalan bioenergetik sel. Oleh itu, kajian ini memfokuskan secara strategik kepada profil neurotoksisiti rotenone merangkumi kegagalan lokomotor, penurunan tahap DA, peningkatan tekanan oksidatif, neuroinflamasi, penurunan populasi neuron DA, serta disfungsi mitokondria, yang secara kolektif mengesahkan integriti mekanistik model ini dalam mencontohi patofisiologi PD manusia (Rico et al. 2011; Subhan & Siddique 2024).

Model PD aruhan rotenone dalam kajian ini menunjukkan kemerosotan fungsi motor yang ketara, dicirikan oleh penurunan jumlah jarak berenang keseluruhan dan

peningkatan tingkah laku seperti keresahan yang dinilai menggunakan ujian tangki baharu (*novel tank test*) dalam kajian ini, yang mencadangkan bahawa pendedahan kepada rotenone (5 µg/L) selama empat minggu telah mengakibatkan kemerosotan fungsi motor dalam zebrafish dewasa (Rajah 4.5). Penemuan ini memberi indikasi bahawa pemberian rotenone berpotensi menyebabkan gangguan terhadap kemampuan pergerakan normal zebrafish. Hasil ini didapati konsisten dengan kajian terdahulu yang melaporkan gangguan pergerakan dalam model PD aruhan rotenone (Ünal et al. 2019; Wang et al. 2017; Yurtsever et al. 2022). Aktiviti lokomotor yang berkurangan mungkin disebabkan oleh penurunan tahap DA di dalam otak selepas pemberian rotenone, yang juga selaras dengan kajian terdahulu (Khotimah et al. 2015). Di samping itu, PD juga disertai oleh gejala bukan pergerakan, seperti keresahan yang berlaku dalam kira-kira 31 % pesakit PD (Blundell et al. 2023; Broen et al. 2016; Leentjens et al. 2011). Zebrafish yang diberi dengan rotenone menunjukkan penurunan masa berada di kawasan atas tangki, dan peningkatan masa di kawasan bawah tangki berbanding kumpulan kawalan (Rajah 4.6 dan Rajah 4.7). Penemuan ini dapat menunjukkan bahawa rotenone meningkatkan tahap keresahan dalam zebrafish. Begitu juga, kajian-kajian terdahulu telah menunjukkan bahawa pemberian rotenone menyebabkan tingkah laku seperti keresahan menggunakan ujian kotak terang/gelap (*light/dark box test*) (Dal Santo et al. 2021; Wang et al. 2017). Selain itu, Ashok et al. (2025) menunjukkan bahawa zebrafish yang didedahkan kepada rotenone mencetuskan pengurangan jumlah jarak berenang dan masa yang dihabiskan di zon atas, yang masing-masing, mencerminkan defisit nyata dalam prestasi lokomotor serta peningkatan tingkah laku keresahan.

Pendedahan kepada rotenone menyebabkan peningkatan secara signifikan dalam ekspresi gen *mt2* dan *smtb* (Rajah 4.8), selari dengan hasil daripada model PD aruhan MPTP (Mohamad Najib et al. 2023). Hasil analisis qPCR mengesahkan peningkatan ekspresi ini berbanding kumpulan kawalan ( $p < 0.001$ ), yang mencerminkan pengaktifan mekanisme perlindungan sel sebagai tindak balas pampasan terhadap kerosakan sel yang dicetuskan oleh tekanan oksidatif dan neuroinflamasi. Fenomena ini selari dengan profil transkriptomik dalam model PD aruhan MPTP, yang menunjukkan kecenderungan sistem neuron untuk meningkatkan kapasiti antioksidan dan homeostasis logam bagi menangani tekanan sitotoksik.

Meskipun wujud percubaan pampasan oleh gen pertahanan endogen, pendedahan rotenone didapati melumpuhkan sistem sokongan kemandirian neuron melalui penurunan ekspresi gen *bdnf* secara signifikan (Rajah 4.10,  $p < 0.001$ ), yang sejajar dengan hasil kajian yang dilakukan oleh Bilge et al. (2020). BDNF merupakan faktor neurotropik penting yang menjamin kelangsungan hidup neuron DA melalui interaksi spesifik dengan reseptor tirosina kinase B (*tyrosine receptor kinase B*, TrkB). Pengaktifan kompleks BDNF-TrkB yang seterusnya mengaktifkan laluan pengisyaratan fosfatidilinositol 3-kinase/Akt (*phosphatidylinositol 3-kinase/Akt*, PI3K/Akt) bagi menghalang apoptosis dan mengekalkan kelangsungan hidup neuron. Penurunan tahap *bdnf* yang diperhatikan dalam kajian ini secara langsung meningkatkan kerentanan neuron terhadap serangan ROS dan memacu proses degenerasi secara progresif. Secara mekanistik, penurunan ekspresi *bdnf* dalam patogenesis PD sering dikaitkan dengan pengagregatan protein  $\alpha$ -sinuklein yang merencat biogenesis TrkB serta mengurangkan pengaktifan Akt, yang seterusnya mewujudkan kitaran tindak balas negatif yang memburukkan lagi kemerosotan integriti neuron (Singh et al. 2023). Oleh itu, kegagalan sokongan neurotropik ini bertindak sebagai pemacu utama kepada kematian neuron DA dan gangguan fungsi lokomotor yang diperhatikan dalam model zebrafish ini.

Integriti sistem dopaminergik merupakan penanda aras utama dalam menilai perkembangan patogenesis PD. Dalam kajian ini, pendedahan rotenone menyebabkan gangguan aktiviti lokomotor zebrafish, yang dibuktikan melalui penurunan ekspresi gen pengangkut DA (*dat*) secara signifikan ( $p < 0.001$ , Rajah 4.11). DAT merupakan protein transmembran yang kritikal untuk pengambilan semula DA di terminal sinaps (Mohamad Najib et al. 2023), jadi penurunan ekspresinya menandakan kehilangan fungsi terminal dopaminergik yang meluas. Di samping itu, ekspresi gen biosintesis DA, iaitu *th1* dan *th2*, meningkat secara signifikan dalam otak zebrafish kumpulan rotenone kajian ini. Walau bagaimanapun, Wang et al. (2017) melaporkan bahawa ekspresi TH menurun sebanyak 50 % dalam zebrafish yang diberi rotenone berdasarkan analisis blot barat. Meskipun terdapat peningkatan ekspresi *th1* dan *th2*, tahap DA otak zebrafish dalam kajian ini masih kekal rendah selepas pendedahan kepada rotenone (Rajah 4.7), sejajar dengan hasil daripada kajian terdahulu (Khotimah et al. 2015; Wang et al. 2017). Oleh itu, peningkatan ekspresi gen *th1* dan *th2* yang signifikan ini

ditafsirkan sebagai mekanisme pampasan endogen ini untuk mengekalkan tahap neurotransmitter DA bagi menampung kehilangan neuron, namun strategi pampasan ini ternyata gagal untuk menstabilkan tahap DA sistemik selari dengan kemerosotan populasi neuron DA yang diperhatikan (Rajah 4.12 dan Rajah 4.13).

Bukti kerosakan sistem dopaminergik ini diperkukuhkan lagi melalui analisis imunohistokimia terhadap populasi neuron DA yang dilabelkan dengan antibodi TH (sel TH<sup>+</sup>). Walaupun TH merupakan penanda standard bagi kesemua neuron katekolaminergik termasuk neuron DA, neuron noradrenergik dan neuron adrenergik, tetapi neuron DA terutamanya didapati dalam kelompok pada diensefalon, pratektal, praoptik, telensefalon, dan bulba olfaktori (Godoy et al. 2020). Sebaliknya, neuron noradrenergik dan neuron adrenergik biasanya tertumpu di otak belakang, terutamanya di lokus seruleus dan medula oblongata (Chandler et al. 2019). Hasil kajian ini menunjukkan penurunan bilangan neuron DA yang signifikan merentasi kesemua lima bahagian otak yang dikaji (Rajah 4.12 dan Rajah 4.13), selari dengan penurunan tahap DA dan kecacatan motor yang turut diperhatikan dalam model PD rodent (Rocha et al. 2022). Kemerosotan tertinggi diperhatikan pada bahagian telensefalon (71 %), diikuti oleh pratektal (47 %), praoptik (43 %), rombensefalon (34 %) dan diensefalon (32 %), yang mengesahkan sifat neurotoksik rotenone yang tinggi terhadap neuron DA. Penemuan ini selaras dengan kajian terdahulu yang menyatakan bahawa neuron DA mempunyai kerentanan yang lebih tinggi terhadap ketoksikan rotenone berbanding jenis sel neuron yang lain (Cannon et al. 2009; Haddad & Nakamura 2015; Radad et al. 2019). Kepelbagaian morfologi neuron DA yang terjejas, daripada saiz kecil di bulba olfaktori hingga neuron dendritik besar di lokus seruleus, mencerminkan impak neurodegeneratif yang bersifat menyeluruh. Penemuan ini konsisten dengan profil klinikal PD di mana kemerosotan neuron DA dalam ganglia basal secara langsung membawa kepada kecacatan motor yang diperhatikan dalam ujian lokomotor (Johansson et al. 2024).

Selain daripada gangguan pada sistem dopaminergik, neuroinflamasi telah dikenal pasti sebagai ciri patologi asas yang memacu perkembangan PD secara progresif (Lee et al. 2019; Subhramanyam et al. 2019; Tansey & Goldberg 2010). Dalam kajian ini, pendedahan kepada rotenone didapati mencetuskan induksi lata

sitokin pro-keradangan yang signifikan merangkumi *il-1a*, *il-1b*, *cox-2*, dan *tnf- $\alpha$*  ( $p < 0.001$ , Rajah 4.9). Peningkatan tahap ekspresi gen yang paling drastik diperhatikan pada gen *il-1a* dan *il-1b*, yang menunjukkan perbezaan lipatan (*fold change*) yang tinggi berbanding kumpulan kawalan. Peningkatan ini mencerminkan pengaktifan mikroglia secara kronik yang mewujudkan mikrop persekitaran sitotoksik di dalam CNS zebrafish. Keadaan ini selari dengan penemuan klinikal pada otak tengah pesakit PD di mana tahap TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IFN- $\gamma$  yang tinggi dikesan bersamaan dengan degenerasi neuron DA (Ferrari et al. 2006; McCoy et al. 2006).

Impak neuroinflamasi ini diperburuk oleh kegagalan sistem homeostasis redoks sel. Hasil kajian ini menunjukkan peningkatan tahap TBARS yang drastik sebanyak 1157 % dalam kumpulan rotenone berbanding kumpulan kawalan (Rajah 4.14). Peningkatan kepekatan MDA ini merupakan indikator jelas berlakunya pemperoksidaan lipid yang meluas, di mana radikal bebas menyerang asid lemak poliotaktepunya pada membran neuron (Cordiano et al. 2023). Ketidakseimbangan antara penghasilan ROS dan kapasiti pertahanan antioksidan endogen ini selaras dengan laporan Ünal et al. (2020) dan Cansız et al. (2021) mengenai penurunan aktiviti enzim SOD, *glutathione S-transferase* (GST) dan *glutathione* (GSH) dalam otak zebrafish selepas pendedahan kepada rotenone. Sinergi antara tekanan oksidatif yang melampau dan rembesan sitokin pro-keradangan ini membentuk satu "kitaran kejam" (*vicious cycle*) yang memacu kerosakan makromolekul sel tak berbalik (Liu et al. 2025).

Secara mekanistik, pengaktifan sel mikroglia akibat pendedahan rotenone bukan sahaja merembeskan faktor sitokin pro-keradangan seperti TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6 (Ferreira & Romero-Ramos 2018), tetapi juga berkait rapat dengan patologi  $\alpha$ -sinuklein. Pada peringkat awal, neuroinflamasi pada tahap sederhana berperanan penting untuk mengekalkan kesihatan neuron melalui fungsi mikroglia yang mendegradasi  $\alpha$ -sinuklein dan menyingkirkan puing neuron (*neuronal debris*) melalui proses fagositosis. Walau bagaimanapun, pengumpulan protein  $\alpha$ -sinuklein yang berterusan boleh mencetuskan tindak balas keradangan secara kronik, yang seterusnya membawa kepada apoptosis neuron dan memburukkan lagi proses degenerasi neuron berkaitan PD (Goswami et al. 2017; Moehle & West 2015; Rodríguez-Cruz et al. 2020; Wang et al. 2015). Oleh itu, data transkriptomik dan biokimia dalam kajian ini

mengesahkan bahawa simulasi lata keradangan dan kerosakan oksidatif merupakan pemacu utama kepada kemerosotan integriti neuron DA dalam model zebrafish PD ini.

Bagi memperoleh pemahaman yang lebih mendalam mengenai mekanisme molekul yang mendasari proses degenerasi neuron DA dalam PD, analisis transkriptomik melalui analisis mikrosusun telah menunjukkan profil DEG yang signifikan dalam otak zebrafish aruhan rotenone. Dapatan utama menunjukkan bahawa rotenone mencetuskan pengaktifan komponen imun sel yang agresif, khususnya melibatkan sistem imun adaptif. Peningkatan ekspresi gen *gzm3* dan *cd8a* secara signifikan ( $p < 0.001$ , Rajah 4.2) menandakan kehadiran populasi sel T sitotoksik CD8<sup>+</sup> yang tinggi dalam CNS. Secara mekanistik, *gzm3* (ortolog kepada granzyme B manusia) bertindak sebagai protease sitotoksik yang bekerjasama dengan protein pembentukan liang (*pore-forming protein*) untuk mengganggu kebolehtelapan membran sel sasaran bagi memicu proses sitolisis dan apoptosis oleh sel pemusnah semula jadi (Susanto et al. 2013). Penemuan ini selaras dengan kajian Karikari et al. (2022) yang melaporkan peningkatan ekspresi granzyme B dalam sel T sitotoksik pada sampel otak pesakit PD. Kehadiran populasi sel T CD8<sup>+</sup> yang lebih tinggi dalam CNS, seperti yang ditunjukkan melalui peningkatan ekspresi gen *cd8a* dalam hasil kajian ini, mengukuhkan hipotesis bahawa sistem keimunan penyesuaian memainkan peranan kritikal dalam mendorong neurodegenerasi melalui pengaktifan lata apoptosis neuron DA (Galiano-Landeira et al. 2020).

Kajian ini mendapati bahawa pengaktifan sistem imun yang berlebihan dimediasi oleh laluan pengisyratan reseptor sel T (*T cell receptor*, TCR) yang hiperaktif, dibuktikan melalui peningkatan gen pengawalatur *lck* dan *themis* ( $p < 0.001$ , Rajah 4.2). Protein Lck memainkan peranan kritikal dalam fasa awal pengisyratan TCR dengan memulakan lata fosforilasi yang membolehkan sel T berinteraksi dengan sel penyaji antigen (*antigen-presenting cell*, APC) untuk mengenal pasti dan menghapuskan bahan asing dalam tubuh (Ghosh et al. 2003; Van Leeuwen & Samelson 1999). Sebaik sahaja TCR diaktifkan, beberapa proses lata pengisyratan hiliran akan bermula, yang akhirnya menentukan ciri-ciri sel melalui proses pengawalaturan penghasilan sitokin, kelangsungan hidup sel, proliferasi, dan pembezaan. Seterusnya, *themis* memainkan peranan penting dalam perkembangan timosit (*thymocyte*

*development*), iaitu proses asas yang berlaku di dalam timus (*thymus*) sebelum pembentukan sistem imun yang matang (Liu et al. 2022b). Oleh itu, *themis* bertindak sebagai pengawal selia penting dalam proses pematangan dan pembezaan timosit kepada nasabah sel (*cell lineage*) CD4 atau CD8 (Allen 2009; Trynka et al. 2010). Peningkatan ekspresi gen *lck* dan *themis* ini menunjukkan bahawa rotenone bukan sahaja mengakibatkan kecederaan metabolik, tetapi juga mencetuskan disregulasi imun yang mendorong serangan sel T yang tidak terkawal terhadap neuron DA. Oleh itu, perkaitan antara varian THEMIS dengan keadaan keradangan kronik dan sklerosis berbilang pada manusia (Genet 2013; Hsu et al. 2002; Trynka et al. 2011) memberikan bukti sokongan bahawa pengaktifan laluan ini dalam model PD pada zebrafish menyumbang kepada pembentukan mikropersekitaran CNS yang radang dan neurotoksik.

Kesambungan daripada pengaktifan imun adaptif tersebut, rotenone turut mengganggu homeostasis imun semula jadi melalui induksi mikrogliosis yang melampau. Profil transkriptomik menunjukkan peningkatan gen *tyrobp*, yang juga dikenali sebagai protein pengaktif DNAX 12 kDa (*DNAX-activating protein of 12 kDa*, DAP12) secara signifikan ( $p < 0.001$ , Rajah 4.3). *Tyrobp* merupakan protein penyesuai (*adaptor protein*) kritikal yang mengawal selia pengaktifan mikroglia (Kobayashi et al. 2015). Peningkatan ekspresi gen *tyrobp* dalam model PD zebrafish ini mencadangkan bahawa rotenone mencetuskan tindak balas mikroglia yang berlebihan terhadap tekanan neurotoksik, yang seterusnya mempercepat kematian neuron melalui mekanisme neuroinflamasi kronik. Secara mekanistik, *tyrobp* berfungsi melalui pengikatan bukan kovalen dengan reseptor permukaan sel mieloid, terutamanya *triggering receptor expressed on myeloid cells 2* (TREM2), untuk memulakan transduksi isyarat dan pengaktifan intrasel (Dietrich et al. 2000; Lanier & Bakker 2000; Lu et al. 2021). Kompleks TREM2/DAP12 telah dikenal pasti sebagai pengawalatur utama bagi fungsi fisiologi dan pengaktifan fenotip mikroglia dalam pelbagai penyakit neurodegeneratif, termasuk PD (Haure-Mirande et al. 2019; Kinugawa et al. 2013; Mukherjee et al. 2019; Virgone - Carlotta et al. 2013; Zhang et al. 2013), strok iskemia (Kawabori et al. 2015), penyakit pendemielinan (*demyelinating disease*) (Poliani et al. 2015), dan kecederaan saraf periferi (Kobayashi et al. 2015). Selain peranannya dalam sel mieloid, *tyrobp* juga boleh berperanan sama ada dalam merangsang sel pemusnah semula jadi dan sel imun

pro-keradangan melalui pengaktifan laluan pengisyarat PI3K-Akt, MAPK, PLC $\gamma$ , atau bertindak sebagai perencat isyarat yang dimediasi oleh reseptor *Toll-like* (TLR) yang seterusnya menghalang pengaktifan sel keradangan yang berkaitan (Turnbull & Colonna 2007). Dalam kajian ini, pengaktifan laluan hiliran (*downstream*) tersebut didapati mendorong mikroglia ke arah fenotip keradangan. Walaupun data *tyrobp* dalam konteks PD masih terhad, penemuan ini mengukuhkan peranannya sebagai penanda molekul utama bagi pengaktifan mikroglia yang boleh mempercepat kematian neuron DA melalui rembesan faktor neuroinflamasi kronik.

Selari dengan pengaktifan mikroglia tersebut, peningkatan ekspresi kemokin *ccl34b.4* ( $p < 0.05$ ) dan sitokin *il2rb* ( $p < 0.001$ ) secara signifikan dalam kumpulan rotenone (Rajah 4.3) mencerminkan persekitaran neuroinflamasi yang progresif. Walau bagaimanapun, penemuan mengenai kemokin *ccl34b.4* dalam konteks PD adalah terhad. Secara umumnya, keradangan neuron dalam otak mencetuskan pengaktifan mikroglia, diikuti oleh sekresi sitokin keradangan, radikal bebas, faktor keradangan, dan juga kemokin (Harms et al. 2013). Kemokin *ccl34b.4* berperanan penting dalam kemotaksis, di mana kemokin tersebut memudahkan sel imun periferi seperti leukosit ke dalam kawasan CNS yang terjejas dan memulakan sistem keimunan penyesuaian sebagai tindak balas terhadap rangsangan kemokin (Kannarkat et al. 2013). Peningkatan kemokin ini bukan sahaja merosakkan integriti BBB, tetapi juga merekrut leukosit periferi yang memburukkan lagi lara keradangan neuron dalam otak melalui rembesan faktor sitotoksik (Liu et al. 2019; Ransohoff & Perry 2009; Réaux-Le Goazigo et al. 2013). Manakala *il2rb* terlibat dalam pengaktifan laluan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). IL-2 adalah sitokin yang amat perlu di antara sitokin lain dalam merangsang proliferasi sel T. Sel T mula merembes dan menghasilkan IL-2 selepas sel T diaktifkan oleh APC. IL-2 ini kemudiannya akan merangsang reseptor IL-2 pada sel T untuk bertindak balas dalam laluan pengisyarat autokrin dan parakrin (Park et al. 2011). Secara umum, sitokin IL-2 dan pengisyarat reseptor IL-2 meningkatkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel T dan B yang terlibat dalam gerak balas imun primer dan memori secara *in vivo* (Saparov et al. 1999; Williams et al. 2006). Pengaktifan p38 MAPK oleh tekanan oksidatif dan pengisyarat IL-2 yang dimanipulasi oleh rotenone mencetuskan kegagalan fungsi autofagi dan membolehkan keradangan berlaku yang mengakibatkan disfungsi mitokondria (He et al. 2018; Hwang

et al. 2017). Di samping itu, Wu dan rakan penyelidik melaporkan bahawa peningkatan tahap p38 MAPK menyebabkan kematian neuron dalam model sel dan tikus aruhan rotenone dalam PD (Wu et al. 2013). Oleh itu, perkaitan antara mikrogliosis (*tyrobp*) dan lara sitokin/kemokin ini membuktikan bahawa rotenone mencetuskan kegagalan pengawalaturan imun sistemik yang membawa kepada kehilangan neuron DA.

Kemuncak kepada disregulasi imun dan neuroinflamasi tersebut adalah pengaktifan fasa pelaksanaan kematian sel terancang, yang juga dikenali sebagai apoptosis. Analisis terhadap gen berkaitan apoptosis menunjukkan peningkatan gen *dedd1* secara signifikan ( $p < 0.001$ , Rajah 4.4) dalam kumpulan rotenone kajian ini. Peningkatan ekspresi *dedd1* yang ketara ini mengesahkan bahawa kemerosotan populasi neuron DA dalam model zebrafish adalah didorong oleh pengaktifan laluan apoptosis ekstrinsik susulan pendedahan rotenone. Gen *dedd1*, ortolog kepada *DEDD2* manusia, mengkodkan *caspase-binding death effector domain protein*. Protein ini memainkan berperanan dalam laluan apoptosis berantaraan reseptor kematian pada permukaan sel (Fleischer et al. 2007; Lin & Leonard 1997; O'shea et al. 2002). Proses ini bermula dengan pembentukan kompleks pengisyarat aruhan kematian (*death-inducing signaling complex*, DISC) yang melibatkan interaksi antara protein Domain Kematian (*Death Domain*, DD) dan Domain Efektor Kematian (*Death Effector Domain*, DED). Apabila reseptor kematian pada permukaan sel (seperti Fas) diaktifkan oleh rangsangan sitotoksik rotenone, protein adaptor sitoplasma seperti *Fas-Associated Death Domain* (FADD) akan direkrut melalui pengikatan DD. Pengikatan ini seterusnya merekrut pro-kaspase yang mengandungi DED, khususnya pro-kaspase-8, yang kemudiannya diaktifkan melalui pembelahan proteolitik. Kaspase-8 yang aktif seterusnya mencetuskan lara pengaktifan kaspase-3, iaitu enzim pelaksana utama yang bertanggungjawab terhadap fragmentasi DNA dan degradasi protein sel (Fleischer et al. 2007). Walau bagaimanapun, masih tiada kajian yang secara khusus melaporkan perkaitan antara gen *dedd1* dengan PD setakat ini. Penemuan ekspresi berlebihan gen *dedd1* dalam kajian ini memberikan perspektif baharu mengenai laluan kematian neuron DA. Peningkatan *dedd1* mencadangkan bahawa rotenone bukan sahaja mengganggu bioenergetik mitokondria (laluan intrinsik), tetapi juga mengeksploitasi laluan ekstrinsik melalui reseptor kematian untuk mempercepat atrofi neuron. Fenomena ini berkait rapat dengan mikro persekitaran neuroinflamasi yang agresif, di

mana rembesan sitokin pro-keradangan seperti TNF- $\alpha$  (Rajah 4.9) bertindak sebagai ligan yang memicu reseptor kematian tersebut. Oleh itu, *dedd1* dikenal pasti sebagai penanda molekul kritikal yang menghubungkan disregulasi imun dengan kehilangan integriti neuron secara progresif dalam patogenesis PD.

Analisis fungsian melalui *Gene Ontology* (GO) memperkukuh dapatan kajian ini dengan mendedahkan penglibatan proses biologi berkaitan imun secara menyeluruh (Jadual 4.2). Istilah GO yang paling signifikan merangkumi pembezaan dan pengaktifan sel T (GO:0046652, GO:0042110) serta pengaktifan limfosit (GO:0046649). Peningkatan istilah GO ini mencadangkan bahawa rotenone bukan sekadar bertindak sebagai perencat respirasi mitokondria (kompleks I), tetapi juga berperanan sebagai pemangkin kepada migrasi sel imun periferi ke dalam CNS. Fenomena ini selari dengan bukti klinikal pada pesakit PD dan model mamalia yang menunjukkan penembusan limfosit T ke dalam substantia nigra yang mengalami degenerasi neuron DA (Chen et al. 2025; Harms et al. 2021). Kajian ini turut mengenal pasti kepentingan laluan pengisyaratan perantaraan reseptor antigen (*Antigen receptor-mediated signaling pathway*) (GO:0050851) dan laluan pengisyaratan reseptor permukaan sel (GO:0007166), yang menekankan anjakan mekanisme transduksi isyarat melibatkan interaksi antara neuron dan sel imun. Pemetaan melalui *WikiPathways* mengesahkan bahawa laluan pengisyaratan IL-2 dan reseptor sel T (TCR) merupakan laluan yang paling terjejas secara kritikal (Jadual 4.3). Pengaktifan laluan TCR yang dimediasi oleh gen pengawalatur seperti *lck* dan *themis* menunjukkan bahawa tindak balas imun adaptif mungkin teretus akibat manifestasi antigen neuron yang dilepaskan semasa kerosakan neuron DA. Keadaan ini seterusnya mencetuskan rembesan sitokin pro-keradangan dan ROS yang memburukkan lagi tekanan oksidatif sel (Cebrián et al. 2014). Secara mekanistik, pendedahan rotenone mengganggu integriti BBB, membolehkan sel imun periferi menyusup masuk dan berinteraksi dengan sel glia yang telah diaktifkan. NF- $\kappa$ B merupakan pengawalatur utama dalam neuroinflamasi yang bertindak memodulasi ekspresi gen bagi tindak balas perlindungan dan kemudahan. Pengaktifan laluan pengisyaratan NF- $\kappa$ B ini melalui translokasi NF- $\kappa$ B ke nukleus sel sasaran untuk berinteraksi dengan jujukan DNA, yang kemudiannya menjejaskan integriti BBB dengan meningkatkan kebolehtelapan sel endotelium, yang membolehkan sel imun dan molekul keradangan memasuki otak (Yang et al. 2023).

Dalam keadaan fisiologi normal, NF- $\kappa$ B disekat di dalam sitoplasma oleh protein perencat  $\kappa$ B (I $\kappa$ Bs). Walau bagaimanapun, tekanan sel dan sitokin pro-keradangan akibat pendedahan rotenone mendorong fosforilasi serta mendegradasi I $\kappa$ Bs, sekali gus membolehkan NF- $\kappa$ B beralih ke nukleus untuk mengawal atur gen sasaran yang berkaitan dengan keradangan (Sivamaruthi et al. 2023). Pengaktifan berterusan NF- $\kappa$ B dalam mikroglia mendorong peralihan fenotip daripada keadaan rehat kepada keadaan aktif, yang seterusnya merembeskan sitokin pro-keradangan seperti TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6, serta ROS. Peningkatan tahap sitokin ini (termasuk interferon- $\gamma$ ) telah dikesan dalam otak tengah pesakit PD dan berkait rapat dengan patologi  $\alpha$ -sinuklein (Ferreira & Romero-Ramos 2018; Tansey et al. 2022). Walaupun aktiviti mikroglia pada peringkat awal berfungsi secara protektif melalui fagositosis sisa neuron dan mendegradasi  $\alpha$ -sinuklein, kehadiran agregat protein tersebut secara kronik mencetuskan kitaran keradangan berpanjangan (Goswami et al. 2017; Moehle & West 2015; Rodríguez-Cruz et al. 2020; Wang et al. 2015). Keadaan neuroinflamasi yang progresif ini memburukkan lagi tekanan oksidatif dan eksitotoksiti, yang akhirnya mempercepat apoptosis neuron DA (Castillo-Rangel et al. 2023). Penglibatan istilah GO yang berkaitan dengan pengawalaturan tindak balas imun (GO:0002768, GO:0002429) menekankan bahawa neuroinflamasi dalam model ini bukan sekadar kesan sampingan, sebaliknya merupakan pemacu utama neurodegenerasi. Oleh itu, disregulasi meluas pada sistem imun neuron dan integriti pengisyaratan sel yang dikesan melalui profil transkriptomik ini membuktikan keberkesanan model zebrafish dalam mensimulasikan lata keradangan kompleks yang menjadi ciri utama patogenesis PD.

Terdapat semakin banyak kajian yang melaporkan bahawa disfungsi mitokondria memainkan peranan penting dalam patogenesis PD, sama ada dalam bentuk sporadik atau kekeluargaan. Oleh sebab neuron DA mempunyai keperluan tenaga yang tinggi, gangguan pada fungsi mitokondria dalam sel yang terjejas oleh PD boleh mempercepat degenerasi neuron DA di SNpc (Gao et al. 2022b). Disfungsi mitokondria merupakan punca utama dalam patogenesis PD, memandangkan neuron DA mempunyai keperluan metabolisme yang amat tinggi. Dalam kajian ini, profil respirasi mitokondria melalui plat MitoPlate I-1 menunjukkan kegagalan bioenergetik yang nyata akibat pendedahan kepada rotenone. Kumpulan rotenone mempamerkan

sifat ketahanan (*resistant*) yang signifikan terhadap perencat kompleks II (malonat dan karboksil) serta meklizin berbanding kumpulan kawalan (Rajah 4.15). Fenomena ini mencerminkan keadaan di mana fungsi asas mitokondria telah pun terjejas secara intrinsik oleh neurotoksik rotenone, menyebabkan penambahan perencat luaran tidak lagi mampu memberikan impak penurunan aktiviti yang drastik. Sehubungan dengan itu, fungsi kompleks II secara spesifik dikesan terjejas secara kritikal. Kumpulan rotenone menunjukkan penurunan aktiviti sebanyak 60 % dan 58 % masing-masing terhadap perencat malonat dan karboksil ( $p < 0.001$ , Rajah 4.28), dengan hanya mencatatkan kadar penurunan pewarna sekitar 20 % bagi kedua-dua perencat tersebut (Rajah 4.16). Ketidakupayaan mitokondria untuk bertindak balas terhadap substrat suksinat membuktikan bahawa aliran elektron telah terputus pada peringkat awal ETC. Secara mekanistik, pemerhatian ini berpunca daripada penyekatan serentak pada dua laluan masuk utama elektron. Apabila kompleks I direncatkan secara langsung oleh rotenone, aliran elektron daripada NADH terputus, memaksa mitokondria bergantung sepenuhnya kepada kompleks II (suksinat dehidrogenase, SDH) untuk mengekalkan pemindahan elektron ke hujung distal ETC. Hal ini demikian kerana penggunaan malonat sebagai perencat persaingan menyekat pengoksidaan suksinat kepada fumarat, manakala karboksil menyekat tapak pengikatan ubikuinon pada kompleks II. Oleh yang demikian, kedua-dua tindakan ini melumpuhkan aliran elektron ke hilir (*downstream*) menuju ke Kompleks III dan IV. Malonat, sebagai perencat persaingan dengan suksinat, sering dikaitkan dengan pengumpulan suksinat sel yang seterusnya memacu pengangkutan elektron terbalik (*reverse electron transport*, RET) pada kompleks I, yang merupakan punca utama lonjakan ROS (Chouchani et al. 2014). Justeru, gangguan sistemik terhadap kompleks I (perencatan secara langsung oleh rotenone) dan kompleks II (seperti yang dibuktikan melalui plat MitoPlate I-1) mengakibatkan kebocoran elektron yang melampau. Elektron yang bocor ini berinteraksi dengan molekul oksigen untuk membentuk superoksida ( $O_2^{\cdot-}$ ), yang kemudiannya melalui tindak balas Fenton membentuk radikal hidroksil ( $\cdot OH$ ) yang sangat reaktif, mencetuskan kerosakan oksidatif pada membran lipid neuron (Cadenas & Davies 2000; Liaudet et al. 2009; Raimondi et al. 2020; Scialò et al. 2017; Seifert et al. 2010; Turrens 2003).

Selain daripada gangguan langsung pada kompleks II, kajian ini juga menunjukkan kumpulan rotenone mempamerkan sifat ketahanan (*resistant*) yang signifikan terhadap perencat meklizin berbanding kumpulan kawalan (Rajah 4.15). Secara kuantitatif, pendedahan meklizin menyebabkan penurunan kadar penurunan pewarna redoks tetrazolium sebanyak 67 % dalam kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.28), dengan hanya mencatatkan kadar penurunan pewarna sekitar 23 % bagi perencat tersebut (Rajah 4.16). Meklizin bertindak sebagai perencat respirasi mitokondria dengan menghalang enzim PCYT2, iaitu enzim pengehadan kadar dalam laluan Kennedy yang bertanggungjawab bagi biosintesis fosfatidiletanolamina (*phosphatidylethanolamine*, PE) di sitosol dan retikulum endoplasma (Gohil et al. 2011; Gohil et al. 2013). PE merupakan komponen fosfolipid yang penting untuk mengekalkan fungsi dan integriti struktur membran dalam mitokondria (Calzada et al. 2016). Ketahanan relatif yang diperhatikan dalam kumpulan rotenone menunjukkan bahawa status bioenergetik mitokondria telah pun mengalami kemerosotan awal akibat rotenone, sehingga kesan perencatan tambahan oleh meklizin terhadap respirasi menjadi tidak begitu dominan. Kesan meklizin dalam merencat respirasi mitokondria boleh dikaitkan dengan dua mekanisme utama. Pertama, perencatan PCYT2 menyebabkan peningkatan tahap *phosphoethanolamine* (PEtn) intrasel secara mendadak (Gohil et al. 2011; Gohil et al. 2013). Fontana et al. (2020) mencadangkan bahawa PEtn berupaya bersaing secara terus dengan suksinat pada kompleks II mitokondria, yang seterusnya menghalang aliran elektron dalam ETC. Kedua, pengurangan sintesis PE melalui laluan Kennedy, dan laluan mitokondria yang dimangkin oleh *phosphatidylserine decarboxylase* (Psd1) dalam mitokondria, menjejaskan kestabilan kompleks respirasi dan proses OxPhos secara keseluruhan (Böttinger et al. 2012; Chan & Mcquibban 2012; Steenbergen et al. 2005; Tasseva et al. 2013).

Kegagalan mitokondria dalam kumpulan rotenone untuk memanifestasikan tindak balas respirasi normal terhadap meklizin akibat pendedahan rotenone mencetuskan kegagalan bioenergetik yang sistemik. Di bawah pengaruh meklizin, gangguan pada homeostasis PE bukan sahaja menjejaskan integriti membran, tetapi juga mengakibatkan penyahstabilan susunan superkompleks dalam ETC (Calzada et al. 2016). Keadaan ini menjadi lebih kritikal apabila pendedahan rotenone yang menyekat

kompleks I digabungkan dengan tindakan meklizin yang menghalang pirau gliserol-3-fosfat (G3P). Fenomena ini mencerminkan kewujudan satu "suis homeostatik" (*homoeostatic switch*) yang menghubungkan metabolisme lipid dengan respirasi mitokondria (Tighanimine et al. 2024).

Penyekatan laluan Kennedy oleh meklizin mencetuskan pengumpulan intrasel bagi dua perantara utama, iaitu G3P dan PEtn. Dalam senario fisiologi normal, pirau G3P bertindak sebagai mekanisme penting untuk memindahkan elektron daripada NADH sitosolik terus ke dalam takungan CoQ dalam mitokondria dengan memintas kompleks I (Herpe et al. 2026). Walau bagaimanapun, pendedahan rotenone telah pun melumpuhkan pintu masuk utama elektron melalui kompleks I. Apabila meklizin menyekat "laluan sandar" (*backup route*) ini, pengumpulan G3P dan PEtn bertindak sebagai isyarat metabolik yang menandakan kegagalan penyelarasan antara sintesis lipid membran dan keperluan bioenergetik sel (Tighanimine et al. 2024). Dalam senario ini, aliran elektron ke arah hilir menjadi sangat terhad kerana dua laluan masuk utama ke dalam takungan CoQ telah disekat sepenuhnya. Penyekatan pirau G3P menyebabkan ETC bergantung sepenuhnya kepada kompleks II, yang seperti dibincangkan sebelum ini, turut mengalami kemerosotan fungsi akibat kesan neurotoksik rotenone. Disebabkan jumlah keseluruhan elektron yang mencapai kompleks III dan IV telah berkurangan secara mendadak, kadar penggunaan oksigen menurun dengan drastik (Alberts et al. 2002). Keadaan ini membuktikan bahawa kerosakan sistemik dalam model PD zebrafish ini berpunca daripada kegagalan suis homeostatik yang menyepadukan integriti membran lipid dengan kecekapan respirasi, yang akhirnya memacu kematian neuron DA melalui krisis tenaga yang parah.

### **Kesan hMT2 kepada model PD zebrafish**

Kajian ini bertujuan untuk memahami mekanisme MT dalam perlindungan neuron terhadap model PD aruhan rotenone pada zebrafish. Sebagai protein endogen yang bersifat neuroprotektif, MT berperanan penting dalam mengurangkan tekanan oksidatif, neuroinflamasi, sitotoksiti  $\alpha$ -sinuklein, serta disfungsi mitokondria, di mana adalah faktor-faktor utama yang memacu patogenesis PD (Miyazaki & Asanuma 2023). Kapasiti MT untuk mengkelat ion logam seperti kuprum dan ferum turut dikaitkan dengan perencatan pengagregatan  $\alpha$ -sinuklein serta peneutralan radikal bebas bagi

mengekalkan homeostasis redoks dan integriti fungsi mitokondria. Walau bagaimanapun, peranan spesifik hMT2 dalam model PD zebrafish aruhan rotenone masih belum dikaji secara mendalam. Oleh itu, kajian ini bertujuan untuk menilai potensi perlindungan neuron serta efikasi rawatan protein hMT2 dalam memitigasi patofisiologi PD, seperti memulihkan fungsi motor, meningkatkan tahap DA dan fungsi mitokondria, serta mengurangkan tekanan oksidatif, keradangan, dan kehilangan neuron DA dalam model PD zebrafish aruhan rotenone.

Potensi hMT2 eksogen dalam memulihkan gangguan pergerakan dan manifestasi keresahan akibat pendedahan rotenone telah dinilai menggunakan ujian tangki baharu. Hasil kajian menunjukkan bahawa pemberian hMT2 (0.2 µg/ikan) melalui suntikan intrakranium, sama ada sehari sebelum permulaan pendedahan rotenone sebagai kumpulan prarawatan, mahupun sebagai kumpulan pascarawatan sejurus selepas fasa induksi rotenone selesai, berjaya memulihkan kemerosotan fungsi motor dalam zebrafish. Pemulihan ini dicirikan oleh peningkatan dalam jumlah jarak berenang keseluruhan dan pengurangan fenotip keresahan secara signifikan. Sehubungan dengan itu, intervensi pascarawatan hMT2 berjaya meningkatkan jumlah jarak berenang secara signifikan berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.17). Sebaliknya, intervensi prarawatan hMT2 tidak mempamerkan perbezaan prestasi lokomotor berbanding kumpulan rotenone. Penemuan ini mencadangkan bahawa intervensi pascarawatan hMT2 lebih berkesan untuk memulihkan gangguan pergerakan selepas permulaan kecederaan neuron. Pemulihan lokomotor yang diperhatikan dalam kumpulan pascarawatan hMT2 memberikan indikasi yang jelas bahawa protein ini berupaya memulihkan integriti sistem dopaminergik yang terjejas. Selain itu, peningkatan aktiviti berenang ini berkait rapat dengan kapasiti hMT2 dalam menstabilkan semula fluks dopaminergik. Pemerhatian ini dibuktikan melalui pemulihan ekspresi gen *dat* dan penstabilan gen biosintesis DA (*th1* dan *th2*) (Rajah 4.23), serta pemulihan populasi neuron DA di bahagian diensefalon (Rajah 4.25). Kawasan diensefalon ini merupakan kluster utama bagi neuron DA yang bertanggungjawab mengawal fungsi pergerakan dalam zebrafish.

Bagi manifestasi profil keresahan, kedua-dua intervensi prarawatan dan pascarawatan hMT2 menunjukkan efikasi dalam mengurangkan fenotip keresahan

secara signifikan. Kesan rawatan ini dicerminkan oleh peningkatan masa zebrafish berenang di zon atas tangki berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.18). Penemuan ini diperkukuhkan lagi oleh analisis penjejakan video berkomputer (Rajah 4.19), yang menunjukkan bahawa kumpulan rawatan hMT2 mempamerkan corak penerokaan ruang yang meluas dan menghabiskan masa yang lebih lama di zon atas tangki. Sebaliknya, kumpulan rotenone memmanifestasikan tingkah laku seumpama keresahan dengan aktiviti berenang yang terhad di zon bawah tangki. Sehubungan dengan itu, penemuan ini mencadangkan potensi hMT2 dalam memulihkan gangguan motor serta mengurangkan fenotip keresahan dalam model PD zebrafish.

Potensi hMT2 eksogen dalam memulihkan keseimbangan homeostasis sel dinilai melalui profil ekspresi gen MT endogen, iaitu *mt2* dan *smtb*. Hasil analisis qPCR menunjukkan bahawa kedua-dua intervensi prarawatan dan pascarawatan hMT2 berjaya menurunkan ekspresi gen *mt2* dan *smtb* secara signifikan berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.05$ , Rajah 4.20). Penurunan tahap ekspresi ini menandakan satu peralihan penting dalam status fisiologi otak zebrafish, di mana keperluan terhadap mekanisme pertahanan pampasan (*compensatory defense mechanism*) didapati berkurangan susulan intervensi hMT2 eksogen yang berkesan. Secara mekanistik, peningkatan drastik gen *mt* dalam kumpulan rotenone mencerminkan tindak balas pertahanan sel serta-merta terhadap neuroinflamasi dan tekanan oksidatif yang berlebihan (Rajah 4.20).

Walau bagaimanapun, pemberian hMT2 eksogen berfungsi untuk menstabilkan homeostasis redoks dan mengurangkan beban sitotoksik dalam mikropersekitaran neuron. Apabila hMT2 eksogen mengambil alih peranan dalam penutralan radikal bebas dan pengkelatan logam, sel tidak lagi perlu mengekspresikan gen pertahanan endogen secara berlebihan bagi mengekalkan kelangsungan hidup. Fenomena ini mencadangkan bahawa hMT2 berkesan dalam mengurangkan tekanan sel yang dialami oleh neuron DA. Selain itu, modulasi gen ini berkait rapat dengan penambahbaikan profil bioenergetik dan pengurangan disregulasi imun. Seperti yang ditunjukkan dalam analisis *Gene Ontology*, pendedahan rotenone memacu laluan pengaktifan limfosit dan pengisyaratan reseptor permukaan sel secara meluas (Jadual 4.3), yang sering memungkinkan peningkatan ekspresi MT sebagai tindak balas fasa akut. Penurunan

ekspresi *mt2* dan *smtb* oleh rawatan hMT2 memberikan tanda-tanda bahawa fungsi mitokondria (Rajah 4.15) dan sistem dopaminergik telah pulih setakat ini daripada kerosakan yang disebabkan oleh rotenone. Keadaan ini membolehkan profil ekspresi gen pertahanan kembali ke tahap yang menyerupai kumpulan kawalan membuktikan fungsi hMT2 sebagai sistem pertahanan endogen bagi mengekang kerosakan sel akibat neurotoksin rotenone.

Pemulihan sokongan neurotropik merupakan mekanisme kritikal bagi menjamin kemandirian neuron DA daripada kemerosotan secara progresif. Hasil analisis qPCR menunjukkan bahawa intervensi hMT2 memulihkan ekspresi gen *bdnf* secara signifikan berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.22), yang menandakan pengaktifan semula sistem kelangsungan hidup neuron bagi mengekang lara apoptosis yang dicetuskan oleh ROS dan neurotoksisiti rotenone. Secara mekanistik, pemulihan tahap *bdnf* oleh hMT2 mencadangkan potensi pengukuhan laluan pengisyaratan hiliran seperti PI3K/Akt yang mengawal selia kemandirian neuron DA. Memandangkan BDNF berfungsi secara spesifik melalui interaksi bersama reseptor TrkB, kehadiran hMT2 berkemungkinan menstabilkan mikropersekitaran sel bagi mengekalkan biogenesis dan integriti fungsi reseptor tersebut dalam keadaan tekanan sel. Menariknya, intervensi prarawatan hMT2 menunjukkan trend pemulihan yang lebih tinggi berbanding pascarawatan hMT2. Keunggulan fasa profilaksis ini dalam pengawalaturan *bdnf* (Jadual 4.4) memberikan indikasi bahawa hMT2 menyediakan kesan neuronprotektif dengan mengekalkan ketersediaan faktor pertumbuhan yang mencukupi sebelum permulaan punca neurotoksik. Peningkatan sokongan neurotropik ini mempunyai perkaitan langsung dengan analisis lokomotor dan kuantitatif populasi neuron DA yang diperhatikan. Peningkatan ekspresi gen *bdnf* menyumbang secara sinergistik kepada pemeliharaan kepadatan populasi neuron DA (Rajah 4.25) dan pemulihan aktiviti lokomotor (Rajah 4.17). Selain itu, profil respirasi mitokondria yang lebih stabil dalam kumpulan rawatan hMT2, terutamanya dalam mengekalkan integriti ETC, menyediakan asas bioenergetik yang diperlukan untuk menyokong proses keplastikan neuron yang memerlukan tenaga yang tinggi (Rajah 4.27). Secara keseluruhannya, data ini mencadangkan bahawa hMT2 bertindak sebagai modulator faktor pertumbuhan yang berkesan dalam membendung kemerosotan integriti sistem neuron secara proaktif dan terapeutik dalam model PD zebrafish.

Integriti sistem dopaminergik merupakan penanda aras utama dalam menilai keberkesanan hMT2 sebagai agen neuroprotektif terhadap kerosakan neuron secara progresif. Hasil analisis qPCR menunjukkan bahawa rawatan hMT2 berjaya memulihkan semula ekspresi gen pengangkut DA (*dat*) ke tahap basal yang setara dengan kumpulan kawalan ( $p < 0.05$ , Rajah 4.23). Pemulihan ekspresi gen *dat* ini memberikan indikasi yang kuat terhadap pemulihan fungsi terminal dopaminergik dalam pengambilan semula neurotransmitter, yang sebelum ini terjejas akibat pendedahan rotenone. Bagi gen biosintesis DA, iaitu *th1* dan *th2*, intervensi pascarawatan hMT2 didapati berupaya menstabilkan semula ekspresi gen tersebut ke tahap yang lebih rendah secara signifikan berbanding profil pampasan melampau dalam kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.23). Penurunan ekspresi mRNA *th1* dan *th2* ini menunjukkan bahawa hMT2 telah berjaya menstabilkan fluks dopaminergik. Dengan kata lain, hMT2 bukan sahaja melindungi neuron daripada kematian, tetapi juga menyeimbangkan semula metabolisme DA sehingga tahap sintesis pampasan yang berlebihan melalui laluan hidroksilasi tirosin tidak lagi diperlukan untuk mengekalkan tahap neurotransmitter yang optimum.

Keberkesanan hMT2 dalam melindungi integriti sistem dopaminergik secara fizikal dapat disahkan lagi melalui analisis imunohistokimia terhadap populasi neuron DA yang dilabelkan dengan antibodi TH (sel TH<sup>+</sup>) (Rajah 4.24). Rawatan hMT2 mencatatkan peningkatan bilangan sel TH<sup>+</sup> yang signifikan merentasi kesemua bahagian otak yang dikaji. Pemulihan populasi neuron yang paling menonjol diperhatikan pada bahagian telensefalon (125 %), diikuti oleh praoptik (62 %), rombensefalon (50 %), diensefalon (40 %), dan pratektal (39 %) berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.25). Keupayaan hMT2 untuk memulihkan populasi neuron secara meluas ini membuktikan peranannya dalam membendung kesan neurotoksisiti sistemik rotenone yang sebelum ini mencetuskan degenerasi neuron DA yang parah. Secara perbandingan, intervensi prarawatan hMT2 menunjukkan kecekapan yang lebih tinggi dalam mengekalkan kepadatan populasi neuron DA berbanding pascarawatan. Fenomena ini memperkukuhkan peranan hMT2 sebagai agen profilaksis yang berkesan yang mampu mengekalkan integriti struktur neuron sebelum lara serangan neurotoksik bermula. Secara keseluruhan, pemulihan populasi neuron DA dan pemulihan profil genetik (*dat*, *th1*, *th2*) menjelaskan mekanisme molekul di samping pemulihan fungsi

lokomotor yang diperhatikan (Rajah 4.17). Data ini membuktikan bahawa hMT2 berjaya membantu dalam mengurangkan neurodegenerasi yang progresif dalam model PD zebrafish melalui penstabilan metabolisme neurotransmitter dan pemeliharaan struktur sel.

Keupayaan hMT2 dalam membendung neurodegenerasi yang progresif dapat diperkukuhkan lagi melalui aktiviti anti-keradangan yang signifikan. Hasil analisis qPCR menunjukkan bahawa rawatan hMT2 berjaya menindas ekspresi gen bagi sitokin pro-keradangan utama, iaitu *il-1a*, *il-1b*, *cox-2*, dan *tnf- $\alpha$*  secara signifikan berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.05$ , Rajah 4.21). Penurunan tahap ekspresi ini memberikan indikasi yang kuat bahawa hMT2 bertindak sebagai modulator imun yang berkesan dalam meredakan lara keradangan yang dicituskan oleh neurotoksisiti rotenone. Secara mekanistik, keupayaan hMT2 untuk menurunkan ekspresi gen *il-1a* dan *il-1b* adalah sangat penting kerana kedua-dua sitokin ini merupakan pemacu utama kepada pengaktifan mikroglia dan astrosit di dalam CNS. Penindasan terhadap induksi sitokin ini menghalang pembentukan mikroperekitaran sitotoksik yang biasanya memacu kematian neuron DA secara progresif. Selain itu, penurunan ekspresi *cox-2* dan *tnf- $\alpha$*  mencadangkan bahawa hMT2 berupaya mengawal selia laluan keradangan hiliran, yang seterusnya mengurangkan kerosakan pada tisu otak sekitarnya. Seperti yang ditunjukkan dalam analisis GO, pendedahan rotenone memacu pengaktifan limfosit dan pengisyaratan reseptor permukaan sel secara meluas (Jadual 4.3), dan intervensi hMT2 berjaya memulih semula profil imun ini. Penemuan ini menyokong hujah bahawa hMT2 bukan sahaja berfungsi dalam menstabilkan homeostasis logam, tetapi juga mempunyai sifat pelbagai fungsi (*multifunctional*) dalam menangani aspek neuroinflamasi PD. Pemulihan profil sitokin ini selari dengan pemulihan integriti sistem dopaminergik (Rajah 4.23) dan peningkatan fungsi lokomotor (Rajah 4.17) yang diperhatikan dalam kumpulan rawatan hMT2. Berdasarkan perbandingan efikasi dalam Jadual 4.4, intervensi pascarawatan hMT2 (terapeutik) menunjukkan kecemerlangan dalam parameter neuroinflamasi, yang menunjukkan keberkesanan hMT2 dalam merawat keradangan aktif selepas permulaan kecederaan neuron. Secara keseluruhannya, data ini mengukuhkan potensi terapeutik hMT2 sebagai agen anti-keradangan yang mampu menstabilkan mikroperekitaran saraf dan memelihara kelangsungan hidup neuron dalam model PD zebrafish.

Keberkesanan hMT2 sebagai agen neuroprotektif diperkukuhkan lagi melalui keupayaannya dalam menstabilkan sistem homeostasis redoks sel yang sebelum ini terjejas teruk oleh pendedahan rotenone. Penilaian tahap pemperoksidaan lipid melalui pengukuran tahap TBARS menunjukkan bahawa rawatan hMT2 berjaya menurunkan tekanan oksidatif secara drastik. Khususnya, intervensi pascarawatan hMT2 mencatatkan penurunan tahap TBARS sebanyak 85 %, manakala intervensi prarawatan hMT2 mencatatkan penurunan sebanyak 66 % berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.26). Penurunan ketara kepekatan MDA ini membuktikan peranan hMT2 dalam melindungi asid lemak poli-taktepu pada membran neuron daripada serangan radikal bebas yang meluas. Secara mekanistik, keupayaan hMT2 mengekalkan tahap MDA yang rendah memberikan indikasi bahawa integriti membran sel dan organel telah berjaya distabilkan. Keadaan ini sangat kritikal memandangkan membran mitokondria merupakan tapak utama bagi ETC. Dengan membendung pemperoksidaan lipid, hMT2 secara langsung memelihara mikropersekitaran bagi kompleks I hingga IV, yang seterusnya membolehkan pemulihan profil respirasi mitokondria seperti yang diperhatikan dalam analisis MitoPlate I-1 (Rajah 4.27). Pemulihan fungsi bioenergetik ini memutus "kitaran kejam" (*vicious cycle*) antara tekanan oksidatif dan kegagalan penghasilan tenaga yang biasanya memacu kerosakan makromolekul tak berbalik dalam patogenesis PD. Tekanan oksidatif dan keradangan merupakan faktor utama yang menyumbang kepada degenerasi neuron DA yang sering berlaku dalam PD (Marogianni et al. 2020). Oleh itu, pengurangan tekanan oksidatif merupakan aspek penting dalam strategi rawatan PD. Hasil kajian ini mendapati bahawa rawatan hMT2 dapat menurunkan ekspresi sitokin pro-keradangan (Rajah 4.21) serta tahap pemperoksidaan lipid (Rajah 4.26) secara signifikan, yang seterusnya mengukuhkan peranan hMT2 sebagai agen antioksidan dan anti-keradangan. Penemuan ini sejajar dengan kajian sebelum ini yang melaporkan bahawa rawatan MT eksogen dalam model kecederaan saraf tunjang tikus berupaya mengurangkan penghasilan ROS dan tahap pemperoksidaan lipid (Rios et al., 2018). Selain itu, ekspresi berlebihan MT2A dalam titisan sel (*cell line*) kanser pundi juga didapati mampu menurunkan penghasilan ROS endogen dan mengurangkan tekanan oksidatif yang disebabkan oleh  $H_2O_2$ , yang seterusnya menunjukkan sifat antioksidatif MT (Sung et al. 2022).

Kajian-kajian terdahulu telah melaporkan bahawa MT berupaya menekan penghasilan ROS akibat pendedahan kepada pelbagai faktor tekanan (*stressors*) dan dalam pelbagai penyakit (Ruttkay-Nedecky et al. 2013; Yang et al. 2024b). Kadar pemalar (*rate constant*) tindak balas MT dengan radikal hidroksil dilaporkan berlaku kira-kira 300 kali lebih tinggi berbanding GSH yang diturunkan (*reduced GSH*), iaitu sejenis antioksidan utama dalam sistem biologi (Sato & Bremner 1993; Tanaka et al. 2025). Selain itu, MT juga dilaporkan mampu menghalang pemperoksidaan lipid mikrosom yang diaruh oleh ADP-Fe<sup>3+</sup> dan NADPH, dengan keberkesannya kira-kira 10 kali ganda lebih tinggi daripada GSH (Miura et al. 1997; Tanaka et al. 2025). Kesan ini menunjukkan bahawa hMT2 berpotensi menekan tindak balas keradangan berlebihan yang dicetuskan oleh rotenone. Mekanisme ini penting memandangkan keradangan kronik dalam CNS telah dikenal pasti sebagai faktor penyumbang utama kepada degeneratif neuron dalam penyakit seperti PD (Mou et al. 2022). Tambahan pula, hMT2 juga dipercayai dapat menekan pengaktifan mikroglia yang berlebihan, seterusnya mengurangkan rembesan sitokin pro-keradangan yang boleh menyebabkan kerosakan neuron (Miyazaki & Asanuma 2023). Peningkatan dalam bilangan neuron DA secara signifikan (Rajah 4.10) selepas rawatan hMT2 turut menyokong peranan perlindungan hMT2 terhadap kesan neurotoksik rotenone. Oleh itu, penemuan ini mencadangkan bahawa peningkatan aktiviti lokomotor yang diperhatikan secara signifikan dalam kumpulan pascarawatan hMT2 bukan sekadar berfungsi dalam pencegahan degeneratif neuron, tetapi juga hasil daripada keupayaan hMT2 mempercepat proses pemulihan selepas terdedah kepada rotenone.

Potensi neuroprotektif hMT2 dibuktikan melalui keupayaannya untuk meredakan tindak balas imun sel yang agresif akibat pendedahan rotenone. Analisis profil transkriptomik menunjukkan bahawa rawatan hMT2 berjaya menindas peningkatan ekspresi gen *gzm3* dan *cd8a* secara signifikan berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.30). Penurunan ekspresi *gzm3* menunjukkan bahawa hMT2 mampu menyekat aktiviti protease sitotoksik yang bertanggungjawab terhadap gangguan membran sel sasaran dan pencetus apoptosis neuron. Selain itu, penurunan ekspresi *cd8a* memberikan indikasi bahawa hMT2 berkesan dalam mengawal selia populasi sel T sitotoksik CD8<sup>+</sup> dalam CNS, sekali gus menghalang serangan imun penyesuaian terhadap neuron DA yang biasanya memacu kemerosotan sistem

dopaminergik secara progresif. Keupayaan hMT2 dalam mengawal selia persekitaran imun ini turut diperhatikan melalui modulasi laluan pengisyaratan TCR. Rawatan hMT2 menunjukkan trend penurunan yang signifikan pada gen pengawal selia *themis* ( $p < 0.001$ , Rajah 4.30). Memandangkan *themis* memainkan peranan kritikal dalam pematangan dan pembezaan sel T kepada sel T CD8, penindasan gen ini mencadangkan bahawa hMT2 bertindak mengekang fasa pematangan sistem imun yang hiperaktif akibat aruhan rotenone. Walau bagaimanapun, rawatan hMT2 tidak menunjukkan kesan penurunan terhadap ekspresi gen *lck* berbanding kumpulan rotenone. Keadaan ini memberikan gambaran bahawa hMT2 mungkin lebih utamakan dalam memodulasi mekanisme aliran pengaktifan sel T dan proses pembezaan sel berbanding permulaan laluan fosforilasi awal pada peringkat TCR. Selain itu, pengekalan tahap ekspresi *lck* yang stabil mungkin mencerminkan keperluan sel untuk mengekalkan pengisyaratan basal yang kritikal bagi kemandirian sel imun asas. Keadaan ini menunjukkan bahawa hMT2 hanya memodulasi aktiviti keradangan yang agresif tanpa melumpuhkan sepenuhnya jentera pengisyaratan asas sistem imun. Modulasi selektif ini penting bagi memastikan homeostasis imun terpelihara sementara laluan neuroinflamasi yang merosakkan neuron DA disekat secara berkesan. Sehubungan dengan itu, penurunan ketara pada gen *gzm3*, *cd8a*, dan *themis* mencerminkan potensi hMT2 dalam meredakan sebahagian tindak balas neuroinflamasi yang agresif. Kesan modulasi imun ini memberikan perlindungan terhadap integriti neuron dengan menyekat laluan kerosakan yang dimediasi oleh sel T sitotoksik. Penemuan ini turut disokong oleh data integratif dalam Jadual 4.4, di mana intervensi terapeutik (pascarawatan hMT2) didapati lebih unggul dalam menindas penanda neuroinflamasi secara sistemik berbanding intervensi profilaksis. Dengan mengurangkan beban imun sel dalam CNS, hMT2 secara tidak langsung menyumbang kepada pemulihan aktiviti lokomotor dan kelestarian populasi neuron DA dalam model PD zebrafish ini. Keupayaan hMT2 untuk memelihara kelangsungan hidup neuron DA turut disokong secara meluas oleh peranannya sebagai modulator imun semula jadi yang berkesan di dalam CNS. Berdasarkan data transkriptomik, rawatan hMT2 terbukti berjaya mengekang gangguan pengawalaturan mikrogliosis dan menyekat laluan pengisyaratan sitokin pro-keradangan yang agresif akibat aruhan rotenone. Manifestasi utama daripada kesan modulasi ini diperhatikan melalui penurunan ekspresi gen *tyrobp* secara signifikan dan drastik dalam kumpulan rawatan hMT2 berbanding kumpulan rotenone ( $p < 0.001$ , Rajah 4.31). Memandangkan protein penyesuai Tyrobp (DAP12)

bertindak mengikat reseptor permukaan seperti TREM2 untuk memulakan transduksi isyarat pengaktifan intrasel sel mieloid, penindasan gen *tyrobp* oleh hMT2 memberikan petunjuk langsung terhadap penyekatan fasa pengaktifan mikroglia reaktif kepada fenotip pro-keradangan yang merosakkan. Penurunan ekspresi gen ini menunjukkan bahawa kehadiran hMT2 mampu memotong isyarat hiliran (*downstream*) seperti laluan PI3K-Akt atau MAPK sebelum mikroglia sempat merembeskan faktor neuroinflamasi kronik yang boleh mempercepat kematian neuron DA. Selari dengan penindasan mikrogliosis tersebut, rawatan hMT2 turut menunjukkan keupayaan yang signifikan dalam melemahkan tindak balas kemotaksis dan isyarat sitokin. Keadaan ini dibuktikan melalui penurunan ekspresi bagi gen kemokin *ccl34b.4* ( $p < 0.05$ ) dan gen sitokin *il2rb* ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan rotenone (Rajah 4.31). Penurunan ekspresi *ccl34b.4* mencadangkan bahawa hMT2 berupaya mengawal selia proses kemotaksis leukosit, yang secara tidak langsung mengurangkan risiko penyusupan sel imun periferi berbahaya menerusi BBB yang terjejas. Sementara itu, penurunan modulasi *il2rb* membayangkan bahawa hMT2 berkesan dalam melemahkan gelung maklum balas autokrin dan parakrin bagi proliferasi sel T yang dikawal perantara oleh pengisyaratan reseptor IL-2. Dengan mengurangkan kepekaan reseptor ini, hMT2 secara tidak langsung menyekat keaktifan melampau laluan p38 MAPK yang sering dikaitkan dengan disfungsi autofagi dan disfungsi mitokondria. Dapatan bersepadu ini mengesahkan bahawa rawatan hMT2, terutamanya melalui pendekatan terapeutik (pascarawatan hMT2) yang terbukti dominan dalam domain neuroinflamasi (Jadual 4.4), mempunyai kapasiti yang unggul untuk melemahkan mikropersekitaran CNS yang meradang dan progresif. Melalui tindakan yang menyasarkan penindasan pengaktifan sel glial (*tyrobp*) dan pelemahan paksi pengisyaratan sitokin (*il2rb* dan *ccl34b.4*), hMT2 berjaya menghentikan lata kerosakan imun sistemik. Seterusnya, penstabilan mikropersekitaran neuron ini menyediakan ruang optimum untuk pemulihan pengekspresan gen perlindungan neuron *bdnf* dan penstabilan jangka panjang bagi fungsi respirasi mitokondria.

Kemuncak kapasiti perlindungan neuron hMT2 dalam model PD dibuktikan oleh peranannya dalam memodulasi fasa pelaksanaan apoptosis. Berdasarkan analisis transkriptomik, kesan intervensi hMT2 terhadap parameter apoptosis didapati sangat bergantung pada strategi masa rawatan (Rajah 4.32). Hasil kajian menunjukkan bahawa

hanya intervensi prarawatan hMT2 (profilaksis) yang berjaya menyekat peningkatan ekspresi gen pro-apoptosis *dedd1* secara signifikan berbanding dengan kumpulan rotenone ( $p < 0.05$ , Rajah 4.32). Sebaliknya, intervensi pascarawatan hMT2 (terapeutik) tidak menunjukkan kesan penurunan regulasi yang signifikan terhadap ekspresi gen tersebut. Memandangkan gen *dedd1* mengkodkan protein domain efektor kematian pengikat kaspase (*caspase-binding death effector domain protein*) yang terlibat secara langsung dalam pembentukan kompleks pengisyaratan pencetus kematian (*death-inducing signaling complex*, DISC) bagi laluan ekstrinsik, penindasan awal melalui pendekatan profilaksis ini mempunyai implikasi biologi yang besar. Kehadiran hMT2 sebagai agen pencegah didapati berupaya untuk menyekat interaksi hulu antara protein domain kematian (DD) dengan protein domain efektor kematian (DED) sebelum kaspase pelaksana utama (seperti kaspase-8 dan kaspase-3) diaktifkan melalui pembelahan proteolitik. Dengan merencat ekspresi *dedd1*, hMT2 berkesan dalam memutuskan laluan apoptosis pada peringkat awal sebelum fragmentasi DNA dan degradasi protein sel yang tidak berbalik berlaku dalam neuron DA.

Keberkesanan selektif profilaksis ini dalam menindas *dedd1* adalah berkait rapat dengan kawalan mikropersekitaran sel yang dibincangkan sebelum ini. Pendekatan prarawatan hMT2 bertindak sebagai pelindung awal yang melemahkan lonjakan sitokin pro-keradangan seperti TNF- $\alpha$  yang dirembeskan akibat pendedahan kepada rotenone. Memandangkan TNF- $\alpha$  berfungsi sebagai ligan utama yang mencetuskan reseptor kematian permukaan, pengurangan sitokin ini secara tidak langsung menghalang permulaan laluan apoptosis ekstrinsik yang dikawal perantara oleh *dedd1*. Kegagalan fasa terapeutik (pascarawatan hMT2) untuk mengurangkan *dedd1* secara signifikan menunjukkan bahawa sebaik sahaja rotenone memulakan laluan apoptosis ekstrinsik, jentera kematian sel menjadi lebih sukar untuk direncat pada peringkat genetik. Walau bagaimanapun, data bersepadu dalam Jadual 4.4 menunjukkan bahawa fasa terapeutik kekal unggul dari segi parameter sistemik seperti pengurangan tekanan oksidatif (TBARS) dan pemulihan fungsi motor secara keseluruhan. Keadaan ini menunjukkan bahawa hMT2 menunjukkan potensi perlindungan neuron yang dinamik yang bertindak sebagai agen pencegah (profilaksis) yang sangat berkesan dalam memelihara kemandirian struktur dan populasi neuron DA daripada serangan apoptosis ekstrinsik (*dedd1* & *bdnf*), di samping berfungsi sebagai agen pemulihan (terapeutik) yang cekap

dalam menstabilkan respirasi mitokondria dan memulihkan aktiviti lokomotor pada zebrafish. Penemuan ini mengesahkan bahawa intervensi awal hMT2 adalah kritikal untuk merencat laluan apoptosis ekstrinsik bagi mengekang perkembangan neurodegeneratif yang progresif dalam model PD ini.

Dari aspek bioenergetik, rawatan hMT2 terbukti berjaya membalikkan kegagalan respirasi mitokondria yang dicituskan oleh neurotoksisiti rotenone. Analisis kolorimetri menggunakan plat MitoPlate I-1 menunjukkan pemulihan sensitiviti ETC terhadap perencat luaran, yang menandakan pengaktifan semula fungsi metabolisme organel tersebut secara sistematik ( $p < 0.001$ , Rajah 4.27). Penemuan ini mencadangkan bahawa hMT2 bukan sekadar agen antioksidan, tetapi juga bertindak sebagai pemangkin pemulihan enjin sel yang telah lumpuh akibat perencatan kompleks I ETC. Peningkatan aktiviti mitokondria yang paling menonjol diperhatikan pada pengaktifan semula kompleks II. Rawatan hMT2 meningkatkan kadar penurunan pewarna redoks tetrazolium secara signifikan, dengan peningkatan sebanyak 2.4 kali ganda bagi prarawatan hMT2 dan 2.2 kali ganda bagi pascarawatan hMT2 apabila didedahkan kepada perencat malonat dan karboksil ( $p < 0.001$ , Rajah 4.28). Pemulihan aktiviti mitokondria sekitar 30 % daripada tahap kumpulan rotenone (Rajah 4.29) membuktikan bahawa hMT2 berjaya menyambung semula aliran elektron yang terputus pada peringkat hulu ETC. Secara mekanistik, hMT2 berkemungkinan besar memulihkan integriti protein suksinat dehidrogenase (SDH) dan memastikan ketersediaan substrat suksinat untuk dioksidakan, yang seterusnya membolehkan mitokondria menjana potensi membran walaupun dalam kehadiran perencat kompleks I oleh rotenone.

Selain pemulihan kompleks II, rawatan hMT2 menunjukkan impak yang signifikan terhadap penstabilan metabolisme fosfolipid melalui laluan Kennedy. Data menunjukkan rawatan hMT2 meningkatkan kadar penurunan pewarna redoks tetrazolium sehingga 2.9 kali ganda bagi prarawatan hMT2 dan 2.3 kali ganda bagi pascarawatan hMT2 apabila didedahkan kepada perencat meklizin ( $p < 0.001$ , Rajah 4.28). Keupayaan hMT2 mengekalkan aktiviti respirasi sehingga 68 % berbanding hanya 23 % dalam kumpulan rotenone (Rajah 4.29) yang mencadangkan bahawa hMT2 mampu mengurangkan gangguan pada enzim PCYT2. Dengan menstabilkan semula

biosintesis PE, hMT2 memastikan integriti struktur membran dalaman mitokondria kekal sempurna untuk menyokong susunan "superkompleks" respirasom.

Pemulihan "suis homeostasis" ini sangat kritikal dalam konteks PD. Apabila hMT2 mengimbangi semula metabolisme lipid dan respirasi, pirau G3P kembali berfungsi sebagai laluan sandar (*backup route*) yang berkesan untuk menyalurkan elektron ke dalam takungan CoQ. Keadaan ini menghalang pengumpulan toksik G3P dan PEn yang sebelum ini dikesan dalam kumpulan rotenone. Keberkesanan intervensi prarawatan hMT2 yang lebih tinggi (2.88 kali ganda) berbanding pascarawatan hMT2 (2.25 kali ganda) dalam parameter ini mengukuhkan peranan hMT2 sebagai agen profilaksis yang mampu menyediakan mitokondria dengan ketahanan membran yang lebih tinggi sebelum serangan neurotoksik bermula. Secara keseluruhannya, pemulihan kecekapan ETC dan pemulihan metabolisme fosfolipid oleh hMT2 menyediakan asas bioenergetik yang kukuh bagi menyokong kemandirian neuron DA. Keberkesanan hMT2 dalam memulihkan respirasi mitokondria ini menjelaskan mekanisme biokimia di samping pengurangan tekanan oksidatif (Rajah 4.26), pemulihan tahap *bdnf* (Rajah 4.22), dan pemulihan fungsi motor zebrafish (Rajah 4.17) yang diperhatikan dalam kajian ini.

Di samping itu, rawatan dengan hMT2 menunjukkan peningkatan dalam kadar penurunan pewarna ujian respirasi mitokondria menunjukkan bahawa hMT2 mempunyai potensi untuk memulihkan fungsi mitokondria (Rajah 4.29). Mekanisme ini berkemungkinan berkaitan dengan peningkatan aliran elektron dalam ETC, yang membantu mengurangkan kesan perencatan yang disebabkan oleh rotenone. Pemulihan yang lebih tinggi dalam kumpulan prarawatan hMT2 berbanding pascarawatan hMT2 mencadangkan bahawa rawatan awal mungkin lebih berkesan dalam melindungi mitokondria daripada kesan toksik rotenone. Selain itu, kumpulan hMT2 menunjukkan tahap pemulihan dalam pemantauan masa nyata sepanjang enam jam (Rajah 4.29). Keadaan ini mencadangkan hMT2 dapat memperbaiki gangguan ini, tetapi tidak sepenuhnya memulihkan kecekapan pengangkutan elektron ke tahap normal. Tambahan pula, rawatan dengan hMT2 menunjukkan potensi dalam mengurangkan kesan perencatan kompleks I, terutamanya dalam kumpulan prarawatan yang menunjukkan peningkatan dalam kadar penurunan pewarna merentas semua perencat

yang diuji (Rajah 4.21). Keadaan ini menunjukkan bahawa hMT2 mungkin bertindak sebagai agen perlindungan yang membantu mengekalkan aktiviti mitokondria sebelum terjadinya perencatan kompleks I. Walau bagaimanapun, pemulihan dalam kumpulan pascarawatan hMT2 hanya diperhatikan dalam kebanyakan perencat tetapi tidak dalam kes berberin dan celastrol. Keadaan ini mencadangkan bahawa keberkesanan hMT2 mungkin bergantung kepada mekanisme perencatan kompleks I yang spesifik bagi setiap perencat yang digunakan. Di samping itu, kadar penurunan pewarna yang tidak mencecah 30 % dalam semua kumpulan menunjukkan bahawa perencatan kompleks I secara umumnya menyebabkan pengurangan aktiviti ETC yang ketara, di mana rawatan dengan hMT2 hanya memberikan pemulihan separa.

Di samping itu, rawatan dengan hMT2 turut menunjukkan peningkatan dalam kadar penurunan pewarna secara signifikan yang mencerminkan pemulihan fungsi mitokondria yang terjejas akibat rotenone, khususnya dalam kehadiran perencat kompleks II mitokondria, termasuk malonat, karboksilat, dan juga meklizine (Rajah 4.29, 4.31). Kesan hMT2 terhadap perencat kompleks II ini berkemungkinan berkait rapat dengan peranannya dalam mengekalkan proses pengoksidaan suksinat, yang khususnya terjejas oleh disfungsi mitokondria akibat pendedahan kepada rotenone. Walaupun bukti eksperimen mengenai peranan MT dalam fungsi utama mitokondria masih terhad, kajian yang lepas melaporkan bahawa ekspresi MT1A dalam mitokondria sel neuroblastoma SH-SY5Y yang diberi MPP+ dapat mengurangkan kerosakan mitokondria dengan memulihkan tahap ATP, aktiviti NADH dehidrogenase, dan tahap superoksida mitokondria (Kang et al. 2018).

MT dihasilkan terutamanya oleh astrosit dalam otak dan dirembeskan ke ruang ekstrasel (Saenz - Antoñanzas et al. 2024). Kajian yang lepas menunjukkan bahawa MT yang dirembeskan ini berpotensi melindungi neuron DA daripada ketoksikan 6-OHDA (Isooka et al. 2020). Oleh itu, pemberian hMT2 eksogen dipercayai berfungsi dalam ruang ekstrasel dan dapat memberikan kesan perlindungan kepada neuron melalui sifat antioksidan dan anti-keradangan yang dimilikinya. Namun begitu, terdapat bukti yang menunjukkan bahawa MT yang dirembeskan oleh astrosit boleh diserap ke dalam neuron melalui interaksi dengan reseptor permukaan, iaitu *low-density lipoprotein receptor (LDL-R)-related proteins (LRP)*, seperti LRP-1 dan LRP-2

(megalin). Jakovac et al. (2018) melaporkan bahawa neuron yang mengekspresikan megalin turut menunjukkan kereaktifan imun terhadap MT dalam membran dan sitoplasma neuron yang seterusnya mengaktifkan laluan pengisyaratan AKT1/Protein kinase B, yang diketahui mengekalkan kelangsungan hidup neuron. Oleh itu, pemberian hMT2 berpotensi untuk bertindak sebagai agen perlindungan neuron dalam ruang ekstrasel serta merencat laluan patogenik intrasel dalam neuron.

### **Perbandingan Efikasi Antara Intervensi Profilaksis dan Terapeutik hMT2**

Penentuan fasa intervensi rawatan hMT2 yang optimum merupakan langkah penting dalam memahami aplikasi mekanistik protein ini sebagai agen neuroprotektif. Hasil kajian ini mengesahkan bahawa hMT2 mempunyai efikasi neuroprotektif yang dinamik, berfungsi sama ada sebagai agen pencegahan (profilaksis) atau agen pemulihan (terapeutik) susulan kecederaan neuron. Perbandingan komprehensif menunjukkan bahawa intervensi terapeutik (pascarawatan hMT2) lebih unggul dalam aspek fungsi dan biokimia akut, manakala intervensi profilaksis (prarawatan hMT2) menawarkan kelebihan dalam integriti struktur dan kestabilan bioenergetik (Jadual 4.4).

Intervensi terapeutik (pascarawatan hMT2) didapati lebih dominan dalam memulihkan parameter fungsi dan biokimia pasca-kecederaan. Keunggulan fasa ini dibuktikan melalui pemulihan aktiviti lokomotor yang signifikan, yang menyaksikan jumlah jarak berenang diperbaiki sehingga melampaui tahap kumpulan rotenone dan menghampiri profil kumpulan kawalan (Rajah 4.17). Dari sudut mekanistik, keberkesanan terapeutik ini didorong oleh keupayaan hMT2 yang lebih drastik dalam menindas lara sitokin pro-keradangan (*il-1 $\alpha$* , *cox-2*, dan *tnf- $\alpha$* ) (Rajah 4.21) serta mengurangkan tekanan oksidatif (TBARS) sebanyak 85% (Rajah 4.26). Penurunan beban sitotoksik yang pantas ini secara langsung mengurangkan keperluan sel untuk mengekspresikan gen pertahanan endogen (*mt2* dan *smtb*) secara berlebihan (Rajah 4.20), sekali gus menstabilkan mikroperekitaran neuron dengan lebih efisien.

Sebaliknya, intervensi profilaksis (prarawatan hMT2) menunjukkan kelebihan yang nyata dalam mengekalkan integriti struktur dan kelestarian fungsi jangka panjang. Kehadiran awal hMT2 sebelum pendedahan rotenone bertindak sebagai "perisai biokimia" yang mengekalkan kepadatan populasi neuron DA secara signifikan merentas

kelima-lima bahagian utama otak (Rajah 4.25). Kelebihan fasa profilaksis ini berkait rapat dengan keupayaan hMT2 dalam memacu peningkatan ekspresi gen neuroprotektif BDNF (Rajah 4.22) dan pengangkut DA DAT (Rajah 4.23) pada tahap yang lebih tinggi berbanding fasa terapeutik. Dari aspek bioenergetik, profilaksis didapati lebih unggul dalam memelihara kecekapan respirasi mitokondria, yang menunjukkan integriti ETC dan laluan Kennedy dikekalkan daripada gangguan awal, sekali gus menghalang krisis tenaga sistemik (Rajah 4.29).

Secara keseluruhan, perbandingan ini memberikan perspektif baharu bahawa rawatan terapeutik menawarkan penyelesaian pantas terhadap gejala motor dan kerosakan oksidatif reaktif, manakala pendekatan profilaksis merupakan fasa yang optimum bagi kelestarian neuroprotektif. Keupayaan prarawatan hMT2 dalam meminimumkan kehilangan neuron DA dan menstabilkan respirasi mitokondria sebelum patologi berkembang adalah kunci utama dalam menyekat lata kerosakan neuron dengan lebih berkesan. Penemuan ini mengukuhkan kedudukan hMT2 sebagai modaliti rawatan yang holistik, yang bukan sahaja mampu bertindak sebagai agen penyelamat untuk memulihkan fungsi, tetapi juga sebagai agen neuroprofilaktik yang unggul dalam mengekalkan integriti sistem dopaminergik dalam model PD.

## BAB VI

### RUMUSAN DAN CADANGAN

#### 6.1 RUMUSAN

Kajian ini berjaya mencirikan profil patologi PD yang dicetuskan oleh neurotoksin rotenone serta menunjukkan potensi hMT2 dalam perlindungan neuron dengan menggunakan model *Danio rerio*. Melalui penyepaduan parameter aktiviti lokomotor, biokimia, imunohistokimia, pengekspresan genetik, dan analisis mikrosusun, kajian ini menyediakan kesimpulan yang holistik dan mendalam. Pendedahan kronik kepada rotenone terbukti berjaya memanifestasikan ciri-ciri utama patogenesis PD klinikal seperti yang diperhatikan pada manusia. Neurotoksisiti ini didapati memacu disregulasi sistemik yang teruk, bermula daripada penurunan drastik dalam aktiviti lokomotor (pengurangan dalam jumlah jarak berenang) yang disertai oleh manifestasi fenotip keresahan yang ketara. Pada peringkat organel, rotenone mengganggu ETC dengan merencat respirasi kompleks I dan II, kemudiannya mencetuskan peningkatan drastik dalam pemperoksidaan lipid seperti yang dibuktikan oleh lonjakan tahap TBARS. Kesan buruk ini seterusnya mengurangkan sokongan neurotropik penting (*bdnf*), mengganggu homeostasis dopaminergik (*dat*, *th1*, dan *th2*), serta menyebabkan kematian fizikal neuron DA di kawasan otak yang kritikal. Kemusnahan neuron ini diburukkan lagi oleh tindak balas neuroinflamasi secara progresif melalui pencetusan sitokin pro-keradangan (*il-1a*, *il-1b*, *cox-2*, *tnf- $\alpha$* ), pengaktifan mikrogliosis reaktif (*tyrobp*), dan serangan agresif daripada populasi sel T sitotoksik CD8<sup>+</sup> (*gzm3*, *cd8a*, *themis*, dan *lck*). Kemuncak kerosakan neuron ini dikawal perantara oleh peningkatan ekspresi gen *dedd1* yang bertindak mengikat kaspase untuk memulakan pemecahan protein struktur dan fragmentasi DNA neuron melalui laluan apoptosis ekstrinsik.

Intervensi rawatan dengan protein hMT2 eksogen telah terbukti menunjukkan neuroprotector multiasaran yang sangat berkesan dalam memulihkan homeostasis

biokimia dan sel yang terjejas. Bagi gejala PD, hMT2 berjaya menstabilkan parameter lokomotor dan mengurangkan fenotip keresahan zebrafish kepada tahap normal. Pada peringkat molekul, hMT2 melemahkan mikropersekitaran CNS yang meradang secara berkesan melalui penindasan sitokin pro-keradangan, perencatan mikrogliosis reaktif (*tyrobp*, *il2rb*, dan *ccl34b.4*), serta penormalan gen pengaktifan sel T (*gzm3*, *cd8a*, dan *themis*) bagi mengekang serangan imun adaptif patogenik. Kesan imunomodulasi selektif ini adalah selaras dengan penurunan tekanan oksidatif (TBARS), pemulihan kecekapan respirasi mitokondria, dan perangsangan rembesan faktor neurotropik (*bdnf*), yang secara kolektif berfungsi untuk mengekalkan integriti struktur, merencat tindak balas apoptosis ekstrinsik, dan mengekalkan kepadatan populasi neuron DA.

Dapatan paling berimpak dalam kajian ini menyimpulkan bahawa kapasiti perlindungan neuron hMT2 adalah dinamik dan bergantung secara signifikan pada strategi rawatan yang digunakan (kecekapan bersandarkan masa). Pendekatan profilaksis (prarawatan hMT2) didapati unggul dan dominan dari segi perlindungan struktur sel hulu (*upstream cellular structural protection*). Pendekatan profilaksis ini bertindak sebagai pelindung awal yang mengekalkan populasi neuron DA, menstabilkan kecekapan respirasi mitokondria, mengekalkan ekspresi gen *bdnf* dan *dat*, serta berupaya menyekat fasa pelaksanaan apoptosis pada peringkat genetik melalui penindasan mutlak pengekspresan gen *dedd1* sebelum lata kematian sel yang tidak berbalik berlaku. Sebaliknya, pendekatan terapeutik (pascarawatan hMT2) didapati unggul dan dominan dari segi pemulihan berfungsi hilir (*downstream functional recovery*). Intervensi pascarawatan hMT2 ini memberikan keberkesanan maksimum dalam meringankan beban tekanan oksidatif sistemik (TBARS), menyekat lata sitokin keradangan akut, dan mengaktifkan sistem pertahanan endogen zebrafish (*mt2* dan *smtb*), yang akhirnya diterjemahkan kepada pemulihan aktiviti lokomotor luaran yang lebih cekap. Kesimpulannya, data daripada model zebrafish ini memberikan asas praklinikal yang kukuh untuk mencadangkan hMT2 sebagai modaliti rawatan dwifungsi (profilaksis dan terapeutik) yang berpotensi tinggi, serta mempunyai potensi terapeutik dalam memperlambatkan atau menghentikan perkembangan neurodegeneratif yang progresif demi pengurusan PD pada masa hadapan.

## 6.2 LIMITASI KAJIAN

Walaupun kajian ini memberikan pemahaman baharu tentang potensi perlindungan neuron protein hMT2, terdapat beberapa had metodologi yang perlu diakui bagi membimbing penterjemahan data dan hala tuju penyelidikan pada masa hadapan. Antara had utama dalam reka bentuk kajian ini termasuklah ketiadaan kumpulan kawalan pembawa (*vehicle control group*) khusus untuk prosedur rawatan hMT2. Kumpulan kawalan pembawa amat kritikal dalam kajian farmakologi bagi memastikan bahawa kesan perlindungan neuron atau sebarang perubahan fenotip yang diperhatikan adalah benar-benar dicetuskan oleh molekul aktif (iaitu hMT2 eksogen) dan bukannya akibat kesan daripada larutan pembawa (penimbal) atau medium pelarut yang digunakan. Walaupun kumpulan kawalan normal (tanpa rawatan) telah digunakan sebagai garis dasar untuk membandingkan kesan rotenone dan intervensi tersebut, ketiadaan kumpulan kawalan pembawa menghadkan keupayaan kajian ini untuk menolak sepenuhnya kemungkinan kesan biokimia minimum yang mungkin disumbangkan oleh komponen pelarut eksogen kepada sistem fisiologi zebrafish.

Di samping itu, kajian ini juga tidak melibatkan penggunaan kumpulan kawalan positif dalam pengurusan PD, seperti ubat L-DOPA (levodopa) atau agonis DA yang biasa digunakan dalam kajian klinikal dan praklinikal. Penggunaan kawalan positif amat penting untuk berfungsi sebagai piawaian rujukan atau penanda aras kecekapan bagi menilai magnitud perlindungan neuron dan pemulihan motor oleh hMT2 berbanding dengan modaliti rawatan sedia ada di pasaran. Ketiadaan parameter perbandingan langsung ini menyebabkan penilaian tahap keberkesanan terapeutik hMT2 bersifat relatif kepada kumpulan kawalan dan kumpulan rotenone sahaja, tanpa keupayaan untuk mengesahkan sama ada kapasiti pemulihan hMT2 adalah setara, lebih rendah, atau lebih unggul berbanding dengan standard emas semasa bagi rawatan PD. Walau bagaimanapun, ketiadaan kumpulan kawalan positif ini diimbangi secara konseptual oleh kewujudan beberapa kajian terdahulu yang telah mendokumentasikan kesan dan parameter rawatan protein hMT2 dalam model haiwan zebrafish. Data literatur yang sedia ada ini telah memberikan asas rujukan (Mohamad Najib et al. 2023; Teoh 2016) yang kukuh mengenai profil keselamatan, pengoptimuman dos, dan bioaktiviti asas hMT2 dalam sistem fisiologi zebrafish. Oleh itu, walaupun perbandingan silang dengan ubat klinikal semasa tidak dapat dilakukan secara langsung

dalam reka bentuk eksperimen ini, penilaian kecekapan hMT2 tetap mempunyai kesahan saintifik yang tinggi kerana penilaian tersebut bersandarkan penanda aras mekanistik yang telah disahkan oleh kajian-kajian terdahulu.

### 6.3 CADANGAN KAJIAN LANJUTAN

Bagi mengukuhkan dan memperluas skop dapatan yang diperoleh daripada kajian ini, beberapa kajian susulan yang strategik boleh dipertimbangkan untuk penyelidikan pada masa hadapan. Skop kajian molekul boleh diperluas dengan melibatkan kumpulan kawalan positif seperti levodopa (L-DOPA) atau agonis dopamin yang lain, di samping memastikan kehadiran kumpulan kawalan pembawa khusus untuk larutan pembawa hMT2. Kehadiran kumpulan perbandingan langsung ini bukan sahaja akan meningkatkan kesahan dalaman bagi reka bentuk eksperimen, tetapi juga membolehkan penanda aras kecekapan dilakukan untuk membandingkan tahap perlindungan neuron dan keselamatan hMT2 relatif kepada rawatan standard emas komersial semasa. Selain itu, kajian kinetik tindak balas dos hMT2 yang lebih luas juga perlu dijalankan untuk mengenal pasti julat tettingkap terapeutik yang paling selamat dan optimum sebelum sebarang penterjemahan klinikal diusahakan.

Di samping itu, bagi meningkatkan nilai penterjemahan protein hMT2 daripada model akuatik kepada aplikasi mamalia dan manusia, penyelidikan ini perlu dimajukan ke peringkat model *in vivo* yang lebih tinggi. Kajian lanjut menggunakan model mamalia seperti rodensia yang dicetuskan oleh neurotoksin sama ada rotenone atau MPTP merupakan langkah kritikal yang seterusnya. Melalui model mamalia, penyelidik boleh meneliti isu farmakokinetik yang lebih kompleks termasuklah keupayaan protein hMT2 untuk menembusi BBB mamalia yang lebih ketat, profil biodistribusi, kadar perkumuhan, serta potensi imunogenisiti atau kesan sampingan jangka panjang. Penerokaan model praklinikal yang lebih maju ini akan menyediakan asas data bioperubatan yang lebih teguh dan holistik untuk merealisasikan potensi hMT2 sebagai modaliti terapeutik atau profilaksis moden yang inovatif bagi merawat PD.

## RUJUKAN

- Abdul Wahid, A. I. & Ahmad Khan, H. 2010. Environmental Toxins And Parkinson's Disease: Putative Roles Of Impaired Electron Transport Chain And Oxidative Stress. *Toxicology And Industrial Health* 26(2): 121–128.
- Abou-Sleiman, P. M., Muqit, M. M. & Wood, N. W. 2006. Expanding Insights Of Mitochondrial Dysfunction In Parkinson's Disease. *Nature Reviews Neuroscience* 7(3): 207–219.
- Adebayo, O. G., Ben-Azu, B., Akpofure, E., Modo, E. U., Ndidiamaka, I. P., Enya, J. I., Udoeyop, F. A., Oritsemuelebi, B., Chidebe, E. O. & Chimezie, J. 2024. Zingiber Officinale Roscoe Extract Improves Nigrostriatal Dopaminergic Activity In Rotenone-Induced Parkinsonian Mice: Implication Of Cox-2/Tnf- $\alpha$ /Il-6 And Antioxidant Enzyme Crosstalk In The Immunoinflammatory Responses. *Phytomedicine Plus*: 100610.
- Ahmed, S., Venkatesan, G., Prapul, D. S. & Babu, A. 2023. Utility Of Zebrafish Behavioral Assays In Ecotoxicological And Biomedical Studies: Materials And Methods. *International Journal Of Engineering Research In Mechanical And Civil Engineering (IJERMCE)* 10: 2349–1590.
- Ahn, E. H., Lei, K., Kang, S. S., Wang, Z.-H., Liu, X., Hong, W., Wang, Y. T., Edgington-Mitchell, L. E., Jin, L. & Ye, K. 2021. Mitochondrial Dysfunction Triggers The Pathogenesis Of Parkinson's Disease In Neuronal C/Ebpb Transgenic Mice. *Molecular Psychiatry* 26(12): 7838–7850.
- Al-Abdulrasul, H., Ajalin, R., Tuisku, J., Zetterberg, H., Blennow, K., Vahlberg, T., Ekblad, L., Helin, S., Forsback, S. & Rinne, J. O. 2025. Neuroinflammation In Parkinson's Disease: A Study With [11c] Pbr28 Pet And Cerebrospinal Fluid Markers. *Parkinsonism & Related Disorders* 130: 107177.
- Alam, M. & Schmidt, W. 2002. Rotenone Destroys Dopaminergic Neurons And Induces Parkinsonian Symptoms In Rats. *Behavioural Brain Research* 136(1): 317–324.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2002. Electron-Transport Chains And Their Proton Pumps. *Molecular Biology Of The Cell* 4:
- Aleström, P., Holter, J. L. & Nourizadeh-Lillabadi, R. 2006. Zebrafish In Functional Genomics And Aquatic Biomedicine. *Trends In Biotechnology* 24(1): 15–21.
- Allan, S. M. & Rothwell, N. J. 2001. Cytokines And Acute Neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience* 2(10): 734–744.
- Allen, J. P. & Neely, M. N. 2010. Trolling For The Ideal Model Host: Zebrafish Take The Bait. *Future Microbiology* 5(4): 563–569.
- Allen, P. M. 2009. Themis Imposes New Law And Order On Positive Selection. *Nature Immunology* 10(8): 805–806.

- Álvarez-Barrios, A., Álvarez, L., García, M., Artime, E., Pereiro, R. & González-Iglesias, H. 2021. Antioxidant Defenses In The Human Eye: A Focus On Metallothioneins. *Antioxidants* 10(1): 89.
- Amadou, A., Praud, D., Coudon, T., Danjou, A. M., Faure, E., Deygas, F., Grassot, L., Leffondré, K., Severi, G. & Salizzoni, P. 2021. Exposure To Airborne Cadmium And Breast Cancer Stage, Grade And Histology At Diagnosis: Findings From The E3n Cohort Study. *Scientific Reports* 11(1): 23088.
- Amaral, L., Martins, M., Côrte-Real, M., Outeiro, T. F., Chaves, S. R. & Rego, A. 2025. The Neurotoxicity Of Pesticides: Implications For Parkinson's Disease. *Chemosphere* 377: 144348.
- Angeles, D. C., Gan, B. H., Onstead, L., Zhao, Y., Lim, K. L., Dachsel, J., Melrose, H., Farrer, M., Wszolek, Z. K. & Dickson, D. W. 2011. Mutations In Lrrk2 Increase Phosphorylation Of Peroxiredoxin 3 Exacerbating Oxidative Stress - Induced Neuronal Death. *Human Mutation* 32(12): 1390–1397.
- Antonini, A., Poewe, W., Chaudhuri, K. R., Jech, R., Pickut, B., Pirtošek, Z., Szasz, J., Valldeoriola, F., Winkler, C. & Bergmann, L. 2017. Levodopa-Carbidopa Intestinal Gel In Advanced Parkinson's: Final Results Of The Gloria Registry. *Parkinsonism & Related Disorders* 45: 13–20.
- Antony, P. M., Diederich, N. J., Krüger, R. & Balling, R. 2013. The Hallmarks Of P Arkinson's Disease. *The FEBS Journal* 280(23): 5981–5993.
- Armstrong, M. J. & Okun, M. S. 2020. Diagnosis And Treatment Of Parkinson Disease: A Review. *Jama* 323(6): 548–560.
- Aryal, B. & Lee, Y. 2019. Disease Model Organism For Parkinson Disease: *Drosophila Melanogaster*. *BMB Reports* 52(4): 250.
- Ashok, C., Rajasekaran, N. K., Jeyabalan, S., Veeraraghavan, G., Lakshmi, S., Sugumar, R., Jabaris, S. L., Subramaniyan, V. & Wong, L. S. 2025. Comparative Evaluation Of Mptp And Rotenone As Inducing Agents For Parkinson's Disease In Adult Zebrafish: Behavioural And Histopathological Insights. *Toxicology Reports*: 102084.
- Ashrafi, G., Schlehe, J. S., Lavoie, M. J. & Schwarz, T. L. 2014. Mitophagy Of Damaged Mitochondria Occurs Locally In Distal Neuronal Axons And Requires Pink1 And Parkin. *Journal Of Cell Biology* 206(5): 655–670.
- Askar, M. H., Hussein, A. M., Al-Basiony, S. F., Meseha, R. K., Metias, E. F., Salama, M. M., Antar, A. & El-Sayed, A. 2019. Effects Of Exercise And Ferulic Acid On Alpha Synuclein And Neuroprotective Heat Shock Protein 70 In An Experimental Model Of Parkinsonism Disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)* 18(2): 156–169.

- Ayala, A., Muñoz, M. F. & Argüelles, S. 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, And Signaling Mechanisms Of Malondialdehyde And 4 - Hydroxy - 2 - Nonenal. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity* 2014(1): 360438.
- Azzouz, D., Khan, M. A. & Palaniyar, N. 2021. Ros Induces Netosis By Oxidizing DNA And Initiating DNA Repair. *Cell Death Discovery* 7(1): 113.
- Ba, F., Obaid, M., Wieler, M., Camicioli, R. & Martin, W. W. 2016. Parkinson Disease: The Relationship Between Non-Motor Symptoms And Motor Phenotype. *Canadian Journal Of Neurological Sciences* 43(2): 261–267.
- Babu, A. H., Prasanth, D., Yaraguppi, D. A., Panda, S. P., Ahmad, S. F., Al-Mazroua, H. A., Sai, A. R. & Kumar, P. P. 2024. Antiparkinson Potential Of Khellin On Rotenone-Induced Parkinson's Disease In A Zebrafish Model: Targeting Mao, Inflammatory, And Oxidative Stress Markers With Molecular Docking, Md Simulations, And Histopathology Evidence. *Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 284: 109997.
- Babula, P., Masarik, M., Adam, V., Eckschlager, T., Stiborova, M., Trnkova, L., Skutkova, H., Provaznik, I., Hubalek, J. & Kizek, R. 2012. Mammalian Metallothioneins: Properties And Functions. *Metallomics* 4(8): 739–750.
- Ball, N., Teo, W.-P., Chandra, S. & Chapman, J. 2019. Parkinson's Disease And The Environment. *Frontiers In Neurology* 10: 421551.
- Bartels, A., Willemsen, A., Doorduyn, J., De Vries, E., Dierckx, R. & Leenders, K. 2010. [11c]-Ptk11195 Pet: Quantification Of Neuroinflammation And A Monitor Of Anti-Inflammatory Treatment In Parkinson's Disease? *Parkinsonism & Related Disorders* 16(1): 57–59.
- Basu, A., Krady, J. K. & Levison, S. W. 2004. Interleukin - 1: A Master Regulator Of Neuroinflammation. *Journal Of Neuroscience Research* 78(2): 151–156.
- Bauer, S., Kerr, B. J. & Patterson, P. H. 2007. The Neuropoietic Cytokine Family In Development, Plasticity, Disease And Injury. *Nature Reviews Neuroscience* 8(3): 221–232.
- Bazopoulou, D., Knoefler, D., Zheng, Y., Ulrich, K., Oleson, B. J., Xie, L., Kim, M., Kaufmann, A., Lee, Y.-T. & Dou, Y. 2019. Developmental Ros Individualizes Organismal Stress Resistance And Lifespan. *Nature* 576(7786): 301–305.
- Belvisi, D., Pellicciari, R., Fabbrini, G., Tinazzi, M., Berardelli, A. & Defazio, G. 2020. Modifiable Risk And Protective Factors In Disease Development, Progression And Clinical Subtypes Of Parkinson's Disease: What Do Prospective Studies Suggest? *Neurobiology Of Disease* 134: 104671.
- Benner, E. J., Banerjee, R., Reynolds, A. D., Sherman, S., Pisarev, V. M., Tsiperson, V., Nemachek, C., Ciborowski, P., Przedborski, S. & Mosley, R. L. 2008.

Nitrated A-Synuclein Immunity Accelerates Degeneration Of Nigral Dopaminergic Neurons. *PLoS One* 3(1): E1376.

Bensellam, M., Laybutt, D. R. & Jonas, J.-C. 2021. Emerging Roles Of Metallothioneins In Beta Cell Pathophysiology: Beyond And Above Metal Homeostasis And Antioxidant Response. *Biology* 10(3): 176.

Berg, A. F., Ettich, J., Weitz, H. T., Krusche, M., Floss, D. M., Scheller, J. & Moll, J. M. 2021. Exclusive Inhibition Of Il-6 Trans-Signaling By Soluble Gp130flyrfc. *Cytokine: X* 3(4): 100058.

Berg, D., Youdim, M. B. & Riederer, P. 2004. Redox Imbalance. *Cell And Tissue Research* 318: 201–213.

Bergman, H., Wichmann, T., Karmon, B. & DeLong, M. 1994. The Primate Subthalamic Nucleus. Ii. Neuronal Activity In The Mptp Model Of Parkinsonism. *Journal Of Neurophysiology* 72(2): 507–520.

Berliocchi, L., Bano, D. & Nicotera, P. 2005. Ca<sup>2+</sup> Signals And Death Programmes In Neurons. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences* 360(1464): 2255–2258.

Besemer, A. S., Maus, J., Ax, M. D., Stein, A., Vo, S., Freese, C., Nalbach, K., Von Hilchen, C., Pfalzgraf, I. F. & Koziollek-Drechsler, I. 2021. Receptor-Mediated Endocytosis 8 (Rme-8)/Dnajc13 Is A Novel Positive Modulator Of Autophagy And Stabilizes Cellular Protein Homeostasis. *Cellular And Molecular Life Sciences* 78(2): 645–660.

Betarbet, R., Sherer, T. B., Mackenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V. & Greenamyre, J. T. 2000. Chronic Systemic Pesticide Exposure Reproduces Features Of Parkinson's Disease. *Nature Neuroscience* 3(12): 1301–1306.

Bexci, S. & Subramani, R. 2018. Decoding Parkinson's Associated Health Messages In Social Media Pages By Malaysian Service Administrators. *Malaysian Journal Of Medical Research (MJMR)* 2(4): 64–72.

Bezard, E. & Przedborski, S. 2011. A Tale On Animal Models Of Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 26(6): 993–1002.

Bilge, S. S., Günaydin, C., Önger, M. E., Bozkurt, A. & Avci, B. 2020. Neuroprotective Action Of Agmatine In Rotenone-Induced Model Of Parkinson's Disease: Role Of Bdnf/Creb And Erk Pathway. *Behavioural Brain Research* 392: 112692.

Bilguvar, K., Tyagi, N. K., Ozkara, C., Tuysuz, B., Bakircioglu, M., Choi, M., Delil, S., Caglayan, A. O., Baranoski, J. F. & Erturk, O. 2013. Recessive Loss Of Function Of The Neuronal Ubiquitin Hydrolase Uchl1 Leads To Early-Onset Progressive Neurodegeneration. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 110(9): 3489–3494.

Billingsley, K., Bandres-Ciga, S., Saez-Atienzar, S. & Singleton, A. 2018. Genetic Risk Factors In Parkinson's Disease. *Cell And Tissue Research* 373: 9–20.

- Bindoff, L., Birch, M. M. & Cartidge, N. 1989. Mitochondrial Function In Parkinson's Disease. *LANCET* 1: 49.
- Bisbal, M. & Sanchez, M. 2019. Neurotoxicity Of The Pesticide Rotenone On Neuronal Polarization: A Mechanistic Approach. *Neural Regeneration Research* 14(5): 762–766.
- Bjorklund, G., Stejskal, V., Urbina, M. A., Dadar, M., Chirumbolo, S. & Mutter, J. 2018. Metals And Parkinson's Disease: Mechanisms And Biochemical Processes. *Current Medicinal Chemistry* 25(19): 2198–2214.
- Blandini, F. & Armentero, M. T. 2012. Animal Models Of Parkinson's Disease. *The FEBS Journal* 279(7): 1156–1166.
- Blandini, F., Porter, R. H. & Greenamyre, J. T. 1996. Glutamate And Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology* 12: 73–94.
- Blesa, J. & Przedborski, S. 2014. Parkinson's Disease: Animal Models And Dopaminergic Cell Vulnerability. *Frontiers In Neuroanatomy* 8: 123289.
- Blinkouskaya, Y. & Weickenmeier, J. 2021. Brain Shape Changes Associated With Cerebral Atrophy In Healthy Aging And Alzheimer's Disease. *Frontiers In Mechanical Engineering* 7: 705653.
- Blundell, E. K., Grover, L. E., Stott, J. & Schrag, A. 2023. The Experience Of Anxiety For People With Parkinson's Disease. *Npj Parkinson's Disease* 9(1): 75.
- Bone, R. C. 1996. Immunologic Dissonance: A Continuing Evolution In Our Understanding Of The Systemic Inflammatory Response Syndrome (Sirs) And The Multiple Organ Dysfunction Syndrome (Mods). *Annals Of Internal Medicine* 125(8): 680–687.
- Bonifati, V., Rizzu, P., Van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., Dekker, M. C., Squitieri, F., Ibanez, P. & Joesse, M. 2003. Mutations In The Dj-1 Gene Associated With Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism. *Science* 299(5604): 256–259.
- Borsche, M., Pereira, S. L., Klein, C. & Grünewald, A. 2021. Mitochondria And Parkinson's Disease: Clinical, Molecular, And Translational Aspects. *Journal Of Parkinson's Disease* 11(1): 45–60.
- Bose, A. & Beal, M. F. 2016. Mitochondrial Dysfunction In Parkinson's Disease. *Journal Of Neurochemistry* 139: 216–231.
- Böttinger, L., Horvath, S. E., Kleinschroth, T., Hunte, C., Daum, G., Pfanner, N. & Becker, T. 2012. Phosphatidylethanolamine And Cardiolipin Differentially Affect The Stability Of Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes. *Journal Of Molecular Biology* 423(5): 677–686.

- Bourke, E., Cassetti, A., Villa, A., Fadlon, E., Colotta, F. & Mantovani, A. 2003. Il-1 $\beta$  Scavenging By The Type Ii Il-1 Decoy Receptor In Human Neutrophils. *The Journal Of Immunology* 170(12): 5999–6005.
- Bové, J. & Perier, C. 2012. Neurotoxin-Based Models Of Parkinson's Disease. *Neuroscience* 211: 51–76.
- Bové, J., Prou, D., Perier, C. & Przedborski, S. 2005. Toxin-Induced Models Of Parkinson's Disease. *NeuroRx* 2(3): 484–494.
- Braak, H., De Vos, R. A., Bohl, J. & Del Tredici, K. 2006. Gastric A-Synuclein Immunoreactive Inclusions In Meissner's And Auerbach's Plexuses In Cases Staged For Parkinson's Disease-Related Brain Pathology. *Neuroscience Letters* 396(1): 67–72.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., De Vos, R. A., Steur, E. N. J. & Braak, E. 2003. Staging Of Brain Pathology Related To Sporadic Parkinson's Disease. *Neurobiology Of Aging* 24(2): 197–211.
- Bridi, J. C. & Hirth, F. 2018. Mechanisms Of A-Synuclein Induced Synaptopathy In Parkinson's Disease. *Frontiers In Neuroscience* 12: 80.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller Jr, F. J. & Krause, K.-H. 2012. Reactive Oxygen Species: From Health To Disease. *Swiss Medical Weekly* 142(3334): W13659–W13659.
- Brinez-Gallego, P., Da Costa Silva, D. G., Cordeiro, M. F., Horn, A. P. & Hort, M. A. 2023. Experimental Models Of Chemically Induced Parkinson's Disease In Zebrafish At The Embryonic Larval Stage: A Systematic Review. *Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part B* 26(4): 201–237.
- Brochard, V., Combadière, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-Berthet, V., Bonduelle, O., Alvarez-Fischer, D., Callebert, J. & Launay, J.-M. 2008. Infiltration Of Cd4+ Lymphocytes Into The Brain Contributes To Neurodegeneration In A Mouse Model Of Parkinson Disease. *The Journal Of Clinical Investigation* 119(1):
- Broen, M. P., Narayen, N. E., Kuijf, M. L., Dissanayaka, N. N. & Leentjens, A. F. 2016. Prevalence Of Anxiety In Parkinson's Disease: A Systematic Review And Meta - Analysis. *Movement Disorders* 31(8): 1125–1133.
- Burbulla, L. F. & Krainc, D. 2019. The Role Of Dopamine In The Pathogenesis Of Gba1-Linked Parkinson's Disease. *Neurobiology Of Disease* 132: 104545.
- Burbulla, L. F., Song, P., Mazzulli, J. R., Zampese, E., Wong, Y. C., Jeon, S., Santos, D. P., Blanz, J., Obermaier, C. D. & Strojny, C. 2017. Dopamine Oxidation Mediates Mitochondrial And Lysosomal Dysfunction In Parkinson's Disease. *Science* 357(6357): 1255–1261.
- Burré, J., Sharma, M. & Südhof, T. C. 2018. Cell Biology And Pathophysiology Of A-Synuclein. *Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine* 8(3): A024091.

- Butnaru, C., Pascu, M., Mircea, C., Agoroaei, L., Solovăstru, L., Vătă, D., Butnaru, E. & Petrescu, Z. 2008. Serum Zinc And Copper Levels In Some Dermatological Diseases. *Revista Medico-Chirurgicala A Societatii De Medici Si Naturalisti Din Lasi* 112(1): 253–257.
- Cadenas, E. & Davies, K. J. 2000. Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, And Aging. *Free Radical Biology And Medicine* 29(3-4): 222–230.
- Cai, L., Iskander, S., Cherian, M. G. & Hammond, R. R. 2004. Zinc-Or Cadmium-Pre-Induced Metallothionein Protects Human Central Nervous System Cells And Astrocytes From Radiation-Induced Apoptosis. *Toxicology Letters* 146(3): 217–226.
- Calì, T., Ottolini, D., Negro, A. & Brini, M. 2012. A-Synuclein Controls Mitochondrial Calcium Homeostasis By Enhancing Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Interactions. *Journal Of Biological Chemistry* 287(22): 17914–17929.
- Calzada, E., Onguka, O. & Claypool, S. M. 2016. Phosphatidylethanolamine Metabolism In Health And Disease. *International Review Of Cell And Molecular Biology* 321: 29–88.
- Cannon, J. R. & Greenamyre, J. T. 2010. Neurotoxic In Vivo Models Of Parkinson's Disease: Recent Advances. *Progress In Brain Research* 184: 17–33.
- Cannon, J. R., Tapias, V., Na, H. M., Honick, A. S., Drolet, R. E. & Greenamyre, J. T. 2009. A Highly Reproducible Rotenone Model Of Parkinson's Disease. *Neurobiology Of Disease* 34(2): 279–290.
- Cansız, D., Unal, I., Beler, M., Ustundag, U. V., Ak, E., Emekli-Alturfan, E. & Alturfan, A. A. 2023. The Effect Of Acetic Acid-Induced Pain In Parkinson's Disease Model In Zebrafish. *Neurotoxicology* 99: 14–23.
- Cansız, D., Ünal, İ., Üstündağ, Ü. V., Alturfan, A. A., Altinoz, M. A., Elmacı, İ. & Emekli-Alturfan, E. 2021. Caprylic Acid Ameliorates Rotenone Induced Inflammation And Oxidative Stress In The Gut-Brain Axis In Zebrafish. *Molecular Biology Reports* 48: 5259–5273.
- Cantuti-Castelvetri, I., Keller-Mcgandy, C., Bouzou, B., Asteris, G., Clark, T. W., Frosch, M. P. & Standaert, D. G. 2007. Effects Of Gender On Nigral Gene Expression And Parkinson Disease. *Neurobiology Of Disease* 26(3): 606–614.
- Caracciolo, D., Clark, S. C. & Rovera, G. 1989. Human Interleukin-6 Supports Granulocytic Differentiation Of Hematopoietic Progenitor Cells And Acts Synergistically With Gm-Csf. *Blood* 73(3): 666–670.
- Caramillo, E. M. & Echevarria, D. J. 2017. Alzheimer's Disease In The Zebrafish: Where Can We Take It? *Behavioural Pharmacology* 28(2 And 3): 179–186.
- Carrillo-Mora, P., Silva-Adaya, D. & Villaseñor-Aguayo, K. 2013. Glutamate In Parkinson's Disease: Role Of Antiglutamatergic Drugs. *Basal Ganglia* 3(3): 147–157.

- Cascella, R., Chen, S. W., Bigi, A., Camino, J. D., Xu, C. K., Dobson, C. M., Chiti, F., Cremades, N. & Cecchi, C. 2021. The Release Of Toxic Oligomers From A-Synuclein Fibrils Induces Dysfunction In Neuronal Cells. *Nature Communications* 12(1): 1814.
- Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J. L., Gamse, J. T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R. T., Van Cruchten, S. & Zon, L. I. 2019. Use Of Zebrafish In Drug Discovery Toxicology. *Chemical Research In Toxicology* 33(1): 95–118.
- Castelo Rueda, M. P., Raftopoulou, A., Gögele, M., Borsche, M., Emmert, D., Fuchsberger, C., Hantikainen, E. M., Vukovic, V., Klein, C. & Pramstaller, P. P. 2021. Frequency Of Heterozygous Parkin (Prkn) Variants And Penetrance Of Parkinson's Disease Risk Markers In The Population-Based Chris Cohort. *Frontiers In Neurology* 12: 706145.
- Castillo-Rangel, C., Marin, G., Hernandez-Contreras, K. A., Vichi-Ramirez, M. M., Zarate-Calderon, C., Torres-Pineda, O., Diaz-Chiguer, D. L., De La Mora González, D., Gómez Apo, E. & Teco-Cortes, J. A. 2023. Neuroinflammation In Parkinson's Disease: From Gene To Clinic: A Systematic Review. *International Journal Of Molecular Sciences* 24(6): 5792.
- Cavanna, A. E. 2018. *Parkinson Disease. Motion And Emotion: The Neuropsychiatry Of Movement Disorders And Epilepsy*. Springer, Cham.
- Cebrián, C., Zucca, F. A., Mauri, P., Steinbeck, J. A., Studer, L., Scherzer, C. R., Kanter, E., Budhu, S., Mandelbaum, J. & Vonsattel, J. P. 2014. Mhc-I Expression Renders Catecholaminergic Neurons Susceptible To T-Cell-Mediated Degeneration. *Nature Communications* 5(1): 3633.
- Cenci, M. A. 2014. Glutamatergic Pathways As A Target For The Treatment Of Dyskinesias In Parkinson's Disease. *Biochemical Society Transactions* 42(2): 600–604.
- Cenini, G., Lloret, A. & Cascella, R. 2019. Oxidative Stress In Neurodegenerative Diseases: From A Mitochondrial Point Of View. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity* 2019(1): 2105607.
- Cereda, E., Cilia, R., Canesi, M., Tesesi, S., Mariani, C. B., Zecchinelli, A. L. & Pezzoli, G. 2017. Efficacy Of Rasagiline And Selegiline In Parkinson's Disease: A Head-To-Head 3-Year Retrospective Case-Control Study. *Journal Of Neurology* 264(6): 1254–1263.
- Cerri, S., Milanese, C. & Mastroberardino, P. G. 2019a. Endocytic Iron Trafficking And Mitochondria In Parkinson's Disease. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology* 110: 70–74.
- Cerri, S., Mus, L. & Blandini, F. 2019b. Parkinson's Disease In Women And Men: What's The Difference? *Journal Of Parkinson's Disease* 9(3): 501–515.

- Chakrabarti, S. & Bisaglia, M. 2023. Oxidative Stress And Neuroinflammation In Parkinson's Disease: The Role Of Dopamine Oxidation Products. *Antioxidants* 12(4): 955.
- Chan, E. Y. & Mcquibban, G. A. 2012. Phosphatidylserine Decarboxylase 1 (Psd1) Promotes Mitochondrial Fusion By Regulating The Biophysical Properties Of The Mitochondrial Membrane And Alternative Topogenesis Of Mitochondrial Genome Maintenance Protein 1 (Mgm1). *Journal Of Biological Chemistry* 287(48): 40131–40139.
- Chandler, D. J., Jensen, P., Mccall, J. G., Pickering, A. E., Schwarz, L. A. & Totah, N. K. 2019. Redefining Noradrenergic Neuromodulation Of Behavior: Impacts Of A Modular Locus Coeruleus Architecture. *Journal Of Neuroscience* 39(42): 8239–8249.
- Chang, H.-C. & Guarente, L. 2014. Sirt1 And Other Sirtuins In Metabolism. *Trends In Endocrinology & Metabolism* 25(3): 138–145.
- Chang, R. L., Stanley, J. A., Robinson, M. C., Sher, J. W., Li, Z., Chan, Y. A., Omdahl, A. R., Wattiez, R., Godzik, A. & Matallana - Surget, S. 2020. Protein Structure, Amino Acid Composition And Sequence Determine Proteome Vulnerability To Oxidation - Induced Damage. *The EMBO Journal* 39(23): E104523.
- Chang, Y., Wang, L.-B., Li, D., Lei, K. & Liu, S.-Y. 2017. Efficacy Of Rasagiline For The Treatment Of Parkinson's Disease: An Updated Meta-Analysis. *Annals Of Medicine* 49(5): 421–434.
- Chase, T. N., Oh, J. & Konitsiotis, S. 2000. Antiparkinsonian And Antidyskinetic Activity Of Drugs Targeting Central Glutamatergic Mechanisms. *Journal Of Neurology* 247: II36–II42.
- Cheignon, C. M., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C. & Collin, F. 2018. Oxidative Stress And The Amyloid Beta Peptide In Alzheimer's Disease. *Redox Biology* 14: 450–464.
- Chen, C., Weng, Y. H., Chien, K. Y., Lin, K., Yeh, T., Cheng, Y., Lu, C. & Wang, H. 2012. (G2019s) Lrrk2 Activates Mkk4-Jnk Pathway And Causes Degeneration Of Sn Dopaminergic Neurons In A Transgenic Mouse Model Of Pd. *Cell Death & Differentiation* 19(10): 1623–1633.
- Chen, C., Xun, P., Nishijo, M., Carter, S. & He, K. 2016a. Cadmium Exposure And Risk Of Prostate Cancer: A Meta-Analysis Of Cohort And Case-Control Studies Among The General And Occupational Populations. *Scientific Reports* 6(1): 25814.
- Chen, E. Y., Kallwitz, E., Leff, S. E., Cochran, E. J., Mufson, E. J., Kordower, J. H. & Mandel, R. J. 2000. Age - Related Decreases In Gtp - Cyclohydrolase - I Immunoreactive Neurons In The Monkey And Human Substantia Nigra. *Journal Of Comparative Neurology* 426(4): 534–548.

- Chen, S., Crack, P. J. & Taylor, J. M. 2025. The Contribution Of Type-I Ifn-Mediated Neuroinflammation To Parkinson's Disease Progression. *Brain, Behavior, & Immunity-Health*: 101017.
- Chen, W. W., Zhang, X. & Huang, W. J. 2016b. Role Of Neuroinflammation In Neurodegenerative Diseases. *Molecular Medicine Reports* 13(4): 3391–3396.
- Chen, Y., Azad, M. & Gibson, S. 2009a. Superoxide Is The Major Reactive Oxygen Species Regulating Autophagy. *Cell Death & Differentiation* 16(7): 1040–1052.
- Chen, Y., Holstein, D. M., Aime, S., Bollo, M. & Lechleiter, J. D. 2016c. Calcineurin B Protects Brain After Injury By Activating The Unfolded Protein Response. *Neurobiology Of Disease* 94: 139–156.
- Chen, Y.-C., Priyadarshini, M. & Panula, P. 2009b. Complementary Developmental Expression Of The Two Tyrosine Hydroxylase Transcripts In Zebrafish. *Histochemistry And Cell Biology* 132(4): 375–381.
- Chia, S. J., Tan, E.-K. & Chao, Y.-X. 2020. Historical Perspective: Models Of Parkinson's Disease. *International Journal Of Molecular Sciences* 21(7): 2464.
- Choi, J.-E. & Mostoslavsky, R. 2014. Sirtuins, Metabolism, And DNA Repair. *Current Opinion In Genetics & Development* 26: 24–32.
- Chouchani, E. T., Pell, V. R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S. Y., Robb, E. L., Logan, A., Nadtochiy, S. M., Ord, E. N. & Smith, A. C. 2014. Ischaemic Accumulation Of Succinate Controls Reperfusion Injury Through Mitochondrial Ros. *Nature* 515(7527): 431–435.
- Chu, Y., Kompoliti, K., Cochran, E. J., Mufson, E. J. & Kordower, J. H. 2002. Age - Related Decreases In Nurr1 Immunoreactivity In The Human Substantia Nigra. *Journal Of Comparative Neurology* 450(3): 203–214.
- Chu, Y., Muller, S., Tavares, A., Barret, O., Alagille, D., Seibyl, J., Tamagnan, G., Marek, K., Luk, K. C. & Trojanowski, J. Q. 2019. Intrastratial Alpha-Synuclein Fibrils In Monkeys: Spreading, Imaging And Neuropathological Changes. *Brain* 142(11): 3565–3579.
- Chung, I. Y. & Benveniste, E. N. 1990. Tumor Necrosis Factor-Alpha Production By Astrocytes. Induction By Lipopolysaccharide, Ifn-Gamma, And Il-1 Beta. *Journal Of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 144(8): 2999–3007.
- Chung, R. S., Adlard, P. A., Dittmann, J., Vickers, J. C., Chuah, M. I. & West, A. K. 2004. Neuron - Glia Communication: Metallothionein Expression Is Specifically Up - Regulated By Astrocytes In Response To Neuronal Injury. *Journal Of Neurochemistry* 88(2): 454–461.
- Chung, R. S., Penkowa, M., Dittmann, J., King, C. E., Bartlett, C., Asmussen, J. W., Hidalgo, J., Carrasco, J., Leung, Y. K. J. & Walker, A. K. 2008. Redefining The Role Of Metallothionein Within The Injured Brain: Extracellular

- Metallothioneins Play An Important Role In The Astrocyte-Neuron Response To Injury. *Journal Of Biological Chemistry* 283(22): 15349–15358.
- Cicero, C. E., Mostile, G., Vasta, R., Rapisarda, V., Santo Signorelli, S., Ferrante, M., Zappia, M. & Nicoletti, A. 2017. Metals And Neurodegenerative Diseases. A Systematic Review. *Environmental Research* 159: 82–94.
- Citron, B. A., Ameenuddin, S., Uchida, K., Suo, W. Z., Santacruz, K. & Festoff, B. W. 2016. Membrane Lipid Peroxidation In Neurodegeneration: Role Of Thrombin And Proteinase-Activated Receptor-1. *Brain Research* 1643: 10–17.
- Collier, T. J., Kanaan, N. M. & Kordower, J. H. 2017. Aging And Parkinson's Disease: Different Sides Of The Same Coin? *Movement Disorders* 32(7): 983–990.
- Collins, L. M., Toulouse, A., Connor, T. J. & Nolan, Y. M. 2012. Contributions Of Central And Systemic Inflammation To The Pathophysiology Of Parkinson's Disease. *Neuropharmacology* 62(7): 2154–2168.
- Collymore, C. 2020. Anesthesia, Analgesia, And Euthanasia Of The Laboratory Zebrafish. In (Ed.). *The Zebrafish In Biomedical Research*, Pp.403–413. Elsevier.
- Connolly, B. S. & Lang, A. E. 2014. Pharmacological Treatment Of Parkinson Disease: A Review. *Jama* 311(16): 1670–1683.
- Contassot, E., Beer, H.-D. & French, L. E. 2012. Interleukin-1, Inflammasomes, Autoinflammation And The Skin. *Swiss Medical Weekly* 142(2122): W13590–W13590.
- Cooper, C. A., Jain, N., Gallagher, M. D., Weintraub, D., Xie, S. X., Berlyand, Y., Espay, A. J., Quinn, J., Edwards, K. L. & Montine, T. 2017. Common Variant Rs356182 Near Snca Defines A Parkinson's Disease Endophenotype. *Annals Of Clinical And Translational Neurology* 4(1): 15–25.
- Cooper, G. M. 2000. Mitochondria. In (Ed.). 2. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd Edition*, Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Cooper, J. F. & Van Raamsdonk, J. M. 2018. Modeling Parkinson's Disease In C. Elegans. *Journal Of Parkinson's Disease* 8(1): 17–32.
- Cordiano, R., Di Gioacchino, M., Mangifesta, R., Panzera, C., Gangemi, S. & Minciullo, P. L. 2023. Malondialdehyde As A Potential Oxidative Stress Marker For Allergy-Oriented Diseases: An Update. *Molecules* 28(16): 5979.
- Costa, C., Miozzi, E., Teodoro, M., Briguglio, G., Rapisarda, V. & Fenga, C. 2017. New Insights On 'Old' toxicants In Occupational Toxicology. *Molecular Medicine Reports* 15(5): 3317–3322.
- Costa, M. I., Sarmiento-Ribeiro, A. B. & Gonçalves, A. C. 2023. Zinc: From Biological Functions To Therapeutic Potential. *International Journal Of Molecular Sciences* 24(5): 4822.

- Coyle, P., Philcox, J., Carey, L. & Roife, A. 2002. Metallothionein: The Multipurpose Protein. *Cellular And Molecular Life Sciences CMLS* 59: 627–647.
- Crichton, R. R. 2016. Metal Toxicity – An Introduction. 1 In (Ed.). *Metal Chelation In Medicine*, Pp.1–23.
- Cuadrado, A. & Nebreda, A. R. 2010. Mechanisms And Functions Of P38 Mapk Signalling. *Biochemical Journal* 429(3): 403–417.
- Cuoghi, B. & Mola, L. 2007. Microglia Of Teleosts: Facing A Challenge In Neurobiology. *European Journal Of Histochemistry* 51(4): 231–240.
- Dai, H., Wang, L., Li, L., Huang, Z. & Ye, L. 2021. Metallothionein 1: A New Spotlight On Inflammatory Diseases. *Frontiers In Immunology* 12: 739918.
- Dal Santo, G., De Veras, B. O., Rico, E., Dal Magro, J., Agostini, J. F., Vieira, L. D., Calisto, J. F. F., Mocelin, R., De Sá Fonseca, V. & Wanderley, A. G. 2021. Hexane Extract From *Spondias Mombin* L.(Anacardiaceae) Prevents Behavioral And Oxidative Status Changes On Model Of Parkinson's Disease In Zebrafish. *Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 241: 108953.
- Danbolt, N. C. 2001. Glutamate Uptake. *Progress In Neurobiology* 65(1): 1–105.
- Davis, C. N., Tabarean, I., Gaidarova, S., Behrens, M. M. & Bartfai, T. 2006. IL - 1 $\beta$  Induces A Myd88 - Dependent And Ceramide - Mediated Activation Of Src In Anterior Hypothalamic Neurons. *Journal Of Neurochemistry* 98(5): 1379–1389.
- Dawson, T. M., Ko, H. S. & Dawson, V. L. 2010. Genetic Animal Models Of Parkinson's Disease. *Neuron* 66(5): 646–661.
- De Araujo, F. M., Cuenca-Bermejo, L., Fernandez-Villalba, E., Costa, S. L., Silva, V. D. A. & Herrero, M. T. 2022. Role Of Microgliosis And Nlrp3 Inflammasome In Parkinson's Disease Pathogenesis And Therapy. *Cellular And Molecular Neurobiology* 42(5): 1283–1300.
- Deas, E., Cremades, N., Angelova, P. R., Ludtmann, M. H., Yao, Z., Chen, S., Horrocks, M. H., Banushi, B., Little, D. & Devine, M. J. 2016. Alpha-Synuclein Oligomers Interact With Metal Ions To Induce Oxidative Stress And Neuronal Death In Parkinson's Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 24(7): 376–391.
- Degli Esposti, M., Rugolo, M. & Lenaz, G. 1983. Inhibition Of The Mitochondrial Bc1 Complex By Dibromothymoquinone. *FEBS Letters* 156(1): 15–19.
- Delgado - Alvarado, M., Marano, M., Santurtún, A., Urriaga - Gallano, A., Tordesillas - Gutierrez, D. & Infante, J. 2020. Nonpharmacological, Nonsurgical Treatments For Freezing Of Gait In Parkinson's Disease: A Systematic Review. *Movement Disorders* 35(2): 204–214.

- Deng, H., Wang, P. & Jankovic, J. 2018. The Genetics Of Parkinson Disease. *Ageing Research Reviews* 42: 72–85.
- Devos, D., Labreuche, J., Rascol, O., Corvol, J.-C., Duhamel, A., Guyon Delannoy, P., Poewe, W., Compta, Y., Pavese, N. & Růžička, E. 2022. Trial Of Deferiprone In Parkinson's Disease. *New England Journal Of Medicine* 387(22): 2045–2055.
- Dexter, D. T. & Jenner, P. 2013. Parkinson Disease: From Pathology To Molecular Disease Mechanisms. *Free Radical Biology And Medicine* 62: 132–144.
- Dexter, D. T., Statton, S. A., Whitmore, C., Freinbichler, W., Weinberger, P., Tipton, K. F., Della Corte, L., Ward, R. J. & Crichton, R. R. 2011. Clinically Available Iron Chelators Induce Neuroprotection In The 6-OHda Model Of Parkinson's Disease After Peripheral Administration. *Journal Of Neural Transmission* 118: 223–231.
- Dezsi, L. & Vecsei, L. 2017. Monoamine Oxidase B Inhibitors In Parkinson's Disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)* 16(4): 425–439.
- Di Biase, L., Pecoraro, P. M., Carbone, S. P., Caminiti, M. L. & Di Lazzaro, V. 2023. Levodopa-Induced Dyskinesias In Parkinson's Disease: An Overview On Pathophysiology, Clinical Manifestations, Therapy Management Strategies And Future Directions. *Journal Of Clinical Medicine* 12(13): 4427.
- Di Monte, D., Sandy, M. S., Ekström, G. & Smith, M. T. 1986. Comparative Studies On The Mechanisms Of Paraquat And 1-Methyl-4-Phenylpyridine (Mpp<sup>+</sup>) Cytotoxicity. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 137(1): 303–309.
- Di Sante, G., Pestell, T. G., Casimiro, M. C., Bisetto, S., Powell, M. J., Lisanti, M. P., Cordon-Cardo, C., Castillo-Martin, M., Bonal, D. M. & Debattisti, V. 2015. Loss Of Sirt1 Promotes Prostatic Intraepithelial Neoplasia, Reduces Mitophagy, And Delays Park2 Translocation To Mitochondria. *The American Journal Of Pathology* 185(1): 266–279.
- Dias, N. & Bailly, C. 2005. Drugs Targeting Mitochondrial Functions To Control Tumor Cell Growth. *Biochemical Pharmacology* 70(1): 1–12.
- Dias, V., Junn, E. & Mouradian, M. M. 2013. The Role Of Oxidative Stress In Parkinson's Disease. *Journal Of Parkinson's Disease* 3(4): 461–491.
- Díaz, G., Lengele, L., Sourdet, S., Soriano, G. & De Souto Barreto, P. 2022. Nutrients And Amyloid B Status In The Brain: A Narrative Review. *Ageing Research Reviews* 81: 101728.
- Diaz, K., Kohut, M., Russell, D. & Stegemöller, E. 2022. Peripheral Inflammatory Cytokines And Motor Symptoms In Persons With Parkinson's Disease. *Brain, Behavior, & Immunity-Health* 21: 100442.

- Dietrich, J., Cella, M., Seiffert, M., BüHring, H.-J. R. & Colonna, M. 2000. Cutting Edge: Signal-Regulatory Protein B1 Is A Dap12-Associated Activating Receptor Expressed In Myeloid Cells. *The Journal Of Immunology* 164(1): 9–12.
- Digiacomo, M., Lam, P., Roberts, B. L., Lau, T. C., Song, R. & Davidson, P. M. 2010. Exploring The Reasons For Adherence To T'ai Chi Practice. *Journal Of Alternative And Complementary Medicine*:
- Dinarello, C. A. 2000. Proinflammatory Cytokines. *Chest* 118(2): 503–508.
- Dinarello, C. A. 2011. Interleukin-1 In The Pathogenesis And Treatment Of Inflammatory Diseases. *Blood, The Journal Of The American Society Of Hematology* 117(14): 3720–3732.
- Ding, R., Zhang, C., Zhu, X., Cheng, H., Zhu, F., Xu, Y., Liu, Y., Wen, L. & Cao, J. 2017. Ros-Akt-Mtor Axis Mediates Autophagy Of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced By Cooking Oil Fumes-Derived Fine Particulate Matters In Vitro. *Free Radical Biology And Medicine* 113: 452–460.
- Dodson, M., Wani, W. Y., Redmann, M., Benavides, G. A., Johnson, M. S., Ouyang, X., Cofield, S. S., Mitra, K., Darley-USmar, V. & Zhang, J. 2017. Regulation Of Autophagy, Mitochondrial Dynamics, And Cellular Bioenergetics By 4-Hydroxynonenal In Primary Neurons. *Autophagy* 13(11): 1828–1840.
- Dolgacheva, L. P., Berezhnov, A. V., Fedotova, E. I., Zinchenko, V. P. & Abramov, A. Y. 2019. Role Of Dj-1 In The Mechanism Of Pathogenesis Of Parkinson's Disease. *Journal Of Bioenergetics And Biomembranes* 51: 175–188.
- Dolinsky, V. W., Chan, A. Y., Robillard Frayne, I., Light, P. E., Des Rosiers, C. & Dyck, J. R. 2009. Resveratrol Prevents The Prohypertrophic Effects Of Oxidative Stress On Lkb1. *Circulation* 119(12): 1643–1652.
- Dongjie, S., Rajendran, R. S., Xia, Q., She, G., Tu, P., Zhang, Y. & Liu, K. 2022. Neuroprotective Effects Of Tongtian Oral Liquid, A Traditional Chinese Medicine In The Parkinson's Disease-Induced Zebrafish Model. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 148: 112706.
- Dorsey, E. A., Constantinescu, R., Thompson, J., Biglan, K., Holloway, R., Kieburtz, K., Marshall, F., Ravina, B., Schifitto, G. & Siderowf, A. 2007. Projected Number Of People With Parkinson Disease In The Most Populous Nations, 2005 Through 2030. *Neurology* 68(5): 384–386.
- Dorsey, E. R. & Bloem, B. R. 2018. The Parkinson Pandemic—A Call To Action. *JAMA Neurology* 75(1): 9–10.
- Dorszewska, J., Kowalska, M., Prendecki, M., Piekut, T., Kozłowska, J. & Kozubski, W. 2021. Oxidative Stress Factors In Parkinson's Disease. *Neural Regeneration Research* 16(7): 1383.

- Doyle, J. M. & Croll, R. P. 2022. A Critical Review Of Zebrafish Models Of Parkinson's Disease. *Frontiers In Pharmacology* 13: 835827.
- Driver, J. A., Logroscino, G., Lu, L., Gaziano, J. M. & Kurth, T. 2011. Use Of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs And Risk Of Parkinson's Disease: Nested Case-Control Study. *Bmj* 342:
- Drolet, R. E., Sanders, J. M. & Kern, J. T. 2011. Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (Lrrk2) Cellular Biology: A Review Of Recent Advances In Identifying Physiological Substrates And Cellular Functions. *Journal Of Neurogenetics* 25(4): 140–151.
- Dryden, S. C., Nahhas, F. A., Nowak, J. E., Goustin, A.-S. & Tainsky, M. A. 2003. Role For Human Sirt2 Nad-Dependent Deacetylase Activity In Control Of Mitotic Exit In The Cell Cycle. *Molecular And Cellular Biology* 23(9): 3173–3185.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. 2000. Smac, A Mitochondrial Protein That Promotes Cytochrome C-Dependent Caspase Activation By Eliminating Iap Inhibition. *Cell* 102(1): 33–42.
- Du, Y. & Graves, S. M. 2019. Spiny Projection Neuron Dynamics In Toxin And Transgenic Models Of Parkinson's Disease. *Frontiers In Neural Circuits* 13: 17.
- Du, Y., Guo, Q., Shan, M., Wu, Y., Huang, S., Zhao, H., Hong, H., Yang, M., Yang, X. & Ren, L. 2016. Spatial And Temporal Distribution Of Dopaminergic Neurons During Development In Zebrafish. *Frontiers In Neuroanatomy* 10: 115.
- Duan, X., Tong, J., Xu, Q., Wu, Y., Cai, F., Li, T. & Song, W. 2014. Upregulation Of Human Pink1 Gene Expression By Nfkb Signalling. *Molecular Brain* 7(1): 1–10.
- Dufek, M., Hamaňová, M., Lokaj, J., Goldemund, D., Rektorová, I., Michálková, Z., Sheardová, K. & Rektor, I. 2009. Serum Inflammatory Biomarkers In Parkinson's Disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 15(4): 318–320.
- Dumitriu, A., Golji, J., Labadorf, A. T., Gao, B., Beach, T. G., Myers, R. H., Longo, K. A. & Latourelle, J. C. 2015. Integrative Analyses Of Proteomics And Rna Transcriptomics Implicate Mitochondrial Processes, Protein Folding Pathways And Gwas Loci In Parkinson Disease. *BMC Medical Genomics* 9(1): 5.
- Duncan, G. W., Khoo, T. K., Yarnall, A. J., O'brien, J. T., Coleman, S. Y., Brooks, D. J., Barker, R. A. & Burn, D. J. 2014. Health - Related Quality Of Life In Early Parkinson's Disease: The Impact Of Nonmotor Symptoms. *Movement Disorders* 29(2): 195–202.
- Duncan, K. E. R. & Stillman, M. J. 2006. Metal-Dependent Protein Folding: Metallation Of Metallothionein. *Journal Of Inorganic Biochemistry* 100(12): 2101–2107.
- Dutsch-Wicherek, M., Sikora, J. & Tomaszewska, R. 2008. The Possible Biological Role Of Metallothionein In Apoptosis. *Front Biosci* 13(9): 4029–4038.

- Dutta, R. & Trapp, B. D. 2011. Mechanisms Of Neuronal Dysfunction And Degeneration In Multiple Sclerosis. *Progress In Neurobiology* 93(1): 1–12.
- Dziegiel, P. 2004. Expression Of Metallothioneins In Tumor Cells. *Polish Journal Of Pathology* 55(1): 3–12.
- East, D. A., Fagiani, F., Crosby, J., Georgakopoulos, N. D., Bertrand, H., Schaap, M., Fowkes, A., Wells, G. & Campanella, M. 2014. Pmi: A  $\Delta\psi$ m Independent Pharmacological Regulator Of Mitophagy. *Chemistry & Biology* 21(11): 1585–1596.
- Ebrahimi-Fakhari, D., Saffari, A., Wahlster, L. & Sahin, M. 2017. Using Tuberos Sclerosis Complex To Understand The Impact Of Mtorc1 Signaling On Mitochondrial Dynamics And Mitophagy In Neurons. *Autophagy* 13(4): 754–756.
- Eibl, J. K., Abdallah, Z. & Ross, G. M. 2010. Zinc–Metallothionein: A Potential Mediator Of Antioxidant Defence Mechanisms In Response To Dopamine-Induced Stress. *Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology* 88(3): 305–312.
- Ekstrand, M. I., Terzioglu, M., Galter, D., Zhu, S., Hofstetter, C., Lindqvist, E., Thams, S., Bergstrand, A., Hansson, F. S. & Trifunovic, A. 2007. Progressive Parkinsonism In Mice With Respiratory-Chain-Deficient Dopamine Neurons. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 104(4): 1325–1330.
- El-Kattan, M. M., Rashed, L. A., Shazly, S. R. & Ismail, R. S. 2022. Relation Of Serum Level Of Tumor Necrosis Factor-Alpha To Cognitive Functions In Patients With Parkinson's Disease. *The Egyptian Journal Of Neurology, Psychiatry And Neurosurgery* 58(1): 1–7.
- Elbaz, A., Carcaillon, L., Kab, S. & Moisan, F. 2016. Epidemiology Of Parkinson's Disease. *Revue Neurologique* 172(1): 14–26.
- Elbaz, A., Clavel, J., Rathouz, P. J., Moisan, F., Galanaud, J. P., Delemotte, B., Alperovitch, A. & Tzourio, C. 2009. Professional Exposure To Pesticides And Parkinson Disease. *Annals Of Neurology* 66(4): 494–504.
- Elesawy, W. H., El-Sahar, A. E., Sayed, R. H., Ashour, A. M., Alsufyani, S. E., Arab, H. H. & Kandil, E. A. 2024. Repurposing Ezetimibe As A Neuroprotective Agent In A Rotenone-Induced Parkinson's Disease Model In Rats: Role Of Ampk/Sirt-1/Pgc-1 $\alpha$  Signaling And Autophagy. *International Immunopharmacology* 138: 112640.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review Of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35(4): 495–516.
- Erta, M., Quintana, A. & Hidalgo, J. 2012. Interleukin-6, A Major Cytokine In The Central Nervous System. *International Journal Of Biological Sciences* 8(9): 1254.

- Fan, Z., Pan, Y.-T., Zhang, Z.-Y., Yang, H., Yu, S.-Y., Zheng, Y., Ma, J.-H. & Wang, X.-M. 2020. Systemic Activation Of Nlrp3 Inflammasome And Plasma A-Synuclein Levels Are Correlated With Motor Severity And Progression In Parkinson's Disease. *Journal Of Neuroinflammation* 17: 1–10.
- Fao, L., Mota, S. I. & Rego, A. C. 2019. Shaping The Nrf2-Are-Related Pathways In Alzheimer's And Parkinson's Diseases. *Ageing Research Reviews* 54: 100942.
- Faucheux, B. A., Agid, Y., Hirsch, E. C. & Bonnet, A.-M. 1999. Blood Vessels Change In The Mesencephalon Of Patients With Parkinson's Disease. *The Lancet* 353(9157): 981–982.
- Fearnley, J. M. & Lees, A. J. 1991. Ageing And Parkinson's Disease: Substantia Nigra Regional Selectivity. *Brain* 114(5): 2283–2301.
- Febbraro, F., Andersen, K. J., Sanchez-Guajardo, V., Tentillier, N. & Romero-Ramos, M. 2013. Chronic Intranasal Deferoxamine Ameliorates Motor Defects And Pathology In The A-Synuclein Raav Parkinson's Model. *Experimental Neurology* 247: 45–58.
- Feng, J. 2006. Microtubule: A Common Target For Parkin And Parkinson's Disease Toxins. *The Neuroscientist* 12(6): 469–476.
- Ferrari, C. C., Godoy, M. C. P., Tarelli, R., Chertoff, M., Depino, A. M. & Pitossi, F. J. 2006. Progressive Neurodegeneration And Motor Disabilities Induced By Chronic Expression Of Il-1 $\beta$  In The Substantia Nigra. *Neurobiology Of Disease* 24(1): 183–193.
- Ferrari, D., Bortolanza, M. & Del Bel, E. 2021. Interferon- $\Gamma$  Involvement In The Neuroinflammation Associated With Parkinson's Disease And L-Dopa-Induced Dyskinesia. *Neurotoxicity Research* 39: 705–719.
- Ferrari, F. & Villa, R. F. 2017. The Neurobiology Of Depression: An Integrated Overview From Biological Theories To Clinical Evidence. *Molecular Neurobiology* 54(7): 4847–4865.
- Ferreira, S. A. & Romero-Ramos, M. 2018. Microglia Response During Parkinson's Disease: Alpha-Synuclein Intervention. *Frontiers In Cellular Neuroscience* 12: 247.
- Fifel, K. 2013. Alterations Of The Circadian Timing System In Rodent And Non Human Primate Models Of Parkinson's Disease. Université Claude Bernard-Lyon I,
- Figura, M., Kuśmierska, K., Bucior, E., Szlufik, S., Koziorowski, D., Jamrozik, Z. & Janik, P. 2018. Serum Amino Acid Profile In Patients With Parkinson's Disease. *PLoS One* 13(1): E0191670.
- Finkel, T., Deng, C.-X. & Mostoslavsky, R. 2009. Recent Progress In The Biology And Physiology Of Sirtuins. *Nature* 460(7255): 587–591.

- Fleischer, A., Duhamel, M., Lopez-Fernandez, L. A., Muñoz, M., Rebollo, M. P., Alvarez-Franco, F. & Rebollo, A. 2007. Cascade Of Transcriptional Induction And Repression During Il-2 Deprivation-Induced Apoptosis. *Immunology Letters* 112(1): 9–29.
- Fleming, A., Diekmann, H. & Goldsmith, P. 2013. Functional Characterisation Of The Maturation Of The Blood-Brain Barrier In Larval Zebrafish. *PLoS One* 8(10): E77548.
- Fleury, C., Mignotte, B. & Vayssière, J.-L. 2002. Mitochondrial Reactive Oxygen Species In Cell Death Signaling. *Biochimie* 84(2-3): 131–141.
- Flinn, L. J., Keatinge, M., Breaud, S., Mortiboys, H., Matsui, H., De Felice, E., Woodroof, H. I., Brown, L., Mctighe, A. & Soellner, R. 2013. Tigarb Causes Mitochondrial Dysfunction And Neuronal Loss In Pink1 Deficiency. *Annals Of Neurology* 74(6): 837–847.
- Fontana, B. D., Mezzomo, N. J., Kalueff, A. V. & Rosemberg, D. B. 2018. The Developing Utility Of Zebrafish Models Of Neurological And Neuropsychiatric Disorders: A Critical Review. *Experimental Neurology* 299: 157–171.
- Fontana, D., Mauri, M., Renso, R., Docci, M., Crespiatico, I., Røst, L. M., Jang, M., Niro, A., D'aliberti, D. & Massimino, L. 2020. Etnk1 Mutations Induce A Mutator Phenotype That Can Be Reverted With Phosphoethanolamine. *Nature Communications* 11(1): 5938.
- Foret, M. K., Do Carmo, S., Lincoln, R., Greene, L. E., Zhang, W., Cuello, A. C. & Cosa, G. 2019. Effect Of Antioxidant Supplements On Lipid Peroxidation Levels In Primary Cortical Neuron Cultures. *Free Radical Biology And Medicine* 130: 471–477.
- Franceschi, C., Bonafe, M. & Valensin, S. 2000. Human Immunosenescence: The Prevailing Of Innate Immunity, The Failing Of Clonotypic Immunity, And The Filling Of Immunological Space. *Vaccine* 18(16): 1717–1720.
- Franceschi, C., Valensin, S., Fagnoni, F., Barbi, C. & Bonafè, M. 1999. Biomarkers Of Immunosenescence Within An Evolutionary Perspective: The Challenge Of Heterogeneity And The Role Of Antigenic Load. *Experimental Gerontology* 34(8): 911–921.
- Franco-Iborra, S., Vila, M. & Perier, C. 2016. The Parkinson Disease Mitochondrial Hypothesis: Where Are We At? *The Neuroscientist* 22(3): 266–277.
- Frank, M., Duvezin-Caubet, S., Koob, S., Occhipinti, A., Jagasia, R., Petcherski, A., Ruonala, M. O., Priault, M., Salin, B. & Reichert, A. S. 2012. Mitophagy Is Triggered By Mild Oxidative Stress In A Mitochondrial Fission Dependent Manner. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1823(12): 2297–2310.

- Fridovich, I. 1999. Fundamental Aspects Of Reactive Oxygen Species, Or What's The Matter With Oxygen? *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 893(1): 13–18.
- Fruehauf, J. P. & Meyskens Jr, F. L. 2007. Reactive Oxygen Species: A Breath Of Life Or Death? *Clinical Cancer Research* 13(3): 789–794.
- Fu, J., Chen, S., Liu, J., Yang, J., Ou, R., Zhang, L., Chen, X. & Shang, H. 2023. Serum Inflammatory Cytokines Levels And The Correlation Analyses In Parkinson's Disease. *Frontiers In Cell And Developmental Biology* 11: 1104393.
- Fulda, S., Meyer, E., Friesen, C., Susin, S. A., Kroemer, G. & Debatin, K.-M. 2001. Cell Type Specific Involvement Of Death Receptor And Mitochondrial Pathways In Drug-Induced Apoptosis. *Oncogene* 20(9): 1063–1075.
- Fyfe, I. 2020. Aspirin And Ibuprofen Could Lower Risk Of Lrrk2 Parkinson Disease. *Nature Reviews Neurology* 16(9): 460–460.
- Gahring, L. C., Carlson, N. G., Kulmer, R. A. & Rogers, S. W. 1996. Neuronal Expression Of Tumor Necrosis Factor Alpha In The Olfactory Bulb Brain. *Neuroimmunomodulation* 3(5): 289–303.
- Galiano-Landeira, J., Torra, A., Vila, M. & Bove, J. 2020. Cd8 T Cell Nigral Infiltration Precedes Synucleinopathy In Early Stages Of Parkinson's Disease. *Brain* 143(12): 3717–3733.
- Gan, Z. Y., Callegari, S., Cobbold, S. A., Cotton, T. R., Mlodzianoski, M. J., Schubert, A. F., Geoghegan, N. D., Rogers, K. L., Leis, A. & Dawson, G. 2022. Activation Mechanism Of Pink1. *Nature* 602(7896): 328–335.
- Gao, H., Yang, W., Qi, Z., Lu, L., Duan, C., Zhao, C. & Yang, H. 2012. Dj-1 Protects Dopaminergic Neurons Against Rotenone-Induced Apoptosis By Enhancing Erk-Dependent Mitophagy. *Journal Of Molecular Biology* 423(2): 232–248.
- Gao, L., Shi, C., Lin, Q., Wu, Y., Hu, L., Wang, M., Guan, J., Lin, S., Liao, Y. & Wu, C. 2022a. Case Report: A Case Of Pla2g6 Gene-Related Early-Onset Parkinson's Disease And Review Of Literature. *Frontiers In Neuroscience* 16: 1064566.
- Gao, X., Chen, H., Schwarzschild, M. A. & Ascherio, A. 2011. Use Of Ibuprofen And Risk Of Parkinson Disease. *Neurology* 76(10): 863–869.
- Gao, X.-Y., Yang, T., Gu, Y. & Sun, X.-H. 2022b. Mitochondrial Dysfunction In Parkinson's Disease: From Mechanistic Insights To Therapy. *Frontiers In Aging Neuroscience* 14: 885500.
- García-Flores, L. A., Medina, S., Cejuela, R., Martínez-Sanz, J. M., Oger, C., Galano, J.-M., Durand, T., Casas-Pina, T., Martínez-Hernández, P. & Ferreres, F. 2016. Assessment Of Oxidative Stress Biomarkers—Neuroprostanes And Dihomo-Isoprostanes—In The Urine Of Elite Triathletes After Two Weeks Of Moderate-Altitude Training. *Free Radical Research* 50(5): 485–494.

- García-García, F., Ponce, S., Brown, R., Cussen, V. & Krueger, J. M. 2005. Sleep Disturbances In The Rotenone Animal Model Of Parkinson Disease. *Brain Research* 1042(2): 160–168.
- Garza-Lombó, C., Posadas, Y., Quintanar, L., Gonsebatt, M. E. & Franco, R. 2018. Neurotoxicity Linked To Dysfunctional Metal Ion Homeostasis And Xenobiotic Metal Exposure: Redox Signaling And Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 28(18): 1669–1703.
- Gautam, D., Naik, U. P., Naik, M. U., Yadav, S. K., Chaurasia, R. N. & Dash, D. 2023. Glutamate Receptor Dysregulation And Platelet Glutamate Dynamics In Alzheimer's And Parkinson's Diseases: Insights Into Current Medications. *Biomolecules* 13(11): 1609.
- Genet, N. 2013. Analysis Of Immune-Related Loci Identifies 48 New Susceptibility Variants For Multiple Sclerosis. *Nat Genet* 45(11): 1353–1360.
- Genoud, S., Roberts, B. R., Gunn, A. P., Halliday, G. M., Lewis, S. J., Ball, H. J., Hare, D. J. & Double, K. L. 2017. Subcellular Compartmentalisation Of Copper, Iron, Manganese, And Zinc In The Parkinson's Disease Brain. *Metallomics* 9(10): 1447–1455.
- Georgiev, D., Hamberg, K., Hariz, M., Forsgren, L. & Hariz, G. M. 2017. Gender Differences In Parkinson's Disease: A Clinical Perspective. *Acta Neurologica Scandinavica* 136(6): 570–584.
- Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, R. B. & Brooks, D. J. 2006. In Vivo Imaging Of Microglial Activation With [<sup>11</sup>C](R)-Pk11195 Pet In Idiopathic Parkinson's Disease. *Neurobiology Of Disease* 21(2): 404–412.
- Gershanik, O. S. 2015. Improving L - Dopa Therapy: The Development Of Enzyme Inhibitors. *Movement Disorders* 30(1): 103–113.
- Ghassaban, K., He, N., Sethi, S. K., Huang, P., Chen, S., Yan, F. & Haacke, E. M. 2019. Regional High Iron In The Substantia Nigra Differentiates Parkinson's Disease Patients From Healthy Controls. *Frontiers In Aging Neuroscience* 11: 106.
- Ghosh, D., Mondal, M., Mohite, G. M., Singh, P. K., Ranjan, P., Anoop, A., Ghosh, S., Jha, N. N., Kumar, A. & Maji, S. K. 2013. The Parkinson's Disease-Associated H50q Mutation Accelerates A-Synuclein Aggregation In Vitro. *Biochemistry* 52(40): 6925–6927.
- Ghosh, M. C., Mondal, A. C., Basu, S., Banerjee, S., Majumder, J., Bhattacharya, D. & Dasgupta, P. S. 2003. Dopamine Inhibits Cytokine Release And Expression Of Tyrosine Kinases, Lck And Fyn In Activated T Cells. *International Immunopharmacology* 3(7): 1019–1026.
- Gijbels, K. & Billiau, A. 1992. Interleukin 6: General Biological Properties And Possible Role In The Neural And Endocrine Systems. *Advances In Neuroimmunology* 2(2): 83–97.

- Gill, S. S. & Tuteja, N. 2010. Reactive Oxygen Species And Antioxidant Machinery In Abiotic Stress Tolerance In Crop Plants. *Plant Physiology And Biochemistry* 48(12): 909–930.
- Gillies, G. E., Pienaar, I. S., Vohra, S. & Qamhawi, Z. 2014. Sex Differences In Parkinson's Disease. *Frontiers In Neuroendocrinology* 35(3): 370–384.
- Giralt, M., Penkowa, M., Lago, N., Molinero, A. & Hidalgo, J. 2002. Metallothionein-1+ 2 Protect The Cns After A Focal Brain Injury. *Experimental Neurology* 173(1): 114–128.
- Glaab, E. & Schneider, R. 2015. Comparative Pathway And Network Analysis Of Brain Transcriptome Changes During Adult Aging And In Parkinson's Disease. *Neurobiology Of Disease* 74:
- Gobbi, L. T., Oliveira-Ferreira, M. D., Caetano, M. J. D., Lirani-Silva, E., Barbieri, F. A., Stella, F. & Gobbi, S. 2009. Exercise Programs Improve Mobility And Balance In People With Parkinson's Disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 15: S49–S52.
- Godoy, R., Hua, K., Kalyn, M., Cusson, V.-M., Anisman, H. & Ekker, M. 2020. Dopaminergic Neurons Regenerate Following Chemogenetic Ablation In The Olfactory Bulb Of Adult Zebrafish (*Danio Rerio*). *Scientific Reports* 10(1): 12825.
- Goedert, M., Jakes, R. & Spillantini, M. G. 2017. The Synucleinopathies: Twenty Years On. *Journal Of Parkinson's Disease* 7(S1): S51–S69.
- Gohil, V. M., Offner, N., Walker, J. A., Sheth, S. A., Fossale, E., Gusella, J. F., Macdonald, M. E., Neri, C. & Mootha, V. K. 2011. Meclizine Is Neuroprotective In Models Of Huntington's Disease. *Human Molecular Genetics* 20(2): 294–300.
- Gohil, V. M., Zhu, L., Baker, C. D., Cracan, V., Yaseen, A., Jain, M., Clish, C. B., Brookes, P. S., Bakovic, M. & Mootha, V. K. 2013. Meclizine Inhibits Mitochondrial Respiration Through Direct Targeting Of Cytosolic Phosphoethanolamine Metabolism. *Journal Of Biological Chemistry* 288(49): 35387–35395.
- Goldstein, D. S., Jinsmaa, Y., Sullivan, P., Holmes, C., Kopin, I. J. & Sharabi, Y. 2016. Comparison Of Monoamine Oxidase Inhibitors In Decreasing Production Of The Autotoxic Dopamine Metabolite 3, 4-Dihydroxyphenylacetaldehyde In Pc12 Cells. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 356(2): 483–492.
- Gonzalez-Alcocer, A., Duarte-Jurado, A. P., Soto-Dominguez, A., Loera-Arias, M. D. J., Villarreal-Silva, E. E., Saucedo-Cardenas, O., De Oca-Luna, R. M., Garcia-Garcia, A. & Rodriguez-Rocha, H. 2023. Unscrambling The Role Of Redox-Active Biometals In Dopaminergic Neuronal Death And Promising Metal Chelation-Based Therapy For Parkinson's Disease. *International Journal Of Molecular Sciences* 24(2): 1256.

- Gonzalez-Hunt, C. P., Luz, A. L., Ryde, I. T., Turner, E. A., Ilkayeva, O. R., Bhatt, D. P., Hirschev, M. D. & Meyer, J. N. 2021. Multiple Metabolic Changes Mediate The Response Of *Caenorhabditis Elegans* To The Complex I Inhibitor Rotenone. *Toxicology* 447: 152630.
- Goo, H.-G., Jung, M. K., Han, S. S., Rhim, H. & Kang, S. 2013. Htra2/Omi Deficiency Causes Damage And Mutation Of Mitochondrial DNA. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1833(8): 1866–1875.
- Goronzy, J. J., Li, G., Yang, Z. & Weyand, C. M. 2013. The Janus Head Of T Cell Aging—Autoimmunity And Immunodeficiency. *Frontiers In Immunology* 4: 131.
- Goswami, P., Joshi, N. & Singh, S. 2017. Neurodegenerative Signaling Factors And Mechanisms In Parkinson's Pathology. *Toxicology In Vitro* 43: 104–112.
- Götz, M. E., Double, K., Gerlach, M., Youdim, M. B. & Riederer, P. 2004. The Relevance Of Iron In The Pathogenesis Of Parkinson's Disease. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 1012(1): 193–208.
- Gröger, A., Kolb, R., Schäfer, R. & Klose, U. 2014. Dopamine Reduction In The Substantia Nigra Of Parkinson's Disease Patients Confirmed By In Vivo Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging. *PLoS One* 9(1): E84081.
- Gromadzka, G., Tarnacka, B., Flaga, A. & Adamczyk, A. 2020. Copper Dyshomeostasis In Neurodegenerative Diseases—Therapeutic Implications. *International Journal Of Molecular Sciences* 21(23): 9259.
- Gronich, N., Abernethy, D. R., Auriel, E., Lavi, I., Rennert, G. & Saliba, W. 2018. B2 - Adrenoceptor Agonists And Antagonists And Risk Of Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 33(9): 1465–1471.
- Gruden, M. A., Yanamandra, K., Kucheryanu, V. G., Bocharova, O. R., Sherstnev, V. V., Morozova-Roche, L. A. & Sewell, R. D. 2012. Correlation Between Protective Immunity To A-Synuclein Aggregates, Oxidative Stress And Inflammation. *Neuroimmunomodulation* 19(6): 334–342.
- Gu, C., Wang, F., Zhang, Y. T., Wei, S. Z., Liu, J. Y., Sun, H. Y., Wang, G. H. & Liu, C. F. 2021. Microglial Mtl Activation Inhibits Lps - Induced Neuroinflammation Via Regulation Of Metabolic Reprogramming. *Aging Cell* 20(6): E13375.
- Gu, J., Huang, X., Zhang, Y., Bao, C., Zhou, Z., Tong, H. & Jin, J. 2022. Cerebrospinal Fluid Interleukin-6 Is A Potential Diagnostic Biomarker For Central Nervous System Involvement In Adult Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers In Oncology* 12: 1013781.
- Guan, C., Zou, X., Shi, W., Gao, J., Yang, C., Ge, Y., Xu, Z., Bi, S. & Zhong, X. 2025. Metallothionein 1b Attenuates Inflammation And Hepatic Steatosis In Mash By Inhibiting The Akt/Pi3k Pathway. *Journal Of Lipid Research* 66(1): 100701.

- Guarente, L. 2013. Calorie Restriction And Sirtuins Revisited. *Genes & Development* 27(19): 2072–2085.
- Guella, I., Evans, D. M., Szu - Tu, C., Nosova, E., Bortnick, S. F., Group, S. C. S., Goldman, J. G., Dalrymple - Alford, J. C., Geurtsen, G. J. & Litvan, I. 2016. A - Synuclein Genetic Variability: A Biomarker For Dementia In Parkinson Disease. *Annals Of Neurology* 79(6): 991–999.
- Gulati, K., Guhathakurta, S., Joshi, J., Rai, N. & Ray, A. 2016. Cytokines And Their Role In Health And Disease: A Brief Overview. *Moj Immunol* 4(2): 00121.
- Gupta, R. C., Mukherjee, I. R. M., Malik, J. K., Doss, R. B., Dettbarn, W.-D. & Milatovic, D. 2019. Insecticides. In (Ed.). *Biomarkers In Toxicology*, Pp.455–475. Elsevier.
- Guzman, J. N., Sanchez-Padilla, J., Wokosin, D., Kondapalli, J., Ilijic, E., Schumacker, P. T. & Surmeier, D. J. 2010. Oxidant Stress Evoked By Pacemaking In Dopaminergic Neurons Is Attenuated By Dj-1. *Nature* 468(7324): 696–700.
- Haaxma, C. A., Bloem, B. R., Borm, G. F., Oyen, W. J., Leenders, K. L., Eshuis, S., Booij, J., Dluzen, D. E. & Horstink, M. W. 2007. Gender Differences In Parkinson's Disease. *Journal Of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 78(8): 819–824.
- Haberzettl, P. & Hill, B. G. 2013. Oxidized Lipids Activate Autophagy In A Jnk-Dependent Manner By Stimulating The Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Redox Biology* 1(1): 56–64.
- Haddad, D. & Nakamura, K. 2015. Understanding The Susceptibility Of Dopamine Neurons To Mitochondrial Stressors In Parkinson's Disease. *FEBS Letters* 589(24): 3702–3713.
- Hahn, S. H., Yoo, O. J. & Gahl, W. A. 2001. Effect Of Metal Ions On The Stability Of Metallothionein In The Degradation By Cellular Fractions In Vitro. *Experimental & Molecular Medicine* 33(1): 32–36.
- Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., Pramodh, S., Alsulimani, A., Alkhanani, M. F. & Harakeh, S. 2022. Oxidative Stress In Human Pathology And Aging: Molecular Mechanisms And Perspectives. *Cells* 11(3): 552.
- Halliday, G., Lees, A. & Stern, M. 2011. Milestones In Parkinson's Disease—Clinical And Pathologic Features. *Movement Disorders* 26(6): 1015–1021.
- Halliday, G. M. & Stevens, C. H. 2011. Glia: Initiators And Progressors Of Pathology In Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 26(1): 6–17.
- Han, S., Lin, F., Qi, Y., Liu, C., Zhou, L., Xia, Y., Chen, K., Xing, J., Liu, Z. & Yu, W. 2022. Ho - 1 Contributes To Luteolin - Triggered Ferroptosis In Clear Cell Renal Cell Carcinoma Via Increasing The Labile Iron Pool And Promoting

- Lipid Peroxidation. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity* 2022(1): 3846217.
- Han, Y., Ishibashi, S., Iglesias-Gonzalez, J., Chen, Y., Love, N. R. & Amaya, E. 2018. Ca<sup>2+</sup>-Induced Mitochondrial ROS Regulate The Early Embryonic Cell Cycle. *Cell Reports* 22(1): 218–231.
- Hargis, K. E. & Blalock, E. M. 2017. Transcriptional Signatures Of Brain Aging And Alzheimer's Disease: What Are Our Rodent Models Telling Us? *Behavioural Brain Research* 322: 311–328.
- Harms, A. S., Cao, S., Rowse, A. L., Thome, A. D., Li, X., Mangieri, L. R., Cron, R. Q., Shacka, J. J., Raman, C. & Standaert, D. G. 2013. Mhcii Is Required For A-Synuclein-Induced Activation Of Microglia, Cd4 T Cell Proliferation, And Dopaminergic Neurodegeneration. *Journal Of Neuroscience* 33(23): 9592–9600.
- Harms, A. S., Ferreira, S. A. & Romero-Ramos, M. 2021. Periphery And Brain, Innate And Adaptive Immunity In Parkinson's Disease. *Acta Neuropathologica* 141(4): 527–545.
- Hasegawa, M., Nonaka, T. & Masuda-Suzukake, M. 2016. A-Synuclein: Experimental Pathology. *Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine* 6(9): A024273.
- Hassandarvish, M. 2019. Malaysian Parkinson's Disease Patients Expected To Rise Fivefold — Here's What You Need To Know. *Malay Mail*,
- Haure-Mirande, J.-V., Wang, M., Audrain, M., Fanutza, T., Kim, S. H., Heja, S., Readhead, B., Dudley, J. T., Blitzer, R. D. & Schadt, E. E. 2019. Integrative Approach To Sporadic Alzheimer's Disease: Deficiency Of Tyrobp In Cerebral A $\beta$  Amyloidosis Mouse Normalizes Clinical Phenotype And Complement Subnetwork Molecular Pathology Without Reducing A $\beta$  Burden. *Molecular Psychiatry* 24(3): 431–446.
- Hauser, R. A., Li, R., Pérez, A., Ren, X., Weintraub, D., Elm, J., Goudreau, J. L., Morgan, J. C., Fang, J. Y. & Aminoff, M. J. 2017. Longer Duration Of Mao-B Inhibitor Exposure Is Associated With Less Clinical Decline In Parkinson's Disease: An Analysis Of Net-Pd Ls1. *Journal Of Parkinson's Disease* 7(1): 117–127.
- Hawk, M. A., Gorsuch, C. L., Fagan, P., Lee, C., Kim, S. E., Hamann, J. C., Mason, J. A., Weigel, K. J., Tsegaye, M. A. & Shen, L. 2018. Ripk1-Mediated Induction Of Mitophagy Compromises The Viability Of Extracellular-Matrix-Detached Cells. *Nature Cell Biology* 20(3): 272–284.
- Haworth, S. & Henderson, E. J. 2024. Drug Treatment Of Parkinson's Disease In Older Adults. *Medicine* 52(11): 701–705.
- Hayes, M. T. 2019. Parkinson's Disease And Parkinsonism. *The American Journal Of Medicine* 132(7): 802–807.

- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T. & Ma, X. 2017. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis By Elimination Of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology And Biochemistry* 44(2): 532–553.
- He, Y., She, H., Zhang, T., Xu, H., Cheng, L., Yepes, M., Zhao, Y. & Mao, Z. 2018. P38 Mapk Inhibits Autophagy And Promotes Microglial Inflammatory Responses By Phosphorylating Ulk1. *Journal Of Cell Biology* 217(1): 315–328.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G. & Schaper, F. 2003. Principles Of Interleukin (Il)-6-Type Cytokine Signalling And Its Regulation. *Biochemical Journal* 374(1): 1–20.
- Hernandez, D. G., Reed, X. & Singleton, A. B. 2016. Genetics In Parkinson Disease: Mendelian Versus Non - Mendelian Inheritance. *Journal Of Neurochemistry* 139: 59–74.
- Herpe, L., Aminot, M. & Pichaud, N. 2026. When Alternative Becomes Essential: The Role Of Mitochondrial Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 123(9): E2535701123.
- Hettiarachchi, P., Niyangoda, S. S., Jarosova, R. & Johnson, M. A. 2022. Dopamine Release Impairments Accompany Locomotor And Cognitive Deficiencies In Rotenone-Treated Parkinson's Disease Model Zebrafish. *Chemical Research In Toxicology* 35(11): 1974–1982.
- Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L. & El Khoury, J. 2018. Microglia In Neurodegeneration. *Nature Neuroscience* 21(10): 1359–1369.
- Higgins Jr, D. S. & Greenamyre, J. T. 1996. [3h] Dihydrorotenone Binding To Nadh: Ubiquinone Reductase (Complex I) Of The Electron Transport Chain: An Autoradiographic Study. *Journal Of Neuroscience* 16(12): 3807–3816.
- Hinarejos, I., Machuca, C., Sancho, P. & Espinós, C. 2020. Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress And Neuroinflammation In Neurodegeneration With Brain Iron Accumulation (Nbia). *Antioxidants* 9(10): 1020.
- Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., Nakajima, K., Pyun, K. H. & Kishimoto, T. 1985. Purification To Homogeneity And Characterization Of Human B-Cell Differentiation Factor (Bcdf Or Bsfp-2). *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 82(16): 5490–5494.
- Hirota, Y., Yamashita, S.-I., Kurihara, Y., Jin, X., Aihara, M., Saigusa, T., Kang, D. & Kanki, T. 2015. Mitophagy Is Primarily Due To Alternative Autophagy And Requires The Mapk1 And Mapk14 Signaling Pathways. *Autophagy* 11(2): 332–343.
- Hirsch, E. C. & Hunot, S. 2009. Neuroinflammation In Parkinson's Disease: A Target For Neuroprotection? *The Lancet Neurology* 8(4): 382–397.
- Hirsch, E. C., Vyas, S. & Hunot, S. 2012. Neuroinflammation In Parkinson's Disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 18: S210–S212.

- Hirsch, L., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T. & Pringsheim, T. 2016. The Incidence Of Parkinson's Disease: A Systematic Review And Meta-Analysis. *Neuroepidemiology* 46(4): 292–300.
- Hodes, G. E., Ménard, C. & Russo, S. J. 2016. Integrating Interleukin-6 Into Depression Diagnosis And Treatment. *Neurobiology Of Stress* 4: 15–22.
- Holzschuh, J., Ryu, S., Aberger, F. & Driever, W. 2001. Dopamine Transporter Expression Distinguishes Dopaminergic Neurons From Other Catecholaminergic Neurons In The Developing Zebrafish Embryo. *Mechanisms Of Development* 101(1-2): 237–243.
- Hongxia, L., Yuxiao, T., Zhilei, S., Yan, S., Yicui, Q., Jiamin, S., Xin, X., Jianxin, Y., Fengfeng, M. & Hui, S. 2019. Zinc Inhibited Lps-Induced Inflammatory Responses By Upregulating A20 Expression In Microglia Bv2 Cells. *Journal Of Affective Disorders* 249: 136–142.
- Horst, C. H., Schlemmer, F., De Aguiar Montenegro, N., Domingues, A. C. M., Ferreira, G. G., Da Silva Ribeiro, C. Y., De Andrade, R. R., Del Bel Guimarães, E., Titze-De-Almeida, S. S. & Titze-De-Almeida, R. 2018. Signature Of Aberrantly Expressed Micrnas In The Striatum Of Rotenone-Induced Parkinsonian Rats. *Neurochemical Research* 43: 2132–2140.
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L. & Bohr, V. A. 2019. Ageing As A Risk Factor For Neurodegenerative Disease. *Nature Reviews Neurology* 15(10): 565–581.
- Houlden, H. & Singleton, A. B. 2012. The Genetics And Neuropathology Of Parkinson's Disease. *Acta Neuropathologica* 124(3): 325–338.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K. & Matthews, L. 2013. The Zebrafish Reference Genome Sequence And Its Relationship To The Human Genome. *Nature* 496(7446): 498–503.
- Hsieh, C.-H., Shaltouki, A., Gonzalez, A. E., Da Cruz, A. B., Burbulla, L. F., Lawrence, E. S., Schüle, B., Krainc, D., Palmer, T. D. & Wang, X. 2016. Functional Impairment In Miro Degradation And Mitophagy Is A Shared Feature In Familial And Sporadic Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell* 19(6): 709–724.
- Hsieh, P. C., Wang, C. C., Tsai, C. L., Yeh, Y. M., Lee, Y. S. & Wu, Y. R. 2019. Polg R964c And Gba L444p Mutations In Familial Parkinson's Disease: Case Report And Literature Review. *Brain And Behavior* 9(5): E01281.
- Hsu, K. C., Chida, S., Geraghty, D. E. & Dupont, B. 2002. The Killer Cell Immunoglobulin - Like Receptor (Kir) Genomic Region: Gene - Order, Haplotypes And Allelic Polymorphism. *Immunological Reviews* 190(1): 40–52.
- Hsu, Y.-T., Liao, C.-C., Chang, S.-N., Yang, Y.-W., Tsai, C.-H., Chen, T.-L. & Sung, F.-C. 2015. Increased Risk Of Depression In Patients With Parkinson Disease:

- A Nationwide Cohort Study. *The American Journal Of Geriatric Psychiatry* 23(9): 934–940.
- Huang, X., Alonso, A., Guo, X., Umbach, D. M., Lichtenstein, M. L., Ballantyne, C. M., Mailman, R. B., Mosley, T. H. & Chen, H. 2015. Statins, Plasma Cholesterol, And Risk Of Parkinson's Disease: A Prospective Study. *Movement Disorders* 30(4): 552–559.
- Huang, X., Deng, J., Xu, T., Xin, W., Zhang, Y. & Ruan, X. 2021. Downregulation Of Metallothionein-2 Contributes To Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain. *Journal Of Neuroinflammation* 18: 1–13.
- Hübner, C. & Haase, H. 2021. Interactions Of Zinc-And Redox-Signaling Pathways. *Redox Biology* 41: 101916.
- Hunter, P. 2023. Replacing Mammals In Drug Development: Non-Mammalian Models Accelerate Translational And Pre-Clinical Research. *EMBO Reports* 24(1): EMBR202256485.
- Hwang, C. J., Kim, Y. E., Son, D. J., Park, M. H., Choi, D.-Y., Park, P.-H., Hellström, M., Han, S.-B., Oh, K.-W. & Park, E. K. 2017. Parkin Deficiency Exacerbate Ethanol-Induced Dopaminergic Neurodegeneration By P38 Pathway Dependent Inhibition Of Autophagy And Mitochondrial Function. *Redox Biology* 11: 456–468.
- Ibarra-Gutiérrez, M. T., Serrano-García, N. & Orozco-Ibarra, M. 2023. Rotenone-Induced Model Of Parkinson's Disease: Beyond Mitochondrial Complex I Inhibition. *Molecular Neurobiology* 60(4): 1929–1948.
- Imai, S.-I. & Guarente, L. 2016. It Takes Two To Tango: Nad<sup>+</sup> And Sirtuins In Aging/Longevity Control. *Npj Aging And Mechanisms Of Disease* 2(1): 1–6.
- Inden, M., Kitamura, Y., Abe, M., Tamaki, A., Takata, K. & Taniguchi, T. 2011. Parkinsonian Rotenone Mouse Model: Reevaluation Of Long-Term Administration Of Rotenone In C57bl/6 Mice. *Biological And Pharmaceutical Bulletin* 34(1): 92–96.
- Inoue, K.-I., Takano, H., Shimada, A. & Satoh, M. 2009. Metallothionein As An Anti - Inflammatory Mediator. *Mediators Of Inflammation* 2009(1): 101659.
- Institutional Animal Care And Use Program 2019. Zebrafish Care Standards. IACUP Policy, UCSF Office Of Research: 4.
- Iovino, L., Tremblay, M. & Civiero, L. 2020. Glutamate-Induced Excitotoxicity In Parkinson's Disease: The Role Of Glial Cells. *Journal Of Pharmacological Sciences* 144(3): 151–164.
- Islam, K. N., Kayanoki, Y., Kaneto, H., Suzuki, K., Asahi, M., Fujii, J. & Taniguchi, N. 1997. Tgf-B1 Triggers Oxidative Modifications And Enhances Apoptosis In Hit Cells Through Accumulation Of Reactive Oxygen Species By Suppression

Of Catalase And Glutathione Peroxidase. *Free Radical Biology And Medicine* 22(6): 1007–1017.

- Isooka, N., Miyazaki, I., Kikuoka, R., Wada, K., Nakayama, E., Shin, K., Yamamoto, D., Kitamura, Y. & Asanuma, M. 2020. Dopaminergic Neuroprotective Effects Of Rotigotine Via 5-Ht1a Receptors: Possibly Involvement Of Metallothionein Expression In Astrocytes. *Neurochemistry International* 132: 104608.
- Ives, N. J., Stowe, R. L., Marro, J., Counsell, C., Macleod, A., Clarke, C. E., Gray, R. & Wheatley, K. 2004. Monoamine Oxidase Type B Inhibitors In Early Parkinson's Disease: Meta-Analysis Of 17 Randomised Trials Involving 3525 Patients. *Bmj* 329(7466): 593.
- Iwasaki, Y., Ikeda, K., Shiojima, T. & Kinoshita, M. 1992. Increased Plasma Concentrations Of Aspartate, Glutamate And Glycine In Parkinson's Disease. *Neuroscience Letters* 145(2): 175–177.
- Jahnke, R., Larkey, L., Rogers, C., Etnier, J. & Lin, F. 2010. A Comprehensive Review Of Health Benefits Of Qigong And Tai Chi. *American Journal Of Health Promotion* 24(6): E1–E25.
- Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K. B., Awuh, J. A., Øvervatn, A., McMahon, M., Hayes, J. D. & Johansen, T. 2010. P62/Sqstm1 Is A Target Gene For Transcription Factor Nrf2 And Creates A Positive Feedback Loop By Inducing Antioxidant Response Element-Driven Gene Transcription. *Journal Of Biological Chemistry* 285(29): 22576–22591.
- Jakovac, H., Kezele, T. G. & Radošević-Stašić, B. 2018. Expression Profiles Of Metallothionein I/ii And Megalin In Cuprizone Model Of De-And Remyelination. *Neuroscience* 388: 69–86.
- Jaleel, M., Nichols, R. J., Deak, M., Campbell, D. G., Gillardon, F., Knebel, A. & Alessi, D. R. 2007. Lrrk2 Phosphorylates Moesin At Threonine-558: Characterization Of How Parkinson's Disease Mutants Affect Kinase Activity. *Biochemical Journal* 405(2): 307–317.
- James, S. L., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., Abbasi, N., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdela, J. & Abdelalim, A. 2018. Global, Regional, And National Incidence, Prevalence, And Years Lived With Disability For 354 Diseases And Injuries For 195 Countries And Territories, 1990–2017: A Systematic Analysis For The Global Burden Of Disease Study 2017. *The Lancet* 392(10159): 1789–1858.
- Jankovic, J. & Tan, E. K. 2020. Parkinson's Disease: Etiopathogenesis And Treatment. *Journal Of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 91(8): 795–808.
- Jansen Van Rensburg, Z., Abrahams, S., Bardien, S. & Kenyon, C. 2021. Toxic Feedback Loop Involving Iron, Reactive Oxygen Species, A-Synuclein And Neuromelanin In Parkinson's Disease And Intervention With Turmeric. *Molecular Neurobiology* 58(11): 5920–5936.

- Jarosz, M., Olbert, M., Wyszogrodzka, G., Młyniec, K. & Librowski, T. 2017. Antioxidant And Anti-Inflammatory Effects Of Zinc. Zinc-Dependent Nf-Kb Signaling. *Inflammopharmacology* 25: 11–24.
- Javitch, J. A., D'amato, R. J., Strittmatter, S. M. & Snyder, S. H. 1985. Parkinsonism-Inducing Neurotoxin, N-Methyl-4-Phenyl-1, 2, 3, 6-Tetrahydropyridine: Uptake Of The Metabolite N-Methyl-4-Phenylpyridine By Dopamine Neurons Explains Selective Toxicity. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 82(7): 2173–2177.
- Jayaram, S. & Krishnamurthy, P. T. 2021. Role Of Microgliosis, Oxidative Stress And Associated Neuroinflammation In The Pathogenesis Of Parkinson's Disease: The Therapeutic Role Of Nrf2 Activators. *Neurochemistry International* 145: 105014.
- Jellinger, K. A. 2015. Neuropathobiology Of Non-Motor Symptoms In Parkinson Disease. *Journal Of Neural Transmission* 122(10): 1429–1440.
- Jenner, P. 2003. Oxidative Stress In Parkinson's Disease. *Annals Of Neurology: Official Journal Of The American Neurological Association And The Child Neurology Society* 53(S3): S26–S38.
- Jenner, P., Morris, H. R., Robbins, T. W., Goedert, M., Hardy, J., Ben-Shlomo, Y., Bolam, P., Burn, D., Hindle, J. V. & Brooks, D. 2013. Parkinson's Disease—The Debate On The Clinical Phenomenology, Aetiology, Pathology And Pathogenesis. *Journal Of Parkinson's Disease* 3(1): 1–11.
- Ji, J., Bourque, M., Di Paolo, T. & Dluzen, D. E. 2009. Genetic Alteration In The Dopamine-Transporter Differentially Affects Male And Female Nigrostriatal Transporter Systems. *Biochemical Pharmacology* 78(11): 1401–1411.
- Ji, S. G. & Weiss, J. H. 2018. Zn<sup>2+</sup>-Induced Disruption Of Neuronal Mitochondrial Function: Synergism With Ca<sup>2+</sup>, Critical Dependence Upon Cytosolic Zn<sup>2+</sup> Buffering, And Contributions To Neuronal Injury. *Experimental Neurology* 302: 181–195.
- Jia, X., Chen, X., Gao, C., Wang, H., Yang, C., Jiang, L. H. & Fan, Y. 2023. Functional Cooperation Between Ikca And Trpc1 Channels Regulates Serum - Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Via Mediating Ca<sup>2+</sup> Influx And Erk1/2 Activation. *Cell Proliferation* 56(4): E13385.
- Jiang, R., Hua, C., Wan, Y., Jiang, B., Hu, H., Zheng, J., Fuqua, B. K., Dunaief, J. L., Anderson, G. J. & David, S. 2015. Hephaestin And Ceruloplasmin Play Distinct But Interrelated Roles In Iron Homeostasis In Mouse Brain. *The Journal Of Nutrition* 145(5): 1003–1009.
- Jiang, X., Tang, P.-C., Chen, Q., Zhang, X., Fan, Y.-Y., Yu, B.-C., Gu, X.-X., Sun, Y., Ge, X.-Q. & Zhang, X.-L. 2019. Cordycepin Exerts Neuroprotective Effects Via An Anti-Apoptotic Mechanism Based On The Mitochondrial Pathway In A Rotenone-Induced Parkinsonism Rat Model. *CNS & Neurological Disorders-*

*Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)* 18(8): 609–620.

- Jin, S. M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L. A., Narendra, D. P. & Youle, R. J. 2010. Mitochondrial Membrane Potential Regulates Pink1 Import And Proteolytic Destabilization By Parl. *Journal Of Cell Biology* 191(5): 933–942.
- Jin, X., Si, X., Lei, X., Liu, H., Shao, A. & Li, L. 2024. Disruption Of Dopamine Homeostasis Associated With Alteration Of Proteins In Synaptic Vesicles: A Putative Central Mechanism Of Parkinson's Disease Pathogenesis. *Aging And Disease* 15(3): 1204.
- Joers, V., Masilamoni, G., Kempf, D., Weiss, A. R., Rotterman, T. M., Murray, B., Yalcin-Cakmakli, G., Voll, R. J., Goodman, M. M. & Howell, L. 2020. Microglia, Inflammation And Gut Microbiota Responses In A Progressive Monkey Model Of Parkinson's Disease: A Case Series. *Neurobiology Of Disease* 144: 105027.
- Joers, V., Tansey, M. G., Mulas, G. & Carta, A. R. 2017. Microglial Phenotypes In Parkinson's Disease And Animal Models Of The Disease. *Progress In Neurobiology* 155: 57–75.
- Johansson, M. E., Toni, I., Kessels, R. P., Bloem, B. R. & Helmich, R. C. 2024. Clinical Severity In Parkinson's Disease Is Determined By Decline In Cortical Compensation. *Brain* 147(3): 871–886.
- Johnson, M. E. & Bobrovskaya, L. 2015. An Update On The Rotenone Models Of Parkinson's Disease: Their Ability To Reproduce The Features Of Clinical Disease And Model Gene–Environment Interactions. *Neurotoxicology* 46: 101–116.
- Jomova, K., Alomar, S. Y., Nepovimova, E., Kuca, K. & Valko, M. 2024. Heavy Metals: Toxicity And Human Health Effects. *Archives Of Toxicology*: 1–57.
- Jomova, K., Vondrakova, D., Lawson, M. & Valko, M. 2010. Metals, Oxidative Stress And Neurodegenerative Disorders. *Molecular And Cellular Biochemistry* 345: 91–104.
- Jose, D., Allen, A. L., Blakley, B. & Al-Dissi, A. 2021. Evaluation Of Metallothionein And Ki-67 Expression In Chronic Cholangiohepatitis In Cats. *Canadian Journal Of Veterinary Research* 85(1): 36–44.
- Joselin, A. P., Hewitt, S. J., Callaghan, S. M., Kim, R. H., Chung, Y.-H., Mak, T. W., Shen, J., Slack, R. S. & Park, D. S. 2012. Ros-Dependent Regulation Of Parkin And Dj-1 Localization During Oxidative Stress In Neurons. *Human Molecular Genetics* 21(22): 4888–4903.
- Jost, S. T., Konitsioti, A., Loehrer, P. A., Ashkan, K., Rizos, A., Sauerbier, A., Dos Santos Ghilardi, M. G., Rosenkranz, F., Strobel, L., Gronostay, A. J. P. & Disorders, R. 2023. Non-Motor Effects Of Deep Brain Stimulation In

- Parkinson's Disease Motor Subtypes. *Parkinsonism & Related Disorders*: 105318.
- Juárez-Rebollar, D., Rios, C., Nava-Ruiz, C. & Méndez-Armenta, M. 2017. Metallothionein In Brain Disorders. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity* 2017(1): 5828056.
- Jucker, M. 2010. The Benefits And Limitations Of Animal Models For Translational Research In Neurodegenerative Diseases. *Nature Medicine* 16(11): 1210–1214.
- Jung, U. J. & Kim, S. R. 2018. Beneficial Effects Of Flavonoids Against Parkinson's Disease. *Journal Of Medicinal Food* 21(5): 421–432.
- Kalia, L. V. & Lang, A. E. 2015. Parkinson's Disease. *The Lancet* 386(9996): 896–912.
- Kalinderi, K., Bostantjopoulou, S. & Fidani, L. 2016. The Genetic Background Of Parkinson's Disease: Current Progress And Future Prospects. *Acta Neurologica Scandinavica* 134(5): 314–326.
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M. & Gerlai, R. 2014. Zebrafish As An Emerging Model For Studying Complex Brain Disorders. *Trends In Pharmacological Sciences* 35(2): 63–75.
- Kalyn, M., Hua, K., Mohd Noor, S., Wong, C. E. D. & Ekker, M. 2019. Comprehensive Analysis Of Neurotoxin-Induced Ablation Of Dopaminergic Neurons In Zebrafish Larvae. *Biomedicines* 8(1): 1.
- Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T., Morikawa, S. & Masumoto, J. 2019. The Role Of Interleukin-1 In General Pathology. *Inflammation And Regeneration* 39: 1–16.
- Kang, Y. C., Son, M., Kang, S., Im, S., Piao, Y., Lim, K. S., Song, M.-Y., Park, K.-S., Kim, Y.-H. & Pak, Y. K. 2018. Cell-Penetrating Artificial Mitochondria-Targeting Peptide-Conjugated Metallothionein 1a Alleviates Mitochondrial Damage In Parkinson's Disease Models. *Experimental & Molecular Medicine* 50(8): 1–13.
- Kang, Y. J. 2006. Metallothionein Redox Cycle And Function. *Experimental Biology And Medicine* 231(9): 1459–1467.
- Kannarkat, G. T., Boss, J. M. & Tansey, M. G. 2013. The Role Of Innate And Adaptive Immunity In Parkinson's Disease. *Journal Of Parkinson's Disease* 3(4): 493–514.
- Karikari, A. A., Mcfleder, R. L., Ribechini, E., Blum, R., Bruttel, V., Knorr, S., Gehmeyr, M., Volkmann, J., Brotchie, J. M. & Ahsan, F. 2022. Neurodegeneration By A-Synuclein-Specific T Cells In Aav-A53t-A-Synuclein Parkinson's Disease Mice. *Brain, Behavior, And Immunity* 101: 194–210.
- Kaur, D., Yantiri, F., Rajagopalan, S., Kumar, J., Mo, J. Q., Boonplueang, R., Viswanath, V., Jacobs, R., Yang, L. & Beal, M. F. 2003. Genetic Or

Pharmacological Iron Chelation Prevents Mptp-Induced Neurotoxicity In Vivo: A Novel Therapy For Parkinson's Disease. *Neuron* 37(6): 899–909.

Kawabori, M., Kacimi, R., Kauppinen, T., Calosing, C., Kim, J. Y., Hsieh, C. L., Nakamura, M. C. & Yenari, M. A. 2015. Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 2 (Trem2) Deficiency Attenuates Phagocytic Activities Of Microglia And Exacerbates Ischemic Damage In Experimental Stroke. *Journal Of Neuroscience* 35(8): 3384–3396.

Kempster, P. A., Williams, D. R., Selikhova, M., Holton, J., Revesz, T. & Lees, A. J. 2007. Patterns Of Levodopa Response In Parkinson's Disease: A Clinico-Pathological Study. *Brain* 130(8): 2123–2128.

Keus, S. H., Munneke, M., Nijkrake, M. J., Kwakkel, G. & Bloem, B. R. 2009. Physical Therapy In Parkinson's Disease: Evolution And Future Challenges. *Movement Disorders* 24(1): 1–14.

Khan, E., Hasan, I. & Haque, M. E. 2023. Parkinson's Disease: Exploring Different Animal Model Systems. *International Journal Of Molecular Sciences* 24(10): 9088.

Khan, Z., Elahi, A., Bukhari, D. A. & Rehman, A. 2022. Cadmium Sources, Toxicity, Resistance And Removal By Microorganisms-A Potential Strategy For Cadmium Eradication. *Journal Of Saudi Chemical Society* 26(6): 101569.

Khotimah, H., Sumitro, S. B. & Widodo, M. A. 2015. Zebrafish Parkinson's Model: Rotenone Decrease Motility, Dopamine, And Increase A-Synuclein Aggregation And Apoptosis Of Zebrafish Brain. *Int J Pharmtech Res* 4: 614–621.

Kim, H., Lee, H. J., Hwang, J.-Y., Ha, E.-H., Park, H., Ha, M., Kim, J. H., Hong, Y.-C. & Chang, N. 2010. Blood Cadmium Concentrations Of Male Cigarette Smokers Are Inversely Associated With Fruit Consumption. *The Journal Of Nutrition* 140(6): 1133–1138.

Kim, H. G., Hwang, Y. P., Han, E. H., Choi, C. Y., Yeo, C.-Y., Kim, J. Y., Lee, K. Y. & Jeong, H. G. 2009. Metallothionein-Iii Provides Neuronal Protection Through Activation Of Nuclear Factor-Kb Via The Trka/Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Signaling Pathway. *Toxicological Sciences* 112(2): 435–449.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K.-L. 2011. Ampk And Mtor Regulate Autophagy Through Direct Phosphorylation Of Ulk1. *Nature Cell Biology* 13(2): 132–141.

Kim, J.-H., Choi, T. G., Park, S., Yun, H. R., Nguyen, N. N. Y., Jo, Y. H., Jang, M., Kim, J., Kim, J. & Kang, I. 2018. Mitochondrial Ros-Derived Pten Oxidation Activates Pi3k Pathway For Mtor-Induced Myogenic Autophagy. *Cell Death & Differentiation* 25(11): 1921–1937.

Kim, S., Kwon, S.-H., Kam, T.-I., Panicker, N., Karuppagounder, S. S., Lee, S., Lee, J. H., Kim, W. R., Kook, M. & Foss, C. A. 2019. Transneuronal Propagation Of

Pathologic A-Synuclein From The Gut To The Brain Models Parkinson's Disease. *Neuron* 103(4): 627–641. E627.

Kim, T. Y., Leem, E., Lee, J. M. & Kim, S. R. 2020. Control Of Reactive Oxygen Species For The Prevention Of Parkinson's Disease: The Possible Application Of Flavonoids. *Antioxidants* 9(7): 583.

Kim, W.-G., Mohney, R. P., Wilson, B., Jeohn, G.-H., Liu, B. & Hong, J.-S. 2000. Regional Difference In Susceptibility To Lipopolysaccharide-Induced Neurotoxicity In The Rat Brain: Role Of Microglia. *Journal Of Neuroscience* 20(16): 6309–6316.

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. 1995. Stages Of Embryonic Development Of The Zebrafish. *Developmental Dynamics* 203(3): 253–310.

Kinter, L. B., Dehaven, R., Johnson, D. K. & DeGeorge, J. J. 2021. A Brief History Of Use Of Animals In Biomedical Research And Perspective On Non-Animal Alternatives. *ILAR Journal* 62(1-2): 7–16.

Kinugawa, K., Monnet, Y., Béchade, C., Alvarez-Fischer, D., Hirsch, E. C., Bessis, A. & Hunot, S. 2013. Dap12 And Cd11b Contribute To The Microglial-Induced Death Of Dopaminergic Neurons In Vitro But Not In Vivo In The Mptp Mouse Model Of Parkinson's Disease. *Journal Of Neuroinflammation* 10: 1–12.

Kitamura, H., Ohno, Y., Toyoshima, Y., Ohtake, J., Homma, S., Kawamura, H., Takahashi, N. & Taketomi, A. 2017. Interleukin - 6/Stat 3 Signaling As A Promising Target To Improve The Efficacy Of Cancer Immunotherapy. *Cancer Science* 108(10): 1947–1952.

Klein, C. & Schlossmacher, M. G. 2007. Parkinson Disease, 10 Years After Its Genetic Revolution: Multiple Clues To A Complex Disorder. *Neurology* 69(22): 2093–2104.

Klein, S., Piya, S., Lu, Z., Xia, Y., Alonso, M., White, E., Wei, J., Gomez-Manzano, C., Jiang, H. & Fueyo, J. 2015. C-Jun N-Terminal Kinases Are Required For Oncolytic Adenovirus-Mediated Autophagy. *Oncogene* 34(41): 5295–5301.

Knez, D., Wang, F., Duan, W.-X., Rambaher, M. H., Gobec, S., Cheng, X.-Y., Wang, X.-B., Mao, C.-J. & Liu, C.-F. 2024. Development Of Novel Aza-Stilbenes As A New Class Of Selective Mao-B Inhibitors For The Treatment Of Parkinson's Disease. *Bioorganic Chemistry* 153: 107877.

Kobayashi, M., Konishi, H., Takai, T. & Kiyama, H. 2015. A Dap12 - Dependent Signal Promotes Pro - Inflammatory Polarization In Microglia Following Nerve Injury And Exacerbates Degeneration Of Injured Neurons. *Glia* 63(6): 1073–1082.

- Kodera, K. & Matsui, H. 2022. Zebrafish, Medaka And Turquoise Killifish For Understanding Human Neurodegenerative/Neurodevelopmental Disorders. *International Journal Of Molecular Sciences* 23(3): 1399.
- Koentjoro, B., Park, J.-S. & Sue, C. M. 2017. Nix Restores Mitophagy And Mitochondrial Function To Protect Against Pink1/Parkin-Related Parkinson's Disease. *Scientific Reports* 7(1): 44373.
- Koh, J.-Y. & Lee, S.-J. 2020. Metallothionein-3 As A Multifunctional Player In The Control Of Cellular Processes And Diseases. *Molecular Brain* 13(1): 116.
- Konnova, E. A. & Swanberg, M. 2018. Animal Models Of Parkinson's Disease. *Exon Publications*: 83–106.
- Koprich, J. B., Reske-Nielsen, C., Mithal, P. & Isacson, O. 2008. Neuroinflammation Mediated By Il-1 $\beta$  Increases Susceptibility Of Dopamine Neurons To Degeneration In An Animal Model Of Parkinson's Disease. *Journal Of Neuroinflammation* 5(1): 8.
- Koren, G., Norton, G., Radinsky, K. & Shalev, V. 2019. Chronic Use Of B-Blockers And The Risk Of Parkinson's Disease. *Clinical Drug Investigation* 39(5): 463–468.
- Kouli, A. & Williams-Gray, C. H. 2022. Age-Related Adaptive Immune Changes In Parkinson's Disease. *Journal Of Parkinson's Disease* 12(S1): S93–S104.
- Kovács, M., Makkos, A., Aschermann, Z., Janszky, J., Komoly, S., Weintraut, R., Karádi, K. & Kovács, N. 2016. Impact Of Sex On The Nonmotor Symptoms And The Health - Related Quality Of Life In Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease* 2016(1): 7951840.
- Krause, K.-H. & Bedard, K. 2008. Nox Enzymes In Immuno-Inflammatory Pathologies. *Seminars In Immunopathology*, Pp.193–194.
- Kreitzer, A. C. 2009. Physiology And Pharmacology Of Striatal Neurons. *Annual Review Of Neuroscience* 32: 127–147.
- Krezel, A. & Maret, W. 2021. The Bioinorganic Chemistry Of Mammalian Metallothioneins. *Chemical Reviews* 121(23): 14594–14648.
- Krežel, A. & Maret, W. 2007. Different Redox States Of Metallothionein/Thionein In Biological Tissue. *Biochemical Journal* 402(3): 551–558.
- Krishnan, V. & Nestler, E. J. 2008. The Molecular Neurobiology Of Depression. *Nature* 455(7215): 894–902.
- Kritzinger, C., Vollstedt, E.-J., Hüchelheim, K., Lorwin, A., Graf, J., Tunc, S., Klein, C. & Kasten, M. 2015. Qualitative Characteristics Of Depression In Parkinson's Patients And Controls. *Behavioural Neurology* 2015(1): 961372.

- Kucheryanu, V. & Kryzhanovskii, G. 2000. Effect Of Glutamate And Antagonists Of N-Methyl-D-Aspartate Receptors On Experimental Parkinsonian Syndrome In Rats. *Bulletin Of Experimental Biology And Medicine* 130: 629–632.
- Kumari, M. R., Hiramatsu, M. & Ebadi, M. 1998. Free Radical Scavenging Actions Of Metallothionein Isoforms I And Ii. *Free Radical Research* 29(2): 93–101.
- Kuscha, V., Barreiro - Iglesias, A., Becker, C. G. & Becker, T. 2012. Plasticity Of Tyrosine Hydroxylase And Serotonergic Systems In The Regenerating Spinal Cord Of Adult Zebrafish. *Journal Of Comparative Neurology* 520(5): 933–951.
- Kuwana, T. & Newmeyer, D. D. 2003. Bcl-2-Family Proteins And The Role Of Mitochondria In Apoptosis. *Current Opinion In Cell Biology* 15(6): 691–699.
- Kwak, S. Y., Jang, W. I., Park, S., Cho, S. S., Lee, S. B., Kim, M.-J., Park, S., Shim, S. & Jang, H. 2021. Metallothionein 2 Activation By Pravastatin Reinforces Epithelial Integrity And Ameliorates Radiation-Induced Enteropathy. *Ebiomedicine* 73: 103477.
- Labbé, C., Lorenzo-Betancor, O. & Ross, O. A. 2016. Epigenetic Regulation In Parkinson's Disease. *Acta Neuropathologica* 132(4): 515–530.
- Lal, R. & Chopra, K. 2024. Experimental Models Of Parkinson's Disease: Challenges And Opportunities. *European Journal Of Pharmacology*: 176819.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W. & Irwin, I. 1983. Chronic Parkinsonism In Humans Due To A Product Of Meperidine-Analog Synthesis. *Science* 219(4587): 979–980.
- Lanier, L. L. & Bakker, A. B. 2000. The Itam-Bearing Transmembrane Adaptor Dap12 In Lymphoid And Myeloid Cell Function. *Immunology Today* 21(12): 611–614.
- Latham, A. S., Rocha, S. M., Mcdermott, C. P., Reigan, P. & Tjalkens, R. B. 2024. Neuroprotective Efficacy Of The Glucocorticoid Receptor Modulator Pt150 In The Rotenone Mouse Model Of Parkinsons Disease. *Biorxiv*: 2024.2004.2012.589261.
- Lau, A. & Tymianski, M. 2010. Glutamate Receptors, Neurotoxicity And Neurodegeneration. *Pflügers Archiv-European Journal Of Physiology* 460(2): 525–542.
- Lau-Cam, C. A. 2020. Protective Role Of Taurine And Structurally Related Compounds Against Diabetes-Induced Oxidative Stress. *Diabetes*: 351–359.
- Lazarou, M., Sliter, D. A., Kane, L. A., Sarraf, S. A., Wang, C., Burman, J. L., Sideris, D. P., Fogel, A. I. & Youle, R. J. 2015. The Ubiquitin Kinase Pink1 Recruits Autophagy Receptors To Induce Mitophagy. *Nature* 524(7565): 309–314.
- Lazo, C., Guillot, T. & Miller, G. 2014. Rotenone. *Encyclopedia Of The Neurological Sciences (Second Edition)*. J., M., Aminoff, B., R. & Daroff, Academic Press: 74–75.

- Lazo, J. S. & Pitt, B. R. 1995. Metallothioneins And Cell Death By Anticancer Drugs. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology* 35: 635–653.
- Leal, M. C., Casabona, J. C., Puntel, M. & Pitossi, F. J. 2013. Interleukin-1 $\beta$  And Tumor Necrosis Factor-A: Reliable Targets For Protective Therapies In Parkinson's Disease? *Frontiers In Cellular Neuroscience* 7: 53.
- Lecours, C., Bordeleau, M., Cantin, L., Parent, M., Paolo, T. D. & Tremblay, M.-È. 2018. Microglial Implication In Parkinson's Disease: Loss Of Beneficial Physiological Roles Or Gain Of Inflammatory Functions? *Frontiers In Cellular Neuroscience* 12: 282.
- Lee, A. & Gilbert, R. M. 2016. Epidemiology Of Parkinson Disease. *Neurologic Clinics* 34(4): 955–965.
- Lee, D. K., Carrasco, J., Hidalgo, J. & Andrews, G. K. 1999. Identification Of A Signal Transducer And Activator Of Transcription (Stat) Binding Site In The Mouse Metallothionein-I Promoter Involved In Interleukin-6-Induced Gene Expression. *Biochemical Journal* 337(1): 59–65.
- Lee, H., James, W. S. & Cowley, S. A. 2017. Lrrk2 In Peripheral And Central Nervous System Innate Immunity: Its Link To Parkinson's Disease. *Biochemical Society Transactions* 45(1): 131–139.
- Lee, J. & Kim, H.-J. 2022. Normal Aging Induces Changes In The Brain And Neurodegeneration Progress: Review Of The Structural, Biochemical, Metabolic, Cellular, And Molecular Changes. *Frontiers In Aging Neuroscience* 14: 931536.
- Lee, K. Y., Hui-Chan, C. W. & Tsang, W. W. 2015. The Effects Of Practicing Sitting Tai Chi On Balance Control And Eye-Hand Coordination In The Older Adults: A Randomized Controlled Trial. *Disability And Rehabilitation* 37(9): 790–794.
- Lee, S.-J. & Koh, J.-Y. 2010. Roles Of Zinc And Metallothionein-3 In Oxidative Stress-Induced Lysosomal Dysfunction, Cell Death, And Autophagy In Neurons And Astrocytes. *Molecular Brain* 3: 1–9.
- Lee, S. H., Jung, S., Lee, Y. J., Hyun, M. & Chung, K. C. 2021. Fbxo7 Triggers Caspase 8-Mediated Proteolysis Of The Transcription Factor Foxo4 And Exacerbates Neuronal Cytotoxicity. *Journal Of Biological Chemistry* 297(6):
- Lee, Y., Lee, S., Chang, S.-C. & Lee, J. 2019. Significant Roles Of Neuroinflammation In Parkinson's Disease: Therapeutic Targets For Pd Prevention. *Archives Of Pharmacal Research* 42: 416–425.
- Leentjens, A. F., Dujardin, K., Marsh, L., Martinez - Martin, P., Richard, I. H. & Starkstein, S. E. 2011. Symptomatology And Markers Of Anxiety Disorders In Parkinson's Disease: A Cross - Sectional Study. *Movement Disorders* 26(3): 484–492.

- Lerner, U. H. 2020. Role Of Interleukins On Physiological And Pathological Bone Resorption And Bone Formation: Effects By Cytokines In The Il-1 And Il-2 Families. 45–66.
- Lesage, S., Drouet, V., Majounie, E., Deramecourt, V., Jacoupy, M., Nicolas, A., Cormier-Dequaire, F., Hassoun, S. M., Pujol, C. & Ciura, S. 2016. Loss Of Vps13c Function In Autosomal-Recessive Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction And Increases Pink1/Parkin-Dependent Mitophagy. *The American Journal Of Human Genetics* 98(3): 500–513.
- Lesage, S., Mangone, G., Tesson, C., Bertrand, H., Benmahdjoub, M., Kesraoui, S., Arezki, M., Singleton, A., Corvol, J.-C. & Brice, A. 2021. Clinical Variability Of Synj1-Associated Early-Onset Parkinsonism. *Frontiers In Neurology* 12: 648457.
- Lewis, P. A. & Cookson, M. R. 2012. Gene Expression In The Parkinson's Disease Brain. *Brain Research Bulletin* 88(4): 302–312.
- Li, B., Hu, Q., Wang, H., Man, N., Ren, H., Wen, L., Nukina, N., Fei, E. & Wang, G. 2010. Omi/Htra2 Is A Positive Regulator Of Autophagy That Facilitates The Degradation Of Mutant Proteins Involved In Neurodegenerative Diseases. *Cell Death & Differentiation* 17(11): 1773–1784.
- Li, C., Li, M., Jin, Y., An, Q., Dang, H. & Gong, W. 2024a. Investigating The Therapeutic Effects Of A Japanese Sake Yeast Supplement On A Zebrafish Model Of Parkinson's Disease: Antioxidant And Inflammatory Responses. *Experimental Gerontology* 194: 112509.
- Li, C., Ou, R., Chen, Y., Gu, X., Wei, Q., Cao, B., Zhang, L., Hou, Y., Liu, K. & Chen, X. 2020a. Mutation Analysis Of Dnajc Family For Early - Onset Parkinson's Disease In A Chinese Cohort. *Movement Disorders* 35(11): 2068–2076.
- Li, J., Ding, Y., Zhang, J., Zhang, Y., Cui, Y., Zhang, Y., Chang, S., Chang, Y. Z. & Gao, G. 2024b. Iron Overload Suppresses Hippocampal Neurogenesis In Adult Mice: Implication For Iron Dysregulation - Linked Neurological Diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 30(2): E14394.
- Li, M., Luo, S., Li, Y., Li, Y., Ma, B., Liu, F., Wang, H., Guo, J. & Ling, L. 2023. Dyclonine Relieves The Parkinson's Disease Progression In Rotenone-Induced Drosophila Model. *Behavioural Brain Research* 452: 114561.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J. A. & Robinson, J. P. 2003. Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis Through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Journal Of Biological Chemistry* 278(10): 8516–8525.
- Li, P., Lv, H., Zhang, B., Duan, R., Zhang, X., Lin, P., Song, C. & Liu, Y. 2022a. Growth Differentiation Factor 15 Protects Sh-Sy5y Cells From Rotenone-Induced Toxicity By Suppressing Mitochondrial Apoptosis. *Frontiers In Aging Neuroscience* 14: 869558.

- Li, Q. & Barres, B. A. 2018. Microglia And Macrophages In Brain Homeostasis And Disease. *Nature Reviews Immunology* 18(4): 225–242.
- Li, R., Xin, T., Li, D., Wang, C., Zhu, H. & Zhou, H. 2018. Therapeutic Effect Of Sirtuin 3 On Ameliorating Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Role Of The Erk-Creb Pathway And Bnip3-Mediated Mitophagy. *Redox Biology* 18: 229–243.
- Li, S., Kim, M.-J., Lee, S.-H., Jin, L., Cong, W., Jeong, H.-G. & Lee, K.-Y. 2021a. Metallothionein 3 Promotes Osteoblast Differentiation In C2c12 Cells Via Reduction Of Oxidative Stress. *International Journal Of Molecular Sciences* 22(9): 4312.
- Li, T., Ning, B., Kong, L., Dai, B., He, X., Thomas, J. M., Sawa, A., Ross, C. A. & Smith, W. W. 2021b. A Lrrk2 Gtp Binding Inhibitor, 68, Reduces Lps-Induced Signaling Events And Tnf-A Release In Human Lymphoblasts. *Cells* 10(2): 480.
- Li, W., Kui, L., Demetrios, T., Gong, X. & Tang, M. 2020b. A Glimmer Of Hope: Maintain Mitochondrial Homeostasis To Mitigate Alzheimer's Disease. *Aging And Disease* 11(5): 1260.
- Li, X., Zhong, S., Sun, Y., Huang, X., Li, Y., Wang, L., Wu, Y., Yang, M., Yuan, H.-X. & Liu, J. 2022b. Integration Analysis Identifies The Role Of Metallothionein In The Progression From Hepatic Steatosis To Steatohepatitis. *Frontiers In Endocrinology* 13: 951093.
- Li, Y., Chen, Y., Jiang, L., Zhang, J., Tong, X., Chen, D. & Le, W. 2021c. Intestinal Inflammation And Parkinson's Disease. *Aging And Disease* 12(8): 2052.
- Liaudet, L., Vassalli, G. & Pacher, P. 2009. Role Of Peroxynitrite In The Redox Regulation Of Cell Signal Transduction Pathways. *Frontiers In Bioscience: A Journal And Virtual Library* 14: 4809.
- Lim, G. G., Chua, D. S., Basil, A. H., Chan, H.-Y., Chai, C., Arumugam, T. & Lim, K.-L. 2015. Cytosolic Pten-Induced Putative Kinase 1 Is Stabilized By The Nf-Kb Pathway And Promotes Non-Selective Mitophagy. *Journal Of Biological Chemistry* 290(27): 16882–16893.
- Lim, J. L., Ng, E. Y., Lim, S.-Y., Tan, A. H., Abdul-Aziz, Z., Ibrahim, K. A., Gopalai, A. A., Tay, Y. W., Vijayanathan, Y. & Toh, T. S. 2021. Association Study Of Mccc1/Lamp3 And Dgkq Variants With Parkinson's Disease In Patients Of Malay Ancestry. *Neurological Sciences* 42(10): 4203–4207.
- Lin, C.-L. G., Kong, Q., Cuny, G. D. & Glicksman, M. A. 2012. Glutamate Transporter Eaata2: A New Target For The Treatment Of Neurodegenerative Diseases. *Future Medicinal Chemistry* 4(13): 1689–1700.
- Lin, C.-Y., Chiang, C.-Y. & Tsai, H.-J. 2016. Zebrafish And Medaka: New Model Organisms For Modern Biomedical Research. *Journal Of Biomedical Science* 23(1): 19.

- Lin, J.-X. & Leonard, W. J. 1997. Signaling From The Il-2 Receptor To The Nucleus. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 8(4): 313–332.
- Lindeque, J., Levanets, O., Louw, R. & Van Der Westhuizen, F. 2010. The Involvement Of Metallothioneins In Mitochondrial Function And Disease. *Current Protein And Peptide Science* 11(4): 292–309.
- Liu, J., Tan, S., Wang, Y., Luo, J., Long, Y., Mei, X. & Tang, Y. 2020a. Role Of Metallothionein-1 And Metallothionein-2 In The Neuroprotective Mechanism Of Sevoflurane Preconditioning In Mice. *Journal Of Molecular Neuroscience* 70: 713–723.
- Liu, J.-Q., Chu, S.-F., Zhou, X., Zhang, D.-Y. & Chen, N.-H. 2019. Role Of Chemokines In Parkinson's Disease. *Brain Research Bulletin* 152: 11–18.
- Liu, S., Liu, J., Wang, Y., Deng, F. & Deng, Z. 2025. Oxidative Stress: Signaling Pathways, Biological Functions, And Disease. *Medcomm* 6(7): E70268.
- Liu, W., Porter, N. A., Schneider, C., Brash, A. R. & Yin, H. 2011. Formation Of 4-Hydroxynonenal From Cardiolipin Oxidation: Intramolecular Peroxyl Radical Addition And Decomposition. *Free Radical Biology And Medicine* 50(1): 166–178.
- Liu, X., Quan, J., Shen, Z., Zhang, Z., Chen, Z., Li, L., Li, X., Hu, G. & Deng, X. 2022a. Metallothionein 2a (Mt2a) Controls Cell Proliferation And Liver Metastasis By Controlling The Mst1/Lats2/Yap1 Signaling Pathway In Colorectal Cancer. *Cancer Cell International* 22(1): 205.
- Liu, Y., Cong, Y., Niu, Y., Yuan, Y., Tan, F., Lai, Q., Hu, Y., Hou, B., Li, J. & Lin, C. 2022b. Themis Is Indispensable For Il-2 And Il-15 Signaling In T Cells. *Science Signaling* 15(721): Eabi9983.
- Liu, Y., Liu, C. & Li, J. 2020b. Comparison Of Vitamin C And Its Derivative Antioxidant Activity: Evaluated By Using Density Functional Theory. *ACS Omega* 5(39): 25467–25475.
- Lokensgard, J. R., Hu, S., Sheng, W., Vanoijen, M., Cox, D., Cheeran, M. C.-J. & Peterson, P. K. 2001. Robust Expression Of Tnf- $\alpha$ , Il-1 $\beta$ , Rantes, And Ip-10 By Human Microglial Cells During Nonproductive Infection With Herpes Simplex Virus. *Journal Of Neurovirology* 7: 208–219.
- Longhena, F., Faustini, G., Missale, C., Pizzi, M., Spano, P. & Bellucci, A. 2017. The Contribution Of A-Synuclein Spreading To Parkinson's Disease Synaptopathy. *Neural Plasticity* 2017(1): 5012129.
- Lopez, A., Gorb, A., Palha, N., Fleming, A. & Rubinsztein, D. C. 2022. A New Zebrafish Model To Measure Neuronal A-Synuclein Clearance In Vivo. *Genes* 13(5): 868.
- Lu, J., Peng, Y., Huang, R., Feng, Z., Fan, Y., Wang, H., Zeng, Z., Ji, Y., Wang, Y. & Wang, Z. 2021. Elevated Tyrobp Expression Predicts Poor Prognosis And High

Tumor Immune Infiltration In Patients With Low-Grade Glioma. *BMC Cancer* 21(1): 723.

Lücking, C. B., Dürr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., Harhangi, B. S., Meco, G., Denèfle, P. & Wood, N. W. 2000. Association Between Early-Onset Parkinson's Disease And Mutations In The Parkin Gene. *New England Journal Of Medicine* 342(21): 1560–1567.

Luk, K. C. 2019. Oxidative Stress And A-Synuclein Conspire In Vulnerable Neurons To Promote Parkinson's Disease Progression. *The Journal Of Clinical Investigation* 129(9): 3530–3531.

Lukowski, S. W., Fish, R. J., Martin-Levilain, J., Gonelle-Gispert, C., Bühler, L. H., Maechler, P., Dermitzakis, E. T. & Neerman-Arbez, M. 2015. Integrated Analysis Of Mrna And Mirna Expression In Response To Interleukin-6 In Hepatocytes. *Genomics* 106(2): 107–115.

Luo, Q., Sun, W., Wang, Y.-F., Li, J. & Li, D.-W. 2022. Association Of P53 With Neurodegeneration In Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease* 2022(1): 6600944.

Ma, J., Cao, H., Rodrigues, R. M., Xu, M., Ren, T., He, Y., Hwang, S., Feng, D., Ren, R. & Yang, P. 2020. Chronic-Plus-Binge Alcohol Intake Induces Production Of Proinflammatory Mtdna-Enriched Extracellular Vesicles And Steatohepatitis Via Ask1/P38mapk $\alpha$ -Dependent Mechanisms. *JCI Insight* 5(14):

Ma, J., Gao, J., Wang, J. & Xie, A. 2019a. Prion-Like Mechanisms In Parkinson's Disease. *Frontiers In Neuroscience* 13: 552.

Ma, J., Gao, J., Wang, J. & Xie, A. 2019b. Prion-Like Mechanisms In Parkinson's Disease. *Frontiers In Neuroscience* 13: 435928.

Macrae, C. A. & Peterson, R. T. 2015. Zebrafish As Tools For Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 14(10): 721–731.

Makris, A., Barkas, F., Sfrikakis, P. P., Liberopoulos, E., Filippatos, T. D., Ray, K. K. & Agouridis, A. P. 2023. Lipoprotein (A), Interleukin-6 Inhibitors, And Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Is There An Association? *Atherosclerosis Plus* 54: 1–6.

Malek, N., Weil, R. S., Bresner, C., Lawton, M. A., Grosset, K. A., Tan, M., Bajaj, N., Barker, R. A., Burn, D. J. & Foltynie, T. 2018. Features Of Gba-Associated Parkinson's Disease At Presentation In The Uk Tracking Parkinson's Study. *Journal Of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 89(7): 702–709.

Malkus, K. A., Tsika, E. & Ischiropoulos, H. 2009. Oxidative Modifications, Mitochondrial Dysfunction, And Impaired Protein Degradation In Parkinson's Disease: How Neurons Are Lost In The Bermuda Triangle. *Molecular Neurodegeneration* 4(1): 24.

- Mann, V., Cooper, J., Krige, D., Daniel, S., Schapira, A. & Marsden, C. 1992. Brain, Skeletal Muscle And Platelet Homogenate Mitochondrial Function In Parkinson's Disease. *Brain* 115(2): 333–342.
- Marino, G., Calabresi, P. & Ghiglieri, V. 2022. Alpha-Synuclein And Cortico-Striatal Plasticity In Animal Models Of Parkinson Disease. *Handbook Of Clinical Neurology* 184: 153–166.
- Marogianni, C., Sokratous, M., Dardiotis, E., Hadjigeorgiou, G. M., Bogdanos, D. & Xiromerisiou, G. 2020. Neurodegeneration And Inflammation—An Interesting Interplay In Parkinson's Disease. *International Journal Of Molecular Sciences* 21(22): 8421.
- Marshall, K.-A., Daniel, S. E., Cairns, N., Jenner, P. & Halliwell, B. 1997. Upregulation Of The Anti-Apoptotic Protein Bcl-2 May Be An Early Event In Neurodegeneration: Studies On Parkinson's And Incidental Lewy Body Disease. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 240(1): 84–87.
- Martinez, T. N. & Greenamyre, J. T. 2012. Toxin Models Of Mitochondrial Dysfunction In Parkinson's Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 16(9): 920–934.
- Martínez-Rumayor, A., Arrieta, O., Sotelo, J. & García, E. 2009. Female Gender But Not Cigarette Smoking Delays The Onset Of Parkinson's Disease. *Clinical Neurology And Neurosurgery* 111(9): 738–741.
- Martinez - Martin, P., Rodriguez - Blazquez, C., Kurtis, M. M., Chaudhuri, K. R. & Nmss Validation Group. 2011. The Impact Of Non - Motor Symptoms On Health - Related Quality Of Life Of Patients With Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 26(3): 399–406.
- Mason, R. P., Casu, M., Butler, N., Breda, C., Campesan, S., Clapp, J., Green, E. W., Dhulkhed, D., Kyriacou, C. P. & Giorgini, F. 2013. Glutathione Peroxidase Activity Is Neuroprotective In Models Of Huntington's Disease. *Nature Genetics* 45(10): 1249–1254.
- Mata, I. F., Wedemeyer, W. J., Farrer, M. J., Taylor, J. P. & Gallo, K. A. 2006. Lrrk2 In Parkinson's Disease: Protein Domains And Functional Insights. *Trends In Neurosciences* 29(5): 286–293.
- Matsui, H., Gavinio, R., Asano, T., Uemura, N., Ito, H., Taniguchi, Y., Kobayashi, Y., Maki, T., Shen, J. & Takeda, S. 2013. Pink1 And Parkin Complementarily Protect Dopaminergic Neurons In Vertebrates. *Human Molecular Genetics* 22(12): 2423–2434.
- Mattson, M. P. 2006. Neuronal Life-And-Death Signaling, Apoptosis, And Neurodegenerative Disorders. *Antioxidants & Redox Signaling* 8(11-12): 1997–2006.

- Mccord, J. M. 2000. The Evolution Of Free Radicals And Oxidative Stress. *The American Journal Of Medicine* 108(8): 652–659.
- Mccormack, A., Atienza, J., Langston, J. & Di Monte, D. 2006. Decreased Susceptibility To Oxidative Stress Underlies The Resistance Of Specific Dopaminergic Cell Populations To Paraquat-Induced Degeneration. *Neuroscience* 141(2): 929–937.
- Mccormack, A. L., Thiruchelvam, M., Manning-Bog, A. B., Thiffault, C., Langston, J. W., Cory-Slechta, D. A. & Di Monte, D. A. 2002. Environmental Risk Factors And Parkinson's Disease: Selective Degeneration Of Nigral Dopaminergic Neurons Caused By The Herbicide Paraquat. *Neurobiology Of Disease* 10(2): 119–127.
- Mccooy, M. K., Martinez, T. N., Ruhn, K. A., Szymkowski, D. E., Smith, C. G., Botterman, B. R., Tansey, K. E. & Tansey, M. G. 2006. Blocking Soluble Tumor Necrosis Factor Signaling With Dominant-Negative Tumor Necrosis Factor Inhibitor Attenuates Loss Of Dopaminergic Neurons In Models Of Parkinson's Disease. *Journal Of Neuroscience* 26(37): 9365–9375.
- Mccooy, M. K. & Tansey, M. G. 2008. Tnf Signaling Inhibition In The Cns: Implications For Normal Brain Function And Neurodegenerative Disease. *Journal Of Neuroinflammation* 5(1): 1–13.
- Mcgeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E. & Mcgeer, E. 1988. Reactive Microglia Are Positive For Hla - Dr In The Substantia Nigra Of Parkinson's And Alzheimer's Disease Brains. *Neurology* 38(8): 1285–1285.
- Mcgeer, P. L., Mcgeer, E. G. & Suzuki, J. S. 1977. Aging And Extrapyrmidal Function. *Archives Of Neurology* 34(1): 33–35.
- Mcgeer, P. L., Yasojima, K. & Mcgeer, E. G. 2002. Association Of Interleukin-1 $\beta$  Polymorphisms With Idiopathic Parkinson's Disease. *Neuroscience Letters* 326(1): 67–69.
- Mclean, D. L. & Fetcho, J. R. 2004. Ontogeny And Innervation Patterns Of Dopaminergic, Noradrenergic, And Serotonergic Neurons In Larval Zebrafish. *Journal Of Comparative Neurology* 480(1): 38–56.
- Mcleary, F. A., Rcom-H'cheo-Gauthier, A. N., Goulding, M., Radford, R. A., Okita, Y., Faller, P., Chung, R. S. & Pountney, D. L. 2019. Switching On Endogenous Metal Binding Proteins In Parkinson's Disease. *Cells* 8(2): 179.
- Mcleary, F. A., Rcom-H'cheo-Gauthier, A. N., Kinder, J., Goulding, M., Khoo, T. K., Mellick, G. D., Chung, R. S. & Pountney, D. L. 2018. Dexamethasone Inhibits Copper-Induced Alpha-Synuclein Aggregation By A Metallothionein-Dependent Mechanism. *Neurotoxicity Research* 33: 229–238.
- Mcnaught, K. S. P., Perl, D. P., Brownell, A. L. & Olanow, C. W. 2004. Systemic Exposure To Proteasome Inhibitors Causes A Progressive Model Of Parkinson's Disease. *Annals Of Neurology* 56(1): 149–162.

- Mehanna, R. & Jankovic, J. 2019. Young-Onset Parkinson's Disease: Its Unique Features And Their Impact On Quality Of Life. *Parkinsonism & Related Disorders* 65: 39–48.
- Mehra, S., Sahay, S. & Maji, S. K. 2019. A-Synuclein Misfolding And Aggregation: Implications In Parkinson's Disease Pathogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Proteins And Proteomics* 1867(10): 890–908.
- Mei, Y.-Y., Wu, D. C. & Zhou, N. 2018. Astrocytic Regulation Of Glutamate Transmission In Schizophrenia. *Frontiers In Psychiatry* 9: 544.
- Menza, M., Dobkin, R. D., Marin, H. & Bienfait, K. 2010. Sleep Disturbances In Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 25(S1): S117–S122.
- Meredith, G., Totterdell, S., Beales, M. & Meshul, C. 2009. Impaired Glutamate Homeostasis And Programmed Cell Death In A Chronic Mptp Mouse Model Of Parkinson's Disease. *Experimental Neurology* 219(1): 334–340.
- Metzger, J. M. & Emborg, M. E. 2019. Autonomic Dysfunction In Parkinson Disease And Animal Models. *Clinical Autonomic Research* 29(4): 397–414.
- Michael, G. J., Esmailzadeh, S., Moran, L. B., Christian, L., Pearce, R. K. & Graeber, M. B. 2011. Up-Regulation Of Metallothionein Gene Expression In Parkinsonian Astrocytes. *Neurogenetics* 12(4): 295–305.
- Michel, P. P., Hirsch, E. C. & Hunot, S. 2016. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways In Parkinson Disease. *Neuron* 90(4): 675–691.
- Miguel, R., Gago, M. F., Martins, J., Barros, P., Vale, J. & Rosas, M. J. 2014. Polg1-Related Levodopa-Responsive Parkinsonism. *Clinical Neurology And Neurosurgery* 126: 47–54.
- Mittal, S., Bjørnevik, K., Im, D. S., Flierl, A., Dong, X., Locascio, J. J., Abo, K. M., Long, E., Jin, M. & Xu, B. 2017. B2-Adrenoreceptor Is A Regulator Of The A-Synuclein Gene Driving Risk Of Parkinson's Disease. *Science* 357(6354): 891–898.
- Miura, N. & Koizumi, S. 2005. Gene Expression Profiles In The Liver And Kidney Of Metallothionein-Null Mice. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 332(4): 949–955.
- Miura, T., Muraoka, S. & Ogiso, T. 1997. Antioxidant Activity Of Metallothionein Compared With Reduced Glutathione. *Life Sciences* 60(21): 301–309.
- Miyazaki, I. & Asanuma, M. 2023. Multifunctional Metallothioneins As A Target For Neuroprotection In Parkinson's Disease. *Antioxidants* 12(4): 894.
- Miyazaki, I., Asanuma, M., Kikkawa, Y., Takeshima, M., Murakami, S., Miyoshi, K., Sogawa, N. & Kita, T. 2011. Astrocyte - Derived Metallothionein Protects Dopaminergic Neurons From Dopamine Quinone Toxicity. *Glia* 59(3): 435–451.

- Mizuno, Y., Ohta, S., Tanaka, M., Takamiya, S., Suzuki, K., Sato, T., Oya, H., Ozawa, T. & Kagawa, Y. 1989. Deficiencies In Complex I Subunits Of The Respiratory Chain In Parkinson's Disease. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 163(3): 1450–1455.
- Moehle, M. S. & West, A. B. 2015. M1 And M2 Immune Activation In Parkinson's Disease: Foe And Ally? *Neuroscience* 302: 59–73.
- Moffatt, P. & Denizeau, F. 1997. Metallothionein In Physiological And Physiopathological Processes. *Drug Metabolism Reviews* 29(1-2): 261–307.
- Mogi, M., Harada, M., Narabayashi, H., Inagaki, H., Minami, M. & Nagatsu, T. 1996. Interleukin (Il)-1 $\beta$ , Il-2, Il-4, Il-6 And Transforming Growth Factor-A Levels Are Elevated In Ventricular Cerebrospinal Fluid In Juvenile Parkinsonism And Parkinson's Disease. *Neuroscience Letters* 211(1): 13–16.
- Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K. & Nagatsu, T. 1994. Tumor Necrosis Factor-A (Tnf-A) Increases Both In The Brain And In The Cerebrospinal Fluid From Parkinsonian Patients. *Neuroscience Letters* 165(1-2): 208–210.
- Mohamad Najib, N. H., Yahaya, M. F., Das, S. & Teoh, S. L. 2023. The Effects Of Metallothionein In Paraquat-Induced Parkinson Disease Model Of Zebrafish. *International Journal Of Neuroscience* 133(8): 822–833.
- Mohamed, W. 2024. Induction And Validation Of Zebrafish Model Of Parkinson's Disease. In (Ed.). *Zebrafish As A Model For Parkinson's Disease*, Pp.204–214. CRC Press.
- Montalbán-Rodríguez, A., Abalo, R. & López-Gómez, L. 2024. From The Gut To The Brain: The Role Of Enteric Glial Cells And Their Involvement In The Pathogenesis Of Parkinson's Disease. *International Journal Of Molecular Sciences* 25(2): 1294.
- Monteith, A. J. & Skaar, E. P. 2021. The Impact Of Metal Availability On Immune Function During Infection. *Trends In Endocrinology & Metabolism* 32(11): 916–928.
- Montgomery, S. L. & Bowers, W. J. 2012. Tumor Necrosis Factor-Alpha And The Roles It Plays In Homeostatic And Degenerative Processes Within The Central Nervous System. *Journal Of Neuroimmune Pharmacology* 7(1): 42–59.
- Moon, H. E. & Paek, S. H. 2015. Mitochondrial Dysfunction In Parkinson's Disease. *Experimental Neurobiology* 24(2): 103.
- Morgan, M. J. & Liu, Z.-G. 2011. Crosstalk Of Reactive Oxygen Species And Nf-Kb Signaling. *Cell Research* 21(1): 103–115.
- Mori, T., Miyamoto, T., Yoshida, H., Asakawa, M., Kawasumi, M., Kobayashi, T., Morioka, H., Chiba, K., Toyama, Y. & Yoshimura, A. 2011. Il-1 $\beta$  And Tnf $\alpha$ -Initiated Il-6–Stat3 Pathway Is Critical In Mediating Inflammatory Cytokines

And Rankl Expression In Inflammatory Arthritis. *International Immunology* 23(11): 701–712.

Mou, Y., Du, Y., Zhou, L., Yue, J., Hu, X., Liu, Y., Chen, S., Lin, X., Zhang, G. & Xiao, H. 2022. Gut Microbiota Interact With The Brain Through Systemic Chronic Inflammation: Implications On Neuroinflammation, Neurodegeneration, And Aging. *Frontiers In Immunology* 13: 796288.

Mukherjee, P., Roy, S., Ghosh, D. & Nandi, S. 2022. Role Of Animal Models In Biomedical Research: A Review. *Laboratory Animal Research* 38(1): 18.

Mukherjee, S., Klaus, C., Pricop-Jeckstadt, M., Miller, J. A. & Struebing, F. L. 2019. A Microglial Signature Directing Human Aging And Neurodegeneration-Related Gene Networks. *Frontiers In Neuroscience* 13: 2.

Mulak, A. & Bonaz, B. 2015. Brain-Gut-Microbiota Axis In Parkinson's Disease. *World Journal Of Gastroenterology: WJG* 21(37): 10609.

Mule, N. K. & Singh, J. N. 2018. Diabetes Mellitus To Neurodegenerative Disorders: Is Oxidative Stress Fueling The Flame? *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)* 17(9): 644–653.

Müller, T. 2025. Update On The Present And Future Pharmacologic Treatment Of Parkinson's Disease. *Neurology And Therapy* 14(5): 1769–1781.

Müller, T., Blum - Degen, D., Przuntek, H. & Kuhn, W. 1998. Short Communication Interleukin - 6 Levels In Cerebrospinal Fluid Inversely Correlate To Severity Of Parkinson's Disease. *Acta Neurologica Scandinavica* 98(2): 142–144.

Murakami, S., Miyazaki, I., Sogawa, N., Miyoshi, K. & Asanuma, M. 2014. Neuroprotective Effects Of Metallothionein Against Rotenone-Induced Myenteric Neurodegeneration In Parkinsonian Mice. *Neurotoxicity Research* 26: 285–298.

Murray, K. N., Clark, T. S., Kebus, M. J. & Kent, M. L. 2022. Specific Pathogen Free—A Review Of Strategies In Agriculture, Aquaculture, And Laboratory Mammals And How They Inform New Recommendations For Laboratory Zebrafish. *Research In Veterinary Science* 142: 78–93.

Musgrove, R. E., Helwig, M., Bae, E.-J., Aboutaleb, H., Lee, S.-J., Ulusoy, A. & Di Monte, D. A. 2019. Oxidative Stress In Vagal Neurons Promotes Parkinsonian Pathology And Intercellular A-Synuclein Transfer. *The Journal Of Clinical Investigation* 129(9): 3738–3753.

Muzio, L., Viotti, A. & Martino, G. 2021. Microglia In Neuroinflammation And Neurodegeneration: From Understanding To Therapy. *Frontiers In Neuroscience* 15: 742065.

- Naert, T. & Vleminckx, K. 2018. Crispr/Cas9 Disease Models In Zebrafish And Xenopus: The Genetic Renaissance Of Fish And Frogs. *Drug Discovery Today: Technologies* 28: 41–52.
- Nakagawa, Y. & Chiba, K. 2016. Involvement Of Neuroinflammation During Brain Development In Social Cognitive Deficits In Autism Spectrum Disorder And Schizophrenia. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 358(3): 504–515.
- Nakazato, K., Tomioka, S., Nakajima, K., Saito, H., Kato, M., Kodaira, T., Yatsuzuka, S.-I., Shimomura, Y., Hiroki, T. & Motoyama, K. 2014. Determination Of The Serum Metallothionein (Mt) 1/2 Concentration In Patients With Wilson's Disease And Menkes Disease. *Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology* 28(4): 441–447.
- Nandhu, M., Paul, J., Kuruvila, K. P., Abraham, P. M., Antony, S. & Paulose, C. 2011. Glutamate And Nmda Receptors Activation Leads To Cerebellar Dysfunction And Impaired Motor Coordination In Unilateral 6-Hydroxydopamine Lesioned Parkinson's Rat: Functional Recovery With Bone Marrow Cells, Serotonin And Gaba. *Molecular And Cellular Biochemistry* 353: 47–57.
- Navarro-Sempere, A., Martínez-Peinado, P., Rodrigues, A. S., Garcia, P. V., Camarinho, R., Grindlay, G., Gras, L., García, M. & Segovia, Y. 2023. Metallothionein Expression In The Central Nervous System In Response To Chronic Heavy Metal Exposure: Possible Neuroprotective Mechanism. *Environmental Geochemistry And Health* 45(11): 8257–8269.
- Nawaz, M. S., Asghar, R., Pervaiz, N., Ali, S., Hussain, I., Xing, P., Bao, Y. & Abbasi, A. A. 2020. Molecular Evolutionary And Structural Analysis Of Human Uchl1 Gene Demonstrates The Relevant Role Of Intragenic Epistasis In Parkinson's Disease And Other Neurological Disorders. *BMC Evolutionary Biology* 20(1): 130.
- Netea, M. G., Simon, A., Van De Veerdonk, F., Kullberg, B.-J., Van Der Meer, J. W. & Joosten, L. A. 2010. Il-1 $\beta$  Processing In Host Defense: Beyond The Inflammasomes. *PLoS Pathogens* 6(2): E1000661.
- Ng, P., Li, K., Wong, R., Chui, K., Wong, E., Li, G. & Fok, T. 2003. Proinflammatory And Anti-Inflammatory Cytokine Responses In Preterm Infants With Systemic Infections. *Archives Of Disease In Childhood Fetal And Neonatal Edition* 88(3): F209.
- Ni, A. & Ernst, C. 2022. Evidence That Substantia Nigra Pars Compacta Dopaminergic Neurons Are Selectively Vulnerable To Oxidative Stress Because They Are Highly Metabolically Active. *Frontiers In Cellular Neuroscience* 16: 826193.
- Niciu, M. J., Kelmendi, B. & Sanacora, G. 2012. Overview Of Glutamatergic Neurotransmission In The Nervous System. *Pharmacology Biochemistry And Behavior* 100(4): 656–664.

- Nielsen, A. E., Bohr, A. & Penkowa, M. 2006. The Balance Between Life And Death Of Cells: Roles Of Metallothioneins. *Biomarker Insights* 1: 117727190600100016.
- Niranjan, R. 2014. The Role Of Inflammatory And Oxidative Stress Mechanisms In The Pathogenesis Of Parkinson's Disease: Focus On Astrocytes. *Molecular Neurobiology* 49: 28–38.
- Nishimura, M., Mizuta, I., Mizuta, E., Yamasaki, S., Ohta, M., Kaji, R. & Kuno, S. 2001. Tumor Necrosis Factor Gene Polymorphisms In Patients With Sporadic Parkinson's Disease. *Neuroscience Letters* 311(1): 1–4.
- Noor, S. M. & Norazit, A. 2022. Fishing For Synucleinopathy Models. *Fisheries And Aquatic Sciences* 25(3): 117–139.
- Nor Azman, N. H. E., Goon, J. A., Abdul Ghani, S. M., Hamid, Z. & Wan Ngah, W. Z. 2018. Comparing Palm Oil, Tocotrienol-Rich Fraction And A-Tocopherol Supplementation On The Antioxidant Levels Of Older Adults. *Antioxidants* 7(6): 74.
- Nordberg, M. 1998. Metallothioneins: Historical Review And State Of Knowledge. *Talanta* 46(2): 243–254.
- Nordberg, M. & Nordberg, G. F. 2022. Metallothionein And Cadmium Toxicology—Historical Review And Commentary. *Biomolecules* 12(3): 360.
- O'gorman Tuura, R. L., Baumann, C. R. & Baumann-Vogel, H. 2018. Beyond Dopamine: Gaba, Glutamate, And The Axial Symptoms Of Parkinson Disease. *Frontiers In Neurology* 9: 806.
- O'shea, J. J., Ma, A. & Lipsky, P. 2002. Cytokines And Autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* 2(1): 37–45.
- Obeso, J. A., Rodríguez - Oroz, M. C., Benitez - Temino, B., Blesa, F. J., Guridi, J., Marin, C. & Rodriguez, M. 2008. Functional Organization Of The Basal Ganglia: Therapeutic Implications For Parkinson's Disease. *Movement Disorders: Official Journal Of The Movement Disorder Society* 23(S3): S548–S559.
- Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. 2009. The Nf-Kb Family Of Transcription Factors And Its Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology* 1(4): A000034.
- Okita, Y., Rcom-H'cheo-Gauthier, A. N., Goulding, M., Chung, R. S., Faller, P. & Pountney, D. L. 2017. Metallothionein, Copper And Alpha-Synuclein In Alpha-Synucleinopathies. *Frontiers In Neuroscience* 11: 114.
- Olszewska, D. A., Fearon, C. & Lynch, T. 2016. Novel Gene (Tmem230) Linked To Parkinson's Disease. *Journal Of Clinical Movement Disorders* 3(1): 17.
- Opara, J. A., Małeckki, A., Małeczka, E. & Socha, T. 2017. Motor Assessment In Parkinsons Disease. *Annals Of Agricultural And Environmental Medicine* 24(3):

- Orihuela, R., Fernandez, B., Palacios, O., Valero, E., Atrian, S., Watt, R. K., Domínguez-Vera, J. M. & Capdevila, M. 2011. Ferritin And Metallothionein: Dangerous Liaisons. *Chemical Communications* 47(44): 12155–12157.
- Ouchi, Y., Yoshikawa, E., Sekine, Y., Futatsubashi, M., Kanno, T., Ogusu, T. & Torizuka, T. 2005. Microglial Activation And Dopamine Terminal Loss In Early Parkinson's Disease. *Annals Of Neurology* 57(2): 168–175.
- Pacelli, C., Giguère, N., Bourque, M.-J., Lévesque, M., Slack, R. S. & Trudeau, L.-É. 2015. Elevated Mitochondrial Bioenergetics And Axonal Arborization Size Are Key Contributors To The Vulnerability Of Dopamine Neurons. *Current Biology* 25(18): 2349–2360.
- Pagonabarraga, J., Tinazzi, M., Caccia, C. & Jost, W. H. 2021. The Role Of Glutamatergic Neurotransmission In The Motor And Non-Motor Symptoms In Parkinson's Disease: Clinical Cases And A Review Of The Literature. *Journal Of Clinical Neuroscience* 90: 178–183.
- Paisán-Ruiz, C., Lewis, P. A. & Singleton, A. B. 2013. Lrrk2: Cause, Risk, And Mechanism. *Journal Of Parkinson's Disease* 3(2): 85–103.
- Paithankar, J. G., Saini, S., Dwivedi, S., Sharma, A. & Chowdhuri, D. K. 2021. Heavy Metal Associated Health Hazards: An Interplay Of Oxidative Stress And Signal Transduction. *Chemosphere* 262: 128350.
- Palmiter, R. D., Findley, S. D., Whitmore, T. E. & Durnam, D. M. 1992. Mt-iii, A Brain-Specific Member Of The Metallothionein Gene Family. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 89(14): 6333–6337.
- Parameswari, E., Ilakiya, T., Davamani, V., Kalaiselvi, P. & Sebastian, S. P. 2021. Metallothioneins: Diverse Protein Family To Bind Metallic Ions. *Heavy Metals-Their Environmental Impacts And Mitigation*.
- Park, J.-S., Koentjoro, B., Veivers, D., Mackay-Sim, A. & Sue, C. M. 2014. Parkinson's Disease-Associated Human Atp13a2 (Park9) Deficiency Causes Zinc Dyshomeostasis And Mitochondrial Dysfunction. *Human Molecular Genetics* 23(11): 2802–2815.
- Park, S., Yoon, Y., Kang, S., Kim, T., Kim, Y., Joo, H., Kim, H., Jeong, K., Lee, D. & Lee, S. 2011. Impact Of Il2 And Il2rb Genetic Polymorphisms In Kidney Transplantation. *Transplantation Proceedings*, Pp.2383–2387.
- Parker Jr, W. D., Boyson, S. J. & Parks, J. K. 1989. Abnormalities Of The Electron Transport Chain In Idiopathic Parkinson's Disease. *Annals Of Neurology: Official Journal Of The American Neurological Association And The Child Neurology Society* 26(6): 719–723.
- Parker Jr, W. D., Parks, J. K. & Swerdlow, R. H. 2008. Complex I Deficiency In Parkinson's Disease Frontal Cortex. *Brain Research* 1189: 215–218.

- Parkinson, J. 2002. An Essay On The Shaking Palsy. *The Journal Of Neuropsychiatry And Clinical Neurosciences* 14(2): 223–236.
- Parkinson Study Group. 2002. A Controlled Trial Of Rasagiline In Early Parkinson Disease: The Tempo Study. *Archives Of Neurology* 59(12): 1937–1943.
- Parkinson Study Group. 2005. A Randomized Placebo-Controlled Trial Of Rasagiline In Levodopa-Treated Patients With Parkinson Disease And Motor Fluctuations: The Presto Study. *Archives Of Neurology* 62(2): 241–248.
- Patankar, H. V., Al-Harrasi, I., Al Kharusi, L., Jana, G. A., Al-Yahyai, R., Sunkar, R. & Yaish, M. W. 2019. Overexpression Of A Metallothionein 2a Gene From Date Palm Confers Abiotic Stress Tolerance To Yeast And Arabidopsis Thaliana. *International Journal Of Molecular Sciences* 20(12): 2871.
- Pearson, B. L., Simon, J. M., Mccoy, E. S., Salazar, G., Fragola, G. & Zylka, M. J. 2016. Identification Of Chemicals That Mimic Transcriptional Changes Associated With Autism, Brain Aging And Neurodegeneration. *Nature Communications* 7(1): 11173.
- Pedersen, M. Ø., Jensen, R., Pedersen, D. S., Skjolding, A. D., Hempel, C., Maretty, L. & Penkowa, M. 2009. Metallothionein - I+ II In Neuroprotection. *Biofactors* 35(4): 315–325.
- Peng, Y., Chang, X. & Lang, M. 2021. Iron Homeostasis Disorder And Alzheimer's Disease. *International Journal Of Molecular Sciences* 22(22): 12442.
- Penkowa, M. 2006. Metallothioneins Are Multipurpose Neuroprotectants During Brain Pathology. *The FEBS Journal* 273(9): 1857–1870.
- Penkowa, M., Cáceres, M., Borup, R., Nielsen, F. C., Poulsen, C. B., Quintana, A., Molinero, A., Carrasco, J., Florit, S. & Giralt, M. 2006. Novel Roles For Metallothionein - I+ II (Mt - I+ II) In Defense Responses, Neurogenesis, And Tissue Restoration After Traumatic Brain Injury: Insights From Global Gene Expression Profiling In Wild - Type And Mt - I+ II Knockout Mice. *Journal Of Neuroscience Research* 84(7): 1452–1474.
- Penkowa, M., Florit, S., Giralt, M., Quintana, A., Molinero, A., Carrasco, J. & Hidalgo, J. 2005. Metallothionein Reduces Central Nervous System Inflammation, Neurodegeneration, And Cell Death Following Kainic Acid - Induced Epileptic Seizures. *Journal Of Neuroscience Research* 79(4): 522–534.
- Peralta, D., Bronowska, A. K., Morgan, B., Dóka, É., Van Laer, K., Nagy, P., Gräter, F. & Dick, T. P. 2015. A Proton Relay Enhances H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Sensitivity Of Gapdh To Facilitate Metabolic Adaptation. *Nature Chemical Biology* 11(2): 156–163.
- Pereira, C. S., Teixeira, M. H., Russell, D. A., Hirst, J. & Arantes, G. M. 2023. Mechanism Of Rotenone Binding To Respiratory Complex I Depends On Ligand Flexibility. *Scientific Reports* 13(1): 6738.

- Perier, C., Bove, J., Dehay, B., Jackson - Lewis, V., Rabinovitch, P. S., Przedborski, S. & Vila, M. 2010. Apoptosis - Inducing Factor Deficiency Sensitizes Dopaminergic Neurons To Parkinsonian Neurotoxins. *Annals Of Neurology* 68(2): 184–192.
- Phillips, J. B. & Westerfield, M. 2014. Zebrafish Models In Translational Research: Tipping The Scales Toward Advancements In Human Health. *Disease Models & Mechanisms* 7(7): 739–743.
- Piccinin, E., Sardanelli, A. M., Seibel, P., Moschetta, A., Cocco, T. & Villani, G. 2021. Pgc-1s In The Spotlight With Parkinson's Disease. *International Journal Of Molecular Sciences* 22(7): 3487.
- Pienaar, I. S. & Chinnery, P. F. 2013. Existing And Emerging Mitochondrial-Targeting Therapies For Altering Parkinson's Disease Severity And Progression. *Pharmacology & Therapeutics* 137(1): 1–21.
- Pihlstrøm, L., Blauwendraat, C., Cappelletti, C., Berge - Seidl, V., Langmyhr, M., Henriksen, S. P., Van De Berg, W. D., Gibbs, J. R., Cookson, M. R. & Consortium, I. P. D. G. 2018. A Comprehensive Analysis Of Snca - Related Genetic Risk In Sporadic Parkinson Disease. *Annals Of Neurology* 84(1): 117–129.
- Pinsky, M. R., Vincent, J.-L., Deviere, J., Alegre, M., Kahn, R. J. & Dupont, E. 1993. Serum Cytokine Levels In Human Septic Shock: Relation To Multiple-System Organ Failure And Mortality. *Chest* 103(2): 565–575.
- Pizarro-Galleguillos, B. M., Kunert, L., Brüggemann, N. & Prasuhn, J. 2022. Iron-And Neuromelanin-Weighted Neuroimaging To Study Mitochondrial Dysfunction In Patients With Parkinson's Disease. *International Journal Of Molecular Sciences* 23(22): 13678.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D. & Bitto, A. 2017. Oxidative Stress: Harms And Benefits For Human Health. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity* 2017(1): 8416763.
- Poewe, W. & Antonini, A. 2015. Novel Formulations And Modes Of Delivery Of Levodopa. *Movement Disorders* 30(1): 114–120.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.-E. & Lang, A. E. 2017. Parkinson Disease. *Nature Reviews Disease Primers* 3(1): 1–21.
- Poliani, P. L., Wang, Y., Fontana, E., Robinette, M. L., Yamanishi, Y., Gilfillan, S. & Colonna, M. 2015. Trem2 Sustains Microglial Expansion During Aging And Response To Demyelination. *The Journal Of Clinical Investigation* 125(5): 2161–2170.

- Post, B., Van Den Heuvel, L., Van Prooije, T., Van Ruissen, X., Van De Warrenburg, B. & Nonnekes, J. 2020. Young Onset Parkinson's Disease: A Modern And Tailored Approach. *Journal Of Parkinson's Disease* 10(S1): S29–S36.
- Prange, S., Klinger, H., Laurencin, C., Danaila, T. & Thobois, S. 2022. Depression In Patients With Parkinson's Disease: Current Understanding Of Its Neurobiology And Implications For Treatment. *Drugs & Aging* 39(6): 417–439.
- Prasuhn, J., Göttlich, M., Gerkan, F., Kourou, S., Ebeling, B., Kasten, M., Hanssen, H., Klein, C. & Brüggemann, N. 2022. Relationship Between Brain Iron Deposition And Mitochondrial Dysfunction In Idiopathic Parkinson's Disease. *Molecular Medicine* 28(1): 28.
- Puspita, L., Chung, S. Y. & Shim, J.-W. 2017. Oxidative Stress And Cellular Pathologies In Parkinson's Disease. *Molecular Brain* 10: 1–12.
- Qian, L., Flood, P. M. & Hong, J.-S. 2010. Neuroinflammation Is A Key Player In Parkinson's Disease And A Prime Target For Therapy. *Journal Of Neural Transmission* 117: 971–979.
- Qu, F., Wang, P., Zhang, K., Shi, Y., Li, Y., Li, C., Lu, J., Liu, Q. & Wang, X. 2020. Manipulation Of Mitophagy By “All-In-One” Nanosensitizer Augments Sonodynamic Glioma Therapy. *Autophagy* 16(8): 1413–1435.
- Radad, K., Al-Shraim, M., Al-Emam, A., Wang, F., Kranner, B., Rausch, W.-D. & Moldzio, R. 2019. Rotenone: From Modelling To Implication In Parkinson's Disease. *Folia Neuropathologica* 57(4): 317–326.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S. & Dhama, K. 2014. Oxidative Stress, Prooxidants, And Antioxidants: The Interplay. *Biomed Research International* 2014:
- Raimondi, V., Ciccicarese, F. & Ciminale, V. 2020. Oncogenic Pathways And The Electron Transport Chain: A Dangerous Liaison. *British Journal Of Cancer* 122(2): 168–181.
- Raj, K., Kaur, P., Gupta, G. & Singh, S. 2021. Metals Associated Neurodegeneration In Parkinson's Disease: Insight To Physiological, Pathological Mechanisms And Management. *Neuroscience Letters* 753: 135873.
- Ransohoff, R. M. & Perry, V. H. 2009. Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annual Review Of Immunology* 27(1): 119–145.
- Rappold, P. M., Cui, M., Chesser, A. S., Tibbett, J., Grima, J. C., Duan, L., Sen, N., Javitch, J. A. & Tieu, K. 2011. Paraquat Neurotoxicity Is Mediated By The Dopamine Transporter And Organic Cation Transporter-3. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 108(51): 20766–20771.
- Rasheed, M., Liang, J., Wang, C., Deng, Y. & Chen, Z. 2021. Epigenetic Regulation Of Neuroinflammation In Parkinson's Disease. *International Journal Of Molecular Sciences* 22(9): 4956.

- Ravichandran, K. A. & Heneka, M. T. 2023. Inflammasome And Neurodegenerative Diseases. In (Ed.). *Inflammasome Biology*, Pp.291–326. Elsevier.
- Raza, C. & Anjum, R. 2019. Parkinson's Disease: Mechanisms, Translational Models And Management Strategies. *Life Sciences* 226: 77–90.
- Réaux-Le Goazigo, A., Van Steenwinckel, J., Rostène, W. & Parsadaniantz, S. M. 2013. Current Status Of Chemokines In The Adult Cns. *Progress In Neurobiology* 104: 67–92.
- Recasens, A. & Dehay, B. 2014. Alpha-Synuclein Spreading In Parkinson's Disease. *Frontiers In Neuroanatomy* 8: 159.
- Reich, S. G. & Savitt, J. M. 2019. Parkinson's Disease. *Medical Clinics Of North America* 103(2): 337–350.
- Reinecke, F., Levanets, O., Olivier, Y., Louw, R., Semete, B., Grobler, A., Hidalgo, J., Smeitink, J., Olckers, A. & Van Der Westhuizen, F. H. 2006. Metallothionein Isoform 2a Expression Is Inducible And Protects Against Ros-Mediated Cell Death In Rotenone-Treated Hela Cells. *Biochemical Journal* 395(2): 405–415.
- Ren, J., Hua, P., Pan, C., Li, Y., Zhang, L., Zhang, W., Xu, P., Zhang, M. & Liu, W. 2020. Non-Motor Symptoms Of The Postural Instability And Gait Difficulty Subtype In De Novo Parkinson's Disease Patients: A Cross-Sectional Study In A Single Center. *Neuropsychiatric Disease And Treatment*: 2605–2612.
- Ren, Y., Chen, Q., Wu, M., Mei, K., Liu, H. & Cheng, S. 2026. Foliar Application Of Fe<sup>2+</sup> At Heading Stage Modulates 2-Acetyl-1-Pyrroline Accumulation, Antioxidant Capacity, And Yield Formation In Fragrant Rice. *Journal Of Cereal Science*: 104416.
- Rico, E., Rosemberg, D., Seibt, K., Capiotti, K., Da Silva, R. & Bonan, C. D. 2011. Zebrafish Neurotransmitter Systems As Potential Pharmacological And Toxicological Targets. *Neurotoxicology And Teratology* 33(6): 608–617.
- Rink, E. & Wullimann, M. F. 2002a. Connections Of The Ventral Telencephalon And Tyrosine Hydroxylase Distribution In The Zebrafish Brain (Danio Rerio) Lead To Identification Of An Ascending Dopaminergic System In A Teleost. *Brain Research Bulletin* 57(3-4): 385–387.
- Rink, E. & Wullimann, M. F. 2002b. Development Of The Catecholaminergic System In The Early Zebrafish Brain: An Immunohistochemical Study. *Developmental Brain Research* 137(1): 89–100.
- Rocha, S. M., Bantle, C. M., Aboellail, T., Chatterjee, D., Smeyne, R. J. & Tjalkens, R. B. 2022. Rotenone Induces Regionally Distinct A-Synuclein Protein Aggregation And Activation Of Glia Prior To Loss Of Dopaminergic Neurons In C57bl/6 Mice. *Neurobiology Of Disease* 167: 105685.
- Rodríguez-Cruz, A., Romo-Mancillas, A., Mendiola-Precoma, J., Escobar-Cabrera, J. E., García-Alcocer, G. & Berumen, L. C. 2020. Effect Of Valerenic Acid On

Neuroinflammation In A Mptp-Induced Mouse Model Of Parkinson's Disease. *IBRO Reports* 8: 28–35.

Rothaug, M., Becker-Pauly, C. & Rose-John, S. 2016. The Role Of Interleukin-6 Signaling In Nervous Tissue. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1863(6): 1218–1227.

Röytt, Collan & Rinne. 1999. Unbiased Morphometrical Measurements Show Loss Of Pigmented Nigral Neurones With Ageing. *Neuropathology And Applied Neurobiology* 25(5): 394–399.

Royzman, D., Andreev, D., Stich, L., Peckert-Maier, K., Wild, A. B., Zinser, E., Mühl-Zürbes, P., Jones, E., Adam, S. & Frey, S. 2022. The Soluble Cd83 Protein Prevents Bone Destruction By Inhibiting The Formation Of Osteoclasts And Inducing Resolution Of Inflammation In Arthritis. *Frontiers In Immunology* 13: 936995.

Rubio, C., Serrano-García, N., Taddei, E., Castañeda, E., Romo, H. & Rubio-Osornio, M. 2025. Rotenone-Induced Mitochondrial Dysfunction, Neuroinflammation, Oxidative Stress, And Glial Activation In Parkinson's And Alzheimer's Diseases. *Biocell* 49(8): 1391–1412.

Ruiz, L. M., Libedinsky, A. & Elorza, A. A. 2021. Role Of Copper On Mitochondrial Function And Metabolism. *Frontiers In Molecular Biosciences* 8: 711227.

Ruiz-Martinez, J., Krebs, C. E., Makarov, V., Gorostidi, A., Martí-Massó, J. F. & Paisán-Ruiz, C. 2015. Ggyl2 Mutation In Late-Onset Parkinson's Disease With Cognitive Impairment. *Journal Of Human Genetics* 60(10): 637–640.

Ruiz-Pozo, V. A., Tamayo-Trujillo, R., Cadena-Ullauri, S., Frias-Toral, E., Guevara-Ramírez, P., Paz-Cruz, E., Chapela, S., Montalván, M., Morales-López, T. & Simancas-Racines, D. 2023. The Molecular Mechanisms Of The Relationship Between Insulin Resistance And Parkinson's Disease Pathogenesis. *Nutrients* 15(16): 3585.

Ruttkay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V. & Kizek, R. 2013. The Role Of Metallothionein In Oxidative Stress. *International Journal Of Molecular Sciences* 14(3): 6044–6066.

Ruzicka, L., Howe, D. G., Ramachandran, S., Toro, S., Van Slyke, C. E., Bradford, Y. M., Eagle, A., Fashena, D., Frazer, K. & Kalita, P. 2019. The Zebrafish Information Network: New Support For Non-Coding Genes, Richer Gene Ontology Annotations And The Alliance Of Genome Resources. *Nucleic Acids Research* 47(D1): D867–D873.

Sabolić, I., Breljak, D., Škarica, M. & Herak-Kramberger, C. M. 2010. Role Of Metallothionein In Cadmium Traffic And Toxicity In Kidneys And Other Mammalian Organs. *Biometals* 23: 897–926.

- Sadiq, I. Z. 2023. Free Radicals And Oxidative Stress: Signaling Mechanisms, Redox Basis For Human Diseases, And Cell Cycle Regulation. *Current Molecular Medicine* 23(1): 13–35.
- Saengphatrachai, W., Praditukrit, K., Owattanapanich, W., Pitakpatapee, Y. & Srivanitchapoom, P. 2021. The Association Between Developing Parkinson's Disease And B-Adrenoceptor Acting Agents Use: A Systematic Review And Meta-Analysis. *Journal Of The Neurological Sciences* 430: 120009.
- Saenz - Antoñanzas, A., Muñoz - Culla, M., Rigo, P., Ruiz - Barreiro, L., Moreno - Valladares, M., Alberro, A., Cruces - Salguero, S., Arroyo - Izaga, M., Arranz, A. M. & Otaegui, D. 2024. Centenarian Hippocampus Displays High Levels Of Astrocytic Metallothioneins. *Aging Cell*: E14201.
- Saijo, K., Winner, B., Carson, C. T., Collier, J. G., Boyer, L., Rosenfeld, M. G., Gage, F. H. & Glass, C. K. 2009. A Nurr1/Corest Pathway In Microglia And Astrocytes Protects Dopaminergic Neurons From Inflammation-Induced Death. *Cell* 137(1): 47–59.
- Saini, N., Georgiev, O. & Schaffner, W. 2011. The Parkin Mutant Phenotype In The Fly Is Largely Rescued By Metal-Responsive Transcription Factor (Mtf-1). *Molecular And Cellular Biology* 31(10): 2151–2161.
- Salama, R. M., Darwish, S. F., Yehia, R., Eissa, N., Elmongy, N. F., Abd-Elgalil, M. M., Schaalán, M. F. & El Wakeel, S. A. 2024. Apilarnil Exerts Neuroprotective Effects And Alleviates Motor Dysfunction By Rebalancing M1/M2 Microglia Polarization, Regulating Mir-155 And Mir-124 Expression In A Rotenone-Induced Parkinson's Disease Rat Model. *International Immunopharmacology* 137: 112536.
- Sallinen, V., Torkko, V., Sundvik, M., Reenilä, I., Khrustalyov, D., Kaslin, J. & Panula, P. 2009. Mptp And Mpp<sup>+</sup> Target Specific Aminergic Cell Populations In Larval Zebrafish. *Journal Of Neurochemistry* 108(3): 719–731.
- Sampaio-Marques, B., Felgueiras, C., Silva, A., Rodrigues, M., Tenreiro, S., Franssens, V., Reichert, A. S., Outeiro, T. F., Winderickx, J. & Ludovico, P. 2012. SncA (A-Synuclein)-Induced Toxicity In Yeast Cells Is Dependent On Sir2-Mediated Mitophagy. *Autophagy* 8(10): 1494–1509.
- Sanders, L. H. & Greenamyre, J. T. 2013. Oxidative Damage To Macromolecules In Human Parkinson Disease And The Rotenone Model. *Free Radical Biology And Medicine* 62: 111–120.
- Santana, C., Rodriguez, M., Afonso, D. & Arevalo, R. 1992. Dopaminergic Neuron Development In Rats: Biochemical Study From Prenatal Life To Adulthood. *Brain Research Bulletin* 29(1): 7–13.
- Santoriello, C. & Zon, L. I. 2012. Hooked! Modeling Human Disease In Zebrafish. *The Journal Of Clinical Investigation* 122(7): 2337–2343.

- Santos, C. R., Martinho, A., Quintela, T. & Gonçalves, I. 2012. Neuroprotective And Neuroregenerative Properties Of Metallothioneins. *IUBMB Life* 64(2): 126–135.
- Saparov, A., Wagner, F. H., Zheng, R., Oliver, J. R., Maeda, H., Hockett, R. D. & Weaver, C. T. 1999. Interleukin-2 Expression By A Subpopulation Of Primary T Cells Is Linked To Enhanced Memory/Effector Function. *Immunity* 11(3): 271–280.
- Sassone, J., Reale, C., Dati, G., Regoni, M., Pellecchia, M. T. & Garavaglia, B. 2021. The Role Of Vps35 In The Pathobiology Of Parkinson's Disease. *Cellular And Molecular Neurobiology* 41(2): 199–227.
- Satish, G. 2017. Dehydroacetic Acid–Metal Complexes. In (Ed.). *Dehydroacetic Acid And Its Derivatives*, Pp.61–79. Elsevier.
- Sato, M. & Bremner, I. 1993. Oxygen Free Radicals And Metallothionein. *Free Radical Biology And Medicine* 14(3): 325–337.
- Scalzo, P., Kümmer, A., Cardoso, F. & Teixeira, A. L. 2009. Increased Serum Levels Of Soluble Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Receptor-1 In Patients With Parkinson's Disease. *Journal Of Neuroimmunology* 216(1-2): 122–125.
- Scalzo, P., Kümmer, A., Cardoso, F. & Teixeira, A. L. 2010. Serum Levels Of Interleukin-6 Are Elevated In Patients With Parkinson's Disease And Correlate With Physical Performance. *Neuroscience Letters* 468(1): 56–58.
- Schapira, A. 2007. Mitochondrial Dysfunction In Parkinson's Disease. *Cell Death & Differentiation* 14(7):
- Schapira, A., Cooper, J., Dexter, D., Clark, J., Jenner, P. & Marsden, C. 1990. Mitochondrial Complex I Deficiency In Parkinson's Disease. *Journal Of Neurochemistry* 54(3): 823–827.
- Schapira, A. H. 2008. Mitochondria In The Aetiology And Pathogenesis Of Parkinson's Disease. *The Lancet Neurology* 7(1): 97–109.
- Schapira, A. H. 2011. Monoamine Oxidase B Inhibitors For The Treatment Of Parkinson's Disease: A Review Of Symptomatic And Potential Disease-Modifying Effects. *CNS Drugs* 25: 1061–1071.
- Schmillen, A. D., Wang, D., Yap, W. A., Bandaogo, M. A. S. S., Simler, K., Binti Ali Ahmad, Z. & Abdur Rahman, A. B. 2020. A Silver Lining-Productive And Inclusive Aging For Malaysia.
- Schneider, R. B., Iourinets, J. & Richard, I. H. 2017. Parkinson's Disease Psychosis: Presentation, Diagnosis And Management. *Neurodegenerative Disease Management* 7(6): 365–376.
- Schober, A. 2004. Classic Toxin-Induced Animal Models Of Parkinson's Disease: 6-OHda And Mptp. *Cell And Tissue Research* 318(1): 215–224.

- Schoofs, H., Schmit, J. & Rink, L. 2024. Zinc Toxicity: Understanding The Limits. *Molecules* 29(13): 3130.
- Schormair, B., Kemlink, D., Mollenhauer, B., Fiala, O., Machetanz, G., Roth, J., Berutti, R., Strom, T. M., Haslinger, B. & Trenkwalder, C. 2018. Diagnostic Exome Sequencing In Early - Onset Parkinson's Disease Confirms Vps13c As A Rare Cause Of Autosomal - Recessive Parkinson's Disease. *Clinical Genetics* 93(3): 603–612.
- Schrag, A. & Taddei, R. N. 2017. Depression And Anxiety In Parkinson's Disease. *International Review Of Neurobiology* 133: 623–655.
- Schuler, F. & Casida, J. E. 2001. Functional Coupling Of Psst And Ndl Subunits In Nadh: Ubiquinone Oxidoreductase Established By Photoaffinity Labeling. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1506(1): 79–87.
- Scialò, F., Fernández-Ayala, D. J. & Sanz, A. 2017. Role Of Mitochondrial Reverse Electron Transport In Ros Signaling: Potential Roles In Health And Disease. *Frontiers In Physiology* 8: 428.
- Ségalat, L. 2007. Invertebrate Animal Models Of Diseases As Screening Tools In Drug Discovery. *ACS Chemical Biology* 2(4): 231–236.
- Seifert, E. L., Estey, C., Xuan, J. Y. & Harper, M.-E. 2010. Electron Transport Chain-Dependent And-Independent Mechanisms Of Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Emission During Long-Chain Fatty Acid Oxidation. *Journal Of Biological Chemistry* 285(8): 5748–5758.
- Sekovanić, A., Jurasović, J. & Piasek, M. 2020. Gene Polymorphisms In Relation To Diseases And Trace Element Levels In Humans. *Archives Of Industrial Hygiene And Toxicology* 71(1): 27–47.
- Semenzato, G. 1990. Tumour Necrosis Factor: A Cytokine With Multiple Biological Activities. *British Journal Of Cancer* 61(3): 354.
- Sequeira, L., Benfeito, S., Fernandes, C., Lima, I., Peixoto, J., Alves, C., Machado, C. S., Gaspar, A., Borges, F. & Chavarria, D. 2024. Drug Development For Alzheimer's And Parkinson's Disease: Where Do We Go Now? *Pharmaceutics* 16(6): 708.
- Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A. & Pamer, E. G. 2003. Tnf/Inos-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense Against Bacterial Infection. *Immunity* 19(1): 59–70.
- Serrano, L., Martínez-Redondo, P., Marazuela-Duque, A., Vazquez, B. N., Dooley, S. J., Voigt, P., Beck, D. B., Kane-Goldsmith, N., Tong, Q. & Rabanal, R. M. 2013. The Tumor Suppressor Sirt2 Regulates Cell Cycle Progression And Genome Stability By Modulating The Mitotic Deposition Of H4k20 Methylation. *Genes & Development* 27(6): 639–653.

- Sgambato-Faure, V. & Cenci, M. A. 2012. Glutamatergic Mechanisms In The Dyskinesias Induced By Pharmacological Dopamine Replacement And Deep Brain Stimulation For The Treatment Of Parkinson's Disease. *Progress In Neurobiology* 96(1): 69–86.
- Shah, S., Tryphena, K. P., Singh, G., Kulkarni, A., Pinjala, P. & Khatri, D. K. 2024. Neuroprotective Role Of Carvacrol Via Nrf2/Ho-1/Nlrp3 Axis In Rotenone-Induced Pd Mice Model. *Brain Research* 1836: 148954.
- Shaltouki, A., Hsieh, C.-H., Kim, M. J. & Wang, X. 2018. Alpha-Synuclein Delays Mitophagy And Targeting Miro Rescues Neuron Loss In Parkinson's Models. *Acta Neuropathologica* 136: 607–620.
- Shamsi, T. N. & Fatima, S. 2014. Metallothionein: Classification, Biochemical Features And Clinical Applications. *Journal Of Proteins And Proteomics* 5(1): 25–33.
- Sharma, P., Kishore, A., De, I., Negi, S., Kumar, G., Bhardwaj, S. & Singh, M. 2023. Mitigating Neuroinflammation In Parkinson's Disease: Exploring The Role Of Proinflammatory Cytokines And The Potential Of Phytochemicals As Natural Therapeutics. *Neurochemistry International*: 105604.
- Sharma, S. 2024. *The Charnolosome As A Novel Nanotheranostic Biomarker: Overcoming Future Challenges In Medicine*. Elsevier.
- Shen, H., Pirruccello, M. & De Camilli, P. 2012. Snapshot: Membrane Curvature Sensors And Generators. *Cell* 150(6): 1300–1300. E1302.
- Shiba-Fukushima, K., Inoshita, T., Hattori, N. & Imai, Y. 2014. Pink1-Mediated Phosphorylation Of Parkin Boosts Parkin Activity In Drosophila. *PLoS Genetics* 10(6): E1004391.
- Shimohama, S., Sawada, H., Kitamura, Y. & Taniguchi, T. 2003. Disease Model: Parkinson's Disease. *Trends In Molecular Medicine* 9(8): 360–365.
- Shulman, J. M., De Jager, P. L. & Feany, M. B. 2011. Parkinson's Disease: Genetics And Pathogenesis. *Annual Review Of Pathology: Mechanisms Of Disease* 6(1): 193–222.
- Si, M. & Lang, J. 2018. The Roles Of Metallothioneins In Carcinogenesis. *Journal Of Hematology & Oncology* 11: 1–20.
- Sieber, S., Grossen, P., Detampel, P., Siegfried, S., Witzigmann, D. & Huwyler, J. 2017. Zebrafish As An Early Stage Screening Tool To Study The Systemic Circulation Of Nanoparticulate Drug Delivery Systems In Vivo. *Journal Of Controlled Release* 264: 180–191.
- Sies, H., Berndt, C. & Jones, D. P. 2017. Oxidative Stress. *Annual Review Of Biochemistry* 86: 715–748.

- Sies, H. & Jones, D. P. 2020. Reactive Oxygen Species (Ros) As Pleiotropic Physiological Signalling Agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21(7): 363–383.
- Siima, A. A., Stephano, F., Munissi, J. J. & Nyandoro, S. S. 2020. Ameliorative Effects Of Flavonoids And Polyketides On The Rotenone Induced Drosophila Model Of Parkinson's Disease. *Neurotoxicology* 81: 209–215.
- Sillitoe, R. V. & Vogel, M. W. 2008. Desire, Disease, And The Origins Of The Dopaminergic System. *Schizophrenia Bulletin* 34(2): 212–219.
- Simi, A., Tsakiri, N., Wang, P. & Rothwell, N. 2007. Interleukin-1 And Inflammatory Neurodegeneration. *Biochemical Society Transactions* 35(5): 1122–1126.
- Simon, H.-U., Haj-Yehia, A. & Levi-Schaffer, F. 2000. Role Of Reactive Oxygen Species (Ros) In Apoptosis Induction. *Apoptosis* 5(5): 415–418.
- Simunovic, F., Yi, M., Wang, Y., Stephens, R. & Sonntag, K. C. 2010. Evidence For Gender-Specific Transcriptional Profiles Of Nigral Dopamine Neurons In Parkinson Disease. *PLoS One* 5(1): E8856.
- Singh, A., Hussain, S., Akkala, S., Klugarova, J., Pokorna, A., Klugar, M., Walters, E. H., Hopper, I., Campbell, J. A. & Taylor, B. 2022. Beta-Adrenergic Drugs And Risk Of Parkinson's Disease: A Systematic Review And Meta-Analysis. *Ageing Research Reviews* 80: 101670.
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L. & Kukreti, S. 2019. Oxidative Stress: A Key Modulator In Neurodegenerative Diseases. *Molecules* 24(8): 1583.
- Singh, A., Tripathi, P. & Singh, S. 2021. Neuroinflammatory Responses In Parkinson's Disease: Relevance Of Ibuprofen In Therapeutics. *Inflammopharmacology* 29(1): 5–14.
- Singh, C. K., Chhabra, G., Ndiaye, M. A., Garcia-Peterson, L. M., Mack, N. J. & Ahmad, N. 2018. The Role Of Sirtuins In Antioxidant And Redox Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* 28(8): 643–661.
- Singh, R., Zahra, W., Singh, S. S., Birla, H., Rathore, A. S., Keshri, P. K., Dilnashin, H., Singh, S. & Singh, S. P. 2023. Oleuropein Confers Neuroprotection Against Rotenone-Induced Model Of Parkinson's Disease Via Bdnf/Creb/Akt Pathway. *Scientific Reports* 13(1): 2452.
- Singhal, A., Morris, V., Labhasetwar, V. & Ghorpade, A. 2013. Nanoparticle-Mediated Catalase Delivery Protects Human Neurons From Oxidative Stress. *Cell Death & Disease* 4(11): E903–E903.
- Singleton, A. B., Farrer, M. J. & Bonifati, V. 2013. The Genetics Of P Arkinson's Disease: Progress And Therapeutic Implications. *Movement Disorders* 28(1): 14–23.

- Sivamaruthi, B. S., Raghani, N., Chorawala, M., Bhattacharya, S., Prajapati, B. G., Elossaily, G. M. & Chaiyasut, C. 2023. Nf-Kb Pathway And Its Inhibitors: A Promising Frontier In The Management Of Alzheimer's Disease. *Biomedicines* 11(9): 2587.
- Smith, J. A., Das, A., Ray, S. K. & Banik, N. L. 2012. Role Of Pro-Inflammatory Cytokines Released From Microglia In Neurodegenerative Diseases. *Brain Research Bulletin* 87(1): 10–20.
- Smith, L. J., Bolsinger, M. M., Chau, K.-Y., Gegg, M. E. & Schapira, A. H. 2023. The Gba Variant E326k Is Associated With Alpha-Synuclein Aggregation And Lipid Droplet Accumulation In Human Cell Lines. *Human Molecular Genetics* 32(5): 773–789.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. & Smith, C. 2008. The Behaviour And Ecology Of The Zebrafish, *Danio Rerio*. *Biological Reviews* 83(1): 13–34.
- Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L. & Angelini, C. 2012. Assessment Of Mitochondrial Respiratory Chain Enzymatic Activities On Tissues And Cultured Cells. *Nature Protocols* 7(6): 1235–1246.
- Springer, W. & Kahle, P. J. 2011. Regulation Of Pink1-Parkin-Mediated Mitophagy. *Autophagy* 7(3): 266–278.
- Srinivasan, E., Chandrasekhar, G., Chandrasekar, P., Anbarasu, K., Vickram, A., Karunakaran, R., Rajasekaran, R. & Srikumar, P. 2021. Alpha-Synuclein Aggregation In Parkinson's Disease. *Frontiers In Medicine* 8: 736978.
- Stankovic, R. K., Chung, R. S. & Penkowa, M. 2007. Metallothioneins I And Ii: Neuroprotective Significance During Cns Pathology. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology* 39(3): 484–489.
- Stark, A. & Pakkenberg, B. 2004. Histological Changes Of The Dopaminergic Nigrostriatal System In Aging. *Cell And Tissue Research* 318(1): 81–92.
- Stebbins, G. T., Goetz, C. G., Burn, D. J., Jankovic, J., Khoo, T. K. & Tilley, B. C. 2013. How To Identify Tremor Dominant And Postural Instability/Gait Difficulty Groups With The Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale: Comparison With The Unified Parkinson's Disease Rating Scale. *Movement Disorders* 28(5): 668–670.
- Steenbergen, R., Nanowski, T. S., Beigneux, A., Kulinski, A., Young, S. G. & Vance, J. E. 2005. Disruption Of The Phosphatidylserine Decarboxylase Gene In Mice Causes Embryonic Lethality And Mitochondrial Defects. *Journal Of Biological Chemistry* 280(48): 40032–40040.
- Sterky, F. H., Lee, S., Wibom, R., Olson, L. & Larsson, N.-G. 2011. Impaired Mitochondrial Transport And Parkin-Independent Degeneration Of Respiratory Chain-Deficient Dopamine Neurons In Vivo. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 108(31): 12937–12942.

- Stocchi, F. & Olanow, C. W. 2013. Obstacles To The Development Of A Neuroprotective Therapy For Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 28(1): 3–7.
- Stockwell, B. R., Jiang, X. & Gu, W. 2020. Emerging Mechanisms And Disease Relevance Of Ferroptosis. *Trends In Cell Biology* 30(6): 478–490.
- Stokes, A. H., Hastings, T. G. & Vrana, K. E. 1999. Cytotoxic And Genotoxic Potential Of Dopamine. *Journal Of Neuroscience Research* 55(6): 659–665.
- Stoyek, M. R., Croll, R. P. & Smith, F. M. 2015. Intrinsic And Extrinsic Innervation Of The Heart In Zebrafish (D Anio Rerio). *Journal Of Comparative Neurology* 523(11): 1683–1700.
- Subedi, L., Lee, S. E., Madiha, S., Gaire, B. P., Jin, M., Yumnam, S. & Kim, S. Y. 2020. Phytochemicals Against Tnf A-Mediated Neuroinflammatory Diseases. *International Journal Of Molecular Sciences* 21(3): 764.
- Subhan, I. & Siddique, Y. H. 2024. Effect Of Rotenone On The Neurodegeneration Among Different Models. *Current Drug Targets* 25(8): 530–542.
- Subhramanyam, C. S., Wang, C., Hu, Q. & Dheen, S. T. 2019. Microglia-Mediated Neuroinflammation In Neurodegenerative Diseases. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, Pp.112–120.
- Subramaniam, S. R. & Chesselet, M.-F. 2013. Mitochondrial Dysfunction And Oxidative Stress In Parkinson's Disease. *Progress In Neurobiology* 106: 17–32.
- Subramanian Vignesh, K. & Deepe Jr, G. S. 2017. Metallothioneins: Emerging Modulators In Immunity And Infection. *International Journal Of Molecular Sciences* 18(10): 2197.
- Sun, H., Liang, R., Yang, B., Zhou, Y., Liu, M., Fang, F., Ding, J., Fan, Y. & Hu, G. 2016. Aquaporin-4 Mediates Communication Between Astrocyte And Microglia: Implications Of Neuroinflammation In Experimental Parkinson's Disease. *Neuroscience* 317: 65–75.
- Sun, Q., Wang, Y., Hou, L., Li, S., Hong, J.-S., Wang, Q. & Zhao, J. 2024. Clozapine-N-Oxide Protects Dopaminergic Neurons Against Rotenone-Induced Neurotoxicity By Preventing Ferritinophagy-Mediated Ferroptosis. *Free Radical Biology And Medicine* 212: 384–402.
- Sun, S.-C., Chang, J.-H. & Jin, J. 2013. Regulation Of Nuclear Factor-Kb In Autoimmunity. *Trends In Immunology* 34(6): 282–289.
- Sung, H.-C., Chang, K.-S., Chen, S.-T., Hsu, S.-Y., Lin, Y.-H., Hou, C.-P., Feng, T.-H., Tsui, K.-H. & Juang, H.-H. 2022. Metallothionein 2a With Antioxidant And Antitumor Activity Is Upregulated By Caffeic Acid Phenethyl Ester In Human Bladder Carcinoma Cells. *Antioxidants* 11(8): 1509.

- Susanto, O., Stewart, S. E., Voskoboinik, I., Brasacchio, D., Hagn, M., Ellis, S., Asquith, S., Sedelies, K. A., Bird, P. I. & Waterhouse, N. 2013. Mouse Granzyme A Induces A Novel Death With Writhing Morphology That Is Mechanistically Distinct From Granzyme B-Induced Apoptosis. *Cell Death & Differentiation* 20(9): 1183–1193.
- Sveinbjornsdottir, S. 2016. The Clinical Symptoms Of Parkinson's Disease. *Journal Of Neurochemistry* 139: 318–324.
- Taipa, R., Pereira, C., Reis, I., Alonso, I., Bastos-Lima, A., Melo-Pires, M. & Magalhães, M. 2016. Dj-1 Linked Parkinsonism (Park7) Is Associated With Lewy Body Pathology. *Brain* 139(6): 1680–1687.
- Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., Sonobe, Y., Mizuno, T. & Suzumura, A. 2006. Tumor Necrosis Factor-A Induces Neurotoxicity Via Glutamate Release From Hemichannels Of Activated Microglia In An Autocrine Manner. *Journal Of Biological Chemistry* 281(30): 21362–21368.
- Tamano, H., Morioka, H., Nishio, R., Takeuchi, A. & Takeda, A. 2018. Ampa-Induced Extracellular Zn<sup>2+</sup> Influx Into Nigral Dopaminergic Neurons Causes Movement Disorder In Rats. *Neurotoxicology* 69: 23–28.
- Tambasco, N., Nigro, P., Romoli, M., Prontera, P., Simoni, S. & Calabresi, P. 2016. A53t In A Parkinsonian Family: A Clinical Update Of The Snca Phenotypes. *Journal Of Neural Transmission* 123(11): 1301–1307.
- Tambosco, L., Percebois-Macadré, L., Rapin, A., Nicomette-Bardel, J. & Boyer, F.-C. 2014. Effort Training In Parkinson's Disease: A Systematic Review. *Annals Of Physical And Rehabilitation Medicine* 57(2): 79–104.
- Tanaka, K.-I., Uehara, Y., Shimoda, M., Funayama, R., Shiota, S., Yamaguchi, A., Sugimoto, A., Ichitani, M., Kadota, Y. & Kawakami, T. 2025. Metallothionein, An Endogenous Antioxidant Protein, Protects Against Acute Lung Injury Caused By Air Pollutants. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 185: 117965.
- Tanaka, K. I., Shiota, S., Sakakibara, O., Shimoda, M., Takafuji, A., Takabatake, M., Kadota, Y., Kawakami, T., Suzuki, S. & Kawahara, M. 2022. Exacerbation Of Elastase-Induced Emphysema Via Increased Oxidative Stress In Metallothionein-Knockout Mice. *Biomolecules* 12(4): 583.
- Tang, P., Chong, L., Li, X., Liu, Y., Liu, P., Hou, C. & Li, R. 2014. Correlation Between Serum Rantes Levels And The Severity Of Parkinson's Disease. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity* 2014:
- Tanimoto, Y., Kakinuma, H., Aoki, R., Shiraki, T., Higashijima, S.-I. & Okamoto, H. 2024. Transgenic Tools Targeting The Basal Ganglia Reveal Both Evolutionary Conservation And Specialization Of Neural Circuits In Zebrafish. *Cell Reports* 43(3):

- Tanner, C. M., Kamel, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G. S., Kasten, M. & Chade, A. R. 2011. Rotenone, Paraquat, And Parkinson's Disease. *Environmental Health Perspectives* 119(6): 866–872.
- Tansey, M. G. & Goldberg, M. S. 2010. Neuroinflammation In Parkinson's Disease: Its Role In Neuronal Death And Implications For Therapeutic Intervention. *Neurobiology Of Disease* 37(3): 510–518.
- Tansey, M. G., Mccoy, M. K. & Frank-Cannon, T. C. 2007. Neuroinflammatory Mechanisms In Parkinson's Disease: Potential Environmental Triggers, Pathways, And Targets For Early Therapeutic Intervention. *Experimental Neurology* 208(1): 1–25.
- Tansey, M. G., Wallings, R. L., Houser, M. C., Herrick, M. K., Keating, C. E. & Joers, V. 2022. Inflammation And Immune Dysfunction In Parkinson Disease. *Nature Reviews Immunology* 22(11): 657–673.
- Tapias, V., Mccoy, J. L. & Greenamyre, J. T. 2019. Phenothiazine Normalizes The Nadh/Nad<sup>+</sup> Ratio, Maintains Mitochondrial Integrity And Protects The Nigrostriatal Dopamine System In A Chronic Rotenone Model Of Parkinson's Disease. *Redox Biology* 24: 101164.
- Tasseva, G., Bai, H. D., Davidescu, M., Haromy, A., Michelakis, E. & Vance, J. E. 2013. Phosphatidylethanolamine Deficiency In Mammalian Mitochondria Impairs Oxidative Phosphorylation And Alters Mitochondrial Morphology. *Journal Of Biological Chemistry* 288(6): 4158–4173.
- Tay, T. L., Ronneberger, O., Ryu, S., Nitschke, R. & Driever, W. 2011. Comprehensive Catecholaminergic Projectome Analysis Reveals Single-Neuron Integration Of Zebrafish Ascending And Descending Dopaminergic Systems. *Nature Communications* 2(1): 171.
- Teleanu, D. M., Niculescu, A.-G., Lungu, I. I., Radu, C. I., Vladăcenco, O., Roza, E., Costăchescu, B., Grumezescu, A. M. & Teleanu, R. I. 2022. An Overview Of Oxidative Stress, Neuroinflammation, And Neurodegenerative Diseases. *International Journal Of Molecular Sciences* 23(11): 5938.
- Teoh, S. L. 2016. Neuroprotective Effect Of Metallothionein. Ph.D. Thesis, Brain Research Institute, Monash University,
- Teoh, S. L., Ogawa, S. & Parhar, I. S. 2015. Localization Of Genes Encoding Metallothionein-Like Protein (Mt2 And Smtb) In The Brain Of Zebrafish. *Journal Of Chemical Neuroanatomy* 70: 20–32.
- Terada, T., Yokokura, M., Yoshikawa, E., Futatsubashi, M., Kono, S., Konishi, T., Miyajima, H., Hashizume, T. & Ouchi, Y. 2016. Extrastriatal Spreading Of Microglial Activation In Parkinson's Disease: A Positron Emission Tomography Study. *Annals Of Nuclear Medicine* 30: 579–587.

- Thakur, S., Dhapola, R., Sarma, P., Medhi, B. & Reddy, D. H. 2023. Neuroinflammation In Alzheimer's Disease: Current Progress In Molecular Signaling And Therapeutics. *Inflammation* 46(1): 1–17.
- Thenganatt, M. A. & Jankovic, J. 2014. Parkinson Disease Subtypes. *JAMA Neurology* 71(4): 499–504.
- Thirugnanam, T. & Santhakumar, K. 2022. Chemically Induced Models Of Parkinson's Disease. *Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 252: 109213.
- Thirumoorthy, N., Shyam Sunder, A., Manisenthil Kumar, K., Senthil Kumar, M., Ganesh, G. & Chatterjee, M. 2011. A Review Of Metallothionein Isoforms And Their Role In Pathophysiology. *World Journal Of Surgical Oncology* 9: 1–7.
- Tighanimine, K., Nabuco Leva Ferreira Freitas, J. A., Nemazanyy, I., Bankolé, A., Benarroch-Popivker, D., Brodesser, S., Doré, G., Robinson, L., Benit, P. & Ladraa, S. 2024. A Homoeostatic Switch Causing Glycerol-3-Phosphate And Phosphoethanolamine Accumulation Triggers Senescence By Rewiring Lipid Metabolism. *Nature Metabolism* 6(2): 323–342.
- Toledo-Ibarra, G. A., Rojas-Mayorquín, A. E. & Girón-Pérez, M. I. 2013. Influence Of The Cholinergic System On The Immune Response Of Teleost Fishes: Potential Model In Biomedical Research. *Journal Of Immunology Research* 2013(1): 536534.
- Tomlinson, C. L., Herd, C. P., Clarke, C. E., Meek, C., Patel, S., Stowe, R., Deane, K. H., Shah, L., Sackley, C. M. & Wheatley, K. 2014. Physiotherapy For Parkinson's Disease: A Comparison Of Techniques. *Cochrane Database Of Systematic Reviews* (6):
- Trempe, J.-F. & Gehring, K. 2023. Structural Mechanisms Of Mitochondrial Quality Control Mediated By Pink1 And Parkin. *Journal Of Molecular Biology* 435(12): 168090.
- Trevisan, L., Gaudio, A., Monfrini, E., Avanzino, L., Di Fonzo, A. & Mandich, P. 2024. Genetics In Parkinson's Disease, State-Of-The-Art And Future Perspectives. *British Medical Bulletin* 149(1): 60–71.
- Trist, B. G., Hare, D. J. & Double, K. L. 2019. Oxidative Stress In The Aging Substantia Nigra And The Etiology Of Parkinson's Disease. *Aging Cell* 18(6): E13031.
- Trynka, G., Hunt, K. A., Bockett, N. A., Romanos, J., Mistry, V., Szperl, A., Bakker, S. F., Bardella, M. T., Bhaw-Rosun, L. & Castillejo, G. 2011. Dense Genotyping Identifies And Localizes Multiple Common And Rare Variant Association Signals In Celiac Disease. *Nature Genetics* 43(12): 1193–1201.
- Trynka, G., Wijmenga, C. & Van Heel, D. A. 2010. A Genetic Perspective On Coeliac Disease. *Trends In Molecular Medicine* 16(11): 537–550.

- Tsai, K.-F., Hsu, P.-C., Kung, C.-T., Lee, C.-T., You, H.-L., Huang, W.-T., Li, S.-H., Cheng, F.-J., Wang, C.-C. & Lee, W.-C. 2021. The Risk Factors Of Blood Cadmium Elevation In Chronic Kidney Disease. *International Journal Of Environmental Research And Public Health* 18(23): 12337.
- Tsika, E. & Moore, D. J. 2012. Mechanisms Of Lrrk2-Mediated Neurodegeneration. *Current Neurology And Neuroscience Reports* 12(3): 251–260.
- Tsunemi, T. & Krainc, D. 2014. Zn<sup>2+</sup> Dyshomeostasis Caused By Loss Of Atp13a2/Park9 Leads To Lysosomal Dysfunction And Alpha-Synuclein Accumulation. *Human Molecular Genetics* 23(11): 2791–2801.
- Turnbull, I. R. & Colonna, M. 2007. Activating And Inhibitory Functions Of Dap12. *Nature Reviews Immunology* 7(2): 155–161.
- Turrens, J. F. 2003. Mitochondrial Formation Of Reactive Oxygen Species. *The Journal Of Physiology* 552(2): 335–344.
- Ujvári, B., Pytel, B., Márton, Z., Bognár, M., Kovács, L. Á., Farkas, J., Gaszner, T., Berta, G., Kecskés, A. & Kormos, V. 2022. Neurodegeneration In The Centrally-Projecting Edinger–Westphal Nucleus Contributes To The Non-Motor Symptoms Of Parkinson's Disease In The Rat. *Journal Of Neuroinflammation* 19(1): 31.
- Ullah, I., Zhao, L., Hai, Y., Fahim, M., Alwayli, D., Wang, X. & Li, H. 2021. Metal Elements And Pesticides As Risk Factors For Parkinson's Disease-A Review. *Toxicology Reports* 8: 607–616.
- Ünal, İ., Çalışkan-Ak, E., Üstündağ, Ü. V., Ateş, P. S., Alturfan, A. A., Altinoz, M. A., Elmaci, İ. & Emekli-Alturfan, E. 2020. Neuroprotective Effects Of Mitoquinone And Oleandrin On Parkinson's Disease Model In Zebrafish. *International Journal Of Neuroscience* 130(6): 574–582.
- Ünal, İ., Üstündağ, Ü. V., Ateş, P. S., Eğilmez, G., Alturfan, A. A., Yiğitbaşı, T. & Emekli-Alturfan, E. 2019. Rotenone Impairs Oxidant/Antioxidant Balance Both In Brain And Intestines In Zebrafish. *International Journal Of Neuroscience* 129(4): 363–368.
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A. R. & Healy, D. G. 2004. Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused By Mutations In Pink1. *Science* 304(5674): 1158–1160.
- Van De Ven, R. A., Santos, D. & Haigis, M. C. 2017. Mitochondrial Sirtuins And Molecular Mechanisms Of Aging. *Trends In Molecular Medicine* 23(4): 320–331.
- Van Den Berge, N., Ferreira, N., Gram, H., Mikkelsen, T. W., Alstrup, A. K. O., Casadei, N., Tsung-Pin, P., Riess, O., Nyengaard, J. R. & Tamgüney, G. 2019. Evidence For Bidirectional And Trans-Synaptic Parasympathetic And

- Sympathetic Propagation Of Alpha-Synuclein In Rats. *Acta Neuropathologica* 138(4): 535–550.
- Van Den Eeden, S. K., Tanner, C. M., Bernstein, A. L., Fross, R. D., Leimpeter, A., Bloch, D. A. & Nelson, L. M. 2003. Incidence Of Parkinson's Disease: Variation By Age, Gender, And Race/Ethnicity. *American Journal Of Epidemiology* 157(11): 1015–1022.
- Van Der Worp, H. B., Howells, D. W., Sena, E. S., Porritt, M. J., Rewell, S., O'collins, V. & Macleod, M. R. 2010. Can Animal Models Of Disease Reliably Inform Human Studies? *PLoS Medicine* 7(3): E1000245.
- Van Laar, A. D., Webb, K. R., Keeney, M. T., Van Laar, V. S., Zharikov, A., Burton, E. A., Hastings, T. G., Glajch, K. E., Hirst, W. D. & Greenamyre, J. T. 2023. Transient Exposure To Rotenone Causes Degeneration And Progressive Parkinsonian Motor Deficits, Neuroinflammation, And Synucleinopathy. *Npj Parkinson's Disease* 9(1): 121.
- Van Leeuwen, J. E. & Samelson, L. E. 1999. T Cell Antigen-Receptor Signal Transduction. *Current Opinion In Immunology* 11(3): 242–248.
- Van Raamsdonk, J. M. & Hekimi, S. 2012. Superoxide Dismutase Is Dispensable For Normal Animal Lifespan. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 109(15): 5785–5790.
- Vanni, S., Colini Baldeschi, A., Zattoni, M. & Legname, G. 2020. Brain Aging: A Janus - Faced Player Between Health And Neurodegeneration. *Journal Of Neuroscience Research* 98(2): 299–311.
- Vargas, J. Y., Grudina, C. & Zurzolo, C. 2019. The Prion-Like Spreading Of A-Synuclein: From In Vitro To In Vivo Models Of Parkinson's Disease. *Ageing Research Reviews* 50: 89–101.
- Vasanthi, R. K. & Ying, A. C. K. 2021. A Survey Of Perceived Barriers And Motivators Towards Exercise Among People With Parkinson's Disease In Malaysia. *IIUM Medical Journal Malaysia* 20(3):
- Vavilova, J. D., Boyko, A. A., Ponomareva, N. V., Fokin, V. F., Fedotova, E. Y., Streltsova, M. A., Kust, S. A., Grechikhina, M. V., Bril, E. V. & Zimnyakova, O. S. 2021. Reduced Immunosenscence Of Peripheral Blood T Cells In Parkinson's Disease With Cmv Infection Background. *International Journal Of Molecular Sciences* 22(23): 13119.
- Vehovszky, A., Szabó, H., Hiripi, L., Elliott, C. J. & Hernádi, L. 2007. Behavioural And Neural Deficits Induced By Rotenone In The Pond Snail *Lymnaea stagnalis*. A Possible Model For Parkinson's Disease In An Invertebrate. *European Journal Of Neuroscience* 25(7): 2123–2130.
- Vellingiri, B., Suriyanarayanan, A., Abraham, K. S., Venkatesan, D., Iyer, M., Raj, N. & Gopalakrishnan, A. V. 2022. Influence Of Heavy Metals In Parkinson's Disease: An Overview. *Journal Of Neurology* 269(11): 5798–5811.

- Vetrano, A. M., Heck, D. E., Mariano, T. M., Mishin, V., Laskin, D. L. & Laskin, J. D. 2005. Characterization Of The Oxidase Activity In Mammalian Catalase. *Journal Of Biological Chemistry* 280(42): 35372–35381.
- Vila, M. & Przedborski, S. 2003. Targeting Programmed Cell Death In Neurodegenerative Diseases. *Nature Reviews Neuroscience* 4(5): 365–375.
- Vilariño-Güell, C., Rajput, A., Milnerwood, A. J., Shah, B., Szu-Tu, C., Trinh, J., Yu, I., Encarnacion, M., Munsie, L. N. & Tapia, L. 2014. Dnajc13 Mutations In Parkinson Disease. *Human Molecular Genetics* 23(7): 1794–1801.
- Virgone - Carlotta, A., Uhlrich, J., Akram, M. N., Ressenkoff, D., Chrétien, F., Domenget, C., Gherardi, R., Despars, G., Jurdic, P. & Honnorat, J. 2013. Mapping And Kinetics Of Microglia/Neuron Cell - To - Cell Contacts In The 6 - Ohda Murine Model Of Parkinson's Disease. *Glia* 61(10): 1645–1658.
- Vives-Bauza, C., Tocilescu, M., Rosa, L., Alessi, D. M., Jackson-Lewis, V. & Przedborski, S. 2010. Control Of Mitochondrial Integrity In Parkinson's Disease. *Progress In Brain Research* 183: 99–113.
- Vos, M. 2022. Mitochondrial Complex I Deficiency: Guilty In Parkinson's Disease. *Signal Transduction And Targeted Therapy* 7(1): 136.
- Wadan, A.-H. S. & Mohamed, W. 2025. Various Zebrafish Models Of Parkinson's Disease: What Gives Us Hope. In (Ed.). *Translational Models Of Parkinson's Disease And Related Movement Disorders*, Pp.219–230. Elsevier.
- Wager, K. & Russell, C. 2013. Mitophagy And Neurodegeneration: The Zebrafish Model System. *Autophagy* 9(11): 1693–1709.
- Wahyudi, L. D., Yu, S. H. & Cho, M. K. 2022. The Effect Of Curcumin On The Cadmium-Induced Mitochondrial Apoptosis Pathway By Metallothionein 2a Regulation. *Life Sciences* 310: 121076.
- Walton, H. S. & Dodd, P. R. 2007. Glutamate–Glutamine Cycling In Alzheimer's Disease. *Neurochemistry International* 50(7-8): 1052–1066.
- Wang, C., Gong, Z., Hu, S. & Zhang, G. 2019. Metallothionein-1 Is Associated With Osteoarthritis Disease Activity And Suppresses Proinflammatory Cytokines Production In Synovial Cells. *International Immunopharmacology* 75: 105815.
- Wang, J., Wang, F., Mai, D. & Qu, S. 2020. Molecular Mechanisms Of Glutamate Toxicity In Parkinson's Disease. *Frontiers In Neuroscience* 14: 585584.
- Wang, Q., Liu, Y. & Zhou, J. 2015. Neuroinflammation In Parkinson's Disease And Its Potential As Therapeutic Target. *Translational Neurodegeneration* 4(1): 19.
- Wang, X., Lupardus, P., Laporte, S. L. & Garcia, K. C. 2009. Structural Biology Of Shared Cytokine Receptors. *Annual Review Of Immunology* 27: 29–60.

- Wang, X., Whelan, E., Liu, Z., Liu, C.-F. & Smith, W. W. 2021a. Controversy Of Tmem230 Associated With Parkinson's Disease. *Neuroscience* 453: 280–286.
- Wang, X., Zhang, J.-B., He, K.-J., Wang, F. & Liu, C.-F. 2021b. Advances Of Zebrafish In Neurodegenerative Disease: From Models To Drug Discovery. *Frontiers In Pharmacology* 12: 713963.
- Wang, X.-L., Schnoor, M. & Yin, L.-M. 2023. Metallothionein-2: An Emerging Target In Inflammatory Diseases And Cancers. *Pharmacology & Therapeutics* 244: 108374.
- Wang, Y., Liu, W., Yang, J., Wang, F., Sima, Y., Zhong, Z.-M., Wang, H., Hu, L.-F. & Liu, C.-F. 2017. Parkinson's Disease-Like Motor And Non-Motor Symptoms In Rotenone-Treated Zebrafish. *Neurotoxicology* 58: 103–109.
- Wang, Y., Nartiss, Y., Steipe, B., Mcquibban, G. A. & Kim, P. K. 2012. Ros-Induced Mitochondrial Depolarization Initiates Park2/Parkin-Dependent Mitochondrial Degradation By Autophagy. *Autophagy* 8(10): 1462–1476.
- Wasel, O. & Freeman, J. L. 2020. Chemical And Genetic Zebrafish Models To Define Mechanisms Of And Treatments For Dopaminergic Neurodegeneration. *International Journal Of Molecular Sciences* 21(17): 5981.
- Wataya, T., Nunomura, A., Smith, M. A., Siedlak, S. L., Harris, P. L., Shimohama, S., Szweda, L. I., Kaminski, M. A., Avila, J. & Price, D. L. 2002. High Molecular Weight Neurofilament Proteins Are Physiological Substrates Of Adduction By The Lipid Peroxidation Product Hydroxynonenal. *Journal Of Biological Chemistry* 277(7): 4644–4648.
- Weber, A., Wasiliew, P. & Kracht, M. 2010. Interleukin-1 (Il-1) Pathway. *Science Signaling* 3(105): Cm1–Cm1.
- Weingarten, C. P., Sundman, M. H., Hickey, P. & Chen, N.-K. 2015. Neuroimaging Of Parkinson's Disease: Expanding Views. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 59: 16–52.
- Westerfield, M. 1995. *The Zebrafish Book: A Guide For The Laboratory Use Of Zebrafish (Brachydanio Rerio)*. University Of Oregon Press.
- Wetherington, J., Serrano, G. & Dingledine, R. 2008. Astrocytes In The Epileptic Brain. *Neuron* 58(2): 168–178.
- Williams, M. A., Tyznik, A. J. & Bevan, M. J. 2006. Interleukin-2 Signals During Priming Are Required For Secondary Expansion Of Cd8+ Memory T Cells. *Nature* 441(7095): 890–893.
- Willis, A., Roberts, E., Beck, J., Fiske, B., Ross, W., Savica, R., Van Den Eeden, S., Tanner, C., Marras, C. & M., P. S. F. P. G. A. R. S. M. R. B. C. H. C. T. W. B. D. J. 2022. Incidence Of Parkinson Disease In North America. *Npj Parkinson's Disease* 8(1): 170.

- Wise, R. M., Wagener, A., Fietzek, U. M., Klopstock, T., Mosharov, E. V., Zucca, F. A., Sulzer, D., Zecca, L. & Burbulla, L. F. 2022. Interactions Of Dopamine, Iron, And Alpha-Synuclein Linked To Dopaminergic Neuron Vulnerability In Parkinson's Disease And Neurodegeneration With Brain Iron Accumulation Disorders. *Neurobiology Of Disease* 175: 105920.
- Wittbrodt, J., Shima, A. & Scharl, M. 2002. Medaka—A Model Organism From The Far East. *Nature Reviews Genetics* 3(1): 53–64.
- Won, S. J., Fong, R., Butler, N., Sanchez, J., Zhang, Y., Wong, C., Tambou Nzoutchoum, O., Huynh, A., Pan, J. & Swanson, R. A. 2022. Neuronal Oxidative Stress Promotes A-Synuclein Aggregation In Vivo. *Antioxidants* 11(12): 2466.
- Woo, E. S., Dellapiazza, D., Wang, A. S. & Lazo, J. S. 2000. Energy - Dependent Nuclear Binding Dictates Metallothionein Localization. *Journal Of Cellular Physiology* 182(1): 69–76.
- Wooten, G., Currie, L., Bovbjerg, V., Lee, J. & Patrie, J. 2004. Are Men At Greater Risk For Parkinson's Disease Than Women? *Journal Of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 75(4): 637–639.
- Wu, F., Wang, Z., Gu, J.-H., Ge, J.-B., Liang, Z.-Q. & Qin, Z.-H. 2013. P38mapk/P53-Mediated Bax Induction Contributes To Neurons Degeneration In Rotenone-Induced Cellular And Rat Models Of Parkinson's Disease. *Neurochemistry International* 63(3): 133–140.
- Wu, Y., Guo, X. Y., Wei, Q. Q., Ou, R. W., Song, W., Cao, B., Zhao, B. & Shang, H. F. 2016. Non - Motor Symptoms And Quality Of Life In Tremor Dominant Vs Postural Instability Gait Disorder Parkinson' S Disease Patients. *Acta Neurologica Scandinavica* 133(5): 330–337.
- Wulansari, N., Darsono, W. H. W., Woo, H.-J., Chang, M.-Y., Kim, J., Bae, E.-J., Sun, W., Lee, J.-H., Cho, I.-J. & Shin, H. 2021. Neurodevelopmental Defects And Neurodegenerative Phenotypes In Human Brain Organoids Carrying Parkinson's Disease-Linked Dnajc6 Mutations. *Science Advances* 7(8): Eabb1540.
- Wullmann, M. F. & Rink, E. 2001. Detailed Immunohistology Of Pax6 Protein And Tyrosine Hydroxylase In The Early Zebrafish Brain Suggests Role Of Pax6 Gene In Development Of Dopaminergic Diencephalic Neurons. *Developmental Brain Research* 131(1-2): 173–191.
- Xi, Y., Noble, S. & Ekker, M. 2011. Modeling Neurodegeneration In Zebrafish. *Current Neurology And Neuroscience Reports* 11: 274–282.
- Xiao, B., Deng, X., Lim, G. G., Xie, S., Zhou, Z. D., Lim, K.-L. & Tan, E.-K. 2017a. Superoxide Drives Progression Of Parkin/Pink1-Dependent Mitophagy Following Translocation Of Parkin To Mitochondria. *Cell Death & Disease* 8(10): E3097–E3097.

- Xiao, B., Goh, J.-Y., Xiao, L., Xian, H., Lim, K.-L. & Liou, Y.-C. 2017b. Reactive Oxygen Species Trigger Parkin/Pink1 Pathway-Dependent Mitophagy By Inducing Mitochondrial Recruitment Of Parkin. *Journal Of Biological Chemistry* 292(40): 16697–16708.
- Xiao, B., Kuruvilla, J. & Tan, E.-K. 2022. Mitophagy And Reactive Oxygen Species Interplay In Parkinson's Disease. *Npj Parkinson's Disease* 8(1): 135.
- Xu, G., Fan, L., Zhao, S. & Ouyang, C. 2022. Mtlg Inhibits The Growth And Epithelial-Mesenchymal Transition Of Gastric Cancer Cells By Regulating The Pi3k/Akt Signaling Pathway. *Genetics And Molecular Biology* 45(1): E20210067.
- Xu, K., Xu, Y., Brown-Jermyn, D., Chen, J.-F., Ascherio, A., Dluzen, D. E. & Schwarzschild, M. A. 2006. Estrogen Prevents Neuroprotection By Caffeine In The Mouse 1-Methyl-4-Phenyl-1, 2, 3, 6-Tetrahydropyridine Model Of Parkinson's Disease. *Journal Of Neuroscience* 26(2): 535–541.
- Xue, J., Wang, H.-L. & Xiao, G. 2020. Transferrin1 Modulates Rotenone-Induced Parkinson's Disease Through Affecting Iron Homeostasis In *Drosophila Melanogaster*. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 531(3): 305–311.
- Yahya, N. A. A. & Meramat, A. A. 2022. Association Between Occupational Toxicity Exposure To Pesticides And Parkinson's Disease Among Adults: Systematic Review And Meta-Analysis. *Asian Journal Of Medicine And Biomedicine* 6(S1): 43–44.
- Yakhine-Diop, S. M., Niso-Santano, M., Rodríguez-Arribas, M., Gómez-Sánchez, R., Martínez-Chacón, G., Uribe-Carretero, E., Navarro-García, J. A., Ruiz-Hurtado, G., Aiastrui, A. & Cooper, J. M. 2019. Impaired Mitophagy And Protein Acetylation Levels In Fibroblasts From Parkinson's Disease Patients. *Molecular Neurobiology* 56: 2466–2481.
- Yamada, T., Murata, D., Adachi, Y., Itoh, K., Kameoka, S., Igarashi, A., Kato, T., Araki, Y., Haganir, R. L. & Dawson, T. M. 2018. Mitochondrial Stasis Reveals P62-Mediated Ubiquitination In Parkin-Independent Mitophagy And Mitigates Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metabolism* 28(4): 588–604. E585.
- Yang, G., Hu, Y., Qin, X., Sun, J., Miao, Z., Wang, L., Ke, Z. & Zheng, Y. 2023. Micheliolide Attenuates Neuroinflammation To Improve Cognitive Impairment Of Alzheimer's Disease By Inhibiting Nf-Kb And Pi3k/Akt Signaling Pathways. *Heliyon* 9(7): E17848.
- Yang, J., Liu, L., Li, M., Huang, X., Yang, H. & Li, K. 2021. Naringenin Inhibits Pro-Inflammatory Cytokine Production In Macrophages Through Inducing Mtlg To Suppress The Activation Of Nf-Kb. *Molecular Immunology* 137: 155–162.
- Yang, N., Tan, T., Wei, J., Gao, X., Wang, M., Li, R., Wang, C., Lei, M., Hu, H. & Wang, M. 2024a. Combining Blood Pressure Variability And Heart Rate

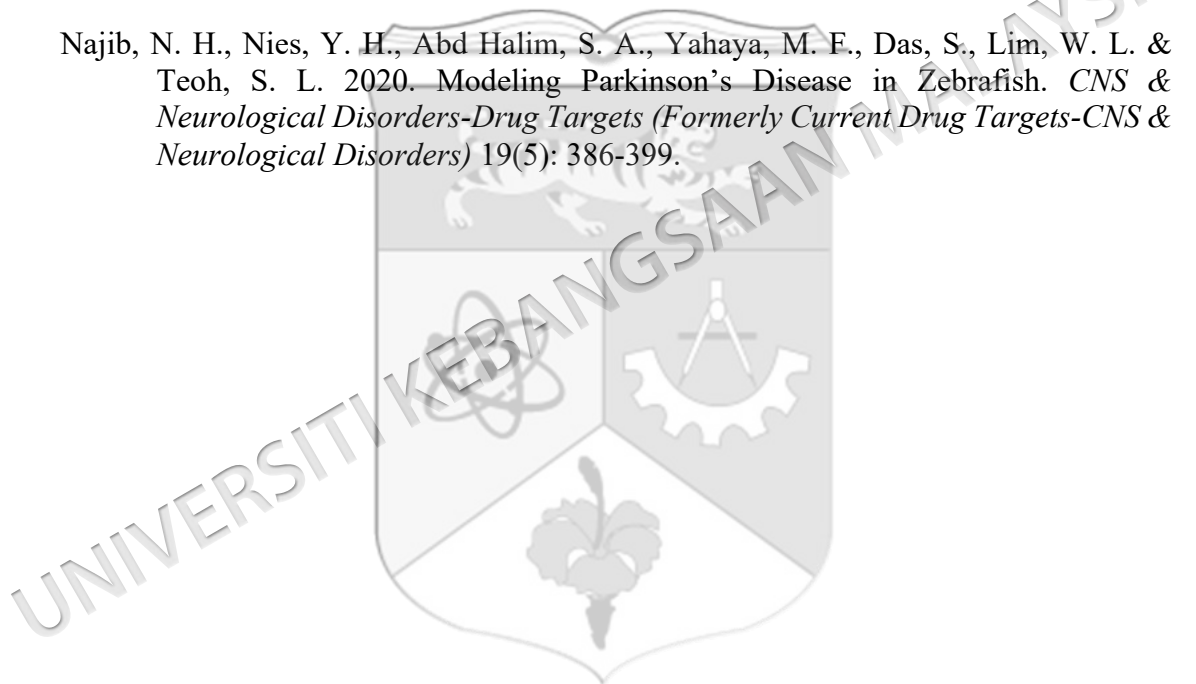
- Variability To Analyze The Autonomic Nervous Function Of Rotenone Induced Parkinson's Rat Model. *Journal Of Neuroscience Methods* 409: 110217.
- Yang, R., Roshani, D., Gao, B., Li, P. & Shang, N. 2024b. Metallothionein: A Comprehensive Review Of Its Classification, Structure, Biological Functions, And Applications. *Antioxidants* 13(7): 825.
- Yang, S., Wang, W., Xu, Y., Yuan, Y. & Hao, S. 2024c. Fe-Zn Alloy, A New Biodegradable Material Capable Of Reducing Ros And Inhibiting Oxidative Stress. *Regenerative Biomaterials* 11: Rbae002.
- Yang, W., Nagasawa, K., Münch, C., Xu, Y., Satterstrom, K., Jeong, S., Hayes, S. D., Jedrychowski, M. P., Vyas, F. S. & Zaganjor, E. 2016. Mitochondrial Sirtuin Network Reveals Dynamic Sirt3-Dependent Deacetylation In Response To Membrane Depolarization. *Cell* 167(4): 985–1000. E1021.
- Yang, Y., Neo, S. Y., Chen, Z., Cui, W., Chen, Y., Guo, M., Wang, Y., Xu, H., Kurzay, A. & Alici, E. 2020. Thioredoxin Activity Confers Resistance Against Oxidative Stress In Tumor-Infiltrating Nk Cells. *The Journal Of Clinical Investigation* 130(10): 5508–5522.
- Yaribeygi, H., Panahi, Y., Javadi, B. & Sahebkar, A. 2018. The Underlying Role Of Oxidative Stress In Neurodegeneration: A Mechanistic Review. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)* 17(3): 207–215.
- Ye, B., Maret, W. & Vallee, B. D. 2001. Zinc Metallothionein Imported Into Liver Mitochondria Modulates Respiration. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 98(5): 2317–2322.
- Yin, L.-M., Xu, Y.-D., Peng, L.-L., Duan, T.-T., Liu, J.-Y., Xu, Z., Wang, W.-Q., Guan, N., Han, X.-J. & Li, H.-Y. 2018. Transgelin-2 As A Therapeutic Target For Asthmatic Pulmonary Resistance. *Science Translational Medicine* 10(427): Eaam8604.
- Yin, X., Knecht, D. A. & Lynes, M. A. 2005. Metallothionein Mediates Leukocyte Chemotaxis. *BMC Immunology* 6: 1–12.
- Yurtsever, İ., Üstündağ, Ü. V., Ünal, İ., Ateş, P. S. & Emekli-Alturfan, E. 2022. Rifampicin Decreases Neuroinflammation To Maintain Mitochondrial Function And Calcium Homeostasis In Rotenone-Treated Zebrafish. *Drug And Chemical Toxicology* 45(4): 1544–1551.
- Yusupov, M., Wende, K., Kupsch, S., Neyts, E. C., Reuter, S. & Bogaerts, A. 2017. Effect Of Head Group And Lipid Tail Oxidation In The Cell Membrane Revealed Through Integrated Simulations And Experiments. *Scientific Reports* 7(1): 5761.
- Zangger, K., Öz, G., Haslinger, E., Kunert, O. & Armitage, I. M. 2001. Nitric Oxide Selectively Releases Metals From The N - Terminal Domain Of

- Metallothioneins: Potential Role At Inflammatory Sites. *The FASEB Journal* 15(7): 1303–1305.
- Zeng, X.-S., Geng, W.-S. & Jia, J.-J. 2018. Neurotoxin-Induced Animal Models Of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism And Assessment. *ASN Neuro* 10: 1759091418777438.
- Zhang, B., Gaiteri, C., Bodea, L.-G., Wang, Z., Mcelwee, J., Podtelezchnikov, A. A., Zhang, C., Xie, T., Tran, L. & Dobrin, R. 2013. Integrated Systems Approach Identifies Genetic Nodes And Networks In Late-Onset Alzheimer's Disease. *Cell* 153(3): 707–720.
- Zhang, C., Nie, P., Zhou, C., Hu, Y., Duan, S., Gu, M., Jiang, D., Wang, Y., Deng, Z. & Chen, J. 2021. Oxidative Stress-Induced Mitophagy Is Suppressed By The Mir-106b-93-25 Cluster In A Protective Manner. *Cell Death & Disease* 12(2): 209.
- Zhang, F., Wu, Z., Long, F., Tan, J., Gong, N., Li, X. & Lin, C. 2022a. The Roles Of Atp13a2 Gene Mutations Leading To Abnormal Aggregation Of A-Synuclein In Parkinson's Disease. *Frontiers In Cellular Neuroscience* 16: 927682.
- Zhang, J.-M. & An, J. 2007. Cytokines, Inflammation And Pain. *International Anesthesiology Clinics* 45(2): 27.
- Zhang, S., Wang, J., Song, N., Xie, J. & Jiang, H. 2009. Up-Regulation Of Divalent Metal Transporter 1 Is Involved In 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (Mpp<sup>+</sup>)-Induced Apoptosis In Mes23. 5 Cells. *Neurobiology Of Aging* 30(9): 1466–1476.
- Zhang, T.-M., Yu, S.-Y., Guo, P., Du, Y., Hu, Y., Piao, Y.-S., Zuo, L.-J., Lian, T.-H., Wang, R.-D. & Yu, Q.-J. 2016. Nonmotor Symptoms In Patients With Parkinson Disease: A Cross-Sectional Observational Study. *Medicine* 95(50): E5400.
- Zhang, W., Luo, M., Xiong, B. & Liu, X. 2022b. Upregulation Of Metallothionein 1 G (Mt1g) Negatively Regulates Ferroptosis In Clear Cell Renal Cell Carcinoma By Reducing Glutathione Consumption. *Journal Of Oncology* 2022(1): 4000617.
- Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D. S., Wu, X., Block, M. L., Wilson, B., Zhang, W., Zhou, Y. & Hong, J.-S. 2005. Aggregated A - Synuclein Activates Microglia: A Process Leading To Disease Progression In Parkinson's Disease. *The FASEB Journal* 19(6): 533–542.
- Zhang, Y.-Y., Li, X.-S., Ren, K.-D., Peng, J. & Luo, X.-J. 2023. Restoration Of Metal Homeostasis: A Potential Strategy Against Neurodegenerative Diseases. *Ageing Research Reviews* 87: 101931.
- Zhao, S., Gu, Y., Dong, Q., Fan, R. & Wang, Y. 2008. Altered Interleukin-6 Receptor, Il-6r And Gp130, Production And Expression And Decreased Socs-3

- Expression In Placentas From Women With Pre-Eclampsia. *Placenta* 29(12): 1024–1028.
- Zhong, H., Lu, J., Xia, L., Zhu, M. & Yin, H. 2014. Formation Of Electrophilic Oxidation Products From Mitochondrial Cardiolipin In Vitro And In Vivo In The Context Of Apoptosis And Atherosclerosis. *Redox Biology* 2: 878–883.
- Zhong, Z., Umemura, A., Sanchez-Lopez, E., Liang, S., Shalpour, S., Wong, J., He, F., Boassa, D., Perkins, G. & Ali, S. R. 2016. Nf-Kb Restricts Inflammasome Activation Via Elimination Of Damaged Mitochondria. *Cell* 164(5): 896–910.
- Zhou, Q., Chen, B., Wang, X., Wu, L., Yang, Y., Cheng, X., Hu, Z., Cai, X., Yang, J. & Sun, X. 2016. Sulforaphane Protects Against Rotenone-Induced Neurotoxicity In Vivo: Involvement Of The Mtor, Nrf2 And Autophagy Pathways. *Scientific Reports* 6(1): 32206.
- Zhou, S., Wang, Z. & Klaunig, J. E. 2013. Caenorhabditis Elegans Neuron Degeneration And Mitochondrial Suppression Caused By Selected Environmental Chemicals. *International Journal Of Biochemistry And Molecular Biology* 4(4): 191.
- Zhou, Z. D. & Tan, E. K. 2020. Oxidized Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Dependent Mitochondrial Deacetylase Sirtuin-3 As A Potential Therapeutic Target Of Parkinson's Disease. *Ageing Research Reviews* 62: 101107.
- Zhou, Z. D., Xie, S. P., Sathiyamoorthy, S., Saw, W. T., Sing, T. Y., Ng, S. H., Chua, H. P. H., Tang, A. M. Y., Shaffra, F. & Li, Z. 2015. F-Box Protein 7 Mutations Promote Protein Aggregation In Mitochondria And Inhibit Mitophagy. *Human Molecular Genetics* 24(22): 6314–6330.
- Zhu, B., Yin, D., Zhao, H. & Zhang, L. 2022. The Immunology Of Parkinson's Disease. *Seminars In Immunopathology*, Pp.659–672.
- Ziller, A. & Fraissinet-Tachet, L. 2018. Metallothionein Diversity And Distribution In The Tree Of Life: A Multifunctional Protein. *Metallomics* 10(11): 1549–1559.
- Zou, L., Tian, Y. & Zhang, Z. 2021. Dysfunction Of Synaptic Vesicle Endocytosis In Parkinson's Disease. *Frontiers In Integrative Neuroscience* 15: 619160.

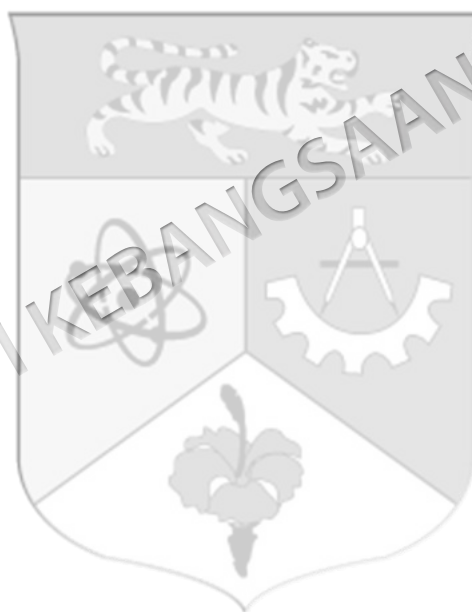
**PENERBITAN BERDASARKAN KAJIAN**

- Nies, Y. H., Lim, W. L., Abd Karim, N., Yahaya, M. F. & Teoh, S. L. 2025. Metallothionein II Treatment Mitigates Rotenone-Induced Neurodegeneration in Zebrafish Models of Parkinson's Disease. *Frontiers in Pharmacology* 16: 1478013.
- Nies, Y. H., Yahaya, M. F., Lim, W. L. & Teoh, S. L. 2024. Microarray-Based Analysis of Differential Gene Expression Profile in Rotenone-Induced Parkinson's Disease Zebrafish Model. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets-CNS & Neurological Disorders* 23(6): 761-772.
- Nies, Y. H., Mohamad Najib, N. H., Lim, W. L., Kamaruzzaman, M. A., Yahaya, M. F. & Teoh, S. L. 2021. MicroRNA Dysregulation in Parkinson's Disease: A Narrative Review. *Frontiers in Neuroscience* 15: 660379.
- Najib, N. H., Nies, Y. H., Abd Halim, S. A., Yahaya, M. F., Das, S., Lim, W. L. & Teoh, S. L. 2020. Modeling Parkinson's Disease in Zebrafish. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)* 19(5): 386-399.



**LAMPIRAN A**

Surat Kelulusan Jawatankuasa Etika Haiwan (UKMAEC)





**UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA  
ANIMAL ETHICS COMMITTEE**

c/o Laboratory Animal Resource Unit  
Faculty of Medicine, UKM  
Jalan Temerloh, 53200 Kuala Lumpur  
Tel: 92895086, 92895091, 92895087



16<sup>th</sup> January, 2020

UKMAEC APPROVAL NUMBER: ANAT/FP/2020/SEONG LIN/16-JAN./1076-JAN.-2020-DEC.-2020

CHIEF INVESTIGATOR: Dr. Teoh Seong Lin  
DIVISION/DEPT. OF CHIEF INVESTIGATOR: Dept. of Anatomy, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia.

FUNDING INSTITUTION (S): Universiti Kebangsaan Malaysia  
GRANT NUMBER (S): -

PROJECT TITLE: Analysis of zebrafish mRNA expression profiles to identify potential regulators/pathways of rotenone-induced Parkinson's disease model.

CO-INVESTIGATOR: Dr. Muhammad Fairuz Yahaya  
Dr Norwahidah Abd Karim

STUDENT: Nies Yong Hui


OTHER AUXILIARIES:

PROJECT CLASSIFICATION: C


SOURCE OF ANIMALS: Brain Research Institute Monash Sunway.

HOUSING-LOCATION OF ANIMALS DURING PROJECT: Zebrafish lab, Department of Anatomy, Level 9 Preclinical Building, FP, UKM.

ESTIMATED DURATION OF PROJECT: From January 2020 to December 2020

  
Assoc. Prof. Dr. Nur Azlina Mohd Fahami  
Chairperson of UKMAEC  
Universiti Kebangsaan Malaysia



  
Low Kiat Cheong  
Secretary of UKMAEC  
Universiti Kebangsaan Malaysia

**LAMPIRAN B**





Poster Presentation Merit Award  
Presented to  
**Nies Yong Hui**  
of the

**6th International Anatomical Sciences and Cell Biology Conference**  
held virtually in Singapore from 21 February to 23 February 2022



Associate Professor S Thameem Dheen  
Chairman  
Organizing Committee, 6th IASCBC 2022