

DETEKCIA PATOLOGICKEJ FORMY FOSFORYLOVANÉHO ALFA-SYNUKLEÍNU V MIKROBIOPSIÁCH SLIZNICE HRUBÉHO ČREVA U PACIENTOV V PRODROMÁLNOM ŠTÁDIU PARKINSONOVEJ CHOROBY

Kunová A.¹, Tóth Š.¹, Mechírová E.¹, Kulcsárová K.², Mareta M.², Feketeova E.², Gdovinová Z.², Ventosa J.R.², Gombošová L.³, Škorvánek M.²

¹ Ústav histológie a embryológie UPJŠ LF, Košice

² Neurologická klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice

³ I. interná klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice

Úvod Parkinsonova choroba, druhé najčastejšie neurodegeneratívne ochorenie, postihuje periférny nervový systém pred nástupom typických príznakov, ktoré sú dôsledkom poškodenia súčastí centrálného nervového systému. Imunohistochemická detekcia patologickeho proteínu, fosforylovaného α -synukleínu, ktorý je prítomný v nervovom tkanive v prodrómálnom štádiu, by mohla slúžiť na včasné rozpoznanie ochorenia.

Cieľ Cieľom našej imunohistochemickej analýzy bolo posúdiť imunoreaktivitu a distribúciu p - α -syn v sliznici hrubého čreva u pacientov v prodrómálnom štádiu Parkinsonovej choroby (PD) v porovnaní so zdravými kontrolami. Súčasne na základe výsledkov našej imunohistochemickej štúdie stanoviť aktuálnu senzitivitu a špecificitu použitej protilátky proti patologickej forme p - α -syn.

Materiál a metodika Do analýzy bolo zaradených 11 pacientov v prodrómálnej fáze PD a 13 zdravých kontrol. Pacientom boli odobrané mikrobiopsie *colon ascendens* a na zistenie prítomnosti patologickej formy α -synukleínu (α -syn) bola použitá imunohistochemická metóda.

Výsledky Použitá protilátka proti p - α -syn má podľa našich výsledkov pomerne vysokú senzitivitu aj špecificitu v sliznici hrubého čreva u pacientov v prodrómálnom štádiu PD.

Záver Detekcia p - α -syn v sliznici *colon ascendens* u RBD pacientov by mohla predstavovať vhodný biomarker prodrómálneho štádia PD. Zistenia je však nutné potvrdiť na väčšej skupine pacientov ako aj zdravých kontrol.

Kľúčové slová: Parkinsonova choroba, p - α -synukleín, imunohistochemia, sliznica hrubého čreva, porucha REM spánku

Úvod

PD je druhým najčastejším neurodegeneratívnym ochorením, ktoré postihuje najmä staršiu populáciu a diagnostikuje sa na základe typických motorických príznakov ako bradykinéza, rigidita, tremor a posturálna instabilita, ktoré sú výsledkom poškodenia súčastí centrálného nervového systému [15, 25]. Nemotorické príznaky, zahŕňajúce poruchy čuchu, depresiu, poruchu správania v REM spánku (iRBD), poruchu motility tráviaceho traktu a ďalšie, sa objavujú aj 10 rokov pred nástupom motorických príznakov a sú spojené s prítomnosťou patologickej formy α -syn v periférnom autonómnom nervovom systéme, napríklad v gastrointestinálnom trakte [3, 5, 8, 15]. α -syn a jeho vysoké hladiny v krvnom sére podľa niektorých nových štúdií zohráva úlohu aj v rozvoji cievej endotelovej dysfunkcie, následne aterosklerózy a kardiovaskulárnych ochorení s ňou súvisiacich [24]. Najčastejšia patologická forma α -syn, ktorá bola potvrdená ako intracytoplazmatická inklúzia v mozgu pacientov s PD, vzniká jeho polymerizáciou, agregáciou a najmä fosforyláciou na seríne 129 [19]. Podľa Braakovej hypotézy a niektorých výskumov, Lewyho telieska s obsahom patologickej formy α -syn pravdepodobne vznikajú v enterickom nervovom systéme a transynapticky sa šíria do mozgu prostredníctvom *nervus vagus* [10, 12]. Shannon a kol. (2012) dokázali akumuláciu α -syn v *tunica mucosa et submucosa* hrubého čreva u pacientov s PD ešte v čase pred objavením sa charakteristických motorických symptómov [21]. Niekoľko rokov neskôr Stokholm a kol. preukázali prítomnosť Lewyho patológie, čiže agregovanej formy fos-

forylovaného α -syn (p - α -syn), vo vzorkách z gastrointestinálneho traktu pacientov v premotorickom štádiu PD [23]. Dôkaz p - α -syn v dostupných častiach tráviacej rúry by sa tak mohol stať relevantným biomarkerom pre diagnostiku PD.

Cieľ

Cieľom imunohistochemickej analýzy bolo posúdiť imunoreaktivitu a distribúciu p - α -syn v sliznici hrubého čreva u pacientov v prodrómálnom štádiu Parkinsonovej choroby (PD) v porovnaní so zdravými kontrolami. Súčasne na základe výsledkov našej imunohistochemickej štúdie stanoviť aktuálnu senzitivitu a špecificitu použitej protilátky proti patologickej forme p - α -syn.

Materiál a metódy

Do analýzy bolo zaradených celkovo 11 pacientov (RBD), ktorí mali polysomnograficky potvrdenú iRBD (najvýznamnejší včasný marker PD) a zároveň spĺňali klinické kritériá pre prítomnosť prodrómálnej fázy Parkinsonovej choroby na základe MDS výskumných kritérií pre pPD (pravdepodobnosť pPD ≥ 80 %) [16]. Ako zdravú kontrolu (HC) sme do štúdie zaradili aj 13 negatívnych pacientov ($n = 13$). Pacientom boli odobrané mikrobiopsie *colon ascendens* s kompletne zachytenou sliznicou čreva. Biopsie boli fixované v 4% neutrálnom formaldehyde, zaliate do paraplastu a ďalej spracované štandardným histologickým postupom pre svetelnú mikroskopiu. Histologické rezy hrubé 2 - 4 μ m boli spracované imunohistochemicky, kolorimetrickou metódou na dôkaz prítomnosti

p- α -syn. V rámci použitého imunohistochemického protokolu bola použitá primárna protilátka voči patologickej forme alfa synukleínu - *p*- α -syn (Anti-Phosphorylated Alpha-Synuclein Monoclonal Primary Antibody, pSyn#64, WAKO CHEMICALS - 015-25191) v celkovom riedení 1:150, s inkubačnými parametrami: 1 h pri laboratórnej teplote. Sekundárna protilátka Biotinylated Anti-Mouse IgG Secondary Antibody (H+L) (Vector Laboratories, BA-2000) bola použitá v riedení 1:200 s dobou inkubácie 2 h pri laboratórnej teplote. V rámci protokolu sme použili VECTASTAIN ELITE ABC KIT (Vector Laboratories, PK-6103). Imunoreaktívne štruktúry vo väzive črevnej sliznice boli detegované a diagnostikované pozitívnym hnedým zafarbením pomocou chromogénu DAB (diaminobenzidín). Histologicky sme analyzovali a posudzovali semikvantitatívne imunoreaktivitu *p*- α -syn-pozitívnych štruktúr. Imunoreaktivita bola analyzovaná histologicky na základe posúdenia: neprítomnosti pozitívnych štruktúr: (-) negativita alebo prítomnosti pozitívnych štruktúr: (+) pozitivita. Hodnotenie bolo vykonané dvoma nezávislými histológmi na základe prieniku výsledkov ich nezávislých hodnotení. Priemerné počty zaznamenaných pozitívnych imunoreaktívnych štruktúr boli vyhodnotené numericky, štatisticky a následne graficky spracované.

Table 1 Overview of the results of *p*- α -syn immunoreactivity

(source: Kunová, A. 2022, Ústav histológie a embryológie, LF UPJŠ)

Code of microbiopsy of <i>colon ascendens</i>	HC	Code of microbiopsy of <i>colon ascendens</i>	RBD
HC-083/17	-	RBD-078/18	+
HC-050/17	-	RBD-080/18	+
HC-060/21	-	RBD-090/20	-
HC-061/17	-	RBD-083/18	+
HC-069/17	-	RBD-086/19	+
HC-02/15	+	RBD-082/18	+
HC-070/17	+	RBD-088/19	+
HC-076/17	-	RBD-297/19	+
HC-077/17	-	RBD-092/21	-
HC-078/17	-	RBD-095/21	+
HC-079/17	-	RBD-081/18	+
HC-086/17	-		
HC-087/17	-		
<i>n</i> = 13	0.23 ± 0.12 (M±S.E.M.)		0.81 ± 0.12 (M±S.E.M.)
Specificity:	84.62 %		81.82 %

Semiquantitative evaluation of *p*- α -syn immunoreactivity in microbiopsies of the colonic mucosa in healthy controls (HC) and RBD patients.

Imunoreaktivita *p*- α -syn bola v hodnotených rezoch výhradne intracytoplazmatická a týkala sa axoplazmy prípadne dendroplazmy malých a tenkých zväzkov nervových vlákien, príp. izolovaných nervových vlákien a ich terminálnych zakončení. Pozitívna cytoplazma vykazovala zreteľné tmavo-hnedé depozity *p*- α -syn vo forme jemného až hrubozrného granulátu s distribúciou rôzneho charakteru (Obr.2: B1-3). Predominantne boli pozitívne štruktúry detegované v riedkom kolagénovom väzive *lamina propria mucosae* v bezprostrednej blízkosti črevných krýpt, prípadne priamo v podvrstve hladkej svaloviny sliznice

Na štatistickú analýzu bol použitý softvér GraphPad InStat ver.3.10 pre Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Semikvantitatívne výsledky (pozitívna reakcia na prítomnosť *p*- α -syn) boli vyjadrené ako aritmetický priemer (M) ± štandardná chyba merania (S.E.M.). Štatistická významnosť medzi analyzovanými skupinami bola analyzovaná pomocou jednofaktorového ANOVA testu s následným Tukey-Kramer *post hoc* pre viacnásobné porovnanie. Súčasne boli získané hodnoty imunohistochemickej pozitivity (+) a negativity (-) prepočítané a vyjadrené ako špecificita a senzitivita použitej primárnej protilátky (diagnostický test prístupný na linku: MedCalc's Diagnostic test evaluation calculator).

Tento projekt bol schválený Etickou komisiou pri UNLP v Košiciach (EK č. protokolu 12/2013).

Výsledky

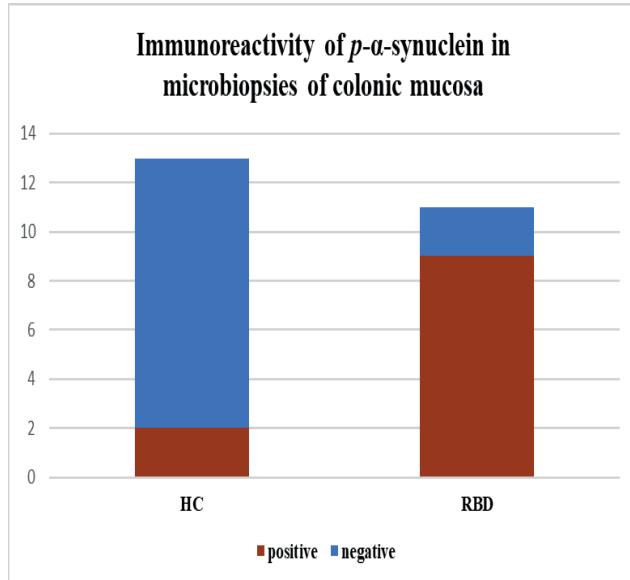
Imunohistochemická a cytomorfológická analýza

Na základe našej semikvantitatívnej imunohistochemickej analýzy sme zistili výrazne vyšší podiel pozitivity na prítomnosť *p*- α -syn v skupine RBD pacientov oproti zdravej kontrole (HC). Tento nárast pozitivity patologickej formy *p*- α -syn nebol na základe štatistickej analýzy významný, ale numericky dosiahol až 71 % zvýšenie oproti nálezu v skupine zdravých kontrol (Tab. 1, Fig. 1).

lamina muscularis mucosae. Za imunohistochemicky pozitívne boli posúdené tmavo-hnedé depozity rôznej veľkosti (Obr.2: B3). Veľmi často boli detegované depozity rôznej intenzity zafarbenia aj v cytoplazme buniek variabilného tvaru zväčša väčších rozmerov pravdepodobne patriace do monocyto-makrofágového systému. Podľa cytomorfológických znakov ide s veľkou pravdepodobnosťou o populáciu aktivovaných tkanivových makrofágov histiocytov (Obr.2: B4-5). Tieto štruktúry však neboli pri celkovom a konečnom hodnotení posudzované za pozitívne. Na základe našej imunohistochemickej analýzy

výsledná senzitivita dosiahla 81,82 % (48,22 % až 97,72 %) a špecificita hodnotu 84,62 % (54,55 % až 98,08 %, vid'. Tab.1, Graf 1).

Figure 1 Immunoreactivity of p - α -syn in microbiopsies of colonic mucosa (source: Kunová, A. 2023, Ústav histológie a embryológie, LF UPJŠ)

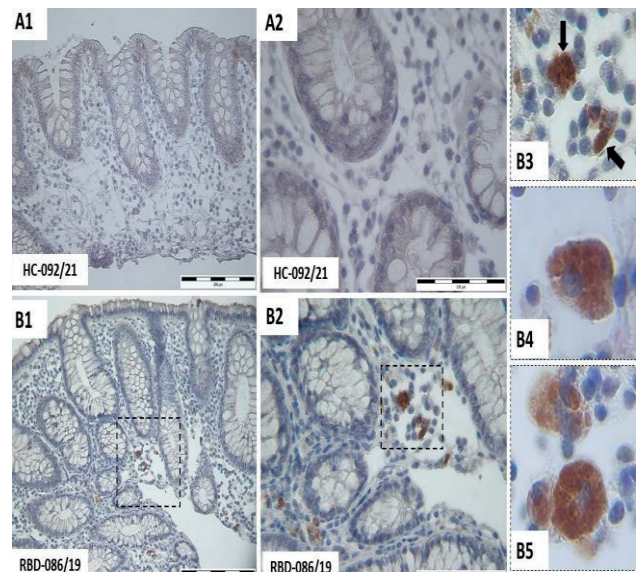


Semiquantitative analysis of p - α -syn immunoreactivity in microbiopsies of the colonic mucosa in healthy controls (HC) and RBD patients.

Diskusia

Alfa-synukleín je prítomný v nervovom systéme aj za fyziologických okolností a hrá úlohu v transporte a exocytóze neurotransmiterov. Beck a kol. (2020) vo svojej štúdií porovnávali protilátky proti α -syn a p - α -syn. Nezaznamenali žiadny významný rozdiel v expresii α -syn medzi zdravými pacientami a pacientami v prodromálnom štádiu PD, ani v *tunica muscularis*, ani v *tela submucosa*. Ich výsledky však naznačili význam p - α -syn, ktorého dôkaz v *tunica muscularis* by mohol byť senzitívnym a užitočným biomarkerom prodromálneho štádia PD. Histologické vzorky z mikrobiopsií *colon ascendens* v našej štúdií obsahovali len vrstvu *tunica mucosa*. V tejto vrstve, na rozdiel od nás, Beck a kol. (2020) nezaznamenal žiadnu imunoreaktivitu [4]. V našej práci sa nám pomocou uvedených postupov podarilo potvrdiť pomerne vysokú senzitivitu (81,82 %) aj špecificitu (84,62 %) použitej protilátky proti p - α -syn v *tunica mucosa* hrubého čreva. Podľa štúdie z roku 2014, patologická forma α -syn bola potvrdená vo vzorkách z gastrointestinálneho traktu už 7 rokov pred nástupom príznakov ochorení spojených s Lewyho patológiou, napr. PD. V tejto štúdií sa podarilo dokázať p - α -syn v *tela submucosa* v 65 % vzoriek, v *tunica muscularis* v 72 % vzoriek a v subserózných nervových zväzkoch v 57 % vzoriek. V *tunica mucosa* sa im nepodarilo dokázať žiadne agregáty α -syn. Tkanivové vzorky však získavali pri resekciách častí GIT, kedy už sliznica mohla byť postihnutá zápalovým procesom, ischémiou alebo tumorom a spôsob odberu vzorky neumožňoval skúmať väčšiu oblasť väziva sliznice [14].

Figure 2 Distribution of p - α -syn immunoreactive structures in colonic mucosa – representative microphotographs (source: Tóth, Š. 2022, Ústav histológie a embryológie, LF UPJŠ)



A - Negative immunohistochemical result, B - Positive immunohistochemical result: 1- region of analysed colonic mucosa; 2 - region of analysed mucosal connective tissue; 3 - detail (arrows) of positive immunoreactive deposits of p - α -syn in nerve fibers (B3), activated macrophages (B4,5).

Pouclet a kol. (2012) zaznamenali pozitivitu v biopstických vzorkách pacientov, konkrétne v *tunica mucosa* aj v *tela submucosa*, čo čiastočne korešponduje s výsledkami našej imunohistochemickej štúdie. Na rozdiel od výsledkov našej analýzy však autori nezaznamenali žiadnu pozitivitu u zdravých kontrol. Ich výsledky súvisia s patofyziológiou PD. Dendrity a axóny prítomné v črevnej sliznici, ktoré ovplyvňujú sekréciu a prekrvenie, patria najmä neurónom v *plexus submucosus* Meissneri a v omnoho menšej miere neurónom v *plexus myentericus* Auerbacha. Prítomnosť α -syn v sliznici a jeho absencia v podsliznicovom väzive u dvoch pacientov v danej štúdií naznačuje, že v niektorých prípadoch sa agregáty α -syn objavujú primárne v najdialšnejších úsekoch axónov [20]. Toto tvrdenie potvrdzuje aj štúdiá, v ktorej bola zistená výraznejšia a oveľa skoršia akumulácia α -syn v dialšnych axónoch sympatikového nervového systému ako aj v paravertebrálnych gangliách [18]. Neurodegeneratívny proces v autonómnom nervovom systéme ako aj v enterickom nervovom systéme by mohol v niektorých prípadoch postupovať aj centripetálne [20].

Vyššie uvedené zistenia by mohli vysvetliť aj výsledky analýzy od Shin a kol. (2017), kde bola zistená nízka pozitivita gastrointestinálnych biopsií v oboch skupinách – u pacientov s PD, aj u HC, avšak pacienti, u ktorých boli prítomné imunoreaktívne štruktúry v biopstických vzorkách, mali všetky vzorky získané pri resekcií čreva (obsahujúce celú stenu čreva) negatívne [22]. Tieto zistenia sú v rozpore s vyššie uvedenými od Beck a kol. (2020), kde bola pozitivita prítomná len v hlbších vrstvách steny čreva, neboli zachytené žiadne pozitívne štruktúry v sliznici [4].

Zaujímavé výsledky ohľadom imunoreaktivity α -syn zaznamenali iní autori, ktorí sa vo svojej štúdií zamerali na jedincov bez akýchkoľvek príznakov neurodegeneratívneho ochorenia. Dokázali akumuláciu α -syn aj p - α -syn u pacientov bez neurodegeneratívneho ochorenia v *plexus submucosus et plexus myentericus*. Na základe analýzy autori vyslovili hypotézu, že množstvo p - α -syn sa zvyšuje exponenciálne so stúpajúcim vekom. Akumulácia α -syn je pravdepodobne fyziologická [7].

V jednej z nedávnych štúdií sa Beach a kol. (2016) snažili identifikovať vhodnú imunohistochemickú metódu na odlíšenie 5 pacientov s už diagnostikovanou PD a 5 HC vo vzorkách získaných počas chirurgického zákroku z oblasti *colon sigmoideum* obsahujúcich všetky vrstvy steny čreva. Jedna zo skúmaných metód s využitím monoklonálnej protilátky proti p - α -syn vykazovala 100% diagnostickú presnosť [2]. Takáto sľubná vysoká presnosť však bola aj predtým zachytená vo viacerých štúdiách s menším počtom vzoriek [6,17], no nebola potvrdená prácami zahrňajúcimi väčší počet pacientov s PD [1, 11, 13, 23, 26]. Výsledky štúdie od Beach a kol. (2016) by preto mali byť potvrdené vo väčšej skupine pacientov s PD, aby ich bolo možné generalizovať.

Zistenia našej histologickej štúdie sú limitované rozsahom získanej enteromikrobiopsie a tiež menším počtom zaradených pacientov a zdravých kontrol. Vyžadovali by si histopatologické hodnotenie prítomnosti p - α -syn aj v *tela submucosa*, prípadne *tunica muscularis externa*, ako aj vzájomné porovnanie výskytu a distribúcie p - α -syn v jednotlivých vrstvách steny hrubého čreva. Získané výsledky však naznačujú, že použitá protilátka proti p - α -syn môže mať využiteľný potenciál pri komplexom hodnotení enteromikrobiopsii sliznice hrubého čreva.

Do našej analýzy boli zaradení pacienti v prodromálnom štádiu PD, na základe polysomnograficky dokázanej poruchy REM fázy spánku. Narušená architektúra spánku a zároveň aj porucha REM fázy spánku je vo väčšej miere pozorovaná u obeznych pacientov a po poklese hmotnosti bolo pozorované predĺženie a úprava REM fázy spánku [9].

Záver

Na základe výsledkov našej imunohistochemickej analýzy je možné konštatovať že:

(1) Pozitívne depozity p - α -syn boli predominantne detegované u RBD pacientov v sliznici hrubého čreva vo väzive sliznice v bezprostrednom okolí bázy črevných krýpt a tesnej blízkosti svaloviny sliznice čreva a iba ojedinele zasahovali priamo podvrstvy hladkej svaloviny sliznice.

(2) Pozitívne p - α -syn-imunoreaktívne štruktúry boli na základe nášho zistenia prítomné výhradne v nervových vláknach (axóny príp. dendrity). Ojedinele sme depozity podobného charakteru zaznamenali aj v cytoplazme aktivovaných makrofágov, v dôsledku ich stimulácie, a následnej aktívnej fagocytárnej aktivity, čo však nebolo vyhodnotené v rámci nášho definovaného imunohistochemického algoritmu ako pozitívita.

(3) Výsledná senzitivita dosiahla hodnotu 81,82 % a špecificita hodnotu 84,62 %.

(4) Výsledky našej analýzy naznačujú, že detekcia p - α -syn v mikrobiopsiách črevnej sliznice *colon ascendens* od RBD pacientov môže predstavovať užitočný biomarker, ale aj vhodný histopatologický doplnkový parameter diagnostiky, ktorý je však nevyhnutné konfrontovať s ďalšími klinickými vyšetreniami a nálezmi.

Literatúra

1. Antunes, L., Frascuilho, S., Ostasyewski, M., et al.: Similar alpha-synuclein staining in the colon mucosa in patients with Parkinson's disease and controls. *Mov. Disord.* 31, 2016, (10):1567-570. doi: 10.1002/mds.26702.
2. Beach, T.G., Corbillé, A.G., Letournell, F. et al.: Multicenter assessment of immunohistochemical methods for pathological alpha-synuclein in sigmoid colon of autopsied Parkinson's disease and control subjects. *J Park Dis.* 6, 2016, (4):761-70. doi: 10.3233/JPD-160888.
3. Beach, T.G., Adler, C.H., Sue, L.I. et al.: Multi-organ distribution of phosphorylated α -synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* 119, 2010, (6):689-702. doi: 10.1007/s00401-010-0664-3.
4. Beck, G., Hori, Y., Hayashi, Y. et al.: Detection of Phosphorylated Alpha-Synuclein in the Muscularis Propria of the Gastrointestinal Tract Is a Sensitive Predictor for Parkinson's Disease. *Parkinson's disease, Hindawi Parkinson's disease*, 2020, doi.org/10.1155/2020/4687530.
5. Bloch, A., Probst, A., Bissig, H. et al.: α -Synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 32, 2006, (3):284-95. doi: 10.1111/j.1365-2990.2006.00727.x.
6. Braak, H., de Vos, R.A.I., Bohl, J. et al.: Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* 396, 2006, (1):67-72. doi: 10.1016/j.neulet.2005.11.012.
7. Bu, L.L., Huang, K.X., Zheng, D.Z. et al.: Alpha-Synuclein Accumulation and Its Phosphorylation in the Enteric Nervous System of Patients Without Neurodegeneration: An Explorative Study. *Frontiers in Aging Neuroscience* 12, 2020, article 575481. doi: 10.3389/fnagi.2020.575481.
8. Cersosimo, M., G., Benarroch, E., E.: Autonomic involvement of Parkinson's disease: Pathology, pathophysiology, clinical features and possible peripheral biomarkers. *J Neurol Sci.* 313, 2012, (1-2):57-63. doi: 10.1016/j.jns.2011.09.030.
9. Grešová, S., Šimková, M., Štimmelová, J. et al.: Obštrukčné spánkové apnoe, obezita a architektúra spánku. *Ateroskleróza.* 23, 2019, (3-4):1332-1338.

10. Hawkes, C.H., Del Tredici, K., Braak, H.: Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 33, 2007, (6):599-614. doi: 10.1111/j.1365-2990.2007.00874.x.
11. Hilton D., Stephens, M., Kirk, L. et al.: Accumulation of alpha-synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 127, 2014, 235-41. doi: 10.1007/s00401-013-1214-6.
12. Holmqvist, S., Chutna, O., Bousset, L. et al.: Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol.* 128, 2014, (6):805-20. doi: 10.1007/s00401-014-1343-6.
13. Chung, S.J., Kim, J., Lee, H.J. et al.: Alpha-synuclein in gastric and colonic mucosa in Parkinson's disease: limited role as a biomarker. *Mov. Disord.* 31, 2016, (2):241-49. doi: 10.1002/mds.26473.
14. Ito, S., Takao, M., Hatsuta, H. et al.: Alpha-synuclein immunohistochemistry of gastrointestinal and biliary surgical specimens for diagnosis of Lewy body disease. *Int J Clin Exp Pathol.* 7, 2014, (4):1714-1723.
15. Klingerhoefer, I., Reichman, H.: Pathogenesis of Parkinson disease – the gut – brain axis and environmental factors. *Nature reviews. Neurology* 11, 2015, (11):625-36. doi: 10.1038/nrneuro.2015.197.
16. Kulcsarova K., Ventosa, J.R., Feketeova, E. et al.: Comparison in detection of prodromal Parkinson's disease patients using original and updated MDS research criteria in two independent cohorts. *Parkinsonism Relat Disord.* 87, 2021, 48-55. doi: 10.1016/j.parkreldis.2021.04.028.
17. Leboviev, T., Chaumette, T., Damier, P. et al.: Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut.* 57, 2008, (12):1741-1743. doi: 10.1136/gut.2008.162503.
18. Orimo, S., Uchihara, T., Nakamura, A. et al.: Axonal α -synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain.* 131, 2008, (3):642-50. doi: 10.1093/brain/awm302.
19. Oueslati, A.: Implication of alpha-synuclein phosphorylation at S129 in synucleinopathies: what have we learned in the last decade? *J Parkinsons Dis.* 6, 2016, (1):39-51. doi: 10.3233/JPD-160779.
20. Pouclet, H., Leboviev, T., Coron, E. et al.: A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurogastroenterol Motil.* 24, 2012, (4):e202-e205. doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01887.x.
21. Shannon, K.M., Keshavarzian, A., Dodyia, H.B. et al.: Is alpha-synuclein in the colon a biomarker for premotor Parkinson's Disease? Evidence from 3 cases. *Mov Disord.* 27, 2012, (6):716-19. doi: 10.1002/mds.25020.
22. Shin, C., Park, S.H., Yun, J.Y. et al.: Fundamental limit of alpha-synuclein pathology in gastrointestinal biopsy as a pathologic biomarker of Parkinson's disease: Comparison with surgical specimens. *Parkinsonism Related Disord.* 44, 2017, 73-78. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.09.001.
23. Stokholm, M.G., Danielsen, E.H., Hamilton-Dutoit, S.J. et al.: Pathological α -synuclein in gastrointestinal tissues from prodromal Parkinson's disease patients. *Ann Neurol.* 79, 2016, (6):940-949.
24. Takami, Y., Wang, Ch., Nakagami, H. et al.: Novel pathophysiological roles of α -synuclein in age-related vascular endothelial dysfunction. *FASEB J.* 36, 2022, (10)e22555. doi: 10.1096/fj.202101621R.
25. Tysnes, O.B., Storstein, A.: Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neuronal Transm (Vienna)* 124, 2017, (8):901-905. doi:10.1007/s00702-017-1686-y.
26. Visanji, N.P., Marras, C., Kern, D.S. et al.: Colonic mucosal α -synuclein lacks specificity as a biomarker for Parkinson disease. *Neurology* 84, 2015, (6):609-16. doi: 10.1212/WNL.0000000000001240.

IMMUNOREACTIVITY AND DISTRIBUTION OF PATHOLOGICAL ALPHA-SYNUCLEIN POSITIVE STRUCTURES IN MICROBIOPSY OF COLONIC MUCOSA

Kunová A., Tóth Š., Mechírová E., Kulcsárová K., Mareta M., Feketeová E., Gdovinová Z., Ribeiro Ventosa J., Gombošová L., Škorvánek M.

Introduction Parkinson's disease (PD), the second most common neurodegenerative disorder, involves peripheral nervous system before the onset of typical symptoms resulting from the defect of central nervous system. Immunohistochemical detection of pathological protein, phosphorylated α -synuclein (p - α -syn), which is present in peripheral nervous tissue in prodromal stage of PD, can serve for identification of early stage of PD.

Aim The aim of immunohistochemical analysis was to assess immunoreactivity and distribution of p - α -syn in colonic mucosa of patients in prodromal stage of PD compared to healthy controls (HC). Concurrently the aim was to specify sensitivity and specificity of used antibody against p - α -syn.

Material and Methods There were 11 patients in prodromal stage of PD and 13 healthy controls included in the analysis. Colonic microbiopsies were obtained from all included patients and HCs, immunohistochemistry was used to detect pathological form of p - α -syn.

Results According to our results, the used antibody against p -syn has relatively high sensitivity and specificity in the colon mucosa patients in the prodromal stage of PD.

Conclusion *Detection of p- α -syn in colonic mucosa of RBD patients is appropriate biomarker of prodromal stage of PD. It is necessary to confront our results with other clinical examinations and findings.*

Key words: Parkinson disease, p- α -synuclein, immunohistochemistry, colonic mucosa, REM-sleep behaviour disorder (RBD)

Žiadny z autorov nemá potencionálny konflikt záujmov.

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore projektu VEGA 1/0712/22, APVV-18-057, OPENMED No. ITMS2014+:313011V455.

MUDr. Alexandra Kunová
Ústav histológie a embryológie UPJŠ LF
Šrobárova 2, 040 01 Košice
E-mail: alexandra.kunova@upjs.sk