

ОБЗОРЫ

©Нарыжный, Легина

ЗОНУЛИН — РЕГУЛЯЦИЯ ПЛОТНЫХ КОНТАКТОВ В МОЗГЕ И КИШЕЧНИКЕ — ФАКТЫ И ГИПОТЕЗЫ

С.Н. Нарыжный^{1,2}, О.К. Легина²*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: snaryzhny@mail.ru

²Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра
“Курчатовский институт”, 188300, Ленинградская область, Гатчина, Орлова роща, 1

За последние годы взаимная связь между мозгом и кишечником стала областью большого научного интереса. Кишечник отвечает не только за пищеварение, он содержит миллионы нейронов, собственную иммунную систему и влияет на эмоциональные и когнитивные процессы. Взаимоотношение между кишечником и мозгом предполагает, что процессы, осуществляемые микробиотой кишечника, играют значительную роль в регуляции работы мозга, и наоборот. Особую роль здесь играют межклеточные плотные контакты (ПК, tight junctions, TJ), где важное место занимает белок зонулин. Зонулин — непротестированный предшественник зрелого гаптоглобина, единственный физиологический модулятор ПК, открытый за последние годы, который может обратимо регулировать проницаемость интестинального (ИБ) и гематоэнцефалического (ГЭБ) барьеров в организме человека. Нарушение ГЭБ и изменённый состав микробиоты связывают со многими заболеваниями, в том числе неврологическими расстройствами и нейровоспалением. То есть, имеется кишечно-мозговая ось (КМО) — коммуникативная система, посредством которой мозг модулирует функции желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), и наоборот. В основе КМО лежат нейронные, эндокринные и иммунологические механизмы, связанные друг с другом на организменном, органном, клеточном и молекулярном уровнях.

Ключевые слова: зонулин; гаптоглобин; мозг; кишечник

DOI: 10.18097/PBMC20226805309

ВВЕДЕНИЕ

Гипотеза о наличии оси кишечник-мозг (КМО) предполагает, что взаимодействия в кишечной среде играют решающую роль в регуляции функций мозга. Многие исследования указывают на связь кишечника, микробиоты и головного мозга. Нарушение кишечного барьера и изменённый состав микробиоты кишечника могут приводить к неврологическим расстройствам, вызванным нейровоспалением. Повышенная проницаемость кишечника позволяет различным факторам пересекать эпителиальный ИБ и далее через кровоток и нарушенный ГЭБ проникать в мозг, влияя на его функцию. Особую роль здесь играет белок зонулин, открытый в 2000 году группой Fasano и являющийся членом семейства тканеспецифических

регуляторов параклеточной проницаемости кишечного (ИБ) и экстраинтестинального эпителия, а также сосудистого эндотелия, включая ГЭБ [1-4]. Зонулин участвует в развитии интестинального врождённого иммунитета и является первым охарактеризованным членом семейства зонулиновых структурно родственных белков [1].

Весьма впечатляюще выглядит список заболеваний, связанных с избыточной экспрессией зонулина, то есть с синдромом повышенной проницаемости кишечника (таблица). В этом списке, прежде всего, аутоиммунные заболевания (целиакия — глютенная энтеропатия, сахарный диабет 1 типа, рассеянный склероз, колит) и метаболические заболевания (неалкогольное ожирение печени, сахарный диабет 2 типа). Список продолжают

Таблица. Заболевания, связанные с нарушениями в КМО и зонулином [1-9].

Неврологические	Желудочно-кишечные	Аутоиммунные	Онкологические
Шизофрения	Синдром раздражённого кишечника	Ревматоидный артрит	Глиобластома
Альцгеймер	Болезнь Крона	Целиакия	Аденокарцинома лёгких
Паркинсон	Воспаление кишечника	Сахарный диабет	Рак молочной железы
Депрессия	Язвенная болезнь	Псориаз	Рак поджелудочной железы
Аутизм	Некротизирующий энтероколит		Колоректальный рак
Рассеянный склероз			Рак яичников

Принятые сокращения: ИБ — интестинальный барьер; ГЭБ — гематоэнцефалический барьер; ПК — плотные контакты; КМО — кишечно-мозговая ось; ЖКТ — желудочно-кишечный тракт, Нр — гаптоглобин; пре-Нр2 — прегаптоглобин; СПЭП — синдром повышенной эпителиальной проницаемости; MASP — маннозо-связывающая лектин-ассоциированная сериновая протеаза; ЗТМ — зонулин-трансгенная мышь; НСК — нейрональные стволовые клетки; TEER — трансэндотелиальное электрическое сопротивление.

ревматоидный артрит, заболевания лёгких, заболевания нервной системы, псориаз, разные типы рака (мозга, молочной железы, поджелудочной железы, аденокарцинома лёгких и т.д.) [3, 5-9]. Зонулин синтезируется в печени и тонком кишечнике и обнаруживается в жировой ткани, мозге, сердце, иммунных клетках, лёгких, почках и коже [1, 10, 11]. Триггером секретирования зонулина служат два главных фактора: глиадин (один из компонентов глютена) и энтеробактерии (патогенные и непатогенные, независимо от вирулентности) [6, 12]. Глиадин — это класс белков, присутствующих в ряде зерновых культур (пшеница, рожь, ячмень), но не обнаруженных в рисе, кукурузе, овсе. Глиадин вызывает секрецию зонулина у 80% популяции с фенотипом Hр2-1 или Hр2-2 [6]. Стимулирование секреции зонулина увеличивает проницаемость кишечника и предопределяет связь с хроническими заболеваниями. Причем технология гибридизации пшеницы, направленная на улучшение пекарских качеств, значительно увеличивают содержание глютена в зерне. Таким образом, частое употребление хлебных изделий, то есть обычное питание, хронически разрушает контроль равновесия между толерантностью и иммунным ответом к чужеродным антигенам, может приводить к многочисленным заболеваниям и соответствует словам Гиппократов: “все болезни начинаются в кишечнике” [3, 6]. Определение содержания циркулирующего зонулина в двух биологических средах — плазме и кале — удобный неинвазивный метод оценки нарушения кишечной проницаемости [13-16]. Однако уровни зонулина в крови отражают секрецию не только из кишечника, поэтому точный источник повышения уровня зонулина в плазме в настоящее время определить невозможно [17]. Концентрация зонулина вариабельна и зависит от вида патологии. Также отмечается вариабельность уровней зонулина в зависимости от интервала времени после забора крови [18]. В связи с современной эпидемиологической обстановкой отметим, что оценка повышенного уровня зонулина в сочетании с другими маркерами учитывается при отборе пациентов с COVID-19, требующих госпитализации [19].

В контексте надёжности диагностических методов определения барьерной функции кишечника и молекулярного анализа белков, вовлечённых в структуру ПК, в том числе зонулина, следует отметить, что значительная идентичность между разными формами гаптоглобина (Hр) и высокие концентрации зрелого Hр в плазме затрудняют анализ. Одно из решений — использование моноклональных антител, специфичных для прегаптоглобина (пре-Hр2)/зонулина [20]. Верхний уровень пре-Hр2 в сыворотке здорового индивидуума предположительно составляет 3-4 мкг/мл [20].

Изучение структуры и функции, совершенствование методов диагностики зонулина важны для формирования нового взгляда на патогенез многих хронических воспалительных и аутоиммунных заболеваний и остаётся объектом активных исследований, так как зонулин

ослабляет защитные барьеры во всём организме: в кишечнике, лёгких, кровеносных сосудах, коже, и, возможно, в мозге [3]. Предлагаемый обзор основан на работах, посвящённых роли зонулина в модуляции ПК в ИБ и ГЭБ, и не претендует на детальный анализ многочисленных работ, связанных с нарушением кишечной проницаемости, ГЭБ и сопутствующими заболеваниями.

1. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ ПК

Фундаментальная роль эпителия — разделить компартменты внутри многоклеточного организма и регулировать обмен веществ между ними [21]. Кишечный эпителий представляет собой обширную контактную поверхность (интерфейс) площадью более 200 м² между внешним окружением и внутренней средой [3, 9]. Он защищает организм от чужеродных патогенов, токсинов, антигенов, потенциально вредных факторов окружающей среды, организован эпителиальными клетками и несколькими компонентами: щелевые контакты, зона адгезии, ПК, десмосомы. В случае эндотелия десмосомы отсутствуют.

ПК (TJ, zonula occludense), присущие позвоночным и связывающие соседние эпителиальные клетки, а также эндотелиальные клетки, впервые были описаны в 1963 году [22]. Исторически ПК считались статичным непроницаемым барьером, блокирующим параклеточное прохождение молекул. Однако оказалось, что при воспалении в результате реализации нескольких механизмов, связанных с ПК, происходит повышение проницаемости кишечника. Этому способствуют внешние факторы (вирусы и бактерии), влияющие на синтез белков и состав ПК, токсины, действующие на организацию ПК, механическое растяжение при искусственной вентиляции лёгких, а также гипоксия и ионизирующее излучение. Они подробно рассмотрены в развёрнутом обзоре Симаненкова с соавторами [23]. Кроме того, обнаружено, что имеется наследственная предрасположенность к нарушениям проницаемости ПК, связанная с белком зонулином. Открытие зонулина утвердило концепцию эпителиальной барьерной функции, регулируемой ПК [24]. В настоящее время очевидно, что ПК осуществляет исключительно динамичную регуляцию барьерной функции как эпителиальных, так и эндотелиальных клеток, изменяя их проницаемость в ответ на эндогенные и экзогенные стимулы. Дизрегуляция и разрушение ПК эпителия приводят к увеличению кишечной проницаемости. В результате чужеродные агенты выходят в кровяное русло, что может играть решающую роль в патогенезе воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Эту ситуацию называют синдромом повышенной эпителиальной проницаемости (СПЭП) или “синдромом дырявой кишки” (the leaky gut syndrome) [13]. ПК вовлекаются в физиологическое, патологическое и диетическое регулирование селективной проницаемости кишечного эпителия путём обратимого открытия

плотных контактов между клетками с участием цитокинов, патогенов и различных факторов, присутствующих в пище [6, 25-27]. Идентифицировано более 50 различных белков, включая зонулин, действующих в ПК [3, 21, 28]. Ключевые элементы ПК — это трансмембранные белки, которые пронизывают липидный бислой: окклюдины (occludins), клаудины (claudins), ангулины (angulins), трицеллюлин (tricellulin), молекулы клеточной адгезии JAM (junctional adhesion molecules) [29-33] (рис. 1). Необходимо выделить клаудины и окклюдины — основные белки ПК двух соседних клеток. Взаимодействие клаудинов обеспечивает селективную проницаемость барьера [23]. Причём, клаудины (Mw: ~23000) представляют семейство из 24 членов [21, 32]. Трансмембранные белки взаимодействуют между собой и с клеточными каркасными (scaffolding) белками, включая ZO (zonula occludens, запирающие межклеточные контакты). Каркасные белки — это три ZO белка: ZO-1 (Mw: ~220000), ZO-2 (Mw: ~160000), ZO-3 (Mw: ~130000), необходимые для создания и закрепления структуры ПК путём связывания с актиновым и миозиновым цитоскелетом, который сокращается при соответствующих стимулах и обеспечивает контроль прохождения молекул через межклеточное пространство [23, 26, 32, 34-36]. Каркасные белки имеют общий структурный домен PDZ (важен для закрепления белков с компонентами цитоскелета в мембране). Кроме того, ПК содержит супрессоры опухоли (ZO-1, ZO-2), транскрипционные факторы, и белки, вовлекаемые в транспорт везикул. Также в структуре ПК идентифицировано два компонента филаментов [21].

2. СЕМЕЙСТВО ЗОНУЛИНА

Важная роль в функционировании ПК отводится зонулину — человеческому аналогу кишечного патогена *Vibrio cholerae* (ZOT). Открытию зонулина предшествовали исследования токсина холерного вибриона *Vibrio cholerae*. В ряде работ было показано, что ZOT, вырабатываемый вибрионом *Vibrio cholerae*, взаимодействует со специфическим рецептором кишечного эпителия, вызывает каскад реакций, включающих активацию фосфолипазы С, протеинкиназы С и полимеризацию актина для регуляции параклеточного пути [37-39]. Эта регуляция обратима, зависит от дозы и времени воздействия стимула и ограничивается тонкой кишкой [40]. ZOT обладает клеточной специфичностью, взаимодействует со специфическим рецептором в разных тканях (мозг, сердце, тонкая кишка) [4]. Естественно, возник вопрос: существуют ли эукариотические аналоги ZOT? Группа Fasano показала, какие эукариотические белки секретируются из гастроинтестинальной слизистой оболочки в ответ на контакт с бактерией или её токсином [1]. С использованием аффинно-очищенных anti-ZOT антител был успешно проведён иммуоскрининг тканей сердца, мозга, кишечника эмбрионов и взрослых особей человека. Во всех образцах был обнаружен иммуореактивный белок с Mw: ~47000. Оказалось, что энтероциты в ответ на стимулы секретируют белок, который вызывает отделение каркасного белка ZO-1 из комплекса ПК слизистой, расширение межклеточных контактов, регулирование кишечной проницаемости [6, 12]. С помощью камеры Уссинга

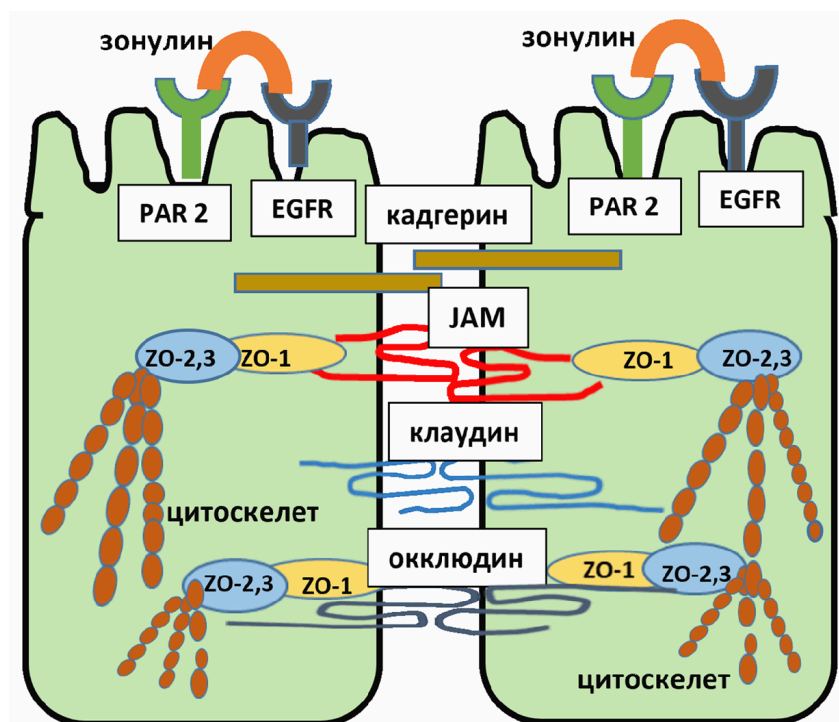


Рисунок 1. Упрощённая схема эпителиального кишечного барьера (ИБ). Контакт зонулина с рецепторами PAR2 и EGFR запускает процесс раскрытия плотных контактов, которые обеспечиваются трансмембранными белками клаудинами-3, -5, -12, окклюдинами, кадгеринами; соединительными адгезионными молекулами JAM; каркасными белками ZO-1, -2, -3; цитоскелетными белками (актин/миозин/виментин).

(устройство для измерения характеристики эпителиальной мембраны по определению электрического сопротивления контроля и опытного образца) показано, что аффинно-очищенный белок (Mw: ~47000) индуцировал разборку, понижал электрическое сопротивление кишечного эпителия у приматов, и этот эффект полностью блокировался преинкубацией обнаруженного белка с анти-ZOT антителами [1]. Ряд экспериментов с камерой Уссинга и анти-ZOT антителами привел к идентификации белка, который и получил название зонулин [1, 41]. При сравнении аминокислотных структур показано, что N-терминальные последовательности молекулы зонулина (8-15 а.о.) и биологически активного фрагмента ZOT DeltaG (Mw: 12000, 291-298 а.о.) имеют общий консервативный мотив из восьми а.о. GGVLVGPG, четыре из которых идентичны: G в положении 8, V в положении 12, Q в положении 13, G в положении 15, и поэтому могут быть критичными для связывания с рецептором. N-концевая последовательность зонулина эмбрионов на 60% идентична N-концевой последовательности зонулина взрослых особей. Предполагается, что структурные различия связаны с процессом развития эмбриона во взрослую особь. Большее сходство в последовательностях а.о. в других областях белковой молекулы не найдено [1].

Оказалось, что зонулин является непротессированной формой гаптоглобина с фенотипом Hp2. Гаптоглобин (гликопротеин плазмы крови, белок острой фазы) эволюционировал из ассоциированного с комплементом белка MASP (маннозо-связывающая лектин-ассоциированная сериновая протеаза), который потерял протеазную функцию из-за мутаций в каталитическом домене, приобрёл новые функции, включая главную — связывание гемоглобина в комплекс и предотвращение окислительного повреждения окружающих тканей в случае зрелого белка [42-44]. В случае же зонулина имеет место совершенно другая функция — способность модулировать ПК и регулировать проницаемость кишечного эпителия и сосудистого эндотелия [45]. Гаптоглобин, как и многие секретируемые белки, синтезируется в виде предшественника — пре-гаптоглобина. Вследствие полиморфизма гена гаптоглобина человека, представленного двумя аллелями, *HP1* и *HP2*, экспрессируются три генотипа/фенотипа белка, известные как Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2. В то время как гаптоглобин консервативен у большинства млекопитающих, Hp2 генотип уникален для человека [46]. В ходе процессинга происходят сложные посттрансляционные модификации: отщепление N-концевого сигнального пептида, разрезание на α - и β -цепи, удаление C-концевого остатка аргинина (R) α -цепи карбоксипептидазой N, образование дисульфидных связей, димеризация и превращение в зрелый тетрамерный белок (Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2), состоящий из двух α - и двух β -цепей [47-50]. Эти преобразования происходят в эндоплазматическом ретикулуме, здесь же содержится наибольшее количество зонулина по сравнению с цитоплазматической

мембраной, цитоплазмой и митохондриями, так как часть пре-Hp остаётся неразрезанной [51]. Поскольку масс-спектрометрический анализ и секвенирование N-концевой последовательности идентифицировали зонулин как человеческий пре-Hp2 [50], то индивидуумы, имеющие гетерозиготы Hp2-1 или гомозиготы Hp2-2, являются продуцентами зонулина, носители Hp1-1 неспособны продуцировать зонулин [6]. Согласно данным UniProt каноническая изоформа Pre-Hp2 состоит из 406 а.о. (Mw: 45200). В плазме доля пре-Hp2 от зрелого Hp2 составляет около 8% [50]. Протеолитически разрезанный зонулин теряет активность регуляции проницаемости, вероятно, из-за разного фолдинга в разрезанной и целой формах [5].

Для подтверждения идентификации зонулина как пре-Hp2 был получен высокоочищенный рекомбинантный пре-Hp2 в бакуловирусной экспрессионной системе. Он детектировался поликлональными анти-ZOT антителами, влиял на проницаемость слизистой тонкой кишки мыши. Пре-Hp2, разрезанный на α - и β -субъединицы, терял эту способность, что подтверждает разные биологические функции зонулина и зрелого гаптоглобина [5, 50].

Высокая скорость мутаций во время эволюции привела к образованию семейства структурно и функционально связанных зонулинов, включая пре-Hp2 и пропердин — другой представитель семейства, который является положительным регулятором альтернативного пути активации системы комплемента, стабилизатором C3 и C5 конвертазы [52, 53]. Пропердин (Mw: 51276) — плазменный гликопротеин; он продуцируется лейкоцитами, проявляет ряд функций, включая влияние на врождённый и адаптивный иммунитет, продукцию провоспалительных цитокинов, инфильтрацию иммунных клеток и повреждение ткани [53].

Действие зонулина осуществляется посредством трансактивации рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) через активируемый протеиназой рецептор 2 (PAR2) [54, 55]. В настоящее время зонулин рассматривается как единственный физиологический модулятор ПК эпителия и эндотелия [9, 56]. Зонулин является членом семейства эукариотических белков, вовлечённых в цитоскелетную реорганизацию и имеющих вариативную N-концевую последовательность, которая обеспечивает тканевую специфичность членов семейства [4]. Как уже отмечено, зонулин является эукариотическим аналогом ZOT. Но если патологический эффект ZOT наблюдается только в кишечном тракте, зонулин проявляет активность в разных тканях и вовлечён в заболевания многих органов. В клинической практике пептиды семейства зонулина (zonulin family peptides, ZFP) рассматриваются как медиаторы и маркеры проницаемости интестинального эпителия [17].

Новым этапом в исследовании зонулина являются эксперименты на модели *in vivo* зонулин-трансгенной мыши (ЗТМ). С её помощью впервые было показано влияние зонулина

на интестинальную проницаемость [57]. После обработки декстран-сульфатом натрия наблюдалось увеличение проницаемости тонкой кишки, заболевание колитом и повышение смертности. Блокировка рецепторов зонулиновым антагонистом, ингибитором АТ-1001 (larazotide acetate), приводила к снижению уровня заболевания [57-59]. На такой же модели ЗТМ с увеличенной интестинальной проницаемостью в экспериментах с использованием ПЦР в реальном времени наблюдалось изменение профиля генной экспрессии белков ПК и белков иммунного профиля по сравнению с обычной мышью. Уровни клаудина-15, клаудина-5, Jam3, миозина-1 снижались у мужских особей, а клаудина-15, -7, -2 — у женских. Эти результаты могут свидетельствовать о потере барьерной функции и представляют молекулярную основу изменённой проницаемости тонкой кишки [60].

3. УЧАСТИЕ ЗОНУЛИНА В МОЗГОВЫХ ПРОЦЕССАХ

На первых этапах исследования зонулина было показано, что он обратимо действует на структуру ПК эпителия тонкого кишечника и увеличивает его проницаемость [1, 12, 24, 51, 61-63]. Дизрегуляция ПК кишечника может вносить вклад в развитие кишечных заболеваний, включая нарушение внутрикишечных коммуникаций, злокачественные новообразования и метастазы [64]. В связи с обнаружением рецептора зонулина в ткани мозга и высказано предположение, что зонулин при физиологических условиях может вовлекаться в процессы не только в тонком кишечнике, но и во внекишечном эпителии, а также сосудистом эндотелии, включая ГЭБ [4, 24]. ИБ и ГЭБ, образованные, соответственно, эпителиальными и эндотелиальными клетками, различаются не только разной морфологией и свойствами, но и тем, что эндотелиальные клетки более чувствительны к окружающей среде. В состав ГЭБ входят также перicytes и астроциты. Общее для обоих барьеров — связь трансмембранных белков с цитоскелетом [65]. Кроме того, в обоих барьерах плотные контакты “поляризуют” клетки с образованием апикальных и базолатеральных мембранных компартментов [66]. Один из механизмов транспорта веществ через эндотелий — межклеточные контакты тех же типов, что эпителия (кроме десмосом). Проницаемость регулируется в значительной степени белковым комплексом, в который входит тканеспецифичный сосудисто-эндотелиальный кадгерин [23]. Оба барьера регулируются взаимодействиями с глияльными клетками, которые связаны с нервной системой кишечника и центральной нервной системой (ЦНС). ГЭБ не регенерирует после повреждения [67].

При изучении опухолей мозга человека была впервые обнаружена экспрессия зонулина в агрессивной форме глияльной опухоли — глиобластоме [2]. Отличительными признаками патогенеза глиобластомы человека являются

активная инвазивность и васкуляриность, что связано с внеклеточной деградацией матрикса межклеточных ПК. Поэтому вовлечение зонулина, обратимо действующего на ПК, в биологию глиямы вполне закономерно. Эта гипотеза была проверена с использованием флуоресцентной иммуногистохимии для идентификации белков на образцах биопсии глияльной опухоли мозга разных степеней заболевания: глиобластомы WHO IV стадии, а также астроцитомы WHO III, менингиомы WHO III и менингиомы I (доброкачественная опухоль, контроль) [2]. Экспрессию зонулина в этих образцах сопоставляли с экспрессией ранее установленных маркеров глияльных опухолей человека: c-kit (тирозинкиназный рецептор) и GFAP (глияльный фибриллярный кислый белок) [68, 69]. Обнаружена корреляция: увеличение экспрессии c-kit сопровождалось увеличением уровня зонулина. Также уровень зонулина коррелировал с деградацией ГЭБ, исчезновением эндотелиального барьера и стенок капилляров, что выявляли по сайтам связывания и агглютинации лектина (*Griffonia simplicifolia* lectin), с использованием которого визуализировали кровеносные сосуды.

В наших экспериментах по анализу протеоформ Нp2-2 в плазме пациентов с глиобластомой и клетках глиобластомы с использованием одно- и двумерного (1DE и 2DE соответственно) электрофореза с последующими иммуноанализом и масс-спектрометрией также была обнаружена непротессированная форма Pre-Hp2 (зонулин) [70]. Причём эта форма обнаружена как со стандартными физико-химическими параметрами (pI 6,3, Mw: 43000), так и с более высокой изотопностью (>8), что указывает на модификацию данной протеоформы зонулина, а также и на возможность использования её в качестве потенциального онкомаркера [70].

О том, что зонулин увеличивает проницаемость ПК, опосредованно свидетельствуют эксперименты с пептидным модулятором ПК, агонистом зонулина, АТ-1002. АТ-1002 — синтетический гексамерный пептид, состоящий из первых шести аминокислотных остатков Delta G активного фрагмента ZOT (Mw: 12000) обеспечивает обратимую модуляцию ПК, вызывает, в частности, перераспределение ZO-1 в ПК [63]. Детали возможного механизма описаны в статье [71]. В модельных системах ГЭБ (первичная культура эндотелиальных клеток мозга) и Caco-2 (иммортилизованная клеточная линия колоректальной аденокарциномы человека), являющаяся моделью интестинального эпителиального барьера, пептидный модулятор АТ-1002 увеличивал проницаемость обоих барьеров [72]. Этот результат, в частности, показывает, что АТ-1002 наряду с другими пептидами можно эффективно использовать для улучшения доставки лекарств через биологические барьеры путём обратимого размыкания ПК [72].

Убедительно роль зонулина как модулятора ПК была показана в потенциальном использовании нейрональных стволовых клеток (НСК) как векторов (путём инъекции) в генной терапии злокачественных

глиом. С помощью модели ГЭБ *in vitro*, состоящей из монослоев клеток RBMEK (культура микроваскулярных эндотелиальных клеток мозга крысы), установлено, что VEGF (vascular endothelial growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), зонулин, присутствующие в кондиционированной среде клеточной линии глиомы C6, индуцировали трансмиграцию НСК через ГЭБ. Удаление зонулина иммунопреципитацией специфическими антителами снижало трансмиграцию на 36%. В аналогичных опытах с кондиционированной средой астроцитов, не содержащей зонулин, этот эффект не наблюдался. Это свидетельствует о влиянии именно зонулина на ПК ГЭБ и подтверждается присутствие зонулина в глиомах [73].

В ряде работ была исследована роль разрушения эпителиального ИБ в патогенезе рассеянного склероза [45, 74-76]. Высказана гипотеза о том, что наблюдаемые высокие проницаемости ГЭБ и ИБ механистически связаны. В системе *in vitro* на модели первичных микроваскулярных эндотелиальных клеток мозга человека (НВМЕС) было показано, что зонулин, наряду с двумя цитокинами IL17A и IFN γ , действующими через специальные рецепторы и запускающими внутриклеточную сигнализацию, увеличивал проницаемость ГЭБ для декстрана (Mw: 40000) [76]. Целостность параклеточного барьера оценивали, измеряя трансэндотелиальное электрическое сопротивление (TEER), величина которого отражает плотность межклеточных соединений [77]. Целостность ПК, как известно, зависит от соответствующей локализации трансмембранных, соединительных, цитоплазматических каркасных белков, а также актинового цитоскелета [78, 79]. Опыты с иммунофлуоресцентной меткой показали, что обработка всеми тремя медиаторами усиливала проницаемость барьера, быстро модифицируя локализацию основных белков ПК: ZO-1, клаудина-5, окклюдина, и подвергая деполимеризации актиновый цитоскелет [76].

Основываясь на том, что аналогичные эффекты наблюдались в системе *in vitro* на клетках Caco-2, можно предположить возможный механизм, по которому ось “кишечник — мозг” (КМО) вовлекается в патогенез нейровоспалительных заболеваний [76]. Например, увеличенная кишечная проницаемость позволяет антигенам пересечь кишечный эпителий и с потоком крови через нарушенный ГЭБ войти в мозг и воздействовать на его функции [80] (рис. 2).

За последние годы двунаправленная связь между мозгом и кишечником стала областью большого научного интереса. Многочисленные факты свидетельствуют о том, что значительную роль в этой связи играет зонулин — важнейший модулятор ПК и регулятор проницаемости ИБ и ГЭБ. Так, повышенные по сравнению с мужчинами уровни зонулина в крови женщин и, следовательно, увеличение кишечной проницаемости могут быть связаны с повышенной чувствительностью к стимулам, индуцирующим депрессию [81].

Большое влияние на взаимодействие кишечник-мозг оказывает микробиота кишечника. Она рассматривается как ключевой регулятор этого двунаправленного взаимодействия [82]. Исследования на животных показали, что бактериальная колонизация кишечника — центральное событие для развития и созревания интестинальной и центральной нервной системы [83]. Заслуживающее внимания доказательство взаимодействия гастроинтестинальной микробиоты человека с мозгом было получено более 20 лет назад, когда назначение антибиотиков привело к улучшению состояния пациентов с печеночной энцефалопатией [84]. Роль микробиоты прослеживается и у больных аутизмом [85, 86]. Физиологические стрессы модулируют состав и общую биомассу кишечной микробиоты. Даже короткие мощные воздействия на микробиоту, такие как два часа социального стресса, способны изменить общий профиль и снизить относительные пропорции основного типа микробиоты [87].

Недавние исследования на животных показали, что трансплантация микробиоты кишечника может “переносить фенотип поведения”, и кишечная микробиота может быть регулирующим фактором развития патогенеза нейropsychиатрического характера [82, 88, 89]. Возможные способы коммуникации между мозгом и микробиотой изложены, в частности, в обзоре, где авторы оперируют уже общепринятым понятием оси: микробиота-кишечник-мозг [89].

Был рассмотрен также аспект возможного участия зонулина в процессах мозга, связанный с неврологической манифестацией инфекции одним из вирусных респираторных патогенов — SARS Cov-2 [90]. Головная боль, энцефалит, anosmia, ataxia, головокружение, нарушение сознания, обмороки обнаруживаются более чем у 50% пациентов с Covid-19 [91]. Такое проявление инфекции опосредованно свидетельствует о вовлечении зонулина в реорганизацию ПК эндотелия мозга, поскольку именно зонулин, как отмечено выше, связан с повышенной проницаемостью ГЭБ [72]. Повышенная активация системы комплемента в случае нейровоспалительных заболеваний также связана с увеличенной проницаемостью ГЭБ [92]. Предполагается, что повышенный уровень зонулина разрушает ПК, увеличивает проницаемость ГЭБ, открывая параклеточный путь [90]. Вирус может инфицировать эндотелиальные клетки сосудов и распространяться в ЦНС.

Увеличение проницаемости ГЭБ — общий механизм повреждения, используемый многочисленными вирусами, в том числе респираторными [93]. Более того, рецептор зонулина мозга человека — гликопротеин с многочисленными остатками сиаловой кислоты, постулируется как новый рецептор SARS-Cov-2 [90, 94].

Многочисленные наблюдения свидетельствуют о том, что сбалансированное взаимодействие нескольких факторов обеспечивает гомеостаз системы (организма человека): генетическая

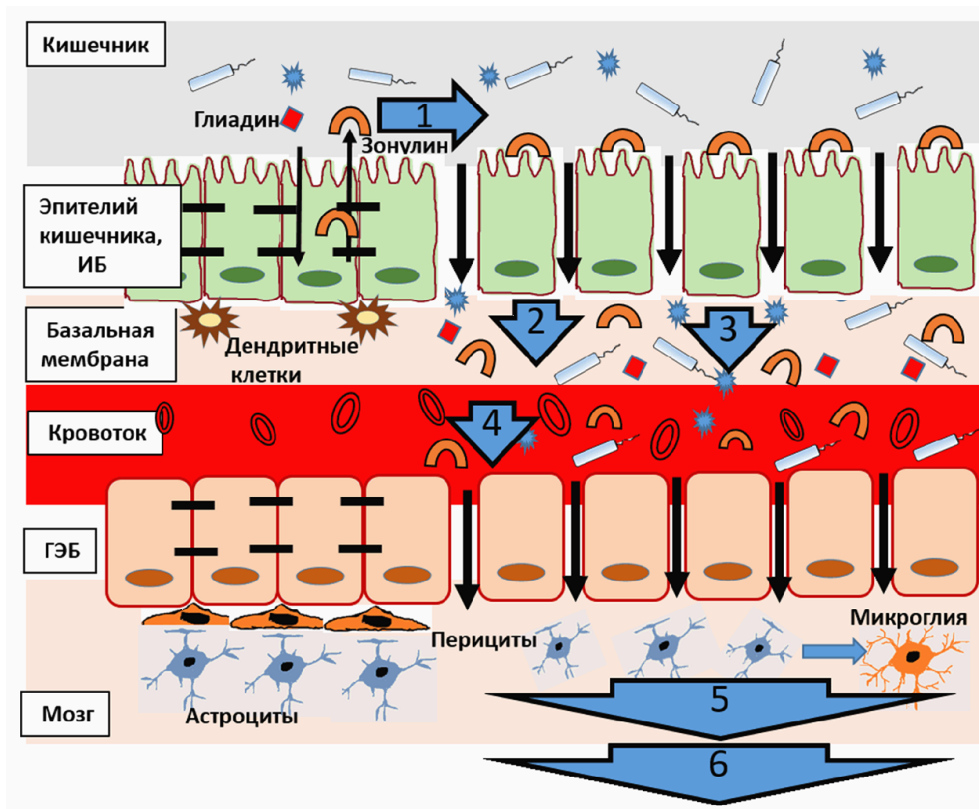


Рисунок 2. Предполагаемая роль зонулина в цепи событий от нарушения ПК до нейровоспаления. 1. Секретция зонулина, вызванная глиадином и патогенными бактериями на эндотелиальные клетки. Зонулин стимулирует размыкание ПК, увеличивает проницаемость кишечника, облегчает проход стресс-стимулирующих компонентов, включая зонулин, компоненты ПК, антигены, патогены, токсины, бактериальные липополисахариды, воспалительные цитокины и антитела в базальную мембрану. 2. Воздействие стресс-стимулирующих компонентов вызывает иммунный ответ и воспаление. 3. Стресс-стимулирующие компоненты попадают в кровоток. 4. Нарушение функции ГЭБ, в который входят эндотелиальные клетки и ПК. Зонулин из кровотока связывается с зонулиновыми рецепторами в ГЭБ, что ведёт к размыканию ПК и пропуску стресс-стимулирующих компонентов в мозг. 5. Увеличение прохождения нежелательных молекул вызывает повреждение астроцитов, что ведёт к иммунному ответу, который стимулируется микроглией. Возникает воспаление и нейровоспаление. 6. Хроническое нейровоспаление приводит к разнообразным патологическим состояниям, включая болезнь Альцгеймера, аутизм, деменцию, шизофрению, слабоумие и т.д.

предрасположенность, подверженность окружающим стимулам, надлежащий иммунный ответ, изменения микробиоты и ещё один важнейший компонент — потеря кишечной барьерной функции, в значительной степени связанная с модулирующим ПК действием зонулина [9, 60, 95].

В заключение можно привести ещё для примера гипотетическую модель участия зонулина в КМО, предложенную на сайте портала FX Medicine [96]. В данной модели предполагается, что воздействие патогенных бактерий или же глиадина на эндотелиальные клетки вызывает секрецию зонулина, который стимулирует размыкание ПК и увеличивает проницаемость кишечника. Это приводит к попаданию в кровоток стресс-стимулирующих компонентов, включая и сам зонулин, что вызывает иммунный ответ и воспаление. Далее, попавший в кровоток зонулин связывается с зонулиновыми рецепторами в ГЭБ, что ведёт к размыканию ПК и пропуску стресс-стимулирующих компонентов в мозг. Увеличение прохождения в мозг этих нежелательных молекул вызывает повреждение астроцитов, что ведёт

к иммунному ответу, который стимулируется микроглией. В конечном итоге возникает хроническое нейровоспаление, которое приводит к разнообразным патологическим состояниям, включая болезнь Альцгеймера, аутизм, деменцию, шизофрению, слабоумие и т.д.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование проведено в рамках выполнения Государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”-ПИЯФ на 2021-2023 годы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang W., Uzzau S., Goldblum S.E., Fasano A. (2000) Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J. Cell Sci.*, **113**, 4435-4440. DOI: 10.1242/jcs.113.24.4435
2. Skardelly M., Armbruster F.P., Meixensberger J., Hilbig H. (2009) Expression of zonulin, c-kit, and glial fibrillary acidic protein in human gliomas. *Transl. Oncol.*, **2**(3), 117-120. DOI: 10.1593/tlo.09115
3. Fasano A. (2020) All disease begins in the (leaky) gut: Role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. *F1000Research*, **9**, 1-12. DOI: 10.12688/f1000research.20510.1
4. Lu R., Wang W., Uzzau S., Vigorito R., Zielke H.R., Fasano A. (2000) Affinity purification and partial characterization of the zonulin/zonula occludens toxin (Zot) receptor from human brain. *J. Neurochem.*, **74**(1), 320-326. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.0740320.x
5. Fasano A. (2012) Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. *Ann. NY Acad. Sci.*, **1258**(1), 25-33. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06538.x
6. Pizzorno J. (2013) Zonulin! The wheat conundrum solved. *Integrative Medicine*, **12**, 8-14.
7. Akao T., Morita A., Onji M., Miyake T., Watanabe R., Uehara T., Kawasaki K., Miyaike J., Oomoto M. (2018) Low serum levels of zonulin in patients with HCV-infected chronic liver diseases. *Euroasian J. Hepato-Gastroenterology*, **8**(2), 112-115. DOI: 10.5005/jp-journals-10018-1275
8. Zak-Golab A., Piotr K., Aptekorz M., Zientara M., Juszczak L., Martirosian G., Chudek J., Olszanecka-Glinianowicz M. (2013) Zonulin concentration in obese and normal weight subjects. *Int. J. Endocrinol.*, **2013**, 1-9. DOI: 10.1155/2013/674106
9. Sturgeon C., Fasano A. (2016) Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers*, **4**(4), 1-19. DOI: 10.1080/21688370.2016.1251384
10. Yeung C.Y., Chiang Chiau J.S., Cheng M.L., Chan W.T., Jiang C.B., Chang S.W., Liu C.Y., Chang C.W., Lee H.C. (2021) Effects of vitamin D-deficient diet on intestinal epithelial integrity and zonulin expression in a C57BL/6 mouse model. *Front. Med.*, **8**, 1-13. DOI: 10.3389/fmed.2021.649818
11. Vanuytsel T., Vermeire S., Cleynen I. (2013) The role of Haptoglobin and its related protein, Zonulin, in inflammatory bowel disease. *Tissue Barriers*, **1**(5), e27321. DOI: 10.4161/tisb.27321
12. Asmar R.E., Panigrahi P., Bamford P., Berti I., Not T., Coppa G.V., Catassi C., Fasano A. (2002) Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterology*, **123**(5), 1607-1615. DOI: 10.1053/gast.2002.36578
13. Ajamian M., Steer D., Rosella G., Gibson P.R. (2019) Serum zonulin as a marker of intestinal mucosal barrier function: May not be what it seems. *PLoS One*, **14**(1), 1-14. DOI: 10.1371/journal.pone.0210728
14. Demir E., Ozkan H., Seckin K.D., Sahtiyanci B., Demir B., Tabak O., Kumbasar A., Uzun H. (2019) Plasma zonulin levels as a non-invasive biomarker of intestinal permeability in women with gestational diabetes mellitus. *Biomolecules*, **9**(24), 1-8. DOI: 10.3390/biom9010024
15. Хавкин А.И., Богданова Н.М., Новикова В.П. (2021) Биологическая роль зонулина и эффективность его использования в качестве биомаркера синдрома повышенной кишечной проницаемости. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*, **66**, 31-38. [Khavkin A.I., Bogdanova N.M., Novikova V.P. (2021) The biological role of zonulin and the effectiveness of its use as a biomarker of the syndrome of increased intestinal permeability. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii*, **66**(1), 31-38.] DOI: 10.21508/1027-4065-2021-66-1-31-38
16. Зыбина Н.Н., Никонов Е.Л., Герштейн Е.С., Мамедли З.З., Стилиди И.С., Кушлинский Н.Е. (2022) Зонулин как маркер проницаемости клеточных контактов при соматических и онкологических заболеваниях (обзор литературы). *Доказательная гастроэнтерология*, **11**(1), 28-44. [Zybina N.N., Nikonov E.L., Gershtein E.S., Memdli Z.Z., Stilidi I.S., Kushlinskii N.E. (2022) Zonulin as a marker of epithelial and endothelial barrier functions in non-communicable diseases (narrative review). *Dokazatel'naya Gastroenterologiya*, **11**(1), 28-44.] DOI: 10.17116/dokgastro20221101128
17. Pietrukaniec M., Migacz M., Zak-Golab A., Olszanecka-Glinianowicz M., Chudek J., Dulawa J., Holecki M. (2019) Zonulin family peptide levels in ascites and serum in patients with liver cirrhosis: A preliminary study. *Dis. Markers*, **2019**, 1-6. DOI: 10.1155/2019/2804091
18. Vojdani A., Vojdani E., Kharrazian D. (2017) Fluctuation of zonulin levels in blood vs stability of antibodies. *World J. Gastroenterol.*, **23**(31), 5669-5679. DOI: 10.3748/wjg.v23.i31.5669
19. Giron L.B., Dweep H., Yin X., Wang H., Damra M., Goldman A.R., Gorman N., Palmer C.S., Tang H.Y., Shaikh M.W., Forsyth C.B., Balk R.A., Zilberstein N.F., Liu Q., Kossenkova A., Keshavarzian A., Landay A., Abdel-Mohsen M. (2021) Plasma markers of disrupted gut permeability in severe COVID-19 patients. *Front. Immunol.*, **12**, 1-16. DOI: 10.3389/fimmu.2021.686240
20. Flanagan J.J., Arjomandi A., Delaney M.L., Du Paty E., Galea P., Laune D., Rieunier F., Walker R.P., Binder S.R. (2014) Development of monoclonal antibodies to pre-haptoglobin 2 and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Immunol. Methods*, **406**, 34-42. DOI: 10.1016/j.jim.2014.02.009
21. González-Mariscal L., Betanzos A., Nava P., Jaramillo B.E. (2003) Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **81**(1), 1-44. DOI: 10.1016/S0079-6107(02)00037-8
22. Farquhar M.G., Palade G.E. (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.*, **17**(2), 375-412. DOI: 10.1083/jcb.17.2.375
23. Симаненков В.И., Маев И.В., Ткачева О.Н., Алексеенко С.А., Андреев Д.Н., Бордин Д.С., Власов Т.Д., Воробьева Н.М., Гриневич В.Б., Губонина И.В., Дробизhev М.Ю., Ефремов Н.С., Каратеев А.Е., Котовская Ю.В., Кравчук Ю.А., Кривобородов Г.Г., Кульчавеня Е.В., Лила А.М., Маевская М.В., Полуктова Е.А., Попкова Т.В., Саблин О.А., Соловьева О.И., Суворов А.Н., Тарасова Г.Н., Трухан Д.И., Федотова А.В. (2021) Синдром повышенной эпителиальной проницаемости в клинической практике. Мультидисциплинарный национальный консенсус. Кардиоваскулярная Терапия и Профилактика, **20**(1), 121-153. [Simanenkova V.I., Maev I.V., Tkacheva O.N., Alexeenko S.A., Andreev D.N., Bordin D.S., Vlasov T.D., Vorob'eva N.M., Grinevitch V.B., Gubonina I.V., Drobizhev M.Yu., Efremov N.S., Karateev A.E., Kotovskaya Yu.V., Kravchuk Yu.A., Krivoborodov G.G., Kulchavenya E.V., Lila A.M., Maevskaya M.V., Poluektova E.A., Popkova T.V., Sablin O.A., Solov'eva O.I., Suvorov A.N., Tarasova G.N., Trukhan D.I., Fedotova A.V. (2021) Syndrome of increased epithelial permeability in clinical practice. Multidisciplinary national consensus. *Cardiovascular Therapy and Prevention*, **20**(1), 121-153.] DOI: 10.15829/1728-8800-2021-2758

24. Fasano A. (2000) Regulation of intercellular tight junctions by Zonula occludens toxin and its eukaryotic analogue zonulin. *Ann. NY Acad. Sci.*, **915**, 214-222. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05244.x
25. Turner J.R. (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, **9**(11), 799-809. DOI: 10.1038/nri2653
26. Suzuki T. (2013) Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol. Life Sci.*, **70**(4), 631-659. DOI: 10.1007/s00018-012-1070-x
27. Camilleri M., Madsen K., Spiller R., van Meerveld B.G., Verne G.N. (2012) Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil.*, **24**(6), 503-512. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x
28. Baioumy S.A., Elgendy A., Ibrahim S.M., Taha S.I., Fouad S.H. (2021) Association between serum zonulin level and severity of house dust mite allergic asthma. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.*, **17**(1), 1-10. DOI: 10.1186/s13223-021-00586-7
29. Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S., Tsukita S. (1993) Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.*, **123**(6), 1777-1788. DOI: 10.1083/jcb.123.6.1777
30. Furuse M., Fujita K., Hiiiragi T., Fujimoto K., Tsukita S. (1998) Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.*, **141**(7), 1539-1550. DOI: 10.1083/jcb.141.7.1539
31. Higashi T., Tokuda S., Kitajiri S.I., Masuda S., Nakamura H., Oda Y., Furuse M. (2013). Analysis of the "angulin" proteins LSR, ILDR1 and ILDR2 – tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. *J. Cell Sci.*, **126**(4), 966-977. DOI: 10.1242/jcs.138271
32. Ikenouchi J., Furuse M., Furuse K., Sasaki H., Tsukita S., Tsukita S. (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol.*, **171**(6), 939-945. DOI: 10.1083/jcb.200510043
33. Martin-Padura L., Lostaglio S., Schneemann M., Williams L., Romano M., Fruscella P., Panzeri C., Stoppacciaro A., Ruco L., Villa A., David Simmons D., Dejana E. (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.*, **142**(1), 117-127. DOI: 10.1083/jcb.142.1.117
34. Gumbiner B., Lowenkopf T., Apatira D. (1991) Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**(8), 3460-3464. DOI: 10.1073/pnas.88.8.3460
35. Umeda K., Ikenouchi J., Katahira-Tayama S., Furuse K., Sasaki H., Nakayama M., Matsui T., Tsukita S., Furuse M., Tsukita S. (2006) ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *J. Cell Biol.*, **126**(4), 741-754. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.043
36. Haskins J., Gu L., Wittchen E.S., Hibbard J., Stevenson B.R. (1998) ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J. Cell Biol.*, **141**(1), 199-208. DOI: 10.1083/jcb.141.1.199
37. Fasano A., Baudry B., Pumphlin D.W., Wasserman S.S., Tall B.D., Ketley J.M., Kaper J.B. (1991) *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**(12), 5242-5246. DOI: 10.1073/pnas.88.12.5242
38. Baudry B., Fasano A., Ketley J., Kaper J.B. (1991) Cloning of a gene (zot) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*, **60**(2), 428-434. DOI: 10.1128/iai.60.2.428-434.1992
39. Fasano A., Fiorentini C., Donelli G., Uzzau S., Kaper J.B., Margaretten K., Ding X., Guandalini S., Comstock L., Goldblum S. (1995) Zonula occludens toxin modulates tight junctions through protein kinase C-dependent actin reorganization, *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, **96**(2), 710-720. DOI: 10.1172/JCI118114
40. Fasano A., Uzzau S. (1997) Modulation of intestinal tight junctions by zonula occludens toxin permits enteral administration of insulin and other macromolecules in an animal model. *J. Clin. Invest.*, **99**(6), 1158-1164. DOI: 10.1172/JCI119271
41. Fasano A. (1999) Cellular microbiology: Can we learn cell physiology from microorganisms? *Am. J. Physiol. – Cell Physiol.*, **276**(4), 765-776. DOI: 10.1152/ajpcell.1999.276.4.c765
42. Kurosky A., Barnett D.R., Lee T.H., Touchstone B., Hay R.E., Arnott M.S., Bowman B.H., Fitch W.M. (1980) Covalent structure of human haptoglobin: A serine protease homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**(6), 3388-3392. DOI: 10.1073/pnas.77.6.3388
43. Langlois M.R., Delanghe J.R. (1996) Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin. Chem.*, **42**(10), 1589-1600. DOI: 10.1093/clinchem/42.10.1589
44. Нарыжный С.Н., Легина О.К. (2021) Гаптоглобин как биомаркер. *Биомедицинская химия*, **67**(2), 105-118. [Naryzhny S.N., Legina O.K. (2021) Haptoglobin as a biomarker. *Biomeditsinskaya Khimia*, **67**(2), 105-118.] DOI: 10.18097/PBMC20216702105
45. Fasano A. (2011) Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: The biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol. Rev.*, **91**(1), 151-175. DOI: 10.1152/physrev.00003.2008
46. Tajik N., Frech M., Schulz O., Schäfer F., Lucas S., Azizov V., Dürholz K., Steffen F., Omata Y., Rings A. et al. (2020). Targeting zonulin and intestinal epithelial barrier function to prevent onset of arthritis. *Nat. Commun.*, **11**(1), 1-14. DOI: 10.1038/s41467-020-15831-7
47. Schaer C.A., Owczarek C., Deuel J.W., Schauer S., Baek J.H., Yalamanoglu A., Hardy M.P., Scotney P.D., Schmidt P.M., Pelzing M., Soupourmas P., Buehler P.W., Schaer D.J. (2018) Phenotype-specific recombinant haptoglobin polymers co-expressed with C1r-like protein as optimized hemoglobin-binding therapeutics. *BMC Biotechnol.*, **18**(1), 1-13. DOI: 10.1186/s12896-018-0424-3
48. Hanley J.M., Haugen T.H., Heath E.C. (1983) Biosynthesis and processing of rat haptoglobin. *J. Biol. Chem.*, **258**(12), 7858-7869. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)32258-0
49. Wicher K.B., Fries E. (2004) Prohaptoglobin is proteolytically in the endoplasmic reticulum by the complement C1r-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**(40), 14390-14395. DOI: 10.1073/pnas.0405692101
50. Tripathi A., Lammers K.M., Goldblum S., Shea-Donohue T., Netzel-Arnett S., Buzza M.S., Antalis T.M., Vogel S.N., Zhao A., Yang S., Arrietta M.C., Meddings J.B., Fasano A. (2009) Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**(39), 16799-16804. DOI: 10.1073/pnas.0906773106
51. Drago S., Asmar R., di Pierro M., Clemente M.G., Tripathi A., Sapone A., Thakar M., Iacono G., Carroccio A., d'Agate C., Not T., Zampini L., Catassi C., Fasano A. (2006) Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand. J. Gastroenterol.*, **41**(4), 408-419. DOI: 10.1080/0036552050023533

52. Scheffler L., Crane A., Heyne H., Tönjes A., Schleinitz D., Ihling C.H., Stumvoll M., Freire R., Fiorentino M., Fasano A., Kovacs P., Heiker J.T. (2018) Widely used commercial ELISA does not detect precursor of haptoglobin2, but recognizes properdin as a potential second member of the zonulin family. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **9**, 1-11. DOI: 10.3389/fendo.2018.00022
53. Chen J.Y., Cortes C., Ferreira V.P. (2018) Properdin: A multifaceted molecule involved in inflammation and diseases. *Mol. Immunol.*, **102**, 58-72. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.05.018
54. Bueno L., Fioramonti J. (2008) Protease-activated receptor 2 and gut permeability: A review. *Neurogastroenterol. Motil.*, **20**(6), 580-587. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2008.01139.x
55. Raimondi F., Santoro P., Barone M.V., Pappacoda S., Barretta M.L., Nanayakkara M., Apicella C., Capasso L., Paludetto R. (2008) Bile acids modulate tight junction structure and barrier function of Caco-2 monolayers via EGFR activation. *Am. J. Physiol. – Gastrointest. Liver Physiol.*, **294**(4), 906-913. DOI: 10.1152/ajpgi.00043.2007
56. Wang X., Li M.-M., Niu Y., Zhang X., Yin J.-B., Zhao C.-J., Wang R. (2019) Serum zonulin in HBV-associated chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Dis. Markers*, **2019**, 1-6. DOI: 10.1155/2019/5945721
57. Sturgeon C., Lan J., Fasano A. (2017) Zonulin transgenic mice show altered gut permeability and increased morbidity/mortality in the DSS colitis model. *Ann. NY Acad. Sci.*, **1397**(1), 130-142. DOI: 10.1111/nyas.13343
58. Arrieta M.C., Madsen K., Doyle J., Meddings J. (2009) Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. *Gut*, **58**(1), 41-48. DOI: 10.1136/gut.2008.150888
59. Slifer Z.M., Krishnan B.R., Madan J., Blikslager A.T. (2021) Larazotide acetate: A pharmacological peptide approach to tight junction regulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **320**(6), G983-G989. DOI: 10.1152/AJPGI.00386.2020
60. Miranda-Ribera A., Ennamorati M., Serena G., Cetinbas M., Lan J., Sadreyev R.I., Jain N., Fassano A., Fiorentino M. (2019) Exploiting the zonulin mouse model to establish the role of primary impaired gut barrier function on microbiota composition and immune profiles. *Front. Immunol.*, **10**, 1-14. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02233
61. Marinaro M., Fasano A., de Magistris M.T. (2003) Zonula occludens toxin acts as an adjuvant through different mucosal routes and induces protective immune responses. *Infect. Immun.*, **71**(4), 1897-1902. DOI: 10.1128/IAI.71.4.1897-1902.2003
62. Clemente M.G., de Virgiliis S., Kang J.S., Macatagney R., Musu M.P., di Pierro M.R., Drago S., Congia M., Fasano A. (2003) Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*, **52**(2), 218-223. DOI: 10.1136/gut.52.2.218
63. di Pierro M., Lu R., Uzzau S., Wang W., Margaretten K., Pazzani C., Maimone F., Fasano A. (2001) Zonula occludens toxin structure-function analysis: Identification of the fragment biologically active on tight junctions and of the zonulin receptor binding domain. *J. Biol. Chem.*, **276**(22), 19160-19165. DOI: 10.1074/jbc.M009674200
64. Catassi C., Fasano A. (2008) Celiac disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, **24**(6), 687-691. DOI: 10.1097/MOG.0b013e32830edc1e
65. Wolburg H., Lippoldt A. (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation. *Vascul. Pharmacol.*, **38**(6), 323-337. DOI: 10.1016/S1537-1891(02)00200-8
66. Zlokovic B.V. (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, **57**(2), 178-201. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.01.003
67. Daneman R., Rescigno M. (2009) The gut immune barrier and the blood-brain barrier: Are they so different? *Immunity*, **31**(5), 722-735. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.09.012
68. Puputti M., Tynninen O., Sihto H., Blom T., Mäenpää H., Isola J., Paetau A., Joensuu H., Nupponen N.N. (2006) Amplification of KIT, PDGFRA, VEGFR2, and EGFR in gliomas. *Mol. Cancer Res.*, **4**(12), 927-934. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0085
69. Jung C.S., Foerch C., Schänzer A., Heck A., Plate K.H., Seifert V., Steinmetz H., Raabe A., Sitzer M. (2007) Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain*, **130**(12), 3336-3341. DOI: 10.1093/brain/awm263
70. Naryzhny S., Ronzhina N., Zorina E., Kabachenko F., Zavialova M., Zgoda V., Klopov N., Legina O., Pantina R. (2021) Evaluation of haptoglobin and its proteoforms as glioblastoma markers. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(12), 1-12. DOI: 10.3390/ijms22126533
71. Gopalakrishnan S., Pandey N., Tamiz A.P., Vere J., Carrasco R., Somerville R., Tripathi A., Ginski M., Paterson B.M., Alkan S.S. (2009) Mechanism of action of ZOT-derived peptide AT-1002, a tight junction regulator and absorption enhancer. *Int. J. Pharm.*, **365**(1-2), 121-130. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.08.047
72. Bocsik A., Walter F.R., Gyebrovski A., Fülöp L., Blasig I., Dabrowski S., Otvos F., Toth A., Rakhely G., Veszelska S., Vastag M., Szabo-Revesz P., Deli M. (2016) Reversible opening of intercellular junctions of intestinal epithelial and brain endothelial cells with tight junction modulator peptides. *J. Pharm. Sci.*, **105**(2), 754-765. DOI: 10.1016/j.xphs.2015.11.018
73. Díaz-Coránguez M., Segovia J., López-Ornelas A., Puerta-Guardo H., Ludert J., Chávez B., Meraz-Cruz N., González-Mariscal L. (2013) Transmigration of neural cells across the blood brain barrier induced by glioma cells. *PLoS One*, **8**(4), 1-13. DOI: 10.1371/journal.pone.0060655
74. Rahman M.T., Ghosh C., Hossain M., Linfield D., Rezaee F., Janigro D., Marchi N., van Boxel-Dezaire A.N.N. (2018) IFN- γ , IL-17A, or zonulin rapidly increase the permeability of the blood-brain and small intestinal epithelial barriers: Relevance for neuro-inflammatory diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **507**(1-4), 274-279. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.11.021
75. Buscarinu M.C., Romano S., Mechelli R., Pizzolato Umeton R., Ferraldeschi M., Fornasiero A., Reniè R., Cerasoli B., Morena E., Romano C., Loizzo N.D., Umeton R., Salvetti M., Ristori G. (2018) Intestinal permeability in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*, **15**(1), 68-74. DOI: 10.1007/s13311-017-0582-3
76. Camara-Lemarroy C.R., Metz L., Meddings J.B., Sharkey K.A., Wee Yong V. (2018) The intestinal barrier in multiple sclerosis: Implications for pathophysiology and therapeutics. *Brain*, **141**(7), 1900-1916. DOI: 10.1093/brain/awy131
77. Benson K., Cramer S., Galla H.J. (2013) Impedance-based cell monitoring: Barrier properties and beyond. *Fluids Barriers CNS*, **10**(1), 1-11. DOI: 10.1186/2045-8118-10-5
78. Lechuga S., Ivanov A.I. (2017) Disruption of the epithelial barrier during intestinal inflammation: Quest for new molecules and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.*, **1864**(7), 1183-1194. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.03.007

79. Ivanov A.I., Parkos C.A., Nusrat A. (2010) Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation. *Am. J. Pathol.*, **177**(2), 512-524. DOI: 10.2353/ajpath.2010.100168
80. Miranda-Ribera A., Serena G., Liu J., Fasano A., Kingsbury M.A., Fiorentino M.R. (2022) The Zonulin-transgenic mouse displays behavioral alterations ameliorated via depletion of the gut microbiota. *Tissue Barriers*, **10**(3), DOI: 10.1080/21688370.2021.2000299
81. Maget A., Dalkner N., Hamm C., Bengesser S.A., Fellendorf F.T., Platzer M., Queissner R., Birner A., Lenger M., Morkl S., Kohlhammer-Dohr A., Rieger A., Seidl M., Mendel L., Farber T., Wetzlmair L., Schwalsberger K., Amberger-Otti D.V., Schoggl H., Lahousen T., Leitner-Afschar B., Unterwieser R., Zelzer S., Mangge H., Reininghaus E.Z. (2021) Sex differences in zonulin in affective disorders and associations with current mood symptoms. *J. Affect. Disord.*, **294**, 441-446. DOI: 10.1016/j.jad.2021.07.021
82. Cenit M.C., Sanz Y., Codoñer-Franch P. (2017) Influence of gut microbiota on neuropsychiatric disorders. *World J. Gastroenterol.*, **23**(30), 5486-5498. DOI: 10.3748/wjg.v23.i30.5486
83. Stilling R.M., Dinan T.G., Cryan J.F. (2014) Microbial genes, brain & behaviour – epigenetic regulation of the gut-brain axis. *Genes, Brain Behav.*, **13**(1), 69-86. DOI: 10.1111/gbb.12109
84. Carabotti M., Scirocco A., Maselli M.A., Severi C. (2015) The gut-brain axis: Interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann. Gastroenterol.*, **28**(2), 203-209.
85. Mayer E.A., Padua D., Tillisch K. (2014) Altered brain-gut axis in autism: Comorbidity or causative mechanisms? *BioEssays*, **36**(10), 933-939. DOI: 10.1002/bies.201400075
86. Song Y., Liu C., Finegold S.M. (2004) Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**(11), 6459-6465. DOI: 10.1128/AEM.70.11.6459-6465.2004
87. Galley J.D., Nelson M.C., Yu Z., Dowd S.E., Walter J., Kumar P.S., Lyte M., Bailey M.T. (2014) Exposure to a social stressor disrupts the community structure of the colonic mucosa-associated microbiota. *BMC Microbiol.*, **14**, 1-13. DOI: 10.1186/1471-2180-14-189
88. Luczynski P., McVey Neufeld K.A., Oriach C.S., Clarke G., Dinan T.G., Cryan J.F. (2016) Growing up in a bubble: Using germ-free animals to assess the influence of the gut microbiota on brain and behavior. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, Invited Review, **19**(8), 1-17. DOI: 10.1093/ijnp/pyw020
89. Bonaz B., Bazin T., Pellissier S. (2018) The vagus nerve at the interface of the microbiota-gut-brain axis. *Front Neurosci.*, **12**, 1-9. DOI: 10.3389/fnins.2018.00049
90. Llorens S., Nava E., Muñoz-López M., Sánchez-Larsen Á., Segura T. (2021) Neurological symptoms of COVID-19: The zonulin hypothesis. *Front. Immunol.*, **12**, 1-9. DOI: 10.3389/fimmu.2021.665300
91. Romero-Sánchez C.M., Díaz-Maroto I., Fernández-Díaz E., Sánchez-Larsen Á., Layos-Romero A., García-García J., González E., Redondo-Peñas I., Perona-Moratalla A.B., Valle-Perez J.A.D., Gracia-Gil J., Rojas-Bartolome L., Feria-Vilar I., Monteagudo M., Palao M., Palazon-García E., Alcahut-Rodríguez C., Sopelana-Garay D., Moreno Y., Ahmad J., Segura T. (2020) Neurologic manifestations in hospitalized patients with COVID-19: The ALBACOV registry. *Neurology*, **95**(8), e1060-70. DOI: 10.1212/WNL.00000000000009937
92. Jacob A., Alexander J.J. (2014) Complement and blood-brain barrier integrity. *Mol. Immunol.*, **61**(2), 149-152. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.06.039
93. Robinson C.P., Busl K.M. (2020) Neurologic manifestations of severe respiratory viral contagions. *Crit. Care Explor.*, **2**(4), e0107. DOI: 10.1097/cce.0000000000000107
94. Lee D.B.N., Huang E., Ward H.J. (2006) Tight junction biology and kidney dysfunction. *Am. J. Physiol. – Ren. Physiol.*, **290**(1), 20-34. DOI: 10.1152/ajprenal.00052.2005
95. Yu J., Shen Y., Zhou N. (2021) Advances in the role and mechanism of zonulin pathway in kidney diseases. *Int. Urol. Nephrol.*, **53**(10), 2081-2088. DOI: 10.1007/s11255-020-02756-9
96. Leaky gut, leaky brain: the role of zonulin. Retrived August 8, 2022 from <https://www.fxmedicine.com.au/content/leaky-gut-leaky-brain-role-zonulin>

Поступила в редакцию: 08. 08. 2022.
После доработки: 19. 09. 2022.
Принята к печати: 13. 10. 2022.

**ZONULIN — REGULATION OF TIGHT CONTACTS
IN THE BRAIN AND INTESTINE — FACTS AND HYPOTHESES**

S.N. Naryzhny^{1,2}, O.K. Legina²*

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: snaryzhny@mail.ru

²Petersburg Institute of Nuclear Physics B.P. Konstantinova National Research Center “Kurchatov Institute”,
1 Orlova Roshcha, Gatchina, Leningrad Region, 188300 Russia

In recent years, the interrelationship between the brain and the gut has become an area of high scientific interest. The intestine is responsible not only for digestion, as it contains millions of neurons, its own immune system, and affects the emotional and cognitive processes. The relationship between the gut and the brain suggests that the processes carried out by the gut microbiota play a significant role in the regulation of brain function, and vice versa. A special role here is played by intercellular tight junctions (TJ), where the zonulin protein holds an important place. Zonulin, an unprocessed precursor of mature haptoglobin, is the only physiological modulator of intercellular TJ that can reversibly regulate the permeability of the intestinal (IB) and blood-brain (BBB) barriers in the human body. BBB disruption and altered microbiota composition are associated with many diseases, including neurological disorders and neuroinflammation. That is, there is a gut-brain axis (GBA) — a communication system through which the brain modulates the functions of the gastrointestinal tract (GIT) and vice versa. GBA is based on neuronal, endocrine, and immunological mechanisms that are interconnected at the organismal, organ, cellular, and molecular levels.

Key words: zonulin; haptoglobin; brain; intestine

Funding. The study was conducted within the framework of the State Assignment of the National Research Center “Kurchatov Institute”-PNPI (Petersburg Nuclear Physics Institute) for 2021-2023.

Received: 08.08.2022; revised: 19.09.2022; accepted: 13.10.2022.