„LYUKAS HÖRGŐ” SZINDRÓMA krónikus obstruktív tüdőbetegségben

Dr. Nagy László Béla
Felsődobsza

Az epitheliális barrier elmélet szerint a krónikus nem fertőző betegségek – köztük az autoimmun és allergiás kórképek – gyakoribbá válásának egyik oka a hámszövet barrier funkciójának károsodása. Ebben a környezeti toxikus anyagoknak komoly szerepük van: diszbiózist, a mikrobióta szubepitheliális szövetekbe jutását, az opportunista patogének kolonizációját okozzák, ezáltal krónikus gyulladást, lokális és szisztémás immunválaszt váltanak ki (1. ábra). A fizikai barrier funkción kívül a kémiai védelem is működik. A hámsejtek antimikrobiális peptideket, proteázokat és antioxidánsokat szekretálnak, és részt vesznek az immunvédekezésben is. Molekuláris szenzorokat expresszálnak, melyek mikrobiális és egyéb károsító mintákat érzékelnek a sejtfelszínen és intracellulárisan, ezáltal aktiválják az immunrendszert. A gasztrointesztinális traktusban és a légutakban hasonló struktúrájú és működésű szelektív barrier működik, ami szabályozza a gázok és a tápanyagok átjutását, fenntartja az egyensúlyt a mikrobiótával, és akadályozza a patogének bejutását. A nyálkahártya barrier alapvető részét a hámsejtek közti intercelluláris kapcsolatok alkotják[1].

Ismert, hogy COPD-ben és bronchitisben fokozott a légúti permeabilitás. Erre vonatkozóan az első adatot – bár más célból történt a vizsgálat – *Bonomo* közölte 1964-ben. Krónikus bronchitisben kimutatta, hogy a vérben lévő albumin folyamatosan bekerül a köpetbe[2]. Aztán 1980-ban *Jones* technécium izotóppal jelzett dietilén-triamin-penta-acetátot (99mTc-DTPA) inhaláltatott. A nem dohányosokhoz képest a dohányosoknál ez jelentősen nagyobb koncentrációt ért el a vérben, jeléül a fokozott légzőszervi permeabilitásnak[3]. Tengerimalacon észlelték, hogy cigaretta expozícióra a permeabilitás fokozódása a légutak minden szintjén érvényesül, nemcsak az alveolusokban, hanem a hörgőhámban is. Utóbbit emberen is megerősítették, szintén dohányzás hatására[4]. Radioaktívan jelzett albuminnal összehasonlítottak asztmás és krónikus bronchitises betegeket. A légúti nyálkahártya permeabilitásának fokozódását a bronchitises betegeknél tapasztalták[5]. A hámszöveten keresztüli transzport részben transzcelluláris. Ez a sejteken keresztül történő aktív folyamat, felszívódás vagy kiválasztás, mely specifikus pumparendszerek és transzporterek által zajlik. Ezzel szemben a paracelluláris, sejtek mellett zajló transzport passzív folyamat.

A JUNKCIONÁLIS KOMPLEXEK

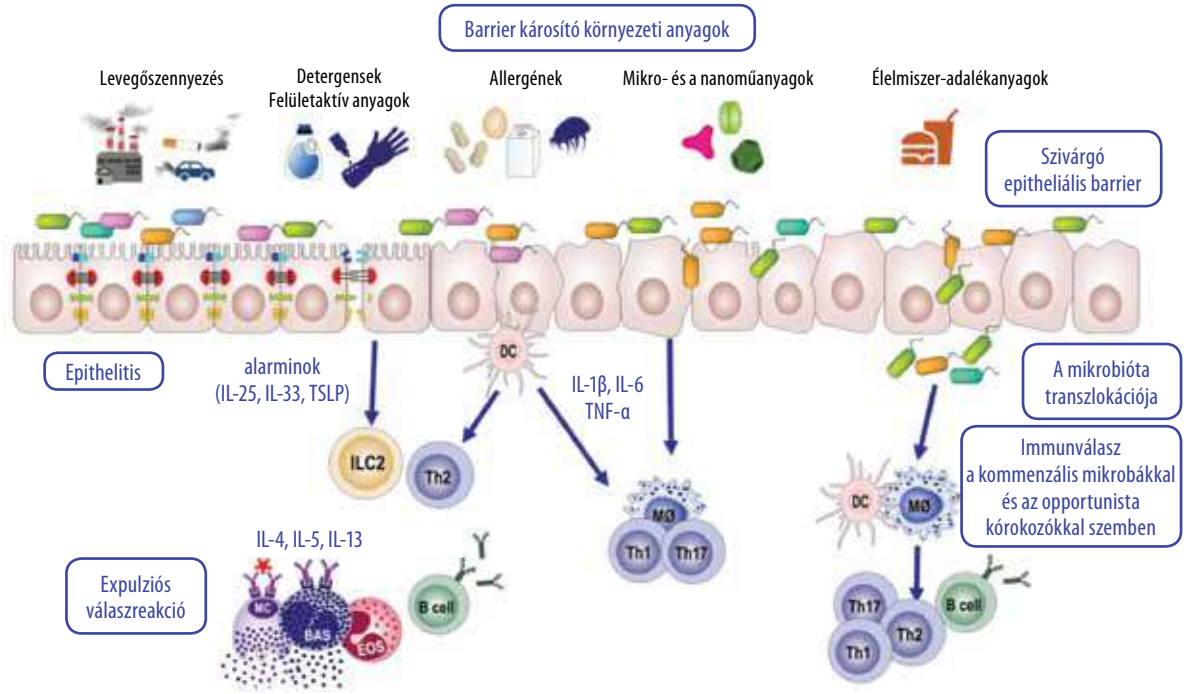
Már a fénymikroszkópos korszakban is látták, hogy a hámsejtek érintkező felületein egy zárólécrendszer helyezkedik el. Elektronmikro-

szkópos technikákkal derítették ki, hogy ez egy speciális záróberendezés, a junkcionális komplex. Részletes leírását *Farquhar* publikálta 1963-ban[6]. Alkotórészei közül 1993-ban vált ismertté az okkludin[7], 1998-ban pedig a klaudin[8].

A junkcionális komplexnek több eleme ismert[9]. A *zonula occludens* (záróléc, tight junction) feladata az, hogy paracellulárisan megakadályozza anyagok átjutását. Gallérszerűen körbefutva szorosan összeilleszti a szomszédos sejteket a sejtek apicolaterális részén. Területén eltűnik a glikokalix és a szomszédos sejtek sejtmembránjainak külső lipid rétegei összeolvadnak egymással. A *zonula adherens* a zonula occludensnél lazább sejtkapcsolódási mód, a sejtek bazolaterális részén. Elsődleges feladata az, hogy megakadályozza a sejtek szeparálódását. A sejtek citoplazmájából a sejthártya felé finom fonalak, tonofilamentumok futnak. Ezek a citoszkeleton átmeneti filamentumai közé tartoznak. A zonula adherens területén egyes anyagok diffúzióval átjutnak. A zonula adherens folyamatos kapcsolat, ha pontszerű, akkor macula adherens a neve. A *gap junction* (réskapcsolat) két sejt citoplazmája között létesít kapcsolatot kis csatornácskákkal, melyek lehetőséget teremtenek kis molekulasúlyú anyagok átjutására.

Tight junction

A permeabilitás fokozódásában alapvető szereppel bír a sejtfelszín apikális részén elhelyezkedő tight junction, melynek szerkezetét a 2. ábra mutatja. A struktúráját illetően három modellt dolgoztak ki. Elsőként a protein modellt, mely szerint membránproteinekből épül fel. Ezután jött a lipid micella modell, ami a morfológiai hasonlóságból eredt. Ma a hibrid protein-lipid modell az elfogadott. A funkciót illetően hangsúlyozzák, hogy a tight junction nemcsak

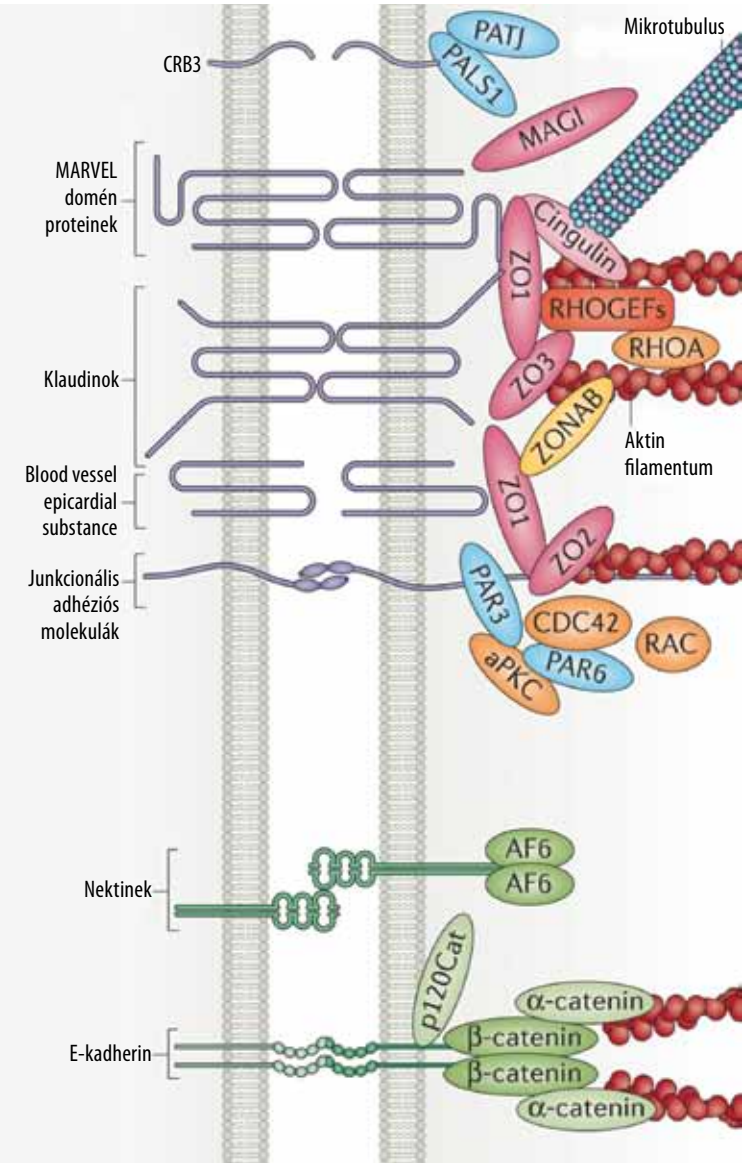


1. ábra: Az epitheliális barrier környezeti anyagok okozta károsodása. Ezek a veszélyes tényezők – ideértve a légszennyező anyagokat (lebegő részecskék, cigarettafüst, illékony szerves vegyületek, stb.), a mosószereket és felületaktív anyagokat, a kézfertőtlenítőket, az allergéneket (mogyoró, tojás, tej, háziporatka, pollen stb.), a mikro- és a nanoműanyagokat és az élelmiszer-adalékanyagokat (élelmiszer-színezékek, emulgeálószerek és édesítőszerek) – mind az epitheliális barrier károsodását és gyulladását váltják ki. A sejthalál alarmin (IL-25, IL-33 és TSLP) szekrécióval jár, ami 2-es típusú gyulladáshoz vezet, amelyre jellemző a 2-es csoportba tartozó veleszületett limfoid sejtek (ILC2), Th2-sejtek, eozinofilek (EOS), bazofilek (BAS) és hízósejtek (MC) aktivitása. Emellett a hámsejtek proinflammatorikus citokineket (IL-1β, IL-6, TNF-α) szekretálnak. A mikrobióta szubepitheliális területekre történő transzlokációja a kommenzális mikrobákkal és az opportunista kórokozókkal szemben egyaránt immunválaszt vált ki. (*Pat és mtsai.* nyomán)[1]

egy gát, hanem az anyagtranszportot is szabályozza, mégpedig kétféleképpen: az egyik a permeabilitás szabályozása a részecskenagyság szerint, a másik a töltés szelektív pórusként való működés. Utóbbi kationszelektív és a klaudinhoz kötődik, a makromolekula permeabilitás pedig a junkcionális adhéziós molekulákhoz[10].

A struktúrában és működésben szereplő molekuláknak több csoportja van. Transzmembrán proteinek: klaudin család, junkcionális MARVEL domén proteinek (okkludin, tricellulin, MARVEL D3), junkcionális adhéziós molekulák. Adaptor proteinek: zonula occludens család. Szignalizáló proteinek: ZONAB (ZO-associated nucleic acid binding protein)[11].

A klaudin család valamennyi hámszövetben előfordul, de szövetspecifikusak (emberben több mint 20 fajta klaudin ismert). Funkciójukat illetően barrier vagy csatorna formálóak, extracelluláris és intracelluláris szálakból állnak. Az okkludin citoplazmatikus N- és C-terminálisból és extracelluláris hurokból áll, a C-terminálisa összeköttetésben van a ZO-proteinekkel. A tricellulin a nagy molekulák passzázsában játszik szerepet. A három sejt találkozásánál lévő tight junction a potenciálisan gyenge pontja a paracelluláris barriernek. A junkcionális adhéziós molekulák immunglobulin-szerű ektodoménnal rendelkeznek, sokfelé előfordulnak, így a hámszövetekben és az endotheliumban is. A MAGUK (membrane associated guanylate kinase homolog) fehérjék családjába tartoznak a ZO-1-2-3 molekulák, melyek a klaudinok intracellulláris C-terminálisához kötődnek[12].



2. ábra: A tight junction szerkezete (*Zihni és mtsai.* nyomán)[11]

A zonulin

A történet 1991-ben indult. Ismert volt, hogy a *Vibrio cholerae* termel egy enterotoxint, ami a kolera esetén jelentkező profúz hasmenést okozza, mivel megnöveli a bélnyálkahártya permeabilitását. *Fasano* felfedezte, hogy a kórokozó termel egy másik toxint is, amely hasonló hatású és megváltoztatja a zonula occludens morfológiáját. Ezt elnevezte zonula occludens toxinnak (ZOT)[13]. Tovább vizsgálta különböző sejtvonalakon és megállapította, hogy egy specifikus receptorhoz kapcsolódik, aminek a kifejeződése a különböző sejteken eltérő mértékű. A ZOT kapcsolódása pedig egy intracelluláris kaszkádot aktivál, ami megváltoztatja a per-meabilitást és egyúttal az aktin polimerizációját is. Ismert, hogy a fehérje foszforiláció szereppel bír a tight junction működésében, a ZOT pedig fokozza a foszfokináz-alfa aktivitását. Ez eredményezi az aktin monomerek polimerizációját és a mikrofilamentumok geometriájának megváltozását[14].

Előállítottak ZOT elleni antitesteket és ezekkel különböző szöveteket vizsgáltak. A meglepetés akkor történt, amikor a humán intesztinális szövettel is pozitivitást kaptak, és kiderült, hogy a zonula occludens toxinnak van egy eukaryota analógja. Ezt zonulinnak nevezték el.

Vajon mi ennek az élettani szerepe?

Újabb meglepetésre a zonulint kimutatták számos extraintesztinális szövetben is, például a humán szívben és az agyban is. Kiderült, hogy a zonulin a tight junctiont szabályozó szövetspecifikus regulátor család tagja. Mindegyik tag kb. 47 kDa és eltérő az N-terminális receptorkötő motívum, amely a szövetspecificitásáért felelős. A C-terminális tau-szerű domén felelős a citoszkeleton átrendeződéséért, azaz az aktin mikrofilamentumok proteinkináz-alfa dependens polimerizációjáért. Ez a receptorhoz kötődés után internalizálódik és egy sor intracelluláris folyamatot indít el, többek között foszfolipáz C és foszfokináz-alfa aktivációt, és ezek vezetnek a folyamat további lépéseihez, végül a tight junction megnyílik[15,16].

A coeliakiás betegek esetében is fokozott volt a ZOT elleni antitestek által kiváltott reakció. Zonulin mutatható ki megnövekedett mennyiségben, aminek szerepe van a coeliakia esetén észlelhető fokozott intesztinális permeabilitásban. Ez utóbbit nevezik „lyukas bél" szindrómának[17].

A humán agyszövetből kivont zonulin két ZOT kötő proteint tartalmaz: az 55 kDa protein tubulinként működik, a 45 kDa pedig a receptor. Ez a receptor egy több sziálsavgyököt tartalmazó glükoprotein. A zonulin és a receptor N-terminális szekvenciája hasonlóságot mutat a kálciumkötő proteinekkel[18].

A struktúra–funkció analízist elvégezve megállapították, hogy a ZOT biológiailag aktív doménje a C-terminálison helyezkedik el és az aminosav sorrendjét a zonulinnal összehasonlítva kiderült, hogy ugyanaz az oktapeptid a receptorkötő doménjük[19].

A humán zonulin tehát a tight junction élettani modulátora. Tovább vizsgálva, a szérum proteoma elemzésével kiderült, hogy a zonulin azonos a humán haptoglobin-2 prekurzorral, azaz prehaptoglobin-2[20].

A prehaptoglobin szintézise elsősorban a májban történik, de kisebb mértékben más szövetekben, a tüdőben, vesében és a bőrben is keletkezik. A termelődését fokozzák a fő proinflammációs citokinek (IL-1, IL-6, TNF-alfa)[21,22]. Tetramer fehérje, amely két alfa/béta dimerből tevődik össze. Mindegyik dimert külön gén kódolja. Poszttranszlációsan a polipeptidet proteáz hasítja haptoglobinná. A proteáz a MASP (mannózkötő lektin-asszociált szerin-proteáz) család tagja. A haptoglobin szokatlan abból a szempontból, hogy a hasítási folyamat nem a Golgi-komplexben zajlik, hanem az endoplazmatikus retikulumban. (Érdekes, hogy a zonulin intracelluláris frakciója szintén az endoplazmatikus retikulumban a legmagasabb koncentrációjú.) Az érett humán haptoglobin egy heterodimer plazma glükoprotein, mely alfa és béta polipeptid láncból áll, melyeket kovalens kötéssel diszulfid hidak kötnek össze, és csak a béta-lánc glükolizált. Eltérően a béta-lánctól az alfa-láncnak két doménja van, alfa-1 és alfa-2. Az alfaláncoktól függően a haptoglobinnak három izoformája van: HP-1-1, HP-2-1 és HP-2-2.

Az alfa-lánc tartalmaz egy komplement kontroll proteint, a béta-lánc pedig katalitikus kimotripszin-szerű szerin proteáz domént. A multidomén struktúra ellenére korábban a haptoglobinnak csak egyetlen funkciója volt ismert, nevezetesen az, hogy megköti a szabad hemoglobint és ezzel megakadályozza, hogy az oxidatív károsodást okozzon: tehát antioxidáns. Ezt a kötést a makrofág-specifikus CD163 receptor közvetíti. A későbbiekben kiderült, hogy a hapotoglobinnak számos más funkciója is van, az akut fázis proteinek közé tartozik. A monocita-makrofág vonalon kívül befolyásolja a T-helper 1 és T-helper 2 sejtek egyensúlyát is, továbbá szerepe van az immunválaszban, az angiogenezisben, a nitrogén-monoxid homeosztázisban, a prosztaglandin szintézisben és az infekciók elleni védekezésben is. Egyébként a MASP család tagjai egy plazminogén-szerű növekedési faktort tartalmaznak (HGF: hepatocyta growth faktor). Összefüggésben vannak még a sejtnövekedéssel, a proliferációval, a differenciálódással, a migrációval és az intercelluláris junkciók felszakadásával[23-27] is.

A prehaptoglobinnak viszont eddig nem volt semmilyen ismert funkciója azon kívül, hogy prekurzor. Rágcsáló vékonybél nyálkahártyában megvizsgálták a zonulin biológiai hatását a tight junctionra rekombináns prehaptoglobinnal. Eltérően az érett haptoglobintól, a prehaptoglobin dózistól és időtől függően elvesztette permeabilitás fokozó hatását az alfa-2 és a béta-alegység lehasítás után. Megállapították azt is, hogy az egyláncú zonulin – de nem az érett forma – aktiválja az EGFR-t (epidermális növekedési faktor receptor) a PAR-2 (proteáz-aktivált receptor-2) molekulán keresztül. Az egyláncú zonulin az epidermális növekedési faktor aktivátora, de a komplett kettősláncú haptoglobin-2 már nem az. Az EGFR és a PAR-2 szerepét a hám permeabilitásban korábban már leírták[28].

A nyálkahártyák permeabilitása szerepet játszik az antigének átjutásának gátlásában is. Ha a zonulin mennyisége nő, akkor a barrier funkció csökken, és több antigén jut be. Ez is egyik magyarázata lehet annak, hogy a zonulint a későbbiekben összefüggésbe hozták számos betegség patomechanizmusával[29].

A zonulin család többi tagja

Properdin

A properdin szintén a mannózkötő lektin-asszociált szerin-proteázok (MASP) családjába tartozik[31]. Akut mikrobiális expozíciót követően a neutrofil sejtekből, a T-sejtekből és a makrofágokból szabadul fel, és fokozza a komplement rendszer aktivitását. Mindhárom komplement utat felerősíti azáltal, hogy a C3 és C5 konvertázhoz kötődve, azokat stabilizálja. Egyúttal mintafelismerő molekula is, továbbá immunkomplexet képezve fokozza az endothel permeabilitását[30]. Azt találták, hogy a zonulin mérésére használt kereskedelmi ELISA-kit felismer egy másik molekulát is. További módszerekkel vizsgálva ezt a properdinnel azonosították, mely strukturálisan hasonló a zonulinhoz. Lehetséges, hogy funkciójukban is rokonok. A zonulin is, mint prehaptoglobin-2 C3a-t és C5a-t generál, és ennek következtében számos szervben fokozza a vaszkuláris permeabilitást, többek között a tüdőben is. A zonulin kapcsolatban van a kemokinekkel is, mert a zonulin felszabadulásának legfőbb szabályozója a CXC kemokin receptor-3. Ez egy proinflammációs kemokin, melynek számos ligandja van. A CXCR 3 pedig kemotaxist, sejtmigrációt és immunsejt adhéziót indukál[27]. A zonulin család fehérjéi a komplement asszociált proteinekből, nevezetesen a mannózkötő lektin-asszociált szerin-proteázokból keletkeznek. Ezeknek már nincs proteáz aktivitásuk, mivel egy mutáció miatt elvesztették a katalitikus doménjüket és ezáltal új funkciókra tettek szert: a tight junction befolyásolására. Ide tartozik még a humán koagulációs faktor X és a CD5 antigen-like protein[33].

1. táblázat: A zonulin család

zonulin
properdin
MASP
AIM/CD5L
koagulációs faktor X
CXCR3 ligandok
akut fázis molekulák, haptoglobin

MASP

A mannózkötő lektin-asszociált szerin-proteázok a komplementrendszer lektin útjának enzimjei. Nagy mintafelismerő molekulákhoz kötődnek (kollektinek, fikolinok). Először a MASP-1 autoaktiválódik, aztán aktiválja a MASP-2-t, végül mindkettő részt vesz a C3b2a konvertáz kialakulásában. Számos egyéb funkciójuk is van, a MASP-1 fontos a koagulációs kaszkádban és az endothelsejt aktivációban is[34].

AIM/CD5L

A CD5L fehérjét a makrofágok expresszálják, és fontos szerepe van a gyulladás kontrollálásában. Sejtfelszíni receptorai számos sejtféleségen megtalálhatók[35]. Felismeri az antizonulin antitestet és csökkenti a hám elektromos ellenállását, ami a zonulinnal strukturális és funkcionális hasonlóságra utal[33].

Koagulációs faktor X
A fő tényezője a trombin keletkezésének. Az antizonulin antitestek felismerik, ami strukturális hasonlóságot jelent. Csökkenti a hám barrier elektromos ellenállását, ami funkcionális hasonlóságra utal[33].

CXCR3 ligandok
A CXC kemokinek a CXCR receptorokhoz kötődnek. Ezek egyike a CXCR3, amely T-sejteket aktivál. Emellett expresszálják a természetes killer sejtek és a dendritikus sejtek is, továbbá a fibroblasztok és az endothel sejtek[36]. A gliadin a CXCR3 receptorokhoz kötődve váltja ki a MyD88 útján az enterocitákban a zonulin felszabadulást[37].

Akut fázis molekulák
Gyulladásos markerek, melyeknek különböző funkciójuk van a folyamatokban. Ide tartozik a haptoglobin is[38].

JUNKCIONÁLIS KOMPLEXEK A TÜDŐBEN

A hörgőhámban és az endothelben szintén jelen vannak a junkcionális komplexek, köztük számtalan tight junction. Molekuláik a következők: a junkcionális MARVEL protein család (okkludinok, tricellulin, MARVEL D3), az immunglobulin-szerű proteinek (JAM, junkcionális adhéziós molekula), a CAR (Coxsackie adenovírus receptor), az E-kadherin és a nektin család, a perifériás membrán protein és az aktinkötő fehérjék[39].

Ezeknek a lokalizációja és pontos szerepe a légzőszervben csak részben kivizsgált. A légutak hámjában számos klaudin mutatható ki immunhisztokémiával, melyeknek a lokalizációja eltérő. A klaudin-2 intracellulárisan, a klaudin-3, -5 és -8 kizárólag a tight junctionban, míg a klaudin-1 és -4 a tight junctionban és a laterális membránokban található meg. Az alveoláris hámban eltér az I-es a II-es típusú alveoláris sejtek klaudin mintázata. *In vitro* a klaudin-3 fokozza, a klaudin-4 csökkenti a paracelluláris permeabilitást, a klaudin-2, -5 és -18 pedig fokozza. A tight junctionon kívül található klaudin inkább a sejt-sejt kontaktus szabályozásában vesz részt. A klaudin-7 funkciója bonyolultabb. Túlexpressziója csökkenti az ion-permeabilitást, de fokozza a töltéssel nem rendelkező molekulák permeabilitását. A klaudin-8 szelektíven redukálja a monovalens és a bivalens kationok permeabilitását, de a klorid-ionét nem befolyásolja. Kimutatták, hogy gyulladás esetén a klaudinok működése megváltozik[40,41,42].

Tüdőmodelleken az okkludin csökkent expressziója a barrierfunkció csökkenésével és a permeabilitás fokozódásával jár[39]. Ebben fontos szereplők a proinflammációs citokinek, melyek különböző jelátviteli utakon megváltoztatják a junkcionális proteinek expresszióját[43].

Zonulin a tüdőben
Egérben kísérletesen létrehozott akut tüdőkárosodásban az intratracheálisan beadott zonulin receptor antagonista larazotid vagy a neutralizáló antitest dózisdependensen gátolta az intrapulmonális IgG lerakódást, gátolta a tüdőben a neutrofilek akkumulációját és a proinflammációs citokinek felszabadulását. A zonulin egészséges egereken fokozta a légúti hám permeabilitását, ugyanakkor komplement aktiváció is észlelhető volt[44]. Humán hörgőhámsejteken a zonulin *in vitro* fokozta a permeabilitást[45].

JUNKCIONÁLIS KOMPLEXEK ASZTMÁBAN

Összehasonlították az atopiás asztmások és az egészséges, nem atopiás egyének hörgőnyálkahártya biopsziás anyagait. Az alfa-katenin, a ZO-1 és az E-kadherin expresszió jelentősen csökkent asztmásoknál, és az expressziójuk fordítottan korrelált az eozinofil sejtek számával. A csökkenés részben a citokinek hatása lehet, de a eozinofil és neutrofil sejtek által szekretált proteázok is közrejátszhatnak[46]. Humán hörgőhámsejt tenyészetben vizsgálva, háziporatka allergén hatására azonnal esett az elektromos impedanciával mért transzepitheliális elektro-

mos ellenállás, ami együtt járt a makromolekulák permeabilitásának növekedésével, az E-kadherin és a ZO-1 delokalizációjával, valamint a ZO-1 proteolitikus degradációjával. A folyamatban a PAR-2 (protease-activated receptor-2) EGFR dependens aktivációja játszott szerepet az E-kadherin esetében, míg a ZO-1 degradáció ettől független volt[47].

Az asztmás betegek hörgőbiopsziás mintájában tight junction diszrupciót észleltek, ami a permeabilitás fokozódásával jár, és lehetővé teszi az allergének fokozott bejutását[48]. Egészséges emberek és asztmások hörgőkefe biopsziás anyagában az asztmásoknál szignifikánsan csökkent a klaudin-18 mRNS expressziója. A klaudin-18 csak a tüdőben előforduló tagja a klaudin-családnak, védő szerepe van, szintjének csökkenése fokozza a permeabilitást, ahogyan ezt a szerzők humán sejttenyészetben, valamint *in vivo* egér modellen ki is mutatták[49].

Zonulin asztmában

Egy eset-kontroll vizsgálatban 48 egészséges embert és 48 háziporatka-allergiás asztmás beteget hasonlítottak össze. Az átlagos szérum zonulin szint asztmásoknál 258,3 ng/ml, egészségeseknél 80 ng/ml volt, a különbség erősen szignifikáns. A zonulin szint korrelált az asztma súlyosságával, de nem korrelált a szérum össz-IgE szinttel. Ez az emelkedés nyilvánvalóan a hám fokozott permeabilitásával és a tight junction károsodásával függ össze, ami lehetővé teszi az allergének fokozott bejutását a nyálkahártyába. A szerzők megemlítik, hogy a nyálkahártya defektusa egyszerre több szervben is létrejön, és feltételezik, hogy a magas szérum zonulin szint a bélnyálkahártyából ered és hangsúlyozzák a bél-tüdő tengely szerepét[50].

Eredményeiket később egy másik munkacsoport is megerősítette. Az ő vizsgálatukban a szérum zonulin szint súlyos asztmásoknál átlagosan 51,98 ng/ml, enyhe-középsúlyos asztmásoknál és egészségeseknél 26,35 ng/ml volt, és korrelált a FEV_1 csökkenés mértékével. (A két munkacsoport a zonulin mérésére eltérő metodikát használt, ebből adódnak a más számértékek.) A hörgőbiopsziás anyagban immunhisztokémiával vizsgálták a zonulin expressziót. Ez súlyos asztmában lokálisan is magas volt, egészségeseken viszont lokálisan nem tudták kimutatni. A szérum zonulin szintet az asztma súlyosságát jelző biomarkernek tartják. Ez az első vizsgálat, amely asztmás betegek biopsziás mintáiban lokálisan igazolta a zonulin jelenlétét. Feltételezhető, hogy a zonulin lokálisan a hörgőkben is képződik és nem feltétlenül csak a bélből jut a szisztémás keringésbe, majd onnan a tüdőbe[51].

JUNKCIONÁLIS KOMPLEXEK COPD-BEN

Dohányzás és permeabilitás

Boucher és munkatársai 1980-ban publikálták, hogy a cigarettafüst tengerimalacon dózisfüggően növeli a légúti permeabilitást[52]. Ennek a kórmechanizmusát humán hörgőhámsejt vonalon tovább vizsgálva megállapították, hogy a cigarettafüst dózisfüggően csökkenti a transzepitheliális elektromos ellenállást és növeli az albumin átáramlást, ami multicelluláris tight junction átrendeződéssel jár együtt, és mindezt gátolni lehet az Rho-kináz és a tirozin-kináz gátlásával[53]. Ennek során a ZO-1 tight junction protein transzformáció változást szenved, és ebben szerepe van az ERK1/2 kináz foszforizációjának[43]. Hasonló permeabilitás fokozódást mutattak ki dízelkorom hatására is, és eközben csökkent az okkludin mRNS expressziója[54]. Ugyancsak humán hörgőhámsejteken *in vitro* a cigarettafüst hatására a tight junction integritás károsodik, a ZO-1 és a ZO-2 szintje pedig csökken. A folyamatot a TGF-béta 1 (transforming growth factor 1) gátolta. Sejtkultúrában a dohányfüst expozíció mind a tight junction, mind a zonula adherens fehérjéinek a génjeit szupprimálta[55].

Vizsgálatok COPD-ben

Shaykhiev és munkatársai hörgőkefe mintát vettek egészséges nemdohányzókból, egészséges dohányosokból és COPD-s betegekből, majd transzkriptóma elemzést végeztek. Az

apikális junkcionális komplex molekuláinak gén-expresszió a dohányosoknál csökkent, a COPD-s dohányosoknál még inkább csökkent, és ezzel párhuzamosan a transzepitheliális elektromos ellenállás is kisebb volt[56]. Humán hörgőhámsejt szövettenyészetben ugyancsak észlelték a tight junction proteinek degradációját. Itt három COPD-s betegnél nem volt különbség a dohányosokhoz képest, de ezek a COPD-sek leszokott dohányosok voltak[57].

Humán hörgőhámsejteken az elektromos ellenállás csökkenésével párhuzamosan az okkludin és a ZO-1 lokalizációja megváltozik, a tight junction sérül, és összehasonlítva a COPD-s és nem COPD-s dohányosokat kiderült, hogy mindez nem a dohányzással, hanem magával a COPD-vel függött össze[58]. COPD-s betegeknél *in vitro* hámsejtek és szövettani anyag vizsgálata során egyaránt a béta-kadherin és a béta-katenin expressziójának csökkenését figyelték meg dohányfüst expozíciót követően[59].

Összehasonlították a klaudin-5 plazma szintjét a klinikai jellemzőkkel. Egészséges kontrollokon átlag 6,9 ng/ml, stabil COPD-ben 0,63 ng/ml, exacerbáció esetén 0,71 ng/ml volt, és ezek az értékek korreláltak a FEV_1 értékkel[60]. Ugyanilyen eredményre jutottak a klaudin-4 vizsgálatakor is[61]. Egérkísérletben az E-kadherin inaktivációja károsodott barrier funkcióval járt[62]. Összehasonlították nem COPD-s és COPD-s dohányosoknál a tight junction proteinek mRNS expresszióját, ami csökkentnek bizonyult és korrelált a FEV_1 értékkel[63]. COPD-ben kimutatták az E-kadherin gén epigenetikai átprogramozását [64].

Zonulin COPD-ben

Erre vonatkozóan alig vannak adatok. *In vitro* sejtkultúrát hörgőmosófolyadékkal és zonulin antagonistával kezelve az elektromos ellenállás változásából zonulin jelenlétére lehetett következtetni. A hörgőmosófolyadék itt nem COPD-s betegekből, hanem tüdő transzplantáltakból származott[45]. A COPD-s betegek zonulin plazma szintje 22,8%-kal magasabb volt, mint az egészséges kontrolloké[65]. Kérdés, hogy ez lokálisan a hörgőnyálkahártyában keletkezik-e vagy a bélnyálkahártyában, és onnan jut a keringésbe. COPD-ben diszbiózis és permeabilitás növekedés mutatható ki a bélrendszerben[66]. Feltételezik, hogy a zonulint a bélnyálkahártya termeli és a bél-tüdő tengely közvetítésével jut a tüdőbe[68]. Ez azonban kétirányú kölcsönhatás: nemcsak bél-tüdő, hanem tüdő-bél irányú is.

Amennyiben a zonulinnak szerepe van a COPD kórmechanizmusában, akkor azt terápiásan befolyásolni lehetne. Coeliakiában a zonulin receptor antagonista larazotid acetáttal vizsgálatokat végeztek a bél permeabilitás csökkentésére, pozitív eredménnyel[32]. A szer gyermekek multiszisztémás gyulladásos szindrómájában a bél permeabilitás csökkentésével elősegítette a gasztrointesztinális tünetek oldódását[67]. Preklinikai vizsgálatokban más betegségekben (lipopoliszaccharid indukálta akut tüdőkárosodásban) is jók az eredmények[27].

HIPOTÉZIS

1. A zonulinnak szerepe van a COPD esetén megfigyelt fokozott permeabilitás létrejöttében. A tüdőben is jelen van. Asztmában kimutatott a szerepe a permeabilitás fokozódásában.
2. A tüdőben is keletkezik, COPD esetén helyben termelődik. A bélnyálkahártyán kívül számos szerv termeli (a tüdő is), ami nem meglepő, hiszen akut fázis fehérje.
3. Ha a larazotid acetát csökkenti a permeabilitást coeliakiában és akut tüdőkárosodásban, akkor ez feltételezhető COPD-ben is. Ezért érdemes lenne erre a célra klinikailag kipróbálni.

IRODALOM

1. Pat Y, Yazici D, Davino P, et al. Recent advances in the epithel barrier theory. *Internat Immunol* 2024; 36: 211-221.

2. Bonomo L, D'Addabbo A. [^{131}I]Albumin turnover and loss of protein into the sputum in chronic bronchitis. *Clin Chim Acta* 1964; 10: 214-222.

3. Jones JG, Minty BD, Lawler P, et al. Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers. *Lancet* 1980; 315: 66-68.

4. Mason GR, Uszler JM, Effros RM, et al. Rapidly reversible alterations of pulmonary epithelial permeability induced by smoking. *Chest* 1983; 83: 6-11.

5. Honda I, Shimura S, Sasaki T, et al. Airway mucosal permeability in chronic bronchitics and bronchial asthmatics with hypersecretion. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 866-871.

6. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963; 17: 375-412.

7. Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993; 123: 1777-1788.

8. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, et al. Claudin-1 and 2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998; 141: 1539-1550.

9. Polgár V. Sejbiológia. In: Szemere Gy. Alkalmazott biológia, Semmelweis Kiadó, Budapest 2003.

10. Otani T, Furuse M. Tight junction structure and function revisited. *Trends Cell Biol* 2020; 30: 805-817.

11. Zihni C, Mills C, Matter K, et al. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2016; 17: 564-580.

12. Heinemann U, Schuetz A. Structural features of tight junction proteins. *Int J Mol Sci* 2019; 20(23): 6020.

13. Fasano A, Baudry B, Pumplin DW, et al. Vibrio cholerae produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5242-5246.

14. Fasano A, Florentini C, Donelli G, et al. Zonula occludens toxin modulates tight junctions through protein kinase C-dependent actin reorganization, in vitro. *J Clin Invest* 1995; 96: 710-720.

15. Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, et al. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci* 2000; 113: 4435-4440.

16. Fasano A. Regulation of intercellular tight junctions by zonula occludens toxin and its eukaryotic analogue zonulin. *Ann NY Acad* 2000; 915: 214-222.

17. Fasano A, Not T, Wang W, et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 2000; 355: 1518-1519.

18. Lu R, Wang W, Uzzau S, et al. Affinity purification and partial characterization of the zonulin/zonula occludens toxin (zot) receptor from human brain. *J Neurochemistry* 2000; 74: 320-326.

19. Di Pierro M, Lu R, Uzzau S, et al. Zonula occludens toxin structure-function analysis. *J Biol Chem* 2001; 276: 19160-19165.

20. Flanagan JJ, Arjomandi , Delanoy ML, et al. Development of monoclonal antibodies to pre-haptoglobin 2 and their use in an enzyme-linked immunosorbent. *J Immunol Meth* 2014; 406: 34-42.

21. Hanley JM, Haugen TH, Heath EC. Biosynthesis and processing of rat haptoglobin. *J Biol Chem* 19832; 258: 7858-7869.

22. Mahdi A. On the role of pulmonary haptoglobin (pHp) and its receptor (CD163) in the human lung. Thesis for the acquisition a doctorate at the University of Lübeck 2010.

23. Wicher KB, Fries E. Prohaptoglobin is proteolytically cleaved in the endoplasmic reticulum by the complement C1r-like protein. *PNAS* 2004; 101: 14390-14395.

24. Andersen CB, Stodkilde K, Saederup KL, et al. Haptoglobin. DOI: 10.1089/ars.2016.6793..

25. Di Masi A, De Simone G, Ciaccio C et al. Haptoglobin: From hemoglobin scavenging to human health. *Mol Aspect Med* 2020; 73:e 100851.

26. Naryzhny SN, Legina OK. Haptoglobin as a biomarker. *Biomed Chem* 2021; 15: 184-198.

27. Veres-Székely A, Szász Cs, Pap D, et al. Zonulin as a potential therapeutic target in microbiota-gut-brain axis disorders: Encouraging results and emerging questions. *Internat J Mol Sci* 2023; 24: 7548.

28. Tripathy A, Lammers KM, Goldblum S, et al. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *PNAS* 2009; 106: 16799-16804.

29. Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers* 2016; 4(4): e1251384.

30. Chen JY, Cortes C, Ferreira VP. Properdin: A multifaced molecule involved in inflammation and diseases. *Mol Immunol* 2018; 102: 58-72.

31. Scheffler L, Crane A, et al. Widely used commercial ELISA does not detect precursor of haptoglobin2, but recognizes properdin as a potential second member of the zonulin family. *Front Endocrinol* 2018; 9: Article 22: 1-11.

32. Valitutti F, Fasano A. Breaking down barriers: How understanding celiac disease pathogenesis informed the development of novel treatment. *Digestive Dis Sci* 2019; 64: 1748-1758.

33. Konno T, Martinez EE, Ji J, et al. Human coagulation factor X and CD5 antigen-like are potential new members of the zonulin family proteins. *Biochem Biophys Res Comm* 2023; 638: 127-133.

34. Dobó J, Pál G, Cervnak L, et al. The emerging roles of mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) in the lectin pathway of complement and beyond. *Immunol Rev* 2016; 274: 98-111.

35. Sanjurjo L, Aran G, Roher N, et al. AIM/CD5L: a key protein in the control of immune homeostasis and inflammatory disease. *J Leukocyte Biol* 2015; 98: 173-184.

36. Van Raemdonck K, Van den Steen PE, Liekens S, et al. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26: 311-327.

37. Lammers KM, Lu R, Brownley J, et al. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology* 2008; 135: 194-204.

38. Gulhar R, Ashraf MA, Jialal I. Physiology, acute phase reactans. Stat pearls Publ, 2023, Jan: 1-5.

39. Rezaee F, Georas SN. Breaking barriers. New insights into airway epithelial barrier function in health and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014; 50: 857-869.

40. Wang F, Daugherty B, Keise LL, et al. Heterogenity of claudin expression by alveolar epithel cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 62-70.

41. Frank JA. Claudins and alveolar epihelial barrier function in the lung. *Ann NY Acad Sci* 2012; 1257: 175-183.

42. Wittekindt OH. Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation. *Pflugers Arch* 2017; 469(1): 135-147.

43. Petecchia L, Sabatini F, Usai C, et al. Cytokines induce tight junction disassembly in airway cell via an EGFR-dependent MAPK/ERK 162 pathway. *Lab Investig* 2012; 92: 1140-1148.

44. Rittirsch D, Flierl MA, Nadeau BA, et al. Zonulin as prehaptoglobin2 regulates lung permeability and activates the complement system. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013; 304: L863-L872.

45. Romem A, Lammers K, Iacono AT, et al. Zonulin - A novel player in human lung pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: A4266.

46. De Boer WI, Sharma HS, Baelemans SMI, et al. Altered expression of epithelial junctional proteins in atopic asthma: possible role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86: 105-112.

47. Heijink LH, van Oosterhout A, Kapus A. Epidermal growth factor receptor signaling contributes to house dust mite-induced epithelial barrier dysfunction. *Eur Respir J* 2010; 36: 1016-1026.

48. Xiao C, Puddicombe SM, Filed S, et al. Defective epithelial barrier function in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 549-556.

49. Sweerus K, Lachowicz-Scrogglins M, Gordon E, et al. Claudin-18 deficiency is associated with airway epithelial barrier dysfuncion and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 139: 72-81.

50. Baloumy SA, Egendy A, Malbrahim S, et al. Association between serum zonulin level and severity of house dust mite allergic asthma. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2021; 17(1): 86.

51. Kim NY, Shin E, Byeon SJ, et al. Serum zonulin is a biomarker for severe asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 2023; 15: 526-535.

52. Boucher RC, Jonhson J, Inoue S, et al. The effect of cigarette smoke on the permeability of guinea pig airways. *Lab Investig* 1980; 43: 94-100.

53. Olivera DS, Boggs SE, Beenhouwer C, et al. Cellular mechanisms of mainstream cigarette smoke-induced lung epithelial tight junction permeability changes in vitro. *Inhal Toxicol* 2007; 19: 13-22.

54. Lehmann AD, Blank F, Baum O, et al. Diesel exhaust particles modulate the tight junction protein occludin in lung cells in vitro. *Particle Fibre Toxicol* 2009; 6: 26.

55. Tatsuta M, Kano K, Ishii Y, et al. Effects of cigarette smoke on barrier function and tight junction proteins in the bronchial epithelium: protective role of cathelicidin LL-37. *Respir Res* 2019; 20: 251.

56. Shaykhiev R, Otaki F, Bonsu P, et al. Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 5.

57. Heijink IH, Brandenburg SM, Postma DS, et al. Cigarette smoke impairs airway epithelial barrier function and cell-cell contact recovery. *Eur Respir J* 2012; 39: 419-428.

58. Heijink IH, Noordhoiek JA, Timens W, et al. Abnormalities in airway epithelial junction formation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189: 1439-1442.

59. Nishida K, Brune KA, Putcha N, et al. Cigarette smoke disrupts monolayer integrity by altering epithelial cell-cell adhesion and cortical tension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2017; 313: L581-L591.

60. Kim BG, Lee PH, Lee SH, et al. Impact of the endothelial tight junction protein claudin-5 on clinical profiles of patients with COPD. *Allergy Asthma Immunol Res* 2018; 10: 533-542.

61. Park S, Lee PH, Baek AR, et al. Association of the tight junction protein claudin-4 with lung function and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *Internat J Chron Obstr Pulm Dis* 2021; 16: 2735-2740.

62. Ghosh B, Loube J, Thapa S, et al. Loss of E-cadherin is cause to pathologic changes in chronic lung disease. *Comm Biol* 2022; 1149: 1-14.

63. ShaikhSB, Gouda MM, Irfan K, et al. Alterations in mRNA expession levels of tight junction proteins in the blood cells of smokers with and without COPD. *Endocrin, metabolic & Immun Disord* 2023; 23: 389-395.

64. Yeung-Luk BH, Wally A, Swaby C, et al. Epigenetic reprogramming drives epithelial disruption in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2024; 70: 165-177.

65. Karim A, Muhammd T, Ustrana S, et al. Intestinal permeability marker zonulin as a predictor of sarcopenia in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2021; 189: 106662: 1-6.

66. Comini L, et al. Dysbiosis and leaky gut in hyper-inflated COPD patients: Have smoking and exercise training any role? *Respir Med Res* 2023; 83: 100995.

67. Yonker LM, Swank Z, Gilboa T, et al. Zonulin antagonist, Laratozide (AT 1001), as an adjuvant treatment for multisystem inflammatory syndrome in children: A case series. *Crit Care Explorations* 2022; 4(2): 1-8.

68. Wang L, Cai Y, et al. The bidirectional gut-lung axis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2023; 207: 1145-1160.