

Wydział Lekarski Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego



Agnieszka Gonet-Surówka

**Wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na apoptozę komórek
nabłonkowych jelit i pochwy in vitro**

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. Piotr B. Heczko

Pracę wykonano w Katedrze Mikrobiologii Collegium Medicum UJ

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. med. Piotr B. Heczko

Kraków, 2008

**Dziękuję moim Rodzicom za inspiracje,
mojemu Mężowi za wsparcie,
moim Dzieciom za cierpliwość i zrozumienie**

Podziękowania

Szczególne podziękowania składam Panu Profesorowi dr hab. med. Piotrowi Heczko za poświęcony czas, opiekę i cenne wskazówki udzielone mi podczas przygotowania rozprawy doktorskiej.

Serdeczne podziękowania składam Panu Doktorowi Michałowi Berecie, bez którego uzyskanie wyników badań byłoby trudne.

Wyrazy podziękowania dla całego zespołu Pracowników Zakładu Bakteriologii, Ekologii Drobnoustrojów i Parazytologii Katedry Mikrobiologii CMUJ oraz dla

Pracowników Katedry Immunologii CMUJ za życzliwość i pomoc w realizacji badań.

Spis treści:

Wykaz skrótów	6
I. Wstęp	7
I.1. Rola kaspaz w apoptozie	9
I.2. Rola inhibitorów i aktywatorów kaspaz komórce	12
I.3. Regulacja apoptozy poprzez białka z rodziny Bcl-2	13
I.4. Znaczenie mitochondrium w procesie apoptozy komórek	14
I.5. Rola wolnych rodników tlenowych w procesie apoptozy	16
I.6. Czynniki martwicy nowotworu w regulacji apoptozy	17
I.7. Inne rodzaje destrukcji komórek	18
I.8. Fizjologiczne znaczenie apoptozy	19
I.9. Rola apoptozy w etiopatogenezie nowotworów	20
I.10. Fizjologiczne znaczenie apoptozy w tkance nabłonkowej jelit	22
I.11. Rola nadtlenu wodoru w przekazywaniu sygnału o apoptozie	24
I.12. Wpływ związków chemicznych zawartych w pożywieniu na apoptozę i proces nowotworzenia	25
I.13. Rola bakterii w apoptozie komórek nabłonkowych	26
I.14. Rola receptorów TLR w utrzymaniu homeostazy w tkance	30
I.15. Wpływ bakterii komensalnych na funkcjonowanie nabłonka	31
I.16. Wpływ szczepów probiotycznych na funkcjonowanie organizmów	33
I.17. Antynowotworowe działanie szczepów probiotycznych	35
I.18. Rola szczepów <i>Lactobacillus</i> produkujących nadtlenek wodoru w utrzymaniu homeostazy tkanki	36
I.19. Wpływ bakterii z rodzaju <i>Lactobacillus</i> na apoptozę komórek	37
II. Cele Pracy	39
III. Materiały i Metody	41
III.1 Linie komórkowe	42
III.2 Metody hodowli bakteryjnych	43
III.3 Izolacja kolonocytów mysich	44
III.4 Dobór warunków eksperymentu	45
III.5 Metody badania apoptozy	45

III.5.1 Wykrywanie aktywnych kaspaz w komórce	47
III.5.2 Wizualizacja aktywnych kaspaz w komórce przy zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego	47
III.5.3 Rozdział elektroforetyczny wyizolowanych fragmentów DNA	48
III.6 Fluorescencyjne barwienie filamentów aktynowych	49
III.7 Cyfrowe metody uzyskiwania wyników	50
IV. Wyniki	51
IV.1 Wstępna ocena jakości danych i określenie optymalnych metod statystycznych	52
IV.2 Określenie zależności pomiędzy czasem ekspozycji na czynnik a procentem komórek apoptotycznych	55
IV.3 Określenie odpowiedniej gęstości hodowli bakteryjnej wywołującej apoptozę komórek nabłonkowych	56
IV.4. Badanie poziomu aktywacji kaspaz w komórkach linii HT-29	58
IV.5. Badanie poziomu aktywacji kaspaz w komórkach linii HT-29 MTX	62
IV.6 Wpływ bakterii oraz cytokin na żywotność komórek linii CaCo-2	65
IV.7 Badanie poziomu aktywacji kaspaz w komórkach izolowanych z jelit myszy	69
IV.8 Badanie poziomu aktywacji kaspaz w komórkach linii A431	72
IV.9. Wizualizacja aktywnych kaspaz w mikroskopie Olympus	74
IV. 10. Analiza rozdziału elektroforetycznego wyizolowanych fragmentów DNA komórek	77
IV.11. Wpływ bakterii z rodzaju Lactobacillus na strukturę filamentów aktynowych	79
V. Dyskusja	82
VI. Wnioski	91
VII. Streszczenie	92
VIII. Załączniki	94
Wykaz rycin i tabel	94
IX. Piśmiennictwo	95

Wykaz skrótów:

AIDS – Acquired Immunodeficiency Syndrome,
AIF – Apoptosis Inhibition Factor
Apaf-1 - Apoptotic Protease Activating Factor 1
ATCC - American Type Culture Collection
ATP - Adenozynotrójfosforan
CARD – Caspase Activation Required Domain
DD – Death Domain
DED – Death Effector Domain
DISC- Death Inducing Signaling Complex
DMEM - Dulbecco's Modified Essential Medium
DNA – kwas deoksyrybonukleinowy,
ECCG - Epigallokatechiny gallat
EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy
EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor
EHEC - Enterohaemorrhagic E. coli
EPEC - Enteropatogenne E. coli
FADD - Fas-Associated protein with Death Domain
FBS – Foetal Bovine Serum
GTP - Guanozynotrifosforan
HPV - Human Papilloma Virus
HSP - Heat Shock Proteins
IAP - Inhibitor of Apoptosis Protein
ICAD - Inhibitor of Caspase-3-Activated DNase
INF – Interferon
JNK - cJun N-terminal kinase
LGG - Lactobacillus rhamnosus GG
LPS - Lipopolisacharide
MALT - Mucous Associated Lymphoid Tissue
MAP – Mitogen Activated Protein
MTX - Metotrexat
MUC – gen mucyny
NADPH - Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NAIP - Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein
NF- κ B – Nuklear Factor
NK – Natural Killer
OD – Optical Density
PARP - Poly ADP Ribose Polymerase
PIDD - P53-induced Protein with a Death Domain
PKC – Phospho Kinase C
ROS – Reactive Oxygen Species
TGF - Transforming Growth Factor
TLR – Toll Like Receptor
TNF - Tumor Necrosis Factor
TNFR - Tumor Necrosis Factor Receptor
TRAIL - Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

XIAP - X-linked Mammalian Inhibitor of Apoptosis Protein

I. Wstep

Apoptoza, zwana także programowaną śmiercią komórki jest podstawowym fizjologicznym procesem, który gra krytyczną rolę w rozwoju i utrzymaniu homeostazy tkanek i całych organizmów. Apoptoza jest także zaangażowana w szereg procesów patologicznych. Programowana śmierć komórek jest regulowana głównie poprzez sygnały decydujące o przeżyciu lub destrukcji komórki. (1)

Komórka apoptotyczna wykazuje szereg charakterystycznych cech morfologicznych i biochemicznych, takich jak zanikanie i zagęszczanie cytoplazmy, ściślejsze upakowanie organelli, kondensacja i marginalizacja chromatyny oraz trawienie genomowego DNA. Cała komórka dzieli się na fragmenty zawierające organelle, otoczone błoną komórkową, zwane ciałkami apoptotycznymi. (2,3,4) Zachowanie integralności błony zewnętrznej podczas całego procesu zapobiega wyciekaniu zawartości komórki do środowiska oraz ułatwia fagocytozę przez komórki sąsiednie, a brak inicjacji lokalnego procesu zapalnego odróżnia ten proces od nekrozy. (5,6,7,8)

Nekroza jest zazwyczaj niekontrolowanym i pasywnym procesem, niewymagającym zużycia energii. (9) W komórce ulegającej nekrozie tworzą się pęcherzyki cytoplazmy, retikulum endoplazmatyczne jest rozdęte, a lizosomy i mitochondria zniszczone; rybosomy rozpraszają się i odrywają, błona zewnętrzna ulega rozerwaniu. (10,11,12,13,14,15)

Proces apoptozy został zaobserwowany w 1972 przez Kerr'a i współpracowników, a nazwę zaczerpnięto z greckiego słowa oznaczającego „opadanie płatków kwiatu”. (16) Późniejsze badania nad komórkami nicienia *Caenorhabditis elegans* pozwoliły odkryć geny kontrolujące ten proces. (17,18) Termin apoptoza jest często określany jako programowana śmierć komórki, regulowana genetycznie. Na poziomie molekularnym apoptoza jest ściśle regulowana przez wiele genów. Ponad sto różnych typów białek jest zaangażowanych w ten proces. Apoptoza jest procesem konserwatywnym ewolucyjnie i gra ważną rolę w usuwaniu zdrowych tkanek podczas rozwoju embrionalnego, ale także uszkodzonych i bezużytecznych dla organizmu komórek organizmu dorosłego. (19,20,21,22,23,24) Niemożność komórki do wejścia w mechanizm samobójczej śmierci może prowadzić do procesu nowotworzenia. O tym, jak ważny i częsty jest to proces świadczy liczba około 10 bilionów komórek dziennie ulegających apoptozie w ciele dorosłego człowieka.

Apoptoza może być wywołana przez szereg różnych czynników pochodzenia zewnętrznego, bądź stanem wewnątrz komórki. Brak czynników wzrostu, niedotlenienie oraz fizyczne, bądź chemiczne uszkodzenia prowadzące do mutacji DNA mogą zainicjować program autodestrukcji. (25,26,27). Ważnym elementem uruchomienia apoptozy są receptory śmierci na powierzchni komórki, a także utrata kontaktu z podłożem lub sąsiednimi

komórkami. (28,29) Również sprzeczne sygnały dochodzące do komórki, dotyczące cyklu podziałowego mogą wyzwolić mechanizm samobójczej śmierci. (30) Apoptozę mogą wywołać nawet niewielkie zmiany temperatury, promieniowanie, czy niskie dawki substancji cytotoksycznych, podczas gdy wysokie dawki tych czynników wywołują zazwyczaj nekrozę. (31)

Fizjologicznym znaczeniem apoptozy jest głównie utrzymywanie homeostazy w tkance. Zaburzenia w przebiegu tego procesu obserwowane są w wielu stanach patologicznych. Nadmierny wzrost częstości apoptozy charakteryzuje choroby degeneracyjne jak AIDS, choroba Alzheimera, Parkinsona, czy choroby zakaźne jak wirusowe zapalenie wątroby, gdzie indeks apoptotyczny jest wysoki. (32,33,34,35,36) Natomiast zanik tego procesu lub zmniejszenie jego częstotliwości obserwuje się w chorobach nowotworowych, autoimmunologicznych, czy innych infekcjach wirusowych. (37) Rola apoptozy w powstawaniu nowotworów została wnikliwie zbadana. (38,39) Nabłonki jelita cienkiego i grubego różnią się między sobą częstotliwością występowania spontanicznej i indukowanej apoptozy, co koreluje z częstotliwością powstawania nowotworów w tych dwóch różnych odcinkach jelita. (40) Zaburzenia apoptozy są przyczyną powstania nieprawidłowej blizny podczas procesu gojenia rany. (41,42) Nagromadzenie wolnych rodników tlenowych sprzyja kumulacji uszkodzeń DNA, wywołuje nadmierną apoptozę lub nekrozę i wyzwala proces starzenia. (43) Wraz z wiekiem odpowiedź na uszkodzenia DNA może być słabiej kontrolowana, co sprzyja chorobom degeneracyjnym i nowotworowym. (44) Szacuje się, iż proces apoptozy i jego zaburzenia zaangażowany jest w połowę znanych chorób. Kluczowe komponenty tego procesu są celem intensywnych badań.

I.1. Rola kaspaz w apoptozie

Szereg badań poświęcono, aby poznać mechanizmy inicjacji, przekazywania i egzekucji sygnału dotyczącego programowanej śmierci komórki. Dotychczas poznano wiele, głównie białkowych substancji, które biorą udział w kaskadzie przekazywania sygnału o apoptozie. (45) Jednym z najistotniejszych komponentów decydującym o przebiegu i egzekucji programowanej śmierci są enzymy zwane kaspazami. (46) Istnieją dwie dobrze scharakteryzowane drogi aktywacji kaspaz, w zależności od pochodzenia źródła sygnału: zewnątrzkomórkowe, pochodzące od receptorów śmierci lub wewnątrzkomórkowe, jak na przykład uszkodzenie DNA komórki. (47) Kaspazy są białkami konserwatywnymi ewolucyjnie, odgrywają kluczową rolę w mechanizmie apoptozy i zapalenia. Są to proteazy

cysteinowe rozpoznające reszty asparginianu w białkach. Początkowo zostały wykryte u nicienia *Caenorhabditis elegans* jako produkt genu CED-3. Jak dotąd zostało wykrytych około 14 kaspaz, wszystkie występują w komórce w postaci nieaktywnych zymogenów zwanych prokaspazami i zbudowane są z dużej (p20) i małej podjednostki (p10). U ssaków rozpoznano 12 kaspaz; kaspazy od-1 do-10 oraz kaspaza-12 i kaspaza-14. (48, 49) Mając na uwadze ich rolę w komórce można je podzielić na kaspazy inicjatorowe i efektorowe oraz biorące udział w mechanizmach zapalenia. Kaspazy efektorowe (-3,-6,-7) posiadają krótką prodomenę, są to główne enzymy tnące białka strukturalne oraz enzymy w komórce; ich substratami mogą być także prokaspazy. (50)

Rolą kaspaz inicjatorowych z długą prodomeną (-8,-9,-10) jest detekcja sygnału i aktywacja kaskady prowadzącej do apoptozy. Kaspazy inicjatorowe występują w komórce w postaci monomerów, uaktywniane są przez dimeryzację lub oligomeryzację niewymagającą cięcia proteolitycznego. (51) Każda kaspaza inicjatorowa ma własne białko adaptorowe, które oddziałując z długą prodomeną enzymu wymusza dimeryzację i powstanie aktywnego katalitycznie białka. Substratami kaspaz inicjatorowych są prokaspazy efektorowe, których aktywacja wymaga cięcia proteolitycznego. Jest to mechanizm dodatnio sprzężony, ponieważ raz aktywowana kaspaza efektorowa może stabilizować pozostałe prokaspazy inicjatorowe, chroniąc przed działaniem inhibitorów. (52) Aktywacja kaspazy następuje w części N-terminalnej prodomeny poprzez cięcie autokatalityczne lub działanie innej kaspazy i utworzenie heterodimeru. Z dwóch heterodimerów powstaje aktywny enzymatycznie heterotetramer. (53) Większość kaspaz zawiera domenę rekrutacji kaspaz CARD (kaspaza-1, -2, -4, -5, -9, -11, -12) lub tzw. efektorową domenę śmierci DED (kaspaza -8,-10). Autoaktywacja kaspaz inicjatorowych odbywa się w kompleksach białkowych, zwanych w zależności od roli apoptosomem, kompleksem śmierci DISC lub PIDD-osomem albo inflammosomem aktywującym kaspazę -1. (54) Natomiast aktywacja kaspaz efektorowych (kaspaza-3, -6, -7, -14) odbywa się na drodze proteolizy katalizowanej przez inną kaspazę inicjatorową.

Ze względu na źródło pochodzenia sygnału dzieli się drogi aktywacji kaspaz na receptorowe, indukowane stresem np. uszkodzenie DNA oraz pochodzenia mitochondrialnego. Doświadczenia na myszach z delecją genów kaspaz dowiodły, iż aktywacja kaspazy -8 jest wymagana w kaskadzie przekazywania sygnału od receptora, natomiast kaspaza -9 jest zaangażowana w mitochondrialną drogę prowadzącą do apoptozy. (55,56) Kluczową kaspazą efektorową jest kaspaza -3, której aktywacja wymagana jest we wszystkich drogach sygnału apoptotycznego, zarówno wewnątrzkomórkowych jak i

zwnątrzkomórkowych. (57) Aktywacja drogi od receptora rozpoczyna się od przyłączenia ligandu do zwnątrzkomórkowej domeny receptorów śmierci. Ligandami tych receptorów może być ligand Fas (FasL) lub czynnik martwicy nowotworu (TNF). (58,59,60) Aktywowany receptor śmierci Fas może związać cytoplazmatyczne białko DED poprzez domenę FADD (w przypadku receptora TNFR ta domena zwana jest TRADD). Uaktywnione efektorowe domeny śmierci DED wiążą się z domenami kaspazy –8, która znajduje się przy cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej. Powstaje duży kompleks białkowy o nazwie DISC, następuje oligomeryzacja i autoaktywacja kaspazy-8. Kaspaza-10 jest aktywowana w kompleksie DISC głównie w komórkach limfoidalnych, niezależnie od kaspazy-8. (61,62,63) Obie kaspazy mogą następnie aktywować prokaspazę-3, a także mitochondrialną drogę autodestrukcji poprzez uaktywnienie proapoptotycznego białka Bid z rodziny Bcl-2. (64) Poza aktywacją kaspazy-8 przez domenę receptora śmierci jej aktywność może wzbudzić cytochrom c – białko mitochondrium oraz katalityczne cięcie przez kaspazę-6. Jest to droga aktywacji prokaspazy-8 niezależna od kompleksu DISC. Aktywowane receptory śmierci mogą także związać prokaspazę-2 za pośrednictwem białka RIP również zawierającego domeny śmierci. (65)

Kaspazą, której aktywacja zależy od mitochondrium, jest prokaspaza-9. Na skutek stresu komórkowego otwarte zostają pory mitochondrium, co powoduje przemieszczenie się cytochromu c do cytoplazmy. (66) Cytochrom c wraz z prokaspazą-9, cytoplazmatycznym czynnikiem aktywującym proteazy Apaf-1 i ATP tworzy kompleks zwany apoptosomem. (67) N-terminalny koniec białka Apaf i prodomena kaspazy-9 oddziałują ze sobą poprzez odcinek CARD, co uaktywnia kaspazę. Aktywny enzym może z kolei uaktywnić kaspazę-3, – 7. Kaspaza –3 może na drodze dodatniego sprzężenia zwrotnego aktywować prokaspazę-9. Kaspaza-3 będąca kluczową kaspazą efektorową w kaskadzie sygnału apoptotycznego może być aktywowana przez inne enzymy i białka jak kaspaza-8,-9,-10, granzym B lub białko CPP-32. Substratami kaspazy-3 jest szereg różnych białek, w tym sama prokaspaza-3, prokaspaza-6, prokaspaza-9, enzym fosfokinaza C (PKC), polimeraza poli – ADP-rybozy (PARP). (68) Cięcie białek strukturalnych przez kaspazy decyduje o charakterystycznym wyglądzie komórki apoptotycznej. Inne białka szkieletu komórkowego również są ważnymi substratami kaspaz. Trawienie fodryny i żelzolino prowadzi do destrukcji filamentów aktynowych, oderwania komórki od podłoża i utworzenia ciałek apoptotycznych. (69,70,71) Cięcie β - katenin oraz plakoglobiny będących składowymi połączeń międzykomórkowych skutkuje utratą kontaktu z sąsiednimi komórkami. (72) Dużą grupę substratów kaspaz stanowią białka decydujące o naprawie DNA, jak ICAD - inhibitor deoxyrybonukleazy.

Odłączając inhibitor od enzymu kaspaza umożliwia degradację DNA. (73,74,75) Wiele białek regulujących cykl komórkowy jest ciętych przez kaspazy podczas procesu apoptozy. Innymi substratami kaspaz mogą być kinazy antyapoptotyczne (Akt, Raf-1 and MEK) i czynniki transkrypcyjne (GATA-1 and STAT1) lub kinazy promujące śmierć komórki (MEKK1, PKC, PAK2, MST1), oraz molekuly sygnałowe dla czynników transkrypcyjnych. (76) Homologiem kaspazy-3 są kaspazy -6 i -7, co powoduje, że te enzymy mają wiele wspólnych substratów i mogą wymiennie działać jako kaspazy efektorowe w różnych komórkach. Kaspaza-2 jest jedną z najwcześniej zidentyfikowanych u ssaków, posiada dualistyczną rolę - może działać jako kaspaza efektorowa i inicjatorowa. Bierze udział w kaskadzie apoptotycznej pochodzącej od różnych sygnałów, w tym także od bakterii i wirusów. Badania wykazały, że kaspaza-2 może być indukowana zarówno przy udziale cytochromu c, jak i niezależnie od tego białka. (77) Kaspaza-12 zlokalizowana jest w siateczce endoplazmatycznej i uczestniczy w przekazywaniu kaskady sygnałowej pochodzącej od tej składowej komórki. Jej substratem jest głównie prokaspaza-9. Większość kaspaz w komórce zlokalizowana jest w cytoplazmie, ale niektóre prokaspazy zidentyfikowano w mitochondriach (prokaspaza-3), a także w aparacie Golgiego oraz w jądrze komórki (kaspaza-2, -9) (78)

Kaspazy są kluczowym elementem w kaskadzie sygnału apoptotycznego; pełnią rolę inicjatorową, wykonawczą, a także regulacyjną. Te enzymy biorą udział w także innych procesach zachodzących w komórce, a niezwiązanych z procesem programowanej śmierci jak modulacja odpowiedzi zapalnej, proces różnicowania i proliferacji. Ludzkie kaspazy -1,-4,-5 oraz mysie kaspazy -11, -12 są zaangażowane głównie w regulację procesu zapalnego. Białka z grupy NOD-LRR są odpowiedzialne za aktywację kaspazy-1 w inflammosomie w odpowiedzi na patogeny. (79)

I.2. Rola inhibitorów i aktywatorów kaspaz w komórce

Kaspazy są bardzo ważnymi białkami w komórkach, decydują o jej przeżyciu, dlatego ich aktywność musi być ściśle regulowana. Posiadają one szereg aktywatorów i inhibitorów. Jednym z nich jest czynnik IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein); w ludzkich komórkach zidentyfikowano szereg takich białek hamujących apoptozę: cIAP1, cIAP2, XIAP (X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein), NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), białko surwiwinę i liwinę. Wszystkie te białka zawierają w domenie BIR strukturę podobną do tzw. „palca cynkowego”, która wiąże się z miejscem katalitycznym kaspaz blokując ich

aktywność. Białka rodziny IAP same mogą być blokowane przez białka mitochondrialne zwane Smac/Diablo. (80,81)

Istotną grupą odgrywającą rolę w regulacji mechanizmów apoptozy są Hsp - białka szoku cieplnego (heat shock proteins). Czynniki zewnętrzne, takie jak promieniowanie UV czy stres oksydacyjny potencjalnie mogą zainicjować proces samodestrukcji komórki, ale mogą być także powodem uruchomienia programu decydującego o przeżyciu. (82) Białka opiekuńcze Hsp biorą udział głównie w zahamowywaniu sygnału apoptotycznego lub nekrotycznego wewnątrz komórki. Są to substancje obecne w komórce konstytutywnie lub takie, których transkrypcja rozpoczyna się dopiero po zadziałaniu czynnika destrukcyjnego. Ich budowa jest bardzo konserwatywna. Białka Hsp 70 i Hsp 90 zbudowane są z C-terminalnej domeny wiążącej inne białka oraz N-terminalnej domeny o właściwościach ATP-azy. (83) Hsp mogą zahamować uwolnienie cytochromu c z mitochondrium lub też zahamować aktywność kaspaz. (84) Hsp 70 może blokować cięcie białka Bid przez kaspazę – 8, co uniemożliwia uaktywnienie białka Bax. (85) Hsp70 może także wiązać się z białkami o roli proapoptotycznej, jak białko AIF zapobiegając jego translokacji do jądra komórkowego. (86) Hsp 90 i Hsp 70 mogą także zapobiec powstaniu apoptosomu poprzez blokowanie dostępu do czynnika Apaf-1 dla prokaspazy-9. (87) Białka opiekuńcze biorą udział w modulacji sygnałów pochodzących od receptorów śmierci. Ich celem jest głównie aktywacja czynnika NF- κ B i wzmacnianie sygnału decydującego o przeżyciu komórki. (88)

I.3. Regulacja apoptozy poprzez białka z rodziny Bcl-2

Głównymi regulatorami funkcji kaspaz są jednak białka z rodziny Bcl-2. (89) Wśród tej rodziny wyróżnia się zarówno białka proapoptotyczne jak i antyapoptotyczne. (90) Do białek antyapoptotycznych należą m.in.: A1/Bfl1, Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, Boo/Diva, Mcl-1, NR-13, Nrf3 u ssaków oraz Ced-9 zidentyfikowany u nicienia *C. elegans*. Natomiast do zidentyfikowanych białek proapoptotycznych z rodziny Bcl-2 zalicza się: Bad, Bak, Bax, Bcl-Rambo, Bcl-xS, Bid, Bik, Bim, Blk, BNIP3, Bok/Mtd, Hrk. Bax i Bak uaktywnione podczas kaskady apoptotycznej mogą wnikać przez błonę mitochondrium, gdzie oligomeryzują tworząc pory w błonie, co ułatwia wypłynięcie cytochromu c i innych czynników proapoptotycznych z wnętrza mitochondrium. Natomiast grupa antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 ma za zadanie wiązać się z aktywną formą Bax, zapobiegając jego wnikaniu do zewnętrznej błony mitochondrium i tym samym blokując sygnał o apoptozie. (91) Grupa białek antyapoptotycznych BCL-2, BCL-xL, A1, MCL-1 i BCL-w w swojej budowie posiada

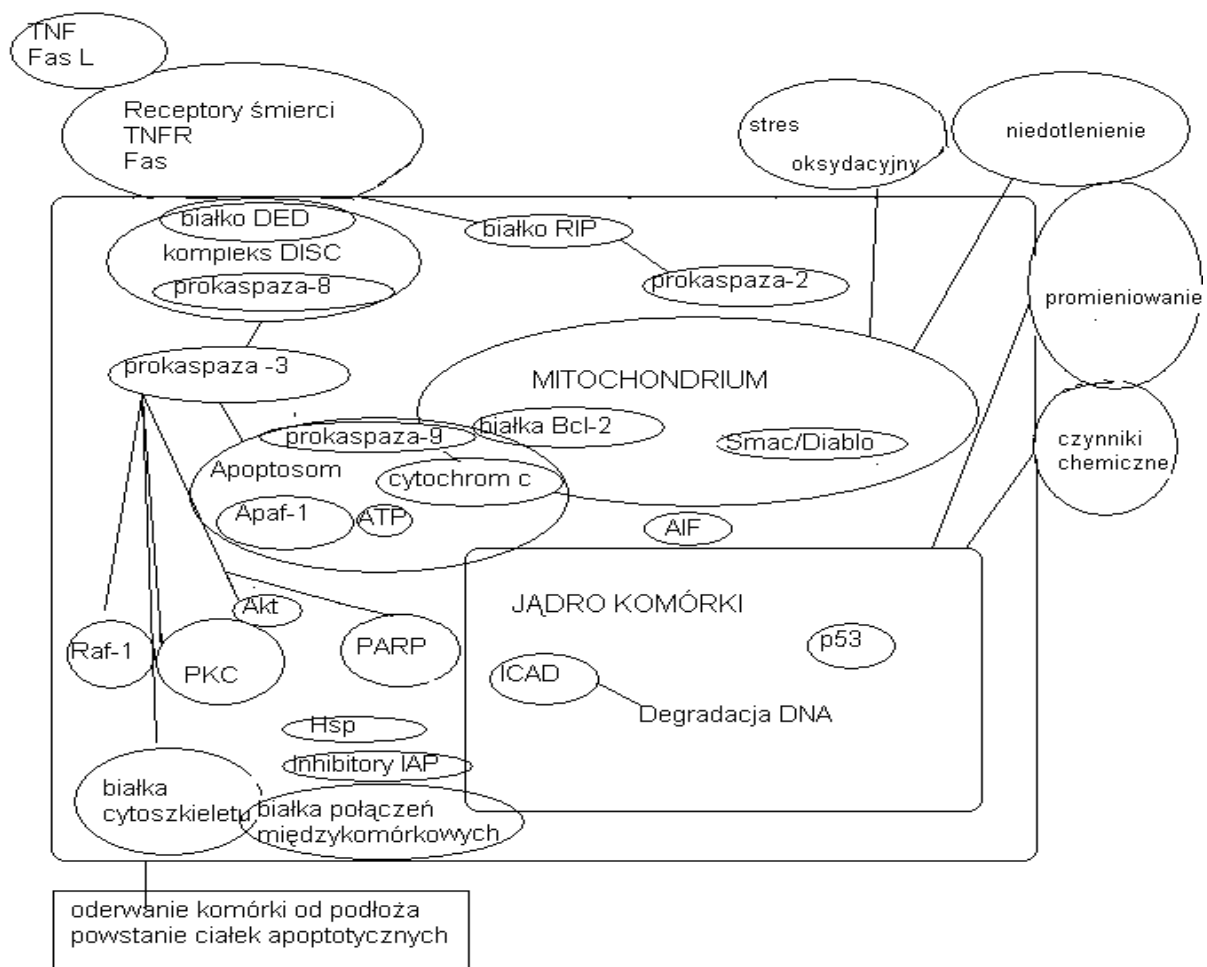
4 różne domeny białek Bcl-2, zwanych w skrócie BH. Białka proapoptotyczne jak Bax, Bak i Bok posiadają domeny BH od 1 do 3. Pozostałe białka jak Bid, Bam, Bim, Bmf zawierają tylko jedną domenę BH3. (92) Białko p53 jest podstawowym regulatorem transkrypcji tych białek. P53 jest może zainicjować naprawę DNA, decyduje o zatrzymaniu komórki w fazie G1 lub inicjuje proces apoptozy w przypadku nagromadzenia uszkodzeń DNA. (93) Kluczowym elementem mitochondrialnej drogi apoptotycznej jest utworzenie przez Bax i Bak kanałów w zewnętrznej błonie mitochondrium, co umożliwia przejście do cytoplazmy takich białek jak cytochrom c, Diabło czy Apaf-1. (94) Zadaniem pozostałych białek proapoptotycznych zawierających tylko jedną domenę BH3 jest ułatwianie oligomeryzacji i zapobieganie inaktywacji białka Bax przez antyapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2. Białko Bcl-2 promujące przeżycie komórki należy do grupy protoonkogenów, jego działanie może uratować komórkę przed programowaną śmiercią. Bcl-2 lokalizuje się mitochondrium, w reticulum endoplazmatycznym, a także w błonie jądrowej. Głównym zadaniem tego białka jest kontrolowanie równowagi pomiędzy białkami z tej grupy, dodatkowo uczestniczy ono w regulacji gospodarki wapniowej w komórce. (95,96) Same białka z domeną BH3 mogą być aktywowane przez różne czynniki, jak na przykład kaspazy czy granzym B. Aktywatorem proapoptotycznej drogi pochodzącej od mitochondrium jest granzym B, który może trawić białko Bid. Granzym B jest też bezpośrednim aktywatorem kaspaz w komórkach układu immunologicznego. (96) Białko Bim wiąże się ze składową cytoszkieletu i w razie jego destrukcji jest uaktywniane. Inne białka z rodziny Bcl-2, z domena BH3 mogą być aktywowane na drodze defosforylacji lub przy udziale p53. Uszkodzenie mitochondrium poprzez otwarcie kanałów utworzonych z białek proapoptotycznych jest charakterystyczna dla procesu apoptozy, inny rodzaj uszkodzenia prowadzący do dysfunkcji mitochondrium odbywa się zasadniczo na drodze nekrozy. (97,98)

I.4. Znaczenie mitochondrium w procesie apoptozy komórek

Ważnym białkiem biorącym udział w przekazywaniu sygnału apoptotycznego od mitochondrium jest cytochrom c, który lokalizuje się w wewnętrznej stronie błony mitochondrialnej i pełni rolę przekaźnika elektronów pomiędzy kompleksem III i IV łańcucha oddechowego. Sam cytochrom c jest syntetyzowany w cytoplazmie jako apoproteina, a następnie w mitochondrium dołączona zostaje grupa hemowa. Funkcjonalny cytochrom c zbudowany jest ze 104 aminokwasów połączonych kowalencyjnie z grupą hemową. W mitochondrium cytochrom c oddziałuje z kardiolipiną, po otwarciu kanałów w błonie

mitochondrium zostaje uwolniony i lokalizuje się w cytoplazmie, gdzie ułatwia allosteryczną aktywację czynnika Apaf-1. (99) Otwarcie kanałów w zewnętrznej błonie mitochondrium nie tylko powoduje uwolnienie molekuł zaangażowanych w apoptozę, ale także dezaktywuje funkcje mitochondrium niezbędną dla przeżycia komórki. Innym czynnikiem uwalnianym z mitochondrium podczas apoptozy jest AIF. Jest to czynnik, który po uwolnieniu do cytoplazmy wędruje do jądra, gdzie może kierować kondensacją chromatyny i fragmentacją DNA. (100)

Dwie odmienne drogi prowadzące do procesu programowanej śmierci; droga zewnętrzna za pośrednictwem receptora, jak i droga wewnętrzna przy udziale mitochondrium, charakteryzują często wspólne punkty, takie jak aktywacja kaspaz efektorowych oraz grupa białek Smac/Diablo uwalniana z mitochondrium podczas sygnału apoptotycznego pochodzącego od receptora. (101) Także białko p53 uaktywniane po uszkodzeniu DNA komórki oddziałuje na mitochondria uwalniając białka Bax, ale także może sterować transkrypcją genu ligandu Fas stymulując produkcję tego białka. (102)



Rycina 1. Schemat przedstawiający podstawowe szlaki sygnału i białka decydujące o apoptozie komórki

I.5. Rola wolnych rodników tlenowych w procesie apoptozy

Oprócz szeregu białek biorących udział w przekazywaniu sygnału o apoptozie, istotną rolę pełnią także wolne rodniki tlenowe (ROS – Reactive Oxygen Species). Stres oksydacyjny komórki jest stanem, w którym podwyższony jest poziom wolnych rodników w komórce – głównie anionorodnika ponadtlenkowego, nadtlenku wodoru oraz rodnika hydroksylowego. Są to wysoko reaktywne związki, niszczące DNA, lipidy i białka komórki. Znana jest dualistyczna rola ROS jako wtórnego przekaźnika w komórce; wolne rodniki mogą brać udział w wielu szlakach metabolicznych i sygnałowych. Źródłem wolnych rodników w komórce może być zarówno mitochondrialny łańcuch transportu elektronów, jak i oksydaza NADPH komórki oraz kaskada fosfolipazy A2. (103)

Modele eksperymentalne wskazują głównie na proapoptotyczny efekt wewnątrzkomórkowych wolnych rodników tlenowych. ROS wzmagają proces programowanej śmierci pochodzącej od receptorów CD95 (Fas/Apo-1), gdyż dodatek różnych antyoksydantów jest w stanie zablokować proces apoptozy od tych receptorów. (104,105) Najprawdopodobniej wzrost stężenia ROS w komórce stymuluje ekspresję receptorów CD 95 na powierzchni komórki lub ułatwia tworzenie apoptosomu wzmacniając tym samym drogę sygnału pochodzącą od mitochondrium. Rodzaj sygnału i jego przebieg zależny jest od rodzaju i stadium, w jakim znajduje się komórka, dlatego istnieją dowody na to, że anionorodnik ponadtlenkowy może hamować proces apoptozy pochodzący od receptorów śmierci w niektórych komórkach. (106) ROS mogą także podwyższać ekspresję antyapoptotycznych białek Bcl-2. Losy sygnału wewnątrzkomórkowego mogą się różnić w zależności od rodzaju konkretnego typu rodnika; sygnał od nadtlenku wodoru może działać odmiennie od sygnału pochodzącego z nagromadzenia anionorodnika ponadtlenkowego. (107) Na stężenie wewnątrzkomórkowych wolnych rodników wpływ mają czynniki wzrostu, przykładowo przyłączenie czynnika martwicy nowotworu (TNF - Tumor Necrosis Factor α) znacznie przyczynia się do wzrostu generacji ROS. (108) Nagromadzenie wolnych rodników po zadziałaniu TNF α sprzyja także aktywacji kaspaz w komórce, gdyż dodanie przeciwutleniaczy znosi efekt apoptotyczny od pochodzący od tego czynnika. (109) Interesujący jest także fakt, że sygnał od receptorów śmierci zależny jest od źródła wolnych rodników – podczas gdy, ROS produkowane przy udziale oksydazy NADPH hamują sygnał apoptotyczny pochodzący od TNF α , wolne rodniki pochodzące z łańcucha oddechowego mitochondrium stymulują proces apoptozy. (110)

I.6. Czynniki martwicy nowotworu w regulacji apoptozy

Czynnik martwicy nowotworu jest cytokiną prozapalną wydzielaną głównie przez makrofagi. TNF α działa na komórkę poprzez dwa różne receptory TNFR1 i TNFR2. (111) TNFR1 wstępuje na większości komórek, ekspresja TNFR2 ogranicza się głównie do komórek układu immunologicznego. (112) Tylko TNFR1 posiada cytoplazmatyczną domenę śmierci DD, z którą oddziałują inne białka szlaku apoptotycznego. Po związaniu TNF, TNFR1 trimeryzuje, co umożliwia zmianę konformacji cytoplazmatycznej domeny DD. Białko SODD blokujące dostęp do domeny DD przy nieaktywnym receptorze odłącza się od receptora, a białko TRADD przyłącza się do domeny śmierci DD receptora rekrutując białko RIP, TRAFF2 oraz białko FADD. (113) Białko FADD wiąże prokaspazę-8 i umożliwia jej aktywację i dalsze przekazanie sygnału o apoptozie od receptora TNFR1 poprzez uaktywnienie głównej kaspazy efektorowej - prokaspazy-3. (114) Działanie TNF α nie ogranicza się tylko do inicjacji procesu apoptozy. Szeroko zbadana jest także przeciwna rola indukcji sygnału promująca przeżycie i proliferację komórki. Związanie białka TRAF2 powoduje fosforylację kinaz MAP (mitogen activated kinase) oraz w konsekwencji fosforylację kinazy p38MAPK i kinazy JNK (cJun N-terminal kinase) i uaktywnienie czynnika transkrypcyjnego cFos/cJun. (115) Droga od receptora TNF może prowadzić także do wyzwolenia czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, który aktywuje transkrypcję genów prozapalnych i jest głównym czynnikiem odgrywającym rolę w przeżyciu komórki nowotworowej pomimo działania czynnika martwicy nowotworu. (116) Równolegle białko TRAF2 także może uaktywniać inhibitory kaspaz cIAP, co może prowadzić do zahamowania ich aktywności i zatrzymania sygnału o apoptozie. Dualistyczna rola TNF α jest dobrze poznana, jednakże odpowiedź na pytanie, co decyduje o przewadze sygnału o przeżyciu komórki pomimo zadziałania czynnika proapoptotycznego jest trudna. (117)

Oprócz receptorów TNFR na komórkach występują także receptory FAS (CD 95, Apo-1), które biorą udział w przekazywaniu sygnału o apoptozie dotyczącej zwłaszcza kilku ważnych fizjologicznych procesów takich, jak selekcja dojrzałych limfocytów T lub zabicie komórki zakażonej wirusem przez komórki cytotoksyczne lub NK. Analogicznie do receptora TNFR receptor FAS jest homotrimerem, który po przyłączeniu liganda trimeryzuje, co ułatwia oddziaływanie domeny śmierci receptora z domeną białka FADD. Białko ma także zdolności oddziaływania z zymogenem kaspazy-8. Autoaktywacja kaspazy-8 uruchamia kaskadę kaspaz począwszy od kaspazy-9. Komórki można podzielić na dwa typy ze względu na konieczność aktywacji drogi mitochondrialnej podczas przekazywania sygnału od ligandu

Fas. W pierwszym typie komórek aktywacja kaspazy-8 wystarczy do uaktywnienia kaspaz efektorowych. Aktywacja kaspaz efektorowych w drugim typie komórek zależy od cięcia białka Bid przez kaspazę-8 oraz uwolnienia cytochromu c z mitochondrium i aktywację kaspazy-9 w apoptosomie. Innym białkiem, który może wiązać się do receptora CD95 jest cytoplazmatyczne białko Daxx, którego związanie inicjuje sygnał niezależny od białka FADD i prowadzący do aktywacji kinazy c-Jun (JNK), co promuje przeżycie komórki pomimo przyłączenia ligandu FasL. (118)

I.7. Inne rodzaje destrukcji komórek

Proces apoptozy może zostać zahamowany poprzez wiele czynników, ale uszkodzenia komórki mogą być znaczące, co doprowadzi komórkę do zniszczenia poprzez inne procesy destrukcji, jakimi są nekroza, czy autofagia. Indukcja lokalnego procesu zapalnego jest charakterystyczna dla nekrozy. Komórka w skutek dysregulacji transportu jonów, utraty źródła energii lub gwałtownej zmiany pH ulega nekrozie, która charakteryzuje się utratą ciągłości błony, wakuolizacją cytoplazmy oraz wyciekaniem zawartości komórki do otoczenia. (119) Nekroza może być także spowodowana zakażeniem lub nagromadzeniem wolnych rodników. Proces ten jest również ważny z punktu widzenia fizjologicznego, przykładowo podczas procesu odnowy śluzówki jelita cienkiego, enterocyty umierają zarówno na drodze apoptozy jak i nekrozy. (120) Zablokowanie kaskady apoptotycznej poprzez inhibicje kaspaz może wymusić na komórce śmierć na drodze nekrozy. (121)

W literaturze opisywane są także inne formy destrukcji komórki: autofagia oraz tzw. katastrofa mitotyczna. Autofagia jest konserwatywnym ewolucyjnie procesem, który polega na lizosomalnej drodze destrukcji białek lub całych organelli. Autofagia może być zainicjowana przez szereg czynników jak akumulacja źle sfałdowanych białek, brak czynników odżywczych, stres oksydacyjny, oraz sygnał od TRAIL, może zostać zainicjowana w stanie głodu i zmusza komórkę do przejścia w stan katabolizmu. Proces ten może także z powodzeniem zastępować proces apoptozy w przypadku jej blokady. Podobnie jak proces apoptozy, autofagia wymaga czynnika indukującego, nakładu energii i syntezy nowych białek. (122) Istnieją również dowody na to, iż zaburzenia w tym procesie również mogą prowadzić do rozwoju nowotworu. (123, 124)

Katastrofa mitotyczna spowodowana jest głównie przez aberracje mitotyczne i prowadzi do powstania gigantycznej komórki zawierającej nieskondensowane chromosomy. Leki, które niszczą mikrotubule i wrzeciono podziałowe wywołują katastrofę mitotyczną.

Zablokowanie podziału komórki w fazie G2 służy naprawieniu uszkodzeń DNA. Jeśli ten etap zostanie zaburzony w skutek inhibicji białek regulujących ten proces i komórka będzie w stanie wejść w fazę mitozy zanim zostanie ukończona naprawa DNA, może to wyzwolić proces zniszczenia komórki na drodze katastrofy mitotycznej. (125) Uważa się, iż wszystkie te formy śmierci mogą następować wymiennie, a także jeden proces może być kontynuacją drugiego. Rodzaj i typ śmierci, jaki nastąpi w komórce zależy od jej typu, rodzaju tkanki, poziomu zróżnicowania, czy siły samego czynnika indukującego. (126)

I.8. Fizjologiczne znaczenie apoptozy

Fizjologiczne znaczenie apoptozy można zaobserwować na każdym etapie życia organizmu. Jakikolwiek zaburzenia tego procesu zachodzącego w pojedynczych komórkach mogą mieć negatywne skutki dla całego organizmu. Nadmierna i niekontrolowana apoptoza prowadzi do chorób degeneracyjnych i autoimmunologicznych. (127,128) Natomiast zatrzymanie procesu samobójczej śmierci może prowadzić do rozwoju procesu nowotworowego. (129)

Choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Alzheimera i choroba Parkinsona są w dużej mierze powiązane z nadmierną degeneracją neuronów mózgu zachodzącej na drodze apoptotycznej jak i nieapoptotycznej. (130) Model śmierci komórkowej w chorobach neurodegeneracyjnych zależy głównie od rodzaju genów zaangażowanych w ten proces. Wiąże się to z nadekspresją receptora Fas oraz receptora dla TNF α . Także nagromadzenie źle ukształtowanych białek, charakterystyczne dla chorób prionowych, choroby Alzheimera może wyzwolić w komórkach proces apoptozy za pośrednictwem reticulum endoplazmatycznego. (131) Śmierć neuronów, które może mieć także charakter nekrozy jako następstwo urazu, niedotlenienia, jest niezależna od aktywacji kaspaz i wiąże się ze wzrostem wewnątrzkomórkowych jonów wapnia i co za tym idzie uaktywnieniem białek typu kalpain, katepsyn. (132,133)

Choroby autoimmunologiczne także mają swoje przyczyny w nieprawidłowościach związanych z procesem apoptozy. Skuteczna fagocytoza ciałek apoptotycznych ma zapobiegać indukcji procesu zapalnego. Defekty genetyczne związane z rozpoznaniem i fagocytozą komórki apoptotycznej są przyczyną chorób autoimmunologicznych i rozwoju odpowiedzi na antygeny własne i ciągłą odpowiedź autoimmunologiczną. Istotnym zagadnieniem dotyczącym apoptozy jest szybkie rozpoznanie i usunięcie komórki przechodzącej proces programowanej śmierci, aby zapobiec wyciekaniu potencjalnie

immunogennej zawartości komórek. Nieskuteczna fagocytoza może bowiem prowadzić do chorób autoimmunologicznych. Fagocytoza ciałek apoptotycznych indukuje wydzielanie cytokin antyzapalnych jak interleukina-10 oraz TGF β . (134). Sygnałem dla fagocytów jest fosfatydyloseryna, której reszty znajdują się po wewnętrznej stronie błony komórkowej, ale podczas procesu apoptozy są wystawione na zewnątrz komórki i ułatwiają jej rozpoznanie. (135) W rozwoju tolerancji immunologicznej istotną rolę odgrywa apoptoza limfocytów na drodze od ligandu Fas, TRAIL. Zaburzenia w funkcjonowaniu receptorów na limfocytach doprowadza do zmniejszonej apoptozy i zaburzenia homeostazy w układzie immunologicznym, a co za tym idzie doprowadza do rozwoju choroby autoimmunologicznej. (136)

Ostatnio postuluje się znaczący udział procesu apoptozy w rozwoju i przebiegu szoku septycznego. (137) Obserwuje się głównie wzmożoną apoptozę limfocytów w śledzionie oraz grasicy i w wielu tkankach limfoidalnych zasocjowanych z błonami śluzowymi.(138,139) Nadmiernej apoptozie ulegają także komórki dendrytyczne, monocyty, makrofagi oraz enterocyty. (140, 141) Droga sygnału prowadzącego do efektu programowanej śmierci w szoku septycznym może pochodzić zarówno z zewnątrz komórki jak i z wnętrza komórki. Uszkodzenie tkanek i całych organów, jakie występuje w sepsie ma wpływ na przeżycie pacjenta i wiąże się zaburzeniami procesu apoptozy lub nekrozy. Poznanie mechanizmów procesu apoptozy występujących w rozwoju szoku septycznego może mieć istotne znaczenie dla leczenia tej choroby o wysokiej śmiertelności. Wykazano, iż zahamowanie nadmiernej apoptozy limfocytów występującej w sepsie sprzyja wyzdrowieniu zwierząt eksperymentalnych, u których występują objawy szoku. (142,143,144)

I.9. Rola apoptozy w etiopatogenezie nowotworów

Utrzymywanie stałej liczby komórek w tkankach ciągle regenerujących się o wysokim wskaźniku podziałów wymaga równowagi pomiędzy zamieraniem a namnażaniem się komórek. Niekontrolowana proliferacja i zaburzenia procesu apoptozy w tkance mogą skutkować rozwojem nowotworu. Kancerogeneza jest złożonym, wieloetapowym procesem, u podstaw którego leżą zmiany genetyczne prowadzące do powstania guza, jego rozrastania się i rozprzestrzeniania. Aby doszło do rozwoju raka, komórki muszą uzyskać szereg właściwości. Jednym z etapów nowotworzenia jest uniewrażliwienie się komórek na sygnały pochodzące od inhibitorów wzrostu oraz wydzielanie czynników wzrostu na drodze autokrynnej. Kolejną ważną właściwością, która umożliwia rozwój guza jest podtrzymywanie

angiogenezy oraz możliwość rozprzestrzeniania i inwazji sąsiednich tkanek. Istotnym etapem nowotworzenia jest niekontrolowana replikacja komórki, a także zaburzenie procesu apoptozy. (145) Mutacje zachodzące w komórkach nowotworowych zaburzają proces apoptozy poprzez zablokowanie działania białek proapoptotycznych lub nadekspresję białek funkcjonujących jako inhibitory programowanej śmierci. Jednym z głównych białek, których mutacje często obserwuje się w komórkach nowotworowych jest rodzina białek Bcl-2. Mutacja w domenie BH proapoptotycznego białka Bax lub Bak skutkuje utratą funkcji tych białek i zatrzymanie apoptozy na drodze mitochondrialnej. (146) Ekspresja białka Bcl-2 w transgenicznych myszach, u których rozwinęła się białaczka udowodniła, że inhibicja apoptozy prowadzić może do rozwoju nowotworu. Mutacja w ważnym białku hamującym rozwój nowotworu, jakim jest p53 może wpłynąć na zahamowanie apoptozy. Białko p53 jest kluczowym regulatorem transkrypcji białek odpowiedzialnych za cykl komórkowy, mutacje tego białka obserwuje się w większości nowotworów. Uszkodzenie genu p 53 może być spowodowane promieniowaniem, czynnikami chemicznymi lub replikacją wirusa HPV (Human Papilloma Wirus - wirus brodawczaka ludzkiego). (147) Wystąpienie nowotworu jest bardziej prawdopodobne, jeśli zahamowaniu apoptozy towarzyszy inna mutacja, na przykład zmiany w funkcjonowaniu proto-onkogenów jak c-myc sprzyjającym niekontrolowanym podziałom komórkowym. (148)

Inne białka z rodziny Bcl-2 również mogą być zaangażowane w zahamowanie procesu programowanej śmierci i rozwój nowotworów. Myszy, których komórki nie wykazują ekspresji genu Bax również spontanicznie zapadają na różne choroby nowotworowe. Istnieją także dowody na to, iż mutacje genów Bax i Bak u ludzi sprzyjają rozwojowi raka żołądka, odbytnicy i rozwojowi białaczek. (149) Białko Bak jest ważnym regulatorem apoptozy w normalnych komórkach nabłonkowych jelit, obniżenie jego poziomu obserwuje się w nowotworach jelit, aktywacja onkogeny Ras stymuluje to obniżenie. Postuluje się też udział inhibitorów kaspaz IAPs, których podwyższony poziom stwierdzono w różnych liniach nowotworowych oraz biopsjach guzów. (150) Także w mechanizmie powstawania czerniaka złośliwego jest obserwowana utrata ekspresji białka Apaf-1. (151) Poziom białka surwiwiny związanego z apoptozą podnosi się w wielu typach złośliwych nowotworów, wysoki poziom tego białka może być wskaźnikiem złośliwienia guza. Również ekspresja genów kaspaz może mieć wpływ na prognozę leczenia różnych typów raka. Zaobserwowano, iż nowotwory trzustki i neuroblastoma wykazują mniejszą złośliwość, jeśli w jądrze komórek zlokalizowana jest kaspaza-3. (152) Brak ekspresji kaspazy-8 może korelować z rozwojem raka płuc i neuroblastoma. Dodatkowo zaburzenia ekspresji integryn i kaspazy-8 promuje uzłośliwienie

neuroblastoma ułatwiają inwazję do sąsiednich tkanek. (153) Niewrażliwość na sygnał proapoptotyczny spowodowana może być także nadaktywacją wewnątrzkomórkowych szlaków decydujących o przeżyciu komórki, jak sygnał od kinazy AKT, która aktywuje różne szlaki zachowujące komórkę przy życiu. W wielu typach nowotworów te szlaki są bardzo aktywne. U podstaw wzmożonej aktywacji kinazy AKT leżą mutacje w onkogenach Ras lub receptorze hormonu wzrostu. (154) Innym szlakiem bardzo aktywnym w komórkach nowotworowych jest sygnał związany z czynnikiem transkrypcyjnym NF- κ B, który może zahamować apoptozę. (155) Przyczyną nadekspresji tego sygnału są genetyczne translokacje i amplifikacje genów kodujących białko NF- κ B i jego inhibitor. NF- κ B jest czynnikiem regulującym proces zapalny, a także apoptozę. Efekt tego czynnika zależy od typu komórki, w której jest aktywowany, przykładowo może on promować proces apoptozy poprzez indukcję ekspresji Fas ligandu. (156) W komórkach nabłonka jelit wzmożona aktywacja tego czynnika związana jest ze stanem zapalnym śluzówki i zahamowaniem apoptozy.

Istnieje wiele dowodów na to, że białka decydujące o przekazywaniu sygnału dotyczącego programowanej śmierci mają istotne znaczenie w progresji nowotworu. Czynniki działające proapoptotycznie mają działanie supresorów nowotworów, spadek ich poziomu, bądź zaburzenie funkcji białka skutkuje rozwojem nowotworu. Wydaje się także, że białka hamujące apoptozę mogą działać jako onkogeny i potencjalnie ich wzrost również będzie sprzyjał powstaniu guza. Jednakże proces kancerogenezy jest złożony i zaburzenia apoptozy mogą być tylko jednym z jego etapów. O znaczeniu procesu apoptozy w rozwoju nowotworu świadczyć może fakt, iż rak jelita grubego zdarza się znacznie częściej niż jelita cienkiego, gdzie proces apoptozy w warstwie intensywnych podziałów komórek jest częściej obserwowany niż w nabłonku jelita grubego. Te obserwacje potwierdza fakt, iż stosunek białka Bax/Bcl-2 jest wyższy w komórkach macierzystych nabłonka jelita cienkiego w porównaniu z komórkami jelita grubego. (157)

I.10. Fizjologiczne znaczenie apoptozy w tkance nabłonkowej jelit

W stanie fizjologicznym organizmu apoptoza jest procesem często zachodzącym, podtrzymującym homeostazę w tkankach o dużym tempie podziałów komórek. W szczególności w tkankach nabłonkowych występujących na powierzchniach narządów, jak nabłonek jelit, żołądka, pochwy, etc. Komórki nabłonkowe jelita cienkiego namnażają się w kryptach kosmków jelitowych, a następnie są przesuwane ku górnym partiom, w świetle jelita ulegają złuszczeniu już jako komórki zróżnicowane. Cały proces trwa około 3-5 dni. Utrata

kontaktu komórki adherentnej z podłożem skutkuje formą śmierci zwanej „anoikis”. Proces ten opisany przez Frisch i Francis w 1993 roku jest indukowany poprzez zmiany zachodzące w ekspresji białek decydujących o zakotwiczeniu komórki w podłożu, jak integryny, kadheryny, co jest związane z genetycznie zaprogramowaną terminacją cyklu komórkowego. (158) Rozmnażaniem i różnicowaniem komórek w osi krypta-światło jelita kierują cytokiny jak TGF α . (159) Natomiast o apoptozie decydują cytokiny, takie jak TNF- α i INF- γ . TNF- α może działać poprzez receptor TNFR1 w górnych partiach kosmków jelit wywołując apoptozę enterocytów i ułatwiając ich oderwanie w świetle jelita. Ta sama cytokina może działać przez receptor TNFR2 w kryptach podnosząc poziom białka p53 i zapobiegając nadmiernej apoptozie w tej części tkanki. (160) Apoptoza w warstwie intensywnych podziałów komórek zdarza się rzadko i ma na celu eliminację komórek wadliwych. Natomiast uważa się, iż komórki ulegające oderwaniu w górnych partiach nabłonka zamierają na drodze apoptozy bądź nekrozy. O takim przebiegu procesu różnicowania enterocytów może świadczyć wysoki poziom antyapoptotycznego białka Bcl-2 w komórkach krypt, oraz zwiększający się poziom białka Bax w miarę przesuwania się komórek w wyższe partie kosmków jelitowych. Regulacja tego procesu i decyzja o wejściu w etap programowanej śmierci zależą od balansu pomiędzy homologami z grupy proapoptotycznej i antyapoptotycznej białek Bcl-2. Zaburzenia charakteryzujące się nadmierną apoptozą enterocytów, bądź zaburzeniami podziałów komórek występują w takich chorobach jak wrzodziejące zapalenie jelit bądź choroba Crohna. Są to choroby o podłożu genetycznym, w których znaczny udział ma system immunologiczny i przewlekły stan zapalny pochodzący od aktywowanych makrofagów i limfocytów T. Wśród limfocytów T izolowanych z obszarów przewlekłych zapaleń obserwuje się zaniżoną apoptozę. Stosunek Bcl-2/Bax w chorobie Crohna jest wysoki, co powoduje akumulację komórek T i chroniczny stan zapalny. (161) We wrzodziejącym zapaleniu jelita obserwuje się masową apoptozę enterocytów spowodowaną interakcją receptor Fas-Fas ligand obecnych na limfocytach CD3 gromadzących się w miejscu zapalenia i niszczących śluzówkę jelit. (162) W stanach zapalnych jelit ważną rolę odgrywa wzmożone wydzielanie cytokin, a w szczególności TNF- α i INF- γ niszczących śluzówkę. Nadprodukcja cytokin wpływa także na integralność nabłonka gdyż utrudnia tworzenie połączeń zamykających (ang. tight junction) osłabiając barierę jaką stanowi nabłonek. (163) Wzmożona apoptoza enterocytów wywołuje przyspieszenie tempa podziałów komórkowych, co z kolei sprzyja mutacjom i procesowi nowotworzenia. Pacjenci z nawracającym wrzodziejącym zapaleniem jelit lub chorobą Crohna częściej zapadają na nowotwory. (164) Mutacje prowadzące do nowotworu u tych pacjentów są podobne do tych,

jakie zdarzają się w sporadycznych przypadkach raka jelit i obejmują gen p53, geny APC. Komórki raka okrężnicy dodatkowo wykazują ekspresję ligandu Fas, co pozwala im uniknąć zniszczenia przez aktywowane limfocyty T.

I.11. Rola nadtlenu wodoru w przekazywaniu sygnału o apoptozie

Przewlekły stan zapalny w tkankach jest zawsze związany z możliwością rozwoju nowotworu. Na skutek nagromadzenia wolnych rodników, aldehydów i czynników prozapalnych może dojść do uszkodzenia DNA, mutacji w genach i zahamowania apoptozy. W stanie zapalnym dochodzi do aktywacji wielu enzymów jak cyklooksygenaza, syntetaza tlenu azotu i zwiększenia poziomu wolnych rodników. W większości typów komórek nowotworowych obserwowany jest wzrost wewnątrzkomórkowych wolnych rodników tlenowych. (165) Ich źródłem może być szereg enzymów jak oksydaza NADPH, peroksydazy, mitochondrialny łańcuch transportu elektronów, cyklooksygenaza, lipooksygenaza, oraz cytochrom P450. W normalnych warunkach w prawidłowej komórce ilość reaktywnych form tlenu jest ściśle kontrolowana przez systemy enzymatyczne jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa oraz przeciwutleniacze. Ta ścisła kontrola i regulacja sprawia, iż wolne rodniki tlenowe mogą uczestniczyć w przekazywaniu sygnału wewnątrzkomórkowego dotyczącego apoptozy i proliferacji komórki. Wolne rodniki mogą wpływać na aktywność kinaz i fosfataz oraz aktywować czynniki transkrypcyjne. (166) Produkcja ROS jest elementem działania czynników wzrostu wiążących się z receptorami o aktywności kinazy tyrozynowej. Aktywacja oksydazy NADPH w tym szlaku prowadzi do wytworzenia anionorodnika ponadtlenkowego, a następnie powstania nadtlenu wodoru, który działając jako wtórny przekaźnik może zablokować apoptozę komórki oraz uaktywnić niekontrolowaną proliferację poprzez aktywację onkogenów. Nadmiar wolnych rodników tlenowych sprzyja transformacji. Reaktywne formy tlenu wywołują mutacje w DNA, w szczególności w DNA mitochondrium i wpływają na ekspresję białek regulujących wzrostem i rozmnażaniem komórki. Komórki nowotworowe dzieląc się intensywnie tworzą guz, w którym pojedyncze komórki znajdują się w stanie niedotlenienia i braku substancji odżywczych. Te warunki wyzwalają w komórkach nowotworowych takie procesy adaptacyjne, które umożliwiają im wzrost i przeżycie polegające na zahamowaniu procesu programowanej śmierci i zmianach w metabolizmie komórki. W tym procesie istotną rolę mogą odgrywać wolne rodniki tlenowe, gdyż są one produkowane w mitochondriach w przypadku braku tlenu. Powstaje wtedy anionorodnik ponadtlenkowy, który jest zamieniany

w nadtlenek wodoru przy udziale dysmutazy nadtlenkowej. Zwiększona ilość wewnątrzkomórkowego nadtlenku wodoru jest wtórnym przekaźnikiem sygnału i może wpływać na ekspresję genów poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych i ułatwiać komórce przeżycie pomimo braku czynników odżywczych. (167) Nadtlenek wodoru może pełnić dualistyczną rolę w przypadku regulacji procesu apoptozy; odpowiednie stężenia mogą wyzwolić lub zahamować proces apoptozy. (168)

I.12. Wpływ związków chemicznych zawartych w pożywieniu na apoptozę i proces nowotworzenia

W pożywieniu obecnych jest szereg bioaktywnych komponentów, które mogą wpływać na metabolizm komórki, stężenie wolnych rodników oraz regulować proces apoptozy. Niektórzy szacują, iż 40% nowotworów jest związanych z dietą. Ta liczba zwiększa się dla konkretnych typów nowotworów i przy określonym składniku diety. (169) Badania epidemiologiczne dowodzą, że odpowiednia dieta bogata w błonnik, nienasycone kwasy tłuszczowe, flawonoidy, czy probiotyki może znacznie zredukować ryzyko rozwoju raka. (170) Większość z tych substancji działa jako antyoksydanty przeciwdziałające wolnym rodnikom uszkadzających komponenty komórek. Substancje takie jak karoten, likopen, czy kwas askorbinowy mogą zmniejszyć występowanie nowotworów piersi, prostaty czy raka okrężnicy. Jednym z elementów powstawania raka, na który mogą mieć wpływ te substancje jest proces apoptozy. (171) Niektóre składniki pożywienia mogą wpływać na apoptozę w komórkach nowotworowych. Galusan epigalokatechiny (ang. (-)-Epigallokatechiny gallat ECCG) - składnik zielonej herbaty wywołuje selektywną apoptozę w komórkach nowotworowych. (172,173) Inne substancje o udowodnionych właściwościach przeciwnowotworowych to resweratrol występujący w czerwonym winie, kurkumina z szafranu indyjskiego oraz kwercetyna z cebuli i likopen występujący w pomidorach. (174,175,176) Szacuje się, że spożycie odpowiednich ilości tych substancji może być istotne dla profilaktyki nowotworów. Działanie tych związków polega na wpływaniu na drogę przekazywania sygnału o apoptozie: aktywację kaspaz, uwolnienie cytochromu c z mitochondrium, regulację białek Bcl-2 lub aktywację białka p 53. Resweratrol pobudza apoptozę na drodze od receptora CD95 w komórkach raka prostaty. (177)

ECCG istotnie wzmacnia sygnał od ligandu TRAIL w komórkach raka wątroby. Profilaktyczne spożycie likopenu wywołuje uwolnienie cytochromu c w komórkach raka prostaty. Beta karoten może indukować uwolnienie cytochromu c z mitochondrium w

komórkach białaczki, raka jelita grubego oraz czerniaka. W komórkach raka trzustki ECGG wywołuje oligomeryzacje białka Bax oraz depolaryzacje błony mitochondrium, co uaktywnia proces apoptozy w tych komórkach. Reserwatrol oraz ECGG mogą dodatkowo wpływać na apoptozę komórek poprzez aktywację białka p53 w komórkach rakowych. Indukcja apoptozy pod wpływem tych związków jest zależna od białka p53 – komórki z delecją tego genu nie ulegają procesowi programowanej śmierci pod wpływem tych składników roślinnych. Reserwatrol może także obniżyć poziom surwiwiny – białka przeciwdziałającego apoptozie. Efekt powyższych eksperymentów stwierdzonych *in vitro* potwierdzają niektóre eksperymenty *in vivo*, zwłaszcza w przypadku wyciągu z zielonej herbaty. (178) W mysich modelach chemicznej indukcji raka zwiększone spożycie kwercetyny i rutyny wywołało wzrost indeksu apoptotycznego w obszarach dysplazji nabłonka okrężnicy w porównaniu do grupy kontrolnej. (179) Profilaktyczny efekt składników roślinnych polega głównie na wpływaniu na proces apoptozy komórek nowotworowych, oszczędzając komórki prawidłowe. W dietetycznej profilaktyce raka ważne jest także wzajemne wzmocnienie i sumowanie się efektu różnych substancji w pożywieniu. Istotne jest także spożycie produktów bogatych w błonnik, gdyż wspomaga on rozwój prawidłowej flory bakteryjnej jelit, w szczególności bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* produkujących krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe redukujące działanie enzymów prokancerogennych. Obecność niektórych gatunków tych bakterii w jelicie obniżać może ryzyko wystąpienia raka jelita grubego. (180)

I.13. Rola bakterii w apoptozie komórek nabłonkowych

Bakterie patogenne i komensalne mogą mieć duży wpływ na funkcjonowanie komórek nabłonka, z którym mają bezpośredni kontakt, w tym także na proces apoptozy. Interakcja bakterii z komórką gospodarza aktywuje szereg procesów i szlaków wewnątrzkomórkowych, których wynikiem może być produkcja cytokin, wolnych rodników, wydzielanie defensyn. Kontakt komórki eukariotycznej z patogenem może także wpłynąć na transdukcję sygnału wewnątrzkomórkowego, ukształtowanie mikrofilamentów, rozmieszczenie wakuol. (181) Bakterie są zdolne do sterowania procesem programowanej śmierci komórki. W niektórych przypadkach te same bakterie mogą aktywować proces apoptozy w komórce, jak również ją hamować. (182) Adherencja niektórych bakterii na powierzchni komórki gospodarza prowadzi do wnikięcia patogenu do wnętrza komórki poprzez fagocytozę lub endocytozę wymuszoną przez patogen. Ścisły kontakt bakterii z komórką gospodarza pozwala bakterii na sterowanie wewnątrzkomórkowymi procesami.

U bakterii z rodzaju *Shigella*, *Salmonella* oraz niektórych typów *E. coli* rezydujących w układzie pokarmowym ssaków wykryto tzw. III typ sekrecji białka polegający na połączeniu za pomocą struktur białkowych zewnętrznej i wewnętrznej błony bakteryjnej ułatwiających wstrzyknięcie określonych białek do komórki eukariotycznej. (183) Rozpuszczalne białka bakterii w komórce gospodarza wywołują fosforylację kinazy tyrozynowej, aktywację białek Ras, wzrost stężenia wewnątrzkomórkowych jonów wapnia oraz zmiany w cytoszkieletu komórki ułatwiające inwazję bakterii. (184) W przypadku bakterii *Shigella flexneri* białko IpaB będące składową kompleksu inv-spa należącego do III typu sekrecji białek bakteryjnych jest zdolne wywołać szybką apoptozę makrofagów, limfocytów B i T *in vitro*. Białko IpaB aktywuje enzym ICE, który bierze udział w aktywacji szlaku apoptozy w komórkach. Szybkie i skuteczne zabicie komórek układu odpornościowego sąsiadujących z tkanką nabłonkową ułatwia bakterii dalszą inwazję tkanek oraz zapobiega procesowi zapalnemu. (185) Szybka apoptoza enterocytów jednak nie jest dla bakterii *Shigella* korzystna, po wtargnięciu bakterii do komórki nabłonkowej zostaje uruchomiony proces pro-zapalny, hamujący szybką apoptozę komórek gospodarza. Wydzielanie chemokin oraz cytokin pro-zapalnych jak TNF α wiąże się z aktywacją czynnika NF κ B i zahamowaniem procesu apoptozy. (186) Także w przypadku *Salmonella typhimurium* białka systemu III typu sekrecji biorące udział w inwazji bakterii na komórkę gospodarza mogą wywołać apoptozę makrofagów. System III typu sekrecji ułatwia zmianę w ukształtowaniu cytoszkieletu komórki, co z kolei pomaga we wnikanii i rozprzestrzenianiu patogenu. W przypadku komórek niefagocytujących takich, jak enterocyty bakteria w bliskim kontakcie z komórką nabłonkową wywołuje takie zmiany w mikrofilamentach, które ułatwiają endocytozę i inwazję patogenu w głąb komórki oraz niszczy mikrokosmki enterocyta w miejscu inwazji. (187) Białko efektorowe SopB bakterii z rodzaju *Salmonella* wnikając do wnętrza komórki nabłonkowej może hamować apoptozę poprzez aktywację kinazy białkowej Akt. (188)

Enteropatogenne szczepy *E. coli* (EPEC) również wywołują zniszczenie apikalnych struktur enterocyta oraz reorganizację cytoszkieletu za pomocą systemu III typu sekrecji białek bakteryjnych. Do uzyskania efektu wirulencji niezbędny jest ścisły kontakt bakterii z enterocytem. Adherencje bakterii do komórki enterocyta umożliwiają pili na powierzchni bakterii, następnie poprzez aparat sekrecyjny bakteria wprowadza receptor Tir do błony komórki eukariotycznej. Fosforylacja receptora oraz następująca kaskada wewnątrzkomórkowa sygnału doprowadza do uformowania tzw. piedestału złożonego z włókien aktynowych, utrwalającego ścisły kontakt patogenu. Enteropatogenne szczepy *E. coli*

są zdolne wywołać apoptozę komórek nabłonkowych *in vitro*. (189) Enteropatogenna *Escherichia coli* wywołuje biegunkę u dzieci, niszcząc nabłonek jelit. EPEC wpływa zarówno na drogę pro-zapalną jak i anty-zapalną. Enteropatogenne szczepy *E. coli* mogą hamować proces apoptozy, ale także mają zdolność do jej aktywowania, mogą więc manipulować tym procesem. Choć białko EspF wywołuje apoptozę lub nekrozę komórek nabłonkowych jelita cienkiego, bakteria produkuje także białka, które poprzez stymulację receptora czynnika wzrostu EGFR może aktywować antyapoptotyczną drogę przekazania sygnału z udziałem kinazy białkowej Akt. (190) Toksyną mogącą wpływać negatywnie na organizm gospodarza jest CNF1 (czynnik nekrotyzujący 1) pochodzący ze szczepów bakterii *E. coli*, także tych komensalnych. Białko to po związaniu receptora lamininy na powierzchni komórki nabłonkowej ulega endocytozie, a w cytoplazmie komórki oddziałuje z GTPazą białka Rho, należącego do rodziny białek Ras sterującej wieloma funkcjami komórki, jak reorganizacja cytoszkieletu do F-aktyny, utworzenie włókien naprężeniowych, a także wzrost aktywności makropinocytarnej ułatwiających inwazję bakterii oraz promujących metastazę komórki. (191) Czynnik CNF1 może aktywować antyapoptotyczną drogę przekazywania sygnału będącą pod kontrolą czynnika NFκB pomimo działania czynnika inicjującego apoptozę, jakim jest TNF. Toksyna *E. coli* może także wpływać na proces apoptozy związanej z mitochondrium poprzez wzrost ekspresji antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2. Zahamowanie procesu apoptozy oraz zatrzymanie podziału komórki w fazie G1 sprzyja patogenowi i przyczynia się do nagromadzenia uszkodzeń w DNA komórki gospodarza i promocji procesu nowotworzenia. (192) W przypadku *E. coli* wywołującej krwotoczne zapalenie jelit (EHEC) białko EspE (inaczej Tir) ułożone w komórce eukariotycznej za pomocą aparatu III typu sekrecji wywołuje aktywację lekkiego łańcucha miozyny oraz kinazy białkowej C, wywołuje także apoptozę poprzez uwolnienie cytochromu c i dezaktywację enzymu PARP naprawiającego uszkodzenia w DNA. Infekcja EHEC niszczy także połączenia międzykomórkowe, zwiększając przepuszczalność tkanki i ułatwiając dalszą inwazję patogenu. (193)

Bakterie z rodzaju *Yersinia* indukują apoptozę poprzez zahamowanie antyapoptotycznej drogi regulowanej przez czynnik transkrypcyjny NFκB. (194) Białko listeriolizyny O w początkowych fazach listeriozy wywołuje wzmożoną apoptozę hepatocytów, co z kolei korzystne jest dla organizmu, gdyż przyciąga neutrofile w miejsce inwazji i pomaga w niszczeniu bakterii. (195) Szereg białek i toksyn wydzielanych przez bakterie jak egzotoksyna A bakterii *Pseudomonas*, toksyna cholery, czy dyfterytu może zniszczyć komórki gospodarza na drodze apoptotycznej. (196) Śmierć zakażonej komórki na

drodze apoptozy pozwala na szybkie pozbycie się zakażonej komórki i lizę bakterii, bez generacji procesu zapalnego, co jest korzystne dla organizmu gospodarza. Bakterie takie mogą sterować procesem programowanej śmierci komórek eukariotycznych poprzez superantygeny bakteryjne, toksyny, lipopolisacharydy, sekrecje inhibitorów syntezy białka lub białka tworzące pory w błonie komórek. W niektórych przypadkach apoptoza komórek wywołana przez bakterie sprzyja patogenowi, przykładowo apoptoza makrofagów broniących organizm przed dalszą inwazją ułatwia wnikanie bakterii w głąb tkanek, a także do krwioobiegu gospodarza.

Bakterie manipulują sygnałami przekazywanymi wewnątrz komórki, mogą wpływać na ekspresję genów w komórce gospodarza i modyfikować fizjologię komórki. Obecność niektórych patogennych bakterii i ich częsty kontakt z tkanką gospodarza sprzyja powstawaniu przewlekłego procesu zapalnego, co wiąże się z wzmożoną aktywacją czynnika transkrypcyjnego NFκB, wzmożonym wydzielaniem cytokin prozapalnych oraz nadekspresją genu cykloksygenazy 2. Przewlekły stan zapalny w tkance wywołany przez bakterie może zaburzać spontaniczny proces apoptozy komórek nabłonkowych i układu immunologicznego, a w konsekwencji przyczynić się do procesu nowotworzenia. Dobrze zbadanym przykładem powyższej tezy jest wpływ bakterii *Helicobacter pylori* na śluzówkę żołądka. Chroniczna infekcja *H. pylori* wzmacnia produkcję i wydzielanie wolnych rodników przez komórki nabłonkowe, co prowadzi do mutacji i pogłębienia efektu kancerogennego. W przebiegu przewlekłych infekcji wywołanych niektórymi szczepami bakterii komórki eukariotyczne pozostają pod wpływem wielu toksyn bakteryjnych, które oddziałują na szlaki przekazywania sygnału w komórkach eukariotycznych lub też na genom gospodarza. Niektóre toksyny bakteryjne jak CagA będąca produktem genów w obszarze decydującym o patogenności bakterii *H. pylori*, bezpośrednio wpływa na cytoszkielet komórki, molekuly adhezyjne, podział komórki oraz zahamowanie procesu apoptozy i sprzyja metastazie komórek nabłonkowych jamy żołądka. (197) W przeciwieństwie do molekuly CagA toksyna wakualizująca *H. pylori* (VacA) wpływa na uwolnienie cytochromu c z mitochondrium oraz działa proapoptotycznie na komórki eukariotyczne. (198) Zdolność bakterii do sterowania i manipulowania procesem zapalnym i apoptozą ułatwia inwazję patogenu i zwiększa szanse na przeżycie i rozprzestrzenianie wewnątrz organizmu gospodarza. In vitro *H. pylori* wywołuje apoptozę komórek, jednakże dane pochodzące z badań in vivo sugerują zahamowanie apoptozy w przebiegu chronicznej infekcji przyczyniającej się do rozwoju nowotworu żołądka. Stopień, w jaki apoptoza jest wywołana lub zatrzymana przez *H. pylori* może zależeć

od szczepu bakterii i produkowanych białek, a także od profilu cytokin wydzielanych przez tkankę w stanie zapalnym. (199)

I.14. Rola receptorów TLR w utrzymaniu homeostazy w tkance

W procesie apoptozy wywołanej przez bakterie dużą rolę odgrywają receptory TLR. Są to receptory transbłonowe o konserwatywnej budowie zlokalizowane głównie na komórkach układu immunologicznego i komórkach nabłonkowych. Główną ich funkcją jest rozpoznanie patogenu i przekazanie sygnału decydującego o zapaleniu. (200) Różne receptory TLR mogą rozpoznać różne komponenty bakterii, jak lipopolisacharyd, peptydoglikan, kwasy nukleinowe patogenu lub białka flagellinę. Gram-ujemne bakterie dodatkowo mogą oddziaływać z receptorami Toll, czy NOD poprzez lipopolisacharyd LPS, a Gram-dodatnie poprzez kwasy lipoteichojoyowe. (201, 202) Receptory TLR umożliwiają rozpoznanie konkretnych patogenów dając możliwość stymulacji odpowiedniego sygnału o zapaleniu lub apoptozie. U ludzi zidentyfikowano około 10 różnych typów receptora Toll rozpoznających różne komponenty patogenów. (203) Sygnał przekazany przez receptory TLR włącza pro-zapalny program z udziałem czynnika NFκB, kinaz MAP prowadzący do nadekspresji cytokin, chemokin oraz molekuł adhezyjnych, co związane jest z zahamowaniem apoptozy i prolongacją sygnału przeżycia. Sygnał od niektórych typów receptora TLR4 i TLR2 może jednak prowadzić do aktywacji procesu apoptozy przy jednoczesnej inhibicji czynnika NFκB. (204) W przypadku niektórych patogenów takich, jak bakterie z rodzaju *Yersinia* wywołujących apoptozę makrofagów, aktywacja receptora TLR 4 przy równoczesnym zahamowaniu kinazy inhibitora IκB przez białko Yop prowadzi do apoptozy komórki. (205) Rozpoznanie patogenu przez receptor TLR pobudza drogę aktywacji sygnału o apoptozie poprzez białko MyD88 będące molekułą adaptorową receptora angażującą białko FADD uczestniczące w aktywacji kaspazy-8. (206) Brak stymulacji konkretnych receptorów Toll na przykład rozpoznających białko flagellinę w przypadku inwazji bakterii *Salmonelli* z mutacją tego genu nie uruchamia sygnału pozapalnego, lecz programowaną śmierć enterocytów. Jest to kolejny przykład sposobu manipulacji programowaną śmiercią komórki przez patogeny, ale także sposób obrony organizmu przed patogenami poprzez usuwanie zakażonych komórek. Mutacje w budowie białka receptora Toll mogą zmieniać jego funkcjonowanie i wykrywanie patogenów, co usposabia do wielu chorób charakteryzującym się przewlekłym stanem zapalnym. Wykryto, iż myszy z delecją genu TLR5 wykrywającego bakteryjną flagellinę chorują na chroniczne zapalenie okrężnicy. (207) Niewłaściwa odpowiedź na

antygeny bakterii komensalnych przy udziale receptorów Toll jest jedną z głównych przyczyn choroby Crohna. (208) Receptory TLR5 rozpoznające flagellinę znajdującą się w części bazalnej komórek nabłonkowych jelit, lecz przy zaburzeniach prowadzących do wzrostu przepuszczalności nabłonka może dojść do kontaktu flagelliny bakterii komensalnych, czego rezultatem będzie chroniczny stan zapalny. (209) Receptory Toll pełnią funkcje utrzymania homeostazy w tkance poprzez regulację odpowiedzi immunologicznej na patogeny i florę komensalną. Zaburzenia w funkcjonowaniu receptorów Toll mogą więc wpływać na ilość i skład jelitowej flory komensalnej. Zdrowe noworodki rodzą się z jałową skórą i śluzówkami. Podczas normalnego porodu i w kilka dni po urodzeniu dochodzi do kolonizacji tkanki nabłonkowej przez bakterie i grzyby bytujące w środowisku. Receptory Toll pełnią główną rolę w adaptacji śluzówki do nowych warunków środowiska oraz właściwej odpowiedzi na florę komensalną. (210)

I.15. Wpływ bakterii komensalnych na funkcjonowanie nabłonka

W jelitach dorosłego człowieka rezyduje około 400 różnych gatunków bakterii komensalnych. Podczas życia organizmu skład i ilość flory komensalnej mogą ulec zmianie zależnie od wieku, diety, przebytych chorób czy stosowanych leków. (211) Przykładowo flora jelitowa niemowląt karmionych piersią zdominowana jest głównie przez *Bifidobacterium* spp., natomiast we florze dzieci karmionych sztucznym pokarmem dominuje flora mieszana zawierająca również bakterie tlenowe. Związane jest to z brakiem w preparatach z mleka krowiego N-acetyloglukozaminy – substratu dla *Bifidobacterium*. (212) Bakterie adherujące do nabłonka tworzą swoistą sieć zależności pomiędzy sobą i komórkami tkanek, do których przylegają. Mikroorganizmy komensalne są głównymi modulatorami układu immunologicznego związanego ze śluzówką MALT (Mucous Associated Lymphoid Tissue). Wpływ flory komensalnej na układ immunologiczny rozpoczyna się już w pierwszych tygodniach po urodzeniu i jest szczególnie istotny dla prawidłowego rozpoznania i funkcjonowania mikroflory. Ten proces odbywa się głównie przy udziale receptorów Toll na komórkach nabłonkowych oraz immunologicznych będących w ścisłym kontakcie z florą bakteryjną. Ostatnie doniesienia badające rolę receptorów Toll w kontekście interakcji z mikroorganizmami komensalnymi wyznaczają nową rolę dla tych receptorów jako niezbędnych do utrzymania homeostazy i zapobieganiu uszkodzeń tkanki. Probiotyczny szczep *L. casei* CRL431 oddziałuje z TLR2 i wpływa na zwiększone wydzielanie Interleukiny-6 w komórkach nabłonkowych *in vitro*. (213) Wykazano także wpływ szeregu

innych szczepów z rodzaju *Lactobacillus*, jak *L. rhamnosus* oraz *L. plantarum* jako induktorów wydzielania TNF α oraz Il-6 przez monocyty obwodowe w krwi. W wyniku szeregu badań nad wpływem bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na efekt anty-nowotworowy stwierdzono immunomodulację i wzmocnienie aktywności komórek NK i komórek T głównie w przypadku podania *L. casei*. (214) Komórki nabłonkowe są ścisłym kontakcie z bakteriami komensalnymi i pełnią ważną rolę w odpowiedzi układu odpornościowego na antygeny komensali, poprzez wydzielanie chemokin i cytokin dla komórek immunologicznych. Bakterie probiotyczne mogą działać jak adjuwanty wzmacniając odpowiedź na antygeny bakteryjne. Przykładem może być wzrost stężenia immunoglobuliny A wydzielanej lokalnie po zastosowaniu *L. casei* CRL431, a także zwiększenie ilości komórek produkujących tę immunoglobulinę w odległych tkankach jak komórki płuc, czy gruczoł piersiowy. (215)

Flora komensalna jest szczególnie obfita w układzie pokarmowym ssaków. Skład i ilość ludzkiej flory układu pokarmowego zmienia się w zależności od narządów. W kwaśnym środowisku żołądka żyją tylko mikroorganizmy znoszące takie warunki, jak na przykład bakterie z rodzaju *Lactobacillus* - ich liczba sięga maksymalnie 10^3 /ml/g. W jelicie cienkim i okrężnicy liczba może osiągnąć około 10^{11} mikroorganizmów przypadających na gram tkanki jelitowej. Natomiast w 1 gramie flory pochwowej dorosłej kobiety stwierdzono 10^7 bakterii. (216) Tak duża ilość bakterii i grzybów w zdrowym organizmie nie stanowi zagrożenia dla gospodarza, ale tworzy wręcz ochronny biofilm, który wspomaga homeostazę narządów, będąc w ścisłym kontakcie z tkanką nabłonkową i komórkami układu immunologicznego. Bakterie komensalne oddziałują nie tylko na układ odpornościowy gospodarza, ale także wpływają na skład i oddziaływanie flory patogennej na tkankę nabłonkową gospodarza. W zdrowej tkance komensale pozostają w kontakcie z apikalną częścią komórek nabłonka. Penetracja zdrowej tkanki nabłonkowej i kontakt z błoną podstawną przez mikroorganizmy patogenne jest więc utrudniona dzięki ciągłości bariery nieprzepuszczalnej, jaką stanowi nabłonek. Międzykomórkowe połączenia komórek nabłonkowych, takie jak połączenia zamykające decydują o nieprzepuszczalnej strukturze nabłonka. W przypadku zmian w strukturze połączeń międzykomórkowych i wzrostu przepuszczalności tej swoistej bariery może dojść do wyzwolenia odpowiedzi zapalnej nie tylko na patogeny, ale także na bakterie komensalne. To zjawisko obserwowane jest w wielu stanach zapalnych, a także w śluzówce małych dzieci, gdzie często dochodzi do niewłaściwej odpowiedzi na antygeny z pożywienia i bakterie. (217)

I.16. Wpływ szczepów probiotycznych na funkcjonowanie organizmów

Zdrowy organizm pozostający w kontakcie z komensalną florą utrzymuje w jelitach „fizjologiczny stan zapalny”, co pozwala kontrolować florę jelitową, a także patogenną. Od momentu odkrycia, jak istotna jest flora komensalna dla organizmu próbuje się stosować komensalne szczepy grzybów i bakterii w celach terapeutycznych i profilaktycznych jako probiotyki. Jednakże niektóre gatunki komensali już od dawna służyły człowiekowi, głównie ze względu na ich właściwości fermentacyjne, jak opisane przez Mietchnikowa bakterie kwasu mlekowego, które jak uważał noblista zapewniają zdrowie i długowieczność. (218)

Pierwsza definicja dotycząca probiotyków pochodzi z 1965, od naukowców Lilly i Stillwell, którzy określili probiotyki jako żywe mikroorganizmy, które po spożyciu regulują florę mikrobiologiczną z korzyścią dla gospodarza. Ostateczna definicja została sformułowana przez Światową Organizację Zdrowia i Organizację Narodów Zjednoczonych, ds. Wyżywienia i Rolnictwa FAO/WHO i określa probiotyki jako żywe mikroorganizmy, które spożyte w odpowiedniej dawce wywierają korzystny wpływ na organizm gospodarza. Niektórzy naukowcy sugerują, iż definicja probiotyków powinna opierać się głównie na ich właściwościach immunomodulacyjnych i wzmacniających barierę, jaką stanowi nabłonek. Podstawowe kryteria, jakie musi spełniać dobry probiotyk to oporność na kwasy żółciowe i żołądkowe oraz aktywność hydrolazy w solach kwasów żółciowych. Szczep probiotyczny powinien wykazywać dobrą adherencję do nabłonka, a także powinien obniżać zdolność adherencji patogenów. Dodatkowym kryterium w doborze probiotyków może być oddziaływanie na układ odpornościowy, co wiąże się z profilaktyką infekcji oraz chorób nowotworowych. (219) Współzawodniczenie o niszę ekologiczną oraz o składniki odżywcze z organizmami patogennymi, a także produkcja bacteriocyn – małych peptydów o właściwościach bakteriobójczych wydzielanych przez bakterie *Lactobacillus*, to kolejne kryteria doboru probiotyków. Zwiększenie kwasowości środowiska, czy produkcja nadtlenu wodoru również mogą stanowić korzystną cechę szczepu w zależności od pożądanego efektu terapeutycznego. (220) Najczęściej stosowanymi probiotykami są bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, a także drożdże *Saccharomyces boulardii*. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* są względnie beztlenowcami, rosnącymi na złożonych podłożach zawierającymi cukry, z których wytwarzają kwas mlekowy w przebiegu homofermentacji lub octan i mrówczan na drodze heterofermentacji. (221)

Istnieje szereg zbadanych i dobrze udokumentowanych pozytywnych wpływów probiotyków na organizm gospodarza. Niektóre szczepy probiotyczne mają działanie

profilaktyczne dla wielu chorób - głównie układu pokarmowego, a nawet wspomagające leczenie stanów patologicznych. Jednym z przykładów może być wpływ szczepu *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) na czas trwania biegunki rotawirusowej u dzieci, będącej najczęstszą przyczyną odwodnienia u małych dzieci. Podawanie szczepu LGG skraca czas trwania biegunki średnio o 1-2 dni. Podczas infekcji rotawirusowej dochodzi do zniszczenia apikalnej części nabłonka i utraty mikrovilli, a w konsekwencji do wzrostu przepuszczalności nabłonka. O szybszym wyzdrowieniu może decydować fakt znaczącego wzrostu stężenia Immunoglobuliny A przeciwko wirusowi po podaniu szczepu LGG lub też antyapoptotyczne oraz protekcyjne dla komórek właściwości tego szczepu dobrze adherującego do enterocytów. (222, 223) Szczepy probiotyczne mogą także zapobiegać biegunkom spowodowanym przez długotrwałe leczenie antybiotykami i ekspansją *Clostridium difficile*. Takie działanie udowodniono w przypadku podawania szczepu LGG oraz drożdży *Saccharomyces boulardii* podczas stosowania antybiotykoterapii. (224, 225) W zapobieganiu tzw. biegunki podróżnych wywołanych głównie przez lokalne szczepy *E. coli* udowodniony efekt wykazano również w przypadku podania LGG. (226) Wzmocnienie bariery nabłonka przez adherencję LGG może także pomóc w zapobieganiu rozwoju alergii pokarmowej u dzieci. (227) Korzystnym efektem wywieranym przez bakterie kwasu mlekowego jest wspomaganie tolerancji laktozy u osób cierpiących na brak β -galaktozydazy w układzie pokarmowym, który objawia się bolesciami i biegunką. Spożycie fermentowanych produktów mlecznych łagodzi te objawy, dzięki częściowej hydrolizie laktozy podczas procesu fermentacji przez bakterie kwasu mlekowego. (228) Szczep *L. acidophilus* NCFB 1748 skraca czas trwania biegunki u osób po radioterapii, która w znaczący sposób niszczy nabłonek jelit, zaburzając komensalną florę jelitową i wywołując przewlekły stan zapalny. (229) Antybakteryjne działanie szczepów probiotycznych potwierdzono w przypadku działania szczepu *Lactobacillus acidophilus* (LA1), który *in vitro* hamuje wzrost *Helicobacter pylori*, wywołującego zapalenie śluzówki żołądka. (230)

Jednym ze sposobów antybakteryjnego działania *Lactobacillus* są bakteriocyny, które zostały zdefiniowane przez Jacoba w 1953 jako białkowe antybiotyki produkowane przez określone szczepy bakterii i działające na ten sam lub zbliżony gatunek mikroorganizmu poprzez wiązanie do receptora. Bakteriocyny produkowane przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* dzieli się na trzy klasy: tzw. lantibiotyki, małe peptydy oraz duże proteiny temperaturo-wrażliwe. Spośród lantibiotyków na uwagę zasługuje nizyna - białko wykazujące szerokie spektrum bakteriobójcze, głównie w przypadku bakterii Gram-

-dodatnich. Działanie tego białka polega na utworzeniu porów w błonie komórkowej bakterii, które powodują zaburzenie w równowadze osmotycznej komórki i jej lizę. Szczepy bakterii wytwarzające tę bakteriocynę są najczęściej odporne na działanie tego białka dzięki umiejętności blokowania aktywności niszyny. Produkcja danej bakteriocyny może być indukowana lub wzmacniana w obecności szczepu wrażliwego na dane białko, co zwiększa szanse przeżyciowe szczepu produkującego. (231) Bakterie kwasu mlekowego mogą także hamować adhezję innych bakterii do nabłonka konkurując z nimi o nisze ekologiczną. *Lactobacillus* wydzielają substancje blokujące innym bakteriom adhezję do nabłonka, są to głównie składniki ściany komórkowej o dużej masie cząsteczkowej, w skład których wchodzi galaktoza, glukoza, N-acetyloglukozamina. Ich działanie polega na blokowaniu glikoprotein mucyny, zapobiegając wiązaniu innych bakterii do śluzówki. Zaobserwowano, iż szczep *L. fermentum* wydziela komponent redukujący adhezję *E. coli* o 50%. (232) Mucyna jest glikoproteina o wysokiej masie cząsteczkowej produkowaną przez komórki nabłonkowe wielu narządów, w tym także śluzówki jelita. Budowa mucyny charakteryzuje się dużą ilością wiązań O-glikozylowych pomiędzy seryną, treoniną a N-acetyloglukozaminą. Śluz, w skład którego wchodzi mucyna tworzy ochronną warstwę na powierzchni enterocytów i utrudnia dostęp do miejsc wiązania dla bakterii patogennych. Spośród wielu typów mucyny produkty genów MUC2 i MUC3 są najczęściej wydzielane przez komórki jelit. W wielu doświadczeniach *in vitro* wykazano, iż inkubacja komórek linii jelitowych jak HT-29 oraz CaCo-2 ze szczepami probiotycznymi *L. plantarum* oraz LGG wzmacniała ekspresję genów MUC2 i MUC3 istotnie zmniejszając adhezję EPEC do komórek. (233, 234)

I.17. Antynowotworowe działanie szczepów probiotycznych

Przeprowadzono szereg eksperymentów dotyczących przeciw-nowotworowego działania probiotyków u zwierząt i ludzi. Głównym działaniem antynowotworowym, które można przypisać probiotykom jest obniżenie ilości enzymów prokancerogennych wydzielanych przez bakterie jelitowe. Doustna suplementacja żywych bakterii *L. acidophilus* u ludzi i szczurów znacznie obniżyła stężenie kancerogennych substancji poprzez redukcję aktywności β -glukuronidazy, azoreduktazy i nitroreduktazy w jelicie. Enzymy takie jak β -glukuronidaza, 7-dehydroksylaza obecne są głównie w bakteriach z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz *Clostridium*. Bakterie kwasu mlekowego hamują aktywność tych enzymów. Podobne badania na ochotnikach w Japonii obniżyły ilość mutagennych czynników w kale po podaniu bakterii

L. casei. (235, 236). Bakterie kwasu mlekowego mogą związać heterocykliczne aminy powstające po spożyciu gotowanego mięsa będące potencjalnymi mutagenami dla komórek jelitowych. (237) Większość pozytywnych efektów po podaniu probiotyku dotyczyła żywego szczepu mikroorganizmu, a podanie bakterii inaktywowanych ciepłem nie przyniosło rezultatów.

Rak jelita grubego jest jednym z częściej występujących rodzajów choroby nowotworowej w krajach zachodnich. Czynniki ryzyka w przypadku tej choroby są zarówno genetyczne jak i środowiskowe. Niektóre badania epidemiologiczne z lat 70 ubiegłego stulecia dowodzą istotne obniżenie częstości występowania raka jelita grubego u osób spożywających jogurty i sfermentowane produkty mleczne. Pozytywne wyniki badań dotyczących antykancerogenego działania probiotyków wykazano głównie w przypadku działania na zwierzęta laboratoryjne. Podawanie szczepów *L. acidophilus* i *L. rhamnosus* GG znacząco redukuje występowanie chemicznie indukowanych nowotworów jelit u szczurów. W laboratoryjnym modelu raka kolonocytów szczurzych wywołanym przez substancje mutagenne jak 1,2- dimetylohydrazyna szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, a także ich metabolity jak wolne kwasy tłuszczowe obniżają ryzyko rozwoju raka. (238, 239) Badania na pacjentach wśród których stwierdzono raka jelita grubego lub polipy okrężnicy dowodzą, iż stosowanie synbiotyków złożonych ze szczepu *L. rhamnosus* LGG, *Bifidobacterium lactis* Bb12 oraz inuliny mogą mieć znaczenie profilaktyczne. Stosowanie synbiotyków zmniejszyło poziom uszkodzeń DNA w śluzowce oraz tempo podziałów komórek w polipach chorych pacjentów. (240) Spośród krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych na uwagę zasługuje maślan, który jest źródłem węgla dla normalnych kolonocytów oraz podnosi aktywność transferazy glutationowej w komórkach - głównego enzymu detoksyfikacyjnego. W testach *in vitro* maślan blokuje apoptozę normalnych kolonocytów, natomiast wywołuje proces różnicowania i hamuje proliferację komórek linii nowotworowych. *In vivo* wzrost stężenia maślanu hamuje rozwój guza wywołanego eksperymentalnie. (241, 242)

I.18. Rola szczepów *Lactobacillus* produkujących nadtlenek wodoru w utrzymaniu homeostazy tkanki

W obecności tlenu niektóre gatunki z rodzaju *Lactobacillus* są zdolne wytwarzać nadtlenek wodoru przy udziale enzymów oksydazy oraz dysmutazy ponadtlenkowej. W przypadku braku enzymów rozkładających ten związek jak katalaza i pseudokatalaza, nadtlenek wodoru może zostać skumulowany i wykazywać właściwości bójcze wobec innych bakterii. Powstawanie nadtlenu wodoru oraz wolnych rodników tlenowych jest podstawowym mechanizmem bójczym neutrofilli oraz monocytów przeciwko patogenom oraz komórkom nowotworowym. Oksydaza

NADPH zasocjowana z błoną jest aktywna w granulocytach i komórkach transformowanych nowotworowo. Aktywność oksydazy generuje powstanie anionorodnika ponadtlenkowego, który spontanicznie dysmutuje do nadtlenu wodoru. Nagromadzony nadtlenek wodoru może wywoływać apoptozę komórek zarówno normalnych jak i nowotworowych. Natomiast selektywną apoptozę komórek transformowanych może wywołać rodnik hydroksylowy, który powstaje w reakcji podchlorynu i anionorodnika ponadtlenkowego. Źródłem podchlorynu może być nadtlenek wodoru, który reaguje z anionem chloru, reakcję tę katalizuje peroksydaza eozynofilli lub laktoperoksydaza. Zgodnie z hipotezą zaproponowaną przez G. Bauera i współpracowników obecność oksydazy NADPH wyłącznie w komórkach transformowanych, umożliwia selektywną apoptozę komórek transformowanych przy udziale nadtlenu wodoru wyprodukowanego przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Obecność aktywnej peroksydazy oraz szczepy *Lactobacillus* produkujące nadtlenek wodoru stwierdzono w wydzielinie pochwowej, co może stanowić o istotnym wpływie tych bakterii na utrzymanie homeostazy nabłonka i eliminacji komórek wadliwych. (243, 244, 245, 246) W przewlekłych stanach zapalnych pochwy spada ilość bakterii *Lactobacillus* produkujących nadtlenek wodoru, a zaczyna dominować flora beztlenowa. Produkty hodowli szczepów *Lactobacillus* wytwarzających nadtlenek wodoru działają hamująco na wzrost wielu patogenów występujących w stanach zapalnych pochwy jak *S. agalactiae*, *G. vaginalis* czy *C. albicans*. (247,248)

I.19. Wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na apoptozę komórek

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* są istotnym komponentem flory komensalnej wpływającej korzystnie na organizm gospodarza poprzez produkcję substancji antybakteryjnych, modulację układu immunologicznego, wzmacnianie bariery nabłonka. Istotnym zagadnieniem jest wpływ szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na homeostazę nabłonka w tym na apoptozę, proliferację i różnicowanie komórek. Badania ostatnich lat koncentrują się na zagadnieniu regulacji homeostazy tkanki przez szczepy probiotyczne oddziałujące z tkanką nabłonkową gospodarza oraz z komórkami układu immunologicznego.

Choroby zapalne jelit wywołane są głównie przez nieprawidłową stymulację układu odpornościowego przez florę komensalną. Próba regulacji czynności komórek T, które pośredniczą w odpowiedzi immunologicznej przez manipulację składem jakościowym i ilościowym flory może pomóc w wygaszeniu przewlekłego stanu zapalnego. Przykładem może być antyproliferacyjny efekt *L. paracasei* na limfocyty T CD4+. (249) Podobny efekt wykazuje probiotyczny szczep

E. coli Nissle 1917, który hamując wzrost limfocytów izolowanych z krwi oraz śluzówki jelit doprowadza do obniżenia syntezy $\text{INF}\gamma$. (250)

Równie istotnym aspektem działania probiotyków jest ich wpływ na apoptozę komórek nabłonkowych jelit i pochwy, gdzie ich liczba jest największa. Wiele stanów patologicznych jak choroby zapalne jelit są związane ze wzrostem wydzielania cytokin prozapalnych $\text{TNF}\alpha$, czy $\text{INF}\gamma$ sprzyjających wzmożonej apoptozie komórek nabłonkowych prowadzącej do zwiększonej przepuszczalności nabłonka. (251) Badania naukowe ostatniej dekady nad wpływem bakterii probiotycznych na homeostazę tkanek pokazują, iż niektóre szczepy z rodzaju *Lactobacillus* mogą sterować sygnałem apoptotycznym. Szczep *Lactobacillus rhamnosus* LGG zapobiega apoptozie mysich i ludzkich komórek jelita grubego wywołanej przez cytokiny prozapalne. Inkubacja komórek ze szczepem LGG aktywuje wewnątrzkomórkowy sygnał antyapoptotyczny poprzez kinazę Akt oraz hamuje proapoptotyczną p38/MAP kinazę, której aktywacja inicjowana jest działaniem $\text{TNF}\alpha$. (252) Wykazano, iż komponenty bakteryjne mające efekt antyapoptotyczny wydzielane są przez ten szczep, a ich działanie jest dawko-zależne. Wyizolowano dwa białka o masie 75 i 40 kilodaltonów, których działanie polega na hamowaniu apoptozy i pobudzaniu podziałów komórek. (253) Przeciwny, proapoptotyczny efekt wywiera natomiast cytoplazmatyczna frakcja homogenatu bakterii LGG na ludzką linię nowotworową komórek żołądka HGC-27. (254) Inny gatunek z rodzaju *Lactobacillus*, *L. reuteri* również steruje sygnałem apoptotycznym zainicjowanym przez cytokiny. Stwierdzono, iż szczep *L. reuteri* hamuje proliferację komórek poprzez inhibicję działania czynnika $\text{NF}\kappa\beta$ oraz promuje apoptozę w komórkach białaczki pochodzenia mieloidalnego. (255) Końcowy efekt wywierany przez szczepy probiotyczne na sygnał programowanej śmierci komórki zależy nie tylko od danego szczepu bakterii oraz od poszczególnych komponentów komórki bakteryjnej, ale także od rodzaju eukariotycznej komórki docelowej, na którą działa dany probiotyk. Kolejnym aspektem mogącym wpłynąć na proces apoptozy jest produkcja substancji o właściwościach hamujących wzrost i rozmnażanie komórek wydzielanych przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, takie jak nadtlenuk wodoru. Ta substancja wpływająca na komórki eukariotyczne w odpowiednim stężeniu może wywołać apoptozę bądź nekrozę. Oprócz białek i nadtlenuku wodoru mogą istnieć inne substancje wydzielane przez probiotyki wpływające na homeostazę tkanki. Zbadanie wpływu powszechnie stosowanych probiotyków na apoptozę i funkcjonowanie nabłonka może być istotne z punktu widzenia zapobiegania i leczenia wielu stanów patologicznych jak rozwój nowotworu.

II. Cele Pracy

II. CELE PRACY

Celem badań było udzielenie odpowiedzi na pytanie, czy i w jaki sposób bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, stosowane w leczeniu różnych schorzeń wpływają na apoptozę komórek nabłonkowych *in vitro*. Podjęta została próba ustalenia wpływu wybranych szczepów *Lactobacillus* na mechanizmy rządzące interakcją tych bakterii i komórek nabłonkowych.

W tym celu istotna wydaje się odpowiedź na następujące pytania:

1. Czy różne gatunki bakterii z rodzaju *Lactobacillus* hamują, czy pobudzają apoptozę komórek pochodzących z linii komórkowych lub z hodowli pierwotnych kolonocytów?
2. Czy apoptoza komórek wywołana patogenami lub cytokinami wydzielanymi w procesie zapalnym może być hamowana przez gatunki bakterii z rodzaju *Lactobacillus*?
3. Czy różne gatunki bakterii z rodzaju *Lactobacillus* produkujące odpowiednie stężenia nadtlenku wodoru mają wpływ na hamowanie bądź indukcję apoptozy komórek *in vitro*?
4. Jaki jest wpływ różnych gatunków bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na aktywację kaspaz oraz fragmentację DNA?
5. Czy gatunki bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wpływają na białka cytoszkieletu komórek nabłonkowych jelit?

Odpowiedź na powyższe pytania pozwoliła bliżej poznać mechanizmy działania powszechnie stosowanych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na funkcjonowanie nabłonka *in vivo*. Badania były częścią większego projektu dotyczącego działania bakterii z rodzaju *Lactobacillus* prowadzonego w Zakładzie Bakteriologii, Ekologii Drobnoustrojów i Parazytologii Katedry Mikrobiologii CMUJ.

III. Materiały i Metody

III. MATERIAŁY I METODY

III. 1 Linie komórkowe:

Caco-2 - linia nowotworowa wyprowadzona z ludzkich kolonocytów, linia przejawiająca pod względem morfologicznym i enzymatycznym cechy prawidłowych, ludzkich enterocytów. Komórki hodowane były w pożywce DMEM (Biomed) z dodatkiem 2mM L-glutaminy (Sigma) i 10% surowicy (Fetal Calf Serum, Sigma) oraz mieszaniny 1mM aminokwasów (Non-essential amino acids, Sigma) i antybiotyków (Penicylina, Streptomycyna, Neomycyna, Sigma). Pożywka zmieniana była co 2 dni, pasaż przeprowadzany był z użyciem trypsyny- EDTA (Sigma).

HT-29 - linia nowotworowa wyprowadzona z ludzkich kolonocytów. Komórki hodowane były w pożywce DMEM (Biomed) z dodatkiem 2mM L-glutaminy (Sigma) i 10% surowicy (Fetal Calf Serum, Sigma) oraz mieszaniny 1mM aminokwasów (Non-essential amino acids, Sigma) i antybiotyków (Penicylina, Streptomycyna, Neomycyna, Sigma). Pożywka zmieniana była co 2 dni, pasaż przeprowadzany był z użyciem trypsyny- EDTA (Sigma).

HT-29 MTX – komórki linii HT-29 traktowane metotreksatem

A431 – ludzka linia nowotworowa wyizolowana z nabłonka sromu, hodowana w MEM z 10% surowicą i antybiotykami (Penicylina, Streptomycyna, Neomycyna, Sigma). Pożywka zmieniana była co 2 dni, pasaż przeprowadzany był z użyciem trypsyny- EDTA (Sigma).

Linie komórkowe były hodowane w 5% CO₂, 95% wilgotności i w temperaturze 37°C.

III.2 Metody hodowli bakteryjnych:

Szczepy bakterii *Lactobacillus* oraz *Escherichia coli* i z rodzaju *Streptococcus* użyte do eksperymentów pochodziły z kolekcji szczepów zgromadzonych w Zakładzie Bakteriologii Katedry Mikrobiologii CM UJ, były pochodzenia ludzkiego lub mysiego. W badaniach użyto następujących szczepów wzorcowych: *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074, *Lactobacillus gasseri* DSM 20243, *Lactobacillus acidophilus* CNBL 1007, *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Lactobacillus fermentum* DSM 20052, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14431, *Lactobacillus casei* DSM 20021, *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (LGG). Szczepy *Escherichia coli*, *Streptococcus mitis*, *Enterococcus faecalis* wyizolowano od osób chorych na raka jelita grubego.

1. Szczepy przechowywane były w -70°C w podłożu Schaedlera z glicerolem. Rozmrażano wybrany szczep bakterii i wysiewano na odpowiednie podłoże:
 - Blood Agar (Oxoid) - tlenowo - *Streptococcus*
 - McConkey Agar (Oxoid) - tlenowo - *Enterobacteriaceae*
 - MRS Agar (Oxoid) - beztlenowo- *Lactobacillus*
2. Hodowlę prowadzono inkubując płytki przez 24h w warunkach tlenowych, w 37°C oraz w warunkach beztlenowych w komorze MACS - Don Whitley przez 48h, w 37°C .
3. Wybierano jedną kolonię bakteryjną i namnażano w odpowiednich pożywkach płynnych przez 24 godziny, aż do uzyskania pożądanej gęstości 1×10^9 komórek/ml.
4. Hodowlę bakteryjną wirowano, a osad zawieszano w 2 ml PBS, ponownie odwirowano i zawieszano w 1 ml PBS, a następnie zmierzono gęstość optyczną OD i dostosowano objętość PBS dla uzyskania jednolitej gęstości komórek w hodowlach bakteryjnych.
5. W celu sporządzenia supernatantu hodowli bakteryjnych *Lactobacillus* lub *Streptococcus* zawieszano jedną kolonię w podłożu płynnym bulionowym lub MRS, hodowano przez 24 godziny do uzyskania odpowiedniej gęstości, następnie przepłukiwano, a osad zawieszano w 1 ml PBS i inkubowano w warunkach tlenowych przez 4 godziny.
6. Stężenie nadtlenu wodoru sprawdzano przy pomocy pasków testowych (Merckoquant Peroxide Analytical Test Strips, Merk, Germany), po zanurzeniu w supernatancie wynik odczytano po 1 minucie. Hodowle odwirowano, a supernatant przesączano przez filtr o porach $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore, USA) i wykorzystywano do dalszych doświadczeń.
7. Aby sprawdzić działanie martwych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* 24-godzinne hodowle żywych bakterii hodowanych w płynnym MRS poddawano działaniu wysokiej temperatury 85°C przez 4 godziny, następnie przepłukiwano 2-krotnie PBS i odwirowano. Osad

rozpipetowano w PBS, zmierzono gęstość hodowli bakteryjnej i zadawano w odpowiedniej gęstości do hodowli lini komórkowych.

III.3 Izolacja kolonocytów mysich:

Metodę izolacji kolonocytów oparto na publikacji Seidelin JB i współp. dotyczącej izolacji kolonocytów z biopsji. (257) Metoda ta pozwala na minimalizację strat związanych z apoptozą komórki spowodowaną oderwaniem komórki od jej podłoża i komórek sąsiednich.

1. Fragmenty jelita uzyskane z sekcji myszy były przepłukiwane, rozdrobnione w zimnym buforze PBS bez jonów Ca^{2+} oraz Mg^{2+} zawierającego 50 IU/ml penicyliny, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycyny oraz 0,5 mg/ml gentamycyny przez około 20 min.
2. Rozdrobnione fragmenty były przepłukiwane trzykrotnie w buforze z antybiotykami. Następnie próbki poddawane były działaniu mieszaniny chelatującej w skład, której wchodzi 1 mM EDTA oraz 1mM EGTA (Sigma, USA) w buforze PBS bez jonów Ca^{2+} oraz Mg^{2+} w czasie 75 minut, w temperaturze 21°C.
3. Fragmenty jelita przeniesiono do probówki z zimnym PBS z mieszaniną antybiotyków i intensywnie wytrząsano w celu uwolnienia tkanki nabłonkowej z błony podstawnej. Wyjęto resztki tkanki jelitowej, a zawiesinę w której znajdował się nabłonek poddawano wirowaniu przez 2 minuty przy 40g.
4. Osad zawieszano w 12 ml DMEM z 15% surowicą FBS i mieszaniną antybiotyków. Następnie podzielono zawiesinę dodając po 400 μl do dołków płytki 24 dołkowej, której dno pokryte było kollagenem I typu (Cell Coat, Grainer). Hodowla była prowadzona w 5% CO_2 , 95% wilgotności i temperaturze 37°C.
5. Po 2 godzinach od wysiania komórki poddawano eksperymentowi.

III.4 Dobór warunków eksperymentu:

1. W celu wybrania odpowiedniego stężenia bakterii w hodowli komórek eucariotycznych mogącego wywołać apoptozę bądź nekrozę dokonano seryjnych rozcieńczeń hodowli bakteryjnych w PBS lub w DMEM.
2. Badana liczba komórek bakterii przypadającej na 1 komórkę eukariotyczną w kokulturze wynosiła: 10, 50, 100, 200.
3. Testowany czas inkubacji z czynnikiem mającym wywołać apoptozę komórek wynosił: 4, 6, 12 oraz 24 godziny.

4. Komórki inkubowano także z supernatantami hodowli bakteryjnych lub z chemicznie czystym nadtlenkiem wodoru (POCh) oraz z supernatantem wraz z 0,3% katalazą (Sigma, USA) i nadtlenkiem wodoru wraz z katalazą.
5. Kontrolę pozytywną stanowiła staurosporyna (Sigma, USA) w stężeniu 1 uM będąca inhibitorem kinaz białkowych i dobrze znanym czynnikiem proapoptocycznym.
6. Eksperymenty wykonano w dwóch (n=2) lub trzech powtórzeniach (n=3).

III.5 Metody badania apoptozy:

III.5.1 Wykrywanie aktywnych kaspaz w komórce

Wykrycie aktywnych kaspaz pozwala na określenie stopnia zaawansowania procesu samobójczej śmierci komórki, bowiem w miarę postępu procesu apoptozy wzrasta ilość aktywnych kaspaz w komórce. W celu wykrycia stopnia zaawansowania procesu użyto zestawu ApoFluor®Green Apoptosis Detection Kit (ICN Biomedicals Inc.), w skład którego wchodzi peptydowy inhibitor kaspaz sprzężony z karboksylfluoresceiną FAM-VAD-FMK. Po wnikięciu inhibitora do komórek wiąże się on kowalencyjnie z aktywnymi kaspazami. Niezwiązany inhibitor ulega wypłukaniu z komórki. FAM-VAD-FMK wiąże się z wieloma kaspazami (pan-kaspazy: -1,-3,-4,-5,-6,-7,-8,-9). Optymalna długość fali potrzebnej do wzbudzenia karboksylfluoresceiny FAM-VAD-FMK wynosi 488-492 nm, a emisja następuje w zakresie 515-535nm. Komórki w bardziej zaawansowanym stadium apoptozy świeciły mocniej na zielono niż komórki we wczesnym stadium apoptozy. Dla odróżnienia komórek martwych, nekrotycznych lub z uszkodzoną błoną komórkową w późnej fazie apoptozy użyto jodku propidyny o stężeniu 250 ug/ml. Wzbudzenie tej substancji następuje przy 488-493 nm, a maksimum emisji następuje przy 635 nm długości fali.

1. Komórki określonej linii komórkowej rosnące na dnie butelki (Corning, USA) o powierzchni 25cm², przepłukiwano PBS bez wapnia i magnezu, poddawano trypsynizacji (Trypsin-EDTA, Sigma, USA) i zwirowano, zlewano supernatant.
2. Komórki policzono i wysiewano na płytkę 12 – dołkową w odpowiedniej ilości pozwalającej na osiągnięcie pożądanej gęstości 1x10⁶ komórek/ próbkę.
3. Po 24 godzinach od pasażu komórki przepłukiwano PBS bez jonów Ca, Mg. Do dołków dodawano odpowiedni czynnik wywołujący, bądź hamujący apoptozę lub nekrozę zawieszony w PBS. Jako kontrolę negatywną używano pożywki DMEM z 10% surowicą FBS. Kontrolę pozytywną stanowiła staurosporyna (Sigma, USA) w stężeniu 1 uM.

4. Komórki inkubowano z zadaniem czynnikiem przez określony czas od 4 do 24 godzin w warunkach tlenowych, w 5% CO₂. Po określonym czasie zlewano pożywkę z pływającymi komórkami do sterylnych probówek typu eppendorf, a pozostałe komórki poddawano trypsynizacji. Całość przepłukiwano w PBS, wirowano i zawieszano w 300 ul pożywki DMEM. Następnie dodawano po 10 ul 30x rozcieńczonego roztworu ApoFluor®Green.
5. Zawiesinę komórek inkubowano przez 1 godzinę, w ciemnościach, w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂, co jakiś czas mieszając.
6. Po godzinie dodawano buforu płuczającego, wirowano przy 400g przez 5 minut, wylewano supernatant i zawieszano w buforze płuczającym, czynność powtarzano trzykrotnie. Ostatecznie komórki zawieszano w 400 ul buforu i trzymano na lodzie.
7. Próbkę badaną barwiono 2ul jodku propidyny o wyjściowym stężeniu 250 ug/ml.
8. W celu ustawienia wartości kompensacji cytometru i statystyki w kwadrantach przygotowano następujące próbki kalibrujące:
 - komórki niebarwione indukowane 1 uM staurosporiny i nieindukowane hodowane w DMEM z 10% surowicą FBS,
 - komórki barwione tylko ApoFluor®Green - indukowane i nieindukowane,
 - komórki barwione tylko jodkiem propidyny - indukowane i nieindukowane,
 - komórki barwione ApoFluor®Green oraz jodkiem propidyny indukowane i nieindukowane.
9. Analizę przeprowadzono przy użyciu cytometru przepływowego FACS Calibur (Becton-Dickinson) badając zadaną liczbę 10000 komórek dla danego pomiaru.

III.5.2 Wizualizacja aktywnych kaspaz w komórce przy zastosowaniu mikroskopu Olympus

1. Komórki określonej linii komórkowej HT-29 oraz HT29 MTX, przepłukiwano PBS bez wapnia i magnezu, poddawano trypsynizacji (Trypsin-EDTA, Sigma) i wirowano, zlewano supernatant. Komórki policzono i wysiewano na płytkę 12 – dołkową w odpowiedniej gęstości.
2. Po 24 godzinach od pasażu komórki przepłukiwano PBS bez jonów Ca, Mg. Do dołków dodawano odpowiedni czynnik wywołujący, bądź hamujący apoptozę lub nekrozę. Jako kontrolę negatywną używano pożywki DMEM z 10% surowicą FBS. Kontrolę pozytywną stanowiła staurosporyna w stężeniu 1 μ M.
3. Komórki inkubowano z zadany czynnikiem przez określony czas od 4 do 24 godzin. Po określonym czasie zlewano pożywkę z pływającymi komórkami do sterylnych probówek typu eppendorf, a pozostałe komórki poddawano trypsynizacji.
4. Całość przepłukiwano PBS, wirowano i zawieszano w 300 μ l pożywki DMEM. Następnie dodawano 10 μ l 30x rozcieńczonego roztworu ApoFluor®Green (ICN Biomedicals Inc.). Zawiesinę komórek inkubowano przez 1 godzinę, w ciemnościach, w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂, co jakiś czas mieszając.
5. Po godzinie dodawano buforu płuczącego, wirowano przy 400g przez 5 minut, wylewano supernatant i zawieszano w buforze płuczącym (ICN Biomedicals Inc.). Do zawiesiny dodawano 1,5 μ l roztworu Hoechst (ICN Biomedicals Inc.) o stężeniu 200 μ g/ml i inkubowano przez 5 minut. Próbkę odpłukiwano trzykrotnie. Ostatecznie komórki zawieszano w 1 ml buforu. Próbkę badaną barwiono 2 μ l jodku propidyny (ICN Biomedicals Inc.) o wyjściowym stężeniu 250 μ g/ml.
6. Komórki oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym BX51 (Olympus) – obiektyw immersyjny 100x.

III.5.3 Rozdział elektroforetyczny wyizolowanych fragmentów DNA

Charakterystyczne dla procesu apoptozy jest fragmentacja DNA do fragmentów 180pz i ich wielokrotności, co daje obraz drabinki wyizolowanego DNA po rozdziale w żelu elektroforetycznym. Izolacje genomowego DNA przeprowadzano według metody przedstawionej w literaturze. (258)

1. Komórki linii A431 oraz HT-29 hodowano na dnie butelek (Corning, USA) o powierzchni 25cm², przepłukiwano PBS bez wapnia i magnezu, poddawano trypsynizacji (Trypsin-EDTA, Sigma) i wirowano, zlewano supernatant. Komórki policzono i wysiewano w dołkach płytki sześciodołkowej w gęstości 1x10⁶ komórek/ dołek
2. Po 24 godzinach od pasażu komórki przepłukiwano PBS bez jonów Ca, Mg. Do dołków dodawano odpowiedni czynnik wywołujący, bądź hamujący apoptozę lub nekrozę. Jako kontrolę negatywną używano pożywki DMEM z 10% surowicą FBS. Kontrolę pozytywną stanowiła staurosporyna w stężeniu 1 uM.
3. Komórki inkubowano z zadaniem czynnikiem przez określony czas 24 godzin, następnie zebrano oderwane komórki, resztę poddano trypsynizacji, odwirowano i zawieszono w 300 ul buforu lizującego (0,01M Tris, 0,005 M EDTA, 0,5% SDS), (Sigma). Probówki inkubowano przez 1 godzinę w 65°C.
4. Do lizatu dodawano RNA-azy (0,2 mg/ml) (Promega), inkubowano 1 godzinę, a następnie dodawano proteinazy K (0,2 mg/ml) (Sigma), pozostawiono na 1 godzinę w temperaturze 50°C.
5. DNA wyekstrachowano używając mieszaniny fenol:chloroform (1:1) (POCh) i wytrącano przy użyciu 75% etanolu z 0,3M octanem sodu przez 2 godziny w temperaturze -20°C, wirowano przy obrotach 13000g przez 10 minut w temperaturze 4 °C. Przepłukiwano 70% etanolem, wirowano.
6. Osad wysuszone i zawieszono w 50 ul buforu TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2mM EDTA) (BioRad). Przed elektroforezą dodano 10 ul buforu obciążającego (błękit bromofenolowy 0,25g/ml, glicerol 20%) (Sigma) i podgrzano do 65°C przez 10 minut.
7. Elektroforezę prowadzono 1,5 % żelu agarozowym zawierającym 0,3 ug/ml bromku etydyny (Sigma) w buforze TAE (BioRad) przez 2 godziny.

8. Wynik elektroforezy oglądano przy użyciu systemu GelDoc2000 (BioRad) kontrolowanego przez program komputerowy do dokumentacji i analizy obrazu Quantity One (BioRad).

III.6 Fluorescencyjne barwienie filamentów aktynowych

W trakcie procesu apoptozy dochodzi do zniszczenia cytoszkieletu komórki, w tym także filamentów aktynowych. Badanie zmian w strukturze cytoszkieletu komórki można badać za pomocą fallotoksyn wyizolowanych z grzyba *Amanta phalloides*. Fallotoksyny są bicyklicznymi peptydami wiążącymi małe i duże filamety F-aktynowe, natomiast nie wykazują powinowactwa do monomerycznej G-aktyny. Znacznik fluorescencyjny sprzężony z fallotoksyną pozwala na ilościową i jakościową ocenę F-aktyny w komórce. W eksperymencie zastosowano falloidyne sprzężoną ze znacznikiem fluorescencyjnym Oregon Green[®] 488, którego wzbudzenie następuje przy 496 nm, a emisja przy 520 nm. Stężenie wyjściowe roztworu fallotoksyny wynosiło 6,6uM.

1. Komórki określonej linii komórkowej rosnące na dnie butelek (Corning, USA) o powierzchni 25cm², przepłukiwano PBS bez wapnia i magnezu, poddawano trypsynizacji (Trypsin-EDTA, Sigma) i wirowano, zlewano supernatant. Komórki policzono i wysiewano na szkiełka nakrywkowe o średnicy 13 mm znajdujące się w dołkach płytki 12 – dołkowej w gęstości 1x10⁵ komórek/ próbkę.
2. Po 24 godzinach od pasażu komórki przepłukiwano PBS bez jonów Ca, Mg. Do dołków dodawano odpowiedni czynnik wywołujący, bądź hamujący apoptozę lub nekrozę. Jako kontrolę negatywną używano pożywki DMEM z 10% surowicą FBS. Kontrolę pozytywną stanowiła staurosporyna w stężeniu 1 uM.
3. Komórki inkubowano z zadanyim czynnikiem przez określony czas 12 godzin. Po tym czasie szkiełka przepłukiwano ogrzanym PBS, a następnie utrwalano zimnym 4% formaldehydem przez 10 minut.
4. Szkiełka przepłukiwano dwukrotnie PBS i zanurzono do acetonu w temperaturze -20°C, powtórnie przepłukiwano PBS.
5. Każde szkiełko zalewano 200 uL rozcieńczonego roztworu Oregon Green[®] 488 phalloidin (Invitrogen, USA) tak, aby na szkiełko przypadała 1 jednostka fallotoksyny i inkubowano w ciemnościach, w temperaturze pokojowej przez 20 minut.

6. Szkiełka przepłukiwano w PBS oraz w wodzie destylowanej i zalewano 1,5 uL roztworu Hoechst (ICN Biomedicals Inc.) o stężeniu 200 ug/ml i inkubowano przez 5 minut, odpłukano w wodzie destylowanej.
7. Szkiełka nakrywkowe osadzono na szklach podstawowych i oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym BX51 (Olympus) – obiektyw immersyjny 100x.

III.7 Cyfrowe metody uzyskiwania wyników

Uzyskanie wyników badań było możliwe przy zastosowaniu odpowiedniego oprogramowania komputerowego. Listę wykorzystanego oprogramowania zamieszczono poniżej.

- **AnalySis (Soft Imaging)** - program umożliwił pracę z mikroskopem fluorescencyjnym BX51,
- **Adobe®Photoshop® v. 7.0 (Adobe Systems Incorporated)** - program umożliwił obróbkę graficzną fotografii stanowiących dokumentację badawczą,
- **Cell Quest (Becton-Dickinson)** – program umożliwił obróbkę danych uzyskanych z cytometru przepływowego,
- **Microsoft® Excel 2000 v. 9.0.2812 (Microsoft Corporation)** - program umożliwił wstępną obróbkę uzyskanych danych liczbowych oraz tworzenie wykresów,
- **Microsoft® Word 2000 v. 9.0.2812 (Microsoft Corporation)** - program umożliwił napisanie tekstu pracy doktorskiej,
- **Microsoft® Power Point 2000 v. 9.0.2812 (Microsoft Corporation)** - program umożliwił obróbkę wyników z cytometru przepływowego,
- **Statistica PI v.6.0 (StatSoft)** - program umożliwił statystyczne opracowanie wyników przeprowadzonych badań,
- **QuantityOne v.4.0.3 (BioRad)** - program umożliwił uzyskanie obrazu oraz analizę wyników elektroforezy na żelach agarozowych.

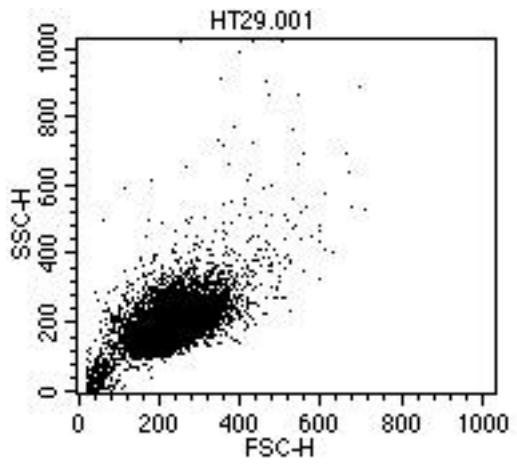
IV. Wyniki

IV. WYNIKI

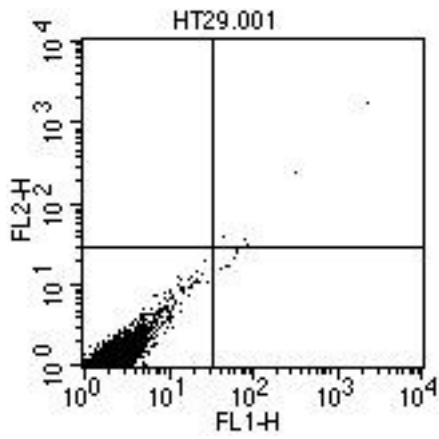
IV.1 Wstępna ocena jakości danych i określenie optymalnych metod statystycznych

Na podstawie próbek kalibrujących dobrano warunki pomiarów przeprowadzonych przy użyciu cytometru przepływowego. Ustalono parametry dla wykresu SSC-H(FSC-H) opisującego zależność poziomu ziarnistości komórki badanej od jej wielkości, opisując charakterystykę badanej populacji komórek (Ryc. 2a). Następnie sporządzano wykresy FL-2(FL-1) obrazujące procent komórek wybarwionych jodkiem propidyny (FL-2) w zależności od procentu komórek barwionych ApoFluor®Green (FL-1) (Ryc. 2b-f). Pomiary sporządzono dla każdej z badanych linii komórkowych. Zbadano wpływ zadawanych czynników na rozkład procentowy komórek żywych, nekrotycznych i apoptotycznych poszczególnych linii komórkowych. Procent komórek dla danej fazy odczytano z kwadrantów wykresów FL2(FL1). Przykładowe wyniki dla komórek linii HT-29 przedstawiono na poniższych wykresach.

Rycina 2. Przykładowe wyniki z cytometru przepływowego pokazujące stopień aktywacji kaspaz oraz uszkodzenie błony komórkowej komórek linii HT-29 pod wpływem danego czynnika. Wykres opisujący zależność SSC-H(FSC-H) dla badanej populacji komórek HT-29 -a. Zależności FL2(FL1) wraz z statystyką dla danej próby odczytanej na podstawie wyników w poszczególnych kwadrantach (ramka obok): b - próba ślepa niebarwiona, c – komórki kontrolne DMEM, d- kontrola pozytywna 1uM staurosporyny, e - komórki traktowane L.delbrueckii DSM 20074, f - komórki traktowane L. rhamnosus GG ATCC 53103



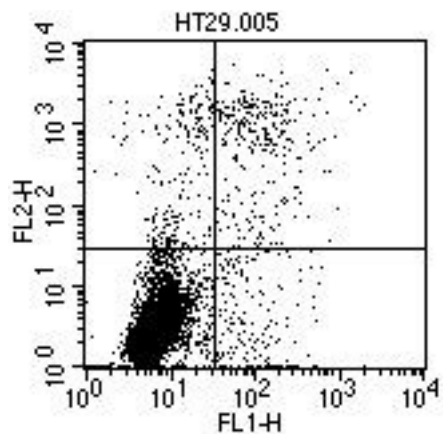
a.)



b.)

File: HT29.001
 Sample ID: 0
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

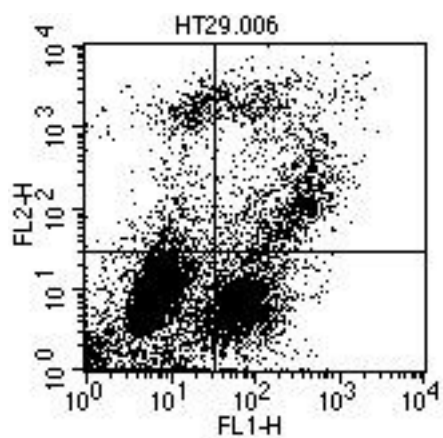
% Gated	% Tota	Y Mean
0.00	0.00	***
0.05	0.05	412.14
99.89	99.89	1.30
0.06	0.06	20.13



c.)

File: HT29.005
 Sample ID: kontr
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

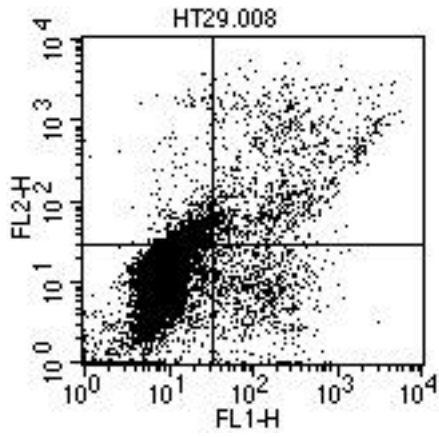
% Gated	% Tota	Y Mean
2.11	2.11	698.35
2.86	2.86	994.77
93.18	93.18	3.14
1.85	1.85	6.60



d.)

File: HT29.006
 Sample ID: stauro2um
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

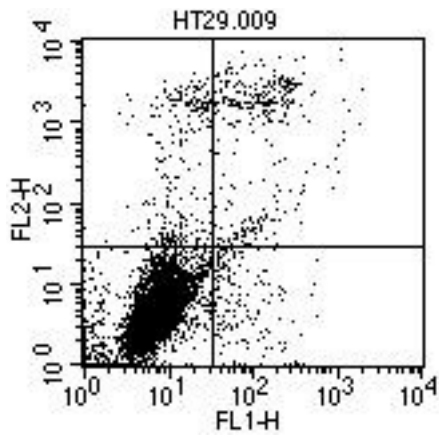
% Gated	% Tota	Y Mean
7.31	7.31	820.52
14.11	14.11	800.34
57.35	57.35	7.60
21.23	21.23	7.66



e.)

File: HT29.008
 Sample ID: delb 20074
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

% Gated	% Tota	Y Mean
14.44	14.44	84.67
9.70	9.70	501.17
69.32	69.32	12.26
6.54	6.54	9.78



f.)

File: HT29.009
 Sample ID: gg
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

% Gated	% Tota	Y Mean
2.66	2.66	870.69
3.24	3.24	1636.73
92.43	92.43	4.34
1.67	1.67	9.43

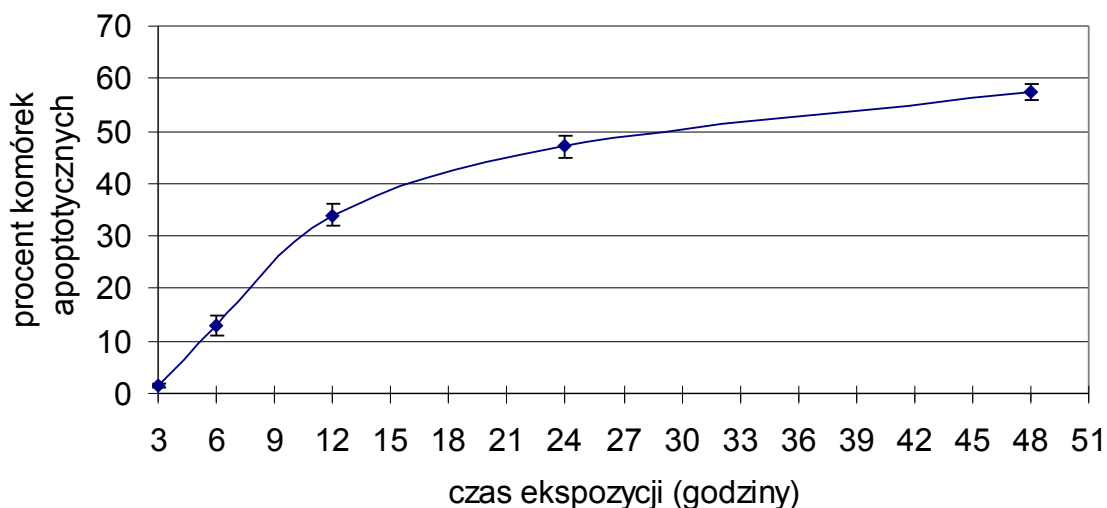
Przed przystąpieniem do właściwej oceny uzyskanych wyników przeprowadzono wstępną analizę danych. Sprawdzone, czy rozkład wyników odczytanych z kwadrantów w poszczególnych grupach zgodny jest z rozkładem normalnym. W tym celu stosowano test Shapiro-Wilka na normalność rozkładu (dla procentu komórek apoptotycznych Shapiro-Wilka W Test wykazał $W=0,857493$, $p<0,0001$; dla procentu komórek nekrotycznych: $W=0,695235$, $p=0,0000$; dla procentu komórek z wczesną apoptozą: $W=0,854902$, $p<0,0001$; dla procentu komórek żywych: $W=0,955499$, $p<0,0001$). Rozkład istotnie odbiegał od normalnego i dlatego do dalszych porównań stosowano test Kruscalla – Wallisa stanowiący nieparametryczną alternatywę analizy wariancji ANOVA. Z kolei do analiz post-hoc wykorzystywano test Steel'a stanowiący nieparametryczną alternatywę testu Tuckeya.

Za próg istotności statystycznej przyjęto wartość $p<0,05$. Zbiorcze, uśrednione wyniki odczytane z poszczególnych kwadrantów przedstawiono na poniższych rycinach i tabelach, wyniki istotnie statystycznie zaznaczono *.

IV.2 Określenie zależności pomiędzy czasem ekspozycji na czynnik a procentem komórek apoptotycznych:

Komórki linii A431 w ilości 1×10^6 komórek na dołek poddano działaniu 1 uM staurosporyny i sprawdzano aktywację kaspaz po czasie 3, 6, 12, 24 i 48 godzin. Wynik wyrażono jako zależność uśrednionego procentu komórek apoptotycznych od czasu ekspozycji na 1 uM staurosporyny w PBS.

Rycina 3. Wpływ czasu ekspozycji 1 uM staurosporyny na apoptozę komórek nabłonkowych linii A431,



Na podstawie wpływu staurosporyny jako czynnika wywołującego apoptozę komórek linii A431 o dalszych doświadczeń wybrano dwudziestoczwierogodzinny czas ekspozycji. Po czasie 24 godzin około połowa komórek wykazywała cechy komórki apoptotycznej.

IV.3 Określenie odpowiedniej gęstości hodowli bakteryjnej wywołującej apoptozę komórek nabłonkowych.

W celu zbadania, jaka liczba bakterii wpływa na stopień aktywacji kaspaz w komórkach sprawdzono działanie różnych gęstości hodowli szczepu *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 inkubowanej z jednym milionem komórek linii A431.

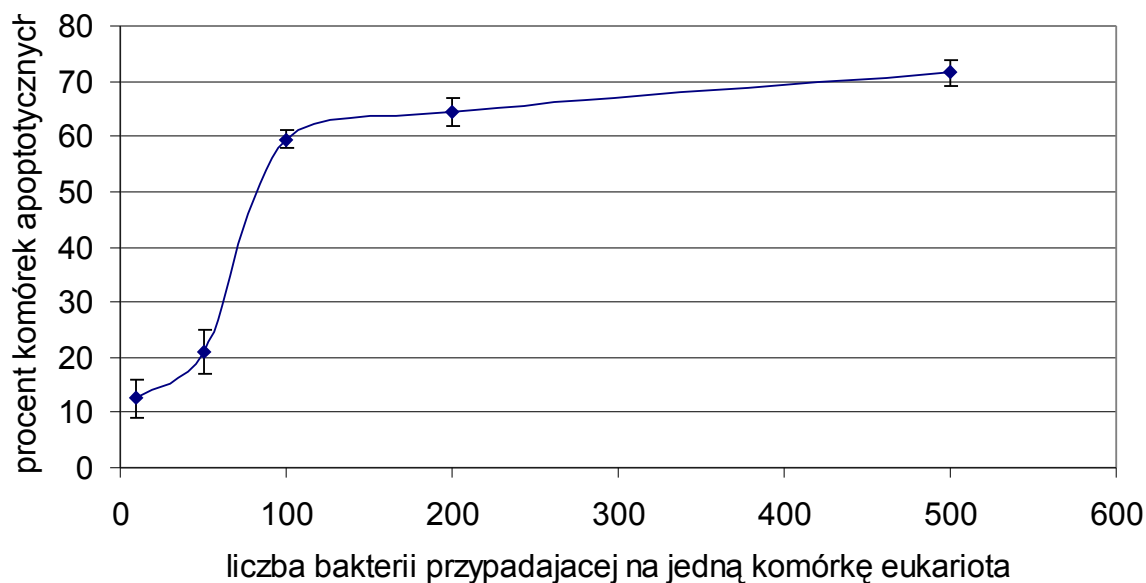
Szczep *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 wybrano ze względu na zdolność wydzielania znaczących ilości nadtlenu wodoru w warunkach hodowli tlenowej. Pozostałe szczepy wybrane jako reprezentatywne dla danego gatunku *Lactobacillus* produkowały mniejsze ilości nadtlenu wodoru lub nie wydzielały go wcale. (Tabela1)

Tabela 1. Ilość wydzielanego nadtlenu wodoru w warunkach tlenowych w 4 godzinnej hodowli w PBS

Szczep <i>Lactobacillus</i>	Ilość wydzielanego nadtlenu wodoru w warunkach tlenowych w 4 godzinnej hodowli (mM)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> DSM 20074	1,06
<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20243	0,8
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CNBL 1007	0,2
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016	0
<i>Lactobacillus fermentum</i> DSM 20052	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14431	0
<i>Lactobacillus casei</i> DSM 20021	0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	0

Szczep *L. delbrueckii* 20074 zadawano odpowiednio rozcieńczając hodowlę o gęstości 1×10^9 . Liczba bakterii przypadającej na jedną komórkę eukariotyczną wynosiła 500, 200, 100, 50, 10 w 1ml.

Rycina 4. Wpływ zadanej liczby bakterii *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 na procent komórek apoptotycznych linii A431 po 24 godzinach



Na podstawie powyższej zależności wybrano liczbę bakterii przypadającej na jedną komórkę eukariotyczną. Gęstość stu bakterii szczepu *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 działającej na jedną komórkę linii A431 wywołuje aktywację kaspaz u 50 % komórek tej linii po 24 godzinnej współinkubacji w warunkach 5% CO₂, w 37°C.

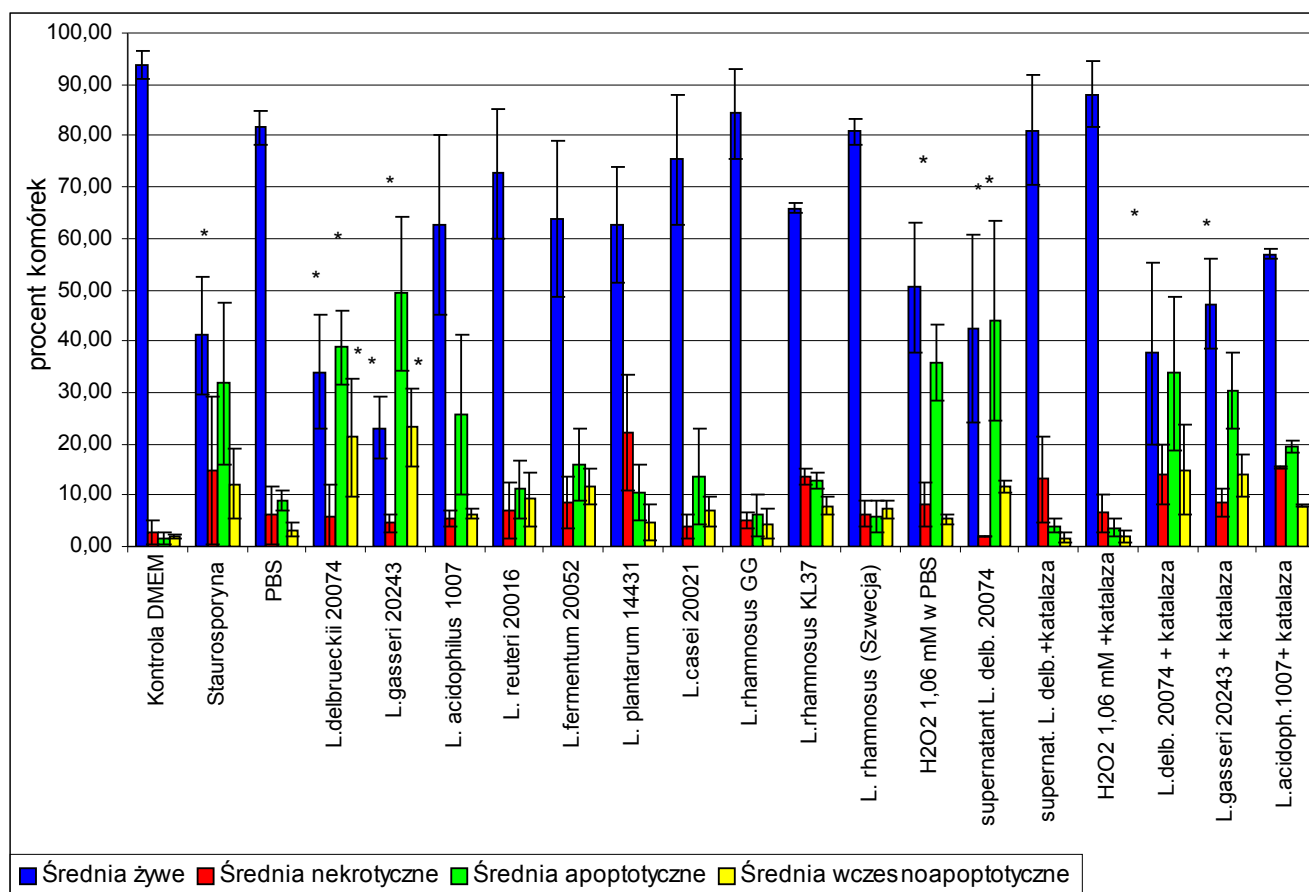
Zgodnie z powyższymi założeniami, aby zbadać wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz ich metabolitów na apoptozę i nekrozę komórek nabłonkowych *in vitro* ustalono czas 24 godzin inkubacji oraz gęstość hodowli bakteryjnych 1x10⁸ komórek przypadającej na 1x10⁶ komórek nabłonkowych w 1 ml PBS. Wyniki przedstawiono na poniższych rycinach i tabelach.

IV.4. Badanie poziomu aktywacji kaspaz w komórkach linii HT-29

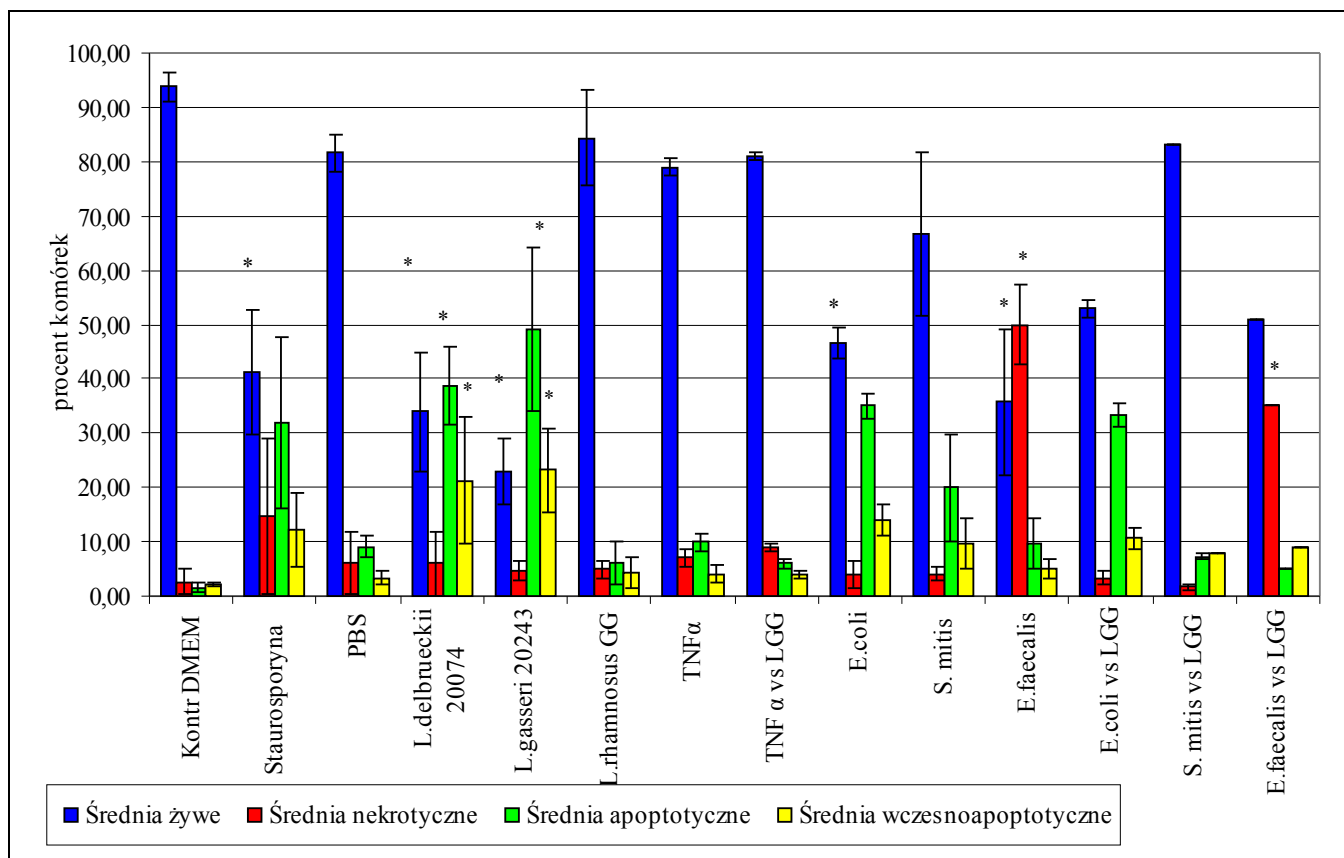
W celu określenia wpływu bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, ich metabolitów, bakterii patogennych i cytokiny na apoptozę i nekrozę komórek nabłonkowych dokonano pomiaru stopnia aktywacji kaspaz i uszkodzenia błony komórkowej w komórkach linii HT-29 - linia nowotworowa wyprowadzona z ludzkich kolonocytów. Po 24 godzinnej inkubacji, przy użyciu cytometru przepływowego zmierzono odsetek komórek żywych, nekrotycznych oraz znajdujących się w

różnych stadiach apoptozy. Wyniki przedstawiono na poniższych wykresach procentowych. Do frakcji komórek żywych zaliczono komórki o nienaruszonej błonie komórkowej i braku aktywności kaspaz. Komórki nekrotyczne charakteryzowało uszkodzenie błony komórkowej, brak znacznego stopnia aktywacji kaspaz. Komórki apoptotyczne cechował znaczny stopień aktywacji kaspaz oraz uszkodzenie błony komórkowej. Komórki w stadium wczesnej apoptozy wykazywały znaczną aktywację kaspaz i brak oznak uszkodzenia błony komórkowej.

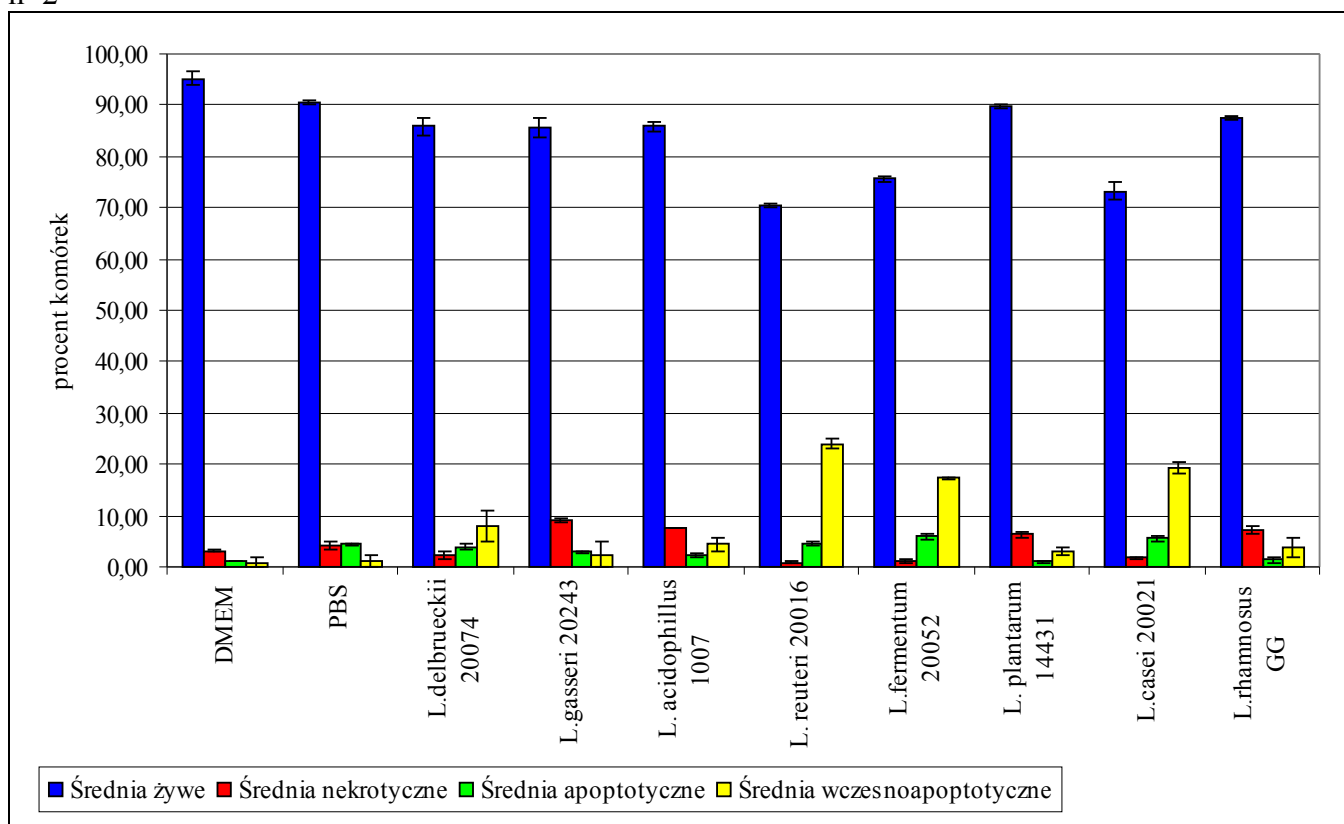
Rycina 5. Wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i ich metabolitów na komórki linii HT-29, n=3



Rycina 6. Wpływ bakterii komensalnych, patogennych i cytokin na komórki linii HT-29, n=3



Rycina 7. Wpływ martwych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na apoptozę komórek linii HT-29, n=2



Analiza powyższych wykresów dotycząca żywotności komórek linii HT-29 wykazała, iż:

najsilniejszy efekt bójczy ($22,98 \pm 6,02\%$ komórek żywych) wynikał ze współinkubacji z szczepem *Lactobacillus gasseri* DSM 20243, a dodanie katalazy zmniejszyło ten efekt o połowę (wyniki istotnie statystycznie, $p=0,0001$) (Rycina 5)

istotnie statystyczny był efekt zmniejszenia żywotności komórek w przypadku działania żywych bakterii *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 ($33,96 \pm 10,99\%$ komórek żywych), a dodanie katalazy nie znosiło tego efektu (Rycina 5)

traktowanie komórek 1 μ M staurosporyny wywoływało zmniejszenie żywotności o ponad połowę, wynik ($41,15 \pm 11,55\%$ komórek żywych) istotnie różnił się od kontroli negatywnej DMEM z 10 % surowicą (Rycina 5)

- porównywalny spadek wywoływała inkubacja ze supernatantem hodowli szczepu *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 ($42,33 \pm 18,37\%$ komórek żywych) oraz działanie czystego nadtlenu w stężeniu 1,06 mM ($50,47 \pm 12,62\%$ komórek żywych) (Rycina 5)
- inkubacja z bakteriami komensalnymi *E. coli* oraz *E. faecalis* również miała istotny wpływ na obniżenie żywotności komórek linii HT-29, redukując ją do $46,67 \pm 2,87\%$ komórek żywych oraz $35,67 \pm 18,37\%$ komórek żywych (Rycina 6)
- dodanie żywych bakterii *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 nieznacznie zmniejszyło efekt bójczy pochodzący od szczepu *E. coli* oraz *E. faecalis* (Rycina 6)
- pozbawienie komórek surowicy poprzez inkubację w PBS nie miało istotnego wpływu na żywotność, (Rycina 6)
- pozostałe bakterie oraz TNF α nie miały istotnego wpływu na spadek żywotności komórek w porównaniu z kontrolą negatywną DMEM lub PBS. (Rycina 6)
- żywotność zbliżoną do kontroli negatywnej DMEM zapewniła inkubacja ze szczepami *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 oraz *Lactobacillus casei* DSM 20021 (Rycina 5)
- dodanie katalazy całkowicie znosiło efekt bójczy pochodzący od inkubacji z supernatantem *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 oraz odpowiadającym mu stężeniem nadtlenu wodoru (Rycina 5)

W przypadku efektu apoptotycznego widoczne były następujące zmiany:

- najsilniejszy, statystycznie istotny efekt $49,23 \pm 15\%$ komórek apoptotycznych osiągnęło działanie *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 (wynik istotny statystycznie, $p < 0,0001$) (Rycina 5.)

- duży procent $38,78 \pm 7,2$ komórek z uszkodzoną błoną i wyraźną aktywacją kaspaz występował w przypadku działania żywego szczepu *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074, jego supernatantu ($44 \pm 19\%$ komórek apoptotycznych) i odpowiadającego mu stężenia nadtlenu wodoru na poziomie $35,96 \pm 7,38\%$ komórek apoptotycznych (Rycina 5.)
- dodanie katalazy nie znosiło efektu działania żywych bakterii pozostawiając wysoki procent komórek apoptotycznych, także w przypadku działania *Lactobacillus acidophilus* CNBL 1007: $19,62 \pm 1,16\%$ komórek apoptotycznych (Rycina 5.)
 - działanie *E.coli* wywoływało istotny $35 \pm 2,45\%$ wzrost poziomu komórek w stanie apoptozy, dodanie *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 nie znosiło tego efektu (Rycina 6.)
 - apoptoza wywołana przez *S. mitis* osiągnęła wartość o połowę mniejszą niż działanie *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074, tj. $20 \pm 9,8\%$ komórek apoptotycznych, współinkubacja ze szczepem LGG zmniejszyła ten efekt do $7 \pm 0,5\%$ komórek apoptotycznych (Rycina 6.)
 - działanie *E. faecalis* wywoływało apoptozę komórek na poziomie około $9,67 \pm 4,5\%$ komórek apoptotycznych, a współinkubacja z LGG zmniejszyła ten efekt o połowę (Rycina 6.)
- dodanie cytokiny TNF α nie wywoływało apoptozy na poziomie istotnie różnym od kontroli ($10 \pm 1,6\%$ komórek apoptotycznych), dodanie LGG zmniejszyło efekt proapoptotyczny do 6% (Rycina 6.)
- działanie *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 wykazywało się najniższym procentem komórek apoptotycznych: $6,05 \pm 4\%$. (Rycina 5.)

Komórki żywe z aktywowanymi kaspazami w stadium wczesnej apoptozy widoczne były:

- w przypadku działania żywych szczepów *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 oraz *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 (wynik istotny statystycznie, $p=0,002$) i ustaliło się na poziomie $23 \pm 7\%$ komórek apoptotycznych i $21 \pm 11\%$ (Rycina 5.)
- duży procent komórek we wczesnej apoptozie widoczny był także w przypadku działania wyżej wspomnianych bakterii i katalazy, a także supernatantu *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074, staurosopryny i *L. fermentum* DSM 20052 (wyniki nie były istotnie różne od kontroli) (Rycina 5.)
- działanie *E.coli* oraz *S. mitis* utrzymywało poziom wczesnej apoptozy porównywalny do oddziaływania staurosopryny, dodanie LGG nieznacznie znosiło ten efekt, (Rycina 6.)

- działanie cytokiny nie wpływało znacząco na poziom apoptozy wczesnej (Rycina 6.)
- w przypadku działania *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 oraz supernatantu *L.delbrueckii* DSM 20074 i nadtlenu wodoru z dodatkiem katalazy procent komórek był porównywalny do kontroli negatywnej DMEM z 10% surowicą. (Rycina 5.)

Efekt nekrotyczny widoczny był:

- głównie w działaniu *E. faecalis* i wynosił $50\pm 7\%$ komórek (wynik istotny statystycznie $p=0,0063$), a dodanie LGG zmniejszyło efekt nekrotyczny do 35% (Rycina 6.)
- w przypadku działania *Lactobacillus plantarum* ATCC 14431 wynosił $22\pm 11\%$, a żywych bakterii *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 i *Lactobacillus acidophilus* CNBL 1007 z dodatkiem katalazy 14 ± 5 i $15,5\pm 0,2\%$ - efekt ten nie był istotny statystycznie (Rycina 5.)
- pozostałe szczepy nie wpływały na nekrozę, podobnie jak kontrola negatywna DMEM i PBS. (Rycina 5.)

Duże wartości odchylenia standardowego populacji spowodowane dużym rozrzutem wyników z poszczególnych eksperymentów wynikały z niejednorodności populacji komórek w hodowli.

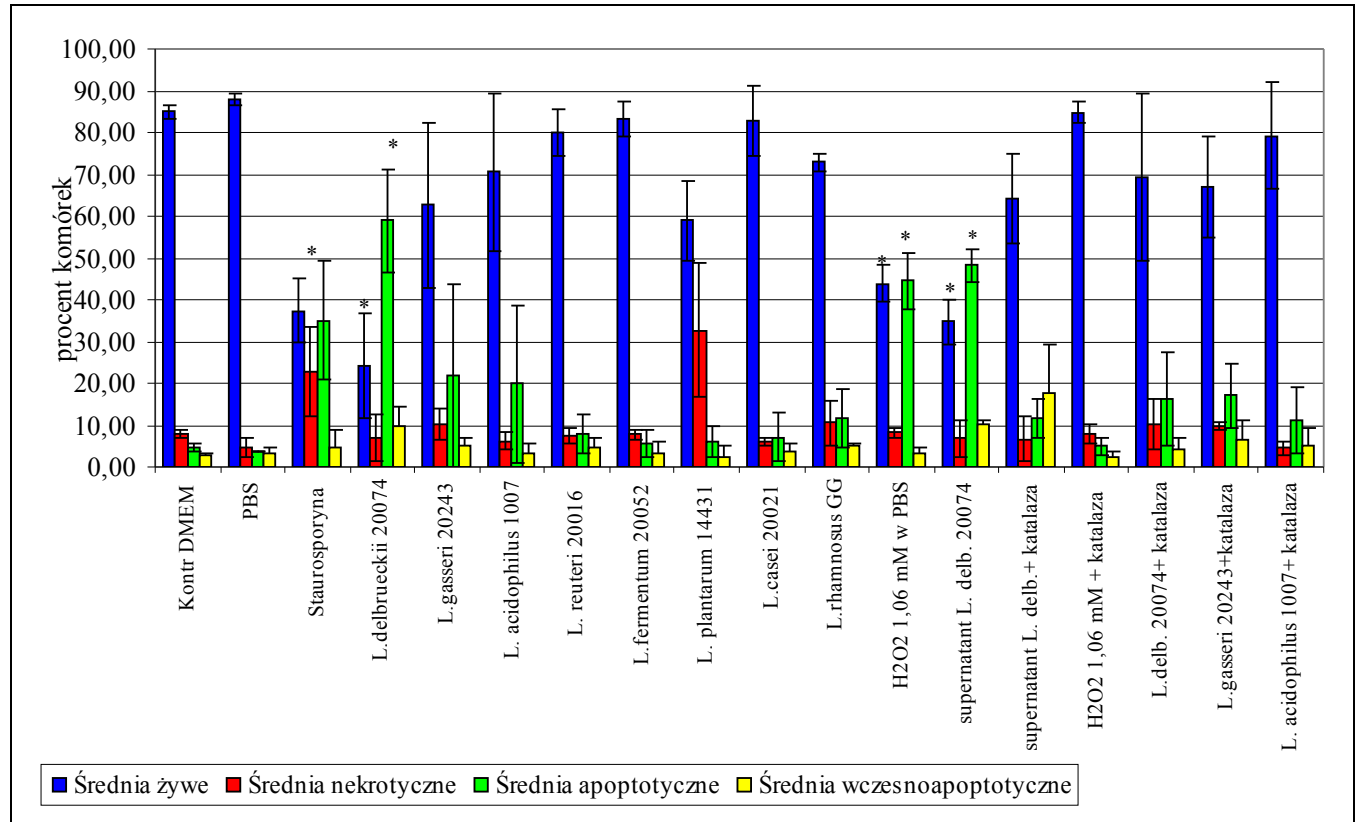
Martwe bakterie z rodzaju *Lactobacillus* nie wpływały istotnie na żywotność, apoptozę oraz nekrozę komórek linii HT-29. W przypadku apoptozy wczesnej uwidaczniał się wpływ szczepów *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Lactobacillus fermentum* DSM 20052 i *Lactobacillus casei* DSM 20021, ale wyniki nie były istotne statystycznie. (Rycina 7.)

IV.5. Badanie poziomu aktywacji kaspaz w komórkach linii HT-29 MTX

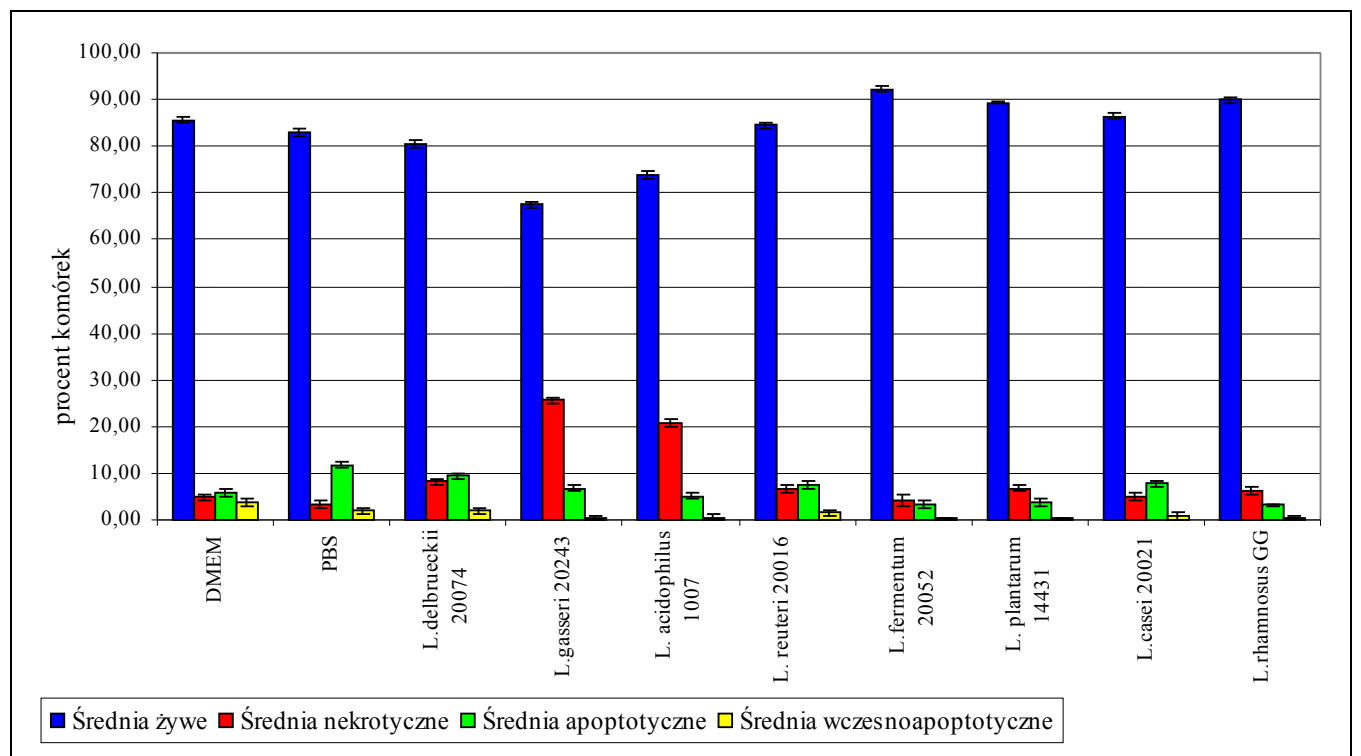
W celu określenia wpływu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz ich metabolitów na apoptozę i nekrozę komórek nabłonkowych dokonano pomiaru stopnia aktywacji kaspaz i uszkodzenia błony komórkowej w komórkach linii HT-29 MTX - linia nowotworowa wyprowadzona z ludzkich kolonocytów traktowana metotreksatem. Po 24 godzinnej inkubacji, przy użyciu cytometru przepływowego zmierzono odsetek komórek żywych, nekrotycznych oraz znajdujących się w różnych stadiach apoptozy. Wyniki przedstawiono na poniższych wykresach procentowych. Do frakcji komórek żywych zaliczono komórki o nienaruszonej błonie komórkowej i braku aktywności kaspaz. Komórki nekrotyczne charakteryzowało uszkodzenie błony komórkowej, brak znacznego stopnia aktywacji kaspaz. Komórki apoptotyczne cechował znaczny

stopień aktywacji kaspaz oraz uszkodzenie błony komórkowej. Komórki w stadium wczesnej apoptozy wykazywały znaczną aktywację kaspaz i brak oznak uszkodzenia błony komórkowej.

Rycina 8. Wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i ich metabolitów na komórki linii HT-29MTX, n=3



Rycina 9. Wpływ martwych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na komórki linii HT-29 MTX, n=2



Wpływ na żywotność komórek linii HT-29 MTX:

- najmniejszą, $24 \pm 12\%$ żywotność komórek wykazywały komórki po współinkubacji ze szczepem *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 (wyniki istotnie statystycznie, $p=0,0018$)
- niska przeżywalność komórek charakteryzowała także działanie supernatantu *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 $35 \pm 5\%$ oraz nadtlenu wodoru $44 \pm 4\%$ i staurosporyny $37 \pm 7\%$ komórek żywych (wynik istotny statystycznie $p=0,0018$) (Rycina 8.)
- dodanie katalazy istotnie poprawiło żywotność komórek z 24% do $69 \pm 20\%$ w przypadku działania żywych bakterii *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074, oraz podobnie w przypadku jego supernatantu z $34,6 \pm 5,5\%$ do $64 \pm 10,5\%$, a w przypadku czystego nadtlenu wodoru zniżyło całkowicie efekt bójeży z $43 \pm 4\%$ do $85 \pm 2,5\%$ komórek żywych (Rycina 8.)
- najwyższa, około 80% przeżywalność komórek występowała po zadziałaniu *Lactobacillus fermentum* DSM 20052 ($83,36 \pm 4,3\%$) oraz *Lactobacillus casei* DSM 20021 ($83 \pm 8,4\%$), *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 ($79,8 \pm 5,54\%$) oraz *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (72 ± 2 komórek żywych) (Rycina 8)
- inkubacja z martwymi bakteriami utrzymywała się na poziomie wartości podobnej do działania czystego PBS, była najniższa w przypadku martwej bakterii *Lactobacillus gasseri* DSM 20243, ale nie był to wynik istotny statystycznie (Rycina 9)

Apoptoza komórek HT-29 MTX

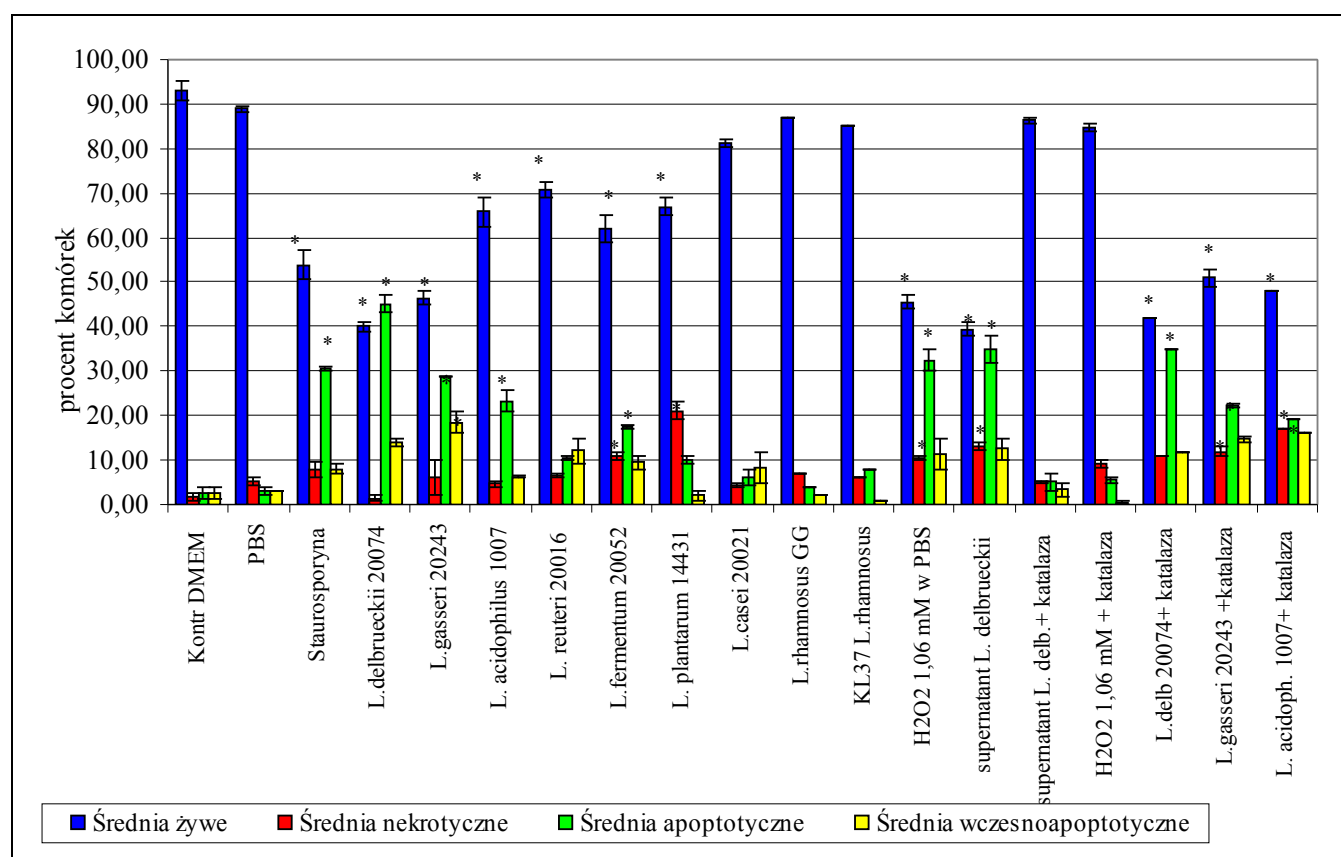
- była najwyższa w przypadku działania szczepu *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 wyniosła około $59 \pm 12,3\%$, supernatantu – $48 \pm 4,5\%$, czystego nadtlenu wodoru – $44,5 \pm 6,7\%$. Dodanie katalazy zmniejszyło ten efekt odpowiednio do $11,67 \pm 4,5\%$ i $16 \pm 11\%$ (wynik istotny statystycznie, $p=0,0029$) (Rycina 8)
- działanie *Lactobacillus gasseri* DSM 20243, *Lactobacillus acidophilus* CNBL 1007 utrzymywało się na poziomie $21,9\%$ i $19,83\%$ komórek apoptotycznych, nie były to wyniki istotne statystycznie, (Rycina 8)
- najniższy poziom apoptozy występował w przypadku działania *Lactobacillus plantarum* ATCC 14431 i *Lactobacillus fermentum* DSM 20052 wynosił około 5% . (Rycina 8.)
- inkubacja komórek z zabitymi termicznie bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* nie wykazywała wyników istotnych statystycznie i utrzymywała się na poziomie wartości dla PBS i mniejszej. (Rycina 9.)

Wpływ bakterii na poziom apoptozy wczesnej nie wykazywał różnic statystycznych dla żadego z wariantów eksperymentu. ($p=0,5$). W przypadku nekrozy poziom istotności testu wyniósł $p=0,2$.

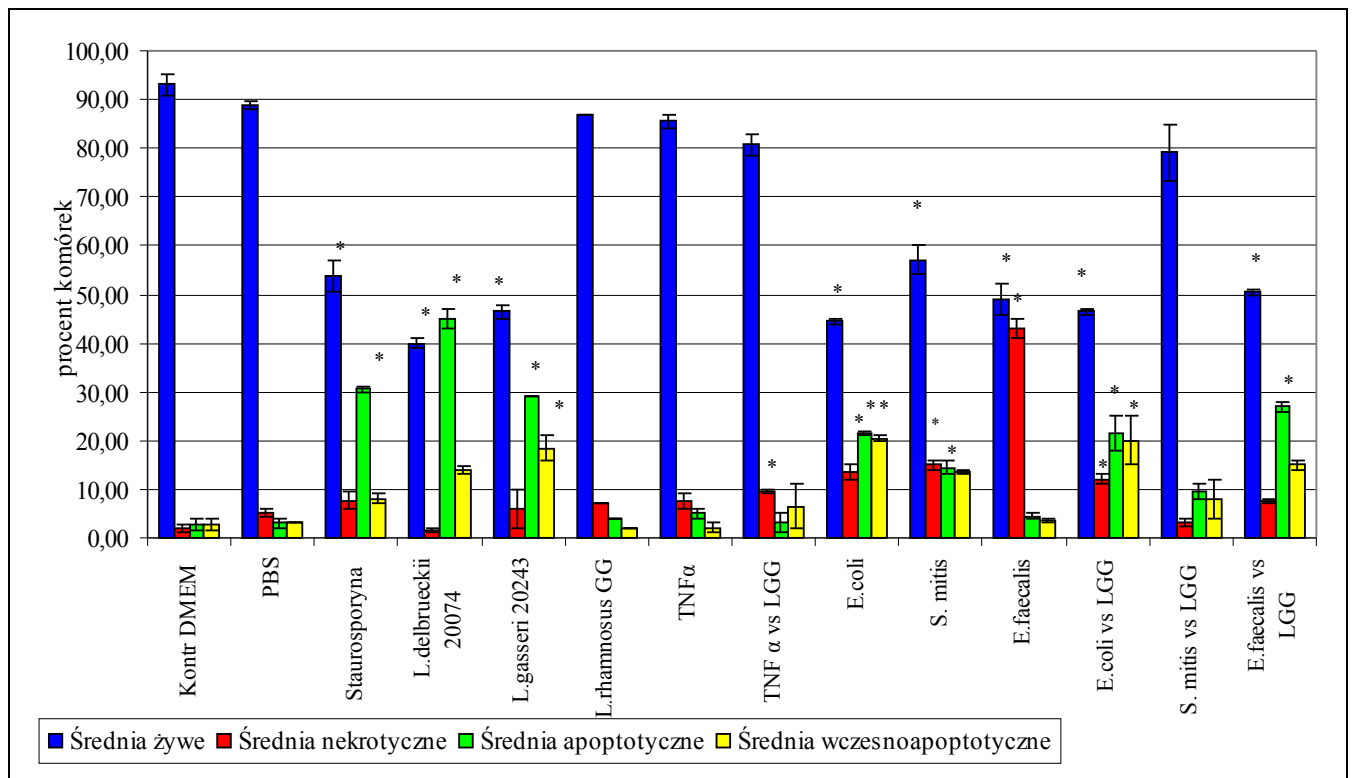
IV.6 Badanie poziomu aktywacji kaspaz w komórkach linii CaCo-2

W celu określenia wpływu bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, ich metabolitów, bakterii patogennych i cytokiny na apoptozę i nekrozę komórek nabłonkowych dokonano pomiaru stopnia aktywacji kaspaz i uszkodzenia błony komórkowej w komórkach linii CaCo-2 - linia nowotworowa wyprowadzona z ludzkich kolonocytów. Po 24 godzinnej inkubacji, przy użyciu cytometru przepływowego zmierzono odsetek komórek żywych, nekrotycznych oraz znajdujących się w różnych stadiach apoptozy. Wyniki przedstawiono na poniższych wykresach procentowych. Do frakcji komórek żywych zaliczono komórki o nienaruszonej błonie komórkowej i braku aktywności kaspaz. Komórki nekrotyczne charakteryzowało uszkodzenie błony komórkowej, brak znacznego stopnia aktywacji kaspaz. Komórki apoptotyczne cechował znaczny stopień aktywacji kaspaz oraz uszkodzenie błony komórkowej. Komórki w stadium wczesnej apoptozy wykazywały znaczną aktywację kaspaz i brak oznak uszkodzenia błony komórkowej.

Rycina 10. Wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz ich metabolitów na komórki linii CaCo-2, $n=2$



Rycina 11. Wpływ bakterii komensalnych, patogennych i cytokin na komórki linii CaCo-2, $n=2$



Wpływ bakterii oraz cytokin na żywotność komórek linii CaCo-2:

- największym spadkiem żywotności komórek do około 40±1% cechowało się działanie szczepu *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074, a także jego supernatantu (39,5±1,5%). Dodanie katalazy nieznacznie poprawiło żywotność do 42% w przypadku żywych bakterii *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074. W przypadku działania supernatantu dodanie katalazy nie odróżniło wyniku od kontroli DMEM 86,7±0,6%. (wyniki były istotne statystycznie, p=0,003) (Rycina 10)
- czysty nadtlenek wodoru również statystycznie istotnie zmniejszył żywotność do 45,5±1,5%, podczas gdy dodanie katalazy poprawiło żywotność do 85±0,83% i wynik ten nie odróżnił się statystycznie od kontroli DMEM (Rycina 10)
- kontrola pozytywna również wykazuje zmniejszoną żywotność do 53,75±3,25% - wynik był istotny statystycznie, (Rycina 10)
- szczepy *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14431, *Lactobacillus fermentum* DSM 20052 wykazywały istotnego wpływ na żywotność komórek, obniżając ją odpowiednio do 70,8±1,83%, 67±2% , 62±3% (Rycina 10)
- szczepy *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 oraz *Lactobacillus acidophilus* CNBL 1007 wpływały na żywotność obniżając ją do do 46,5±1,5% i 65,8±3,2%, dodanie katalazy do hodowli nie zmieniło istotności tego wpływu w przypadku działania *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 (Rycina 10)

- bakterie *E.coli* wywoływały znaczne, istotne obniżenie żywotności do $44\pm 0,5\%$, współinkubacja z bakteriami *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 podnosiła żywotność do $46,5\pm 0,5\%$, ale nie zmieniało to istotności działania *E.coli* (Rycina 11)
- działanie *Streptococcus mitis* również istotnie wpłynęło na żywotność komórek, a dodanie *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 poprawiło ten efekt z poziomu $57\pm 3\%$ do $79,21\pm 5,8\%$ oba wyniki znajdowały się w grupach o innej istotności statystycznej (Rycina 10)
- wpływ *E.faecalis* odznaczał się znacznym obniżeniem żywotności komórek do $49\pm 3\%$, dodanie LGG nieznacznie poprawiło ten efekt (Rycina 10)
- dodanie $TNF\alpha$ do hodowli komórek obniżało żywotność do $85\pm 1,5\%$ i do $80\pm 2,2\%$ w przypadku koinkubacji z LGG, wynik nie różnił się statystycznie od kontroli, (Rycina 11)
- działanie szczepu *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 oraz *Lactobacillus casei* DSM 20021 nie wpływało istotnie na żywotność obniżając ją do ponad 80%. (Rycina 10)

Proapoptycznie działanie na komórki linii CaCo-2 wykazywały następujące szczepy i substancje:

- w przypadku żywych bakterii *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 poziom apoptozy był najwyższy i sięgał $45\pm 0,5\%$, dodanie katalazy obniża ten poziom o 10%. (wyniki były istotnie statystycznie, $p=0,0035$) (Rycina 10)
- staurosporyna ($30,5\pm 0,5\%$ komórek apoptotycznych) oraz inkubacja z czystym nadtlenkiem wodoru ($32,5\pm 2,5\%$ komórek apoptotycznych) i supernatantem hodowli *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 ($35\pm 3\%$ komórek apoptotycznych) istotnie wpływały na poziom apoptozy komórek. Dodanie katalazy do supernatantu oraz czystego nadtlenku wodoru, znosiło ten efekt do poziomu około 5%, który nie różnił się istotnie od kontroli (Rycina 10)
- szczepy *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 (29% komórek apoptotycznych), *Lactobacillus acidophilus* CNBL 1007 ($23\pm 2,3\%$ komórek apoptotycznych) oraz *Lactobacillus fermentum* DSM 20052 ($17,5\pm 0,5\%$ komórek apoptotycznych) wpływały istotnie na poziom apoptozy, a dodanie katalazy nie zmieniało istotności tego wpływu (Rycina 10)
- szczep *E. coli* wywoływał apoptozę na poziomie $21,5\pm 0,5\%$, a dodanie LGG nie wpłynęło na tę wartość (Rycina 11)
- szczep *E. faecalis* wywoływał apoptozę na poziomie $4,5\pm 0,5$, ale dodanie do hodowli szczepu LGG znacząco podnosiło poziom komórek apoptotycznych do $27\pm 1\%$

- *S. mitis* wywoływał apoptozę na poziomie $14,5 \pm 1,5\%$ po dodaniu szczepu LGG liczba ta zmalała do $9,5 \pm 1,5\%$ (Rycina 11.)
- szczepy *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14431, *Lactobacillus casei* DSM 20021 oraz *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 nie wywoływały apoptozy w sposób znacząco różny od kontroli DMEM (Rycina 10.)
- dodanie TNF α nie wpływało istotnie na poziom komórek apoptotycznych, który utrzymywał się na poziomie $5 \pm 1\%$ (Rycina 11.)

Poziom apoptozy wczesnej utrzymywał się na wysokim, istotnie różnym od kontroli poziomie w przypadku działania *E. coli* ($20 \pm 0,5\%$ komórek apoptotycznych) oraz *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 ($18,5 \pm 2,5\%$ komórek apoptotycznych). Pozostałe szczepy i cytokina nie wpływały istotnie na poziom apoptozy wczesnej (wartość istotności statystycznej wynosiła $p=0,0113$). (Rycina 10,11)

W przypadku komórek nekrotycznych dla linii CaCo-2:

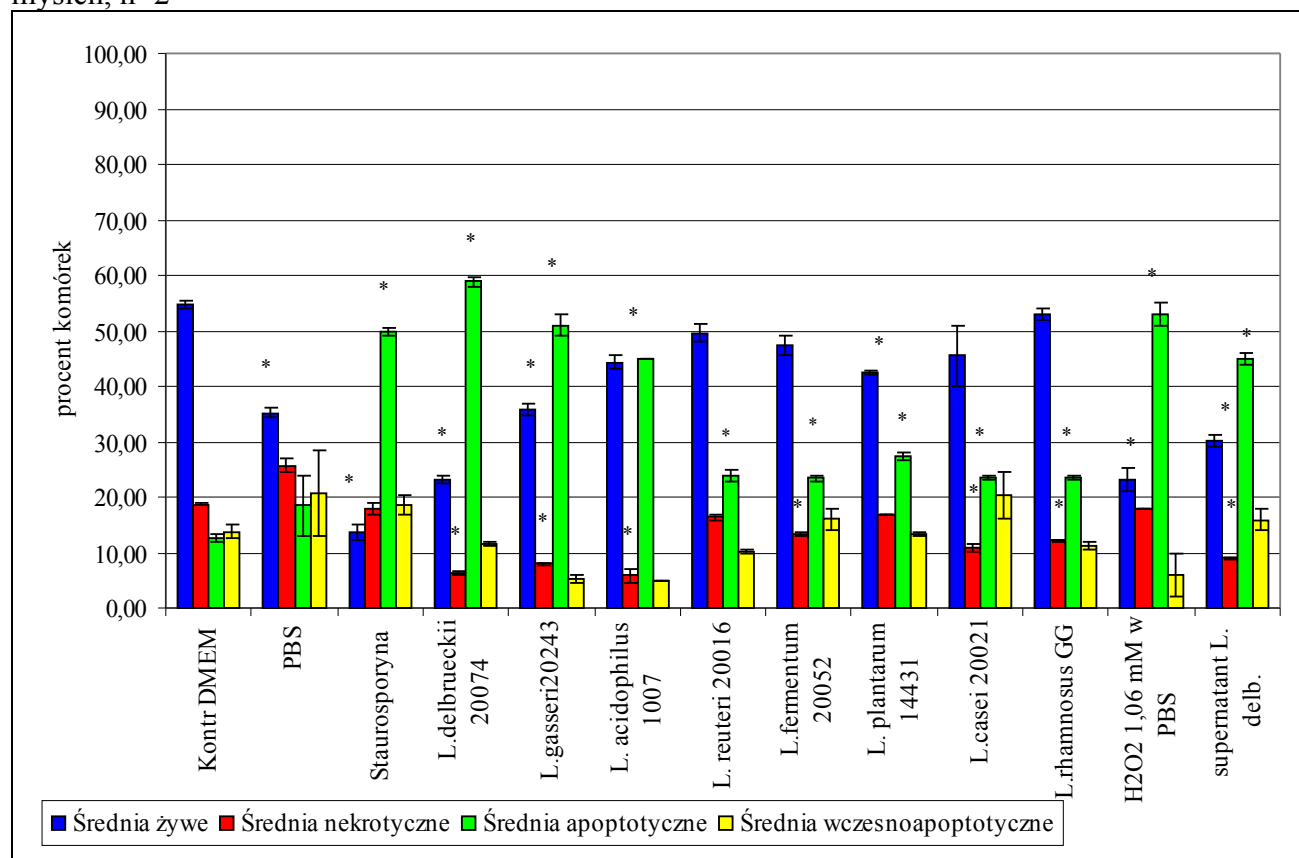
- najwyższą nekrozę, sięgającą wartości $43 \pm 2\%$ wywoływała szczep *E. faecalis*, dodanie szczepu LGG istotnie redukowało ten poziom do $7,5 \pm 0,5\%$. (Rycina 11)
- szczepy *Lactobacillus plantarum* ATCC 14431 oraz *Lactobacillus fermentum* DSM 20052 wywoływały nekrozę statystycznie różniącą się od kontroli, tj. około $21 \pm 2\%$ i $11 \pm 1\%$. (Rycina 10)
- szczep *E. coli* oraz współinkubacja szczepu z LGG wywoływała nekrozę na poziomie 13%, (wyniki były istotne statystycznie, $p=0,0058$). (Rycina 11)
- działanie *S. mitis* wywoływało nekrozę na poziomie około 15%, a dodanie LGG istotnie zmniejszyło ten wynik (Rycina 11)
- poziom nekrozy porównywalny z kontrolą negatywną od 2%-8% obserwowano w przypadku działania: *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074, *Lactobacillus gasseri* DSM 20243, *Lactobacillus acidophilus* CNBL 1007, *Lactobacillus casei* DSM 20021, *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103. (Rycina 10)

IV.7 Badanie poziomu aktywacji kaspaz w komórkach izolowanych z jelit myszy

W celu określenia wpływu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz ich metabolitów na apoptozę i nekrozę komórek nabłonkowych dokonano pomiaru stopnia aktywacji kaspaz i

uszkodzenia błony komórkowej w komórkach izolowanych z jelit mysich. Po 24 godzinnej inkubacji, przy użyciu cytometru przepływowego zmierzono odsetek komórek żywych, nekrotycznych oraz znajdujących się w różnych stadiach apoptozy. Wyniki przedstawiono na poniższych wykresach procentowych. Do frakcji komórek żywych zaliczono komórki o nienaruszonej błonie komórkowej i braku aktywności kaspaz. Komórki nekrotyczne charakteryzowało uszkodzenie błony komórkowej, brak znacznego stopnia aktywacji kaspaz. Komórki apoptotyczne cechował znaczny stopień aktywacji kaspaz oraz uszkodzenie błony komórkowej. Komórki w stadium wczesnej apoptozy wykazywały znaczną aktywację kaspaz i brak oznak uszkodzenia błony komórkowej.

Rycina 12. Wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na komórki nabłonkowe wyizolowane z jelit mysich, n=2



Dla komórek nabłonkowych wyizolowanych z jelit myszy na zmiany w żywotności komórek wpływ miały głównie:

- staurosporyna w stężeniu 1μM obniżały do wartości 13,6±1,4% komórek żywych (wartość istotności testu, p=0,019) (Rycina 12)

- szczep *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 oraz czysty nadtlenuk wodoru (1.06 mM) utrzymywały żywotność na poziomie 23% (Rycina 12)
- inkubacja w czystym PBS przyniosła dość znaczące obniżenie żywotności komórek do $35,15 \pm 0,8\%$ i było to wynik istotnie różny od kontroli DMEM, gdzie utrzymywał się na poziomie około $54,7 \pm 0,7\%$ (Rycina 12)
- działanie supernatantu *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 utrzymywało się na poziomie $30 \pm 1,5\%$ żywotności, ale była to wartość podobna do oddziaływania PBS (Rycina 12)
- istotnie różny od kontroli DMEM pozostawał wpływ *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 i *Lactobacillus plantarum* ATCC 14431 utrzymujący poziom $35,85 \pm 1,15\%$ i $42,4 \pm 0,4\%$ (Rycina 12)
- testowane szczepy bakterii *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Lactobacillus fermentum* DSM 20052 oraz *Lactobacillus casei* DSM 20021 i *Lactobacillus acidophilus* CNBL 1007 nie wykazywały wpływu istotnie różniącego się od kontroli negatywnej DMEM, ale ich działanie istotnie zwiększyło żywotność w porównaniu z działaniem PBS. (Rycina 12)

W przypadku apoptozy ilość komórek o aktywnych kaspazach i uszkodzonej błonie komórkowej:

- była najwyższa w przypadku *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 i wynosiła $59 \pm 0,8\%$, czysty nadtlenuk wodoru dawał wartość $53 \pm 0,2\%$, a supernatantu hodowli tego szczepu oznaczał się żywotnością $44,9 \pm 0,9\%$, (poziom istotności testu $p=0,02$) (Rycina 12)
- staurosporyna dawała wartość apoptozy około $49,7 \pm 0,7\%$, szczep *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 $51 \pm 2\%$, a szczep *Lactobacillus acidophilus* CNBL 1007 45% komórek apoptotycznych, wartości te były istotnie różne od kontroli (Rycina 12)
- działanie pozostałych szczepów było istotnie różne od kontroli DMEM, jednak znajdowało się w grupie o tej samej istotności statystycznej, co działanie PBS i utrzymywało się na poziomie około 20% i $27 \pm 0,6\%$ w przypadku *Lactobacillus plantarum* ATCC 14431. (Rycina 12)

W przypadku apoptozy wczesnej wynik wykazywał istotność statystyczną, ($p=0,03$), ale w testach post-hoc nie udało się wykazać grup różnych statystycznie głównie z powodu wysokiej wartości apoptozy w działaniu PBS. (Rycina 12)

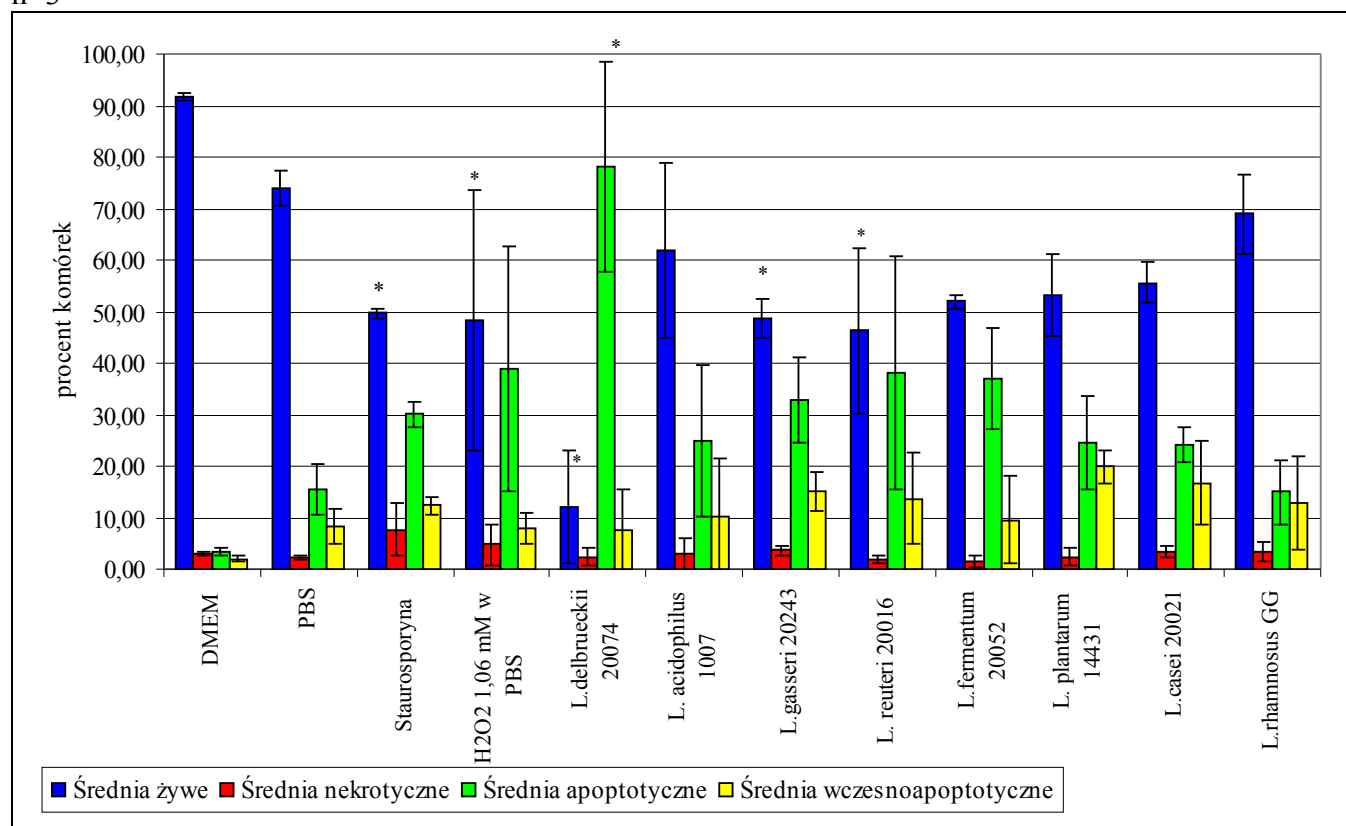
Działanie nekrotyczne dla pierwotnych komórek nabłonkowych było wysokie w kontroli negatywnej DMEM - 19% i PBS- $25,7 \pm 1,3\%$ oraz w hodowli z czystym nadtlenukiem wodoru i

staurosperylinie, a także dla próbek inkubowanych z żywymi bakteriami *Lactobacillus plantarum* ATCC 14431 i *Lactobacillus reuteri* DSM 20016. Pozostałe szczepy wykazywały poziom nekrozy istotnie niższy od kontroli negatywnej DMEM. Poziom istotności testu wynosił $p=0,018$ (Rycina 12)

IV.8 Badanie poziomu aktywacji kaspaz w komórkach linii A431

W celu określenia wpływu bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, ich metabolitów na apoptozę i nekrozę komórek nabłonkowych dokonano pomiaru stopnia aktywacji kaspaz i uszkodzenia błony komórkowej w komórkach linii A431 - linia nowotworowa wyizolowana z nabłonka sromu. Po 24 godzinnej inkubacji, przy użyciu cytometru przepływowego zmierzono odsetek komórek żywych, nekrotycznych oraz znajdujących się w różnych stadiach apoptozy. Wyniki przedstawiono na poniższych wykresach procentowych. Do frakcji komórek żywych zaliczono komórki o nienaruszonej błonie komórkowej i braku aktywności kaspaz. Komórki nekrotyczne charakteryzowało uszkodzenie błony komórkowej, brak znacznego stopnia aktywacji kaspaz. Komórki apoptotyczne cechował znaczny stopień aktywacji kaspaz oraz uszkodzenie błony komórkowej. Komórki w stadium wczesnej apoptozy wykazywały znaczną aktywację kaspaz i brak oznak uszkodzenia błony komórkowej.

Rycina 13. Wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz ich metabolitów na komórki linii A431, n=3



W przypadku działania bakterii z rodzaju *Lactobacillus* żywotności komórek linii A431:

- znacząco spadła w przypadku kontroli pozytywnej – staurosporyny do $49,7 \pm 0,9\%$, nadtlenku wodoru do $48,5 \pm 25,3\%$, (poziom istotności testu $p=0,0172$) (Rycina 13)

- największy spadek żywotności obserwowano w przypadku działania szczepu *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 do $12 \pm 10,9\%$, *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 do $46,2 \pm 16\%$, a także *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 – $48,5 \pm 3,8\%$ (Rycina 13)
- wpływ pozostałych szczepów zaznaczał się spadkiem żywotności do około 52%, jak w przypadku inkubacji z *Lactobacillus fermentum* DSM 20052, ale nie był to wynik istotny statystycznie (Rycina 13)
- w przypadku działania szczepu *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 obserwowano nieznacznie większe obniżenie żywotności komórek niż po inkubacji w PBS (Rycina 13)

Wpływ na procent komórek apoptotycznych linii A431:

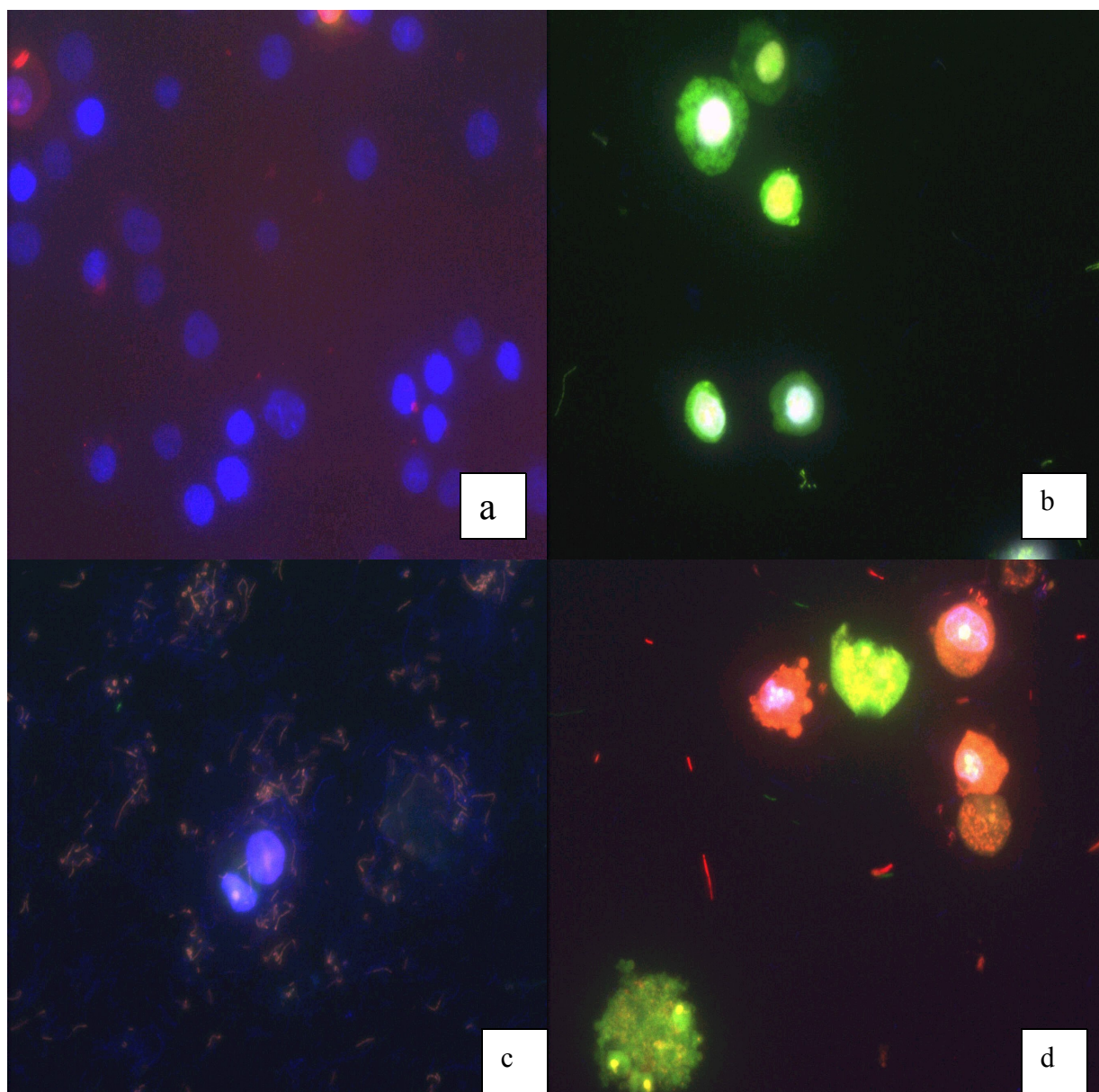
- istotność statystyczna ($p=0,0237$) występowała wyłącznie w przypadku działania *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074, które wywoływało apoptozę w $78,1 \pm 20,5\%$ komórek (Rycina 13)
- wysoki poziom komórek apoptotycznych obserwowano także w przypadku działania czystego nadtlenu wodoru: $38,9 \pm 23,7$ oraz szczepów *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Lactobacillus fermentum* DSM 20052, a także szczepu *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 (Rycina 13)

Różnice w ilości komórek apoptotycznych odznaczających się ciągłą błoną komórkową nie wykazywały istotności statystycznej. Poziom około $20 \pm 3,2\%$ komórek w stadium wczesnej apoptozy osiągnięty został w przypadku działania *Lactobacillus plantarum* ATCC 14431.

W przypadku nekrozy największy poziom $7,73 \pm 2,5\%$ osiągnęło działanie $1 \mu\text{M}$ staurosporyny, ale nie była to różnica istotna statystycznie. (Rycina 13)

IV.9. Wizualizacja aktywnych kaspaz w mikroskopie fluorescencyjnym

Komórki linii HT-29 oraz HT-29 MTX poddano działaniu żywych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz ich metabolitów. W celu wizualizacji aktywnych kaspaz komórki wybarwiono fluorescencyjnym inhibitorem aktywnych kaspaz, uszkodzenie błony komórkowej pokazano poprzez barwienie jodkiem propidyny. Poniższe zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Olympus.



Rycina 14. Komórki linii HT-29 wybarwione fluorescencyjnym inhibitorem aktywnych kaspaz (FITC – kolor zielony), odczynnikiem Hoechst (niebieski) i jodkiem propidyny (czerwony). Analizowane w Olympus Fluorescent Microscope, w obiektywie immersyjnym, powiększenie 1000x.

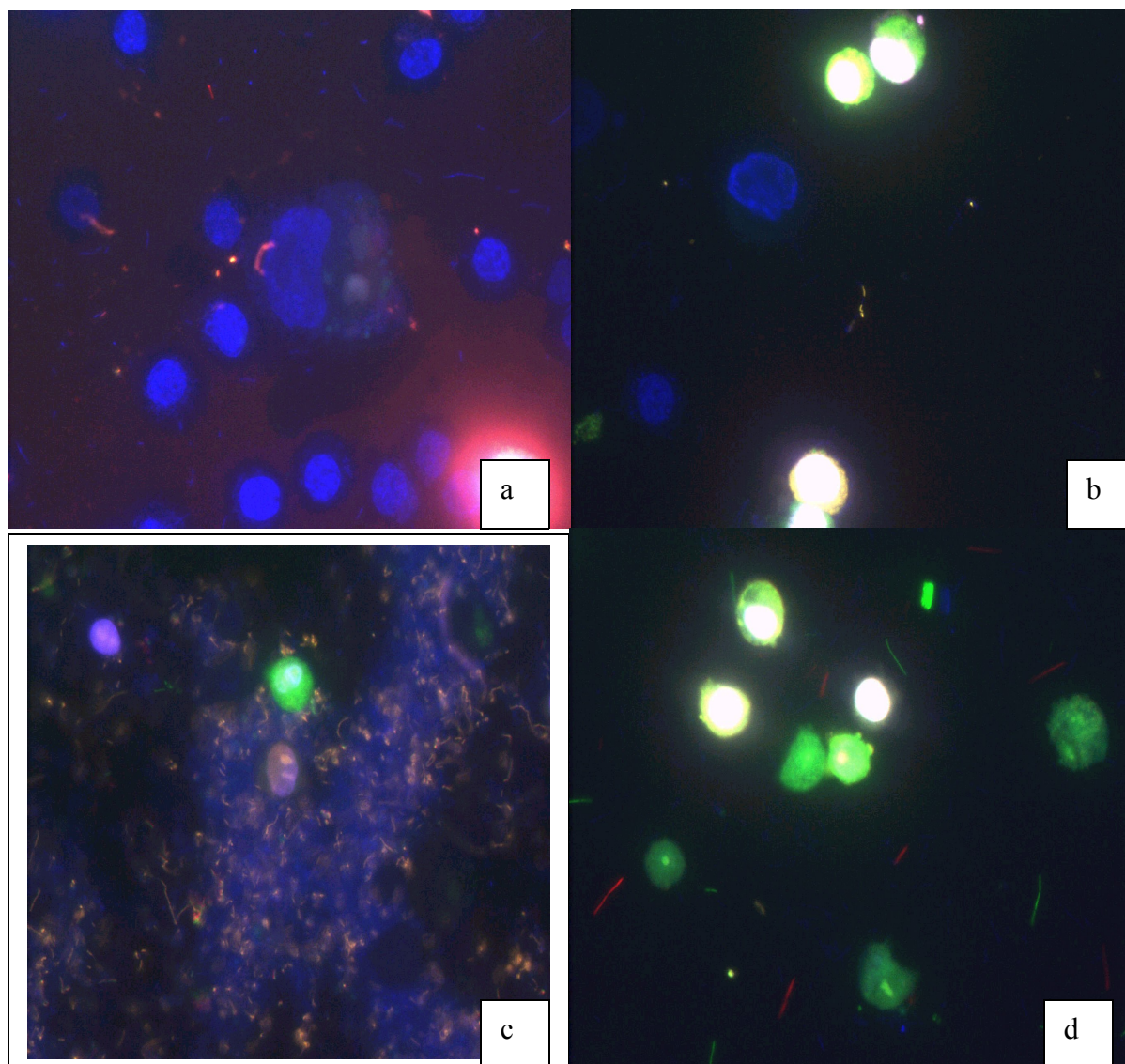
a – kontrola negatywna - DMEM 10% FBS

b – komórki traktowane bakteriami *Lactobacillus gasseri* DSM 20243

c – komórki traktowane żywym bakteriami *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103

d – komórki traktowane żywym bakteriami *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074

Na obrazie 14a dla kontroli negatywnej DMEM widoczne są jądra komórkowe barwione odczynnikiem Hoechst, brak zielonego barwnika i pomarańczowej obwódki świadczy o braku aktywnych kaspaz w komórce i nieuszkodzonej błonie komórkowej. Nagromadzenie aktywnych kaspaz w komórce (kolor zielony) pod wpływem działania bakterii *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 (14b) i *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 (14d) oraz widoczne uszkodzenia i wybrzuszenia błony komórkowej w postaci ciałek apoptotycznych (kolor pomarańczowy) świadczą o stopniu zaawansowania procesu apoptozy po 24 godzinach inkubacji. Obraz 14c przedstawia silną adherencję bakterii LGG do komórek oraz brak widocznych oznak apoptozy.



Rycina 15. Komórki linii HT –29 MTX wybarwione fluorescencyjnym inhibitorem aktywnych kaspaz (FITC – kolor zielony), odczynnik Hoechst (niebieski) i jodkiem propidyny (czerwony). Analizowane w Olympus Fluorescent Microscope, w obiektywie immersyjnym, powiększenie 1000x.

a – kontrola negatywna - DMEM 10% FBS

b – komórki traktowane bakteriami *Lactobacillus gasseri* DSM 20243

c – komórki traktowane żywym bakteriami *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103

d – komórki traktowane żywym bakteriami *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074

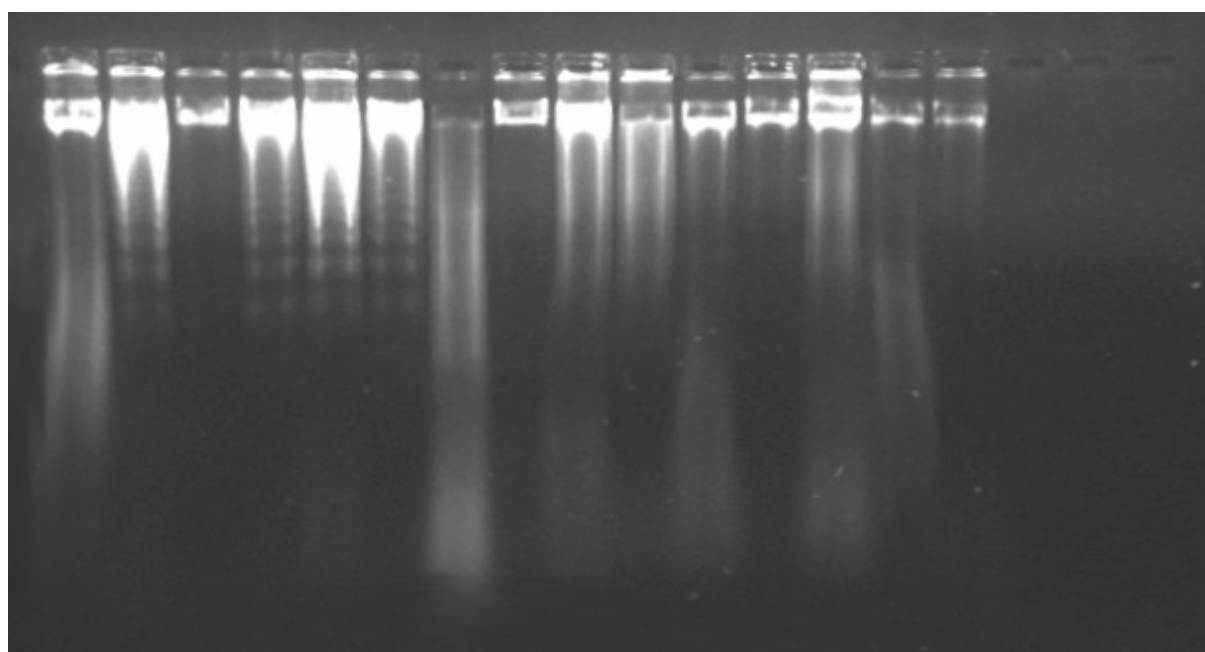
Obraz 15a dla kontroli negatywnej DMEM uwidacznia jądra komórkowe barwione Hoechst, obserwuje się też brak aktywnych kaspaz w komórce i nieuszkodzoną błonę komórkową. Obraz dotyczący wpływu *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 (15b) ukazuje komórki apoptotyczne oderwane od podłoża, zabarwione na zielono oraz komórki żywe z zabarwionym jądrem komórkowym. Aktywne kaspazy (kolor zielony) i wyraźne ciała apoptotyczne widoczne są pod wpływem działania bakterii *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 (15d) Obraz 15c przedstawia adherencję bakterii LGG do komórek oraz oznaki aktywacji kaspaz u części komórek.

Nieostre kontury komórek na fotografiach wynikały z trudności uchwycenia wyraźnego obrazu równocześnie dla komórek zaadherowanych do dna szkiełka, jak i apoptotycznych komórek oderwanych od podłoża.

IV. 10 Analiza rozdziału elektroforetycznego wyizolowanych fragmentów DNA komórek

W celu sprawdzenia obecności zdegradowanego DNA komórek typowego dla końcowego stadium procesu apoptozy dokonano rozdziału elektroforetycznego DNA wyizolowanego z komórek HT-29 i A431 uprzednio poddanych 24 godzinnemu działaniu szczepów *Lactobacillus* i ich metabolitów. Wynik przedstawiono na poniższej rycinie.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Rycina 16. Fotografia przedstawiająca rozdział elektroforetyczny wyizolowanych fragmentów DNA z komórek linii HT-29 oraz A431, numery linii odpowiadają poszczególnym wariantom eksperymentu:

- 1- komórki linii A431 rosnące w pożywce DMEM z 10% surowicą FBS,
- 2- komórki linii A431 traktowane 1 uM staurosporyny przez 24 godziny,
- 3- komórki linii HT-29 rosnące w pożywce DMEM z 10% surowicą FBS,
- 4- komórki linii HT-29 traktowane 1 uM staurosporyny przez 24 godziny,
- 5- komórki linii A431 traktowane 2 uM staurosporyny przez 24 godziny,
- 6- komórki linii HT-29 traktowane 2 uM staurosporyny przez 24 godziny,
- 7- komórki linii HT-29 traktowane 1,06 mM nadtlenu wodoru przez 24 godziny
- 8- komórki linii HT-29 inkubowane w PBS przez 24 godziny,
- 9- komórki linii HT-29 traktowane żywymi bakteriami *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 przez 24 godziny
- 10- komórki linii A431 traktowane żywymi bakteriami *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 przez 24 godziny
- 11- komórki linii HT-29 traktowane żywymi bakteriami *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 przez 24 godziny

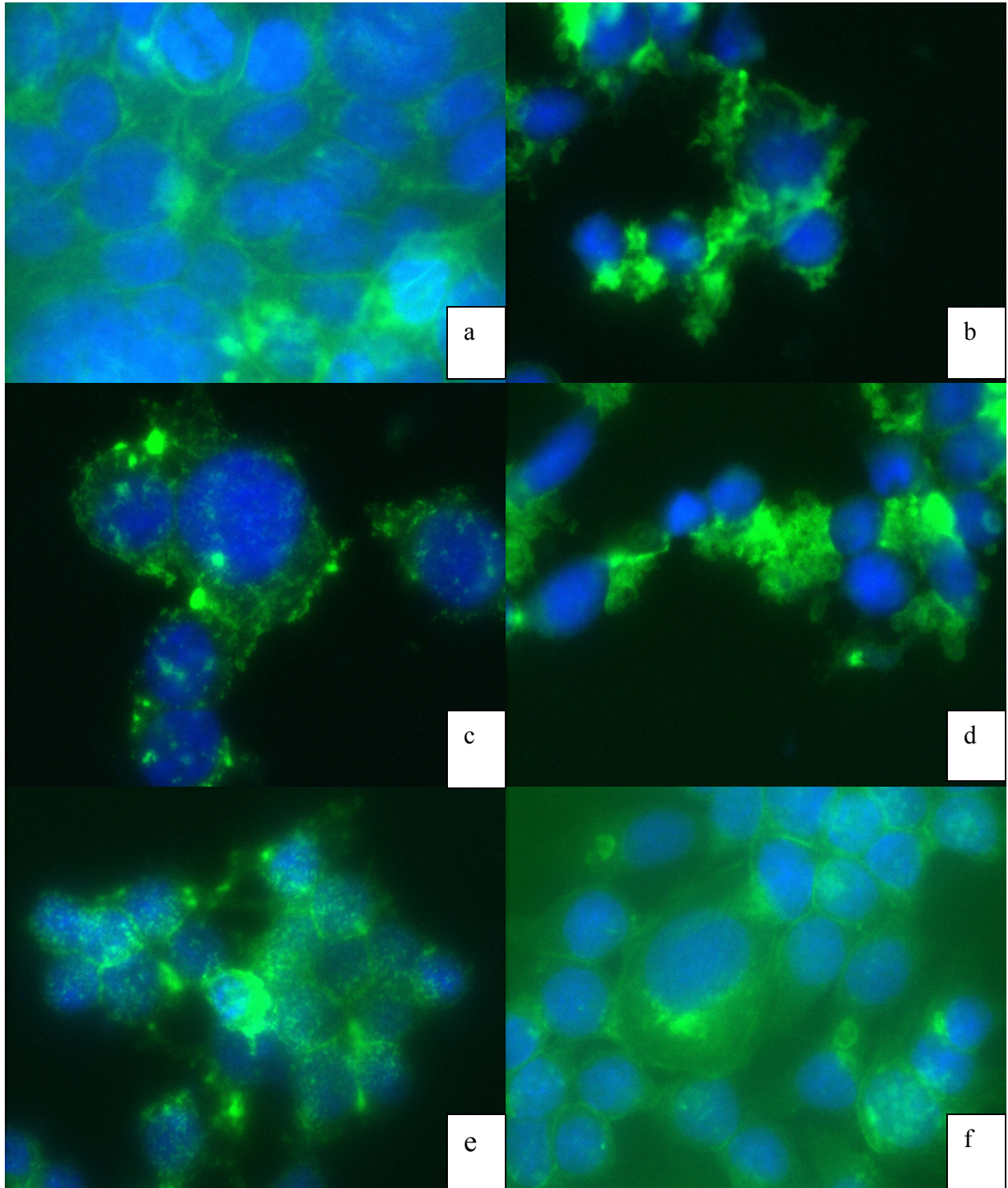
- 12- komórki linii A431 traktowane żywymi bakteriami *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 przez 24 godziny
- 13- komórki linii HT-29 traktowane żywymi bakteriami *Lactobacillus acidophilus* CNBL 1007 przez 24 godziny
- 14- komórki linii A431 traktowane żywymi bakteriami *Lactobacillus acidophilus* CNBL 1007 przez 24 godziny
- 15- komórki linii HT-29 traktowane żywymi bakteriami *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 przez 24 godziny

Obraz drabinki powstałej po rozdiale elektroforetycznym fragmentów DNA charakterystycznych dla procesu apoptozy wyraźnie widoczny jest jedynie w przypadku komórek obu linii HT-29 i A431 traktowanych staurosporyną przez 24 godziny (linia 2,4,5,6).

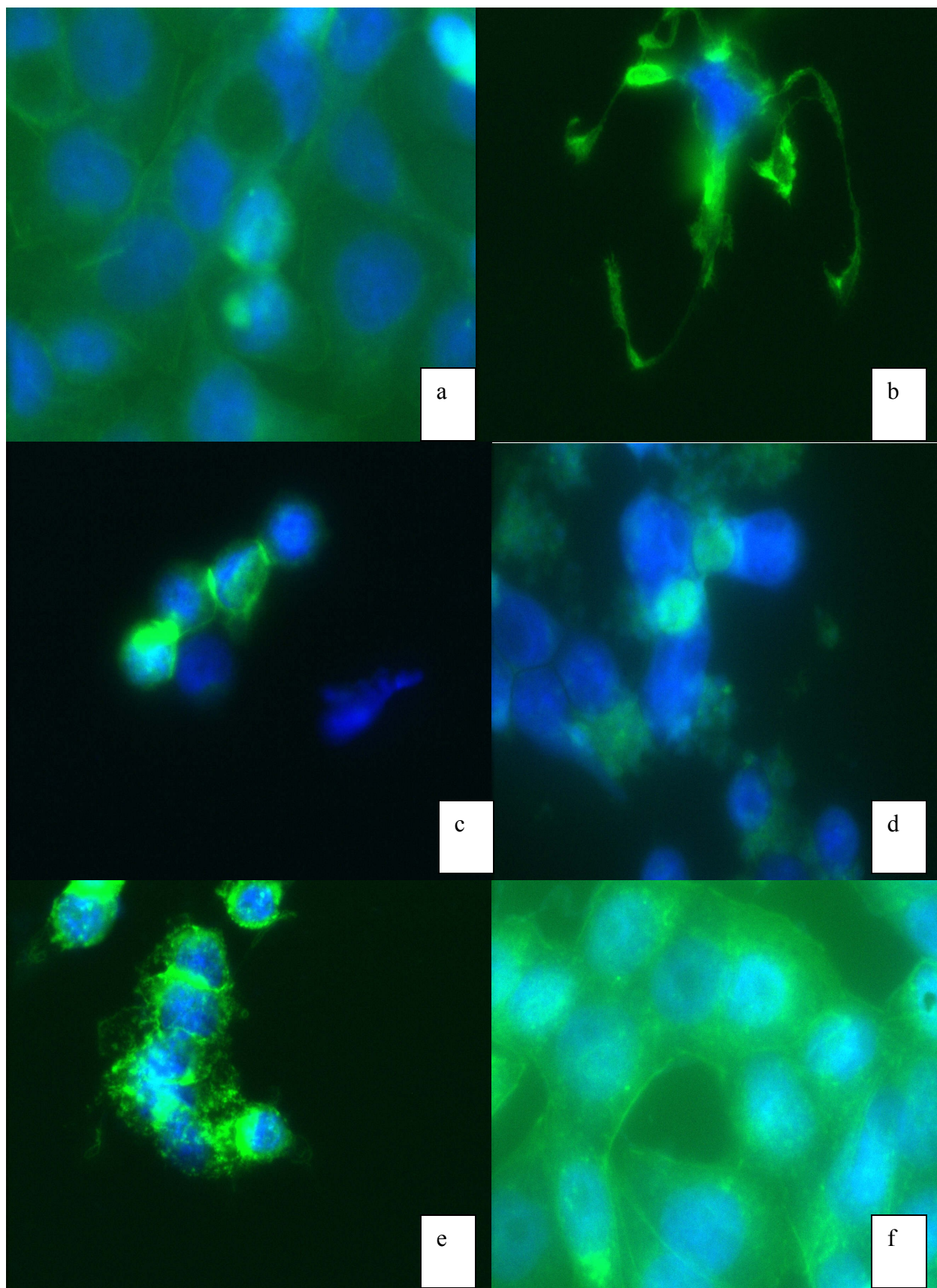
W przypadku traktowania komórek badanych linii żywymi szczepami bakterii z rodzaju *Lactobacillus* produkującymi różne stężenia nadtlenu wodoru, nie stwierdzono typowego obrazu drabinki DNA. Widoczne jest natomiast cięcie DNA do przypadkowych fragmentów o różnych długościach, co objawia się smużeniem w żelu elektroforetycznym. (linia 9-14) Przypadkowe cięcie DNA może być wynikiem nekrozy wywołanej obecnością substancji utleniających takich, jak nadtlenek wodoru oraz pozostałościami bakteryjnego DNA lub efektem działania enzymów bakteryjnych degradujących DNA (linia 7).

IV.11 Wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na strukturę filamentów aktynowych

Zbadano wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na strukturę filamentów aktynowych komórek linii nabłonkowej HT-29 oraz A431 po 24 godzinnej inkubacji z czynnikiem. Wyniki przedstawiono na poniższych fotografiach.



Rycina 17. Zmiany w strukturze filamentów aktynowych komórek linii A431 pod wpływem bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, a-kontrola DMEM, b- staurosporyna 1μM, c-H₂O₂ 1,06 mM, d- *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074, e- *Lactobacillus gasseri* DSM 20243, f- *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103



Rycina 18. Zmiany w strukturze filamentów aktynowych komórek linii HT-29 pod wpływem bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, a-kontrola DMEM, b- staurosporyna 1 μ M, c- H₂O₂ 1,06 mM, d-*Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074, e- *Lactobacillus gasseri* DSM 20243, f- *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103

Na rycinach 17a, 18a widoczne są komórki kontrolne traktowane DMEM z 10% surowicą FBS, są to komórki przylegające ściśle do podłoża o wyraźnych skupiskach włókien filamentów aktywnych (kolor zielony – Oregon green), rozproszonych wokół jądra (zabarwionych odczynnikiem Hoechst na kolor niebieski), a także biegnących w sposób uporządkowany wzdłuż błony komórkowej zaznaczających obraz całej komórki.

Komórki ulegające apoptozie tracą swój kształt i przyczepność do podłoża wskutek zniszczenia cytoszkieletu. Na zdjęciach komórek ulegających apoptozie pod wpływem staurosporyny (17b,18b) widoczne są komórki o intensywnie zabarwionych włóknach filamentów aktywnych, o nieregularnych kształtach i zniszczonej organizacji włókien aktywnych. Obraz komórek traktowanych czystym chemicznie nadtlakiem wodoru (zdjęcia 17c, 18c) ukazuje komórki o okrągłym kształcie oderwane od podłoża, w których widoczne są włókna aktywne zorganizowane głównie w miejscach zachowanych połączeń międzykomórkowych. W przypadku komórek linii A431 (zdjęcie 17c) widoczna jest większa dezorganizacja włókien aktywnych niż w przypadku komórek HT-29 (18c).

Komórki traktowane szczepami *Lactobacillus* produkującymi duże ilości nadtlaku wodoru, a w szczególności szczep *L. delbrueckii* DSM 20074 (zdjęcia 17d, 18d) wykazują widoczną dezorganizację filamentów aktywnych i utratę kształtu komórek. Filamenty aktywne wykazują się postrzępioną, zdezorganizowaną strukturą, a jedynie w przypadku działania *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 (zdjęcie 17e, 18e) widoczne są zachowane włókna w miejscu połączeń międzykomórkowych. Wpływ szczepu *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (17f, 18f) wyraźnie pozwalał na zachowanie kształtu i uporządkowanej struktury filamentów aktywnych, obraz hodowli przypomina komórki kontrolne.

Badanie struktur cytoszkieletu, jakimi są filamenty aktywne pozwala na ocenę stopnia zaawansowania procesu apoptozy, kiedy dochodzi do dezorganizacji wielu komponentów strukturalnych komórek. Reaktywne formy tlenu niszczą białka cytoszkieletu komórek, co z kolei może być sygnałem do wejścia w proces apoptozy. Bakterie z gatunku *L. delbrueckii* DSM 20074 oraz *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 wpływają na dezorganizację aktyny najprawdopodobniej poprzez wydzielanie nadtlaku wodoru. Natomiast szczep LGG działający protekcyjnie na komórki sprzyja wzmocnieniu i usieciowaniu filamentów aktywnych.

V. Dyskusja

V. DYSKUSJA

Obecnie zjawisko apoptozy komórek nabłonkowych jest wnikliwie badanym procesem, gdyż jego zaburzenia obserwowane są w przebiegu wielu chorób rozrostowych i zapalnych. Powstawanie i podtrzymywanie przewlekłych procesów zapalnych wiąże się ściśle z apoptozą komórek. Zaburzenie procesu programowanej śmierci w przebiegu zapalenia może także wpłynąć na powstawanie nowotworów. Etiopatogeneza przewlekłych chorób zapalnych śluzówki jelit i pochwy nie jest do końca poznana. Postuluje się znaczący udział komensalnej i patogennej flory danego narządu objętego zapaleniem. Przykładem może być przewlekła postać zapalenia pochwy tzw. waginoza bakteryjna, w której obserwuje się przerost beztlenowej flory bakteryjnej. Brak skutecznego leczenia zapobiegającemu nawrotom tej choroby skłania do szukania rozwiązań wspierających profilaktykę.

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* stanowią istotny składnik flory komensalnej w wielu narządach wyścielonych nabłonkiem. Popularne jest ich spożywanie po antybiotykoterapii jako środek wspomagający odnowę prawidłowej flory bakteryjnej. Istnieje wiele prac potwierdzających wpływ różnych gatunków tych bakterii na komórki układu immunologicznego (249). Brak jednak w literaturze jednoznacznych danych dotyczących bezpośredniego wpływu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na funkcjonowanie tkanki nabłonkowej ludzkiego organizmu.

Proces apoptozy jest jednym z istotnych czynników wpływających na homeostazę tkanki, który mógłby być sterowany poprzez obecność *Lactobacillus*. W przypadku profilaktyki nowotworów flora jelit i pochwy może mieć duże znaczenie ze względu na ścisły kontakt bakterii z komórkami nabłonka i możliwy wpływ na apoptozę. Postępująca komercjalizacja i ogólna dostępność różnych szczepów tych bakterii, a także niepełny zasób wiedzy na temat wpływu *Lactobacillus* na nabłonek skłoniły mnie do napisania tej pracy.

Celem niniejszej pracy doktorskiej był przegląd różnych gatunków lub szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* pod względem zdolności do wpływania na proces apoptozy oraz oddziaływania na organizację cytoszkieletu komórek nabłonkowych. Przeprowadzone badania *in vitro* miały głównie na celu określenie wpływu szczepów *Lactobacillus* na fenotyp komórki nabłonkowej ulegającej apoptozie. Poziom aktywacji kaspaz w różnych typach komórek okazał się ściśle zależny od szczepu bakterii lub czynnika przez nie wydzielanego. Sumując procent komórek znajdujących się w tzw. fazie apoptozy późnej z uszkodzoną błoną oraz komórek w fazie apoptozy wczesnej z zachowaną ciągłością błony można wysunąć pewne wnioski.

W przypadku komórek linii nowotworowej HT-29 nasilniejszy efekt bójczy obserwowany był w przypadku działania żywego szczepu *L. gasseri* DSM 20243 – kaspazy zostały aktywowane

w ponad 70% komórek na które działał ten szczep. Komórki nekrotyczne stanowiły znikomy procent. Podobny, istotnie statystyczny efekt wywierał szczep *L. delbrueckii* DSM 20074 aktywujący kaspazy w 60% komórek. Działanie supernatantu tego szczepu skutkowało 55% komórek apoptotycznych. Czysty nadtlenek wodoru aktywował kaspazy u 41% komórek. Staurosporyna będąca lekiem antynowotworowym wywołała efekt apoptotyczny u ponad 43% komórek. Inkubacja ze szczepem *L. acidophilus* CNBL 1007 wywołała apoptozę u 30% komórek. Wyżej wymienione szczepy *Lactobacillus* w warunkach dostępności tlenu produkują określone ilości nadtlenu wodoru, który jak wiadomo (43) działa proapoptotycznie na komórki i ze względu na swoje właściwości chemiczne może łatwo stać się sygnałem do aktywacji kaspaz. Najwyższe stężenia nadtlenu wodoru, do poziomu 1,06mM czystego nadtlenu produkowały dwa szczepy *L. delbrueckii* DSM 20074 oraz *L. gasseri* DSM 20243. Porównanie powyższych wyników wskazuje, iż efekt bójczy pochodzący od tych szczepów częściowo można tłumaczyć wydzielaniem tej substancji przez szczep. Za tym efektem przemawia także fakt, iż dodanie katalazy rozkładającej nadtlenek wodoru do czystego chemicznie związku lub supernatantu hodowli szczepu znosiło całkowicie efekt bójczy. Ponieważ dodanie katalazy do żywych bakterii *Lactobacillus* nie znosiło efektu apoptotycznego można sądzić, iż tylko częściowy efekt pochodził od nadtlenu wodoru. Natomiast, jednorazowe dodanie 0,3% katalazy mogło być niewystarczające do rozłożenia całego nadtlenu wodoru wydzielanego w sposób ciągły przez te bakterie. Niewykluczony jest także udział innych substancji i związków chemicznych, takich jak rozpuszczalne polisacharydy, kwasy organiczne lub lotne kwasy tłuszczowe wydzielane przez konkretne szczepy bakterii *Lactobacillus* (256). Fakt, iż termicznie zabite bakterie nie wpływały na apoptozę komórek dowodzi, iż jest to związek wydzielany przez żywe szczepy *Lactobacillus*.

W przypadku działania szczepów *L. fermentum* DSM 20052 oraz *L. reuteri* DSM 20016 poziom apoptozy wyniósł 20% komórek, ale nie była to wartość istotnie różna od kontroli. Po inkubacji ze szczepem *L. plantarum* ATCC 14431 oraz *L. casei* DSM 20021 suma komórek apoptotycznych utrzymywała się na poziomie 15% i 20%. Działanie szczepu *L. plantarum* ATCC 14431 dodatkowo charakteryzowało się wysoką nekrozą, ale wynik ten nie był istotny statystycznie. Szczepy te nie wydzielały nadtlenu wodoru, dlatego poziom apoptozy był stosunkowo niski, jej wartość zbliżona była do poziomu dla kontroli PBS, która wynosiła łącznie 13%. Podwyższony poziom aktywacji kaspaz dla tych prób mógł wynikać z braku surowicy i innych składników odżywczych potrzebnych komórce, a także w przypadku działania *Lactobacillus* spowodowany mógł być obecnością kwasów wydzielanych przez te bakterie.

Poziom apoptozy i nekrozy w przypadku szczepu *L. rhamnosus* GG był najniższy i porównywalny do kontroli negatywnej DMEM. Z pośród trzech badanych szczepów gatunku *L. rhamnosus* inkubacja z LGG okazała się najmniej wpływać na apoptozę komórek HT-29 in vitro. Pozostałe badane szczepy *L. rhamnosus*, jak szczep KL37, gdzie poziom łącznej apoptozy wyniósł aż 20% oraz szczep izolowany od myszy oznaczony symbolem „Szwecja”, okazały się mieć nieco silniejszy efekt bójący na komórki in vitro, ale nie różnił się statystycznie. Na podstawie różnej zdolności do wpływania na aktywność kaspaz można sądzić, iż właściwość ta może nie tylko zależeć od danego gatunku bakterii, ale także różnić się w obrębie szczepów tego samego gatunku. Niestety, nie udało się uzyskać istotnie większego poziomu aktywacji kaspaz w komórkach linii nowotworowych po dodaniu cytokiny TNF α i udowodnić protekcyjnego efektu LGG postulowanego w literaturze. (252) Dodanie LGG obniża poziom komórek apoptotycznych wywołany działaniem cytokiny z 14 do 10%. Brak znamiennej istotnych wyników dla antyapoptycznego działania LGG może wynikać z odmiennej czułości od prezentowanych w literaturze metod wykrywania apoptozy. Efekt antyapoptyczny LGG może być widoczny w przypadku działania *Streptococcus mitis*, który wywoływał całkowitą apoptozę na poziomie 30%, a po współinkubacji z LGG poziom ten zmniejszył się o połowę. W przypadku współdziałania *E. coli* i LGG nastąpił wzrost poziomu żywotności komórek o 7%. Współinkubacja LGG z *E. faecalis* poprawiła żywotność komórek linii HT-29 głównie wpływając na zmniejszenie poziomu nekrozy w hodowli. Podsumowując, efekt LGG na zmniejszenie poziomu apoptozy komórek linii HT-29 wywołanej przez cytokinę lub bakterie wydaje się, iż pewien wpływ protekcyjny zaistniał, lecz nie zmienił on istotności wyniku dla całej populacji komórek w hodowli. Badając apoptozę metodą określającą efekt aktywacji kaspaz trudno jest jednoznacznie potwierdzić dotychczasowe doniesienia dotyczące efektu antyapoptycznego tego szczepu. Efekt protekcyjny mógł zależeć od rodzaju czynnika wywołującego apoptozę oraz czasu inkubacji. Należy zaznaczyć, iż z pewnością jest to szczep bakterii, który nie wywoływał aktywacji kaspaz w komórkach linii nowotworowych. Potwierdziły to także badania dotyczące struktury cytoszkieletu filamentów aktynowych, na które szczep LGG działa protekcyjnie, podobnie jak inkubacja w pożywce DMEM z surowicą FBS.

Komórki linii HT-29 MTX produkują więcej śluzu niż komórki linii HT-29 nie traktowane metotreksatem. Badając wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na apoptozę tych komórek można stwierdzić, iż komórki pokryte grubszą warstwą śluzu są lepiej chronione przed apoptozą. Przykładem może być działanie *L. gasseri* DSM 20243, które obniżyło żywotność komórek HT-29 do poziomu 23%, a w przypadku tych samych komórek traktowanych metotreksatem żywotność wyniosła 63%. Podobnie w przypadku działania *L. fermentum* DSM 20052 żywotność

komórek traktowanych metoreksatem zwiększyła się o 20%. Nie zmieniła się wrażliwość hodowli na nadtlenek wodoru i działanie szczepu *L. delbrueckii* DSM 20074 produkującego najwyższe stężenie tego związku. Natomiast działanie katalazy na żywe szczepy *Lactobacillus* okazała się skuteczniej poprawiać żywotność średnio o około 25% w przypadku komórek HT-29 MTX. Zwiększona grubość śluzu pokrywającego komórki mogła zmniejszać efekt bójczy wywołany przez niższe stężenia nadtlenu wodoru oraz szczepy produkujące ten związek w stężeniu 0,6 mM i mniejszym. Nadtlenek wodoru i inne reaktywne formy tlenu oraz kwasy trudniej przenikają do komórki otoczonej grubszą otoczką śluzową stanowiącą swoisty płaszcz ochronny.

Komórki innej linii nowotworowej wywodzące się z raka okrężnicy CaCo-2 okazały się być wrażliwe na działanie *Lactobacillus* produkujących wysokie stężenia nadtlenu wodoru, które wywoływały całkowitą apoptozę na poziomie ponad 50% komórek. Dodanie katalazy nie zmniejszyło istotności tego wyniku, średnio obniżając poziom apoptozy o około 10%. Znamienne istotny wpływ na żywotność miały także szczepy nie wydzielające nadtlenu wodoru wywołujące wysoki poziom apoptozy lub nekrozy, jak w przypadku szczepu *L. plantarum* ATCC 14431. Dodanie LGG nie zmieniło istotności działania bakterii komensalnych i patogennych z wyłączeniem efektu *S. mitis*. Współinkubacja LGG wraz ze szczepem *S. mitis* powodowała znamienne poprawę żywotności poprzez redukcję zarówno poziomu apoptozy jak i nekrozy.

Wrażliwość na sygnał apoptotyczny pochodzący od *Lactobacillus* może zależeć od rodzaju linii na którą oddziałuje. Przykładem mogą być komórki linii A431 wywodzące się z raka sromu, które okazały się być szczególnie wrażliwe na działanie żywej bakterii *L. delbrueckii* DSM 20074. Poziom apoptozy w tej próbie sięgnął ponad 80%. Znamienne istotny wpływ na żywotność miały także szczepy *L. gasseri* DSM 20243 oraz *L. reuteri* DSM 20016. Rak sromu i pochwy występuje stosunkowo rzadko, co może wiązać się z podatnością tych komórek na proces apoptozy wywołanej bakteriami wydzielającymi nadtlenek wodoru stanowiącymi naturalną mikroflorę nabłonka pochwy.

Analizując wyniki dotyczące działania *Lactobacillus* na komórki nabłonkowe izolowane z jelit myszy, szczególnie uwidoczniła się niska przeżywalność tych komórek także w hodowli w medium z surowicą. Pomimo bardzo niskiej przeżywalności - ponad 30% komórek w czystym PBS - zaznaczył się wpływ gatunków *Lactobacillus* produkujących nadtlenek wodoru. Najwyższą apoptozę ponad 70% komórek obserwowano w przypadku działania *L. delbrueckii* DSM 20074, a inkubacja z *L. gasseri* DSM 20243 i *L. acidophilus* CNBL 1007 dała ponad 50% apoptozę. Sumaryczna apoptoza powstała wskutek oddziaływania z pozostałymi szczepami sięgała ponad 30%. Tak wysoka wrażliwość dla komórek izolowanych z jelit myszy w porównaniu z komórkami nowotworowymi mogła wynikać z niedoskonałości metody izolacji i hodowli. Oderwanie

komórki od jej pierwotnej macierzy międzykomórkowej, innych komórek czy błony podstawnej wywołuje apoptozę komórek prawidłowych. Niewystarczająca ilość składników odżywczych oraz niemożność zapewnienia prawidłowego podłoża do wzrostu tych komórek spowodowała znaczny spadek żywotności także w kontroli negatywnej PBS.

Analizując wpływ konkretnych szczepów na wartości żywotności, apoptozy lub nekrozy dla poszczególnych linii widać, iż działanie *L. delbrueckii* oraz innych szczepów produkujących nadtlenek wodoru nie zmienia się znacząco ($p > 0,05$). Podobnie niespecyficznym dla linii działa szczep LGG, jedynie wyniki dla kolonocytów pierwotnych odbiegają od pozostałych. Specyficzność dla żywotności linii wykazuje szczep *L. reuteri* DSM 20016, który działa znamienne różnie na poszczególne badane linie komórkowe ($p < 0,05$). W przypadku wyników dla apoptozy i nekrozy liniowo-zależne działanie wykazuje *L. fermentum* DSM 20052. Efekt apoptotyczny tego szczepu widoczny jest w przypadku działania na komórki linii A431, pierwotne kolonocyty, komórki CaCo-2, natomiast stosunkowo niską apoptozę wywołuje w komórkach linii HT-29 i HT-29 MTX.

Z dostępnych badań dotyczących oddziaływania *Lactobacillus* na apoptozę wynika, iż niektóre szczepy, takie jak LGG mogą wpływać hamująco na apoptozę wywołaną przez cytokiny np. $TNF\alpha$. (252) Większość prac dotyczących wpływu *Lactobacillus* na apoptozę komórek nabłonkowych opublikowanych w ostatnim pięcioleciu dotyczy głównie szczepu LGG i potwierdza jego antyapoptotyczne działanie. Szczep LGG hamuje *in vitro* wewnątrzkomórkową drogę aktywacji sygnału o apoptozie zainicjowaną przez cytokiny. Na dowód tego grupa badaczy zajmująca się tym tematem wyizolowała od szczepu LGG dwa białka o działaniu antyapoptotycznym. (253) W niniejszej pracy doktorskiej widoczny jest zdecydowanie nieapoptotyczny oraz protekcyjny efekt tego szczepu zarówno w przypadku działania cytokin, jak również w przypadku działania różnych gatunków bakterii patogennych działających bójezo na komórki nabłonkowe. Znamienne istotne działanie antyapoptotyczne udało się wykazać w przypadku bójezego wpływu bakterii *S. mitis*. Bardzo niski, porównywalny do kontroli negatywnej poziom aktywacji kaspaz poparty był efektem utrwalenia organizacji filamentów aktynowych wywołanych przez szczep LGG.

Efekt protekcyjny LGG udowodniony został także w przypadku badań *in vivo* na zwierzętach i dotyczy głównie redukcji obszaru owrzodzenia w żołądkach szczurów wywołanego eksperymentalnie lub zniszczenia śluzówki spowodowanego przez alkohol. Podawanie LGG wykazało dawko-zależną i znaczącą redukcję owrzodzeń. Efekt ten tłumaczono zmniejszeniem częstości apoptozy w tkance oraz wzrostem tempa podziałów. Obserwowana była także wzmożona angiogeneza oraz fosforylacja receptora EGF. Szczep LGG u szczurów pojonych etanolem

wywoływał wzrost poziomu prostaglandyny E i wzrost wydzielania śluzu w śluzówce żołądka zwierząt. (259,260) W świetle powyższych danych działanie LGG może być wykorzystane do leczenia chorób spowodowanych zbyt wysokim indeksem apoptotycznym lub wzmożoną nekrozą jak na przykład owrzodzenia lub trudno gojące się rany. Natomiast kontrowersyjne może być stosowanie tego szczepu u osób zagrożonych chorobami nowotworowymi przewodu pokarmowego, gdzie może dojść do zahamowania procesu apoptozy i dalszego rozwoju guza wspomaganego przez protekcyjne działanie tego szczepu. Powyższe wyniki są oparte głównie na eksperymentach *in vitro* i wymagają dalszych badań *in vivo*, które powinny dostarczyć danych dotyczących bezpieczeństwa stosowania szczepów *Lactobacillus*.

Szczepy *Lactobacillus* wydzielające nadtlenek wodoru mogą spełniać regulacyjną rolę w podtrzymywaniu homeostazy nabłonka poprzez inicjację procesu apoptozy i eliminację komórek wadliwych. Antyproliferacyjne działanie gatunku *L. delbrueckii* potwierdza praca dotycząca wpływu ekstraktu cytoplazmatycznego dwóch różnych szczepów na komórki *in vitro* w tym także linie nowotworowe i fibroblasty rybie. Apoptotycznym działaniem wykazał się szczególnie jeden z badanych ekstraktów cytoplazmatycznych szczepu *L. delbrueckii* LDL. Autorzy pracy nie rozważają jednak przyczyny takiego działania ekstraktu i ewentualnej roli nadtlenu wodoru wydzielanego przez te szczepy. (261)

Dostępne prace dotyczące oddziaływania termicznie zabitych szczepów z rodzaju *Lactobacillus* wskazują na skuteczne proapoptotyczne działanie rozpuszczalnego polisacharydu uzyskanego z termicznie zabitego szczepu *L. acidophilus* 606 na komórki linii HT-29. Wyniki ukazane w niniejszej pracy doktorskiej dotyczące działania termicznie zabitych szczepów nie potwierdziły znamienne proapoptotycznego efektu któregośkolwiek ze szczepów badanych. Jednak działanie szczepu *L. acidophilus* CNBL 1007 zarówno żywego, jak i zabitego cechuje spadek żywotności aż do około 70% w przypadku komórek HT-29 MTX. Śmierć większości komórek spowodowana działaniem martwego szczepu *L. acidophilus* CNBL 1007 odbyła się na drodze nekrozy, bez aktywacji kaspazy. Do badania poziomu apoptozy komórek HT-29 wywołanej termicznie zabitym szczepem *L. acidophilus* 606 opisywanego w artykule posłużono się metodą wykrywania uszkodzeń błony komórkowej tylko za pomocą jodku propidyny, co nie pozwala jednoznacznie odróżnić komórek nekrotycznych od apoptotycznych. Możliwe jest także zróżnicowanie działania bójczonego w obrębie tego samego gatunku bakterii *L. acidophilus*. (256)

Badania *in vivo* dotyczące działania *L. fermentum* na enterocyty świń hodowanych w warunkach jałowych (ang. germ-free) pokazują, iż poziom kaspazy-3, ligandu Fas oraz produkcja TNF α nie zwiększyła się pod wpływem podawania monokultury *L. fermentum*. Wyniki porównywano do działania szczepu *E. coli* podawanego jałowym zwierzętom, pod wpływem

którego obserwowano wzrost ekspresji TLR2, TNF α , FasL, a także wzmożoną aktywację kaspazy-3 w badanej tkance. (262) Komórki linii nowotworowej HT-29 opisane w tej pracy doktorskiej wykazywały nieznacznie istotny poziom apoptozy pod wpływem działania *L. fermentum* DSM 20052 w porównaniu do działania szczepów *Lactobacillus* produkujących nadtlenek wodoru lub szczepów patogennych, a także *E.coli*. Jednakże proapoptotyczne działanie *L. fermentum* DSM 20052 widoczne jest w przypadku działania na linię CaCo-2 oraz komórki wyizolowane z jelit mysich.

Powyższe wyniki zdają się potwierdzać hipotezę G. Bauera dotyczącą regulacyjnego działania bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wydzielającego nadtlenek wodoru. Szczepy z gatunku *L. delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. acidophilus* należą do często spotykanych komponentów prawidłowej flory pochwy i poprzez wydzielanie nadtlenu wodoru mogą wpływać proapoptotycznie na komórki nabłonka pochwy w tym także na komórki nowotworowe. Komórki linii A431 okazały się szczególnie wrażliwe na działanie nadtlenu wodoru i szczepów *Lactobacillus* wydzielających ten związek, co może potwierdzać proapoptotyczną, regulacyjną rolę szczepów *Lactobacillus* produkujących nadtlenek wodoru w środowisku nabłonka pochwy.

Badanie efektu apoptotycznego, jakim jest degradacja genomowego DNA komórek nie potwierdziła jednoznacznie proapoptotycznego efektu jakiegokolwiek czynnika poza staurosporyną, gdzie obraz tzw. „drabinki DNA” jest dobrze widoczny. Inkubacja komórek linii nowotworowych jelit i pochwy wraz ze szczepami *Lactobacillus* i produktami metabolizmu wywołała także proces nekrozy, podczas którego obserwuje się nieregularne cięcia DNA. Współistnienie dwóch różnych procesów prowadzących do śmierci komórki oraz możliwa obecność DNA bakterii mogła spowodować zamazanie typowego dla procesu apoptozy obrazu drabinki DNA.

Florę dominującą zdrowych jelit człowieka stanowią bakterie beztlenowe, ale w stanach patologicznych, takich jak przewlekłe zapalenia jelit może dojść do zredukowania bioróżnorodności flory i dominacji bakterii tlenowych. (263) Obecne w środowisku śluzówki jelit bakterie z rodzaju *Lactobacillus* zdolne do produkcji nadtlenu wodoru mogłyby zwiększyć wydzielanie tego związku pod wpływem warunków stanu zapalnego i lokalnych wzrostów stężenia tlenu w tkance wywołanej wybuchem tlenowym pochodzącym od aktywowanych komórek układu immunologicznego. (264) Oddziaływanie bakterii z rodzaju *Lactobacillus* mających efekt proapoptotyczny na komórki nowotworowe byłoby korzystne dla homeostazy w tkance zmienionej zapalnie, gdzie może dojść do transformacji nowotworowych i powstania guza. Z drugiej jednak strony nadmierny wzrost proapoptotycznych gatunków *Lactobacillus* sprzyjać może nadmiernej apoptozie komórek prawidłowych i przyczynić się do powstania owrzodzeń. Efekt *in vivo*

proapoptycznych jak i antyapoptotycznie działających szczepów z rodzaju *Lactobacillus* powinien być wnikliwie zbadany w celach doboru optymalnie działającego szczepu dla danego schorzenia. W świetle powyższych badań i konkluzji konieczne jest zweryfikowanie wpływu komercyjnie dostępnych szczepów z rodzaju *Lactobacillus* na apoptozę komórek nabłonkowych *in vivo*. Lepsze poznanie efektów działania probiotyków pozwala na optymalizację leczenia stanów zapalnych i ewentualną profilaktykę nowotworów przy doborze odpowiedniego szczepu o konkretnych właściwościach. Wiedza przedstawiona w prezentowanej pracy doktorskiej dotycząca wpływu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na apoptozę komórek *in vitro* może stanowić dobry wstęp do dalszych testów *in vivo*.

VI. WNIOSKI:

1. W oddziaływaniu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na większość opisywanych linii można wyróżnić trzy grupy:

- ❖ proapoptotyczną, produkującą różne stężenia nadtlenu wodoru działającą znamienne istotnie, do której należą szczepy *L. delbrueckii* DSM 20074, *L. gasseri* DSM 20243 oraz *L. acidophilus* CNBL 1007,
- ❖ działającą proapoptotycznie, ale na poziomie nieznamienne różniącym się od kontroli: szczepy *L. reuteri* DSM 20016, *L. fermentum* DSM 20052, *L. plantarum* ATCC 14431
- ❖ antyapoptotyczną obniżającą poziom apoptozy wywołanej innymi czynnikami, jak patogeny lub cytokina. Do ostatniej grupy można zaliczyć szczep *L. casei* DSM 20021 oraz *L. rhamnosus* ATCC 53103, który znamienne poprawia żywotność komórek traktowanych *Streptococcus mitis*.

2. Poziom wywołanej apoptozy przez określony czynnik może ulegać zmianie w zależności od typu komórek lub rodzaju linii komórkowej. Efekt aktywacji kaspaz znamienne różniący się w odmiennych typach komórek szczególnie widoczny jest przypadku działania *L. reuteri* DSM 20016 oraz *L. fermentum* DSM 20052.

3. Aktywacja kaspaz i inicjacja procesu apoptozy przez szczepy działające proapoptotycznie koreluje ze zniszczeniem uporządkowanych struktur filamentów aktynowych. Za to działanie odpowiedzialny może być nadtlenek wodoru wydzielany przez szczepy *Lactobacillus*. Wpływ na filamety aktynowe potwierdza ochronne działanie LGG, w różnych typach komórek, gdzie ich struktura nie zmienia się.

VII. STRESZCZENIE

Apoptoza, zwana także programowaną śmiercią komórki jest podstawowym fizjologicznym procesem utrzymującym homeostazę tkanki. Zaburzenia tego procesu obserwowane są w wielu procesach rozrostowych i zapalnych, w tym także w chorobach nowotworowych. Czynniki takie jak cytokiny, wolne rodniki tlenowe, czy niedotlenienie komórek mogą mieć istotny wpływ na proces apoptozy. Bakterie komensalne i patogenne będące w ścisłym kontakcie z tkanką nabłonkową jelit i pochwy mogą wpływać na jej homeostazę, w tym także na apoptozę komórek. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* należą do grupy bakterii komensalnych i potencjalnie mogą być zastosowane jako szczepy probiotyczne. Ich wpływ na apoptozę komórek nabłonkowych jelit i pochwy *in vitro* był celem przedstawionej pracy doktorskiej.

W celu zbadania wpływu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na apoptozę wybrano gatunki bakterii najczęściej spotykane w opisach literaturowych oraz szczepy stosowane jako probiotyki. Przy doborze testowanych gatunków kierowano się zdolnością do wydzielania bójczej substancji, jaką stanowi nadtlenek wodoru. Działanie szczepów *Lactobacillus* i ich metabolitów testowano głównie na liniach nowotworowych reprezentujących nabłonek danego narządu, jak linie HT-29, CaCo-2, A431 oraz komórki pierwotne wyizolowane z jelit myszy. Procentowy udział w apoptozie i nekrozie dla poszczególnych szczepów bakterii został zbadany poprzez określenie stopnia aktywacji kaspaz w komórkach nabłonkowych oraz uszkodzeń błony komórkowej. Jako badanie potwierdzające efekt apoptotyczny wykonano test elektroforetycznej drabinki DNA. Zbadano także wpływ poszczególnych gatunków na strukturę cytoszkieletu filamentów aktynowych.

Z pośród wielu wybranych szczepów *Lactobacillus* można wyodrębnić trzy różne grupy działające w sposób przeciwstawny. Do proapoptotycznie działających *Lactobacillus* należą głównie szczepy wydzielające nadtlenek wodoru oraz szczep *L. fermentum* DSM 20052 i *L. reuteri* DSM 20016 działające proapoptotycznie w przypadku niektórych typów komórek. Szczepy z gatunku *L. rhamnosus* ATCC 53103 oraz *L. casei* DSM 20021 nie wykazują się zdolnością do znaczącej aktywacji kaspaz w testowanych komórkach nowotworowych. Dodatkowo szczep LGG wykazuje protekcyjne działanie w przypadku efektu apoptotycznego lub nekrotycznego wywołanego przez bakterie patogenne. Badanie cytoszkieletu aktynowego potwierdza protekcyjny efekt tego szczepu, a także destrukcyjne działanie szczepów produkujących nadtlenek wodoru.

SUMMARY

Apoptosis, called programmed cell death, is one of the main physiological processes that maintain tissue homeostasis. Apoptosis dysfunction can be observed in many pathological conditions like inflammation, cancer, etc. Cytokines, reactive oxygen species, hypoxia can initiate programmed cell death. Pathogen and commensal bacteria are in close contact with epithelial tissue and they can influence apoptotic pathways. The *Lactobacillus* species that are potential probiotic strains can also be important in maintaining tissue balance. They can secrete several different substances that can act on programmed cell death. The aim of this doctoral dissertation was the effect of different *Lactobacillus* strains on epithelial cells apoptosis. Apoptosis of cell line HT-29, CaCo-2, A431 and mouse primary colonocytes was tested. Potentially probiotic and hydrogen peroxide producing *Lactobacillus* strains and their supernatants have been chosen for these experiments.

The level of activated caspases and cell membrane damage has been estimated by flow cytometry. Fluorescent FAM-VAD-FMK caspase inhibitor and propidium iodide have been used to distinguish apoptosis from necrosis. Apoptotic pathway was confirmed by DNA ladder electrophoresis. Changes of the actin filaments structure have been observed after *Lactobacilli* incubation have been performed.

Among many *Lactobacillus* strains chosen three different groups have isolated. *Lactobacilli* that produced and secreted hydrogen peroxide had proapoptotic influence on cancer cell lines and primary colonocytes. Apoptotic fate of the some cells has been observed after incubation with *L. fermentum* and *L. reuteri*, but in most cases *Lactobacilli* that did not secrete hydrogen peroxide did not have significant influence on caspases activation in vitro. Some of the strains can even protect from the apoptotic process initiated by pathogen and proapoptotic substances. Protective effect of these H₂O₂ non-producing *Lactobacilli* can also be seen in case of actin filaments cytoskeleton. Addition of hydrogen peroxide producing *Lactobacilli* or their supernatant resulted in destruction of actin filaments and the loss of cell shape and contact.

The purpose of this work was to better understand the role of *Lactobacillus* as commensal bacteria and their role in tissue homeostasis. Better understanding the role of *Lactobacillus* strains can result in improved prophylactic effect of probiotics.

VIII. Załączniki

Wykaz rycin i tabel

Rycina 1. Schemat przedstawiający podstawowe szlaki sygnału i białka decydujące o apoptozie komórki

Rycina 2. Przykładowe wyniki z cytometru przepływowego pokazujące stopień aktywacji kaspaz oraz uszkodzenie błony komórkowej komórek linii HT-29 pod wpływem danego czynnika. Wykres opisujący zależność SSC-H(FSC-H) dla badanej populacji komórek HT-29 -a. Zależności FL2(FL1) wraz z statystyką dla danej próby odczytanej na podstawie wyników w poszczególnych kwadrantach (ramka obok): b - próba ślepa niebarwiona, c - kontrola DMEM, d- 1uM staurosporyny, e - komórki traktowane *L.delbrueckii* DSM 20074, f - komórki traktowane *L. rhamnosus* GG ATCC 53103

Rycina 3. Wpływ czasu ekspozycji 1 uM staurosporyny na apoptozę komórek nabłonkowych linii A431,

Rycina 4. Wpływ zadanej liczby bakterii *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 na procent komórek apoptotycznych linii A431 po 24 godzinach

Rycina 5. Wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i ich metabolitów na komórki linii HT-29, n=3

Rycina 6. Wpływ bakterii komensalnych, patogennych i cytokin na komórki linii HT-29, n=3

Rycina 7. Wpływ martwych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na apoptozę komórek linii HT-29, n=2

Rycina 8. Wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i ich metabolitów na komórki linii HT-29MTX, n=3

Rycina 9. Wpływ martwych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na komórki linii HT-29 MTX, n=2

Rycina 10. Wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz ich metabolitów na komórki linii CaCo-2, n=2

Rycina 11. Wpływ bakterii komensalnych, patogennych i cytokin na komórki linii CaCo-2, n=2

Rycina 12. Wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na komórki nabłonkowe wyizolowane z jelit mysich, n=2

Rycina 13. Wpływ bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz ich metabolitów na komórki linii A431, n=3

Rycina 14. Komórki linii HT –29 wybarwione fluorescencyjnym inhibitorem aktywnych kaspaz (FITC – kolor zielony), odczynnikiem Hoechst (niebieski) i jodkiem propidyny (czerwony). Analizowane w Olympus Fluorescent Microscope, w obiektywie immersyjnym, powiększenie 1000x.

a – kontrola negatywna - DMEM 10% FBS

b – komórki traktowane bakteriami *Lactobacillus gasseri* DSM 20243

c – komórki traktowane żywym bakteriami *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103

d – komórki traktowane żywym bakteriami *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074

Rycina 15. Komórki linii HT –29 MTX wybarwione fluorescencyjnym inhibitorem aktywnych kaspaz (FITC – kolor zielony), odczynnik Hoechst (niebieski) i jodkiem propidyny (czerwony). Analizowane w Olympus Fluorescent Microscope, w obiektywie immersyjnym, powiększenie 1000x.

a – kontrola negatywna - DMEM 10% FBS

b – komórki traktowane bakteriami *Lactobacillus gasseri* DSM 20243

c – komórki traktowane żywym bakteriami *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103

d – komórki traktowane żywym bakteriami *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074

Rycina 16. Fotografia przedstawiająca rozdział elektroforetyczny wyizolowanych fragmentów DNA z komórek linii HT-29 oraz A431, numery linii odpowiadają poszczególnym wariantom eksperymentu:

1. komórki linii A431 rosnące w pożywce DMEM z 10% surowicą FBS,
2. komórki linii A431 traktowane 1 uM staurosporyny przez 24 godziny,
3. komórki linii HT-29 rosnące w pożywce DMEM z 10% surowicą FBS,
4. komórki linii HT-29 traktowane 1 uM staurosporyny przez 24 godziny,
5. komórki linii A431 traktowane 2 uM staurosporyny przez 24 godziny,
6. komórki linii HT-29 traktowane 2 uM staurosporyny przez 24 godziny,

7. komórki linii HT-29 traktowane 1,06 mM nadtlenku wodoru przez 24 godziny
8. komórki linii HT-29 inkubowane w PBS przez 24 godziny,
9. komórki linii HT-29 traktowane żywymi bakteriami *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 przez 24 godziny
10. komórki linii A431 traktowane żywymi bakteriami *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 przez 24 godziny
11. komórki linii HT-29 traktowane żywymi bakteriami *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 przez 24 godziny
12. komórki linii A431 traktowane żywymi bakteriami *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 przez 24 godziny
13. komórki linii HT-29 traktowane żywymi bakteriami *Lactobacillus acidophilus* CNBL 1007 przez 24 godziny
14. komórki linii A431 traktowane żywymi bakteriami *Lactobacillus acidophilus* CNBL 1007 przez 24 godziny
15. komórki linii HT-29 traktowane żywymi bakteriami *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 przez 24 godziny

Rycina 17. Zmiany w strukturze filamentów aktynowych komórek linii A431 pod wpływem bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, a-kontrola DMEM, b- staurosporyna 1 μ M, c-H₂O₂ 1,06 mM, d- *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074, e- *Lactobacillus gasseri* DSM 20243, f- *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103

Rycina 18. Zmiany w strukturze filamentów aktynowych komórek linii HT-29 pod wpływem bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, a-kontrola DMEM, b- staurosporyna 1 μ M, c- H₂O₂ 1,06 mM, d-*Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074, e- *Lactobacillus gasseri* DSM 20243, f- *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103

Tabela 1. Ilość wydzielanego nadtlenku wodoru w warunkach tlenowych w 4 godzinnej hodowli w PBS

IX. Piśmiennictwo:

1. A. G. Renhan, C. Booyh, Ch. S. Potten What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001,
2. Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000;301:5–17.
3. White MK, Cinti C. A morphologic approach to detect apoptosis based on electron microscopy. *Methods Mol Biol.* 2004;285:105–11
4. Zucker RM, Hunter ES 3rd, Rogers JM. Confocal laser scanning microscopy of morphology and apoptosis in organogenesis-stage mouse embryos. *Methods Mol Biol.* 2000;135:191–202.
5. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000;407:784–8.
6. Reddien PW, Cameron S, Horvitz HR. Phagocytosis promotes programmed cell death in *C. elegans*. *Nature.* 2001;412:198–202
7. Lang RA, Bishop JM. Macrophages are required for cell death and tissue remodeling in the developing mouse eye. *Cell.* 1993;74:453–62.
8. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol.* 2003;171:4672–9.
9. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.* 1997;185:1481–6.
10. Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene.* 1997;15:1573–81.
11. Kressel M, Groscurth P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res.* 1994;278:549–56.
12. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995;146:3–15.
13. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res.* 2003;283:1–16.
14. Schwartz LM, Smith SW, Jones ME, Osborne BA. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:980–4
15. Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol.* 1997;25:82–8.

16. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide – ranging implications in tissue kinetics *Br J Cancer* 1972
17. Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet.* 1998;14:410–6.
18. Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 1999;59:1701s–1706s
19. Cohen JJ. Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol.* 1991;50:55–85
20. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Cellular pathology I: cell injury and cell death. In: Cortan RS, Kumar V, Collins T. *Robbins Pathologic Basis of Disease.* WB. Saunders Co; Philadelphia, PA: 1999. pp. 1–29
21. Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology.* 2002;181–182:471–4.
22. Opferman JT, Korsmeyer SJ. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol.* 2003;4:410–5.
23. Osborne BA. Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Curr Opin Immunol.* 1996;8:245–54
24. Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJ. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology.* 1991;129:2799–801.
25. Kim JK, Lee CJ, Song KW, Do BR, Yoon YD. Gamma-radiation accelerates ovarian follicular atresia In immature mice In vivo 1999
26. Vallat L, Magdelenat H, Merle-Beral H, Masdehors P, Potocki de Montalk G, Davi F, Kruhoffer M, Sabatier L, Orntoft TF, Delic J. The resistance of B-CLL cells to DNA damage-induced apoptosis defined by DNA microarrays. *Blood.* 2003;101:4598–606.
27. Lorenz-Meyer S, Schaper J. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:197–208.
28. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998;281:1305–8
29. Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandenabeele P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58:356–70.
30. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:601–17.
31. Fernandes RS., Cotter TG. Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. *Biochem Pharmacol.* 1994 Aug 17;48(4):675-81

32. Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Metelev V, Pardee AB. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science*. 1995;268:429–31.
33. Nijhawan D, Honarpour N, Wang X. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci*. 2000;23:73–87.
34. Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevet D, Kuan CY, Rakic P. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci*. 2001;21:4752–60.
35. Volbracht C, Leist M, Kolb SA, Nicotera P. Apoptosis in caspase-inhibited neurons. *Mol Med*. 2001;7:36–48
36. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980;284:555–6.
37. Thomson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-1462
38. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 1994;73:2013–26.
39. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:277–88\
40. Hall P, Coates PJ, Ansari B. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis *J. Cell Sci*. 1994 107: 3565- 77
41. Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*. 1995 Jan;146(1):56-66.
42. Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998;30:1019–30
43. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*. 1999;18:7719–30.
44. Harman D. Role of free radicals in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;673:126–41.
45. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407:770–6
46. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997;326(Pt 1):1–16.
47. Susin SA, Dugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*. 2000;192:571–80.

48. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases *Trends Biochem.* 1997 22: 299–306
49. Thornberry NA. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem. Biol.* 1998;5:R97–R103
50. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.* 2001;276:7320–6.
51. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003;15:725–731
52. Salvesen GS, Abrams JM. Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene* 2004 23: 2774–2784.
53. Boatright KM, A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell.* 2003;11:529–541
54. Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia.* 1999;1:5–15
55. Zou H, et al. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 1999;274:11549–11556.
56. Srinivasula SM, et al. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell.* 1998;1:949–957.
57. Zou H, et al. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 1997;90:405–413.
58. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol.* 1998;10:545–51.
59. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science.* 2002;296:1635–6.
60. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104:487–501.
61. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell.* 1995;81:495–504.
62. Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity.* 1998;8:297–303.
63. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J.* 1995;14:5579–88.
64. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998;94:491–501.
65. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Fas triggers an alternative, caspase-8 independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule *Nat. Immunol* 2000 1:489-95

66. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 2006;13:1423–33
67. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol.* 2000;2:156–62
68. Lazebnik YA, et al. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature.* 1994;371:346–347.
69. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 1997;278:294–8.
70. Martin SJ, et al. Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1995;270:6425–6428.
71. Gervais FG, et al. Caspases cleave focal adhesion kinase during apoptosis to generate a FRNK-like polypeptide. *J. Biol. Chem.* 1998;273:17102–17108.
72. Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD, Wong WW. Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem.* 1997;272:9677–9682.
73. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998;391:43–50
74. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 1998;391:96–9.
75. Enari M, et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD *Nature.* 1998;391:43–50.
76. Fischer Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates 2003
77. Lassus P, Opitz-Araya X & Lazebnik Y. Requirement for Caspase-2 in Stress-Induced Apoptosis Before Mitochondrial Permeabilization (2002) *Science* 297: 1352–1354
78. Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A & Orrenius S. (1999) *Cell Death Differ.* 6: 644–651 Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis
79. Kang SJ, Wang S, Kuida K, Yuan J. Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ.* 2002;9:1115–25.

80. Fan TJ, Han LH, Cong RS, and Liang J. Caspase Family Proteases and Apoptosis, *Acta Biochim Biophys Sin* 2005;37: 71727
81. Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, LDeveraux QL, Reed JC. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13:239–52
82. Nollen EAA, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing ‘heat shock’ proteins. *J. Cell Sci.* 2002;115:2809–2816.
83. Freeman BC, et al. Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J.* 1995;14:2281–2292.
84. Mosser DD, et al. The chaperone function of Hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20:7146–7159.
85. Gabai VL, et al. Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22:3415–3424.
86. Ravagnan L, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.* 2001;3:839–843
87. Beere HM, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* 2000;2:469–475.
88. Lewis J, et al. Disruption of Hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor- κ B activation. *J. Biol. Chem.* 2000;275:10519–10526
89. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* 1988;335:440–2.2:647–56
90. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002;
91. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell.* 1995;80:285–91.
92. Breckenridge DG and Xue D (2004) Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 647–652

93. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. 1994;9:1799–805.
94. Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim. Biophys. Acta*. 2004; 1644:107–113.
95. Kluck RM, et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997;275:1132–1326.
96. Yang J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 1997;275:1129–1132.
97. Borne, J E Chipuk, L Bouchier-Hayes and D R Green Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario *Cell Death and Differentiation* (2006) 13, 1396–1402.
98. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1366:177–96
99. Luo X, et al. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998;94:481–490.
100. Arnoult D, Karbowski M, Youle RJ. Caspase inhibition prevents the mitochondrial release of apoptosis-inducing factor. *Cell Death Differ*. 2003;10:845–849
101. Verhagen AM, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000;102:43–53.
102. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 2001;29:684–8
103. Yamagishi, S., Inagaki, Y., Kikuchi, S. Nifedipine inhibits tumor necrosis factor- α -induced monocyte chemoattractant protein-1 overexpression by blocking NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species generation. *Drugs Exp. Clin. Res*. 2003 29,147-152,
104. Devadas, S., Hinshaw, J. A., Zaritskaya, L., Williams, M. S. Fas-stimulated generation of reactive oxygen species or exogenous oxidative stress sensitize cells to Fas-mediated apoptosis. *Free Radic. Biol. Med*. 2003 35,648-661,
105. Suzuki, Y., Ono, Y., Hirabayashi, Y. Rapid and specific ROS generation via NADPH oxidase activation during Fas-mediated apoptosis. *FEBS Lett*. 1998 425,209-212.

106. Clement, M. V., Stamenkovic, I. Superoxide anion is a natural inhibitor of FAS-mediated cell death. *EMBO J.* 1996 15,216-225.
107. Clement, M. V., Pervaiz, S. Intracellular superoxide and hydrogen peroxide concentrations: a critical balance that determines survival or death. *Redox Rep.* 2001 6,211-214.
108. Matthews, N., Neale, M. L., Jackson, S. K., Stark, J. M. Tumour cell killing by tumour necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. *Immunology* 1987 62,153-155 .
109. Lee, M. W., Park, S. C., Kim, J. H., Kim, I. K., Han, K. S., Kim, K. Y., Lee, W. B., Jung, Y. K., Kim, S. S. The involvement of oxidative stress in tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in HeLa cells. *Cancer Lett.* 2002 182,75-82
110. Deshpande, S. S., Angkeow, P., Huang, J., Ozaki, M., Irani, K. Rac1 inhibits TNF-alpha-induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by ROS. *FASEB J.* 2000 14,1705-1714.
111. Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R et al. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 1995;5:392–399
112. Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992;13:151–153
113. Takada H, Chen NJ, Mirsos C et al. Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses. *Mol Cell Biol* 2003;23:4026–4033.
114. Degtarev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 2003;22:8543–8567
115. Natoli G, Costanzo A, Ianni A et al. Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. *Cell Signal* 1997;275:200–203.
116. Devin A, Cook A, Lin Y et al. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 2000;12:419–429
117. Chen, G., Goeddel, D. V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002 296,1634-1635
118. Scaffidi C, Fulda S, Srnivasan A, Friesen C, Li F, Two CD95 (Apo-1/Fas)signaling pathways *EMBO J* 1998;17:1675-87
119. Kressel M, Groscurth P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res.* 1994;278:549–56.

120. Ramachandran A, Madesh M, Balasubramanian KA. Apoptosis in the intestinal epithelium: Its relevance in normal pathophysiological conditions. *J of Gastr Hepat.* 2000;15:109–20.
121. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res.* 2003;283:1–16.
122. Huang WP, Klionsky DJ. Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct Funct.* 2002;27:409–20.
123. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 2000;290:1717–21
124. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:211–6.
125. Takai H, Tominaga K, Motoyama N, Minamishima YA, Nagahama H, Tsukiyama T, Ikeda K, Nakayama K, Nakanishini M, Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1 (-/-) mice *Genes Dev* 2000 14:1439-47
126. Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol.* 2003;40:481–95.
127. Yankner BA Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 1996 16:921–932
128. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: Linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 2004, 117: 561-574
129. Evan G. Cancer — a matter of life and cell death. *Int J Cancer.* 1997;71:709711.
130. Cotman CW, Su JH Mechanisms of neuronal death in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 1996 6:493–506
131. Estus S, Tucker HM, van Rooyen C, Wright S, Brigham EF, Wogulis M, Rydel RE Aggregated amyloid- β protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J Neurosci* 1997 17:7736–7745
132. Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces ER stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem* 2003, 278: 91009106
133. Nakagawa T, Yuan JY. Cross-talk between two cysteine protease families: Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 2000, 150: 887894
134. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM, Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂ and PAF *J Clin Invest* 1998 101: 890-8

135. Grimsley C., Ravichandran KS., Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, do not eat-me, and come-get-me signals, *Trends Cell Biol* 2003; 13:648-56
136. Takahasi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S, Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand *Cell* 1994
137. Ayala A, Lomas JL, Grutkoski PS, Chung CS. Pathological aspects of apoptosis in severe sepsis and shock? *Int J Biochem & Cell Biol.* 2003;35:7–15.
138. Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Coopersmith CM, Karl IE. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathway. *J Immunol.* 2005;174
139. Chung CS, Xu YX, Wang W, Chaudry IH, Ayala A. Is Fas ligand or endotoxin responsible for mucosal lymphocyte apoptosis in sepsis? *Arch Surg.* 1998;133:1213–1220
140. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukocyte Biol.* 2005;25:325–337.
141. Coopersmith CM, Stromberg PE, Dunne WM, Davis CG, Amiot IDM, Buchman TG, Karl IE, Hotchkiss RS. Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis. *JAMA.* 2002;287:1716–1721
142. Chung CS, Song GY, Lomas J, Simms HH, Chaudry IH, Ayala A. Inhibition of Fas/Fas ligand signaling improves septic survival: differential effects on macrophage apoptotic and functional capacity. *J Leukoc Biol.* 2003;74:344–351
143. Bommhardt U, Chang KC, Swanson PE, Wagner TH, Tinsley KW, Karl IE, Hotchkiss RS. Akt decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol.* 2004;172:7583–7591.
144. Rice TW, Bernard GR. Therapeutic interventions and targets for sepsis. *Annual Review Medicine.* 2005;56:225–248
145. Pedraza-Fariña LG Cancer Issue Mechanisms of Oncogenic Cooperation in Cancer Initiation and Metastasis. *Yale J Biol Med.* 2006 December; 79(3-4): 95–103.
146. Strasser A., Harris A.W., Bath M.L., Cory S. (1990) Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348:331–333)
147. Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene.* 2004;23:2809–2818.
148. Guroff, G. *Oncogenes, genes, and growth factors.* New York: Wiley; 1987.

149. Ouyang H., Furukawa T., Abe T., Kato Y., Horii A. (1998) The BAX gene, the promoter of apoptosis, is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach, and endometrium. *Clin. Cancer Res.* 4:1071–1074
150. Uren A.G., O'Rourke K., Aravind L.A., Pisabarro M.T., Seshagiri S., Koonin E.V., Dixit V.M. (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol. Cell* 6:961–967
151. Soengas M.S., Capodieci P., Polsky D., et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001 409:207–211)
152. Satoh K., Kaneko K., Hirota M., Toyota T., Shimosegawa T. The pattern of CPP32/caspase-3 expression reflects the biological behavior of the human pancreatic duct cell tumors. *Pancreas* 2000 21:352–357
153. Stupack D.G., Teitz T., Potter M.D., Mikolon D., Houghton P.J., Kidd V.J., Lahti J.M., Cheresch D.A. 2006 Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature* 439:95–99
154. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:489–501.
155. Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:649–683
156. Rayet B, G elinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer *Oncogene.* 1999 Nov 22;18(49):6938-47.
157. Merritt A.J. Differential expression of bcl-2 in intestinal-epithelia correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia *J. Cell Science* 108 :2261-71
158. Frisch SM, Francis H Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* 1994 Feb;124(4):619-26.
159. Ruifrok AC, Mason KA, Lozano G, Thames HD, Spatial and temporal patterns of expression of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and transforming growth factor beta 1-3 and their receptors in mouse jejunum after radiation treatment *Radiat. Res* 1997 147:1-12
160. Guy-Grand D, DiSanto JP, Henchoz P, Malassis – Seris M, Vassali P, Small bowel enteropathy Role of intraepithelial lymphocytes and cytokines (Il-12, IFN- gamma, TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal *Eur. J. Immunol* 1998 28 730-44

161. Ina K, Itoh J, Fukushima K Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance *J Immunol* 1999 163 1081-90
162. Ueyama H, Kiyohara T, Sawada N, Isozaki K, Kitamura S, Kondo S, Miyagawa J, Kanayama S, Shinomura Y, Ishikawa H, Ohtani T, Nezu R, Nagata S, Matsuzawa Y. High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis. *Gut*. 1998 Jul;43(1):48-55
163. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 2007 Jan;56(1):61-72. Epub 2006 Jul 5
164. Danese S. Inflammatory bowel disease and inflammation-associated colon cancer: partners in crime. *Curr Drug Targets*. 2008 May;9(5):360,
165. Hussain, S.P., Hofseth, L.J. and Harris, C.C. (2003) Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 276–285
166. Fruehauf JP, Meyskens FL Jr. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 1;13(3):789-94.
167. Sermeus A, Cosse JP, Crespín M, Mainfroid V, de Longueville F, Ninane N, Raes M, Remacle J, Michiels C. Hypoxia induces protection against etoposide-induced apoptosis: molecular profiling of changes in gene expression and transcription factor activity. *Mol Cancer*. 2008 Mar 26;7:27.
168. Lopez- Lazaro M Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett*. 2007 Jul 8;252(1):1-8.
169. World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A global perspective*. Washington, D.C.: American Institute for Cancer Research, 1997.
170. Milner, JA. Molecular targets for bioactive food components. *J Nutr* 134:2492s–2498s, 2004.
171. Meyskens FL, Szabo E. Diet and cancer: the disconnect between epidemiology and randomized clinical trials. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1366–9
172. Ahmad N., et al. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J. Natl Cancer Inst*. 1997 89:1881–1886.

173. Khan N., et al. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res.* 2006;66:2500–2505
174. Gautam S., et al. (2000) Resveratrol selectively inhibits leukemia cells: a prospective agent for ex vivo bone marrow purging. *Bone Marrow Transplant* 25:639–645.
175. Hantz H., et al. (2005) Physiologically attainable concentrations of lycopene induce mitochondrial apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Exp. Biol. Med* 230:171–179
176. Somasundaram S., et al. (2002) Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer. *Cancer Res.* 62:3868–3875
177. Clement M., et al. (1998) Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* 92:996–1002
178. Hastak K., et al. Ablation of either p21 or Bax prevents p53-dependent apoptosis induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *FASEB J* 2005 19:789–791
179. Mahmoud N.N., et al. Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis* 2000 21:921–927
180. Goldin BR, Gorbach SL, The effect of milk and Lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity *Am J Clin Nutr* 1984 39 (5) 756-71
181. Batchelor, M., J. Guignot, A. Patel, N. Cummings, J. Cleary, S. Knutton, D. W. Holden, I. Connerton, and G. Frankel. Involvement of the intermediate filament protein cytokeratin-18 in actin pedestal formation during EPEC infection. *EMBO Rep.* 2004.5:104-109.
182. Crane, J. K., S. Majumdar, and D. F. Pickhardt III. Host cell death due to enteropathogenic *Escherichia coli* has features of apoptosis. *Infect. Immun.* 1999.67:2575-2584
183. Cornelis, G. R., and F. Van Gijsegem.. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000 54:735-774
184. Campellone, K. G., and J. M. Leong. Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003. 6:82-90.
185. Zychlinski A, Prevost MC, Sansonetti PJ, *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages *Nature* 1992 358: 167-9
186. Sansonetti PJ, Molecular and cellular mechanisms of invasion of the intestinal barrier by enteric pathogens The paradigm of *Shigella flexneri* *Folia Microbiol.* 1998 43: 239-36

187. Guiney DG. The role of host cell death in Salmonella infections *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;289:131-50.
188. Knodler LA, Finlay BB, Steele-Mortimer O. The Salmonella effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. *J Biol Chem.* 2005; 280: 9058-9064
189. Lai LC, Wainwright LA, Stone KD, Donnenberg MS A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. *Infect Immun.* 1997;65:2211–2217
190. Miraglia AG, Travaglione S, Meschini S, Falzano L, Matarrese P, Quaranta MG, Viora M, Fiorentini C, Fabbri A. Cytotoxic necrotizing factor 1 prevents apoptosis via the Akt/IkappaB kinase pathway: role of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *Mol Biol Cell.* 2007 Jul;18(7):2735-44. Epub 2007 May 16.
191. Boquet P. The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon.* 2001;39:1673–1680.
192. Fiorentini C., Falzano L., Travaglione S., Fabbri A. Hijacking Rho GTPases by protein toxins and apoptosis: molecular strategies of pathogenic bacteria. *Cell Death Differ.* 2003;10:147–152.
193. DeVinney R, Stein M, Reinscheid D, Abe A, Ruschkowski S, Finlay BB. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated *Infect Immun.* 1999 May;67(5):2389-98
194. Juris SJ, Shao F, Dixon JE. *Yersinia* effectors target mammalian signalling pathways. *Cell Microbiol.* 2002 Apr;4(4):201-11. Review.
195. Parra MC, Baquero F, Perez-Diaz JC. The role of apoptosis in *Listeria monocytogenes* neural infection: listeriolysin O interaction with neuroblastoma Neuro-2a cells. *Infect Genet Evol.* 2008 Jan;8(1):59-67. Epub 2007 Oct 9
196. Miao EA, Ernst RK, Dors M, Mao DP, Aderem A. *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through IpafProc *Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 19;105(7):2562-7. Epub 2008 Feb 6.
197. Rokkas T, Ladas S, Liatsos C, Petridou E, Papatheodorou G, Theocharis S, Karameris A, Raptis S. Relationship of *Helicobacter pylori* CagA status to gastric cell proliferation and apoptosis *Dig Dis Sci.* 1999 Mar;44(3):487-93.

198. Maeda S, Yoshida H, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Shiratori Y, Omata M. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Mol Pathol*. 2002 Oct;55(5):286-93.
199. de Freitas D, Urbano M, Goulao MH, Donato MM, Baldaia C, Martins MI, Souto P, Gregorio C, Figueiredo P, Gouveia H, Romaozinho JM. The effect of *Helicobacter pylori* infection on apoptosis and cell proliferation in gastric epithelium *Hepatogastroenterology*. 2004 May-Jun;51(57):876-82.
200. Belvin MP & Anderson KV A conserved signaling pathway: the *Drosophila* Toll-dorsal pathway. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 1996 12 393–416
201. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L & Aderem A 2000 The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *PNAS* 97 13766–13771.
202. Paul-Clark MJ, McMaster SK, Belcher E, Sorrentino R, Anandarajah J, Fleet M, Sriskandan S & Mitchell JA 2006 Differential effects of Gram-positive versus Gram-negative bacteria on NOSII and TNFalpha in macrophages: role of TLRs in synergy between the two. *British Journal of Pharmacology* 148 1067–1075.
203. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K & Akira S 1999a Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11 443–451
204. Aliprantis, A. O., R. B. Yang, D. S. Weiss, P. Godowski, A. Zychlinsky. 2000. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J*. 19:3325
205. Zhang, Y., J. B. Bliska. 2003. Role of Toll-like receptor signaling in the apoptotic response of macrophages to *Yersinia* infection. *Infect. Immun.* 71:1513
206. Bjorkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, Lee MA, Means T, Halmen K, Luster AD, Golenbock DT et al. 2004 Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nature Medicine* 10 416–421
207. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM & Aderem A 2001 The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410 1099–1103
208. Murillo LS, Morre SA & Pena AS 2003 Role of the CARD15 gene in the pathogenesis of Crohn disease: phenotypic classification and prognostic implications. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 38 1107–1114

209. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ & Madara JL 2001 Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *Journal of Immunology* 167 1882–1885.
210. Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptative immune response. *Nat. Immunol.* 5:987-995
211. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 1996;4:430–5
212. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics.* 2006 Aug;118(2):511-21.
213. Galdeano, C. M., and G. Perdigon. 2006. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut immune system through innate immunity. *Clin. Vaccine Immunol.* 13:219-226
214. Takeda K, Okumura K. Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the human NK-cell activity. *J Nutr.* 2007 Mar;137(3 Suppl 2):791S-3S.
215. de Moreno de LeBlanc, A., C. Maldonado Galdeano, S. Chaves, and G. Perdigon. 2005. Oral administration of *L. casei* CRL 431 increases immunity in bronchus and mammary glands. *Eur. J. Inflamm.* 3:23-28
216. Weinstein L. The bacterial flora of the human vagina *Yale J Biol Med* 1938 10,247-60
217. Isolauri E, Majamaa H, Arvola T, Rantala I, Virtanen E, Arvilommi H. *Lactobacilli casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology.* 1993;105:1643–50
218. de Kruif P. „Łowcy Mikrobów“ Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich , 1956
219. Ljungh A, Wadström T. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2006 Sep;7(2):73-89
220. TaggJR, Dajani AS, Wannamaker LW, Bacteriocins of gram-positive bacteria *Bacteriol Rev* 1993 12 39-85
221. Salminen S, Wright A *Lactic acid bacteria* Dekker NewYork 1993
222. Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M, Vesikari T *Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis* *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995 20 333-8
223. Szajewska H, Mrukowicz JZ. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized,

- double-blind, placebo-controlled trials. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001 Oct;33 Suppl 2:S17-25.
224. Gorbach SL, Chang TW, Goldin B, Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*, *Lancet* 1987 29, 160-7
225. Kimmey MB, Elmer GW, Surawicz CM, McFarland L, Prevention of further recurrence of *Clostridium difficile* colitis with *Saccharomyces boulardii* *Dig Dis Sci* 1990 35, 897-901
226. Oksanen PJ, Salminen S, Saxelin M Prevention of traveler's diarrhea by *Lactobacillus GG* *Ann Med* 1990 22, 53-6
227. Johnson-Henry KC, Donato KA, Shen-Tu G, Gordanpour M, Sherman PM. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. *Infect Immun.* 2008 Apr;76(4):1340-8. Epub 2008 Jan 28
228. de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J, Probiotics- compensation of lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* 2001, 73:421S-9S
229. Salminen E, Elomaa I, Minkinen J, Vapaatalo H, Salminen S. Preservation of intestinal integrity during radiotherapy using live *Lactobacillus acidophilus* cultures. *Clin Radiol.* 1988 Jul;39(4):435-7.
230. Michetti P, Dorta G, Wiesel PH, Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans *Digestion* 1999 60, 203-9
231. McAuliffe O, Ross RP, Hill C Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev.* 2001 May;25(3):285-308
232. Silva de Ruiz C, del R Rey M, Nader-Macías ME. Structural and ultrastructural studies of the urinary tract of mice inoculated with *Lactobacillus fermentum*. *BJU Int.* 2003 Jun;91(9):878-82
233. Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut.* 2003 Jun;52(6):827-33
234. David R. Mack, Sonia Michail, Shu Wei, Laura McDougall, and Michael A. Hollingsworth Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999; 276: G941-G950

235. Pool-Zobel BL, Bertram B, Knoll M, Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in vivo in the gastrointestinal tract of rats *Nutr Cancer* 1993 20, 271-82
236. Goldin B, Gorbach SL, The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity *Am J Clin Nutr* 1984 39 756-61
237. Orrhange K, Sillerstrom E, Gustaffson JA, Nord CE, Rafter J, Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria *Mutat Res* 1994 311, 239-48
238. Goldin BR, Gualtieri LJ, Moore RP, The effect of Lactobacillus GG on the initiation and promotion of DMH-induced intestinal tumors in the rat. *Nutr Cancer* 1996 25: 197-204
239. Goldin BR, Golbach SL, effect of Lactobacillus acidophilus dietary supplements on 1,2 – dimethylhydrazine dichloride induced intestinal cancer in rats *J Natl Cancer Inst* 1980 64: 263-5
240. Rafter et al Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients *J Clin Nutr* 2007 85 488-96
241. Gibson PR, Rosella O, Wilson AJ, Mariadason JM, Rickard K, Byron K, Barkla Dh, Colonic epithelial cell activation and the paradoxical effects of butyrate 1994 *Carcinogenesis* 20, 539-544
242. Medina V, Afonso JT, Alvers-Arquelles H, Hernandez C, Gonzales F, Sodium butyrate inhibits carcinoma development in 1,2-dimethylhydrazine – induced rat colon cancer 1998 *J Ent Parent Nutr* 22,14-17
243. Klebanoff SJ, Hillier SL, Eschenbach D, Waltersdorff AM, Control of the microbial flora of the vagina by hydrogen-peroxide-generating lactobacilli *J Infect Dis* 1991, 164, 94-100
244. Klebanoff SJ, Rosen H, Waltersdorff AM Antimicrobial activity of mieloperoxidase *Methods Enzymol* 1984 105, 399-403
245. Bauer G, Dormann S, Engelmann I, Schulz A, Saran M, Reactive oxygen species and apoptosis In Rg Cameron and G Feuer *Handbook of Exp. Pharmacology Vol 42* Berlin Springer Verlag 2000 275-318
246. Bauer G, Lactobacilli-mediated control of vaginal cancer through specific reactive oxygen species interaction *Med Hypoth* 2001 57, 252-257
247. Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Prevalence of hydrogen peroxide producing Lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis *J Clin Bact* 1989 27, 251-6

248. Strus M, Brzywczy –Włoch M, Kochan P, Heczko P Nadtlenek wodoru wytwarzany przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, jako czynnik regulujący mikroflorę pochwy *Med. Dośw Mikrobiol* 2004 56, 67-77
249. Ilaria Peluso, Daniele Fina, Roberta Caruso, Carmine Stolfi, Flavio Caprioli, Massimo Claudio Fantini, Giorgio Caspani, Enzo Grossi, Laura Di Iorio, Francesco Maria Paone, Francesco Pallone, and Giovanni Monteleone *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 Suppresses Human T-Cell Proliferation *Infect Immun*. 2007 April; 75(4): 1730–1737.
250. Guzy C, Paclik D, Schirbel A, Sonnenborn U, Wiedenmann B, Sturm A. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 induces $\{\gamma\}\{\delta\}$ T cell apoptosis via caspase- and FasL-dependent pathways. *Int Immunol*. 2008 Apr 30
251. Li Q, Zhang Q, Wang M, Zhao S, Ma J, Luo N, Li N, Li Y, Xu G, Li J. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction. *Clin Immunol*. 2008 Jan;126(1):67-80. Epub 2007 Oct 26
252. Yan F, Polk DB, Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells 2002 *J.Biol. Chem*. 277, 50959-65
253. Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK, Polk DB. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology*. 2007 Feb;132(2):562-75. Epub 2006 Nov 17.
254. Russo F, Orlando A, Linsalata M, Cavallini A, Messa C. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on the cell growth and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric cancer cells. *Nutr Cancer*. 2007;59(1):106-14.
255. Iyer C, Kosters A, Sethi G, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB, Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kappaB and MAPK signalling. *Cell Microbiol*. 2008 Mar 26
256. Choi SS, Kim Y, Han KS, You S, Oh S, Kim SH Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. *Lett Appl Microbiol*. 2006 May;42(5):452-8
257. Seidelin JB, Horn T, Nielsen OH, Simple and efficient method for isolation and cultivation of endoscopically obtained human colonocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003, 285:G1122-G1128

258. Guzik K, Bzowska M, Dobrucki J, Pryjma J Heat-Shocked Monocytes Are Resistant to *Staphylococcus aureus*-induced Apoptotic DNA Fragmentation due to Expression of HSP72. *Infection and Immunity*, Aug. 1999, p. 4216–4222
259. Lam EK, Yu L, Wong HP, Wu WK, Shin VY, Tai EK, So WH, Woo PC, Cho CH. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG enhances gastric ulcer healing in rats. *Eur J Pharmacol*. 2007 Jun 22;565(1-3):171-9
260. Lam EK, Tai EK, Koo MW, Wong HP, Wu WK, Yu L, So WH, Woo PC, Cho CH. Enhancement of gastric mucosal integrity by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Life Sci*. 2007 May 16;80(23):2128-36
261. Salinas I, Meseguer J, Esteban MA. Antiproliferative effects and apoptosis induction by probiotic cytoplasmic extracts in fish cell lines. *Vet Microbiol*. 2008 Jan 1;126(1-3):287-94.
262. Willing BP, Van Kessel AG. Enterocyte proliferation and apoptosis in the caudal small intestine is influenced by the composition of colonizing commensal bacteria in the neonatal gnotobiotic pig. *J Anim Sci*. 2007 Dec;85(12):3256-66.
263. Ott SJ, Musfeldt M, Wedington F, Hampe J, Brant O, Folsch UR, Timmis K N, and Schreiber S. 2004. Reduction in diversity of colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*. 53:685-693
264. Rugtveit J, Haraldsen G, Høgåsen AK, Bakka A, Brandtzaeg P, and Scott H. 1995. Respiratory burst of intestinal macrophages in inflammatory bowel disease is mainly caused by CD14+L1+ monocyte derived cells. *Gut*. 37:367-373.

