

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie  
Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka

mgr Łukasz Kopiasz

# Mechanizmy działania $\beta$ -D-glukanu z owsa na przebieg choroby Crohna i wczesnych stadiów kancerogenezy okrężnicy – badania modelowe *in vivo*

Mechanisms of action of oat  $\beta$ -D-glucan on Crohn's disease and  
early stages of colon carcinogenesis - *in vivo* model studies

Praca doktorska  
Doctoral thesis

Promotor  
prof. dr hab. Joanna Gromadzka-Ostrowska  
Katedra Dietetyki, Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Promotor pomocniczy  
dr hab. Katarzyna Dziendzikowska  
Katedra Dietetyki, Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2023



*Pragnę złożyć wyrazy wdzięczności mojej promotor  
prof. dr hab. Joannie Gromadzkiej-Ostrowskiej  
za opiekuńczość, cierpliwość i wyrozumiałość  
okazaną w trakcie powstawania niniejszej pracy  
oraz za wszelkie uwagi, bezcenne wskazówki i zaufanie,  
którym zostałem obdarzony przez te wszystkie lata pracy naukowej.*

*Składam serdeczne podziękowania promotor pomocniczej  
dr hab. Katarzynie Dziendzikowskiej  
za życzliwość, zaangażowanie, merytoryczne wsparcie  
oraz czas poświęcony mi podczas tworzenia niniejszej pracy.*

*Dziękuję wszystkim członkom zespołu badawczego,  
za okazaną pomoc i miłą atmosferę pracy.*

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie  
Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka

mgr Łukasz Kopiasz

# Mechanizmy działania $\beta$ -D-glukanu z owsa na przebieg choroby Crohna i wczesnych stadiów kancerogenezy okrężnicy – badania modelowe *in vivo*

Mechanisms of action of oat  $\beta$ -D-glucan on Crohn's disease and  
early stages of colon carcinogenesis - *in vivo* model studies

Praca doktorska  
Doctoral thesis

Promotor  
prof. dr hab. Joanna Gromadzka-Ostrowska  
Katedra Dietetyki, Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Promotor pomocniczy  
dr hab. Katarzyna Dziendzikowska  
Katedra Dietetyki, Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2023





*Pragnę złożyć wyrazy wdzięczności mojej promotor  
prof. dr hab. Joannie Gromadzkiej-Ostrowskiej  
za opiekuńczość, cierpliwość i wyrozumiałość  
okazaną w trakcie powstawania niniejszej pracy  
oraz za wszelkie uwagi, bezcenne wskazówki i zaufanie,  
którym zostałem obdarzony przez te wszystkie lata pracy naukowej.*

*Składam serdeczne podziękowania promotor pomocniczej  
dr hab. Katarzynie Dziendzikowskiej  
za życzliwość, zaangażowanie, merytoryczne wsparcie  
oraz czas poświęcony mi podczas tworzenia niniejszej pracy.*

*Dziękuję wszystkim członkom zespołu badawczego,  
za okazaną pomoc i miłą atmosferę pracy.*



### Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 16.11.2023

Podpis promotora pracy [signature]

### Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data 15.11.2023r.

Podpis autora pracy [signature]



Rozprawa doktorska została wykonana w ramach projektów:

*„Wpływ rozpuszczalnej frakcji beta-glukanów owsa na nieswoiste stany zapalne jelita grubego”*

Projekt NCN nr 2015/17/B/NZ9/01740 (konkurs OPUS 9)

Kierownik projektu: prof. dr hab. Joanna Gromadzka-Ostrowska

*„Mechanizmy działania 1-3,1-4-beta-D-glukanu z owsa we wczesnych stadiach kancerogenezy okrężnicy”*

Projekt NCN nr 2018/29/B/NZ9/01060 (konkurs OPUS 15)

Kierownik projektu: prof. dr hab. Joanna Gromadzka-Ostrowska

Wyniki, które zawarto w rozprawie są opublikowane w poniższych artykułach:

**Kopiasz Ł.**, Dziendzikowska K., Gajewska M., Oczkowski M., Majchrzak-Kuligowska K., Królikowski T., Gromadzka-Ostrowska J. (2021). *Effects of dietary oat beta-glucans on colon apoptosis and autophagy through TLRs and Dectin-1 signaling pathways – Crohn's disease model study*. *Nutrients*, 13:321. doi: 10.3390/nu13020321.

140 pkt. MEiN; IF<sub>2021 r.</sub> = 6,706

Wkład własny: 50%

**Kopiasz Ł.**, Dziendzikowska K., Gromadzka-Ostrowska J. (2022). *Colon expression of chemokines and their receptors depending on the stage of colitis and oat beta-glucan dietary intervention – Crohn's disease model study*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23:1406. doi: 10.3390/ijms23031406.

140 pkt. MEiN; IF<sub>2022 r.</sub> = 5,6

Wkład własny: 70%

**Kopiasz Ł.\***, Dziendzikowska K., Oczkowski M., Harasym J., Gromadzka-Ostrowska J. (2023). *Low molar-mass oat beta-glucan impacts autophagy and apoptosis in early stages of induced colorectal carcinogenesis in rats*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254:127832. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.127832

100 pkt. MEiN; IF<sub>2022 r.</sub> = 8,2

Wkład własny: 70%

\*autor korespondencyjny

Łączne osiągnięcie: 380 pkt. MEiN; IF = 20,506



## Streszczenie

### Mechanizmy działania $\beta$ -D-glukanu z owsa na przebieg choroby Crohna i wczesnych stadiów kancerogenezy okrężnicy – badania modelowe *in vivo*

Choroba Leśniowskiego-Crohna (CD) i rak jelita grubego (CRC) należą do przewlekłych schorzeń jelit. Liczba nowo diagnozowanych przypadków CD stale rośnie, a choroba związana jest z wysokim ryzykiem zachorowania na CRC, który jest drugim na świecie nowotworem pod względem śmiertelności. Konieczne jest zatem opracowywanie nowych, skutecznych metod wspomagania leczenia tych schorzeń, w tym dietoterapii.

Celem badań było określenie terapeutycznego potencjału wysokooczyszczonego beta-glukanu z owsa (O $\beta$ G) w chorobie Leśniowskiego-Crohna i potencjalnych możliwości hamowania rozwoju wczesnych stadiów kancerogenezy okrężnicy, a także poznanie mechanizmów tych działań.

Badania zostały przeprowadzone w ramach dwóch eksperymentów *in vivo* na szczurach Sprague-Dawley. Szczury w obu eksperymentach podzielono na dwie główne grupy: kontrolną i z indukowanym zapaleniem (model CD) lub wczesnym stadium kancerogenezy jelita grubego (model CRC). W modelu CD jako czynnik żywieniowy zastosowano dodatek do paszy 1% O $\beta$ G o dużej lub małej masie molowej, natomiast w eksperymencie z CRC dodatek do paszy 1% lub 3% O $\beta$ G o małej masie molowej.

W modelu CD indukowane zapalenie zwiększyło ekspresję genów wielu chemokin i ich receptorów oraz markera apoptozy, a także obniżyło ekspresję markera autofagii w okrężnicy, natomiast spożywanie z paszą O $\beta$ G spowodowało obniżenie ekspresji genów chemokin i ich receptorów oraz hamowanie nadmiernej apoptozy i stymulację autofagii. W modelu CRC indukowane wczesne stadium kancerogenezy nie wpłynęło na poziom ekspresji markerów apoptozy i autofagii, natomiast spożywanie paszy z O $\beta$ G spowodowało nasilenie obu procesów. Spożycie O $\beta$ G jako dodatku do pożywienia redukuje naciek zapalny na poziomie molekularnym zmieniając ekspresję chemokin i ich receptorów oraz moduluje proces apoptozy i autofagii w przewlekłych schorzeniach jelit w sposób zależny o rodzaju schorzenia.

**Słowa kluczowe:** beta-glukan z owsa, choroba Leśniowskiego-Crohna, rak jelita grubego, apoptoza, autofagia, chemokiny

## Summary

### Mechanisms of action of oat $\beta$ -D-glucans on Crohn's disease and early stages of colon carcinogenesis - *in vivo* model studies

Crohn's disease (CD) and colorectal cancer (CRC) are chronic intestinal diseases. The number of newly diagnosed cases of CD continues to rise, and the disease is associated with a high risk of developing CRC which is the second deadliest cancer globally. In addition, patients with CD have a high risk of developing CRC, which is the second most common cancer in terms of mortality worldwide. Therefore, it is necessary to develop new and effective methods to support the treatment of these conditions, including dietary therapy.

The aim of this study was to determine the therapeutic potential of highly purified oat beta-glucan (O $\beta$ G) in Crohn's disease and its potential to inhibit the early stages of colon carcinogenesis, and to understand the mechanisms of these actions.

The study comprised two *in vivo* experiments conducted in Sprague-Dawley rats. Rats in both experiments were divided into two main groups: control and with induced inflammation (CD model) or early stage of colon carcinogenesis (CRC model). In the CD model, 1% high or low molar weight O $\beta$ G was added to the feed as a dietary factor, while in the CRC experiment, 1% or 3% low molar weight O $\beta$ G was added to the feed.

In the CD model, induced inflammation resulted in an upregulation of gene expression for chemokines and their receptors, increased the apoptosis marker, and decreased the expression of the autophagy marker in the colon, while consumption of feed with O $\beta$ G downregulated the gene expression of chemokines and their receptors, inhibited excessive apoptosis and stimulated autophagy. In the CRC model, the induced early stage of carcinogenesis did not affect the expression levels of apoptosis and autophagy markers, while consumption of feed with O $\beta$ G increased both processes. Consumption of O $\beta$ G as a feed supplement reduces inflammatory infiltration at the molecular level by changed expression of chemokines and their receptors as well as modulates apoptosis and autophagy in chronic intestinal diseases in a disease-dependent manner.

**Key words:** oat beta-glucan, Crohn's disease, colorectal cancer, apoptosis, autophagy, chemokines





## Wykaz stosowanych skrótów

- CD – (ang. *Crohn disease*) choroba Leśniowskiego-Crohna
- CRC – (ang. *colorectal cancer*) rak jelita grubego
- CRP – (ang. *C-reactive protein*) białko C-reaktywne
- DSS – (ang. *dextran sulfate sodium*) siarczan dekstranu sodu
- GALT – (ang. *gut-associated lymphoid tissue*) tkanka limfatyczna związana z jelitami
- IBD – (ang. *inflammatory bowel diseases*) nieswoiste zapalenia jelit
- IEC – (ang. *intestinal epithelial cells*) komórki nabłonka jelitowego
- IFN- $\gamma$  – interferon gamma
- IL – interleukina
- IOD – (ang. *integrated optical density*) integralna gęstość optyczna
- LC3B – (ang. *microtubule-associated proteins 1A/1B-light chain 3B*) białko związane z mikrotubulami 1A/1B-łańcucha lekkiego 3B
- NK – (ang. *natural killers cells*) – komórki NK
- O $\beta$ G – (ang. *oat beta-glucan*) beta-glukan z owsa
- O $\beta$ Gm – beta-glukan z owsa o małej masie molowej
- O $\beta$ Gd – beta-glukan z owsa o dużej masie molowej
- SCFA – (ang. *short chain fatty acids*) - krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe
- Th – (ang. *helper T cells*) - limfocyty T pomocnicze
- TLR – (ang. *Toll-like receptors*) – receptory rozpoznawania wzorców toll-podobne
- TNBS – kwas 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy
- TNF- $\alpha$  – (ang. *tumor necrosis factor alpha*) - czynnik martwicy nowotworów alfa
- UC – (ang. *ulcerative colitis*) wrzodziejące zapalenie jelita grubego
- ZO-1 – (ang. *zonula occludens-1*) białka ścisłego połączenia-1



## Spis treści

1. Wstęp.....	15
2. Uzasadnienie podjętego tematu w oparciu o dane literaturowe .....	16
2.1. Charakterystyka choroby Leśniowskiego-Crohna .....	16
2.2. Charakterystyka nowotworów jelita grubego.....	20
2.3. Potencjalne mechanizmy działania beta-glukanu z owsa na przebieg choroby Leśniowskiego-Crohna oraz wczesnych stadiów kancerogenezy okrężnicy .....	21
3. Cel badań i hipotezy badawcze .....	25
4. Zakres badań wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	25
5. Materiał i metody .....	26
5.1. Przygotowanie oczyszczonych frakcji beta-glukanu z owsa o dużej i małej masie molowej	26
5.2. Doświadczenia <i>in vivo</i> .....	27
5.2.1. Doświadczenie przeprowadzone na zwierzęcym modelu choroby Leśniowskiego- Crohna (Doświadczenie I).....	27
5.2.2. Doświadczenie przeprowadzone na zwierzęcym modelu wczesnych etapów kancerogenezy jelita grubego (Doświadczenie II) .....	28
5.3. Pobranie i zabezpieczenie próbek do dalszych analiz.....	29
5.4. Analiza immunohistochemiczna markerów apoptozy i autofagii w błonie śluzowej jelita grubego .....	29
5.5. Analiza Western blot markerów apoptozy i autofagii w komórkach jelita grubego.....	30
5.6. Analiza ekspresji genów chemokin i ich receptorów w komórkach jelita grubego .....	30
5.7. Analiza statystyczna otrzymanych wyników .....	31
6. Syntetyczne omówienie wybranych wyników wchodzących w skład rozprawy doktorskiej .....	32
6.1. Doświadczenie I.....	32
6.2. Doświadczenie II.....	36
7. Podsumowanie wyników i ich dyskusja.....	39
7.1. Doświadczenie I.....	39
7.2. Doświadczenie II.....	45
8. Wnioski.....	48
9. Bibliografia.....	49
10. Załączniki .....	57



## 1. Wstęp

Do przewlekłych schorzeń jelit zaliczane są między innymi nieswoiste choroby zapalne jelit (IBD – ang. *inflammatory bowel diseases*) oraz nowotwory złośliwe jelita grubego nazywane również rakiem (CRC – ang. *colorectal cancer*). Na całym świecie na IBD cierpi ponad 6,8 miliona ludzi, przy czym największa częstość występowania tego schorzenia odnotowywana jest w Europie i Ameryce Północnej, gdzie dotyka ono ponad 0,3% populacji. Ponadto liczba diagnozowanych każdego roku przypadków IBD stale rośnie, przy znacznej zmienności w poziomach i trendach chorobowych w różnych krajach i regionach (Alatab i wsp., 2020; Mak i wsp., 2020). Nieswoiste zapalenia jelit, w tym choroba Leśniowskiego-Crohna (CD – ang. *Crohn's disease*) i wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC – ang. *ulcerative colitis*) należą do przewlekłych schorzeń zapalnych obejmujących przewód pokarmowy. Biorąc pod uwagę przewlekły, postępujący charakter i wysokie koszty leczenia, wzrost zachorowalności na IBD pociąga za sobą rosnące obciążenie społeczno-ekonomiczne. Należy ponadto zauważyć istotną korelację między IBD a zwiększoną podatnością na inne schorzenia układu pokarmowego, w tym celiakię i nowotwór jelita grubego (Shah i wsp., 2019). Pacjenci z IBD mają wysokie ryzyko zachorowania na CRC, który jest jedną z głównych przyczyn zgonów pacjentów onkologicznych, a ryzyko zachorowania na ten nowotwór z powodu IBD w ostatnich latach ciągle rośnie. Dane wskazują, że ryzyko to sięga nawet do 18% w ciągu trzydziestu lat od zachorowania na IBD (Nadeem i wsp., 2020). CRC jest trzecim najczęściej występującym nowotworem na świecie oraz drugim pod względem liczby zgonów (Baidoun i wsp., 2021). Zgodnie z danymi WHO w 2020 roku liczba nowych przypadków wynosiła ponad 1,9 miliona, a liczba zgonów ponad 900 tysięcy. Informacje te wskazują na istotny, stale rosnący problem zdrowotny i ekonomiczno-społeczny jaki się wiąże z tymi przewlekłymi schorzeniami. Powyższe dane epidemiologiczne skłaniają do badań dotyczących oceny możliwości zastosowania nowych sposobów prewencji oraz terapii IBD i CRC, w tym poszukiwania czynników żywieniowych opartych na aktywnych składnikach pochodzenia naturalnego, bezpiecznych w długotrwałym stosowaniu. Jednym z takich potencjalnych składników pokarmowych wydają się być beta-glukany, w tym te pochodzące z owsa.

Beta-glukan z owsa (O $\beta$ G) są polisacharydami występującymi w ścianie komórek warstwy aleuronowej ziaren tego zboża i należą do rozpuszczalnej frakcji błonnika pokarmowego. Składają się z monomerów D-glukozy połączonych wiązaniami  $\beta$ -1,3- i  $\beta$ -1,4-glikozydowymi tworząc polimery o bardzo słabo rozgałęzionej, głównie liniowej strukturze. Dzięki swojej specyficznej budowie wykazują szereg właściwości

prozdrowotnych, takich jak działanie hipoglikemiczne, hipolipemiczne, immunomodulacyjne czy przeciwzapalne (Suchecka i wsp., 2017; Bai i wsp., 2019; Sushytskiy i wsp., 2023). Wyniki badań na modelach zwierzęcych wskazują na wpływ beta-glukanu z owsa na redukcję stężenia markerów zapalnych, takich jak interleukiny (IL), w tym IL-1, IL-6 czy IL-12, czynnik martwicy nowotworów typu alfa (TNF- $\alpha$ ), białko C-reaktywne (CRP) oraz na zwiększenie stężenia przeciwzapalnej interleukiny 10 (IL-10) w jelicie grubym zwierząt z indukowanym stanem zapalnym jelita grubego. Ponadto dane literaturowe sugerują, że wraz ze zmniejszeniem masy molowej beta-glukanu z owsa zwiększają się ich właściwości przeciwzapalne (Żyła i wsp., 2019, 2021). Działanie przeciwnowotworowe tych polisacharydów zbożowych zostało potwierdzone dotychczas tylko w badaniach *in vitro*, których wyniki wskazują na silną aktywność antykancerogenną w stosunku do dwóch linii komórkowych ludzkiego nowotworu złośliwego płuca (A549, H69AR) oraz brak toksyczności dla komórek zdrowych (Choromańska i wsp., 2018). Shah i wsp. (2015) stwierdzili natomiast wzrost aktywności antyproliferacyjnej ludzkich komórek nowotworu złośliwego okrężnicy (Colo-205) wraz ze zmniejszeniem masy molowej beta-glukanu z jęczmienia, który ma podobną strukturę i właściwości do beta-glukanu z owsa (Shah i wsp., 2015).

Istotne wydaje się zatem bardziej dogłębne poznanie wpływu beta-glukanu z owsa na przebieg stanu zapalnego jelita grubego oraz na rozwój początkowych stadiów kancerogenezy okrężnicy, jak również poznanie mechanizmów tego działania.

## **2. Uzasadnienie podjętego tematu w oparciu o dane literaturowe**

### **2.1. Charakterystyka choroby Leśniowskiego-Crohna**

CD, jako jedna z nieswoistych chorób zapalnych jelit, charakteryzuje się przewlekłym zapaleniem mogącym obejmować każdy odcinek przewodu pokarmowego oraz całą grubość jego ściany, w przeciwieństwie do UC, w którym zmiany chorobowe zlokalizowane są w jelicie grubym i dotyczą błony śluzowej i podśluzowej (Gajendran i wsp., 2018). W CD stan zapalny zaczyna się w błonie śluzowej, a następnie wraz z upływem czasu może rozprzestrzeniać się na głębsze warstwy ściany przewodu pokarmowego. Patologiczne zmiany mogą dotyczyć dowolnej części przewodu pokarmowego, lecz najczęściej zajmują jelito cienkie i kręte. Ponadto charakteryzują się naprzemiennym występowaniem tkanki zdrowej i zmienionej chorobowo, a progresji choroby towarzyszą okresy zaostrzeń i remisji. U pacjentów z CD, szczególnie w okresach

zaostrzeń, mogą występować takie objawy, jak przewlekłe bóle brzucha, biegunki (często krwawe), nudności, wymioty, niedożywienie z utratą masy ciała, zmęczenie i gorączka. Interwencje terapeutyczne mają na celu osiągnięcie długotrwałej remisji (histologicznej, endoskopowej i objawowej), która umożliwi wygojenie się błony śluzowej. Aby utrzymać remisję przez jak najdłuższy czas, poza leczeniem farmakologicznym, ważne jest wdrożenie zmian w stylu życia i stosowanej przez pacjenta diecie, uwzględniającej czynniki żywieniowe o działaniu przeciwzapalnym oraz wspomagającym odbudowę i utrzymanie prawidłowej mikrobioty i bariery jelitowej (Le Berre i wsp., 2020; Roda i wsp., 2020).

Skala problemu związana z zachorowalnością i śmiertelnością na nieswoiste schorzenia jelit na całym świecie jest istotnym problemem, szczególnie w regionach wysoko rozwiniętych, gdzie dominuje typ diety tzw. zachodniej. Od 1990 do 2017 roku liczba osób cierpiących na IBD wzrosła z 3,7 miliona do ponad 6,8 milionów. Podobną tendencję obserwuje się w rocznej liczbie zgonów, która zwiększyła się natomiast z 23 tysięcy w 1990 roku do ok 38 tysięcy w 2017 roku. Należy jednak zaznaczyć, że w przeliczeniu na 100 tys. mieszkańców liczba nowych przypadków wzrosła jedynie o 6,1%, natomiast liczba zgonów zmniejszyła się o 16,4% (Alatab i wsp., 2020). W Europie obserwuje się wzrost zachorowalności na IBD na całym kontynencie. W Dani w latach 1980-2013 częstość występowania CD zwiększyła się z 5,2 do 9,1 osób na 100 tys. mieszkańców tego kraju. Podobnie we Francji częstość występowania CD wzrosła z 4,2 do 9,5 na 100 tys. (Mak i wsp., 2020). Według danych z Narodowego Funduszu Zdrowia w Polsce liczba osób cierpiących z powodu CD wzrosła z 5 016 przypadków w 2009 roku do 23 574 w 2020 roku. W 2018 roku wskaźnik zachorowań wynosił 4,7 osób na 100 tys. i był wyższy u mężczyzn (4,9 na 100 tys.). Ponadto, najwyższy wskaźnik zachorowań zaobserwowano w grupie osób w wieku 20-29 lat i wynosił 8,2 osoby na 100 tys., a w grupie osób w wieku 10-19 lat niewiele mniej, bo 7,2 osoby na 100 tys. (Zagórowicz i wsp., 2022).

Dokładna etiologia CD jest złożona i nadal nie do końca wyjaśniona. W rozwoju tej choroby uczestniczą czynniki genetyczne, immunologiczne oraz środowiskowe. Należy podkreślić, że do rozwoju CD kluczowa jest interakcja pomiędzy powyższymi czynnikami. Do głównych czynników środowiskowych należy palenie tytoniu, szeroko rozumiana dieta oraz styl życia. Dieta wydaje się być jednym z najbardziej istotnych modyfikowalnych czynników środowiskowych przyczyniających się do zwiększonego ryzyka zachorowania na choroby zapalne jelit (Roda i wsp., 2020). W ciągu ostatnich dekad nastąpiła zmiana stylu żywienia opartego na produktach o wysokiej zawartości błonnika i niskiej zawartości tłuszczu na żywność przetworzoną i wysoko oczyszczoną, zawierającą bardzo mało



błonnika, a za to dużo tłuszczu (w tym nasyconych kwasów tłuszczowych i kwasów tłuszczowych trans) oraz cukrów prostych. Takie zmiany powodują poważne zaburzenia składu mikrobioty jelitowej powodując dysbiozę będącą jedną z cech charakterystycznych CD. Dieta jest bowiem jednym z kluczowych czynników wpływających na prawidłowy skład mikrobioty, a co za tym idzie na prawidłowe działanie układu immunologicznego błony śluzowej jelit (GALT, ang. *gut-associated lymphoid tissue*) (Levine i wsp., 2018). Badania modelowe wskazują, że pozbawienie drobnoustrojów okrężnicy błonnika powoduje wykorzystanie przez bakterie bytujące w jelicie glikoprotein śluzu wydzielanego przez gospodarza jako źródła składników odżywczych. To prowadzi do zmniejszenia warstwy śluzu, zaburzenia naturalnej bariery jelitowej, zwiększonej podatności błony śluzowej na uszkodzenia i nadmiernej aktywacji układu GALT (Desai i wsp., 2016). Podczas zaostrzenia CD komórki odpornościowe są nadmiernie stymulowane, co powoduje naciek zapalny makrofagów, limfocytów T, neutrofilów i komórek plazmatycznych (Singh i wsp., 2016). Intensywna migracja komórek układu odpornościowego do miejsca rozwijającego się zapalenia jest możliwa dzięki obecności mediatorów stanu zapalnego, takich jak cytokiny chemotaktyczne (chemokiny) (Cheluvappa i wsp., 2018).

Chemokiny należą do rodziny niskocząsteczkowych białek (8-10 kDa), które dzielą się na cztery podrodziny: C, CC, CXC i CX3C. Związki te wykazują silne działanie chemotaktyczne, przez co stymulują migrację komórek układu immunologicznego w tkankach, jak również są zaangażowane w aktywację tych komórek. Aktywność ich związana jest z pobudzeniem specyficznych receptorów błonowych obecnych na powierzchni neutrofilów, eozynofili, bazofili, monocytów, limfocytów, komórek NK czy komórek dendrytycznych (Trivedi i Adams, 2018). Poza działaniem chemotaktycznym, chemokiny i ich receptory wykazują wpływ na szereg innych istotnych procesów fizjologicznych, takich jak embriogeneza, angiogeneza, proliferacja, apoptoza czy funkcjonowanie limfocytów T pomocniczych (Cheng i wsp., 2019). Częsteczki te uwalniane są między innymi z uszkodzonych komórek nabłonka jelitowego, jak również są wydzielane przez aktywowane komórki układu odpornościowego. W IBD, oprócz limfocytów T, neutrofilów i makrofagów, ściana jelita jest również infiltrowana przez inne komórki, takie jak fibroblasty, komórki śródbłonka i nabłonka jelitowego, które same także mogą wytwarzać różne chemokiny. Podsumowując, chemokiny i ich receptory odgrywają istotną rolę w procesie zapalnym przez specyficzny dla tkanki i selektywny dla komórek odpornościowych transport i zatrzymywanie leukocytów w miejscu zapalenia (Singh i wsp., 2016; Trivedi i Adams, 2018). W rezultacie w okresach zaostrzenia choroby powstaje

znaczny naciek zapalny. Modułacja syntezy i wydzielania specyficznych tkankowo chemokin może mieć zatem wpływ na intensywność i okres trwania zapalenia. Przykładowe chemokiny wydzielane przez różne typy komórek analizowane w niniejszej rozprawie doktorskiej to: chemokiny wydzielane przez komórki nabłonka jelitowego (CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11), makrofagi (CXCL1, CCL5, CXCL10), komórki tuczne (CCL5) i neutrofile (CXCL1, CXCL2, CXCL10) (Günaltay i wsp., 2015; Hong i wsp., 2017; Girbl i wsp., 2018). Badania wykazują, że ekspresja genów i/lub białek wymienionych chemokin jest zwiększona u pacjentów cierpiących na CD (Günaltay i wsp., 2015; Zhou i Liu, 2017).

Jednym z głównych skutków przewlekłego zapalenia związanego z CD jest uszkodzenie nabłonka jelitowego i znaczny wzrost programowanej śmierci komórek tego nabłonka (IEC – ang. *intestinal epithelial cells*). W warunkach stanu zapalnego dochodzi ponadto do zaburzeń mechanizmów regulujących aktywność metaboliczną komórek, w tym procesu autofagii (Nunes i wsp., 2014). Oba te procesy, apoptoza i autofagia, regulują homeostazę komórek i tkanek w odpowiedzi na działanie czynników pozakomórkowych, w tym cytokin prozapalnych. W badaniach prowadzonych zarówno na modelach zwierzęcych, jak i u osób cierpiących na IBD, odnotowuje się nasilenie procesu apoptozy w IEC (Blander, 2016). Nadmierna apoptoza może powodować zmniejszenie szczelności bariery jelitowej, co z kolei będzie nasilało proces zapalny poprzez zwiększoną penetrację czynników patogennych (antygenów pokarmowych i bakteryjnych) do głębszych warstw ściany jelit i wzrost syntezy i wydzielania wolnych rodników. Indukcja miejscowego stanu zapalnego w ścianie jelit będzie z kolei zwiększała apoptozę i dalszą degradację szczelności bariery jelitowej (Blander, 2016; Pott i wsp., 2018). Z drugiej strony, zaburzenie procesu apoptozy w kierunku jej nadmiernego hamowania może sprzyjać nagromadzeniu się komórek uszkodzonych lub zmienionych przez stan zapalny, co sprzyja transformacji i progresji nowotworowej (Dias i wsp., 2014). U pacjentów z CD badania wykazały redukcję intensywności procesów autofagii w różnych rodzajach komórek, w tym komórek nabłonka jelitowego i komórek dendrytycznych. Zwiększony poziom cytokin prozapalnych obserwowany u pacjentów z CD jest również silnie powiązany z rozregulowaniem autofagii, która jest wymagana do prezentacji antygenów pochodzących ze zdegradowanych składników bakteryjnych adaptacyjnemu układowi odpornościowemu. Ma to szczególne znaczenie, ponieważ zaburzenie funkcji limfocytów T jest kluczową cechą patogenezy CD (Hooper i wsp., 2017). Co więcej, obniżenie efektywności autofagii spowodowane delecją genu *ATG16L1* sprawia, że nabłonek jelitowy jest bardziej podatny na apoptozę indukowaną

przez TNF- $\alpha$  (Matsuzawa-Ishimoto i wsp., 2017). Nieprawidłowości te mogą zatem powodować utrzymywanie się zapalenia bakteryjnego, które szczególnie przy towarzyszącej mu dysbiozie może nasilać uszkodzenia bariery jelitowej. Utrzymujący się przewlekły stan zapalny w połączeniu z niesprawną autofagią może powodować uszkodzenia białek i DNA komórek jelit, co w konsekwencji sprzyja transformacji nowotworowej (Saha i wsp., 2018). Dlatego aktywacja procesu autofagii w stanach zapalnych jelit jest konieczna w celu zwiększenia przeżywalności komórek przy jednoczesnym zmniejszeniu ryzyka transformacji nowotworowej. Ten mechanizm przyczynia się do poprawy szczelności bariery jelitowej.

## **2.2. Charakterystyka nowotworów jelita grubego**

Nowotwory jelita grubego są jednym z poważnych problemów onkologicznych. Według danych WHO z 2020 roku liczba nowych przypadków CRC wynosiła ponad 1,9 mln, co plasowało ten rodzaj nowotworów na trzecim miejscu wśród pozostałych typów nowotworów. Pod względem śmiertelności CRC, z ponad 900 tysiącami zgonów, zajmuje natomiast drugie miejsce, ustępując jedynie nowotworom płuc. Na świecie wystandaryzowany wskaźnik zapadalności na CRC w 2020 roku wynosił 19,5 przy wskaźniku śmiertelności 9,0 przypadków na 100 tys. osób, podczas gdy w Centralnej i Wschodniej Europie wskaźnik ten wynosił odpowiednio aż 29,3 i 14,5 przypadków na 100 tys. osób (WHO, 2020a). W Polsce w 2020 roku liczba nowych przypadków CRC wynosiła 25 597, co stanowiło 12,5% wszystkich rodzajów nowotworów, natomiast liczba zgonów z powodu tego typu nowotworu wynosiła 15 088 (12,7% spośród wszystkich nowotworów) (WHO, 2020b). W świetle znacznego wzrostu liczby zidentyfikowanych przypadków CRC w populacji starszych osób szacuje się, że globalna zachorowalność na CRC wzrośnie ponad dwukrotnie do 2035 roku, przy czym najbardziej znaczący wzrost nastąpi w krajach słabiej rozwiniętych (Hossain i wsp., 2022).

Rak jelita grubego jest chorobą występującą wyłącznie w okrężnicy lub odbytnicy i spowodowany jest nieprawidłową proliferacją komórek nabłonka gruczołowego. Istnieją trzy główne rodzaje CRC: sporadyczny, dziedziczny i związany z zapaleniem jelita grubego (Hossain i wsp., 2022). Ryzyko rozwoju CRC determinują zarówno czynniki środowiskowe, jak i genetyczne. Wśród czynników etiologicznych CRC wyróżnić można czynniki modyfikowalne, do których zaliczana jest dieta i styl życia (palenie tytoniu, aktywność fizyczna) oraz niemodyfikowalne, takie jak obciążenie rodzinne czy wiek (Venugopal i Carethers, 2022). Ponadto istotnym elementem ryzyka są chroniczne stany zapalne, które

istotnie zwiększają ryzyko rozwoju CRC wraz z wiekiem (Nadeem i wsp., 2020). Kluczową cechą CRC jest fakt, iż nowotwór ten może rozwijać się przez wiele lat bez zauważalnych objawów klinicznych. Najczęściej rozwój zapoczątkowuje polip w ścianie jelita, który potrzebuje od 10. do 15. lat na przekształcenie się w nowotwór złośliwy. To sprawia, że bardzo ważna jest zarówno wczesna diagnostyka, jak i poszukiwanie czynników terapeutycznych i zapobiegawczych, które działają na wczesnych etapach kancerogenezy (Hossain i wsp., 2022).

Nowotwory to nagromadzenia nieprawidłowych komórek, charakteryzujące się niekontrolowaną proliferacją oraz opornością na programowaną śmierć komórek. W nowotworach obserwuje się brak wrażliwości na sygnały prowadzące do procesu apoptozy, co sprzyja przetrwaniu i replikacji komórek nowotworowych. Dlatego niezbędny do zapobiegania powstawaniu nowotworów jest sprawnie działający mechanizm inicjacji apoptozy (Letai, 2017). Do procesów naprawczych uczestniczących w regulacji aktywności metabolicznej komórek zalicza się proces autofagii, czyli kataboliczny proces masowej degradacji i usuwania składników komórkowych, w tym głównie uszkodzonych lub nieprawidłowych białek i peptydów. Proces ten jest również ściśle powiązany z wieloma podstawowymi procesami komórkowymi, takimi jak regulacja śmierci i proliferacji komórek, modulacja stanu zapalnego czy regulacja wrodzonych i adaptacyjnych funkcji odpornościowych (Saha i wsp., 2018). Ze względu na tak szerokie spektrum właściwości, proces autofagii może działać jako supresor we wczesnych stadiach nowotworzenia lub jako promotor rozwoju nowotworów w stadiach zaawansowanych. Proces ten może przyczyniać się do hamowania wzrostu guza poprzez usuwanie uszkodzonych komórek i organelli komórkowych, ograniczając w ten sposób proliferację komórek i niestabilność genomu (Zhou i wsp., 2016; Long i wsp., 2020).

### **2.3. Potencjalne mechanizmy działania beta-glukanu z owsa na przebieg choroby Leśniowskiego-Crohna oraz wczesnych stadiów kancerogenezy okrężnicy**

Jak już wspomniano wcześniej beta-glukan z owsa są złożone z cząsteczek D-glukozy połączonych wiązaniami  $\beta$ -1,3-,  $\beta$ -1,4-glikozydowymi, dzięki czemu te polisacharydy nie są trawione przez enzymy układu pokarmowego człowieka, co skutkuje tym, że mogą docierać do dalszych jego odcinków pełniąc funkcję rozpuszczalnej frakcji błonnika pokarmowego. Docierając do jelita grubego są degradowane przez enzymy bakterii zasiedlających przewód pokarmowy, wspierając w ten sposób rozwój korzystnej mikrobioty jelitowej. W literaturze opisano kilka prawdopodobnych mechanizmów korzystnego

działania beta-glukanów. Pierwszy z nich to wpływ tych polisacharydów na proces apoptozy i autofagii poprzez ich działanie prebiotyczne. Zarówno badania *in vitro*, jak i *in vivo* wykazały prebiotyczne właściwości O $\beta$ G polegające na zwiększeniu wytwarzania krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA, ang. *short chain fatty acids*), zwłaszcza maślanu i propionianu (Wilczak i wsp., 2015; Bai i wsp., 2021a, 2021b). SCFA są ważnymi substancjami odżywczymi dla mikrobioty jelitowej oraz mediatorami między mikrobiotą a organizmem gospodarza. SCFA wykazują istotny wpływ na integralność bariery jelitowej oraz uczestniczą w odpowiedzi zapalnej GALT (Agus i wsp., 2021). W przypadku stanu zapalnego ten potencjalny mechanizm może być powiązany z funkcją maślanu, który utrzymuje integralność bariery jelitowej poprzez stymulowanie syntezy śluzu i indukcję ekspresji białek połączeń ścisłych (Rivière i wsp., 2016). Propionian z kolei wykazuje zdolność łagodzenia zapalenia jelita grubego i poprawy funkcji bariery jelitowej przez hamowanie obniżenia ekspresji białek tworzących połączenia ścisłe (białka ścisłego połączenia-1 (ZO-1) i okludyny) w okrężnicy (Tong i wsp., 2016). W przypadku nowotworów, kiedy to apoptoza komórek raka jelita grubego jest inaktywowana, wyniki badań wskazują na właściwości proapoptotyczne i antyproliferacyjne SCFA, szczególnie maślanu (Mirzaei i wsp., 2021). Ponadto wykazano, że kwas masłowy zmniejsza proliferację komórek raka jelita grubego, a zwiększa proliferację komórek nienowotworowych (Han i wsp., 2018).

Inny potencjalny mechanizm działania O $\beta$ G jest związany z ich właściwościami immunomodulacyjnymi i przeciwzapalnymi. W tym miejscu należy dodać, że beta-glukan z owsa jest strukturalnie zbliżony do beta-glukanu z jęczmienia, w którym cząsteczki D-glukozy są połączone tym samym rodzajem wiązań. Dzięki temu oba związki mają zbliżone właściwości fizykochemiczne i biologiczne. Polisacharydy te można zatem zaliczyć do grupy beta-glukanów zbożowych. Z racji tego w opisie potencjalnych mechanizmów działania O $\beta$ G, można uwzględniać zarówno wyniki badań dotyczące beta-glukanu z owsa, jak i jęczmienia (Suchecka i wsp., 2017). Po spożyciu polisacharydy te mogą bezpośrednio oddziaływać na aktywność układu GALT w konsekwencji ich transportu do blaszki właściwej błony śluzowej przy udziale komórek M w kępkach Peyera. Następnie cząsteczki te wiążą się z receptorami obecnymi na powierzchni komórek układu odpornościowego, takimi jak receptory rozpoznawania wzorców (Toll-podobne) (TLR)-4, TLR-5, TLR-9, dektyna-1, jak również receptor dopełniacza 3 i lektyny typu C (Kanjana i wsp., 2017; Nakashima i wsp., 2018). Działanie immunomodulacyjne połączone z właściwościami przeciwzapalnymi potwierdzają badania *in vitro*, których wyniki

udowodniły działanie indukujące odpowiedź immunologiczną w komórkach dendrytycznych. Eksperymenty na ludzkich i mysich liniach komórek dendrytycznych wykazały obniżenie wytwarzania cytokin prozapalnych, takich jak IL-6, IL-8, IL-12, szczególnie po narażeniu na lipopolisacharyd bakteryjny (LPS) (Mikkelsen i wsp., 2014; Bermudez-Brito i wsp., 2015). Również inkubacja ludzkich makrofagów THP-1 stymulowanych LPS z beta-glukanami z jęczmienia lub owsa obniżała ekspresję cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 (Arena i wsp., 2016). Właściwości immunomodulujące potwierdzają również wyniki badań *in vivo* przeprowadzone przez nasz zespół badawczy, w których spożycie przez zwierzęta modelowe O $\beta$ G zarówno o małej, jak i dużej masie molowej stymulowało wzrost procentowego udziału limfocytów T oraz zmniejszenie udziału komórek NK w zmienionej zapalnie błaszce właściwej błony śluzowej okrężnicy. Ponadto, spożycie O $\beta$ G o dużej masie molowej przeciwdziało zmniejszeniu udziału limfocytów Tc i Th. W tym badaniu wykazano również, że spożycie paszy z O $\beta$ G redukowało poziom cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ) oraz zwiększało ekspresję cytokiny przeciwzapalnej IL-10, z silniejszym efektem obserwowanym dla O $\beta$ G o małej masie molowej (Żyła i wsp., 2019, Żyła i wsp., 2021). Nasuwa się tutaj przypuszczenie, że wpływ O $\beta$ G na profil i liczbę leukocytów w miejscu zapalenia może być również związany z modulacją ekspresji chemokin i ich receptorów. Może to być podobne działanie jak stwierdzone dla beta-glukanu grzybowego zmniejszającego ekspresję genów takich chemokin, jak *Ccl3*, *Cxcl1*, *Cxcl2* i *Cxcl3* w zwierzęcym modelu zapalenia jelit wywołanym siarczanem dekstranu sodu (DSS) (Xie i wsp., 2019).

Wpływ O $\beta$ G na proces apoptozy w stanie zapalnym może być zatem związany ze zmniejszeniem ekspresji cytokin prozapalnych, w tym przede wszystkim TNF- $\alpha$ . Wyniki badań wykazały, że TNF- $\alpha$  może stymulować apoptozę przez wiązanie się m.in. z receptorem TNFR1a, który należy do tzw. receptorów śmierci komórki aktywujących zewnątrzpochodny szlak apoptozy (Günther i wsp., 2012). Ponadto wpływ na ekspresję TNF- $\alpha$  może być również powiązany z jego działaniem na proces autofagii. Sakaguchi i wsp. (2018) wykazali wpływ beta-glukanu grzybowego na indukcję procesu autofagii w komórkach nabłonka jelitowego będącą skutkiem zmniejszenia ekspresji mRNA cytokin prozapalnych w okrężnicy (*Tnf*, *Il1b*, *Il6*) i ekspresji receptora TNFR1. Efekt ten był związany z interakcją tego polisacharydu z receptorem dektyna-1 (Sakaguchi i wsp., 2018).

Właściwości immunomodulujące w kontekście działania przeciwnowotworowego są związane między innymi z właściwościami prebiotycznymi tych polisacharydów, polegającymi na modulacji syntezy SCFA. Zarówno maślan, jak i propionian mogą

stymulować limfocyty T, prowadząc do wydzielania kluczowych cytokin, takich jak IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , które z kolei indukują apoptozę w komórkach nowotworowych i hamują ich wzrost (Al-Qadami i wsp., 2022). Wpływ O $\beta$ G na proces apoptozy komórek potencjalnie nowotworowych powinien być zatem odwrotny. Należy jednak podkreślić, że nie może być zbyt nasilony, gdyż mogłoby to doprowadzić do zmniejszenia integralności bariery jelitowej. Proces autofagii w kancerogenezie powinien być również wzmożony, tak jak w przypadku stanu zapalnego. W przypadku procesu nowotworzenia mechanizm działania O $\beta$ G może być podobny jak w stanach zapalnych jelit, czyli przez działanie przeciwzapalne. W procesie nowotworzenia, szczególnie w późniejszych jego etapach, może występować miejscowy stan zapalny powodujący nasilenie uszkodzeń struktur białkowych oraz DNA komórek. Dodatkowa dysregulacja procesu autofagii będzie nasilała kumulację uszkodzeń i w konsekwencji zwiększała ryzyko transformacji nowotworowej (Saha i wsp., 2018). Opisane w poprzednim akapicie działanie przeciwzapalne w kontekście nasilenia autofagii może być potencjalnym mechanizmem działania O $\beta$ G również w przypadku kancerogenezy.

Inny mechanizm działania przeciwzapalnego O $\beta$ G jest prawdopodobnie związany z właściwościami fizyko-chemicznymi O $\beta$ G o dużej masie molowej. Ta frakcja O $\beta$ G ma zdolność absorpcji dużej ilości wody, w wyniku czego tworzy lepki żel odporny na działanie kwasów i enzymów obecnych w przewodzie pokarmowym, a jednocześnie stanowiący dobre źródło substancji odżywczych dla mikrobioty jelitowej zdolnej do trawienia tych polisacharydów. Te właściwości pozwalają na pokrycie wewnętrznej powierzchni ściany przewodu pokarmowego, w tym jelita grubego, cienką warstwą żelu tworzącą swego rodzaju barierę ochronną dla uszkodzonych przez stan zapalny komórek nabłonka jelitowego. Dzięki temu IEC są chronione przed szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi mogącymi nasilać stan zapalny (Vetvicka i wsp., 2015; Wilczak i wsp., 2017). Taka ochronna warstwa również będzie zapobiegać dalszym uszkodzeniom integralności bariery jelitowej, a także na skutek zmniejszenia nasilenia stanu zapalnego wpływać na proces apoptozy i autofagii.

### 3. Cel badań i hipotezy badawcze

Celem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej była ocena potencjału terapeutycznego wysokooczyszczzonego beta-glukanu z owsa w chorobie Leśniowskiego-Crohna oraz jego możliwości do hamowania rozwoju wczesnych stadiów kancerogenezy okrężnicy, a także poznanie mechanizmów tych działań.

Hipotezy badawcze:

1. Beta-glukan z owsa o małej lub dużej masie molowej zmniejsza naciek zapalny ściany jelita grubego przez zmianę ekspresji genów chemokin i ich receptorów;
2. Beta-glukan z owsa o małej lub dużej masie molowej łagodzi ostry stan zapalny jelita grubego w wyniku modulacji procesu apoptozy i autofagii;
3. Beta-glukan z owsa o małej masie molowej zatrzymuje lub zmniejsza tempo rozwoju nowotworu jelit grubego, we wczesnym stadium kancerogenezy na skutek zmian w intensywności procesów apoptozy i autofagii.

### 4. Zakres badań wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Prezentowana rozprawa doktorska oparta jest o trzy artykuły naukowe, w tym pierwszy opublikowany w roku 2021 (w czasopiśmie *Nutrients*), drugi w roku 2022 (w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*) i trzeci w roku 2023 (w czasopiśmie *International Journal of Biological Macromolecules*). Wszystkie trzy czasopisma są zaliczone, według wykazu Ministerstwa Edukacji i Nauki z roku 2021 i 2023, do dyscypliny „Technologia żywności i żywienia”. Według bazy Journal Citation Reports (JCR) tworzonej przez firmę Clarivate, *Nutrients* należy do pierwszego kwartyłu (Q1) w kategorii żywienie i dietetyka, natomiast *International Journal of Molecular Sciences* i *International Journal of Biological Macromolecules* należą do Q1 w kategorii biochemia i biologia molekularna. Łączna wartość współczynnika wpływu dla wspomnianych trzech artykułów wynosi 20,506, a suma punktów ministerialnych wynosi 380 (punkty MEiN zgodne z rokiem wydania publikacji).

Pierwsze dwa opublikowane artykuły dotyczą wpływu spożycia wraz z dietą beta-glukanu z owsa o małej lub dużej masie molowej na wywołany eksperymentalnie stan zapalny jelita grubego u szczurów (zwierzęcy model choroby Leśniowskiego-Crohna; Doświadczenie I). Wyniki badań zawarte w tych artykułach dotyczą wpływu badanych polisacharydów na ekspresję genów i białek chemokin i ich receptorów oraz ekspresję głównych markerów apoptozy i autofagii. W trzecim artykule zostały przedstawione wyniki pochodzące z drugiego doświadczenia dotyczącego wpływu beta-glukanu z owsa o małej



masie molowej na proces apoptozy i autofagii w początkowych etapach rozwoju nowotworu jelita grubego (Doświadczenie II). W tym artykule opisano wpływ tego polisacharydu zawartego w paszy zwierząt modelowych w dwóch różnych dawkach na proces apoptozy i autofagii w zmienionym przez początkowy etap kancerogenezy jelicie grubym.

## **5. Materiał i metody**

Poniżej zostały opisane metody badawcze użyte do wykonania eksperymentów, które pozwoliły otrzymać wyniki przedstawione w kolejnym rozdziale. Bardziej szczegółowy opis tych metod wraz z dokładniejszymi informacjami dotyczącymi wykorzystanych materiałów badawczych znajduje się w artykułach naukowych, na których oparta jest niniejsza rozprawa doktorska (Kopiasz i wsp., 2021, Kopiasz i wsp., 2022, Kopiasz i wsp., 2023).

### **5.1. Przygotowanie oczyszczonych frakcji beta-glukanu z owsa o dużej i małej masie molowej**

1-3, 1-4, beta-D-glukan z owsa o dużej i małej masie molowej uzyskano z otrębów owsianych przy zastosowaniu opatentowanych metod (nr patentu EP 2515672 B1; (Harasym i wsp., 2010) – OβG o dużej masie molowej; nr patentu PL 226915 B1; (Harasym i Gromadzka-Ostrowska, 2014) – OβG o małej masie molowej). Sposób pozyskiwania OβG oraz dokładna charakterystyka uzyskanych preparatów zostały szczegółowo opisane w artykułach naukowych naszego zespołu (Harasym i wsp., 2015, 2019). W skrócie, obie frakcje beta-glukanu wyizolowano metodą mokrej ekstrakcji alkalicznej (pH=8,5; NaOH), z tą różnicą, że przy otrzymywaniu OβGm otręby wcześniej poddano mrożeniu (-20°C, 24h) i następnie mieleniu zamrożonego materiału. Po ekstrakcji preparaty odbiałczono przez strącenie nadmiaru białka w punkcie izoelektrycznym (pH=4,5), a osad usunięto przez wirowanie. Supernatant oddzielono i zobojętniono, a następnie strącono beta-glukan przez dodanie 96% etanolu. Czystość beta-glukanu została scharakteryzowana przy użyciu metody enzymatycznej bazującej na lichenazie (AOAC 995.16; Megazyme, Irlandia) zgodnie ze standardami analityki AACC (*American Association for Cereal Chemistry*) do oznaczania zawartości skrobi całkowitej i beta-glukanów. Masę molową wyznaczono wykonując pomiar lepkości właściwej roztworów OβG z wykorzystaniem równania Marka-Houwinka (Tabela 1).

Tabela 1. Masa molowa i czystość frakcji beta-glukanu z owsa stosowanych jako dodatek do paszy zwierząt doświadczalnych.

	Frakcja OβG	Masa molowa [g/mol]	Czystość [%]
Doświadczenie I	mała	$5,9 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$	99,1
	duża	$1,7 \times 10^6 \pm 0,05 \times 10^6$	97,4
Doświadczenie II	mała	$5,2 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$	99,3

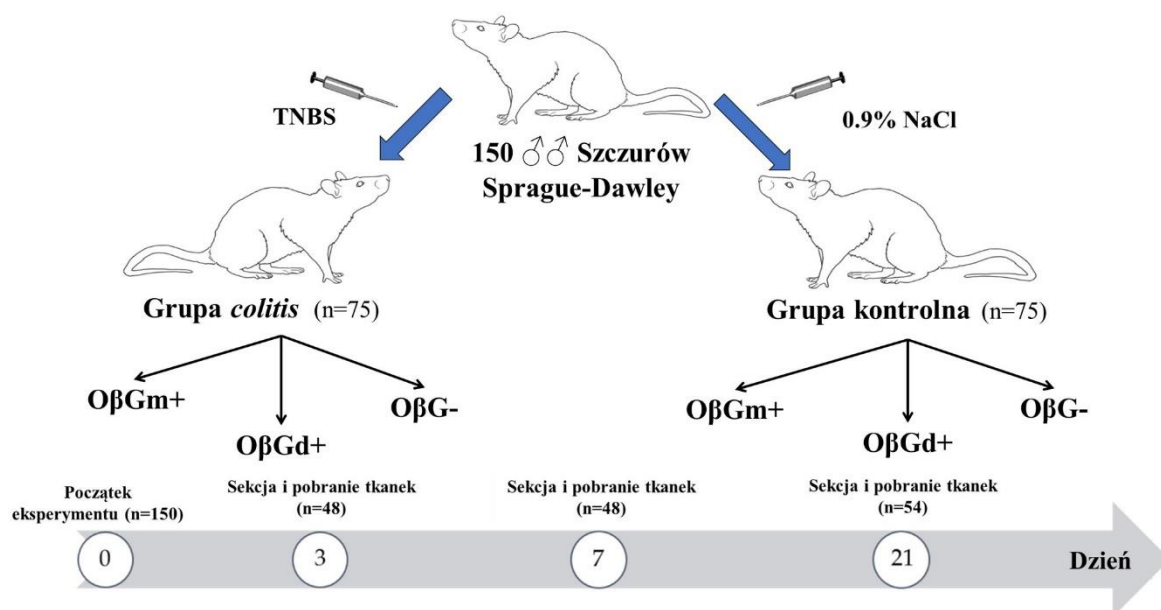
## 5.2. Doświadczenia *in vivo*

W zakres rozprawy doktorskiej wchodzi wyniki pochodzące z dwóch różnych doświadczeń *in vivo* przeprowadzonych na młodych dorosłych samcach szczurów Sprague-Dawley pochodzących z hodowli niekrewniaczych (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Niemcy). W czasie obu doświadczeń zwierzęta były utrzymywane w kontrolowanych warunkach otoczenia: temperatura  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , wilgotność powietrza  $50 \pm 5\%$ , cykl światło/ciemno 12/12 h, wymiana powietrza 15 razy/godzinę. Po tygodniu aklimatyzacji, szczury rozdzielono i umieszczono w pojedynczych, poliuretanowych klatkach.

### 5.2.1. Doświadczenie przeprowadzone na zwierzęcym modelu choroby Leśniowskiego-Crohna (Doświadczenie I)

Doświadczenie I zostało przeprowadzone na 150 szczurach. Zwierzęta podzielono na dwie główne grupy eksperymentalne: grupę z indukowanym przez jednorazowe doodbytnicze podanie etanolowego roztworu kwasu 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowego (TNBS) (150 mg/kg m.c.) stanem zapalnym jelita grubego (grupa *colitis*) oraz grupę kontrolną, w której szczurom podano analogiczną drogą roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl). Zwierzęta z obu głównych grup podzielono na trzy podgrupy żywieniowe: podgrupę żywioną paszą podstawową AIN-93M bez beta-glukanu (OβG-), podgrupę żywioną paszą AIN-93M z dodatkiem 1% (w/w) beta-glukanu z owsa o małej masie molowej (OβGm+) i podgrupę żywioną paszą AIN-93M z dodatkiem 1% (w/w) beta-glukanu z owsa o dużej masie molowej (OβGd+). Długość okresu żywienia powyższymi dietami wynosił 3, 7 lub 21 dni od momentu iniekcji doodbytniczej. Dokładny schemat doświadczenia został przedstawiony na Rycinie 1. Na potrzeby niniejszej rozprawy doktorskiej nazwy grup zostały ujednolicone i spolszczone przez nieznaczące modyfikacje względem oryginalnych użytych w artykułach. Na przeprowadzenie doświadczenia *in vivo* i wykonanie wszystkich procedur uzyskano zgodę II Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie (Uchwała nr 60/2015)

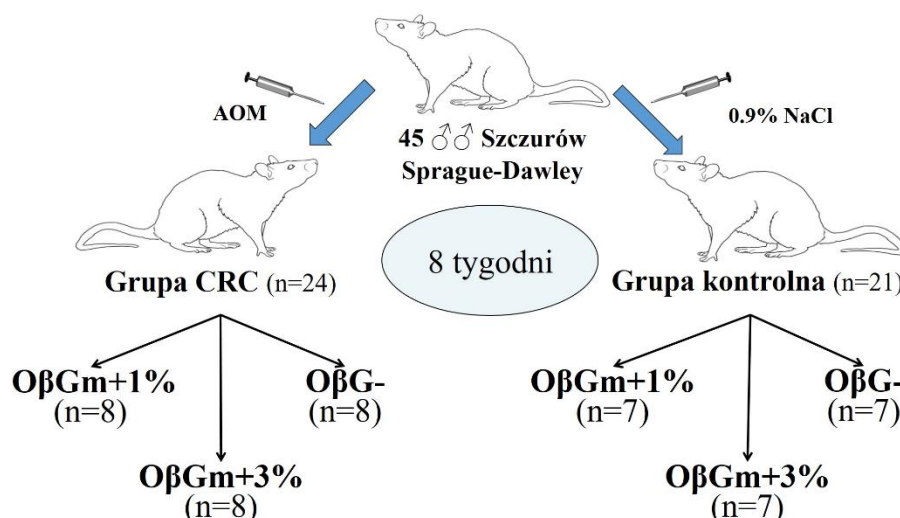
zgodnie z Dyrektywą UE 2010/63/EU dotyczącej doświadczeń na zwierzętach i zasadami 3R (ang. *replacement, reduction and refinement* – zastąpienie, ograniczenie i doskonalenie).



**Rycina 1.** Schemat doświadczenia I przeprowadzonego na zwierzęcym modelu choroby Leśniowskiego-Crohna. TNBS – kwas 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy.

### 5.2.2. Doświadczenie przeprowadzone na zwierzęcym modelu wczesnych etapów kancerogenezy jelita grubego (Doświadczenie II)

Doświadczenie II zostało przeprowadzone na 45 szczurach. Zwierzęta zostały podzielone na dwie główne grupy eksperymentalne: szczury z indukowanym wczesnym etapem kancerogenezy jelita grubego (CRC) i grupę kontrolną. Wczesny etap kancerogenezy został wywołany przez dwukrotną (w tygodniowych odstępach) dootrzewnową iniekcję azoksymetanu (AOM). W grupach kontrolnych podano tą samą drogą roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl). Zwierzęta z głównych grup podzielono następnie na trzy podgrupy żywieniowe otrzymujące paszę podstawową AIN-93M bez dodatku beta-glukanu (OβG-), taką samą paszę z dodatkiem 1% (w/w) beta-glukanu z owsa o małej masie molowej (OβGm+1%) lub z dodatkiem 3% (w/w) beta-glukanu z owsa o małej masie molowej (OβGm+3%) (Rycina 2). Na potrzeby niniejszej rozprawy doktorskiej nazwy grup zostały ujednolicone i spolszczone przez nieznaczne modyfikacje względem oryginalnych użytych w artykułach. Na przeprowadzenie doświadczenia *in vivo* i wykonanie wszystkich procedur uzyskano zgodę II Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie (Uchwała nr WAW2/040/2019) zgodnie z Dyrektywą UE 2010/63/EU dotyczącej doświadczeń na zwierzętach i zasadami 3R.



**Rycina 2.** Schemat doświadczenia II przeprowadzonego na zwierzęcym modelu wczesnych etapów kancerogenezy jelita grubego. AOM – azoksymetan; CRC – grupa z indukowanym wczesnym etapem kancerogenezy jelita grubego.

### 5.3. Pobranie i zabezpieczenie próbek do dalszych analiz

W doświadczeniu I podczas sekcji pobrano próbkę okrężnicy z części, w której wywołany został miejscowy silny stan zapalny, podczas gdy w doświadczeniu II od każdego szczura pobrane były trzy fragmenty jelita grubego z jego trzech odcinków (okrężnicy proksymalnej i dystalnej oraz z prostnicy). Fragmenty do analizy Western blot zamrożono w ciekłym azocie, do analizy ekspresji genów (Real-Time PCR) utrwalono w odczynniku QIAzol (Qiagen, Venlo, Holandia) i zamrożono w ciekłym azocie, a do analizy immunohistochemicznej utrwalono w 10% roztworze buforowanej formaliny, odwodniono i zatopiono w bloczkach parafinowych.

### 5.4. Analiza immunohistochemiczna markerów apoptozy i autofagii w błonie śluzowej jelita grubego

Próbki jelita grubego zatopione w bloczkach parafinowych zostały pocięte na skrawki o grubości 5  $\mu\text{m}$  i umieszczane na szkiełkach mikroskopowych. Z tak przygotowanych próbek usuwano parafinę przy użyciu ksyleny, a następnie materiał uwadniano w serii roztworów etanolu o malejących stężeniach. W celu odkrycia antygenów, próbki gotowano w buforze cytrynianowym (pH=6), a w celu zablokowania enzymów endogennych inkubowano z Bloxall Blocking Solution (Vector Laboratories, USA). Następnie próbki inkubowano przez noc w lodówce z przeciwciałami pierwszorzędowymi (królicze przeciwciała przeciw LC3B, ciętej kaspazie-3, całkowitej kaspazie-3). Następnego dnia wypłukano nadmiar przeciwciał pierwszorzędowych i naniesiono przeciwciała

drugorzędowe sprzężone z peroksydazą chrzanową. W celu uwidocznienia miejsc przyłączenia przeciwciał drugorzędowych próbki inkubowano z 3,3'-diaminobenzydyną, która pod wpływem peroksydazy chrzanowej daje produkt o brązowej barwie. Na koniec próbki odwodniono i zabezpieczono przez naklejenie szkiełek nakrywkowych.

Preparaty immunohistochemiczne były analizowane przy użyciu mikroskopu świetlnego (NIKON Eclipse Ti2, Tokio, Japonia). W doświadczeniu I ekspresja markerów apoptozy i autofagii była oznaczana w komórkach nabłonka jelita grubego przez obrysowanie dwudziestu obszarów nabłonka jelitowego o zbliżonej powierzchni na każdym skrawku. Ekspresja chemokin i ich receptorów, jak również markerów apoptozy i autofagii w doświadczeniu II były oznaczane w błonie śluzowej jelita grubego przez obrysowanie sześciu fragmentów błony śluzowej na każdej próbce jelita. Ekspresja była wyliczana jako zintegrowana gęstość optyczna (ang. *Integrated Optical Density* [IOD]) z zastosowaniem poniższego wzoru:

$$IOD = \frac{\text{Powierzchnia brązowych obszarów}}{\text{Powierzchnia zaznaczonych obszarów}} \times \text{Średnie nasycenie barwy}$$

## **5.5. Analiza Western blot markerów apoptozy i autofagii w komórkach jelita grubego**

Próbki jelita grubego zhomogenizowano w buforze RIPA z dodatkiem inhibitorów fosfataz i proteaz. Po odwirowaniu pobrano supernatant, w którym oznaczono stężenie białka przy użyciu zestawu Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Próbki (znormalizowane do stężenia białka 50 µg) zostały rozdzielone za pomocą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym i przeniesione na membranę PVDF przy użyciu systemu TransBlot Turbo Transfer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Następnie membrany inkubowano przez noc w lodówce z przeciwciałami pierwszorzędowymi (królicze przeciwciała przeciw LC3B i kaspazie-3). Następnego dnia po wypłukaniu nadmiaru przeciwciał pierwszorzędowych, naniesiono przeciwciała drugorzędowe sprzężone z barwnikiem fluorescencyjnym. Do analizy ekspresji badanych białek użyto ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), a następnie obliczono integralną gęstość optyczną (IOD) z normalizacją jej poziomu względem ekspresji beta-aktyny.

## **5.6. Analiza ekspresji genów chemokin i ich receptorów w komórkach jelita grubego**

RNA z próbek jelita grubego wyizolowano przy użyciu zestawu RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) zgodnie z instrukcjami producenta oraz

oceniono stężenie i czystość RNA przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Następnie zsyntezowano komplementarne cDNA wykorzystując zestaw RT2 First Standard Kit (Qiagen, Niemcy) i przeprowadzono analizę ekspresji genów przy użyciu macierzy PCR RT<sup>2</sup> Profiler (Qiagen, Hilden, Niemcy). Macierz zawierała startery dla wybranych genów białek zaangażowanych w proces apoptozy i autofagii oraz genów chemokin i ich receptorów. Amplifikacja została przeprowadzona w termocyklerze AriaMx Real-time PCR System (Agilent Technologies, USA), a względna ekspresja genów obliczona została z zastosowaniem metody  $\Delta\Delta C_t$  z Rplp1 i Ldha jako genami referencyjnymi w programie GeneGlobe Qiagen (Qiagen, Niemcy). Wyniki przedstawiono jako względną ekspresję genu docelowego w stosunku do genów referencyjnych (średnia arytmetyczna), przy czym grupę kontrolną obliczono jako 1.

### **5.7. Analiza statystyczna otrzymanych wyników**

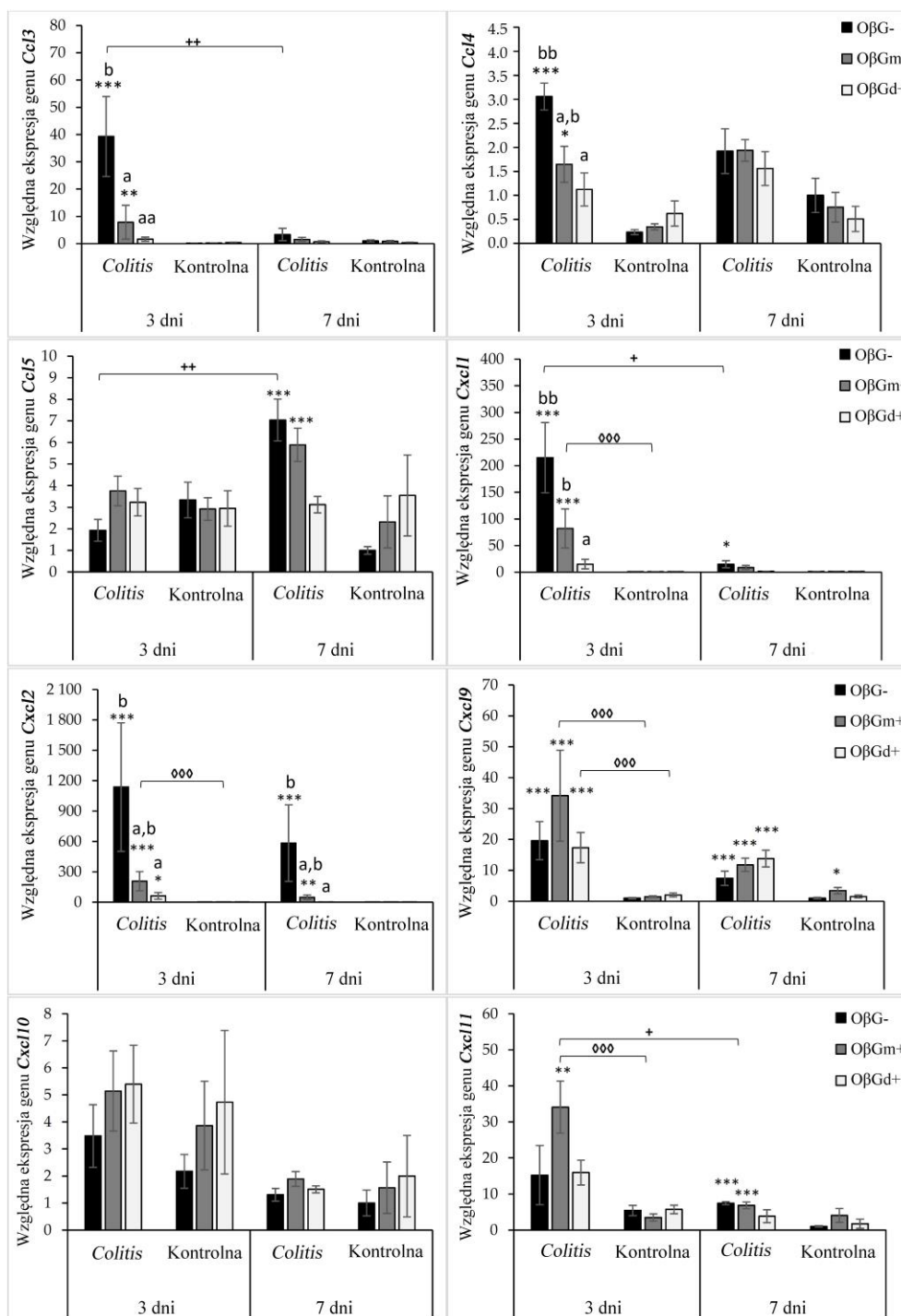
Uzyskane wyniki przeanalizowano przy użyciu programu Statistica (StatSoft, Kraków, Polska). W pierwszej kolejności dla wszystkich danych została określona normalność rozkładu testem Shapiro-Wilka i jednorodność wariancji testem Browna-Forsythe'a. Aby móc przeprowadzić dalszą analizę statystyczną z wykorzystaniem analizy wariancji, część danych poddano przekształceniom (pierwiastkowanie lub logarytmowanie), co jest dokładnie opisane w artykułach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Do oceny wpływu czynników eksperymentalnych na badane parametry oraz interakcji między tymi czynnikami została wykorzystana wieloczynnikowa analiza wariancji (ANOVA). Różnice między grupami zostały określone za pomocą testu post-hoc Tukey'a. Ponadto w artykule opublikowanym w *International Journal of Biological Macromolecules* wyniki, dla których ANOVA wykazała istotność, a test post-hoc Tukeya nie wykazał istotnych różnic, zastosowano mniej rygorystyczny test post-hoc Duncana. Wyniki wszystkich podgrup żywieniowych porównano z grupą kontrolną (OßG-) za pomocą testu post-hoc Dunnetta. Za istotne statystycznie różnice przyjęto *p-value* o wartości poniżej 0,05.

## 6. Syntetyczne omówienie wybranych wyników wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

### 6.1. Doświadczenie I

Ekspresja genów chemokin i ich receptorów była analizowana po 3. i 7. dniach od wywołania zapalenia, a to ze względu na charakterystykę zmian zapalnych w ścianie jelita grubego oraz stopień nasilenia tych zmian. Po 3. dniach od wywołania zapalenia zmiany w ścianie jelita grubego były charakterystyczne dla fazy zaostrenia CD u ludzi, natomiast po 7. dniach miały one cechy okresu wchodzenia w remisję charakterystycznego dla osób cierpiących na CD.

Wyniki ekspresji genów chemokin zostały przedstawione na rycinie 3. Analiza wariancji wykazała, że ekspresja genów wszystkich badanych chemokin (z wyjątkiem *Cxcl10*) była istotnie wyższa w grupie z zapaleniem jelita grubego w porównaniu z wartościami w grupie kontrolnej ( $p < 0,01$ ). Ponadto ekspresja genów *Ccl3*, *Ccl4*, *Cxcl1* i *Cxcl2* była istotnie obniżona w grupie otrzymującej paszę z dodatkiem O $\beta$ Gd+ w porównaniu do szczurów spożywających dietę kontrolną bez dodatku beta-glukanu ( $p < 0,05$ ). Po 7 dniach zaobserwowano znaczące obniżenie ekspresji genów *Ccl3*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl10* i *Cxcl11* w porównaniu do wartości odnotowanych 3 dni od podania TNBS ( $p < 0,05$ ). Ponadto, jak wykazała ANOVA, zaobserwowano istotną interakcję między stanem zapalnym okrężnicy a interwencją żywieniową, która wpłynęła na ekspresję genów *Ccl3*, *Cxcl1* i *Cxcl2* ( $p < 0,01$ ). Istotnie wyższą ekspresję genów tych chemokin zaobserwowano w grupie *colitis* O $\beta$ G- w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy w grupie *colitis* O $\beta$ Gd+ ekspresja wyszczególnionych genów była niższa w porównaniu z grupą *colitis* O $\beta$ G- i jednocześnie na tym samym poziomie co w grupie kontrolnej. Dodatkowo, ANOVA wykazała statystycznie istotną interakcję pomiędzy wszystkimi trzema czynnikami eksperymentalnymi (stan zapalny jelita grubego, interwencja dietetyczna i czas interwencji), które wpłynęły na ekspresję genów *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5* i *Cxcl11* ( $p < 0,05$ ).



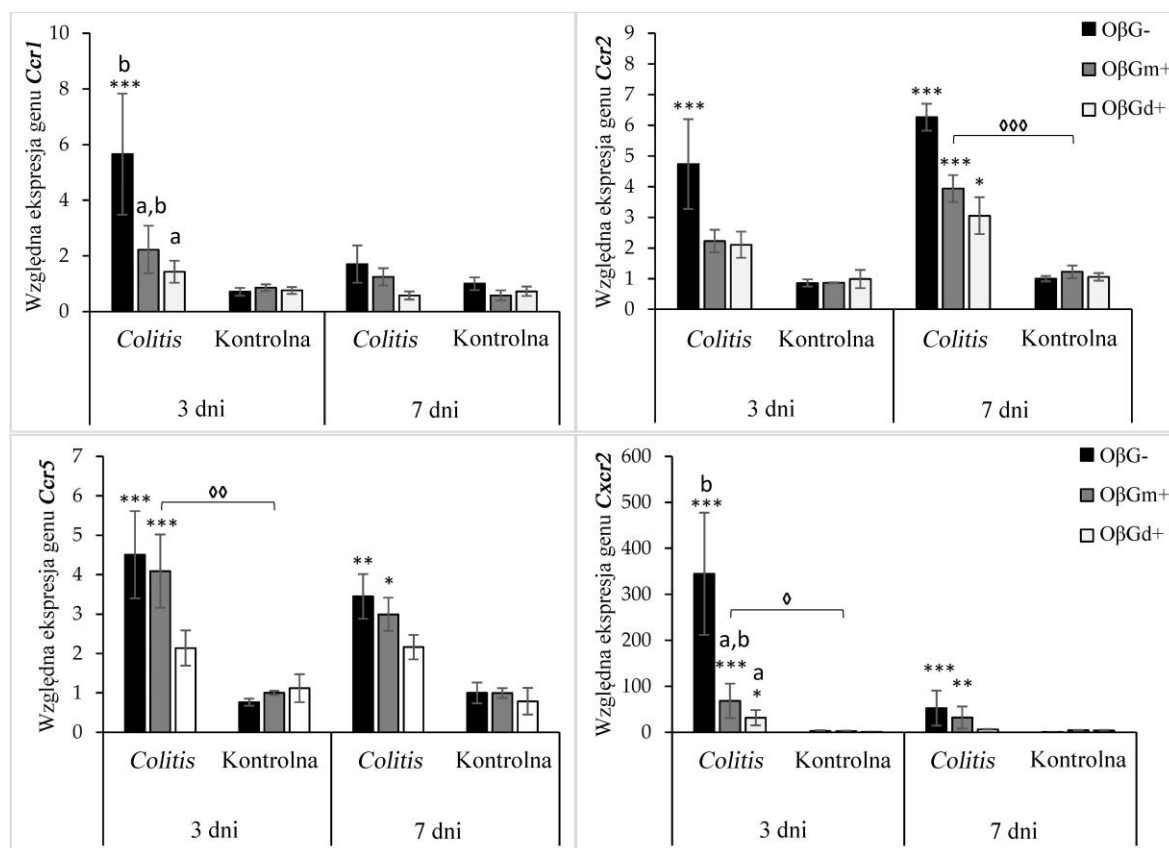
**Rycina 3.** Względna ekspresja genów chemokin. Istotne różnice względem grupy kontrolnej OβG- w tym samym punkcie czasowym analizowano testem post-hoc Dunnett'a (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Istotne różnice pomiędzy grupami z zapaleniem jelita grubego i grupami kontrolnymi w tym samym punkcie czasowym i z tą samą interwencją żywieniową analizowano testem post hoc Tukey'a (°°°  $p < 0,001$ ). Istotne różnice między tą samą podgrupą żywieniową w różnych punktach czasowych analizowano testem post hoc Tukey'a (+  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ ). Różne litery oznaczają istotne różnice w grupie z zapaleniem okrężnicy lub w grupie kontrolnej w tym samym punkcie czasowym analizowane testem post hoc Tukey'a (a,b  $p < 0,05$ , aa,bb  $p < 0,01$ ).

Wyniki ekspresji genów receptorów chemokin zostały przedstawione na rycinie 4. Analiza statystyczna tych wyników wykazała wyższą ekspresję genów *Ccr1*, *Ccr2*, *Ccr5*



i *Cxcr2* u szczurów z zapaleniem w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej ( $p < 0,001$ ). Ponadto, ANOVA wykazała istotnie niższą ekspresję genów *Ccr1* i *Ccr2* u szczurów spożywających paszę O $\beta$ Gd<sup>+</sup> w porównaniu do szczurów spożywających paszę bez beta-glukanu ( $p < 0,05$ ). Interakcję między stanem zapalnym a interwencją żywieniową wykazano dla *Ccr2* i *Cxcr2* ( $p < 0,01$ ), a w przypadku ekspresji *Ccr1* i *Ccr5* wykazano taki sam trend ( $p < 0,1$ ). Istotnie wyższa ekspresja genów receptorów wszystkich czterech chemokin była w grupie *colitis* O $\beta$ G<sup>-</sup> w porównaniu z grupą kontrolną O $\beta$ G<sup>-</sup> ( $p < 0,01$ ), natomiast w grupie *colitis* O $\beta$ Gd<sup>+</sup> ta ekspresja była obniżona w porównaniu z grupą *colitis* O $\beta$ G<sup>-</sup> ( $p < 0,05$ ).

Należy podkreślić, że ekspresja genów wszystkich wybranych chemokin i ich receptorów w grupach bez indukowanego zapalenia jelita grubego była niewielka, nie stwierdzono żadnych istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi podgrupami badawczymi.

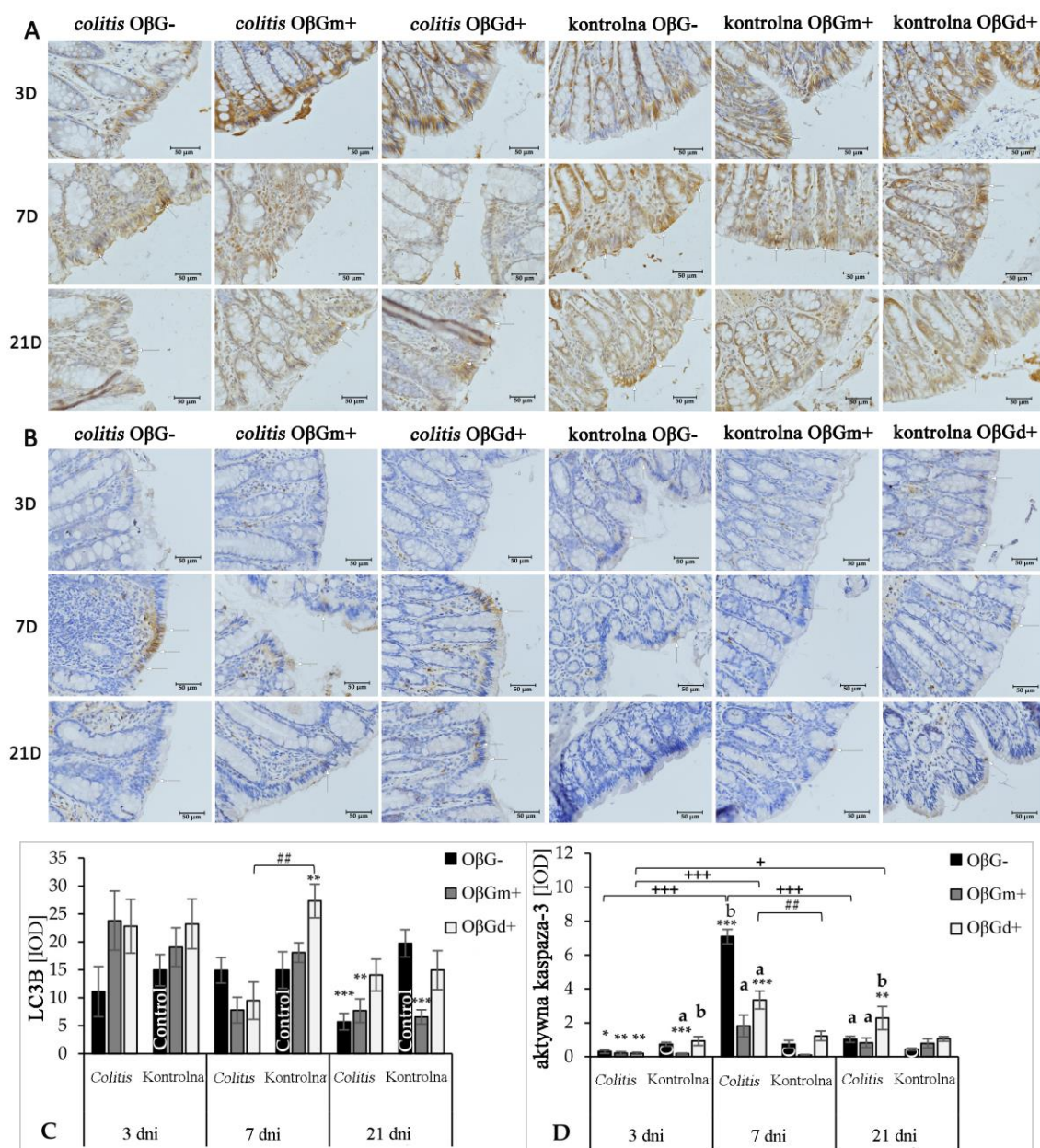


**Rycina 4.** Względna ekspresja genów receptorów chemokin. Istotne różnice względem grupy kontrolnej O $\beta$ G<sup>-</sup> w tym samym punkcie czasowym analizowano testem post-hoc Dunnett'a (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Istotne różnice pomiędzy grupami z zapaleniem jelita grubego i grupami kontrolnymi w tym samym punkcie czasowym i z tą samą interwencją żywieniową analizowano testem post hoc Tukey'a ( $^{\circ}$   $p < 0,05$ ,  $^{\circ\circ}$   $p < 0,01$ ,  $^{\circ\circ\circ}$   $p < 0,001$ ). Różne litery oznaczają istotne różnice w grupie z zapaleniem okrężnicy lub grupie kontrolnej w tym samym punkcie czasowym analizowane testem post hoc Tukey'a ( $^{a,b}$   $p < 0,05$ ).

Wyniki immunohistochemicznej ekspresji białka LC3B (markera autofagii) i ciętej (aktywnej formy) kaspazy-3 (markera apoptozy) w komórkach nabłonka okrężnicy zostały

przedstawione na rycinie 5. ANOVA wykazała istotny wpływ na ekspresję LC3B wszystkich trzech czynników doświadczalnych: długości okresu jaki upłynął od podania TNBS, spożycia O $\beta$ G wraz z paszą oraz obecności stanu zapalnego. Ekspresja LC3B zmniejszała się wraz z upływem czasu od podania TNBS ( $p < 0,001$ ). Indukowany stan zapalny zmniejszył również ekspresję tego białka ( $p < 0,01$ ). Spożycie paszy z O $\beta$ Gd+ spowodowało natomiast znaczący wzrost ekspresji LC3B w porównaniu z innymi grupami żywieniowymi ( $p < 0,05$ ). ANOVA wykazała również istotną interakcję między tymi trzema czynnikami eksperymentalnymi ( $p < 0,01$ ), co znalazło odzwierciedlenie w istotnie wyższej ekspresji LC3B po 7 dniach w grupie kontrolnej O $\beta$ Gh+ w porównaniu z grupą *colitis* O $\beta$ Gh+. Również po 21 dniach były obserwowane istotne różnice między podgrupami badawczymi, a ekspresja tego białka była istotnie niższa w grupach *colitis* O $\beta$ G-, *colitis* O $\beta$ Gm+ i kontrolnej O $\beta$ Gm+ w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy w grupie *colitis* O $\beta$ Gd+ ekspresja badanego białka była na zbliżonym poziomie do stwierdzonej w grupie kontrolnej.

Na ekspresję aktywnej formy kaspazy-3 wpłynęły wszystkie badane czynniki, czyli indukowany stan zapalny, długość okresu od wywołania zapalenia oraz dodatek do paszy O $\beta$ G ( $p < 0,0001$ ). Najważniejsze zmiany jakie wykazała analiza statystyczna to bardzo znaczący wzrost ekspresji tego białka w kolonocytach szczurów z indukowanym zapaleniem w 7. dniu od podania TNBS. W tym punkcie czasowym wykazano, że spożycie paszy z dodatkiem O $\beta$ G zarówno o dużej, jak i małej masie molowej spowodowało istotnie niższą ekspresję ciętej kaspazy-3 w kolonocytach szczurów z indukowanym zapaleniem. Ponadto, w grupie *colitis* O $\beta$ Gm+ poziom ekspresji tego białka był na poziomie zbliżonym do grupy kontrolnej. Po 3 i 21 dniach od wywołania zapalenia poziom ekspresji markera apoptozy był na znacznie niższym poziomie, lecz w obu okresach czasowych wykazano istotne różnice. W początkowym okresie (po 3 dniach) w grupach z indukowanym zapaleniem ekspresja aktywnej kaspazy-3 była niższa niż w grupie kontrolnej, natomiast po 21 dniach w grupie *colitis* O $\beta$ Gd+ ekspresja była wyższa w porównaniu z grupą kontrolną oraz pozostałymi podgrupami z indukowanym zapaleniem.

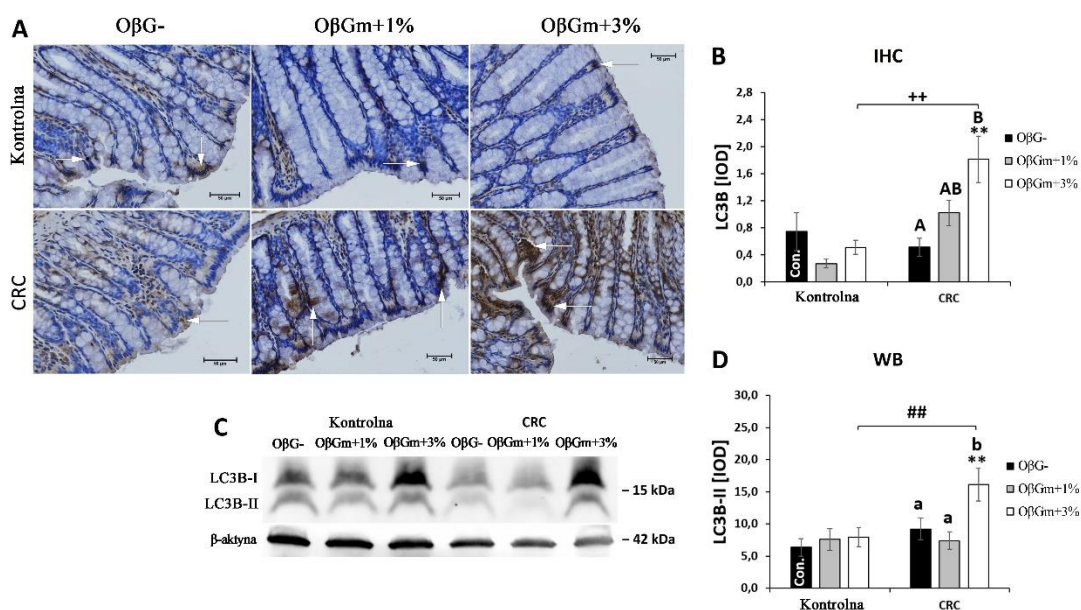


**Rycina 5.** Ekspresja markerów autofagii i apoptozy w kolonocytach – wyniki analizy immunohistochemicznej. (A, B) – zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu świetlnego (powiększenie 400x). Białe strzałki wskazują kolonocyty z wysoką ekspresją białka LC3B (A) i aktywnej kaspazy-3 (B) (brązowy kolor). (C, D) – wykresy ekspresji LC3B i aktywnej kaspazy-3 (średnia  $\pm$  SE) wyrażone jako zintegrowana gęstość optyczna (IOD). Istotne różnice względem grupy kontrolnej OβG- w tym samym punkcie czasowym analizowano testem post-hoc Dunnett'a (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Istotne różnice pomiędzy grupami z zapaleniem jelita grubego i grupami kontrolnymi w tym samym punkcie czasowym i z tą samą interwencją żywieniową analizowano testem post-hoc Tukey'a (##  $p < 0,001$ ). Istotne różnice pomiędzy tą samą podgrupą żywieniową w różnych punktach czasowych analizowano testem post-hoc Tukey'a (+  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$ ). Różne litery oznaczają istotne różnice w grupie z zapaleniem okrężnicy lub grupie kontrolnej w tym samym punkcie czasowym analizowane testem post-hoc Tukey'a (a,b  $p < 0,05$ ).

## 6.2. Doświadczenie II

Wyniki ekspresji głównego markera tworzenia autofagosomów (LC3B) zostały przedstawione na rycinie 6. Za pomocą metody immunohistochemicznej oznaczono ekspresję obu form LC3B (LC3B-I i LC3B-II) w błonie śluzowej jelita grubego. Analiza

wariancji wykazała istotną interakcję między rozwojem wczesnych stadiów raka jelita grubego a interwencją żywieniową ( $p < 0,01$ ). Ekspresja LC3B była wyższa w błonie śluzowej szczurów z grupy CRC żywionych paszą z dodatkiem 3% O $\beta$ Gm w porównaniu z grupami kontrolnymi oraz grupą CRC O $\beta$ G- (ryc. 6B). Forma LC3B-II, która bezpośrednio koreluje z liczbą utworzonych autofagów i jest najbardziej wiarygodnym markerem autofagii, została oznaczona w całej ścianie jelita grubego za pomocą analizy Western blot. Wyniki ekspresji LC3B-II w ścianie jelita grubego również wykazały istotnie wyższą ekspresję tego białka u szczurów z grupy CRC O $\beta$ Gm+3% w porównaniu z grupami kontrolnymi oraz grupą CRC O $\beta$ G- (ryc. 6D). Spożycie O $\beta$ Gm nie miało natomiast wpływu na ekspresję LC3B w grupach kontrolnych.

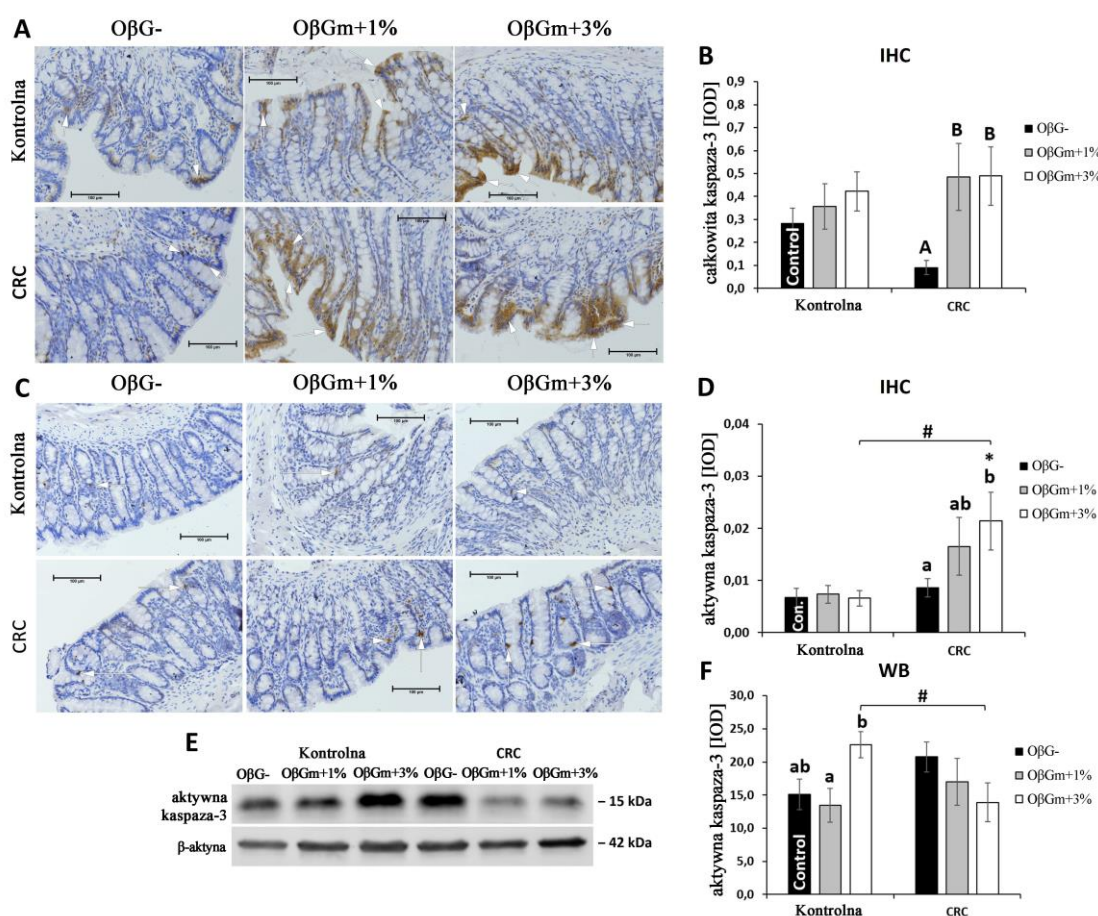


**Rycina 6.** Zmiany w ekspresji LC3B w błonie śluzowej jelita grubego (A, B) przy użyciu analizy immunohistochemicznej (IHC) i ekspresji LC3B-II w całej ścianie jelita grubego (C, D) przy użyciu analizy Western blot (WB). (A) Zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu świetlnego (powiększenie x400). Białe strzałki wskazują obszary o wysokiej ekspresji LC3B (brązowe obszary). (B) Zmiany w ekspresji LC3B przedstawione jako zintegrowana gęstość optyczna (IOD), (średnia  $\pm$  SE). (C) Reprezentatywne zdjęcia immunoblotów. (D) Zmiany w ekspresji LC3B-II przedstawione jako IOD, (średnia  $\pm$  SE). Różne litery oznaczają istotne różnice pomiędzy podgrupami żywieniowymi w grupie kontrolnej i CRC określone testem post-hoc Tukey'a (A,B  $p < 0,05$ ) lub testem post-hoc Duncan'a (a,b  $p < 0,05$ ). Istotne różnice pomiędzy podgrupami kontrolnymi i CRC z tą samą interwencją żywieniową analizowano testem post hoc Tukey'a ( $++ p < 0,01$ ) lub testem post hoc Duncan'a ( $## p < 0,01$ ). Istotne różnice w porównaniu z grupą kontrolną O $\beta$ G- analizowano za pomocą testu post-hoc Dunnett'a ( $** p < 0,01$ ).

Za pomocą analizy immunohistochemicznej oznaczona została ekspresja obu form kaspazy-3 (aktywnej i nieaktywnej) tzw. całkowita kaspaza-3 (ryc. 7A, B), jak również ekspresja aktywnej formy (cięta kaspaza-3) (ryc. 7C, D). Wykazano istotne różnice w ekspresji całkowitej kaspazy-3 oraz aktywnej formy tego białka ( $p < 0,05$ ). Indukcja wczesnego etapu kancerogenezy jelita grubego spowodowała obniżenie ekspresji całkowitej kaspazy-3 w błonie śluzowej, ale efekt ten został potwierdzony jedynie przez test post-hoc



Duncana ( $p < 0,05$ ), który ma wysokie ryzyko błędu pierwszego rodzaju (odrzućcia hipotezy zerowej gdy jest ona prawdziwa). Ponadto efekt ten nie był wykazany dla aktywnej formy tego białka. Najbardziej istotne różnice w ekspresji całkowitej i ciętej kaspazy-3 zostały wykazane pomiędzy grupą CRC O $\beta$ Gm+3% a grupą CRC O $\beta$ G-, w których wyższa ekspresja była u szczurów żywionych paszą z dodatkiem 3% O $\beta$ Gm. Należy podkreślić, że we wszystkich grupach kontrolnych nie zaobserwowano zmian w ekspresji kaspazy-3. Zmiany w ekspresji aktywnej kaspazy-3 w ścianie jelita grubego oznaczone za pomocą analizy Western blot przedstawiono na rycinie 7E i 7F. Ekspresja tego białka w całej ścianie jelita była wyższa tylko w grupie kontrolnej O $\beta$ Gm+3% w porównaniu do grup kontrolnych O $\beta$ Gm+1% i CRC O $\beta$ Gm+3%. Nie zaobserwowano różnic między innymi podgrupami.



**Rycina 7.** Zmiany w ekspresji całkowitej kaspazy-3 (A, B) i aktywnej kaspazy-3 (C, D) w błonie śluzowej jelita grubego wykazane przy użyciu analizy immunohistochemicznej (IHC) oraz ekspresji aktywnej kaspazy-3 w całej ścianie jelita grubego (E, F) przy użyciu analizy Western blot (WB). (A, C) Zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu świetlnego (powiększenie x400). Białe strzałki wskazują obszary o wysokiej ekspresji kaspazy-3 i jej aktywnej formy (brązowe obszary). (B, D) Zmiany w ekspresji kaspazy-3 i jej aktywnej formy przedstawione jako zintegrowana gęstość optyczna (IOD), (średnia  $\pm$  SE). (E) Reprezentatywne zdjęcia immunoblotów. (F) Zmiany w ekspresji aktywnej kaspazy-3 przedstawione jako IOD, (średnia  $\pm$  SE). Różne litery oznaczają istotne różnice pomiędzy podgrupami dietetycznymi w grupie kontrolnej i CRC określone testem post-hoc Tukey'a (A,B  $p < 0,05$ ) lub testem post-hoc Duncan'a (a,b  $p < 0,05$ ). Istotne różnice pomiędzy podgrupami kontrolnymi i CRC z tą samą interwencją żywieniową analizowano testem post hoc Duncan'a (#  $p < 0,05$ ). Istotne różnice w porównaniu z grupą kontrolną O $\beta$ G- analizowano za pomocą testu post-hoc Dunnett'a (\*  $p < 0,05$ ).

## **7. Podsumowanie wyników i ich dyskusja**

Cel badań wchodzących w zakres niniejszej rozprawy doktorskiej można podzielić na dwie odrębne części. Pierwsza z nich dotyczyła weryfikacji terapeutycznego potencjału beta-glukanu z owsa o różnej masie molowej w CD wraz z poznaniem mechanizmów tego działania, w tym przede wszystkim mechanizmów związanych z wpływem na tworzenie nacieku zapalnego w miejscu indukcji zapalenia oraz z modulacją procesu apoptozy i autofagii, które mają wpływ na integralność bariery jelitowej i są zaangażowane w mechanizmy rozwoju nowotworów przez wpływ na transformację i progresję. Druga część dotyczyła mechanizmów działania potencjału terapeutycznego beta-glukanu z owsa o małej masie molowej we wczesnych etapach kancerogenezy jelita grubego, ze szczególnym uwzględnieniem procesu apoptozy i autofagii, które jak wspomniano powyżej, mają istotny wpływ na transformację i progresję nowotworową.

### **7.1. Doświadczenie I**

Model zapalenia jelita grubego zastosowany w niniejszej rozprawie doktorskiej jest charakterystyczny dla CD u ludzi, przede wszystkim ze względu na obecność przezściennych zmian zapalnych z gęstą infiltracją limfocytów i wydzielaniem cytokin prozapalnych w całej ścianie jelita (Antoniou i wsp., 2016; Catana i wsp., 2018), co zostało potwierdzone i opisane we wcześniejszych publikacjach naszego zespołu (Żyła i wsp., 2019, Żyła i wsp., 2021). Analizowane w tym badaniu modelowym trzy punkty czasowe odzwierciedlają trzy stadia rozwoju CD. Okres 3 dni od podania TNBS odpowiada miejscowemu ostremu stanowi zapalnemu charakterystycznemu dla aktywnej fazy CD. W 7. dniu wykazano zmniejszenie ekspresji markerów stanu zapalnego oraz redukcję innych objawów związanych z zapaleniem, co wskazuje na początek okresu remisji (Żyła i wsp., 2021). Po 21. dniach ocena histologiczna wykazała łagodne lub umiarkowane zapalenie jelita grubego oraz znaczne zmniejszenie ekspresji markerów stanu zapalnego, co odzwierciedla stadium okołoremisyjne CD (Żyła i wsp., 2019). W analizowanym w niniejszej rozprawie modelu CD, zapalenie jelit uzyskano przez miejscowe podanie roztworu TNBS w 50% etanolu, co wiąże się zarówno z wywołaniem uszkodzenia chemicznego ściany jelita, jak i indukcją zwiększonej reaktywności immunologicznej limfocytów T. Użyty w badaniu modelowym etanol prowadzi do osłabienia bariery śluzówkowej umożliwiając lepszą penetrację TNBS, który powoduje poważne uszkodzenia ściany okrężnicy przez silne właściwości oksydacyjne tego związku (Antoniou i wsp., 2016; El-Salhy i Hatlebakk, 2016). U badanych szczurów natychmiast po podaniu TNBS wystąpił

miejscowy stan zapalny, co objawiało się utratą apetytu powodującą zmniejszone spożycie paszy przez 5 dni od podania TNBS, biegunkami u niektórych szczurów oraz mniejszym przyrostem masy ciała tych zwierząt. Należy jednak zaznaczyć, że zmiany te były przemijające i mało inwazyjne, na co wskazuje ogólny dobry stan zdrowia zwierząt oraz brak wzrostu aktywności transaminaz wątrobowych w osoczu (Kopiasz i wsp., 2020).

Przebieg CD u ludzi charakteryzuje się okresami zaostrzeń i remisji. Okresom zaostrzeń towarzyszy znaczny naciek zapalny leukocytów w błonie śluzowej i podśluzowej jelita, w tym makrofagów, neutrofilów i limfocytów T (takich jak komórki Th1 i Th17). Komórki te migrują poprzez wiązanie cząsteczek integryn znajdujących się na powierzchni leukocytów z cząsteczkami adhezji komórkowej znajdującymi się na powierzchni komórek śródbłonna. W odpowiedzi na sygnały zapalne w błonie śluzowej jelit, komórki śródbłonna drobnych naczyń krwionośnych oraz komórki nabłonka jelit wytwarzają chemokiny, które działają jako chemoatraktanty dla leukocytów, rekrutując te komórki do miejsca zapalenia (Singh i wsp., 2016; Ramos i Papadakis, 2019). Ostry stan zapalny obserwowany po 3. dniach od podania TNBS był spowodowany uszkodzeniem komórek okrężnicy. Cząsteczki z uszkodzonych komórek działają jako sygnały chemotaktyczne, stymulując migrację komórek odpornościowych z krwi do tkanki objętej stanem zapalnym. Zrekrutowane komórki odpornościowe zwiększają ekspresję cytokin prozapalnych, które z kolei rekrutują nowe komórki odpornościowe i wzmacniają odpowiedź immunologiczną (Ramos i Papadakis, 2019). W prezentowanym w rozprawie badaniu indukowane zapalenie jelita grubego u szczurów zwiększało ekspresję genów chemokin, takich jak *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl9* i *Cxcl11* oraz receptorów chemokin, takich jak *Ccr1*, *Ccr2*, *Ccr5* i *Cxcr2*. Ponadto wykazano znaczący wpływ czasu na zmniejszenie ekspresji genów *Ccl3*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl10*, *Cxcl11* i *Ccr1* po 7. dniach od podania TNBS w porównaniu do 3. dni (Kopiasz i wsp., 2022). Zwiększoną ekspresję chemokin i ich receptorów potwierdzają również wyniki innych badań modelowych na zwierzętach, w których indukowany stan zapalny jelita grubego spowodował wzrost ekspresji genów *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcr2*, *Ccr1*, *Ccr5*, jak również wzrost ekspresji białek CXCL2 i CXCR2 (Sasaki i wsp., 2014; Majima i wsp., 2018; Miranda i wsp., 2018; Li i wsp., 2021). Ponadto, zwiększoną ekspresję białek i genów chemokin i ich receptorów obserwuje się również u pacjentów z UC i CD (Singh i wsp., 2016; Zhou i Liu, 2017; Ramos i Papadakis, 2019).

Po 3. dniach od indukcji zapalenia wykazano zmniejszoną ekspresję genów chemokin, takich jak *Ccl3* i *Ccl4* oraz receptorów chemokin *Ccr1* i *Ccr2* u zwierząt z zapaleniem jelita grubego żywionych paszą z OßG o małej masie molowej, podczas gdy

zwierzęta otrzymujące paszę z OβG o dużej masie molowej wykazywały zmniejszoną ekspresję chemokin *Ccl3*, *Ccl4*, *Cxcl1* i *Cxcl2* oraz receptorów *Ccr1*, *Ccr2*, *Ccr5* i *Cxcr2* (Kopiasz i wsp., 2022). Wyniki te wyraźnie wskazują na silniejszy wpływ beta-glukanu z owsa o dużej masie molowej na modulację ekspresji genów chemokin i ich receptorów w ścianie okrężnicy podczas ostrej fazy zapalenia.

Spośród powyższych chemokin, na które miało wpływ spożycie OβG o dużej masie molowej, kluczowe wydają się być chemokiny CXCL1 i CXCL2 oraz ich receptor CXCR2, odgrywające istotną rolę w zapaleniu jelita grubego i progresji nowotworowej. Oś CXCLs/CXCR2 odgrywa istotną rolę w rekrutacji neutrofili do miejsca zapalenia oraz zwiększa penetrację błony śluzowej przez mieloidalne komórki supresorowe (MDSC). Rozległa infiltracja neutrofili podczas przewlekłego stanu zapalnego jest jednym z najważniejszych czynników patogenezы w różnych chorobach zapalnych, w tym CD. Ponadto, przewlekły stan zapalny jest ściśle skorelowany z inicjacją raka, a MDSC osłabiają przeciwnowotworowe działanie limfocytów T i promują inwazję i zdolność przerzutowania nowotworu (Cheng i wsp., 2019). Zatem wykazane w badaniu własnym zmniejszenie ekspresji genów *Cxcl1*, *Cxcl2* i *Cxcr2* pod wpływem spożycia OβG o dużej masie molowej, wydaje się być korzystne, jednakże sama ekspresja genów nie zawsze przekłada się bezpośrednio na ekspresję danego białka w tkance. Kierunek zmian w ekspresji białka CXCL1 i CXCR2 był odwrotny. W grupie szczurów z zapaleniem po 3. i 7. dniach doświadczenia ekspresja tych białek była na niskim poziomie, podczas gdy w grupach z zapaleniem otrzymujących pasze z OβG ekspresja CXCL1 była na poziomie zbliżonym do wartości stwierdzonej u zwierząt z grupy kontrolnej. Ponadto ekspresja CXCR2 po 7. dniach była w tych grupach na znacznie wyższym poziomie niż w pozostałych grupach. Należy również podkreślić, że w grupach *colitis* żywionych paszą z OβG wysoka ekspresja białka CXCR2 była wykazana szczególnie w pobliżu obszaru nacieków zapalnych i silnie uszkodzonej błony śluzowej (Rycina 4A z artykułu Kopiasz i wsp., 2022). Można zatem przypuszczać, że taki kierunek zmian ekspresji tych białek spowodował, że wzrosła również liczba neutrofili i monocytów, które pełnią wiele istotnych funkcji w organizmie. Dzięki silnej reaktywności na patogeny i aktywności przeciwbakteryjnej, neutrofile chronią organizm przed zewnętrznymi patogenami, szczególnie podczas uszkodzenia bariery jelitowej. Z drugiej strony, rezydujące w tkankach monocyty mogą być przekształcane w makrofagi, które po prowokacji mikrobiologicznej są aktywowane do wytwarzania chemoatraktantów neutrofili, takich jak chemokiny CXCL1 i CXCL2 (Prame Kumar i wsp., 2018). Biorąc pod uwagę wczesny etap ostrego indukowanego zapalenia oraz rolę neutrofili



i monocytów/makrofagów w niszczeniu i neutralizacji patogenów wydaje się, że ich szybka infiltracja spowodowana beta-glukanem z owsa może być korzystna poprzez wzmocnienie ochrony przed patogenami utraconej przez uszkodzenie integralności bariery jelitowej. Ochronne działanie neutrofili w indukowanym przez TNBS i DSS zapaleniu jelita grubego potwierdzają również badania innych autorów (Kühl i wsp., 2007; Zhang i wsp., 2011).

Niski poziom ekspresji genu i białka receptora CCR5, jak również ekspresja białka CCL5 (liganda dla tego receptora) był stwierdzony w fazie ostrego zapalenia u szczurów żywionych paszą z dodatkiem O $\beta$ G o dużej masie molowej, podczas gdy żywienie paszą z dodatkiem O $\beta$ G o małej masie molowej zmieniało tak samo tylko ekspresję tych białek, nie mając natomiast wpływu na ekspresję ich genów. Chemokina CCL5 może być syntetyzowana i wydzielana przez wiele rodzajów komórek, w tym płytki krwi, makrofagi, limfocyty T, fibroblasty czy komórki śródbłónki i nabłonka jelitowego. Chemokina ta jest zaangażowana m.in. w aktywację szlaków sygnałowych STAT3, czynnik jądrowy NF- $\kappa$ B i MAPK za pośrednictwem receptora CCR5 obecnego na powierzchni komórek (Li i wsp., 2020). Aktywacja tych szlaków indukuje wzrost ekspresji cytokin prozapalnych, takich jak TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6 (Sahu i wsp., 2016). Ponadto, w patogenezę CD zaangażowane są głównie komórki Th1, które charakteryzują się wysoką ekspresją receptora CCR5, dlatego wzrost ekspresji koreluje z intensywnością stanu zapalnego. Receptor ten jest również chemoatraktantem dla komórek CD4+, których liczba wzrasta podczas stanu zapalnego (Mencarelli i wsp., 2016). To wskazuje, że przeciwzapalne i immunomodulujące działanie O $\beta$ G jest związane z modulacją ekspresji genów i białek chemokin i ich receptorów.

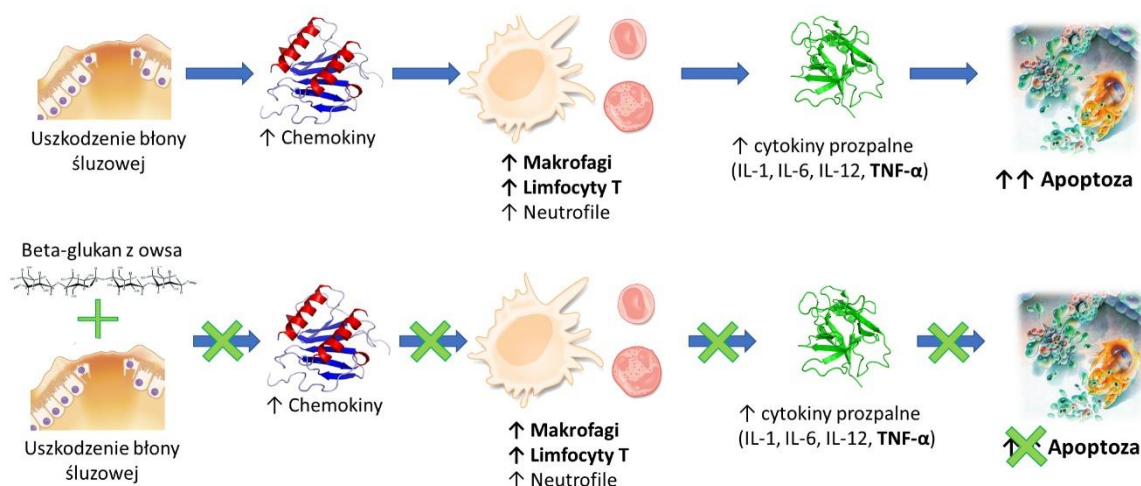
W szczurzym modelu CD badano również zmiany intensywności procesu autofagii i apoptozy. W początkowym okresie eksperymentu ekspresja LC3B, markera tworzenia i dojrzewania autofagosomów, była wyższa w porównaniu do 21. dnia od podania TNBS lub soli fizjologicznej (Kopiasz i wsp., 2022). Mogło to być spowodowane mechanicznym podrażnieniem spowodowanym doodbytniczym podaniem tych substancji. Istotny wpływ zapalenia na zmniejszenie ekspresji LC3B w IEC wykazano po 21. dniach. Upośledzenie procesu autofagii obserwuje się również u ludzi z CD (Hooper i wsp., 2017). Wyniki badań własnych wykazały, że spożycie O $\beta$ G o dużej masie molowej zmniejszało negatywny wpływ stanu zapalnego na proces autofagii. Ta frakcja polisacharydów spowodowała, że ekspresja LC3B była na poziomie zbliżonym do grupy kontrolnej. Istotny wpływ O $\beta$ G na autofagię wykazano również w eksperymencie przeprowadzonym na szczurach, u których indukowano zapalenie poprzez dożylnie podanie LPS. W tym przypadku analiza transkryptomiczna wykazała, że spożycie obu frakcji O $\beta$ G zwiększało ekspresję genu *Atg10*

i *Atg13*, które należą do rodziny genów związanych z autofagią (Błaszczyk i wsp., 2018). Powyższe dane wskazują zatem na znaczący wpływ beta-glukanu z owsa w przywracaniu efektywności procesu autofagii w IEC objętych stanem zapalnym, przy silniejszym wpływie frakcji o dużej masie molowej.

Wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej dokumentują silny wpływ indukowanego zapalenia na nasilenie procesu apoptozy po 7. dniach od podania TNBS. Ekspresja aktywnej kaspazy-3 w IEC w tym punkcie czasowym była około ośmiokrotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną, co świadczy o nadmiernej programowanej śmierci komórek, co mogło prowadzić do zmniejszenia integralności bariery jelitowej. W ostrej fazie (po 3. dniach) wykazano natomiast istotnie niższy poziom tego enzymu w grupach z zapaleniem, co mogło być spowodowane bardzo silnym miejscowym uszkodzeniem błony śluzowej okrężnicy wraz z towarzyszącą temu martwicą. Takie uszkodzenia skutkowały silnym miejscowym stanem zapalnym, który po 7. dniach spowodował inicjację apoptozy w komórkach nabłonka jelitowego, które nie były uszkodzone bezpośrednio przez TNBS (Kopiasz i wsp., 2021). Nasilony proces apoptozy obserwowany jest również u osób z CD i UC, u których skutkuje to zaburzeniami integralności bariery jelitowej i umożliwia migrację patogennej flory bakteryjnej do blaszki właściwej jelita grubego, a to z kolei prowadzi do zwiększenia nasilenia stanu zapalnego i poziomu cytokin prozapalnych, w tym TNF- $\alpha$  (Blander, 2016). W badaniu własnym spożycie O $\beta$ G spowodowało istotnie niższą ekspresję aktywnej kaspazy-3 po 7. dniach. Spożycie paszy z O $\beta$ G o dużej masie molowej spowodowało około dwukrotne obniżenie ekspresji tego białka w porównaniu z grupą z zapaleniem spożywającą paszę bez O $\beta$ G, podczas gdy u szczurów spożywających paszę z O $\beta$ G o małej masie molowej wykazano prawie czterokrotnie niższą ekspresję tego białka. Ponadto ekspresja tego białka w grupie *colitis* O $\beta$ Gm<sup>+</sup> była na poziomie zbliżonym do stwierdzonej w grupie kontrolnej (Kopiasz i wsp. 2021). Dowodzi to faktu, że obie frakcje O $\beta$ G skutecznie tłumią nadmierną apoptozę IEC, przy czym znacznie silniejszy wpływ wykazuje frakcja o małej masie molowej.

Wpływ O $\beta$ G na proces apoptozy jest prawdopodobnie związany ze zmniejszeniem stężenia TNF- $\alpha$  i innych cytokin prozapalnych w ścianie okrężnicy zmienionej zapalnie (Żyła i wsp., 2019; Żyła i wsp., 2021). TNF- $\alpha$  jest jednym z głównych mediatorów stanu zapalnego, który bezpośrednio stymuluje proces apoptozy. Wiązanie tego czynnika z receptorem TNFR1a indukuje zewnątrzpochodny szlak apoptozy (Günther i wsp., 2012). Ponadto, jak wskazują wyniki badania Pott i wsp. (2018), może to być powiązane również z procesem autofagii. Zwiększona intensywność procesu autofagii w nabłonku jelitowym

objętym stanem zapalnym chroni komórki przed apoptozą indukowaną przez  $\text{TNF-}\alpha$ , a to z kolei pomaga w utrzymaniu integralności bariery jelitowej i zmniejszeniu stanu zapalnego (Pott i wsp., 2018). W związku z tym obecnie leczenie CD u ludzi opiera się między innymi na lekach stymulujących autofagię i zmniejszających stężenie  $\text{TNF-}\alpha$  (Azzman, 2019).



**Rycina 8.** Schemat mechanizmu działania beta-glukanu z owsa na proces apoptozy przez modulację ekspresji chemokin.

Podsumowując, potencjalny mechanizm przeciwdziałania nadmiernej apoptozie komórek nabłonka jelitowego w zmienionej zapalnie okrężnicy na skutek spożywania paszy z dodatkiem O $\beta$ G może być powiązany z wpływem tych polisacharydów na ekspresję chemokin i ich receptorów. Potencjalny ciąg przyczynowo-skutkowy jest przedstawiony na Rycinie 8. Zgodnie z przedstawionymi powyżej wynikami i danymi literaturowymi indukowany stan zapalny powoduje uszkodzenie błony śluzowej co pociąga za sobą uwolnienie wielu chemokin, które wykazują działanie chemotaktyczne względem komórek układu odpornościowego, w tym limfocytów, makrofagów i neutrofilii. Migracja leukocytów do miejsca uszkodzeń błony śluzowej oraz głębszych warstw ściany jelita grubego powoduje naciek zapalny komórek układu immunologicznego oraz ich aktywację przez interakcję chemokin z odpowiadającymi im receptorami, co pociąga za sobą zwiększone wydzielanie cytokin prozapalnych wytwarzanych przez aktywowane makrofagi i limfocyty T. Szczególnie istotny wydaje się być udział  $\text{TNF-}\alpha$ , który jest jednym z głównych mediatorów stanu zapalnego bezpośrednio stymulujący programowaną śmierć komórki przez aktywację zewnątrzpochodnego szlaku apoptotycznego. O $\beta$ G wykazują działanie ochronne na uszkodzoną barierę jelitową zmniejszając ekspresję genów wielu chemokin i ich receptorów oraz modulując ekspresję białek chemokin i ich receptorów. To pociąga za sobą modulowanie migracji komórek układu immunologicznego, zmniejszając naciek zapalny,

przede wszystkim przez limfocyty T i makrofagi. Zmniejszenie ekspresji chemokin powoduje również mniejszą aktywację leukocytów do wydzielania cytokin prozapalnych, które są bezpośrednimi mediatorami zapalenia, w tym przede wszystkim TNF- $\alpha$ . W konsekwencji O $\beta$ G powodują hamowanie nadmiernej indukcji apoptozy wykazując ochronne działanie na integralność bariery jelitowej, co w chorobie Leśniowskiego-Crohna jest jednym z kluczowych elementów przyspieszających wyciszenie stanu zapalnego i remisję choroby.

## 7.2. Doświadczenie II

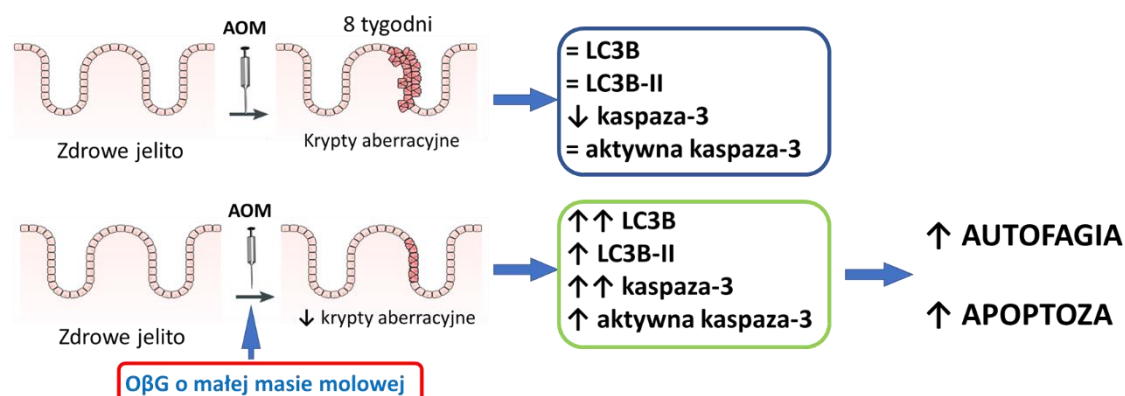
Prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej badanie (opisane bardziej szczegółowo w artykule Kopiasz i wsp., 2023) jest pierwszym w literaturze, które opisuje wpływ spożycia O $\beta$ G o małej masie molowej i wysokiej czystości (99,3%) na wczesne etapy rozwoju raka jelita grubego. W eksperymencie *in vivo* zastosowano model indukcji CRC polegający na dootrzewnowej iniekcji azoksymetanu, w którym to po 8-12 tygodniach zaczynają pojawiać się krypty aberracyjne będące wczesnym markerem rozwoju CRC. W badaniach zastosowano 8-tygodniowy protokół, dzięki czemu uzyskano bardzo wczesny etap kancerogenezy, w którym pojedyncze nieprawidłowe krypty jelitowe dopiero zaczynają się pojawiać i są widoczne w obrazie histologicznym, co stwierdzono u szczurów z grupy CRC. Wyniki tej analizy potwierdziły skuteczność modelu badawczego. W niniejszym badaniu *in vivo* została oceniona ekspresja białek będących markerami autofagii i apoptozy przy użyciu dwóch metod analitycznych – immunohistochemii i Western blot. Dzięki metodzie immunohistochemicznej oznaczona została ekspresja i lokalizacja badanych białek w błonie śluzowej jelita grubego, natomiast dzięki analizie Western blot została oznaczona z dużą dokładnością ekspresja badanych białek w całej ścianie jelita grubego. Ponadto dzięki metodzie Western blot możliwe było oznaczenie ekspresji dwóch izoform białka LC3B: LC3B-I i LC3B-II, co jest istotne ze względu na to, że LC3B-II jest bezpośrednim markerem tworzenia autofagosomów i najlepiej odzwierciedla intensywność autofagii. W niniejszej rozprawie zostały zaprezentowane wyniki dwóch najważniejszych markerów autofagii i apoptozy, czyli ekspresja białka LC3B bezpośrednio związanego z tworzeniem autofagosomów i kaspazy-3 będącej enzymem egzekutorowym i łączącym szlak zewnątrz- i wewnątrzpochodny apoptozy.

Indukowany w prezentowanym badaniu wczesny etap kancerogenezy nie wpłynął istotnie na ekspresję LC3B, jak również spożycie jako dodatku do paszy O $\beta$ Gm w grupach kontrolnych nie miało wpływu na ekspresję tego białka. Natomiast ekspresja LC3B w błonie

śluzowej oraz LC3B-II w całej ścianie jelita grubego była zwiększona u szczurów, u których był wywołany wczesny etap kancerogenezy, i które spożywały paszę z dodatkiem 3% OβGm. Różnica w ekspresji tego białka pomiędzy grupą CRC OβG- a grupą CRC OβGm+3% wskazuje na stymulujące autofagię działanie OβGm w zmienionej przez rozwój raka błonie śluzowej okrężnicy (Kopiasz i wsp., 2023). Wpływ autofagii na proces kancerogenezy może być zarówno korzystny, jak i niekorzystny w zależności od fazy rozwoju raka. Proces ten może pośredniczyć w przetrwaniu i progresji komórek nowotworowych poprzez dostarczanie im składników odżywczych w warunkach stresu, a z drugiej zaś strony może prowadzić do śmierci komórek i zahamowania progresji nowotworu. We wczesnych etapach kancerogenezy może działać jako supresor, a w zaawansowanych stadiach rozwoju raka jako promotor (Zhou i wsp., 2016; Long i wsp., 2020). W badaniu własnym (Kopiasz i wsp., 2023) nasilenie autofagii przez OβGm wydaje się mieć korzystny wpływ poprzez zmniejszenie ryzyka niestabilności genomowej i inicjacji kancerogenezy po ekspozycji na AOM, szczególnie ze względu na bardzo wczesny etap jej rozwoju.

Podczas gdy rola autofagii w kancerogenezie jest nieco kontrowersyjna, apoptoza odgrywa jednoznaczną rolę przeciwnowotworową poprzez indukowanie śmierci komórek nowotworowych lub potencjalnie nowotworowych (Das i wsp., 2021). Wyniki badania własnego (Kopiasz i wsp., 2023) wskazują na niewielkie obniżenie ekspresji całkowitej kaspazy-3 w błonie śluzowej szczurów z indukowanym wczesnym etapem kancerogenezy, podczas gdy spożywanie paszy uzupełnionej obiema dawkami OβGm spowodowało znaczący wzrost ekspresji tego białka u szczurów z grupy CRC. Większa dawka OβGm (3%) miała również istotny wpływ na wzrost ekspresji aktywnej kaspazy-3 u szczurów z grupy CRC. Co więcej, efekt ten nie był obserwowany w całej ścianie jelita grubego, prawdopodobnie ze względu na stwierdzoną w badaniu immunohistochemicznym lokalizację tej zwiększonej ekspresji aktywnej kaspazy-3. Zwiększona ekspresja aktywnej formy tego enzymu pod wpływem spożywania 3% OβGm była jedynie w błonie śluzowej, głównie w komórkach krypt jelitowych. Komórki te są głównym miejscem inicjacji transformacji nowotworowej, prowadzącej do powstania krypt aberracyjnych (Clapper i wsp., 2020). W związku z tym obserwowane nasilenie apoptozy tylko w tym miejscu jest pożądane w początkowym etapie kancerogenezy, ponieważ zwiększa programowaną śmierć potencjalnie nowotworowych komórek. Należy również podkreślić, że zwiększona ekspresja aktywnej kaspazy-3 była ograniczona tylko do pojedynczych komórek i nie była rozległa, co wskazuje na umiarkowane nasilenie apoptozy, które nie powinno wpływać negatywnie na integralność bariery jelitowej.

Potencjalny mechanizm działania przeciwnowotworowego O $\beta$ Gm przez indukcję apoptozy jest związany prawdopodobnie z działaniem immunomodulującym w tym przede wszystkim ze zwiększeniem poziomu czynników zapalnych, takich jak IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , a także zwiększoną infiltracją błony śluzowej przez granzym B wytwarzany przez limfocyty T. Czynniki te zaangażowane są w indukcję apoptozy przez szlak zewnątrzpochodny, w tym w szczególności TNF- $\alpha$ , który wiąże się z receptorami śmierci takimi jak TNFR1 i TNFR2 (Zhang i wsp., 2018; Carneiro i El-Deiry, 2020). Ponadto, prawdopodobnie efekt ten powiązany jest z wpływem O $\beta$ G na mikrobiotę, która w rezultacie wytwarza zwiększone ilości SCFA, w tym maślanu i propionianu. Te konkretne krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe mogą stymulować limfocyty T do wydzielania IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , które aktywują apoptozę jak to opisano powyżej (Al-Qadami i wsp., 2022). Poza tym, granzym B może indukować apoptozę komórek nowotworowych poprzez różne szlaki, w tym bezpośrednią i pośrednią aktywację kaskady apoptotycznej prowadzącej do rozszczepienia prokaspazy-3 do postaci aktywnej (Wang i wsp., 2021).



**Rycina 9.** Schemat wpływu spożywania O $\beta$ Gm na proces apoptozy i autofagii w zmienionej przez wczesny etap kancerogenezy błonie śluzowej jelita grubego.

Podsumowując, niniejsze badanie wykazało, że spożycie beta-glukanu z owsa o małej masie molowej stymuluje proces autofagii i apoptozy w błonie śluzowej jelita grubego we wczesnym stadium kancerogenezy poprzez zwiększenie ekspresji LC3B, LC3B-II, całkowitej kaspazy-3 oraz aktywnej formy kaspazy-3 (Ryc. 9). Efekt ten był zależny od dawki i silniejszy dla 3% dodatku O $\beta$ Gm do paszy. Należy również zauważyć, że modulujący wpływ był wykazany tylko w jelicie grubym zmienionym przez rozwój raka. Podobnego efektu nie stwierdzono w jelicie grubym szczurów bez indukowanego wczesnego etapu kancerogenezy. Właściwości te sugerują, że spożywanie O $\beta$ Gm jest bezpieczne i wywiera działanie modulujące tylko w momencie nasilonych zmian związanych z nowotworzeniem.

## 8. Wnioski

Wyniki badań wchodzących w zakres niniejszej rozprawy doktorskiej pozwoliły na pozytywne zweryfikowanie wszystkich postawionych hipotez badawczych, co umożliwiło sformułowanie następujących spostrzeżeń:

1. beta-glukan z owsa wykazuje właściwości immunomodulujące, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe przez wpływ na ekspresję chemokin i ich receptorów oraz na proces autofagii i apoptozy;
2. niezależnie od schorzenia jelita grubego, beta-glukan z owsa wykazuje działanie stymulujące autofagię, natomiast wpływ na apoptozę jest zależny od rodzaju schorzenia;
3. w przypadku ostrego stanu zapalnego jelita grubego beta-glukan z owsa wykazuje działanie zmniejszające nadmierną apoptozę, z silniejszym wpływem frakcji o małej masie molowej, podczas gdy w początkowym etapie kancerogenezy jelita grubego beta-glukan z owsa o małej masie molowej wykazuje działanie stymulujące proces apoptozy;
4. beta-glukan z owsa nie wykazuje wpływu na ekspresję badanych markerów stanu zapalnego oraz apoptozy i autofagii w jelicie grubym bez indukowanego zapalenia czy kancerogenezy.

Powyższe stwierdzenia upoważniają do wyciągnięcia następujących wniosków:

1. Beta-glukan z owsa, w szczególności frakcja o dużej masie molowej, zastosowany jako dodatek do pożywienia, w zapaleniu jelita grubego wykazuje silne właściwości immunomodulujące i przeciwzapalne na poziomie ekspresji chemokin i ich receptorów.
2. Mechanizm działania beta-glukanu z owsa w obu badanych schorzeniach jelita grubego polega na modulowaniu procesu apoptozy i autofagii w błonie śluzowej, co w konsekwencji wywołuje redukcję stanu zapalnego, przyspiesza okres remisji i hamuje proces nowotworzenia.
3. Beta-glukan z owsa, zastosowany jako dodatek do pożywienia w przypadku zdrowego jelita grubego nie wykazuje żadnych działań niepożądanych, co potwierdza bezpieczeństwo jego stosowania.

Wniosek praktyczny z prezentowanych badań:

- Beta-glukan z owsa stosowany jako dodatek do pożywienia jest bezpiecznym i skutecznym środkiem wspomagającym terapię, który może być stosowany w schorzeniach jelita grubego, takich jak choroba Leśniowskiego-Crohna oraz nowotwory jelita grubego na wczesnych etapach ich rozwoju.

## 9. Bibliografia

1. Agus, A., Clément, K. i Sokol, H. (2021). Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut*, 70(6), 1174–1182; doi:10.1136/gutjnl-2020-323071.
2. Al-Qadami, G.H., Secombe, K.R., Subramaniam, C.B., Wardill, H.R. i Bowen, J.M. (2022). Gut microbiota-derived short-chain fatty acids: impact on cancer treatment response and toxicities. *Microorganisms*, 10, 2048; doi:10.3390/microorganisms10102048.
3. Alatab, S., Sepanlou, S.G., Ikuta, K., Vahedi, H., Bisignano, C., Safiri, S., ... Naghavi, M. (2020). The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, 5(1), 17–30; doi:10.1016/S2468-1253(19)30333-4.
4. Antoniou, E., Margonis, G.A., Angelou, A., Pikouli, A., Argiri, P., Karavokyros, I., ... Pikoulis, E. (2016). The TNBS-induced colitis animal model: an overview. *Annals of Medicine and Surgery*, 11, 9–15; doi:10.1016/j.amsu.2016.07.019.
5. Arena, M.P., Russo, P., Capozzi, V., Rascón, A., Felis, G.E., Spano, G. i Fiocco, D. (2016). Combinations of cereal  $\beta$ -glucans and probiotics can enhance the anti-inflammatory activity on host cells by a synergistic effect. *Journal of Functional Foods*, 23, 12–23; doi:10.1016/j.jff.2016.02.015.
6. Azzman, N. (2019). Crohn's disease: potential drugs for modulation of autophagy. *Medicina*, 55(6), 224; doi:10.3390/medicina55060224.
7. Bai, J., Li, T., Zhang, W., Fan, M., Qian, H., Li, Y. i Wang, L. (2021a). Systematic assessment of oat  $\beta$ -glucan catabolism during in vitro digestion and fermentation. *Food Chemistry*, 348, 129116; doi:10.1016/j.foodchem.2021.129116.
8. Bai, J., Ren, Y., Li, Y., Fan, M., Qian, H., Wang, L., ... Rao, Z. (2019). Physiological functionalities and mechanisms of  $\beta$ -glucans. *Trends in Food Science and Technology*, 88, 57–66; doi:10.1016/j.tifs.2019.03.023.
9. Bai, J., Zhao, J., Al-Ansi, W., Wang, J., Xue, L., Liu, J., ... Wang, L. (2021b). Oat  $\beta$ -glucan alleviates DSS-induced colitis via regulating gut microbiota metabolism in mice. *Food & Function*, 12, 8976–8993; doi:10.1039/d1fo01446c.
10. Baidoun, F., Elshiw, K., Elkerai, Y., Merjaneh, Z., Khoudari, G., Sarmini, M.T., ... Saad, A. (2021). Colorectal cancer epidemiology: recent trends and impact on outcomes. *Current Drug Targets*, 22(9), 998–1009;.
11. Bermudez-Brito, M., Sahasrabudhe, N.M., Rösch, C., Schols, H.A., Faas, M.M. i De Vos, P. (2015). The impact of dietary fibers on dendritic cell responses in vitro is dependent on the differential effects of the fibers on intestinal epithelial cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(4), 698–710; doi:10.1002/mnfr.201400811.
12. Blander, J.M. (2016). Death in the intestinal epithelium—basic biology and implications



- for inflammatory bowel disease. *FEBS Journal*, 283, 2720–2730; doi:10.1111/febs.13771.
13. Błaszczyk, K., Gajewska, M., Wilczak, J., Kamola, D., Majewska, A., Harasym, J. i Gromadzka-Ostrowska, J. (2018). Oral administration of oat beta-glucan preparations of different molecular weight results in regulation of genes connected with immune response in peripheral blood of rats with LPS-induced enteritis. *European Journal of Nutrition*, 58(7), 2859–2873; doi:10.1007/s00394-018-1838-3.
  14. Carneiro, B.A. i El-Deiry, W.S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(7), 395–417; doi:10.1038/s41571-020-0341-y.
  15. Catana, C.S., Magdas, C., Tabaran, F.A., Craciun, E.C., Deak, G., Magdas, V.A., ... Dumitrascu, D.L. (2018). Comparison of two models of inflammatory bowel disease in rats. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 27(5), 599–607; doi:10.17219/acem/69134.
  16. Cheluvappa, R., Thomas, D.G. i Selvendran, S. (2018). The role of specific chemokines in the amelioration of colitis by appendicitis and appendectomy. *Biomolecules*, 8(3), 59; doi:10.3390/biom8030059.
  17. Cheng, Y., Ma, X. lei, Wei, Y. quan i Wei, X.W. (2019). Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1871(2), 289–312; doi:10.1016/j.bbcan.2019.01.005.
  18. Choromańska, A., Kulbacka, J., Harasym, J., Oledzki, R., Szewczyk, A. i Saczko, J. (2018). High- and low-molecular weight oat beta-glucan reveals antitumor activity in human epithelial lung cancer. *Pathology and Oncology Research*, 24, 583–592; doi:10.1007/s12253-017-0278-3.
  19. Clapper, M.L., Chang, W.C.L. i Cooper, H.S. (2020). Dysplastic aberrant crypt foci: biomarkers of early colorectal neoplasia and response to preventive intervention. *Cancer Prevention Research*, 13(3), 229–239; doi:10.1158/1940-6207.CAPR-19-0316.
  20. Das, S., Shukla, N., Singh, S.S., Kushwaha, S. i Shrivastava, R. (2021). Mechanism of interaction between autophagy and apoptosis in cancer. *Apoptosis*, 26, 512–533; doi:10.1007/s10495-021-01687-9.
  21. Desai, M.S., Seekatz, A.M., Koropatkin, N.M., Kamada, N., Hickey, C.A., Wolter, M., ... Martens, E.C. (2016). A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell*, 167(5), 1339–1353; doi:10.1016/j.cell.2016.10.043.
  22. Dias, C.B., Milanski, M., Portovedo, M., Horita, V., De Ayrizono, M.L.S., Planell, N., ... Leal, R.F. (2014). Defective apoptosis in intestinal and mesenteric adipose tissue of Crohn's disease patients. *PLoS ONE*, 9(6), e98547; doi:10.1371/journal.pone.0098547.
  23. El-Salhy, M. i Hatlebakk, J.G. (2016). Changes in enteroendocrine and immune cells following colitis induction by TNBS in rats. *Molecular Medicine Reports*, 14(6), 4967–

- 4974; doi:10.3892/mmr.2016.5902.
24. Gajendran, M., Loganathan, P., Catinella, A.P. i Hashash, J.G. (2018). A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Disease-a-Month*, 64(2), 20–57; doi:10.1016/j.disamonth.2017.07.001.
  25. Girbl, T., Lenn, T., Perez, L., Rolas, L., Barkaway, A., Thiriot, A., ... Nourshargh, S. (2018). Distinct compartmentalization of the chemokines CXCL1 and CXCL2 and the atypical receptor ACKR1 determine discrete stages of neutrophil diapedesis. *Immunity*, 49(6), 1062–1076; doi:10.1016/j.immuni.2018.09.018.
  26. Günaltay, S., Kumawat, A.K., Nyhlin, N., Bohr, J., Tysk, C., Hultgren, O. i Hultgren Hörnquist, E. (2015). Enhanced levels of chemokines and their receptors in the colon of microscopic colitis patients indicate mixed immune cell recruitment. *Mediators of Inflammation*, 2015, 132458; doi:10.1155/2015/132458.
  27. Günther, C., Neumann, H., Neurath, M.F. i Becker, C. (2012). Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut*, 62(7), 1062–1071; doi:10.1136/gutjnl-2011-301364.
  28. Han, A., Bennett, N., Ahmed, B., Whelan, J. i Donohoe, D.R. (2018). Butyrate decreases its own oxidation in colorectal cancer cells through inhibition of histone deacetylases. *Oncotarget*, 9(43), 27280–27292; doi:10.18632/oncotarget.25546.
  29. Harasym, J., Brach, J., Czarnota, J.L., Stechman, M., Słabisz, A., Kowalska, A., ... Madera, A. (2010). A method of production of beta-glucan, insoluble food fibre and oat protein preparation. Patent europejski – EP 2515672 B1. 2010 doi:10.1210/JC.74.2.345.
  30. Harasym, J. i Gromadzka-Ostrowska, J. (2014). Sposób otrzymywania beta-glukanu zbożowego o niskiej masie cząsteczkowej. Patent polski - PL 226915 B1. 2014.
  31. Harasym, J., Suchecka, D. i Gromadzka-Ostrowska, J. (2015). Effect of size reduction by freeze-milling on processing properties of beta-glucan oat bran. *Journal of Cereal Science*, 61, 119–125; doi:10.1016/j.jcs.2014.10.010.
  32. Harasym, J., Żyła, E., Dziendzikowska, K. i Gromadzka-Ostrowska, J. (2019). Proteinaceous residue removal from oat  $\beta$ -glucan. *Molecules*, 24(9), 1729; doi:10.3390/molecules24091729.
  33. Hong, S.N., Joung, J.G., Bae, J.S., Lee, C.S., Koo, J.S., Park, S.J., ... Kim, Y.H. (2017). RNA-seq reveals transcriptomic differences in inflamed and noninflamed intestinal mucosa of Crohn's disease patients compared with normal mucosa of healthy controls. *Inflammatory Bowel Diseases*, 23(7), 1098–1108; doi:10.1097/MIB.0000000000001066.
  34. Hooper, K.M., Barlow, P.G., Stevens, C. i Henderson, P. (2017). Inflammatory bowel disease drugs: a focus on autophagy. *Journal of Crohn's and Colitis*, 11(1), 118–127; doi:10.1093/ecco-jcc/jjw127.
  35. Hossain, M.S., Karuniawati, H., Jairoun, A.A., Urbi, Z., Ooi, D.J., John, A., ... Hadi, M.A. (2022). Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology,

- current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies. *Cancers*, 14, 1732; doi:10.3390/cancers14071732.
36. Kanjan, P., Sahasrabudhe, N.M., de Haan, B.J. i de Vos, P. (2017). Immune effects of  $\beta$ -glucan are determined by combined effects on Dectin-1, TLR2, 4 and 5. *Journal of Functional Foods*, 37, 433–440; doi:10.1016/j.jff.2017.07.061.
  37. Kopiasz, Ł., Dziendzikowska, K., Gajewska, M., Oczkowski, M., Majchrzak-Kuligowska, K., Królikowski, T. i Gromadzka-Ostrowska, J. (2021). Effects of dietary oat beta-glucans on colon apoptosis and autophagy through tlr5 and dectin-1 signaling pathways — Crohn's disease model study. *Nutrients*, 13(2), 1–25; doi:10.3390/nu13020321.
  38. Kopiasz, Ł., Dziendzikowska, K., Gajewska, M., Wilczak, J., Harasym, J., Żyła, E., ... Gromadzka-Ostrowska, J. (2020). Time-dependent indirect antioxidative effects of oat beta-glucans on peripheral blood parameters in the animal model of colon inflammation. *Antioxidants*, 9(5), 375; doi:10.3390/antiox9050375.
  39. Kopiasz, Ł., Dziendzikowska, K. i Gromadzka-Ostrowska, J. (2022). Colon expression of chemokines and their receptors depending on the stage of colitis and oat beta-glucan dietary intervention—Crohn's disease model study. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1406; doi:10.3390/ijms23031406.
  40. Kopiasz, Ł., Dziendzikowska, K., Harasym, J. i Gromadzka-Ostrowska, J. (2023). Low-molar-mass oat beta-glucan impacts autophagy and apoptosis in early stages of induced colorectal carcinogenesis in rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 127832; doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.127832.
  41. Kühn, A.A., Kakirman, H., Janotta, M., Dreher, S., Cremer, P., Pawlowski, N.N., ... Hoffmann, J.C. (2007). Aggravation of different types of experimental colitis by depletion or adhesion blockade of neutrophils. *Gastroenterology*, 133(6), 1882–1892; doi:10.1053/j.gastro.2007.08.073.
  42. Le Berre, C., Ananthakrishnan, A.N., Danese, S., Singh, S. i Peyrin-Biroulet, L. (2020). Ulcerative colitis and Crohn's disease have similar burden and goals for treatment. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 18(1), 14–23; doi:10.1016/j.cgh.2019.07.005.
  43. Letai, A. (2017). Apoptosis and cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, 1, 275–294; doi:10.1146/annurev-cancerbio-050216-121933.
  44. Levine, A., Sigall Boneh, R. i Wine, E. (2018). Evolving role of diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Gut*, 67(9), 1726–1738; doi:10.1136/gutjnl-2017-315866.
  45. Li, M., Sun, X., Zhao, J., Xia, L., Li, J., Xu, M., ... Xia, Q. (2020). CCL5 deficiency promotes liver repair by improving inflammation resolution and liver regeneration through M2 macrophage polarization. *Cellular and Molecular Immunology*, 17(7), 753–764; doi:10.1038/s41423-019-0279-0.

46. Li, Q., Lian, Y., Deng, Y., Chen, J., Wu, T., Lai, X., ... Ren, J. (2021). mRNA-engineered mesenchymal stromal cells expressing CXCR2 enhances cell migration and improves recovery in IBD. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 26, 222–236; doi:10.1016/j.omtn.2021.07.009.
47. Long, J., He, Q., Yin, Y., Lei, X., Li, Z. i Zhu, W. (2020). The effect of miRNA and autophagy on colorectal cancer. *Cell Proliferation*, 53(10), e12900; doi:10.1111/cpr.12900.
48. Majima, T., Funahashi, Y., Kawamorita, N., Takai, S., Matsukawa, Y., Yamamoto, T., ... Gotoh, M. (2018). Role of microglia in the spinal cord in colon-to-bladder neural crosstalk in a rat model of colitis. *Neurourology and Urodynamics*, 37(4), 1320–1328; doi:10.1002/nau.23484.
49. Mak, W.Y., Zhao, M., Ng, S.C. i Burisch, J. (2020). The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 35(3), 380–389; doi:10.1111/jgh.14872.
50. Matsuzawa-Ishimoto, Y., Shono, Y., Gomez, L.E., Hubbard-Lucey, V.M., Cammer, M., Neil, J., ... Cadwell, K. (2017). Autophagy protein ATG16L1 prevents necroptosis in the intestinal epithelium. *Journal of Experimental Medicine*, 214(12), 3687–3705; doi:10.1084/jem.20170558.
51. Mencarelli, A., Cipriani, S., Francisci, D., Santucci, L., Baldelli, F., Distrutti, E. i Fiorucci, S. (2016). Highly specific blockade of CCR5 inhibits leukocyte trafficking and reduces mucosal inflammation in murine colitis. *Scientific Reports*, 6, 30802; doi:10.1038/srep30802.
52. Mikkelsen, M.S., Jespersen, B.M., Mehlsen, A., Engelsen, S.B. i Frøkiær, H. (2014). Cereal  $\beta$ -glucan immune modulating activity depends on the polymer fine structure. *Food Research International*, 62, 829–836; doi:10.1016/j.foodres.2014.04.021.
53. Miranda, P.M., De Palma, G., Serkis, V., Lu, J., Louis-Auguste, M.P., McCarville, J.L., ... Bercik, P. (2018). High salt diet exacerbates colitis in mice by decreasing *Lactobacillus* levels and butyrate production. *Microbiome*, 6(1), 57; doi:10.1186/s40168-018-0433-4.
54. Mirzaei, R., Afaghi, A., Babakhani, S., Sohrabi, M.R., Hosseini-Fard, S.R., Babolhavaeji, K., ... Karampoor, S. (2021). Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in cancer development and prevention. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 139, 111619; doi:10.1016/j.biopha.2021.111619.
55. Nadeem, M.S., Kumar, V., Al-Abbasi, F.A., Kamal, M.A. i Anwar, F. (2020). Risk of colorectal cancer in inflammatory bowel diseases. *Seminars in Cancer Biology*, 64, 51–60; doi:10.1016/j.semcancer.2019.05.001.
56. Nakashima, A., Yamada, K., Iwata, O., Sugimoto, R., Atsuji, K., Ogawa, T., ... Suzuki, K. (2018).  $\beta$ -Glucan in foods and its physiological functions. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 64, 8–17; doi:10.3177/jnsv.64.8.

57. Nunes, T., Bernardazzi, C. i De Souza, H.S. (2014). Cell death and inflammatory bowel diseases: Apoptosis, necrosis, and autophagy in the intestinal epithelium. *BioMed Research International*, 2014, 218493; doi:10.1155/2014/218493.
58. Pott, J., Kabat, A.M. i Maloy, K.J. (2018). Intestinal epithelial cell autophagy is required to protect against TNF-induced apoptosis during chronic colitis in mice. *Cell Host and Microbe*, 23(2), 191–202; doi:10.1016/j.chom.2017.12.017.
59. Prame Kumar, K., Nicholls, A.J. i Wong, C.H.Y. (2018). Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. *Cell and Tissue Research*, 371(3), 551–565; doi:10.1007/s00441-017-2753-2.
60. Ramos, G.P. i Papadakis, K.A. (2019). Mechanisms of disease: inflammatory bowel diseases. *Mayo Clinic Proceedings*, 94(1), 155–165; doi:10.1016/j.mayocp.2018.09.013.
61. Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F. i De Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in Microbiology*, 7, 979; doi:10.3389/fmicb.2016.00979.
62. Roda, G., Chien Ng, S., Kotze, P.G., Argollo, M., Panaccione, R., Spinelli, A., ... Danese, S. (2020). Crohn's disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1) doi:10.1038/s41572-020-0156-2.
63. Saha, S., Panigrahi, D.P., Patil, S. i Bhutia, S.K. (2018). Autophagy in health and disease: a comprehensive review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 104(May), 485–495; doi:10.1016/j.biopha.2018.05.007.
64. Sahu, B.D., Kumar, J.M. i Sistla, R. (2016). Fisetin, a dietary flavonoid, ameliorates experimental colitis in mice: relevance of NF- B signaling. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 28, 171–182; doi:10.1016/j.jnutbio.2015.10.004.
65. Sakaguchi, K., Shirai, Y., Itoh, T. i Mizuno, M. (2018). Lentinan exerts its anti-inflammatory activity by suppressing TNFR1 transfer to the surface of intestinal epithelial cells through Dectin-1 in an in vitro and mice model. *Immunome Research*, 14(3), 1000165; doi:10.4172/1745-7580.1000165.
66. Sasaki, S., Baba, T., Shinagawa, K., Matsushima, K. i Mukaida, N. (2014). Crucial involvement of the CCL3-CCR5 axis-mediated fibroblast accumulation in colitis-associated carcinogenesis in mice. *International Journal of Cancer*, 135(6), 1297–1306; doi:10.1002/ijc.28779.
67. Shah, A., Ahmad, M., Ashwar, B.A., Gani, A., Masoodi, F.A., Wani, I.A., ... Gani, A. (2015). Effect of  -irradiation on structure and nutraceutical potential of  -d-glucan from barley (*Hordeum vulgare*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1168–1175; doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.08.056.
68. Shah, A., Walker, M., Burger, D., Martin, N., Von Wulffen, M., Koloski, N., ... Holtmann, G.J. (2019). Link between celiac disease and inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 53(7), 514–522;

doi:10.1097/MCG.0000000000001033.

69. Singh, U.P., Singh, N.P., Murphy, E.A., Price, R.L., Fayad, R., Nagarkatti, M. i Nagarkatti, P.S. (2016). Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. *Cytokine*, 77, 44–49; doi:10.1016/j.cyto.2015.10.008.
70. Suchecka, D., Gromadzka-Ostrowska, J., Żyła, E., Harasym, J.P. i Oczkowski, M. (2017). Selected physiological activities and health promoting properties of cereal beta-glucans. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 26(3), 183–191; doi:10.22358/jafs/70066/2017.
71. Sushytskyi, L., Synytsya, A., Copikova, J., Lukac, P., Rajsiglova, L., Tenti, P. i Vannucci, L.E. (2023). Perspectives in the application of high, medium, and low molecular weight oat  $\beta$ -D-glucans in dietary nutrition and food technology—a short overview. *Foods*, 12(6), 1121; doi:10.3390/foods12061121.
72. Tong, L.C., Wang, Y., Wang, Z. Bin, Liu, W.Y., Sun, S., Li, L., ... Zhang, L.C. (2016). Propionate ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis by improving intestinal barrier function and reducing inflammation and oxidative stress. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 253; doi:10.3389/fphar.2016.00253.
73. Trivedi, P.J. i Adams, D.H. (2018). Chemokines and chemokine receptors as therapeutic targets in inflammatory bowel disease; Pitfalls and promise. *Journal of Crohn's and Colitis*, 12, S641–S652; doi:10.1093/ecco-jcc/jjx145.
74. Venugopal, A. i Carethers, J.M. (2022). Epidemiology and biology of early onset colorectal cancer. *EXCLI Journal*, 21, 162–182; doi:10.17179/excli2021-4456.
75. Vetvicka, V., Vannucci, L. i Sima, P. (2015). Role of  $\beta$ -glucan in biology of gastrointestinal tract. *Medical Sciences Journal of Nature and Science*, 1(7), 129;.
76. Wang, H., Huang, Y., He, J., Zhong, L. i Zhao, Y. (2021). Dual roles of granzyme B. *Scandinavian Journal of Immunology*, 94(3), e13086; doi:10.1111/sji.13086.
77. WHO. (2020a). Colorectal Cancer. [Internet]  
[https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10\\_8\\_9-Colorectum-fact-sheet.pdf](https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf)  
[dostęp: 30.10.2023 r.].
78. WHO. (2020b). Poland. [Internet]  
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/616-poland-fact-sheets.pdf>  
[dostęp: 30.10.2023 r.].
79. Wilczak, J., Błaszczyk, K., Kamola, D., Gajewska, M., Harasym, J.P., Jałosińska, M., ... Gromadzka-Ostrowska, J. (2015). The effect of low or high molecular weight oat beta-glucans on the inflammatory and oxidative stress status in the colon of rats with LPS-induced enteritis. *Food and Function*, 6(2), 590–603; doi:10.1039/c4fo00638k.
80. Wilczak, J., Jałosińska, M., Harasym, J. i Gromadzka-Ostrowska, J. (2017). Dietoprofilaktyka w nieswoistym zapaleniu jelit. [w:] Nowak B.A., i Maciąg M. (eds.). *Obraz społeczeństwa w badaniach naukowych*. 2017, 47–67.
81. Xie, J., Liu, Y., Chen, B., Zhang, G., Ou, S., Luo, J. i Peng, X. (2019). *Ganoderma*

- lucidum polysaccharide improves rat DSS-induced colitis by altering cecal microbiota and gene expression of colonic epithelial cells. *Food & Nutrition Research*, 63, 1559; doi:10.29219/fnr.v63.1559.
82. Zagórowicz, E., Walkiewicz, D., Kucha, P., Perwieniec, J., Maluchnik, M., Wieszczy, P. i Reguła, J. (2022). Nationwide data on epidemiology of inflammatory bowel disease in Poland between 2009 and 2020. *Polish Archives of Internal Medicine*, 132(5), 1–8; doi:10.20452/pamw.16194.
  83. Zhang, M., Chun, L., Sandoval, V., Graor, H., Myers, J., Nthale, J., ... Kim, J. (2018). Systemic administration of  $\beta$ -glucan of 200 kDa modulates melanoma microenvironment and suppresses metastatic cancer. *OncoImmunology*, 7(2), e1387347; doi:10.1080/2162402X.2017.1387347.
  84. Zhang, R., Ito, S., Nishio, N., Cheng, Z., Suzuki, H. i Isobe, K. ichi. (2011). Up-Regulation of Gr1+CD11b+ population in spleen of dextran sulfate sodium administered mice works to repair colitis. *Inflammation and Allergy - Drug Targets*, 10(1), 39–46; doi:10.2174/187152811794352114.
  85. Zhou, G.X. i Liu, Z.J. (2017). Potential roles of neutrophils in regulating intestinal mucosal inflammation of inflammatory bowel disease. *Journal of Digestive Diseases*, 18(9), 495–503; doi:10.1111/1751-2980.12540.
  86. Zhou, H., Yuan, M., Yu, Q., Zhou, X., Min, W. i Gao, D. (2016). Autophagy regulation and its role in gastric cancer and colorectal cancer. *Cancer Biomarkers*, 17(1), 1–10; doi:10.3233/CBM-160613.
  87. Żyła, E., Dziendzikowska, K., Gajewska, M., Wilczak, J., Harasym, J. i Gromadzka-Ostrowska, J. (2019). Beneficial effects of oat beta-glucan dietary supplementation in colitis depend on its molecular weight. *Molecules*, 24(19), 3591; doi:10.3390/molecules24193591.
  88. Żyła, E., Dziendzikowska, K., Kamola, D., Wilczak, J., Sapierzyński, R., Harasym, J. i Gromadzka-Ostrowska, J. (2021). Anti-inflammatory activity of oat beta-glucans in a crohn's disease model: time-and molar mass-dependent effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9) doi:10.3390/ijms22094485.

## 10. Załączniki

1. Oświadczenia o współautorstwie autorów publikacji 1
2. Publikacja 1 – **Kopiasz Ł.**, Dziendzikowska K., Gajewska M., Oczkowski M., Majchrzak-Kuligowska K., Królikowski T., Gromadzka-Ostrowska J. (2021). Effects of dietary oat beta-glucans on colon apoptosis and autophagy through TLRs and Dectin-1 signaling pathways – Crohn’s disease model study. *Nutrients*, 13:321. doi: 10.3390/nu13020321.
3. Oświadczenia o współautorstwie autorów publikacji 2
4. Publikacja 2 – **Kopiasz Ł.**, Dziendzikowska K., Gromadzka-Ostrowska J. (2022). Colon expression of chemokines and their receptors depending on the stage of colitis and oat beta-glucan dietary intervention – Crohn’s disease model study. *International Journal of Molecular Sciences*, 23:1406. doi: 10.3390/ijms23031406.
5. Oświadczenia o współautorstwie autorów publikacji 3
6. Publikacja 3 – **Kopiasz Ł.**, Dziendzikowska K., Oczkowski M., Harasym J., Gromadzka-Ostrowska J. (2023). Low molar-mass oat beta-glucan impacts autophagy and apoptosis in early stages of induced colorectal carcinogenesis in rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254:127832. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.127832



Warszawa, 13.11.2023 r.

Łukasz Kopiasz  
lukasz\_kopiasz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologii  
Żywności i Żywienia  
Szkół Główniej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy Łukasz Kopiasz, Katarzyna Dziendzikowska, Małgorzata Gajewska, Michał Oczkowski, Kinga Majchrzak-Kuligowska, Tomasz Królikowski, Joanna Gromadzka-Ostrowska (2021). *Effects of dietary oat beta-glucans on colon apoptosis and autophagy through TLRs and Dectin-1 signaling pathways – Crohn's disease model study*. Nutrients, 13:321. doi: 10.3390/nu13020321 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu doświadczenia *in vivo*, wykonaniu analiz immunohistochemicznych, opracowaniu statystycznym i opisanu wszystkich wyników, wizualizacji i napisaniu oryginalnego draftu artykułu, dyskusji wyników.



Podpis

Warszawa, 13.11.2023

Katarzyna Dziendzikowska  
katarzyna\_dziendzikowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologii  
Żywności i Żywienia**

**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy Łukasz Kopiasz, Katarzyna Dziendzikowska, Małgorzata Gajewska, Michał Oczkowski, Kinga Majchrzak-Kuligowska, Tomasz Królikowski, Joanna Gromadzka-Ostrowska (2021). *Effects of dietary oat beta-glucans on colon apoptosis and autophagy through TLRs and Dectin-1 signaling pathways – Crohn's disease model study*. Nutrients, 13:321. doi: 10.3390/nu13020321 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu doświadczenia in vivo, wykonaniu analizy dyskryminacyjnej Fisher'a, edycji i korekcie merytorycznej artykułu, prowadzeniu korespondencji z wydawcą.

*Katarzyna Dziendzikowska*

Podpis

Warszawa, 14.11.2023 r.

Małgorzata Gajewska  
malgorzata\_gajewska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologii  
Żywności i Żywienia  
Szkół Główniej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy Łukasz Kopiasz, Katarzyna Dziendzikowska, Małgorzata Gajewska, Michał Oczkowski, Kinga Majchrzak-Kuligowska, Tomasz Królikowski, Joanna Gromadzka-Ostrowska (2021). *Effects of dietary oat beta-glucans on colon apoptosis and autophagy through TLRs and Dectin-1 signaling pathways – Crohn's disease model study*. Nutrients, 13:321. doi: 10.3390/nu13020321 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu analizy Western blot, edycji i korekcie merytorycznej artykułu.

  
Podpis


Warszawa, 14.11.2023 r.

Michał Oczkowski  
michal\_oczkowski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologii  
Żywności i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy Łukasz Kopiasz, Katarzyna Dziendzikowska, Małgorzata Gajewska, Michał Oczkowski, Kinga Majchrzak-Kuligowska, Tomasz Królikowski, Joanna Gromadzka-Ostrowska (2021). *Effects of dietary oat beta-glucans on colon apoptosis and autophagy through TLRs and Dectin-1 signaling pathways – Crohn's disease model study*. Nutrients, 13:321. doi: 10.3390/nu13020321 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu doświadczenia *in vivo*, wykonaniu analiz immunohistochemicznych.

Podpis  


Warszawa, 13.11.2023 r.

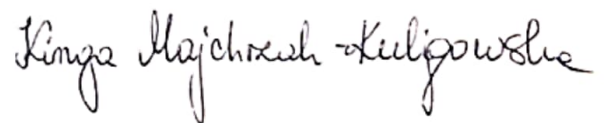
Kinga Majchrzak-Kuligowska  
kinga\_majchrzak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologii  
Żywności i Żywnienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy Łukasz Kopiasz, Katarzyna Dziendzikowska, Małgorzata Gajewska, Michał Oczkowski, Kinga Majchrzak-Kuligowska, Tomasz Królikowski, Joanna Gromadzka-Ostrowska (2021). *Effects of dietary oat beta-glucans on colon apoptosis and autophagy through TLRs and Dectin-1 signaling pathways – Crohn's disease model study*. Nutrients, 13:321. doi: 10.3390/nu13020321 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu analiz immunohistochemicznych.

Podpis



Warszawa, 14.11.2023 r.

Tomasz Królikowski  
tomasz\_krolikowski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologii  
Żywności i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy Łukasz Kopiasz, Katarzyna Dziendzikowska, Małgorzata Gajewska, Michał Oczkowski, Kinga Majchrzak-Kuligowska, Tomasz Królikowski, Joanna Gromadzka-Ostrowska (2021). *Effects of dietary oat beta-glucans on colon apoptosis and autophagy through TLRs and Dectin-1 signaling pathways – Crohn's disease model study*. Nutrients, 13:321. doi: 10.3390/nu13020321 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu doświadczenia *in vivo*.

Podpis



Warszawa, 14.11.2023 r.

Joanna Gromadzka-Ostrowska  
joanna\_gromadzka-ostrowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologii  
Żywności i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy Łukasz Kopiasz, Katarzyna Dziendzikowska, Małgorzata Gajewska, Michał Oczkowski, Kinga Majchrzak-Kuligowska, Tomasz Królikowski, Joanna Gromadzka-Ostrowska (2021). *Effects of dietary oat beta-glucans on colon apoptosis and autophagy through TLRs and Dectin-1 signaling pathways – Crohn's disease model study*. Nutrients, 13:321. doi: 10.3390/nu13020321 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji badania, dyskusji wyników, edycji i korekcie merytorycznej artykułu.








Podpis



## Article

# Effects of Dietary Oat Beta-Glucans on Colon Apoptosis and Autophagy through TLRs and Dectin-1 Signaling Pathways—Crohn's Disease Model Study

Lukasz Kopiasz <sup>1</sup>, Katarzyna Dziendzikowska <sup>1,\*</sup>, Małgorzata Gajewska <sup>2</sup>, Michał Oczkowski <sup>1</sup>, Kinga Majchrzak-Kuligowska <sup>2</sup>, Tomasz Królikowski <sup>1</sup> and Joanna Gromadzka-Ostrowska <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Dietetics, Institute of Human Nutrition Sciences, Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland; lukasz\_kopiasz@sggw.edu.pl (L.K.); michal\_oczkowski@sggw.edu.pl (M.O.); tomasz\_krolikowski@sggw.edu.pl (T.K.); joanna\_gromadzka\_ostrowska@sggw.edu.pl (J.G.-O.)

<sup>2</sup> Department of Physiological Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 159, 02-776 Warsaw, Poland; malgorzata\_gajewska@sggw.edu.pl (M.G.); kinga\_majchrzak@sggw.edu.pl (K.M.-K.)

\* Correspondence: katarzyna\_dziendzikowska@sggw.edu.pl; Tel.: +48-2259-37-033



**Citation:** Kopiasz, L.; Dziendzikowska, K.; Gajewska, M.; Oczkowski, M.; Majchrzak-Kuligowska, K.; Królikowski, T.; Gromadzka-Ostrowska, J. Effects of Dietary Oat Beta-Glucans on Colon Apoptosis and Autophagy through TLRs and Dectin-1 Signaling Pathways—Crohn's Disease Model Study. *Nutrients* **2021**, *13*, 321. <https://doi.org/10.3390/nu13020321>

Academic Editor: Seiichiro Aoe

Received: 23 December 2020

Accepted: 19 January 2021

Published: 22 January 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Background: Crohn's disease (CD) is characterized by chronic inflammation of the gastrointestinal tract with alternating periods of exacerbation and remission. The aim of this study was to determine the time-dependent effects of dietary oat beta-glucans on colon apoptosis and autophagy in the CD rat model. Methods: A total of 150 Sprague–Dawley rats were divided into two main groups: healthy control (H) and a TNBS (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid)-induced *colitis* (C) group, both including subgroups fed with feed without beta-glucans ( $\beta G-$ ) or feed supplemented with low- ( $\beta GI$ ) or high-molar-mass oat beta-glucans ( $\beta Gh$ ) for 3, 7, or 21 days. The expression of autophagy (LC3B) and apoptosis (Caspase-3) markers, as well as Toll-like (TLRs) and Dectin-1 receptors, in the colon epithelial cells, was determined using immunohistochemistry and Western blot. Results: The results showed that in rats with *colitis*, after 3 days of induction of inflammation, the expression of Caspase-3 and LC3B in intestinal epithelial cells did not change, while that of TLR 4 and Dectin-1 decreased. Beta-glucan supplementation caused an increase in the expression of TLR 5 and Dectin-1 with no changes in the expression of Caspase-3 and LC3B. After 7 days, a high expression of Caspase-3 was observed in the colitis-induced animals without any changes in the expression of LC3B and TLRs, and simultaneously, a decrease in Dectin-1 expression was observed. The consumption of feed with  $\beta GI$  or  $\beta Gh$  resulted in a decrease in Caspase-3 expression and an increase in TLR 5 expression in the C $\beta GI$  group, with no change in the expression of LC3B and TLR 4. After 21 days, the expression of Caspase-3 and TLRs was not changed by colitis, while that of LC3B and Dectin-1 was decreased. Feed supplementation with  $\beta Gh$  resulted in an increase in the expression of both Caspase-3 and LC3B, while the consumption of feed with  $\beta Gh$  and  $\beta GI$  increased Dectin-1 expression. However, regardless of the type of nutritional intervention, the expression of TLRs did not change after 21 days. Conclusions: Dietary intake of  $\beta GI$  and  $\beta Gh$  significantly reduced colitis by time-dependent modification of autophagy and apoptosis, with  $\beta GI$  exhibiting a stronger effect on apoptosis and  $\beta Gh$  on autophagy. The mechanism of this action may be based on the activation of TLRs and Dectin-1 receptor and depends on the period of exacerbation or remission of CD.

**Keywords:** oat beta-glucan; *colitis*; Crohn's disease; apoptosis; autophagy; TLRs; Dectin-1; rats

## 1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is becoming an increasingly common disease in the population of developed countries. One of the reasons for the increase in its incidence



is changes in lifestyle, including eating habits, which have been observed over the past few decades. The transition from a diet based on natural or mildly processed products to a Western-type diet is a consequence of change from a rural lifestyle to an urban one, which took place on a large scale in the 20th century [1]. IBD is a disease characterized by chronic inflammation of the gastrointestinal tract, and includes ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) [2]. The etiology of both these diseases is multifactorial, in which interactions between genetic and environmental factors as well as changes in the profile of the gut microbiota (dysbiosis) consequently contribute to disturbances in immune response mechanisms, leading to the development of inflammation [3]. UC first appears in the mucosa and submucosa of the large intestine, while in CD the chronic inflammatory process may occur in any part of the gastrointestinal tract, covering the entire thickness of its wall [4,5].

One of the main effects of chronic inflammation related to CD is damage to the intestinal epithelium and a significant increase in the programmed death of intestinal epithelial cells (IECs). In addition, disturbances occur in the mechanisms regulating the metabolic activity of cells, including autophagy [6]. Apoptosis contributes to the dynamic control of cells by removing damaged cells or that function abnormally without triggering inflammatory response or oxidative stress, thus ensuring appropriate tissue function. Simultaneously, autophagy plays an important role in maintaining the homeostasis of living organisms, as they regulate the basic metabolic functions and pathogenesis of many diseases, including malignant neoplasms, neurodegenerative and cardiovascular diseases, and IBD [6–8]. Both these processes regulate tissue homeostasis and response to extracellular factors, including the production of proinflammatory cytokines, and intensification of the apoptosis of IECs has been reported in people with IBD and in *in vivo* studies on animal models [9]. Caspase-3 is considered to be one of the key executive enzymes of apoptosis, the activation of which is common to both extrinsic and intrinsic pathways, as well as is dependent on granzyme B [10]. A protein specific to autophagy is LC3, which is involved in the final formation of the autophagosome [8]. In mammalian cells, this protein occurs in three isoforms—LC3A, LC3B, and LC3C—of which the LC3B form is the marker of autophagosomal activity [11,12].

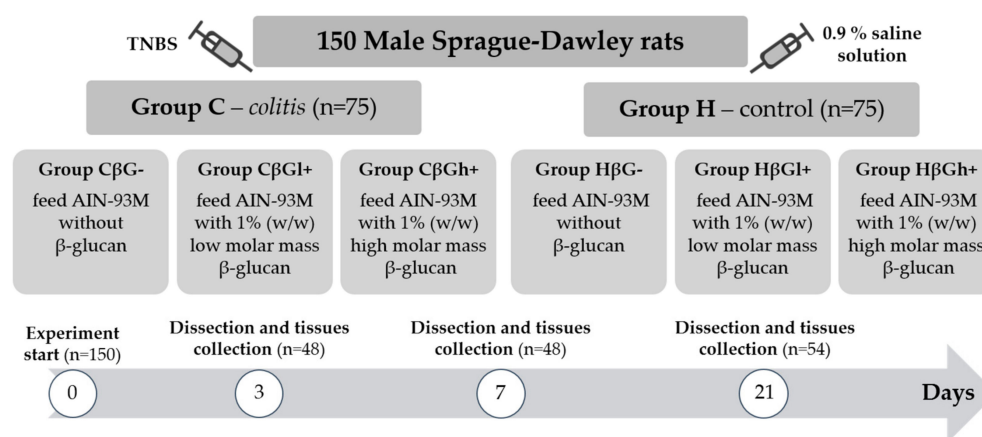
In the light of the latest research, factors regulating the proliferation, autophagy, and apoptosis of intestinal cells include membrane Toll-like receptors (TLRs), such as TLR 4, TLR 5, and TLR 9, and Dectin-1 receptor. Activation of TLRs and Dectin-1 receptors stimulates the immune response. The main function of these receptors is the recognition of bacterial and fungal antigens. They also recognize a wide variety of bacterial and fungal ligands, of which the best known are lipopolysaccharide (LPS), flagellin, and triacyl lipopeptides. Plant-origin polysaccharides, including beta-glucans, are ligands that bind to TLRs and Dectin-1 receptors. Due to their specific structure, beta-glucans exhibit a number of health-promoting properties, and their biological activity results from their ability to bind with TLRs and Dectin-1 receptors, as well as with complement receptor 3 and type C lectin [13,14]. Beta-glucans are recognized by different cells expressing TLRs and Dectin-1 receptors, which in turn activate them [15–17]. It should be emphasized that the activation of Dectin-1 receptor by oat beta-glucans is influenced by the size of these polysaccharide molecules and is greater when they are subjected to preliminary digestion, i.e., when large molecules are broke down into smaller ones [17]. Dectin-1 receptors are involved, among others, in regulating the differentiation of macrophages and dendritic cells during ongoing inflammation, as well as modulating the immune response and controlling the recruitment of autophagy-related proteins, mainly LC3 [18–21]. The deficiency of TLRs inhibits the proliferation and differentiation of IECs and increases apoptosis, which affects the reconstruction of the intestinal epithelium [22,23]. This is very important with respect to the treatment of IBD, because due to chronic inflammation, the IECs are vulnerable to damage caused by high levels of reactive oxygen species (ROS). Moreover, as a consequence of the increased secretion of proinflammatory cytokines by immune cells, the permeability of the intestinal barrier increases [24,25].

The results of our research have shown the beneficial anti-inflammatory and indirect antioxidant effects of oat beta-glucans with low and high molar mass. These properties have been demonstrated in both the LPS-induced enteritis model [26,27] and the TNBS (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid)-induced colitis model [28,29], but the mechanisms underlying these effects have not yet been elucidated. Therefore, this study aimed to determine the effect of two oat beta-glucan forms with different molar mass on the activity of autophagy and apoptosis in the colonocytes of rats with colitis. Rectal administration of an ethanolic solution of TNBS causes strictly localized transmural inflammatory lesions in the large intestine, with dense lymphocyte infiltration and secretion of proinflammatory cytokines in the whole wall, which are characteristic of CD in humans. Moreover, this animal model is characterized by reproducibility, technical simplicity and low cost [30,31]. The molecular effects of both beta-glucan forms have been analyzed at different stages of colitis development.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals and Experimental Design

The experiment was performed on 150 adult male Sprague–Dawley rats (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) with an initial body weight of  $414.8 \pm 1.3$  g. The rats were divided into two main groups—an experimental group (colitis group—C) with colitis induced by one-time rectal administration of 1 mL of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) solution (150 mg/kg bw) dissolved in 50% ethanol and a control group (H) without colitis, which was given 0.9% NaCl in the same way. Administration of TNBS was performed using the polyethylene catheter (FTP-18-75-50; Instech Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA, USA) according to Parra et al. (2015) [32]. The animals from both groups were then divided into three nutritional subgroups, which received a diet with different types of supplementation for 3, 7, or 21 days—AIN-93M feed with 1% (w/w) low-molar-mass oat beta-glucans ( $\beta$ Gl+ group), AIN-93M feed with 1% (w/w) high-molar-mass oat beta-glucans ( $\beta$ Gh+ group), and AIN-93M feed without beta-glucans ( $\beta$ G− group) (Figure 1). A detailed description of the in vivo experiment and the method used for the extraction of beta-glucans from oats as well as the composition of the three types of rat feed used in this study is provided in our previous papers [28,29].



**Figure 1.** Scheme of experimental design of the study. TNBS: 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid alcohol solution.

The large intestine samples obtained for histological and immunohistochemical analysis were fixed in 10% buffered formaldehyde and routinely embedded in paraffin. Then, 5- $\mu$ m sections were cut from each paraffin block and fixed on microscope glass slides. The slides prepared were used for further laboratory analyses.

The animal experiment was conducted after the approval of the II Local Animal Care and Use Committee in Warsaw (Resolution # 60/2015). All the procedures will be designed and conducted according to Polish and EU law regulations and with respect to 3R rules (Replacement, Reduction and Refinement).

## 2.2. Western Blot Analysis

Colon tissue samples were homogenized in RIPA buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, and 1 mM PMSF) supplemented with protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) with a tissue homogenizer (Bio-Gen PRO 200; PRO Scientific, Oxford, CT, USA). Following the mechanical disruption of tissue, the homogenates were incubated for 30 min at 4 °C. The lysates were cleared for 30 min at 14,000 rpm, and supernatants were collected. Protein concentration in the lysates was determined using Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit according to the producer's instructions (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Then, the proteins (50 µg) were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto PVDF membrane (Sigma-Aldrich). The membranes were blocked in 5% (*w/v*) nonfat dry milk in TBS (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl) containing 0.5% Tween20. Next, they were incubated under gentle shaking at 4 °C overnight with primary antibodies, including anti-Cleaved Caspase-3 antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-LC3B antibody (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), anti-Becn-1 antibody (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), and anti-β-actin (8H10D10) mouse monoclonal antibody (#3700; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). The membranes were incubated with chosen primary antibodies at a dilution range between 1:200 and 1:1000, depending on the antibody. Following incubation, the membranes were washed three times for 15 min and incubated with appropriate secondary antibodies conjugated with IR fluorophores: IRDye® 680 or IRDye® 800 CW (at 1:5000 dilution). Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) was used to analyze the protein expression. Scan resolution of the instrument was set at 169 µm, and the intensity at 4. Quantification of the integrated optical density (IOD) was performed using the analysis software provided with the Odyssey scanner (LI-COR Biosciences). Immunoblot analysis was carried out on samples obtained from three independent experiments. For the purpose of publication, the color immunoblot images were converted into black and white images in the Odyssey software.

## 2.3. Immunohistochemical Staining

Five-micrometer-large intestine sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in a series of decreasing concentrations of ethanol. To recover the antigen, the slides were placed in citrate buffer (pH 6.0) and boiled in a microwave two times for 5 min. After cooling and washing with distilled water, the samples were incubated in the Peroxidase Blocking Reagent (Dako, Denmark) for 13 min at room temperature. Then, these samples were incubated at room temperature in 2% bovine serum albumin (BSA) (Sigma Aldrich, Germany) for 30 min. Next, they were treated with the following primary antibodies (diluted in 2% BSA): mouse anti-TLR 4 antibody (1:100 dilution; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), rabbit anti-Dectin-1/CLEC7A antibody (1:400 dilution; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), rabbit anti-TLR 5 antibody (1:500 dilution; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), rabbit anti-TLR 6 antibody (1:250 dilution; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), rabbit anti-LC3B antibody (1:500 dilution; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), rabbit anti-Cleaved Caspase-3 antibody (1:400 dilution; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). The slides with antibodies were incubated overnight in a refrigerator at +4 °C.

EnVision kit (Dako, Glostrup Kommune, Denmark) was used for staining the slides. After incubating overnight and washing with phosphate-buffered saline, labeled polymers consisting of secondary antimouse or antirabbit antibodies conjugated with HRP enzyme complex was used (Dako). To obtain brown staining, 3,3'-diaminobenzidine was applied,

which was washed with water after 25 s. Then, hematoxylin was used for nuclei counterstaining. Finally, the samples were dehydrated using a series of alcohols of increasing concentration and xylene, and preserved by sticking coverslips.

A negative control (staining without primary antibodies) was used for each immunohistochemical experiment.

#### 2.4. Image Analysis

The immunohistochemically stained slides were observed under a  $\times 20$  objective lens in a NIKON Eclipse Ti2 microscope. In the recorded photos, 20 areas of colonocytes were marked, and the colorimetric intensity (brown color reflecting antigen expression) and object area were measured by using NIS-Elements BR 5.01 program. In the next step, IOD was calculated from the following formula:

$$\text{Integrated Optical Density (IOD)} = \frac{\text{Object area}}{\text{Measured area}} \times \text{Mean intensity}$$

#### 2.5. Statistical Analysis

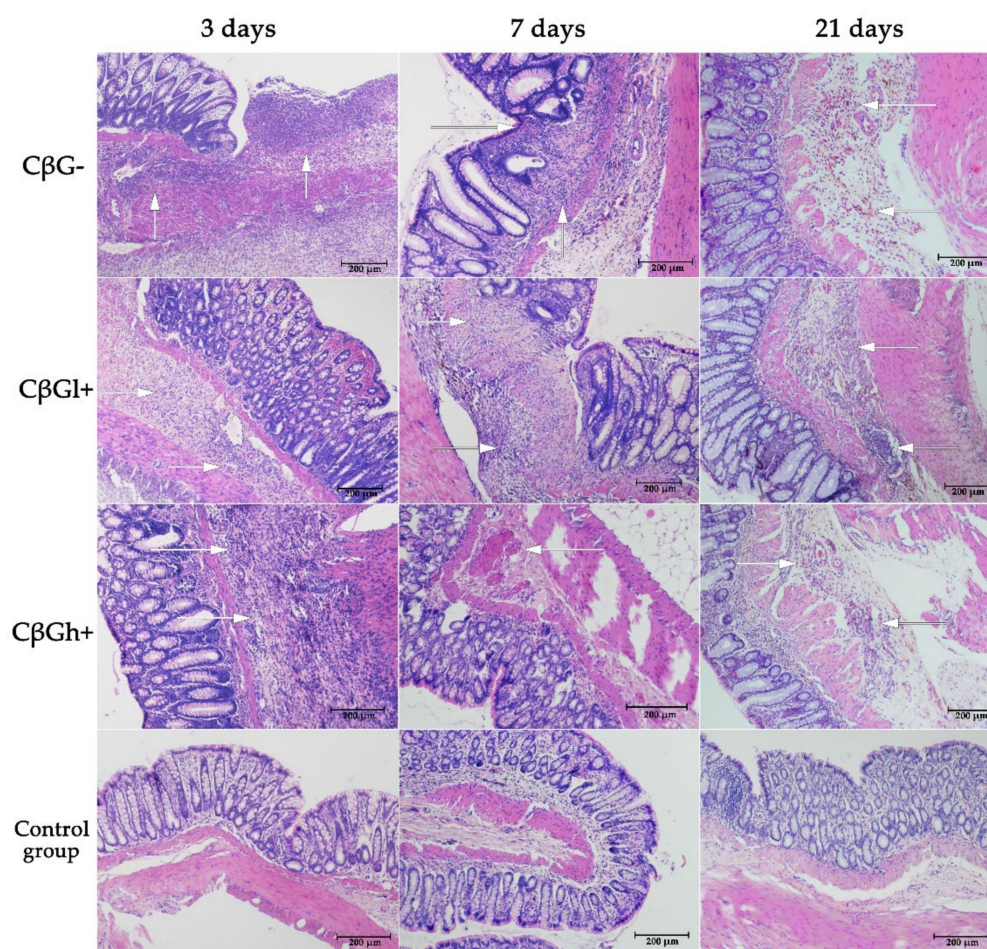
The obtained data were analyzed using Statistica software (version 13.1 PL; StatSoft, Cracow, Poland). The normality of distribution and equality of variance were determined for all data. Statistical analysis was carried out in two stages. In the first stage, for each time point (3, 7, and 21 days), a two-way analysis of variance (ANOVA) (colon inflammation vs. dietary intervention) was performed, while in the second stage, a three-way ANOVA (colon inflammation vs. dietary intervention vs. period of its use) was carried out. The significance of differences between the groups was determined by the Tukey post hoc test. In addition, the results of all nutritional subgroups were compared with the control subgroup (H $\beta$ G–) by the Dunnett post hoc test. The differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . To assess the time-dependent effect between the experimental factors, Fisher's linear discriminant (FLD) analysis was performed using R statistics software (version 3.1.3; [www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

### 3. Results

#### 3.1. Histological Changes in the Large Intestine

Histological analysis revealed extensive inflammation in the colon tissue of rats in the C $\beta$ G– group (Figure 2). The lesions were of transwall nature, covering not only mucosa but also the deeper layers of the intestinal wall, which is a characteristic of CD. Inflammation in the colon (colitis) was confirmed in the same animals not only histologically but also biochemically, including analysis of colon level of pro-inflammatory cytokines (i.e., IL-1; IL-6 or TNF  $\alpha$ ) and CRP protein [28]. These microscopic and biochemical observations also confirmed the results of gene expression analysis of pro-inflammatory cytokines in colon tissue affected by colitis, including *Ifng* and *Tnf* after 3 days and *Il21* after 21 days (Figure S9). In the groups of animals fed with feed supplemented with oat beta-glucans during 21 days, these lesions were clearly reduced, as was presented in our previous study [28]. The expression of pro-inflammatory cytokine genes was also significantly reduced (Figure S9). Hematoxylin-eosin staining showed that the histopathology of the colon tissue in the control groups was within the normal limits.

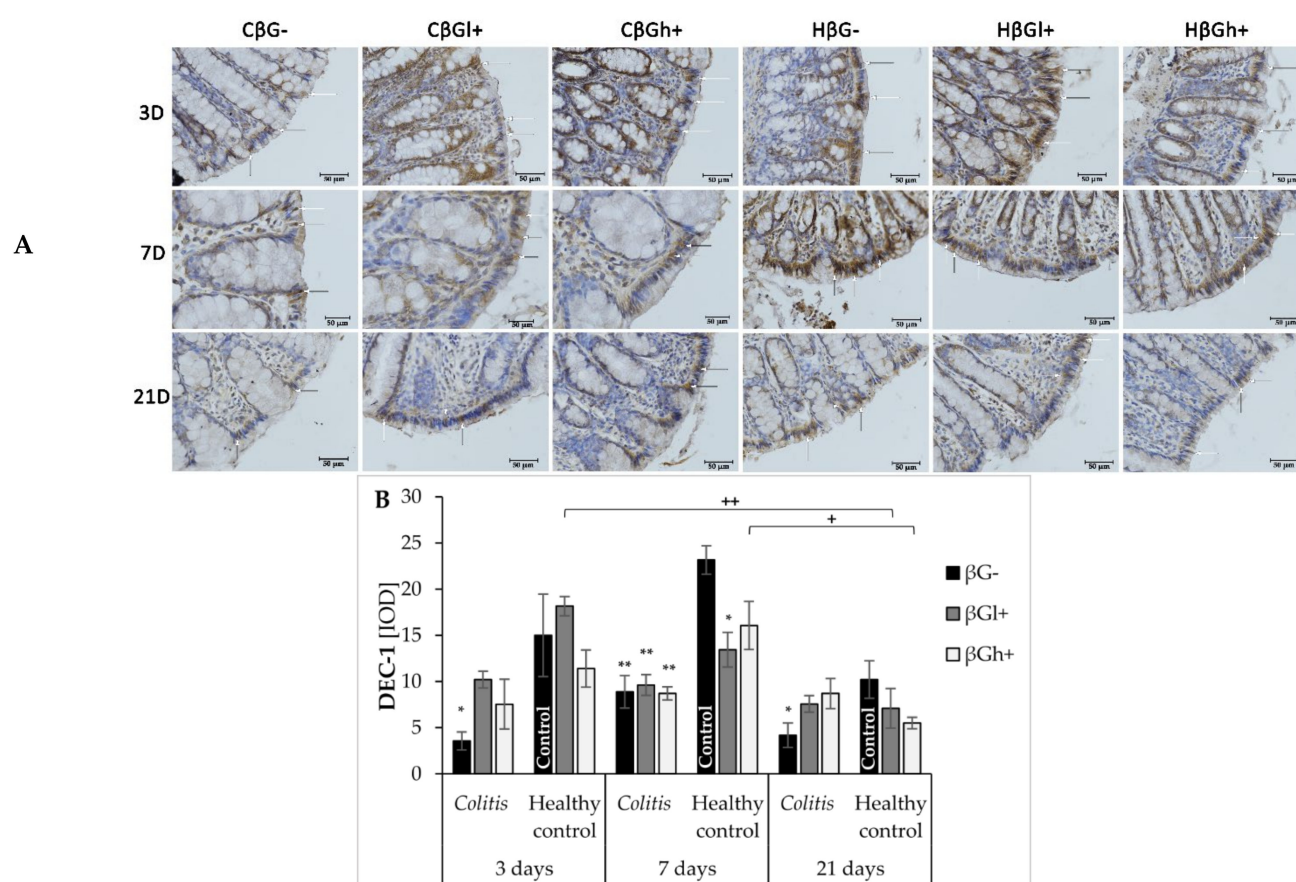




**Figure 2.** Microscopic changes in the colon caused by TNBS-induced inflammation. White arrows indicate diffused multifocal inflammation (lymphocyte infiltration) of the submucosa of varying severity.

### 3.2. Dectin-1 and Toll-like Receptors 4, 5, and 6 Expression in the Colonocytes

The expression of Dectin-1 beta-glucan receptor is presented in Figure 3. As shown by ANOVA, the expression of this receptor in colonocytes was lower in the rats with TNBS-induced *colitis* (ANOVA,  $p < 0.001$ ; Figure S1A), whereas dietary intervention with oat beta-glucans resulted in a change in its expression after 3 and 21 days of feeding, which was confirmed by ANOVA. Furthermore, one-way ANOVA showed that the expression of Dectin-1 was lower after 21 days (ANOVA,  $p < 0.001$ ; Figure S1B). After 7 days, induced *colitis* caused a significant decrease in Dectin-1 expression in all dietary subgroups compared with the control group (HβG−) (for each subgroup: Dunnett post hoc test,  $p < 0.01$ ). In addition, analysis of variance showed the effect of interaction between time after TNBS/saline administration and the occurrence of inflammation on Dectin-1 expression (ANOVA,  $p < 0.01$ ; Figure S1C). In the control groups, 3 and 7 days after saline solution administration, the expression of this receptor was significantly higher than in the colitis groups at the same time point and in the control group after 21 days.



**Figure 3.** Dectin-1 (DEC-1) expression in colonocytes: results of the immunohistochemical analysis. White arrows indicate colonocytes with high expression of the Dectin-1 (brown precipitate). **(A)**—Light micrographs imaged under the NIKON Eclipse Ti2 microscope ( $\times 40$  magnification). Dectin-1 antigen is represented by a brown precipitate in the colonocytes. **(B)**—Changes in the expression of DEC-1 in colonocytes presented (mean  $\pm$  SE) as integrated optical density (IOD). \* Significantly different from the control group (healthy control  $\beta G-$ ) at the same time point according to the Dunnett post hoc test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ). + Significantly different from the same subgroups at another time point according to the Tukey post hoc test (+  $p < 0.05$ , ++  $p < 0.01$ ).

Changes in the expression of TLRs are presented in Figure 4. ANOVA showed a significant interaction between two experimental factors: induced inflammation of the colon and feed supplementation with oat beta-glucans, which influenced the expression level of all the examined TLRs (ANOVA,  $p < 0.001$ ; Figures S2A, S3C and S4C)—TLR 4, TLR 5, and TLR 6. Post hoc analysis showed a significantly lower expression of TLR 4 and TLR 6 in rats from the *colitis* group that consumed feed without beta-glucans ( $C\beta G-$ ) compared to the control rats receiving the same feed ( $H\beta G-$ ) (Tukey post hoc,  $p < 0.01$ ). In the case of TLR 5, a significantly lower expression was found only in the  $C\beta G-$  group compared to the  $C\beta G+$  group (Tukey post hoc,  $p < 0.001$ ).

Statistical analysis also revealed that TLR 4 expression significantly differed between the subgroups only 3 days after *colitis* induction (Figure 4A,D), while a significantly lower expression was found in all *colitis* subgroups compared to the control group ( $H\beta G-$ ) (Dunnett post hoc,  $p < 0.001$ ), with the greatest differences observed between the  $C\beta G-$  and  $H\beta G-$  groups. It should be noted that the expression of this protein was also significantly lower in the control group that consumed the feed with low-molar-mass beta-glucans ( $H\beta G+$ ) compared to the rats from the  $H\beta G-$  group. The effect of the dietary intervention length and inflammation on the TLR 4 expression was confirmed by ANOVA ( $p < 0.05$ ; Figure S2B), which showed an increase in the expression of this receptor in the *colitis* group



and a decrease in differences observed between the *colitis* groups and the control groups at all time points after the induction of large-intestine inflammation.

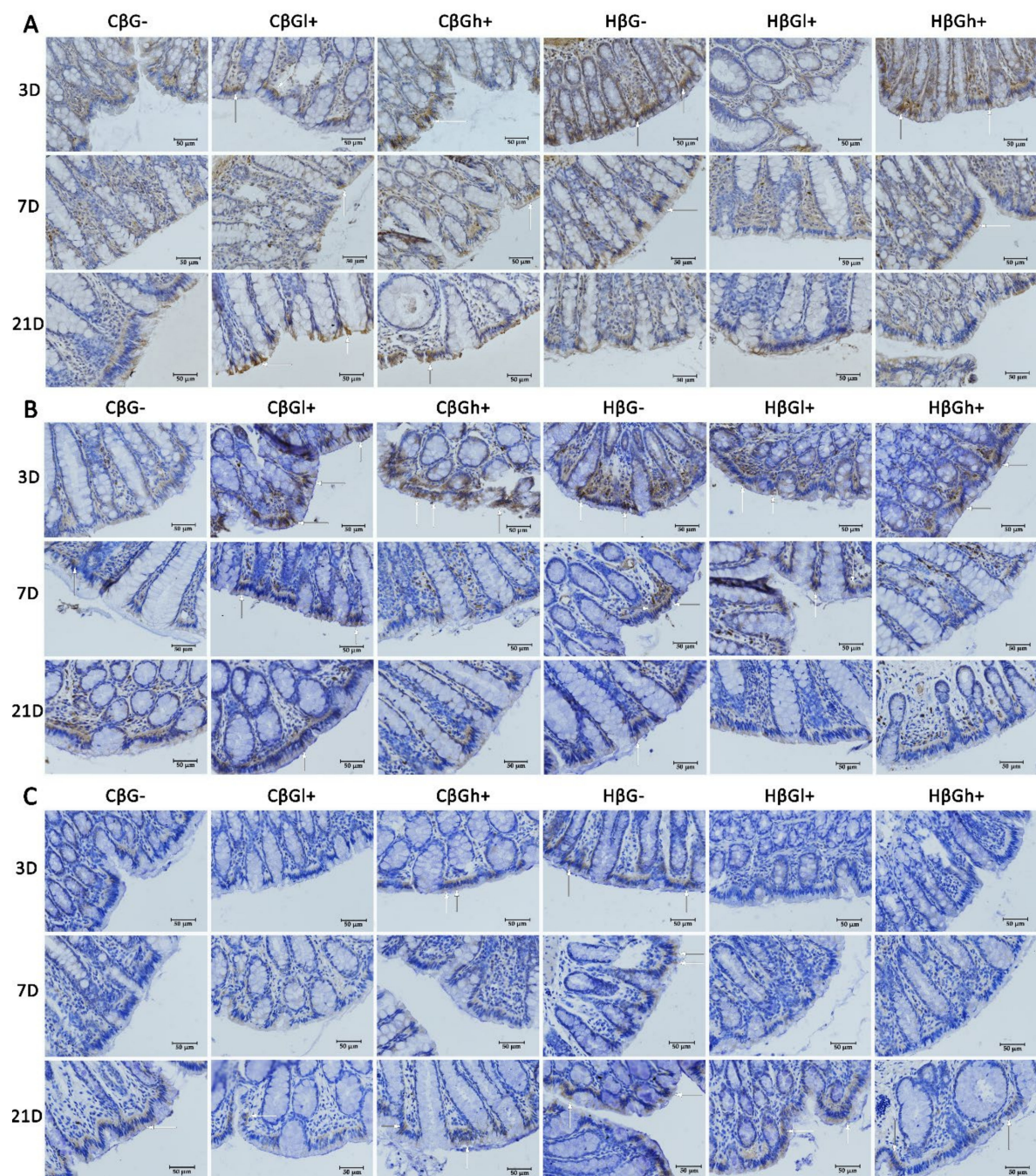
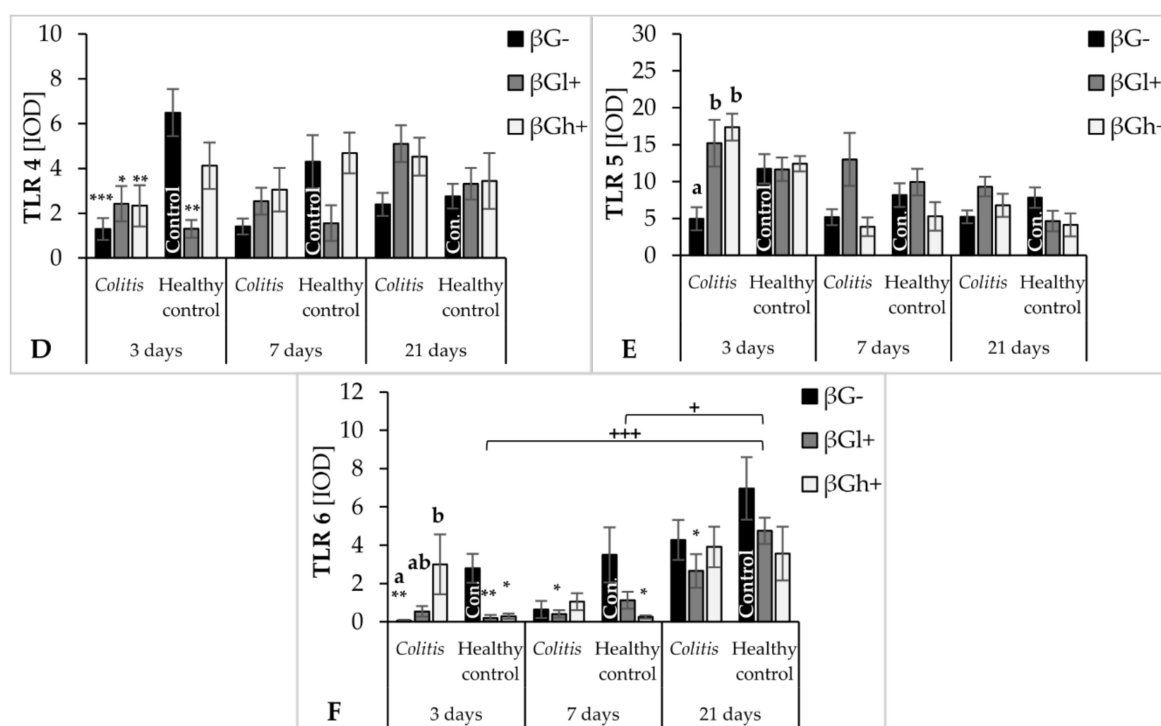


Figure 4. *Cont.*



**Figure 4.** Expression of Toll-like receptors (TLRs) in the colonocytes: results of the immunohistochemical analysis. White arrows indicate colonocytes with high expression of the TLRs (brown precipitate). (A–C)—Light micrographs imaged under the NIKON Eclipse Ti2 microscope ( $\times 40$  magnification). (D–F)—Changes in the expression of TLRs (TLR 4, TLR 5, and TLR 6, respectively) presented (mean  $\pm$  SE) as integrated optical density (IOD). TLR 4 antigen is represented by a brown precipitate in the colonocytes in (A). TLR 5 antigen is represented by a brown precipitate in the colonocytes in (B). TLR 6 antigen is represented by a brown precipitate in the colonocytes in (C). \* Significantly different from the control group (healthy control  $\beta G^-$ ) at the same time point according to the Dunnett post hoc test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). + Significantly different from the same subgroups at another time point according to the Tukey post hoc test (+  $p < 0.05$ , +++  $p < 0.001$ ). <sup>a,b</sup> Different letters denote significant differences in the colitis/healthy control group at the same time point according to the Tukey post hoc test ( $p < 0.05$ ).

The expression of TLR 5 was influenced by the time after TNBS administration and feed supplementation with oat beta-glucans (Figure 4B,E). ANOVA showed a significant decrease in the expression of this receptor parallel to the extension of the post-TNBS period (ANOVA,  $p < 0.0001$ ; Figure S3A). The highest expression of TLR 5 was found in rats fed with feed supplemented with low-molar-mass oat beta-glucans, while the lowest expression was found in the group of animals fed with feed without beta-glucans (ANOVA,  $p < 0.01$ ; Figure S3B). Post hoc analysis showed significant differences between the experimental groups only after 3 days of TNBS administration with a lower expression observed in the colitis group fed with feed without beta-glucans ( $C\beta G^-$ ) compared to the colitis groups treated with low- and high-molar-mass beta-glucans ( $C\beta Gl^+$  and  $C\beta Gh^+$ ) (Tukey post hoc,  $p < 0.05$ ).

TLR 6 expression differed significantly between the dietary groups (Figure 4C,F). One-way ANOVA showed a significant effect of TNBS administration (ANOVA,  $p < 0.0001$ ; Figure S4A) and consumption of feed with or without oat beta-glucans (ANOVA,  $p < 0.05$ ; Figure S4B). After 21 days of induction of colon inflammation, the expression of TLR 6 was approximately four times higher compared to that after 3 or 7 days. The highest expression of this receptor was found in the group of rats fed with feed without oat beta-glucans. ANOVA revealed a statistically significant interaction between three experimental factors: inflammation, length of period after TNBS administration, and the type of feed (ANOVA,  $p < 0.001$ ). Three days after TNBS administration, a significantly lower expression of TLR 6 was noted in  $C\beta G^-$ ,  $H\beta Gl^+$ , and  $H\beta Gh^+$  groups compared to the control group ( $H\beta G^-$ )



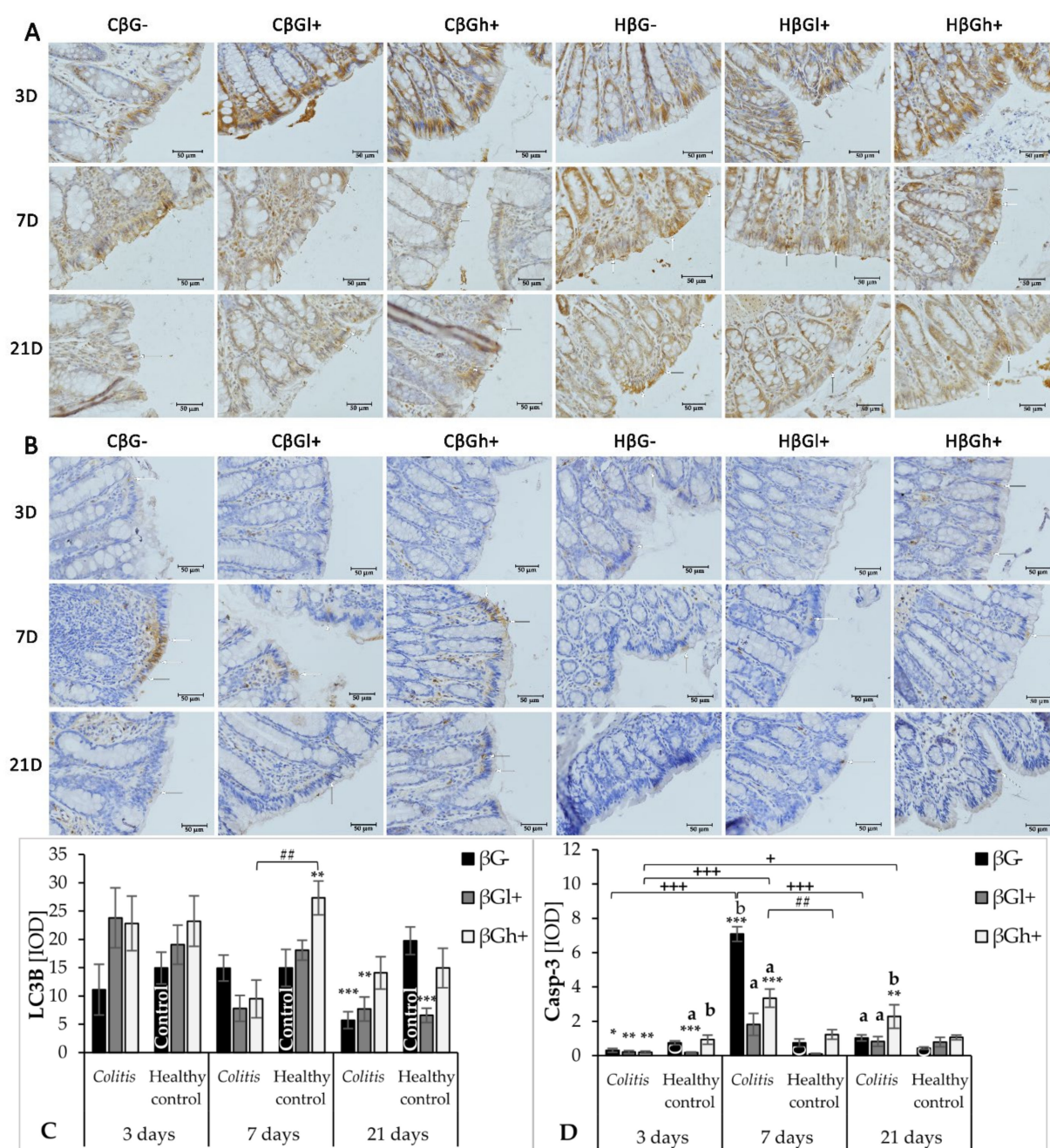
(Dunnett post hoc, groups C $\beta$ G $^-$  and H $\beta$ GI $^+$  vs. group H $\beta$ G $^-$ :  $p < 0.01$ ; group H $\beta$ Gh $^+$  vs. group H $\beta$ G $^-$ :  $p < 0.05$ ). Seven days after the induction of colitis, a lower expression of this receptor was found only in the C $\beta$ GI $^+$  and H $\beta$ Gh $^+$  groups compared to the H $\beta$ G $^-$  group (Dunnett post hoc,  $p < 0.05$ ). Twenty-one days after the induction of colitis, TLR 6 expression differed significantly only between C $\beta$ GI $^+$  and H $\beta$ G $^-$  groups (Dunnett post hoc,  $p < 0.05$ ). It should be added that TLR 6 expression in the *colitis* group fed with feed supplemented with high-molar-mass beta-glucans (C $\beta$ Gh $^+$ ) was at a similar level as in the control group (H $\beta$ G $^-$ ) group after 3, 7, and 21 days of TNBS administration.

### 3.3. Autophagy and Apoptosis Markers Expression in the Large Intestine

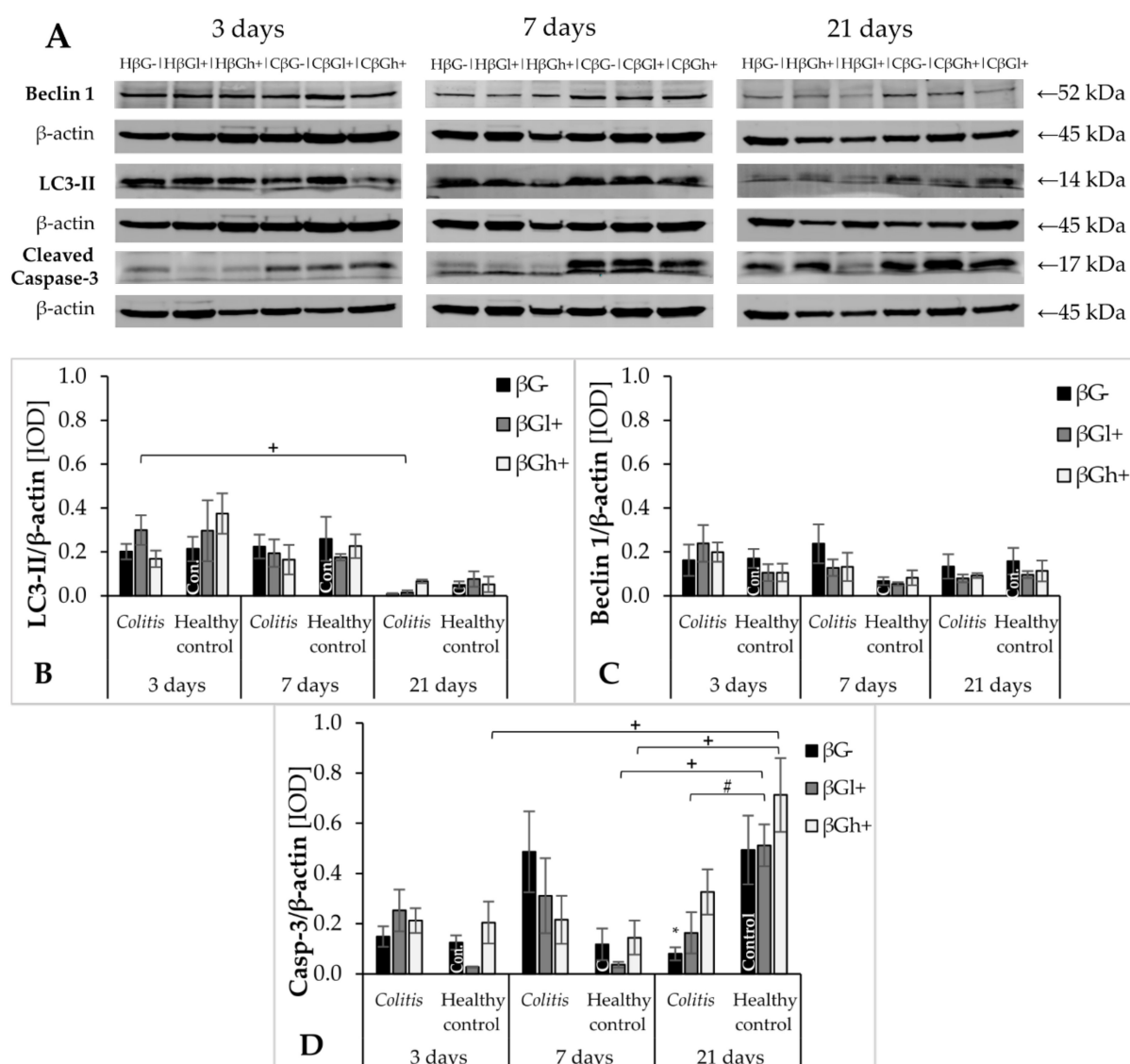
Immunohistochemical results showing the expression of selected markers of autophagy (LC3B) and apoptosis (Caspase-3) in IECs are presented in Figure 5. ANOVA showed a significant influence on LC3B expression by all three experimental factors: time since TNBS administration, consumption of oat beta-glucans with feed, and the occurrence of inflammation. Analyzing each factor separately, it was found that LC3B expression decreased with time since TNBS administration (ANOVA,  $p < 0.001$ ; Figure S5A), as well as a significant reduction in its expression, was caused by the induction of colitis (ANOVA,  $p < 0.01$ ; Figure S5C). The consumption of feed with high-molar-mass oat beta-glucans resulted in a significantly higher expression of LC3B compared to other dietary groups (ANOVA,  $p < 0.05$ ; Figure S5B). ANOVA also showed a significant interaction between the three experimental factors ( $p < 0.01$ ), which was reflected by a significantly higher expression of LC3B after 7 days in the H $\beta$ Gh $^+$  group compared with the C $\beta$ Gh $^+$  group (Tukey post hoc,  $p < 0.01$ ), while after 21 days, the expression of this protein was significantly lower in the C $\beta$ G $^-$ , C $\beta$ GI $^+$ , and H $\beta$ GI $^+$  groups compared to the control group (H $\beta$ G $^-$ ) (Dunnett post hoc,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.01$ , respectively).

All three investigated factors significantly influenced the expression of Caspase-3 (ANOVA,  $p < 0.0001$ ; Figure S6A–C). The expression of this apoptotic protein 3 days after TNBS administration was at a very low level, but it was significantly lower in the *colitis* groups and H $\beta$ GI $^+$  group compared to the control group (H $\beta$ G $^-$ ) (Dunnett post hoc, C $\beta$ GI $^+$  vs. H $\beta$ G $^-$ :  $p < 0.05$ ; C $\beta$ Gh $^+$  and C $\beta$ G $^-$  vs. H $\beta$ G $^-$ :  $p < 0.01$ ; H $\beta$ GI $^+$  vs. H $\beta$ G $^-$ :  $p < 0.001$ ), while in the H $\beta$ Gh $^+$  group it was at the same level as in the H $\beta$ G $^-$  group. After 7 days of the experiment, the expression of Caspase-3 in the *colitis* group fed with feed without beta-glucans (C $\beta$ G $^-$ ) in relation to other experimental groups was very high, while a significantly lower expression was found in the *colitis* subgroups fed with feed supplemented with both forms of beta-glucans (C $\beta$ GI $^+$  and C $\beta$ Gh $^+$ ) compared to the C $\beta$ G $^-$  group (Tukey post hoc,  $p < 0.05$ ). However, a very low expression of this enzyme was observed in all control groups. Caspase-3 expression in the C $\beta$ Gh $^+$  group after 21 days was at a similar level as the expression found after 7 days, with a significantly higher level compared to other *colitis* groups (Tukey post hoc,  $p < 0.05$ ) and control group (H $\beta$ G $^-$ ) (Dunnett post hoc,  $p < 0.01$ ).

Figure 6 shows the changes in the expression of autophagy- (LC3-II and Beclin-1) and apoptosis-related proteins (Caspase-3) in the colon wall determined by Western blot. As the results of ANOVA indicate, only time elapsed after TNBS administration had a significant effect on the reduction of LC3-II expression, while the induction of inflammation had a significant effect on Beclin-1 expression with a higher expression observed in the *colitis* group (ANOVA,  $p < 0.05$ ; Figure S7). However, post-hoc analysis showed no significant differences between the experimental subgroups.



**Figure 5.** Expression of autophagy and apoptosis markers in the colonocytes: results of the immunohistochemical analysis. White arrows indicate colonocytes with high expression of the LC3B protein (A) and Caspase-3 protein (B) (brown precipitate). (A,B)—Light micrographs imaged under the NIKON Eclipse Ti2 microscope ( $\times 40$  magnification). (C,D)—Changes in the expression of autophagy and apoptosis markers (LC3B and Caspase-3 (Casp-3), respectively) presented (mean  $\pm$  SE) as integrated optical density (IOD). Autophagy-related protein LC3B antigen is represented by a brown precipitate in the colonocytes in (A). Apoptosis-related protein Casp-3 antigen is represented by a brown precipitate in the colonocytes in (B). \* Significantly different from the control group (control  $\beta G-$ ) at the same time point according to the Dunnett post hoc test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). # Significantly different between the *colitis* and control groups at the same time point and the same feed according to the Tukey post hoc test (##  $p < 0.01$ ). + Significantly different from the same subgroups at another time point according to the Tukey post hoc test (+  $p < 0.05$ , +++  $p < 0.001$ ). <sup>a,b</sup> Different letters denote significant differences in the *colitis*/control group at the same time point according to the Tukey post hoc test ( $p < 0.05$ ).



**Figure 6.** Results of the densitometric analysis for the expression of autophagy and apoptosis markers in the large intestinal wall. (A)—Representative immunoblot images. (B)—Autophagy-related protein LC3-II. (C)—Autophagy-related protein Beclin 1. (D)—Apoptosis-related protein cleaved Caspase-3 (Casp-3). \* Significantly different from the control group (healthy control βG−) at the same time point according to the Dunnett post hoc test (\*  $p < 0.05$ ). # Significantly different between the *colitis* and control groups at the same time point and the same feed according to the Tukey post hoc test (#  $p < 0.05$ ). + Significantly different from the same subgroups at another time point according to the Tukey post hoc test (+  $p < 0.05$ ).

After 21 days of TNBS administration, Caspase-3 expression was found to be significantly higher (ANOVA,  $p < 0.001$ ; Figure S8A). Two-way ANOVA showed significant interactions between the time since TNBS administration and induced inflammation (ANOVA,  $p < 0.001$ ; Figure S8B). After 7 days of colitis induction, a significantly higher expression of Caspase-3 in the colon wall was found in the *colitis* group (Tukey post hoc,  $p < 0.05$ ), and after 21 days after colitis induction, a higher expression was observed in the noninflammatory group (Tukey post hoc,  $p < 0.001$ ). Post hoc analysis confirmed a significantly higher expression of this enzyme 21 days after TNBS administration in HβG+ and HβGh+ groups compared to the expression observed in the corresponding *colitis* subgroups after 7 days of TNBS administration (Tukey post hoc,  $p < 0.05$ ), while it confirmed a lower expression in the *colitis* group that consumed feed without beta-glucans (CβG−) compared to the control group that consumed the same feed (HβG−) (Dunnett post hoc,  $p < 0.05$ ).



### 3.4. Fisher's Linear Discriminant Analysis (FLD)

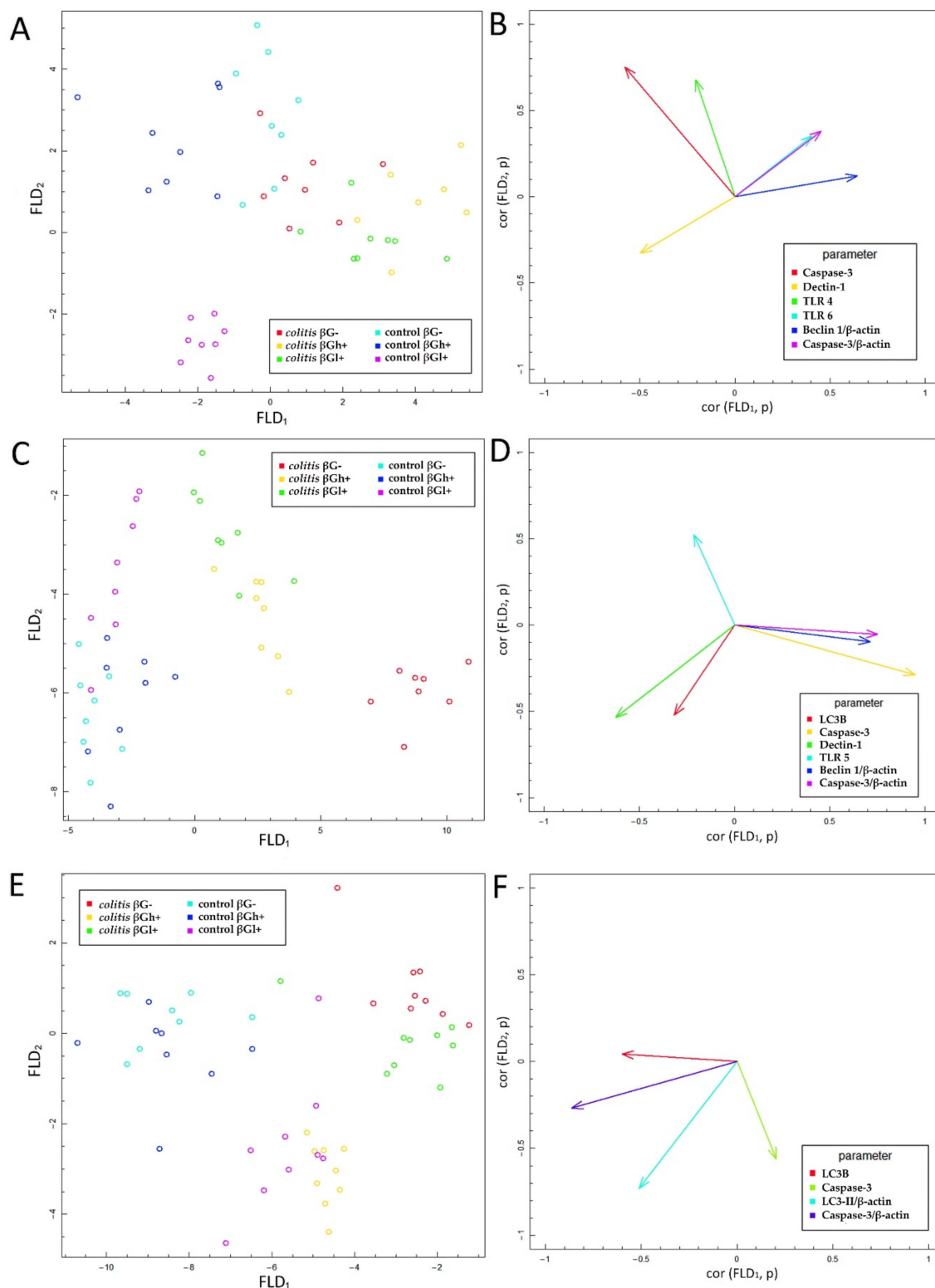
The results of the FLD analysis obtained for the expression of experimental factors are presented in Figure 7. This analysis was used to find the linear combinations of expression of the analyzed receptors and autophagy and apoptosis markers which allow for the best separation of the groups of animals at three time points selected in the experimental model. The experimental data were divided into three groups depending on the experimental time point, as well as the stage of inflammation corresponding to different periods of the disease (exacerbation and remission period). The FLD method provides the most optimal linear combination of parameters used in the analysis such that the highest possible separation between the data groups is achieved. The results of the linear discriminant analysis at three time points are shown in Figure 7A,C,E. In each figure, six experimental groups are isolated. The data are presented in the space between the linear combinations of parameters (FLDs), marked as FLD<sub>1</sub> and FLD<sub>2</sub>, which separate the best-predefined groups.

Figure 7B,D,F shows the correlation vectors of the analyzed parameters in the experiment with FLD<sub>1</sub> and FLD<sub>2</sub> predictors, which determine the direction and strength of the separation of the experimental groups at three time points—3 days (A and B), 7 days (C and D), and 21 days (E and F). The graphs show the parameters that had the greatest impact on the separation of data at particular time points after TNBS administration. The parameter corresponding to a particular vector caused the data to shift in the direction determined by the vector. The performed FLD analysis complemented the ANOVA models by indicating the common set of features that separates the best experimental data (as opposed to the analysis of individual features in the ANOVA model) and allows for an augmented analysis of the obtained results.

FLD analysis performed for the data 3 days after TNBS/saline administration (Figure 7A,B) showed that the factors that most differentiated these experimental groups were Caspase-3 (determined in colonocytes as well as in the whole colon wall), immunohistochemical expression of Dectin-1, TLR 4, and TLR 6 in colonocytes, and expression of Beclin-1 autophagy protein in the colon wall. The FLD analysis allowed determining the combination of the above parameters, which in turn helped in distinguishing the control feed groups supplemented with beta-glucans (HβGl+ and HβGh+) from the other groups in the horizontal plane (FLD<sub>1</sub>). The vertical plane (FLD<sub>2</sub>) enabled the separation of the control group fed with feed supplemented with low-molar-mass oat beta-glucans (HβGl+) from the other groups (Figure 7A). The expression of Beclin-1 protein was the most correlated with FLD<sub>1</sub>, while the expression of TLR 4 and Caspase-3 in colonocytes had the most influence on FLD<sub>2</sub>, and that of Dectin-1, TLR 6, and Caspase-3 in the colon wall was important for both FLDs (Figure 7B). Based on the linear discriminant analysis, it can be concluded that the control group supplemented with βGl+ was characterized by a significantly higher expression of Dectin-1 receptor and a lower expression of TLR 6 receptor and Caspase-3 protein in the colon wall compared to the *colitis* groups. The highest Caspase-3 expression was observed in the control group fed with feed supplemented with high-molar-mass oat beta-glucans (HβGh+).

After 7 days of *colitis* induction (Figure 7C,D), the separation of the *colitis* group from control groups was much more visible than after 3 days. The horizontal plane (FLD<sub>1</sub>) allowed clear separation of control groups from the *colitis* groups, as well as the separation of *colitis* group (CβG−) and *colitis* groups that consumed the feed supplemented with beta-glucans (CβGl+ and CβGh+). Animals from the groups fed feed with a low-molar-mass oat beta-glucans (HβGl+ and CβGl+) were separated from the other groups, in particular from those receiving feed without beta-glucans supplementation (HβG− and CβG−), also in the vertical FLD direction (FLD<sub>2</sub>), however to a lesser extent. Expression of Caspase-3 (in colonocytes and colon wall) and Beclin-1 in the colon wall had the greatest influence on FLD<sub>1</sub>, while TLR 5 expression had the most impact on FLD<sub>2</sub>. Both FLDs were influenced by the expression of Dectin-1 receptor and LC3B protein in colonocytes. Therefore, it can be concluded that the *colitis* group fed with feed without beta-glucans had the highest expression of Caspase-3 and Beclin-1, while the lowest expression of both these proteins

was observed in the control groups. In addition, H $\beta$ G $^-$  and H $\beta$ Gh $^+$  groups showed the highest expression of Dectin-1 receptor and LC3B protein. The highest TLR 5 expression was found in the  $\beta$ Gl $^+$ -fed groups, both with and without *colitis*.



**Figure 7.** Fisher's linear discriminant (FLD) analysis. (A,C,E)—Experimental data on the plane spanned by two of the most data-separating FLDs. (B,D,F)—Parameters contributing the most to the FLDs. Scheme (A,B): 3. days; (C,D): 7 days; (E,F): 21 days.

After 21 days of TNBS administration (Figure 7E,F), the analyzed parameters differentiated the experimental groups to a much lesser extent than at earlier time points (3 and 7 days). After 21 days of *colitis* induction, only the expression of LC3B/LC3-II and Caspase-3 in the colonocytes and colon wall allowed separating the experimental groups. C $\beta$ G $^-$  group together with C $\beta$ Gl $^+$  group was separated by FLD $_1$  from other subgroups, while H $\beta$ Gl $^+$  and C $\beta$ Gh $^+$  groups were separated from other subgroups along the vertical axis (FLD $_2$ ). LC3B expression in colonocytes and Caspase-3 expression in the colon wall had the greatest impact on FLD $_1$ , whereas Caspase-3 expression in colonocytes influenced FLD $_2$ . Expression of LC3-II in the colon wall had an effect on both FLDs (Figure 7F). FLD analysis showed that LC3B expression in the colonocytes and that of Caspase-3 in the colon wall were slightly higher in the control groups fed with  $\beta$ Gh $^+$  and  $\beta$ G $^-$  feed compared to the C $\beta$ Gl $^+$  and C $\beta$ G $^-$  groups. Expression of Caspase-3 in colonocytes and that of LC3-II in the colon wall were slightly higher in the H $\beta$ Gl $^+$  and C $\beta$ Gh $^+$  groups compared to the C $\beta$ G $^-$  and C $\beta$ Gl $^+$  groups.

#### 4. Discussion

Crohn's disease belongs to the group of inflammatory bowel diseases and is characterized by the presence of chronic inflammation within the gut. The course of this disease is associated with alternating periods of exacerbation and remission. Food is one of the significant factors influencing the course of CD through many mechanisms. Another influencing factor is the modulation of cellular processes, including cell death, which maintains homeostasis and eliminates abnormal and damaged cells [2]. In this study, we determined the effects of the consumption of low- and high-molar-mass oat beta-glucans on the expression of selected markers of apoptosis and autophagy in colonocytes in TNBS colitis-induced rats. In addition, we analyzed the expression of colon wall receptors, including TLRs and Dectin-1, which are involved in the recognition of molecular patterns of pathogens in colon epithelial cells. Rectal administration of a TNBS ethanol solution in animals caused transmural colitis, which is a well-described intestinal inflammation animal model with predominantly Crohn's disease symptoms [31,33]. According to Antoniou and coworkers, TNBS-induced colitis is a good model for studying immunopathogenesis and potential treatments for Crohn's disease [30]. In this model intestinal inflammation is achieved by a local administration of TNBS in 50% ethanol which involves both chemical damage and T cell immune reactivity. Additionally, TNBS administration results in acute necrosis of the colon wall due to oxidative damage, along with transmural inflammation that closely resembles the histopathological lesions developed in human CD [30,34,35]. The ethanol breaks the mucosal barrier allowing the penetration of the reagent. The main symptoms in animals with TNBS-induced colitis are bloody diarrhoea, weight loss and intestinal wall thickening. The presence of the features typical of CD was confirmed by histological evaluation, which revealed widespread inflammation of the colon, including not only the mucosa but also the deeper layers of the intestinal wall. The induction of acute inflammation in the colon wall was also confirmed by the results obtained from the analysis of the concentration of proinflammatory cytokines and the lymphocyte profile performed on the same biological material [28] as well as by the results of pro-inflammatory cytokines gene expression. Here, the effects of beta-glucans were assessed at three time points: after 3, 7, and 21 days of TNBS administration. This allowed evaluating the analyzed parameters in animals with different intensities of inflammatory changes in the intestine. It also reflects the periods of exacerbation and remission of colitis in people with CD and enabled determining the effectiveness of beta-glucan supplementation in these periods of the disease. The examined rats developed local acute inflammation immediately after TNBS administration. The inflammation was significantly less severe 1 and 3 weeks after TNBS administration, which indicated remission of the induced inflammation. This was confirmed by macro- and microscopic examinations of changes in the colon, including swelling of the mucosa, microbleeding, and necrosis [28]. It should be noted that the changes were transient and minimally invasive, indicating an early stage of CD develop-

ment. This was evidenced by the good health of rats, decreased feed consumption only five days after the administration of TNBS, lower weight gain in rats with induced colitis, and no increase in the activity of plasma liver transaminases [29].

In this study, we also examined changes in the intensity of the autophagy process. It contributes to the adaptation of cells and the maintenance of intracellular homeostasis enabling cells to survive under stressful conditions. The autophagy marker in the colon wall and IECs investigated in the study was the expression of the LC3B protein, which participates in the formation and maturation of autophagosomes [8]. A decrease in this protein was found in the colon wall after TNBS administration, which indicates intense repair processes of the intestinal epithelium accompanying/preceding the period of CD remission. In the initial period of the experiment, autophagy was slightly increased in the colon wall in all experimental groups, which could be due to the mechanical irritation caused by rectal administration of TNBS or saline solution. A significant effect of colitis on the reduction of LC3B expression in IECs was found after 21 days. At this time point, the expression of LC3B in colonocytes was approximately four times lower in the colitis rats fed with feed without beta-glucans (C $\beta$ G $-$ ) compared to the  $\beta$ G $-$  control group. A similar effect of colitis was observed in induced rats by Xiong et al. (2019), who showed a decrease in the expression of LC3-II in the epithelium of the large intestine in colitis-induced animals compared to the control group [36]. In humans, CD is also characterized by impaired autophagy [37]. A study recognized polymorphism in the ULK1 kinase gene involved in the autophagy process and mutation of the protein containing the nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) as a direct mechanism responsible for the autophagy impairment in CD [8].

Our results showed that supplementation with high-molar-mass oat beta-glucans reduced the negative effects of inflammation on the expression of LC3B protein. After 21 days of the experiment, it was observed that the expression of LC3B in IECs in the colitis group fed with feed supplemented with high-molar-mass oat beta-glucans was similar to that in the  $\beta$ G $-$  control group. The increase in the expression of this protein under the influence of high-molar-mass beta-glucans in animals without colitis after 7 days of the experiment was also significant compared to other experimental groups. This may indicate the autophagy-enhancing effect of these polysaccharides in IECs in animals with and without colitis. The results of a previous study conducted by our team also indicated the effect of supplementing animal feed with oat beta-glucans on the expression of autophagy-related proteins. In an experiment carried out on rats in which enteritis was induced by intravenous administration of LPS, the transcriptomic analysis showed that the consumption of oat beta-glucans with feed increased the expression of the *Atg10* gene belonging to the ATG (autophagy-related genes) family. In addition, high-molar-mass oat beta-glucans caused a significant upregulation of the expression of the *Atg13* gene, another gene of the ATG family [38]. Therefore, the above data indicate a significant effect of oat beta-glucans in restoring the activity of the autophagy process in inflamed IECs, and a stronger effect of oat beta-glucans with a high molar mass, which also increased the activity of autophagy in colon tissue of the control animals without colitis.

Disturbances in the apoptotic process are believed to play an important role in the pathogenesis of CD. On one hand, excessively intensified apoptosis of epithelial cells leads to their increased elimination and damage to the intestinal barrier [39]. On the other hand, the low intensity of apoptosis of inflammatory cells promotes their accumulation in the gastrointestinal wall and maintenance of inflammation and promote tumor progression [24,40]. The present study showed that in the early stages of the development of acute colitis in animals with colitis, the expression of Caspase-3, the executive enzyme of apoptosis, was very low. It indicates a strong inflammation caused by the rectal administration of the TNBS ethanol solution. The highest expression of Caspase-3 protein was observed in the control group fed with feed supplemented with high-molar-mass oat beta-glucans (H $\beta$ Gh $+$ ), which indicates the beneficial effect of this beta-glucan fraction in this respect. The physical properties of high-molar-mass beta-glucans favor the formation of a protective layer on

the inner wall of the intestine, and hence this beta-glucan fraction effectively supports the development of beneficial microbiota producing short-chain fatty acids which favor the faster regeneration of epithelium damaged by saline administration [23,41,42].

After 7 days of TNBS administration, Caspase-3 expression in colitis-induced animals was approximately eight times higher than in the control group, which indicates an increase in the apoptosis process in response to intestinal inflammation. This was also confirmed by the FLD analysis, in which the control groups were clearly separated from the colitis groups. The clear separation of the control groups was mainly due to the greater Caspase-3 expression in the colon epithelium and colon wall in inflammatory animals. An intensified process of apoptosis is also observed in people with CD and UD. This is associated with the disturbance of the intestinal barrier integrity, which causes the transfer of the commensurate microbiota to the intestinal lamina propria. This in turn leads to an increase in inflammation and the level of proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  [9,43]. Oat beta-glucans may reduce the extent of apoptosis in the colon tissue and, consequently, improve the integrity of the intestinal barrier. In our study, consumption of feed supplemented with high-molar-mass oat beta-glucans by colitis animals resulted in approximately two times lower Caspase-3 expression after 7 days of inflammation induction. Consumption of feed with low-molar-mass oat beta-glucans resulted in the expression of this enzyme in colitis animals at a similar level as in the control group, which was also confirmed by the results of the FLD analysis. This proves that both forms of beta-glucans are effective in inhibiting apoptotic cell death, reducing inflammation markers, and inducing the remission period. In colitis rats fed with feed supplemented with oat beta-glucans of high molar mass after 7 and 21 days, the expression level of Caspase-3 was similar, but after 21 days it was higher compared to the other feeding groups. This confirms the significant effect of oat beta-glucans with a low and high molar mass in reducing the expression of this apoptotic enzyme during ongoing inflammation, with low-molar-mass beta-glucans having a stronger effect.

Oat beta-glucans influence the activity of the autophagy process and inhibition of apoptosis in inflamed IECs. It is probably related to the interaction of oat beta-glucans on the Dectin-1 receptor and the pattern recognition TLRs: TLR 4, TLR5, and TLR6. These receptors are responsible, among others, for the stimulation of the immune response to pathogenic factors, as well as the regulation of proliferation, autophagy, and apoptosis of intestinal cells [15,17]. In our experiment, the expression of Dectin-1 across all experimental time points was found to be reduced compared to the control group, due to the induced inflammation. It should be noted, that de Vries et al. showed increased Dectin-1 expression in an animal model of DSS-induced colon and mesenteric lymph nodes inflammation [44], while Van Hung and Suzuki showed no significant changes in the expression of this receptor in the DSS-induced small intestine inflammation [45]. Similarly, in patients with Crohn's disease, increased expression of the Dectin-1 receptor in macrophages, neutrophils, and other immune cells has been reported [46]. The observed inconsistency is likely caused by the differences in colitis induction and the type of cells examined for Dectin-1 expression assessment. According to our knowledge, there are no reports describing the effect of TNBS-induced colitis on Dectin-1 expression in intestinal epithelial cells. The decrease in Dectin-1 expression observed in our study may result from a different method of inducing colitis. In addition, we analyzed the Dectin-1 expression in the intestinal epithelial cells, not in the colon wall or the immune cells. In this case decrease in Dectin 1 expression in colonocytes noticed in our study may be related to disrupted intestinal barrier integrity by the ethanolic TNBS solution, that as a consequence, causes infiltration of pathogens/antigens into the deeper layers of the colon wall and allows their direct contact with cells of the immune system. The subsequent activation of immune cells results in an increased expression of Dectin-1 in these cells [30,47]. Moreover, in our study, it is important to point that the increase in the expression of this receptor in IECs was observed in the control groups after 3 and 7 days of saline solution administration, which could have been caused by mechanical damage to these cells evidenced by the lack of similar changes after 21 days. This confirmed that the administration of the saline solution did not cause the injury of the intestinal barrier,



that was observed after TNBS administration. We also observed simultaneous reduction of colonocyte Dectin-1 in the colitis group and its increase in control groups caused by the mechanical stimulus that resulted in a significant difference in the expression of this receptor between these groups. Consumption of the feed supplemented with oat beta-glucans reduced the difference between colitis and control groups in the experimental animals on days 3 and 21 after TNBS administration. The results showed an increase in the expression of Dectin-1 in inflamed IECs under the influence of oat beta-glucans. It should be noted that these polysaccharides have a similar effect on the expression of LC3B protein, with oat beta-glucans with a high molar mass having a stronger effect. FLD analysis showed that after 7 days of TNBS administration, the increased expression of Dectin-1 receptor was accompanied by an increased expression of the LC3B protein, the increase being characteristic of the control group fed with feed without beta-glucans and the control group fed with feed with beta-glucans with a high molar mass, which indicates the intensification of autophagy processes stimulating epithelial repair. Sakaguchi et al. (2018) described autophagy activation caused by the attachment of polysaccharide ligands to the Dectin-1 receptor as the mechanism of action of fungal beta-glucans administered to mice with induced colitis. These authors demonstrated that administration of beta-glucans decreased the expression of inflammatory cytokine mRNA in the colon (*Tnf*, *Il1b*, *Il6*) and the expression of TNFR1 receptor in IECs through the interaction of these polysaccharides with the Dectin-1 receptor. In addition, activation of Dectin-1 by beta-glucans reduced the translocation of NF- $\kappa$ B responsible for the induction and maintenance of inflammation [21].

Our other results showed that the concentration of TNF- $\alpha$  and other proinflammatory cytokines in the colon wall of animals with TNBS-induced inflammation was significantly increased at all time points. Consumption of oat beta-glucans reduced the concentration of these inflammatory factors (data not published [28]). TNF- $\alpha$  is one of the inflammatory mediators that directly stimulate the apoptotic process. The extrinsic pathway of apoptosis is induced by the binding of this factor to the TNFR1a receptor [48]. Pott et al. (2018) showed that increased autophagy in the inflamed intestinal epithelium protected cells against TNF- $\alpha$ -induced apoptosis, which in turn helped to maintain the integrity of the intestinal barrier and reduce inflammation. Thus, autophagy disorders cause exacerbation of inflammation and intensification of apoptosis in IECs induced by proinflammatory cytokines, mainly TNF- $\alpha$  [39]. This is in line with the results of another study in which the authors used a model of enteritis induced by murine norovirus infection and administration of DSS (dextran sulfate sodium). Matsuzawa-Ishimoto et al. (2017) showed that autophagy deficiency caused by deletion of the *ATG16L1* gene (encoding a component of the large protein complex essential for autophagy) made IECs in the small intestine more susceptible to TNF- $\alpha$ -induced apoptosis [49]. Currently, the treatment of CD in humans is based on drugs that stimulate autophagy and reduce TNF- $\alpha$  concentration in the inflamed parts of the gastrointestinal tract [50]. In summary, the activation of the inflamed Dectin-1 receptor in IECs by oat beta-glucans reduces the proapoptotic effect of the TNF- $\alpha$  complex with TNFR1 receptor. As a consequence of these changes, the autophagy process is intensified, which entails the protection of cells against excessive apoptosis as well as helps to maintain the integrity of the intestinal barrier and alleviate inflammation.

The antiapoptotic effect of oat beta-glucans in colitis is probably also related to their influence on the TLR expression. The results of this study showed that, after 3 days of TNBS administration, the expression of TLR 4 and TLR 6 receptors in colonocytes was significantly lower in the colitis group receiving feed without beta-glucans as compared to the control group fed with the same feed. In addition, in the same group of rats (C $\beta$ G–), TLR 5 expression was lower compared to the colitis groups fed with feed supplemented with low- and high-molar-mass oat beta-glucans. This difference disappeared with the passage of time after TNBS administration, which proves that the decrease in the expression of these receptors is mostly influenced by acute intestinal inflammation. Nevertheless, oat beta-glucans caused a significant increase in the expression of these receptors, especially TLR 5 and TLR 6, in inflamed IECs in the initial period of the experiment. This period was

characterized by the presence of active inflammation. Oat beta-glucans with a low molar mass had a stronger effect in increasing TLR 5 expression, while the expression of TLR 6 was influenced only by oat beta-glucans with a high molar mass.

Deficiency of TLRs, including TLR 4 and TLR 5, increases the susceptibility to induced inflammation resulting in increased permeability of the intestinal epithelium, inhibition of proliferation, increased apoptosis, and delayed IEC differentiation, which in turn leads to increased damage and ineffective reconstruction of the intestinal epithelium [51,52]. On the other hand, activation of TLRs alleviates the symptoms of colitis by stimulating the synthesis of cytoprotective and function-modulating factors in mesenchymal stem cells and immune cells that migrate to the sites of active inflammation. Furthermore, TLRs take part in the repair of the intestinal epithelium by inducing the synthesis of TFF3 (trefoil factor 3), amphiregulin, and prostaglandin E2, which increase the migration, survival, and proliferation of epithelial cells [22]. TLR 4 overexpression in patients with chronic IBD increases the risk of colorectal cancer due to increased proliferation and decreased apoptosis of IECs that are continuously exposed to proinflammatory cytokines and ROS [24,25].

Discriminant analysis by Fisher showed a positive correlation between the expression of TLR 4 and Caspase-3 in colon epithelial cells after 3 days of the experiment. A higher expression of TLR 4 and Caspase-3 was observed in the control groups fed with feed supplemented with high-molar-mass beta-glucans and beta-glucan-free feed compared to all colitis-induced groups, as well as in the control group consuming feed supplemented with low-molar-mass beta-glucans. This may indicate the activation of the apoptotic pathway with TLR 4 participation, which could have been caused by mechanical damage to the intestinal epithelium after rectal administration of physiological saline. Such damage increases the possibility of pathogen contact with the receptors present on the IEC membranes and consequently induces apoptosis. Some results indicate that bacterial LPS, a component of the cell membrane of some pathogenic bacteria, is one of the factors that reduce the proliferation and increase the apoptosis of cells of the small intestine and colon by activating TLR 4 [53,54]. The significant effect of the consumption of low-molar-mass oat beta-glucans by rats from the control group, which showed lower TLR 4 and Caspase-3 expression compared to other control groups, may indicate the antiapoptotic effect of this polysaccharide. As shown by the results of our research, the mechanism of the antiapoptotic action of beta-glucans is associated with decreased expression of TLR 4. It should be noted, however, that the intensity of the apoptosis process was relatively lower in the control groups, especially compared to the colitis groups after 7 days of TNBS administration.

Flagelin is a TLR5-specific ligand and the major protein of the surface structures of bacterial cells. Expression of TLR 5 in IECs regulates the composition and localization of the intestinal microbiota, preventing the development of intestinal inflammation [55]. The intestinal epithelial layer of TLR 5-deficient mice, as indicated in a review by Burgueño and Abreu (2020), was much more colonized by commensal microorganisms. TLR 5 deficiency, accompanied by an abnormal immune response to commensal antigens, led to the spontaneous development of colitis or exacerbation of the existing inflammation in mice [22]. In our study, we observed a significant effect of the consumption of oat beta-glucans on the increase in TLR 5 expression in acutely inflamed IECs, which consequently resulted in equating the expression of this receptor in colitis animals with the expression found in the  $\beta$ G– control group. There are no reports directly linking the effect of beta-glucans with TLR 5 expression. These polysaccharides are not typical ligands for TLRs, so it should be assumed that their likely mechanism of interaction with these receptors is indirect, possibly resulting from the influence on the expression of MyD88 (myeloid differentiation primary response 88) and TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ). Studies by other authors have indicated that TLR 5 is an important factor regulating the composition of the intestinal microbiota. However, microbiota does not have a direct impact on the TLR 5 transcript, but on the MyD88 and TRIF adapters, which are among

the main signaling molecules modulating the activity of TLRs by promoting epithelial reconstruction and repair as well as the production of cytoprotective factors [51,56].

Interactions between activated Dectin-1 and TLRs also play an important role. As indicated by the results from other authors, the receptors activated by soluble and insoluble beta-glucans, such as Dectin-1, TLR 2, TLR 4, and TLR 6, in macrophage membranes are important modulators of cytokine synthesis and participate in the activation of intracellular metabolic pathways. The main mediator of the activation of Dectin-1-dependent pathways in immune cells is the Syk tyrosine kinase, which, along with the Dectin-1 receptor, activates NF- $\kappa$ B through the CARD9-Bcl10-MALT1 complex [13]. Williams et al. demonstrated that NF- $\kappa$ B1-deficient mice exhibited increased IEC apoptosis in response to TNF- $\alpha$ . This is due to the function of the TNFR1 receptor. In addition to initiating apoptosis, this receptor also induces the expression of antiapoptotic genes by NF- $\kappa$ B [57]. Through their ability to simultaneously interact with the Dectin-1 receptor, TLR 2, and TLR 4, beta-glucans can induce NF- $\kappa$ B in the MyD88 protein-dependent signaling cascade. However, the binding of Dectin-1 by these polysaccharides with a parallel blocked TLR 5 did not have such an effect [13]. These data suggest that TLR 5 binding by beta-glucans does not further modulate the cytokines produced. It should be noted, however, that water-insoluble beta-glucans have a stronger Dectin-1 receptor-activating effect [13]. Such signaling synergy was also demonstrated by Patidar et al., who described the co-localization and clustering of Dectin-1 and TLR 2 in peritoneal macrophages stimulated by barley or yeast beta-glucans (zymosan), with zymosan showing a stronger effect. The phosphorylation pattern in the present study indicates that Dectin-1 and TLR 2 stimulation can activate downstream signaling pathways in a variety of ways. Dectin-1 follows the Syk kinase signaling pathway, while TLR 2 follows the signaling pathway of I $\kappa$ B kinase (IKK-I $\kappa$ B) [58]. Another in vitro study, in which the authors showed increased activation of NF- $\kappa$ B in human dendritic cells by oat beta-glucans via the Dectin-1 receptor, confirms the activation of the Dectin-1/NF- $\kappa$ B signaling pathway by water-soluble beta-glucans. A significant finding in their study was that they noted a stronger stimulatory effect of beta-glucans subjected to enzymatic digestion, which was probably associated with a greater number of  $\beta$ -(1,3) bonds available for Dectin-1 receptors [17].

The mechanism by which beta-glucans influence apoptosis and autophagy in inflamed IECs is related to their effect on the expression of receptors not only in these but also in the cells of the immune system, such as macrophages or dendritic cells. The research results cited above indicate that beta-glucans modulate the synthesis of inflammatory cytokines by the immune cells, which translates into the modification of autophagy and apoptosis signaling pathways in IECs.

In our study, we described for the first time the effects of beta-glucans at three time points—3, 7, and 21 days after TNBS administration, reflecting the periods of exacerbation and remission that occur in people with CD. The results showed significant correlations between the expression of TLRs and Dectin-1 receptors and that of LC3B, Caspase-3, and Beclin-1 protein. Fisher's discriminant analysis showed such correlations only on days 3 and 7 after induction of colitis, while after 21 days, the analysis showed only the effect of expression of autophagy and apoptosis proteins in the colon wall and epithelium on the differentiation of the experimental groups. The ANOVA and FLD results as well as the results of our previous study indicated a significant effect of time on the effectiveness of beta-glucans in the model of colitis characteristic of CD. In the initial period, the direction of changes in the studied parameters indicates acute local inflammation, while over time, remission occurs [29]. It should be noted that the effect of oat beta-glucans on apoptosis and autophagy through TLRs and Dectin-1 receptors was dependent on the severity of inflammation, which was mainly confirmed by the FLD analysis. With the passage of time after TNBS administration and the progression of inflammatory remission, the immune and metabolic responses to these polysaccharides decreased at the cellular level.

## 5. Conclusions

In summary, oat beta-glucans were found to have the ability to alleviate the course of induced inflammation. Their influence on the course of apoptosis and autophagy seems to be particularly significant. The observed reduction in the activity of apoptosis and increased activity of autophagy, in combination with the immunomodulatory activity of beta-glucans, suggest their beneficial therapeutic effect. Depending on the molar mass, these polysaccharides may act via different signaling pathways, but both consequently reduce inflammation and accelerate remission by, among others, protecting the integrity of the intestinal barrier. The presented results do not clearly indicate which beta-glucan fraction has a more effective protective effect on IECs; however, it seems that oat beta-glucans with a low molar mass have a slightly stronger effect in alleviating the induced colitis by greatly influencing the apoptosis process. In addition, the results published earlier by our team indicated that oat beta-glucans with low molar mass are more effective in removing the systemic effects of colitis, including anti-inflammatory and indirect antioxidant effects [28,29]. These properties of oat beta-glucans, in particular those of low molar mass, indicate their utility as preparations added during the production of food for special medical purposes for people suffering from inflammatory bowel disease, especially Crohn's disease.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/2/321/s1>, Figure S1: DEC-1 Changes expression in colonocytes expressed (mean  $\pm$  SE) as integrated optical density.; Figure S2: Changes expression TLR 4 in colonocytes expressed (mean  $\pm$  SE) as integrated optical density.; Figure S3: Changes expression TLR 5 in colonocytes expressed (mean  $\pm$  SE) as integrated optical density.; Figure S4: Changes expression TLR 6 in colonocytes expressed (mean  $\pm$  SE) as integrated optical density.; Figure S5: Changes expression LC3B in colonocytes expressed (mean  $\pm$  SE) as integrated optical density.; Figure S6: Changes expression Caspase-3 in colonocytes expressed (mean  $\pm$  SE) as integrated optical density.; Figure S7: Results of the densitometric analysis for Beclin 1 expression in the large intestinal wall expressed (mean  $\pm$  SE) as integrated optical density.; Figure S8: Results of the densitometric analysis for Caspase-3 expression in the large intestinal wall expressed (mean  $\pm$  SE) as integrated optical density.; Figure S9: Relative expression of cytokine genes vs. Ldha mRNA.

**Author Contributions:** Conducted research and performed experiments, Ł.K., K.D., M.G., M.O., K.M.-K., T.K.; writing—prepared the original draft, Ł.K., K.D., M.G.; statistical analysis, results description, visualization, Ł.K.; project administration, Fisher's Linear Discriminant Analysis, K.D.; writing—results discussion, Ł.K., K.D., J.G.-O.; writing—review and editing, K.D., M.G., J.G.-O.; conceptualization, funding acquisition and supervision, J.G.-O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript

**Funding:** The authors acknowledge the financial support of the National Science Centre, Poland through grant number 2015/17/B/NZ9/01740.

**Institutional Review Board Statement:** The animal experiment was conducted after the approval of the II Local Animal Care and Use Committee in Warsaw (Resolution # 60/2015; 29.06.2015).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author [K.D.].

**Acknowledgments:** The authors wish to thank MS Ewa Żyła and Wilczak from WULS for assistance and supervision over in vivo study and thank Rafał Sapierzyński from WULS for assistance in histology analysis. Furthermore, thank Joanna Harasym from Wrocław University of Economics and Business for prepare pure extract of oat beta-glucans.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.



## References

- Actis, G.C.; Pellicano, R.; Fagoonee, S.; Ribaldone, D.G. History of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1970. [\[CrossRef\]](#)
- Ramos, G.P.; Papadakis, K.A. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. *Mayo Clin. Proc.* **2019**, *94*, 155–165. [\[CrossRef\]](#)
- Van Der Sloot, K.W.J.; Amini, M.; Peters, V.; Dijkstra, G.; Alizadeh, B.Z. Inflammatory bowel diseases: Review of known environmental protective and risk factors involved. *Inflamm. Bowel Dis.* **2017**, *23*, 1499–1509. [\[CrossRef\]](#)
- Gajendran, M.; Loganathan, P.; Catinella, A.P.; Hashash, J.G. A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Disease-a-Month* **2018**, *64*, 20–57. [\[CrossRef\]](#)
- Gajendran, M.; Loganathan, P.; Jimenez, G.; Catinella, A.P.; Ng, N.; Umapathy, C.; Ziade, N.; Hashash, J.G. A comprehensive review and update on ulcerative colitis. *Disease-a-Month* **2019**, *65*, 100851. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nunes, T.; Bernardazzi, C.; De Souza, H.S. Cell death and inflammatory bowel diseases: Apoptosis, necrosis, and autophagy in the intestinal epithelium. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 218493. [\[CrossRef\]](#)
- Patel, K.K.; Stappenbeck, T.S. Autophagy and intestinal homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.* **2013**, *75*, 241–262. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Saha, S.; Panigrahi, D.P.; Patil, S.; Bhutia, S.K. Autophagy in health and disease: A comprehensive review. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *104*, 485–495. [\[CrossRef\]](#)
- Blander, J.M. Death in the intestinal epithelium—basic biology and implications for inflammatory bowel disease. *FEBS J.* **2016**, *283*, 2720–2730. [\[CrossRef\]](#)
- Green, D.R.; Llambi, F. Cell death signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2015**, *7*, a006080. [\[CrossRef\]](#)
- Koukourakis, M.I.; Kalamida, D.; Giatromanolaki, A.; Zois, C.E.; Sivridis, E.; Pouliliou, S.; Mitrakas, A.; Gatter, K.C.; Harris, A.L. Autophagosome proteins LC3A, LC3B and LC3C have distinct subcellular distribution kinetics and expression in cancer cell lines. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0137675. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Schläfli, A.M.; Berezowska, S.; Adams, O.; Langer, R.; Tschann, M.P. Reliable LC3 and p62 autophagy marker detection in formalin fixed paraffin embedded human tissue by immunohistochemistry. *Eur. J. Histochem.* **2015**, *59*, 2481. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kanjan, P.; Sahasrabudhe, N.M.; de Haan, B.J.; de Vos, P. Immune effects of  $\beta$ -glucan are determined by combined effects on Dectin-1, TLR2, 4 and 5. *J. Funct. Foods* **2017**, *37*, 433–440. [\[CrossRef\]](#)
- Nakashima, A.; Yamada, K.; Iwata, O.; Sugimoto, R.; Atsui, K.; Ogawa, T.; Ishibashi-Ohgo, N.; Suzuki, K.  $\beta$ -Glucan in foods and its physiological functions. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2018**, *64*, 8–17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hug, H.; Mohajeri, M.H.; La Fata, G. Toll-like receptors: Regulators of the immune response in the human gut. *Nutrients* **2018**, *10*, 203. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zhang, X.; Qi, C.; Guo, Y.; Zhou, W.; Zhang, Y. Toll-like receptor 4-related immunostimulatory polysaccharides: Primary structure, activity relationships, and possible interaction models. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *149*, 186–206. [\[CrossRef\]](#)
- Sahasrabudhe, N.M.; Tian, L.; van den Berg, M.; Bruggeman, G.; Bruininx, E.; Schols, H.A.; Faas, M.M.; de Vos, P. Endo-glucanase digestion of oat  $\beta$ -Glucan enhances Dectin-1 activation in human dendritic cells. *J. Funct. Foods* **2016**, *21*, 104–112. [\[CrossRef\]](#)
- Rahabi, M.; Jacquemin, G.; Prat, M.; Meunier, E.; AlaEddine, M.; Bertrand, B.; Lefèvre, L.; Benmoussa, K.; Batigne, P.; Aubouy, A.; et al. Divergent roles for macrophage C-type lectin receptors, Dectin-1 and mannose receptors, in the intestinal inflammatory response. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 4386–4398. [\[CrossRef\]](#)
- Tam, J.M.; Mansour, M.K.; Khan, N.S.; Seward, M.; Puranam, S.; Tanne, A.; Sokolovska, A.; Becker, C.E.; Acharya, M.; Baird, M.A.; et al. Dectin-1-dependent LC3 recruitment to phagosomes enhances fungicidal activity in macrophages. *J. Infect. Dis.* **2014**, *210*, 1844–1854. [\[CrossRef\]](#)
- Cohen-Kedar, S.; Baram, L.; Elad, H.; Brazowski, E.; Guzman-Gur, H.; Dotan, I. Human intestinal epithelial cells respond to  $\beta$ -glucans via Dectin-1 and Syk. *Eur. J. Immunol.* **2014**, *44*, 3729–3740. [\[CrossRef\]](#)
- Sakaguchi, K.; Shirai, Y.; Itoh, T.; Mizuno, M. Lentian exerts its anti-inflammatory activity by suppressing TNFR1 transfer to the surface of intestinal epithelial cells through Dectin-1 in an in vitro and mice model. *Immunome Res.* **2018**, *14*, 1000165. [\[CrossRef\]](#)
- Burgueño, J.F.; Abreu, M.T. Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *17*, 263–278. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Akkerman, R.; Logtenberg, M.J.; An, R.; Van Den Berg, M.A.; de Haan, B.J.; Faas, M.M.; Zoetendal, E.; de Vos, P.; Schols, H.A. Endo-1,3(4)- $\beta$ -Glucanase-Treatment of Oat  $\beta$ -Glucan Enhances Fermentability by Infant Fecal Microbiota, Stimulates Dectin-1 Activation and Attenuates Inflammatory Responses in Immature Dendritic Cells Renate. *Nutrients* **2020**, *12*, 1660. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ullman, T.A.; Itzkowitz, S.H. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* **2011**, *140*, 1807–1816. [\[CrossRef\]](#)
- Sussman, D.A.; Santaolalla, R.; Bejarano, P.A.; Garcia-Buitrago, M.T.; Perez, M.T.; Abreu, M.T.; Clarke, J. In silico and Ex vivo approaches identify a role for toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2014**, *33*, 45. [\[CrossRef\]](#)
- Wilczak, J.; Błaszczyk, K.; Kamola, D.; Gajewska, M.; Harasym, J.P.; Jałosińska, M.; Gudej, S.; Suchecka, D.; Oczkowski, M.; Gromadzka-Ostrowska, J. The effect of low or high molecular weight oat beta-glucans on the inflammatory and oxidative stress status in the colon of rats with LPS-induced enteritis. *Food Funct.* **2015**, *6*, 590–603. [\[CrossRef\]](#)
- Suchecka, D.; Harasym, J.P.; Wilczak, J.; Gajewska, M.; Oczkowski, M.; Gudej, S.; Błaszczyk, K.; Kamola, D.; Filip, R.; Gromadzka-Ostrowska, J. Antioxidative and anti-inflammatory effects of high beta-glucan concentration purified aqueous extract from oat in experimental model of LPS-induced chronic enteritis. *J. Funct. Foods* **2015**, *14*, 244–254. [\[CrossRef\]](#)

28. Żyła, E.; Dziendzikowska, K.; Wilczak, J.; Harasym, J.; Gromadzka-Ostrowska, J. Beneficial effects of oat beta-glucan dietary supplementation in colitis depend on its molecular weight. *Molecules* **2019**, *24*, 3591. [\[CrossRef\]](#)
29. Kopiasz, Ł.; Dziendzikowska, K.; Gajewska, M.; Wilczak, J.; Harasym, J.; Żyła, E.; Kamola, D.; Oczkowski, M.; Królikowski, T.; Gromadzka-Ostrowska, J. Time-dependent indirect antioxidative effects of oat beta-glucans on peripheral blood parameters in the animal model of colon inflammation. *Antioxidants* **2020**, *9*, 375. [\[CrossRef\]](#)
30. Antoniou, E.; Margonis, G.A.; Angelou, A.; Pikouli, A.; Argiri, P.; Karavokyros, I.; Papalois, A.; Pikoulis, E. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. *Ann. Med. Surg.* **2016**, *11*, 9–15. [\[CrossRef\]](#)
31. Catana, C.S.; Magdas, C.; Tabaran, F.A.; Craciun, E.C.; Deak, G.; Magdas, V.A.; Cozma, V.; Gherman, C.M.; Berindan-Neagoe, I.; Dumitrascu, D.L. Comparison of two models of inflammatory bowel disease in rats. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2018**, *27*, 599–607. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Parra, R.S.; Lopes, A.H.; Carreira, E.U.; Feitosa, M.R.; Cunha, F.Q.; Garcia, S.B.; Cunha, T.M.; Da Rocha, J.J.R.; Féres, O. Hyperbaric oxygen therapy ameliorates TNBS-induced acute distal colitis in rats. *Med. Gas Res.* **2015**, *5*, 6. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Tian, T.; Wang, Z.; Zhang, J. Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, e4535194. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. El-Salhy, M.; Hatlebakk, J.G. Changes in enteroendocrine and immune cells following colitis induction by TNBS in rats. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *14*, 4967–4974. [\[CrossRef\]](#)
35. Motavallian-Naeini, A.; Andalib, S.; Rabbani, M.; Mahzouni, P.; Afsharipour, M.; Minaian, M. Validation and optimization of experimental colitis induction in rats using 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid. *Res. Pharm. Sci.* **2012**, *7*, 159–169.
36. Xiong, Y.J.; Deng, Z.B.; Liu, J.N.; Qiu, J.J.; Guo, L.; Feng, P.P.; Sui, J.R.; Chen, D.P.; Guo, H.S. Enhancement of epithelial cell autophagy induced by sinensetin alleviates epithelial barrier dysfunction in colitis. *Pharmacol. Res.* **2019**, *148*, 104461. [\[CrossRef\]](#)
37. Hooper, K.M.; Barlow, P.G.; Stevens, C.; Henderson, P. Inflammatory bowel disease drugs: A focus on autophagy. *J. Crohn's Colitis* **2017**, *11*, 118–127. [\[CrossRef\]](#)
38. Błaszczyk, K.; Gajewska, M.; Wilczak, J.; Kamola, D.; Majewska, A.; Harasym, J.; Gromadzka-Ostrowska, J. Oral administration of oat beta-glucan preparations of different molecular weight results in regulation of genes connected with immune response in peripheral blood of rats with LPS-induced enteritis. *Eur. J. Nutr.* **2018**, *58*, 2859–2873. [\[CrossRef\]](#)
39. Pott, J.; Kabat, A.M.; Maloy, K.J. Intestinal epithelial cell autophagy is required to protect against TNF-induced apoptosis during chronic colitis in mice. *Cell Host Microbe* **2018**, *23*, 191–202. [\[CrossRef\]](#)
40. Dias, C.B.; Milanski, M.; Portovedo, M.; Horita, V.; De Ayrizono, M.L.S.; Planell, N.; Coy, C.S.R.; Velloso, L.A.; Meirelles, L.R.; Leal, R.F. Defective apoptosis in intestinal and mesenteric adipose tissue of Crohn's disease patients. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98547. [\[CrossRef\]](#)
41. Bai, J.; Ren, Y.; Li, Y.; Fan, M.; Qian, H.; Wang, L.; Wu, G.; Zhang, H.; Qi, X.; Xu, M.; et al. Physiological functionalities and mechanisms of  $\beta$ -glucans. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *88*, 57–66. [\[CrossRef\]](#)
42. Grundy, M.M.L.; Quint, J.; Rieder, A.; Ballance, S.; Dreiss, C.A.; Cross, K.L.; Gray, R.; Bajka, B.H.; Butterworth, P.J.; Ellis, P.R.; et al. The impact of oat structure and  $\beta$ -glucan on in vitro lipid digestion. *J. Funct. Foods* **2017**, *38*, 378–388. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Neurath, M.F. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 329–342. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. De Vries, H.S.; Plantinga, T.S.; van Krieken, J.H.; Stienstra, R.; van Bodegraven, A.A.; Festen, E.A.M.; Weersma, R.K.; Crusius, J.B.A.; Linskens, R.K.; Joosten, L.A.B.; et al. Genetic association analysis of the functional c.714T>G polymorphism and mucosal expression of dectin-1 in inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7818. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Van Hung, T.; Suzuki, T. Guar gum fiber increases suppressor of cytokine signaling-1 expression via toll-like receptor 2 and dectin-1 pathways, regulating inflammatory response in small intestinal epithelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *61*, 1700048. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Takedatsu, H.; Mitsuyama, K.; Mochizuki, S.; Kobayashi, T.; Sakurai, K.; Takeda, H.; Fujiyama, Y.; Koyama, Y.; Nishihira, J.; Sata, M. A new therapeutic approach using a schizophyllan-based drug delivery system for inflammatory bowel disease. *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 1234–1241. [\[CrossRef\]](#)
47. Kiesler, P.; Fuss, I.J.; Strober, W. Experimental models of inflammatory bowel diseases. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *1*, 154–170. [\[CrossRef\]](#)
48. Günther, C.; Neumann, H.; Neurath, M.F.; Becker, C. Apoptosis, necrosis and necroptosis: Cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut* **2013**, *62*, 1062–1071. [\[CrossRef\]](#)
49. Matsuzawa-Ishimoto, Y.; Shono, Y.; Gomez, L.E.; Hubbard-Lucey, V.M.; Cammer, M.; Neil, J.; Dewan, M.Z.; Lieberman, S.R.; Lazrak, A.; Marinis, J.M.; et al. Autophagy protein ATG16L1 prevents necroptosis in the intestinal epithelium. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 3687–3705. [\[CrossRef\]](#)
50. Azzman, N. Crohn's disease: Potential drugs for modulation of autophagy. *Medicina* **2019**, *55*, 224. [\[CrossRef\]](#)
51. Price, A.E.; Shamardani, K.; Lugo, K.A.; Deguine, J.; Roberts, A.W.; Lee, B.L.; Barton, G.M. A map of Toll-like receptor expression in the intestinal epithelium reveals distinct spatial, cell type-specific, and temporal patterns. *Immunity* **2018**, *49*, 560–575. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Abreu, M.T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: How bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 131–143. [\[CrossRef\]](#)