

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu



mgr inż. Maria Magdalena Kasprzak

**Cytotoksyczność stigmasterolu, estrów stigmasterolu
i produktów ich termiczno-oksydacyjnej degradacji
w badaniach *in vitro***

Praca doktorska

Promotor: prof. UPP dr hab. Anna Olejnik

Promotor: prof. dr hab. Magdalena Rudzińska

Praca wykonana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
oraz w Katedrze Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Poznań 2023

Składam serdeczne podziękowania Pani prof. UPP dr hab. Annie Olejnik
za opiekę naukową, cenne wskazówki, poświęcony czas, gotowość do pomocy
oraz zrozumienie w czasie studiów doktoranckich

Serdecznie dziękuję Pani prof. dr hab. Magdalenie Rudzińskiej
za cenne rady, wyrozumiałość oraz gotowość do pomocy i poświęcony czas

Dziękuję również
pracownikom Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
oraz Katedry Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
za miłą i przyjazną atmosferę
ułatwiającą realizację pracy

Dziękuję Mężowi, Rodzicom i Teściom
za wsparcie i pomoc w czasie studiów doktoranckich

Spis treści

Streszczenie	6
Summary	8
1. Wprowadzenie	10
1.1. Fitosterole i ich naturalne źródła	11
1.2. Biodostępność i metabolizm fitosteroli	13
1.3. Bezpieczeństwo fitosteroli.....	15
1.4. Stigmasterol i jego aktywność biologiczna	16
1.4.1. Działanie przeciwhipercholesterolemiczne	17
1.4.2. Działanie przeciwnotworowe	18
1.4.3. Potencjał leczniczy w chorobie zwyrodnieniowej stawów	21
1.4.4. Aktywność przeciwzapalna	22
1.4.5. Działanie immunomodulujące.....	23
1.4.6. Działanie przeciwcukrzycowe.....	23
1.4.7. Działanie przeciwutleniające i neuroprotekcyjne.....	24
1.4.8. Działanie przeciwdrobnoustrojowe	25
1.5. Produkty przemian termiczno-oksydacyjnych stigmasterolu.....	26
2. Cel pracy i zakres badań.....	28
3. Materiały i metodyka badań	31
3.1. Analizowane związki.....	31
3.2. Otrzymywanie estrów stigmasterolu na drodze estryfikacji chemicznej	31
3.3. Ogrzewanie badanych związków	32
3.4. Analiza zawartości stigmasterolu w analizowanych związkach	32
3.5. Analiza zawartości kwasów tłuszczowych w badanych związkach.....	33
3.6. Analiza produktów degradacji stigmasterolu i jego estrów	33
3.7. Analiza oligomerów po obróbce termiczno-oksydacyjnej stigmasterolu i jego estrów	34
3.8. Analizy cytotoksyczności stigmasterolu i jego estrów dla komórek układu pokarmowego <i>in vitro</i>	34
3.8.1. Linie komórkowe.....	34
3.8.2. Warunki hodowli komórek.....	35
3.8.3. Testy cytotoksyczności.....	36
3.8.3.1. Test MTT.....	37
3.8.3.2. Test skojarzony MT-FMC	37

3.8.3.3. Test BrdU	38
3.9. Oznaczanie genotoksyczności	38
3.10. Analiza potencjału mutagennego i promutagennego	40
3.10.1. Zmutowane szczepy bakterii	40
3.10.2. Analiza właściwości mutagennych i promutagennych.....	41
3.11. Oznaczenie reaktywnych form tlenu	43
3.12. Oznaczenie aktywności kaspaz-3/7	44
3.13. Analiza cyklu komórkowego.....	45
3.14. Analiza wpływu stigmasterolu i estrów stigmasterolu na nabłonek jelitowy Caco-2.....	45
3.14.1. Przygotowanie modelu nabłonka jelitowego Caco-2.....	45
3.14.2. Analiza integralności i przepuszczalności nabłonka jelitowego	45
3.14.3. Analiza wpływu na różnicowanie komórek Caco-2 i tworzenie funkcjonalnego nabłonka jelitowego	47
3.14.4. Analiza ekspresji genów metodą Real-Time PCR	47
3.14.4.1. Izolacja RNA.....	47
3.14.4.2. Odwrotna transkrypcja	48
3.14.4.3. Analiza Real-Time PCR.....	49
3.15. Analiza statystyczna	50
4. Wyniki badań i dyskusja	51
4.1. Wpływ obróbki termiczno-oksydacyjnej na stopień degradacji stigmasterolu i estrów stigmasterolu	51
4.2. Wpływ obróbki termiczno-oksydacyjnej stigmasterolu i jego estrów na tworzenie oksypochodnych stigmasterolu	53
4.3. Wpływ obróbki termiczno-oksydacyjnej stigmasterolu i jego estrów na tworzenie oligomerów.....	56
4.4. Cytotoksyczność stigmasterolu i jego estrów.....	58
4.5. Genotoksyczność stigmasterolu i jego estrów.....	72
4.6. Potencjał mutageny i promutageny stigmasterolu i jego estrów	75
4.7. Wpływ stigmasterolu i estrów stigmasterolu na produkcję reaktywnych form tlenu w komórkach	81
4.8. Wpływ stigmasterolu i estrów stigmasterolu na aktywność kaspaz 3/7.....	83
4.9. Wpływ stigmasterolu i estrów stigmasterolu na przebieg cyklu komórkowego.....	85
4.10. Wpływ stigmasterolu, estrów stigmasterolu i produktów ich termicznej degradacji na nabłonek jelitowy Caco-2.....	86
4.10.1. Wpływ analizowanych związków na proliferujące komórki Caco-2.....	87

4.10.2. Wpływ badanych związków na integralność nabłonka jelitowego.....	89
4.10.3. Wpływ analizowanych związków na przepuszczalność nabłonka jelitowego.....	90
4.10.4. Wpływ badanych związków na tworzenie funkcjonalnego nabłonka jelitowego <i>in vitro</i>	93
4.10.4.1. Wpływ badanych związków na integralność utworzonego nabłonka jelitowego.....	93
4.10.4.2. Wpływ badanych związków na szczelność bariery jelitowej	94
4.10.4.3. Wpływ analizowanych związków na ekspresję genów białek ścisłych połączeń międzykomórkowych w nabłonku jelitowym	96
5. Podsumowanie.....	101
6. Wnioski.....	106
7. Literatura	108
8. Załączniki	122
Wykaz tabel i rysunków	122
Dorobek naukowy	126

Streszczenie

„Cytotoksyczność stigmasterolu, estrów stigmasterolu i produktów ich termiczno-oksydacyjnej degradacji w badaniach *in vitro*”

Stigmasterol i estry stigmasterolu z kwasami tłuszczowymi są stosowane jako funkcjonalne dodatki do produktów spożywczych obniżających poziom cholesterolu całkowitego i jego frakcji LDL (*low-density lipoprotein*) we krwi. Badania naukowe wykazały, że oprócz działania przeciwhipercholesterolemicznego, stigmasterol posiada również szereg innych właściwości prozdrowotnych istotnych dla prewencji i wspomagania terapii wielu chorób. Żywność wzbogacona w stigmasterol może być przeznaczona do spożycia bezpośredniego lub po obróbce termicznej, obejmującej gotowanie, pieczenie, czy smażenie. Podczas długoterminowego przechowywania i obróbki wysokotemperaturowej dochodzi do tworzenia produktów degradacji i oksypochodnych stigmasterolu o potencjalnie niekorzystnym działaniu na organizm człowieka, zwiększającym ryzyko miażdżycy i chorób sercowo-naczyniowych czy chorób nowotworowych.

W ramach pracy dokonano identyfikacji i ilościowego oznaczenia produktów termiczno-oksydacyjnych przemian stigmasterolu oraz jego estrów z kwasem linolowym i oleinowym. W badaniach *in vitro* oceniono poziom ich cytotoksyczności i genotoksyczności dla ludzkich prawidłowych komórek układu pokarmowego. Oznaczono również potencjał mutageny i promutageny analizowanych związków z zastosowaniem zmutowanych szczepów bakterii *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *typhimurium* i enzymów frakcji mikrosomalnej. Analizowano również wpływ stigmasterolu, estrów stigmasterolu i ich pochodnych generowanych podczas obróbki termiczno-oksydacyjnej na integralność i funkcjonalność bariery jelitowej *in vitro*.

Na podstawie przeprowadzonych analiz chemicznych stwierdzono, że warunki obróbki termicznej związków determinują ilość generowanych produktów degradacji oraz oksypochodnych stigmasterolu. Udowodniono, że estry stigmasterolu są bardziej stabilne niż wolny stigmasterol podczas ogrzewania w temperaturze 60 °C (12 h) i 180 °C (8 h), a stopień nienasycenia łańcucha węglowego kwasu tłuszczowego ma istotny wpływ na produkcję pochodnych przemian termiczno-oksydacyjnych.

Wyniki analiz biologicznych wykazały, że estry stigmasterolu charakteryzują się znacznie mniejszą cytotoksycznością dla komórek nabłonka jelita cienkiego i grubego oraz wątroby niż wolny stigmasterol. Estry stigmasterolu i pochodne ich przemian termiczno-

oksydacyjnych stosowane w niskich, fizjologicznie realnych, dawkach (≤ 40 $\mu\text{g/ml}$) nie wywoływały efektów cytotoksycznych w komórkach układu pokarmowego. Natomiast wolny stigmasterol hamował proliferację komórek poprzez supresję syntezy DNA, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G_2/M oraz kierowanie komórek na zależny od kaspaz szlak apoptozy. Ogrzewanie w temperaturze 180 $^{\circ}\text{C}$ powodowało obniżenie potencjału cytotoksycznego stigmasterolu, co było związane z degradacją cząsteczki stigmasterolu. Negatywnym efektem ogrzewania stigmasterolu było zwiększenie jego reaktywności oksydacyjnej, przejawiającej się w indukcji nadprodukcji reaktywnych form tlenu w komórkach. Podobną aktywnością pro-oksydacyjną charakteryzował się również ogrzewany linolan stigmasterolu. Niezależnie od warunków obróbki termicznej, stigmasterol i estry stigmasterolu nie działały genotoksycznie, mutagennie czy promutagennie.

W badaniach przeprowadzonych na modelu nabłonka jelitowego wykazano, że stigmasterol może naruszać integralność bariery jelitowej, powodować rozszczelnienie połączeń międzykomórkowych i zwiększać jej przepuszczalność. Chroniczne narażenie nabłonka jelitowego na linolan stigmasterolu może prowadzić do zaburzenia jego integralności i osłabienia ekspresji genów kodujących białkowe składniki połączeń międzykomórkowych w nabłonku. W przeciwieństwie do linolanu, oleinian stigmasterolu nie wpływał negatywnie na integralność i funkcjonalność bariery jelitowej. Badania dowiodły, że spośród analizowanych związków, oleinian stigmasterolu charakteryzuje się najwyższą stabilnością podczas ogrzewania i jest najbardziej bezpieczny pod względem toksykologicznym dla komórek układu pokarmowego.

Uzyskane dane sugerują, że stigmasterol i związki stigmasterolu oraz produkty ich przemian termiczno-oksydacyjnych mogą wywoływać niekorzystne efekty zdrowotne. Należy podkreślić, że badania nad bezpieczeństwem i aktywnością biologiczną tych związków powinny być kontynuowane i rozszerzane o zastosowanie zaawansowanych modeli doświadczalnych, obejmujących modele tkankowe i organotypowe *in vitro* oraz modele zwierzęce *in vivo*.

Praca doktorska została wykonana w ramach projektu nr 2015/17/B/NZ9/01535 w konkursie OPUS 9 finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki w latach 2016 - 2020.

Summary

„Cytotoxicity of stigmasterol, stigmasterol esters and their thermo-oxidative degradation products in *in vitro* studies”

Stigmasterol and stigmasterol esters with fatty acids are used as functional additives to food products, which lower the level of total cholesterol and its LDL (*low-density lipoprotein*) fraction in blood. Scientific research has shown that, in addition to its antihypercholesterolemic effect, stigmasterol also has numerous other health-promoting properties important for the prevention and support of the therapy of many diseases. The food enriched with stigmasterol can be intended for direct consumption or after thermal treatment, including cooking, baking, or frying. During the long-term storage and high-temperature processing, degradation products and oxyderivatives of stigmasterol are formed, which have a potentially adverse effect on the human body, including an increased risk of atherosclerosis, cardiovascular diseases, and cancer.

As part of the work, the products of thermal-oxidative transformations of stigmasterol and its esters with linoleic and oleic acid were identified and quantitatively determined. *In vitro* studies assessed the level of their cytotoxicity and genotoxicity to normal human digestive system cells. The mutagenic and promutagenic potential of the analyzed compounds was also determined using mutant bacterial strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *typhimurium* and enzymes of the microsomal fraction. The influence of stigmasterol, stigmasterol esters and their derivatives generated during thermal-oxidative treatment on the integrity and functionality of the intestinal barrier *in vitro* was also analyzed.

Based on the chemical analysis, it was found that the conditions of thermal treatment of compounds determine the amount of generated degradation products and oxidative derivatives of stigmasterol. It has been proven that stigmasterol esters are more stable than free stigmasterol when heated at 60 °C (12 h) and 180 °C (8 h), and the degree of unsaturation of the fatty acid carbon chain has a significant impact on the production of derivatives of thermal-oxidative ester transformations.

The results of biological analyses showed that stigmasterol esters are characterized by much less cytotoxicity to the epithelial cells of the small intestine, large intestine and liver than free stigmasterol. Stigmasterol esters and derivatives of their thermal-oxidative transformations at low, physiologically realistic doses (≤ 40 $\mu\text{g/ml}$) did not cause cytotoxic

effects in the cells of the digestive system. In contrast, free stigmasterol inhibited cell proliferation by suppressing DNA synthesis, arresting the cell cycle in the G₂/M phase, and directing cells to the caspase-dependent apoptosis pathway. Heating at 180 °C resulted in a decrease in the cytotoxic potential of stigmasterol, which was related to the degradation of the stigmasterol molecule. The negative effect of heating stigmasterol was its increased oxidative reactivity, manifested in the induction of overproduction of reactive oxygen species in cells. Heated linoleic stigmasterol ester was also characterized by similar pro-oxidant activity. Regardless of the heating conditions, stigmasterol and stigmasterol esters did not have genotoxic, mutagenic or pro-mutagenic effects.

The studies conducted on the intestinal epithelium model have shown that stigmasterol may disturb the integrity of the intestinal barrier, cause the intercellular connections to become unsealed, and increase its permeability. Chronic exposure of the intestinal epithelium to stigmasterol linoleate may disrupt its integrity and weaken the expression of genes encoding protein components of intercellular junctions in the epithelium. Unlike linoleate, stigmasterol oleate did not negatively affect the integrity and functionality of the intestinal barrier. The studies proved that among the analyzed compounds, stigmasterol oleate is characterized by the highest stability during the heating process and is the toxicologically safest for digestive system cells.

The obtained data suggest that stigmasterol, stigmasterol compounds, and products of their thermal-oxidative transformations may cause adverse health effects. It should be emphasized that research on these compounds' safety and biological activity should be continued and expanded by applying advanced experimental models, including tissue and organotypic models *in vitro* and animal models *in vivo*.

The doctoral thesis was carried out as part of project no. 2015/17/B/NZ9/01535 in the OPUS 9 grant funded by the National Science Centre in 2016 – 2020.

1. Wprowadzenie

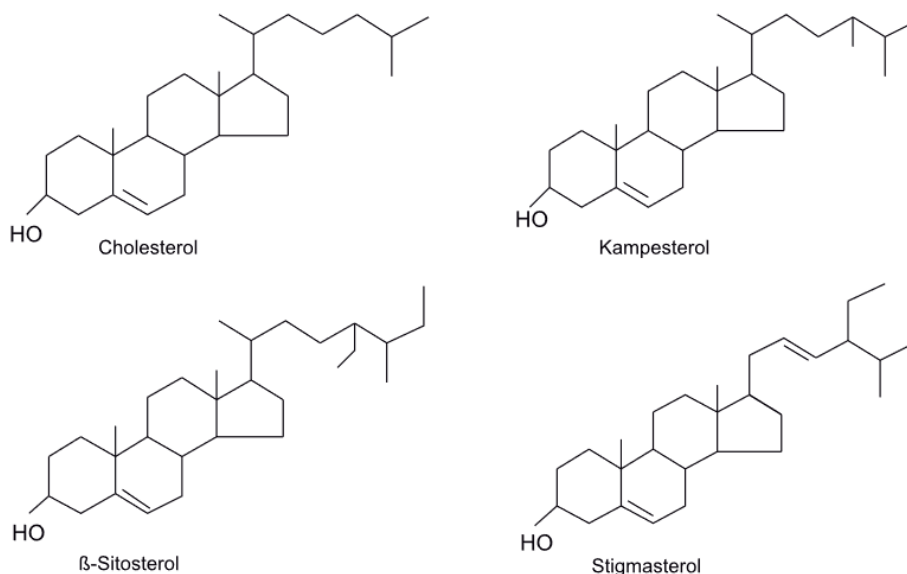
Sterole roślinne są naturalnymi składnikami żywności pochodzenia roślinnego; występują między innymi w roślinach strączkowych, roślinach oleistych, sezamie, pestkach słonecznika czy pestkach dyni. Do fitosteroli zalicza się sterole i stanole roślinne oraz ich estry (Półrolniczak i in., 2008). Fitosterole i ich estry z kwasami tłuszczowymi są wykorzystywane jako funkcjonalne dodatki do żywności i są popularne wśród konsumentów ze względu na ich właściwości obniżania poziomu cholesterolu we krwi (Katan i in., 2003; Berger i in., 2004). Skuteczną, a zarazem bezpieczną dawkę tych związków, ustalono na 3 g/dzień (EFSA, 2020).

Fitosterole wykazują także szereg innych aktywności prozdrowotnych, w tym działanie przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwcukrzycowe, przeciwutleniające, immunomodulujące i neuroprotektoryjne. Istnieją również doniesienia o ich potencjale przeciwpasożytniczym, przeciwgrzybiczym, przeciwbakteryjnym i przeciwwirusowym, (Bakrim i in., 2022). Jednak, oprócz korzystnych właściwości biologicznych, coraz częściej pojawiają się raporty o potencjalnych negatywnych skutkach działania fitosteroli na organizm człowieka (Salehi i in., 2021; Feng i in., 2022). Wykazano, że podczas przetwarzania i przechowywania żywności zawierającej sterole roślinne i ich estry, powstają pochodne utlenione, dimery, oligomery i wiele związków niskocząsteczkowych o potencjalnym działaniu cytotoksycznym i/lub genotoksycznym na komórki i tkanki organizmu (Rudzińska i in., 2009, Raczyk i in., 2017). Cytotoksyczność steroli roślinnych i ich estrów w odniesieniu do komórek nowotworowych była przedmiotem wielu badań (Ryan i in., 2005; Raczyk i in., 2018), natomiast jak dotąd nie prowadzono intensywnych prac badawczych nad wpływem fitosteroli na komórki pochodzące z tkanek prawidłowych. W literaturze naukowej niewiele jest też doniesień o bioaktywności pochodnych fitosteroli generowanych podczas obróbki termicznej i przechowywania żywności. Z uwagi na rosnące spożycie steroli roślinnych, zapewnienie ich bezpieczeństwa zdrowotnego jest bardzo ważnym wyzwaniem dla producentów żywności bogatej w te związki.

Przedstawiana praca stanowi odpowiedź na potrzebę badań nad działaniem fitosteroli w aspekcie ich bezpośredniego wpływu na komórki i tkanki układu pokarmowego oraz bezpieczeństwa toksykologicznego dla organizmu człowieka.

1.1. Fitosterole i ich naturalne źródła

Fitosterole to grupa związków, obejmująca sterole i stanole roślinne oraz ich estry (Pórolniczak i in., 2008). Fitosterole są podstawowymi składnikami błon komórkowych roślin. Chemicznie są strukturalnymi i funkcjonalnymi analogami cholesterolu, które nie są produkowane w organizmie człowieka. Różnią się od cholesterolu jedynie łańcuchami bocznymi węgla i/lub obecnością lub brakiem wiązania podwójnego. Są to 28- lub 29-węglowe alkohole wielopierścieniowe, wzbogacone grupą metylową lub etylową. Dodatkowo mogą zawierać w łańcuchu jedno lub dwa wiązania podwójne. W komórkach roślinnych zidentyfikowano ponad 200 fitosteroli, w tym najpowszechniej występujące: β -sitosterol, kampesterol oraz stigmasterol (ryc. 1) (Moreau i in., 2002; Kopeć i in., 2011). Związki te w naturze nigdy nie występują pojedynczo. Obecne w roślinach zarówno w formie wolnej, jak i zestryfikowanej kwasami tłuszczowymi, regulują płynność i przepuszczalność błon komórek roślinnych (Hartmann, 1998; Valitova i in., 2016).



Rycina 1. Struktura cholesterolu i fitosteroli (β -sitosterolu, kampesterolu i stigmasterolu) powszechnie występujących w materiale roślinnym (Nowak, 2011).

Fitosterole dodawane są do żywności głównie ze względu na ich zdolność do obniżania poziomu cholesterolu we krwi. Przeciwoholesterolowe działanie steroli roślinnych u zwierząt i ludzi odkryto w latach 50. XX wieku (Peterson, 1951; Pollak, 1953). W późniejszych latach dowiedziono, że podobne działanie wykazują stanole roślinne oraz estry fitosteroli i fitostanoli (Sugano i in., 1976; Mattson i in., 1977). Udowodniono, że sterole i stanole roślinne obniżają poziom cholesterolu całkowitego i jego frakcji LDL (*low-density lipoprotein*) we krwi. Stwierdzono, że codzienne spożywanie 2 g steroli lub stanoli roślinnych obniża poziom cholesterolu LDL o 10% (Katan i in., 2003; Berger i in., 2004). Działanie przeciwoholesterolowe steroli roślinnych polega na wypieraniu cholesterolu przez fitosterole z miceli lipidowych w świetle jelita (De Smet i in., 2012).

Dawka steroli roślinnych przyjmowana ze standardową dietą, zawierającą dużą ilość naturalnych fitosteroli, nie jest wystarczająca do uzyskania efektu antycholesterolowego (Lin i in., 2010). Dlatego są one dodawane do różnych produktów spożywczych, takich jak margaryna, mleczne napoje fermentowane, mleko, sery, napoje sojowe i owocowe, sosy sałatkowe, pasty do smarowania, wędliny, pieczywo, dania gotowe do spożycia, batoniki i słodczyce (Bacchetti i in., 2011). Skuteczna i zarazem bezpieczna dawka fitosteroli została ustalona na poziomie 2-3 g/dzień (Cremonini i in., 2021). Głównymi źródłami fitosteroli są oleje roślinne, orzechy, rośliny strączkowe, w mniejszym stopniu także ziarna zbóż i produkty zbożowe, oraz warzywa i owoce (tabela 1). Komórki roślinne mogą zawierać 1-3 mg fitosteroli w 1 gramie suchej masy (Shaller, 2004; Leal-Castañeda i in., 2015). Zwyczajowe spożycie tych składników w przeciętnej diecie człowieka wynosi 150 - 440 mg/dzień, a w diecie wegańskiej do 1 g/dzień (Garcia-Llatas i Rodriguez-Estrada, 2011). W ostatnich latach, ze względu na powszechność włączania fitosteroli do różnych grup produktów spożywczych, ich spożycie zostało zwiększone do poziomu ok. 3 g/dzień (EFSA, 2020).

Tabela 1. Zawartość fitosteroli w wybranych produktach spożywczych (zestawienie przygotowano na podstawie opracowania Witkowskiej i in., 2021)

Produkt	Zawartość fitosteroli (mg/100 g produktu)			
	Stigmasterol	Kampesterol	β -sitosterol	Zawartość fitosteroli ogółem
Olej rzepakowy	2,4	260,0	368,0	630,4
Olej sojowy	55,4	58,0	153,0	266,4
Olej słonecznikowy	34,5	31,5	210,0	290,0
Olej palmowy	8,4	15,7	38,5	62,6
Oliwa z oliwek	1,0	5,7	126,0	132,7
Orzechy laskowe	1,0	7,0	108,0	116,0
Migdały	3,0	9,0	118,0	130,0
Nasiona słonecznika	15,8	20,9	140,4	222,5
Mąka pszenna	0,4	6,5	21,0	31,8
Ryż biały	2,0	1,8	8,3	13,4
Fasola biała, sucha	86,2	15,2	85,1	186,5
Soja, sucha	16,3	20,9	65,0	161,0
Groszek zielony, świeży	4,0	5,6	41,4	53,7
Brokuł	1,1	6,9	31,0	39
Burak czerwony	5,7	0,6	9,1	17,1
Kapusta biała	0,2	2,8	9,4	13,0
Awokado	2,0	5,0	76,0	83,0
Banan	1,8	1,5	11,0	14,3
Jabłko	0,1	0,4	13,0	13,5

1.2. Biodostępność i metabolizm fitosteroli

Fitosterole nie są syntetyzowane endogennie w organizmie człowieka, są dostarczane wyłącznie z produktami zawartymi w diecie. Pomimo podobieństwa strukturalnego do cholesterolu, fitosterole wchłaniają się z przewodu pokarmowego w znacznie mniejszym stopniu. U osób zdrowych biodostępność fitosteroli szacowana jest poniżej 5%, w odróżnieniu od cholesterolu, którego biodostępność określana jest na poziomie 50-60% (Li i in., 2022).

W jelicie cienkim fitosterole są wbudowywane w micelle złożone z hydrolizatu tłuszczu, kwasów żółciowych, lecytyny i innych składników odżywczych. W tym procesie fitosterole konkurują z cholesterolem. Z uwagi na ich wyższą hydrofobowość, łatwiej ulegają wbudowaniu w micelle i mają zdolność do wypierania cholesterolu z miceli. Fitosterole po uwolnieniu z miceli przechodzą przez rąbek szczoteczkowy z udziałem białka transportowego NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-Like 1*) zlokalizowanego w błonie wierzchołkowej enterocytów. W enterocytach ulegają estryfikacji przy pomocy enzymu acylotransferazy acylokoenzymu A:cholesterol 2 (ACAT 2). Zestryfikowane fitosterole są składane w chylomikrony z triacyloglicerolem i apolipoproteina B 48 (Apo B48) z udziałem mikrosomalnego białka przenoszącego triglicerydy (MTP). Chylomikrony wydzielane są do limfy i trafiają do krążenia ogólnego. Estryfikacja jelitowa fitosteroli przez ACAT 2 zachodzi z niewielką wydajnością; jest ona ok. 60 razy mniejsza niż estryfikacja cholesterolu. Niezestryfikowane fitosterole wydzielane są z powrotem do światła jelit na drodze transportu aktywnego z udziałem białek transportowych ABC G5/G8 (*ATP-binding cassette transporter G5/G8*) należących do nadrodziny transporterów ABC. Niewchłonięte fitosterole mogą ulegać przemianom prowadzonym przez mikrobiotę jelitową. Stopień absorpcji jelitowej jest zależny od rodzaju związku. Stwierdzono, że największą przyswajalnością charakteryzuje się kampesterol, następnie β -sitosterol, a najmniejszą stigmasterol. Fitosterole trafiają do wątroby, skąd są wydzielane jako lipidowe składowe lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL, *very low density lipoprotein*). Fitosterole są wydalane z organizmu wraz z żółcią, również z udziałem transportowych białek ABCG5/G8 (Feng i in., 2022).

Mutacje genów kodujących transportery ABCG5 i ABCG8, ulegające ekspresji w komórkach jelitowych i hepatocytach, odpowiedzialne za szybkie wydalanie cholesterolu oraz steroli i stanoli roślinnych z organizmu, powodują poważne zaburzenia w metabolizmie steroli i ich odkładanie w organizmie (Ajagbe i in., 2015). Osoby homozygotyczne pod względem mutacji w jednym z genów ABCG5 i ABCG8, charakteryzują się podwyższonym stężeniem fitosteroli w surowicy wynikającym ze zwiększonej absorpcji jelitowej fitosteroli i zmniejszonego ich wydalania wraz z żółcią. Zaburzenia w metabolizmie fitosteroli zwiększają ryzyko przedwczesnego wystąpienia zmian miażdżycowych, nawet u osób z prawidłowym poziomem cholesterolu we krwi. Dlatego pacjentom cierpiącym na fitosterolemię zaleca się unikanie produktów lub suplementów zawierających sterole roślinne (Berger i in., 2004).

1.3. Bezpieczeństwo fitosteroli

Fitosterole spożywane w dawkach nieprzekraczających 3 g/dziennie są uważane za bezpieczne dla człowieka (EFSA, 2012; EFSA, 2020); chociaż w literaturze naukowej pojawia się coraz więcej doniesień na temat możliwych efektów niepożądanych (Salehi i in., 2021; Feng i in., 2022). Szkodliwe skutki zdrowotne mogą być związane z autoutlenianiem fitosteroli, zachodzącym w organizmie lub/i poza organizmem człowieka, prowadzącym do powstawania produktów utleniania fitosteroli (POPs - *phytosterol oxidation products*), zwanych oksyfitosterolami (Hovenkamp i in., 2008; Rudzińska, 2022). Zmiany autooksydacyjne zachodzą poprzez mechanizmy wolnorodnikowe, w których zwykle pośredniczą reaktywne formy tlenu (RFT) (Lengyel i in., 2012). Procesy utleniania fitosteroli ze znaczącym tworzeniem oksypochoodnych mają miejsce podczas przechowywania żywności oraz obróbki termicznej (Barriuso i in., 2016; Rudzińska i in., 2005). POPs, podobnie jak produkty utleniania cholesterolu (COPs - *cholesterol oxidation products*), są identyfikowane w osoczu i tkankach organizmu (Husche i in., 2011; Baumgartner i in., 2015; Luister i in., 2015), co budzi obawy o bezpieczeństwo fitosteroli i występowanie możliwych niekorzystnych skutków zdrowotnych, w tym cytotoksyczności i działania proaterogennego. Luister i wsp. (2015) zaobserwowali, że pacjenci z chorobą wieńcową i znaczącym zwężeniem zastawki aortalnej charakteryzują się zwiększonym stężeniem steroli roślinnych w osoczu i ich kumulacją w tkance zastawki aortalnej. Podobnie podwyższone stężenia POPs w osoczu stwierdzono u pacjentów z upośledzoną tolerancją glukozy i cukrzycą typu 2, co może wskazywać na związek między POPs a stanem zdrowia (Baumgartner i in., 2017). Ponadto wykazano, że dieta wysokotłuszczowa zawierająca POPs zwiększała zmiany miażdżycowe u zwierząt doświadczalnych (Plat i in., 2014). Dowiedziono również, że POPs mogą wpływać na komórki śródbłoka naczyń. Na przykład, oksyfitosterole zwiększały poziom RFT w komórkach śródbłoka aorty szczura, wzmacniały ekspresję cyklooksygenazy 2 (Cox-2) i osłabiały wazodylatację naczyń w nienaruszonym śródbłoku (Yang i in., 2013). W innych badaniach pochodne epoksydowe β -sitosterolu hamowały wzrost ludzkich komórek śródbłoka izolowanych z aorty brzusznej. Podobnie frakcja POPs otrzymana z podgrzewanego oleju rzepakowego obniżała żywotność komórek śródbłoka (Rubiś i in., 2008). Zaproponowano kilka mechanizmów, poprzez które POPs mogą promować rozwój miażdżycy, takich jak zaburzenie homeostazy lipidów, indukcja śmierci komórek, aktywacja procesu oksydacyjnego, czy inicjacja stanu zapalnego. POPs są podejrzewane o działanie prozapalne; jednak wyniki badań naukowych są niejednoznaczne i nie dostarczają silnych dowodów na indukcję zapalenia.

Stwierdzono, że 7-ketostigmasterol wywołuje odpowiedź zapalną w ludzkich komórkach okrężnicy Caco-2, zwiększając produkcję cytokin prozapalnych TNF- α i IL-8 oraz cytokiny przeciwzapalnej IL-10 (Alemany i in., 2013). Z drugiej strony, wykazano, że 7 β -hydroksysterol i 7-ketosterol nie indukują stanu zapalnego w ludzkich monocytach linii U937 (Vejux i in., 2012).

Niekorzystne właściwości POPs mogą być związane z ich cytotoksycznością, która zależy od struktury fitosterolu i jego przemian oksydacyjnych (Wang i Lu, 2018). Ryan i in. (2005) wskazali na cytotoksyczność mieszaniny oksysteroli dla monocytów U937, nowotworowych komórek okrężnicy Caco-2 i wątroby HepG2. Natomiast indukcję śmierci apoptotycznej stwierdzono tylko w komórkach linii U937 (Ryan i in., 2005). Podobnie, oksystigmasterole (7 β -hydroksy, epoksydiol, diepoksyd) również indukowały apoptozę w monocytach U937, działając poprzez obniżenie ekspresji antyapoptotycznego, sprzyjającego przetrwaniu komórek, białka Bcl-2 (O'Callaghan i in. 2010). Pochodne 7-keto, w tym 7-ketosterol, 7-ketokampesterol, 7-ketobrassicasterol i 7-ketostigmasterol, hamowały proliferację ludzkich nowotworowych komórek jelitowych. Przy czym, 7-ketosterol i 7-ketokampesterol charakteryzowały się najwyższym potencjałem antyproliferacyjnym; powodowały zatrzymanie cyklu komórkowego i indukcję apoptozy ze wzrostem aktywności kaspazy-3 i inhibicją ekspresji białka Bcl-2. Działanie proapoptotyczne wykazywał również 7-ketobrassicasterol, w przeciwieństwie do 7-ketostigmasterolu (Gao i in., 2015). W innych badaniach 7-ketostigmasterol nie indukował apoptozy w komórkach okrężnicy Caco-2, a nawet ograniczał działanie cytotoksyczne 7-ketocholesterolu (Alemany i in., 2012). Wiedza na temat cytotoksyczności i aterogenności POPs oraz ich potencjalnego działania prozapalnego jest wciąż niewystarczająca, a niektóre doniesienia naukowe raportują sprzeczne wyniki badań. Naukowcy wskazują na potrzebę prowadzenia dalszych zaawansowanych badań w celu potwierdzenia bezpieczeństwa fitosteroli oraz określenia zaleceń dotyczących przechowywania i obróbki cieplnej żywności funkcjonalnej wzbogaconej w fitosterole (Feng i in., 2022; Wang i Lu, 2018).

1.4. Stigmasterol i jego aktywność biologiczna

Stigmasterol (C₂₉H₄₈O, stigmasta-5,22-dien-3-ol) to nienasycony fitosterol należący do klasy tetracyklicznych triterpenów. Jest nierozpuszczalny w wodzie, ale rozpuszczalny w alkoholach (Bakrim i in., 2022). Obok β -sitosterolu i kampesterolu, związek ten należy do najpowszechniej występujących steroli w roślinach (tabela 1) i ma duże znaczenie w diecie

człowieka. Głównymi źródłami stigmasterolu dla osób dorosłych w Polsce są kawa (25,1%), warzywa (23,2%), tłuszcze (16,9%) i ziarna zbóż (12,9%). Do produktów dostarczających największe ilości stigmasterolu w diecie zaliczono kawę (25,1%), margarynę (11,8%) i białe pieczywo (6,5%). Dzielne spożycie tego fitosterolu oszacowano na poziomie 23,5 mg dla mężczyzn i 21,1 mg dla kobiet (Witkowska i in., 2021).

Stigmasterol zyskuje coraz większe zainteresowanie konsumentów i producentów żywności funkcjonalnej z uwagi na szereg właściwości prozdrowotnych o istotnym znaczeniu dla prewencji i wspomagania leczenia wielu chorób. Wykazano, że związek ten ma działanie przeciwhipercholesterolemiczne, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwcukrzycowe, immunomodulujące, przeciw pasożytnicze, przeciwgrzybicze, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwutleniające i neuroprotektyjne (Bakrim i in., 2022).



Rycina 2. Potencjał prozdrowotny stigmasterolu

1.4.1. Działanie przeciwhipercholesterolemiczne

Badania *in vivo* wykazały, że stigmasterol ma zdolność modulowania metabolizmu cholesterolu skutecznie obniżając poziom cholesterolu całkowitego i jego frakcji LDL oraz stężenia triglicerydów w osoczu. Stwierdzono, że stigmasterol ogranicza wchłanianie

cholesterolu, na podstawie zwiększonej ilości cholesterolu i produktów jego metabolizmu w kale. Udowodniono, że stigmasterol hamuje ekspresję genów kluczowych dla wchłaniania jelitowego cholesterolu, w tym genów ACAT2 i MTP, jednak bez wpływu na ekspresję genu transportera NPC1L1 (Liang i in., 2011). Stigmasterol obniżał też poziom transkryptów mRNA ABCG5, bez ingerencji w ekspresję ABCG8. Efektem zdolności modulujących wchłanianie i metabolizm cholesterolu było ograniczenie tworzenia blaszki miażdżycowej oraz zmniejszenie gromadzenia cholesterolu w aorcie i poprawa jej funkcjonalności, co wykazano w eksperymentach na zwierzętach doświadczalnych karmionych paszą zawierającą 0,1% stigmasterolu (Liang i in., 2011).

Ponadto, w badaniach *in vivo* wykazano, że stigmasterol wpływa na regulację metabolizmu lipidów i łagodzi niealkoholową stłuszczeniową chorobę wątroby (NAFLD). U myszy karmionych dietą wysokotłuszczową, w której tłuszcze dostarczają 40-60% kalorii, stwierdzono, że wzbogacenie diety zwierząt w stigmasterol w ilości 0,4% powodowało obniżenie całkowitej zawartości lipidów, triacylogliceroli i cholesterolu w wątrobie, oraz wpływało na poprawienie obrazów histopatologicznych wątroby. U zwierząt z NAFLD zanotowano również zmniejszony poziom jelitowych kwasów żółciowych i zwiększoną ilość lipidów w kale. Stigmasterol korzystnie wpływał na regulację ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm lipidów. Analizy lipidomiczne prób wątroby i surowicy wykazały, że stigmasterol zapobiega zwiększeniu poziomu di- i triacylogliceroli oraz obniżeniu poziomu fosfolipidów - zmianom indukowanym przez dietę wysokotłuszczową. Co więcej, udowodniono, że stigmasterol był bardziej skuteczny niż β -sitosterol w korzystnym oddziaływaniu na większość analizowanych parametrów (Feng i in., 2018^a, Feng i in., 2018^b).

Badania *in vitro* na modelu ludzkiego nabłonka jelitowego Caco-2 również dostarczyły dowodów na aktywność antyhipercholesterolemiczną stigmasterolu. Stigmasterol ograniczał biosyntezę cholesterolu dzięki hamowaniu ekspresji syntazy hydroksymetyloglutarylo-CoA (HMGCS1, HMG-CoA *synthase*), zmniejszał wychwyt cholesterolu w komórkach Caco-2 poprzez wpływ na regulację ekspresji białek kluczowych dla transportu i metabolizmu cholesterolu. Hamował ekspresję białka NPC1L1, zwiększał poziom ABCG5 i ABCG8, a także blokował ekspresję ACAT2 w komórkach nabłonka jelitowego (Yuan i in., 2020).

1.4.2. Działanie przeciwnowotworowe

Badania prowadzone w ostatnich latach dowodzą, że stigmasterol wykazuje właściwości przeciwnowotworowe w stosunku do komórek pochodzących z różnych

nowotworów, w tym białaczki, raka skóry, żołądka, wątroby, płuc, endometrium, szyjki macicy, piersi czy jajnika (tabela 2).

Tabela 2. Cele molekularne i mechanizmy przeciwnowotworowego działania stigmasterolu

Nowotwór	Model badawczy	Mechanizm działania	Referencje
Wątroba	Linia HepG2	Indukcja apoptozy (↑BAX, ↑p53, ↓BCL-2).	Kim i in., 2014
	Linia SMMC-7721	Blokowanie cyklu komórkowego w fazie G ₀ /G ₁ , ↓onkogeny (FOS, MYC, RAS, PIM-1, MET, REL), ↑ geny supresorowe nowotworu (NF-2, MAP2K6) Indukcja mitochondrialnego szlaku apoptozy, ↑ RFT, ↓potencjał błony mitochondrialnej ↑ wewnątrzkomórkowy poziom Ca	Zhang i in., 2008 Li i Li, 2012
Żołądek	Komórki SGC-7901 Komórki MGC-803	hamowanie szlaku sygnałowego Akt/mTOR, indukcja apoptozy (↑BAX, ↓BCL-2, ↑CAS-3/9) i autofagii	Zhao i in., 2021
	Komórki SNU-1	Blokowanie cyklu komórkowego w fazie G ₂ /M, indukcja mitochondrialnego szlaku apoptozy, hamowanie szlaku sygnałowego JAK/STAT, hamowanie migracji komórek	Li i in., 2018
Woreczek żółciowy	Komórki izolowane od pacjentów	Indukcja apoptozy zależnej i niezależnej od kaspaz, ↑CAS-3, ↑ RFT, ↑ p27 i ↓ Jab1; hamowanie cyklu w fazie G ₁	Pandey i in., 2019
Okreźnica	Linia Caco-2	↓prolifercja, indukcja mitochondrialnego szlaku apoptozy, ↑ wewnątrzkomórkowy poziom Ca, ↑ RFT	Cilla i in., 2015
Płuca	Komórki NCI-H1975, model myszy <i>in vivo</i>	↓żywołność, ↓metabolizm energetyczny, ↓prolifercja, hamowanie cyklu komórkowego, ↓cykliny D1, ↓CDK2, ↓CDK4, ↓CDK6; ↓SIRT1, ↑p21, ↑acetylo-p53, ↑ PPARγ	Song i in., 2022
	Komórki PLA-801D, A-549, H661, SK-SEM-1, BEAS-2B	↓prolifercja, indukcja apoptozy, modulacja receptora sierocego kwasu retinowego	Dong i in., 2021
Gruzoł piersiowy	Linia MCF-7 Myszy BALB/c	Indukcja apoptozy, ↓BCL-2, ↓Bcl-xL ↓objętości guza po 30 dniach terapii stigmasterolem	AmeliMojarad i in., 2022
	Linie MCF-7 i MDA-MB 231	działanie przeciwnowotworowe stigmasterolu w połączeniu z sorafenibem; ↓prolifercja (↓Ki-67), ↓p-ERK, ↓NF-κB, indukcja apoptozy (↑CAS-3, ↓BCL-2), ↓angiogeneza (↓VEGF-A, ↓VEGFR-2)	Omran i in., 2021
	Komórki LMM3, Komórki HUVEC, myszy BALB/c	Hamowanie angiogenezy, ↓VEGF	Michelini i in., 2016
	Linia MCF-7	Cytotoksyczność dla komórek MCF-7 większa niż dla prawidłowych komórek nerki HEK293; Indukcja apoptozy (↑CAS-3, ↑CAS-9)	Al-Fatlawi, 2019
Jajnik	Linia ES2 Linia OV90	Aktywacja ścieżek sygnałowych apoptozy, ↑CAS-3, ↑CAS-9, ↑BAX, ↑BAK, ↑Ca w mitochondriach i cytozolu, ↑RFT, oś ER-mitochondrium; Hamowanie migracji komórek; ↓VEGF-A, ↓PLAU, ↓MMP2, ↓MMP9, ↓MMP14	Bae i in., 2020
Endometrium	Linia Ishikawa, Linia SPEC2	Inhibicja Nrf2. Wzmocnienie działania cisplatyny w hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych i ich inwazyjności oraz indukcji apoptozy	Liao i in., 2020

Skóra	myszy Swiss albinosy	↓objętości guza, ↓ALT, ↓AST, ↓AP, ↓bilirubina, ↑SOD, ↑katalaza, ↑glutation, ↓RFT, ↓uszkodzeń DNA	Ali i in., 2015
	Komórki czerniaka B16-F10	↓żywołność, ↓proliferaacja, indukcja apoptozy	Xingan Cheng i Zhang, 2014
Białaczka	Linia CCRF-CEM i jej lekooporny odpowiednik CCRF-VCR1000	Cytotoksyczność estrów stigmasterolu dla komórek ostrej białaczki limfoblastycznej; najsilniejsze działanie estru z kwasem linolowym	Raczyk i in., 2018
	Linia Jurkat/E6-1	Indukcja apoptozy, ↓BCL-2, ↓Bcl-xL, ↓VEGF	Nazemi i in., 2020

ALT - aminotransferaza alaninowa, AP - alkaliczna fosfataza, AST - aminotransferaza asparaginianowa, BCL-2 i Bcl-xL - białka antyapoptotyczne z rodziny BCL-2, BAX i BAK - białka proapoptotyczne z rodziny BCL-2, CAS - kaspaza, CDK - kinazy zależne od cyklin, ERK - rodzina kinaz regulowanych sygnałem zewnątrzkomórkowym, MMP - metaloproteinaza macierzy, NF-κB - jądrowy czynnik transkrypcyjny kappaB; Nrf2 - jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2, PLAU - aktywator plazminogenu typu 2, PPARγ - receptory aktywowane przez proliferatory peroksysonów γ; RFT - reaktywne formy tlenu, SIRT1 - Sirtuina 1, SOD - dysmutaza ponadtlenkowa, VEGF - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego, VEGFR - receptor VEGF.

Wyniki eksperymentów wskazują, że stigmasterol może hamować proces nowotworowy na różnych jego etapach, począwszy od prewencji, przez promocję i progresję kancerogenezy. Stigmasterol działał supresyjnie na proliferację komórek nowotworowych przez blokowanie cyklu komórkowego w fazie G₁ i G₂ odpowiednio w komórkach nowotworowych wątroby (Zhang i in., 2008) i żołądka (Li i in., 2018), poprzez wpływanie na różne ścieżki sygnałowe w komórkach, czy indukcję procesu apoptozy. Stigmasterol promował apoptozę komórek izolowanych z różnych zmian neoplastycznych przez wzmacnianie ekspresji białek pro-apoptotycznych (BAX, BAK) i obniżanie ekspresji białek anty-apoptotycznych (BCL-xL, BCL-2) wspierających przeżycie komórek nowotworu. W zależności od pochodzenia komórek, stigmasterol aktywował różne szlaki apoptozy z aktywacją kaspaz wykonawczych 3 i 9, nadprodukcją RFT, czy regulacją ekspresji czynników transkrypcyjnych kluczowych dla przebiegu procesu nowotworowego (Li i Li, 2012; Ali i in., 2015; Al-Fatlawi, 2019; Pandey i in., 2019; Bae i in., 2020; Omran i in., 2021; Zhao i in., 2021). Ponadto, stigmasterol hamował migrację i inwazję komórek nowotworowych oraz ograniczał procesy związane z angiogenezą i unaczynieniem guza (Michelini i in., 2016; Nazemi i in., 2020; Liao i in., 2020; Bae i in. 2020; Omran i in., 2021). Mechanizmy działania stigmasterolu i jego cele molekularne w różnych typach nowotworów przedstawiono w tabeli 2.

Badania przedkliniczne dostarczyły również dowodów na współdziałanie stigmasterolu z niektórymi lekami przeciwnowotworowymi. Stigmasterol uwrażliwiał komórki raka endometrium (Liao i in., 2020) i piersi (Omran i in., 2021) na odpowiednio cisplatynę

i sorafenib i wspomagał te leki w hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych. Synergistyczne działanie stigmasterolu i cytostatyków daje szansę na zmniejszenie dawki leków i złagodzenie negatywnych skutków terapii. Dodatkowo, wykazano, że cytotoksyczność stigmasterolu w odniesieniu do komórek prawidłowych jest znacznie mniejsza niż dla komórek nowotworowych, co znajduje potwierdzenie w wartościach dawek cytotoksycznych określonych w hodowlach komórek raka piersi MCF-7 ($IC_{50} = 27,4 \mu M$) i wątroby HepG2 ($IC_{50} = 25,8 \mu M$) i hodowli embrionalnych komórek nerki HEK293 ($IC_{50} = 421,7 \mu M$) (Al-Fatlawi, 2019). Potencjałem cytotoksycznym dla komórek nowotworowych charakteryzował się nie tylko wolny stigmasterol, ale również stigmasterol w postaci zestryfikowanej z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi, w tym z kwasem oleinowym, linolowym i linolenowym. Przy czym linolenian stigmasterolu wykazywał najwyższą cytotoksyczność w stosunku do komórek ostrej białaczki limfoblastycznej (Raczyk i in. 2018).

Obiecujące wyniki eksperymentów przeprowadzonych na komórkowych modelach nowotworów *in vitro* wymagają potwierdzenia w badaniach *in vivo* i próbach klinicznych. Poważne wątpliwości budzi skuteczność działania stigmasterolu na guzy nowotworowe *in vivo*. Niska biodostępność stigmasterolu i jego ograniczone możliwości dotarcia do tkanek docelowych mogą determinować osiągnięcie skutecznych dawek terapeutycznych. Tworzenie modyfikowanych pochodnych stigmasterolu w celu zwiększenia jego stabilności i bezpieczeństwa oraz poprawienia biodostępności i efektywności działania jest ważnym kierunkiem badań, który daje szansę na potencjalne wykorzystanie stigmasterolu w terapii przeciwnowotworowej.

1.4.3. Potencjał leczniczy w chorobie zwyrodnieniowej stawów

Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że stigmasterol może wspomagać leczenie choroby zwyrodnieniowej stawów. W modelu zwierzęcym stwierdzono, że stigmasterol ogranicza degradację chrząstki i zmniejsza ekspresję metaloproteinaz (MMP-1, MMP-3, MMP-13) przy jednoczesnym zwiększeniu ekspresji tkankowego inhibitora metaloproteinazy (TIMP-1) (Chen i in., 2012). Eksperymenty przeprowadzone na szczurach pokazały, że leczenie skojarzone oparte na terapii mezenchymalnymi komórkami macierzystymi i stigmasterolem prowadzi do regeneracji chrząstki w kłykciu i rowku bloczka kości udowej (Sampath i in., 2021^a). Korzystne efekty obserwowano również w badaniach *in vitro* z zastosowaniem szczurzych chondrocytów z indukowanym stanem zapalnym. Obecność medium kondycjonowanego z hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych i dodatek

stigmasterolu spowodowały wyciszenie stanu zapalnego, czego dowodem było zmniejszenie ekspresji indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS) i interleukiny 6 (IL-6). Obserwowano również supresję ekspresji metaloproteinaz MMP-3 i MMP-13 oraz metaloproteinazy z motywem trombospondyny (ADAMTS-5), a także znaczący wzrost ekspresji kolagenu typu II (COL2A1). Zastosowanie stigmasterolu wraz z medium kondycjonowanym z hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych, zawierającym czynniki o działaniu regeneracyjnym i przeciwzapalnym, spowodowało prawie całkowite wyciszenie stanu zapalnego (Sampath i in, 2021^b).

Potencjał leczniczy stigmasterolu wykazano również w doświadczeniach na ludzkich i mysich chondrocytach aktywowanych do odpowiedzi zapalnej. Stigmasterol hamował ekspresję prozapalnej interleukiny IL-6 oraz metaloproteinaz macierzy (MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4) i dezintegryny A. Efektem była również zmniejszona produkcja prostaglandyny E2 (PGE₂), zaangażowanej w degradację chrząstki w chorobie zwyrodnieniowej stawów, wywołana przez hamowanie ekspresji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB (Gabay i in., 2010). Mechanizm działania stigmasterolu był analizowany w modelu mysich komórek chondrogennych ATDC5 indukowanych IL-1β. Stwierdzono, że stigmasterol nie wpływa na żywotność komórek, ale osłabia działanie induktora IL-1β i hamuje ich ferroptozę poprzez obniżenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego SREBPF2 (*sterol regulatory element-binding protein 2*) i wzmocnienie hamującego działania inhibitorów ferroptozy (Mo i in., 2021). W podsumowaniu badań, autorzy podkreślają, że stigmasterol charakteryzuje się wysokim potencjałem terapeutycznym w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów.

1.4.4. Aktywność przeciwzapalna

Stan zapalny towarzyszy wielu jednostkom chorobowym, w tym chorobom nowotworowym, chorobom sercowo-naczyniowym, otyłości i związanym z nią zaburzeniom metabolicznym (cukrzycy typu 2, dyslipidemii). Badania opublikowane w ostatnich latach wskazują na przeciwzapalny potencjał stigmasterolu, który analizowano na modelach imitujących stany zapalne o różnej etiologii. W modelu zwierzęcym z indukowanym reumatoidalnym zapaleniem stawów wykazano, że stigmasterol obniża ekspresję mediatorów prozapalnych (iNOS, IL-6, IL-1β, COX-2 i TNF-α) i wzmacnia ekspresję cytokiny przeciwzapalnej (IL-10) poprzez supresję ekspresji p38MAPK i NF-κBp65 w zmienionych chorobowo stawach. Efektem działania stigmasterolu było zmniejszenie uszkodzeń stawów i ograniczenie zmian histopatologicznych (Khan i in., 2020). Z kolei, w mysim modelu

zapalenia otrzewnej, związek ten zmniejszał naciek leukocytów oraz obrzęk łąp indukowany kwasem arachidonowym (Morgan i in., 2021). Działanie przeciwzapalne było obserwowane również w ostrym zapaleniu płuc indukowanym lipopolisacharydami z *E. coli* po zastosowaniu mieszaniny fitosteroli, w której stigmasterol stanowił jeden z kluczowych komponentów. Potencjał przeciwzapalny analizowano na mysich makrofagach RAW264.7 i w mysim modelu zwierzęcym. Stwierdzono, że stigmasterol aktywuje szlak sygnałowy LXRs/ABCA1 i zmienia aktywację szlaku TLR4/NF- κ B (He i in., 2022).

1.4.5. Działanie immunomodulujące

Poza aktywnością przeciwzapalną, stigmasterol wykazuje również zdolność do stymulowania komórek układu immunologicznego. Stwierdzono, że ekstrakt stigmasterolu otrzymany z owoców *Solanum xanthocarpum* niweluje immunosupresję indukowaną cyklofosfamidem. W modelu mysim, po podaniu ekstraktu obserwowano niespecyficzną odpowiedź immunologiczną, polepszenie parametrów hematologicznych i zwiększenie adhezji neutrofilii (Sultana i in., 2011; Khanam i Sultana, 2012). W innych badaniach udowodniono, że stigmasterol wpływa na komórki układu immunologicznego podczas alergii wywołanej albuminą jaja kurzego. Podawanie stigmasterolu w dawkach 10-100 mg/kg powodowało obniżenie proliferacji limfocytów, eozynofili i monocytów, a także zmniejszenie nacieku komórek zapalnych w okolicach naczyń, oskrzelików i pęcherzyków płucnych. Dodatkowo stigmasterol znacząco zmniejszał ekspresję białka VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) oraz obniżał poziomy immunoglobuliny IgE (Antwi i in., 2017).

W modelu mysim, stigmasterol i β -sitosterol wyizolowane z rośliny *Clinacanthus nutans* hamowały proliferację limfocytów T pomocniczych (Th) indukowaną konkanawaliną A bez wpływu na wydzielanie cytokiny: IL-2 i interferonu γ (IFN- γ). Stigmasterol, w przeciwieństwie do β -sitosterolu, nie blokował wydzielania cytokin przeciwzapalnych: IL-4 i IL-10. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że fitosterole wyizolowane z *Clinacanthus nutans* mają potencjalne działanie immunomodulujące (Le i in., 2017).

1.4.6. Działanie przeciwcukrzycowe

Potencjał prozdrowotny stigmasterolu był analizowany również w aspekcie działania przeciwcukrzycowego. Dane uzyskane w mysim modelu cukrzycy wskazują, że efektem podawania stigmasterolu w dawce 2,6 mg/kg m.c. przez 20 dni była redukcja stężenia glukozy

w surowicy oraz aktywności wątrobowej glukozy-6-fosfatazy przy jednoczesnym wzroście poziomu insuliny (Panda i in., 2009). W badaniach Poulouze i in. (2021) zanotowano znaczące obniżenie stężenia glukozy we krwi u szczurów traktowanych stigmasterolem wyizolowanym z wodorostów *Gelidium spinosum*. Wang i in. (2017) stwierdzili, że stigmasterol ekstrahowany z oleju sojowego wzmacnia translokację transportera glukozy GLUT4 i wychwyt glukozy w szczurzych mioblastach linii L6. Suplementacja myszy cukrzycowych stigmasterolem w dawkach 50 i 100 mg/kg m.c. przez 4 tygodnie wywołała zauważalny efekt hipoglikemiczny, polegający na zmniejszeniu stężenia glukozy we krwi na czczo, obniżeniu poziomu insuliny w surowicy, złagodzeniu oporności na insulinę i poprawieniu tolerancji glukozy. Ponadto, zauważono poprawienie wskaźników profilu lipidowego, w tym obniżenie stężenia cholesterolu i trójglicerydów we krwi (Wang i in. 2017). W badaniach na szczurach z cukrzycą indukowaną alloksanem, wykazano, że po 4-tygodniowej suplementacji stigmasterolem w stężeniach 100 i 200 mg/kg m.c. dochodzi do obniżenia poziomu glukozy we krwi na czczo i odwrócenia nieprawidłowości dotyczących zawartości białka, mocznika i kreatyniny w surowicy krwi/moczu. Również objawy cukrzycowe, takie jak polifagia, wielomocz, obecność glukozy w moczu i utrata masy ciała zostały złagodzone. Kolejnym efektem suplementacji było zwiększenie poziomu insuliny i hemoglobiny oraz obniżenie poziomu hemoglobiny glikowanej. Ponadto, zmienione aktywności enzymów uczestniczących w procesie glukoneogenezy (glukozy-6-fosfatazy, fruktozo-1,6-bisfosfatazy i dehydrogenazy mleczanowej) zostały unormowane. Dowodów na korzystne działanie stigmasterolu dostarczyły także analizy histologiczne, które wskazywały na regenerację komórek β trzustki (Ramu i in., 2016).

1.4.7. Działanie przeciwutleniające i neuroprotektoryjne

Dane publikowane w literaturze dowodzą, że fitosterole przechodzą przez barierę krew-mózg i mogą być w mózgu akumulowane. Wyniki badań wskazują na korzystne działanie stigmasterolu na komórki nerwowe i złagodzenie zaburzeń neurologicznych.

Burg i in. (2013) analizowali wpływ różnych steroli (cholesterolu, β -sitosterolu, kampesterolu, brassikasterolu i stigmasterolu) na powstawanie amyloidu- β w ludzkich komórkach nerwiaka zarodkowego SH-SY5Y i w mysim modelu *in vivo*. Amyloid- β jest głównym składnikiem płytek starczych w chorobie Alzheimera, tworzonym przez proteolityczną obróbkę białka prekursorowego amyloidu (APP) z udziałem enzymów: β - i γ -sekreazy. Na podstawie wyników badań stwierdzono, że fitosterole wykazują mniejszą

amyloidogenność niż cholesterol, a stigmasterol, jako jedyny z badanych fitosteroli, redukuje powstawanie amyloidu- β poprzez zmniejszenie aktywności β -sekretazy, obniżenie ekspresji czterech białek kompleksu heterotetramerycznego γ -sekretazy, ograniczenie dystrybucji cholesterolu i preseniliny w tratwach lipidowych związanych z rozszczepieniem amyloidogennego białka APP oraz zmniejszenie internalizacji β -sekretazy BACE 1 do kompartmentów endosomalnych (Burg i in., 2013).

Neuroprotekcyny potencjał stigmasterolu opisano również w modelu komórkowym SH-SY5Y. Jego działanie polegało na obniżeniu stresu oksydacyjnego indukującego w komórkach nerwowych proces apoptozy, związany z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych. Stwierdzono, że stigmasterol wpływa na utrzymanie prawidłowego poziomu RFT w komórkach SH-SY5Y i zapobiega inicjacji apoptozy indukowanej nadtlenkiem wodoru (H_2O_2). W komórkach traktowanych H_2O_2 i eksponowanych na stigmasterol, utrzymywany był stały poziom ekspresji białka anty-apoptotycznego BCL-2 i zwiększeniu ulegała ekspresja jądrowego czynnika transkrypcyjnego FOXO3a (*forkhead box O*) i katalazy. Stigmasterol wpływał również na regulację ekspresji sirtuiny 1 (SIRT1), znacząco obniżonej w komórkach indukowanych H_2O_2 . Efekty powodowane przez stigmasterol były porównywalne z efektami wywołanymi przez resweratrol, który jest znanym aktywatorem SIRT1 (Pratiwi i in., 2021).

W badaniach wskazuje się również na neuromodulacyjne działanie stigmasterolu polegające na stymulacji rozwoju neuronów ośrodkowego układu nerwowego oraz regulacji ekspresji genów zaangażowanych w neurytogenezę (*Map2*, *Dcx*, *Reln*) i synaptogenezę (*Arc*, *Egr1*, *Nr4a1*) w neuronach hipokampa (Haque i Moon, 2018). Ponadto, stigmasterol skutecznie zmniejszał deficyty neurologiczne i uszkodzenia mózgu u szczurów doświadczalnych wywołane urazem niedokrwiennym / reperfuzyjnym.; niwelował zmiany histopatologiczne i regulował działanie endogennej obrony antyoksydacyjnej (Sun i in., 2019).

1.4.8. Działanie przeciwdrobnoustrojowe

Stigmasterol wykazuje szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, hamuje wzrost bakterii Gram-ujemnych, Gram-dodatnich i grzybów. Działanie przeciwbakteryjne opisano w odniesieniu do *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae* oraz *Neisseria gonorrhoeae* (Dambatta i in, 2017) oraz szczepu *Staphylococcus aureus* opornego na metycylinę (Adnan i in., 2017). Aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazywał także ekstrakt heksanowy

z liści *ICACINA TRICHANTHA* zawierający oprócz stigmasterolu również β -sitosterol. Ekstrakt fitosteroli hamował wzrost bakterii *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* oraz grzybów *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium notatum* oraz *Candida albicans* (Alawode i in., 2021). Podobnie stigmasterol pozyskany z *Neocarya macrophylla* wykazywał działanie skierowane przeciwko bakteriom *Staphylococcus aureus* oraz *Staphylococcus aureus* opornym na antybiotyk metycylinę, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* oraz grzybom *Candida albicans* i *Candida krusei*. Natomiast nie był skuteczny w supresji enterokoków opornych na wankomycynę, *Salmonella typhimurium* oraz *Klebsiella pneumoniae* (Yusuf i in. 2018).

1.5. Produkty przemian termiczno-oksydacyjnych stigmasterolu

Przechowywanie i obróbka wysokotemperaturowa tłuszczów roślinnych, w tym smażenie, pieczenie, uwodornianie czy dezodoryzacja, istotnie wpływają na stabilność fitosteroli. Procesy te prowadzą do zmniejszenia zawartości fitosteroli w produktach oraz tworzenia pochodnych przemian termicznych i oksydacyjnych (Bai i in., 2021). Znacząca większość badań nad bioaktywnością fitosteroli, w tym również stigmasterolu, była prowadzona na związkach podstawowych - bez uwzględnienia produktów degradacji i pochodnych generowanych podczas obróbki wysokotemperaturowej i długoterminowego przechowywania. Badania pochodnych fitosteroli skupiają się przede wszystkim na ich identyfikacji i ilościowym oznaczeniu w produktach oraz określeniu poziomu cytotoksyczności. Alemany i in. (2012) stwierdzili brak cytotoksycznego działania 7-ketostigmasterolu (0 – 120 μ M) na komórki nabłonkowe Caco-2 pochodzące z nowotworu okrężnicy eksponowane przez 4 – 24 godzin. Ponadto, autorzy zasugerowali, że 7-ketostigmasterol może redukować toksyczność 7-keto-cholesterolu dla komórek nabłonka jelitowego (Alemany i in. 2012). O'Callaghan i in. (2010) poddali analizom szereg pochodnych stigmasterolu, w tym 5 α ,6 α -epoksystigmast-22-en-3 β -ol (α -epoksyd), 5 β ,6 β -epoksystigmast-22-en-3 β -ol (β -epoksyd), stigmasta-5,22-dien-7-on-3 β -ol (7-keto), stigmasta-5,22-dien-3 β ,7 β -diol (7 β -OH), 5,6-epoksystigmasta-22S,23S-diol (epoksydiol), 5,6,22,23-diepoksystigmastan (diepoksyd), (22R,23R)-stigmast-5-en-3 β ,22,23-triol (22R,23R-triol) oraz 5 α -stigmast-22-en-3 β ,5 α ,6 β -triol (3,5,6-triol). Do oznaczeń zastosowano linię komórkową U937 ludzkich monocytów. Najbardziej cytotoksyczne spośród badanych związków okazały się 7 β -OH, epoksydiol, diepoksyd oraz 22R,23R-triol. Stwierdzono, że 7 β -OH, epoksydiol oraz diepoksyd

indukują apoptozę oraz obniżają poziom ekspresji antyapoptotycznych białek Bcl-2 (O'Callaghan i in., 2010). Badania utlenionych pochodnych stigmasterolu były również prowadzone *in vivo* na modelu zwierzęcym. Wykazano, że chomiki karmione paszą z dodatkiem utlenionych pochodnych stigmasterolu i β -sitosterolu utraciły zdolność do obniżania poziomu cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL i triacylogliceroli w porównaniu z grupą kontrolną (Liang i in., 2011). W innych badaniach udowodniono cytotoksyczne działanie produktów przemian termiczno-oksydacyjnych estrów stigmasterolu z kwasem oleinowym, linolowym i linolenowym na ludzkie komórki białaczki limfoblastycznej linii CCRF-CEM i CCRF-VCR1000. Najsilniejsze działanie zaobserwowano w przypadku oleinianu stigmasterolu ogrzewanego w 180 °C przez 4 godziny i dłużej. Pochodną oleinianu stigmasterolu, która determinowała cytotoksyczność był prawdopodobnie α -epoksytystigmasterol, który został zidentyfikowany wyłącznie w produktach oksydacji tego estru (Raczyk i in., 2018).

Nieliczne doniesienia naukowe dokumentują cytotoksyczne działanie pochodnych stigmasterolu powstających podczas procesów termicznych i oksydacyjnych. Biorąc pod uwagę wysoką aktywność biologiczną stigmasterolu oraz jego potencjał prozdrowotny w prewencji i terapii wielu schorzeń, ważnym zagadnieniem jest opracowanie związków stigmasterolu bezpiecznych dla zdrowia o korzystnych właściwościach technologicznych i wysokiej stabilności podczas przechowywania i przetwarzania. Dlatego potrzebne są szeroko zakrojone badania ukierunkowane na konstruowanie nowych związków stigmasterolu, identyfikację powstających produktów degradacji i oksypochodnych, obejmujące analizy biodostępności, bioaktywności i bezpieczeństwa toksykologicznego.

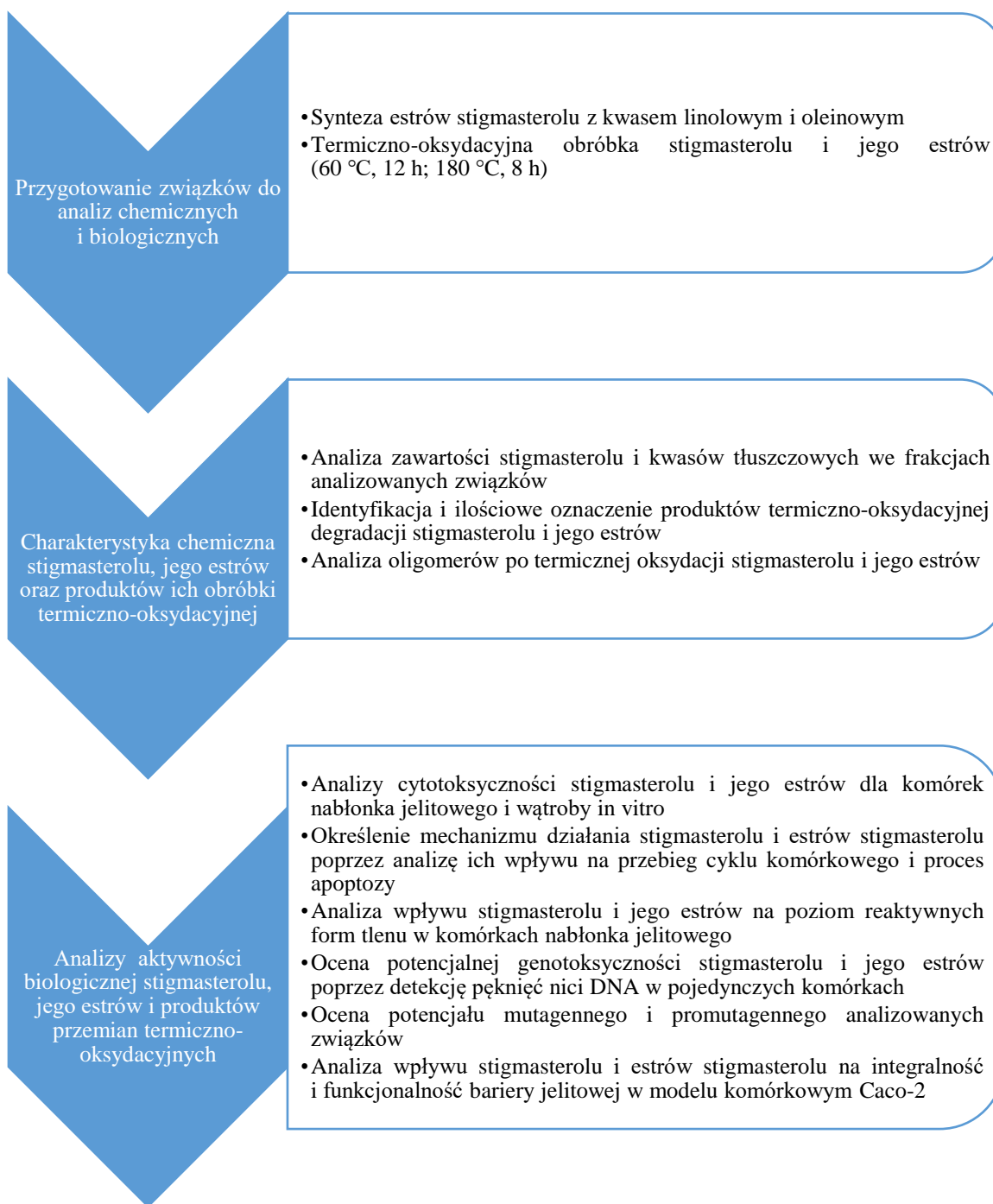
2. Cel pracy i zakres badań

Celem głównym pracy była identyfikacja produktów termiczno-oksydacyjnych przemian stigmasterolu i jego estrów oraz analiza ich cytotoksyczności, genotoksyczności i mutagenności.

Cele szczegółowe:

1. Synteza estrów stigmasterolu z kwasem linolowym i oleinowym oraz ich obróbka termiczna (60 °C i 180 °C) w warunkach tlenowych.
2. Charakterystyka chemiczna stigmasterolu, linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu oraz identyfikacja produktów przemian termiczno-oksydacyjnych tych związków.
3. Analiza cytotoksyczności i genotoksyczności stigmasterolu, linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu oraz produktów ich termiczno-oksydacyjnych przemian w odniesieniu do ludzkich prawidłowych komórek nabłonka jelitowego i wątroby.
4. Ocena wpływu stigmasterolu, jego estrów i produktów ich przemian termiczno-oksydacyjnych na integralność i funkcjonalność nabłonka jelitowego *in vitro*.
5. Analiza aktywności mutagennej i promutagennej stigmasterolu, jego estrów i produktów powstających podczas obróbki termiczno-oksydacyjnej.

Schemat badań wykonanych dla realizacji celów pracy przedstawiono na rycinie 3.



Rycina 3. Schemat badań

Hipotezy badawcze:

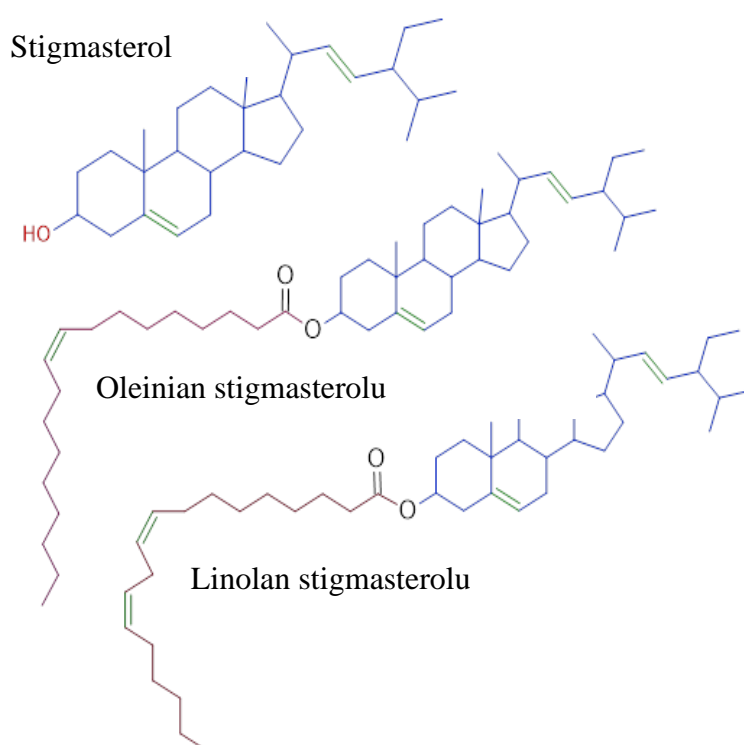
1. Warunki obróbki termiczno-oksydacyjnej stigmasterolu oraz estrów stigmasterolu z kwasem linolowym i oleinowym wpływają na generowanie produktów degradacji i oksypochodnych.
2. Estryfikacja stigmasterolu z kwasem linolowym lub kwasem oleinowym zwiększa jego stabilność termiczną i oksydacyjną oraz ogranicza tworzenie oksypochodnych stigmasterolu.
3. Stopień nienasycenia łańcucha węglowego kwasu tłuszczowego wpływa na ilość produktów generowanych podczas obróbki termiczno-oksydacyjnej linolanu i oleinianu stigmasterolu.
4. Estry stigmasterolu (linolan i oleinian stigmasterolu) i produkty ich przemian termiczno-oksydacyjnych w mniejszym stopniu oddziałują na komórki układu pokarmowego niż wolny stigmasterol i jego pochodne produkowane podczas ogrzewania.
5. Stopień nienasycenia łańcucha węglowego kwasu tłuszczowego wpływa na reaktywność biologiczną i oksydacyjną estrów stigmasterolu i produktów tworzonych podczas ich obróbki termiczno-oksydacyjnej
6. Stigmasterol, estry stigmasterolu i produkty generowane podczas przemian termiczno-oksydacyjnych mogą wpływać na integralność i funkcjonalność bariery jelitowej.

3. Materiały i metodyka badań

3.1. Analizowane związki

- stigmasterol ($C_{29}H_{48}O$, stigmasta-5,22-dien-3-ol)
- linolan stigmasterolu
- oleinian stigmasterolu

Stigmasterol i jego estry były poddawane obróbce termicznej w temperaturze 60 °C przez 12 godzin lub w temperaturze 180 °C przez 8 godzin w warunkach tlenowych. Struktury chemiczne analizowanych związków przedstawiono na rycinie 4.



Rycina 4. Struktura analizowanych związków: stigmasterolu oraz jego estrów z kwasem oleinowym i linolowym

3.2. Otrzymywanie estrów stigmasterolu na drodze estryfikacji chemicznej

Oleinian oraz linolan stigmasterolu otrzymano na drodze chemicznej estryfikacji zgodnie z metodą Neisesa i Steglich (1978). W pierwszym etapie, stigmasterol (Sigma Aldrich) w ilości 500 mg rozpuszczono w dichlorometanie w objętości 30 ml i umieszczono w kolbie trójszyjnej. Powietrze wypełniające kolbę zastępowano azotem. Następnie do kolby wprowadzano katalizatory reakcji: 500 mg DCC (N,N'- Dicykloheksylokarbodiimid; Sigma-

Aldrich) i 15 mg DMAP (4-Dimetyloaminopirydyna; Sigma-Aldrich) oraz 600 mg odpowiedniego kwasu tłuszczowego (oleinowego lub linolowego) (Sigma Aldrich). Estryfikację prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny bez dostępu światła, po czym mieszaninę reakcyjną umieszczano w rozdzielaczu i dodawano do niej 10 ml wody destylowanej. Po wymieszaniu i rozdzieleniu się faz zbierano dolną warstwę tłuszczową. Procedurę powtarzano trzykrotnie. Z uzyskanej frakcji tłuszczowej odparowywano rozpuszczalnik w temperaturze 30 °C w wyparce rotacyjnej Laborote 4000 (Heidolph, Schwabach, Niemcy), a pozostałość rozpuszczano w 20 ml heksanu. Mieszaninę oczyszczano na kolumnie chromatograficznej (45×2,5 cm) wypełnionej żelem krzemionkowym (Sigma Aldrich). Związki były wymywane z kolumny przy pomocy mieszaniny heksan:diocetan etylu (9:1, v/v) o objętości 450 ml. Czystość uzyskanych frakcji była oznaczana przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej TLC.

3.3. Ogrzewanie badanych związków

Stigmasterol i jego estry rozporcjowano po ok. 50 mg do szklanych fiolek, które wypełniano tlenem i umieszczano w suszarce laboratoryjnej, gdzie prowadzono proces obróbki termicznej związków, poprzez ich ogrzewanie w temperaturze 60 °C przez 12 godzin lub w temperaturze 180 °C przez 8 godzin przy dostępie tlenu. Próby po ogrzewaniu przechowywano w temperaturze -18 °C.

3.4. Analiza zawartości stigmasterolu w analizowanych związkach

Zawartość stigmasterolu w badanych próbach określano z wykorzystaniem metodyki AOCS Official Method Ch 6-91(1997). W pierwszym etapie analizy prowadzono reakcję zmydlania (0,2 mg estru zmydlano z 1M KOH w metanolu) w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie do mieszaniny dodawano wodę destylowaną i ekstrahowano niezmydlone składniki za pomocą mieszaniny heksan:eter metylo-tert-butyłowy w stosunku 1:1 (v/v). Rozpuszczalnik odparowano pod strumieniem azotu. Pozostałość rozpuszczano w 100 µl pirydyny (Sigma-Aldrich) i silylowano za pomocą 400 µl odczynnika BSTFA (N,O-Bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid) z dodatkiem 1% TMCS (Trimetylochlorosilan) (Fluka Chemie).

Próby rozdzielano na chromatografii gazowej Hewlett Packard 6890 wyposażonym w kolumnę kapilarną DB-35MS (25 m×0,20 mm; 0,33 µm; J&W Scientific). Próbki

nastrzykiwano bez podziału strumienia. Kolumna pracowała w programie temperatur od 160 °C (5 minut) przez 250 °C (1 minuta) z szybkością zmiany 25 °C/min do temperatury 290 °C z szybkością zmiany 3 °C/min. Temperaturę końcową kolumny (290 °C) utrzymywano przez 20 minut. Temperatura detektora wynosiła 300 °C. Jako gaz nośny zastosowano wodór przy szybkości przepływu na poziomie 1,5 ml/min. Jako standard wewnętrzny zastosowano 5 α -cholestan (Sigma-Aldrich).

3.5. Analiza zawartości kwasów tłuszczowych w badanych związkach

Zawartość kwasów tłuszczowych określano za pomocą metody AOCS Official Method Ce 1 k-07 (2007). W pierwszym etapie badane estry w ilości 100 μ g umieszczano w szklanych fiolkach i hydrolizowano przy pomocy 0,5 M KOH w metanolu. Następnie kwasy tłuszczowe metylowano z katalizatorem - 14% trifluorkiem boru (Sigma-Aldrich) w metanolu.

Uzyskane estry metylowe kwasów tłuszczowych analizowano na chromatografie gazowym Hewlett Packard 5890 Series II wyposażonym w kolumnę kapilarną Supelcowax 10 (30 m \times 0,25 mm; 0,25 μ m; Supelco). Próbkę nastrzykiwano bez podziału strumienia. Temperatura iniektora oraz detektora wynosiła 240 °C. Temperaturę kolumny utrzymywano na stałym poziomie równym 210 °C. Jako gaz nośny zastosowano wodór przy szybkości przepływu 1 ml/min. Jako standard wewnętrzny zastosowano heptadekanianal metylu.

3.6. Analiza produktów degradacji stigmasterolu i jego estrów

Oznaczanie produktów degradacji stigmasterolu i jego estrów przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Raczyk i in. (2017). W pierwszym etapie mieszaninę zawierającą ester stigmasterolu lub stigmasterol (100 μ g), 19-hydroksycholesterol (Steraloids) (20 μ g) jako standard wewnętrzny oraz 10% metanolan sodu w metanolu (2 ml) umieszczano w fiole i poddawano intensywnemu mieszaniu na wortexie. Frakcję zawierającą oksyfitosterole ekstrahowano za pomocą chloroformu, po czym odparowywano rozpuszczalnik pod strumieniem azotu. Pozostałość zawieszano w 250 μ l chloroformu i frakcjonowano za pomocą kolumn SEP-PAK NH₂ (Waters). Frakcję oksyfitosteroli wymywano acetonem, a następnie rozpuszczalnik odparowywano pod strumieniem azotu. Pozostałość poddawano derywatyzacji za pomocą odczynnika BSTFA oraz 1% TCMS (Fluka Chemie).

Derywaty analizowano na chromatografie gazowym Hewlett Packard 6890 wyposażonym w kolumnę DB-5MS (30 m \times 0,25 mm; 0,25 μ m; J&W Scientific). Próbkę

nastrzykiwano bez podziału strumienia. Kolumna pracowała w programie temperatur od 160 °C (1 minuta) przez 270 °C (1 minuta) z szybkością zmiany 40 °C/min do temperatury 280 °C z szybkością zmiany 4 °C/min. Temperaturę końcową kolumny (280 °C) utrzymywano przez 25 minut. Temperatura iniektora oraz detektora wynosiła 300 °C. Jako gaz nośny zastosowano wodór przy szybkości przepływu na poziomie 1 ml/min.

3.7. Analiza oligomerów po obróbce termiczno-oksydacyjnej stigmasterolu i jego estrów

Oligomery powstające w wyniku ogrzewania stigmasterolu i jego estrów rozdzielono na frakcję polarną i frakcję niepolarną według metody opisanej przez Kmiecik i in. (2018). Ogrzewane związki rozpuszczano w toluenie i наносzono na kolumnę z żelem krzemionkowym. Frakcję niepolarną wmywano za pomocą mieszaniny heksanu i eteru diizopropylowego (82:18, v/v), a następnie frakcję polarną wmywano za pomocą eteru diizopropylowego.

Czystość obu frakcji sprawdzano za pomocą chromatografii TLC. Płytkę z żelem krzemionkowym rozwijano za pomocą mieszaniny heksan : eter diizopropylowy (82:18, v/v), spryskiwano mieszaniną siarczanu miedzi, kwasu fosforowego i metanolu (Sigma-Aldrich), a następnie ogrzewano w temperaturze 120 °C.

Skład oligomerów oznaczano metodą chromatografii cieczowej HPLC/SEC-ELSD na dwóch połączonych szeregowo kolumnach Phenogel (100Å i 500Å, 5 µl, 300 × 7,8 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Temperatura kolumny oraz detektora światła rozproszonego wynosiła 30 °C, ciśnienie detektora wynosiło 2,5 bara. Nastrzykiwano próbę o objętości 1 µl. Fazę ciekłą stanowił dichlorometan o szybkości przepływu 1 ml/min.

3.8. Analizy cytotoksyczności stigmasterolu i jego estrów dla komórek układu pokarmowego *in vitro*

3.8.1. Linie komórkowe

W badaniach zastosowano następujące linie komórkowe:

- Ludzkie prawidłowe komórki nabłonka jelita cienkiego linii FHs 74 Int (ATCC®CCL-241™)
- Ludzkie prawidłowe komórki nabłonka jelita grubego linii CCD 841 CoN (ATCC®CRL-1790™)

- Ludzkie prawidłowe komórki wątroby linii THLE-2 (ATCC[®]CRL-2706[™])
- Ludzkie komórki nabłonka okrężnicy linii Caco-2 (ATCC[®]HTB-37[™])

Wszystkie linie komórkowe stosowane w badaniach pozyskano z kolekcji ATCC (*American Type Culture Collection, Manassas, Wirginia, USA*).

3.8.2. Warunki hodowli komórek

Hodowle komórek prowadzono zgodnie z procedurą rekomendowaną przez kolekcję ATCC, z której zostały pozyskane.

Komórki nabłonka jelita cienkiego linii FHs 74 Int hodowano w pożywce Hybri-Care Medium ATCC 46-X (ATCC) z dodatkiem naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*, Sigma-Aldrich) w ilości 30 ng/ml i 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS, *foetal bovine serum*) (Gibco, Thermo Fisher Scientific Polska).

Do hodowli komórek nabłonka jelita grubego linii CCD 841 CoN stosowano pożywkę EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*, ATCC 30-2003) suplementowaną 10% FBS.

Komórki wątroby linii THLE-2 hodowano w pożywce BEGM[™] (*Bronchial Epithelial Cell Growth Medium*, Lonza Clonetics®, Walkersville, USA) wzbogaconej w czynniki zawarte w zestawie do hodowli BEGM Bullet Kit (Lonza), w dodatkową porcję EGF (5 ng/ml), fosfoetanolaminę (70 ng/ml) i 10% FBS. Hodowle komórek wątroby prowadzono w naczyniach o powierzchni wzrostu opłaszczonych macierzą zawierającą fibronektynę (0,01 mg/ml), kolagen typu I (0,03 mg/ml) i albuminę bydlęcą (0,01 mg/ml). Elementy składowe żelu były rozpuszczane w pożywce BEGM[™].

Hodowle ludzkich komórek linii Caco-2 prowadzono w pożywce DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich) suplementowanej 1% mieszaniną niezbędnych aminokwasów (MEM Non-essential Amino Acid Solution, 100x, Sigma-Aldrich) i 10% FBS.

Podczas rutynowych hodowli do kultur komórkowych dodawano gentamycynę w stężeniu 50 mg/l. Wszystkie komórki stosowane w badaniach były hodowane w temperaturze 37 °C, w atmosferze gazowej zawierającej 95% powietrza i 5% CO₂. Z uwagi na to, że komórki wykazywały wzrost typu adherentnego (przylegającego), do uwalniania komórek od powierzchni naczynia hodowlanego stosowano roztwór trypsyno-wersenu (Sigma-Aldrich). Po uwolnieniu komórek trypsynę inaktywowano za pomocą pożywki z dodatkiem FBS. Wyjątek stanowiła inaktywacja trypsyny podczas pasażowania komórek linii THLE-2, do której zastosowano sojowy inhibitor trypsyny (Gibco).

3.8.3. Testy cytotoksyczności

Analiza cytotoksyczności stigmasterolu, jego estrów i produktów termiczno – oksydacyjnej degradacji tych związków przeprowadzana była przy pomocy dwóch testów: testu MTT (Sigma-Aldrich) oraz testu *MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay* (MT-FMC) (Promega). Dodatkowo wpływ związków na komórki linii CCD 841 CoN analizowano za pomocą testu BrdU (bromodeoksyurydyna).

Test MTT oparty jest na oznaczeniu aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej - enzymu obecnego w żywych, aktywnych metabolicznie komórkach. Przekształca on rozpuszczalną w wodzie sól tetrazolową o kolorze żółtym (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazolowy) w formę zredukowaną - nierozpuszczalny w wodzie formazan o barwie fioletowej, gromadzony w komórkach w postaci kryształów. Po ekstrakcji i rozpuszczeniu kryształów formazanu w izopropanolu powstaje barwny roztwór, którego intensywność zabarwienia mierzona jest spektrofotometrycznie. Intensywność barwy roztworu jest wprost proporcjonalna do ilości powstałego produktu i pośrednio do liczby żywych, aktywnych metabolicznie komórek.

W skojarzonym teście MT-FMC aktywność proteaz komórek żywych mierzona jest za pomocą fluorogenicznego substratu peptydowego GF-aminofluorokumaryny (*glycyl-phenylalanyl-aminofluorocoumarin*). Po wniknięciu substratu do komórki jest on rozszczepiany przez proteazy zawarte w żywej komórce z uwolnieniem aminofluorokumaryny i emisją sygnału fluorescencyjnego, proporcjonalnego do ilości żywych komórek. Drugi substrat peptydowy bis-AAF-R110 (*bis-alanyl-alanyl-phenylalanyl-rhodamine 110*) służy do pomiaru aktywności proteazy uwolnionej z komórek w wyniku utraty integralności błon komórkowych. Substrat ten nie wnika do komórek z nienaruszoną błoną komórkową. Uwolniony produkt oznaczany jest poprzez pomiar fluorescencji wytworzonej przez rodaminę 110 zawartą w odczynniku dołączonym do zestawu.

BrdU jest syntetycznym analogiem nukleozydu tymidyny, który wbudowuje się do nowopowstającego DNA podczas replikacji w fazie syntezy cyklu komórkowego. Detekcja wbudowanych cząsteczek BrdU jest możliwa dzięki zastosowaniu specyficznego przeciwciała skierowanego przeciw BrdU sprzężonego z enzymem. Reakcja enzymu z chromogennym substratem pozwala na kolorymetryczną analizę syntezy DNA i zdolności komórek do proliferacji w obecności analizowanych związków.

W pierwszym etapie analiz hodowle komórek zakładano na płytkach 96-dołkowych transparentnych (test MTT) lub białych, rekomendowanych do pomiaru fluorescencji (test

MT-FMC) przy zastosowaniu inokulum 2×10^4 komórek/cm². Hodowle inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37 °C przy 5% CO₂. Analizowane związki rozpuszczano i rozcieńczano w acetonie w celu uzyskania odpowiednich stężeń. Następnie przygotowane związki rozcieńczano w pożywkach w celu uzyskania stężeń: 1,25; 2,5; 5; 10; 20 i 40 µg/ml, przy zachowaniu stałego stężenia rozpuszczalnika w hodowli. Analizowane związki wprowadzano do 24-godzinnych kultur komórkowych i ekspozowano komórki przez kolejne 72 godziny w standardowych warunkach hodowli. W każdej analizie przygotowano hodowlę kontrolną, w której komórki były ekspozowane na rozpuszczalnik, w stężeniu analogicznym jak w próbach właściwych. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w co najmniej trzech powtórzeniach.

Na podstawie wyników testu MTT wykreślono krzywe opisujące zależność żywotności komórek od stężenia badanych związków oraz na podstawie modelu matematycznego obliczono dawki cytotoksyczne EC (*effective concentration*), w tym: pierwszą dawkę toksyczną (EC₁₀), właściwą dawkę toksyczną (EC₅₀) i dawkę letalną (EC₉₀), określające stężenie stigmasterolu i jego estrów powodujące odpowiednio: 10-, 50- i 90-procentowe ograniczenie proliferacji i żywotności komórek.

3.8.3.1. Test MTT

Po 72 godzinach inkubacji komórek z analizowanymi związkami, do hodowli komórek wprowadzono odczynnik MTT przygotowany w DMEM bez czerwieni fenolowej w stężeniu końcowym 0,5 mg/ml. Komórki inkubowano z MTT przez 3 godziny w standardowych warunkach hodowli (37 °C, 5% CO₂). Po inkubacji powstały formazan ekstrahowano z komórek izopropanolem. Ekstrakcję prowadzono na kołysce laboratoryjnej z mieszaniem przez 20 minut. Formazan oznaczano spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji przy długości fali właściwej $\lambda = 570$ nm i referencyjnej $\lambda = 690$ nm. Pomiar wykonano przy użyciu czytnika mikropłytek TECAN Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland).

3.8.3.2. Test skojarzony MT-FMC

Po 72 godzinach inkubacji komórek z pochodnymi stigmasterolu przeprowadzono analizę cytotoksyczności przy pomocy testu MT-FMC. Analizę wykonano zgodnie z instrukcją zalecaną przez producenta. Fluorescencję mierzono z wykorzystaniem czytnika mikropłytek TECAN Infinite M200 przy długościach fali: wzbudzenia $\lambda = 400$ nm, emisji $\lambda = 505$ nm

dla pomiaru ilości żywych komórek oraz wzbudzenia $\lambda = 485$ nm, emisji $\lambda = 520$ nm dla pomiaru ilości komórek martwych.

3.8.3.3. Test BrdU

Komórki śluzówki jelita grubego linii CCD 841 CoN były wysiewane na płytki 96-dołkowe w stężeniu $0,2 \times 10^5$ komórek/cm². Po 24-godzinnej preinkubacji, do hodowli wprowadzano analizowane związki oraz BrdU i ekspozycję komórek przez 24 godziny w standardowych warunkach hodowli. Do ilościowego oznaczenia syntezy DNA w komórkach CCD 841 CoN ekspozycję na stigmasterol i jego pochodne zastosowano zestaw *Cell Proliferation ELISA kit* firmy Roche Diagnostics GmbH (Niemcy). Analizę wykonano zgodnie z zaleceniami producenta.

3.9. Oznaczanie genotoksyczności

Pęknięcia nici DNA indukowane przez stigmasterol, jego estry i produkty ich degradacji były wykrywane przy zastosowaniu elektroforezy pojedynczych komórek SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis*), powszechnie nazywanej testem kometowym. Technika ta służy do analizy stopnia uszkodzeń DNA, które zostały wywołane w komórce czynnikami chemicznymi (np. mutagenami, stresem oksydacyjnym) lub fizycznymi (np. promieniowaniem jonizującym i UV). Metoda polega na unieruchomieniu analizowanych komórek w agarozie na szkiełkach mikroskopowych, poddaniu ich lizie i przeprowadzeniu elektroforezy. Po elektroforezie komórkowy DNA wybarwia się barwnikiem fluorescencyjnym lub solami srebra, po czym analizuje pod mikroskopem.

W analizie kometowej zastosowano komórki linii CCD 841 CoN, które posiano na płytce 6-dołkowej przy inokulum 2×10^4 komórek/cm². Płytki inkubowano w temperaturze 37 °C w atmosferze 5% CO₂. Po 24-godzinnej preinkubacji, do hodowli wprowadzono analizowane związki w stężeniach: 5, 10, 20 i 40 µg/ml. Oprócz prób właściwych, w analizie uwzględniono również dwie próby kontrolne: kontrolę negatywną (i), w której komórki były ekspozycję na aceton stosowany jako rozpuszczalnik oraz kontrolę pozytywną (ii), w której komórki traktowano przez 30 minut 100 µM nadtlenkiem wodoru (H₂O₂) w celu indukcji uszkodzeń DNA. Po 48-godzinnej ekspozycji na analizowane związki komórki uwalniano z powierzchni za pomocą roztworu trypsyny i dwukrotnie przemywano zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (DPBS – Dulbecco's *phosphate buffered saline*), a następnie

rozcieńczano DPBS do gęstości 10^6 komórek/ml. Do analizy pobierano 80 μ l próby, którą wprowadzano do 150 μ l płynnej 0,5% agarozy o niskiej temperaturze topnienia (Sigma-Aldrich). Następnie komórki zawieszono w płynnej agarozie nakładano w ilości 60 μ l na wcześniej przygotowane szkiełka podstawowe pokryte 1% agarozą o normalnej temperaturze topnienia (Sigma-Aldrich). Szkiełka podstawowe z nałożonymi komórkami przykrywano szkiełkami nakrywkowymi i chłodzono przez 10 minut w temperaturze 4 °C. Po schłodzeniu szkiełka nakrywkowe delikatnie zsuwano, a szkiełka podstawowe umieszczano w buforze lizującym (2,5 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100; pH = 10) w temperaturze 4 °C na 60 minut. Po procesie lizy, szkiełka trzykrotnie przemywano zimną wodą destylowaną i umieszczano w aparacie do elektroforezy (Zestaw Kometa-DNA, Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne). Następnie, szkiełka zalewano zimnym buforem do elektroforezy (300 mM NaOH, 1 mM EDTA; pH > 13) i inkubowano przez 30 minut. W czasie inkubacji zachodziło rozluźnienie struktury i denaturacja alkaliczna DNA. Następnie prowadzono elektroforezę przy napięciu 0,75 V/cm, w temperaturze 4 °C przez 30 min. Podczas elektroforezy zachodziła migracja fragmentów uszkodzonego DNA z jądra komórki w kierunku anody, dzięki czemu formowany był charakterystyczny ogon komety. Po zakończeniu elektroforezy szkiełka przedmiotowe przemywano trzykrotnie wodą destylowaną i umieszczano na 10 minut w zimnym buforze neutralizującym (0,4 M TRIS-HCl; pH = 7,5). Następnie szkiełka przemywano trzykrotnie wodą destylowaną, osuszano i utrwalano przez 5 minut w 70% etanolu. Utrwalone szkiełka przechowywano w eksykatorze do momentu analizy mikroskopowej.

Preparaty wybarwiano barwnikiem SYBR-Gold (Molecular Probes™) i oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym AXIOVERT 200 (Zeiss). Wyniki analizowano przy użyciu programu komputerowego CometScore™, oceniając po 80-100 komórek na szkiełku przedmiotowym, przy czym z każdej hodowli przygotowano 3 preparaty. Poziom uszkodzeń DNA wyrażano jako procentową zawartość DNA w ogonach komet. Ponadto, w zależności od zawartości DNA w ogonach komet, komety klasyfikowano do pięciu kategorii, obejmujących klasę 0 (< 1%, brak uszkodzeń), klasę 1 (1–25%; niewielkie uszkodzenia), klasę 2 (> 25–45%; średnie uszkodzenia), klasę 3 (> 45–70%; duże uszkodzenia), klasę 4 (> 70%; bardzo duże uszkodzenia). Na podstawie kategoryzacji komet obliczono parametr TCS (*Total comet score*) według następującego wzoru:

$$\text{TCS} = 0(n) + 1(n) + 2(n) + 3(n) + 4(n) \text{ (Collins i in. 2008)}$$

gdzie „n” oznacza liczbę komórek w każdej klasie komet (0–4)

3.10. Analiza potencjału mutagennego i promutagennego

Do analizy potencjału mutagennego i promutagennego badanych związków zastosowano bakteryjny test Ames. Określa on poziom mutacji powrotnych z histydynowej auksotrofii do prototrofii w specjalnie skonstruowanych mutantach bakterii *Salmonella typhimurium*. Zasada działania testu Ames polega na wykryciu mutacji, które odwracają mutacje obecne w testowanych szczepach i przywracają funkcjonalną zdolność bakterii do syntezy niezbędnej dla nich histydyny. Efektem rewersji mutacji jest wzrost komórek w pożywce z niewielkim dodatkiem tego aminokwasu (Maron i Ames, 1983).

3.10.1. Zmutowane szczepy bakterii

W badaniach zastosowano pięć zmutowanych szczepów bakterii *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *typhimurium*. Trzy szczepy bakterii: PCM 2179 / TA98, PCM 2180 / TA100 i PCM 2182 / TA1537 pozyskano z Polskiej Kolekcji Drobnoustrojów, znajdującej się w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, zarejestrowanej w Światowej Federacji Kolekcji Drobnoustrojów (WFCC, nr 106) oraz w Europejskiej Organizacji Kolekcji Drobnoustrojów (ECCO). Jeden szczep bakterii *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *typhimurium* oznaczony jako LT2 TA102 (ARCC® AA2722™) pozyskano z kolekcji ATCC (USA). Charakterystykę stosowanych szczepów bakterii przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Charakterystyka szczepów *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *typhimurium* zastosowanych w teście Ames (Sugiyama i in., 2016).

Szczep	Mutacje	Plazmidy
<i>S. typhimurium</i> TA98	<i>hisD3052 rfa Δ(gal chl bio uvrB)</i>	pKM101
<i>S. typhimurium</i> TA100	<i>hisG46 rfa Δ(gal chl bio uvrB)</i>	pKM101
<i>S. typhimurium</i> TA102	<i>hisG428 rfa galE hisΔ(G)8476</i>	pKM101, pAQ1
<i>S. typhimurium</i> TA1537	<i>hisC3076 rfa Δ(gal chl bio uvrB)</i>	brak

Wszystkie stosowane szczepy są nosicielami mutacji *rfa* powodującej częściową utratę bariery lipopolisacharydowej, pokrywającej powierzchnię bakterii, zwiększając przepuszczalność dla dużych cząsteczek, które nie przenikają przez normalną ścianę

komórkową. Poszczególne szczepy testowe różnią się od siebie mutacjami w operonie histydynowym: hisD3052 (szczep TA98), hisG46 (szczep TA100), hisG428 (szczep TA102) oraz hisC3076 (szczep TA1537). Dodatkowo, szczepy TA98, TA100 oraz TA1537 mają mutację polegającą na delecji genu *uvrB*, związanego z systemem naprawy DNA, co skutkuje znacznie zwiększoną czułością w wykrywaniu wielu mutagenów. Delecja wycinająca gen *uvrB* rozciąga się na gen reduktazy azotanowej *chl* oraz gen *gal* sprawiający, że szczepy testowe są niepatogenne, a także gen *bio*, w wyniku czego bakterie do wzrostu potrzebują biotyny. Szczepy testowe TA98, TA100 i TA102 zawierają plazmid czynnika R (pKM101), zawierający gen *mucAB*, który zawiera gen oporności na ampicylinę oraz warunkuje mutagenezę zależną od systemu błędnej naprawy DNA. Mutacje w tych szczepach są odwracane przez szereg mutagenów, które nie są wykrywane lub są słabo wykrywane przez szczepy rodzicielskie bez czynnika R. Szczep TA102 oprócz plazmidu pKM101 zawiera również wielokopiowy plazmid pAQ1, który przenosi mutację hisG428 i gen oporności na tetracyklinę. Dodatkowo szczep ten zawiera mutację w genie *galE* (Ames i in., 1973; Maron i Ames, 1983; Sugiyama i in., 2016). W doświadczeniach oprócz aktywności mutagennej określono również aktywność promutagenną badanych związków, poprzez ich aktywację metaboliczną w obecności frakcji mikrosomalnej wątroby szczura po indukcji za pomocą Aroclor 1254.

3.10.2. Analiza właściwości mutagennych i promutagennych

Oznaczenia właściwości mutagennych i promutagennych badanych związków przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez Marona i Ames (1983), po wprowadzeniu modyfikacji własnych.

Mieszaniny reakcyjne przygotowane do analiz w teście Ames zawierały następujące składniki:

- zawiesinę bakterii *Salmonella typhimurium* pochodzącą z 16-godzinnej hodowli prowadzonej w bulionie wzbogaconym glukozą w temperaturze 37 °C
- analizowane związki: stigmasterol, linolan stigmasterolu i oleinian stigmasterolu w trzech formach jako: nie poddawane ogrzewaniu (i), ogrzewane w temperaturze 60 °C przez 12 godzin (ii) oraz 180 °C przez 8 godzin (iii). Wszystkie związki były analizowane w trzech stężeniach: 10, 20 i 40 µg/ml. Kontrolę negatywną stanowiła próba z dodatkiem acetonu, który był stosowany jako rozpuszczalnik analizowanych związków.
- mutagen wzorcowy w próbach stanowiących kontrolę pozytywną. Mutageny wzorcowe zastosowano w dawkach optymalnych dla indukcji mutacji w poszczególnych szczepach bakterii, jak przedstawiono w tabeli 4

- roztwór stymulujący przemiany metaboliczne związków, zawierający wątrobową frakcję mikrosomalną pochodzenia szczurzego S9 (Sigma-Aldrich) w ilości 20 μ l, 6 mM glukozo-6-fosforan (Sigma-Aldrich), 4 mM NADP (Sigma-Aldrich), roztwór soli potasu i magnezu (1,65 M KCl, 0,4 M MgCl₂) oraz 0,2 M PBS; objętość całkowita roztworu aktywacyjnego wynosiła 0,5 ml
- PBS w ilości uzupełniającej objętość końcową mieszaniny reakcyjnej do 1 ml

Skład ilościowy mieszanin reakcyjnych stosowanych w teście Ames został podany w tabeli 5.

Przygotowane mieszaniny reakcyjne poddawano pre-inkubacji w łaźni wodnej w temperaturze 37 °C przez 20 minut. Po inkubacji mieszaninę reakcyjną wprowadzano do 3 ml upłynnionego agaru powierzchniowego o temperaturze 48 °C z dodatkiem 300 μ l roztworu zawierającego biotynę (0,01%) i histydynę (0,01%). Całość wylewano na płytki Petriego z zestalonym podłożem agarowym zawierającym sole mineralne Vogel-Bonnera i glukozę (10%). Płytki po wykonaniu posiewu inkubowano w temperaturze 37 °C przez 48 godzin, po czym liczone wyrosłe kolonie. Każdą analizę wykonano w co najmniej 3 powtórzeniach.

Tabela 4. Mutageny wzorcowe stanowiące kontrolę pozytywną w analizach mutagenności. Dawki mutagenów zostały dobrane eksperymentalnie.

Szczep	Mutagen / promutagen	Dawka (μ g/płytkę)
TA98	2-aminofluoren	200
TA100	azydek sodu	1
TA102	TERT-butyl-H ₂ O ₂	50
TA1537	9-aminoakrydyna	25
TA98, TA100, TA1537	2-aminoantracen	20
TA102		10

Tabela 5. Skład mieszanin reakcyjnych stosowanych w analizach mutagenności i promutagenności analizowanych związków z zastosowaniem testu Ames

Mieszanina reakcyjna	1	2	3	4	5	6
Analiza właściwości mutagennych						
Kontrola pozytywna	100 µl	10 µl	-	-	-	890 µl
Kontrola negatywna	100 µl	-	-	10 µl	-	890 µl
Próba badana	100 µl	-	10 µl	-	-	890 µl
Analiza właściwości promutagennych						
Kontrola pozytywna	100 µl	10 µl	-	-	500 µl	390 µl
Kontrola negatywna	100 µl	-	10 µl	10 µl	500 µl	390 µl
Próba badana	100 µl	-	10 µl	-	500 µl	390 µl

(1) – zawiesina bakterii, (2) - mutagen w odpowiedniej dawce referencyjny dla każdego ze szczepów bakterii, (3) – analizowane związki w stężeniach 10, 20 i 40 µg/10 µl, (4) - aceton jako rozpuszczalnik analizowanych związków negatywnej, (5) – roztwór zawierający frakcję mikrosomalną, (6) – bufor PBS

Na podstawie uzyskanych wyników obliczono aktywność mutageną (AM) mutagenów referencyjnych oraz stigmasterolu i jego estrów, stosując następujące równanie:

$$AM = (R_m - R_s) / R_s$$

gdzie: R_m oznacza ilość rewertantów indukowanych mutagenem/promutagenem wzorcowym w kontroli pozytywnej lub analizowanym związkiem w próbie badanej; R_s oznacza ilość rewertantów spontanicznych otrzymanych w kontroli negatywnej.

3.11. Oznaczenie reaktywnych form tlenu

RFT wytwarzane w komórkach eksponowanych na stigmasterol, estry stigmasterolu oraz produkty ich termicznej degradacji analizowano za pomocą zestawu *Cellular Reactive Oxygen Species Detection Kit (Deep Red Fluorescence)* firmy Abcam. Test umożliwia wykrywanie nadtlenków i rodników hydroksylowych gromadzonych wewnątrz komórek. W analizie stosowany jest barwnik ROS Deep Red, który przenika przez błony komórkowe i reaguje z RFT produkowanymi w komórce, generując sygnał czerwonej fluorescencji.

Wpływ stigmasterolu i jego pochodnych na komórkowy status oksydacyjny analizowano w hodowlach komórek nabłonka jelita grubego linii CCD 841 CoN. Hodowle zakładano na płytce 96-dołkowej przy inokulum 2×10^4 komórek/cm², po czym prowadzono inkubację przez 24 godziny w temperaturze 37 °C przy 5% zawartości CO₂. Przygotowane

24-godzinne hodowle poddawano ekspozycji na badane związki rozpuszczone w acetonie i rozcieńczane w pożywce do osiągnięcia założonych stężeń: 5, 10, 20 i 40 $\mu\text{g/ml}$. Jako kontrolę negatywną zastosowano pożywkę z dodatkiem acetonu; stężenie acetonu było tożsame jak w próbach właściwych. Do kontroli pozytywnej wprowadzano 50 μM H_2O_2 w celu indukcji RFT. Wszystkie analizy zostały wykonane w trzech powtórzeniach.

Detekcję RFT za pomocą zestawu *Cellular Reactive Oxygen Species Detection Kit (Deep Red Fluorescence)* przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta. Do hodowli dodawano po 100 μl przygotowanego odczynnika i płytki inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37 $^\circ\text{C}$ w atmosferze 5% CO_2 . Po inkubacji dokonywano pomiaru fluorescencji na czytniku mikropłytek TECAN Infinite M200 przy następujących długościach fali: wzbudzenie $\lambda = 650 \text{ nm}$, emisja $\lambda = 675 \text{ nm}$.

3.12. Oznaczenie aktywności kaspaz-3/7

Kaspaza-3 i kaspaza-7 odgrywają kluczową rolę w fazie wykonawczej procesu apoptozy. Do analizy aktywności tych enzymów w komórkach nabłonka jelita grubego linii CCD 841 CoN zastosowano zestaw *Apo-ONE Homogenous Caspase-3/7 Assay* (Promega). W oznaczeniu stosowano substrat specyficzny dla kaspaz 3 i 7, którym jest profluorescencyjny związek Z-DEVD-R110. Aktywna kaspaza 3 i 7 powoduje rozszczepienie substratu i usunięcie sekwencji peptydów DEVD, czemu towarzyszy uwolnienie silnie fluorescencyjnej rodaminy R110. Fluorescencja była odczytywana przy długości fali wzbudzenia $\lambda = 499 \text{ nm}$ oraz emisji $\lambda = 521 \text{ nm}$. Substrat Z-DEVD-R110 ulega rozszczepieniu tylko w komórkach apoptotycznych zawierających aktywne kaspazy 3/7; wynik pomiaru fluorescencji koreluje z aktywnością tych enzymów.

Komórki hodowano w białej płytce 96-dołkowej przystosowanej do pomiaru fluorescencji (BD Falcon). Hodowle były zakładane przy początkowej gęstości komórek 2×10^4 komórek/ cm^2 . Komórki hodowano w standardowych warunkach temperatury i atmosfery gazowej (37 $^\circ\text{C}$; 5% CO_2). Po 24 godzinach hodowli, komórki eksponowano na analizowane związki rozpuszczone w acetonie i rozcieńczone w pożywce do uzyskania stężeń 5, 10, 20 i 40 $\mu\text{g/ml}$. W kontroli negatywnej zastosowano pożywkę z dodatkiem acetonu, który był obecny we wszystkich hodowlach komórek traktowanych testowanymi związkami. Kontrolę pozytywną stanowiła hodowla z dodatkiem 50 μM kamptotecyny jako substancji referencyjnej indukującej proces apoptozy. Wszystkie analizy przeprowadzono w trzech powtórzeniach, zgodnie z instrukcją opracowaną przez producenta.

3.13. Analiza cyklu komórkowego

Analizę cyklu komórkowego przeprowadzono w hodowli komórek CCD 841 CoN eksponowanych na stigmasterol oraz estry stigmasterolu (nieogrzewane i ogrzewane w temperaturze 60 °C przez 12 godzin oraz w temperaturze 180 °C przez 8 godzin) w stężeniach 10, 20 i 40 µg/ml. Komórki po ekspozycji na badane związki uwalniano z powierzchni za pomocą trypsynizacji i przepłukiwano dwukrotnie buforem DPBS. Do osadu komórkowego dodawano 70% etanol. Zawiesinę komórek inkubowano w temperaturze 4 °C przez 30 minut w celu utrwalenia komórek i zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych. Następnie komórki wirowano i dwukrotnie przepłukiwano za pomocą DPBS. Do osadu komórkowego dodawano DPBS zawierający jodek propidyny (50 µg/ml) i RNAzę (100 µg/ml). Barwienie prowadzono w temperaturze 37 °C przez 30 minut, po czym komórki analizowano na cytometrze przepływowym AmnisTMFlowSightTM (Luminex Corporation, USA).

3.14. Analiza wpływu stigmasterolu i estrów stigmasterolu na nabłonek jelitowy Caco-2

3.14.1. Przygotowanie modelu nabłonka jelitowego Caco-2

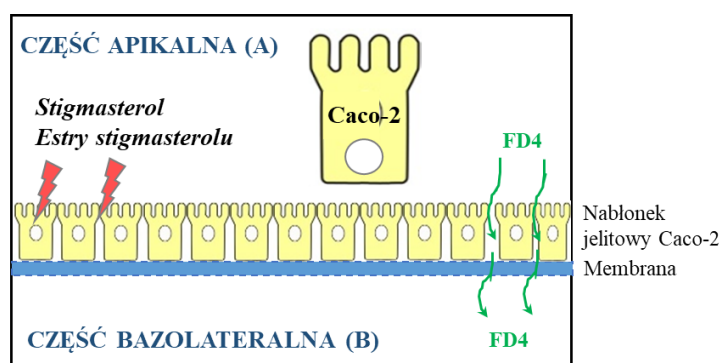
Komórki linii Caco-2 posiewano na półprzepuszczalne membrany z politereftalanu etylenu (PET, *polyethylene terephthalate*) o porowatości 0,4 µm (Millicell[®] Cell Culture Inserts, Millipore, Merck Group) przy początkowej ilości komórek 4×10^5 komórek/cm². Hodowle prowadzono w pożywce DMEM suplementowanej FBS (20% v/v) i mieszaniną niezbędnych aminokwasów (1%). Do hodowli dodawano również gentamycynę (50 mg/l). Pożywkę wymieniało co 2-3 dni zależnie od stadium hodowli. Hodowle prowadzono przez 21 dni w celu uzyskania integralnego, w pełni funkcjonalnego modelu nabłonka jelitowego. Tworzenie ścisłych połączeń międzykomórkowych i szczelnej bariery jelitowej monitorowano poprzez pomiar przelnabłonkowej oporności elektrycznej (TEER, *transepithelial electrical resistance*). Pomiar TEER wykonywano przy pomocy woltomierza Millicell ERS-2 (Millipore, USA) w dniach, w których wymieniało pożywkę hodowlaną.

3.14.2. Analiza integralności i przepuszczalności nabłonka jelitowego

Stigmasterol i estry stigmasterolu rozpuszczone w acetonie i rozcieńczone w pożywce wprowadzono na nabłonek jelitowy Caco-2. W kontrolach pozytywnych zastosowano dwa związki referencyjne: aspirynę (40 mM) i czynnik martwicy nowotworu TNF-α (50 ng/ml),

powodujące naruszenie szczelności nabłonka jelitowego (Liu i in., 2016). Po 4-godzinnej i 24-godzinnej ekspozycji, oznaczano wpływ związków na integralność bariery jelitowej przez pomiar parametru TEER oraz wpływ na przepuszczalność nabłonka przez pomiar przenikalności dekstranu znakowanego izotiocyanianem fluoresceiny o masie cząsteczkowej 4 kDa (FD4, Sigma-Aldrich).

Do układu modelowego z funkcjonalnym nabłonkiem jelitowym Caco-2 (ryc. 5), do części apikalnej (A) i bazolateralnej (B) wprowadzano bufor transportowy (pH 7,4) oparty na buforze HBSS (*Hank's balanced salt solution*) z dodatkiem HEPES (5,96 mg/ml) i wodorowęglanu sodu Na_2HCO_3 (0,35 mg/ml). Do części apikalnej, imitującej światło jelit, dodawano 100 mM FD4 w buforze transportowym. Końcowa objętość buforu w części A i B układu wynosiła odpowiednio 0,4 ml i 0,6 ml. Transport FD4 przez nabłonek jelitowy Caco-2 prowadzono w temperaturze 37 °C, przy ciągłym mieszaniu z szybkością 120 rpm. W czasie transportu, co 30 minut, pobierano próby z kompartmentu B o objętości 100 μl w celu oznaczenia FD4 przenikającego przez nabłonek. Objętość próby pobranej do analizy FD4 uzupełniano świeżym buforem transportowym o temperaturze 37 °C. W czasie transportu utrzymywano stałą objętość buforu w części donorowej (A) i akceptorowej (B) układu, która wynosiła odpowiednio 0,4 i 0,6 ml. Bezpośrednio po pobraniu próby, oznaczano FD4 przez pomiar fluorescencji na czytniku mikropłytek Tecan Infinite M200 przy długości fali wzbudzenia $\lambda = 492 \text{ nm}$ i emisji $\lambda = 535 \text{ nm}$.



Rycina 5. Schemat przedstawiający model nabłonka jelitowego Caco-2 w układzie doświadczalnym

Na podstawie uzyskanych wyników obliczono szybkość przepływu FD4 (nM/h) oraz współczynnik przenikalności pozornej P_{app} (*apparent permeability coefficient*), stosując formuły opisane w pracy Tavelin i in. (2002) oraz następujące równanie:

$$P_{app} = V/A \times C_0 \times dC/dt \text{ (cm/s)} \text{ (Artursson 1990)}$$

gdzie:

V – objętość porcji w części akceptorowej (cm^3)

A – powierzchnia membrany (cm^2)

C_0 – początkowe stężenie substancji w części donorowej (μM)

dC/dt – przyrost stężenia substancji transportowanej w części akceptorowej (dC) w czasie (dt), szybkość przenikania substancji przez monowarstwę ($\mu\text{M/s}$)

3.14.3. Analiza wpływu na różnicowanie komórek Caco-2 i tworzenie funkcjonalnego nabłonka jelitowego

Stigmasterol i estry stigmasterolu rozpuszczone w acetonie i rozcieńczone w pożywkę wprowadzano do hodowli komórek Caco-2 na membranach. Hodowlę prowadzono w sposób opisany w rozdziale 3.14.1. w celu uzyskania funkcjonalnego modelowego nabłonka jelitowego. Analizowane związki były obecne w hodowli komórek Caco-2 przez cały proces różnicowania i były dodawane każdorazowo podczas wymiany pożywki na świeżą (co 2-3 dni hodowli, zależnie od stadium kultury). W czasie hodowli, w dniu wymiany pożywki, dokonywano pomiaru wartości TEER. Po 21 dniach hodowli, analizowano funkcjonalność nabłonka Caco-2, w tym jego integralność przez pomiar TEER, przenikalność FD4 i poziom ekspresji genów kodujących białka ścisłych połączeń barierowych znanych jako *tight junction proteins* (TJP), w tym białko, okludyna (gen *OCNLI*) i kładyna 1 (gen *CLDNI*) oraz białko peryferyjne - zonulina 1 (ZO-1, zonula occludens 1) (gen *TJPI*).

3.14.4. Analiza ekspresji genów metodą Real-Time PCR

3.14.4.1. Izolacja RNA

Do izolacji RNA stosowano odczynnik TRI-Reagent (Sigma-Aldrich) w ilości 1 ml na 10 cm^2 powierzchni warstwy komórek. Po liczeniu komórek i przeniesieniu lizatu do probówek, do prób dodawano chloroform (Sigma-Aldrich) w stosunku ilościowym 0,2 ml chloroformu na 1 ml odczynnika TRI-Reagent. Próby wytrząsano przez 5 min i wirowano w temperaturze

4 °C przez 15 min z prędkością 13 000 rpm. Górną warstwę zawierającą RNA przenoszono do nowych probówek i dodawano 2-propanol (Sigma-Aldrich) z zachowaniem proporcji: 0,5 ml 2-propanolu / 1 ml TRI-Reagent. Po wymieszaniu, próby pozostawiano na 10 minut w temperaturze pokojowej, po czym wirowano w 4 °C przez 15 min przy 13 000 rpm. Następnie osad RNA przemywano zimnym 75% etanolem i wirowano w 4 °C przez 5 min przy 9 000 rpm. Osad RNA suszono na wolnym powietrzu przez 5-10 min i rozpuszczono w wodzie dejonizowanej wolnej od RNaz.

W celu usunięcia zanieczyszczeń genomowym DNA przeprowadzano proces trawienia przy zastosowaniu rekombinowanej DNazy I (Roche Diagnostics Polska). Trawienie prowadzono w temperaturze 37 °C przez 15 min w buforze reakcyjnym dostarczonym przez producenta enzymu. W celu inaktywacji DNazy do prób dodawano 200 µM EDTA (pH 8,0) w ilości 1 µl / 25 µl i inkubowano w temperaturze 75 °C przez 10 min.

Stężenie i czystość wyizolowanego RNA oznaczano spektrofotometrycznie na aparacie Nano Drop-1000 (Thermo Scientific). Przygotowane RNA wykorzystano jako matryce do syntezy cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji.

3.14.4.2. Odwrotna transkrypcja

Do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystano zestaw odczynników *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche Diagnostics Polska). Mieszanina reakcyjna dla pojedynczej próby zawierała: 1 µg RNA w 10 µl wody dejonizowanej, 1 µl startera oligo(dT)18 o stężeniu 50 pmol/µl, 2 µl startera heksamerowego o stężeniu 600 pmol/µl. Mieszaninę poddawano 10-minutowej inkubacji w temperaturze 65 °C i schładzano na lodzie. Następnie dodawano 7 µl mieszaniny zawierającej: 4 µl buforu reakcyjnego, 0,5 µl inhibitora RNaz (40 U/µl), 2 µl mieszaniny deoksynukleotydów dNTP (10 mM) oraz 0,5 µl odwrotnej transkryptazy (20 U/µl). Składniki wymieszano, krótko zwirowano i inkubowano w temperaturze 25 °C przez 10 min. Próby przenoszono do termobloku i inkubowano w 50 °C przez 30 min. Odwrotną transkryptazę inaktywowano w temperaturze 85 °C przez 5 min. Otrzymany cDNA służył jako matryca do reakcji łańcuchowej polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR).

3.14.4.3. Analiza Real-Time PCR

Poziom ekspresji genów w komórkach Caco-2 oznaczano techniką Real-Time PCR przy wykorzystaniu aparatu SmartCycler firmy Cepheid (USA) oraz oprogramowania SmartCycler 3.0 Software. Reakcje przygotowano w oparciu o zestaw odczynników *SYBR[®]Select Master Mix* firmy Life Technologies Biosystems zgodnie z zaleceniami producenta. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: *SYBR[®]Select Master Mix* (12 µl), 1 µM starter forward (1 µl), 1 µM starter reverse (1 µl), matryca cDNA (1 µl) i woda w ilości uzupełniającej objętość końcową do 25 µl. Startery i ich sekwencje przedstawiono w tabeli 6. Pierwszym etapem reakcji qPCR była 10-minutowa denaturacja w temperaturze 94 °C w celu aktywacji polimerazy typu hot-start. Bezpośrednio po niej przeprowadzano właściwą reakcję PCR, na którą składało się 40 cykli. Każdy cykl rozpoczynał się od 40-sekundowej denaturacji w temperaturze 94 °C, po której następowało przyłączanie starterów (59 °C przez 30 s) i wydłużanie - synteza nici komplementarnej (72 °C przez 30 s). Po zakończeniu reakcji przeprowadzana była analiza temperatury topnienia produktu w celu potwierdzenia specyficzności transkryptów.

Wyniki oznaczeń ilościowych cDNA analizowanych genów normalizowano względem standardów wewnętrznych, które stanowiły cDNA genów konstytutywnych o względnie stałej ekspresji nie podlegającej regulacji pod wpływem badanych związków. Jako standard wewnętrzny zastosowano cDNA genów kodujących dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH*). Względna zmianę poziomu ekspresji obliczano według metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak i in. 2001).

Tabela 6. Startery zastosowane w reakcji Real-Time PCR

Starter	Referencja NCBI	Seqwencje starterów (5' → 3')	Wielkość produktu (pz)
Hs <i>GAPDH</i>	NM 002046.7	F: AATGAAGGGGTCATTGATGG R: AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	108
Hs <i>TJPI</i>	NM 0013550	F: ACCAGTAAGTCGTCCTGATCC R: TCGGCCAAATCTTCTCACTCC	128
Hs <i>OCN</i>	NM 0012052	F: ACAAGCGGTTTTATCCAGAGTC R: GTCATCCACAGCCGAAGTTAAT	89
Hs <i>CLDN1</i>	NM 021101.5	F: GTCTTTGACTCCTTGCTGAATCTG R: CACCTCATCGTCTTCCAAGCAC	144

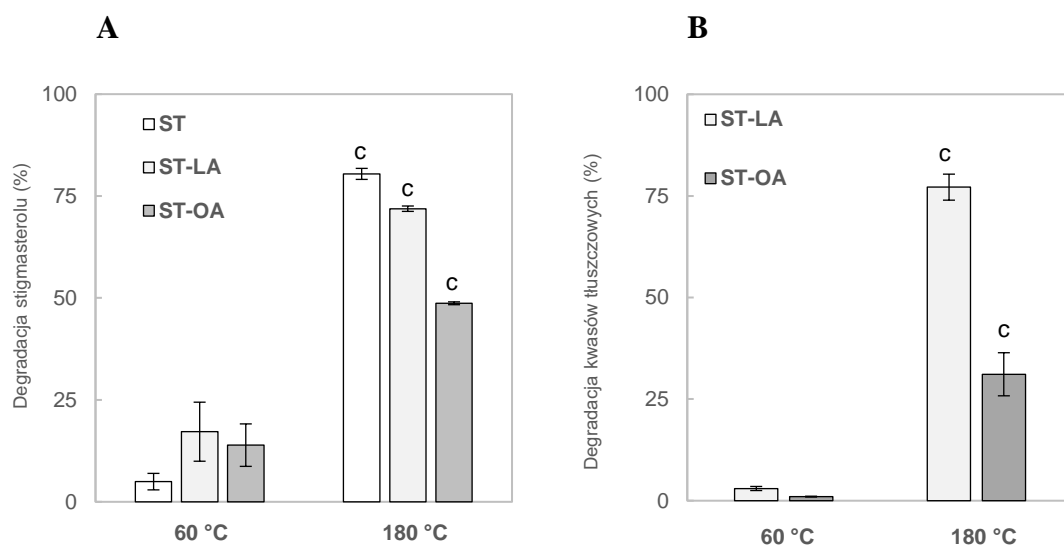
3.15. Analiza statystyczna

Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w co najmniej trzech powtórzeniach. Przedstawione wyniki stanowią średnie arytmetyczne \pm SD (*standard deviation*). Analizę statystyczną wykonano przy użyciu oprogramowania STATISTICA w wersji 13.3 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Do porównania dwóch grup danych zastosowano test t-Studenta. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), a następnie test post hoc Tukeya, aby określić różnice między średnimi wartościami wielu grup. Założenie jednorodności wariancji zostało zweryfikowane z wykorzystaniem testu Levene'a. Punkt odcięcia dla różnic istotności przyjęto na poziomie $p \leq 0,05$.

4. Wyniki badań i dyskusja

4.1. Wpływ obróbki termiczno-oksydacyjnej na stopień degradacji stigmasterolu i estrów stigmasterolu

Stigmasterol i estry stigmasterolu poddano obróbce termiczno-oksydacyjnej w temperaturze 60 °C przez 12 godzin oraz w temperaturze 180 °C przez 8 godzin. Warunki modelowe symulowały odpowiednio przyspieszony proces przechowywania w piecu Schaala oraz proces smażenia (Raczyk i in., 2017). Po obróbce temperaturowej analizowano stopień degradacji związków poprzez oznaczenie wolnych reszt stigmasterolowych i kwasów tłuszczowych w ogrzewanych frakcjach. Wyniki analiz przedstawiono na rycinie 6.



Rycina 6. Stopień degradacji stigmasterolu (A) oraz kwasów tłuszczowych (B) po ogrzewaniu stigmasterolu (ST), linolanu stigmasterolu (ST-LA) i oleinianu stigmasterolu (ST-OA) w temperaturze 60 °C przez 12 godzin oraz w temperaturze 180 °C przez 8 godzin. Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=3). Poziom istotności różnic oznaczono testem t-Studenta. ^ap \leq 0,05; ^bp \leq 0,01; ^cp \leq 0,001.

W wyniku ogrzewania nieestryfikowanego stigmasterolu w temperaturze 60 °C przez 12 godzin zawartość wolnego stigmasterolu uległa redukcji o 5%, podczas gdy zawartość reszt sterolowych w estrach stigmasterolu, oleinianie i linolanie, obniżyła się odpowiednio o 14% i 17% (ryc. 6A). Przeprowadzone analizy nie wykazały statystycznej istotności różnic pomiędzy ilością grup sterolowych w estrach ogrzewanych w 60 °C, niezależnie od stopnia nienasycenia kwasów tłuszczowych. Bardziej znamienne różnice po ogrzewaniu estrów w 60 °C zanotowali inni autorzy. W badaniach Raczyk i in. (2017) zawartość stigmasterolu

po ogrzewaniu oleinianu stigmasterolu obniżyła się jedynie o 5%. Natomiast ogrzewanie linolanu stigmasterolu skutkowało redukcją reszty sterolowej na poziomie 17%, podobnie jak w niniejszej pracy. Rudzińska i in. (2022) wykazali, że po obróbce termicznej, w tych samych warunkach temperatury, zawartość stigmasterolu w estrach z kwasem palmitynowym i oleinowym zmniejszyła się o 6% i 12%, natomiast degradacja wolnego stigmasterolu została oszacowana na poziomie 3%. Wyniki badań publikowane przez Raczyk i in. (2017) i Rudzińską i in. (2022) wskazują na zależność stopnia nienasycenia kwasu tłuszczowego i degradacji grupy sterolowej zachodzącą podczas ogrzewania w temperaturze 60 °C.

Redukcja zawartości stigmasterolu i jego estrów w temperaturze 180 °C była bardziej znacząca, pomimo skrócenia czasu ogrzewania do 8 godzin. W tej temperaturze degradacja stigmasterolu wolnego wynosiła 80%, natomiast zmniejszenie zawartości reszt sterolowych w estrach oleinowym i linolowym kształtowała się na poziomie 49% i 72% (ryc. 6A). Po zastosowaniu obróbki w temperaturze 180 °C, wykazano statystycznie istotny wpływ stopnia nienasycenia kwasu tłuszczowego w estrach na poziom redukcji stigmasterolu. Raczyk i in. (2017) zaobserwowali podobne efekty ogrzewania estrów w 180 °C; degradację reszty sterolowej w oleinianie i linolanie stigmasterolu oszacowano na 43% i 69%. Z kolei w badaniach, prowadzonych przez zespół Rudzińskiej, wykazano, że rodzaj kwasu tłuszczowego (nasycony i nienasycony) w estrach stigmasterolu nie wpływa w istotny sposób na stabilność reszty sterolowej podczas ogrzewania w temperaturze 180 °C przez 8 godzin. Redukcja reszt sterolowych w wyniku wysokotemperaturowej obróbki termicznej estrów palmitynowego i oleinowego wynosiła 50% i 53% (Rudzińska i in., 2022).

Analizy zawartości reszt kwasów tłuszczowych w badanych estrach, oleinowym i linolowym, wykazały, że ich degradacja w temperaturze 60 °C zachodzi na bardzo niskim poziomie. Ubytek kwasu oleinowego i linolowego oszacowano na 1% i 3%. Natomiast, w wyniku ogrzewania estrów w temperaturze 180 °C, degradacja reszt kwasowych była znacznie większa i wynosiła 31% i 77% odpowiednio dla kwasu oleinowego i linolowego. Uzyskane wyniki potwierdzają, że stopień nienasycenia kwasu tłuszczowego w estrach stigmasterolu ma istotny wpływ na jego stabilność podczas wysokotemperaturowej obróbki termicznej (ryc. 6B).

Raczyk i in. (2017) stwierdzili, że podczas ogrzewania estrów stigmasterolu w temperaturze 60 °C najbardziej widoczna jest degradacja kwasów tłuszczowych, natomiast w temperaturze 180 °C przeważają zmiany ilościowe dotyczące reszty sterolowej. Natomiast w badaniach Rudzińskiej i in. (2022) wykazano, że ubytek kwasów palmitynowego i oleinowego w estrach stigmasterolowych wynosił odpowiednio ok. 14% i 27%. W innej pracy,

opublikowanej przez Barriuso i wsp. (2012) stwierdzono, że degradacja stigmasterolu po 5-minutowym ogrzewaniu w 180 °C wynosi 56%, a po 6 godzinach ogrzewania wzrasta do 96%. Wykazano także, że obecność nienasyconych kwasów tłuszczowych w ogrzewanym związku utrudnia degradację fitosteroli (Barriuso i in., 2016). Lin i in. (2017) stwierdzili, że w margarynach, po obróbce termicznej w 150 °C, 180 °C oraz 210 °C, degradacja fitosteroli następuje wolniej niż w olejach roślinnych.

4.2. Wpływ obróbki termiczno-oksydacyjnej stigmasterolu i jego estrów na tworzenie oksypochodnych stigmasterolu

Podczas ogrzewania stigmasterolu oraz jego estrów zidentyfikowano siedem produktów termicznej oksydacji stigmasterolu, w tym 7 α -hydroksystigmasterol (7 α OH-ST), 7 β -hydroksystigmasterol (7 β OH-ST), 5 α ,6 α -epoksy-stigmasterol (α epoxy-ST), 5 β ,6 β -epoksy-stigmasterol (β epoxy-ST), stigmasten-3 β ,5 α ,6 β -triol (triol-ST), 25-hydroksystigmasterol (25OH-ST) i 7-ketostigmasterol (7-keto-ST). Wyniki analizy ilościowej przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Zawartość oksystigmasteroli powstających w wyniku ogrzewania stigmasterolu, oleinianu stigmasterolu oraz linolanu stigmasterolu. Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=3).

Pochodne utlenione (μ g/g)	Stigmasterol		
	Nieogrzewany	60 °C 12 h	180 °C 8 h
7 α OH-ST	53,70 \pm 3,72	339,15 \pm 46,89	272,50 \pm 22,57
7 β OH-ST	55,53 \pm 5,39	135,82 \pm 11,29	662,71 \pm 14,67
α epoxy-ST	64,78 \pm 1,98	94,34 \pm 7,22	64,95 \pm 1,29
β epoxy-ST	0,00 \pm 0,00	96,61 \pm 10,06	61,97 \pm 0,76
triol-ST	0,00 \pm 0,00	75,19 \pm 2,38	424,41 \pm 11,72
25OH-ST	36,99 \pm 6,78	198,13 \pm 12,99	254,90 \pm 47,47
7-keto-ST	31,85 \pm 2,88	135,98 \pm 0,04	689,28 \pm 11,08
Razem	242,86 \pm 6,01	1075,22 \pm 25,56	2430,72 \pm 109,55
Pochodne utlenione (μ g/g)	Oleinian stigmasterolu		
	Nieogrzewany	60 °C 12 h	180 °C 8 h
7 α OH-ST	14,64 \pm 0,65	111,44 \pm 3,11	158,63 \pm 23,60
7 β OH-ST	8,75 \pm 0,02	31,00 \pm 4,38	58,61 \pm 1,87
α epoxy-ST	6,48 \pm 1,47	10,16 \pm 0,09	106,18 \pm 13,16
β epoxy-ST	19,43 \pm 2,47	16,47 \pm 0,81	63,40 \pm 0,87
triol-ST	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	69,62 \pm 2,00
25OH-ST	20,58 \pm 0,03	20,03 \pm 0,61	36,44 \pm 0,96
7-keto-ST	35,39 \pm 0,57	22,35 \pm 0,54	67,53 \pm 3,10
Razem	105,27 \pm 2,73	211,45 \pm 9,53	560,41 \pm 31,98

Pochodne utlenione ($\mu\text{g/g}$)	Linolan stigmasterolu		
	Nieogrzewany	60 °C 12 h	180 °C 8 h
7 α OH-ST	50,02 \pm 3,19	175,54 \pm 10,60	264,81 \pm 4,58
7 β OH-ST	22,42 \pm 3,37	214,41 \pm 18,35	520,20 \pm 49,18
α epoxy-ST	10,01 \pm 0,89	136,17 \pm 9,10	138,35 \pm 0,17
β epoxy-ST	16,32 \pm 2,83	89,58 \pm 4,33	127,99 \pm 9,85
triol-ST	3,03 \pm 0,13	48,20 \pm 9,08	66,14 \pm 3,16
25OH-ST	10,37 \pm 0,07	123,27 \pm 2,53	64,50 \pm 1,30
7-keto-ST	39,36 \pm 26,37	180,06 \pm 0,61	94,98 \pm 3,35
Razem	151,53 \pm 35,07	967, 23 \pm 144,94	1276,97 \pm 68,98

W próbach związków nieogrzewanych całkowita zawartość oksystigmasteroli (SOP) była niewielka i mieściła się w zakresie od 0,11 do 0,24 mg/g. Podczas ogrzewania stigmasterolu i jego estrów ilość SOP ulegała zwiększeniu. Po ogrzewaniu stigmasterolu w temperaturze 60 °C przez 12 godzin całkowita ilość SOP zwiększyła się do 1,1 mg/g, a po ogrzewaniu w temperaturze 180 °C przez 8 godzin do 2,4 mg/g. W wyniku ogrzewania linolanu stigmasterolu stwierdzono zwiększenie stężenia SOP do 0,97 mg/g (w 60 °C) i 1,28 mg/g (w 180 °C). Najmniejszą ilość SOP generowanych podczas ogrzewania w 60 °C i 180 °C zanotowano w przypadku oleinianu stigmasterolu; zawartość SOP wynosiła odpowiednio 0,2 mg/g i 0,6 mg/g (tabela 7).

W próbach nieogrzewanych zawartość 7 α OH-ST i 7-keto-ST oznaczono na poziomie odpowiednio 54 $\mu\text{g/g}$ i 32 $\mu\text{g/g}$ dla stigmasterolu, 15 $\mu\text{g/g}$ i 35 $\mu\text{g/g}$ dla oleinianu stigmasterolu oraz 50 i 39 $\mu\text{g/g}$ dla linolanu stigmasterolu. Po 12 godzinach ogrzewania w temperaturze 60 °C ilość 7 α OH-ST zwiększyła się do 339 $\mu\text{g/g}$, 111 $\mu\text{g/g}$ i 176 $\mu\text{g/g}$, w przypadku odpowiednio stigmasterolu, oleinianu stigmasterolu i linolanu stigmasterolu. Głównymi SOP identyfikowanymi po ogrzewaniu estru linolowego w 60 °C był 7 β OH-ST i 7-keto-ST, które oznaczono w ilości odpowiednio 214 $\mu\text{g/g}$ i 180 $\mu\text{g/g}$. Triol, postrzegany jako najbardziej toksyczna oksypochodna (Ryan i in., 2005), został oznaczony w największej ilości w przypadku stigmasterolu (75 $\mu\text{g/g}$) i linolanu stigmasterolu (48 $\mu\text{g/g}$) ogrzewanych w temperaturze 60 °C. Skład SOP w próbach ogrzewanych w temperaturze 180 °C przez 8 godzin był zróżnicowany i zależny od budowy chemicznej związków macierzystych. Po ogrzewaniu stigmasterolu w warunkach wysokotemperaturowych, spośród oksypochodnych, najwyższą zawartość zarejestrowano dla 7-keto-ST (689 $\mu\text{g/g}$) i 7 β OH-ST (663 $\mu\text{g/g}$). W próbie wolnego stigmasterolu odnotowano również najwyższą zawartość triolu-ST, która kształtowała się na poziomie 424 $\mu\text{g/g}$. 7 β OH-ST był również głównym składnikiem powstającym podczas degradacji linolanu stigmasterolu; jego stężenie wynosiło 520 $\mu\text{g/g}$. Mniejszą ilość 7 α OH-ST

oznaczono w próbie estru linolowego, wynosiła ona 265 µg/g. Największą ilość pochodnych epoksydowych (αepoksy-ST i βepoksy-ST) wykryto po ogrzewaniu tego estru w temperaturze 180 °C; ich zawartość wynosiła odpowiednio 138 µg/g i 128 µg/g (tabela 7).

Wyniki przeprowadzonych analiz dowodzą, że estryfikacja stigmasterolu ogranicza tworzenie oksypochodnych stigmasterolu podczas przechowywania i obróbki termicznej; szczególnie podczas ogrzewania w wysokiej temperaturze (180 °C). Stopień nienasycenia kwasu tłuszczowego zastosowanego w procesie estryfikacji ma istotne znaczenie dla ilości produkowanych SOP. Pod względem całkowitej zawartości SOP, nieogrzewane związki stigmasterolu można uszeregować w następującej kolejności stigmasterol > linolan stigmasterolu > oleinian stigmasterolu. W próbach estrów z kwasem oleinowym i linolowym, niepoddawanych obróbce termiczno-oksydacyjnej, sumaryczna zawartość SOP była o 2,3 i 1,6 razy mniejsza niż w nieogrzewanych próbach wolnego stigmasterolu. Należy jednak podkreślić, że ilość SOP w wyjściowych próbach oleinianu stigmasterolu była o 50% mniejsza niż w próbach linolanu stigmasterolu. Istotność nienasycenia kwasu tłuszczowego zawartego w estrach stigmasterolu miała też duże znaczenie dla ilości SOP generowanych podczas obróbki termicznej. Biorąc pod uwagę sumaryczną ilość SOP w próbach poddanych ogrzewaniu, związki stigmasterolu można uszeregować w następujący sposób stigmasterol > linolan stigmasterolu > oleinian stigmasterolu. Całkowita zawartość SOP po ogrzewaniu linolanu stigmasterolu w temperaturze 60 °C i 180 °C była odpowiednio 4,6-krotnie i 2,3-krotnie większa niż po ogrzewaniu oleinianu stigmasterolu w tych warunkach. Na tej podstawie można stwierdzić, że efekty estryfikacji stigmasterolu z kwasem oleinowym są najbardziej korzystne biorąc pod uwagę ograniczenie produkcji SOP niezależnie od obróbki termiczno-oksydacyjnej i warunków temperaturowych. W wyniku estryfikacji stigmasterolu z kwasem oleinowym, ogólna zawartość SOP została zredukowana 2,3-krotnie. Efekty estryfikacji są jeszcze bardziej znaczące uwzględniając procesy termiczno-oksydacyjne. Po ogrzewaniu oleinianu stigmasterolu w 60 °C i 180 °C, produkcja SOP została ograniczona odpowiednio 5,1-krotnie i 4,3-krotnie w stosunku do generowania SOP podczas ogrzewania wolnego stigmasterolu.

W badaniach Rudzińskiej i in. (2022) wykazano, że w wyniku ogrzewania stigmasterolu i jego estrów, palmitynowego i oleinowego, w temperaturze 60 °C i 180 °C, produkowany jest w największej ilości 7-ketostigmasterol. W próbach stigmasterolu, palmitynianu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu ogrzewanych w 60 °C, ilość 7-ketostigmasterolu wynosiła odpowiednio 8 mg/g, 1,2 mg/g i 0,7 mg/g, natomiast po ogrzewaniu związków w 180 °C zawartość tej oksypochodnej określono na poziomie 2,7 mg/g, 2,4 mg/g i 2,6 mg/g. Raportowane dane ilościowe dotyczące zawartości 7-ketostigmasterolu w próbach

stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu różnią się od tych uzyskanych w przedstawianej pracy. Produkty utleniania fitosteroli (POP) analizowano nie tylko w układach modelowych, obejmujących czyste związki, ale również w produktach spożywczych. Botelho i in. (2014) oznaczyli zawartość POP na poziomie 6,9–8,3 mg/100 g w batonach czekoladowych przechowywanych w temperaturze 30 °C przez 5 miesięcy. W margarynach wzbogaconych fitosterolami przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C dominowała pochodna 7-hydroksylowa stigmasterolu (Rudzińska i in., 2014). Prowadzono również badania porównawcze dotyczące stabilności i produkcji oksypochodnych fitosteroli. Lin i in. (2018) wykazali, że kampesterol podczas obróbki lub przechowywania w temperaturze poniżej 65 °C jest bardziej podatny na degradację oksydacyjną niż β -sitosterol.

4.3. Wpływ obróbki termiczno-oksydacyjnej stigmasterolu i jego estrów na tworzenie oligomerów

Analiza oligomerów powstających podczas ogrzewania stigmasterolu i jego estrów w temperaturze 60 °C i 180 °C wykazała obecność dimerów polarnych, trimerów oraz innych oligomerów i dimerów niepolarnych. Zidentyfikowano również monomery i rozdrobnione cząsteczki analizowanych związków. Wyniki zostały przedstawione w tabeli 8.

Polarne oligomery tworzyły główną frakcję w linolanie stigmasterolu ogrzewanym w temperaturze 60 °C (100%) oraz w oleinianie i linolanie stigmasterolu ogrzewanym w temperaturze 180 °C (94% i 98%). Oligomery niepolarne dominowały w stigmasterolu ogrzewanym w temperaturze 60 °C (99,7%) i 180 °C (71%) oraz w oleinianie stigmasterolu ogrzewanym w 60 °C (85%). Polarne dimery i trimery wykryto podczas ogrzewania większości związków; polarnych trimerów nie zaobserwowano jedynie w przypadku stigmasterolu ogrzewanego w 60 °C. Inne, niezidentyfikowane polarne oligomery wykryto tylko w próbach estru linolowego ogrzewanego w temperaturach 60 °C i 180 °C. Niepolarne dimery oznaczono w prawie wszystkich ogrzewanym próbach, z wyjątkiem linolanu stigmasterolu ogrzewanego w 60 °C.

Najwyższą sumaryczną zawartość oligomerów stwierdzono w próbce stigmasterolu ogrzewanej w 180 °C (360 mg/g), następnie w próbce linolanu stigmasterolu (85 mg/g) i próbce oleinianu stigmasterolu (35 mg/g). Zawartość dimerów i trimerów polarnych utworzonych podczas ogrzewania stigmasterolu w 180 °C wynosiła odpowiednio 67 i 37 mg/g, natomiast zawartość dimerów niepolarnych wynosiła 257 mg/g. Po ogrzewaniu linolanu stigmasterolu w 180 °C oznaczono polarne dimery, trimery, inne oligomery i niepolarne dimery w ilościach

odpowiednio 63 mg/g, 14 mg/g, 6 mg/g i 2 mg/g. Oleinian stigmasterolu ogrzewany w temperaturze 180 °C ulegał degradacji z wytworzeniem do 21 mg/g polarnych dimerów, 13 mg/g polarnych trimerów i 2 mg/g niepolarnych dimerów (tabela 8).

Analizy stigmasterolu, palmitynianu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu przeprowadzone przez Rudzińską i wsp. (2022) wykazały, że zarówno we frakcji polarnej, jak i niepolarnej, dominowały monomery, a następnie fragmentaryczne pochodne i dimery. Trimery wykryto jedynie we frakcji polarnej wyizolowanej po ogrzewaniu stigmasterolu i jego estrów palmitynowego i oleinowego w temperaturze 180 °C. Lehtonen i in. (2012) oznaczyli obecność oligomerów o wyższej masie cząsteczkowej niż związki macierzyste podczas ogrzewania trzech estrów cholesterolu: stearynowego, oleinowego i linolowego w temperaturze 100 °C i 140 °C. Autorzy stwierdzili, że polimeryzacja konkuruje z tworzeniem się produktów utleniania steroli nawet w umiarkowanych temperaturach. Wyniki prac wykazały, że produkty utleniania mogą być substratami do tworzenia oligomerów ze względu na ich wysoką reaktywność chemiczną, i charakter rodników wielu z nich (Hazer i Akyol, 2016).

Tabela 8. Produkty termiczno–oksydacyjnej degradacji stigmasterolu, oleinianu stigmasterolu oraz linolanu stigmasterolu. Dane przedstawiono jako wartości średnie ± SD (n=3).

Frakcja	Składniki (mg/g)	Stigmasterol		
		Nieogrzewany	60 °C 12 h	180 °C 8 h
Polarna	Rozdrobnione*	0,03 ± 0,00	1,14 ± 0,01	17,6 ± 0,29
	Monomery	2,97 ± 0,02	59,67 ± 3,42	231,79 ± 5,22
	Dimery	Nw	0,19 ± 0,01	67,06 ± 1,42
	Trimery	Nw	Nw	36,55 ± 2,71
	Inne oligomery	Nw	Nw	Nw
	Oligomery razem	Nw	0,19 ± 0,01	103,61 ± 3,24
Niepolarna	Rozdrobnione*	Nw	Nw	9,73 ± 0,63
	Monomery	997,00 ± 2,27	884,72 ± 3,15	380,43 ± 1,57
	Dimery	Nw	54,28 ± 2,03	256,85 ± 2,52
Oligomery razem		Nw	54,47 ± 2,04	360,46 ± 5,76
		Oleinian stigmasterolu		
		Nieogrzewany	60 °C 12 h	180 °C 8 h
Polarna	Rozdrobnione*	0,150 ± 0,01	6,05 ± 0,75	16,27 ± 1,18
	Monomery	4,85 ± 0,59	64,60 ± 1,43	236,49 ± 3,12
	Dimery	Nw	1,14 ± 0,04	20,64 ± 1,44
	Trimery	Nw	0,21 ± 0,01	12,60 ± 0,96
	Inne oligomery	Nw	Nw	Nw
	Oligomery razem	Nw	1,35 ± 0,05	33,24 ± 2,40
Niepolarna	Rozdrobnione*	44,43 ± 0,77	119,83 ± 2,47	121,32 ± 1,72
	Monomery	950,57 ± 2,60	800,76 ± 5,19	590,67 ± 3,39
	Dimery	Nw	7,41 ± 1,01	2,01 ± 0,02
Oligomery razem		Nw	8,76 ± 1,06	35,21 ± 2,42

		Linolan stigmasterolu		
		Nieogrzewany	60 °C 12 h	180 °C 8 h
Polarna	Rozdrobnione*	0,32 ± 0,01	3,40 ± 0,04	14,18 ± 0,93
	Monomery	4,68 ± 0,21	53,44 ± 1,15	151,70 ± 2,63
	Dimery	Nw	10,92 ± 0,65	62,83 ± 1,78
	Trimery	Nw	2,22 ± 0,03	14,18 ± 0,36
	Inne oligomery	Nw	1,02 ± 0,01	6,12 ± 0,44
	Oligomery razem	Nw	14,16 ± 0,04	83,13 ± 1,01
Niepolarna	Rozdrobnione*	27,48 ± 0,98	55,08 ± 2,25	269,25 ± 3,01
	Monomery	967,52 ± 4,16	873,92 ± 3,82	479,72 ± 2,51
	Dimery	Nw	Nw	2,03 ± 0,01
Oligomery razem		Nw	14,16 ± 0,04	85,16 ± 3,02

*Rozdrobnione – częściowe cząsteczki stigmasterolu lub jego estrów; monomery – niezdegradowane cząsteczki stigmasterolu i jego estrów. Nw – nie wykryto

4.4. Cytotoksyczność stigmasterolu i jego estrów

Cytotoksyczność stigmasterolu, jego estrów oraz produktów ich termiczno-oksydacyjnej degradacji oznaczano z zastosowaniem ludzkich komórek prawidłowych izolowanych z nabłonka jelita cienkiego (linia komórkowa FHs 74 Int), nabłonka jelita grubego (linia komórkowa CCD 841 CoN) oraz wątroby (linia komórkowa THLE-2). Wszystkie związki analizowano w zakresie stężeń do 40 µg/ml z uwagi na ich słabą rozpuszczalność w wodzie i ograniczoną biodostępność dla komórek. Proliferację komórek oraz ich żywotność i aktywność metaboliczną określano za pomocą testu MTT, populację komórek żywych i martwych z użyciem skojarzonego testu MT-FMC, a syntezę DNA w komórkach linii CCD 841 CoN za pomocą testu BrdU. Wyniki analiz przedstawiono na rycinach 7 – 16. W tabeli 9 podano wyznaczone eksperymentalnie wartości dawek cytotoksycznych EC₁₀ oraz EC₅₀ dla badanych związków. Obliczone za pomocą modelu dawki letalne EC₉₀ znacząco wykraczały poza zakres stężeń testowanych związków i ich wartości miały jedynie charakter szacunkowy, dlatego nie zostały zamieszczone w tabeli.

Tabela 9. Dawki cytotoksyczne EC₁₀ i EC₅₀ wyznaczone dla stigmasterolu, jego estrów i produktów ich termiczno-oksydacyjnej degradacji w odniesieniu do komórek nabłonka jelita grubego CCD 841 CoN i jelita cienkiego FHs 74 Int oraz wątroby THLE-2. Dane przedstawiono jako wartości średnie ± SD (n=3). Różnice statystycznie znamienne ^a p ≤ 0.05, ^b p ≤ 0.001, ^c p ≤ 0.0001 zostały oszacowane testem t-Studenta z uwzględnieniem związków nie poddawanych obróbce termiczno-oksydacyjnej.

Badany związek	Ogrzewanie	Dawka cytotoksyczna EC ₁₀ ± SD (µg/ml)		
		CCD 841 CoN	FHs 74 Int	THLE-2
Stigmasterol	Nieogrzewany	0,33 ± 0,03	0,65 ± 0,05	0,32 ± 0,01
	60 °C, 12 h	0,30 ± 0,02	0,69 ± 0,11	0,39 ± 0,05
	180 °C, 8 h	2,19 ± 0,21 ^c	7,50 ± 1,15 ^c	0,96 ± 0,24 ^b
Oleinian stigmasterolu	Nieogrzewany	> 40 (nw)	> 40 (nw)	> 40 (nw)
	60 °C, 12 h			
	180 °C, 8 h			
Linolan stigmasterolu	Nieogrzewany	> 40 (nw)	> 40 (nw)	> 40 (nw)
	60 °C, 12 h			
	180 °C, 8 h			
Badany związek	Ogrzewanie	Dawka cytotoksyczna EC ₅₀ ± SD (µg/ml)		
		CCD 841 CoN	FHs 74 Int	THLE-2
Stigmasterol	Nieogrzewany	2,95 ± 0,34	2,63 ± 0,84	2,67 ± 0,18
	60 °C, 12 h	3,29 ± 0,44	4,59 ± 0,69 ^a	3,26 ± 0,54
	180 °C, 8 h	16,09 ± 0,98 ^c	30,64 ± 0,55 ^c	13,97 ± 1,44 ^b
Oleinian stigmasterolu	Nieogrzewany	> 40 (nw)	> 40 (nw)	> 40 (nw)
	60 °C, 12 h			
	180 °C, 8 h			
Linolan stigmasterolu	Nieogrzewany	> 40 (nw)	> 40 (nw)	> 40 (nw)
	60 °C, 12 h			
	180 °C, 8 h			

nw – nie wykryto

Stigmasterol oraz produkty jego termicznej degradacji wykazywały zależne od dawki działanie hamujące wzrost wszystkich komórek zastosowanych w badaniach. Aktywność cytotoksyczna nieogrzewanego stigmasterolu dla komórek pochodzących z różnych tkanek kształtowała się na tym samym poziomie, na co wskazują zbliżone wartości dawki cytotoksycznej EC₅₀ wynoszące od 2,63 do 2,95 µg/ml (tabela 9). Wyniki testu MTT

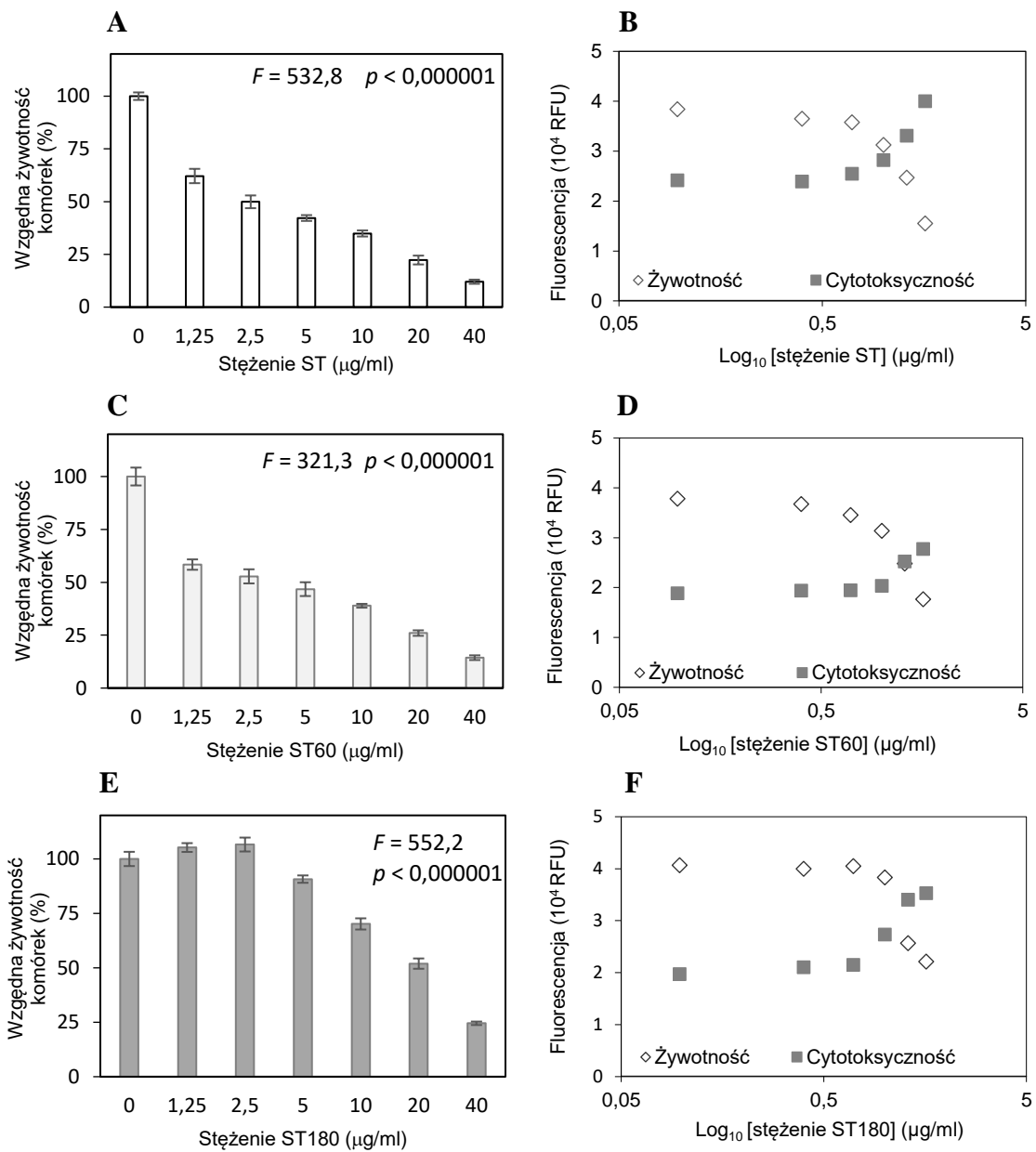
dokumentują zależny od dawki wpływ stigmasterolu na proliferację, żywotność i aktywność metaboliczną komórek nabłonka jelitowego i wątroby (ryc. 7A, 8A i 9A). Kolejny test MT-FMC zastosowany w analizach cytotoksyczności, wykazał, że ekspozycja na nieogrzewany stigmasterol prowadzi do ograniczenia ilości żywych komórek skorelowanego ze wzrostem liczby komórek martwych we wszystkich hodowlach analizowanych linii komórkowych (ryc. 7B, 8B i 9B).

Ogrzewanie stigmasterolu w temperaturze 60 °C przez 12 godzin nie wpłynęło znacząco na jego cytotoksyczność wobec badanych komórek (ryc. 7C, 8C i 9C). Wartości EC₅₀ wynosiły 3,29; 4,59 oraz 3,26 µg/ml odpowiednio dla linii komórkowych CCD 841 CoN, FHs 74 Int oraz THLE-2 (tabela 9). Wyniki testu MT-FMC potwierdzają dane uzyskane w teście MTT (ryc. 7D, 8D i 9D).

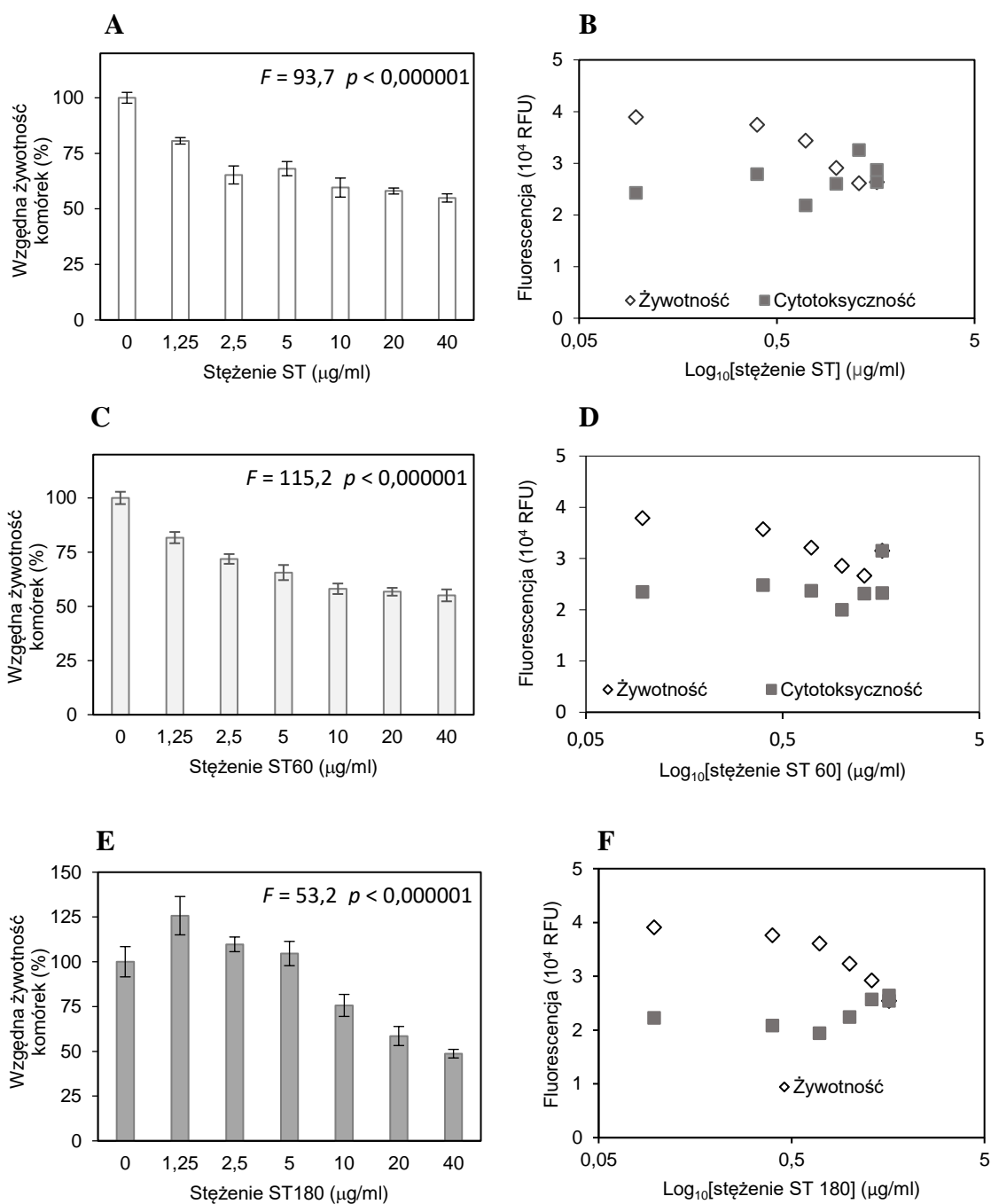
Ogrzewanie stigmasterolu w temperaturze 180 °C przez 8 godzin powodowało istotne zmiany w poziomie jego cytotoksyczności w stosunku do analizowanych komórek. Na rycinie 7E można zauważyć, że komórki linii CCD 841 CoN poddawane działaniu ogrzewanego w 180 °C stigmasterolu w niskich stężeniach (1,25 i 2,5 µg/ml) nie powodują istotnych zmian w proliferacji, żywotności i aktywności metabolicznej komórek. Nieznaczny spadek żywotności komórek zanotowano po inkubacji komórek z ogrzewanym stigmasterolem (180 °C) w stężeniu 2,19 µg/ml, które stanowi pierwszą dawkę cytotoksyczną (EC₁₀). Zwiększenie stężenia ogrzewanego stigmasterolu (180 °C) w hodowli komórek CCD 841 CoN do wartości 16,09 µg/ml spowodowało 50-procentowe ograniczenie ich proliferacji i żywotności (EC₅₀). Podobny efekt cytotoksyczny obserwowano w hodowli komórek wątroby THLE-2 (ryc. 9E). Istotnie niższą cytotoksyczność stigmasterolu ogrzewanego w temperaturze 180 °C wykazano dla komórek jelita cienkiego FHs 74 Int (ryc. 8E). Wartość EC₅₀ w tym przypadku wynosiła 30,64 µg/ml (tabela 9). Test MT-FMC potwierdził dane uzyskane w teście MTT (ryc.8F).

Estry stigmasterolu z kwasem oleinowym i linolowym wprowadzone do hodowli w stężeniach od 5 µg/ml do 40 µg/ml nie indukowały efektów cytotoksycznych w żadnej z badanych linii komórkowych (ryc. 10A, 11A, 12A, 13A, 14A i 15A). Co więcej, ich ogrzewanie w temperaturze 60 °C przez 12 godzin oraz w temperaturze 180 °C przez 8 godzin nie wpłynęło na zwiększenie cytotoksyczności w stosunku do prawidłowych komórek jelita cienkiego, grubego oraz wątroby (ryc. 10C, 10E, 11C, 11E, 12C, 12E, 13C, 13E, 14C, 14E, 15C, 15E). Wyjątek stanowią wyniki uzyskane w teście MT-FMC, które przedstawiają zwiększenie cytotoksyczności i ograniczenie żywotności komórek CCD 841 CoN

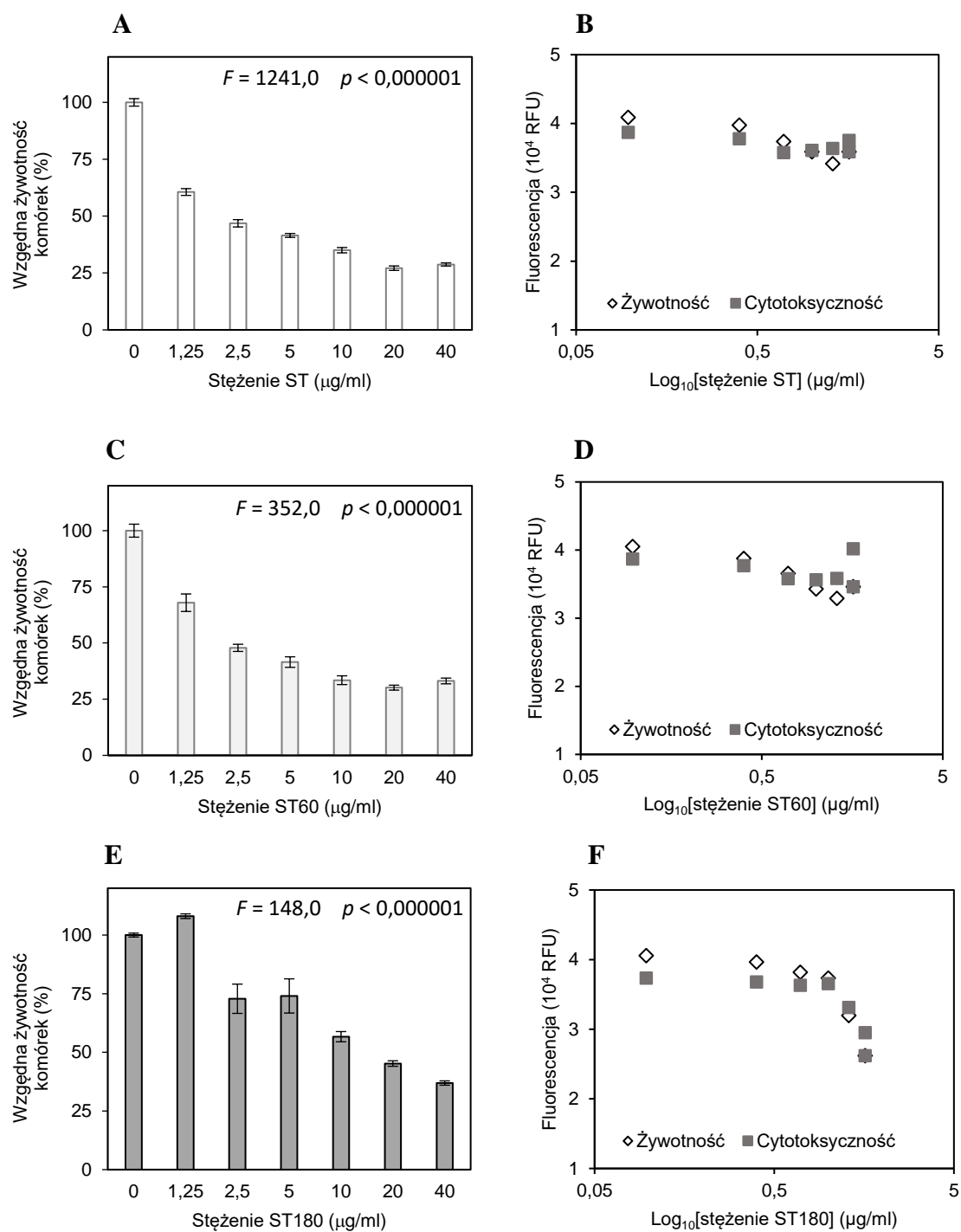
po traktowaniu ogrzewanym w 180 °C linolanem stigmasterolu w najwyższych stosowanych dawkach (20 µg/ml i 40 µg/ml) (ryc. 10F).



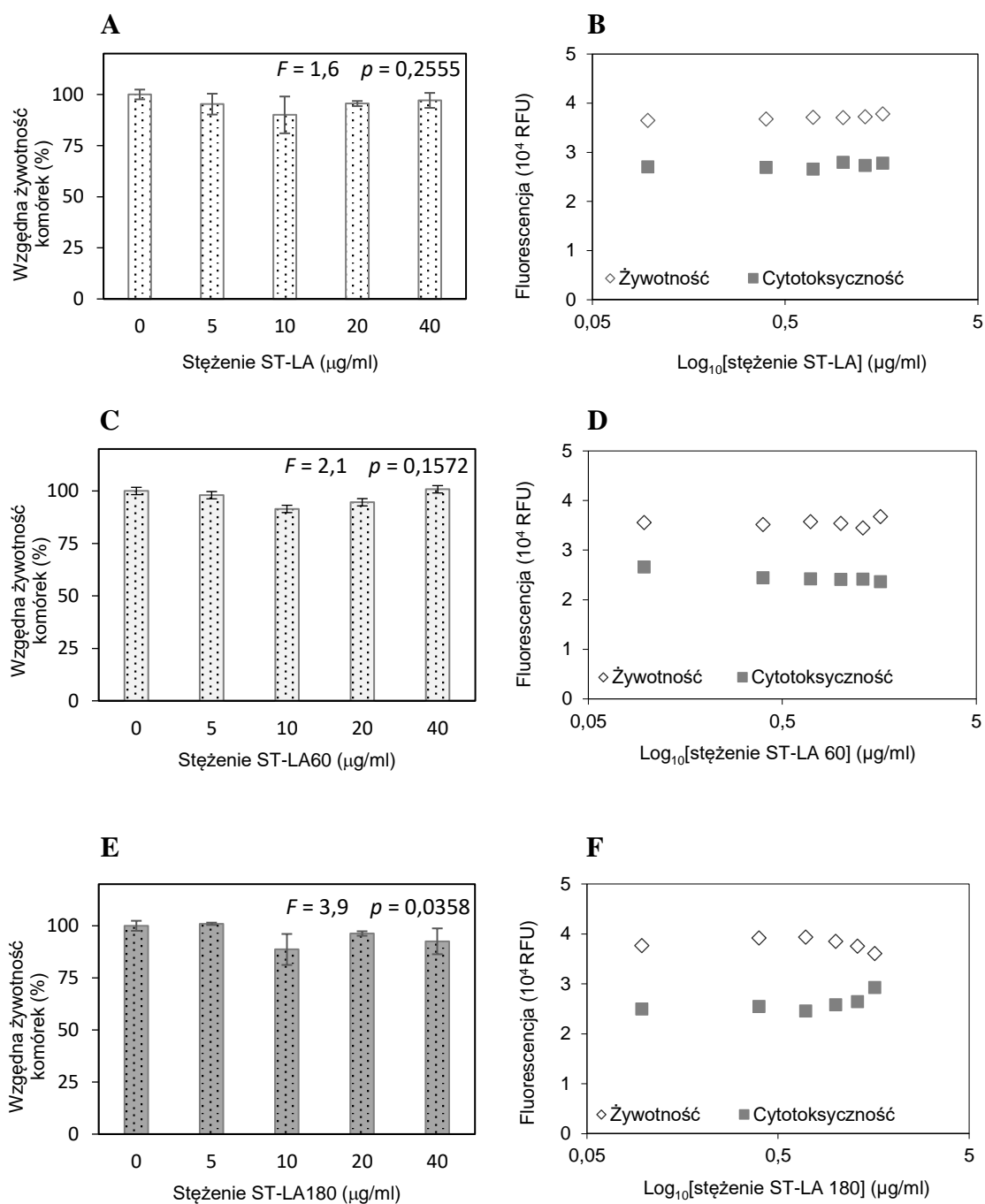
Rycina 7. Wpływ stigmasterolu (ST) nieogrzewanego (A, B) oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin (C, D) i 180 °C przez 8 godzin (E, F) na żywotność i aktywność metaboliczną komórek nabłonka okrężnicy linii CCD 841 CoN. Analizy wykonano za pomocą testu MTT (A, C, E) oraz skojarzonego testu MT-FMC (B, D, F). Dane stanowią średnie arytmetyczne z trzech niezależnych hodowli ± SD. Na wykresach pokazano wyniki analizy wariancji ANOVA (F, p) (n=3).



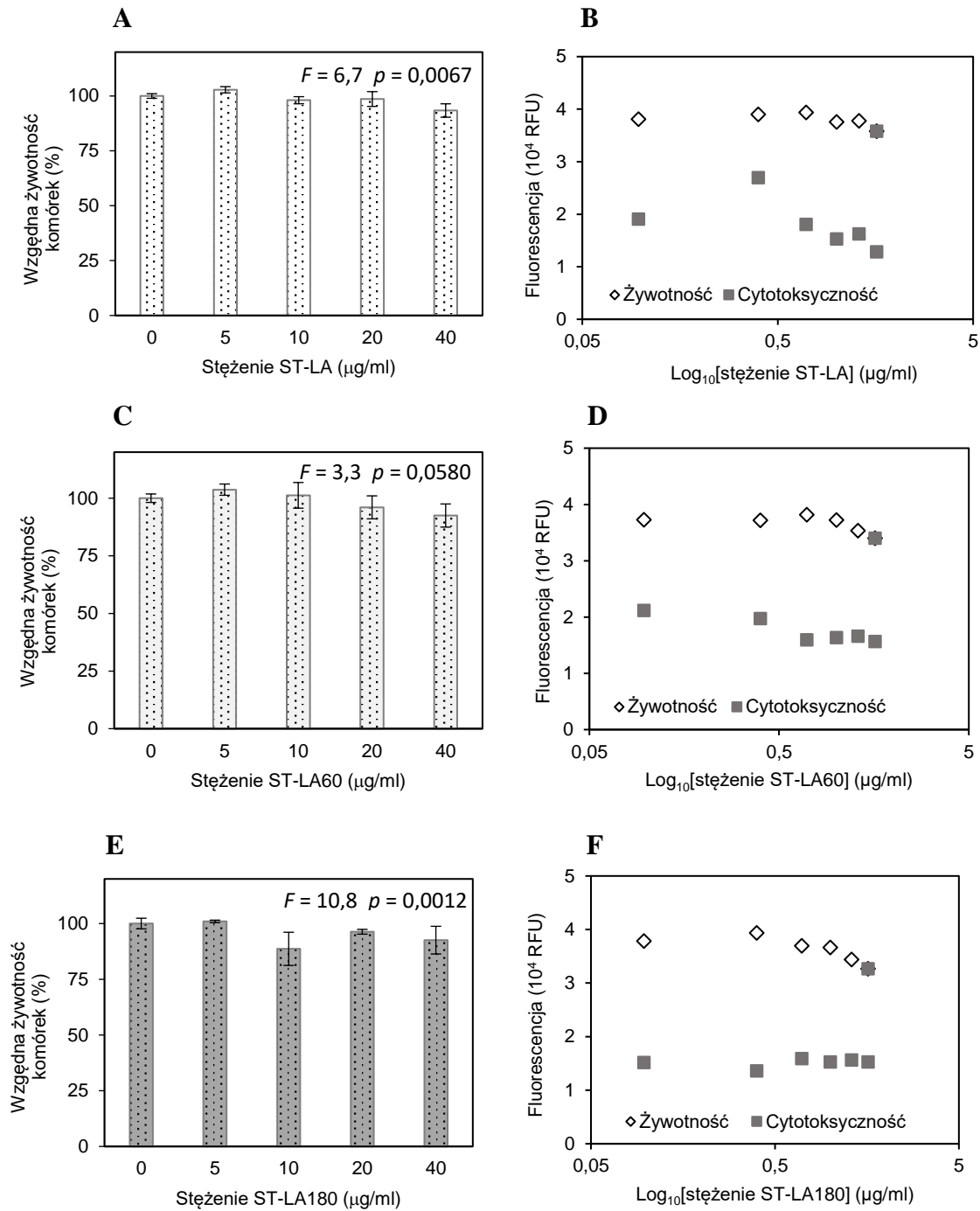
Rycina 8. Wpływ stigmasterolu (ST) nieogrzewanego (A, B) oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin (C, D) i 180 °C przez 8 godzin (E, F) na żywotność i aktywność metaboliczną komórek jelita cienkiego linii FHs 74 Int. Analizy wykonano za pomocą testu MTT (A, C, E) oraz skojarzonego testu MT-FMC (B, D, F). Dane stanowią średnie arytmetyczne z trzech niezależnych hodowli ± SD. Na wykresach pokazano wyniki analizy wariancji ANOVA (F, p) (n=3).



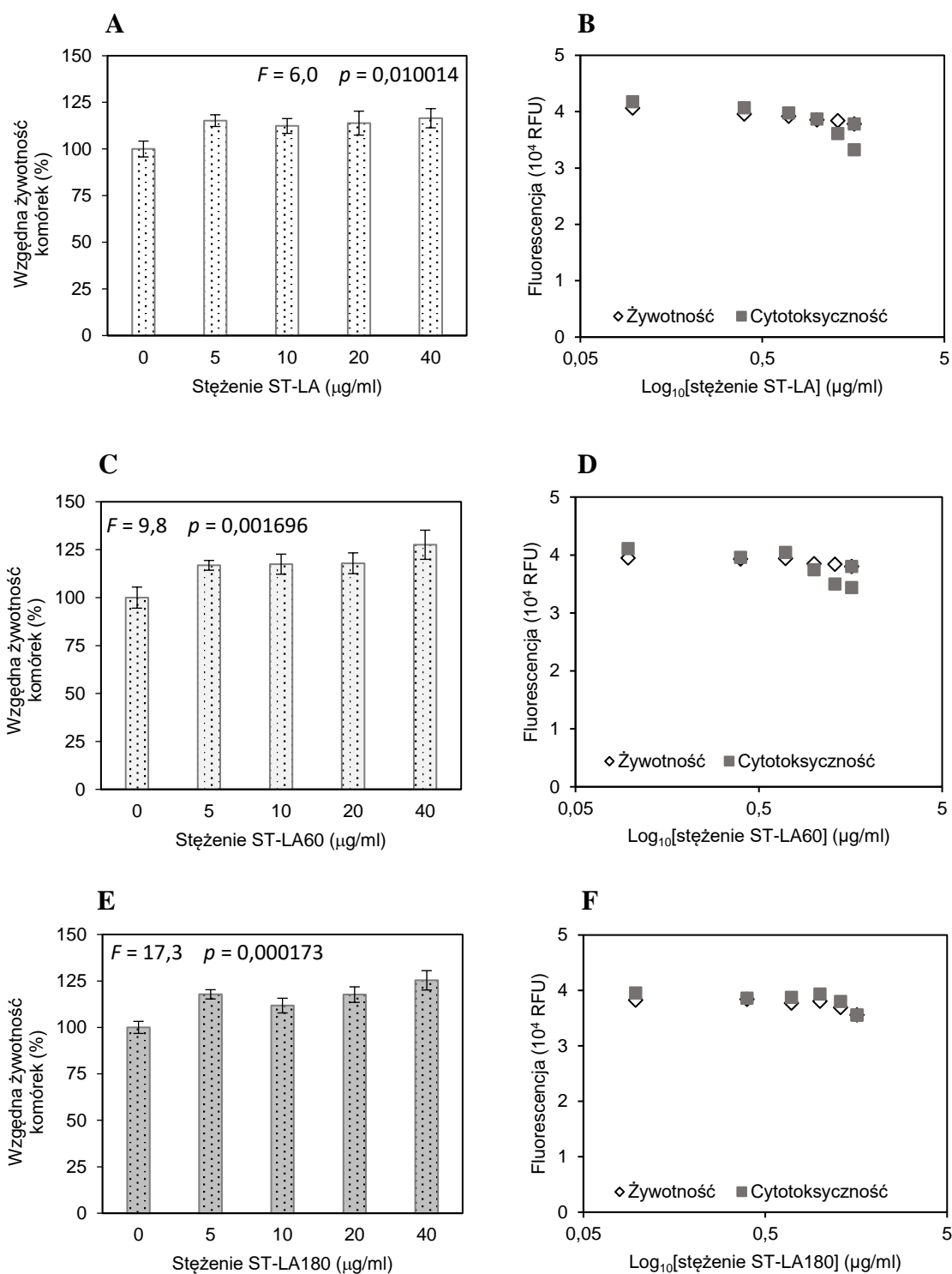
Rycina 9. Wpływ stigmasterolu (ST) nieogrzewanego (A, B) oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin (C, D) i 180 °C przez 8 godzin (E, F) na żywotność i aktywność metaboliczną komórek wątroby linii THLE-2. Analizy wykonano za pomocą testu MTT (A, C, E) oraz skojarzonego testu MT-FMC (B, D, F). Dane stanowią średnie arytmetyczne z trzech niezależnych hodowli ± SD. Na wykresach pokazano wyniki analizy wariancji ANOVA (F, p) (n=3).



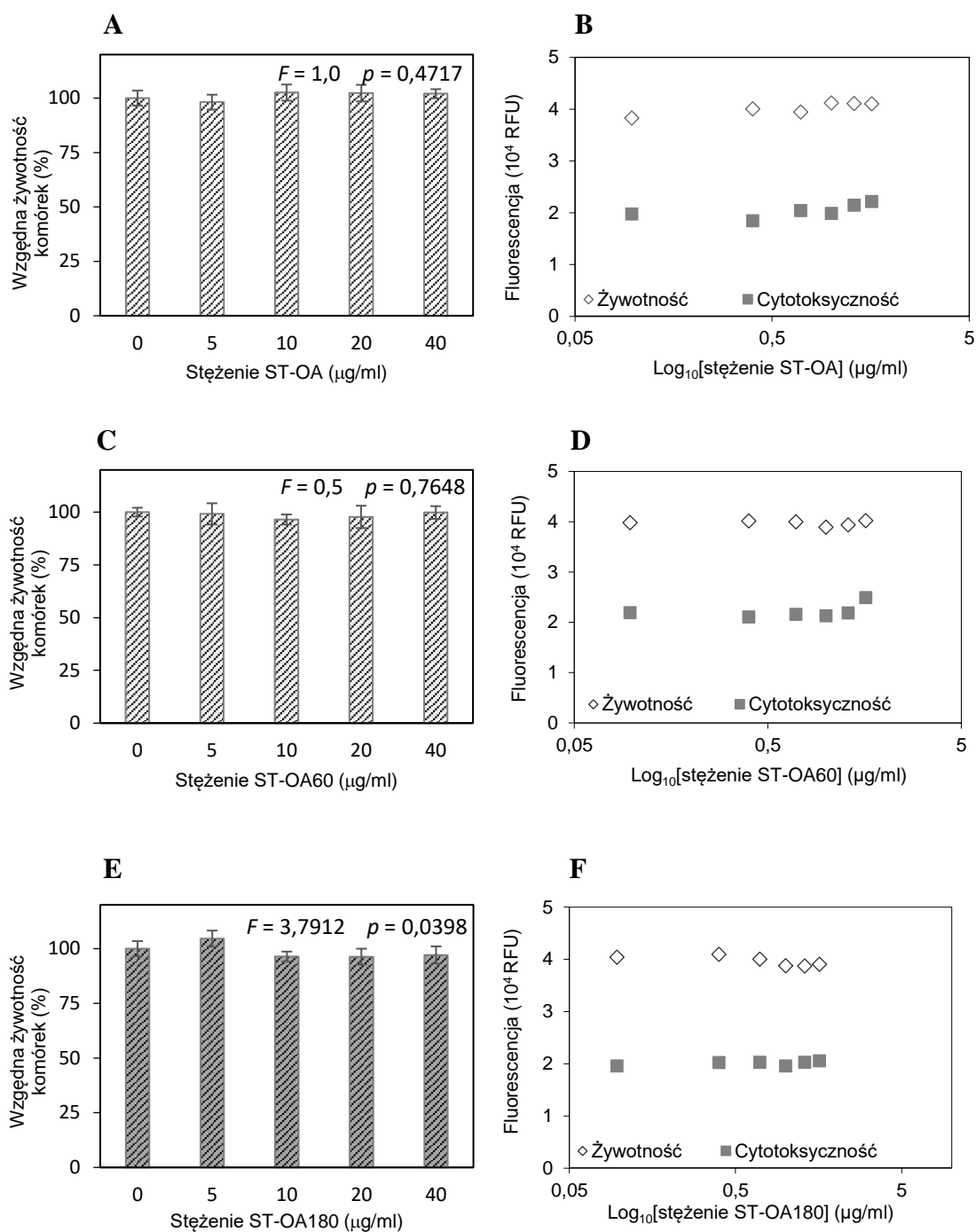
Rycina 10. Wpływ linolanu stigmasterolu (ST-LA) nieogrzewanego (A, B) oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin (C, D) i 180 °C przez 8 godzin (E, F) na żywotność i aktywność metaboliczną komórek nabłonka okrężnicy linii CCD 841 CoN. Analizy wykonano za pomocą testu MTT (A, C, E) oraz skojarzonego testu MT-FMC (B, D, F). Dane stanowią średnie arytmetyczne z trzech niezależnych hodowli ± SD. Na wykresach pokazano wyniki analizy wariancji ANOVA (F, p) (n=3).



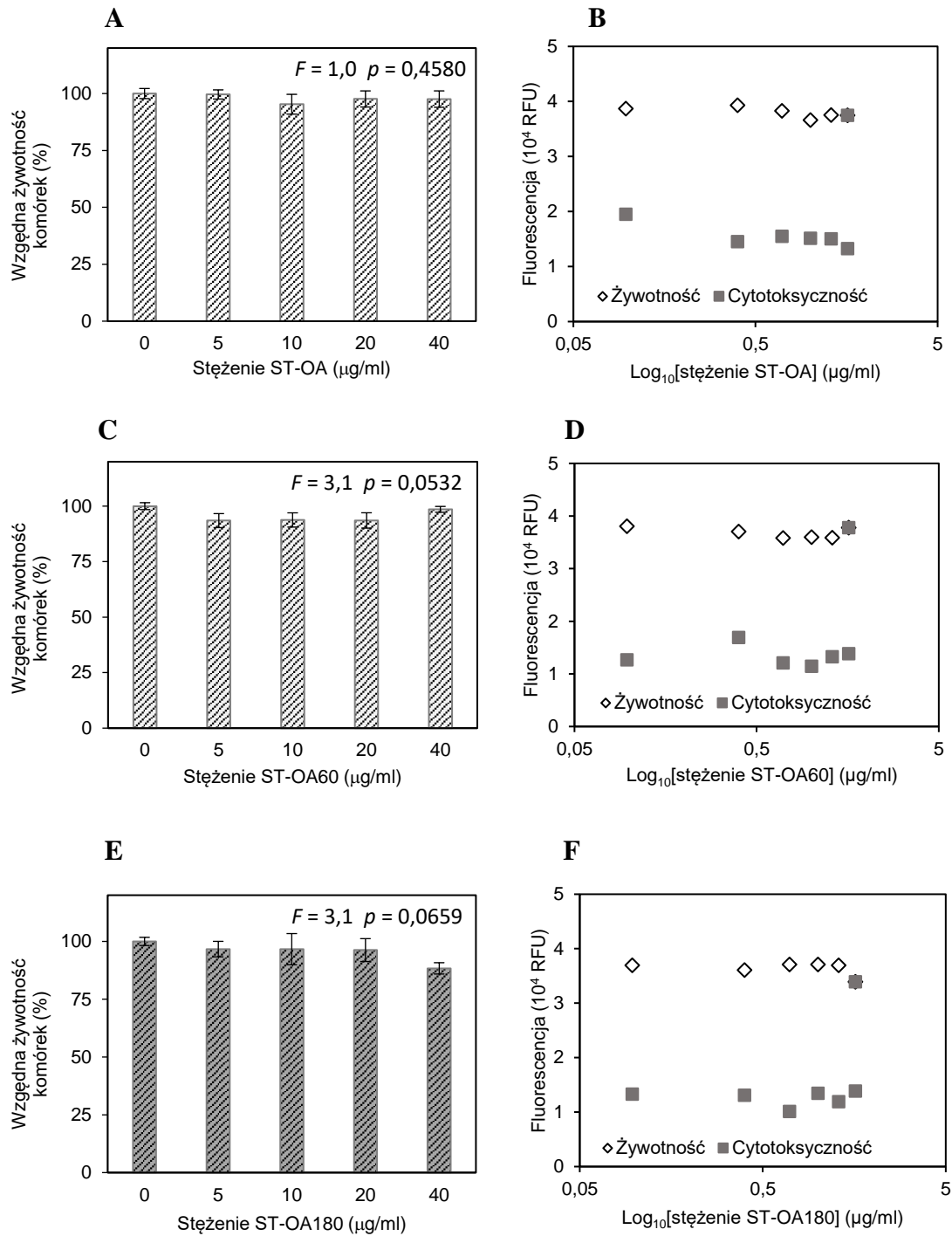
Rycina 11. Wpływ linolanu stigmasterolu (ST-LA) nieogrzewanego (A, B) oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin (C, D) i 180 °C przez 8 godzin (E, F) na żywotność i aktywność metaboliczną komórek jelita cienkiego linii FHs 74 Int. Analizy wykonano za pomocą testu MTT (A, C, E) oraz skojarzonego testu MT-FMC (B, D, F). Dane stanowią średnie arytmetyczne z trzech niezależnych hodowli \pm SD. Na wykresach pokazano wyniki analizy wariancji ANOVA (F, p) (n=3).



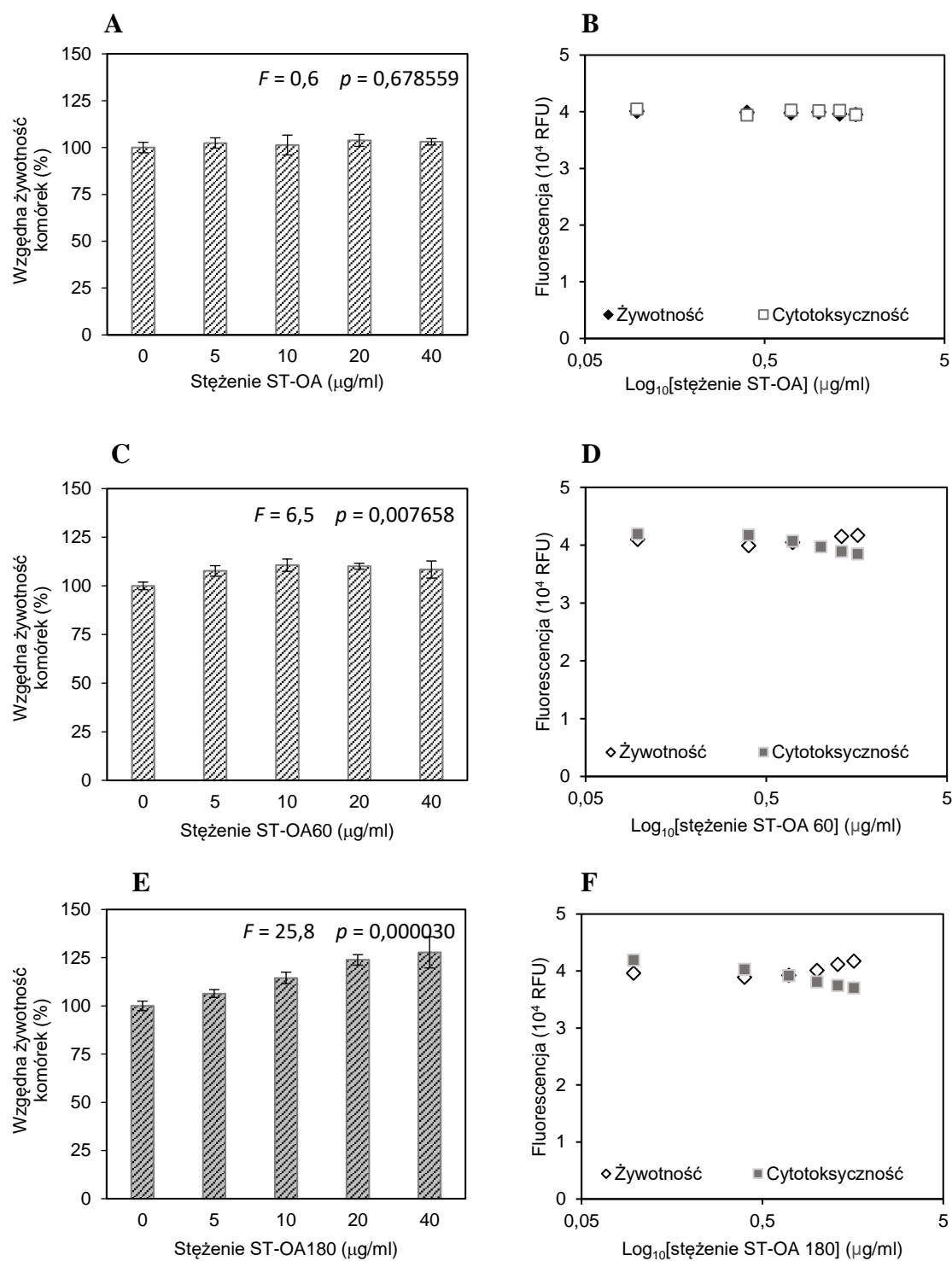
Rycina 12. Wpływ linolanu stigmasterolu (ST-LA) nieogrzewanego (A, B) oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin (C, D) i 180 °C przez 8 godzin (E, F) na żywotność i aktywność metaboliczną komórek wątroby linii THLE-2. Analizy wykonano za pomocą testu MTT (A, C, E) oraz skojarzonego testu MT-FMC (B, D, F). Dane stanowią średnie arytmetyczne z trzech niezależnych hodowli ± SD. Na wykresach pokazano wyniki analizy wariancji ANOVA (F, p) (n=3).



Rycina 13. Wpływ oleinianu stigmasterolu (ST-OA) nieogrzewanego (A, B) oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin (C, D) i 180 °C przez 8 godzin (E, F) na żywotność i aktywność metaboliczną komórek nabłonka okrężnicy linii CCD 841 CoN. Analizy wykonano za pomocą testu MTT (A, C, E) oraz skojarzonego testu MT-FMC (B, D, F). Dane stanowią średnie arytmetyczne z trzech niezależnych hodowli ± SD. Na wykresach pokazano wyniki analizy wariancji ANOVA (F, p) (n=3).



Rycina 14. Wpływ oleinianu stigmasterolu (ST-OA) nieogrzewanego (A, B) oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin (C, D) i 180 °C przez 8 godzin (E, F) na żywotność i aktywność metaboliczną komórek jelita cienkiego linii FHs 74 Int. Analizy wykonano za pomocą testu MTT (A, C, E) oraz skojarzonego testu MT-FMC (B, D, F). Dane stanowią średnie arytmetyczne z trzech niezależnych hodowli ± SD. Na wykresach pokazano wyniki analizy wariancji ANOVA (F, p) (n=3).

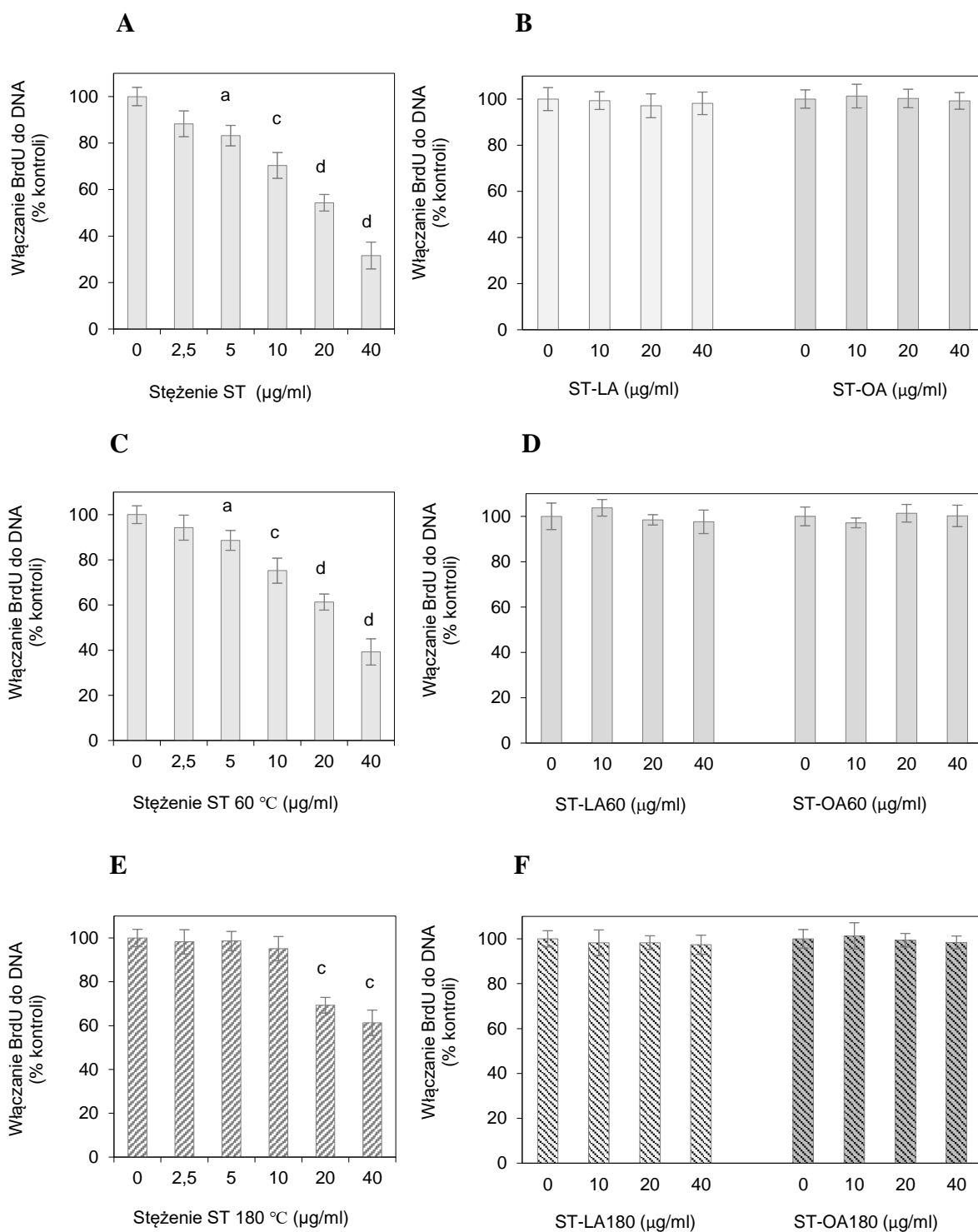


Rycina 15. Wpływ oleinianu stigmasterolu (ST-OA) nieogrzanego (A, B) oraz ogrzanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin (C, D) i 180 °C przez 8 godzin (E, F) na żywotność i aktywność metaboliczną komórek wątroby linii THLE-2. Analizy wykonano za pomocą testu MTT (A, C, E) oraz skojarzonego testu MT-FMC (B, D, F). Dane stanowią średnie arytmetyczne z trzech niezależnych hodowli ± SD. Na wykresach pokazano wyniki analizy wariancji ANOVA (F, p) (n=3).

Analizy wykonane za pomocą testu proliferacyjnego BrdU potwierdzają wyniki pozostałych testów. Ekspozycja komórek CCD 841 CoN na stigmasterol istotnie wpłynęła na syntezę DNA. Ilość BrdU włączonego do nowo zsyntetyzowanego DNA zmniejszała się wraz ze wzrostem dawki nieogrzewanego stigmasterolu. Stigmasterol w stężeniu 5 µg/ml indukował pierwsze efekty hamujące syntezę DNA (↓17%), natomiast w najwyższym stosowanym stężeniu wynoszącym 40 µg/ml obniżał replikację DNA o 68% (ryc. 16A). Działanie stigmasterolu ogrzewanego w temperaturze 60 °C (12 h) inhibujące syntezę DNA w komórkach CCD 841 CoN było zbliżone do działania stigmasterolu nieogrzewanego. W tym przypadku również dawka 5 µg/ml była pierwszą istotnie obniżającą poziom syntezy DNA (↓11%). Stigmasterol w największym analizowanym stężeniu obniżał poziom przyłączonego BrdU o 61% (ryc. 16C). Wyniki testu BrdU wskazują, że obróbka termiczna stigmasterolu w temperaturze 180 °C (8 h) obniżyła jego potencjał hamujący. Zakłócał on syntezę DNA w komórkach nabłonka jelita grubego dopiero w stężeniu 20 µg/ml, obniżając ją o 31%. Stigmasterol w najwyższym analizowanym stężeniu (40 µg/ml) ograniczał syntezę DNA o 39% (ryc. 16E). Estrы stigmasterolu z kwasem linolowym i oleinowym, niezależnie od ogrzewania, nie ingerowały w syntezę DNA w komórkach CCD 841 CoN (ryc. 16 B, 16D, 16E).

W literaturze nie ma wiele badań dotyczących oceny cytotoksyczności stigmasterolu i jego pochodnych dla ludzkich komórek izolowanych z tkanek prawidłowych. W pracy Tao i in. (2019) wykazano, że stigmasterol ma duży wpływ na żywotność komórek istotnych dla układu sercowo-naczyniowego, mianowicie dla ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC) i kardiomiocytów pochodzących z indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych iPSC31. Dodatkowo, u myszy stigmasterolemicznych zaobserwowano niekorzystny fenotyp sercowy, co wskazuje, że stigmasterol może być związkiem o potencjalnym działaniu toksycznym. Z kolei, Fayed i in. (2023) nie zaobserwowali efektów cytotoksycznych po ekspozycji komórek HUVEC na stigmasterol wyizolowany z rośliny *Centaurea pumilio* L., zastosowany w dawkach 2 – 50 µg/ml. Podobnie, najnowsze badania Zhang i in. (2023) wskazują, że stigmasterol w stężeniach 0 – 40 µg/ml nie wpływa na proliferację prawidłowych komórek nabłonka oskrzeli BEAS-2B.

Cytotoksyczność estrów stigmasterolu (oleinowego, linolowego i linolenowego) dla komórek białaczki limfoblastycznej CCRF-CEM oraz CCRF-VCR1000 analizowano w pracy Raczyk i in. (2018). Stwierdzono brak działania cytotoksycznego oleinianu stigmasterolu. Linolan stigmasterolu oraz linolenian stigmasterolu wykazywały słabą aktywność cytotoksyczną w stosunku do analizowanych komórek nowotworowych.



Rycina 16. Wpływ stigmasterolu (ST) (A, C, E), linolanu stigmasterolu (ST-LA) i oleinianu stigmasterolu (ST-OA) (B, D, F) nieogrzewanych (A, B), ogrzewanych w temperaturze 60 °C przez 12 godzin (C, D) i 180 °C przez 8 godzin (E, F) na syntezę DNA w komórkach nabłonka okrężnicy linii CCD 841 CoN. Dane przedstawiają wartości średnie ± SD (n=3). ^a p < 0.05, ^b p < 0.01, ^c p < 0.001, ^d p < 0.0001 (test Tukey'a post hoc).

Alemany i in. (2012) opisali brak potencjału cytotoksycznego 7-ketostigmasterolu dla komórek nowotworowych okrężnicy Caco-2. Co więcej, 7-ketostigmasterol osłabiał cytotoksyczne działanie 7-ketocholesterolu w hodowli komórek Caco-2. Badania cytotoksyczności z wykorzystaniem komórek nowotworowych prowadzili również O'Callaghan i in. (2010), którzy analizowali wpływ utlenionych pochodnych stigmasterolu na komórki limfoblastyczne płuc linii U937. Autorzy obserwowali istotne zmniejszenie populacji komórek U937 po 24 godzinach inkubacji z następującymi pochodnymi stigmasterolu: 7 β -OH, epoksydiolem, diepoksydem i 22R,23R-triolem. Natomiast, w przypadku pochodnych α - i β -epoksydowych, 7-ketostigmasterolu oraz 3,5,6-triolu nie stwierdzono efektów cytotoksycznych wobec komórek U937.

4.5. Genotoksyczność stigmasterolu i jego estrów

Potencjalną genotoksyczność stigmasterolu i jego estrów analizowano za pomocą elektroforezy pojedynczych komórek w żelu agarozowym, powszechnie nazywanej metodą kometową. Analizy wykonano na prawidłowych komórkach jelita grubego linii CCD 841 CoN. Wyniki przedstawiono na rycinach 17-19, pokazujących klasy komet w populacji (ryc. 17), zawartość DNA w ogonach komet i parametr TCS (ryc. 19) oraz dokumentację fotograficzną (ryc. 18).

Dane uzyskane w analizie kometowej wskazują, że stigmasterol oraz jego estry z kwasem oleinowym oraz linolowym w najwyższych stosowanych stężeniach (40 μ g/ml) nie indukują rozległych uszkodzeń nici DNA w komórkach nabłonka jelita grubego. Niewielki wpływ na uszkodzenie DNA uwidoczniło przy podziale komet na klasy według ilości DNA w ogonie komety (ryc.17). W populacji komórek kontrolnych zidentyfikowano jedynie dwie klasy komet – klasę 0 (komórki bez uszkodzeń DNA) oraz klasę 1 (komórki z małą ilością uszkodzeń DNA). W populacji komórek poddanych działaniu stigmasterolu oznaczono obecność komet klasy 1 z niską zawartością DNA w ogonie komety (1 – 25%) w ilości 41,8%; 41,0% oraz 37,2% odpowiednio dla stigmasterolu nieogrzewanego oraz ogrzewanego w 60 °C i w 180 °C. Ekspozycja komórek na estry stigmasterolu w formie nieogrzewanej skutkowałą mniejszą zawartością komet klasy 1, natomiast większym udziałem komet klasy 0 w populacji (ryc.17).

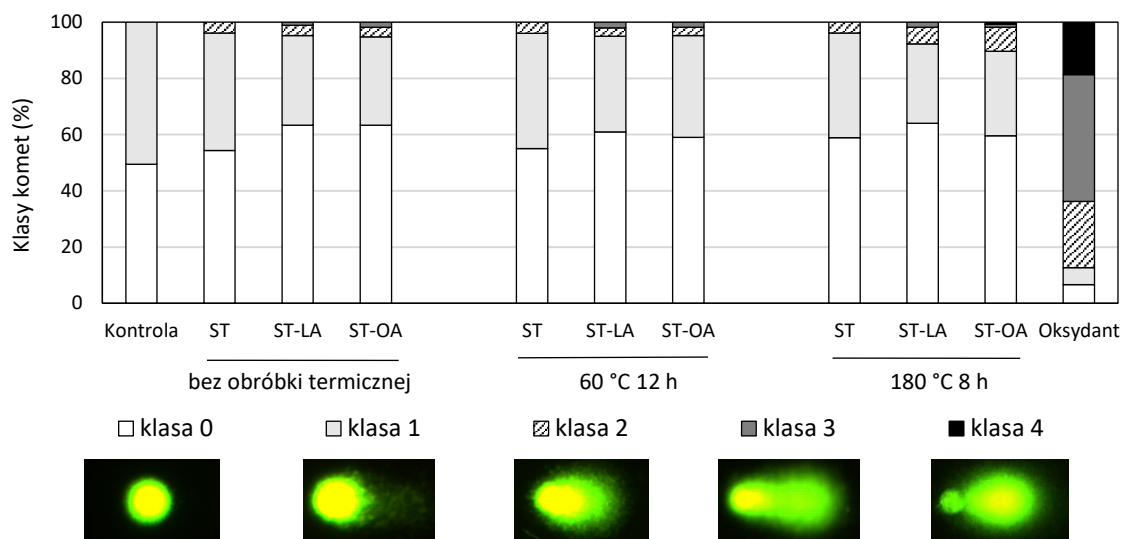
Podczas analizy komórek traktowanych stigmasterolem (zarówno nieogrzewanym, jak i ogrzewanym w temperaturze 60 °C oraz 180 °C) stwierdzono obecność komet klasy 2, charakteryzujących się średnią zawartością DNA w ogonie komety na poziomie 25%–45%.

Komety klasy 2 stanowiły odpowiednio 3,9%; 4,0% oraz 3,8% w populacji komórek inkubowanych ze stigmasterolem nieogrzewanym, ogrzewanym w 60 °C i ogrzewanym w 180 °C (ryc. 17). Komety należące do klasy 2 oznaczono również w hodowli komórek inkubowanych z nieogrzewanym oleinianem (3,3%) oraz linolanem (3,7%) stigmasterolu. Największą grupę komet z uszkodzeniami DNA na poziomie 25%-45% zanotowano po ekspozycji komórek na estry ogrzewane w 180 °C; ich udział procentowy wynosił 5,9% i 8,5% odpowiednio dla komórek traktowanych linolanem i oleinianem stigmasterolu. Ponadto, w populacji komórek eksponowanych na estry linolowy i oleinowy zidentyfikowano nieliczne komórki posiadające uszkodzenia DNA na poziomie 45%-70% sklasyfikowane do klasy 3. Zawartość komet klasy 3 wynosiła 1 – 2% populacji traktowanej estrami stigmasterolu, zależnie od ich ogrzewania. W wyniku traktowania komórek nieogrzewanym stigmasterolem w analizie kometowej nie wykazano obecności komet tej klasy. Chociaż zidentyfikowano nieznaczną liczbę komet klasy 3, ocena parametru TCS nie wykazała istotnych różnic w rozkładzie klas komet po ekspozycji komórek na żaden z analizowanych związków (ryc. 19B).

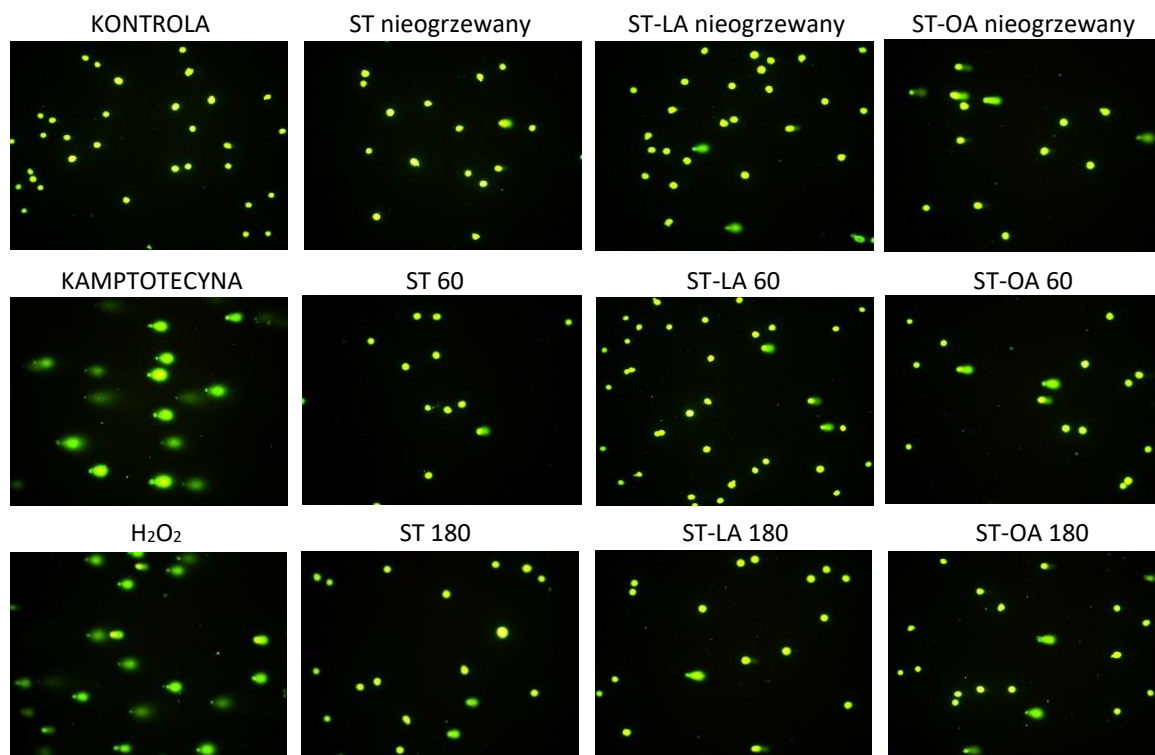
Bardzo wysoki poziom uszkodzeń DNA (>70% uszkodzeń DNA w ogonie komety) obserwowano w pojedynczych komórkach eksponowanych na oleinian stigmasterolu ogrzewany w temperaturze 180 °C (0,7%). Najwyższy stopień uszkodzeń DNA i największą populację komórek o bardzo wysokich uszkodzeniach DNA (18,7%) zanotowano w hodowli komórek po inkubacji ze związkiem referencyjnym (H₂O₂) indukującym oksydacyjne uszkodzenia DNA. Analiza kometowa przeprowadzona w ramach pracy nie wykazała statystycznie istotnych uszkodzeń i pęknięć nici DNA pojawiających się w komórkach eksponowanych na stigmasterol i jego estry oraz pochodne powstające podczas ich ogrzewania.

Podobnie, Saddiq i in. (2022) w badaniach na myszach nie stwierdzili genotoksycznego i toksycznego działania ekstraktu etanolowego pozyskanego z rośliny *Calotropis procera* zawierającego w swoim składzie stigmasterol. Co więcej, ekstrakt ten zmniejszał genotoksyczność indukowaną przez cyklofosfamid w sposób zależny od dawki (Saddiq i in., 2022). W innych badaniach prowadzonych na modelu mysim analizowano ekstrakt z rośliny *Rubus niveus* Thunb., którego jednym z głównych składników był stigmasterol. Genotoksyczność oznaczono za pomocą testu kometowego oraz testu mikrojądrowego na leukocytach i komórkach szpiku kostnego myszy uprzednio traktowanych ekstraktem z *Rubus niveus* Thunb w dawkach 500, 1000 i 2000 mg/kg. W eksperymencie wykazano brak działania genotoksycznego analizowanego ekstraktu. Ponadto, stwierdzono znaczące zmniejszenie uszkodzeń DNA i aberracji chromosomowych pod wpływem działania

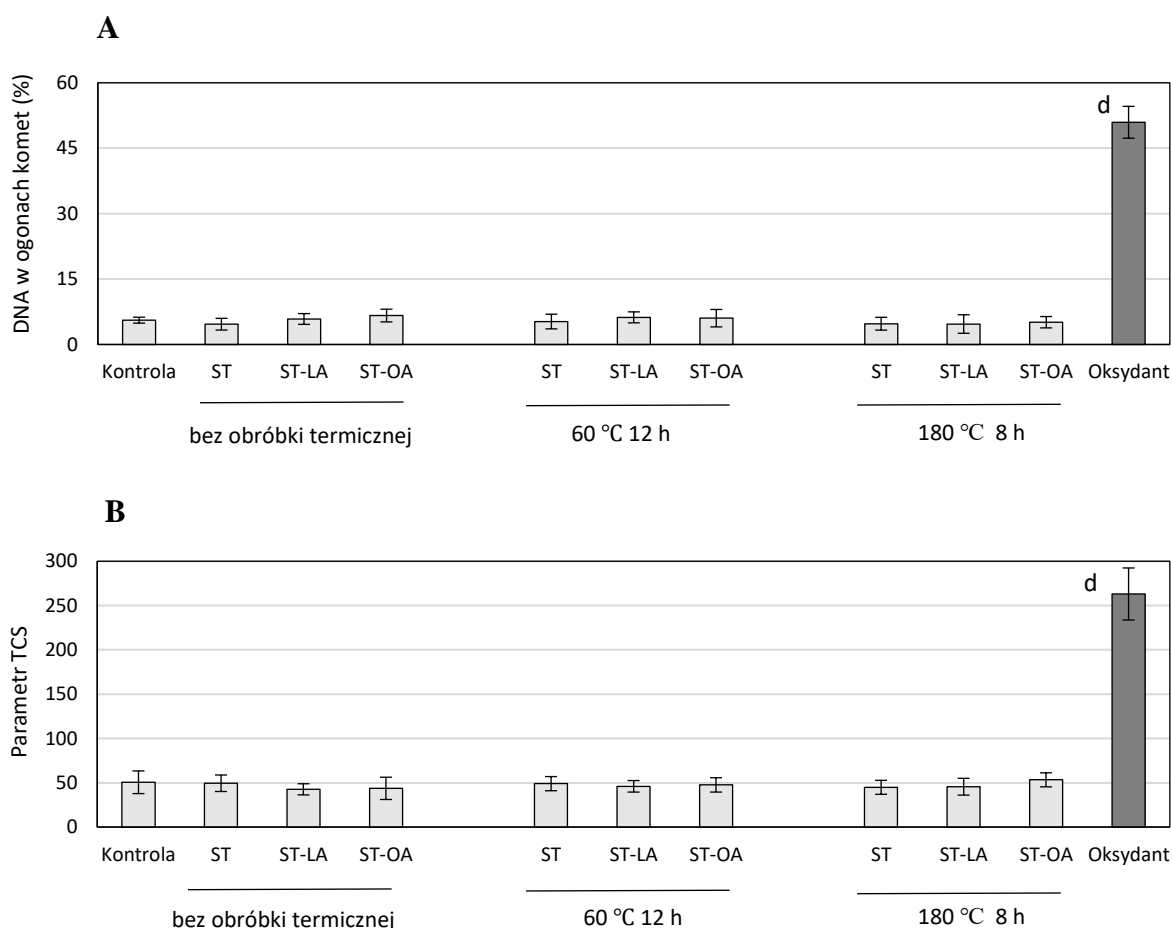
ekstraktu u zwierząt, u których wywołano uszkodzenia DNA poprzez podanie doksorubicyny (Tolentino i in., 2015).



Rycina 17. Pęknięcia nici DNA wykrywane w komórkach nabłonka jelita grubego po ekspozycji na stigmasterol (ST), linolan stigmasterolu (ST-LA) i oleinian stigmasterolu (ST-OA) nieogrzewane i ogrzewane w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin. Analizowane związki były stosowane w stężeniu 40 µg/ml. Jako kontrolę pozytywną zastosowano H₂O₂ (100 µM). W zależności od zawartości DNA w ogonach komet, komety klasyfikowano do 5 klas: klasa 0 (brak uszkodzeń DNA; <1%), klasa 1 (małe uszkodzenia DNA; 1–25%), klasa 2 (średnie uszkodzenia DNA; 25–45%), klasa 3 (duże uszkodzenia DNA; 45–70%), klasa 4 (bardzo duże uszkodzenia DNA; >70%).



Rycina 18. Obrazy komórek traktowanych analizowanymi związkami w dawce 40 µg/ml, po zatopieniu w agarozie, elektroforezie w warunkach alkalicznych i wybarwieniu barwnikiem SybrGold. Zdjęcia wykonano pod mikroskopem fluorescencyjnym przy powiększeniu 100×.

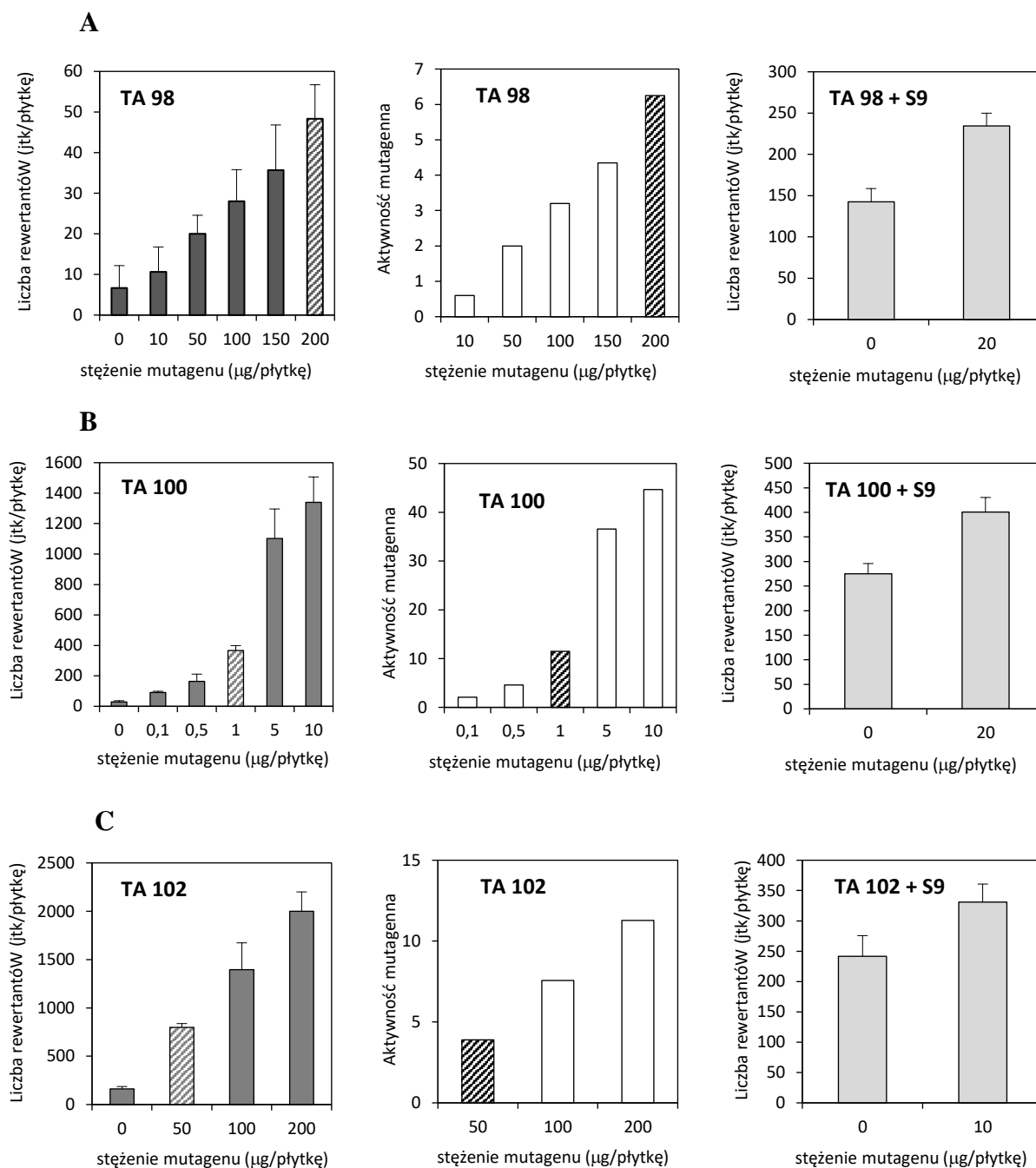


Rycina 19. Wyniki analizy kometowej przedstawiające poziom uszkodzeń DNA w komórkach nabłonka jelita grubego po ekspozycji na stigmasterol (ST), linolan stigmasterolu (ST-LA) i oleinian stigmasterolu (ST-OA) nieogrzewane i ogrzewane w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin. Analizowane związki były stosowane w stężeniu 40 µg/ml. Jako związek referencyjny zastosowano H₂O₂ (100 µM) w celu detekcji oksydacyjnych uszkodzeń DNA w komórkach. Na wykresach pokazano procentową zawartość DNA w ogonach komet (A) i parametr TCS (Total Comet Score) obliczony według równania $TCS = 0(n) + 1(n) + 2(n) + 3(n) + 4(n)$, gdzie “n” oznacza ilość komórek w każdej klasie komet (0, 1, 2, 3, 4) (B). Dane przedstawiono jako wartości średnie ± SD (n=3). ^a p ≤ 0.05, ^b p ≤ 0.01, ^c p ≤ 0.001, ^d p ≤ 0.0001 względem kontroli negatywnej (test t-Studenta).

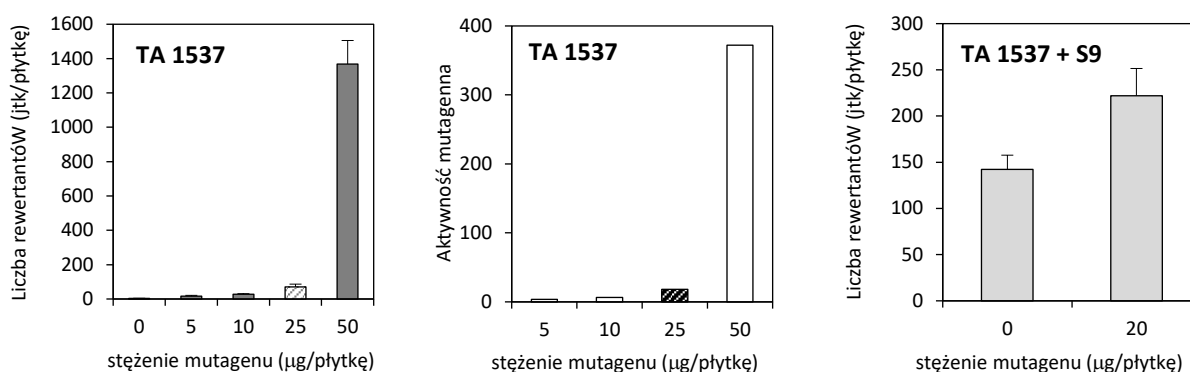
4.6. Potencjał mutagenny i promutagenny stigmasterolu i jego estrów

Do detekcji potencjalnego działania mutagennego i/lub promutagennego stigmasterolu i jego estrów zastosowano test mutacji powrotnych Amesa i cztery zmutowane szczepy bakterii *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102 i TA1537. W kontrolach pozytywnych użyto związki referencyjne o udowodnionym działaniu mutagennym. W celu weryfikacji poprawności działania bakteryjnego układu modelowego wykonano analizy optymalizacyjne w oparciu o mutageny referencyjne. Wyniki analiz wstępnych przedstawiono na rycinie 20. Na ich podstawie ustalono dawki mutagenów referencyjnych zastosowane w analizach nad

potencjałem mutagennym/promutagennym stigmasterolu, estrów stigmasterolu i produktów powstających podczas ich obróbki termiczno-oksydacyjnej. Aktywność mutagenną związków referencyjnych przedstawiono w tabeli 10.



D



Rycina 20. Indukcja rewersji mutacji i aktywność mutagenna w analizowanych szczepach bakterii *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102 i TA1537 z zastosowaniem mutagenów i promutagenów referencyjnych. Jako związki wzorcowe zastosowano: 2-aminofluoren (TA98) (A), azydek sodu (TA100) (B), wodoronadtlenek tert-butyli (TA102) (C) i 9-aminoakrydynę (TA1537) (D) bez aktywacji metabolicznej (-S9) oraz 2-aminoantracen z aktywacją metaboliczną (+S9).

Tabela 10. Aktywność mutagenna wyznaczona dla mutagenów referencyjnych zastosowanych w teście Ames

Mutagen referencyjny (µg/płytkę)	Aktywacja metaboliczna	Aktywność mutagenna (AM)			
		TA98	TA100	TA102	TA1537
2-aminofluoren (200 µg/płytkę)	-	6,25	-	-	-
azydek sodu (1 µg/płytkę)	-	-	11,49	-	-
tert-butyli-H ₂ O ₂ (50 µg/płytkę)	-	-	-	3,90	-
9-aminoakrydyna (25 µg/płytkę)	-				18,18
2-aminoantracen (20 µg/płytkę)	+	0,64	0,46	-	0,56
2-aminoantracen (10 µg/płytkę)	+	-	-	0,37	-

Wyniki analizy potencjału mutagennego stigmasterolu, jego estrów oraz produktów ich termicznej degradacji przedstawiono na rycinie 21, natomiast aktywność mutagenną związków zamieszczono w tabeli 11.

Szczep *S. typhimurium* TA98 wykrywa różne mutageny powodujące zmiany ramki odczytu (Maron i Ames, 1983). Mutagenem referencyjnym zastosowanym do analiz był 2-aminofluoren. Ilość rewertantów szczepu TA98 zwiększyła się jedynie pod wpływem stigmasterolu nieogrzewanego oraz ogrzewanego w temperaturze 180 °C (8 h) w obecności frakcji mikrosomalnej. Żaden z pozostałych analizowanych związków niezależnie od aktywacji metabolicznej nie wykazywał potencjału mutagennego w stosunku do szczepu TA98. Wartości

aktywności mutagennej (AM) wyznaczone dla wszystkich badanych związków z zastosowaniem szczepu TA 98 wynosiły poniżej 2, czyli minimalnej wartości AM wymaganej dla związków mutagennych. Dla porównania, wartość AM oznaczona dla mutagenu referencyjnego wynosiła 6,25 (tabela 10).

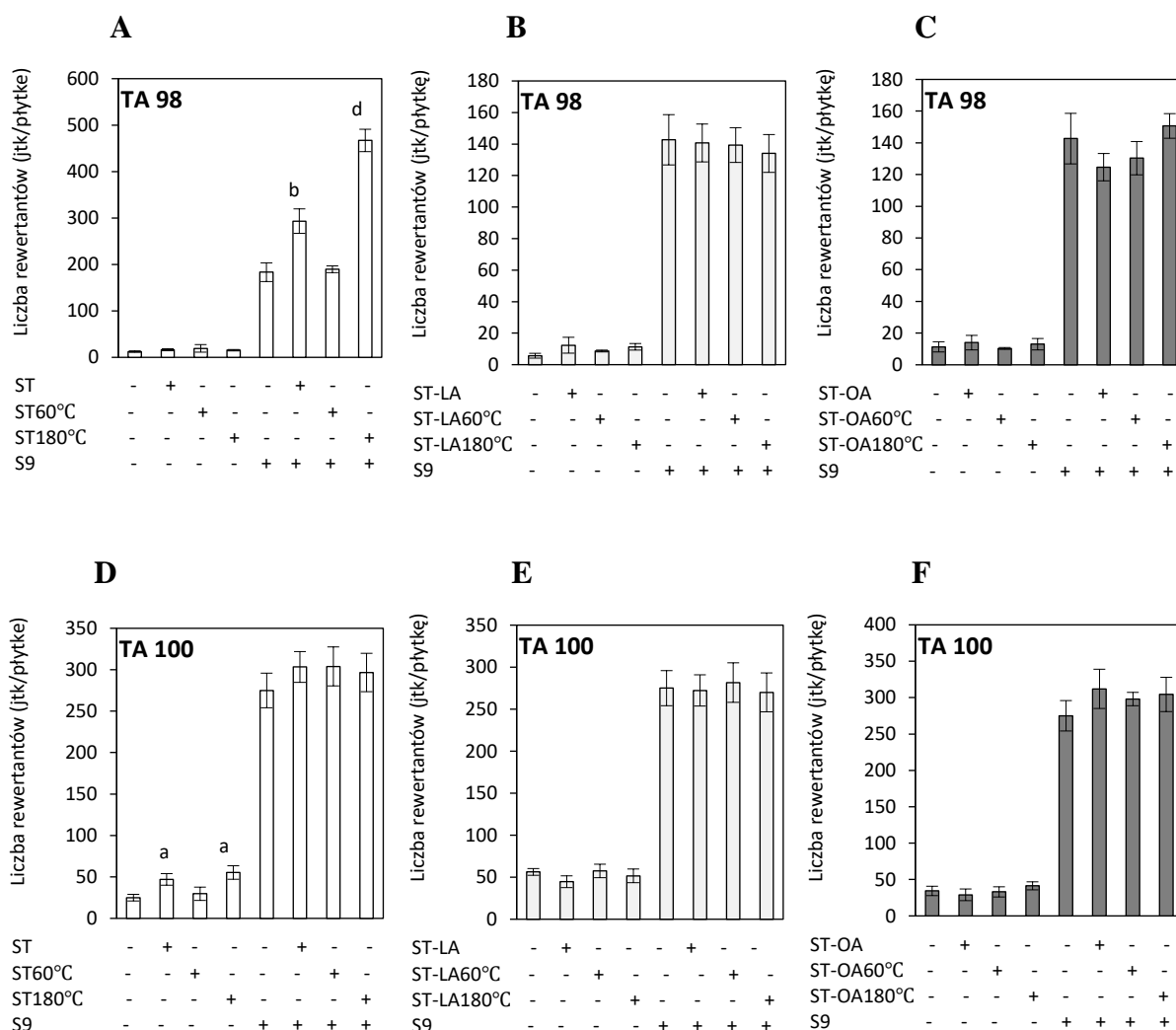
Szczep *S. typhimurium* TA100 pozwala na wykrywanie mutacji polegających na podstawieniu par zasad (Maron i Ames, 1983). Mutagenem referencyjnym zastosowanym dla tego szczepu był azydek sodu. Zwiększenie liczebności rewertantów tego szczepu spowodował jedynie stigmasterol nieogrzewany i ogrzewany w temperaturze 180 °C bez udziału aktywacji metabolicznej. Pozostałe badane związki, niezależnie od aktywacji metabolicznej, nie miały wpływu na liczebność bakterii szczepu TA100. Żaden z analizowanych związków nie wykazywał AM powyżej 2. AM dla mutagenu wzorcowego wynosiła 11,49 (tabela 10).

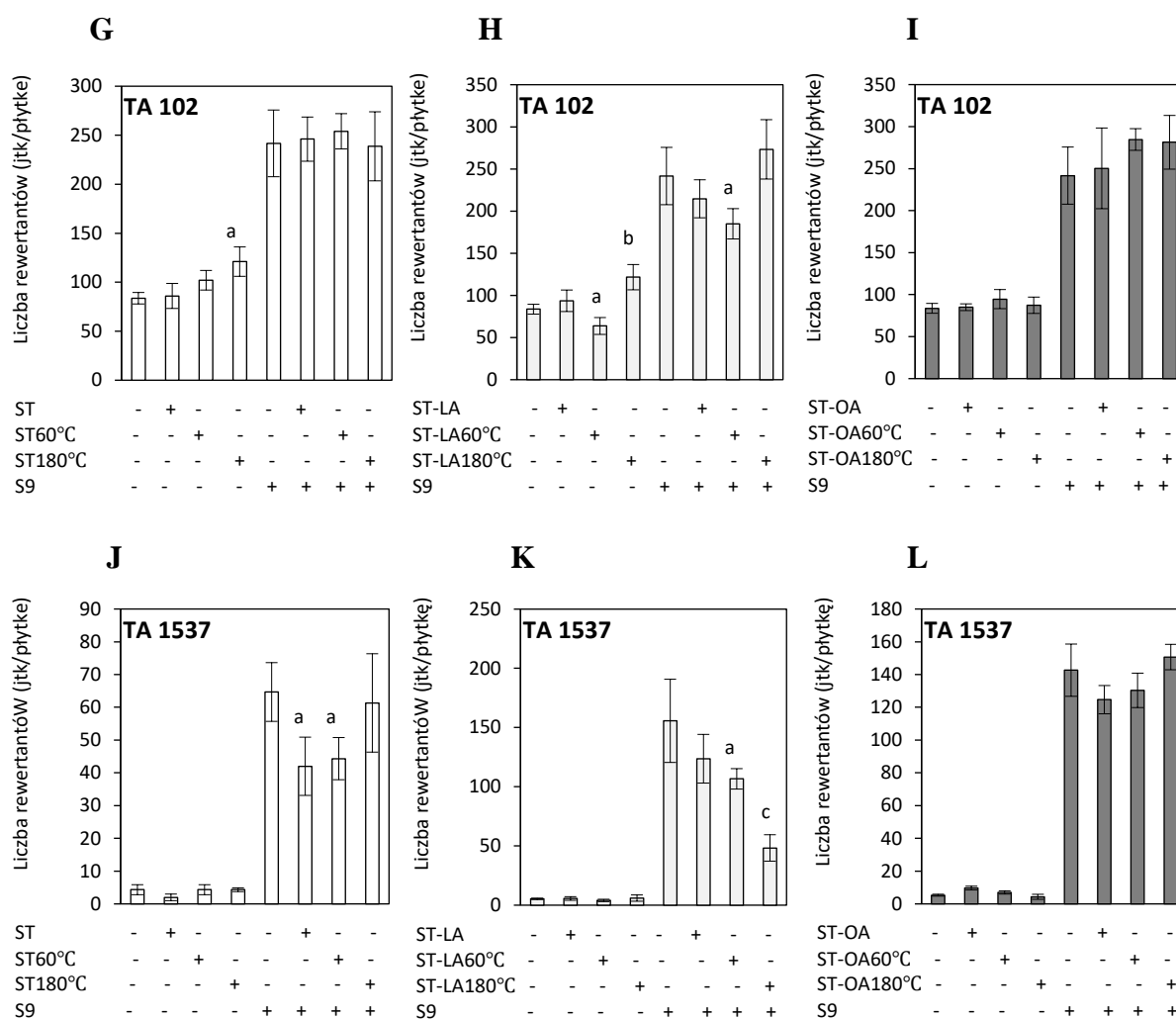
Szczep *S. typhimurium* TA102 jest stosowany do wykrywania aktywności mutagennej związanej z potencjałem oksydacyjnym (Maron i Ames, 1983; Levin i in., 1982). Jako mutagen referencyjny dla tego szczepu wykorzystano wodoronadtlenek tert-butyli. Stigmasterol oraz linolan stigmasterolu ogrzewane w 180 °C bez frakcji mikrosomalnej zwiększały ilość rewertantów tego szczepu, a linolan stigmasterolu ogrzewany w 60 °C niezależnie od aktywacji metabolicznej ją obniżał. Oleinian stigmasterolu niezależnie od aktywacji metabolicznej nie wpływał na liczebność bakterii szczepu TA 102. Działanie związków na bakterie szczepu TA102 można określić jako słabe, o czym świadczy wartość AM mniejsza od 2. Dla porównania, AM dla mutagenu referencyjnego wynosiła 3,90 (tabela 10).

Szczep *S. typhimurium* TA1537 pozwala na wykrycie mutagenów zmieniających ramkę odczytu (Ames i in., 1973). Mutagenem referencyjnym zastosowanym w analizie na tym modelu była 9-aminoakrydyna. Obniżenie liczebności komórek tego szczepu spowodował stigmasterol nieogrzewany oraz ogrzewany w temperaturze 60 °C, a także linolan stigmasterolu ogrzewany w 60 °C i 180°C z dodatkiem frakcji mikrosomalnej. Oleinian stigmasterolu niezależnie od aktywacji metabolicznej i obróbki termicznej nie wpływał na liczebność bakterii szczepu TA1537 (ryc. 21L). W szczepie TA1537 badane związki także nie wykazały działania mutagennego (AM<2), natomiast AM mutagenu referencyjnego wynosiła 18,18 (tabela 10).

Do tej pory przeprowadzono kilka badań nad mutagennością stigmasterolu, jego estrów i produktów ich termicznej degradacji. Test odwrotnej mutacji z wykorzystaniem zmutowanych szczepów bakterii *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 i TA1537 nie wykazał mutagenności i promutagenności mieszaniny estrów fitosteroli z 18-procentowym udziałem estrów stigmasterolu (Wolfreys i Hepburn, 2002). Również mieszanina utlenionych

pochodnych fitosteroli, powstała w wyniku długotrwałego ogrzewania koncentratu estrów fitosteroli, zawierającego 19% estrów fitosteroli, nie wywołała efektów mutagennych w szczepach TA98, TA100, TA1535, TA1537 i TA102 bakterii *Salmonella typhimurium* (Lea i in., 2004). Analizowano także ekstrakt z liści rośliny *Crotalaria pallida* oraz wyizolowany z niego stigmasterol. Jedyńm z badanych szczepów, na które mutagenie działał wymieniony ekstrakt był szczep *Salmonella typhimurium* TA98. Jednak wyizolowany stigmasterol nie wykazał działania mutagennego w stosunku do tego szczepu, zarówno w obecności, jak i przy braku enzymów metabolizujących (Boldrin i in., 2013). Podobnie, ekstrakt chloroformowy zawierający stigmasterol pozyskany z liści rośliny *Alchornea triplinervia* nie wykazał działania mutagennego w teście Ames (Calvo i in., 2010).





Rycina 21. Wpływ stigmasterolu (ST), linolanu stigmasterolu (ST-LA) i oleinianu stigmasterolu (ST-OA) nieogrzewanych i ogrzewanych w temperaturze 60°C (12 h) i 180°C (8 h) na rewersję mutacji w szczepach bakterii *Salmonella typhimurium* TA98 (A-C), TA100 (D-F), TA102 (G-I) i TA1537 (J-L) bez dodatku i z dodatkiem frakcji mikrosomalnej (S9). Analizy wykonano po ekspozycji komórek na związki w dawce 40 µg/ml. Różnice statystycznie istotne na poziomie ^a p ≤ 0,05, ^b p ≤ 0,01, ^c p ≤ 0,001, ^d p ≤ 0,0001.

Tabela 11. Aktywność mutagenna stigmasterolu (ST), linolanu stigmasterolu (ST-LA) oraz oleinianu stigmasterolu (ST-OA) w szczepach *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102 i TA 1537 wyliczona w teście odwróconej mutacji *Salmonella* z (+S9) oraz bez aktywacji metabolicznej (-S9)

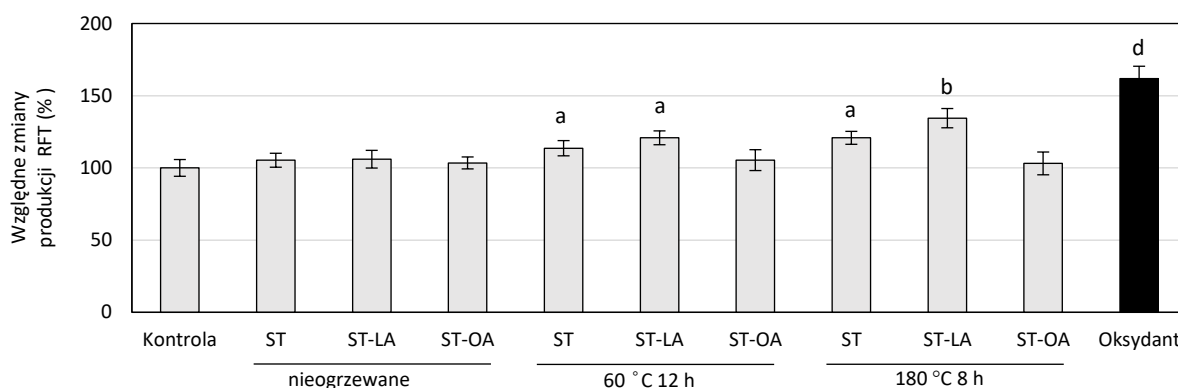
Szczep	AM	Stigmasterol					
		Nieogrzewany		60 °C 12 h		180 °C 8 h	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98		0,32	0,60	0,57	-0,01	0,24	-0,1
		Linolan stigmasterolu					
		Nieogrzewany		60 °C 12 h		180 °C 8 h	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
		1,18	-0,01	0,53	-0,02	1	-0,06

	Oleinian stigmasterolu						
	Nieogrzewany		60 °C 12 h		180 °C 8 h		
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
	0,24	-0,13	-0,09	-0,09	0,15	0,06	
	Stigmasterol						
	Nieogrzewany		60 °C 12 h		180 °C 8 h		
-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9		
0,88	0,10	0,19	0,11	1,21	0,08		
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	Linolan stigmasterolu						
	Nieogrzewany		60 °C 12 h		180 °C 8 h		
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
	-0,21	-0,01	0,02	0,02	-0,08	-0,02	
	Oleinian stigmasterolu						
	Nieogrzewany		60 °C 12 h		180 °C 8 h		
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
	-0,16	0,13	-0,04	0,08	0,20	0,11	
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA102	Stigmasterol					
		Nieogrzewany		60 °C 12 h		180 °C 8 h	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
		0,03	0,02	0,22	0,05	0,45	-0,01
Linolan stigmasterolu							
Nieogrzewany		60 °C 12 h		180 °C 8 h			
-S9		+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
0,12		-0,11	-0,24	-0,23	0,45	0,13	
Oleinian stigmasterolu							
Nieogrzewany		60 °C 12 h		180 °C 8 h			
-S9		+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
0,02		0,04	0,13	0,18	0,04	0,16	
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	Stigmasterol						
	Nieogrzewany		60 °C 12 h		180 °C 8 h		
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
	-0,54	-0,35	0,00	-0,31	0,00	-0,05	
	Linolan stigmasterolu						
	Nieogrzewany		60 °C 12 h		180 °C 8 h		
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
	0,06	-0,21	-0,25	-0,31	0,13	-0,69	
	Oleinian stigmasterolu						
	Nieogrzewany		60 °C 12 h		180 °C 8 h		
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
	0,81	-0,13	0,31	-0,09	-0,19	0,06	

4.7. Wpływ stigmasterolu i estrów stigmasterolu na produkcję reaktywnych form tlenu w komórkach

Wpływ badanych związków na wytwarzanie RFT w prawidłowych komórkach jelita grubego CCD 841 CoN przedstawiono na rycinie 22. W kontroli pozytywnej zastosowano H₂O₂

w stężeniu 50 μM w celu indukcji produkcji RFT w komórkach. Stigmasterol oraz jego estry linolowy i oleinowy niepoddawane ogrzewaniu wprowadzone do hodowli komórkowej w najwyższej analizowanej dawce (40 $\mu\text{g/ml}$) nie wpływały na poziom RFT w badanych komórkach. Jednakże w komórkach traktowanych stigmasterolem oraz jego estrem linolowym, które były ogrzewane w temperaturze 60 °C przez 12 godzin, wykazano istotne zwiększenie wytwarzania RFT. Wzrost wewnątrzkomórkowych RFT wynosił 14% oraz 21% odpowiednio dla stigmasterolu oraz linolanu stigmasterolu. Ester oleinowy stigmasterolu po ogrzewaniu w tych warunkach nie powodował zwiększenia ilości RFT w komórkach (ryc. 22). Podobne efekty obserwowano w komórkach eksponowanych na stigmasterol oraz linolan stigmasterolu po ogrzewaniu w temperaturze 180 °C przez 8 h. Poziom wewnątrzkomórkowych RFT zwiększył się odpowiednio o 21% i 34% po traktowaniu stigmasterolem i linolanem stigmasterolu. Ester oleinowy stigmasterolu ogrzewany w 180 °C nie indukował generowania RFT w komórkach (ryc. 22).



Rycina 22. Wpływ stigmasterolu (ST), linolanu stigmasterolu (ST-LA) i oleinianu stigmasterolu (ST-OA) nieogrzewanych i ogrzewanych w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin na wewnątrzkomórkową produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach nabłonka jelitowego okrężnicy CCD 841 CoN. Analizy wykonano po ekspozycji komórek na związki w dawce 40 $\mu\text{g/ml}$. Nadtlenek wodoru H_2O_2 (50 μM) zastosowano jako związek referencyjny generujący w komórkach stres oksydacyjny. Dane są wyrażone jako średnie z trzech niezależnych eksperymentów \pm SD. ^a $p \leq 0.05$, ^b $p \leq 0.01$, ^c $p \leq 0.001$, ^d $p \leq 0.0001$ w odniesieniu do nietraktowanych komórek kontrolnych (test t-Studenta).

RFT w niskich i umiarkowanych dawkach regulują normalne funkcje fizjologiczne związane z progresją i proliferacją cyklu komórkowego, różnicowaniem, migracją i śmiercią komórek. Jednakże ich nadmierna akumulacja powoduje uszkodzenia oksydacyjne makrocząsteczek komórkowych (białek, lipidów, DNA), błon i organelli, co może indukować apoptotyczną śmierć komórki (Redza-Dutordoir i Averill-Bates, 2016). Zhang i in. (2023) wykazali, że stigmasterol w dawkach 0 – 40 $\mu\text{g/ml}$ obniża stres oksydacyjny w prawidłowych

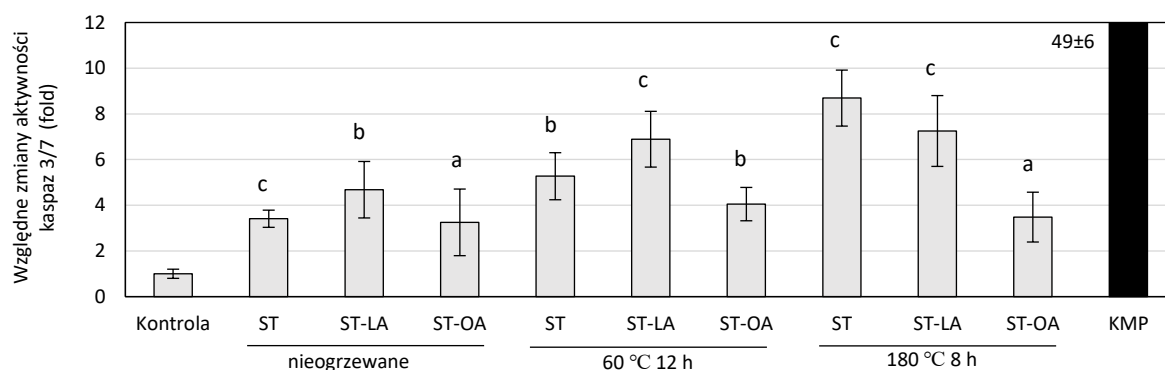
ludzkich komórkach nabłonka oskrzeli BEAS-2B. Wyniki badań Mongkolpobsin i in. (2023) sugerują, że stigmasterol wyizolowany z kwiatów *Azadirachta indica* w mysich komórkach hipokampa (HT-22) hamuje indukowaną glutaminianem śmierć komórek nerwowych poprzez zmniejszanie wewnątrzkomórkowej akumulacji RFT i osłabianie depolaryzacji błony mitochondrialnej, wraz z aktywacją enzymów antyoksydacyjnych. Po 24 godzinach inkubacji z 1 μ M stigmasterolem, w komórkach nerwiaka zarodkowego SH-SY5Y zaobserwowano osłabienie wewnątrzkomórkowego wytwarzania RFT na poziomie porównywalnym z działaniem resweratrolu (Pratiwi i in. 2021). Z drugiej strony, stigmasterol indukował wysoką nadprodukcję RFT w komórkach Caco-2 (López-García i in., 2017). Wpływ produktów oksydacji stigmasterolu na wewnątrzkomórkową produkcję RFT i aktywowaną przez nie apoptozę w ludzkich komórkach pochodzących z tkanek prawidłowych nie został wcześniej opisany. Kilka badań sugeruje jednak kluczową rolę stresu oksydacyjnego w apoptozie indukowanej przez produkty utleniania cholesterolu (Leonarduzzi i in., 2006; Woo i in., 2022).

4.8. Wpływ stigmasterolu i estrów stigmasterolu na aktywność kaspaz 3/7

Potencjalne działanie apoptotyczne stigmasterolu, linolanu stigmasterolu oraz oleinianu stigmasterolu wykrywano poprzez oznaczenie ich wpływu na aktywność kaspaz-3/7 w prawidłowych komórkach jelita grubego CCD 841 CoN. Wyniki analiz przedstawiono na rycinie 23. Uzyskane dane wskazują, że wszystkie analizowane związki w dawce 40 μ g/ml powodowały zwiększenie aktywności kaspazy-3/7 w eksponowanych komórkach. Najwyższą reaktywnością charakteryzował się linolan stigmasterolu, który w postaci nieogrzewanej spowodował 4,7-krotny wzrost aktywności kaspaz 3/7, natomiast po ogrzewaniu w temperaturze 60 °C (12 h) i 180 °C (8 h) zwiększał aktywność tych enzymów 6,9- i 7,3-krotnie. Duży wpływ na aktywność kaspaz 3/7 miał również stigmasterol ogrzewany w 180 °C, zwiększając 8,7-krotnie aktywność enzymów (ryc. 23).

Wyniki badań nad proapoptotycznym czy antyapoptotycznym działaniem stigmasterolu, opublikowane w literaturze, nie są jednoznaczne. W zależności od pochodzenia komórek i dawki fitosterolu dane raportowane przez autorów prowadziły do różnych wniosków. W pracy Li i in. (2018), stosując barwienie DAPI, wykazano, że stigmasterol indukuje apoptozę w komórkach raka żołądka SNU-1 w sposób zależny od dawki. Dane uzyskane w badaniach AmeliMojarad i in. (2022) również potwierdziły, że stigmasterol istotnie obniża ekspresję genów antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-XL oraz indukuje apoptozę w komórkach nowotworu piersi linii MCF-7. Podobnie, proapoptotyczne działanie

stigmasterolu udokumentowano w ludzkich komórkach raka żołądka linii SGC-7901 i MGC-803. Apoptoza indukowana stigmasterolem przebiegała z podwyższoną ekspresją białka Bax przyspieszającego apoptozę, rozszczepienie kaspazy-3 i PARP oraz obniżoną ekspresję białka Bcl-2 (Zhao i in., 2021). Stigmasterol w dawkach 0 – 20 $\mu\text{g/ml}$ stymulował również rozszczepienie kaspazy-3 i kaspazy-9 w komórkach raka jajnika linii ES2 i OV90. Ponadto, aktywował on cytochrom C oraz białka proapoptotyczne Bak i Bax w obu liniach komórkowych (Bae i in., 2020). W badaniach O’Callaghan i in. (2010), utlenione pochodne stigmasterolu: epoksydiol, 7 β -OH oraz diepoksyd powodowały istotny wzrost populacji komórek apoptotycznych w hodowli komórek nowotworowych U937, zaś pochodne 7-keto, β -epoksy i 22R,23R-triol nie indukowały w nich apoptozy.



Rycina 23. Wpływ stigmasterolu (ST), linolanu stigmasterolu (ST-LA) i oleinianu stigmasterolu (ST-OA) nieogrzewanych i ogrzewanych w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin na aktywność kaspaz 3/7 w komórkach nabłonka jelitowego okrężnicy CCD 841 CoN. Analizy wykonano po ekspozycji komórek na związki w dawce 40 $\mu\text{g/ml}$. Kamptotecynę (KMP) w dawce 50 nM zastosowano jako związek referencyjny indukujący proces apoptozy. Dane są wyrażone jako średnie z trzech niezależnych eksperymentów ($n=3$). ^a $p \leq 0.05$, ^b $p \leq 0.01$, ^c $p \leq 0.001$, ^d $p \leq 0.0001$ w odniesieniu do nietraktowanych komórek kontrolnych (test t-Studenta).

Z kolei badania Pratiwi i in. (2021) wykazały, że w komórkach neuroblastycznych SH-SY5Y traktowanych wstępnie 1 μM stigmasterolem i wystawionych na działanie H_2O_2 zmniejszył się odsetek komórek apoptotycznych a poziom białka antyapoptotycznego Bcl-2 nie uległ obniżeniu w stosunku do komórek kontrolnych. Podobnie, w badaniach przeprowadzonych przez Lee i in. (2018) wykazano, że stigmasterol jest silnym inhibitorem apoptozy indukowanej za pomocą peptydu β -amyloidu ($\text{A}\beta_{25-35}$) w komórkach PC12 chromochłonnego guza pochodzenia szczurzego. Natomiast w badaniach Trouillas i in. (2005) stigmasterol nie powodował typowej dla apoptozy fragmentacji DNA, w ludzkich komórkach kostniakomięsaka 1547.

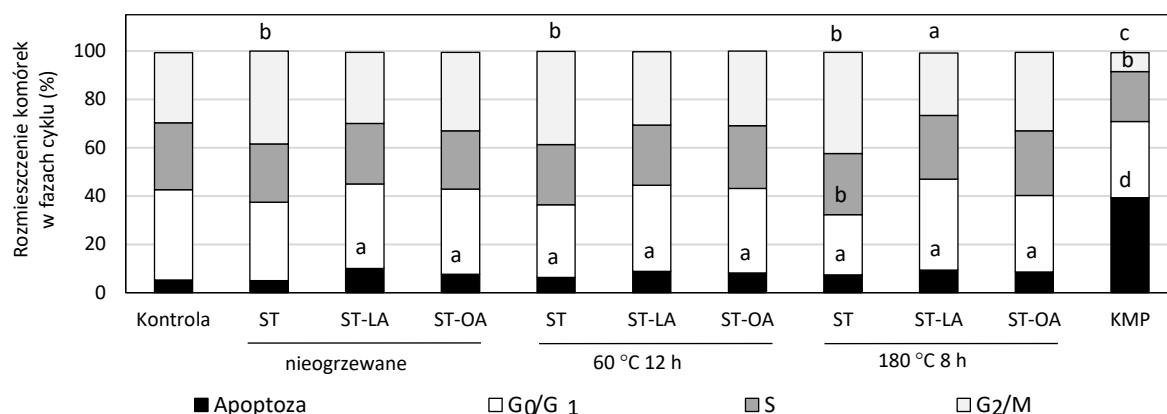
4.9. Wpływ stigmasterolu i estrów stigmasterolu na przebieg cyklu komórkowego

Cykl komórkowy w komórkach CCD 841 CoN eksponowanych na działanie stigmasterolu, jego estrów oraz produktów ich termicznej degradacji analizowano za pomocą cytometrii przepływowej. Rozmieszczenie komórek w różnych fazach cyklu przedstawiono na rycinie 24. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że badane związki w stężeniu 40 µg/ml mogą zakłócać przebieg cyklu komórkowego w komórkach nabłonka jelitowego CCD 841 CoN.

Stigmasterol, zarówno nieogrzewany, jak i ogrzewany w 60 °C (12 h) oraz w 180 °C (8 h) powodował akumulację komórek w fazie G₂/M. Ponadto stigmasterol poddany procesowi ogrzewania w 180 °C zmniejszył populację komórek w fazie G₀/G₁ i zwiększył subpopulację komórek martwych o niższej zawartości DNA. Nieznaczne zwiększenie subpopulacji komórek o obniżonej zawartości DNA zaobserwowano również w hodowlach traktowanych estrami stigmasterolu (linolowym i oleinowym) w dawce 40 µg/ml. Poza tym, linolan stigmasterolu poddany obróbce termicznej w 180 °C spowodował także niewielki spadek ilości komórek w fazie G₂/M. Analiza dystrybucji komórek w różnych fazach cyklu komórkowego wskazuje na łagodne działanie badanych związków indukujące śmierć komórek, niezależnie od procesu ogrzewania. Efekty te są stosunkowo słabe w porównaniu do efektów wywoływanych przez związek referencyjny - kamptotecynę, ale statystycznie znamienne ($p \leq 0,05$).

W badaniach prezentowanych w literaturze oznaczano wpływ stigmasterolu na przebieg cyklu komórkowego w komórkach pochodzenia nowotworowego. Stigmasterol indukował zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₀/G₁ w komórkach raka endometrium (Wang i in., 2022). Stwierdzono także, że stigmasterol hamuje proliferację komórek raka żołądka SNU-1 poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₂/M (Li i in., 2018), podobnie jak podczas hamowania cyklu komórkowego wywołanego przez stigmasterol w prawidłowych komórkach błony śluzowej okrężnicy, które przedstawiane są w niniejszej pracy. W badaniach Bae i in. (2020) w komórkach raka jajnika ES2 oraz OV90, po traktowaniu stigmasterolem w stężeniu 20 µg/ml, zwiększył się odsetek komórek w fazie subG₁ (odpowiednio o 11,1% oraz 5,6%). W komórkach nowotworowych A549 i HeLa eksponowanych na stigmasterol zaobserwowano zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₁ bez zwiększania populacji w fazie subG₀ (Sali i in. 2016). W badaniach prowadzonych przez Kim i in. (2014) wykazano zatrzymanie cyklu komórkowego w fazach G₀/G₁ oraz G₂/M w komórkach nowotworu wątroby HepG2 pod wpływem działania

stigmasterolu. Natomiast w ludzkich komórkach kostniakomiesaka linii 1547 traktowanych stigmasterolem nie stwierdzono ingerencji w przebieg cyklu komórkowego (Trouillas i in., 2005). Podobnie, brak zakłóceń cyklu komórkowego obserwowano w nowotworowych komórkach jelita grubego Caco-2 po ekspozycji na 7-ketostigmasterol (Alemany i in., 2012).



Rycina 24. Rozmieszczenie komórek nabłonka jelitowego okrężnicy CCD 841 CoN w fazach cyklu komórkowego po traktowaniu stigmasterolem (ST), linolanem stigmasterolu (ST-LA) i oleinianem stigmasterolu (ST-OA) nieogrzewanym i ogrzewanym w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin. Analizy wykonano po ekspozycji komórek na związki w dawce 40 µg/ml. Kamptotecynę (KMP) w dawce 50 nM zastosowano jako związek referencyjny, indukujący proces apoptozy i ingerujący w przebieg cyklu komórkowego. Dane wyrażone są jako średnie z trzech niezależnych eksperymentów (n=3). Poziom istotności różnic a $p \leq 0.05$, b $p \leq 0.01$, c $p \leq 0.001$, d $p \leq 0.0001$ obliczono w odniesieniu do nietraktowanych komórek kontrolnych (test t-Studenta)

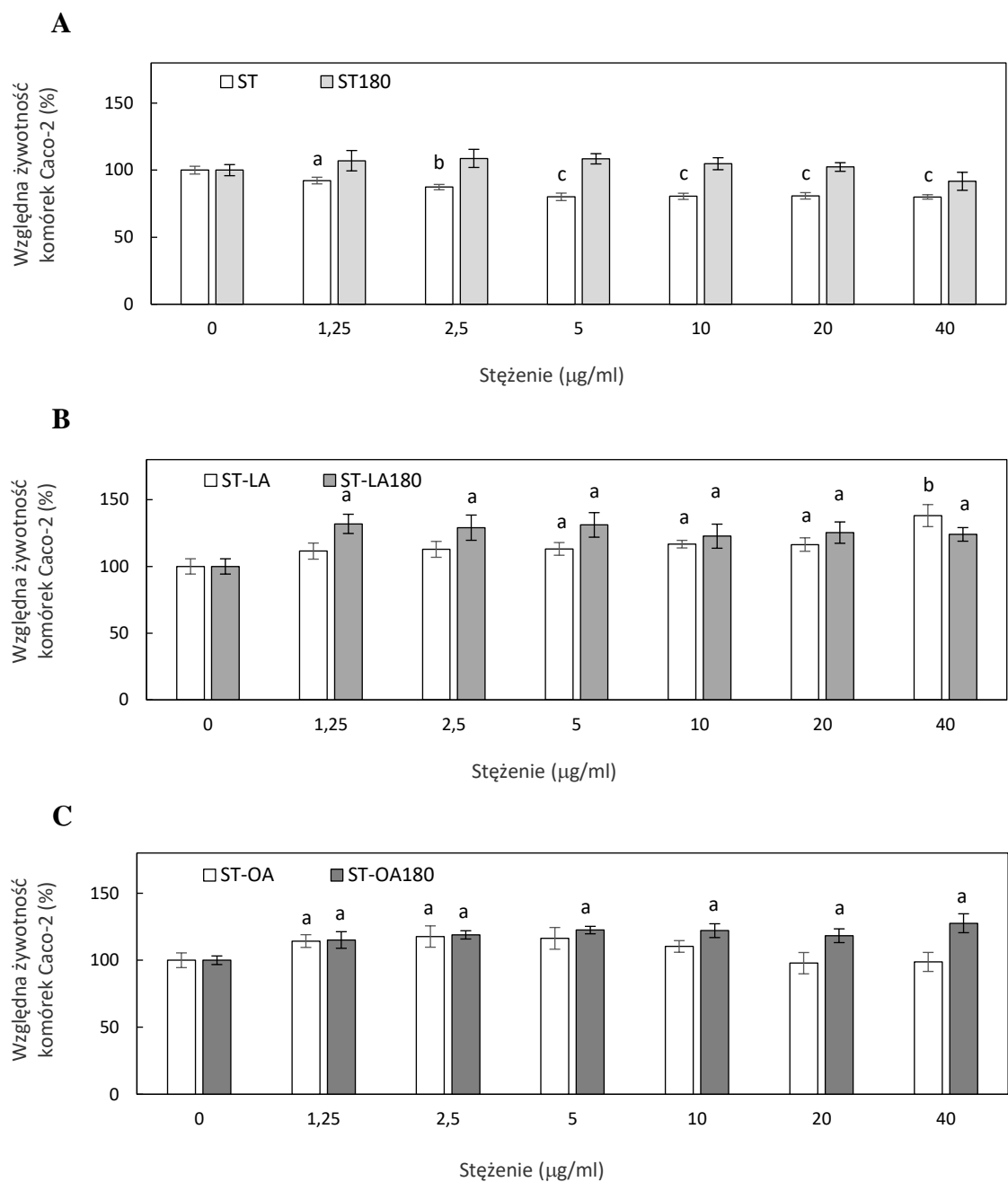
4.10. Wpływ stigmasterolu, estrów stigmasterolu i produktów ich termicznej degradacji na nabłonek jelitowy Caco-2

Analiza wpływu stigmasterolu i jego estrów przed i po obróbce termiczno-oksydacyjnej na barierę jelitową była prowadzona z wykorzystaniem modelu ludzkiego nabłonka jelitowego Caco-2. Komórki Caco-2 zostały wyizolowane z ludzkiego gruczolakoraka okrężnicy. Jednakże, pomimo nowotworowego pochodzenia, kulturę Caco-2 charakteryzuje wysoki stopień podobieństwa zarówno pod względem funkcjonalnym, jak i strukturalnym, do prawidłowego ludzkiego nabłonka jelitowego. Komórki Caco-2 w czasie 21-dniowej hodowli podlegają spontanicznemu różnicowaniu w komórki enterocyto-podobne z jądrem usytuowanym w części podstawnej i mikrokosmkami jelitowymi, tworzącymi dojrzały rąbek szczoteczkowy, w części szczytowej (Pinto i in., 1983). Zróżnicowana długoterminowa kultura Caco-2 tworzy zwartą monowarstwę komórek o ścisłych połączeniach międzykomórkowych,

o wysokim stopniu polaryzacji i ekspresji enzymów rąbka szczoteczkowego, izoenzymów cytochromu P-450 oraz enzymów II fazy, w tym: glutationo-*S*-transferazy, sulfotransferazy czy UDP-glukuronylotransferazy. Ponadto, w komórkach Caco-2 ulegają ekspresji przenośniki biorące udział w aktywnym transporcie substancji przez nabłonek jelitowy (Tavelin i in., 2002; Sambuy i in., 2005). Struktura i właściwości funkcjonalne zróżnicowanej kultury Caco-2, zbliżone do prawidłowego fizjologicznego nabłonka jelitowego, przemawiają za jej wykorzystaniem jako modelu bariery jelitowej w badaniach nad biodostępnością i wchłanianiem leków i substancji bioaktywnych zawartych w żywności. Zastosowanie modelu Caco-2 uzasadnia również dobra korelacja pomiędzy przenikalnością związków przez sztuczny nabłonek jelitowy *in vitro* a ich wchłanianiem w warunkach fizjologicznych *in vivo* (Artusson i Karlsson, 1991; Yee, 1997).

4.10.1. Wpływ analizowanych związków na proliferujące komórki Caco-2

W pierwszym etapie badań oceniono wpływ stigmasterolu i jego estrów w formie nieogrzewanej i ogrzewanej w temperaturze 180 °C (8 h) na proliferację, żywotność i aktywność metaboliczną komórek Caco-2, rosnących w standardowej hodowli na podłożu stałym i eksponowanych na analizowane związki przez 72 godziny w fazie logarytmicznego wzrostu komórek. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów, przedstawione na rycinie 25, wskazują, że estry stigmasterolu z kwasem linolowym (ryc. 25B) i oleinowym (ryc. 25C) w dawkach do 40 µg/ml nie wywołują efektów cytotoksycznych w hodowli namnażających się komórek Caco-2. Co więcej, w hodowlach suplementowanych estrami stigmasterolu obserwowano stymulujący wpływ związków na proliferację komórek (ryc. 25B i 25C). Działanie promujące wzrost komórek nabłonka jelitowego było widoczne również w przypadku estrów stigmasterolu ogrzewanych w 180 °C. Efekty cytotoksyczne w hodowli komórek zanotowano jedynie w przypadku związku macierzystego w formie nieogrzewanej. Wolny stigmasterol w zakresie stężeń od 5 µg/ml do 40 µg/ml powodował ok. 20% obniżenie żywotności komórek w hodowli. Natomiast, po ekspozycji komórek Caco-2 na stigmasterol poddany obróbce termiczno-oksydacyjnej w temperaturze 180°C przez 8 godzin, nie obserwowano statystycznie istotnego wpływu na proliferację i żywotność komórek Caco-2 (ryc. 25A). Poczynione obserwacje są zbieżne z wynikami analiz cytotoksyczności przeprowadzonych na prawidłowych komórkach nabłonka jelitowego i wątroby, które wykazały, że poziom cytotoksyczności stigmasterolu ogrzewanego w 180 °C jest istotnie niższy niż stigmasterolu nieogrzewanego (tabela 9).

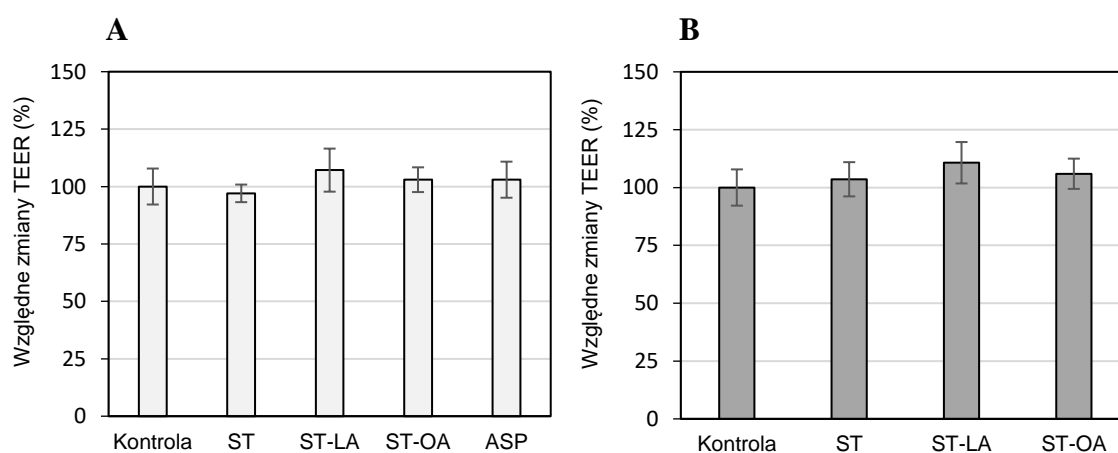


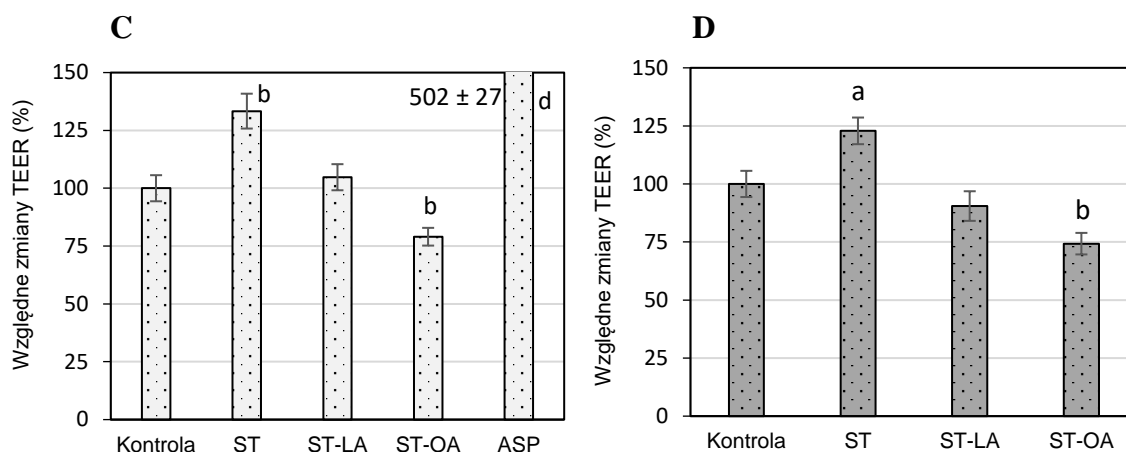
Rycina 25. Wpływ stigmasterolu (ST) (A), linolanu stigmasterolu (ST-LA) (B) i oleinianu stigmasterolu (ST-OA) (C) nieogrzewanych i ogrzewanych w temperaturze 180°C na proliferację, żywotność i aktywność metaboliczną komórek nabłonka jelitowego Caco-2. Po 72 godzinach ekspozycji, działanie związków oznaczono za pomocą testu MTT. Dane określają względną zmianę żywotności komórek w odniesieniu do kontroli negatywnej (0). Wartości przedstawiają średnie arytmetyczne \pm SD (n=3). Poziom istotności różnic oznaczono testem t-Studenta w odniesieniu do kontroli negatywnej. ^ap \leq 0,05; ^bp \leq 0,01; ^cp \leq 0,001.

4.10.2. Wpływ badanych związków na integralność nabłonka jelitowego

Wpływ nieogrzewanego i ogrzewanego (180 °C, 8 h) stigmasterolu, linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu na integralność nabłonka jelitowego Caco-2 oznaczano poprzez pomiar przeznabłonkowej oporności elektrycznej (TEER). W kontroli pozytywnej jako związek referencyjny zastosowano aspirynę, która hamuje proliferację komórek i prowadzi do niszczenia ścisłych połączeń komórkowych w nabłonku (Matsui i in., 2011).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że analizowane związki, zarówno nieogrzewane, jak i ogrzewane w 180 °C, nie powodują naruszenia integralności nabłonka jelitowego Caco-2 w czasie 4-godzinnej ekspozycji (ryc. 26A i 26B). Jednakże, w efekcie wydłużenia ekspozycji do 24 godzin obserwowano zmiany parametru TEER w zależności od zastosowanego związku. Stwierdzono, że nieogrzewany i ogrzewany stigmasterol w dawce 40 µg/ml zmniejsza integralność bariery jelitowej Caco-2, na co wskazywało zwiększenie wartości TEER odpowiednio o 33% i 23% (ryc. 26C i 26D). Efekty indukowane przez stigmasterol były znacznie słabsze niż działanie aspiryny, przy której po 24 godzinach ekspozycji obserwowano dezintegrację i rozszczelnienie nabłonka jelitowego (ryc. 26C). W odróżnieniu od stigmasterolu, jego estry, niezależnie od ogrzewania, nie miały negatywnego wpływu na integralność nabłonka. W przypadku traktowania modelu bariery jelitowej linolanem stigmasterolu w dawce 40 µg/ml nie zanotowano statystycznie istotnych zmian wartości parametru TEER (ryc. 26C i 26D). Natomiast oleinian stigmasterolu nieogrzewany i ogrzewany w 180 °C w takim samym stężeniu powodował zwiększenie wartości TEER odpowiednio o 21% i 26%, co może wskazywać na jego pozytywny wpływ na ścisłość połączeń międzykomórkowych w nabłonku jelitowym i potencjalną zdolność do uszczelniania bariery jelitowej (ryc. 26C i 26D).





Rycina 26. Wpływ stigmasterolu (ST), linolanu stigmasterolu (ST-LA) i oleinianu stigmasterolu (ST-OA) w dawce 40 µg/ml, nieogrzewanych (A, C) i ogrzewanych w temperaturze 180 °C (B, D) na integralność nabłonka jelitowego Caco-2 po ekspozycji przez 4 godziny (A, B) i 24 godziny (C, D). Wartości określają względne zmiany parametru TEER w odniesieniu do kontroli negatywnej. Aspiryna (ASP), jako referencyjny związek naruszający integralność połączeń międzykomórkowych w nabłonku Caco-2, stanowiła kontrolę pozytywną. Wartości przedstawiają średnie arytmetyczne ± SD (n=3). Poziom istotności różnic oznaczono testem t-Studenta w odniesieniu do kontroli negatywnej. ^ap≤0,05; ^bp≤0,01; ^cp≤0,001; ^dp≤0,0001.

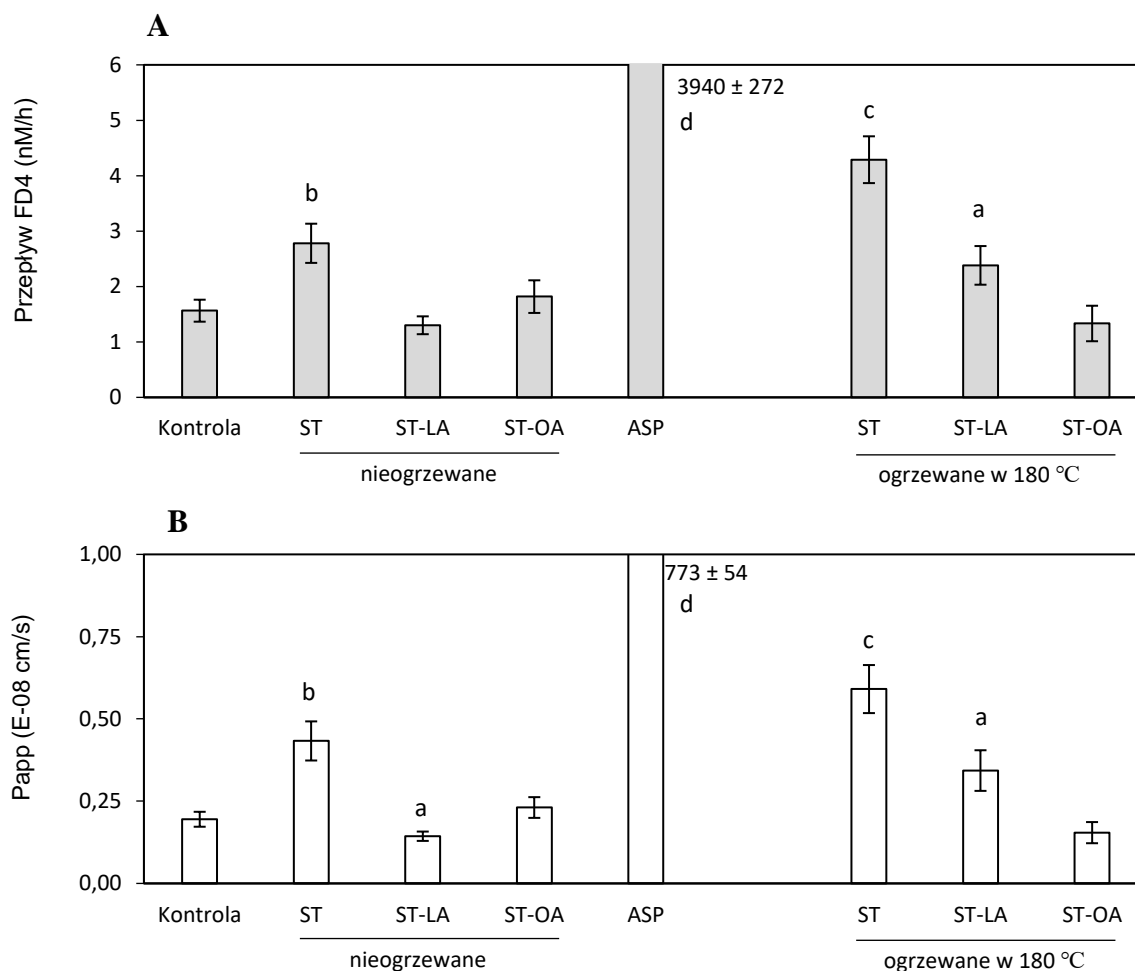
4.10.3. Wpływ analizowanych związków na przepuszczalność nabłonka jelitowego

Wpływ stigmasterolu, linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu na przepuszczalność nabłonka jelitowego Caco-2 oznaczano poprzez pomiar transportu przeznabłonkowego dekstryny o średniej masie molowej 4 kDa znakowanej izotiocyanianem fluoresceiny (FD4). FD4, jako związek o bardzo małej przenikalności przez nabłonek jelitowy, który jest transferowany przez nabłonek na drodze transportu parakomórkowego przez przestrzeń międzykomórkową, stosuje się do detekcji nieszczelności jelit w badaniach nad dysfunkcją bariery jelitowej (Putt i in., 2017).

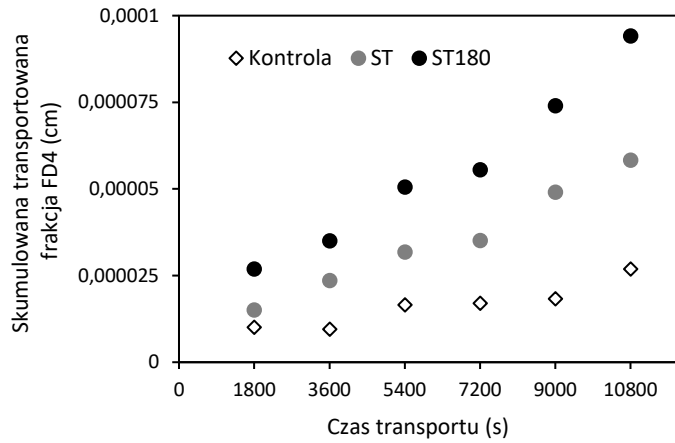
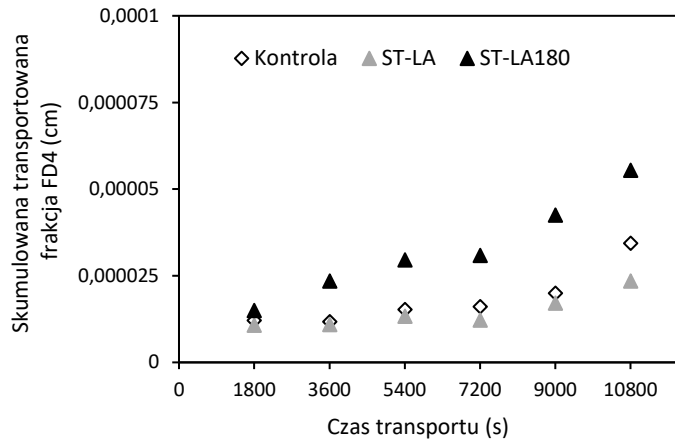
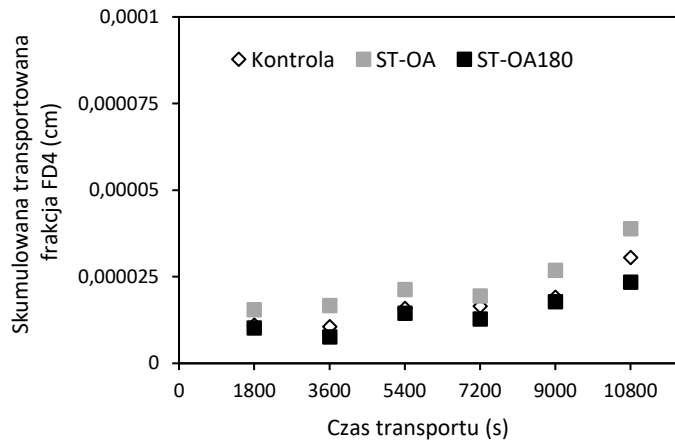
Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wykazały, że 24-godzinna ekspozycja nabłonka jelitowego na stigmasterol nieogrzewany i ogrzewany w 180 °C doprowadziła do rozszczelnienia połączeń międzykomórkowych w nabłonku, czego wyrazem była zwiększona przepuszczalność nabłonka i szybszy przepływ dekstryny FD4 przez nabłonek (ryc. 27A i 28A). Współczynniki przenikalności pozornej (Papp) obliczone dla transportu FD4 przez nabłonek traktowany stigmasterolem nieogrzewanym i ogrzewanym były 2,2 i 3,0-krotnie większe niż Papp oznaczone w hodowli kontrolnej nieekspozowanej na stigmasterol (ryc. 27B).

Nieogrzewane estry stigmasterolu z kwasem linolowym i oleinowym nie powodowały naruszenia połączeń międzykomórkowych w nabłonku jelitowym (ryc. 27A, 27B, 28B, 28C).

Po ekspozycji na linolan stigmasterolu zaobserwowano nieznaczne, lecz statystycznie znamienne, zmniejszenie współczynnika przenikalności Papp dla FD4 ($p \leq 0,05$) (ryc. 27B), chociaż istotność statystyczna redukcji szybkości przepływu FD4 nie została potwierdzona (ryc. 27A). Natomiast, linolan stigmasterolu po ogrzewaniu w 180 °C spowodował rozluźnienie połączeń międzykomórkowych w nabłonku, co było widoczne w nasileniu transportu FD4 ($\uparrow 50\%$) (ryc. 27A i 28B) oraz zwiększeniu współczynnika Papp ($\uparrow 76\%$) w odniesieniu do kontroli (ryc. 27B). W przypadku oleinianu stigmasterolu, po obróbce termicznej, nie zanotowano jego wpływu na integralność nabłonka i szybkość przenikania FD4 (ryc. 27A, 27B, 28C). Po 24-godzinnym traktowaniu nabłonka aspiryną, dezintegracja bariery jelitowej znalazła odbicie w znacząco większej ilości FD4 przenikającego przez nabłonek ($p < 0,0001$) (ryc. 27A i 27B).



Rycina 27. Wpływ 24-godzinnej ekspozycji nabłonka jelitowego Caco-2 na stigmaterol (ST), linolan stigmaterolu (ST-LA) i oleinian stigmaterolu (ST-OA) nieogrzewany i ogrzewany w 180 °C na przepuszczalność dekstryny FD4 (A) i współczynnik przenikalność pozornej (Papp) (B). Aspirynę (ASP) zastosowano jako związek referencyjny powodujący rozszczelnienie nabłonka jelitowego. Wartości przedstawiają średnie arytmetyczne ± SD (n=3). Poziom istotności różnic oznaczono testem t-Studenta w odniesieniu do kontroli negatywnej. ^a $p \leq 0,05$; ^b $p \leq 0,01$; ^c $p \leq 0,001$; ^d $p \leq 0,0001$.

A**B****C**

Rycina 28. Kinetyka transportu FD4 przez nabłonek jelitowy eksponowany przez 24 godziny na stigmasterol (ST) (A), linolan stigmasterolu (ST-LA) (B) i oleinian stigmasterolu (ST-OA) (C) nieogrzewane i ogrzewane w 180°C (ST180, ST-LA180, ST-OA180).

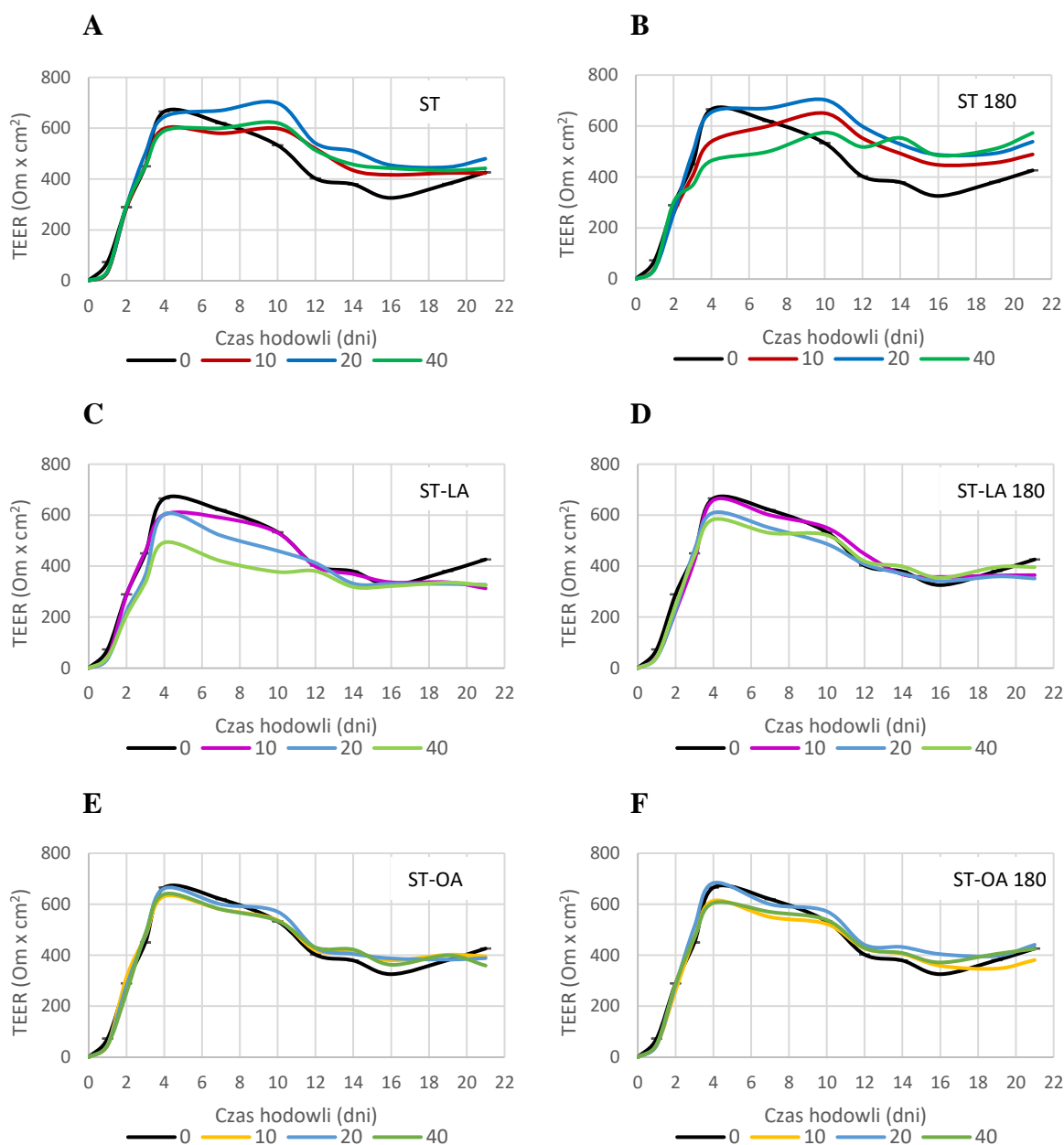
4.10.4. Wpływ badanych związków na tworzenie funkcjonalnego nabłonka jelitowego *in vitro*

Wpływ stigmasterolu oraz linolanu i oleinianu stigmasterolu na tworzenie funkcjonalnego nabłonka jelitowego analizowano poprzez wprowadzanie wymienionych związków do hodowli komórek Caco-2 podczas ich spontanicznego różnicowania w enterocyty. Efekty prowadzonej suplementacji oceniano poprzez oznaczenie zmian parametru TEER podczas długoterminowej hodowli komórek Caco-2. Ponadto, po 21 dniach hodowli, oznaczano poziom przepuszczalności referencyjnego związku FD4 poprzez utworzoną kulturę Caco-2 oraz analizowano ekspresję wybranych genów kodujących białka połączeń międzykomórkowych, które utrzymują szczelność nabłonka jelitowego.

4.10.4.1. Wpływ badanych związków na integralność utworzonego nabłonka jelitowego

Formowanie nabłonka jelitowego Caco-2 o szczelnych połączeniach międzykomórkowych monitorowano poprzez pomiar zmian parametru TEER podczas całej hodowli suplementowanej stigmasterolem i estrami stigmasterolu, w formie nieogrzewanej i ogrzewanej w 180 °C.

Przeprowadzone eksperymenty wskazują, że stigmasterol i jego estry nie wykazują negatywnego wpływu na integralność utworzonego nabłonka jelitowego, niezależnie od ich obróbki termicznej (ryc. 29). Parametr TEER w ostatnim – 21 dniu hodowli charakteryzował się zbliżonymi wartościami w prawie wszystkich hodowlach, niezależnie od zastosowanej dawki związku. Wyjątek stanowiła hodowla suplementowana stigmasterolem po obróbce termicznej w 180 °C, w której oznaczone wartości TEER były większe niż w hodowli kontrolnej. Zwiększenie TEER wynosiło odpowiednio 15%, 26% i 34% w przypadku stigmasterolu w stężeniu 10 µg/ml, 20 µg/ml i 40 µg/ml (ryc. 29B). Zmiany w TEER i kształtowaniu integralnego nabłonka zanotowano również podczas hodowli komórek Caco-2 w obecności linolanu stigmasterolu w dawkach 20 µg/ml i 40 µg/ml. Kultury suplementowane estrem z kwasem linolowym, w dniach od 4-tego do 12-tego, charakteryzowały się niższymi wartościami TEER (ryc. 29C).



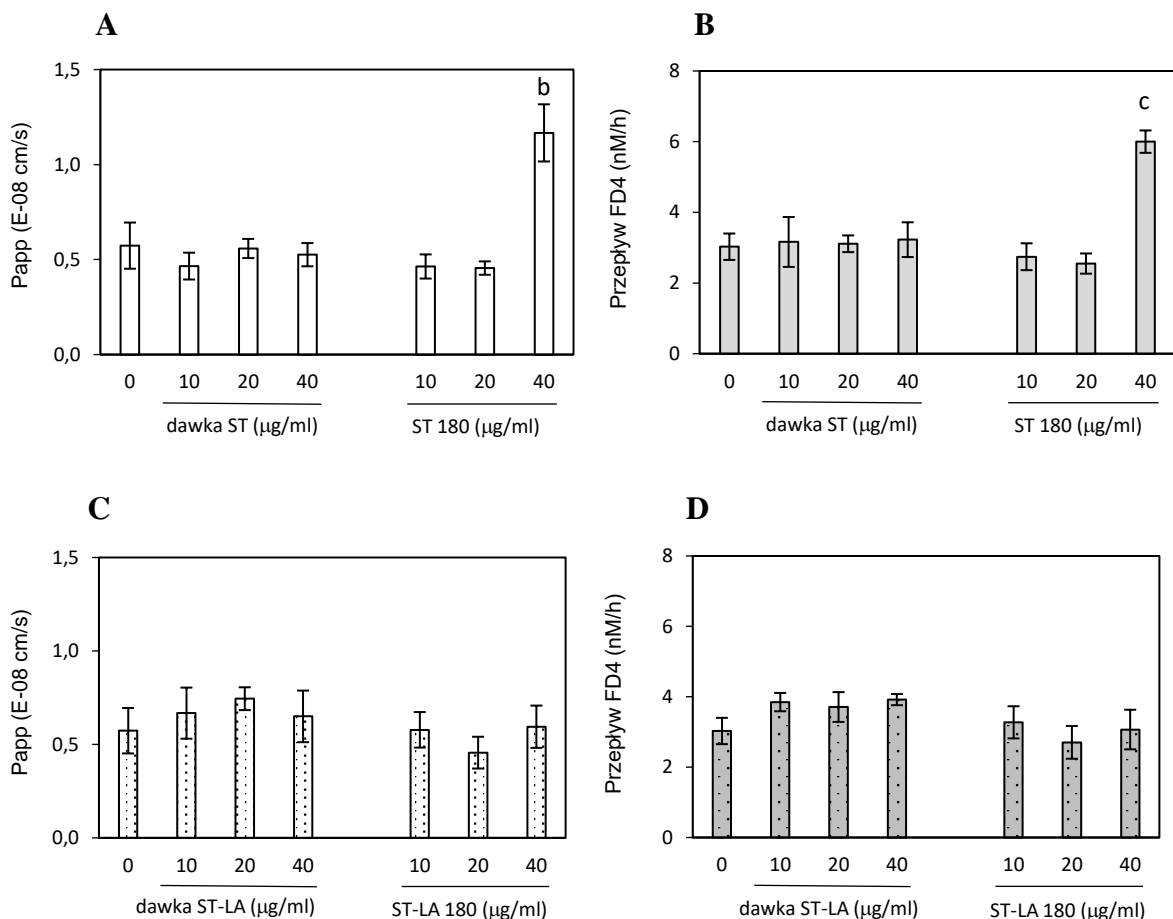
Rycina 29. Wpływ stigmasterolu (ST), linolanu stigmasterolu (ST-LA) i oleinianu stigmasterolu (ST-OA) w dawkach 10, 20 i 40 $\mu\text{g/ml}$, nieogrzewanych (A, C, E) i ogrzewanych w temperaturze 180°C (B, D, F) na integralność nabłonka jelitowego podczas różnicowania komórek Caco-2 w komórki enterocyto-podobne. Kontrolę stanowiła hodowla komórek Caco-2 bez dodatku analizowanych związków (0). Dane wyrażają średnie arytmetyczne z trzech niezależnych hodowli (n=3).

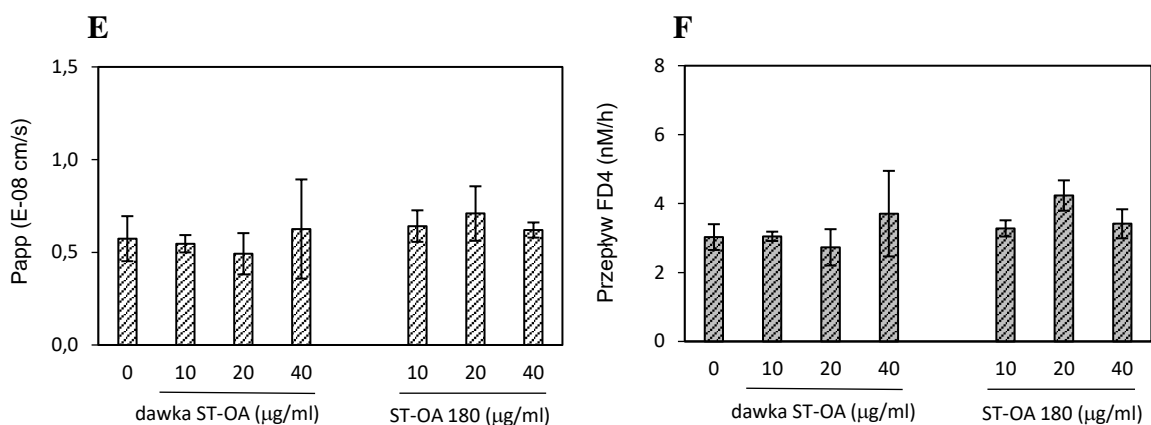
4.10.4.2. Wpływ badanych związków na szczelność bariery jelitowej

Szczelność bariery jelitowej utworzonej w długoterminowej hodowli komórek Caco-2 w obecności stigmasterolu i jego estrów w formie nieogrzewanej i ogrzewanej w 180 °C analizowano poprzez pomiar transportu przeznabłonkowego dekstryny FD4.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że nieogrzewany stigmasterol w dawkach 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ i 40 $\mu\text{g/ml}$ nie wpływa na stopień przepuszczalności FD4 przez utworzony nabłonek jelitowy Caco-2. Natomiast, stigmasterol po obróbce termicznej w 180 $^{\circ}\text{C}$ wprowadzany do hodowli komórek Caco-2 w najwyższej zastosowanej dawce (40 $\mu\text{g/ml}$) powodował powstanie bariery nabłonkowej o rozluźnionych połączeniach międzykomórkowych, o czym świadczy 2-krotnie większa przenikalność FD4 niż w przypadku transportu przez nabłonek kontrolny (ryc. 30A i 30B).

Estry stigmasterolu nieogrzewane i ogrzewane w 180 $^{\circ}\text{C}$ dodawane do hodowli komórkowej Caco-2 w dawkach 10, 20 i 40 $\mu\text{g/ml}$ nie wpłynęły na tworzenie ścisłych połączeń międzykomórkowych w nabłonku jelitowym i transport parakomórkowy FD4. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w przenikalności FD4 przez nabłonki jelitowe utworzone przy suplementacji estrami i bez suplementacji w hodowli kontrolnej (ryc. 30C, 30D, 30E, 30F).





Rycina 30. Wpływ stigmasterolu (ST), linolanu stigmasterolu (ST-LA) i oleinianu stigmasterolu (ST-OA) w dawkach 10, 20 i 40 µg/ml, nieogrzewanych i ogrzewanych w temperaturze 180 °C dodawanych do hodowli komórek Caco-2 podczas ich różnicowania w komórki enterocyto-podobne na współczynnik przenikalności pozornej Papp (A, C, E) i przez nabłonkowy przepływ związku referencyjnego – dekstryny FD4 (B, D, F). Kontrolę stanowiła hodowla komórek Caco-2 bez dodatku analizowanych związków (0). Wartości przedstawiają średnie arytmetyczne ± SD (n=3). Poziom istotności różnic oznaczono testem Tukeya w odniesieniu do kontroli negatywnej. ^ap≤0,05; ^bp≤0,01; ^cp≤0,001.

4.10.4.3. Wpływ analizowanych związków na ekspresję genów białek ścisłych połączeń międzykomórkowych w nabłonku jelitowym

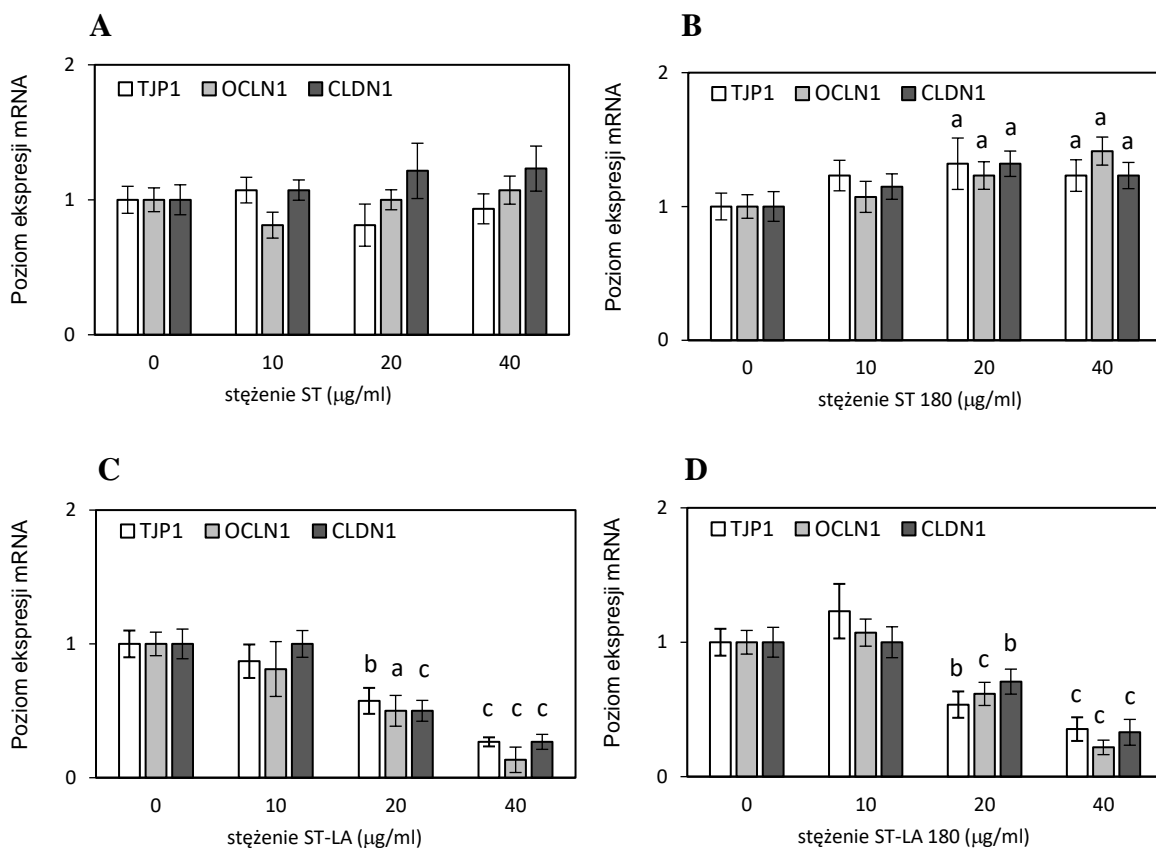
W ramach przedstawianej pracy analizowano wpływ ekspozycji różnicujących komórek Caco-2 na stigmasterol, linolan stigmasterolu i oleinian stigmasterolu na ekspresję wybranych genów, kodujących białkowe składniki połączeń międzykomórkowych w nabłonku, które utrzymują szczelność bariery jelitowej. W nabłonku jelitowym wyróżnia się dwa podstawowe typy połączeń: połączenia przylegające, nazywane w nomenklaturze anglojęzycznej *adherens junctions* (AJs) i połączenia ścisłe (barierowe) nazywane *tight junctions* (TJs) (Sánchez i in., 2019). W niniejszej pracy analizowano ekspresję genów białek transnabłonkowych, okludyny i kładyny, łączących błony sąsiednich komórek, oraz białka peryferyjnego, zamykającego, zonula occludens-1 (ZO-1), typowych dla połączeń ścisłych TJs.

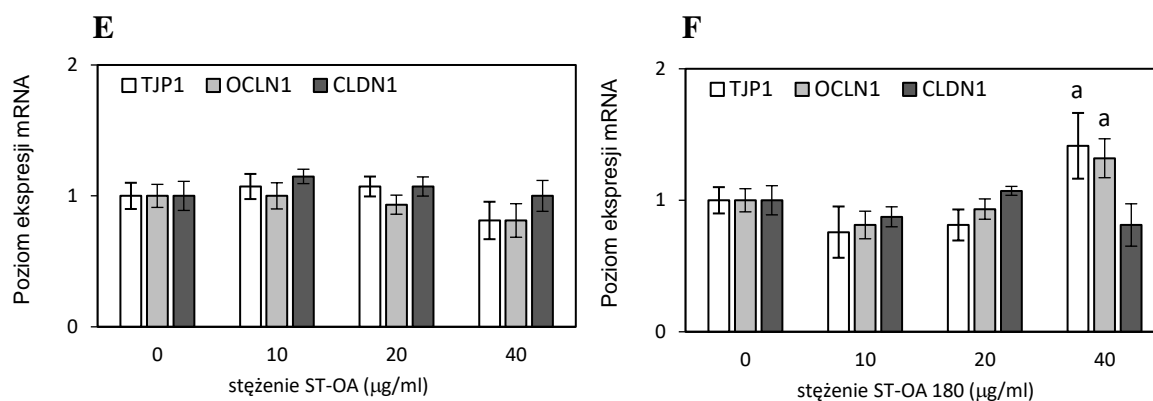
Wyniki analizy molekularnej wykazały, że nieogrzewany stigmasterol nie wpływał na poziom ekspresji *TJPI*, *OCLN1* i *CLDN1*. Obserwowano jedynie nieznaczne, statystycznie nieznaczne zwiększenie ekspresji mRNA genu *CLDN1* kodującego kładynę (ryc. 31A). Natomiast stigmasterol poddany obróbce termicznej wprowadzany do hodowli komórek Caco-2 w dawkach 20 µg/ml i 40 µg/ml spowodował wzrost ekspresji mRNA wszystkich analizowanych genów (*TJPI*, *OCLN1* i *CLDN1*) kodujących białkowe składniki ścisłych

połączeń barierowych w nabłonku Caco-2, odpowiednio białko kompleksu zonula occludens (ZO-1), okludynę i kładynę (ryc. 31B).

Badania nad działaniem estrów stigmasterolu pokazują, że linolan stigmasterolu w dawkach 20 $\mu\text{g/ml}$ i 40 $\mu\text{g/ml}$, niezależnie od obróbki termicznej, znacząco hamował ekspresję wszystkich analizowanych genów (ryc. 31C i 31D). Poczynione obserwacje są zbieżne z analizą parametru TEER, którego wartości były niższe niż w kulturze kontrolnej prowadzonej bez suplementacji w czasie od 4-tego do 12-tego dnia hodowli. Uzyskane wyniki wskazywały na zakłóconą integralność połączeń międzykomórkowych w nabłonku w hodowlach suplementowanych ogrzewanym linolanem stigmasterolu (ryc. 29C).

W przypadku oleinianu stigmasterolu ogrzewanego w 180 $^{\circ}\text{C}$, zastosowanego w najwyższej dawce (40 $\mu\text{g/ml}$), zanotowano statystycznie istotny wzrost ilości transkryptów mRNA genów *TJP1* i *OCLN1*, bez wpływu na ekspresję mRNA *CLDN1*. W mniejszych dawkach ogrzewany ester oleinowy nie wpływał na poziom ekspresji analizowanych genów (ryc. 31F). Natomiast oleinian stigmasterolu niepoddany obróbce termicznej, nie ingerował w ekspresję białek TJs na poziomie mRNA, niezależnie od stosowanego stężenia (ryc. 31E).





Rycina 31. Wpływ stigmasterolu (ST), linolanu stigmasterolu (ST-LA) i oleinianu stigmasterolu (ST-OA) w dawkach 10, 20 i 40 µg/ml, nieogrzewanych (A, C, E) i ogrzewanych w temperaturze 180 °C przez 8 godzin (B, D, F), dodawanych do hodowli komórek Caco-2 podczas ich różnicowania, na poziom ekspresji mRNA genów *TJP1*, *OCLN1* i *CLDN1*, kodujących odpowiednio białko zonula occludens-1 (ZO-1), okludynę i kładynę. Kontrolę stanowiła hodowla komórek Caco-2 bez dodatku analizowanych związków (0). Wartości przedstawiają średnie arytmetyczne ± SD (n=3). Poziom istotności różnic oznaczono testem Tukeya w odniesieniu do kontroli negatywnej. ^ap≤0,05; ^bp≤0,01; ^cp≤0,001.

Model nabłonka jelitowego Caco-2 był stosowany w badaniach transportu jelitowego fitosteroli i pochodnych fitosteroli oraz ich zdolności do hamowania wchłaniania cholesterolu. W najnowszej pracy, Wang i in. (2023) analizowali mechanizm wchłaniania 7-ketofitosteroli (7-ketositosterolu i 7-ketokampesterolu) i ich hamujący wpływ na transport cholesterolu przez nabłonek Caco-2. Stwierdzono, że 4-godzinna ekspozycja monowarstwy komórek Caco-2 na cholesterol-d7, β-sitosterol, kampesterol oraz utlenione pochodne fitosteroli (7-ketositosterol i 7-ketokampesterol) w stężeniach 15 µM, 30 µM i 45 µM nie powoduje zmian w wartościach parametru TEER i nie zwiększa przenikalności substancji referencyjnej (soli sodowej fluoresceiny), co wskazuje na brak naruszenia integralności bariery jelitowej (Wang i in., 2023). Podobne wnioski sformułowano na podstawie wyników badań, uwzględniających krótkotrwałą 4-godzinną ekspozycję nabłonka jelitowego na stigmasterol, estry stigmasterolu i pochodne powstające podczas obróbki termiczno-oksydacyjnej, przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy. Do tej pory jednak nie publikowano prac przedstawiających badania nad długotrwałym działaniem stigmasterolu i jego pochodnych na nabłonek jelitowy, szczelność i przepuszczalność nabłonka i ekspresję białek TJs. Z uwagi na niską absorpcję jelitową fitosteroli, określoną w modelu Caco-2 na poziomie 1,2%-1,7% i 1,2%-2,2% odpowiednio dla 7-ketositosterolu i 7-ketokampesterolu, jak również słabą przenikalność związków macierzystych (Wang i in., 2023), uzasadnionym celem badań jest analiza wpływu fitosteroli,

w tym stigmasterolu, na komórki nabłonka jelitowego, na który fitosterole oddziałują w największych dawkach, w sposób bezpośredni i długotrwały. Niewątpliwie ważnym aspektem jest czas ekspozycji, który ma istotne znaczenie dla wywoływanych efektów cytotoksycznych, determinujących prześlakliwość bariery jelitowej, transport przelnabłonkowy czy procesy związane z regeneracją nabłonka jelitowego. Dlatego w niniejszej pracy wykonano również eksperymenty pozwalające na analizę chronicznego, długotrwałego działania stigmasterolu i jego pochodnych na komórki nabłonka jelitowego i tworzenie funkcjonalnej bariery jelitowej.

Wang i in. (2023) ocenili wpływ fitosteroli (β -sitosterolu i kampesterolu oraz 7-ketositosterolu i 7-ketokampesterolu) na proliferację i żywotność komórek Caco-2 w czasie 48-godzinnej ekspozycji w hodowli płytkowej na podłożu stałym, nieporowatym. Autorzy nie stwierdzili cytotoksycznego działania β -sitosterolu i kampesterolu w stężeniach do 90 μ M. Natomiast pochodne, 7-ketositosterol i 7-ketokampesterol, charakteryzowały się wyższą cytotoksycznością. Efekty cytotoksyczne wywołane przez wymienione oksypochodne obserwowano po zastosowaniu dawki wynoszącej 60 μ M (Wang i in., 2023). W badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy obserwowano efekty cytotoksyczne stigmasterolu po 72-godzinnej ekspozycji komórek Caco-2. Pierwsze statystycznie znamienne działanie hamujące rozwój hodowli zanotowano po suplementacji stigmasterolem w dawce 1,25 μ g/ml (3,0 μ M). Natomiast zwiększenie stężenia stigmasterolu do 40 μ g/ml (96,9 μ M) skutkowało obniżeniem żywotności komórek o ok. 20% (ryc. 25A). W przypadku pochodnych utlenionych i produktów degradacji stigmasterolu generowanych w temperaturze 180 °C przez 8 godzin, w zakresie stężeń do 40 μ g/ml nie obserwowano działania cytotoksycznego na komórki Caco-2 (ryc. 25A). Podobnie, Alemany i wsp. (2012) nie wykryli cytotoksycznego działania pochodnej 7-keto stigmasterolu w stężeniach do 120 μ M podczas ekspozycji komórek Caco-2 przez 4 – 24 godzin. Wymieniona oksypochodna stigmasterolu stanowiła 28,4% wszystkich oznaczonych oksyfitosteroli powstających w wyniku ogrzewania stigmasterolu w 180 °C (tabela 7). Z drugiej strony, analiza proteomiczna wykonana przez grupę Laparra i wsp. (2015) wykazała, że 7-ketostigmasterol może wpływać na zmiany ekspresji białek istotnych dla funkcjonowania mitochondriów, utrzymania homeostazy lipidów, uczestniczących w stanach zapalnych i odpowiedzi przeciwzapalnej oraz białek ważnych dla proliferacji komórek. Jednocześnie wykazano wpływ pochodnej stigmasterolu na fenotypową adaptacyjną odpowiedź komórek jelitowych Caco-2 (Laparra i in., 2015). Stąd w badaniach będących przedmiotem niniejszej pracy, podczas długoterminowej hodowli komórek Caco-2 i ich chronicznego narażenia na stigmasterol i jego pochodne, przy jednoczesnym utrzymywaniu

dobrych warunków środowiska zapewniających wzrost komórek, mogło dochodzić do selekcji komórek przeżywających i ich adaptacji. Laparra i in. (2015) dowiedli również, że 7-ketostigmasterol wpływał na zmiany proteomu w komórkach Caco-2 w sposób odmienny niż 7-ketocholesterol. Największe zmiany proteomiczne obejmowały obniżony poziom ekspresji białek zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną i przeżycie komórek jelitowych. Ekspozycja na 7-ketostigmasterol spowodowała przede wszystkim zwiększenie ekspresji białek zaangażowanych w procesy zapalne, proliferację komórek i sygnalizację komórkową (Laparra i in., 2015). Warto zauważyć, że w hodowlach komórek jelitowych inkubowanych z 7-ketostigmasterolem zidentyfikowano zmiany w białkach istotnych dla wewnątrzkomórkowej homeostazy jonowej i prawidłowej organizacji cytoszkieletu, co wskazuje na możliwość zaburzeń procesów wchłaniania jelitowego niektórych składników odżywczych (Laparra i in., 2015).

Badania przedstawiane w literaturze naukowej na temat działania fitosteroli i ich pochodnych na nabłonek jelitowy są nieliczne, a raportowane wyniki nie są jednoznaczne. Dlatego postuluje się o rozszerzenie prowadzonych prac badawczych, które powinny dotyczyć nie tylko aspektów bezpieczeństwa fitosteroli i ich pochodnych, ale również konsekwencji zdrowotnych wynikających z potencjalnego zakłócania procesów wchłaniania jelitowego. Szeroko zakrojone badania na poziomie przedklinicznym i klinicznym są pilnie potrzebne z uwagi na wielokierunkowe i wielopłaszczyznowe działanie fitosteroli i ich coraz większe spożycie w codziennej diecie.

5. Podsumowanie

Żywność funkcjonalna wzbogacona stigmasterolem i jego estrami może być przeznaczona do bezpośredniego spożycia lub do gotowania, pieczenia i smażenia. Niestety, po obróbce termicznej może ona stanowić źródło produktów termicznej degradacji fitosteroli, w tym pochodnych utleniania stigmasterolu oraz związków niskocząsteczkowych, takich jak substancje lotne i oligomery o słabo udokumentowanej biodostępności i bezpieczeństwie dla organizmu (Rudzińska, 2022; Wang i Lu, 2018).

Analizy cytotoksyczności wykazały stosunkowo wysoki potencjał cytotoksyczny wolnego stigmasterolu. Właściwa dawka cytotoksyczna (EC_{50}) stigmasterolu nieogrzewanego, która spowodowała 50% obniżenie żywotności komórek nabłonka okrężnicy, została obliczona na 2,95 $\mu\text{g/ml}$. Wyniki testu cytotoksyczności MT-FMC wskazują, że wolny stigmasterol indukuje zależne od dawki zmniejszenie żywotności komórek okrężnicy skorelowane ze wzrostem liczby komórek martwych. Pierwsze efekty cytotoksyczne w hodowlach komórek okrężnicy, odzwierciedlone w 10% spadku liczby żywych komórek, zaobserwowano po traktowaniu stigmasterolem w stężeniu niższym niż 1 $\mu\text{g/ml}$. Podobne wyniki uzyskano dla komórek wątroby THLE-2 oraz komórek nabłonka jelita cienkiego FHs 74 Int, przy czym w przypadku komórek FHs 74 Int dawka cytotoksyczna EC_{50} była znacznie wyższa (30,64 $\mu\text{g/ml}$). Ponadto, wykazano, że wolny stigmasterol w wyższych dawkach (5–40 $\mu\text{g/ml}$) znacząco hamuje syntezę DNA w komórkach błony śluzowej okrężnicy, wywierając silne działanie antyproliferacyjne. Stwierdzono również, że stigmasterol, niezależnie od obróbki termicznej powoduje nieznaczne uszkodzenia DNA w komórkach, co mogłoby sugerować jego potencjalną genotoksyczność. Jednakże działanie stigmasterolu było na tyle słabe, że analiza wartości parametru TCS nie potwierdziła efektów związanych z degradacją DNA. Analizy potencjału mutagennego wykazały, że nieogrzewany stigmasterol ma zdolność do cofania mutacji w szczepie *Salmonella typhimurium* TA100 bez aktywacji metabolicznej, a w szczepach TA98 i TA1537 tylko w warunkach aktywacji metabolicznej. Natomiast obliczone indeksy mutagenności, które nie przekraczały wartości 2, wymaganej dla związków mutagennych, nie wskazywały jednoznacznie na aktywność mutagenną czy promutagenną stigmasterolu. Dlatego stigmasterol niepoddany obróbce termooksydacyjnej nie został uznany za związek potencjalnie mutageny.

Promocja apoptozy w prawidłowych komórkach nabłonka jelita grubego CCD 841 CoN traktowanych stigmasterolem, niezależnie od obróbki termicznej, przejawiała się zwiększoną aktywnością kaspaz-3/7, krytycznych kaspaz efektorowych, zaangażowanych w ostateczną

nieodwracalną śmierć komórek. Inicjacja procesu apoptozy przez ogrzewany stigmasterol mogła być związana ze zwiększonym generowaniem RFT w komórkach i ich wewnątrzkomórkową akumulacją, przewyższającą zdolność komórkowych systemów antyoksydacyjnych do niwelowania RFT i łagodzenia stresu oksydacyjnego. Natomiast w przypadku nieogrzewanego stigmasterolu nie stwierdzono nasilonego tworzenia RFT po ekspozycji komórek. Poziom SOP w nieogrzewanych próbach stigmasterolu generowanych w procesach autooksydacji był prawdopodobnie zbyt niski, aby indukować zwiększone wytwarzanie RFT, ale wystarczająco wysoki, aby pośredniczyć w szlakach transdukcji sygnału i zakłócać przebieg podstawowych procesów komórkowych. Analiza cyklu komórkowego wskazała na akumulację komórek i zatrzymanie cyklu w fazie G₂/M po ekspozycji na stigmasterol nieogrzewany i po obróbce termicznej w 60 °C i 180 °C. Dodatkowo, stigmasterol nieogrzewany zmniejszał integralność bariery jelitowej i zwiększał przepuszczalność nabłonka jelitowego po 24-godzinnym traktowaniu.

Ogrzewanie stigmasterolu w temperaturze 60 °C przez 12 godzin miało tylko niewielki wpływ na poziom jego cytotoksyczności, co było widoczne w nieznacznie zmniejszonym wpływie na żywotność komórek i syntezę DNA. Degradacja cząsteczki stigmasterolu podczas ogrzewania w 60 °C (12h) wynosiła jedynie około 5%, co może wyjaśniać stosunkowo silne działanie tego związku poddanego termicznej degradacji w powyższych warunkach. Pomimo niskiego stopnia degradacji stigmasterolu po obróbce termicznej w 60 °C doszło do znaczącego zwiększenia produkcji SOP (wzrost 4,4-krotny). W próbach ogrzewanych zidentyfikowano obecność β-epoxy-ST oraz triol-ST, których nie wykryto w stigmasterolu nieogrzewanym. Pod wpływem ogrzewania zwiększyła się także ilość pozostałych SOP. Zwiększona zawartość SOP w próbach stigmasterolu po procesach termiczno-oksydacyjnych w 60 °C była prawdopodobnie odpowiedzialna za zwiększenie wewnątrzkomórkowego poziomu RFT oraz indukcję apoptozy związanej z aktywnością kaspaz-3/7 w komórkach nabłonka jelita grubego. Ponadto, podobnie jak w przypadku stigmasterolu nieogrzewanego, wykazano zakłócenie przebiegu cyklu komórkowego, przejawiające się w akumulacji komórek w fazie G₂/M. Pomimo stosunkowo wysokiej cytotoksyczności stigmasterolu ogrzewanego w 60 °C, nie wykazano jego działania genotoksycznego i mutagennego czy promutagennego.

Termiczna i oksydacyjna obróbka stigmasterolu, prowadzona w temperaturze 180 °C przez 8 godzin, istotnie zmniejszyła jego potencjał cytotoksyczny, co było widoczne w słabszym wpływie na proliferację, żywotność i aktywność metaboliczną komórek oraz syntezę DNA. Obniżenie cytotoksyczności stigmasterolu w wyniku ogrzewania może być związane ze znaczną degradacją jego cząsteczki, oszacowaną na poziomie 80%. Z drugiej strony obróbka

termiczna w 180 °C doprowadziła do zwiększonego wytwarzania SOP, takich jak 7-keto-ST, 7βOH-ST, 7αOH-ST, 25OH-ST i triol-ST. Podwyższona zawartość SOP w próbie stigmasterolu po obróbce termiczno-oksydacyjnej i w 180 °C wpłynęła na zwiększoną reaktywność oksydacyjną i zdolność stigmasterolu do podwyższenia wewnątrzkomórkowego poziomu RFT w komórkach CCD 841 CoN. W tym przypadku zwiększenie ilości RFT mogło skutkować indukcją apoptozy i podwyższeniem aktywności kaspaz wykonawczych (kaspaz-3/7). Stigmasterol po ogrzewaniu w 180 °C zakłócał również przebieg cyklu komórkowego, co przejawiało się zwiększoną akumulacją komórek w fazie G₂/M oraz G₀/G₁. Potencjał prooksydacyjny stigmasterolu poddanego obróbce termiczno-oksydacyjnej w temperaturze 180 °C został potwierdzony w teście Ames przy zastosowaniu szczepu *Salmonella typhimurium* TA102, wrażliwym na różne mutageny o działaniu oksydacyjnym. Stigmasterol po ogrzewaniu w 180 °C powodował rewersję mutacji w komórkach szczepu TA102, co wskazuje na potencjalne mutagenne i prooksydacyjne działanie stigmasterolu wynikające z nadmiaru SOP. Odwrócenia mutacji nie zaobserwowano jednak w komórkach szczepu TA102 inkubowanych ze stigmasterolem ogrzewanym w 180 °C w obecności enzymów frakcji mikrosomalnej stymulujących ich aktywację metaboliczną. Uzyskane wyniki wskazują, że naturalne komórkowe systemy metaboliczne i antyoksydacyjne mają zdolność do ograniczania potencjału prooksydacyjnego i mutagennego SOP powstających podczas procesów termicznych. Ponadto, biorąc pod uwagę niski indeks mutagenności (<2), ryzyko indukcji mutacji oksydacyjnej jest prawdopodobnie stosunkowo niskie, niezależnie od aktywacji metabolicznej. Przy zastosowaniu innych szczepów bakterii, w tym TA98 (z aktywacją metaboliczną) i TA100 (bez aktywacji metabolicznej) obserwowano wzrost częstości mutacji pod wpływem stigmasterolu ogrzewanego w 180 °C, jednak niski wskaźnik aktywności mutagennej (<2) nie potwierdził jednoznacznie jego mutagenności.

Badania na modelu bariery jelitowej *in vitro* wykazały, że w efekcie 24-godzinnej lub chronicznego traktowania stigmasterolem ogrzewanym w 180 °C, dochodzi do obniżenia integralności nabłonka jelitowego i zwiększenia jego przepuszczalności, pomimo wzmacniania ekspresji genów kodujących białkowe składniki połączeń międzykomórkowych w nabłonku, które determinują szczelność bariery jelitowej.

Analizy wykonane w ramach niniejszej pracy potwierdziły wcześniejsze doniesienia literaturowe, że wolny stigmasterol ulega szybkiej degradacji, generując podczas obróbki termiczno-oksydacyjnej zróżnicowaną grupę produktów degradacji i szereg oksypochodnych, które mogą wykazywać reaktywność oksydacyjną i indukować efekty cytotoksyczne i genotoksyczne w komórkach i tkankach organizmu. Stwierdzono, że estryfikacja

stigmasterolu kwasem oleinowym i linolowym ogranicza degradację stigmasterolu oraz powstawanie produktów degradacji i oligomerów, prowadząc do zmniejszenia ryzyka wystąpienia niepożądanych skutków toksycznych. Wyniki testów cytotoksyczności potwierdziły znacznie niższy potencjał cytotoksyczny estrów stigmasterolu (oleinowego i linolowego) niż wolnego stigmasterolu. W przeciwieństwie do wolnego stigmasterolu, oleinian i linolan stigmasterolu w stężeniach do 40 µg/ml nie wpływały na żywotność i proliferację prawidłowych komórek nabłonka jelitowego i wątroby. Jednak pogłębione badania wykazały, że po ekspozycji komórek śluzówki okrężnicy na estry linolowy i oleinowy w dawce 40 µg/ml, pojawiają się nieliczne populacje komórek apoptotycznych ze zwiększoną aktywnością kaspaz-3/7, bez nasilenia produkcji wewnątrzkomórkowych RFT. Wyniki badań wskazują na brak reaktywności oksydacyjnej, aktywności cytotoksycznej, genotoksycznej i mutagennej estrów linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu niepoddanych obróbce termiczno-oksydacyjnej.

Estryfikacja stigmasterolu kwasem linolowym i oleinowym umożliwiła istotne zredukowanie ilości produktów degradacji i oksypochodnych stigmasterolu generowanych w trakcie obróbki termiczno-oksydacyjnej. Efektem estryfikacji było również wyższe bezpieczeństwo toksykologiczne estrów stigmasterolu niż związku macierzystego. Znacznie większą stabilnością i mniejszą reaktywnością oksydacyjną charakteryzował się oleinian stigmasterolu, który po obróbce termicznej w 60 °C i 180 °C nie wzmagał wewnątrzkomórkowej produkcji RFT, nie działał cytotoksycznie i nie indukował pęknięć DNA w komórkach nabłonka jelita grubego, a także nie wykazywał aktywności mutagennej czy promutagennej. Ponadto, oleinian stigmasterolu był bezpieczny dla funkcjonalnego nabłonka jelitowego; nie zakłócał integralności i szczelności połączeń międzykomórkowych w nabłonku. Natomiast ogrzewany linolan stigmasterolu zwiększał akumulację RFT w komórkach, co sugeruje udział SOP w wywoływanych przez linolan stigmasterolu efektach cytotoksycznych, prooksydacyjnych i proapoptotycznych. SOP generowane podczas obróbki termicznej linolanu stigmasterolu w 180 °C spowodowały wzrost częstości mutacji w wysoce wrażliwym na oksydację zmutowanym szczepie *Salmonella typhimurium* TA102. Jednak w obecności enzymów frakcji mikrosomalnej użytej do aktywacji metabolicznej, nie wykazano istotnej rewersji mutacji i aktywności mutagennej linolanu stigmasterolu poddanego obróbce termiczno-oksydacyjnej. Podobny efekt detoksykujący, obserwowany po aktywacji metabolicznej, stwierdzono również w przypadku wolnego stigmasterolu ogrzewanego w 180 °C. Enzymy przeciwutleniające, takie jak katalaza lub dysmutaza ponadtlenkowa, zawarte we frakcji mikrosomalnej mogą niwelować RFT generowane przez oksypochodne.

Linolan stigmasterolu po ogrzewaniu w 180 °C spowodował rozluźnienie połączeń międzykomórkowych w nabłonku jelitowym, co mogło być też efektem obniżonej ekspresji genów białek odpowiedzialnych za utrzymanie jego szczelności. W przeciwieństwie do linolanu, oleinian stigmasterolu ogrzewany w 180 °C wykazał pozytywny wpływ na nabłonek jelitowy, poprzez uszczelnienie połączeń międzykomórkowych i wzmocnienie ekspresji genów *TJPI* i *OCLNI* kodujących białko zonula occludens-1 i okludynę.

Większość doniesień naukowych wskazuje, że fitosterole, w tym stigmasterol, nie wpływają negatywnie na zdrowie człowieka. Należy jednak podkreślić, że ilość badań i ich wszechchronność jest niewystarczająca, szczególnie w odniesieniu do pochodnych stigmasterolu i produktów powstających podczas ich przechowywania i obróbki termiczno-oksydacyjnej. Badania toksykologiczne powinny być kontynuowane, aby dostarczyć dowodów na bezpieczeństwo i prozdrowotne działanie stigmasterolu i jego pochodnych oraz żywności funkcjonalnej wzbogacanej w te związki.

6. Wnioski

Wyniki badań przeprowadzone w ramach niniejszej pracy pozwoliły sformułować następujące wnioski:

1. Warunki obróbki termiczno-oksydacyjnej (60 °C, 12 h; 180 °C, 8 h) stigmasterolu i jego estrów wpływają na stopień degradacji reszt sterolowych i reszt kwasów tłuszczowych oraz ilość powstających oksystigmasteroli i oligomerów. Ogrzewanie związków w temperaturze 180 °C generuje największą ilość produktów degradacji i oksypochodnych.
2. Estrы stigmasterolu są bardziej stabilne podczas obróbki termiczno-oksydacyjnej niż stigmasterol niezestryfikowany. Ilość produktów generowanych w trakcie ogrzewania estrów jest mniejsza niż przy ogrzewaniu stigmasterolu wolnego, przy czym stopień nienasycenia łańcucha węglowego kwasu tłuszczowego wpływa na ilość produktów przemian termiczno-oksydacyjnych estrów.
3. Wolny stigmasterol charakteryzuje się znacznie większą cytotoksycznością niż stigmasterol zestryfikowany. Estrы stigmasterolu w niskich dawkach, fizjologicznie istotnych, nie wykazują działania cytotoksycznego dla ludzkich komórek nabłonka jelitowego i wątroby.
4. Potencjał cytotoksyczny wolnego stigmasterolu ulega obniżeniu na skutek ogrzewania w temperaturze 180 °C, co prawdopodobnie jest związane z termiczną degradacją cząsteczki stigmasterolu. Stigmasterol, nieogrzewany i ogrzewany w 180 °C, hamuje proliferację komórek nabłonka jelitowego poprzez supresję syntezy DNA, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₂/M oraz kierowanie komórek na zależny od kaspaz szlak apoptozy.
5. Stigmasterol i ester stigmasterolu z kwasem linolowym poddane ogrzewaniu w temperaturze 60 °C i 180 °C charakteryzują się reaktywnością oksydacyjną, wpływając na zwiększenie poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach nabłonka jelitowego.
6. Stigmasterol i jego estrы z kwasem linolowym i oleinowym, niezależnie od obróbki termiczno-oksydacyjnej, nie wykazują działania genotoksycznego, mutagennego czy promutagennego.
7. Stigmasterol przy dłuższym czasie ekspozycji może negatywnie wpływać na barierę jelitową, poprzez obniżenie integracji struktury i rozszczelnienie połączeń międzykomórkowych w nabłonku jelitowym.

8. W efekcie chronicznego narażenia komórek jelitowych na linolan stigmasterolu może dochodzić do zaburzenia integralności nabłonka jelitowego i osłabienia ekspresji genów kodujących białkowe składniki połączeń międzykomórkowych w nabłonku.
9. Oleinian stigmasterolu nie wykazuje negatywnego wpływu na barierę jelitową; nie wpływa na integralność, przepuszczalność i ścisłość połączeń międzykomórkowych w nabłonku jelitowym.
10. Spośród analizowanych związków, oleinian stigmasterolu charakteryzuje się najwyższą stabilnością termiczną i bezpieczeństwem dla komórek układu pokarmowego.

7. Literatura:

1. Adnan, S.N.A., Ibrahim, N., Yaacob, W.A. (2017) Transcriptome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in response to stigmasterol and lupeol. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 8, 48–54.
2. Ajagbe, B.O., Othman, R.A., Myrie, S.B. (2015) Plant sterols, stanols, and sitosterolemia. *Journal of AOAC International*, 98(3), 716–723.
3. Alawode, T.T., Lajide, L., Olaleye, M., Owolabi, B. (2021) Stigmasterol and β -sitosterol: antimicrobial compounds in the leaves of *Icacina trichantha* identified by GC–MS. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 10, 80.
4. Alemany, L., Laparra, J.M., Barberá, R., Alegría, A. (2012) Evaluation of the cytotoxic effect of 7keto-stigmasterol and 7keto-cholesterol in human intestinal (Caco-2) cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(9), 3106–3113.
5. Alemany, L., Laparra, J. M., Barberá, R., Alegría, A. (2013) Relative expression of cholesterol transport-related proteins and inflammation markers through the induction of 7-ketosterol-mediated stress in Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 247–253.
6. Al-Fatlawi, A.A.Y. (2019) Stigmasterol inhibits proliferation of cancer cells via apoptotic regulatory genes. *Bioscience Research*, 16, 695–702.
7. Ali, H., Dixit, S., Ali, D., Alqahtani, S.M., Alkahtani, S., Alarifi, S. (2015) Isolation and evaluation of anticancer efficacy of stigmasterol in a mouse model of DMBA-induced skin carcinoma. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 2793–2800.
8. AmeliMojarad, M., AmeliMojarad, M., Pourmahdian, A. (2022) The inhibitory role of stigmasterol on tumor growth by inducing apoptosis in Balb/c mouse with spontaneous breast tumor (SMMT). *BMC Pharmacology and Toxicology*, 23(1), 42.
9. Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E. (1973) An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(3), 782-6.
10. Antwi, A.O., Obiri, D.D., Osafo, N. (2017) Stigmasterol modulates allergic airway inflammation in guinea pig model of ovalbumin-induced asthma. *Mediators of Inflammation*, 2953930.
11. AOCS Official Method Ce 1 k-07 (2007) Direct methylation of lipids for the determination of total fat, saturated, cis-monounsaturated, cis-polyunsaturated, and trans fatty acids by chromatography. Champaign, IL.

12. Artursson, P. (1990) Epithelial transport of drugs in cell culture. A model of studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79, 476-482.
13. Artursson, P., Karlsson, J. (1991) Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (CACO-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 175(3): 880-885.
14. Bacchetti, T., Masciangelo, S., Bicchiega, V., Bertoli, E., Ferretti, G. (2011) Phytosterols, phytosterols and their esters: from natural to functional foods. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 4 (3), 165–172.
15. Bae, H., Song, G., Lim, W. (2020) Stigmasterol causes ovarian cancer cell apoptosis by inducing endoplasmic reticulum and mitochondrial dysfunction. *Pharmaceutics*, 12(6), 488.
16. Bai, G., Ma, C., Chen, X. (2021) Phytosterols in edible oil: distribution, analysis and variation during processing. *Grain & Oil Science and Technology*, 4(1), 33–44.
17. Bakrim, S., Benkhaira, N., Bourais, I., Benali, T., Lee, L.H., El Omari, N., Sheikh, R.A., Goh, K.W., Ming, L.C., Bouyahya, A. (2022) Health benefits and pharmacological properties of stigmasterol. *Antioxidants*, 11(10), 1912.
18. Barriuso, B., Astiasarán, I., Ansorena, D. (2016) Unsaturated lipid matrices protect plant sterols from degradation during heating treatment. *Food Chemistry*, 196, 451–458.
19. Barriuso, B., Otaegui-Arazola, A., Menéndez-Carreño, M., Astiasarán, I., Ansorena, D. (2012) Sterols heating: degradation and formation of their ring-structure polar oxidation products. *Food Chemistry*, 135, 706–712.
20. Baumgartner, S., Mensink, R.P., Konings, M., Schött, H.F., Friedrichs, S., Husche, C., Lütjohann, D., Plat, J. (2015) Postprandial plasma oxyphytosterol concentrations after consumption of plant sterol or stanol enriched mixed meals in healthy subjects. *Steroids*, 99, 281–286.
21. Baumgartner, S., Mensink, R.P., Haenen, G.R., Bast, A., Binder, C.J., Bekers, O., Husche, C., Lütjohann, D., Plat, J. (2017) The effects of vitamin E or lipoic acid supplementation on oxyphytosterols in subjects with elevated oxidative stress: a randomized trial. *Scientific Reports*, 7, 15288.
22. Berger, A., Jones, P.J.H., Abumweis, S.S. (2004) Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients, *Lipids in Health and Disease*, 3:5.
23. Boldrin, P.K., Resende, F.A., Höhne, A.P.O., de Camargo, M.S., Espanha, L.G., Nogueira, C.H., Melo, M.D.F., Vilegas, W., Varanda, E.A. (2013) Estrogenic and

- mutagenic activities of *Crotalaria pallida* measured by recombinant yeast assay and Ames test. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 13, 216.
24. Botelho, P.B., Galasso, M., Dias, V., Mandrioli, M., Lobato, L.P., Rodriguez-Estrada, M.T., Castro, I.A. (2014) Oxidative stability of functional phytosterol-enriched dark chocolate. *LWT - Food Science and Technology*, 55, 444–451.
 25. Burg, V.K., Grimm, H.S., Rothhaar, T.L., Grösgen, S., Hundsdörfer, B., Hauptenthal, V.J., Zimmer, V.C., Mett, J., Weingärtner, O., Laufs, U., Broersen, L.M., Tanila, H., Vanmierlo, T., Lütjohann, D., Hartmann, T., Grimm, M.O. (2013) Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study. *The Journal of Neuroscience*, 33(41), 16072–16087.
 26. Calvo, T.R., Demarco, D., Santos, F.V., Moraes, H.P., Bauab, T.M., Varanda, E.A., Colus, I.M.S., Vilegas, W. (2010) Phenolic compounds in leaves of *Alchornea triplinervia*: Anatomical localization, mutagenicity, and antibacterial activity, *Natural Product Communications*, 5, 8, 1225 – 1232.
 27. Chen, W.-P., Yu, C., Hu, P.-F., Bao, J.-P., Tang, J.-L., Wu, L.-D. (2012) Stigmasterol blocks cartilage degradation in rabbit model of osteoarthritis. *Acta Biochimica Polonica*, 59(4), 537–541.
 28. Cilla, A., Attanzio, A., Barberá, R., Tesoriere, L., Livrea, M.A. (2015) Anti-proliferative effect of main dietary phytosterols and β -cryptoxanthin alone or combined in human colon cancer Caco-2 cells through cytosolic Ca^{+2} – and oxidative stress-induced apoptosis, *Journal of Functional Foods*, 12, 282-293.
 29. Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Stetina, R. (2008) The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis*, 23, 143–151.
 30. Cremonini, A.L., Formisano, E., Pasta, A., Borgarelli, C., Fresa, R., Pisciotta, L. (2021) Evaluation of the efficacy of plant sterols supplement sterolip® ESI in patients with type IIA hypercholesterolemia in relation to Genetic variants modulating intestinal absorption of cholesterol. *Journal of Food Science and Nutrition Research*, 4, 81-192.
 31. Dambatta, M.B., Ndukwe, G.I., Amupitan, A.O. (2017) Stigmasterol as antimicrobial agent from root extracts of *Cola millenii*. *International Journal of Science for Global Sustainability*, 4(1), 7.
 32. De Smet, E., Mensink R.P., Plat J. (2012) Effects of plant sterols and stanols on intestinal cholesterol metabolism: Suggested mechanisms from past to present. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(7), 1058–1072.

33. Dong, Y., Chen, C., Chen, C., Zhang, C., Zhang, L., Zhang, Y., Li, Y., Dong, Z. (2021) Stigmasterol inhibits the progression of lung cancer by regulating retinoic acid-related orphan receptor c. *Histology and Histopathology*, 36(12), 1285–99.
34. EFSA Panel on Food additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) (2012) Scientific Opinion on the safety of stigmasterol-rich plant sterols as food additive. *EFSA Journal*, 10(5), 2659.
35. EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA) i in. (2020) Safety of the extension of use of plant sterol esters as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, 18, e06135.
36. Fayed, M.A.A., Al-Wahaibi, L.H., Bakr, R.O., Nour, M.S., Basudan, O.A., Parvez, M.K., Al-Dosari, M.S., Abdel-Mageed, W.M. (2023) Sterols from *Centaurea pumilio L.* with cell proliferative activity: In vitro and in silico studies. *Open Chemistry*, 21(1), 20220316.
37. ^aFeng, S., Dai, Z., Liu, A.B., Huang, J., Narsipur, N., Guo, G., Kong, B., Reuhl, K., Lu, W., Luo, Z., Yang, C.S. (2018). Intake of stigmasterol and β -sitosterol alters lipid metabolism and alleviates NAFLD in mice fed a high-fat western-style diet. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863(10), 1274–1284.
38. ^bFeng, S., Gan, L., Yang, C.S., Liu, A.B., Lu, W., Shao, P., Dai, Z., Sun, P., Luo, Z. (2018) Effects of stigmasterol and β -sitosterol on nonalcoholic fatty liver disease in a mouse model: a lipidomic analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(13), 3417–3425.
39. Feng, S., Wang, L., Shao, P., Sun, P., Yang, C.S. (2022) A review on chemical and physical modifications of phytosterols and their influence on bioavailability and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62, 5638–5657.
40. Firestone D.(ed) (1997) Determination of the composition of the sterol fraction of animal and vegetable oils and fats by TLC and capillary GLC. AOCS Official Method Ch 6-91. *American Oil Chemists' Society*, Champaign, IL.
41. Gabay, O., Sanchez, C., Salvat, C., Chevy, F., Breton, M., Nourissat, G., Wolf, C., Jacques, C., Berenbaum, F. (2010) Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(1), 106–116.
42. Gao, J., Chen, S., Zhang, L., Cheng, B., Xu, A., Wu, L., Zhang, X. (2015) Evaluation of cytotoxic and apoptotic effects of individual and mixed 7-ketophytosterol oxides on human intestinal carcinoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(3), 1035–1041.

43. Garcia-Llatas, G., Rodriguez-Estrada, M.T. (2011) Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(6), 607-624.
44. Haque, M.N., Moon, I.S. (2018) Stigmasterol upregulates immediate early genes and promotes neuronal cytoarchitecture in primary hippocampal neurons as revealed by transcriptome analysis. *Phytomedicine*, 46, 164–175.
45. Hartmann M-A. (1998) Plant sterols and the membrane environment. *Trends In Plant Science*, 3(5), 170-175.
46. Hazer, B., Akyol, E. (2016). Efficiency of gold nano particles on the autoxidized soybean oil polymer: fractionation and structural analysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93, 201–213.
47. He, D., Wang, S., Fang, G., Zhu, Q., Wu, J., Li, J., Shi, D., Lian, X. (2022) LXRs/ABCA1 activation contribute to the anti-inflammatory role of phytosterols on LPS-induced acute lung injury. *Journal of Functional Foods*, 89, 104966.
48. Hovenkamp, E., Demonty, I., Plat, J., Lütjohann, D., Mensink, R.P., Trautwein, E.A. (2008) Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge. *Progress in Lipid Research*, 47(1), 37–49.
49. Husche, C., Weingärtner, O., Pettersson, H., Vanmierlo, T., Böhm, M., Laufs, U., Lütjohann, D. (2011) Validation of an isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry method for analysis of 7-oxygenated campesterol and sitosterol in human serum. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(6), 425–431.
50. Katan, M.B., Grundy, S.M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., Paoletti, R. (2003) Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clinic Proceedings*, 78(8), 965–978.
51. Khan, M.A., Sarwar, A.H.M.G., Rahat, R., Ahmed, R.S., Umar, S. (2020) Stigmasterol protects rats from collagen induced arthritis by inhibiting proinflammatory cytokines. *International Immunopharmacology*, 85, 106642.
52. Khanam, S.; Sultana, R. (2012) Isolation of β -sitosterol & stigmasterol as active immunomodulatory constituents from fruits of *Solanum xanthocarpum* (Solanaceae). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(4), 1057–1060.
53. Kim, Y.S., Li, X.F., Kang, K.H., Ryu, B., Kim, S.K. (2014) Stigmasterol isolated from marine microalgae *Navicula incerta* induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *BMB Reports*, 47(8), 433–8.

54. Kmiecik, D., Gramza – Michałowska, A., Korczak, J. (2018) Anti-polymerization activity of tea and fruits extracts during rapeseed oil heating. *Food Chemistry*, 239, 858-864.
55. Kopeć, A., Nowacka, E., Piątkowska, E., Leszczyńska, T. (2011) Charakterystyka i prozdrowotne właściwości steroli roślinnych. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 3(76), 5 – 14.
56. Laparra, J.M., Alfonso-García, A., Alegría, A., Barberá, R., Cilla, A. (2015) 7keto-stigmasterol and 7keto-cholesterol induce differential proteome changes to intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Food and Chemical Toxicology*, 84, 29-36.
57. Le, C.-F., Kailaivasan, T. H., Chow, S.-C., Abdullah, Z., Ling, S.-K., Fang, C.-M. (2017) Phytosterols isolated from *Clinacanthus nutans* induce immunosuppressive activity in murine cells. *International Immunopharmacology*, 44, 203–210.
58. Lea, L.J., Hepburn, P.A., Wolfreys, A.M., Baldrick, P. (2004) Safety evaluation of phytosterol esters. Part 8. Lack of genotoxicity and subchronic toxicity with phytosterol oxides. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 771–783.
59. Leal-Castañeda, E.J., Inchingolo, R., Cardenia, V., Hernandez-Becerra, J.A., Romani, S., Rodriguez-Estrada, M.T., García Galindo, H. S. (2015) Effect of microwave heating on phytosterol oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(22), 5539–5547.
60. Lee, S., Youn, K., Jun, M. (2018) Major compounds of red ginseng oil attenuate A β 25–35-induced neuronal apoptosis and inflammation by modulating MAPK/NF- κ B pathway. *Food & Function*, 9(8), 4122–4134.
61. Lehtonen, M., Lampi, A.M., Agalga, F., Struijs, K., Pironen, V. (2012) The effects of acyl moiety and temperature on the polymerization of sterols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 677–686.
62. Lengyel, J., Rimarčík, J., Vagánek, A., Fedor, J., Lukeš, V., Klein, E. (2012) Oxidation of sterols: Energetics of C–H and O–H bond cleavage. *Food Chemistry*, 133(4), 1435–1440.
63. Leonarduzzi G., Vizio B., Sottero B., Verde V., Gamba P., Mascia C., Chiarotto E., Poli G., Biasi. F (2006) Early involvement of ROS overproduction in apoptosis induced by 7-ketocholesterol. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8, 375–380.
64. Levin, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Schwiers, E.A., Ames, B.N. (1982) A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A \times T base pairs at the site of mutation detects

- oxidative mutagens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 7445–7449.
65. Li, K., Yuan, D., Yan, R., Meng, L., Zhang, Y., Zhu, K. (2018): Stigmasterol exhibits potent antitumor effects in human gastric cancer cells mediated via inhibition of cell migration, cell cycle arrest, mitochondrial mediated apoptosis and inhibition of JAK/STAT signalling pathway. *Journal of BUON*, 23(5), 1420-1425.
66. Li, Q.C.J., Li, Z. (2012) β -sitosterol and stigmasterol induced apoptosis in human hepatoma cell line SMMC-7721. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 03(05), 1173–1175.
67. Li, X., Xin, Y., Mo, Y., Marozik, P., He, T., Guo, H. (2022) The bioavailability and biological activities of phytosterols as modulators of cholesterol metabolism. *Molecules*, 27 (2), 523.
68. Liang, Y.T., Wong, W.T., Guan, L., Tian, X.Y., Ma, K.Y., Huang, Y., Chen, Z.-Y. (2011) Effect of phytosterols and their oxidation products on lipoprotein profiles and vascular function in hamster fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis*, 219(1), 124–133.
69. Liao, H., Zhu, D., Bai, M., Chen, H., Yan, S., Yu, J., Zhu, H., Zheng, W., Fan, G. (2020) Stigmasterol sensitizes endometrial cancer cells to chemotherapy by repressing Nrf2 signal pathway. *Cancer Cell International*, 20, 480.
70. Lin, X., Racette, S.B., Lefevre, M., Spearie, C.A., Most, M., Ma, L., Ostlund, R.E. Jr. (2010) The effects of phytosterols present in natural food matrices on cholesterol metabolism and LDL-cholesterol: a controlled feeding trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64 (12), 1481–1487.
71. Lin, Y., Knol, D., Valk, I., van Andel, V., Friedrichs, S., Lütjohann, D., Hrnčirik, K., Trautwein, E.A. (2017). Thermal stability of plant sterols and formation of their oxidation products in vegetable oils and margarines upon controlled heating. *Chemistry and Physics of Lipids*, 207, 96–107.
72. Lin, Y., Knol, D., Menéndez-Carreño, M., Baris, R., Jansen, H.G., Trautwein, E.A. (2018) Oxidation of sitosterol and campesterol in foods upon cooking with liquid margarines without and with added plant sterol esters. *Food Chemistry*, 241, 387–396.
73. Liu, W., Hu, D., Huo, H., Zhang, W., Adiliaghdam, F., Morrison, S., Ramirez, J.M., Gul, S.S., Hamarneh, S.R., Hodin, R.A. (2016) Intestinal alkaline phosphatase regulates tight junction protein levels. *Journal of the American College of Surgeons*, 222(6), 1009-17.

74. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25, 402-408.
75. López-García, G., Cilla, A., Barbera, R., Alegria, A. (2017): Antiproliferative effect of plant sterols at colonic concentrations on Caco-2 cells. *Journal of Functional Foods*, 39, 84–90.
76. Luister, A., Schött, H.F., Husche, C., Schäfers, H.J., Böhm, M., Plat, J., Gräber, S., Lütjohann, D., Laufs, U., Weingärtner, O. (2015) Increased plant sterol deposition in vascular tissue characterizes patients with severe aortic stenosis and concomitant coronary artery disease. *Steroids*, 99, 272–280.
77. Matsui, H., Shimokawa, O., Kaneko, T., Nagano, Y., Rai, K., Hyodo, L. (2011) The pathophysiology of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced mucosal injuries in stomach and small intestine. *Journal of Clinical Biochemistry Nutrition*, 48, 107–111.
78. Mattson, F.H., Volpenhein, R.A., Erickson, B.A. (1977). Effect of plant sterol esters on the absorption of dietary cholesterol. *The Journal of Nutrition*, 107(7), 1139–1146.
79. Maron D.M., Ames B.N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113, 173-215.
80. Michelini, F.M., Lombardi, M.G., Bueno, C.A., Berra, A., Sales, M.E., Alché, L.E. (2016) Synthetic stigmasterol derivatives inhibit capillary tube formation, herpetic corneal neovascularization and tumor induced angiogenesis: Antiangiogenic stigmasterol derivatives. *Steroids*, 115, 160–168.
81. Mo, Z., Xu, P., Li, H. (2021) Stigmasterol alleviates interleukin-1beta-induced chondrocyte injury by down-regulating sterol regulatory element binding transcription factor 2 to regulate ferroptosis. *Bioengineered*, 12(2), 9332–9340.
82. Mongkolpobsin, K., Sillapachaiyaporn, C., Nilkhet, S., Tencomnao, T., Baek, S.J. (2023) Stigmasterol isolated from *Azadirachta indica* flowers attenuated glutamate-induced neurotoxicity via downregulation of the Cdk5/p35/p25 signaling pathway in the HT-22 cells. *Phytomedicine*, 113, 154728.
83. Moreau, R.A., Whitaker, B.D., Hicks, K.B. (2002) Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 41(6), 457–500.
84. Morgan, L.V., Petry, F., Scatolin, M., De Oliveira, P.V., Alves, B.O., Zilli, G.A.L., Volfe, C.R.B., Oltramari, A.R., De Oliveira, D., Scapinello, J., Müller L.G. (2021) Investigation of the anti-inflammatory effects of stigmasterol in mice: Insight into its mechanism of action. *Behavioural Pharmacology*, 32(8), 640–651.

85. Nazemi, M., Khaledi, M., Golshan, M., Ghorbani, M., Amiran, M.R., Darvishi, A., Rahmanian, O. (2020) Cytotoxicity activity and druggability studies of stigmasterol isolated from marine sponge *Dysidea avara* against oral epithelial cancer cell (KB/C152) and T-lymphocytic leukemia cell line (Jurkat/ E6-1). *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 21(4), 997–1003.
86. Neises, B., Steglich, W. (1978) Simple method for esterification of carboxylic acid. *Angewandte Chemie International Edition*, 17, 522-524.
87. Nowak A. (2011): Fitosterole w codziennej diecie. *Postępy Fitoterapii*, 1, 48-51.
88. O’Callaghan, Y.C., Foley, D.A., O’Connell, N.M., McCarthy, F.O., Maguire, A.R., O’Brien, N.M. (2010) Cytotoxic and apoptotic effects of the oxidized derivatives of stigmasterol in the U937 human monocytic cell line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10793–10798.
89. Omran, G., Abd-Alhaseeb, M., Houssen, M. (2021) The anti-tumor effect of stigmasterol on sorafenib treated human breast cancer cell lines. *Research Square*, 1–14.
90. Panda, S., Jafri, M., Kar, A., Meheta, B.K. (2009) Thyroid inhibitory, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Butea monosperma*. *Fitoterapia*, 80(2), 123–126.
91. Pandey, P., Bajpai, P., Siddiqui, M.H., Sayyed, U., Tiwari, R., Shekh, R., Mishra, K., Kapoor, V.K. (2019) Elucidation of the chemopreventive role of stigmasterol against Jab1 in gall bladder carcinoma. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 19(6), 826–837.
92. Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M.D., Kedingler, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Hafen, K., Fogh, J., Zweibaum, A. (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell*, 47, 323-330.
93. Pollak, O.J. (1953) Reduction of blood cholesterol in man, *Circulation*, 7(5), 702-706.
94. Pórolniczak, A., Rubiś, B., Rybczyńska, M. (2008) Molekularne podstawy komplementacji diety fitosterolami w aspekcie zachorowalności i leczenia raka. *Współczesna Onkologia*, 12(10), 447–451.
95. Peterson, D.W. (1951) Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 78 (1), 143-147.
96. Plat, J., Theuwissen, E., Husche, C., Lütjohann, D., Gijbels, M.J., Jeurissen, M., Shiri-Sverdlov, R., van der Made, I., Mensink, R.P. (2014) Oxidised plant sterols as well as

- oxycholesterol increase the proportion of severe atherosclerotic lesions in female LDL receptor +/- mice. *British Journal of Nutrition*, 111(1), 64–70.
97. Poulouse, N., Sajayan, A., Ravindran, A., Chandran, A., Priyadharshini, G.B., Selvin, J., Kiran, G.S. (2021) Anti-diabetic potential of a stigmasterol from the seaweed *Gelidium spinosum* and its application in the formulation of nanoemulsion conjugate for the development of functional biscuits. *Frontiers in Nutrition*, 8:694362.
98. Pratiwi, R., Nantasenamat, C., Ruankham, W., Suwanjang, W., Prachayasittikul, V., Prachayasittikul, S., Phopin, K. (2021) Mechanisms and neuroprotective activities of stigmasterol against oxidative stress-induced neuronal cell death via sirtuin family. *Frontiers in Nutrition*, 8, 648995.
99. Putt, K.K., Pei, R., White, H.M., Bolling, B.W. (2017) Yogurt inhibits intestinal barrier dysfunction in Caco-2 cells by increasing tight junctions. *Food & Function*, 8(1):406-414.
100. Raczyk, M., Kmiecik, D., Przybylski, R., Rudzińska, M. (2017) Effect of fatty acid unsaturation on phytosterol ester degradation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(5), 701-711.
101. Raczyk, M., Paszel-Jaworska, A., Rudzińska, M. (2018) Cytotoxic activity of stigmasteryl esters and products of their thermo-oxidative degradation against drug sensitive and drug resistant human acute lymphoblastic leukemia cells. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 17(1), 11-18.
102. Ramu, R., Shirahatti, P.S., Nayakavadi, S., Vadivelan, R., Zameer, F., Dhananjaya, B.L., Prasad, N. (2016) The effect of a plant extract enriched in stigmasterol and β -sitosterol on glycaemic status and glucose metabolism in alloxan-induced diabetic rats. *Food & Function*, 7(9), 3999–4011.
103. Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D.A. (2016) Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863, 2977–2992.
104. Rubiś, B., Paszel, A., Kaczmarek, M., Rudzińska, M., Jeleń, H., Rybczyńska, M. (2008) Beneficial or harmful influence of phytosterols on human cells? *British Journal of Nutrition*, 100(6), 1183-1191.
105. Rudzińska, M. (2022) Phytosterols as functional compounds and their oxidized derivatives. W: *Lipid Oxidation in Food and Biological Systems*. Red: Bravo-Diaz, C. Springer, Cham: 361-380.

106. Rudzińska, M., Korczak, J., Wąsowicz, E. (2005) Changes in phytosterols and their oxidation products during frying of French fries in rapeseed oil. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 55(4), 381–387.
107. Rudzińska, M., Olejnik, A., Grygier, A., Kowalska, K., Kmiecik, D., Grudniewska, A., Chojnacka, A., Gładkowski, W., Maciejewska, G., Przybylski, R. (2022) Thermo-oxidative stability of asymmetric distigmasterol-modified acylglycerols as novel derivatives of plant sterols, *Food Chemistry*, 390, 133150.
108. Rudzińska, M., Przybylski, R., Wąsowicz, E. (2009) Products formed during thermo-oxidative degradation of phytosterols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(7), 651–662.
109. Rudzińska, M., Przybylski, R., Wąsowicz, E. (2014) Degradation of phytosterols during storage of enriched margarines. *Food Chemistry*, 142, 294–298.
110. Ryan, E., Chopra, J., McCarthy, F., Maguire, A.R., O'Brien, N.M. (2005) Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxic and apoptotic potential of phytosterol oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products. *British Journal of Nutrition*, 94(3), 443–451.
111. Saddiq, A.A., Tag, H.M., Doleib, N.M., Salman, A.S., Hagagy, N. (2022) Antimicrobial, antigenotoxicity, and characterization of *Calotropis procera* and its rhizosphere-inhabiting actinobacteria: in vitro and in vivo studies. *Molecules*, 27, 3123.
112. Salehi, B., Quispe, C., Sharifi-Rad, J., Cruz-Martins, N., Nigam, M., Mishra, A.P., Kononov, D.A., Orobinskaya, V., Abu-Reidah, I.M., Zam, W., Sharopov, F., Venneri, T., Capasso, R., Kukula-Koch, W., Wawruszak, A., Koch, W. (2021) Phytosterols: from preclinical evidence to potential clinical applications. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 599959.
113. Sali, V.K., Mansingh, D.P., Vasanthi, H.R. (2016) Relative apoptotic potential and specific G1 arrest of stigmaterol and cinnamic acid isolated from the brown algae *Padina gymnospora* in HeLa and A549 cells. *MedChemComm*, 7(7), 1429–1435.
114. Sambuy, Y., Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stamatii, A., Zucco, F. (2005) The Caco-2 cell line as a model of intestinal barrier: influence of cell and culture related factors on Caco-2 cell functional characteristic. *Cell Biology and Toxicology*, 21, 1-26.
115. Sampath, S.J.P., Kotikalapudi, N., Venkatesan, V. (2021) A novel therapeutic combination of mesenchymal stem cells and stigmaterol to attenuate osteoarthritis in rodent model system—a proof of concept study. *Stem Cell Investigation*, 8, 5.

- 116.^bSampath, S.J.P., Rath, S.N., Kotikalapudi, N., Venkatesan, V. (2021) Beneficial effects of secretome derived from mesenchymal stem cells with stigmasterol to negate IL-1 β -induced inflammation in-vitro using rat chondrocytes—OA management. *Inflammopharmacology*, 29(6), 1701–1717.
- 117.Sánchez, A.B., Calpena, A.C., Mallandrich, M., Clares, B. (2019) Validation of an ex vivo permeation method for the intestinal permeability of different BCS drugs and its correlation with Caco-2 in vitro experiments. *Pharmaceutics*, 11, 638.
- 118.Shaller, H. (2004) New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), 465-476.
- 119.Song, N., Wang, J., Lai, Z., Liang, S., Zou, W., Wang, J., Zheng, D., Li, Y., He, Y., Cheng, J., Wu, Y. (2022) *Arisaema heterophyllum blume* monomer stigmasterol targets PPAR γ and inhibits the viability and tumorigenicity of lung adenocarcinoma cells NCI-H1975. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022:5377690.
- 120.Sugano, M., Kamo, F., Ikeda, I., Morioka, H. (1976) Lipid-lowering activity of phytosterols in rats, *Atherosclerosis*, 24 (1–2), 301-309.
- 121.Sugiyama, K., Yamada, M., Awogi, T., Hakura, A. (2016) The strains recommended for use in the bacterial reverse mutation test (OECD guideline 471) can be certified as non-genetically modified organisms. *Genes and Environment*, 38, 2.
- 122.Sultana, R., Khanam, S., Devi, K. (2011) Evaluation of immunomodulatory activity of *Solanum xanthocarpum* fruits aqueous extract, *Der Pharmacia Lettre*, 3(1): 247-253.
- 123.Sun, J., Li, X., Liu, J., Pan, X., Zhao, Q (2019) Stigmasterol exerts neuro-protective effect against ischemic/reperfusion injury through reduction of oxidative stress and inactivation of autophagy. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 15, 2991-3001.
- 124.Tao, C., Shkumatov, A.A., Alexander, S.T., Ason, B.L., Zhou, M. (2019) Stigmasterol accumulation causes cardiac injury and promotes mortality. *Communications Biology*, 2, 20.
- 125.Tavelin, S., Gräsjö, J., Taipälensuu, J., Ocklind, G., Artursson, P. (2002) Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport. W: *Epithelial cell culture protocols. Series: Methods in Molecular Biology*. Red: C. Wise. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey: 233-272.
- 126.Tolentino, F., de Arai, P.A., Marques, E.D., Petreanu, M., de Andrade, S.F., Niero, R., Perazzo, F.F., Rosa, P.C.P., Maistro, E.L. (2015) In vivo evaluation of the genetic toxicity of *Rubus niveus* Thunb. (Rosaceae) extract and initial screening of its potential

- chemoprevention against doxorubicin-induced DNA damage, *Journal of Ethnopharmacology*, 164, 89–95.
127. Trouillas, P., Corbière, C., Liagre, B., Duroux, J.-L., Beneytout, J.-L. (2005) Structure–function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(4), 1141–1149.
128. Valitova, J.N., Sulkarnayeva, A.G., Minibayeva, F.V. (2016) Plant Sterols: diversity, biosynthesis, and physiological functions. *Biochemistry Moscow*, 81(8), 819-834.
129. Vejux, A., Montange, T., Martine, L., Zarrouk, A., Riedinger, J.M., Lizard, G. (2012) Absence of oxysterol-like side effects in human monocytic cells treated with phytosterols and oxyphytosterols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (16), 4060–4066.
130. Wang, J., Huang, M., Yang, J., Ma, X., Zheng, S., Deng, S., Huang, Y., Yang, X., Zhao, P. (2017) Anti-diabetic activity of stigmasterol from soybean oil by targeting the GLUT4 glucose transporter. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1364117.
131. Wang, M., Lu, B. (2018) How do oxyphytosterols affect human health? *Trends in Food Science & Technology*, 79, 148–159.
132. Wang, M., Yu, M., Amrouche, A.T., Jie, F., Ji, S., Lu, B. (2023) Human intestinal Caco-2 cell model to evaluate the absorption of 7-ketophytosterols and their effects on cholesterol transport. *Food Science and Human Wellness*, 12, 5, 1701-1707.
133. Wang, W.L., Chen, S.-M., Lee, Y.-C., Chang, W.W. (2022) Stigmasterol inhibits cancer stem cell activity in endometrial cancer by repressing IGF1R/mTOR/AKT pathway. *Journal of Functional Foods*, 99, 105338.
134. Witkowska, A.M., Waśkiewicz, A.; Zujko, M.E., Mirończuk-Chodakowska, I., Cicha-Mikołajczyk, A., Drygas, W. (2021) Assessment of plant sterols in the diet of adult polish population with the use of a newly developed database. *Nutrients*, 13(8), 2722.
135. Woo, S.-Y., Lee, H., Park, S.M., Choi, H.S., Kim, J., Kwon, M., Sohn, J., Nam, J.H., Kim, H.S., Song, P., Baryawno, N., Kim, Y.-H., Kim, K., Lee, D. (2022) Role of reactive oxygen species in regulating 27-hydroxycholesterol-induced apoptosis of hematopoietic progenitor cells and myeloid cell lines. *Cell Death & Disease*, 13, 916.
136. Wolfreys, A.M., Hepburn, P.A. (2002) Safety evaluation of phytosterol esters. Part 7. Assessment of mutagenic activity of phytosterols, phytosterol esters and the cholesterol derivative, 4-cholesten-3-one. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 461–470.

137. Xingan Cheng, X.Z., Zhang, S. (2014) Effect of phytosterol on growth inhibition and apoptosis induction of melanoma cells. *Guangdong Agricultural Sciences*, 41(10), 94–97.
138. Yang, C., Chen, Z.Y., Wong, S.L., Liu, J., Liang, Y.T., Lau, C.W., Lee, H.K., Huang, Y., Tsang, S.Y. (2013) β -Sitosterol oxidation products attenuate vasorelaxation by increasing reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Cardiovascular Research*, 97(3), 520–532.
139. Yee, S. (1997) In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man - Fact or myth. *Pharmaceutical Research*. 14(6), 763-766.
140. Yuan, L., Zhang, F., Jia, S., Xie, J., Shen, M. (2020) Differences between phytosterols with different structures in regulating cholesterol synthesis, transport and metabolism in Caco-2 cells. *Journal of Functional Foods*, 65, 103715.
141. Yusuf, A.J., Abdullahi, M.I., Aleku, G.A., Ibrahim, I.A.A., Alebiosu, C.O., Yahaya, M., Adamu, H.W., Sanusi, A., Mailafiya, M.M., Abubakar H. (2018). Antimicrobial activity of stigmasterol from the stem bark of *Neocarya macrophylla*. *Journal of Medicinal Plants for Economic Development*, 2(1).
142. Zhang, S.Y.W., Wang, L. (2008) The inhibitory effect of stigmasterol on hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo and its effect on proliferation cycle and apoptosis. *Adv modern biomed*. 8(11), 2016–7.
143. Zhang, J., Zhang, C., Miao, L., Meng, Z., Gu, N., Song, G. (2023) Stigmasterol alleviates allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in asthma mice through inhibiting substance-P receptor, *Pharmaceutical Biology*, 61(1), 449-458.
144. Zhao, H., Zhang, X., Wang, M., Lin, Y., Zhou, S. (2021) Stigmasterol simultaneously induces apoptosis and protective autophagy by inhibiting Akt/mTOR pathway in gastric cancer cells. *Frontiers in Oncology*, 11, 629008.

8. Załączniki

Wykaz tabel i rysunków

Rycina 1. Struktura cholesterolu i fitosteroli (β -sitosterolu, kampesterolu i stigmasterolu) powszechnie występujących w materiale roślinnym.....	11
Rycina 2. Potencjał prozdrowotny stigmasterolu	17
Rycina 3. Schemat badań.....	29
Rycina 4. Struktura analizowanych związków: stigmasterolu oraz jego estrów z kwasem oleinowym i linolowym	31
Rycina 5. Schemat przedstawiający model nabłonka jelitowego Caco-2 w układzie doświadczalnym.....	46
Rycina 6. Stopień degradacji stigmasterolu oraz kwasów tłuszczowych po ogrzewaniu stigmasterolu, linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu w temperaturze 60 °C przez 12 godzin oraz w temperaturze 180 °C przez 8 godzin.....	51
Rycina 7. Wpływ stigmasterolu nieogrzewanego oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin na żywotność i aktywność metaboliczną komórek nabłonka okrężnicy linii CCD 841 CoN	61
Rycina 8. Wpływ stigmasterolu nieogrzewanego oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin na żywotność i aktywność metaboliczną komórek jelita cienkiego linii FHs 74 Int.....	62
Rycina 9. Wpływ stigmasterolu nieogrzewanego oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin na żywotność i aktywność metaboliczną komórek wątroby linii THLE-2.....	63
Rycina 10. Wpływ linolanu stigmasterolu nieogrzewanego oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin na żywotność i aktywność metaboliczną komórek nabłonka okrężnicy linii CCD 841 CoN.....	64
Rycina 11. Wpływ linolanu stigmasterolu nieogrzewanego oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin na żywotność i aktywność metaboliczną komórek jelita cienkiego linii FHs 74 Int.....	65
Rycina 12. Wpływ linolanu stigmasterolu nieogrzewanego oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin na żywotność i aktywność metaboliczną komórek wątroby linii THLE-2.....	66

Rycina 13. Wpływ oleinianu stigmasterolu nieogrzewanego oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin na żywotność i aktywność metaboliczną komórek nabłonka okrężnicy linii CCD 841 CoN	67
Rycina 14. Wpływ oleinianu stigmasterolu nieogrzewanego oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin na żywotność i aktywność metaboliczną komórek jelita cienkiego linii FHs 74 Int.....	68
Rycina 15. Wpływ oleinianu stigmasterolu nieogrzewanego oraz ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin na żywotność i aktywność metaboliczną komórek wątroby linii THLE-2.....	69
Rycina 16. Wpływ stigmasterolu, linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu nieogrzewanych, ogrzewanych w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin na syntezę DNA w komórkach nabłonka okrężnicy linii CCD 841 CoN.....	71
Rycina 17. Pęknięcia nici DNA wykrywane w komórkach nabłonka jelita grubego po ekspozycji na stigmasterol, linolan stigmasterolu i oleinian stigmasterolu nieogrzewane i ogrzewane w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin	74
Rycina 18. Obrazy komórek traktowanych analizowanymi związkami w dawce 40 µg/ml, po zatopieniu w agarozie, elektroforezie w warunkach alkalicznych i wybarwieniu barwnikiem SybrGold.	74
Rycina 19. Wyniki analizy kometowej przedstawiające poziom uszkodzeń DNA w komórkach nabłonka jelita grubego po ekspozycji na stigmasterol, linolan stigmasterolu i oleinian stigmasterolu nieogrzewane i ogrzewane w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin.....	75
Rycina 20. Indukcja rewersji mutacji i aktywność mutagenna w analizowanych szczepach bakterii <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, TA102 i TA1537 z zastosowaniem mutagenów i promutagenów referencyjnych	76
Rycina 21. Wpływ stigmasterolu, linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu nieogrzewanych i ogrzewanych w temperaturze 60°C (12 h) i 180°C (8 h) na rewersję mutacji w szczepach bakterii <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, TA102 i TA1537 bez dodatku i z dodatkiem frakcji mikrosomalnej (S9).....	79
Rycina 22. Wpływ stigmasterolu, linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu nieogrzewanych i ogrzewanych w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin na wewnątrzkomórkową produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach nabłonka jelitowego okrężnicy CCD 841 CoN	82

Rycina 23. Wpływ stigmasterolu, linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu nieogrzewanych i ogrzewanych w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin na aktywność kaspaz 3/7 w komórkach nabłonka jelitowego okrężnicy CCD 841 CoN	84
Rycina 24. Rozmieszczenie komórek nabłonka jelitowego okrężnicy CCD 841 CoN w fazach cyklu komórkowego po traktowaniu stigmasterolem, linolanem stigmasterolu i oleinianem stigmasterolu nieogrzewanym i ogrzewanym w temperaturze 60 °C przez 12 godzin i 180 °C przez 8 godzin	86
Rycina 25. Wpływ stigmasterolu, linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu nieogrzewanych i ogrzewanych w temperaturze 180°C na proliferację, żywotność i aktywność metaboliczną komórek nabłonka jelitowego Caco-2	88
Rycina 26. Wpływ stigmasterolu, linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu w dawce 40 µg/ml, nieogrzewanych i ogrzewanych w temperaturze 180 °C na integralność nabłonka jelitowego Caco-2 po ekspozycji przez 4 godziny i 24 godziny	89
Rycina 27. Wpływ 24-godzinnej ekspozycji nabłonka jelitowego Caco-2 na stigmasterol, linolan stigmasterolu i oleinian stigmasterolu nieogrzewany i ogrzewany w 180 °C na przepuszczalność dekstryny FD4 i współczynnik przenikalności pozornej (Papp).....	91
Rycina 28. Kinetyka transportu FD4 przez nabłonek jelitowy eksponowany przez 24 godziny na stigmasterol, linolan stigmasterolu i oleinian stigmasterolu nieogrzewane i ogrzewane w 180°C.....	92
Rycina 29. Wpływ stigmasterolu, linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu w dawkach 10, 20 i 40 µg/ml, nieogrzewanych i ogrzewanych w temperaturze 180°C na integralność nabłonka jelitowego podczas różnicowania komórek Caco-2 w komórki enterocyto-podobne	94
Rycina 30. Wpływ stigmasterolu, linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu w dawkach 10, 20 i 40 µg/ml, nieogrzewanych i ogrzewanych w temperaturze 180 °C dodawanych do hodowli komórek Caco-2 podczas ich różnicowania w komórki enterocyto-podobne na współczynnik przenikalności pozornej Papp i przeznabłonkowy przepływ związku referencyjnego – dekstryny FD4	95
Rycina 31. Wpływ stigmasterolu, linolanu stigmasterolu i oleinianu stigmasterolu w dawkach 10, 20 i 40 µg/ml, nieogrzewanych i ogrzewanych w temperaturze 180 °C przez 8 godzin, dodawanych do hodowli komórek Caco-2 podczas ich różnicowania, na poziom ekspresji mRNA genów <i>TJPI</i> , <i>OCLN1</i> i <i>CLDN1</i> , kodujących odpowiednio białko zonula occludens-1 (ZO-1), okludynę i kładynę.....	97

Tabela 1. Zawartość fitosteroli w wybranych produktach spożywczych.....	13
Tabela 2. Cele molekularne i mechanizmy przeciwnowotworowego działania stigmasterolu	19
Tabela 3. Charakterystyka szczepów <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. <i>typhimurium</i> zastosowanych w teście Ames.....	40
Tabela 4. Mutageny wzorcowe stanowiące kontrolę pozytywną w analizach mutagenności.	42
Tabela 5. Skład mieszanin reakcyjnych stosowanych w analizach mutagenności i promutagenności analizowanych związków z zastosowaniem testu Ames.....	43
Tabela 6. Startery zastosowane w reakcji Real-Time PCR.....	49
Tabela 7. Zawartość oksystigmasteroli powstających w wyniku ogrzewania stigmasterolu, oleinianu stigmasterolu oraz linolanu stigmasterolu.....	53
Tabela 8. Produkty termiczno–oksydacyjnej degradacji stigmasterolu, oleinianu stigmasterolu oraz linolanu stigmasterolu.	57
Tabela 9. Dawki cytotoksyczne EC ₁₀ i EC ₅₀ wyznaczone dla stigmasterolu, jego estrów i produktów ich termiczno-oksydacyjnej degradacji w odniesieniu do komórek nabłonka jelita grubego CCD 841 CoN i jelita cienkiego FHs 74 Int oraz wątroby THLE-2.....	59
Tabela 10. Aktywność mutagenna wyznaczona dla mutagenów referencyjnych zastosowanych w teście Ames.....	77
Tabela 11. Aktywność mutagenna stigmasterolu, linolanu stigmasterolu oraz oleinianu stigmasterolu w szczepach <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, TA102 i TA 1537 wyliczona w teście odwróconej mutacji <i>Salmonella</i> z (+S9) oraz bez aktywacji metabolicznej (-S9).....	80

Dorobek naukowy

Publikacje:

1. **Maria Kasprzak**, Magdalena Rudzińska, Dominik Kmieciak, Roman Przybylski, Anna Olejnik, Acyl moiety and temperature affects thermo-oxidative degradation of steryl esters. Cytotoxicity of the degradation products. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 136, 111074, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111074>.
IF₂₀₂₀ = 6,023; MNiSW= 100 pkt
2. **Maria Kasprzak**, Magdalena Rudzińska, Roman Przybylski, Dominik Kmieciak, Aleksander Siger, Anna Olejnik. The degradation of bioactive compounds and formation of their oxidation derivatives in refined rapeseed oil during heating in model system, *LWT - Food Science and Technology*, 2020, 123, 109078. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109078>.
IF₂₀₂₀ = 4,952; MNiSW= 100 pkt
3. **Maria Kasprzak**, Magdalena Rudzińska, Wojciech Juzwa, Anna Olejnik. Anti-proliferative potential and oxidative reactivity of thermo-oxidative degradation products of stigmasterol and stigmasteryl esters for human intestinal cells. *Scientific Reports*, 2023, 13, 7093. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34335-0>
IF₂₀₂₂ = 4,600; MNiSW= 140 pkt

Doniesienia konferencyjne:

1. Rudzińska M., Olejnik A., Paszel-Jaworska A., **Kawska M.**, Lisiak N., Romaniuk A., Lipińska N. In vitro studies on cytotoxicity of stigmasterol and its esters to the normal human cells derived from the digestive system. 15th EuroFedLipid Congress „Oil, fats and lipids: New Technologies and Applications for a Healthier Life”, Uppsala, Sweden, 27-30.09.2017.
2. **Kawska M.**, Olejnik A., Rudzińska M. Ocena cytotoksyczności i genotoksyczności produktów termicznej oksydacji stigmasterolu i jego estrów – zarys badań. Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki– X edycja. Poznań, 21.01. 2017.
3. **Kawska M.**, Juzwa W., Myszką K. Cytometryczna procedura oceny żywotności i aktywności metabolicznej komórek drobnoustrojów pobranych z biofilmu wytworzonego sztucznie na powierzchni płytki teflonowej. Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki– X edycja. Poznań, 21.01. 2017 (wyróżnienie za doniesienie konferencyjne).
4. **Kasprzak M.**, Olejnik A., Rudzińska M. Aktywność biologiczna stigmasterolu i jego estrów w odniesieniu do prawidłowych komórek przewodu pokarmowego. Konferencja naukowa „Oleje jadalne od surowca do zdrowia organizmu”. Poznań 12-13 czerwca 2019 (I miejsce w konkursie na najlepszy referat).

Sumaryczny Impact Factor wg *Journal Citation Reports* (JCR) dla publikacji: 15,575;

Suma punktów wg wykazu czasopism MNiSW: 340 pkt.

Sumaryczna liczba cytowań według bazy *Web of Science* (na dzień 23.09.2023r.): 29.