

**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**

## 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 wspomaganie 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 nienasylenia 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 ( $\leq 40 \mu\text{g/ml}$ ) 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.*

25.09.2023.

*Monie Kosmala*