

### 1. Uzasadnienie podjęcia badania :

Sterole roślinne, zwane też fitosterolami, szerokim strumieniem wkraczają do naszej codziennej diety i stają się składnikiem wiadomie poszukiwanym przez wielu konsumentów. Występują naturalnie w olejach roślinnych, warzywach i pestkach owoców, a także dodawane są do produktów spożywczych jako składniki funkcjonalne. Ich właściwością biologiczną jest obniżenie poziomu cholesterolu we krwi człowieka odgrywając coraz większą rolę w profilaktyce i leczeniu niedokrwiennej choroby serca. Początkowo stosowane w postaci leków, potem jako suplementy diety, obecnie dodawane do produktów spożywczych stanowi przykład żywności funkcjonalnej. W 1995 roku po raz pierwszy wprowadzono na rynek margaryn z dodatkiem steroli roślinnych. Dzisiaj mamy do czynienia z dużym rodzajem produktów wysoko i nisko-tłuszczowych wzbogacanych w te związki. Fitosterole zostały uznane przez wiele organizacji międzynarodowych i europejskich (m.in. FDA, SCF) za bezpieczne dla zdrowia człowieka i uzyskały status GRAS, pomimo że obniżają poziom karotenoidów i witaminy E w organizmie. Nie są to jedyne niekorzystne właściwości tych związków. Jako substancje nienasycone, podobnie jak cholesterol – główny sterol pochodzenia zwierzęcego, ulegają utlenianiu. Pochodne utlenione cholesterolu (oksysterole) mają właściwość mutagenne, aterogenne, kancerogenne i cytotoksyczne. O pochodnych utlenionych fitosteroli (oksyfitosterolach) wiemy tylko, że są cytotoksyczne, powodują zmiany aterogenne i przyczyniają się do powstawania stresu oksydacyjnego. W ostatnich 5 latach ukazało się prawie 700 publikacji na temat oksysteroli i tylko 10 dotyczących utleniania fitosteroli. Związki te obecne są w surowcach i produktach spożywczych, a ich zawartość zwiększa się w trakcie przetwarzania i przechowywania żywności. Tym samym zmniejsza się poziom steroli, które oprócz pochodnych utlenionych, mogą też ulegać rozpadowi lub polimeryzacji/polikondensacji. Dane literaturowe na temat tworzących się w tych procesach substancji niskocząsteczkowych, związków lotnych oraz oligomerów są bardzo ograniczone. W dobie powszechnie obecnej żywności wzbogacanej w sterole roślinne, a także w związku z ich obecnością w olejach roślinnych istnieje potrzeba wyjaśnienia wpływu produktów termicznej oksydacji fitosteroli i ich estrów na organizm człowieka, zwłaszcza że produkty te są często stosowane do gotowania, pieczenia lub smażenia.

### 2. Cel badania :

Fitosterole i ich estrы z kwasami tłuszczowymi występują naturalnie w olejach i tłuszczach roślinnych, gdzie stanowią nawet do 90% frakcji niezmydlalnej si. Jako składniki funkcjonalne obniżają poziom cholesterolu we krwi człowieka związki te dodawane są w dużych ilościach do różnych produktów spożywczych.

Prowadzone w ramach wcześniejszych projektów badania, wykazały, że podczas przetwarzania i przechowywania żywności zawierającej sterole roślinne i ich estrы, powstają ich pochodne utlenione, dimery, oligomery i wiele związków niskocząsteczkowych. Cytotoksyczność oleju sojowego i rzepakowego poddanych termicznej oksydacji została udowodniona nie wykazano jednak które związki są odpowiedzialne za to negatywne działanie.

Celem proponowanego projektu jest izolacja produktów degradacji stigmasterolu i jego estrów z układów modelowych i produktów spożywczych oraz badania ich właściwości biologicznych i mechanizmów działania *in vitro*.

### 3. Metoda badawcza:

Materiał do badania stanowi będzie stigmasterol i jego estrы z kwasami tłuszczowymi (oleinowym i linolowym) oraz olej rzepakowy i margaryna wzbogacone w badany fitosterol i jego estrы, poddane termicznej oksydacji w temperaturze 60°C i 180°C. Próby kontrolne będą stanowiły związki i produkty nieogrzewane, a uzyskane wyniki zostaną porównane z danymi uzyskanymi dla cholesterolu.

1. W pierwszym etapie badania zostanie przeprowadzona estryfikacja stigmasterolu wybranymi kwasami tłuszczowymi i termiczna oksydacja tych związków oraz cholesterolu jako wzorca. Produkty degradacji stigmasterolu i jego estrów oraz cholesterolu zostaną oznaczone ilościowo i jako ciowo z zastosowaniem takich technik chromatograficznych, jak: GC-FID, GC-MS, GCxGC-MS, HPLC-SEC/ELSD, HPLC-MS.

2. Produkty termicznej oksydacji stigmasterolu i jego estrów zostaną rozfrakcjonowane przy wykorzystaniu technik SPE i HPLC wg ich polarności i wielkości cząsteček niskocząsteczkowe, monomery, dimery i oligomery. Skład produktów termicznej oksydacji wyizolowana będzie frakcja zawierająca pochodne utlenione stigmasterolu.

3. Następnie zostaną przeprowadzone badania *in vitro* ocenając je cytotoksyczność, genotoksyczność, mutagenność stigmasterolu i jego estrów przed i po termicznej ich oksydacji. Analizy cytotoksyczne i genotoksyczne zostaną przeprowadzone w odniesieniu do ludzkich hepatocytów linii THLE-2, ludzkich komórek linii FHs 74 Int i CCD 841 CoN pozyskanych odpowiednio z prawidłowego nabłonka jelita cienkiego i grubego.

4. Olej rzepakowy i margaryna zostaną wzbogacone w stigmasterol i jego estrы, a następnie poddane termicznej oksydacji w tych samych warunkach, jakie były zastosowane w układach modelowych. W otrzymanych próbkach zostaną zidentyfikowane i oznaczone ilościowo produkty degradacji stigmasterolu i jego estrów, ze szczególnym uwzględnieniem tych frakcji, które wykazywały właściwości toksyczne w badaniach biologicznych.

### 4. Planowane rezultaty:

Wyniki badań prowadzonych w ramach projektu pozwolą na określenie toksycznej aktywności, lub jej brak, produktów powstających podczas termicznej oksydacji fitosteroli i/lub ich estrów w nieprawidłowo przetwarzanych lub przechowywanych produktach spożywczych. Zastosowanie nowoczesnych wysokosprawnych technik analitycznych pozwoli na wyseparowanie poszczególnych frakcji tych związków, a następnie pozyskanie informacji o ich toksyczności i mechanizmach ich działania. Określenie tych właściwości jest fundamentalne ze względu na rosnące spożycie żywności bogatej w sterole roślinne i ich estrы, a wykorzystywane często do obróbki termicznej (pieczenie, smażenie). Analiza aktywności biologicznej badanych związków ma duże znaczenie z punktu widzenia bezpieczeństwa tych produktów. Uzyskane wyniki będą stanowiły bazę do prowadzenia dalszych badań pozwalających na pogłębienie i wykorzystanie wiedzy z zakresu toksyczności produktów degradacji fitosteroli i ich estrów i pozwoli zrozumieć ich znaczenie fizjologiczne.