

# Suda dağılılabilen bitki sterol formülasyonunun, bitki sterol esterlerine kıyasla lipit profili üzerinde daha iyi etki göstermesi

Mandana Amir Shaghghi<sup>a,c</sup>, Scott V. Harding<sup>a,c,1</sup>, Peter J.H. Jones<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Manitoba Üniversitesi, İnsan Beslenme Bilimleri Bölümü, Winnipeg, MB R3T 6C5, Kanada

<sup>b</sup> Manitoba Üniversitesi Gıda Bilimleri Bölümü, Winnipeg, MB R3T 6C5, Kanada

<sup>c</sup> Richardson Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrasötikler Merkezi, Manitoba Üniversitesi, Winnipeg, MB R3T 6C5, Kanada

## MAKALE BİLGİLERİ

Makale geçmişi:

Alınma Tarihi: 13 Ağustos 2013

Revize olarak alınma tarihi:

15 Ekim 2013

Kabul Tarihi: 21 Ekim 2013

Çevrimiçi Erişim: 20 Kasım 2013

Anahtar kelimeler:

Bitki steroller

Suda dağılılabilen bitki steroller

Esterleştirilmiş bitki steroller

Kolesterol emilimi

## ÖZET:

Bitki sterollerinin (PS) kolesterol düşürücü etkisi bilinmekle birlikte, bazı diyet formülasyonlarında PS'nin çözünürlüğünün azalmasıyla ilgili sorunlar hala açıklığa kavuşturulmamıştır. Bu çalışma, serbest bitki sterollerinin (WD-PS) ve bitki sterol esterlerinin (PS-esterler) suda dağılılabilen formülasyonlarının etkinliğini belirlemiştir. Randomize, çapraz bir çalışmada, hafif ila orta derecede hiperkolesterolemili 47 kişiye 4 hafta boyunca tek doz günlük PS ile zenginleştirilmiş yoğurt (WD-PS veya PS esterlerinden 2 g/gün PS) veya plasebo verilmiştir. WD-PS veya PS-esterlerle zenginleştirilmiş yoğurt, kontrol grubuna göre serum toplam kolesterol (sırasıyla %7,7 ve %6,3) ve LDL kolesterol düzeylerinde (sırasıyla %11,7 ve %11,6) benzer düşüşlere neden olmuştur ( $p < 0,001$ ; tümü). Toplam kolesterolün HDL kolesterolüne ve non-HDL kolesterolün HDL kolesterolüne oranları, kontrol grubuna kıyasla WD-PS ile (sırasıyla %10,6 ve %15,2) PS-esterlere göre (sırasıyla %7,0 ve %10,8) daha fazla azalmıştır ( $p < 0,05$ ). WD-PS tüketimi, PS esterlerinin tüketimine kıyasla serum trigliserid düzeylerini düşürdü (13,9%,  $p < 0,05$ ) (0,6%). Hem WD-PS hem de PS esterleri LDL kolesterolün düşürülmesine etkili bir şekilde katkıda bulunmuştur, ancak WD-PS formülasyonu serum TG ve toplam kolesterolün HDL kolesterolüne oranını iyileştirerek kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde ek etkiler sağlamıştır.

Deneme kaydı (clinicaltrials.gov): NCT01478789.

© 2013 Elsevier Ltd. Tüm hakları saklıdır.

## 1. Giriş

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, kardiyovasküler hastalıklar (KVH) dünya çapında önde gelen ölüm nedenleridir (WHO, 2011). LDL kolesterolün düşürülmesi, KVH'nin önlenmesinde merkezi bir rol oynar ve diyet değişiklikleri ve tedavi ile sağlanabilir (NCEP, 2001). Bu nedenle, PS'nin kolesterol düşürücü etkisinin kanıtlanmış olması nedeniyle, birçok danışma kurulu, kan lipid düzeylerini optimize etmek için değiştirilmiş diyetin bir bileşeni olarak günde 2 g PS alımını önermektedir (America Diyabet Derneği, 2008; Health Canada, 2010; NCEP, 2001). PS'nin kolesterol düşürücü özelliğinden sorumlu ana etki mekanizması, bağırsaklarda kolesterol emiliminin engellenmesidir. (Trautwein ve diğerleri, 2003). Safra tuzu misellerinde kolesterol ve PS arasındaki rekabetçi çözünürlük, bağırsak kolesterol emilimini azalttığı ve dolayısıyla dolaşımdaki kolesterol düzeylerini düşürdüğü, aynı zamanda endojen kolesterol biyosentezini kısmen artırdığı iddia

edilmektedir (Abumweis, Barake, & Jones, 2008). PS, kolesterol emilimini azalttığı için, PS kullanımına ilişkin önemli bir endişe, PS'nin yağda çözünen vitaminlerin ve karotenoidlerin emilimini azaltabileceğidir (Berger, Jones, & Abumweis, 2004; Law, 2000; Rudkowska, AbuMweis, Nicolle, & Jones, 2008b). Ancak, farklı çalışmaların sonuçları, yağda çözünen antioksidanlarda hiçbir değişiklik olmaması (De Jong ve diğerleri, 2008; Korpela ve diğerleri, 2006; Thomsen, Hansen, Christiansen, Green, & Berger, 2004; Volpe ve diğerleri, 2001) ile tokoferol ve/veya b-karoten düzeylerinde önemli bir azalma (Clifton ve diğerleri, 2004; Mensink, Ebbing, Lindhout, Plat, & van Heugten, 2002; Noakes, Clifton, Doornbos, & Trautwein, 2005; Richelle ve diğerleri, 2004) veya sadece serum lutein ve likopen düzeylerinde azalma arasında değişiklik göstermiştir (Rudkowska ve diğerleri, 2008b).

Kimyasal yapıları ve düşük çözünürlükleri nedeniyle, PS'nin optimal sağlık yararları elde etmek için uygun şekilde formüle edilmesi gerekir. Gerçekten de, PS kristal özelliklere, yüksek

- Bu çalışma Nutrartis S.A., Inc, Şili tarafından finanse edilmiştir. Sponsor, çalışmanın tasarımı ve yürütülmesi, verilerin analizi ve yorumlanması, raporun yazılması veya makalenin yayınlanmak üzere sunulması kararında hiçbir rol oynamamıştır.

\* İlgili yazar. Adres: Richardson Center for Functional Foods and Nutraceuticals, University of Manitoba, 196 Innovation Drive, Winnipeg, Manitoba R3T 6C5, Kanada. Tel.: +1 204 474 8883; faks: +1 204 474 7552.

E-posta adresleri: scott.harding@kcl.ac.uk (S.V. Harding), peter\_jones@umanitoba.ca (P.J.H. Jones).

<sup>1</sup> Mevcut adres: Diabetes and Nutritional Sciences Division, School of Medicine, King's College London, Franklin-Wilkins Building, 150 Stamford Street, London SE1 9NH, Birleşik Krallık.

Kısaltmalar: CRP, C-reaktif protein; PS, bitki steroller; TC, toplam kolesterol; WD-PS, suda dağılılabilen bitki steroller; PS-ester, esterleştirilmiş bitki steroller

1756-4646/\$ - önsöz bölümüne bakınız © 2013 Elsevier Ltd. Tüm hakları saklıdır.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.10.017>



erime noktasına ve su ve yağlarda düşük çözünürlüğe sahiptir, bu da gıda matrislerine dahil edilmesini zorlaştırır ve pratik uygulamalarını sınırlar. (Berger ve diğerleri, 2004; Fornari, Torres, Torrelo, Senorans, & Reglero, 2009). Geleneksel olarak, en yaygın işlem PS'yi bitkisel yağ asitleri ile esterleştirilmiş formlarına dönüştürmek ve ardından margarin ve sürülebilir yağlar gibi yağ bazlı gıdalara eklemektir (Fornari ve diğerleri, 2009). Ayrıca, nutrasötik endüstrisindeki araştırmalar, PS'nin çözünürlüğünün ve biyoaktivitesinin çeşitli emülsiyon bazlı dağıtım sistemlerine dahil edilerek büyük ölçüde artırılabilirliğini göstermiştir (Gremaud ve diğerleri, 2002; Lin ve diğerleri, 2009; Meguro ve diğerleri, 2001; Ostlund, Spilburg, & Stenson, 1999). Bazı çalışmalarda, lesitin ile serbest PS formülasyonu kolesterol emilimini ve dolaşımdaki LDL-C'yi önemli ölçüde azaltırken, kristal formdaki PS ile daha az etki görülmüştür (Gremaud ve diğerleri, 2002; Ostlund ve diğerleri, 1999). Ayrıca, Lin ve diğerleri (2009) soya lesitinden saflaştırılmış doğal fitosterol glikozitlerin, PS esterlerle eşzamanlı olarak gözlemlenen %30,6'lık azalmaya kıyasla kolesterol emilimini %37,6 oranında azalttığını belirtmiştir. Son olarak, PS'nin doza bağlı LDL-C düşürücü etkinliği, Demonty ve diğerleri (2009) tarafından seksen dört denemenin meta-analizinde gösterilmiştir. Bu çalışma, PS'nin etkinliğinin, yağ bazlı ve yağ bazlı olmayan araçlar ve/veya serbest PS ve PS ester formları dahil olmak üzere çeşitli tedavi özellikleriyle hiçbir bağlantısı olmadığını doğrulamıştır.

PS esterlerine benzer şekilde, uygun şekilde çözünür hale getirilmiş serbest steroller, bazı çalışmalarda, ancak hepsinde değil, eşdeğer serbest sterol dozu verildiğinde benzer bir LDL-C düşürücü etki gösterdiği gösterilmiştir (Richelle ve diğerleri, 2004). Bu nispeten çözünmeyen maddelerin formülasyon ve uygulama zorluğu nedeniyle serbest PS'nin çözünürlüğünün azalması, bu çalışmaların sonuçları arasındaki tutarsızlığın ana nedenlerinden biridir (Berger ve diğerleri, 2004; Moreau, Whitaker, & Hicks, 2002). Bu nedenle, PS'nin biyoaktivitesi ve etkinliği açısından formunun önemi göz önüne alındığında, daha önce test edilen formlardan büyük farklılıklar gösteren her yeni formülasyonun değeri değerlendirilmelidir.

Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, yeni bir suda dağılılabir PS (WD-PS) formülasyonunun serum lipitleri ve yağda çözünen vitamin konsantrasyonları üzerindeki etkilerini, pozitif kontrol olarak geleneksel PS esterleri ve plasebo (sadece araç) ile karşılaştırarak incelemektir. Ek olarak, bildirilen advers olaylar ve/veya karaciğer enzimleri dahil olmak üzere klinik kimya parametrelerinde istenmeyen değişiklikler olarak tanımlanan güvenlik parametreleri, çalışmanın her aşamasında 4 hafta boyunca incelenmiştir. WD-PS'nin, kan toplam kolesterol ve LDL kolesterol düzeylerini düşürmede PS-es-esterler kadar etkili olacağı hipotezini kurduk.

üzere iki ana bileşene sahiptir. PS-esterin ester kısmı bitkisel yağ asitlerine karşılık gelir. Ayrıca antioksidan olarak karışık tokoferoller ve askorbil palmitat (3000 ppm) içerir. WD-PS ve PS esterlerinin bileşimi ve besin değerleri Tablo 1 ve 2'de gösterilmiştir.

PS-ester, saf serbest sterollerin (Arboris LLC, Savannah, GA, ABD) yenilebilir bitkisel yağlardan elde edilen gıda yağ asitleri ile esterleştirilmesi yoluyla üretilmiştir. Gıda sınıfı yağ asitleri ve steroller karıştırıldı ve karışım, herhangi bir kimyasal katalizör kullanılmadan yüksek sıcaklıkta gerçekleştirildi. Esterleştirme işleminden sonra, fazla serbest yağ asitleri yüksek vakumlu damıtma ile uzaklaştırıldı ve rafine PS esterleri soğutuldu. Hedef bileşim ve partikül boyutuna sahip serbest sterollerin submikron dispersiyonu olan WD-PS, Nutrartis S.A. (Santiago, Şili) tarafından WO 2010/095067 25 numaralı patent başvurusu kullanılarak hazırlanmıştır. Kısaca, saf serbest steroller (Arboris LLC, Savannah, GA, ABD) eritilerek suda sterollerin O/W (yağ-su) emülsiyonu oluşturuldu ve ardından soğutulularak dispersiyon haline getirildi. Dispersiyonun parçacık boyutu, Horiba LA910 ekipmanı kullanılarak belirlenmiş ve ortalama parçacık boyutu 400 nm olarak ölçülmüş olup, 100 nm'nin altında hiçbir parçacık tespit edilmemiştir.

Sade yoğurt (4% yağlı süt, Dairyland, Saputo, Kanada) hem PS (WDPS ve PS-esterler) hem de kontrol olarak gıda taşıyıcı olarak kullanıldı. PS esterler, su banyosunda (VWR 1227, San Diego, CA, ABD) 60 °C'de 3 dakika eritildikten sonra hafifçe karıştırılarak yoğurda karıştırıldı (100 g yoğurda 3,37 g PS ester ilave edildi). WD-PS, gıda ürünlerine uygun şekilde formüle edilmesi için yüksek kesme karıştırma veya homojenleştirme gerektirmeyen, kararlı, çökmeyen, kolayca dağılan bir fitosterol dispersiyonuydu ve hafif çalkalama ile yoğurda karıştırıldı (100 g yoğurda 20 g WD-PS eklendi). WD-PS ve PS-esterler, Richardson Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrasötikler Merkezi'nin metabolik mutfağında aromalandırıldı ve yoğurda karıştırıldı (her iki işlem için 100 g yoğurda 2 g serbest bitki sterolu eklendi). PS ile zenginleştirilmiş (WD-PS ve PS esterleri) ve plasebo yoğurtlar arasında organoleptik farklılıklar tespit edilmemiştir.

## 2. Malzemeler ve yöntemler

### 2.1. Tedavi hazırlığı

WD-PS (Nutrartis SA, Santiago, Şili) ve PS-ester (Arboris LLC, Savannah, GA, ABD), ticari olarak temin edilebilen, tall yağından elde edilen sterol ürünleridir ve ağırlıkça yaklaşık %70-80 oranında beta-sitosterol ve %15 oranında kampesterol olmak



**Tablo 1 - Bitki sterollerinin bileşimi.**

Bileşen	% w/w
WD-PS	
Tall yağ sterolleri	10,0
Bitkisel yağ asitleri (Na + tuzları)	0,2
Polisorbatlar	0,3
Su	89,5
PS esterleri	
Tall yağ sterolleri	62,0
Yağ asitleri	38,0

Not: WD-PS: suda dağılılabılır bitki sterolü; PS-esterler: bitki sterol esterleri; W: ağırlık.

**Tablo 2 - 100 g yoğurt başına bitki sterollerinin besin değerleri.**

Bileşen	WD-PS	PS
Enerji (kcal)	0,60	11,06
Toplam yağ (g)	0,05	1,23
Doymuş yağ (g)	-	0,08
Trans yağ asitleri (g)	-	0,02
Tekli doymamış yağ (g)	0,04	0,79
Çoklu doymamış yağ (g)	—	0,28
Azotsuz ekstrakt (g)	0,04	—
Bitki sterolleri (g)	2,00	2,00

Not: WD-PS: suda dağılılabılır bitki sterolü; PS-esterler: bitki sterol esterleri.

## 2.2. Çalışma popülasyonu

Winnipeg metropol bölgesinde, gazetelerde verilen ilanlarla, optimal serum LDL kolesterol konsantrasyonlarının üzerinde olan erkek ve kadınlar çalışmaya dahil edildi. Potansiyel çalışma gönüllüleri, ilk olarak kişisel sağlık bilgileri, tıbbi durumları ve hastalık öyküsü ile ilgili bir anketle tarandı. Deneklerin potansiyel olarak uygun olduğu belirlenirse, ilk ziyarette kan taraması yapılır ve açlık kanı alınarak TC, HDL-C, LDL-C ve TG düzeyleri dahil olmak üzere genel lipit profili test edilir. Dahil edilme kriterleri arasında başlangıç LDL-C düzeyi 2,8 mmol/l'nin üzerinde, TG düzeyi 4,5 mmol/l'nin altında, vücut kitle indeksi (VKİ) 20 ile 30 kg/m<sup>2</sup> arasında ve yaş 19-75 arasında olması yer almaktaydı. Statins, nikotinik asit veya fibratlar alan gönüllüler çalışmadan çıkarıldı. Diyabetes mellitus, alosterolemi, kalp hastalığı, karaciğer hastalığı, böbrek hastalığı tanısı konulan veya yakın zamanda büyük bir ameliyat geçiren denekler de çalışmadan hariç tutuldu. Bu çalışma, Helsinki Bildirgesi'nde belirtilen kurallara göre gerçekleştirilmiş olup, insan deneklerin katıldığı tüm prosedürler Manitoba Üniversitesi Biyomedikal Araştırma Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Tüm deneklerden yazılı bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

## 2.3. Deney protokolü

Elli üç katılımcı (19-75 yaş) çalışmaya dahil edildi. Çalışma, serbest yaşam tarzında, randomize, çapraz bir deneme olup, her biri 4 haftalık aralıklarla ayrılmış üç adet 29 günlük tedavi aşamasından oluşmuştur. Deneklere, WD-PS ile zenginleştirilmiş yoğurt, PS esterleri ile zenginleştirilmiş yoğurt veya PS içermeyen yoğurt (plasebo) tedavileri rastgele sırayla verildi. Her tedavi döneminde, deneklere normal diyetlerini

takip etmeleri ve RCFN'de standart akşam yemeğini yedikten sonra tedaviyi almaları talimatı verildi ve uyumu izlemek için günlük olarak gözetim altında tutuldu.

## 2.4. Kan örneği alma ve analiz

Denemenin 3 aşamasının her birinde 1., 2., 28. ve 29. günlerde 12 saatlik açlık kan örnekleri alındı. 1. ve 2. günlerde alınan kan örnekleri, farklı çalışma ölçümleri için başlangıç değerlerini ölçmek için kullanılırken, son 2 günde alınan kan örnekleri ise nihai değerleri ölçmek için kullanıldı. Kan örnekleri alındı ve 3000 g'de 20 dakika santrifüjlendi. Ayrılan alikvotlar analiz edilene kadar -80 °C'de donduruldu. Plazma TC, TG, HDL-C ve karaciğer enzimleri (AST, ALT, LDH, ALKP, GGT) düzeyleri, VITROS 350 kimya otomatik analiz cihazı (Ortho-Clinical Diagnostics, Markham, ON, Kanada) kullanılarak analiz edildi. Plazma LDL-C konsantrasyonları Friedewald denklemi kullanılarak hesaplandı (Friedewald, Levy, & Fredrickson, 1972). Plazma CRP, Adiva 1800 klinik kimya sistemi (Siemens Healthcare Diagnostic INC, ON, Kanada) kullanılarak analiz edildi.

## 2.5. Plazma kolesterol öncüsü ve bitki sterol analizleri

Serumdaki bitki sterolleri ve öncü sterollerin konsantrasyonları, önceden belirlenmiş yöntemlere göre gaz kromatografisi GC (Bruker 430; Billerica, MA, ABD) kullanılarak ölçülmüştür (Jones ve diğerleri, 2005). Kısaca, iç standart olarak 5 $\alpha$ -kolestan (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Kanada) her plazma örneğine (100  $\mu$ g/0,5 ml plazma) eklenmiştir. Numuneler, 100 °C'de 2 saat boyunca 0,5 M metanol-KOH ile sabunlaştırıldı ve sabunlaşmayan kısım petrol eteri ile ekstrakte edildi. Ekstraksiyonla elde edilen sabunlaşmayan maddeler, PS konsantrasyon seviyelerinin belirlenmesi için kullanıldı. Örnekler, 500  $\mu$ l TMS reaktifi (piridin-heksametildisilazan-trimetilklorosilan; 9:3:1) ile türevlendirildi (Jones ve diğerleri, 2005). Hazırlık işleminden sonra numuneler, alev iyonizasyon dedektörü ve otomatik enjektör sistemi ile donatılmış GC'ye enjekte edildi. Ayırma, iç çapı 0,25 mm ve film kalınlığı 0,25  $\mu$ m olan 30 m'lik bir kapiler kolon ile gerçekleştirildi (SAC-5, Supelco, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Kanada). Kolon sıcaklığı 2 dakika boyunca 130 °C'de başlatıldı. Ardından sıcaklık 10 dakika boyunca 270 °C'ye (hız: 30 °C/dk) yükseltildi ve tekrar 290 °C'ye (hız: 10 °C/dk) artırıldı. 8 dakika sonra sıcaklık 2 dakika boyunca 310 °C'ye (hız: 20 °C/dk) yükseltildi (toplam süre 30 dakikaydı). Enjektör ve dedektör sıcaklıkları sırasıyla 295 °C ve 300 °C olarak ayarlandı. Taşıyıcı gaz (helyum) akış hızı, giriş ayırıcı 100:1 olarak ayarlanarak 1 ml/dk olarak ayarlandı. İlgili zirveleri, otantik standartlar (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Kanada) kullanılarak belirlenmiştir.

Kolesterol sentezi, önceden belirlenmiş ikame yöntemi temel alınarak değerlendirildi. (Jones ve diğerleri, 2005; Mackay & Jones, 2011). Kısaca, kolesterol biyosentezini belirlemek için lathosterolün kolesterole göre mutlak miktarının oranı ( $\mu$ mol/mmol kolesterol) kullanıldı (Miettinen, Strandberg, & Gylling, 2000; Simonen, Gylling, & Miettinen, 2008; Vanstone & Jones, 2004).



## 2.6. Plazma yağda çözünen vitamin ve karotenoid analizleri

Plazma a-tokoferol, y-tokoferol, retinol, lutein, likopen ve p-karotenin eşzamanlı tayini için UV-VIS spektrofotometre dedektörlü (SPD-6A) izokratik yüksek performanslı sıvı kromatografi HPLC (1100 HPLC, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, ABD) kullanılmıştır. Ekstraksiyon prosedürü Gueguen, Herbeth, Siest ve Leroy (2002) tarafından açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir. Kısaca, vitamin ve karotenoid düzeylerini ölçmek için, 200 µl serumun içine bir iç standart (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), retinol asetat ve β-Apo-8'-karotenol metanol çözeltisi eklenmiştir. Serum örnekleri etanol ile proteinlerden arındırıldı ve iki kez heksan ile ekstrakte edildi. Her numunenin kopyaları hazırlandı, ardından elde edilen ekstraktlar, metanol-aseton-trile-tetrahidrofuran (75:20:5, v/v/v) ile elüe edilmiş kolon koruyuculu bir C18 ters faz kolonu (30 cm x 3,9 mm iç çap) (Zorbax EclipseXDB, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, ABD) üzerine enjekte edildi. Akış hızı 1,0 ml/dk olarak ayarlandı. Tüm analitlerin tam elüsyonu 38 dakika içinde izokratik olarak gerçekleştirildi. Algılama dalga boyları, α ve γ-tokoferol, retinol, lutein ve likopen analizleri için sırasıyla 290 nm, 325 nm, 450 nm ve 475 nm olarak ayarlandı.

## 2.7. İstatistiksel analizler

Örneklem büyüklüğü, PS tedavisi nedeniyle LDL-C düzeylerinde beklenen %12'lik (0,54 mmol/l) farkı tespit etmek için 0,732 mmol/l standart sapma kullanılarak hesaplanmıştır. Alfa ve güç sırasıyla 0,05 ve 0,8 idi. Örneklem büyüklüğü, blok büyüklüğü ve tahmini %10 erken katılımcı çekilme oranı dikkate alınarak belirlenmiştir.

Tüm veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. Tüm analizler için istatistiksel anlamlılık  $p < 0,05$  olarak belirlenmiştir. İstatistiksel analiz SPSS 16.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Temel değişkenler 1 faktörlü AN-OVA kullanılarak analiz edildi. Tüm veriler için, son nokta değerleri d 28 ve 29'un ortalamaları olarak rapor edilmiştir. Son nokta, mutlak değişim ve yüzde değişim değerleri, tedavi ve faz sabit faktörler, denek ise rastgele faktör olarak modellenen varyans analizi (AN-OVA) ve ardından Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Temel değerler, serum lipit ölçümleri için modelde kovaryanslar olarak eklendi. Plazma PS'yi ve serumda yağda çözünen vitaminleri ve karotenoidleri standartlaştırmak için, her bir bileşiğin serum konsantrasyonları sırasıyla plazma TC veya LDL-C konsantrasyonlarına bölünmüştür.

## 3. Sonuçlar

### 3.1. Denek özellikleri

Başlangıçta 53 katılımcı seçilmiş, ancak 47 denek (25 erkek ve 22 kadın) denemenin tamamını tamamlamıştır.

Denemeyi tamamlayamama nedenleri arasında yoğurt tüketememe ( $n = 2$ ), başka bir şehre taşınma ( $n = 1$ ) ve kişisel nedenler ( $n = 3$ ) yer almaktadır. Çalışmayı tamamlayan deneklerin temel özellikleri Tablo 3'te gösterilmektedir. Tüm katılımcılar deneysel tedavilere iyi tolerans gösterdi ve herhangi bir yan etki bildirilmedi. Denekler fiziksel aktivitede

herhangi bir değişiklik bildirmemiş ve üç tedavinin uygulanmasından sonra vücut ağırlığında önemli bir fark gözlemlenmemiştir.

### 3.2. PS tedavilerine yanıt olarak plazma lipit konsantrasyonları

Her bir tedaviye verilen başlangıç ve son nokta plazma lipit konsantrasyonu tepkileri Tablo 4'te gösterilmektedir. Başlangıçta, değerlendirilen lipit parametrelerinde üç tedavi arasında önemli bir fark gözlemlenmemiştir.

Bu çalışmada, WD-PS ve PS esterlerinin takviyesi serum lipoprotein profillerini iyileştirmiştir. Özellikle, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, son nokta toplam kolesterol ve LDL kolesterol düzeylerinde azalma ( $p < 0,001$ ) gözlemlenmiştir. WD-PS ile zenginleştirilmiş yoğurt ve PS esterleri ile zenginleştirilmiş yoğurt tüketimi, kontrol ürününe kıyasla toplam kolesterol konsantrasyonlarını ortalama olarak %7,7 ve %6,2 oranında benzer şekilde düşürmüştür (tümü için  $p < 0,001$ ). Benzer şekilde, yoğurta WD-PS ve PS esterlerinin tüketimi, LDL kolesterolü ortalama olarak sırasıyla %11,7 ve %11,6 oranında düşürmüştür (tüm için  $p < 0,001$ ) (Tablo 4). Üç tedavide de son noktada HDL-C düzeylerinde herhangi bir tedavi etkisi gözlemlenmemiş olmakla birlikte, WD-PS takviyesinde TC/HDL-C ve Non-HDL-C/HDL-C oranlarında kontrol grubuna kıyasla önemli azalmalar (sırasıyla %10,5, %15,2,  $p < 0,05$ ) gözlemlenmiştir, ancak PS ester takviyesinde böyle bir azalma gözlemlenmemiştir (Tablo 4). Plazma TG konsantrasyonları, tedaviye bağlı olarak son noktalar arasında farklılık göstermedi. Ancak tedavi süresince, WD-PS ile zenginleştirilmiş yoğurt tüketimi nedeniyle TG düzeyleri başlangıç değerine göre azalmıştır (13,9%,  $p < 0,05$ ), ancak PS esterleri ile zenginleştirilmiş yoğurt ile karşılaştırıldığında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir azalma görülmemiştir (Tablo 4). WD-PS'nin TG düzeyleri üzerindeki olumlu etkisi ile başlangıç TG konsantrasyonları arasındaki potansiyel ilişkiyi incelemek için daha ayrıntılı analizler yapılmıştır. Plazma TG düzeylerindeki azalmalar ile başlangıç TG dolaşımı arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır.

### 3.3. Tedaviye yanıt olarak plazma karotenoid ve vitamin düzeyi

Tablo 5, her aşamanın sonunda yağda çözünen vitamin ve karotenoid konsantrasyonlarını ve LDL-C düzeylerine göre ifade edilen serum yağda çözünen vitamin ve karotenoid konsantrasyonlarını göstermektedir. Ne WD-PS ne de PS esterleri gibi müdahaleler, yağda çözünen vitaminler veya karotenoidler üzerinde herhangi bir etki göstermedi.

### 3.4. Tedavilere yanıt olarak plazma bitki sterol konsantrasyonları

Plazma PS konsantrasyonları ve TC'ye göre ifade edilen PS konsantrasyonları, her aşamanın sonunda Tablo 6'da verilmiştir.



**Tablo 3 - Deneklerin temel özellikleri.**

Değişken	Ortalama	SEM
Yaş (yıl)	50	2,1
Cinsiyet	—	—
Erkek	25	—
Kadın	22	—
Vücut Ağır. (kg)	80,4	2,7
Boy (cm)	168,2	1,4
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28,2	0,7
Toplam kolesterol (mmol/l)	6,0	0,2
LDL-kolesterol (mmol/l)	3,8	0,2
HDL-kolesterol (mmol/l)	1,4	0,1
TG (mmol/l)	1,7	0,1
CRP (mg/l)	1,5	0,3
Kan basıncı	—	—
Sistolik (mmHg)	121	2,4
Diastolik (mmHg)	78	1,8
Karaciğer enzimleri	—	—
AST (U/l)	22,9	2,0
ALT (U/l)	38,2	4,7
LDH (U/l)	529,7	10,7
ALKP (U/l)	76,9	3,0
GGT (U/l)	37,4	3,4

Not: Değerler ortalama ± SEM; N = 47.

ALKP, alkalin fosfataz; ALT, alanin aminotransferaz; AST, asparagin aminotransferaz; GGT, g-glutamiltansferaz; LDH, laktat dehidrojenaz; CRP, C-reaktif protein.

Plazma konsantrasyonlarında kampesterol ve β-sitosterol, kontrol grubuna göre hem WD-PS hem de PS-esterlerde artış göstermiştir (p < 0,001). Benzer şekilde, TC düzeylerine göre ayarlanan kampesterol ve β-sitosterol uç noktaları, WD-PS ve PS-ester aşamalarının her ikisinden sonra kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir (p < 0,001). WD-PS ile zenginleştirilmiş yoğurt tüketildikten sonra plazma stigmasterol düzeyleri kontrol yoğurtuna kıyasla artış gösterdi (p < 0,001). Benzer şekilde, kontrol grubuna kıyasla, WD-PS fazında, PS esterlerinde değil, son nokta ayarlı stigmasterol/TC oranları artmıştır (p < 0,05). WD-PS veya PS esterlerinin kolesterol sentezi belirteçleri desmosterol ve lathosterol üzerinde herhangi bir etkisi gözlemlenmemiştir.

### 3.5. Tedavinin bir fonksiyonu olarak klinik kimya ölçümleri

AST, ALT, ALKP, GGT, LDH ve CRP dahil olmak üzere klinik kimyasal parametreler analiz edildi (Tablo 7). Parametrelerde farklılıklar bulunsada, bu farklılıklar klinik açıdan önemli değildi. Bu parametrelerin hiçbirinde tedavi etkisi gözlemlenmemiştir.

## 4. Tartışma

Bu çalışma, yoğurt bazlı bir ortamda serbest sterollerin ve PS-esterlerin ticari submikron dispersiyonlarının etkinliğini karşılaştıran ilk rapordur. İki farklı PS formülasyonunun karşılaştırmalı değerlendirmesi, WD-PS ve PS esterlerinin tüketiminin, kontrol grubuna kıyasla plazma toplam ve LDL kolesterol konsantrasyonlarında benzer bir azalma sağladığını göstermiştir. Ayrıca, WD-PS tüketimi, katılımcıların kan lipit profilinin ek olarak optimize edilmesiyle de ilişkilendirilmiştir. Daha spesifik olarak, WD-PS tüketimi TC:HDL-C ve NHDL-C:HDL-C oranlarını düşürürken, PS esterlerinin tüketimi bu oranların hiçbirinde etkili bir değişiklik yaratmamıştır. Ayrıca, WD-PS tüketiminin PS-ester ile karşılaştırıldığında dolaşımdaki

TG seviyelerini düzenlemeye yardımcı olduğu gösterilmiştir.

Son analizler, gıdalara eklenen serbest PS ve PS esterinin kolesterol düşürücü etkisinin benzer olduğunu göstermiş olsa da (Abumweis ve diğerleri, 2008; Demonty ve diğerleri, 2009; Katan ve diğerleri, 2003), bazı çalışmalarda PS tüketiminin LDL-C düşürücü etkisinin azaldığı veya hiç olmadığı görülmüştür (Denke, 1995; Jones, Vanstone, Raeini-Sarjaz, & St-Onge, 2003). Bu çalışmalarda PS'nin etkinliğinin olmaması, kullanılan preparatlarda PS'nin çözünürlüğünün azalması ve kristal sterollerin oluşmasından kaynaklanmıştır. Düzgün formüle edilmezse, PS saf ve saf olmayan formlarda safra içinde kolayca çözünmeyen, son derece kararlı kristaller oluşturur. Hidrofilik hidroksil grupları matrisin içinde hapsolür ve çözündürücü sıvılara erişemez, dolayısıyla kolesterol emilimini azaltmaz (Ostlund ve diğerleri, 1999).

Bu çalışmada, WD-PS ile PS esterlerinin yeni formülasyonunun kolesterol düşürücü etkisinin karşılaştırılabilir olması, her yeni PS formülasyonunun uygun bir şekilde çözünürlüğünün, etkinliğin sağlanması için gerekli olduğu görüşünü desteklemektedir. Bu çalışmada WD-PS ve PS-esterin plazma TC ve LDL-C konsantrasyonlarında neden olduğu azalmaların büyüklüğü, çeşitli arka plan diyetleriyle birlikte 2-3 g/gün PS tüketildiği literatürde bildirilen değişikliklerle karşılaştırılabilir düzeydeydi.

Ayrıca, WD-PS ile zenginleştirilmiş yoğurt tüketimi, PS esterleri ile zenginleştirilmiş yoğurt tüketimi ile karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre TC/HDL-C ve NHDL/HDL-C oranlarını etkili bir şekilde düşürmüştür. Aterojenik ve anti-aterojenik lipitlerin ve lipoproteinlerin oranını birleştiren bir indeks olan TC/HDL-C oranı, LDL-C düşürücü tedavi gören hastalarda CVD riski için terapötik hedef değere sahiptir (Kastelein ve diğerleri, 2008; Ridker, Rifai, Cook, Bradwin, & Buring, 2005) ve ayrıca toplam kolesterol veya herhangi bir tekil lipit ölçümünden daha iyi bir CVD olayları öngördürücüsü olarak kabul edilir (Assmann, Schulte, von Eckardstein, & Huang, 1996; Kinoshita, Glick, Preiss, & Puder, 1995; Stampfer, Sacks, Salvini, Willett, & Hennekens, 1991). Küresel kardiyovasküler risk değerlendirme kılavuzlarına göre, LDL-C hedeflerine ulaşmak, CVD için birinci basamak tedavi olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, TC/HDL-C oranı ve trigliserid düzeyleri de, CVD'nin birincil önlenmesi için orta riskli hastaları daha iyi sınıflandırmak açısından önemli olarak tanımlanmaktadır (Genest et al., 2009).

PS tüketimi geleneksel olarak TG düzeylerinin modülasyonu ile ilişkili değildir. Ancak, daha yakın zamanda, özellikle hipertrigliseridemi olan kişilerde, bitki stanol takviyesi ile TG dolaşımı arasında pozitif bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (Naumann, Plat, Kester, & Mensink, 2008; Plat, Brufau, Dall'Angela, Thie, Dasselaa, & Mensink, 2009; Theuwissen, Plat, van der Kallen, van Greevenbroek, & Mensink, 2009). Bitki stanol tüketimi ile TG düzeyleri arasındaki ilişki, karaciğerde TG açısından zengin VLDL-1 partiküllerinin üretiminin azalmasından kaynaklanmaktadır. Bu partiküller, bazal TG düzeyleri yüksek olan kişilerde serum TG dolaşımında bir azalma olarak daha kolay tespit edilebilir (Plat & Mensink, 2009; Theuwissen ve diğerleri, 2009). Mevcut çalışmada, tedavi süresi boyunca WD-PS ile zenginleştirilmiş yoğurt tüketimi, PS esterleri ile zenginleştirilmiş yoğurda kıyasla plazma TG düzeylerinde azalma ile ilişkili bulunmuştur (%13,9).



**Tablo 4 - Her tedavi aşamasının başlangıcında ve sonunda plazma lipit konsantrasyonları.**

Lipit değişkenleri	Kontrol	WD-PS yoğurt	PS-ester yoğurt
<b>Toplam kolesterol</b>			
Başlangıç (mmol/l)	5,85 ± 0,15	5,98 ± 0,15	5,89 ± 0,14
Son (mmol/l)	6,04 ± 0,15	5,73 ± 0,13**	5,72 ± 0,13**
Değişiklik (mmol/l)	0,20 ± 0,08	-0,26 ± 0,07**	-0,18 ± 0,08**
Değişiklik (%)	3,85 ± 1,25	-3,85 ± 1,12**	-2,41 ± 1,35*
Kontrolle göre değişiklik (%)		-7,69 ± 1,46	-6,25 ± 1,93
<b>LDL-Kolesterol</b>			
Başlangıç (mmol/l)	3,67 ± 0,14	3,84 ± 0,14	3,75 ± 0,13
Son (mmol/l)	3,82 ± 0,15	3,58 ± 0,13**	3,50 ± 0,12**
Değişiklik (mmol/l)	0,17 ± 0,08	-0,27 ± 0,06**	-0,25 ± 0,07**
Değişiklik (%)	5,5 ± 2,1	-6,22 ± 1,46**	-6,05 ± 1,91**
Kontrolle göre değişiklik (%)		-11,72 ± 2,52	-11,56 ± 2,94
<b>HDL dışı kolesterol</b>			
Başlangıç (mmol/l)	4,40 ± 0,15	4,58 ± 0,15	4,48 ± 0,14
Son (mmol/l)	4,60 ± 0,15	4,30 ± 0,13	4,32 ± 0,13
Değişiklik (mmol/l)	0,20 ± 0,09	-0,28 ± 0,07	-0,17 ± 0,07
Değişiklik (%)	5,69 ± 1,96	-5,44 ± 1,42	-3,03 ± 1,56*
Kontrolle göre değişiklik (%)		-11,13 ± 2,34	-8,72 ± 2,60
<b>HDL-Kolesterol</b>			
Başlangıç (mmol/l)	1,44 ± 0,06	1,40 ± 0,05	1,41 ± 0,05
Son (mmol/l)	1,44 ± 0,05	1,43 ± 0,05	1,40 ± 0,05
Değişiklik (mmol/l)	-0,01 ± 0,04	0,03 ± 0,02	-0,02 ± 0,02
Değişiklik (%)	1,18 ± 1,85	2,65 ± 1,79	-0,05 ± 1,58
Kontrolle göre değişiklik (%)		2,66 ± 1,79	-0,04 ± 1,58
<b>Triasilgliserol</b>			
Başlangıç (mmol/l)	1,70 ± 0,12	1,68 ± 0,11	1,63 ± 0,11
Son (mmol/l)	1,80 ± 0,13	1,62 ± 0,12	1,80 ± 0,13
Değişiklik (mmol/l)	0,09 ± 0,09	-0,05 ± 0,05***	0,17 ± 0,06
Değişiklik (%)	13,16 ± 7,71	-0,76 ± 3,40***	13,74 ± 4,49
Kontrolle göre değişiklik (%)		-13,92 ± 8,63***	0,58 ± 9,05
<b>TC/HDL-C</b>			
Başlangıç (mmol/l)	4,32 ± 0,19	4,50 ± 0,18	4,41 ± 0,17
Son (mmol/l)	4,46 ± 0,19	4,21 ± 0,16	4,33 ± 0,18
Değişiklik (mmol/l)	0,13 ± 0,11	-0,30 ± 0,09**	-0,09 ± 0,06
Değişiklik (%)	5,16 ± 3,61	-5,39 ± 1,53*	-1,85 ± 1,34
Kontrolle göre değişiklik (%)		-10,55 ± 3,75	-7,01 ± 3,97
<b>NHDL/HDL-C</b>			
Başlangıç (mmol/l)	3,32 ± 0,19	3,5 ± 0,18	3,41 ± 0,17
Son (mmol/l)	3,46 ± 0,19	3,21 ± 0,16	3,32 ± 0,18
Değişiklik (mmol/l)	0,13 ± 0,11	-0,29 ± 0,09**	0,09 ± 0,06
Değişiklik (%)	8,47 ± 5,83	-6,74 ± 1,94*	-2,36 ± 1,74
Kontrolle göre değişiklik (%)		-15,21 ± 5,90	-10,82 ± 6,23

Not: Tedavi etkileri tek yönlü ANOVA ile incelendi. Değerler ortalama ± SEM; N = 47.

Değişim ve yüzde değişim, bireysel verilere dayanmaktadır.

\* p < 0.05 WD-PS ve PS esterlerinin kontrol ile karşılaştırılması anlamlıdır.

\*\* p < 0.001 WD-PS ve PS esterlerinin kontrol ile karşılaştırılması anlamlıdır.

\*\*\* p < 0.05 WD-PS ile PS esterlerin karşılaştırılması önemlidir, ancak Kontrol ile karşılaştırıldığında önemli değildir.

Ancak, plazma TG düzeylerindeki azalmalar ile başlangıç TG dolaşımı arasında herhangi bir ilişki gözlenmemiştir. Ayrıca, yoğurda serbest steroller ekleyen önceki klinik çalışmalarda TG düzeyleri üzerinde herhangi bir etki görülmemiştir (Rudkowska ve diğerleri, 2008b; Volpe ve diğerleri, 2001). Bilgimiz dahilinde, mevcut çalışma, serbest bitki sterollerinin TG düzeyleri üzerinde olumlu bir etki gözlemleyen ilk çalışmadır. WD-PS'nin etkisi ile başlangıç TG düzeyleri arasında bir ilişki olmaması, bitki sterol formülasyonlarının (bitki stanollerini ile PS ve WD-PS ile PS esterleri) TG düşürücü etkisinin potansiyel önemini de ortaya koyabilir. Bu hipotezi kanıtlamak için daha fazla araştırma yapılması gerekebilir.

PS'nin uzun süreli tüketimi, plazma yağda çözünen vitamin ve karotenoid konsantrasyonlarını azalttığı gösterilmiştir (Hansel ve diğerleri, 2007; Law, 2000). Bu çalışmada, WD-PS ve PS-ester takviyesi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, LDL-C düzeyleri ayarlandıktan önce veya sonra yağda çözünen vitamin veya karotenoid düzeylerini olumsuz etkilememiştir. Mevcut sonuçlar, sterol (1,9 g/gün) veya stanol ester (1,8 g/gün) ile zenginleştirilmiş diyetlerin serum retinol, α- ve γ-tokoferol, vitamin D ve K konsantrasyonları veya bunların başlangıç değerlerine göre değişimi üzerinde hiçbir etkisi olmadığını gösteren Raeini-Sarjaz, Ntanios, Vanstone ve diğerleri tarafından elde edilen sonuçlarla uyumludur.



**Tablo 5 - Tedaviye yanıt olarak son nokta plazma karotenoid ve vitamin düzeyleri.**

Analit	Kontrol	WD-PS		PS esterleri	
	Wk 4	Wk 4	Mutlak değişim	Wk 4	Mutlak değişim
$\alpha$ -Tokoferol ( $\mu\text{mol/l}$ )	63,87 $\pm$ 2,64	62,66 $\pm$ 2,51	-1,22 $\pm$ 3,28	62,36 $\pm$ 4,11	-1,51 $\pm$ 3,28
a-Tokoferol-LDL ( $\mu\text{mol/mmol}$ )	10,54 $\pm$ 0,43	10,9 $\pm$ 0,45	0,37 $\pm$ 0,51	10,79 $\pm$ 0,63	0,25 $\pm$ 0,51
$\gamma$ -Tokoferol ( $\mu\text{mol/l}$ )	9,62 $\pm$ 0,65	9,87 $\pm$ 0,72	0,25 $\pm$ 0,84	9,61 $\pm$ 0,41	-0,30 $\pm$ 0,84
$\gamma$ -Tokoferol-LDL ( $\mu\text{mol/mmol}$ )	1,60 $\pm$ 0,11	1,73 $\pm$ 0,13	0,13 $\pm$ 0,13	1,62 $\pm$ 0,07	0,03 $\pm$ 0,13
Retinol ( $\mu\text{mol/l}$ )	3,40 $\pm$ 0,19	3,88 $\pm$ 0,18	-0,02 $\pm$ 0,19	3,89 $\pm$ 0,26	-0,00 $\pm$ 0,19
Retinol/LDL ( $\mu\text{mol/mmol}$ )	0,65 $\pm$ 0,03	0,67 $\pm$ 0,03	0,02 $\pm$ 0,03	0,67 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,03
Lutein ( $\mu\text{mol/l}$ )	0,36 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,02	0,00 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,02	-0,04 $\pm$ 0,02
Lutein/LDL ( $\mu\text{mol/mmol}$ )	0,06 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,00	-0,00 $\pm$ 0,00
$\beta$ Karoten ( $\mu\text{mol/l}$ )	0,63 $\pm$ 0,07	0,62 $\pm$ 0,05	-0,01 $\pm$ 0,05	0,59 $\pm$ 0,06	-0,04 $\pm$ 0,05
$\beta$ Karoten/LDL ( $\mu\text{mol/mmol}$ )	0,10 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,01
Likopen ( $\mu\text{mol/l}$ )	0,69 $\pm$ 0,05	0,62 $\pm$ 0,04	-0,06 $\pm$ 0,07	0,63 $\pm$ 0,07	-0,06 $\pm$ 0,07
Likopen/LDL ( $\mu\text{mol/mmol}$ )	0,12 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,00	-0,01 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01

Not: Değerler ortalama  $\pm$  SEM; N = 47.

Tedavi etkileri, üç farklı aşamanın sonunda tek yönlü ANOVA ( $p < 0,05$ ) ile incelenmiştir. Her bir denek için mutlak değişim şu şekilde hesaplanmıştır: [4. hafta (WD-PS, PS-esterler)]-[4. hafta (kontrol)].

**Tablo 6 - Her tedavi aşamasının sonunda plazma bitki sterol, stanol ve kolesterol öncü konsantrasyonları.**

Bitki sterol değişkenleri ( $\mu\text{mol/l}$ )	Kontrol	WD-PS		PS esterleri	
	WK 4	WK 4	Mutlak değişim	WK 4	Mutlak değişim
Desmosterol	2,80 $\pm$ 0,37	2,95 $\pm$ 0,35	0,15 $\pm$ 0,33	3,06 $\pm$ 0,29	0,26 $\pm$ 0,33
Brassicasterol	0,18 $\pm$ 0,14	0,22 $\pm$ 0,09	0,03 $\pm$ 0,15	0,19 $\pm$ 0,09	0,01 $\pm$ 0,15
Lathosterol	3,69 $\pm$ 0,36	4,03 $\pm$ 0,37	0,34 $\pm$ 0,27	3,86 $\pm$ 0,36	0,18 $\pm$ 0,27
kampesterol	6,47 $\pm$ 0,62	8,94 $\pm$ 0,67	2,48 $\pm$ 0,37**	8,75 $\pm$ 0,37	2,25 $\pm$ 0,37**
Stigmasterol	0,11 $\pm$ 0,06	0,65 $\pm$ 0,28	0,54 $\pm$ 0,26**	0,30 $\pm$ 0,15	0,18 $\pm$ 0,26
$\beta$ sitosterol	3,52 $\pm$ 0,47	6,06 $\pm$ 0,62	2,55 $\pm$ 0,46**	5,51 $\pm$ 0,56	2,00 $\pm$ 0,46**
Stigmastanol	0,35 $\pm$ 0,14	0,58 $\pm$ 0,46	0,23 $\pm$ 0,41	0,49 $\pm$ 0,33	0,14 $\pm$ 0,41
Oranlar ( $\mu\text{mol/mmol}$ )					
Desmosterol/kolesterol	0,46 $\pm$ 0,06	0,51 $\pm$ 0,06	0,05 $\pm$ 0,06	0,54 $\pm$ 0,05	0,07 $\pm$ 0,06
Brassicasterol/kolesterol	0,02 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,02	0,01 $\pm$ 0,02
Lathosterol/kolesterol	0,61 $\pm$ 0,06	0,70 $\pm$ 0,06	0,09 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,06	0,06 $\pm$ 0,05
Kampesterol/kolesterol	1,07 $\pm$ 0,10	1,56 $\pm$ 0,12	0,49 $\pm$ 0,06**	1,53 $\pm$ 0,11	0,46 $\pm$ 0,06**
Stigmasterol/kolesterol	0,02 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,05*	0,06 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,05
$\beta$ sitosterol/kolesterol	0,58 $\pm$ 0,08	1,05 $\pm$ 0,10	0,47 $\pm$ 0,14**	0,96 $\pm$ 0,10	0,37 $\pm$ 0,13**
Stigmastanol/kolesterol	0,06 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,08	0,04 $\pm$ 0,07	0,08 $\pm$ 0,06	0,03 $\pm$ 0,07

Not: Değerler ortalama  $\pm$  SEM; N = 47.

Tedavi etkileri, üç farklı aşamanın sonunda tek yönlü ANOVA ile incelenmiştir.

Her denek için mutlak değişim aşağıdaki şekilde hesaplandı: Wk 4 (WD-PS, PS-esterler)]-[Wk 4 (kontrol)].

\*\*  $p < 0,001$  kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

\*  $p < 0,05$  kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

**Tablo 7 - Tedaviye yanıt olarak karaciğer fonksiyon testi parametreleri ve C-reaktif protein düzeyleri.**

Parametreler	Kontrol	WD-PS		PS esterleri	
	Wk 4	Wk 4	Mutlak değişim	Wk 4	Mutlak değişim
AST (U/l)	20,6 $\pm$ 1,33	22,5 $\pm$ 1,72	1,9 $\pm$ 1,30	21,3 $\pm$ 1,48	0,7 $\pm$ 1,30
ALT (U/l)	35,2 $\pm$ 2,71	38,1 $\pm$ 3,54	2,9 $\pm$ 3,13	40,5 $\pm$ 4,54	5,4 $\pm$ 3,13
LDH (U/l)	504,5 $\pm$ 7,96	509,7 $\pm$ 9,92	5,2 $\pm$ 11,02	514,8 $\pm$ 13,17	10,4 $\pm$ 11,02
ALKP (U/l)	80,3 $\pm$ 6,39	73,7 $\pm$ 2,52	-6,6 $\pm$ 6,93	72,8 $\pm$ 2,62	-7,5 $\pm$ 6,93
GGT (U/l)	35,3 $\pm$ 2,84	36,8 $\pm$ 3,08	1,6 $\pm$ 1,51	36,6 $\pm$ 2,82	1,5 $\pm$ 1,51
CRP (mg/l)	1,75 $\pm$ 0,35	1,50 $\pm$ 0,29	-0,26 $\pm$ 0,44	1,60 $\pm$ 0,31	-0,15 $\pm$ 0,44

Not: Tedavi etkileri tek yönlü ANOVA ile incelendi ( $p < 0,05$ ). Değerler ortalama  $\pm$  SEM; N = 47.

ALKP, alkalin fosfatase; ALT, alanin aminotransferaz; AST, asparagin aminotransferaz

GGT, gama-glutamiltansferase; LDH, laktat dehidrojenaz; CRP, C-reaktif protein

Her denek için mutlak değişim aşağıdaki şekilde hesaplandı: WK 4 (WD-PS, PS-esterler)]-[WK 4 (kontrol)].



Benzer şekilde, Hallikainen and Uusitupa (1999) 2,3 g/gün stanol esterlerin 8 haftalık tüketiminden sonra serum retinol konsantrasyonlarında herhangi bir değişiklik olmadığını, ancak serum  $\beta$ -karoten ve  $\alpha$ -tokoferol konsantrasyonlarında azalma olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle, 2 g/gün WD-PS veya PS esterleri dozunun diğer plazma yağda çözünen bileşenlerde minimum azalma sağladığı sonucuna varabiliriz.

Bu çalışmada, PS ile zenginleştirilmiş her iki yoğurt türünün (WD-PS ve PS-esterler) tüketimi, plazma kam-pestrol ve sitosterol düzeylerini artırmıştır. Bu bulgu, PS alımının sitosterol ve kampesterol plazma konsantrasyonlarını sırasıyla %20-100 ve %40-100 oranında artırdığına dair mevcut bilgilerle tutarlıdır (Derdemezis, Filippatos, Mikhailidis, & Elisaf, 2010; Fransen ve diğerleri, 2007; Jones ve diğerleri, 2000). Ayrıca, bu çalışmada WD-PS veya PS-esterlerin tüketimi, kolesterol sentezinin plazma belirteçlerinde herhangi bir artış göstermedi. Bu sonuca benzer şekilde, Gremaud ve diğerleri (2002) yağ-su emülsiyonunda lesitin ile çözündürülen stanollerin kolesterol sentezinde karşılık gelen bir artış olmaksızın kolesterol emilimini azalttığını gözlemlemiştir. Ancak, bu çalışmada kolesterol sentezinde bir değişiklik olmaması, PS'nin margarin gibi geleneksel matrislere dahil edildiği diğer çalışmalarda (Fransen ve diğerleri, 2007) görülen etkilerle çelişmektedir. Kolesterol sentezindeki değişimin büyüklüğündeki fark, tüketilen PS dozuna veya PS tüketim sıklığına da bağlı olabilir; her ikisi de kolesterol sentezini az veya çok derecede değiştirebilir (Rudkowska, Abu-Mweis, Nicolle, & Jones, 2008a).

Özette, WD-PS ve PS-ester ile zenginleştirilmiş yoğurt, plazma karaciğer enzimlerini veya CRP konsantrasyonlarını değiştirmeden kan lipit profillerini olumlu yönde değiştirmiştir. Bununla birlikte, PS esterleri ile zenginleştirilmiş yoğurtla karşılaştırıldığında, hiperkolesterolemik deneklerde WD-PS ile zenginleştirilmiş yoğurt tüketimi, toplam ve LDL kolesterolü benzer şekilde düşürmekle kalmamış, aynı zamanda trigliseridleri ve TC/HDL-C oranını da düşürmüştür. Bu nedenle, çalışmamız, genel lipit seviyesi yönetimi açısından, geleneksel PS esterlerine kıyasla daha yüksek çözünürlüklü WD-PS formunun ek avantajları olabileceğini desteklemektedir.

## Teşekkürler

Çalışmaya katılanlara ve Richardson Centre for Functional Foods and Nutraceuticals'daki Khatima Khalloufi ve Haifeng Yang dahil olmak üzere analitik teknisyenler olarak yardımlarını esirgemeyen personele ve klinik koordinatör olarak yardımlarını esirgemeyen Kimberley Robinson'a teşekkür ederiz.

Yazarların sorumlulukları şu şekildeydi: MAS, araştırmanın yürütülmesinden, klinik çalışmanın yönetiminden, veri toplama, laboratuvar analizleri, istatistiksel analiz ve makalenin yazılmasından sorumluydu; SVH, deneklerin seçilmesinden sorumluydu ve klinik çalışmanın yürütülmesine, veri toplama ve makalenin son halinin revizyonuna katkıda bulundu; PJH, baş araştırmacıydı ve projenin konsept ve tasarımından, etik onay için başvurudan, finansal destek arayışından ve makalenin hazırlanmasına katkıda bulunmaktan sorumluydu. Tüm yazarlar makalenin son halini gözden geçirmiş ve herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

## REFERANSLAR

- Abumweis, S. S., Barake, R., & Jones, P. J. (2008). Plant sterols/ stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Food and Nutrition Research*, 52. <http://dx.doi.org/10.3402/fnr.v52i0.1811>.
- American Diabetes Association (2008). Nutrition recommendations and interventions for diabetes. A position statement of the American Diabetes Association in *Diabetes Care* (ss. 561-578).
- Assmann, G., Schulte, H., von Eckardstein, A., & Huang, Y. (1996). High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*, 124(Suppl.), S11-S20.
- Berger, A., Jones, P. J., & Abumweis, S. S. (2004). Plant sterols: Factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids in Health and Disease*, 3,5.
- Health Canada (2010). Plant sterols and blood cholesterol lowering. Ottawa (ON): Health Canada, Food Directorate, Health Products and Food Branch (Bureau of Nutritional Sciences).
- Clifton, P. M., Noakes, M., Sullivan, D., Erichsen, N., Ross, D., Annison, G., & Nestel, P. (2004). Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters differ in milk, yoghurt, bread and cereal. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(3), 503-509.
- De Jong, A., Plat, J., Bast, A., Godschalk, R. W., Basu, S., & Mensink, R. P. (2008). Effects of plant sterol and stanol ester consumption on lipid metabolism, antioxidant status and markers of oxidative stress, endothelial function and low-grade inflammation in patients on current statin treatment. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62(2), 263-273.
- Demonty, I., Ras, R. T., van der Knaap, H. C., Duchateau, G. S., Meijer, L., Zock, P. L., & Trautwein, E. A. (2009). Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. *Journal of Nutrition*, 139(2), 271-284.
- Denke, M. A. (1995). Lack of efficacy of low-dose sitostanol therapy as an adjunct to a cholesterol-lowering diet in men with moderate hypercholesterolemia. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61(2), 392-396.
- Derdemezis, C. S., Filippatos, T. D., Mikhailidis, D. P., & Elisaf, M. S. (2010). Review article: Effects of plant sterols and stanols beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *The Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 15(2), 120-134.
- Fornari, T., Torres, C. F., Torrelo, G., Senorans, F. J., & Reglero, G. (2009). Production of phytosterol esters from soybean oil deodorizer distillates. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(5), 459-463.
- Fransen, H. P., de Jong, N., Wolfs, M., Verhagen, H., Verschuren, W. M., Lutjohann, D., & Mensink, R. P. (2007). Customary use of plant sterol and plant stanol enriched margarine is associated with changes in serum plant sterol and stanol concentrations in humans. *Journal of Nutrition*, 137(5), 1301-1306.
- Friedewald, W. T., Levy, R. I., & Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18(6), 499-502.
- Genest, J., McPherson, R., Frohlich, J., Anderson, T., Campbell, N., Carpentier, A., & Ur, E. (2009). 2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult - 2009 recommendations. *Canadian Journal of Cardiology*, 25(10), 567-579.
- Gremaud, G., Dalan, E., Piguat, C., Baumgartner, M., Ballabeni, P., Decarli, B., & Fay, L. B. (2002). Effects of non-esterified stanols in a liquid emulsion on cholesterol absorption and synthesis in hypercholesterolemic men. *European Journal of Nutrition*, 41(2), 54-60.
- Gueguen, S., Herbeth, B., Siest, G., & Leroy, P. (2002). An isocratic liquid chromatographic method with diode-array detection for the simultaneous determination of alpha-tocopherol, retinol, and five carotenoids in human serum. *Journal of Chromatographic Science*, 40(2), 69-76.
- Hallikainen, M. A., & Uusitupa, M. I. J. (1999). Effect of 2 low-fat stanol ester containing margarines on serum cholesterol concentrations as part of low-fat diet in hypercholesterolemic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69(3), 403-410.
- Hansel, B., Nicolle, C., Lalanne, F., Tondou, F., Lassel, T., Dornazalo, Y., &



- Bruckert, E. (2007). Effect of low-fat, fermented milk enriched with plant sterols on serum lipid profile and oxidative stress in moderate hypercholesterolemia. *American Journal of Clinical Nutrition*, 86(3), 790-796.
- Jones, P. J., Raeini-Sarjaz, M., Jenkins, D. J., Kendall, C. W., Vidgen, E., Trautwein, E. A., & Connelly, P. W. (2005). Effects of a diet high in plant sterols, vegetable proteins, and viscous fibers (dietary portfolio) on circulating sterol levels and red cell fragility in hypercholesterolemic subjects. *Lipids*, 40(2), 169-174.
- Jones, P. J., Raeini-Sarjaz, M., Ntanos, F. Y., Vanstone, C. A., Feng, J. Y., & Parsons, W. E. (2000). Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters. *Journal of Lipid Research*, 41(5), 697-705.
- Jones, P. J., Vanstone, C. A., Raeini-Sarjaz, M., & St-Onge, M. P. (2003). Phytosterols in low- and nonfat beverages as part of a controlled diet fail to lower plasma lipid levels. *Journal of Lipid Research*, 44(9), 1713-1719.
- Kastelein, J. J., van der Steeg, W. A., Holme, I., Gaffney, M., Cater, N. B., Barter, P., & Grundy, S. M. (2008). Lipids, apolipoproteins, and their ratios in relation to cardiovascular events with statin treatment. *Circulation*, 117(23), 3002-3009.
- 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.
- Kinoshian, B., Glick, H., Preiss, L., & Puder, K. L. (1995). Cholesterol and coronary heart disease: Predicting risks in men by changes in levels and ratios. *Journal of Investigative Medicine*, 43(5), 443-450.
- Korpela, R., Tuomilehto, J., Högström, P., Seppo, L., Piironen, V., Salo-Vaananen, P., & Tikkanen, M. J. (2006). Safety aspects and cholesterol-lowering efficacy of low fat dairy products containing plant sterols. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60(5), 633-642.
- Law, M. (2000). Plant sterol and stanol margarines and health. *The British Medical Journal*, 320(7238), 861-864.
- Lin, X., Ma, L., Racette, S. B., Anderson Spearie, C. L., & Ostlund, R. E. Jr., (2009). Phytosterol glycosides reduce cholesterol absorption in humans. *The American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(4), G931-G935.
- Mackay, D., & Jones, P. J. (2011). Evaluation of methods for the determination of cholesterol absorption and synthesis in humans. *Atherosclerosis*, 218(2), 253-262.
- Meguro, S., Higashi, K., Hase, T., Honda, Y., Otsuka, A., Tokimitsu, I., & Itakura, H. (2001). Solubilization of phytosterols in diacylglycerol versus triacylglycerol improves the serum cholesterol-lowering effect. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55(7), 513-517.
- Mensink, R. P., Ebbing, S., Lindhout, M., Plat, J., & van Heugten, M. M. (2002). Effects of plant stanol esters supplied in low-fat yoghurt on serum lipids and lipoproteins, non-cholesterol sterols and fat soluble antioxidant concentrations. *Atherosclerosis*, 160(1), 205-213.
- Miettinen, T. A., Strandberg, T. E., & Gylling, H. (2000). Noncholesterol sterols and cholesterol lowering by long-term simvastatin treatment in coronary patients: Relation to basal serum cholestanol. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(5), 1340-1346.
- 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.
- Naumann, E., Plat, J., Kester, A. D., & Mensink, R. P. (2008). The baseline serum lipoprotein profile is related to plant stanol induced changes in serum lipoprotein cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(1), 117-126.
- NCEP (2001). Executive summary of the third report of the national cholesterol education program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). *The Journal of the American Medical Association*, 285(19), 2486-2497.
- Noakes, M., Clifton, P. M., Doornbos, A. M., & Trautwein, E. A. (2005). Plant sterol ester-enriched milk and yoghurt effectively reduce serum cholesterol in modestly hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Nutrition*, 44(4), 214-222.
- Ostlund, R. E., Jr., Spilburg, C. A., & Stenson, W. F. (1999). Sitostanol administered in lecithin micelles potently reduces cholesterol absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(5), 826-831.
- Plat, J., Brufau, G., Dallinga-Thie, G. M., Dasselaa, M., & Mensink, R. P. (2009). A plant stanol yogurt drink alone or combined with a low-dose statin lowers serum triacylglycerol and non-HDL cholesterol in metabolic syndrome patients. *Journal of Nutrition*, 139(6), 1143-1149.
- Plat, J., & Mensink, R. P. (2009). Plant stanol esters lower serum triacylglycerol concentrations via a reduced hepatic VLDL-1 production. *Lipids*, 44(12), 1149-1153.
- Raeini-Sarjaz, M., Ntanos, F. Y., Vanstone, C. A., & Jones, P. J. (2002). No changes in serum fat-soluble vitamin and carotenoid concentrations with the intake of plant sterol/ stanol esters in the context of a controlled diet. *Metabolism*, 51(5), 652-656.
- Richelle, M., Enslin, M., Hager, C., Groux, M., Tavazzi, I., Godin, J. P., & Fay, L. B. (2004). Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of betacarotene and alpha-tocopherol in normocholesterolemic humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(1), 171-177.
- Ridker, P. M., Rifai, N., Cook, N. R., Bradwin, G., & Buring, J. E. (2005). Non-HDL cholesterol, apolipoproteins A-I and B100, standard lipid measures, lipid ratios, and CRP as risk factors for cardiovascular disease in women. *The Journal of the American Medical Association*, 294(3), 326-333.
- Rudkowska, I., AbuMweis, S. S., Nicolle, C., & Jones, P. J. (2008a). Association between non-responsiveness to plant sterol intervention and polymorphisms in cholesterol metabolism genes: A case-control study. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 33(4), 728-734.
- Rudkowska, I., AbuMweis, S. S., Nicolle, C., & Jones, P. J. (2008b). Cholesterol-lowering efficacy of plant sterols in low-fat yogurt consumed as a snack or with a meal. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(5), 588-595.
- Simonen, P., Gylling, H., & Miettinen, T. A. (2008). The validity of serum squalene and non-cholesterol sterols as surrogate markers of cholesterol synthesis and absorption in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 197(2), 883-888.
- Stampfer, M. J., Sacks, F. M., Salvini, S., Willett, W. C., & Hennekens, C. H. (1991). A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 325(6), 373-381.
- Theuwissen, E., Plat, J., van der Kallen, C. J., van Greevenbroek, M. M., & Mensink, R. P. (2009). Plant stanol supplementation decreases serum triacylglycerols in subjects with overt hypertriglyceridemia. *Lipids*, 44(12), 1131-1140.
- Thomsen, A. B., Hansen, H. B., Christiansen, C., Green, H., & Berger, A. (2004). Effect of free plant sterols in low-fat milk on serum lipid profile in hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(6), 860-870.
- Trautwein, Elke A., Duchateau, Guus S. M. J. E., Lin, Yuguang, Mel'nikov, Sergey M., Molhuizen, Henri O. F., & Ntanos, Fady Y. (2003). Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(3-4), 171-185.
- Vanstone, C. A., & Jones, P. J. (2004). Limitations of plasma plant sterols as indicators of cholesterol absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(2), 340-341.
- Volpe, R., Niittynen, L., Korpela, R., Sirtori, C., Bucci, A., Fraone, N., & Pazzucconi, F. (2001). Effects of yoghurt enriched with plant sterols on serum lipids in patients with moderate hypercholesterolaemia. *British Journal of Nutrition*, 86(2), 233-239.
- WHO (2011). Cardiovascular diseases (CVDs) WHO Fact Sheet NO.317. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>



**I, the undersigned, Deniz Esen, certify that I am fluent in the English and Turkish languages, and that this document is an accurate translation of the attached document. - Capacity: Notary Certified Translator**  
**Date: 17 May 2025**  
**Address: Serencebey Yokuşu Fırat İşhanı No:1-16 Beşiktaş - İstanbul 34353**  
**Contact Details: 0212 - 259 60 73 - 0212 - 259 60 92 Fax: 0212 259 61 05**

Available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jff](http://www.elsevier.com/locate/jff)

# Water dispersible plant sterol formulation shows improved effect on lipid profile compared to plant sterol esters ☆

Mandana Amir Shaghaghi<sup>a,c</sup>, Scott V. Harding<sup>a,c,1</sup>, Peter J.H. Jones<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Human Nutritional Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, MB R3T 6C5, Canada

<sup>b</sup>Department of Food Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, MB R3T 6C5, Canada

<sup>c</sup>Richardson Centre for Functional Foods and Nutraceuticals, University of Manitoba, Winnipeg, MB R3T 6C5, Canada

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 13 August 2013

Received in revised form

15 October 2013

Accepted 21 October 2013

Available online 20 November 2013

### Keywords:

Plant sterols

Water dispersible plant sterols

Esterified plant sterols

Cholesterol absorption

## ABSTRACT

While the cholesterol-lowering efficacy of plant sterols (PS) is known, issues surrounding reduced PS solubility of some dietary formulations remain to be elucidated. This study determined the efficacy of a water dispersible formulation of free plant sterols (WD-PS) versus plant sterol esters (PS-esters). Forty-seven mild-to-moderately hypercholesterolemic individuals in a randomized, crossover study were provided for 4 wk with a single-dose daily regimen of PS-enriched yogurt (2 g/d of PS from WD-PS or PS-esters) or placebo. Yogurt enriched with WD-PS or PS-esters induced similar decreases in serum total (7.7% and 6.3%, respectively) and LDL cholesterol levels (11.7% and 11.6%, respectively), as percentage relative to the control ( $p < 0.001$ ; all). Ratios of total to HDL cholesterol and non-HDL to HDL cholesterol decreased more ( $p < 0.05$ ) with WD-PS (10.6% and 15.2%, respectively) than with PS-esters (7.0% and 10.8%, respectively) compared with control. Consumption of WD-PS reduced serum triglyceride levels (13.9%,  $p < 0.05$ ) compared to consumption of PS-esters (0.6%). Both WD-PS and PS-esters contributed effectively to LDL cholesterol lowering, however, the formulation of WD-PS yield additional effects on preventing cardiovascular diseases by improving serum TG and the ratio of total to HDL cholesterol.

Trial registration ([clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)): NCT01478789.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

According to World Health Organization, cardiovascular diseases (CVD) are the leading causes of death globally (WHO,

2011). The lowering of LDL cholesterol is central in the prevention of CVD and can be achieved through dietary modification and therapy (NCEP, 2001). Hence, due to the established cholesterol-lowering effect of PS, several advisory

☆ This study was funded by Nutrartis S.A., Inc, Chile. The sponsor had no role in design and conducting the study, analysis and interpretation of data, writing the report, or in the decision to submit the article for publication.

\* Corresponding author. Address: Richardson Center for Functional Foods and Nutraceuticals, University of Manitoba, 196 Innovation Drive, Winnipeg, Manitoba R3T 6C5, Canada. Tel.: +1 204 474 8883; fax: +1 204 474 7552.

E-mail addresses: [scott.harding@kcl.ac.uk](mailto:scott.harding@kcl.ac.uk) (S.V. Harding), [peter\\_jones@umanitoba.ca](mailto:peter_jones@umanitoba.ca) (P.J.H. Jones).

<sup>1</sup> Current address: Diabetes and Nutritional Sciences Division, School of Medicine, King's College London, Franklin-Wilkins Building, 150 Stamford Street, London SE1 9NH, United Kingdom.

Abbreviations: CRP, C-reactive protein; PS, plant sterols; TC, total cholesterol; WD-PS, water dispersible plant sterols; PS-esters, esterified plant sterols

1756-4646/\$ - see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.10.017>



bodies recommend intake of 2 g/day of PS as a component of modified diet, to optimize blood lipid levels (American Diabetes Association, 2008; Health Canada, 2010; NCEP, 2001). The major mechanism of action responsible for the cholesterol-lowering property of PS is the inhibition of intestinal cholesterol absorption (Trautwein et al., 2003). The competitive solubilization between cholesterol and PS in bile salt micelles purportedly decreases intestinal cholesterol absorption and thus reduces circulating levels of cholesterol, while partially increasing endogenous cholesterol biosynthesis (Abumweis, Barake, & Jones, 2008). Since PS decrease absorption of cholesterol, an important concern about PS use is that PS may reduce absorption of fat-soluble vitamins and carotenoids (Berger, Jones, & Abumweis, 2004; Law, 2000; Rudkowska, AbuMweis, Nicolle, & Jones, 2008b). However, results of different studies varied from no change in fat-soluble antioxidants (De Jong et al., 2008; Korpela et al., 2006; Thomsen, Hansen, Christiansen, Green, & Berger, 2004; Volpe et al., 2001), to a substantial decrease in tocopherol and/or  $\beta$ -carotene (Clifton et al., 2004; Mensink, Ebbing, Lindhout, Plat, & van Heugten, 2002; Noakes, Clifton, Doornbos, & Trautwein, 2005; Richelle et al., 2004), or decrease only in serum lutein and lycopene levels (Rudkowska et al., 2008b).

Owing to their chemical structure and poor solubility, PS must be properly formulated to achieve optimal health benefits. Indeed, PS possess crystalline properties, a high melting point, and low solubility in water and fats which complicate their incorporation into food matrices and limit their practical applications (Berger et al., 2004; Fornari, Torres, Torrello, Senorans, & Reglero, 2009). Traditionally, the most common process is to convert PS to their esterified forms, with vegetable oil fatty acids, for subsequent integration into fat based foods such as margarine and spreads (Fornari et al., 2009). Furthermore, research in the nutraceutical industry has shown that the solubility and bioactivity of PS can be greatly enhanced by incorporating them within various emulsion-based delivery systems (Gremaud et al., 2002; Lin et al., 2009; Meguro et al., 2001; Ostlund, Spilburg, & Stenson, 1999). In some studies, formulating free PS with lecithin considerably reduced cholesterol absorption and circulating LDL-C, while less effect was seen with PS in crystalline form (Gremaud et al., 2002; Ostlund et al., 1999). Moreover, Lin et al. (2009) indicated that natural phytosterol glycosides, purified from soy lecithin, reduced cholesterol absorption by 37.6%, compared to the 30.6% reduction observed simultaneously with PS esters. Finally, the dose-dependent LDL-C-lowering efficacy of PS was shown by Demonty et al. (2009) in a meta-analysis of eighty-four trials, which confirmed that the efficacy of PS had no link with various treatment characteristics, including fat-based vs. non fat-based vehicles and/or free-PS vs. PS-esters forms.

Similar to esters of PS, properly solubilized free sterols, have been shown in some studies, but not all, to induce a similar LDL-C-lowering effect when provided at the equivalent free sterol dose (Richelle et al., 2004). Decreased solubility of free PS, owing to the difficulty of formulating and delivering these relatively insoluble substances is one of the main causes for the inconsistency among the results of these studies (Berger et al., 2004; Moreau, Whitaker, & Hicks, 2002). Therefore, based on the importance of the form of PS in its

bioactivity and efficacy, each new formulation ought to be assessed for value if they differ greatly from previously tested forms.

Therefore, the objective of this study was to examine the effects of a new formulation of a water dispersible PS (WD-PS) on serum lipids and fat soluble vitamins concentrations, compared against a positive control conventional PS-esters and placebo (vehicle only). In addition, safety parameters, defined as reported adverse events and/or undesirable changes in clinical chemistry parameters including liver enzymes, were examined during the 4 wk of each phase of the study. We hypothesized that WD-PS would be as effective as PS-esters in lowering blood total cholesterol and LDL cholesterol levels.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Treatment preparation

WD-PS (Nutrartis SA, Santiago, Chile) and PS-ester (Arboris LLC, Savannah, GA, USA) are commercially available tall oil derived sterol products with the 2 major components distributed approximately as 70–80% and 15% for beta-sitosterol and campesterol by weight, respectively. The ester portion of the PS-ester corresponds to vegetable oil fatty acids. It also contains mixed tocopherols and ascorbyl palmitate as antioxidants (3000 ppm). The composition and nutritional information of WD-PS and PS-esters PS are shown in Tables 1 and 2.

The PS-ester was produced via esterification of pure free sterols (Arboris LLC, Savannah, GA, USA) with food fatty acids derived from edible vegetable oil. The food grade fatty acids and sterols were mixed and the combination was carried out at elevated temperature, without using any chemical catalyst. After the esterification, the excess free fatty acids were removed using high vacuum distillation and the refined PS-esters were cooled down. The WD-PS, sub-micron dispersion of free sterols with the targeted composition and particle size was prepared by Nutrartis S.A. (Santiago, Chile), using the patent application WO 2010/095067 25. Briefly, pure free sterols (Arboris LLC, Savannah, GA, USA) were melted to form an O/W (oil-water) emulsion of sterols in water and then cooled down to form dispersion. Particle size of the dispersion was determined using Horiba LA910 equipment giving an average particle size of 400 nm with no particles detected under 100 nm.

Plain yogurt (4% Fat Milk, Dairyland, Saputo, Canada) was used as a food carrier for both PS (WDPS and PS-esters) and also as the control. PS-esters were melted (at 60 °C/3 min) in a water bath (VWR 1227, San Diego, CA, USA) and then mixed into yogurt through gentle agitation (3.37 g PS-esters added to 100 g yogurt). WD-PS was a stable, non-decating, readily-dispersible phytosterol dispersion that did not require high shear mixing or homogenization to be suitably formulated into food products and was incorporated into the yogurt through gentle agitation (20 g WD-PS added to 100 g yogurt). WD-PS and PS-esters were flavored and suspended in yogurt in the metabolic kitchen of the Richardson Centre for Functional Foods and Nutraceuticals (2 g free plant sterol added to 100 g yogurt for both treatments). No organoleptic differences were detected



**Table 1 – Composition of plant sterols.**

Component	% w/w
WD-PS	
Tall oil sterols	10.0
Vegetable oil fatty acids (Na + salts)	0.2
Polysorbate	0.3
Water	89.5
PS-esters	
Tall oil sterols	62.0
Fatty acids	38.0

Note: WD-PS, water dispersible plant sterol; PS-esters, plant sterol esters; W, weight.

**Table 2 – Nutritional information of plant sterols per 100 g yogurt.**

Component	WD-PS	PS-esters
Energy (kcal)	0.60	11.06
Total fat (g)	0.05	1.23
Saturated fat (g)	–	0.08
Trans fatty acids (g)	–	0.02
Monounsaturated fat (g)	0.04	0.79
Polyunsaturated fat (g)	–	0.28
Nitrogen-free extract (g)	0.04	–
Plant sterols (g)	2.00	2.00

Note: WD-PS, water dispersible plant sterol; PS-esters, plant sterol esters.

between the PS-enriched (WD-PS and PS-esters) and the placebo yogurts.

## 2.2. Study population

Individual men and women with above optimal serum LDL cholesterol concentrations were recruited in the Winnipeg metropolitan area by advertisements in newspapers. Potential study volunteers were initially screened by questionnaire regarding personal health information, medical conditions, and disease history. If subjects were determined to be potentially eligible, they underwent blood screening at the first visit where fasting blood was taken to test for general lipid profile including TC, HDL-C, LDL-C, and TG levels. Inclusion criteria included baseline LDL-C above 2.8 mmol/l, TG below 4.5 mmol/l, a body mass index (BMI) between 20 and 30 kg/m<sup>2</sup>, and age 19–75 yr. Volunteers were excluded if they took statins, nicotinic acid, or fibrates. Subjects who were diagnosed to have diabetes mellitus, sitosterolemia, heart disease, liver disease, kidney disease, or who had recently undergone major surgery were also excluded from the study. This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human subjects were approved by the Biomedical Research Ethics Board at University of Manitoba. Written informed consent was obtained from all subjects.

## 2.3. Experimental protocol

Fifty-three participants (19–75 yr) were recruited. The study was a free-living, randomized, crossover trial consisting of

three 29 d treatment phases each separated by 4 wk washout intervals. Subjects were assigned to receive the treatments, WD-PS-enriched yogurt, PS-esters-enriched yogurt, or yogurt without PS (placebo), in a random order. During each treatment period subjects were instructed to follow their normal diet and consume their standardized supper meal at RCFFN followed by ingestion the treatment, under supervision on a daily basis to monitor compliance.

## 2.4. Blood sampling and analysis

Twelve-hour fasting blood samples were collected on d 1, 2, 28 and 29 of each of the 3 phases of the trial. Blood samples obtained on d 1 and 2 were used to measure baseline values for different study measurements, whereas blood samples obtained on the 2 last days were used to measure final values. Blood samples were collected and centrifuged for 20 min at 3000g. The separated aliquots were frozen at –80 °C until analysis. Plasma TC, TG, HDL-C, and liver enzymes (AST, ALT, LDH, ALKP, GGT) levels were analyzed using a VITROS 350 chemistry autoanalyser (Ortho-Clinical Diagnostics, Markham, ON, Canada). Plasma LDL-C concentrations were calculated using the Friedewald equation (Friedewald, Levy, & Fredrickson, 1972). Plasma CRP was analyzed using an Adiva 1800 clinical chemistry system (Siemens Healthcare Diagnostic INC, ON, Canada).

## 2.5. Plasma cholesterol precursor and plant sterol analyses

Plant sterols and precursor sterols concentrations in serum were measured using gas chromatography GC (Bruker 430; Billerica, MA, USA) based on previously established methods (Jones et al., 2005). Briefly, 5 $\alpha$ -cholestane as an internal standard (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Canada) was added to each plasma sample (100  $\mu$ g/0.5 ml plasma). Samples were saponified with 0.5 M methanol-KOH for 2 h at 100 °C, and the unsaponifiable portion extracted with petroleum ether. The extracted non-saponifiable materials were used to determine PS concentration levels. Samples were derivatized with 500  $\mu$ l TMS reagent (pyridine–hexamethyldisilazane–trimethylchlorosilane; 9:3:1) (Jones et al., 2005). After preparation samples were injected into the GC equipped with a flame ionization detector and an auto-injector system. Separation was achieved on a 30 m capillary column with an internal diameter of 0.25 mm and film thickness of 0.25  $\mu$ m (SAC-5, Supelco, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada). The column temperature was initiated at 130 °C for 2 min. The temperature was then increased to 270 °C (rate: 30 °C/min) for 10 min and was augmented again to 290 °C (rate: 10 °C/min). After 8 min the temperature was increased to 310 °C (rate: 20 °C/min) for 2 min, (total time was 30 min). The injector and detector temperatures were set at 295 °C and 300 °C, respectively. The carrier gas (helium) flow rate was set for 1 ml/min with the inlet splitter set at 100:1. Peaks of interest were identified using authentic standards (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Canada).

Cholesterol synthesis was assessed based on the previously established surrogate method (Jones et al., 2005; Mackay & Jones, 2011). Briefly, the ratio of absolute amount of lathosterol to cholesterol ( $\mu$ mol/mmol of cholesterol) was used to



determine cholesterol biosynthesis (Miettinen, Strandberg, & Gylling, 2000; Simonen, Gylling, & Miettinen, 2008; Vanstone & Jones, 2004).

### 2.6. Plasma fat-soluble vitamin and carotenoid analyses

An isocratic high-performance liquid chromatography HPLC (1100 HPLC, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with UV-VIS spectrophotometer detector (SPD-6A) was used for simultaneous determination of plasma  $\alpha$ -tocopherol,  $\gamma$ -tocopherol, retinol, lutein, lycopene, and  $\beta$ -carotene. The extraction procedure was as described by Gueguen, Herbeth, Siest, and Leroy (2002). In brief, an internal standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), a solution of retinol acetate and  $\beta$ -apo-8'-carotenal in methanol was added to 200  $\mu$ l serum to quantify vitamin and carotenoid levels, respectively. Serum samples were deproteinized with ethanol and extracted twice with hexane. Duplicates of each sample were prepared, then resulting extracts injected onto a C18 reversed-phase column (30 cm  $\times$  3.9 mm id) (Zorbax EclipseXDB, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with column guard eluted with methanol-acetonitrile-tetrahydrofuran (75:20:5, v/v/v). The flow rate was set at 1.0 ml/min. Full elution of all the analytes was realized isocratically within 38 min. The detection wavelengths were set at 290 nm, 325 nm, 450 nm, and 475 nm for  $\alpha$  and  $\gamma$ -tocopherol, retinol, lutein and lycopene analyses, respectively.

### 2.7. Statistical analyses

The sample size was calculated to detect an anticipated difference in LDL-C levels due to PS treatment of 12% (0.54 mmol/l) using a standard deviation of 0.732 mmol/l. The alpha and power were 0.05 and 0.8, respectively. The sample size was determined taking into account the block size and an estimated 10% premature subject withdrawal rate.

All data are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was set at  $p < 0.05$  for all the analyses. Statistical analysis was performed using SPSS 16.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Baseline variables were analyzed by using 1-factor ANOVA. For all data, endpoint values were reported as averages of d 28 and 29. Endpoint, absolute change, and percentage change values were compared using analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's multiple comparison test, with treatment and phase as fixed factors, and subject as a random factor in the model. Baseline values were inserted into the model as covariates for serum lipid measurements. To standardize plasma PS, as well as serum fat-soluble vitamins and carotenoids, serum concentrations of each compound were divided by plasma TC or LDL-C concentrations, respectively.

## 3. Results

### 3.1. Subject characteristics

Fifty-three participants were initially recruited while 47 subjects (25 males and 22 females) completed the entire trial.

Inability to complete the trial included not being able to consume yogurt ( $n = 2$ ), relocation to another city ( $n = 1$ ), and personal reasons ( $n = 3$ ). Baseline characteristics of the subjects who completed the study are shown in Table 3. All participants exhibited good tolerance to the experimental treatments and no side effects were reported. Subjects reported no change in physical activity, and no significant differences were observed in body weight after the consumption of the three treatments.

### 3.2. Plasma lipid concentrations in response to PS treatments

Baseline and endpoint plasma lipid concentration responses to each treatment are shown in Table 4. No significant differences at baseline among the three treatments in any of the lipid parameters assessed were observed.

In the present study, supplementation of both WD-PS and PS-esters improved serum lipoprotein profiles. In particular, reductions ( $p < 0.001$ ) were observed in endpoint total cholesterol and LDL cholesterol levels compared with control. Consumption of the WD-PS-enriched yogurt and PS esters-enriched yogurt similarly lowered ( $p < 0.001$  for all) total cholesterol concentrations on average by 7.7% and 6.2%, respectively, compared with the control product. Likewise, consumption of WD-PS and PS-esters in yogurt lowered ( $p < 0.001$  for all) LDL-cholesterol on average by 11.7% and 11.6%, respectively (Table 4). Although no treatment effects were observed in HDL-C levels at endpoint across the three treatments, ratios of TC to HDL-C and Non-HDL-C to HDL-C showed significant reductions (10.5%, 15.2%,  $p < 0.05$ , respectively) for the supplementation of WD-PS, but not for supplementation of the PS-esters compared to control (Table 4). Plasma TG concentrations did not differ as a function of treatment between endpoints. Over the treatment period, however, TG levels were reduced (13.9%,  $p < 0.05$ ) from baseline due to consumption of WD-PS-enriched yogurt, compared to PS-esters-enriched yogurt, but not compared to control (Table 4). Further analysis was done to examine the potential relationship between positive effect of WD-PS on TG levels and baseline TG concentrations. There was no relationship between the reductions in plasma TG levels with the baseline TG circulations.

### 3.3. Plasma carotenoid and vitamin level in response to treatment

Table 5 provides the fat-soluble vitamin and carotenoid concentrations at the end of each phase, as well as the serum fat-soluble vitamin and carotenoid concentrations, expressed relative to LDL-C levels. Neither intervention, WD-PS and/or PS-esters, had an effect on fat-soluble vitamins or carotenoids.

### 3.4. Plasma plant sterol concentrations in response to treatments

Plasma PS concentrations and PS concentrations expressed relative to TC are provided in Table 6 at the end of each phase. Plasma concentrations of campesterol and  $\beta$ -sitosterol were



**Table 3 – Baseline characteristic of subjects.**

Variable	Mean	SEM
Age (yr)	50	2.1
Sex	–	–
Male	25	–
Female	22	–
Body wt (kg)	80.4	2.7
Height (cm)	168.2	1.4
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.2	0.7
Total cholesterol (mmol/l)	6.0	0.2
LDL-cholesterol (mmol/l)	3.8	0.2
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.4	0.1
TG (mmol/l)	1.7	0.1
CRP (mg/l)	1.5	0.3
Blood pressure		
Systolic (mmHg)	121	2.4
Diastolic (mmHg)	78	1.8
Liver enzymes		
AST (U/l)	22.9	2.0
ALT (U/l)	38.2	4.7
LDH (U/l)	529.7	10.7
ALKP (U/l)	76.9	3.0
GGT (U/l)	37.4	3.4

Note: Values are mean ± SEM; N = 47.

ALKP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, asparagine aminotransferase; GGT, g-glutamyltransferase; LDH, lactate dehydrogenase; CRP, C-reactive protein.

increased ( $p < 0.001$ ) for both WD-PS and PS-esters relative to control. Similarly, endpoints adjusted campesterol and  $\beta$ -sitosterol by TC levels were increased ( $p < 0.001$ ) after both the WD-PS and PS-esters phases, compared to control. Plasma stigmaterol levels increased ( $p < 0.001$ ) after consumption of the WD-PS-enriched yogurt compared to control yogurt. Likewise, the endpoint adjusted stigmaterol, to TC ratios, were increased ( $p < 0.05$ ) for WD-PS phase, not for PS-esters, compared to control. No effects of WD-PS or PS-esters were observed on the cholesterol synthesis markers desmosterol and lathosterol.

### 3.5. Clinical chemistry measures as a function of treatment

Clinical chemical parameters were analyzed including AST, ALT, ALKP, GGT, LDH, and CRP (Table 7). Although variations were found in the parameters, these differences were of no clinical significance. No treatment effect was observed with any of these parameters.

## 4. Discussion

The present study is the first report comparing the efficacy of a commercial sub-micron dispersion of free sterols and PS-esters within a yogurt-based medium. This head to head comparison between two different formulations of PS showed that consumption of both WD-PS and PS-esters resulted in a similar reduction of plasma total and LDL-cholesterol concentrations, compared to control. Moreover, consumption of WD-PS was associated with additionally optimizing the blood lipid profile of the participants. More specifically, consumption of

WD-PS lowered ratios of TC:HDL-C and also NHDL-C:HDL-C while consumption of PS-esters did not effectively alter either of these ratios. In addition, it was shown that consumption of WD-PS helped to regulate circulating TG levels compared to PS-ester.

Although recent analysis demonstrated that free PS and PS-ester incorporated into foods have similar cholesterol lowering action (Abumweis et al., 2008; Demonty et al., 2009; Katan et al., 2003), in some studies consumption of PS showed reduced or no LDL-C lowering effect (Denke, 1995; Jones, Vanstone, Raeini-Sarjaz, & St-Onge, 2003). The lack of efficacy of PS in these studies may have been caused by the reduced PS solubility and formation of crystalline sterols in the preparations used. If not properly formulated, PS form highly stable crystals in which are not readily soluble in bile, the hydrophilic hydroxyl groups are requisitioned inside the matrix and are not available to solubilizing fluids, hence do not reduce cholesterol absorption (Ostlund et al., 1999).

In present study, the comparable cholesterol lowering effect of new formulation of WD-PS with PS-esters supports the notion that proper solubilization of every new PS formulations is essential for proper efficacy. The magnitude of the WD-PS and PS-ester induced reductions in plasma TC and LDL-C concentrations, found in the present study, were comparable with the changes reported in the literature in which 2–3 g/d PS was consumed in conjunction with various background diets.

In addition, consumption of WD-PS-enriched yogurt, but not PS-esters-enriched yogurt, effectively lowered TC/HDL-C and NHDL/HDL-C ratios, compared to control. The ratio of TC/HDL-C as an index combining the proportion of atherogenic to anti-atherogenic lipids and lipoproteins, has therapeutic target value for CVD risk in patients on LDL-C-lowering therapy (Kastelein et al., 2008; Ridker, Rifai, Cook, Bradwin, & Buring, 2005) and also considers as a better predictor of CVD events than is total cholesterol or any individual lipid measurement (Assmann, Schulte, von Eckardstein, & Huang, 1996; Kinoshian, Glick, Preiss, & Puder, 1995; Stampfer, Sacks, Salvini, Willett, & Hennekens, 1991). According to the global cardiovascular risk assessment guidelines reaching LDL-C goals remains to be the first line therapy for CVD, however, TC/HDL-C ratio and triglyceride levels are also defined as important to better stratify intermediate risk patients for primary prevention of CVD (Genest et al., 2009).

Consumption of PS is not traditionally allied with modulation of TG levels. However, more recently, a positive relationship between supplementation of plant stanol and TG circulation was established, especially in individuals with hypertriglyceridemia (Naumann, Plat, Kester, & Mensink, 2008; Plat, Brufau, Dallinga-Thie, Dasselaaar, & Mensink, 2009; Theuwissen, Plat, van der Kallen, van Greevenbroek, & Mensink, 2009). The relationship between plant stanol consumption and TG levels origins from a cutback in the hepatic production of large TG-rich VLDL-1 particles which may be more voluntarily detected as a reduction in serum TG circulations in individuals with baseline elevated TG levels (Plat & Mensink, 2009; Theuwissen et al., 2009). In the current study, over the treatment period, consumption of WD-PS-enriched yogurt was associated with a reduction in plasma TG levels compared to PS-esters-enriched yogurt (13.9%,  $p < 0.05$ ).



**Table 4 – Plasma lipid concentrations at the baseline and endpoint of each treatment phases.**

Lipid variables	Control	WD-PS yogurt	PS-esters yogurt
<b>Total cholesterol</b>			
Start (mmol/l)	5.85 ± 0.15	5.98 ± 0.15	5.89 ± 0.14
End (mmol/l)	6.04 ± 0.15	5.73 ± 0.13**	5.72 ± 0.13**
Change (mmol/l)	0.20 ± 0.08	-0.26 ± 0.07**	-0.18 ± 0.08**
Change (%)	3.85 ± 1.25	-3.85 ± 1.12**	-2.41 ± 1.35*
Change relative to control (%)		-7.69 ± 1.46	-6.25 ± 1.93
<b>LDL-Cholesterol</b>			
Start (mmol/l)	3.67 ± 0.14	3.84 ± 0.14	3.75 ± 0.13
End (mmol/l)	3.82 ± 0.15	3.58 ± 0.13**	3.50 ± 0.12**
Change (mmol/l)	0.17 ± 0.08	-0.27 ± 0.06**	-0.25 ± 0.07**
Change (%)	5.5 ± 2.1	-6.22 ± 1.46**	-6.05 ± 1.91**
Change relative to control (%)		-11.72 ± 2.52	-11.56 ± 2.94
<b>Non-HDL Cholesterol</b>			
Start (mmol/l)	4.40 ± 0.15	4.58 ± 0.15	4.48 ± 0.14
End (mmol/l)	4.60 ± 0.15	4.30 ± 0.13	4.32 ± 0.13
Change (mmol/l)	0.20 ± 0.09	-0.28 ± 0.07	-0.17 ± 0.07
Change (%)	5.69 ± 1.96	-5.44 ± 1.42**	-3.03 ± 1.56*
Change relative to control (%)		-11.13 ± 2.34	-8.72 ± 2.60
<b>HDL-Cholesterol</b>			
Start(mmol/l)	1.44 ± 0.06	1.40 ± 0.05	1.41 ± 0.05
End(mmol/l)	1.44 ± 0.05	1.43 ± 0.05	1.40 ± 0.05
Change (mmol/l)	-0.01 ± 0.04	0.03 ± 0.02	-0.02 ± 0.02
Change (%)	1.18 ± 1.85	2.65 ± 1.79	-0.05 ± 1.58
Change relative to control (%)		2.66 ± 1.79	-0.04 ± 1.58
<b>Triacylglycerol</b>			
Start (mmol/l)	1.70 ± 0.12	1.68 ± 0.11	1.63 ± 0.11
End (mmol/l)	1.80 ± 0.13	1.62 ± 0.12	1.80 ± 0.13
Change (mmol/l)	0.09 ± 0.09	-0.05 ± 0.05***	0.17 ± 0.06
Change (%)	13.16 ± 7.71	-0.76 ± 3.40***	13.74 ± 4.49
Change relative to control (%)		-13.92 ± 8.63**	0.58 ± 9.05
<b>TC/HDL-C</b>			
Start (mmol/l)	4.32 ± 0.19	4.50 ± 0.18	4.41 ± 0.17
End (mmol/l)	4.46 ± 0.19	4.21 ± 0.16*	4.33 ± 0.18
Change(mmol/l)	0.13 ± 0.11	-0.30 ± 0.09**	-0.09 ± 0.06
Change (%)	5.16 ± 3.61	-5.39 ± 1.53*	-1.85 ± 1.34
Change relative to control (%)		-10.55 ± 3.75	-7.01 ± 3.97
<b>NHDL/HDL-C</b>			
Start (mmol/l)	3.32 ± 0.19	3.5 ± 0.18	3.41 ± 0.17
End (mmol/l)	3.46 ± 0.19	3.21 ± 0.16	3.32 ± 0.18
Change (mmol/l)	0.13 ± 0.11	-0.29 ± 0.09**	0.09 ± 0.06
Change (%)	8.47 ± 5.83	-6.74 ± 1.94*	-2.36 ± 1.74
Change relative to control (%)		-15.21 ± 5.90	-10.82 ± 6.23

Note: Treatment effects were examined by one-way ANOVA. Values are mean ± SEM; N = 47.

Change and percentage change are based on individual data.

\* p < 0.05 Comparison of WD-PS and PS-esters with Control are significant.

\*\* p < 0.001 Comparison of WD-PS and PS-esters with Control are significant.

\*\*\* p < 0.05 Comparison of WD-PS with PS-esters is significant, but not significant from Control.

However, no relationship was observed between the reductions in plasma TG levels with the baseline TG circulations. Moreover, previous clinical trials incorporating free sterols in yogurt found no effect on TG levels (Rudkowska et al., 2008b; Volpe et al., 2001). To the best of our knowledge, the current study is the first study observing a positive effect of intake of free plant sterols on TG levels. The fact that there was no relationship between the effect of WD-PS and baseline TG levels might imply the potential importance of formulations of plant sterol (plant stanols vs. PS as well as WD-PS

vs. PS-esters) also on their possible TG lowering efficacy. Further studies may need to prove this hypothesis.

Long term consumption of PS has shown to decrease plasma fat soluble vitamins and carotenoid concentrations (Hansel et al., 2007; Law, 2000). In the present study, supplementation of WD-PS and PS-ester did not adversely influence fat soluble vitamin or carotenoid levels before or after adjustment for LDL-C levels, as compared to control. The present results are in agreement with those of Raeini-Sarjaz, Ntanios, Vanstone, and Jones (2002) who showed no effect of sterol



**Table 5 – Endpoint plasma carotenoid and vitamin levels in response to treatment.**

Analyte	Control	WD-PS		PS-esters	
	Wk 4	Wk 4	Absolute change	Wk 4	Absolute change
$\alpha$ -Tocopherol ( $\mu\text{mol/l}$ )	63.87 $\pm$ 2.64	62.66 $\pm$ 2.51	-1.22 $\pm$ 3.28	62.36 $\pm$ 4.11	-1.51 $\pm$ 3.28
$\alpha$ -Tocopherol-LDL ( $\mu\text{mol/mmol}$ )	10.54 $\pm$ 0.43	10.9 $\pm$ 0.45	0.37 $\pm$ 0.51	10.79 $\pm$ 0.63	0.25 $\pm$ 0.51
$\gamma$ -Tocopherol ( $\mu\text{mol/l}$ )	9.62 $\pm$ 0.65	9.87 $\pm$ 0.72	0.25 $\pm$ 0.84	9.61 $\pm$ 0.41	-0.30 $\pm$ 0.84
$\gamma$ -Tocopherol/LDL ( $\mu\text{mol/mmol}$ )	1.60 $\pm$ 0.11	1.73 $\pm$ 0.13	0.13 $\pm$ 0.13	1.62 $\pm$ 0.07	0.03 $\pm$ 0.13
Retinol ( $\mu\text{mol/l}$ )	3.40 $\pm$ 0.19	3.88 $\pm$ 0.18	-0.02 $\pm$ 0.19	3.89 $\pm$ 0.26	-0.00 $\pm$ 0.19
Retinol/LDL ( $\mu\text{mol/mmol}$ )	0.65 $\pm$ 0.03	0.67 $\pm$ 0.03	0.02 $\pm$ 0.03	0.67 $\pm$ 0.04	0.03 $\pm$ 0.03
Lutein ( $\mu\text{mol/l}$ )	0.36 $\pm$ 0.02	0.36 $\pm$ 0.02	0.00 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.02	-0.04 $\pm$ 0.02
Lutein/LDL ( $\mu\text{mol/mmol}$ )	0.06 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00	-0.00 $\pm$ 0.00
$\beta$ -Carotene ( $\mu\text{mol/l}$ )	0.63 $\pm$ 0.07	0.62 $\pm$ 0.05	-0.01 $\pm$ 0.05	0.59 $\pm$ 0.06	-0.04 $\pm$ 0.05
$\beta$ -Carotene/LDL ( $\mu\text{mol/mmol}$ )	0.10 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.01
Lycopene ( $\mu\text{mol/l}$ )	0.69 $\pm$ 0.05	0.62 $\pm$ 0.04	-0.06 $\pm$ 0.07	0.63 $\pm$ 0.07	-0.06 $\pm$ 0.07
Lycopene/LDL ( $\mu\text{mol/mmol}$ )	0.12 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.00	-0.01 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01

Note: Values are mean  $\pm$  SEM; N = 47.

Treatment effects were examined at the end of the three different phases by one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ). Absolute change was calculated for each subject as follow: [Wk 4 (WD-PS, PS-esters)]-[Wk 4 (control)].

**Table 6 – Plasma plant sterol, stanol, and cholesterol precursor concentrations at the end of each treatment phases.**

Plant sterol variables ( $\mu\text{mol/l}$ )	Control	WD-PS		PS-esters	
	Wk 4	Wk 4	Absolute change	Wk 4	Absolute change
Desmosterol	2.80 $\pm$ 0.37	2.95 $\pm$ 0.35	0.15 $\pm$ 0.33	3.06 $\pm$ 0.29	0.26 $\pm$ 0.33
Brassicasterol	0.18 $\pm$ 0.14	0.22 $\pm$ 0.09	0.03 $\pm$ 0.15	0.19 $\pm$ 0.09	0.01 $\pm$ 0.15
Lathosterol	3.69 $\pm$ 0.36	4.03 $\pm$ 0.37	0.34 $\pm$ 0.27	3.86 $\pm$ 0.36	0.18 $\pm$ 0.27
Campesterol	6.47 $\pm$ 0.62	8.94 $\pm$ 0.67	2.48 $\pm$ 0.37**	8.75 $\pm$ 0.37	2.25 $\pm$ 0.37**
Stigmasterol	0.11 $\pm$ 0.06	0.65 $\pm$ 0.28	0.54 $\pm$ 0.26**	0.30 $\pm$ 0.15	0.18 $\pm$ 0.26
$\beta$ sitosterol	3.52 $\pm$ 0.47	6.06 $\pm$ 0.62	2.55 $\pm$ 0.46**	5.51 $\pm$ 0.56	2.00 $\pm$ 0.46**
Stigmastanol	0.35 $\pm$ 0.14	0.58 $\pm$ 0.46	0.23 $\pm$ 0.41	0.49 $\pm$ 0.33	0.14 $\pm$ 0.41
Ratios ( $\mu\text{mol/mmol}$ )					
Desmosterol/cholesterol	0.46 $\pm$ 0.06	0.51 $\pm$ 0.06	0.05 $\pm$ 0.06	0.54 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.06
Brassicasterol/cholesterol	0.02 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.02
Lathosterol/cholesterol	0.61 $\pm$ 0.06	0.70 $\pm$ 0.06	0.09 $\pm$ 0.05	0.67 $\pm$ 0.06	0.06 $\pm$ 0.05
Campesterol/cholesterol	1.07 $\pm$ 0.10	1.56 $\pm$ 0.12	0.49 $\pm$ 0.06**	1.53 $\pm$ 0.11	0.46 $\pm$ 0.06**
Stigmasterol/cholesterol	0.02 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.05	0.10 $\pm$ 0.05*	0.06 $\pm$ 0.03	0.04 $\pm$ 0.05
$\beta$ sitosterol/cholesterol	0.58 $\pm$ 0.08	1.05 $\pm$ 0.10	0.47 $\pm$ 0.14**	0.96 $\pm$ 0.10	0.37 $\pm$ 0.13**
Stigmastanol/cholesterol	0.06 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.08	0.04 $\pm$ 0.07	0.08 $\pm$ 0.06	0.03 $\pm$ 0.07

Note: Values are mean  $\pm$  SEM; N = 47.

Treatment effects were examined at the end of the three different phases by one-way ANOVA.

Absolute change was calculated for each subject as follow: Wk 4 (WD-PS, PS-esters)]-[Wk 4 (control)].

\*\*  $p < 0.001$  compared with the control.

\*  $p < 0.05$  compared with control.

**Table 7 – Liver function test parameters and C-reactive protein levels in response to treatment.**

Parameters	Control	WD-PS		PS-esters	
	Wk 4	Wk 4	Absolute change	Wk 4	Absolute change
AST (U/l)	20.6 $\pm$ 1.33	22.5 $\pm$ 1.72	1.9 $\pm$ 1.30	21.3 $\pm$ 1.48	0.7 $\pm$ 1.30
ALT (U/l)	35.2 $\pm$ 2.71	38.1 $\pm$ 3.54	2.9 $\pm$ 3.13	40.5 $\pm$ 4.54	5.4 $\pm$ 3.13
LDH (U/l)	504.5 $\pm$ 7.96	509.7 $\pm$ 9.92	5.2 $\pm$ 11.02	514.8 $\pm$ 13.17	10.4 $\pm$ 11.02
ALKP (U/l)	80.3 $\pm$ 6.39	73.7 $\pm$ 2.52	-6.6 $\pm$ 6.93	72.8 $\pm$ 2.62	-7.5 $\pm$ 6.93
GGT (U/l)	35.3 $\pm$ 2.84	36.8 $\pm$ 3.08	1.6 $\pm$ 1.51	36.6 $\pm$ 2.82	1.5 $\pm$ 1.51
CRP (mg/l)	1.75 $\pm$ 0.35	1.50 $\pm$ 0.29	-0.26 $\pm$ 0.44	1.60 $\pm$ 0.31	-0.15 $\pm$ 0.44

Note: Treatment effects were examined by one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  SEM; N = 47.

ALKP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, asparagine aminotransferase

GGT, gamma-glutamyltransferase; LDH, lactate dehydrogenase; CRP, C-reactive protein

Absolute change was calculated for each subject as follow: WK 4 (WD-PS, PS-esters)]-[Wk 4 (control)].



(1.9 g/d) or stanol ester (1.8 g/d) enriched diets on serum retinol,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol, vitamin D and K concentrations, or their change relative to baseline. Similarly, Hallikainen and Uusitupa (1999) reported no changes in serum retinol concentrations after 8 wk of consumption of 2.3 g/d stanol esters, while serum  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol concentrations were reduced. Therefore, we can conclude that the 2-g/d dose of WD-PS or PS-esters appears to provide minimal reductions in other plasma fat-soluble components.

In the present study, consumption of both forms of PS-enriched yogurt (WD-PS and PS-esters) increased plasma campesterol and sitosterol levels. This finding is consistent with existing knowledge that an increase in PS intake promotes plasma concentrations of sitosterol and campesterol by 20–100% and 40–100%, respectively (Derdemezis, Filippatos, Mikhailidis, & Elisaf, 2010; Fransen et al., 2007; Jones et al., 2000). Furthermore, in the present study consumption of WD-PS or PS-esters showed no increase in plasma markers of cholesterol synthesis. Similar to this result, Gremaud et al. (2002) observed that lecithin-solubilized stanols, in an oil-water emulsion, decreased cholesterol absorption without a corresponding increase in cholesterol synthesis. The lack of change in cholesterol synthesis, as in this present study, however, is in contrast with the effects seen in other study (Fransen et al., 2007) where PS was incorporated into traditional matrices, such as margarine. The difference in magnitude of the change in cholesterol synthesis may also be due to the dose of PS consumed or to the frequency of PS consumption, either of which could potentially alter cholesterol synthesis to a greater or lesser degree (Rudkowska, Abumweis, Nicolle, & Jones, 2008a).

In summary, both WD-PS and PS-ester-enriched yogurt favorably modified blood lipid profiles without altering plasma liver enzymes or CRP concentrations. However, in comparison with PS-esters-enriched yogurt, consumption of WD-PS-enriched yogurt, in hypercholesterolemic subjects, not only similarly decreased total and LDL cholesterol but also decreased triglycerides and TC/HDL-C ratio. Hence, our study supports the fact that there may be added advantages of a more highly solubilized WD-PS form over traditional PS-esters in terms of overall lipid level management.

### Acknowledgments

We gratefully acknowledge the participants of the study and personnel at the Richardson Centre for Functional Foods and Nutraceuticals including Khatima Khalloufi and Haifeng Yang for their assistance as analytical technicians, and Kimberley Robinson for her help as a clinical coordinator.

The authors' responsibilities were as follows-MAS was responsible for conducting the research, management of the clinical trial, data collection, laboratory analysis, statistical analysis and writing the paper; SVH was responsible for subject recruitment, and contributed to conduct the clinical trial, data collection, and to revise the final paper; PJH was the principal investigator and responsible for the conception and design of the project, submission for ethical approval, seeking financial support and contribution to the preparation

of the paper. All authors reviewed the final version of the manuscript and had no conflicts of interest to declare.

### REFERENCES

- Abumweis, S. S., Barake, R., & Jones, P. J. (2008). Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Food and Nutrition Research*, 52. <http://dx.doi.org/10.3402/fnr.v52i0.1811>.
- American Diabetes Association (2008). Nutrition recommendations and interventions for diabetes. A position statement of the American Diabetes Association in *Diabetes Care* (pp. 561–578).
- Assmann, G., Schulte, H., von Eckardstein, A., & Huang, Y. (1996). High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*, 124(Suppl.), S11–S20.
- Berger, A., Jones, P. J., & Abumweis, S. S. (2004). Plant sterols: Factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids in Health and Disease*, 3, 5.
- Health Canada (2010). *Plant sterols and blood cholesterol lowering*. Ottawa (ON): Health Canada, Food Directorate, Health Products and Food Branch (Bureau of Nutritional Sciences).
- Clifton, P. M., Noakes, M., Sullivan, D., Erichsen, N., Ross, D., Annison, G., & Nestel, P. (2004). Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters differ in milk, yoghurt, bread and cereal. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(3), 503–509.
- De Jong, A., Plat, J., Bast, A., Godschalk, R. W., Basu, S., & Mensink, R. P. (2008). Effects of plant sterol and stanol ester consumption on lipid metabolism, antioxidant status and markers of oxidative stress, endothelial function and low-grade inflammation in patients on current statin treatment. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62(2), 263–273.
- Demonty, I., Ras, R. T., van der Knaap, H. C., Duchateau, G. S., Meijer, L., Zock, P. L., & Trautwein, E. A. (2009). Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. *Journal of Nutrition*, 139(2), 271–284.
- Denke, M. A. (1995). Lack of efficacy of low-dose sitostanol therapy as an adjunct to a cholesterol-lowering diet in men with moderate hypercholesterolemia. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61(2), 392–396.
- Derdemezis, C. S., Filippatos, T. D., Mikhailidis, D. P., & Elisaf, M. S. (2010). Review article: Effects of plant sterols and stanols beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *The Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 15(2), 120–134.
- Fornari, T., Torres, C. F., Torrelo, G., Senorans, F. J., & Reglero, G. (2009). Production of phytosterol esters from soybean oil deodorizer distillates. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(5), 459–463.
- Fransen, H. P., de Jong, N., Wolfs, M., Verhagen, H., Verschuren, W. M., Lutjohann, D., & Mensink, R. P. (2007). Customary use of plant sterol and plant stanol enriched margarine is associated with changes in serum plant sterol and stanol concentrations in humans. *Journal of Nutrition*, 137(5), 1301–1306.
- Friedewald, W. T., Levy, R. I., & Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18(6), 499–502.
- Genest, J., McPherson, R., Frohlich, J., Anderson, T., Campbell, N., Carpentier, A., & Ur, E. (2009). 2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in



- the adult – 2009 recommendations. *Canadian Journal of Cardiology*, 25(10), 567–579.
- Gremaud, G., Dalan, E., Piguet, C., Baumgartner, M., Ballabeni, P., Decarli, B., & Fay, L. B. (2002). Effects of non-esterified stanols in a liquid emulsion on cholesterol absorption and synthesis in hypercholesterolemic men. *European Journal of Nutrition*, 41(2), 54–60.
- Gueguen, S., Herbeth, B., Siest, G., & Leroy, P. (2002). An isocratic liquid chromatographic method with diode-array detection for the simultaneous determination of alpha-tocopherol, retinol, and five carotenoids in human serum. *Journal of Chromatographic Science*, 40(2), 69–76.
- Hallikainen, M. A., & Uusitupa, M. I. J. (1999). Effect of 2 low-fat stanol ester containing margarines on serum cholesterol concentrations as part of low-fat diet in hypercholesterolemic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69(3), 403–410.
- Hansel, B., Nicolle, C., Lalanne, F., Tondou, F., Lassel, T., Donazzolo, Y., & Bruckert, E. (2007). Effect of low-fat, fermented milk enriched with plant sterols on serum lipid profile and oxidative stress in moderate hypercholesterolemia. *American Journal of Clinical Nutrition*, 86(3), 790–796.
- Jones, P. J., Raeini-Sarjaz, M., Jenkins, D. J., Kendall, C. W., Vidgen, E., Trautwein, E. A., & Connelly, P. W. (2005). Effects of a diet high in plant sterols, vegetable proteins, and viscous fibers (dietary portfolio) on circulating sterol levels and red cell fragility in hypercholesterolemic subjects. *Lipids*, 40(2), 169–174.
- Jones, P. J., Raeini-Sarjaz, M., Ntanos, F. Y., Vanstone, C. A., Feng, J. Y., & Parsons, W. E. (2000). Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters. *Journal of Lipid Research*, 41(5), 697–705.
- Jones, P. J., Vanstone, C. A., Raeini-Sarjaz, M., & St-Onge, M. P. (2003). Phytosterols in low- and nonfat beverages as part of a controlled diet fail to lower plasma lipid levels. *Journal of Lipid Research*, 44(9), 1713–1719.
- Kastelein, J. J., van der Steeg, W. A., Holme, I., Gaffney, M., Cater, N. B., Barter, P., & Grundy, S. M. (2008). Lipids, apolipoproteins, and their ratios in relation to cardiovascular events with statin treatment. *Circulation*, 117(23), 3002–3009.
- 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.
- Kinosian, B., Glick, H., Preiss, L., & Puder, K. L. (1995). Cholesterol and coronary heart disease: Predicting risks in men by changes in levels and ratios. *Journal of Investigative Medicine*, 43(5), 443–450.
- Korpela, R., Tuomilehto, J., Högström, P., Seppo, L., Piironen, V., Salo-Vaananen, P., & Tikkanen, M. J. (2006). Safety aspects and cholesterol-lowering efficacy of low fat dairy products containing plant sterols. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60(5), 633–642.
- Law, M. (2000). Plant stanol and stanol margarines and health. *The British Medical Journal*, 320(7238), 861–864.
- Lin, X., Ma, L., Racette, S. B., Anderson Speare, C. L., & Ostlund, R. E. Jr. (2009). Phytosterol glycosides reduce cholesterol absorption in humans. *The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(4), G931–G935.
- Mackay, D., & Jones, P. J. (2011). Evaluation of methods for the determination of cholesterol absorption and synthesis in humans. *Atherosclerosis*, 218(2), 253–262.
- Meguro, S., Higashi, K., Hase, T., Honda, Y., Otsuka, A., Tokimitsu, I., & Itakura, H. (2001). Solubilization of phytosterols in diacylglycerol versus triacylglycerol improves the serum cholesterol-lowering effect. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55(7), 513–517.
- Mensink, R. P., Ebbing, S., Lindhout, M., Plat, J., & van Heugten, M. M. (2002). Effects of plant stanol esters supplied in low-fat yoghurt on serum lipids and lipoproteins, non-cholesterol sterols and fat soluble antioxidant concentrations. *Atherosclerosis*, 160(1), 205–213.
- Miettinen, T. A., Strandberg, T. E., & Gylling, H. (2000). Noncholesterol sterols and cholesterol lowering by long-term simvastatin treatment in coronary patients: Relation to basal serum cholestanol. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(5), 1340–1346.
- 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.
- Naumann, E., Plat, J., Kester, A. D., & Mensink, R. P. (2008). The baseline serum lipoprotein profile is related to plant stanol induced changes in serum lipoprotein cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(1), 117–126.
- NCEP (2001). Executive summary of the third report of the national cholesterol education program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). *The Journal of the American Medical Association*, 285(19), 2486–2497.
- Noakes, M., Clifton, P. M., Doombos, A. M., & Trautwein, E. A. (2005). Plant sterol ester-enriched milk and yoghurt effectively reduce serum cholesterol in modestly hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Nutrition*, 44(4), 214–222.
- Ostlund, R. E., Jr., Spilburg, C. A., & Stenson, W. F. (1999). Sitostanol administered in lecithin micelles potently reduces cholesterol absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(5), 826–831.
- Plat, J., Brufau, G., Dallinga-Thie, G. M., Dasselara, M., & Mensink, R. P. (2009). A plant stanol yogurt drink alone or combined with a low-dose statin lowers serum triacylglycerol and non-HDL cholesterol in metabolic syndrome patients. *Journal of Nutrition*, 139(6), 1143–1149.
- Plat, J., & Mensink, R. P. (2009). Plant stanol esters lower serum triacylglycerol concentrations via a reduced hepatic VLDL-1 production. *Lipids*, 44(12), 1149–1153.
- Raeini-Sarjaz, M., Ntanos, F. Y., Vanstone, C. A., & Jones, P. J. (2002). No changes in serum fat-soluble vitamin and carotenoid concentrations with the intake of plant sterol/stanol esters in the context of a controlled diet. *Metabolism*, 51(5), 652–656.
- Richelle, M., Enslin, M., Hager, C., Groux, M., Tavazzi, I., Godin, J. P., & Fay, L. B. (2004). Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of beta-carotene and alpha-tocopherol in normocholesterolemic humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(1), 171–177.
- Ridker, P. M., Rifai, N., Cook, N. R., Bradwin, G., & Buring, J. E. (2005). Non-HDL cholesterol, apolipoproteins A-I and B100, standard lipid measures, lipid ratios, and CRP as risk factors for cardiovascular disease in women. *The Journal of the American Medical Association*, 294(3), 326–333.
- Rudkowska, I., AbuMweis, S. S., Nicolle, C., & Jones, P. J. (2008a). Association between non-responsiveness to plant sterol intervention and polymorphisms in cholesterol metabolism genes: A case-control study. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 33(4), 728–734.
- Rudkowska, I., AbuMweis, S. S., Nicolle, C., & Jones, P. J. (2008b). Cholesterol-lowering efficacy of plant sterols in low-fat yogurt consumed as a snack or with a meal. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(5), 588–595.
- Simonen, P., Gylling, H., & Miettinen, T. A. (2008). The validity of serum squalene and non-cholesterol sterols as surrogate markers of cholesterol synthesis and absorption in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 197(2), 883–888.
- Stampfer, M. J., Sacks, F. M., Salvini, S., Willett, W. C., & Hennekens, C. H. (1991). A prospective study of cholesterol,



- apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 325(6), 373–381.
- Theuwissen, E., Plat, J., van der Kallen, C. J., van Greevenbroek, M. M., & Mensink, R. P. (2009). Plant stanol supplementation decreases serum triacylglycerols in subjects with overt hypertriglyceridemia. *Lipids*, 44(12), 1131–1140.
- Thomsen, A. B., Hansen, H. B., Christiansen, C., Green, H., & Berger, A. (2004). Effect of free plant sterols in low-fat milk on serum lipid profile in hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(6), 860–870.
- Trautwein, Elke A., Duchateau, Guus S. M. J. E., Lin, Yuguang, Mel'nikov, Sergey M., Molhuizen, Henri O. F., & Ntanos, Fady Y. (2003). Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(3–4), 171–185.
- Vanstone, C. A., & Jones, P. J. (2004). Limitations of plasma plant sterols as indicators of cholesterol absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(2), 340–341.
- Volpe, R., Niittynen, L., Korpela, R., Sirtori, C., Bucci, A., Fraone, N., & Pazzucconi, F. (2001). Effects of yoghurt enriched with plant sterols on serum lipids in patients with moderate hypercholesterolaemia. *British Journal of Nutrition*, 86(2), 233–239.
- WHO (2011). *Cardiovascular diseases (CVDs) WHO Fact Sheet NO.317*. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>.

