

İNCELEME

Bitki steroller ve stanollerinin bağırsak kolesterol metabolizması üzerindeki etkileri: Geçmişten günümüze önerilen mekanizmalar

Els De Smet, Ronald P. Mensink ve Jogchum Plat

İnsan Biyolojisi Bölümü, Beslenme, Toksikoloji ve Metabolizma Okulu, Maastricht Üniversitesi, Maastricht, Hollanda

Bitki steroller ve stanoller bitkilerde bulunan doğal gıda bileşenleridir. Serum düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL-K) konsantrasyonlarını düşürdükleri 1950 yılında gösterilmiştir. Meta-analiz, günlük 2,5 g bitki sterolü/stanolü alımının serum LDL-K konsantrasyonlarını %10'a kadar düşürdüğünü bildirmiştir. Birçok çalışmaya rağmen, altında yatan mekanizma hala aydınlatılmamıştır. Bu nedenle, geçtiğimiz onlarca yıl boyunca önerilen mekanizmalar tanımlanacak ve mevcut bilgiler bağlamında tartışılacaktır. İlk zamanlarda, bitki sterollerinin/stanollerinin karışık misellerin yanı sıra şilomikronlara dahil olmak için bağırsak kolesterolü ile rekabet ettiği öne sürülmüştür. Daha sonra, odak noktası hücresel süreçlere doğru kaymıştır. Özellikle, enterositlerin membranlarında lokalize olan sterol taşıyıcılarının rolü olduğu öne sürülmüştür. Tüm bu süreçler sonuç olarak bağırsak kolesterol emilimini azaltmıştır. Daha yakın dönemde, kolesterolün dolaşımdan bağırsak lümenine doğrudan salgılanması tarif edilmiştir. Hayvan çalışmalarında elde edilen ilk sonuçlar, bitki sterollerinin/stanollerinin bu yolu aktive ettiğini ve bunun da fekal nötral sterol içeriğinin artmasını ve dolayısıyla bitki sterollerinin/stanollerinin kolesterol düşürücü aktivitesini açıklayabileceğini göstermiştir.

Alınma: 27 Ekim 2011
Revizyon: 27 Şubat 2012
Kabul edilme: 3 Nisan 2012

Anahtar kelimeler:

Kolesterol / Etki mekanizması / Karışık miseller / Bitki stanoller / Bitki steroller

1 Giriş

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) dünya çapında morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenidir. Yaşam tarzının ve özellikle de beslenmemizin KVH'lerin önlenmesi ve tedavisinde önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir [1]. Beslenme müdahaleleri için önemli bir hedef, artan serum düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL-K) konsantrasyonlarını düşürmektir [2].

Kolesterol düşürücü ajanlarla ilgili 26 klinik çalışmanın sonuçlarını özetleyen bir meta-analiz, randomizasyondan 1 yıl sonra serum LDL-K konsantrasyonundaki her 1 mmol/L'lik azalma için ölümcül olmayan tıkalı vasküler olay riskinin yaklaşık beşte bir oranında azaldığını açıkça göstermiştir. Daha spesifik olarak, 1, 2 veya 3 mmol/L'lik bir serum LDL-K azalması, riski sırasıyla %22, 40 ve 50 oranında azaltmıştır [4]. Bu etkileyici risk azalmalarına rağmen, bu etkilerin LDL-K konsantrasyonlarındaki azalma ile nedensel olarak ilişkili olup olmadığı hala devam eden bir tartışma konusudur. Statinlerin kardiyoprotektif etkilerinin nedensel olarak serum LDL-K düşürücü etkileriyle mi yoksa endotel fonksiyonunu iyileştirme, vasküler nitrik oksit biyoyararlanımını artırma ve oksidatif stresi azaltma gibi pleiotropik etkileriyle mi ilişkili olduğu bile sorgulanmaktadır [5]. Bu bağlamda, LaRosa [6] LDL-K'nin nasıl düşürüldüğünün önemli olmadığını açıkça göstermiştir. Mevcut tüm müdahale çalışmalarının sonuçları birleştirildiğinde, ölümcül olmayan miyokard enfarktüsü ve koroner kalp hastalığı ölüm riskini azaltmak için serum LDL-K'nin beslenmeyle düşürülmesinin, örneğin statinler ve 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri ile serum LDL-K'nin düşürülmesi kadar değerli olduğu görülmüştür.

Yazışma adresi: Dr. Jogchum Plat, İnsan Biyolojisi Bölümü, Beslenme, Toksikoloji ve Metabolizma Okulu (NUTRIM), Maastricht Üniversitesi, Posta Kutusu 616, NL-6200 MD Maastricht, Hollanda
E-posta: J.Plat@maastrichtuniversity.nl
Faks: +31-433670976

Kısaltmalar: ABCA1, ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcı A1; ABCG5, ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcı G5; ABCG8, kaset taşıyıcı G8; ACAT-2, asilkoenzim A kolesterol asiltransferaz-2; ANXA2, anneksin2; Caco2, kolorektal adenokarsinom; CAV1, kaveolin1; KVH, kardiyovasküler hastalık; FMD, akım aracılı vazodilatasyon; HMG-CoA, 3-hidroksi-3-metil-glutaril-Koenzim A; LISA, ligand algılama dizisi; LXR, karaciğer X reseptörü; MTP, mikrozomal trigliserit transfer proteini; NPC1L1, Niemann-Pick C1 benzeri 1 proteini; NTD, N-terminal alanı; Ox-LDL, oksitlenmiş LDL; RCT, ters kolesterol taşıması; SREBP2, sterol yanıt elemanı bağlayıcı protein 2; TAG, triasil-glisero; TICE, transintestinal kolesterol atılımı



Bitki sterollerinin veya stanollerinin yağ asidi esterleri, yani bitki sterolü veya stanol esterleri ile zenginleştirilmiş gıdaların, 85 haftalık bir müdahale çalışmasında gösterildiği gibi geçici olmayan serum LDL-K düşürücü etkileri [7, 8] iyi bilinmektedir [9]. Bu bileşiklerin etkinliği, günümüzde Ulusal Kolesterol Eğitim Programı kılavuzları gibi ulusal ve uluslararası kılavuzlara dahil edilmiş olmaları ile daha da desteklenmektedir. Bu kılavuzlar, LDL-K konsantrasyonları yüksek olan kişilerde KVH riskini azaltmak için doymuş yağ asitleri bakımından düşük sağlıklı bir diyetle günlük 2 g bitki sterolü veya stanolü eklenmesini teşvik etmektedir. Bu durumda, bitki sterollerini ve stanollerinin eklenmesi serum LDL-K konsantrasyonlarını %10'a kadar düşürebilir [2].

Bitki sterollerini ve stanollerini bitkilerde doğal olarak bulunan bileşenlerdir. Kolesterol gibi, çoğunlukla serbest ve esterleşmiş formda bulunurlar. Fonksiyonel gıda bileşeni olarak dahil edildiklerinde, bitki sterollerini ve stanollerini, gıda matrisindeki çözünürlüğü artırmak için sıklıkla bir yağ asidi esteri ile esterleştirilir [10]. Kolesterol ve bitki sterollerinin/stanollerinin emilim oranı çok farklıdır. Kolesterolün yaklaşık %40-60'ı emilirken, bitki sterollerini/stanollerini spesifik izoformuna bağlı olarak %15 veya daha az oranda emilir [11-13].

Dört meta-analiz, bitki sterolü veya stanol esterleri ile zenginleştirilmiş gıdaların tüketiminden sonra LDL-K konsantrasyonlarında önemli düşüşler olduğunu göstermiştir [7, 14-16]. Bu dört doğrusal olmayan doz-cevap eğrisinin aksine, Mensink ve arkadaşları [17] bitki stanolü alımı ile LDL-K'de 9 g/gün'e kadar azalma arasında net bir doğrusal ilişki bulmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, günlük 3, 6 ve 9 g tüketimden sonra serum LDL-K konsantrasyonlarındaki azalmalar sırasıyla %7,5, 12 ve 17,4 olmuştur. Karşılaştırılabilir bulgular Gylling ve meslektaşları [18] tarafından rapor edilmiştir. 10 haftalık bir süre boyunca yağ asidi esterleri olarak sağlanan günlük 8,8 g bitki stanolü tüketiminden sonra serum LDL-K'sinde %17,4'lük bir azalma bulunmuştur. Bu bağlamda, Musa-Veloso ve arkadaşlarının [8] en son meta-analizi, şu anda önerilen 2 g/gün'ün üzerinde bitki stanollerini tüketiminin serum LDL-K konsantrasyonunda ek ve doza bağlı bir azalma ile ilişkili olduğunu öne sürmüştür. 113 yayını ve bir yayınlanmamış çalışma raporunu araştırmaya dahil etmişler ve LDL-K'deki maksimum azalmanın sırasıyla 0,8 ila 8,8 g ve 0,19 ila 9 g arasında değişen günlük dozlarda bitki stanollerini tüketiminden sonra %16,4 ve bitki sterollerini tüketiminden sonra %8,3 olduğunu bulmuşlardır. Dikkat çekici bir şekilde, bitki stanollerini ve sterollerinin yüksek dozlarının (> 4 g/gün) LDL-K düşürme aktivitesini birebir karşılaştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, daha yüksek alımlarda bitki sterollerini ve stanollerini arasındaki etkinliği ve olası farklılıkları daha fazla araştırmak için böyle bir klinik çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bitkisel sterol ve stanol esterleri ile zenginleştirilmiş gıdaların LDL-K düşürücü etkisi sürekli ve yaygın olarak kabul görse de, gıda türünün (gıda matrisi) etkinliği etkileyip etkilemediği tartışması halen devam etmektedir [7, 16]. Kullanılan gıda taşıyıcısının türünün yanı sıra, alım sıklığı da önemli görünmektedir [7, 19]. Ayrıca, Abumweis ve arkadaşları [16] alım zamanının da çok önemli olduğu sonucuna varmıştır, çünkü kahvaltıda önce veya kahvaltıyla birlikte tüketim serum LDL-K'sini düşürmede başarısız olurken, bitki sterollerini öğle veya akşam yemeği olan bir ana öğünle birlikte tüketildiğinde beklenen serum LDL-K düşürücü etki gözlenmiştir.

Farklı çalışmalar arasındaki tüm bu tutarsızlıkları daha iyi anlamak için, bitki sterol/stanol esterlerinin (bağırsak) kolesterol metabolizması üzerindeki etkilerini anlamak önemlidir. Bu nedenle, bu derlemenin temel amacı, geçmiş ve yeni bulgulara ve bitki sterol/stanol esterlerinin serum LDL-K düşürücü etkisinin altında yatan mekanizmalara ilişkin varsayımlara ve az çok kabul görmüş açıklamalara odaklanmaktır. Bunun için, 1950'lerden başlayarak günümüze kadar bu bileşiklerin tarihsel bir özeti sunacağız. Bu bulgulara dayanarak, aterosklerotik lezyon oluşumunu azaltmak için kullanımlarının öngörülüp görülmeyeceğine dair bir sonuca varmaya çalışacağız.

2 Yıllar içinde önerilen mekanizmalar

Bağırsak kolesterol emiliminin engellenmesi, LDL ve diğer apoB100 içeren lipoprotein fraksiyonlarının konsantrasyonlarını düşürmek için ilgi çekici bir hedefdir. Kolesterol emilimi çok aşamalı bir süreçtir ve en önemli aşamaları (1) diyet sterol/stanol esterlerinin bağırsak lümeninde serbest sterol/stanollere ayrılması, (2) esterleşmemiş kolesterolün emülsifiye yağ fazına ve lümendeki karışık misellere çözündürülmesi, (3) kolesterolün karıştırılmamış su tabakası ve fırça sınırı membranı gibi mukozal bariyerlerden taşınmasıdır. Enterosit içindeki asilkoenzim A kolesterol asiltransferaz-2 (ACAT-2) tarafından (4) alındıktan ve (5) (yeniden) esterleştirildikten sonra, kolesterol (6) mikrozomal trigliserit transfer proteininin (MTP) katılımıyla şilomikronlara dahil edilir ve (7) lenf içine salınır. Yıllar boyunca, neredeyse her adım, bitki sterolü veya stanol ester tüketimi yoluyla bağırsak kolesterol emilimini düşürmedeki potansiyel katılımı açısından tartışılmıştır. Şimdi bitki sterolü ve stanol esterleri ile bağırsak kolesterol emilimindeki azalmayı açıklayan farklı paradigmalara kronolojisini özetleyeceğiz.

2.1 İlk günler

Bitki sterollerinin serum kolesterol konsantrasyonlarının düzenlenmesindeki rolünden bahseden ilk çalışmalar 1951 yılında Peterson ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Tavuklar %0,5-1 soya fasulyesi sterollerini, %0,5-1 kolesterol veya her iki bileşiğin karışımını içeren bir diyetle beslenmiştir. Soya fasulyesi sterollerini ile desteklenmiş bir diyetle beslenen tavuklarda hepatik ve plazma kolesterol konsantrasyonlarında önemli azalmalar bulunmuştur [20]. Takip eden çalışmalarda [21], yine tavuklarda, bitki sterollerinin aterosklerotik lezyon oluşumu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Kolesterolle beslenen tavuklarda soya fasulyesi sterollerinin verilmesinden sonra lezyonların kapsamı ve şiddeti azalmıştır.



Tablo 1. Geçmişten günümüze bitki sterollerinin/stanollerinin kolesterol düşürücü aktivitesine katkıda bulunan mekanizmalara genel bir bakış

Dönem	Hedef	Önerilen mekanizma
İlk günler: 1950'ler	Bağırsak kolesterol Emilimi	Önerilen bir mekanizma yoktur
Karışık misel dönemi: 1960'lar	Bağırsak kolesterol Emilimi	Karışık misellere dahil olmak için rekabet
Hücresel dönem: 1960'lar ve 1970'ler	Bağırsak kolesterol Emilimi	Şilomikronlara dahil olmak için rekabet
Taşıyıcı dönemi: > 2000	Bağırsak kolesterol Emilimi	Taşıyıcılar: NPC1L1-ABCG5/ABCG8-ABCA1 LXR hedef genlerinin aktivasyonu
Yeni keşifler çağı: > 2006	Kolesterol atılımı	TICE

Soya fasulyesi sterollerinin serum kolesterol konsantrasyonunu düşürdüğü gözlemi Pollak ve çalışma arkadaşları tarafından diğer türlerde de doğrulanmıştır. Bunun için tavşanlar kolesterol, sitosterol veya her ikisinin farklı oranlarda karışımını içeren bir diyetle beslenmiştir. Hiperkolesteroleminin net bir şekilde engellenmesi ve aterosklerozun önlenmesi, uygun miktarda bitki sterolünün verilmesiyle sağlanmıştır. Tavşanlarda sitosterolün kolesterole göre altı kat fazlasına ihtiyaç duyulurken, tavuklarda üç kat fazlası etkili olmuştur [21,22]. Daha bu ilk günlerde, bitki sterollerinin hipokolesterolemik etkisi hastalarda doğrulanmıştır [23]. Bununla beraber, altında yatan mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte, bağırsak kolesterol Emilimi üzerindeki etkilerle ilişkili olduğu düşünülmüştür (Tablo 1 ve Şekil 1A) [22, 23].

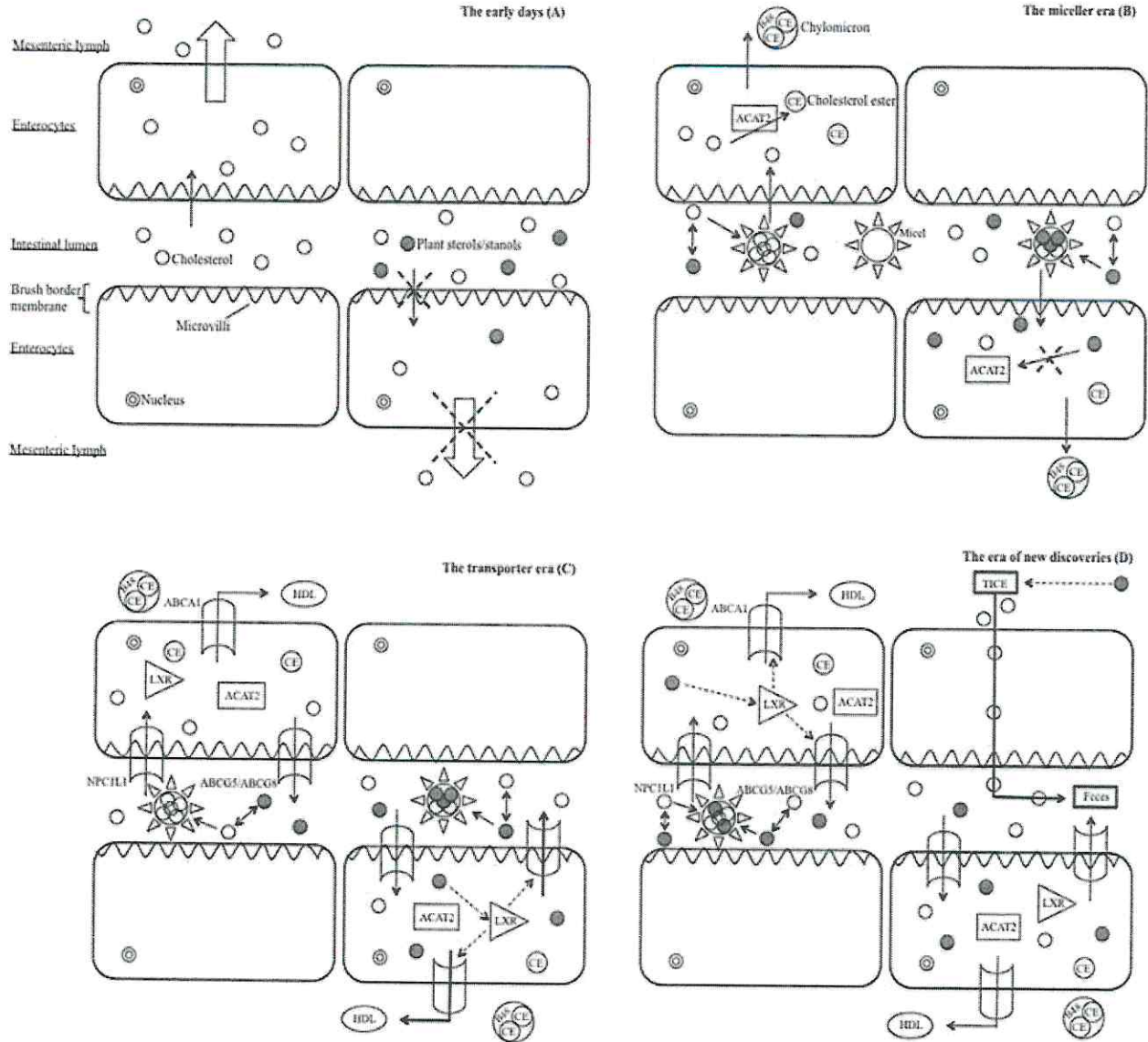
2.2 Karışık misel dönemi

Bağırsak luminal kolesterolü, sırasıyla endojen ve eksojen kolesterolden türetilen iki farklı havuzdan oluşmaktadır. Bu iki havuzun, alım için mevcut kolesterol miktarına ve bunun sonucunda serumda ortaya çıkmasına katkısı eşit değildir. Sklan ve arkadaşları [24] tavuklarda endojen kolesterolün eksojen kolesterole kıyasla daha hızlı ve daha tam olarak emildiğini göstermiştir. Tavuklar kolesterol içermeyen, düşük yağlı bir diyetle beslendiğinde, duodenum ve jejunumun üst kısmı kolesterol Emiliminin ana bölgeleridir. Diyete kolesterol eklenmesi, baskın kolesterol Emilim bölgesinin jejunuma doğru distale kaymasıyla sonuçlanmıştır. Dahası, bu kaymaya endojen kolesterolün yanı sıra safra asitlerinin duodenuma salgılanmasında artış eşlik etmiştir [25]. Esas olarak safra yoluyla zaten miseller halinde salgılanan endojen kolesterolün aksine, diyet kolesterolünün önce spesifik esterazlar tarafından parçalanması gerekir. Diyet kolesterolü ağırlıklı olarak esterleşmiş formda bulunur ve sadece serbest kolesterol Emilim için kullanılabilir hale gelmek üzere karışık misellere dahil edilir [24]. Tüm bu bulgular, endojen kolesterolün eksojen kolesterole göre tercihli Emilimine katkıda bulunabilir.

Asıl soru, bitki sterol ve stanol esterlerinin intestinal kolesterol alımına nasıl müdahale ettiği ve bitki sterol ve stanollerinin endojen ve eksojen kolesterol Emilimi üzerindeki etkileri arasında bir fark olup olmadığıdır.

Kolesterol ve bitki sterollerini/stanolleri pratikte suda çözünmediğinden, Emilimin gerçekleştirilmesi için miseller halinde çözünmeleri gerekir. Ancak misellerin lipofilik suda çözünmeyen molekülleri çözündürme kapasitesi sınırlıdır. Geçen yüzyılda 1960'lı yıllarda [26], bitki steroller ve stanollerinin karışık misellere dahil olmak için diyet kolesterolü ile rekabet ettiği az çok genel kabul görür hale gelmiştir (Şekil 1B). Bitki sterollerini/stanolleri kolesterolden daha hidrofobik olduğundan, kolesterolü karışık misellerden uzaklaştırdıkları [27] ya da başka bir deyişle, bitki sterollerini/stanollerinin karışık miseller içinde kolesterolün çözünürlüğünü azalttığı düşünülmüştür [28,29]. Daha ayrıntılı olarak, Armstrong ve Carey ve arkadaşları [30] kolesterol olmayan sterollerin karışık misellerden daha az kolay ayrıştığını ve böylece kolesterolün misel çözünürlüğünü sınırladığını öne sürmüşlerdir. Bu durum, daha düşük bir çözünürlük ancak miseller için daha yüksek bir afinite ile sonuçlanacak şekilde bitki sterollerinin/stanollerinin kolesterole kıyasla artan hidrofobikliği ile açıklanabilir. Bu misel konsepti Ikeda ve arkadaşları tarafından zarif bir şekilde gösterilmiştir [27]. Bu çalışmada, sıçanlar 10 gün boyunca tek başına %0,5 kolesterol veya %0,5 kolesterol artı eşit miktarda sitosterol veya sitostanol içeren bir diyetle beslenmiş ve hemen ardından bağırsak sulu misel fazının bileşimi analiz edilmiştir. Yalnızca kolesterolle beslenen sıçanlarla karşılaştırıldığında, kolesterolün sulu misel fazdaki çözünürlüğü kolesterol artı sitosterolle beslenen sıçanlarda %24, kolesterol artı sitostanolla beslenenlerde ise %53 daha düşük olmuştur. Sitosterol ve sitostanol arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır. İn vitro deneylerde de sitosterol ve sitostanol arasında bir fark bulunmamıştır. Takip eden deneyler - hala misel bileşimine odaklanarak- bitki sterollerinin ve stanollerin eşit derecede etkili olup olmadığını çözmeye çalışmıştır. Sitostanolün dışkıda geri kazanımının neredeyse tam olduğu, sitosterolün geri kazanımının ise %85 ila 92 arasında değiştiği bulunmuştur [31]. Bunu doğrular biçimde, Hassan ve Rampone [32] Sprague-Dawley sıçanlarının lenflerinde sitostanolün sadece %2'sinin bulunduğunu, kolesterol için bu oranın %36 olduğunu ve bunun da sitostanolün zayıf Emilimini yansıttığını göstermiştir. Bitki sterollerinin/stanollerinin bağırsaktan Emilimi ile kolesterol Emilimini engelleme kabiliyetleri arasında ters bir ilişki olduğunu öne sürmüşlerdir. Bitki stanollerinin kolesterol Emilimi üzerindeki potansiyel olarak daha yüksek etkinliğini açıklamak için Heinemann ve meslektaşları [33] hidrojenasyonun hidrofobikliği arttırdığını, bunun da kolik asit misellerine bağlanma için daha yüksek bir afinite ile sonuçlandığını ve sonuç olarak kolesterolün misellerden daha etkili bir şekilde uzaklaştırıldığı ve kolesterol Emiliminde daha belirgin bir azalma olduğunu öne sürmüştür.





Şekil 1. Son yıllarda bitki steroller ve stanollerinin kolesterol düşürücü aktivitesini açıklayan paradigmalara genel bir bakış.

(A) *Gözlem dönemi*: kolesterol, bitki steroller ve stanoller enterosit içine alınır. Bitki sterollerinin bağırsaktan kolesterol emilimini baskılayarak serum kolesterol konsantrasyonlarının düşmesine yol açtığı halihazırda 1951 yılında ileri sürülmüştür. (B) *Miseller dönemi*: Kolesterol emilimi için çok önemli bir adım olan karışık misellere dahil olmak için kolesterol ve bitki steroller/stanoller arasında bir rekabet vardır. Bitki steroller/stanoller misel kolesterolün yerini alırsa, enterosite daha az kolesterol alınacaktır. Alımdan sonra, kolesterol normalde bağırsak ACAT-2 tarafından esterleştirilir. Bu şekilde oluşan kolesterol esterler şilomikronlara dahil edilir ve lenf içine salgılanır. Buna karşın, bitki steroller/stanoller ACAT-2 için zayıf substratlardır ve enterosit içinde serbest formda kalırlar. (C) *Taşıyıcı dönemi*: ABCG5/ABCG8 ve NPC1L1 gibi farklı sterol taşıyıcıları ve bunların düzenleyici mekanizmaları keşfedilmiştir. Bitki steroller ve stanollerinin LXR gibi hücre içi kolesterol sensörleriyle etkileşime girerek ABCG5/ABCG8 ve ABCA1 ifadesinin artmasına yol açmışlardır. İkincisi steroller yeni oluşan HDL partikülüne taşıırken, ABCG5/ABCG8 sterollerin bağırsak lümenine geri akışını teşvik ederek kolesterol emiliminin azalmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda, NPC1L1'in bitki steroller/stanoller tarafından düzenlenmesi olasılığı ileri sürülmüştür. (D) *Yeni keşifler çağı*: Son zamanlarda, transintestinal kolesterol atılımı (TICE), bitki sterol/stanol aracılı kolesterol düşürücü etki için olası bir hedef olarak önerilmiştir. TICE'in uyanılması fekal nötral sterol kaybını artırmaktadır. Bununla birlikte, bitki sterollerinin/stanollerinin bağırsak kolesterol emilimi üzerindeki etkilerini daha ayrıntılı olarak araştırmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Örneğin, bazolateral ve apikal kolesterol salgılanmasından sorumlu taşıyıcıların tanımlanması gerekmektedir. Ayrıca TICE'in tek başına mı yoksa muhtemelen panel B ve C'de açıklanan diğer mekanizmalarla birlikte mi bitki steroller ve stanollerinin kolesterol düşürücü etkisinin tamamını açıkladığı tartışılmaktadır.

Kısaltmalar: ABCA1: adenosin trifosfat (ATP) bağlayıcı kaset A1 taşıyıcı; ABCG5/ABCG8: ATP bağlayıcı kaset G5 ve G8 taşıyıcı; ACAT-2: asilkoenzim A kolesterol asiltransferaz 2; CE: kolesteril esterler; CM: şilomikron; HDL: yüksek yoğunluklu lipoprotein; LXR: karaciğer X reseptörü; NPC1L1: Nieman-pick C1 benzeri 1; TICE: transintestinal kolesterol atılımı.



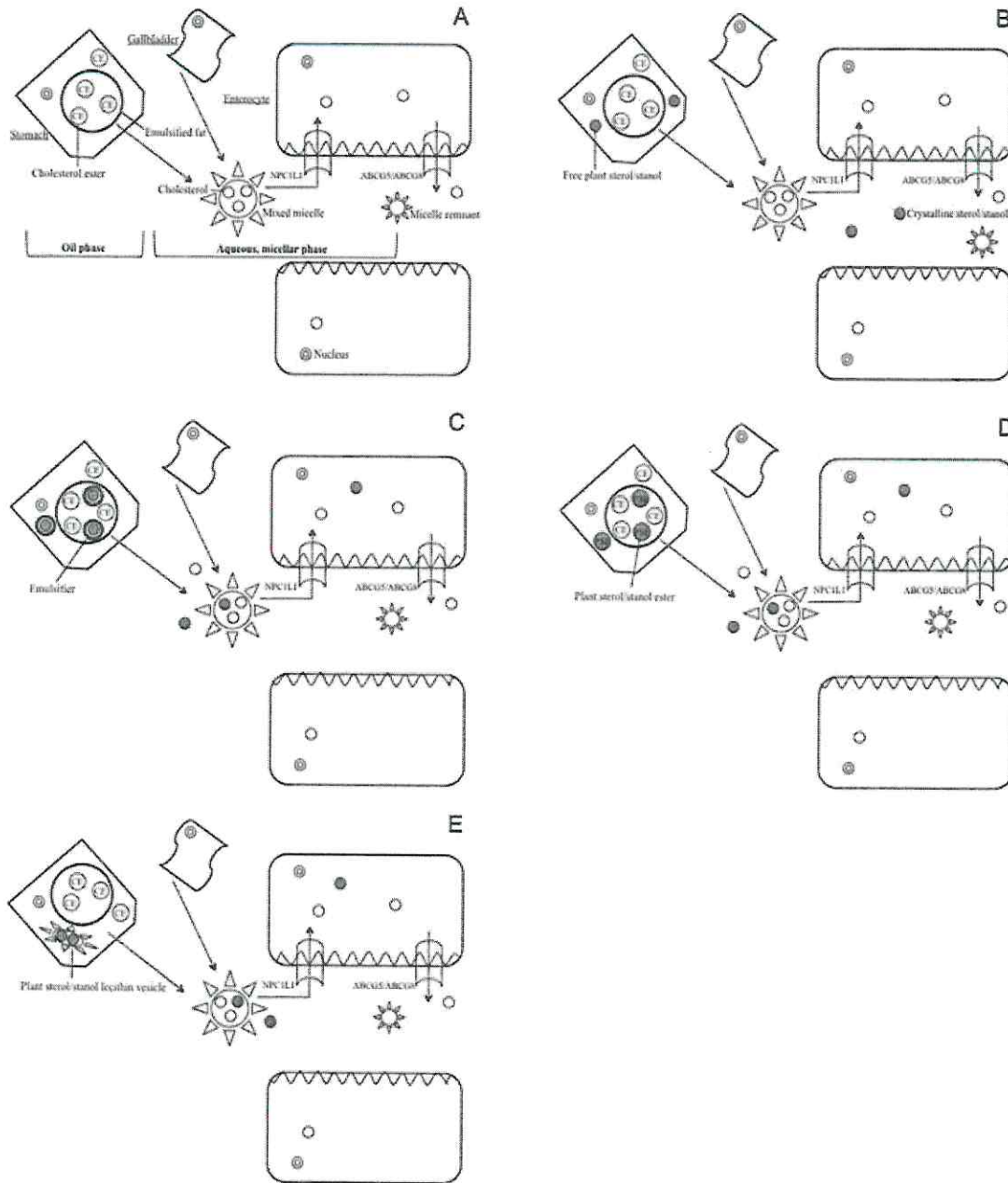
İn vivo çalışmalarında, yüksek dozda sitosterol veya monoleat içinde çözülmüş sitostanol infüzyonundan sonra insanlarda bağırsak kolesterol emilimini karşılaştırmışlardır. Sitosterol, bağırsak kolesterol emilimini neredeyse %50, sitostanol ise neredeyse %85 oranında önemli ölçüde azaltmıştır. Dolayısıyla, bitki steroller ve stanollerinin kolesterolün karışık misellere katılmasını ve dolayısıyla emilim için mevcut kolesterol miktarını azalttığını gösteren kanıtlar ağırlıklı olarak mevcuttur (Tablo 1 ve Şekil 2B-2E).

Önerilen bu mekanizma -yani misel kolesterol birleşmesine müdahale- maksimum kolesterol düşürücü etki elde etmek için bitki steroller ve stanollerinin diyet kolesterolü ile eş zamanlı olarak tüketilmesi gerektiğini göstermektedir. Ancak 2000 yılında Plat ve meslektaşları [19] günde bir kez öğle yemeğinde yağ asidi esterleri olarak 2,5 g bitki stanolü tüketiminin, toplam 2,5 g'lık eşit bir doz kadar etkili olduğunu, ancak artık üç öğüne bölündüğünü göstermiştir. Araştırmacılar, bitki stanollerinin tüketimden sonra bağırsak lümeninde ve hatta enterosit içinde kaldığını varsaymışlardır. Bu hipotezin Niemann-Pick C1 benzeri 1 protein (NPC1L1) gibi taşıyıcıların tanımlanmasından önce ortaya atıldığı unutulmamalıdır. Weststrate ve Meijer [34], bitki sterollerinin öğle ve akşam yemeklerinde tüketilmesinin LDL-K'yi, bitki sterollerinin günde üç kez verildiği çalışmalarla aynı ölçüde azalttığını bulmuştur. Daha sonra, "günde bir kez" protokolünü kullanan daha birçok çalışma gerçekten de öngörülen değişikliklerle uyumlu serum LDL-K azalmaları bulmuştur [35,36]. Bu "günde bir kez etkinlik" bulgusu, bağırsak kolesterol emiliminin azalmasının altında yatan mekanizmaları açıkça sorgulamıştır. Etkiler artık yalnızca kolesterolün karışık misellere daha az dahil olmasıyla açıklanamaz hale gelmiştir. Bununla birlikte, "günde bir kez" yaklaşımını kullanan tüm çalışmalar başarılı olmamıştır. Yağ fazının, daha sonra emülsifiye gıda bileşenlerini sulu misel fazı yoluyla enterositlere doğru taşıyan karışık misellerin oluşumu için çok önemli olduğu fark edilmelidir (Şekil 2). Bu nedenle, alınan gıdaların safra akışı ve pankreatik lipazların yeniden salınımını tetiklemesi son derece önemlidir. Bu durum Abumweis ve arkadaşlarının [16] kahvaltıdan önce veya kahvaltıyla birlikte tek bir bitkisel sterol/stanol tüketiminden sonra serum LDL-K konsantrasyonlarında neden bir azalma bulamadıklarını açıklayabilir. Bununla birlikte, bu alt grup analizinin sonuçları, dahil edilen denek sayısı az olduğu için dikkatle yorumlanmalıdır. Doornbos ve meslektaşları [37] bitki sterollerle zenginleştirilmiş (± 3 g/gün) tek doz yoğurt içeceklerinin alım zamanının etkisini değerlendirmek için 186 denegi dahil etmiştir. Toplam yağ içeriği farklı olan içecekler (%2,2'ye karşı %3,3), kahvaltıdan en az yarım saat önce veya öğle yemeğinden sonra tüketilmiştir. Araştırmacılar, toplam kolesterol ve LDL-K konsantrasyonlarının, içeceklerin yağ içeriğinden bağımsız olarak her iki koşulda da önemli ölçüde azaldığı sonucuna varmışlardır. Bununla birlikte, içecekler öğle yemeğiyle birlikte veya hemen sonrasında tüketildiğinde önemli ölçüde daha büyük bir azalma gözlenmiştir; bu da optimum kolesterol düşürücü aktivite için beslenme durumunun gerekli olduğunu düşündürmektedir. Doornbos ve diğerlerinin [37] ileri sürdüğü gibi, sadece yağ miktarı değil, aynı zamanda bir öğünün protein içeriği de önemli olabilir, çünkü her ikisi de yemekten sonra kolesistokinin salınımını tetiklemekte ve böylece karışık misellerin oluşumunda gerekli bir adım olan safra salgılanmasına neden olmaktadır.

Karışık misel döneminde sadece birkaç çalışmada ele alınan önemli bir faktör, bitki sterollerinin ve stanollerinin fiziksel durumudur. Fiziksel durum, bitki sterollerinin ve kolesterolün bağırsak lümenindeki farklı fazlar arasında bölünmesini etkileyebilir (Şekil 2). Grundy ve meslektaşları [38] bitki sterollerinin bağırsaktan kolesterol emilimini engellemesinin, bitki sterollerinin süspansiyon halinde (neredeyse tüm besinsel çalışmalarda olduğu gibi) verilmesine kıyasla (perfüzyon çalışmalarında kullanıldığı gibi) bir misel çözeltisi olarak verilmesi halinde arttığını göstermiştir. Fiziksel durumun önemi, hiperkolesterolemik hastaları günde 3 g tall yağından elde edilen iki farklı sitosterol preparatıyla (süspansiyon veya toz) besleyen Lees ve arkadaşları [28] tarafından daha da kanıtlanmıştır. Serum kolesterol konsantrasyonları her iki koşulda da azalmıştır, ancak bu azalma süspansiyon halindeki tall yağına (%7) kıyasla toz halindeki tall yağı sterollerinin (%12) verilmesinden sonra daha belirgin olmuştur. Ostlund ve meslektaşları [39] bitki sterollerinin/stanollerinin etkinliğinin sunuldukları forma bağlı olduğu konusunda hemfikiridir. 1 g saf sitostanol tozunun uygulanmasının kolesterol emilimi üzerinde önemli bir etkisi olmazken, lesitin veziküllerinde paketlenmiş 700, 300 ve hatta 100 mg sitostanol, plasebo ile karşılaştırıldığında bağırsak kolesterol emilimini sırasıyla %37, 35 ve 6 oranında azaltmıştır (Şekil 2E). Bu bulgular, sterollerin son derece düşük biyoerişilebilirlik ile karakterize edilen katı çözeltiler olan stabil kristaller oluşturması ile açıklanabilir. Bu nedenle, bir toz neredeyse hiç misel oluşturmaz ve bu formu neredeyse etkisiz hale getirir.

Fiziksel durumun yanı sıra, bitki steroller ve stanollerinin serbest sterol/stanol olarak mı yoksa sterol/stanol esterleri olarak mı sağlandığı da önemli görülmüştür. Mattson ve arkadaşları [40], denekler serbest formdaki bitki sterollerini sterol esterlerine kıyasla aldıklarında bağırsak kolesterol emiliminde %9 daha fazla azalma olduğunu bildirmiştir. Ester bağının bağırsak lümeninde safra asidiyle aktive olan pankreatik kolesterol hidrolaz tarafından tamamen hidrolize edilmediği öne sürülmüştür. Bitki sterol ve stanol esterleri misel fazında zayıf bir şekilde çözüldüğünden, büyük kısmı yağ fazında birikmektedir. Bu durum, bitki sterol esterlerinin ve ayrıca yağ fazındaki kolesterol esterlerinin enterositlere daha az etkili bir şekilde emildiğine dair daha önce bahsedilen gözlemlerle uyumludur [41]. Daha yakın zamanda, Kobayashi ve arkadaşları [42] Sprague-Dawley erkek sıçanlarında serbest ve esterleştirilmiş bitki sterollerinin kolesterol düşürücü aktivitesini yan yana karşılaştırmışlardır. Ticari bir yemle 1 hafta boyunca beslendikten sonra, bitki steroller içermeyen kolesterol, esterleşmemiş bitki steroller içeren kolesterol veya bitki sterol oleatları içeren test emülsiyonlarının uygulanması için mideye bir kateter yerleştirilmiştir. Radyoaktif olarak etiketlenmiş kolesterolün 24 lenfatik geri kazanımı, serbest bitki sterollerle beslenen sıçanlarda, uygulamadan 3 saat sonra kontrol veya bitki sterol oleatları alanlara göre önemli ölçüde daha düşük olmuştur. Bununla birlikte, farklı sterollerin yeme dahil edilmesinden sonra tekrarlandığında, önemli bir fark gözlenmemiştir. Kolesterol ve bitki sterol oleatlarının bir emülsiyon olarak mideye verilmesinin duodenumda bitki sterol oleatlarının hızlı bir şekilde birikmesine neden olduğunu öne sürmüşlerdir. Bağırsak lümeninde büyük miktarda ester bulunması, bitki sterol oleatlarının hidrolizinde bir gecikmeye neden olarak kolesterol emiliminde daha az etkili bir azalmaya neden olabilir. Diyete bitki sterol oleatlarının eklenmesi, bileşiklerin duodenumda aşırı birikmesine yol açmamıştır. Bu çalışmalar, ester bağının optimum şekilde parçalanmasının ve böylece misel faz için serbest sterollerin veya stanollerin serbest bırakılmasının önemini göstermektedir.





Şekil 2. Misellerin kolesterol emilimi sürecindeki önemli rolünün bir gösterimi.

Gıda kaynaklı yağların sindirimi midede gastrik lipaz tarafından başlatılır ve ince bağırsakta pankreatik lipaz ve kolesterol esteraz tarafından hidrolize edilen ham emülsiyonların oluşumuna yol açar. Kolesterolün yanı sıra bitki sterollerini ve stanollerinin de emilim gerçekleşmeden önce karışık misellere dahil edilmesi gerekir.

(A) Emülsifiye yağ damlacıklarının yüzeyinde safra asitleri ve pankreatik enzimlerin birleşik etkisi olarak karışık miseller oluşur. Serbest kolesterolü misel fazı yoluyla enterosite taşırlar. (B) Serbest bitki sterollerini/stanollerini gıda sindirimini emülsifiye yağında çözünmez ve ince bağırsağı kristal steroller olarak geçer. Başka bir deyişle, karışık misellere dahil olmak için kolesterol ile rekabet edemezler. (C) Bu nedenle, serbest bitki sterollerini/stanollerinin rekabet oluşmadan önce yağ fazında "biyolojik olarak kullanılabilir" hale getirilmesi gerekir. Bu, bir emülgatör kullanılarak gerçekleştirilebilir. (D) Bitki sterol/stanol esterlerinin tüketiminden sonra, esterler ince bağırsakta pankreatik kolesterol esteraz tarafından hidrolize edilir. Yine, serbest form, karışık misellere dahil olmak için kolesterol ile rekabet edecek ve böylece bağırsak kolesterol emilimini azaltacaktır. (E) Bitki sterollerini/stanollerinin çözünürlüğünü arttırmak için bir başka olasılık da lesitin ile misel çözeltilerinin oluşturulmasıdır. Yağ fazına girmek için önce diyet yağında çözünmesi ve daha sonra misel fazı ile dengelenmesi gereken esterleşmiş formun aksine, lesitin misellerinin kullanımı bitki bağırsak misel fazına doğrudan verilmesini sağlar.

Kısaltmalar: ABCG5/ABCG8: adenosin-trifosfat (ATP) bağlayıcı kaset G5 ve G8 taşıyıcı; CE: kolesterol esterleri; NPC1L1: Nieman-pick C1 benzeri 1.



Esteraz enzimlerinin in vivo etkinliği hakkında ne biliyoruz? Miettinen ve arkadaşları [43] 1 hafta boyunca bitki stanollerinin hidrolizini beslenen 11 kolektomili hastada 2 g/gün bitki stanollerinin hidrolizini ölçmüş ve kolesterolün %95'inin ve bitki sterollerinin/stanollerinin %90'ının serbest formda olduğunu gözlemlemiştir. Normen ve çalışma arkadaşları [44], 2,5 g/gün bitki sterolu veya stanol esterleri alan yedi ileostomili denek üzerinde bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bitki sterollerinin ve stanollerinin esterleşmiş formlarının oranı sırasıyla %12,6 ve %15,5 olmuştur. Bu durum, bitki sterollerinin/stanollerinin büyük bir kısmının ince bağırsakta hidrolize edildiğini göstermektedir. Aslında, esterlerin neredeyse %50'si alt duodenumda hidrolize olmaktadır. Kobayashi ve çalışma arkadaşlarının [42] bulguları, dilin seröz (von Ebner) bezlerinde bulunan lingual lipaz aktivitesi ve gastrik lipaz aktivitesi ile de açıklanabilir [45]. Bu lipazlar, diyetle eklendiğinde bitki sterol esterlerinin bir kısmını zaten hidrolize ediyor olabilir; test emülsiyonu intragastrik olarak verildiğinde bu etki daha az olabilir.

Serbest bitki sterollerini ve stanollerini en az esterleştirilmiş formlar kadar etkili olabilmelerine rağmen, yağlarda daha yüksek çözünürlükleri nedeniyle fonksiyonel gıdalara dahil edilmek üzere çoğunlukla bitki sterol/stanol esterleri kullanılmaktadır. Bununla birlikte, sterollerin ve stanollerin sadece serbest formu emülsifiye yağ fazına katılır ve bağırsak kolesterol emiliminde bir azalmaya neden olur. Bunun için optimum esteraz aktivitesi gereklidir (Şekil 2). Ne yazık ki, serbest ve esterleştirilmiş bitki sterollerini ve stanollerinin kolesterol düşürücü etkilerini karşılaştıran çok fazla insan çalışması bulunmamaktadır. Richelle ve meslektaşları [46] ardışık yedi gün boyunca 2,2 g serbest veya esterleştirilmiş bitki sterolu alan normokolesterolemik deneklerde kolesterol emiliminin azalmasında (\pm %60) önemli bir fark bulamamıştır. Gıdalara yalnızca sterollerin dahil edilmediği, serbest forma emülgatör olarak sorbitan tristearat eklendiği unutulmamalıdır (Şekil 2C). Emülgatör sayesinde serbest bitki sterollerini/stanollerini emülsifiye yağ fazı ile daha kolay etkileşime girerek esterleştirilmiş form kadar etkili olabilmiştir. Serbest sitostanol ile ilgili olarak, Ostlund ve arkadaşları [39] emülsifiye yağ fazına bölünmeyi kolaylaştırmak için başka bir prosedür tanımlamışlardır. Serbest sitostanol lesitin misellerinin bir parçası olarak uygulanmış ve bu da kolesterol emilimini çok etkili bir şekilde azaltmıştır (Şekil 2E). Lesitin misellerine dahil edildiğinde serbest sitostanolün etkili dozunun 100 ila 300 mg arasında olduğunu bildirmişlerdir. Daha sonraki çalışmalarda [47], lesitin miselleri içindeki 1,8-1,9 g/gün bitki stanollerinin LDL-K'yi aynı günlük alım miktarında bitki stanol esterleri için bildirilenle aynı ölçüde azalttığı bulunmuştur. Daha yeni bir çalışmada, Soderholm ve arkadaşları [48] bir çavdar ekmeğine dahil edilen serbest bitki sterollerinin serum LDL-K konsantrasyonlarını önemli ölçüde düşürdüğünü göstermiştir. Çavdar ekmeği 2 g/gün serbest bitki sterolu ile zenginleştirilmiştir. Hamura eklenmeden önce, yağ fazındaki biyoyararlanımı artırmak için bitki sterollerini mikronize edilmiştir.

Özetle, serbest steroller veya stanoller yağ fazında çözümleri kolaylaştırılmadan sağlanırsa, karışık misellere zayıf bir şekilde dahil olurlar ve sınırlı kolesterol düşürücü aktiviteye sahip olurlar (Şekil 2B). Serbest sterollerin ve stanollerin emülsifiye yağ fazına dahil edilmesi için çeşitli prosedürler sunulmuştur (Şekil 2C-E). Sonuçta, serbest formlar -sterol esterleri ve esterazlar tarafından parçalandıktan sonra stanol esterleri- karışık misellere dahil olmak için kolesterol ile rekabet edecek ve böylece bağırsak kolesterol emilimini azaltacaktır.

2.3 Hücresel çağ

Bağırsak lümenindeki karışık misellerden kolesterolün yer değiştirmesi, bağırsak kolesterol emiliminin bitki sterolu ve stanol ile indüklenen inhibisyonunun önemli bir mekanizması gibi görünse de, aktif olarak düzenlenen süreçleri içeren birkaç başka mekanizma da önerilmiştir. Fırça sınırı membranlarına kolesterol taşınmasının engellenmesi bir örnektir, ancak daha önceki ders kitaplarının çoğu bu alımın pasif difüzyonla gerçekleştiğini belirtmiştir. Ancak daha 1957 yılında Glover ve Green [49] fırça sınırının kolesterol için spesifik bir bağlanma bölgesi içerdiğini ve bunun da kolesterol alımının ana faktörü olarak pasif difüzyonu daha az olası hale getirdiğini yayınlamıştır. Benzer sonuçlar, düşük misel konsantrasyonlarında izole bir fırça sınırında kolesterol ve sitosterol için bağımsız bir bağlanma bölgesinin varlığını doğrulayan Ikeda ve [50] tarafından da bulunmuştur. Kolesterol bağlanması daha yüksek konsantrasyonlarda doygunluğa yaklaşırken sitosterol için bu durum gözlenememiştir [51]. Bu sonuçlara dayanarak, fırça sınırı membranındaki rekabetin bitki sterollerini ve stanollerini aracılı kolesterol düşürücü aktivite üzerinde neredeyse hiçbir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

Bitki sterollerini ve stanollerinin kolesterolün şilomikronlara dahil edilmesine müdahale ettiği de öne sürülmüştür. Bir şilomikrona dahil edilmeden önce serbest steroller ACAT-2 tarafından (yeniden) esterleştirilir. Yeni sentezlenen apoB-48 ve triasilgliserol (TAG), düz endoplazmatik retikulum membranında kolesterol esterleri ile birlikte birikir ve ardından MTP proteinine bağlı bir şilomikron oluşumu gerçekleşir [52]. İn vitro ve in vivo çalışmalar, mukozal ACAT'ın kolesterol emiliminde hız kontrol eden bir enzim olduğunu açıkça göstermiştir. Kam ve arkadaşları [53] emilim çalışmaları için sıklıkla kullanılan bir in vitro model olan kolorektal adenokarsinoma (Caco2) hücrelerini, ACAT'ın spesifik bir inhibitörü olan 58-035'in artan konsantrasyonları ile 1 saat boyunca inkübe etmiştir. İnhibitör, kolesterol ester sentezinde doza bağlı bir azalmaya neden olmuş ve 15 μ g/mL'de maksimum etkiye ulaşmıştır. 24 saatin ardından, bu Caco2 hücrelerinden izole edilen şilomikron ve çok LDL (VLDL) partiküllerinde ölçülebilir miktarda kolesterol ester kalmamıştır.



Bunu doğrular şekilde, Clark ve meslektaşları [54] jejunal mikrozomların 0,6 µg/mL 58-035 ile inkübe edilmesi durumunda ACAT aktivitesinin azaldığını gözlemlemişlerdir. İn vivo olarak, ACAT inhibisyonundan sonra Sprague-Dawley sıçanlarının mezenterik lenf fistülündeki kolesterol emilimini de araştırmışlar ve lenf, lenf şilomikronları ve lenf VLDL'deki kolesterol esterlerde azalma kaydederken, esterleşmemiş kolesterol miktarının arttığını gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlar ACAT'ın kolesterol emiliminde önemli bir düzenleyici rolü olduğunu desteklemektedir. Bitki sterollerinin, kolesterol emilimi sürecindeki son iki önemli adımdan ilki olan enterosit içindeki esterleşmeye müdahale ettiği öne sürülmüştür [28]. Bitki sterolleri ve stanoller ACAT-2 için zayıf substratlar olduğundan, mevcut bölgeleri bağlayabilir ve böylece rekabetçi inhibisyon yoluyla aktivitesini azaltabilirler (Şekil 1). Field ve meslektaşları [55] gerçekten de β-sitosterol ile beslendikten sonra tavşanlarda ACAT aktivitesinde bir düşüş gözlemlemiştir. Buna karşılık, chow diyeti uygulanan tavşanlardan bağırsak mikrozomları toplayıp bunları β-sitosterol ile zenginleştirdiklerinde, 4 saatlik ölçüm sırasında ACAT aktivitesi üzerinde herhangi bir etki gözlemleyememişlerdir. Ancak birkaç yıl sonra aynı grup, tek başına kolesterol veya kolesterol artı β-sitosterol içeren misellerle inkübe edilen Caco2 hücrelerindeki ACAT aktivitesinde farklılıklar olduğunu bildirmiştir [56]. Caco2 hücrelerine misel çözeltisi içinde kolesterol eklenmesi, plazma membranı kolesterolünden türetilen kolesterol esterlerin bazolateral salgılanmasını artırmıştır. Başka bir deyişle, misel kolesterol, kolesterolü plazma membranından endoplazmatik retikuluma kaydırır ve bu da şilomikron montajı ve salgılanması için kullanılır. Bununla birlikte, kolesterolle birlikte aynı miktarda β-sitosterol eklendiğinde, kolesterolün plazma membranından hareketi ve ardından kolesterol esterlerin salgılanması önemli ölçüde azalmıştır. Bu durum, kolesterolün β-sitosterol tarafından misellerden uzaklaştırılmasına bağlanabilir. ACAT aktivitesinin azalması, ACAT aktivitesi substrat tedariki ile düzenlenebileceğinden, kolesterolün plazma zarından endoplazmatik retikuluma taşınmasının azalması ile açıklanabilir [57]. Ayrıca, hücre içi kolesterol konsantrasyonundaki azalmaya rağmen sitosterol eklendiğinde HMG-CoA redüktaz aktivitesinin azaldığı yine Caco2 hücrelerinde gösterilmiştir [56]. Bu, HMG-CoA redüktazın kolesterol ve bitki sterolleri arasında ayrım yapamadığını ve bunun da hücre içi kolesterol havuzlarını daha da düşürdüğünü göstermektedir. Dolayısıyla, ACAT aktivitesi üzerindeki doğrudan etkiler, kolesterol emilimi üzerindeki bitki sterolu/stanol aracılı etkiler için olası bir açıklama değildir. Esterifikasyondan sonra, kolesterol esterler şilomikronlar halinde paketlenir; bu süreçte MTP çok önemli bir rol oynar. Yakın zamanda erkek Altın Suriye hamsterlarda sitosterolün kolesterol düşürücü aktivitesinin MTP'nin mRNA seviyesindeki düşüşle ilişkili olduğu gösterilmiştir [58]. Bu, bitki sterollerinin/stanollerinin de MTP ekspresyonu üzerinde bir etkiye sahip olabileceği ve bunun daha fazla aydınlatılması gerektiği anlamına gelir. Bu varsayım doğrultusunda, Rideout ve arkadaşları [59] yakın zamanda bitki sterolu ile beslenmenin C57BL/6J farelerinde bağırsak yağ emilimini azalttığını ve bunun da MTP üzerindeki etkileri içeren azalmış bir şilomikron oluşumuyla ilgili olabileceğini göstermiştir.

2.4 Taşıyıcı dönemi

Daha yakın zamanda, Davis ve arkadaşları [60] NPC1L1'in kolesterol ve bitki sterollerinin/stanollerinin bağırsaktan alımı ve emilimindeki önemli rolünü ortaya koymuşlardır. NPC1L1 eksikliği olan fareler, kolesterol emiliminde neredeyse %90'lık bir azalma ile karakterize edilmiştir. Ayrıca, bu farelerde serum kampesterol ve sitosterol konsantrasyonları da vahşi tip farelere kıyasla ±%90 oranında azalmıştır. Bu sonuçlar NPC1L1'in hem kolesterol hem de bitki sterollerinin alımında önemli bir rol oynadığını göstererek kolesterol ve bitki sterolu emiliminin sadece pasif difüzyona bağlı olmadığını ortaya koymuştur (Tablo 1 ve Şekil 1C). Annexin2/caveolin1 (ANXA2/CAV1) kompleksleri de bitki sterolu/stanol aracılı kolesterol düşürücü aktivitede rol oynayabilir. ANXA2, CAV1 ve kolesterol esterlerle bir lipid-protein kompleksi oluşturur ve bu da kolesterol esterlerinin kaveolalardan bağırsak fırça sınırının lipid sallarındaki iç membranlara içselleştirilmesi/endositik taşınmasında rol oynayabilir [61]. Smart ve arkadaşları [62] ANXA2'nin bitki sterolleri tarafından aşağı regüle edilebileceğini ve böylece kolesterol işleme ve taşınmasını azaltabileceğini göstermiştir. Ancak bu kompleksin kolesterol emilimi için önemi belirsizdir, çünkü Valasek ve arkadaşları [63] fraksiyonel kolesterol emiliminin ve fekal nötral sterol atılımının CAV1 nakavt farelerde ve vahşi tip benzer olduğunu göstermiştir. Kolesterol akışının yanı sıra, kolesterol ve bitki sterollerinin enterositlerden bağırsak lümenine aktif olarak salgılanması da söz konusudur. Bu süreçte, enterositlerin apikal membranında lokalize iki yarı taşıyıcı olan ABCG5 ve ABCG8 önemli bir rol oynar [64]. Birlikte bir heterodimer olarak işlev görürler ve serbest sterollerin enterositlerden çıkışına aracılık ederler [13]. Teorik olarak, artan ABCG5/ABCG8 aktivitesinin bir sonucu olarak, esterleşme ve şilomikronlara dahil olma için daha az sterol mevcut olacak ve bu nedenle bağırsak sterol emilimi azalacaktır. ABCG5/ABCG8 taşıyıcıları karaciğer X reseptörü (LXR) aracılığıyla düzenlenir ve kolesterol metabolizmasını etkilemek için LXR agonistlerini kullanmak, yani ters kolesterol taşıma (RCT) yollarını yükseltmek için çok sayıda girişimde bulunulmuştur. Ancak sistemik LXR aktivasyonu hepatik yağ asidi sentezinin artmasına [65] ve steatoza [66] neden olmaktadır. Bu nedenle, dokuya özgü yaklaşımlar başlatılmıştır. Nitekim Lo Sasso ve arkadaşları [67] yakın zamanda zarif bir dizi deneyde bağırsağa özgü LXR aktivasyonunun RCT'yi artırdığını ve bağırsak kolesterol emilimini düşürdüğünü göstermiştir. Beklendiği gibi, bağırsak ABCG5/ABCG8 ifadesi artmış ve fekal nötr sterol atılımı artmıştır. Şimdi sorulması gereken soru, bitki sterolleri ve stanollerinin enterositler içindeki bu önemli taşıyıcı proteinlerin ifadesini veya aktivitesini etkileyip etkilemediğidir.



Yamanashi ve [68] ince bağırsak epitel hücreleri için bir model olarak farklılaştırılmış Caco2 hücrelerini kullanarak NPC1L1'in rolünü incelemiştir. NPC1L1'i aşırı eksprese eden Caco2 hücrelerinde, sitosterol emilimi transfekte edilmiş hücrelere kıyasla daha yüksekti. Bununla birlikte, sitosterol emilimi kolesterol emilimine kıyasla önemli ölçüde düşük kalmıştır. Daha yakın zamanda, Zhang ve arkadaşları [69] kolesterolün NPC1L1 proteininin luminal N-terminal alanına (NTD) bağlandığını ve bu spesifik bağlanmanın kolesterolün bağırsak lümeninden enterositte alınması için gerekli olduğunu göstermiştir. Bitki sterollerini NPC1L1-NTD'ye bağlanamaz, bu da memelilerde seçici kolesterol emilimine katkıda bulunabilir. Dolayısıyla, bu hücre ve hayvan çalışmalarına dayanarak, NPC1L1'in bitki sterolu veya stanol alınmadan sonra kolesterol emiliminin azalmasında rol oynamadığı görülmektedir. Bu nedenle, ezetimibe diyetle bitki sterollerini veya stanollerini ile birleştirildiğinde ne olacağını bilmek ilginç olacaktır. Jakulj ve arkadaşları [70] 4 hafta boyunca 2 g/gün bitki sterollerini ile birlikte veya bunlar olmadan 10 mg/gün ezetimibe alan hafif hiperkolesterolemik deneklerde serum LDL-K konsantrasyonu üzerindeki etkileri incelemiştir. Bitki sterollerini ve ezetimibin kombine tedavisi, ezetimib monoterapisine kıyasla serum LDL-K konsantrasyonunu daha fazla azaltmamıştır, yani serum LDL-K azalmaları sırasıyla %25 ve %22 olmuştur. Bitki sterollerini ve ezetimibin aynı taşıyıcısı (bu durumda NPC1L1) hedeflediği iddia edilebilir. Alternatif olarak, ezetimibin NPC1L1'i bloke ettiği ve bunun da bitki sterollerinin enterositlere daha düşük bir hücre alımıyla sonuçlandığı varsayılabilir. İlerleyen bölümlerde belirtildiği gibi, bitki sterollerinin bağırsaktan kolesterol alımının azalmasına katkıda bulunan hücresel süreçleri aktive etmek için hücre içinde mevcut olması gerektiğine dair göstergeler vardır. Bu nedenle, bitki sterolu-ezetimibe kombinasyonunun ek bir etkisinin olmaması, ezetimibe aracılı NPC1L1 inhibisyonu nedeniyle hücre içi bitki sterolu konsantrasyonunun azalmasıyla açıklanabilir. Sebep ne olursa olsun, her ikisi de NPC1L1'in kendisinin bitki sterollerinin çalışma mekanizmalarında yer almadığına işaret etmektedir. Jakulj ve arkadaşlarının [70] bulgularının aksine, Lin ve arkadaşları [71] çok yakın zamanda ezetimibe bitki sterollerinin eklenmesinin kolesterol emilimini daha da azalttığını ve fekal kolesterol atılımını önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Bu sonuç yazarlar tarafından bitki sterollerinin bağırsak kolesterol emilimini düşürme mekanizmasının ezetimibden bağımsız olduğunun bir göstergesi olarak açıklanmıştır. Bununla birlikte, NPC1L1'in bitki sterollerinin/stanollerinin altında yatan mekanizmada rol oynayıp oynamadığını incelemek için daha spesifik olarak bu amaca yönelik tasarlanmış çalışmalara ihtiyaç vardır.

Ayrıca ABC taşıyıcısının ve (bağırsak) lipid metabolizmasında yer alan diğer LXR hedef genlerinin aktivitesindeki değişikliklerle ilgili olarak birkaç çalışma ele alınabilir. Oksisterol ile aktive olan reseptör LXR, aralarında NPC1L1 [72], ABCA1, ABCG5 ve ABCG8'in [73] bulunduğu bir dizi genin ifadesini düzenler. Yukarıda belirtildiği gibi, LXR aktivasyonu fekal nötral sterol kaybında artışa ve bağırsak sterol emiliminde azalmaya neden olur (Şekil 1C). LXR'nin -sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-2 (SREBP-2) ile uyumlu olarak- hücre içi kolesterol konsantrasyonlarındaki değişiklikleri tespit ettiği öne sürülmüştür.

Yüksek hücre içi kolesterol konsantrasyonları söz konusu olduğunda, LXR, hedef genlerinin ifadesi yoluyla hücresel kolesterolün daha fazla birikmesini önlemek için aktive edilir [74]. Bitki sterollerini ve stanollerinin de LXR'yi ya doğrudan ya da henüz bilinmeyen metabolitlere dönüştükten sonra dolaylı olarak aktive ettiği öne sürülmüştür. Gerçekten de, Plat ve arkadaşları [75] hücre içi ligand algılama deneyi (LiSA) kullanarak oksitlenmemiş bitki sterollerini ve stanollerinin LXR'nin güçlü aktivatörleri olduğunu göstermiştir. Ayrıca, Caco2 hücreleri bitki sterollerini ve stanollerle zenginleştirilmiş karışık misellerin varlığında kültürlendiğinde ABCA1 mRNA ifadesinde bir artış olduğunu göstermişlerdir. Ne yazık ki, bu Caco2 hücrelerinde her iki genin mRNA seviyesi tespit edilemediğinden, ABCG5 ve ABCG8'in ifade modelini ölçmek mümkün olmamıştır. Bununla birlikte, bitki sterollerinin/stanollerinin yalnızca enterositlerde etkili olan yerel LXR agonistleri olarak kabul edilebileceği tahmin edilebilir. Enterositlerdeki fizyolojik hücre içi bitki sterol konsantrasyonları gerçekten de LXR aktivasyonu için gerekli EC50 üzerindeki seviyelere ulaşabilir; bu durum bitki sterollerinin düşük emilimi nedeniyle hepatositlerde olası görünmemektedir. Bitki sterollerini ve stanollerinin sistemik olarak değil de lokal LXR agonistleri olarak hareket edebilmesi, sistemik LXR agonistlerinde gözlemlendiği gibi bitki stanollerini [76-78] ve sterollerinin TAG konsantrasyonlarını artırmak yerine serum TAG konsantrasyonlarını düşürdüğü yönündeki son gözlemlerle de uyumludur [65]. Sistemik LXR agonistleri hepatik lipogenezi indükler ve bu da serum TAG'larının yükselmesine neden olur. Ancak Plösch ve meslektaşları [64], bitki sterollerini ve stanollerinin LXR aktivasyonuna bağlı olarak bağırsak kolesterol emilimini azalttığını öne sürmüşlerdir. C57BL/6 farelerini 4 hafta boyunca sterol içermeyen, kolesterolle zenginleştirilmiş ya da kolesterol ve bitki sterollerini veya stanollerle zenginleştirilmiş bir diyetle beslemişlerdir. Diyetle bitki sterollerini veya stanollerin eklenmesi, fekal nötr sterol atılımında beklenen artışla sonuçlanmıştır. Ancak, bilinen LXR hedef genlerinin gen ekspresyon profilleri değişmemiştir. Ayrıca, Calpe-Berdiel ve arkadaşları [79] bitki sterollerini ile zenginleştirilmiş veya bitki sterollerini içermeyen batı tipi diyetle beslenen farelerde LXR hedef genlerinin bağırsak ekspresyonu üzerinde hiçbir etki gözlemlenmemiştir. Son olarak, bitki sterollerini ABCG5 nakavt farelerde bağırsak kolesterol emilimini azaltmada hala etkili olmuştur, bu da bu taşıyıcıların etki göstermek için zorunlu olmadığını göstermektedir [80]. ABC taşıyıcılarının rolüne ilişkin bu tutarsız sonuçlara rağmen, henüz bilinmeyen LXR hedef genlerinin aktivasyonu üzerinde bitki sterollerini ve stanollerinin olası bir rolünü hala dışlayamıyoruz. Bu nedenle, LXR'nin bağırsak kolesterol emilimi üzerinde bitki sterol/stanol kaynaklı etkilerin bir aracı olduğu fikrinin dışlanması için henüz çok erkendir.

2.5 Yeni keşifler çağı

Bitki sterollerinin/stanollerinin bağırsak kolesterol metabolizması üzerindeki etkilerine ilişkin en yeni ve muhtemelen en kışkırtıcı açıklama, transintestinal kolesterol atılımı (TICE) adı verilen süreçle ilgilidir. Yakın zamana kadar, hepatik ABCG5/ABCG8'in aracılık ettiği hepatobiliyer kolesterol salgılanması olan RCT yolunun, kolesterolün atılmasından sorumlu en önemli yol olduğu düşünülüyordu.



Bununla birlikte, farelerde biliyer kolesterol salgısının kesilmesinin fekal nötral sterol atılımı üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır [81, 82]. Bu bulgu, hepatobiliyer kolesterol salgısının bağırsak lümenine kolesterol atılımı için tek yol olmayabileceğini düşündürmüştür. Bu bağlamda, van der Velde ve arkadaşları [83] kolesterolün ince bağırsağın tüm uzunluğu boyunca salgılandığını, ancak en aktif olarak proksimal kısımda olduğunu göstermiştir. Safradan arındırılmış koşullar altında farelerde bağırsak perfüzyon çalışmaları yapmışlar ve intravenöz olarak enjekte edilen radyoaktif olarak etiketlenmiş kolesterolün bağırsak perfüzyonunda sonlandığını bildirmişlerdir. Kandan bağırsak lümenine doğrudan kolesterol akışı Brown ve Goldstein'in sonuçlarıyla da desteklenmektedir [84]. Hepatik ACAT-2'nin hedefli olarak silindiği farelerde fekal nötral sterol atılımında iki kat artış gözlemlenmiştir. Ancak bu artmış fekal sterol kaybı biliyer kolesterol sekresyonunda bir artış olmadan gerçekleşmiştir. Buna karşılık, safra kesesi safra sıvısındaki kolesterol konsantrasyonunda kontrollere kıyasla bir azalma eğilimi gözlenmiştir. Ayrıca, van der Velde ve meslektaşlarının [83] gözlemleri doğrultusunda, bağırsak kolesterol salgısının en çok ince bağırsağın proksimal kısmında belirgin olduğunu da göstermişlerdir. Tüm bu bulgular, kolesterolün dolaşımından bağırsak lümenine doğrudan taşınması gerektiğini göstermektedir. Transintestinal kolesterol atılımı (TICE) olarak adlandırılan bu yol, teorik olarak bitki sterollerini ve stanollerinin kolesterol düşürücü aktivitesi için de bir açıklama olabilir (Tablo 1 ve Şekil 1D). Bitki sterollerinin/stanollerinin de karışık misellere dahil olmak için TICE türevi kolesterol ile rekabet edebileceği ve böylece kolesterol emilimini azaltabileceği unutulmamalıdır. Ancak, bu etkinin büyüklüğü TICE türevi kolesterolün bağırsak lümenine girdiği yere bağlı olabilir. Karışık misel döneminde açıklanan mekanizmalara dayanarak, TICE türevi kolesterol bağırsak lümenine daha distalden girdikçe etkilerin azalması beklenir.

Yakın zamanda, Brufau ve [85] bitki sterollerinin ve stanollerin bu safra dışı yolla kolesterol atılımının uyarılmasında rol oynadığını göstermiştir. Yabani tip farelerin bitki sterolüyle zenginleştirilmiş bir diyetle beslenmesi, beklendiği gibi dışkıda nötr sterol atılımının artmasıyla sonuçlanırken, ABCG5 nakavt farelerde daha ılımlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca, nonbiliyer kolesterol atılımı bitkisel sterol grubunda altı kat, bitkisel sterollerle beslenen ABCG5 nakavt farelerde ise 3,5 kat artmıştır. Enterositten lümene kolesterol akışından sorumlu taşıyıcı proteinin -ve dolayısıyla TICE yolunun bir kısmının- şu anda bilinmediği belirtilmelidir. Bu sürece en azından kısmen ABCG5/ABCG8'in aracılık ettiğini düşünmek cazip olsa da, Brufau ve arkadaşları [85] TICE aktive edilirken bu taşıyıcının hem mRNA seviyesinde hem de protein ifadesinde beklenmedik bir düşüş bulmuştur. ABCG5/ABCG8'in TICE'daki rolüne ilişkin kanıtlar güçlü olmasa da, LXR'nin TICE'in düzenlenmesinde yer alan kilit oyuncularından biri olduğu düşünülmektedir. C57BL/6 farelerinin bir LXR agonisti olan T0901317 ile tedavi edilmesi TICE'da önemli bir artışa neden olmuştur [86].

Bitki sterollerini ve stanollerinin LXR için bir ligand görevi gördüğüne dair kanıtlar çelişkili olsa da (bkz. taşıyıcı dönemi), bu yeni yol bağırsak kolesterol metabolizması üzerindeki etkileri açıklamak için bağırsak LXR aktivasyonunun gerekli olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle, bitki sterol/stanol tüketimine yanıt olarak bağırsak LXR aktivasyonunun çok daha ayrıntılı bir şekilde incelenmesi ve özellikle şu anda bilinmeyen ve bu nedenle henüz analiz edilmemiş LXR hedef genlerinin araştırılmasına dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda, Sehayek ve arkadaşları [87] 2002 yılında ABCG5/ABCG8'den farklı olarak kromozom 2 ve 14 üzerindeki spesifik lokusların farelerde plazma bitki sterol konsantrasyonlarını düzenlediğini bildirmiştir.

Dikkat çekilmesi gereken bir gözlem de bitki sterolü tüketiminin farelerde nonbiliyer kolesterol atılımı üzerinde doz-yanıt etkisinin olmamasıdır. En düşük bitki sterolü takviyesi (%1) bile TICE'in maksimum düzeyde uyarılmasıyla sonuçlanmıştır [85]. Bu durum ancak bitki sterollerini ve stanollerinin sadece TICE'i aktive etmekle kalmayıp aynı zamanda fekal nötral sterol atılımını da arttırdığı ve bağırsak kolesterolünün emilimini azalttığı kabul edilerek açıklanabilir. Her iki sürecin kombinasyonu gözlemlenen net etkidir. Bu nedenle, gelecekteki çalışmalarda, yemek sonrası kolesterolün şilomikron fraksiyonundaki görünümünü ölçmek ve aynı zamanda TICE'deki değişiklikleri ölçmek, fekal nötr sterol kaybındaki artışın hangi kısmının TICE'deki artıştan ve kolesterolün kilomikronlara dahil edilmesindeki azalmadan kaynaklandığını belirlemek zorlu bir görev olacaktır. Şimdiye kadar, insanlarda TICE'in katkısı tanımlanmamıştır. Bununla birlikte, TICE sürecinin daha iyi anlaşılması ve TICE'i aktive etme olanaklarının araştırılması, KVH'lerin önlenmesi ve hatta tedavisi açısından cazip bir yaklaşım gibi görünmektedir.

Yukarıdaki genel bakış göz önüne alındığında, bağırsak kolesterolünün bozulmuş misel çözünürlüğünün, bitki sterollerinin/stanollerinin kesin olarak belirlenmiş tek etkisi olduğu sonucuna varıyoruz. Hücresel ve taşıyıcı olarak adlandırılan dönemler birçok ilginç gözlem sağlamıştır, ancak sonuçlar tutarlı değildir. Bununla birlikte, ne karışık misel döneminin ne de hücresel veya taşıyıcı dönemlerin tüm gözlemleri tam olarak açıklayamadığı gerçeği, bitki sterollerinin/stanollerinin kolesterol düşürücü aktivitesinin arkasındaki kesin moleküler mekanizmaların muhtemelen birden fazla sürecin karmaşık bir etkileşimi olduğunu göstermektedir.

2.6 Klinik fayda

Serum LDL-K düşürücü etkilerin altında yatan mekanizmadan bağımsız olarak, sıklıkla gündeme getirilen önemli bir konu da "kardiyovasküler risk açısından bitki sterolü veya stanol tüketiminden fayda sağladığımızı dair kanıtlar nelerdir?" sorusudur. Çeşitli gözlemler, bitki sterollerini ve stanollerinin sadece serum LDL-K konsantrasyonlarını düşürmekle kalmayıp, aynı zamanda endotel disfonksiyonunu da iyileştirdiğini göstermektedir [88, 89]. Şimdiye kadar, bitki sterollerini ve stanollerinin bu etkileri doğrudan mı yoksa dolaylı bir mi gösterdiği bilinmemektedir. Doğrudan etkiler, bitki sterollerinin/stanollerinin kendilerinin damar duvarı üzerinde işlevsel bir etkisi olduğunu varsaymaktadır. Bu yol için neredeyse hiç kanıt yoktur. Dolaylı etkiler, KVH riskindeki azalmanın LDL-K üzerindeki etkilerle açıklandığı anlamına gelmektedir.



Hayvanlarda, diyet müdahalelerinin lezyon gelişimini etkileyip etkilemediğini değerlendirmek kolaydır, bu elbette insanlarda daha zordur. Bununla birlikte, endotel disfonksiyonu ateroskleroz gelişiminde erken ancak geri döndürülebilir bir aşamanın yansımaları ve endotel disfonksiyonunun varlığı KVH'nin klinik öncesi bir belirteci olarak kabul edilmektedir [90]. Burada, uygun hayvan modellerinde ve insanlarda bitki sterollerinin/stanollerinin endotel fonksiyonu ve/veya olası aterosklerotik lezyon özellikleri üzerindeki etkilerini değerlendiren kontrollü müdahale çalışmaları kısa bir genel bakış sunacağız.

Ntanios ve arkadaşları [91] 24 erkek Yeni Zelanda Beyaz tavşanı kolesterol zengini bir diyetle veya %0,01 (a/a) bitki stanollerini içeren soya fasulyesinden, %0,2 (a/a) bitki stanollerini içeren tall yağından veya %0,8 (a/a) bitki stanollerini içeren tall yağından elde edilen üç %1 (a/a) bitki sterol karışımından biriyle kolesterolle beslemiştir. 0,8 (a/a) bitki stanollerini ile beslenen tavşanlarda, serum total kolesterol, LDL-K ve VLDL kolesterol (VLDL-K) konsantrasyonları kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %49, %37 ve %63 oranında azalmıştır. Ayrıca, çıkan aort ve koroner arterlerdeki lezyon gelişimleri kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. Plak oluşumunda %0,01 ve %0,2 (a/a) bitki stanolu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bitki stanollerinin lezyon oluşumunu gerçekten de azaltabileceği gözlemi, Plat ve arkadaşlarının [92] serum bitki sterolu ve stanol konsantrasyonlarındaki zit değişikliklere rağmen bitki sterolu veya stanol tüketiminin heterozigot LDL reseptörü⁺ farelerinde aterosklerotik lezyon gelişimini aynı ölçüde azalttığını gösteren bir çalışmasıyla uyumludur. Bu bulgular, serum bitki sterollerini veya stanollerindeki değişikliklerin bu farelerde plak gelişimine doğrudan katkıda bulunmadığını göstermektedir. Volger ve arkadaşları [93] serum kolesterol konsantrasyonundaki azalma ile aterosklerotik lezyonlar arasındaki ilişkiyi de değerlendirmiştir. ApoE*3-Leiden transgenik fareleri 38 hafta boyunca bir kontrol diyeti veya bitki stanol esterleri ile zenginleştirilmiş aynı diyetle beslemiştir. Bitki stanol esterlerinin kolesterol düşürücü aktivitesi VLDL ve orta yoğunluklu lipoprotein fraksiyonlarında LDL fraksiyonuna kıyasla daha belirgin olmuştur (sırasıyla %70, 77 ve 20 azalma). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, bitki stanol esterleri ile beslenme aterosklerotik lezyon alanını ve şiddetini önemli ölçüde azaltmıştır. Kontrol fareleri düzenli intimal yağ çizgileri/hafif plaklarla karakterize tip 2-3 lezyonlar gösterirken, bitki stanol esterleri alan fareler ağırlıklı olarak tek tek köpük hücrelerinden oluşan tip 1 lezyonlara sahipti. Buna karşın, Weingartner ve arkadaşları [94] bitki sterol esterlerinin uygulanmasının plazma kolesterol konsantrasyonlarından bağımsız olarak olumsuz bir vasküler etkiye olduğunu öne sürmüştür. C57BL/6 vahşi tip fareleri 4 hafta boyunca %2 (a/a) bitki sterol esterleri ile zenginleştirilmiş normal bir chow ile beslemiştir. Bu farelerde, normal chow yiyen yabani tip farelere kıyasla endotele bağlı vazorelaksasyonda bozulma gelişmiştir.

Kontrol grubuna kıyasla 4 hafta boyunca normal chow ve %2 (a/a) bitki sterol esterleri ile tedavi edilen vahşi tip SV/129 farelerde serebral iskemi sonrası önemli ölçüde daha büyük lezyon boyutu gözlenmiştir. Son olarak, Weingartner ve arkadaşları da ApoE^{-/-} farelerini lipid kaynaklı aterogenez modeli olarak kullanmıştır. Fareler 6 ay boyunca %2 (a/a) bitki sterol esterleri, %0,005 (a/a) ezetimibe, her ikisinin bir kombinasyonu ile zenginleştirilmiş veya herhangi bir takviye olmadan Batı tipi diyet veya normal chow ile beslenmiştir. Aterosklerotik plak oluşumunda azalma en belirgin şekilde ezetimibe ile tedavi edilen farelerde görülmüş ve bitki sterol esterleri ile beslenen farelere kıyasla önemli ölçüde daha fazla olmuştur. Ezetimibe ve bitki sterol esterleri ile tedavi edilen fareler, tek başına ezetimibe ile tedavi edilen farelere kıyasla daha büyük lezyon oluşumuna doğru bir eğilim göstermiştir. Serum kolesterol konsantrasyonundaki eşit azalmaya rağmen, bitki sterol esterleri tüketimi ezetimibe kıyasla iki kat daha fazla plak oluşumuyla ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, bitki sterollerinin farelerde aterogenez üzerindeki potansiyel olumsuz etkisini doğrulamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca, hayvan çalışmalarındaki bitki sterol esterleri takviyesi miktarının, günlük miligram çarpy kilogram vücut ağırlığı olarak hesaplandığında, insan çalışmalarında kullanılan margarine dahil edilen miktardan yaklaşık 100 kat daha fazla olduğu da dikkate alınmalıdır.

İnsanlarda endotel fonksiyonunu ölçmek için en sık kullanılan vekil belirteçlerden biri akım aracılı vazodilatasyondur (FMD) [90]. Celermajer ve arkadaşları [95] FMD'nin gelecekteki kardiyovasküler risk için değerli bir belirteç olduğunu açıkça göstermiştir. Bitki sterolu veya stanol tüketiminin endotelial fonksiyon üzerindeki etkilerini araştıran sadece birkaç çalışma bulunmaktadır. De Jongh ve arkadaşları [96] heterozigot ailesel hiperkolesterolemik çocuklarda bitki sterollerinin endotel disfonksiyonu üzerindeki kısa vadeli etkisini değerlendirmiştir. Yaşları 5 ila 12 arasında değişen 41 çocuğa 4 hafta boyunca günde 2,3 g bitki sterolu verilmiştir. Beklendiği gibi, bitki sterollerinin uygulanması serum LDL-K konsantrasyonlarında %14'lük bir düşüşle sonuçlanmıştır. Ancak bunun, bozulmuş FMD'de bir iyileşme ile ilişkisi olmamıştır. Hallikainen ve arkadaşları [97] da 10 hafta boyunca günlük 2 g bitki sterolu veya stanol esterleri alımının 76 hiperkolesterolemik yetişkinde FMD ile ölçülen endotel fonksiyonu üzerinde hiçbir etkisi olmadığını, ancak serum LDL-K konsantrasyonlarının kontrollere kıyasla %9-12 oranında azaldığını göstermiştir. Ayrıca Jakulj ve arkadaşları [98] 7-12 yaş arası 42 heterozigot AH¹li çocukta bitki stanollerinin (4 hafta boyunca 2 g/gün) FMD üzerindeki etkisini değerlendirmiştir. Serum total kolesterol ve LDL-K konsantrasyonları sırasıyla %7,5 ve %9,2 oranında azalmış ve yine endotel fonksiyonunda iyileşme gözlenmemiştir. Son olarak, Raitakari ve arkadaşları [99] bitki stanol esterlerinin endotel fonksiyonu ve arteriyel elastikiyet üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. 150 hiperkolesterolemik yetişkin 3 ay boyunca 2 g/gün bitki stanol esterleri almıştır. Tedavi edilen ve kontrol grubu arasında LDL-K konsantrasyonunda %9,3'lük önemli bir azalma olmasına rağmen, FMD veya karotid arter uyumunda yine önemli bir değişiklik gözlemlenmemişlerdir. Bununla birlikte, bir alt grup analizi, bu parametreler için ortalama başlangıç değerlerinin altında olan deneklerde arteriyel esnekliğin ve endotelial fonksiyonun iyileştiğini göstermiştir.



Bu, statin tedavisi gören hastalarda bitki sterolü veya stanol esterlerinin vasküler fonksiyon üzerindeki uzun vadeli etkisini (85 hafta) değerlendiren De Jong ve arkadaşlarının [100] gözlemiyle uyumludur. Popülasyonun tamamında herhangi bir etki gözlenmemiştir, ancak kardiyovasküler olay riski taşıyan bir alt grup hastada endotel disfonksiyonu ve arteriyel sertlik iyileşmiştir [99]. Bu durum, bitki sterollerini ve stanollerinin damar durumu optimal olmayan kişilerde vasküler fonksiyonu iyileştirebileceğini [100] ve muhtemelen daha da önemlisi koruyucu etkileri görmek için uzun bir takip süresine ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Bu gözlemler büyük önem taşımakla birlikte, kardiyovasküler olayların gerçekten azaldığını kanıtlanamamaktadır. Bunun için, gelecekte özellikle bu amaç için tasarlanmış çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

2.7 Klinik fayda ile ilişkili mekanizmalar

Bağırsak kolesterol emiliminin azaltılması ve/veya TICE'ın uyarılması, her ikisi de fekal nötr sterol atılımının artmasına neden olan bu iki süreç, şu anda bitki sterollerinin ve stanollerin LDL-K düşürücü aktivitesini açıklayan iki paradigmadır. Açıklanan tüm gözlemlere dayanarak, en azından hayvanlarda her iki mekanizmanın da etkili olması muhtemel görünmektedir.

Bu bağlamda, uzun vadeli klinik yararın, iyi bilinen LDL-K düşürücü etkilerin altında yatan yollara bağlı olup olmayacağı önemli bir sorudur. Bitki sterolü/stanol tedavisinin hedefi bağırsak kolesterol emilimini azaltmaktır, vücut içindeki kolesterol konsantrasyonu azalırken, dışkıda daha fazla kolesterol fekal nötr steroller olarak atılacaktır. Öte yandan, ana mekanizma TICE'ı uyarmaksa, ki bu da fekal nötr sterol atılımının artmasıyla sonuçlanacaktır, muhtemelen daha fazla kolesterol doğrudan damar duvarından bağırsak lümenine ve dışkıya salgılanacaktır. Kolesterolün vücutta yeniden karıştığı bu ikinci yolun en umut verici uzun vadeli klinik sonucun elde edilmesi açısından tercih edilebilir olduğu düşünülebilir. Bununla birlikte, bağırsaktan kolesterol emiliminin azaltılmasının damar duvarına ulaşan mevcut kolesterol miktarını azalttığı da iddia edilebilir. Lezyon oluşumunu engellemede en büyük net etkiye sahip olan sürecin etkinleştirilmesi halen değerlendirilmektedir. Bu sonuç, uzun vadeli klinik faydaları öngörebilmek için bitki sterollerinin/stanollerinin ve diğer gıda bileşenlerinin kolesterol düşürücü aktivitesinin altında yatan mekanizmaları daha iyi anlamının son derece önemli olduğunu göstermektedir.

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

3 Kaynaklar

[1]



REVIEW

Effects of plant sterols and stanols on intestinal cholesterol metabolism: Suggested mechanisms from past to present

Els De Smet, Ronald P. Mensink and Jogchum Plat

Department of Human Biology, School for Nutrition, Toxicology and Metabolism, Maastricht University, Maastricht, The Netherlands

Plant sterols and stanols are natural food ingredients found in plants. It was already shown in 1950 that they lower serum low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) concentrations. Meta-analysis has reported that a daily intake of 2.5 g plant sterols/stanols reduced serum LDL-C concentrations up to 10%. Despite many studies, the underlying mechanism remains to be elucidated. Therefore, the proposed mechanisms that have been presented over the past decades will be described and discussed in the context of the current knowledge. In the early days, it was suggested that plant sterols/stanols compete with intestinal cholesterol for incorporation into mixed micelles as well as into chylomicrons. Next, the focus shifted toward cellular processes. In particular, a role for sterol transporters localized in the membranes of enterocytes was suggested. All these processes ultimately lowered intestinal cholesterol absorption. More recently, the existence of a direct secretion of cholesterol from the circulation into the intestinal lumen was described. First results in animal studies suggested that plant sterols/stanols activate this pathway, which also explains the increased fecal neutral sterol content and as such could explain the cholesterol-lowering activity of plant sterols/stanols.

Received: October 27, 2011

Revised: February 27, 2012

Accepted: April 3, 2012

Keywords:

Cholesterol / Mechanism of action / Mixed micelles / Plant stanols / Plant sterols

1 Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of morbidity and mortality worldwide. It is well established that

lifestyle—and particularly our diet—plays an important role in the prevention and treatment of CVD [1]. A major target for dietary interventions is reducing the increased serum low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) concentrations [2].

A meta-analysis summarizing the results of 26 clinical trials of cholesterol-lowering agents clearly showed a risk reduction of nonfatal occlusive vascular events by about one-fifth for each 1 mmol/L reduction in serum LDL-C concentration 1 year after randomization. More specifically, a serum LDL-C reduction of 1, 2, or 3 mmol/L lowered the risk by 22, 40, and 50%, respectively [4]. Despite these impressive risk reductions, there is still an ongoing discussion whether these effects are causally related to the reduction in LDL-C concentrations. It is even questioned whether the cardioprotective effects of statins are causally related to their serum LDL-C lowering effects or rather to their pleiotropic effects, such as improving endothelial function, increasing vascular nitric oxide bioavailability, and reducing oxidative stress [5]. In this respect, LaRosa [6] clearly showed that it is not important how LDL-C is lowered. Combining the results of all the currently available intervention studies showed that lowering serum LDL-C to decrease the risk for a nonfatal

Correspondence: Dr. Jogchum Plat, Department of Human Biology, School for Nutrition, Toxicology and Metabolism (NUTRIM), Maastricht University, PO Box 616, NL-6200 MD Maastricht, The Netherlands

E-mail: J.Plat@maastrichtuniversity.nl

Fax: +31-433670976

Abbreviations: **ABCA1**, ATP-binding cassette transporter A1; **ABCG5**, ATP-binding cassette transporter G5; **ABCG8**, ATP-binding cassette transporter G8; **ACAT-2**, acylcoenzyme A cholesterol acyltransferase-2; **ANXA2**, annexin2; **Caco2**, colorectal adenocarcinoma; **CAV1**, caveolin1; **CVD**, cardiovascular disease; **FMD**, flow-mediated vasodilatation; **HMG-CoA**, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzyme A; **LiSA**, ligand sensing assay; **LXR**, liver X receptor; **MTP**, microsomal triglyceride transfer protein; **NPC1L1**, Niemann-Pick C1 like 1 protein; **NTD**, N-terminal domain; **Ox-LDL**, oxidized LDL; **RCT**, reverse cholesterol transport; **SREBP2**, sterol response element binding protein 2; **TAG**, triacylglycerol; **TICE**, transintestinal cholesterol excretion



myocardial infarct and coronary heart disease death by diet is as valuable as lowering serum LDL-C by, for example, statins and 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors.

Foods enriched with fatty acid esters of plant sterols or stanols, i.e. plant sterol or stanol esters are well known for their serum LDL-C lowering effect [7, 8], which is not transient, as shown in an 85-week intervention study [9]. The effectiveness of these compounds is further supported by the fact that they are nowadays incorporated into national and international guidelines such as the National Cholesterol Education Program guidelines. These guidelines encourage a daily incorporation of 2 g plant sterols or stanols into a healthy diet low in saturated fatty acids to reduce CVD risk for subjects with elevated LDL-C concentrations. In this case, addition of plant sterols and stanols can lower serum LDL-C concentrations up to 10% [2].

Plant sterols and stanols are components that are naturally present in plants. Like cholesterol, they exist mainly in a free and an esterified form. When incorporated as functional food ingredient, plant sterols and stanols are frequently esterified with a fatty acid ester to increase the solubility in the food matrix [10]. The rate of absorption of cholesterol and plant sterols/stanols is very different. About 40–60% of cholesterol is absorbed, whereas plant sterols/stanols are absorbed for 15% or less, depending on the specific isoform [11–13].

Four meta-analyses have shown significant reductions in LDL-C concentrations after consumption of foods enriched with plant sterol or stanol esters [7, 14–16]. In contrast with these four nonlinear dose–response curves, Mensink et al. [17] found a clear linear relationship between plant stanol intake and reductions in LDL-C up to 9 g/day. Compared with the control group, the reductions in serum LDL-C concentrations after a daily consumption of 3, 6, and 9 g were 7.5, 12, and 17.4%, respectively. Comparable findings were reported by Gylling and colleagues [18], in which a 17.4% reduction in serum LDL-C was found after a daily consumption of 8.8 g plant stanols provided as their fatty acid esters for a period of 10 weeks. In this respect, the most recent meta-analysis from Musa-Veloso et al. [8] suggested that consumption of plant stanols above the currently recommended 2 g/day is associated with an additional and dose-dependent reduction in serum LDL-C concentration. They included 113 publications and one unpublished study report and found that the maximal reduction in LDL-C was 16.4% after plant stanols and 8.3% after plant sterols consumption at daily doses ranging from 0.8 to 8.8 g and 0.19 to 9 g, respectively. Remarkably, there are no studies comparing the LDL-C lowering activity of high doses (>4 g/day) of plant stanols and sterols head-to-head. However, such a clinical trial is needed to further explore the efficacy and possible differences between plant sterols and stanols at higher intakes.

Although the LDL-C lowering effect of food enriched with plant sterol and stanol esters is sustained and widely accepted, the discussion whether the type of food (food matrix) influences its efficacy is still ongoing [7, 16]. Besides the type of

food carrier used, the frequency of intake seems to be important as well [7, 19]. Furthermore, Abumweis et al. [16] concluded that the time of intake is also crucial, since consumption before or with breakfast only failed to reduce serum LDL-C, while the expected serum LDL-C lowering effect was observed when plant sterols were consumed together with a main meal being either lunch or dinner.

To better understand all these discrepancies between the individual studies, understanding the effects of plant sterol/stanol esters on (intestinal) cholesterol metabolism is essential. Therefore, the main objective of this review is to focus on past and recent findings, and on assumptions and more or less accepted explanations of the mechanisms underlying the plant sterol/stanol ester induced serum LDL-C lowering effect. For this, we will provide an historical overview of these compounds, starting in the 1950s until now. Based on these findings, we will try to conclude whether we can predict their use to reduce atherosclerotic lesion formation.

2 Suggested mechanisms over the years

Inhibition of intestinal cholesterol absorption is an interesting target to lower concentrations of LDL and other apoB100 containing lipoprotein fractions. Cholesterol absorption is a multistep process, in which the most important steps are (1) cleavage of (dietary) sterol/stanol esters into free sterols/stanols in the intestinal lumen, (2) the solubilization of unesterified cholesterol into the emulsified fat phase and the mixed micelles in the lumen, (3) the transport of cholesterol through mucosal barriers such as the unstirred water layer and the brush border membrane. After (4) uptake and (5) (re)esterification by acylcoenzyme A cholesterol acyltransferase-2 (ACAT-2) inside the enterocyte, cholesterol is (6) incorporated into chylomicrons by involvement of the microsomal triglyceride transfer protein (MTP), and (7) released into the lymph. Over the years, almost every single step has been discussed for its potential involvement in lowering intestinal cholesterol absorption via plant sterol or stanol ester consumption. We will now recapitulate the chronology of the different paradigms in explaining the reduction in intestinal cholesterol absorption by plant sterol and stanol esters.

2.1 The early days

The very first studies, mentioning a role for plant sterols in the regulation of serum cholesterol concentrations, were published by Peterson et al. in 1951. Chickens were fed a diet containing 0.5–1% soybean sterols, 0.5–1% cholesterol, or a mixture of both compounds. Significant reductions in hepatic and plasma cholesterol concentrations were found in chickens fed a diet supplemented with the soybean sterols [20]. In the following studies [21], again in chickens, the effects of plant sterols on atherosclerotic lesion formation were evaluated. The extent and severity of the lesions decreased after administration of soybean sterols in cholesterol-fed



Table 1. An overview of the mechanisms contributing to the cholesterol-lowering activity of plant sterols/stanols from past to present

Era	Target	Proposed mechanism
The early days: the 1950s	Intestinal cholesterol absorption	No suggested mechanism
The mixed micelle era: the 1960s	Intestinal cholesterol absorption	Competition for incorporation into mixed micelles
The cellular era: the 1960s and 1970s	Intestinal cholesterol absorption	Competition for incorporation into chylomicrons
The transporter era: >2000	Intestinal cholesterol absorption	Transporters: NPC1L1-ABCG5/ABCG8-ABCA1
The era of new discoveries: >2006	Cholesterol excretion	Activation of LXR target genes TICE

chickens. The observation that soybean sterols lowered the serum cholesterol concentration was confirmed in other species by Pollak and co-workers. For this, rabbits were fed a diet with cholesterol, sitosterol, or a mixture of both in different proportions. Clear inhibition of hypercholesterolemia and prevention of atherosclerosis was achieved by feeding the proper amount of plant sterols. In rabbits, sixfold excess of sitosterol over cholesterol was needed, whereas threefold excess was effective in chickens [21, 22]. Already in these early days, the hypocholesterolemic effect of plant sterols was confirmed in patients [23]. However, the underlying mechanism was completely unknown, but was thought to be related to effects on intestinal cholesterol absorption (Table 1 and Fig. 1A) [22, 23].

2.2 The mixed micelle era

Intestinal luminal cholesterol consists of two distinct pools derived from, respectively, endogenous and exogenous cholesterol. The contribution of these two pools to the amounts of cholesterol available for uptake and consequent appearance in serum is not equal. Sklan et al. [24] showed in chickens that endogenous cholesterol is more rapidly and more completely absorbed as compared to exogenous cholesterol. When chickens were fed a cholesterol-free, low-fat diet, the duodenum and the upper part of the jejunum are the main sites of cholesterol absorption. Addition of cholesterol into the diet resulted in a distal shift of the predominant site of cholesterol absorption toward the jejunum. Moreover, this shift was accompanied by an increased secretion of endogenous cholesterol as well as bile acids into the duodenum [25]. In contrast to endogenous cholesterol, which is mainly secreted through the bile already in micelles, dietary cholesterol must first be cleaved by specific esterases. Dietary cholesterol is predominantly present in its esterified form and only free cholesterol is incorporated into the mixed micelles to become available for absorption [24]. Altogether, these findings may contribute to the preferential absorption of endogenous over exogenous cholesterol.

The question is how plant sterol and stanol esters interfere with intestinal cholesterol uptake and whether there is a difference between the effects of plant sterols and stanols

on endogenous and exogenous cholesterol absorption. As cholesterol and plant sterols/stanols are practically water insoluble, they have to be solubilized into micelles before absorption can occur. However, the capacity of micelles to solubilize lipophilic water-insoluble molecules is limited. During the 1960s of the previous century [26], it became more or less generally accepted that plant sterols and stanols competed with dietary cholesterol for incorporation into mixed micelles (Fig. 1B). As plant sterols/stanols are more hydrophobic than cholesterol, it was speculated that they displaced cholesterol from the mixed micelles [27] or in other words, plant sterols/stanols lowered the solubility of cholesterol within the mixed micelles [28, 29]. More into detail, Armstrong and Carey et al. [30] have suggested that noncholesterol sterols are less easily dissociated from mixed micelles, thereby limiting the micellar solubilization of cholesterol. This could be explained by the increased hydrophobicity of plant sterols/stanols compared with cholesterol, resulting in a lower solubility but a higher affinity for micelles. This micelle concept was elegantly shown by Ikeda et al. [27]. In that study, rats were fed a diet containing 0.5% cholesterol alone or 0.5% cholesterol plus an equal amount of sitosterol or sitostanol for 10 days, directly followed by analysis of the composition of the intestinal aqueous micellar phase. Compared with rats fed cholesterol alone, the solubility of cholesterol in the aqueous micellar phase was 24% lower for the rats fed cholesterol plus sitosterol and 53% for those fed cholesterol plus sitostanol. The difference between sitosterol and sitostanol was not statistically significant. There was also no difference between sitosterol and sitostanol in the *in vitro* experiments. Following experiments—still focusing on micellar composition—tried to unravel whether plant sterols and stanols were equally effective or not. It was found that the recovery of sitostanol in the feces was almost complete, whereas the recovery of sitosterol ranged between 85 and 92% [31]. In agreement, Hassan and Rampone [32] showed that only 2% of sitostanol was found in the lymph of Sprague-Dawley rats compared with 36% for cholesterol, reflecting the poor absorption of sitostanol. They proposed an inverse relationship between the intestinal absorption of plant sterols/stanols and their ability to inhibit cholesterol absorption. To explain the potentially higher efficacy of plant stanols on cholesterol absorption, Heinemann and colleagues [33] suggested that hydrogenation enhanced the hydrophobicity, resulting in a higher affinity for binding



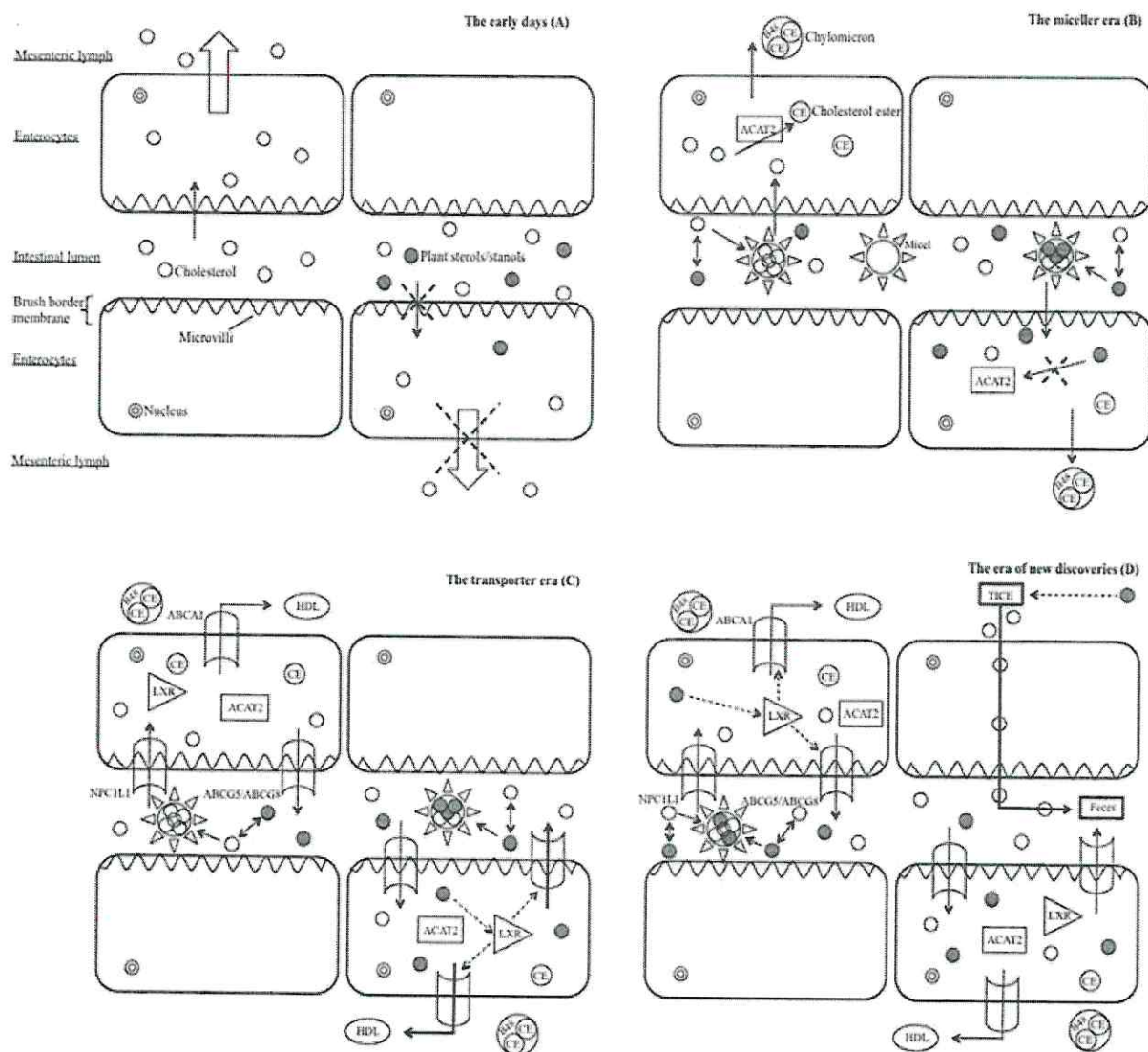


Figure 1. An overview of the paradigms explaining the cholesterol-lowering activity of plant sterols and stanols over the past decades. (A) *The era of the observation:* cholesterol, plant sterols, and stanols are taken up into the enterocyte. It was already suggested in 1951 that plant sterols suppress intestinal cholesterol absorption, resulting in decreased serum cholesterol concentrations. (B) *The micellar era:* there is a competition between cholesterol and the plant sterols/stanols for incorporation into mixed micelles, which is a crucial step for cholesterol absorption. If plant sterols/stanols replace micellar cholesterol, less cholesterol will be taken up into the enterocyte. After uptake, cholesterol is normally esterified by intestinal ACAT-2. The so-formed cholesteryl esters are incorporated into chylomicrons and secreted into the lymph. In contrast, plant sterols/stanols are poor substrates for ACAT-2 and remain in their free form inside the enterocyte. (C) *The transporter era:* different sterol transporters such as ABCG5/ABCG8 and NPC1L1 and their regulatory mechanisms are discovered. It is questioned whether plant sterols and stanols interact with intracellular cholesterol sensors such as LXR, leading to an increased expression of ABCG5/ABCG8 and ABCA1. The latter transports sterols to a nascent HDL particle, whereas ABCG5/ABCG8 promotes the efflux of sterols back into the intestinal lumen, resulting in decreased cholesterol absorption. At the same time, possible regulation of NPC1L1 by plant sterols/stanols is proposed. (D) *The era of new discoveries:* recently, transintestinal cholesterol excretion (TICE) has been suggested as a possible target for the plant sterol/stanol mediated cholesterol-lowering effect. Stimulation of TICE increases fecal neutral sterol loss. However, further research is needed to explore the effects of the plant sterols/stanols on the intestinal cholesterol absorption into more detail. For example, the transporters responsible for basolateral and apical cholesterol secretion need to be identified. It is also debated whether TICE alone or possibly together with other mechanisms described in panels B and C explain the full cholesterol lowering effect of plant sterols and stanols.

Abbreviations: ABCA1: adenosine triphosphate (ATP) binding cassette A1 transporter; ABCG5/ABCG8: ATP-binding cassette G5 and G8 transporter; ACAT-2: acylcoenzyme A cholesterol acyltransferase 2; CE: cholesteryl esters; CM: chylomicron; HDL: high-density lipoprotein; LXR: liver X receptor; NPC1L1: Nieman-pick C1 like 1; TICE: transintestinal cholesterol excretion.



to cholic acid micelles, and as a consequence a more effective displacement of cholesterol from the micelles and a more pronounced reduction in the cholesterol absorption. In their *in vivo* studies, they compared the intestinal cholesterol absorption in humans after infusion of a high dose of sitosterol or sitostanol dissolved in monooleate. Sitosterol significantly reduced the intestinal cholesterol absorption by almost 50%, and sitostanol by almost 85%. Thus, there is a vast majority of evidence showing that plant sterols and stanols lower the incorporation of cholesterol in mixed micelles and as such the amount of cholesterol available for absorption (Table 1 and Fig. 2B–2E).

This proposed mechanism—i.e. interfering with micellar cholesterol incorporation—suggests that plant sterols and stanols have to be consumed simultaneously with dietary cholesterol to achieve a maximal cholesterol lowering effect. However, in 2000, Plat and colleagues [19] showed that a daily consumption of 2.5 g plant stanols as their fatty acid esters once per day at lunch was as effective as an equal total dose of 2.5 g but now divided over three meals. They hypothesized that the plant stanols remained in the intestinal lumen or even within the enterocyte after consumption. It should be realized that this hypothesis was proposed before identification of transporters such as Niemann-Pick C1 like 1 protein (NPC1L1). In agreement, Weststrate and Meijer [34] found that consumption of plant sterols at lunch and dinner only decreased LDL-C to the same extent as in studies that provided the plant sterols three times daily. Later, many more studies using the “once a day” protocol indeed found serum LDL-C reductions in line with predicted changes [35, 36]. This finding of “once a day efficacy” clearly questioned the mechanisms underlying the reduced intestinal cholesterol absorption. Effects could no longer solely be explained by a reduced incorporation of cholesterol into mixed micelles. However, not all studies using the “**once a day” approach were successful. It should be noticed that the oil phase is crucial for the formation of mixed micelles, which subsequently transport the emulsified food components toward the enterocytes via the aqueous micellar phase (Fig. 2). Therefore, it is of utmost importance that the ingested foods induce bile flow and release of pancreatic lipases. This could explain why Abumweis et al. [16] did not find a reduction in serum LDL-C concentrations after a single consumption of plant sterols/stanols before or with breakfast. However, results of this subgroup analysis should be interpreted with caution since the number of subjects included was small. Doornbos and colleagues [37] included 186 subjects to evaluate the impact of time of intake of plant sterol-enriched (± 3 g/day) single-dose yoghurt drinks. The drinks, which were different in total fat content (2.2 versus 3.3%), were consumed at least half an hour before breakfast or after lunch. They concluded that the total cholesterol and LDL-C concentrations were significantly reduced in both conditions, independent of the fat content of the drinks. A significantly larger reduction, however, was observed when the drinks were consumed with or immediately after lunch, suggesting that a fed state is necessary for an opti-

mal cholesterol-lowering activity. As suggested by Doornbos et al. [37], not only the amount of fat, but also the protein content of a meal could be important, since both trigger the release of cholecystokinin after a meal, thereby causing secretion of bile, a necessary step in the formation of mixed micelles.

A crucial factor that has been addressed in only a few studies in the mixed micelle era, is the physical state of the plant sterols and stanols. The physical state may influence the partitioning of plant sterols and cholesterol over the different phases in the intestinal lumen (Fig. 2). Grundy and colleagues [38] showed that the inhibition of intestinal cholesterol absorption by plant sterols was augmented if the plant sterols were administered as a micellar solution (as used in perfusion studies) as compared to administration of plant sterols in suspension (as in almost all dietary studies). The importance of the physical state was further substantiated by Lees et al. [28], who fed hypercholesterolemic patients 3 g/day of two different sitosterol preparations (either suspension or powder) from tall oil. Serum cholesterol concentrations were reduced in both conditions, but the decrease was more pronounced after administration of the powdered tall oil sterols (12%) as compared to the tall oil in suspension (7%). Ostlund and colleagues [39] agreed that the efficacy of plant sterols/stanols depends on the form in which they are presented. Administration of 1 g pure sitostanol powder had no significant effect on cholesterol absorption, whereas 700, 300, and even 100 mg sitostanol packaged in lecithin vesicles reduced intestinal cholesterol absorption as compared with a placebo by 37, 35, and 6%, respectively (Fig. 2E). These findings can be explained by the fact that sterols form stable crystals, which are solid solutions characterized by an extremely low bioaccessibility. Therefore, a powder forms hardly any micelle making this form almost ineffective.

Besides the physical state, it was also considered important whether plant sterols and stanols were provided as free sterols/stanols or as sterol/stanol esters. Mattson et al. [40] reported a 9% larger reduction in intestinal cholesterol absorption when the subjects ingested plant sterols in the free form as compared with the sterol esters. It was suggested that the ester bond was not completely hydrolyzed by the bile acid-activated pancreatic cholesterol hydrolase in the intestinal lumen. Since plant sterol and stanol esters solubilize poorly into the micellar phase, the major part accumulates in the oil phase. This agrees with the earlier mentioned observations that plant sterol esters, and also cholesterol esters in the oil phase, are less effectively absorbed into the enterocytes [41]. More recently, Kobayashi and co-workers [42] compared the cholesterol-lowering activity of free and esterified plant sterols side-by-side in Sprague-Dawley male rats. After feeding a commercial chow for 1 week, a catheter was placed in the stomach for administration of the test emulsions containing cholesterol without plant sterols, cholesterol with unesterified plant sterols or with plant sterol oleates. The lymphatic 24 h recovery of radiolabeled cholesterol was significantly lower in rats fed the free plant sterols than in those receiving the



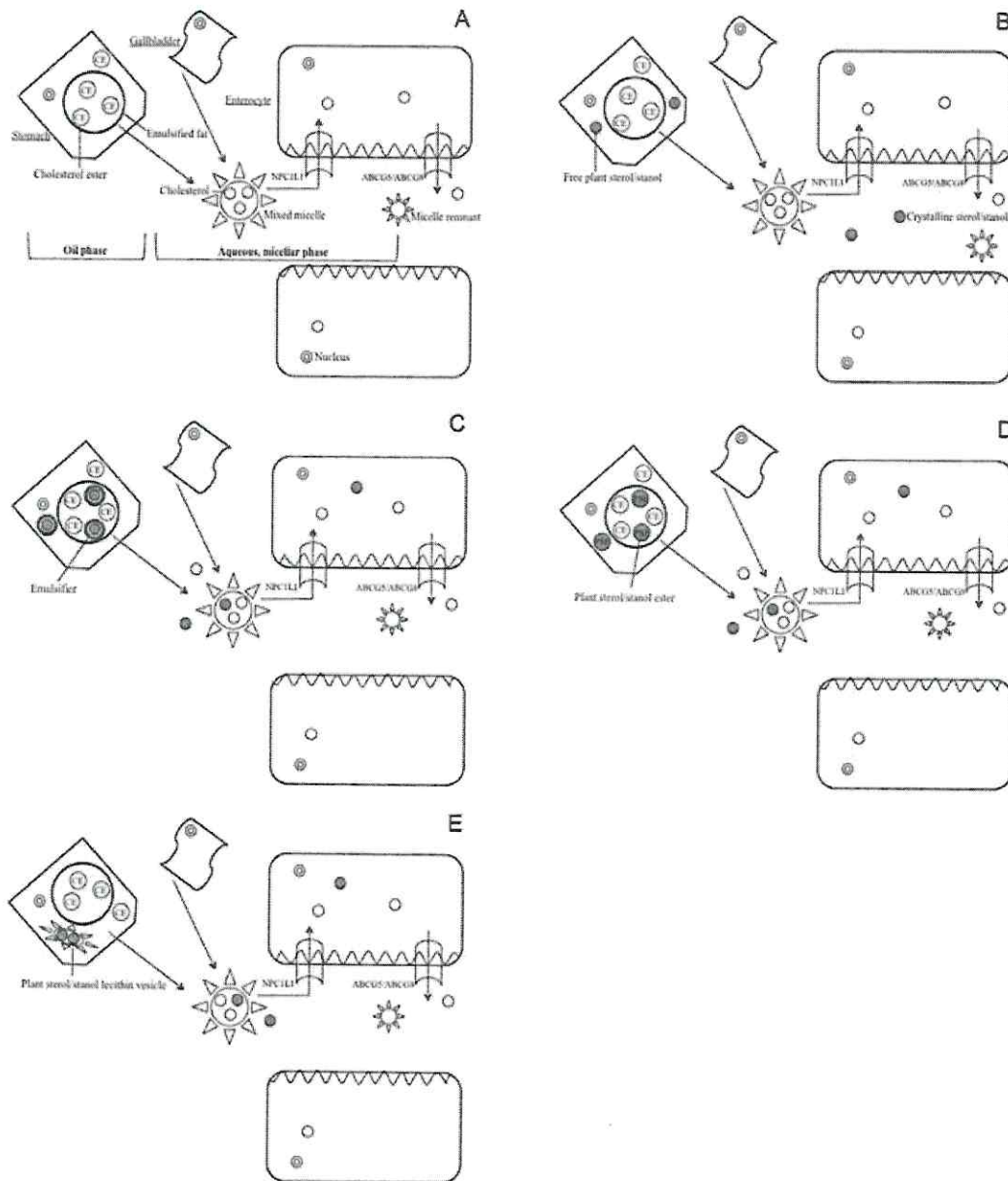


Figure 2. A representation of the crucial role of micelles in the process of cholesterol absorption.

The digestion of food-derived fats is initiated in the stomach by gastric lipase, leading to the formation of crude emulsions, which are further hydrolyzed by pancreatic lipase and cholesterol esterase in the small intestine. Cholesterol as well as plant sterols and stanols have to be incorporated into mixed micelles before absorption can occur.

(A) Mixed micelles are formed on the surface of the emulsified fat droplets as a combined action of bile acids and pancreatic enzymes. They transport free cholesterol through the micellar phase into the enterocyte. (B) Free plant sterols/stanols are not solubilized in the emulsified fat of the food digesta and pass the small intestine as crystalline sterols. In other words, they are unable to compete with cholesterol for incorporation into mixed micelles. (C) Therefore, free plant sterols/stanols need to be made “bioavailable” to the oil phase before competition can occur. This can be realized by the use of an emulsifier. (D) After consumption of plant sterol/stanol esters, the esters are hydrolyzed by pancreatic cholesterol esterase in the small intestine. Again, the free form will compete with cholesterol for incorporation into mixed micelles, thereby reducing intestinal cholesterol absorption. (E) Another possibility to increase the solubility of plant sterols/stanols is the formation of micellar solutions with lecithin. In contrast to the esterified form, which first has to dissolve in dietary fat for entry into the oil phase and next equilibrate with the micellar phase, the use of lecithin micelles allows a direct delivery of plant sterols/stanols into the intestinal micellar phase.

Abbreviations: ABCG5/ABCG8: adenosine-triphosphate (ATP) binding cassette G5 and G8 transporter; CE: cholesteryl esters; NPC1L1: Nieman-pick C1 like 1.



control or the plant sterol oleates at 3 h after administration. However, when it was repeated after incorporating the different sterols into the feed, no significant differences were observed. They suggested that administration of cholesterol and plant sterol oleates as an emulsion into the stomach resulted in a rapid accumulation of plant sterol oleates in the duodenum. The presence of a large amount of the esters in the intestinal lumen might induce a delay in the hydrolysis of the plant sterol oleates, causing a less effective reduction in the cholesterol absorption. Addition of plant sterol oleates to the diet did not lead to an excessive accumulation of the compounds into the duodenum. These studies illustrate the importance of optimal cleavage of the ester bound, thereby releasing free sterols or stanols for the micellar phase.

What do we know about the efficacy of the esterase enzymes *in vivo*? Miettinen et al. [43] quantified the hydrolysis of 2 g/day of plant stanols in 11 colectomized patients fed plant stanol esters for 1 week and observed that 95% of cholesterol and 90% of plant sterols/stanols were in the free form. In agreement, Normen and co-workers [44] performed a study in seven ileostomy subjects receiving 2.5 g/day of plant sterol or stanol esters. The proportion of the esterified forms of the plant sterols and stanols were 12.6 and 15.5%, respectively. This implicates that the major part of the plant sterols/stanols is hydrolyzed in the small intestine. In fact, almost 50% of the esters are hydrolyzed in the lower duodenum. The findings of Kobayashi and co-workers [42] can also be explained by the activity of lingual lipase, present in the serous (von Ebner) glands of the tongue and by the activity of gastric lipase [45]. It could be that these lipases already hydrolyze a part of the plant sterol esters when added to the diet, an effect that may be less when the test emulsion is given intragastrically.

Although free plant sterols and stanols may at least be as effective as the esterified forms, mainly the plant sterol/stanol esters are used for incorporation into the functional foods due to their higher solubility in oils. However, only the free form of the sterols and the stanols participate into the emulsified fat phase, causing a reduction in the intestinal cholesterol absorption. For this, optimal esterase activity is required (Fig. 2). Unfortunately, not many human studies have compared the cholesterol-lowering effects of free and esterified plant sterols and stanols. Richelle and colleagues [46] found no significant differences in the reduction of cholesterol absorption ($\pm 60\%$) in normocholesterolemic subjects receiving 2.2 g plant sterols either free or esterified for seven consecutive days. It should be noted that not solely the sterols were incorporated into the foods, but that sorbitan tristearate was added to the free form as an emulsifier (Fig. 2C). Due to the emulsifier, the free plant sterols/stanols could more easily interact with the emulsified fat phase making them as efficient as the esterified form. Regarding free sitostanol, Ostlund et al. [39] have described another procedure to facilitate partitioning into the emulsified fat phase. Free sitostanol was administered as part of lecithin micelles, which also lowered cholesterol absorption very efficiently (Fig. 2E). They reported that the effective dose of free sitostanol, when incorporated into lecithin micelles,

was between 100 and 300 mg. In later studies [47], it was found that 1.8–1.9 g/day plant stanols in lecithin micelles reduced LDL-C to the same extent as has been reported for plant stanol esters at the same daily intake. In a more recent study, Soderholm et al. [48] showed that free plant sterols incorporated into a rye bread significantly lowered serum LDL-C concentrations. The rye bread was enriched with 2 g/day of free plant sterols. Before adding to the dough, the plant sterols were micronized in order to increase the bioavailability in the oil phase.

In summary, if free sterols or stanols are provided without facilitating its solubilization into the oil phase, they will be poorly incorporated into the mixed micelles and have limited cholesterol-lowering activity (Fig. 2B). For the enhancement of free sterols and stanols into the emulsified fat phase, several procedures have been presented (Fig. 2C–E). Ultimately, the free forms—for sterol esters and stanol esters after cleavage by the esterases—will compete with cholesterol for incorporation into mixed micelles, thereby reducing intestinal cholesterol absorption.

2.3 The cellular era

Although displacement of cholesterol from mixed micelles in the intestinal lumen seemed to be an important mechanism of plant sterol- and stanol-induced inhibition of intestinal cholesterol absorption, several other mechanisms involving actively regulated processes have been suggested. Inhibition of cholesterol transport into the brush border membranes is one example, although many of the earlier textbooks mentioned that this uptake was driven by passive diffusion. However, already in 1957, Glover and Green [49] published that the brush border contains a specific binding site for cholesterol, making passive diffusion as the main driver for cholesterol uptake less likely. Similar results were found by Ikeda et al. [50], who confirmed the existence of an independent binding site for cholesterol and sitosterol in an isolated brush border at low micellar concentrations. Cholesterol-binding approached saturation at higher concentrations, which could not be observed for sitosterol [51]. Based on these results, it was concluded that competition at the brush border membrane had almost no influence on the plant sterols and stanols-mediated cholesterol-lowering activity.

It has also been suggested that plant sterols and stanols interfere with the incorporation of cholesterol into chylomicrons. Before incorporation into a chylomicron, free sterols are (re)esterified by ACAT-2. Newly synthesized apoB-48 and triacylglycerol (TAG) accumulate together with cholesterol esters in the smooth endoplasmic reticulum membrane followed by an MTP protein-dependent formation of chylomicrons [52]. *In vitro* as well as *in vivo* studies have clearly indicated that mucosal ACAT is a rate-controlling enzyme in the absorption of cholesterol. Kam et al. [53] incubated colorectal adenocarcinoma (Caco2) cells, a frequently used *in vitro* model for absorption studies, for 1 h with



increasing concentrations of 58–035, a specific inhibitor of ACAT. The inhibitor caused a dose-dependent decrease in cholesteryl ester synthesis, reaching a maximal effect at 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After 24 h, there were no measurable amounts of cholesteryl esters left in the chylomicron and very LDL (VLDL) particles isolated from these Caco2 cells. In agreement, Clark and colleagues [54] observed a reduced ACAT activity, if jejunal microsomes were incubated with 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of 58–035. In vivo, they investigated also the absorption of cholesterol in mesenteric lymph fistula of Sprague-Dawley rats after ACAT inhibition and observed a reduction in cholesteryl esters in lymph, lymph chylomicrons, and lymph VLDL, whereas the amount of unesterified cholesterol was increased. These results support a major regulatory role for ACAT in cholesterol absorption. It has been suggested that plant sterols interfere with the esterification inside the enterocyte, the first of the final two crucial steps in the process of cholesterol absorption [28]. Since plant sterols and stanols are poor substrates for ACAT-2, they could bind the available sites, thereby decreasing its activity by competitive inhibition (Fig. 1). Field and colleagues [55] indeed observed a decrease in ACAT activity in rabbits after feeding β -sitosterol. In contrast, if they collected intestinal microsomes from rabbits on chow diet and enriched them with β -sitosterol, they could not observe any effect on ACAT activity during the 4 h of measurement. However, some years later, the same group reported differences in the ACAT activity in Caco2 cells incubated with micelles containing cholesterol alone or cholesterol plus β -sitosterol [56]. Addition of cholesterol to the Caco2 cells in a micellar solution increased the basolateral secretion of cholesteryl esters derived from the plasma membrane cholesterol. In other words, micellar cholesterol displaces the cholesterol from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum, which is then used for chylomicron assembly and secretion. If, however, the same amount of β -sitosterol was added together with cholesterol, the movement of cholesterol from the plasma membrane and the subsequent secretion of cholesteryl esters were significantly reduced. This can be attributed to the displacement of cholesterol from the micelles by β -sitosterol. The reduced ACAT activity could be explained by the diminished trafficking of cholesterol from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum, as ACAT activity may be regulated by substrate supply [57]. Moreover, it has been shown again in Caco2 cells that HMG-CoA reductase activity is decreased when sitosterol was added despite a reduction in intracellular cholesterol concentration [56]. This indicates that HMG-CoA reductase cannot discriminate between cholesterol and plant sterols, which even further lower intracellular cholesterol pools. Thus, direct effects on ACAT activity are not a likely explanation for the plant sterol/stanol mediated effects on cholesterol absorption. After esterification, the cholesteryl esters are packaged into chylomicrons, a process in which MTP plays a crucial role. It was recently shown in male Golden Syrian hamsters that the cholesterol-lowering activity of sitosterol was associated with a decrease in the mRNA level of MTP [58]. This implies that plant sterols/stanols could also

have an effect on MTP expression, which has to be further elucidated. In line with this assumption, Rideout et al. [59] recently showed that plant sterol feeding lowered intestinal fat absorption in C57BL/6J mice, which could also be related to a reduced chylomicron formation involving effects on MTP.

2.4 The transporter era

More recently, Davis et al. [60] have described the crucial role of NPC1L1 in the intestinal uptake and absorption of cholesterol and the plant sterols/stanols. NPC1L1-deficient mice were characterized by a reduction in cholesterol absorption of almost 90%. Moreover, also serum campesterol and sitosterol concentrations were reduced by $\pm 90\%$ in these mice as compared with the wild-type mice. These results showed that NPC1L1 plays an important role in the uptake of both cholesterol and plant sterols, indicating that cholesterol and plant sterol absorption was not merely due to passive diffusion (Table 1 and Fig. 1C). The annexin2/caveolin1 (ANXA2/CAV1) complexes can also play a role in the plant sterol/stanol mediated cholesterol-lowering activity. ANXA2 forms a lipid-protein complex with CAV1 and cholesteryl esters, which may be involved in the internalization/endocytic transport of cholesterol esters from caveolae to internal membranes in lipid rafts of the intestinal brush border [61]. Smart et al. [62] have demonstrated that ANXA2 could be down regulated by plant sterols, thereby reducing cholesterol processing and transport. The significance of this complex for cholesterol absorption however is unclear, since Valasek et al. [63] have shown that the fractional cholesterol absorption and fecal neutral sterol excretion are similar in CAV1 knockout mice and their wild-type littermates. Besides cholesterol influx, there is also active secretion of cholesterol and plant sterols from enterocytes back into the intestinal lumen. In this process, ABCG5 and ABCG8, two half-transporters localized on the apical membrane of the enterocytes play a crucial role [64]. They function together as a heterodimer and mediate the efflux of free sterols from the enterocytes [13]. Theoretically, as a consequence of increased ABCG5/ABCG8 activity, less sterols will be available for esterification and incorporation into chylomicrons and as such intestinal sterol absorption will be reduced. The ABCG5/ABCG8 transporters are regulated via the liver X receptor (LXR) and numerous attempts have been made to use LXR agonists to influence cholesterol metabolism, i.e. elevate reverse cholesterol transport (RCT) pathways. However, systemic LXR activation causes increased hepatic fatty acid synthesis [65] and steatosis [66]. Therefore, tissue-specific approaches have been initiated. Indeed, Lo Sasso et al. [67] recently showed in an elegant series of experiments that intestine-specific LXR activation increased RCT and lowered intestinal cholesterol absorption. As expected, intestinal ABCG5/ABCG8 expression was increased and fecal neutral sterol excretion enhanced. The question now is whether plant sterols and stanols influence the



expression or activity of these crucial transporter proteins within the enterocytes.

Yamanashi et al. [68] studied the role of NPC1L1 using differentiated Caco2 cells as a model for small intestinal epithelial cells. In Caco2 cells overexpressing NPC1L1, the absorption of sitosterol was higher as compared to nontransfected cells. However, sitosterol absorption remained significantly lower as compared to cholesterol absorption. More recently, Zhang et al. [69] showed that cholesterol binds to the luminal N-terminal domain (NTD) of the NPC1L1 protein and that this specific binding is required for the uptake of cholesterol from the intestinal lumen into the enterocyte. Plant sterols cannot bind to NPC1L1-NTD, which may contribute to the selective cholesterol absorption in mammals. So, based on these cell and animal studies, it seems that NPC1L1 is not involved in the decreased cholesterol absorption after plant sterol or stanol intake. It is therefore interesting to know what will happen when ezetimibe will be combined with plant sterols or stanols in the diet. Jakulj and colleagues [70] examined the effects on serum LDL-C concentration in mildly hypercholesterolemic subjects receiving 10 mg/day of ezetimibe with or without 2 g/day of plant sterols for 4 weeks. Combined treatment of plant sterols and ezetimibe did not further reduce the serum LDL-C concentration compared with ezetimibe monotherapy, i.e. serum LDL-C reductions were 25 and 22%, respectively. One can argue that plant sterols and ezetimibe targeted the same transporter (in this case NPC1L1). Alternatively, it can be hypothesized that ezetimibe blocks NPC1L1, which results in a lower cellular uptake of plant sterols into the enterocytes. As indicated in the following sections, there are indications that plant sterols should be available intracellular to activate cellular processes that contribute to the lowered intestinal cholesterol uptake. Therefore, the lack of an additive effect of the plant sterol-ezetimibe combination could be explained by the reduced intracellular plant sterol concentration due to the ezetimibe-mediated NPC1L1 inhibition. Whatever reason, both are suggestive for the fact that NPC1L1 itself is not involved in the working mechanisms of plant sterols. In contrast to the findings of Jakulj et al. [70], Lin and colleagues [71] very recently showed that adding plant sterols to ezetimibe resulted in a further reduction of cholesterol absorption and a significantly increased fecal cholesterol excretion. This outcome was explained by the authors as an indication that the mechanism by which plant sterols lower intestinal cholesterol absorption is independent of that of ezetimibe. However, more specifically for this purpose designed studies are needed to examine whether NPC1L1 plays a role in the underlying mechanism of plant sterols/stanols.

Also regarding changes in the activity of the ABC transporters and other LXR target genes involved in (intestinal) lipid metabolism, several studies can be addressed. The oxysterol-activated receptor LXR regulates the expression of a panel of genes amongst which NPC1L1 [72], ABCA1, ABCG5, and ABCG8 [73]. As mentioned above, LXR activation results in an increase in the fecal neutral sterol loss and a decrease in the intestinal sterol absorption (Fig. 1C). It has been sug-

gested that LXR—in line with the sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2)—detects changes in intracellular cholesterol concentrations. In case of high intracellular cholesterol concentrations, LXR is activated to prevent via expression of its target genes a further accumulation of cellular cholesterol [74]. It has been suggested that plant sterols and stanols also activate LXR either directly or indirectly after conversion into yet unknown metabolites. Indeed, using a cell-free ligand-sensing assay (LiSA), Plat et al. [75] showed that nonoxidized plant sterols and stanols were potent activators of LXR. Moreover, they showed an increase in ABCA1 mRNA expression if Caco2 cells were cultured in the presence of mixed micelles enriched with plant sterols and stanols. Unfortunately, it was not possible to measure the expression pattern of ABCG5 and ABCG8, since the mRNA level of both genes was undetectable in these Caco2 cells. It could however be speculated that plant sterols/stanols can be regarded as local LXR agonists acting only in enterocytes. Physiological intracellular plant sterol concentrations in the enterocytes can indeed reach levels above EC50 concentrations necessary for LXR activation, which seems unlikely in hepatocytes due to the low absorption of plant sterols. The fact that plant sterols and stanols could act as local LXR agonists—and not systemically—also fits with recent observations that plant stanols [76–78] and sterols lower serum TAG concentrations instead of increasing TAG concentrations, as observed for systemic LXR agonists [65]. Systemic LXR agonists induce hepatic lipogenesis, which results in elevated serum TAGs. Plösch and colleagues [64], however, have suggested that plant sterols and stanols lower intestinal cholesterol absorption independently of LXR activation. They fed C57BL/6 mice a diet free of sterols, enriched with cholesterol, or enriched with cholesterol and either plant sterols or stanols for 4 weeks. Addition of plant sterols or stanols to the diet resulted in the expected increase in the fecal neutral sterol excretion. However, gene expression profiles of known LXR target genes were not changed. Moreover, Calpe-Berdiel et al. [79] observed no effects on the intestinal expression of LXR target genes in mice fed a western-type diet enriched with or without plant sterols. Finally, plant sterols were still effective in lowering intestinal cholesterol absorption in ABCG5 knockout mice, illustrating that these transporters are not obligatory to show effects [80]. Despite these inconsistent results regarding the role of the ABC transporters, we still cannot exclude a possible role for plant sterols and stanols on the activation of yet unknown LXR target genes. Therefore, it is too early to exclude LXR as a mediator of the plant sterol/stanol induced effects on intestinal cholesterol absorption.

2.5 The era of new discoveries

The most recent and probably most provocative explanation for the effects of plant sterols/stanols on intestinal cholesterol metabolism is related to the process called transintestinal cholesterol excretion (TICE). Until recently, the RCT route,



which is hepatobiliary cholesterol secretion mediated by hepatic ABCG5/ABCG8, was thought to be the most important route responsible for the disposal of cholesterol. However, disruption of biliary cholesterol secretion in mice had no effect on the fecal neutral sterol excretion [81, 82]. This finding suggested that the hepatobiliary cholesterol secretion might not be the only route for cholesterol excretion into the intestinal lumen. In this respect, van der Velde et al. [83] have demonstrated that cholesterol is secreted throughout the entire length of the small intestine, but most actively in the proximal part. They performed intestinal perfusion studies in mice under bile-diverted conditions and reported that intravenously injected radiolabeled cholesterol ends up in the intestinal perfusate. The direct cholesterol flow from blood into the intestinal lumen is further supported by the results of Brown and Goldstein [84]. They observed in mice with a targeted deletion of hepatic ACAT-2 a twofold increase in the fecal neutral sterol excretion. However, this increased fecal sterol loss occurred without an increase in biliary cholesterol secretion. In contrast, a trend toward a reduction in the cholesterol concentration in the gallbladder bile was observed as compared with the controls. In addition, in line with the observations of van der Velde and colleagues [83], they also showed that intestinal cholesterol secretion was most pronounced in the proximal part of the small intestine. Altogether, these findings indicate that there must be a direct transport of cholesterol from the circulation into the intestinal lumen. This so-called transintestinal cholesterol excretion (TICE) pathway could in theory also be an explanation for the cholesterol-lowering activity of the plant sterols and stanols (Table 1 and Fig. 1D). It should be noted that plant sterols/stanols may also compete with TICE-derived cholesterol for incorporation into mixed micelles, thereby decreasing cholesterol absorption. However, the magnitude of this effect may depend on the place where TICE-derived cholesterol enters the intestinal lumen. Based on the mechanisms described in the mixed micelle era, it is expected that the effects diminished the more distal TICE-derived cholesterol enters the intestinal lumen.

Recently, Brufau et al. [85] show a role of plant sterols and stanols in the stimulation of cholesterol excretion via this non-biliary route. Feeding wild-type mice a plant sterol-enriched diet resulted as expected in an increased fecal neutral sterol excretion, whereas a more moderate increase was observed in ABCG5 knockout mice. Furthermore, the nonbiliary cholesterol excretion was sixfold elevated in the plant sterol group and 3.5-fold in the ABCG5 knockout mice fed plant sterols. It should be mentioned that the transporter protein responsible for cholesterol efflux out of the enterocyte into the lumen—and as such part of the TICE route—is currently unknown. Although it is tempting to speculate that this process is at least partly mediated by ABCG5/ABCG8. Brufau et al. [85] found an unexpected decrease in both the mRNA level and the protein expression of this transporter, while TICE was activated. Although the evidence for a role of ABCG5/ABCG8 in TICE is not strong, LXR is thought to be one of the key

players involved in the regulation of TICE. Treating C57BL/6 mice with T0901317, an LXR agonist, caused a significant increase in TICE [86]. Although the evidence for plant sterols and stanols to act as a ligand for LXR is contradictory (see transporter era), this novel pathway does suggest that intestinal LXR activation is needed to explain effects on intestinal cholesterol metabolism. Therefore, intestinal LXR activation in response to plant sterol/stanol consumption needs to be studied into far more detail and especially the search for currently unknown and therefore not yet analyzed LXR target genes needs attention. In this respect, Sehayek et al. [87] reported already in 2002 that specific loci on chromosomes 2 and 14 distinct from ABCG5/ABCG8 regulate plasma plant sterol concentrations in mice.

A remarkable observation that also needs attention was the absence of a dose–response effect of plant sterol consumption on the nonbiliary cholesterol excretion in mice. The lowest supplementation of the plant sterol (1%) resulted already in a maximal stimulation of TICE [85]. This can only be explained by acknowledging that plant sterols and stanols not only activate TICE and as such increase fecal neutral sterol excretion but at the same time must also lower absorption of intestinal cholesterol. The combination of both processes is the observed net effect. Therefore, in future studies, it is a challenge to quantify the postprandial appearance of cholesterol in the chylomicron fraction and at the same time quantify the changes in TICE, to ensure which part of the increase in the fecal neutral sterol loss is due to an increased TICE and to a decreased incorporation of cholesterol into chylomicrons. Up till now, the contribution of TICE in humans has not been described. A better understanding of the process of TICE itself as well as exploring possibilities to activate TICE seems, however, an attractive approach for the prevention and even the treatment of CVDs.

Given the above overview, we conclude that impaired micellar solubilization of intestinal cholesterol is the only unequivocally established effect of the plant sterols/stanols. The so-called cellular and transporter eras have provided many interesting observations, but results are not consistent. However, the fact that both the mixed micelle era, nor the cellular or the transporter eras can fully explain all observations, the exact molecular mechanisms behind the cholesterol-lowering activity of plant sterols/stanols is likely a complex interplay of multiple processes.

2.6 Clinical benefit

Independent from the mechanism underlying the serum LDL-C lowering effects, an important issue often raised is the question “what is the evidence that we benefit from plant sterol or stanol consumption in terms of cardiovascular risk.” Several observations suggest that plant sterols and stanols not only lower serum LDL-C concentrations, but also ultimately improve endothelial dysfunction [88, 89]. Up till now, it is unknown whether plant sterols and stanols exert these



effects by a direct or an indirect effect. Direct effects assume a functional effect of the plant sterols/stanols themselves on the vessel wall. For this route, there is hardly any evidence. Indirect effects mean that the reduced CVD risk is explained through effects on LDL-C.

In animals, it is easy to evaluate whether dietary interventions affect lesion development, which is of course in humans more difficult. However, endothelial dysfunction is a reflection of an early, but reversible stage in the development of atherosclerosis, and the presence of endothelial dysfunction is considered to be a preclinical marker of CVD [90]. Here, we will provide a short overview of controlled intervention studies evaluating effects of plant sterols/stanols on endothelial function and/or possible atherosclerotic lesion characteristics in suitable animal models and humans.

Ntanios et al. [91] fed 24 male New Zealand White rabbits a diet rich in cholesterol or in cholesterol with one of the three 1% (w/w) plant sterol mixtures derived from soybean containing 0.01% (w/w) plant stanols, tall oil containing 0.2% (w/w) plant stanols, or tall oil containing 0.8% (w/w) plant stanols. In rabbits fed, the 0.8% (w/w) plant stanols, serum total cholesterol, LDL-C, and VLDL cholesterol (VLDL-C) concentrations were reduced by 49, 37, and 63%, respectively, as compared to the control group. Moreover, lesion developments in the ascending aorta and coronary arteries were substantially reduced as compared to the control group. There was no significant difference in plaque formation between the 0.01, 0.2% (w/w) plant stanol and the control group. The observation that plant stanols can indeed lower lesion formation agreed with a study by Plat et al. [92], who demonstrated that plant sterol or stanol consumption lowered atherosclerotic lesion development in heterozygous LDL receptor^{+/-} mice to the same extent despite opposite changes in serum plant sterol and stanol concentrations. These findings suggest that changes in serum plant sterols or stanols themselves do not directly contribute to plaque development in these mice. Volger and colleagues [93] also evaluated the association between the reduction in serum cholesterol concentration and atherosclerotic lesions. They fed apoE*3-Leiden transgenic mice a control diet or the same diet enriched with plant stanol esters for 38 weeks. The cholesterol-lowering activity of the plant stanol esters was more pronounced in the VLDL and intermediate-density lipoprotein fractions than in the LDL fraction (70, 77, and 20% reductions, respectively). As compared to the control group, plant stanol ester feeding significantly reduced the atherosclerotic lesion area and severity. The control mice showed type 2–3 lesions, characterized by regular intimal fatty streaks/mild plaques, whereas the mice receiving plant stanol esters predominantly had type 1 lesions, which consist of individual foam cells. In contrast, Weingartner et al. [94] suggested that administration of plant sterol esters caused a negative vascular effect, independent of the plasma cholesterol concentrations. They fed C57BL/6 wild-type mice a normal chow enriched with 2% (w/w) plant sterol esters for 4 weeks. These mice developed an impaired endothelium-dependent vasorelaxation

compared with the wild-type mice on normal chow. A significant larger lesion size after cerebral ischemia was observed in wild-type SV/129 mice treated for 4 weeks with normal chow and 2% (w/w) plant sterol esters compared with the control group. Finally, Weingartner et al. also used ApoE^{-/-} mice as a model of lipid-driven atherogenesis. Mice were fed a Western-type diet or normal chow for 6 months, enriched with 2% (w/w) plant sterol esters, 0.005% (w/w) ezetimibe, a combination of both or without any supplementation. The reduction in atherosclerotic plaque formation was most pronounced in mice treated with ezetimibe and significantly larger than in mice fed the plant sterol esters. The mice treated with ezetimibe and plant sterol ester showed a trend toward greater lesion formation as compared to mice treated with ezetimibe alone. Despite the equal reduction in serum cholesterol concentration, plant sterol ester consumption was associated with twice the amount of plaque formation compared with ezetimibe. However, further studies are needed to confirm the potentially negative effect of plant sterols on atherogenesis in mice. It should also be noticed that the amount of plant sterol ester supplementation in the animal studies, calculated as milligram per day times kilogram body weight, was approximately 100 times higher as the amount incorporated into margarine used in human studies.

One of the most frequently used surrogate markers for measuring endothelium function in humans is flow-mediated vasodilatation (FMD) [90]. Celermaier et al. [95] have clearly shown that FMD is a valuable predictor for future cardiovascular risk. There are only a few studies investigating the effects of plant sterol or stanol consumption on endothelial function. De Jongh et al. [96] evaluated the short-term effect of plant sterols on endothelial dysfunction in heterozygous familial hypercholesterolemic children. Forty-one children between 5 and 12 years of age received 2.3 g plant sterols per day for 4 weeks. As expected, administration of plant sterols resulted in a 14% decrease in serum LDL-C concentrations. However, this was not associated with an improvement of the impaired FMD. Hallikainen and colleagues [97] also showed that a daily intake of 2 g plant sterol or stanol esters for 10 weeks had no effect on the endothelial function as measured by FMD in 76 hypercholesterolemic adults, although serum LDL-C concentrations were reduced by 9–12% as compared to the controls. Also Jakulj et al. [98] evaluated the effect of plant stanols (2 g/day for 4 weeks) on FMD in 42 heterozygous FH children between 7 and 12 years. Serum total cholesterol and LDL-C concentrations were reduced by 7.5 and 9.2%, respectively, and again, improvement on the endothelial function was not observed. Finally, Raitakari et al. [99] evaluated the effect of plant stanol esters on endothelial function and arterial elasticity. The 150 hypercholesterolemic adults received 2 g/day of plant stanol esters for 3 months. Despite the significant 9.3% reduction in the LDL-C concentration between the treated and the control group, they observed again no significant change in FMD or carotid artery compliance. However, a subgroup analysis demonstrated that arterial elasticity and endothelial function improved in subjects with below



average baseline values for these parameters. This is in line with the observation of De Jong et al. [100] who evaluated the long-term effect (85 weeks) of plant sterol or stanol esters on vascular function in patients on statin treatment. No effect in the whole population was observed, but endothelial dysfunction and arterial stiffness were improved in a subgroup of patients at risk for cardiovascular events [99]. This implies that plant sterols and stanols might improve vascular function in subjects with a suboptimal vessel condition [100] and probably more important that a long follow-up period is needed to see protective effects. Although these observations are of great relevance, it does not prove that cardiovascular events are actually reduced. For this, future studies especially designed for this purpose are needed.

2.7 Mechanisms in relation to the clinical benefit

Reducing intestinal cholesterol absorption and/or stimulating TICE, two processes that both result in elevated fecal neutral sterol excretion are currently the two paradigms explaining the LDL-C lowering activity of plant sterols and stanols. Based on all observations described, it seems most likely that—at least in animals—both mechanisms are effective.

In this respect, a relevant question that remains is whether the long-term clinical benefit will depend on the pathways underlying the well-established LDL-C lowering effects. If the target of the plant sterol/stanol treatment is to lower intestinal cholesterol absorption, the cholesterol concentration inside the body will decrease, while more cholesterol is excreted in the feces as fecal neutral sterols. If, on the other hand, the main mechanism is to stimulate TICE, which also results in an increased fecal neutral sterol excretion, possibly more cholesterol will be secreted directly from the vessel wall to the intestinal lumen and the feces. It can be speculated that this latter route of cholesterol reshuffling throughout the body might be preferable in terms of the most promising long-term clinical outcome. However, one can also argue that reducing intestinal cholesterol absorption lowers the amount of available cholesterol reaching the vessel wall. Activation of the process that has the largest net effect on inhibiting lesion formation remains to be evaluated. This conclusion illustrates that it is of utmost importance to better understand the underlying mechanisms of the cholesterol-lowering activity of plant sterols/stanols—and of other food components as well—to be able to predict the long-term clinical benefits.

The authors have declared no conflict of interest.

3 References

- [1] Krauss, R. M., Eckel, R. H., Howard, B., Appel, L. J. et al., AHA Dietary Guidelines: revision 2000: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Stroke* 2000, 31, 2751–2766.
- [2] Lauer, M. S., Fontanarosa, P. B., Updated guidelines for cholesterol management. *JAMA* 2001, 285, 2508–2509.
- [3] Brown, M. S., Goldstein, J. L., Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 1983, 52, 223–261.
- [4] Baigent, C., Blackwell, L., Emberson, J., Holland, L. E. et al., Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* 2010, 376, 1670–1681.
- [5] Landmesser, U., Bahlmann, F., Mueller, M., Spiekermann, S. et al., Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. *Circulation* 2005, 111, 2356–2363.
- [6] LaRosa, J. C., Low-density lipoprotein cholesterol reduction: the end is more important than the means. *Am. J. Cardiol.* 2007, 100, 240–242.
- [7] Demonty, I., Ras, R. T., van der Knaap, H. C., Duchateau, G. S. et al., Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. *J. Nutr.* 2009, 139, 271–284.
- [8] Musa-Veloso, K., Poon, T. H., Elliot, J. A., Chung, C., A comparison of the LDL-cholesterol lowering efficacy of plant stanols and plant sterols over a continuous dose range: results of a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Prostaglandins Leukot Essent. Fatty Acids* 2011, 85, 9–28.
- [9] de Jong, A., Plat, J., Lutjohann, D., Mensink, R. P., Effects of long-term plant sterol or stanol ester consumption on lipid and lipoprotein metabolism in subjects on statin treatment. *Br. J. Nutr.* 2008, 100, 937–941.
- [10] Devaraj, S., Jialal, I., The role of dietary supplementation with plant sterols and stanols in the prevention of cardiovascular disease. *Nutr. Rev.* 2006, 64, 348–354.
- [11] Sudhop, T., Sahin, Y., Lindenthal, B., Hahn, C. et al., Comparison of the hepatic clearances of campesterol, sitosterol, and cholesterol in healthy subjects suggests that efflux transporters controlling intestinal sterol absorption also regulate biliary secretion. *Gut* 2002, 51, 860–863.
- [12] Ling, W. H., Jones, P. J., Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci.* 1995, 57, 195–206.
- [13] Klett, E. L., Lu, K., Kusters, A., Vink, E. et al., A mouse model of sitosterolemia: absence of Abcg8/sterolin-2 results in failure to secrete biliary cholesterol. *BMC Med.* 2004, 2, 5.
- [14] Law, M., Plant sterol and stanol margarines and health. *BMJ* 2000, 320, 861–864.
- [15] Katan, M. B., Grundy, S. M., Jones, P., Law, M. et al., Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin. Proc.* 2003, 78, 965–978.
- [16] Abumweis, S. S., Barake, R., Jones, P. J., Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr. Res.* 2008, 52–69.
- [17] Mensink, R. P., de Jong, A., Lutjohann, D., Haenen, G. R. et al., Plant stanols dose-dependently decrease LDL-cholesterol concentrations, but not cholesterol-standardized fat-soluble antioxidant concentrations, at intakes up to 9 g/d. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010, 92, 24–33.



- [18] Gylling, H., Hallikainen, M., Nissinen, M. J., Simonen, P. et al., Very high plant stanol intake and serum plant stanols and non-cholesterol sterols. *Eur. J. Nutr.* 2009, *49*, 111–117.
- [19] Plat, J., van Onselen, E. N., van Heugten, M. M., Mensink, R. P., Effects on serum lipids, lipoproteins and fat soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2000, *54*, 671–677.
- [20] Peterson, D. W., Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1951, *78*, 143–147.
- [21] Peterson, D. W., Nichols, C. W., Jr., Shneour, E. A., Some relationships among dietary sterols, plasma and liver cholesterol levels, and atherosclerosis in chicks. *J. Nutr.* 1952, *47*, 57–65.
- [22] Pollak, O. J., Successive prevention of experimental hypercholesteremia and cholesterol atherosclerosis in the rabbit. *Circulation* 1953, *7*, 696–701.
- [23] Pollak, O. J., Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation* 1953, *7*, 702–706.
- [24] Sklan, D., Dahan, M., Budowski, P., Hurwitz, S., Differential absorption of endogenous and exogenous cholesterol in the chick as affected by dietary oil level and phytosterols. *J. Nutr.* 1977, *107*, 1996–2001.
- [25] Sklan, D., Budowski, P., Hurwitz, S., Effect of soy sterols on intestinal absorption and secretion of cholesterol and bile acids in the chick. *J. Nutr.* 1974, *104*, 1086–1090.
- [26] Borgstrom, B., Partition of lipids between emulsified oil and micellar phases of glyceride-bile salt dispersions. *J. Lipid Res.* 1967, *8*, 598–608.
- [27] Ikeda, I., Tanabe, Y., Sugano, M., Effects of sitosterol and sitostanol on micellar solubility of cholesterol. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 1989, *35*, 361–369.
- [28] Lees, A. M., Mok, H. Y., Lees, R. S., McCluskey, M. A. et al., Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis* 1977, *28*, 325–338.
- [29] Brown, A. W., Hang, J., Dussault, P. H., Carr, T. P., Phytosterol ester constituents affect micellar cholesterol solubility in model bile. *Lipids* 2010, *45*, 855–862.
- [30] Armstrong, M. J., Carey, M. C., Thermodynamic and molecular determinants of sterol solubilities in bile salt micelles. *J. Lipid Res.* 1987, *28*, 1144–1155.
- [31] Sugano, M., Morioka, H., Ikeda, I., A comparison of hypocholesterolemic activity of beta-sitosterol and beta-sitostanol in rats. *J. Nutr.* 1977, *107*, 2011–2019.
- [32] Hassan, A. S., Rampone, A. J., Intestinal absorption and lymphatic transport of cholesterol and beta-sitostanol in the rat. *J. Lipid Res.* 1979, *20*, 646–653.
- [33] Heinemann, T., Kullak-Ublick, G. A., Pietruck, B., von Bergmann, K., Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. Comparison of sitosterol and sitostanol. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1991, *40*, S59–S63.
- [34] Weststrate, J. A., Meijer, G. W., Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1998, *52*, 334–343.
- [35] Matvienko, O. A., Lewis, D. S., Swanson, M., Arndt, B. et al., A single daily dose of soybean phytosterols in ground beef decreases serum total cholesterol and LDL cholesterol in young, mildly hypercholesterolemic men. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002, *76*, 57–64.
- [36] Rudkowska, I., AbuMweis, S. S., Nicolle, C., Jones, P. J., Cholesterol-lowering efficacy of plant sterols in low-fat yogurt consumed as a snack or with a meal. *J. Am. Coll. Nutr.* 2008, *27*, 588–595.
- [37] Doornbos, A. M., Meynen, E. M., Duchateau, G. S., van der Knaap, H. C. et al., Intake occasion affects the serum cholesterol lowering of a plant sterol-enriched single-dose yoghurt drink in mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2006, *60*, 325–333.
- [38] Grundy, S. M., Mok, H. Y., Determination of cholesterol absorption in man by intestinal perfusion. *J. Lipid Res.* 1977, *18*, 263–271.
- [39] Ostlund, R. E., Jr., Spilburg, C. A., Stenson, W. F., Sitostanol administered in lecithin micelles potently reduces cholesterol absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999, *70*, 826–831.
- [40] Mattson, F. H., Grundy, S. M., Crouse, J. R., Optimizing the effect of plant sterols on cholesterol absorption in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 1982, *35*, 697–700.
- [41] Nissinen, M., Gylling, H., Vuoristo, M., Miettinen, T. A., Micellar distribution of cholesterol and phytosterols after duodenal plant stanol ester infusion. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 2002, *282*, G1009–1015.
- [42] Kobayashi, M., Hamada, T., Goto, H., Imaizumi, K. et al., Comparison of effects of dietary unesterified and esterified plant sterols on cholesterol absorption in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 2008, *54*, 210–214.
- [43] Miettinen, T. A., Vuoristo, M., Nissinen, M., Jarvinen, H. J. et al., Serum, biliary, and fecal cholesterol and plant sterols in colectomized patients before and during consumption of stanol ester margarine. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, *71*, 1095–1102.
- [44] Normen, L., Ellegard, L., Janssen, H. G., Steenbergen, H. et al., Phytosterol and phytostanol esters are effectively hydrolysed in the gut and do not affect fat digestion in ileostomy subjects. *Eur. J. Nutr.* 2006, *45*, 165–170.
- [45] Carey, M. C., Small, D. M., Bliss, C. M., Lipid digestion and absorption. *Annu. Rev. Physiol.* 1983, *45*, 651–677.
- [46] Richelle, M., Enslin, M., Hager, C., Groux, M. et al., Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of beta-carotene and alpha-tocopherol in normocholesterolemic humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, *80*, 171–177.
- [47] Spilburg, C. A., Goldberg, A. C., McGill, J. B., Stenson, W. F. et al., Fat-free foods supplemented with soy stanol-lecithin powder reduce cholesterol absorption and LDL cholesterol. *J. Am. Diet Assoc.* 2003, *103*, 577–581.
- [48] Soderholm, P. P., Alfthan, G., Koskela, A. H., Adlercreutz, H. et al., The effect of high-fiber rye bread enriched with nonesterified plant sterols on major serum lipids

- and apolipoproteins in normocholesterolemic individuals. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2010, DOI:10.1016/j.numecd.2010.09.011.
- [49] Glover, J., Green, C., Sterol metabolism. 3. The distribution and transport of sterols across the intestinal mucosa of the guinea pig. *Biochem. J.* 1957, 67, 308–316.
- [50] Ikeda, I., Tanaka, K., Sugano, M., Vahouny, G. V. et al., Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. *J. Lipid Res.* 1988, 29, 1573–1582.
- [51] Ikeda, I., Tanaka, K., Sugano, M., Vahouny, G. V. et al., Discrimination between cholesterol and sitosterol for absorption in rats. *J. Lipid Res.* 1988, 29, 1583–1591.
- [52] Liu, Y., Manchekar, M., Sun, Z., Richardson, P. E. et al., Apolipoprotein B-containing lipoprotein assembly in microsomal triglyceride transfer protein-deficient McA-RH7777 cells. *J. Lipid Res.* 2010, 51, 2253–2264.
- [53] Kam, N. T., Albright, E., Mathur, S. N., Field, F. J., Inhibition of acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase activity in CaCo-2 cells results in intracellular triglyceride accumulation. *J. Lipid Res.* 1989, 30, 371–377.
- [54] Clark, S. B., Tercyak, A. M., Reduced cholesterol transmucosal transport in rats with inhibited mucosal acyl CoA: cholesterol acyltransferase and normal pancreatic function. *J. Lipid Res.* 1984, 25, 148–159.
- [55] Field, F. J., Mathur, S. N., Beta-sitosterol: esterification by intestinal acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) and its effect on cholesterol esterification. *J. Lipid Res.* 1983, 24, 409–417.
- [56] Field, F. J., Born, E., Mathur, S. N., Effect of micellar beta-sitosterol on cholesterol metabolism in CaCo-2 cells. *J. Lipid Res.* 1997, 38, 348–360.
- [57] Chang, C. C., Chen, J., Thomas, M. A., Cheng, D. et al., Regulation and immunolocalization of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase in mammalian cells as studied with specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 29532–29540.
- [58] Liang, Y. T., Wong, W. T., Guan, L., Tian, X. Y. et al., Effect of phytosterols and their oxidation products on lipoprotein profiles and vascular function in hamster fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis* 2011, 219, 124–133.
- [59] Rideout, T. C., Harding, S. V., Jones, P. J., Consumption of plant sterols reduces plasma and hepatic triglycerides and modulates the expression of lipid regulatory genes and de novo lipogenesis in C57BL/6J mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010, 54, S7–S13.
- [60] Davis, H. R., Jr., Zhu, L. J., Hoos, L. M., Tetzloff, G. et al., Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 33586–33592.
- [61] Calpe-Berdiel, L., Escola-Gil, J. C., Julve, J., Zapico-Muniz, E. et al., Differential intestinal mucosal protein expression in hypercholesterolemic mice fed a phytosterol-enriched diet. *Proteomics* 2007, 7, 2659–2666.
- [62] Smart, E. J., De Rose, R. A., Farber, S. A., Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 3450–3455.
- [63] Valasek, M. A., Weng, J., Shaul, P. W., Anderson, R. G. et al., Caveolin-1 is not required for murine intestinal cholesterol transport. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 28103–28109.
- [64] Plosch, T., Kruit, J. K., Bloks, V. W., Huijckman, N. C. et al., Reduction of cholesterol absorption by dietary plant sterols and stanols in mice is independent of the Abcg5/8 transporter. *J. Nutr.* 2006, 136, 2135–2140.
- [65] Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J. et al., Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes. Dev.* 2000, 14, 2831–2838.
- [66] Grefhorst, A., Elzinga, B. M., Voshol, P. J., Plosch, T. et al., Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 34182–34190.
- [67] Lo Sasso, G., Murzilli, S., Salvatore, L., D'Errico, I. et al., Intestinal specific LXR activation stimulates reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis. *Cell. Metab.* 2010, 12, 187–193.
- [68] Yamanashi, Y., Takada, T., Suzuki, H., Niemann-Pick C1-like 1 overexpression facilitates ezetimibe-sensitive cholesterol and beta-sitosterol uptake in CaCo-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007, 320, 559–564.
- [69] Zhang, J. H., Ge, L., Qi, W., Zhang, L. et al., The N-terminal domain of NPC1L1 protein binds cholesterol and plays essential roles in cholesterol uptake. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 25088–25097.
- [70] Jakulj, L., Trip, M. D., Sudhop, T., von Bergmann, K. et al., Inhibition of cholesterol absorption by the combination of dietary plant sterols and ezetimibe: effects on plasma lipid levels. *J. Lipid Res.* 2005, 46, 2692–2698.
- [71] Lin, X., Racette, S. B., Lefevre, M., Ma, L. et al., Combined effects of ezetimibe and phytosterols on cholesterol metabolism: a randomized, controlled feeding study in humans. *Circulation* 2011, 124, 596–601.
- [72] Duval, C., Touche, V., Tailleux, A., Fruchart, J. C. et al., Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006, 340, 1259–1263.
- [73] Calpe-Berdiel, L., Escola-Gil, J. C., Blanco-Vaca, F., New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis* 2009, 203, 18–31.
- [74] Dang, H., Liu, Y., Pang, W., Li, C. et al., Suppression of 2,3-oxidosqualene cyclase by high fat diet contributes to liver X receptor-alpha-mediated improvement of hepatic lipid profile. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 6218–6226.
- [75] Plat, J., Nichols, J. A., Mensink, R. P., Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J. Lipid Res.* 2005, 46, 2468–2476.
- [76] Plat, J., Brufau, G., Dallinga-Thie, G. M., Dasselaaar, M. et al., A plant stanol yogurt drink alone or combined with a low-dose statin lowers serum triacylglycerol and non-HDL cholesterol in metabolic syndrome patients. *J. Nutr.* 2009, 139, 1143–1149.
- [77] Plat, J., Mensink, R. P., Plant stanol esters lower serum triacylglycerol concentrations via a reduced hepatic VLDL-1 production. *Lipids* 2009, 44, 1149–1153.

- [78] Theuwissen, E., Plat, J., van der Kallen, C. J., van Greevenbroek, M. M. et al., Plant stanol supplementation decreases serum triacylglycerols in subjects with overt hypertriglyceridemia. *Lipids* 2009, *44*, 1131–1140.
- [79] Calpe-Berdiel, L., Escola-Gil, J. C., Ribas, V., Navarro-Sastre, A. et al., Changes in intestinal and liver global gene expression in response to a phytosterol-enriched diet. *Atherosclerosis* 2005, *181*, 75–85.
- [80] Plosch, T., van der Veen, J. N., Havinga, R., Huijckman, N. C. et al., Abcg5/Abcg8-independent pathways contribute to hepatobiliary cholesterol secretion in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006, *291*, G414–G423.
- [81] Kruit, J. K., Plosch, T., Havinga, R., Boverhof, R. et al., Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology* 2005, *128*, 147–156.
- [82] Temel, R. E., Sawyer, J. K., Yu, L., Lord, C. et al., Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport. *Cell. Metab* 2010, *12*, 96–102.
- [83] van der Velde, A. E., Vrins, C. L., van den Oever, K., Kunne, C. et al., Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* 2007, *133*, 967–975.
- [84] Brown, J. M., Bell, T. A., 3rd, Alger, H. M., Sawyer, J. K. et al., Targeted depletion of hepatic ACAT2-driven cholesterol esterification reveals a non-biliary route for fecal neutral sterol loss. *J. Biol. Chem.* 2008, *283*, 10522–10534.
- [85] Brufau, G., Kuipers, F., Lin, Y., Trautwein, E. A. et al., A reappraisal of the mechanism by which plant sterols promote neutral sterol loss in mice. *PLoS One* 2011, *6*, e21576.
- [86] van der Veen, J. N., van Dijk, T. H., Vrins, C. L., van Meer, H. et al., Activation of the liver X receptor stimulates transintestinal excretion of plasma cholesterol. *J. Biol. Chem.* 2009, *284*, 19211–19219.
- [87] Sehayek, E., Duncan, E. M., Lutjohann, D., Von Bergmann, K. et al., Loci on chromosomes 14 and 2, distinct from ABCG5/ABCG8, regulate plasma plant sterol levels in a C57BL/6J x CASA/Rk intercross. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, *99*, 16215–16219.
- [88] Russell, J. C., Ewart, H. S., Kelly, S. E., Kralovec, J. et al., Improvement of vascular dysfunction and blood lipids of insulin-resistant rats by a marine oil-based phytosterol compound. *Lipids* 2002, *37*, 147–152.
- [89] Vaskonen, T., Mervaala, E., Krogerus, L., Karppanen, H., Supplementation of plant sterols and minerals benefits obese Zucker rats fed an atherogenic diet. *J. Nutr.* 2002, *132*, 231–237.
- [90] Corretti, M. C., Anderson, T. J., Benjamin, E. J., Celermajer, D. et al., Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002, *39*, 257–265.
- [91] Ntanios, F. Y., Jones, P. J., Frohlich, J. J., Dietary sitostanol reduces plaque formation but not lecithin cholesterol acyl transferase activity in rabbits. *Atherosclerosis* 1998, *138*, 101–110.
- [92] Plat, J., Beugels, I., Gijbels, M. J., de Winther, M. P. et al., Plant sterol or stanol esters retard lesion formation in LDL receptor-deficient mice independent of changes in serum plant sterols. *J. Lipid Res.* 2006, *47*, 2762–2771.
- [93] Volger, O. L., Mensink, R. P., Plat, J., Hornstra, G. et al., Dietary vegetable oil and wood derived plant stanol esters reduce atherosclerotic lesion size and severity in apoE*3-Leiden transgenic mice. *Atherosclerosis* 2001, *157*, 375–381.
- [94] Weingartner, O., Lutjohann, D., Ji, S., Weisschoff, N. et al., Vascular effects of diet supplementation with plant sterols. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008, *51*, 1553–1561.
- [95] Celermajer, D. S., Sorensen, K. E., Bull, C., Robinson, J. et al., Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1994, *24*, 1468–1474.
- [96] de Jongh, S., Vissers, M. N., Rol, P., Bakker, H. D. et al., Plant sterols lower LDL cholesterol without improving endothelial function in prepubertal children with familial hypercholesterolaemia. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2003, *26*, 343–351.
- [97] Hallikainen, M., Lyyra-Laitinen, T., Laitinen, T., Agren, J. J. et al., Endothelial function in hypercholesterolemic subjects: effects of plant stanol and sterol esters. *Atherosclerosis* 2006, *188*, 425–432.
- [98] Jakulj, L., Vissers, M. N., Rodenburg, J., Wiegman, A. et al., Plant stanols do not restore endothelial function in prepubertal children with familial hypercholesterolemia despite reduction of low-density lipoprotein cholesterol levels. *J. Pediatr.* 2006, *148*, 495–500.
- [99] Raitakari, O. T., Salo, P., Gylling, H., Miettinen, T. A., Plant stanol ester consumption and arterial elasticity and endothelial function. *Br. J. Nutr.* 2008, *100*, 603–608.
- [100] De Jong, A., Plat, J., Bast, A., Godschalk, R. W. et al., 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. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2008, *62*, 263–273.