

CAŁA PRAWDA O OKSYSTEROLACH

Magdalena Iwona Brzeska

Institut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Zakład Analizy Żywności
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa
magdalenabrzeska92@gmail.com

Streszczenie

Cholesterol występujący w diecie uznawany jest za główną przyczynę pojawienia się zmian miażdżycowych, natomiast przyjmuje się, że fitosterole to składniki dobroczynne, które pozwalają obniżyć poziom cholesterolu we krwi. Związki te należą do jednej grupy chemicznej – steroli, która łatwo ulega utlenianiu, w wyniku czego powstają oksysterole. Te natomiast mają właściwości toksyczne dla organizmów żywych. Udowodniono, że istnieje istotne powiązanie między oksysterolami a chorobami sercowo-naczyniowymi. Oczywiście im większe stężenie steroli w żywności, tym większe prawdopodobieństwo wysokiej zawartości ich tlenowych pochodnych w danym produkcie. Istotne jest, by poznać wpływ oksysteroli na organizmy żywe, procesy ich tworzenia oraz zawartość w popularnych produktach spożywczych.

Słowa kluczowe: cholesterol, fitosterole, oksysterole, cytotoxycznosc, żywność

THE WHOLE TRUTH ABOUT OXYSTEROLS

Summary

Cholesterol present in the diet is considered as main cause of the appearance of atherosclerosis, while phytosterols are known as substances that decrease concentration of Low-Density Lipoproteins in blood. Cholesterol and phytosterols belong to the same chemical group, sterols, which willingly undergo oxidation. Products of sterols oxidation are toxic to living organisms. It has been proved that oxysterols significantly impact appearance of cardiovascular disease. Obviously, the higher concentration of sterols in the food, the more likely high content of oxygen derivatives in the diet. Therefore, it is worth to know influence of phytosterols on living organisms, processes which lead to their formation, and their levels in popular foodstuffs.

Key words: cholesterol, phytosterols, oxysterols, cytotoxicity, food

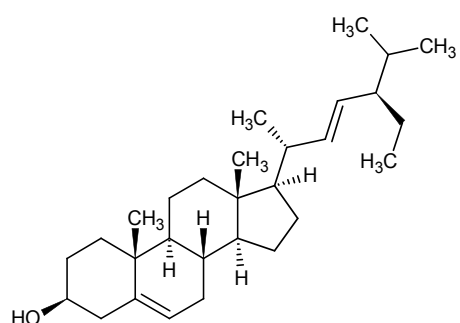
WSTĘP

Lipofilne sterole od lat są obiektem badań, ponieważ pełnią ważne funkcje w organizmie człowieka. Związki te mają budowę czteropierścieniową, zawierają rdzeń steranu z grupą wodorotlenową w pozycji 3. pierścienia B oraz łańcuch boczny w pozycji 17. Ze względu na pochodzenie można wyróżnić: fitosterole (pochodzenia roślinnego), zoosterole (pochodzenia zwierzęcego), mikosterole (pochodzenia grzybiczego) oraz sterole syntetyczne.

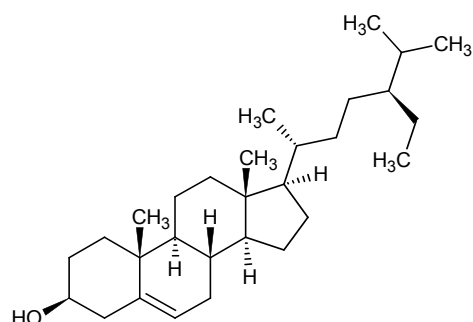
Powszechnie znanymi fitosterolami są β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol i brassikasterol (rysunek 1). Związki te w organizmie człowieka pochodzą jedynie z diety – znajdują się w olejach roślinnych, ziarnach, orzechach, owocach, warzywach. Fitosterole mają podobną budowę chemiczną do cholesterolu, przez co obniżają poziom cholesterolu frakcji lipoprotein o niskiej gęstości (ang. *Low Density Lipoproteins*, LDL) we krwi. Proces ten polega na częściowym hamowaniu wchłaniania tego związku w jelitach, ponieważ fitosterole między innymi łączą się z receptorami komórek jelitowych i uniemożliwiają absorpcję cholesterolu. Badania wskazują, że związki te zmniejszają ryzyko wystąpienia zmian miażdżycowych – dawka 2g fitosteroli na dzień obniża poziom LDL-cholesterolu u ludzi o 10% [Otaegui-Arrazola i in. 2010; De Jong i in. 2003; Katan i in.

2003]. Dzielne spożycie fitosteroli w krajach zachodnich wynosi około 0,25g [Hovenkamp i in. 2008]. Niestety są one trudno wchłaniane, przez co tylko małe ich ilości są obecne w krwioobiegu. Porównując średnie dzielne spożycie i dawkę, która dobroczynnie wpływa na stężenia cholesterolu we krwi, trzeba zauważyć, że 8-krotne zwiększenie ilości przyjmowanych fitosteroli pozwala na uzyskanie opisywanego efektu. Należy jednak pamiętać, że fitosterole mogą ulegać reakcji utleniania, prowadzącej do powstawania toksycznych oksyfitosteroli, o których będzie mowa w dalszej części artykułu.

Najistotniejszym i najlepiej poznany zoosterolem jest cholesterol (cholest-5-en-3 β -ol), występujący we wszystkich komórkach ssaków (rysunek 2). To prekursor kwasów żółciowych, witaminy D₃, hormonów sterydowych, występuje w komórkach nerwowych, jest kluczowym składnikiem błony komórkowej pośredniczącym w jej płynności oraz



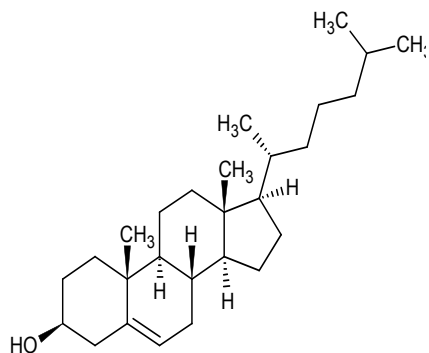
stigmasterol



β -sitosterol

Rysunek 1. Wzory strukturalne popularnych fitosteroli / *Structural formula of popular phytosterols*

przepuszczalności [Otaegui-Arrazola i in. 2010; Hur i in. 2007]. Cholesterol jest również składnikiem lipoprotein, zaangażowanych w transport i metabolizm tłuszczów w organizmie. Wyróżnia się kilka transporterów cholesterolu: lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości (ang.



Rysunek 2. Wzór strukturalny cholesterolu / *Structural formula of cholesterol*

Very Low Density Lipoproteins, VLDL), lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL), w skład których wchodzi 60% całkowitego cholesterolu we krwi, oraz lipoproteiny o dużej gęstości (ang. *High Density Lipoproteins*, HDL).

Lipoproteiny LDL są odpowiedzialne za transport cholesterolu z wątroby do wszystkich komórek ciała, natomiast HDL transportują cholesterol z tkanek do wątroby. Transport nadmiaru lipoprotein o niskiej gęstości do wątroby zapobiega odkładaniu się nadmiaru tłuszczu na ścianach naczyń krwionośnych, dlatego też lipoproteiny HDL są potocznie zwane *dobrym cholesterol*. Normy dotyczące poziomu cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu LDL w osoczu osób zdrowych i osób z grupy najwyższego ryzyka (osoby z chorobami sercowo-naczyniowymi, szczególnie na podłożu miażdżycowym oraz z cukrzycą) zostały ustalone przez Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne w 2012 roku (tabela 1). Gdy stężenie cholesterolu frakcji LDL w osoczu przekroczy optymalny poziom, ryzyko powstania miażdżycy jest bardzo wysokie [Skoczyńska 2005]. Istotny jest zarówno stosunek frakcji HDL i LDL cholesterolu, jak i proporcja między całkowitym stężeniem cholesterolu a tym zawartym w lipoproteinach o dużej gęstości. W arteriosklerozie nadmiar tłuszczu, odkładając się w komórkach ścian naczyń krwionośnych, tworzy tzw. blaszki miażdżycowe, które zwężają światło tętnic (najczęściej wieńcowych). To zaś powoduje zwiększenie ciśnienia krwi lub całkowite zatrzymanie jej przepływu. Hypercholesterolemia (podwyższone stężenie cholesterolu we krwi) to główny czynnik wystąpienia choroby niedokrwiennej serca oraz zawału serca, które są najczęstszymi przyczynami zgonów w Europie [Nichols i in. 2012].

Tabela 1. Dopuszczalne wartości poziomu cholesterolu w osoczu ludzkim
Acceptable levels of cholesterol in blood plasma

Grupa	Poziom cholesterolu całkowitego	Poziom cholesterolu LDL
Osoby zdrowe	< 5 mmol L ⁻¹ (190 mg dl ⁻¹)	< 3 mmol L ⁻¹ (115 mg dl ⁻¹)
Osoby z grupy najwyższego ryzyka	< 4,5 mmol L ⁻¹ (175 mg dl ⁻¹)	< 2,5 mmol L ⁻¹ (100 mg dl ⁻¹)

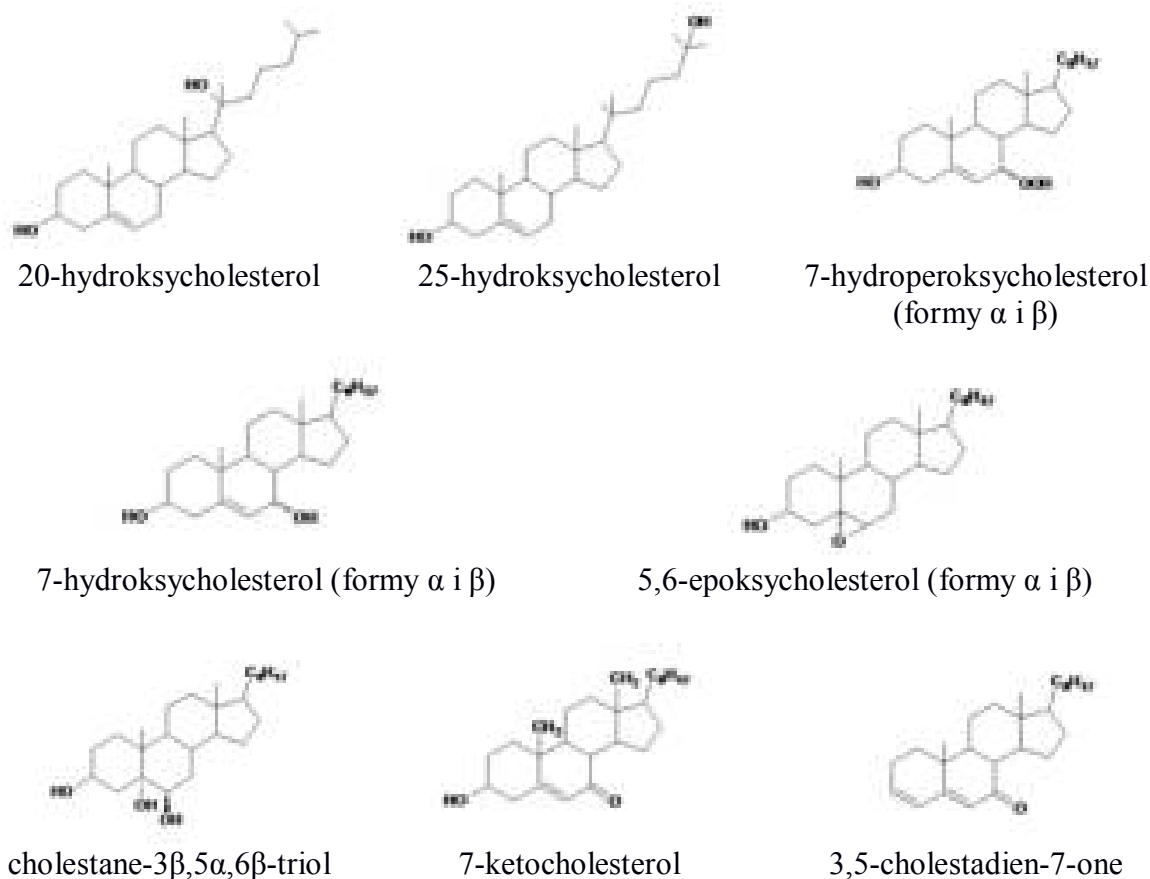
Czynnikami wpływającymi na poziom cholesterolu we krwi są: genetyka, nadwaga, tryb życia (przewlekły stres, palenie papierosów, uprawianie sportu). Istotnym czynnikiem jest również sposób odżywiania się. Choć cholesterol pochodzący z diety stanowi jedynie 33% cholesterolu w organizmie człowieka, to należy ograniczać jego spożycie, ponieważ jest on głównym substratem do produkcji oksysteroli wpływających na pojawienie się poważnych chorób. 27-węglowe produkty pośrednie lub końcowe degradacji cholesterolu pod wpływem tlenu są bardziej polarne niż związek macierzysty, co pozwala na łatwe przedostawanie się ich przez błony lipofilne do wnętrza komórek. Oksycholesterole wykazują patofizjologiczną biochemiczną aktywność nawet o dwa rzędy wielkości wyższą niż cholesterol [Poli i in. 2013]. Badania na szczurach wykazały, że utlenione pochodne cholesterolu są wchłaniane w większym stopniu (92%) niż sam związek macierzysty (75%). Doświadczenia na zwierzętach dostarczyły danych świadczących o negatywnym wpływie utlenionych kwasów tłuszczowych oraz utlenionego cholesterolu pochodzących z diety na zdrowie organizmów żywych – poprzez uszkodzenia i wynikające z tego dysfunkcje makrofagów, komórek mięśni gładkich i nabłonkowych zapoczątkowują one powstawanie, a następnie prowadzą do szybkiego rozwoju zmian miażdżycowych [Staprans i in. 2000; Staprans i in. 1998]. Oksysterole hamują także syntezę DNA oraz biosyntezę cholesterolu, zaburzają działanie błon komórkowych, mają również działanie mutagenne, kancerogenne, cytotoksyczne i immunosupresyjne oraz są łączone z chorobą Alzheimera i Parkinsona [Poli i in. 2013; Gamba i in. 2011; Derewiaka, Obiedziński 2009; Johnson 1996].

Powstawanie utlenionych form steroli

Różnice strukturalne między fitosterolami a cholesterolem widoczne są w budowie łańcucha bocznego: przy węglu w pozycji 24 w roślinnych sterolach obecny jest dodatkowy podstawnik, a między C22 i C23 w niektórych z nich występuje podwójne wiązanie. Nienasycone wiązanie podwójne w rdzeniu między piątym a szóstym węglem występuje we wszystkich sterolach, w związku z czym są one podatne na utlenianie, w wyniku którego powstają oksysterole. Jeśli utlenianym substratem był cholesterol, mówimy o oksycholesterolach lub produktach utleniania cholesterolu (PUC, ang. *Cholesterol Oxidation Products*, COP), natomiast jeśli jest nim fitosterol, związki takie noszą nazwę oksyfitosterole, czyli produkty utleniania fitosteroli (PUF, ang. *Phytosterol Oxidation Products*, POP).

Gdy cholesterol jest narażony na dostęp powietrza, powoli utlenia się do epimerycznej mieszaniny 7-hydronadtlenków. One zaś ulegają rozpadowi na 7 α - i 7 β -hydroksysterole

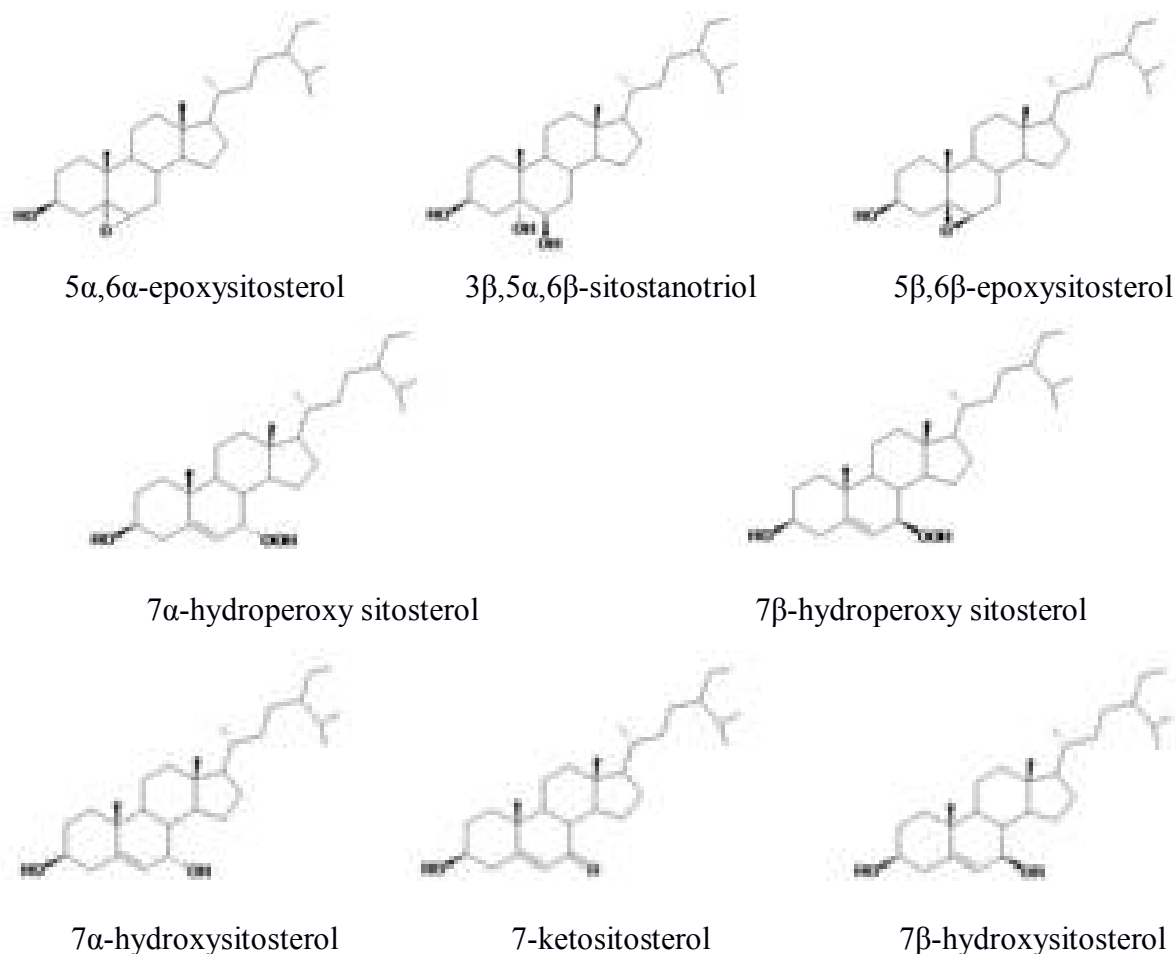
(7 α - i 7 β OH) oraz 7-ketocholesterol (7K). Podczas epoksydacji cholesterolu powstają 5,6 α -epoksy-5 α - oraz 5,6 β -epoksy-5 β -cholestan-3 β -ole (α - i β -EPOX). Uwodnienie epoksysterolu prowadzi do wytworzenia 5 α -cholestan-3 β ,5,6 β -triolu (TRIOI) (rysunek 3). Istnieje również możliwość utlenienia się łańcucha bocznego, co prowadzi do otrzymania rozmaitych 20-, 24-, 25- i 26-wodoronadtlenków. Ma to najczęściej miejsce podczas autooksydacji krystalicznego cholesterolu [Johnson 1996]. W osoczu ludzkim najczęściej spotykanymi oksysterolami są 27OH, 24OH oraz 7 α OH. Większość z nich jest estryfikowana przez lecytynę (acylotransferazę cholesterolu) do kwasów tłuszczowych w pozycji 3 β [Brown, Jessup 1999]. Produkty utleniania steroli występują również w miedzioutlenionych lipoproteinach o niskiej gęstości i obejmują przede wszystkim 7K, 7-wodorotlenek cholesterolu (7OOH), 7OH oraz EPOX. Lipoproteiny LDL mogą być utleniane także podczas kontaktu z makrofagami lub przez inkubację z lipooksygenazą i wtedy akumulują one 7OOH [Tabas 2002].



Rysunek 3. Struktury wybranych oksysteroli
Structural formula of oxysterols

Istnieją trzy źródła oksysteroli obecnych w organizmie ludzkim: a) dieta (najczęściej bogata w produkty przetworzone lub poddane obróbce), b) enzymatyczna lub

nieenzymatyczna transformacja *in vivo* steroli do oksysteroli w komórkach oraz c) utlenienie *in vivo* (w skórze) produktów kosmetycznych zawierających fitosterole. Z diety pochodzą głównie 7K, 7OH, EPOX. Oksysterole pochodzenia endogennego mogą powstawać na drodze nieenzymatycznej oraz enzymatycznej (rzadziej). Droga enzymatyczna powstawania oksysteroli polega na utlenianiu związku macierzystego za pośrednictwem 24-hydroksydazy cholesterolu (głównie w mózgu) oraz 27-hydroksydazy i 7 α -hydroksylazy cholesterolu (w różnych tkankach, np. wątroba, siatkówka oka, komórki nerwowe mózgu, makrofagi). Przemiana nieenzymatyczna cholesterolu polega natomiast na ataku poprzez reaktywne formy tlenu (RFT) w postaci rodników peroksyłowych i alkoksyłowych lub na utlenianiu cholesterolu podczas procesów zapalnych przez system leukocyty-H₂O₂-HOCl. W przypadku nieenzymatycznego utleniania cholesterolu dochodzi do utlenienia pierścienia sterolu i powstania 7K, 7 β OH, α - i β -EPOX, a podczas enzymatycznej reakcji powstaje 7 α OH oraz produkty utleniania łańcucha bocznego, np. 24OH czy 27OH [Poli i in. 2013; Hur i in. 2007; Tabas 2002].



Rysunek 4. Struktury wybranych oksysteroli
Structural formula of oxysterols

Doniesień naukowych na temat procesu utleniania fitosteroli w organizmie ludzkim jest o wiele mniej niż tych dotyczących utleniania cholesterolu. Sugerowane jest, że PUF tworzone są podobnie jak PUC – podczas nieenzymatycznej oksydacji następuje utlenianie pierścienia, natomiast przemiany enzymatyczne prowadzą do utlenienia łańcucha bocznego. Nie ma jednak na to wielu dowodów w postaci badań na ludziach. Należy zauważyć, że różnica w budowie między fitosterolami a cholesterollem, polegająca na obecności grupy alkilowej w pozycji C24, może powodować ograniczenia tworzenia się 25- lub 27OH, ponieważ grupa alkilowa umożliwia stereospecyficzną 24S-hydroksylację [Hovenkamp i in. 2008]. Struktury wybranych oksyfitosteroli przedstawiono na rysunku 4.

Oksysterole a organizmy żywe

Obecność i wpływ na zdrowie człowieka produktów utleniania steroli są badane od II połowy XX wieku. W 1966 roku Brooks wykrył PUC w blaszkach miażdżycowych pochodzenia ludzkiego i właśnie to odkrycie zapoczątkowało intensywne badania dotyczące tych związków, natomiast w latach 90. stało się możliwe badanie oksycholesteroli w osoczu ludzkim [Breuer, Björkhem 1990]. Aktualnie profil badań nad tymi związkami jest bardzo szeroki i obejmuje przede wszystkim: ich zawartość w produktach spożywczych, możliwe przemiany chemiczne, działanie na komórki zwierzęce i ludzkie *in vitro* oraz *in vivo*. Analizy PUF w aspekcie zdrowia ludzkiego zostają przeprowadzone prawie 20 lat później, bo dopiero w 1983 roku, kiedy to podczas badań osocza pacjentów chorych na makroglobulinemię Waldenströma wykryto α - i β -epoksysitosterol, które do tej pory nie były oznaczane w próbkach pochodzenia ludzkiego [Brooks i in. 1983]. Do 2004 roku oksyfitosterole były analizowane jedynie w próbkach osób chorych, natomiast badania André Grandgirarda były przełomem, ponieważ wykrył on wraz ze swoim zespołem badawczym omawiane związki również w materiale pochodzącym od zdrowych ludzi [Grandgirard i in. 2004].

1. Produkty utleniania cholesterolu

Naukowcy zdecydowanie uznają oksycholesterole za czynniki wzmagające reakcje zapalne poprzez wywołanie ekspresji i syntezy cytokinin zapalnych, chemokinin i cząsteczek adhezyjnych. Ekspresja wspomnianych molekuł jest zależna od aktywności czynnika jądrowego κ B – białka transkrypcyjnego – który jest silnie regulowany przez PUC za pomocą aktywacji kinazy białkowej C, czyli kinazy zewnątrzkomórkowej sygnałowo-regulatorowej. Stan zapalny jest głównym źródłem progresji i powikłań wielu przewlekłych chorób. Charakterystyczna dla stanów zapalnych aktywacja fagocytów prowadzi do zwiększenia

poziomu reaktywnych form tlenu, które wzmacniają istniejący stan zapalny. Takie „błędne koło” podtrzymuje i zwiększa proces zapalny [Poli i in. 2013].

Najczęściej opisywaną chorobą wynikającą z pojawienia się oksysteroli w organizmie ludzkim jest miażdżycyca. Najprawdopodobniej czynnikiem, który zapoczątkowuje tworzenie się blaszki miażdżycowej, jest uszkodzenie śródbłonna naczyń, w miejscu którego gromadzą się monocyty. Przemieszczają się one do ściany naczynia i różnicują się w makrofagi. Pobudzone monocyty oraz makrofagi produkują RFT, utleniające lipoproteiny, które są następnie wychwytywane przez receptory zmiatacze dla zmodyfikowanych LDL. Tak tworzą się komórki piankowate, czyli komórki wypełnione lipidami pochodzącymi z uszkodzonych przez reaktywne formy tlenu lipoprotein o niskiej gęstości. Komórki piankowate prowadzą do powstania blaszki miażdżycowej [Bałasińska, Mazur 2004]. Wykazano, że $7\alpha\text{OH}$, $7\beta\text{OH}$ oraz 7K wywołują fenotyp zapalny w komórkach śródbłonna, a 7K indukuje również tworzenie komórek piankowatych [Poli i in. 2013].

Sposób inicjacji utleniania LDL nie jest do końca jasny. Połowa występujących w fosfolipidach LDL reszt kwasów tłuszczowych pochodzi z tłuszczów nienasyconych, dlatego zakłada się, że zmianie ulega część białkowa apolipoproteiny B przez produkty utleniania jej części lipidowej [Bałasińska, Mazur 2004; Khan i in. 1995; Steinberg, Witztum 1990]. Podczas utleniania lipoprotein o niskiej gęstości zachodzi reakcja enzymatyczna katalizowana przez 15-lipoksygenazę, podczas której ma miejsce wymiana utlenionych lipidów między lipoproteinami. Stężenie chylomikronów (lipoprotein bogatych w trójglicerydy) w limfie i stężenie utlenionych lipidów w endogennych lipoproteinach (np. LDL, VLDL) jest ściśle powiązane ze stężeniem utlenionych lipidów pochodzących ze spożytego pokarmu – utlenione kwasy tłuszczowe są przenoszone przez chylomikrony do wątroby i wbudowywane do lipoprotein o bardzo małej gęstości. Podwyższone stężenie trójglicerydów w osoczu krwi, charakterystyczne dla lipemii postprandialnej, także, obok zwiększonego ryzyka rozwoju choroby Alzheimera oraz Parkinsona, jest związane z miażdżycą [Poli i in. 2013; Bałasińska, Mazur 2004]. Po strawieniu pokarmu, tłuszcze pokarmowe zostają rozprowadzone do różnych części organizmu przez chylomikrony oraz chylomikrony resztkowe (czyli pozostałości (remnanty) chylomikronów, które powstały podczas aktywności lipazy lipoproteinowej). Okres postprandialny trwa od 4 do 6 godzin i jest uzależniony od równowagi między wchłonięciem tłuszczu z jelita a wychwyceniem chylomikronów resztkowych przez wątrobę. Zaburzenie metabolizmu lipoprotein bogatych w trójglicerydy oraz wydłużony czas obecności remnantów w krążącej krwi mogą prowadzić do uszkodzenia śródbłonna naczyń, a następnie do pojawienia się blaszki miażdżycowej

[Bałasińska i in. 2004]. Należy wspomnieć, że chylomikrony resztkowe powodują obniżenie ekspresji receptorów LDL w wątrobie, dlatego też podwyższone stężenie trójglicerydów w osoczu może spowodować wyższe stężenia LDL. Dodatkowo podczas przedłużonego okresu lipemii wymiana cholesterolu oraz kwasów tłuszczowych między chylomikronami, LDL oraz HDL zwiększa się. Naukowcy sugerują, że pozostałości chylomikronów mogą powodować estryfikację cholesterolu i gromadzenie się powstałych estrów w makrofagach i komórkach mięśni gładkich ścian naczyń krwionośnych [Bae i in. 2001; Jagła, Schrezenmeir 2001]. Chylomikrony biorą także udział w akumulowaniu lipidów w ścianach naczyń w miejscach zmienionych miażdżycowo, ponieważ gdy przenikną one przez śródbłonek, lipaza hydrolizująca tłuszcze powoduje zwiększenie ich adherencji do ściany [Zilversmit 1979].

Vine [1998] wraz ze współpracownikami badała na królikach krótkoterminowy wpływ oksysteroli z diety na poziom cholesterolu i oksysteroli w lipoproteinach oraz aorcie. U zwierząt karmionych dietą zawierającą cholesterol wraz z oksysterolami stężenie α -epoksycholesterolu i 7-ketocholesterolu w lipoproteinach bogatych w trójglicerydy (ang. *Triglyceride-rich Lipoproteins*, TRL) było odpowiednio 5- i 2-krotnie wyższe niż u królików karmionych dietą z oczyszczonym cholesterolem. Dodatkowo, w próbkach otrzymanych od wspomnianych zwierząt badacze zanotowali 64% wzrost całkowitego aortalnego cholesterolu, ale niższe stężenie cholesterolu w osoczu w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej. Wyniki te dowodzą, że dieta zawierająca oksysterole zdecydowanie zwiększa ryzyko miażdżycy. Podobne badania przeprowadził Staprans i wsp. [2000]. Testom poddane zostały myszy z defektem genetycznym polegającym na braku receptorów LDL i apolipoproteiny E. Zwierzęta z defektem oraz bez niego przez 4 do 7 miesięcy były karmione dietą z dodatkiem cholesterolu (oczyszczonego oraz z formami utlenionymi). Gdy w diecie zawarty był utleniony cholesterol, zwierzęta miały większe nacieki tłuszczowe na ścianach aorty. Badania przeprowadzone na królikach potwierdzają przedstawione powyżej wyniki – u zwierząt karmionych dietą zawierającą cholesterol z jego utlenionymi pochodnymi wzrost nacieków tłuszczowych na ścianach aorty wynosił 100% [Staprans i in. 1998]. Eksperyment na gołębiach również potwierdził toksyczne działanie utlenionego cholesterolu. Jacobson wraz ze współpracownikami [1985] przez 3 miesiące przymusowo karmili białe gołębie Carneau dietą zawierającą cholesterol lub cholesterol ze śladową ilością cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triolu. W doświadczeniu badano wapń i lipidy aortalne oraz histopatologię wieńcową. Całkowity cholesterol w aorcie, estry cholesterolu oraz stosunek estrów cholesterolu do cholesterolu były podobne w przypadku gołębi z obu grup. Akumulacja wapnia w aorcie u gołębi

karmionych cholesterolem była o 40% mniejsza niż u grupy gołębi karmionej dietą zawierającą oksysterole. Miazdzyce tętnic wieńcowych badano poprzez analizę średniego procentowego zwężenia światła naczynia. U gołębi karmionych dietą z triołem cholesterolu wyniki były na poziomie prawie dwa razy wyższym niż w grupie karmionej czystym cholesterolem. Wyniki wykazały, że dieta z cholestane-triolem jest bardziej aterogenna niż dieta zawierająca jedynie czysty cholesterol – spowodowała ona wzrost zwężenia naczyń krwionośnych o 87%. Meynier ze swoją grupą badawczą [2002] przeprowadzili badania na chomikach hiperlipidemicznych karmionych przez 3 miesiące trzema rodzajami diety: niskotłuszczową, wysokotłuszczową zawierającą cholesterol oraz wysokotłuszczową wzbogaconą w oksysterole (mieszanina PUC była w dawce $0,1 \text{ g kg}^{-1}$ diety). Gdy dieta zawierała oksysterole, zgrubienia ścian naczyń krwionośnych, zostały wykryte uszkodzenia śródbłonna oraz proliferacja i migracja komórek mięśni gładkich [Meynier i in. 2002].

Linseisen i Wolfram [1998] w 9-godzinnym eksperymencie badali wchłanianie produktów utleniania cholesterolu z diety w ludzkim osoczu. Posiłek składał się z salami, parmezanu oraz białego chleba. Zawierał on łącznie 0,84 mg wolnych (nieestryfikowanych) produktów utleniania cholesterolu i 2,64 mg zestryfikowanych PUC. Cholesterol w 76% był w postaci wolnej. Wyniki wykazały, że maksymalny poziom wolnych oksysteroli w osoczu zostaje wykryty przed najwyższym stężeniem całkowitej zawartości PUC po spożyciu posiłku, co sugeruje lepszą wchłanialność wolnych form pochodnych cholesterolu. W osoczu występowały głównie: 7OH (formy α i β) oraz 7K. W lipoproteinach o bardzo niskiej gęstości przez 6 h obserwowano stały wzrost stosunku zawartości oksysteroli do cholesterolu. Wzrost stężenia całkowitego cholesterolu oraz całkowitego PUC w surowicy były podobne. Naukowcy porównali również skład PUC w chylomikronach i w testowanym posiłku. W chylomikronach znaleziono TRIOL, 7K, i α -EPOX (ale mniej), 7 β OH nie wykryto. Te wyniki potwierdzają przypuszczenia, że produkty utleniania cholesterolu pochodzące z diety są przyswajane w ludzkim układzie pokarmowym [Linseisen, Wolfram 1998].

W doświadczeniach wykorzystujących modele *in vitro* stwierdzono, że 24OH wchodzi w reakcję z amyloidem A β_{1-24} (peptydem dwóch różnych linii komórek neuronowych) przez silny wzrost wewnątrzkomórkowego RFT w stanie równowagi. Wyniki pokazują, że amyloid A β wymaga utworzenia oligomerów, by aktywować swoją neurotoksyczność, co jest amplifikowane poprzez równowagę utleniająco-redukcyjną. Stres oksydacyjny lub peroksydację lipidów można wiązać ze źródłami choroby Alzheimerera. Ponadto 27OH jest opisywany jako potencjalnie toksyczny, choć często wykazuje niższą neurotoksyczność w porównaniu z 24OH. W badaniach dotyczących choroby Parkinsona znaleziono

zwiększone ilości oksysteroli (24OH, 27OH, 7 α OH, 7 β OH, β -EPOX oraz 7K) selektywnie zlokalizowane w korze wzrokowej. Wyniki wskazują, że oksysterole pochodzenia zarówno enzymatycznego, jak i nieenzymatycznego odgrywają istotną rolę w chorobach mózgu [Poli i in. 2013]. Są również badania dotyczące powiązania oksysteroli z przewlekłymi stanami zapalnymi, np. z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i chorobą Leśniowskiego-Crohna. Wykazano, że mieszanina oksysteroli (7K, 7 α OH, 7 β OH, α EPOX i β EPOX) otrzymana z podgrzanego cholesterolu z żywności doprowadziła do śmierci apoptotycznej komórek Caco-2 [Poli i in. 2013].

2. Produkty utleniania fitosteroli

W literaturze dostępne są również opisy badań nt. wpływu oksyfitosteroli na organizmy żywe. Schött i wsp. [2015] w trwającym 28 dni badaniu na samcach myszy z niedoborem apolipoproteiny E porównywali dystrybucję oraz absorpcję (w osoczu, tkankach mózgu i wątroby) sitosterolu oraz β -hydroksysitosterolu. U myszy, u których następowała iniekcja sitosterolu, bezwzględna całkowita zawartość sitosterolu w osoczu była 2,8-krotnie większa w porównaniu z próbą kontrolną (myszy, które nie otrzymały oksyfitosteroli). Dodatkowo u myszy z tej grupy (w porównaniu z próbą kontrolną) odnotowano obniżenie zawartości całkowitego cholesterolu w osoczu o 32,1%, 1,7- oraz 7,2-krotny wzrost całkowitej zawartości sitosterolu odpowiednio w mózgu i wątrobie. Podanie myszom 7 β -hydroksysitosterolu spowodowało (w porównaniu z próbą kontrolną): 20-krotnie wyższą bezwzględną całkowitą zawartość 7 β -hydroksysitosterolu w osoczu, 42,7- oraz 65,8-krotny wzrost całkowitej zawartości 7 β -hydroksysitosterolu odpowiednio w wątrobie i mózgu. Jako zastępczy marker absorpcji cholesterolu w osoczu analizowany był stosunek kampasterolu do cholesterolu. Podanie myszom sitosterolu powoduje obniżenie tego wskaźnika o 16,2%, natomiast iniekcja 7 β -hydroksysitosterolu zmniejsza wartość stosunku kampasterolu do cholesterolu o 24,5%, a więc sitosterol jak i jego tlenowa pochodna obniżają absorpcję cholesterolu w osoczu. Wyniki badań zespołu badawczego pod kierownictwem Schötta wskazują, że sitosterol i 7 β -hydroksysitosterol wpływają na metabolizm cholesterolu w osoczu i w tkankach narządów wewnętrznych na różne sposoby. Oksyfitosterol jako związek polarny może pokonać barierę krew-mózg z większą efektywnością w porównaniu z sitosterolem [Schött i in. 2015].

Kolejne badania porównujące wchłanianie PUF z pożywienia przeprowadziła na chomikach Grandgirard [2004]. Chomiki były podzielone na cztery grupy (kontrolna oraz 3 z coraz większą zawartością PUF: 100, 500 oraz 2500 ppm PUF w diecie). Badana była

zawartość oksyfiteroli w tłuszczu pochodzącym z osocza, aorty i 3 głównych narządów organizmów żywych – wątroby, nerki i serca. Zwierzęta z grupy otrzymującej wysokie stężenie produktów utleniania fitosteroli (500 oraz 2500 ppm) wykazywały bardzo dużą zawartość PUF (7 β -hydroksykampesterol, β -epoksyskampesterol, 7-ketokampesterol, kampestanetriol, 7 β -hydroksysitosterol, β -epoksysitosterol, 7-ketositosterol oraz sitostanetriol) w analizowanych próbkach z każdej tkanki. Zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupie otrzymującej najniższe stężenie utlenionych fitosteroli jedynie sitostanetriol był obecny w próbkach, co może sugerować, że zwierzęta te mają trudności w eliminowaniu tego związku z organizmu lub jego wysoką wchłaniania. Można również zauważyć, że największe stężenie tych toksycznych związków występuje w aorcie, nerce oraz sercu, co sprzyjać może pojawieniu się poważnych chorób, takich jak miażdżyca czy zawał [Grandgirard i in. 2004].

Brooks i wsp. [1983] podczas badań osocza pacjentów chorych na makroglobulinemię Waldenströma analizowali zawartość oksycholesteroli. Zastosowana metoda pozwoliła również wykryć związek, którym wg badaczy był α - i β -epoksysitosterol. Nie był on do tej pory analizowany w próbkach ludzkich, a naukowcy postawili hipotezę, że jest on obecny jedynie u osób chorych. Jednak Grandgirard i wsp. w 2004 roku oznaczyli w próbkach osocza zdrowych ludzi znaczące ilości 5 β ,6 β -epoksysitostanolu i 3 β ,5 α ,6 β -sitostanetriolu. W próbkach badanych obecne były również, choć na niższym poziomie, 5 α ,6 α -epoksysitostanol, 3 β ,5 α ,6 β -kampestanetriol i 7-ketositosterol. Plat i wsp. [2001] badali natomiast zawartość oksysteroli w osoczu osób chorych na sitosterolemię. Pacjenci tacy charakteryzują się podwyższonym poziomem steroli roślinnych we krwi, ponieważ występuje u nich równocześnie zwiększone wchłanianie jelitowe oraz zmniejszone wydzielanie z żółcią neutralnych steroli. W serum chorych pacjentów najwyższe stężenie osiągnął 5 α ,6 α -epoksysitosterol, w dalszej kolejności były 7-ketositosterol, 7 β -hydroksystigmasterol oraz 3 β ,5 α ,6 β -sitostanetriol. Badacze wskazują, że w dwóch różnych emulsjach lipidowych na bazie oleju sojowego zawarte są właśnie te same oksysterole, które zostały oznaczone w osoczu osób chorych. Porównując wyniki uzyskane przez zespoły pod kierownictwem Grandgirarda i Plata, można wnioskować, że różnica rodzajów i stężenia oksyfiteroli koreluje z różnymi źródłami tych związków – w przypadku chorych na sitosterolemię głównym źródłem będzie dieta. Tonello dodatkowo proponuje wyjaśnienie tych różnic możliwą oksydacją (katalizowaną światłem UV) fitosteroli na skórze, zaabsorbowanych z produktów kosmetycznych [Tonello 2006].

Nie można jednak oceniać wpływ oksysteroli na organizmy żywe w sposób jednostronny. Oksycholesterole uczestniczą w regulacji homeostazy cholesterolu w organizmie. Badania wskazują również na możliwe zaangażowanie niektórych PUF w modulację metabolizmu cholesterolu poprzez aktywację receptorów wątrobowych X i przyrost ekspresji transporterów ABC [Otaegui-Arazola i in. 2010]. Weingärtner i wsp. [2015] prowadzili badania na myszach, podczas których po 4 tygodniach karmienia dietą zachodnią dostawały one zastrzyk dootrzewnowy zawierający sterole (cholesterol, sitosterol, 7 β OH-cholesterol, 7 β OH-sitosterol) lub cyklodekstran – grupa kontrolna. Poziomy cholesterolu w osoczu nie zmieniły się znacząco po podaniu steroli w stosunku do grupy kontrolnej. Podanie cholesterolu lub sitosterolu, a więc nieutlenionych steroli, nie spowodowało podwyższenia się stężenia oksysteroli w osoczu, co może sugerować brak utleniania endogennego substratu. W ścianie tętnic średnie stężenie cholesterolu nie zwiększyło się po zaaplikowaniu tego sterolu, natomiast stężenia sitosterolu i 7 β OH-sitosterol wzrosły po zastosowaniu każdego z nich. Co ciekawe, zastosowanie 7 β OH-cholesterolu nie zmieniło stężenia tego oksysterolu w ścianie tętnic, natomiast podwyższyło jego stężenie w plazmie. Stres oksydacyjny (produkcja reaktywnych form tlenu) w aorcie był podwyższony jedynie u myszy traktowanych 7 β OH-sitosterolem. Badania przeprowadzone przez zespół Weingärtnera dostarczają interesujących wyników, ponieważ zmiany stężenia steroli w osoczu i tkankach aorty nie wykazały wpływu na dysfunkcję śródbłonna i rozwój zmian miażdżycowych [Weingärtner i in. 2015].

Większość przytoczonych powyżej badań na zwierzętach oraz ludziach dowodzi negatywnego wpływu oksysteroli na organizmy żywe. Można wyciągnąć wnioski, że zarówno PUC, jak i PUF są niebezpieczne dla zdrowia i życia człowieka. Stąd też potrzeba kładzenia nacisku na intensywne badania i zapobieganie wysokim stężeniom oksysteroli w pożywieniu, ponieważ jest to jedyne źródło tych związków w organizmie, na który mamy istotny wpływ.

Oksysterole w żywności

1. Trudności i błędy w oznaczaniu

Czynnikami wpływającymi na utlenianie steroli są: dostęp tlenu, światła, podwyższona temperatura, czas ogrzewania, promieniowanie, występowanie w analizowanym produkcie nienasyconych kwasów tłuszczowych, wody, enzymów, jonów metali (np. Fe, Cu, Co, Mg, Ni), barwników naturalnych (np. chlorofil), obecność wolnych rodników oraz nadtlenków, warunki pakowania i przechowywania [Derewiaka, Obiedziński 2009; Hur i in. 2007; Johnson 1996]. Oddziaływanie tak wielu czynników na opisywany proces utleniania steroli

ma wpływ na obecność SOPs w produktach spożywczych – zależnie od warunków przechowywania, poddawania ich działaniu wysokiej temperatury czy składu matrycy możliwe są bardzo zróżnicowane zawartości tych związków w tym samym typie produktów. Oznaczanie oksysteroli jest trudne, ponieważ ich zawartość jest zazwyczaj 10^3 razy mniejsza niż cholesterolu w próbce, który może być czynnikiem interferującym podczas analizy oksycholesteroli za pomocą GC [Griffiths i in. 2013]. Produkty utleniania są problematyczne do oznaczania również dlatego, że podczas procesu izolacji cholesterolu dochodzi do jego samoutleniania i powstania oznaczanych związków. Powoduje to zafałszowanie wyników, gdyż badacze analizują łącznie produkty utleniania cholesterolu z próbki i sztucznie wytworzone podczas przygotowań próbki do analizy. Busch i King [2009] zestawiają wszelkie możliwe czynności wykonywane podczas przygotowania próbki do analizy, które mogą wpłynąć na tworzenie się artefaktów oksysteroli. Tak jak wcześniej wspomniano, należy zminimalizować dostęp powietrza, światła czy obecność jonów metali, aby wynik był wiarygodny. Ponadto bardzo istotne są warunki prowadzenia eksperymentu, tj. warunki ekstrakcji cieczonej oraz do fazy stałej na dalszym etapie procedury analitycznej, saponifikacji (temperatura, czas, reagenty i ich stężenie), wpływ matrycy próbki, warunki derywatywacji oraz parametry analizy. Możliwe jest jednak zminimalizowanie powstawania PUC w trakcie przygotowania próbki za pomocą hydrolizy estrowej, ekstrakcji i derywatywacji w atmosferze argonu i oddzielenia oksysteroli od cholesterolu zaraz po hydrolizie, a przed derywatywacją [Griffiths i in. 2013; Busch, King 2009]. Do zafałszowania wyników dochodzi zwłaszcza podczas zmydlania, ponieważ występują dwa czynniki degradacyjne dla cholesterolu – podwyższona temperatura oraz czynniki silnie zasadowe [Johnson 1996]. Należy także monitorować zmiany zachodzące podczas przygotowania próbki, np. na początku można przygotować i zanalizować próbkę zawierającą standardy produktów utleniania cholesterolu, aby móc skorelować otrzymane wyniki z prawdziwą zawartością PUC w próbce.

2. Produkty utleniania steroli w diecie

Jak wcześniej wspomniano, w wielu publikacjach nieprawidłowości budowy śródbłonka naczyniowego tłumaczone są utlenionymi resztami kwasów tłuszczowych, które są zawarte w chylomikronach resztkowych. Ich obecność w organizmie ludzkim może wynikać z reakcji zachodzących w przewodzie pokarmowym (jelicie) lub z obecności oksysteroli w diecie. Fitosterole są wchłaniane w mniejszym stopniu niż cholesterol – mniej niż 5% w przypadku β sitosterolu, 16% dla kampasterolu w porównaniu z 56% dla cholesterolu. Nie ma jednak

jednoznacznych badań mówiących o podobnej zależności związanej z produktami utleniania steroli [Hovenkamp i in. 2008]. Do oksysteroli występujących w zmianach miażdżycowych zalicza się głównie 27OH i 7K oraz w mniejszym stopniu również 7OH, natomiast w osoczu większość oksysteroli występuje w postaci zestryfikowanej [Brown, Jessup 1999]. PUC w diecie stanowią ok. 1% zawartości całkowitego cholesterolu. Oksysterolami najczęściej występującymi w pożywieniu są: 7OH, 7K, EPOX i TRIOL, a więc produkty utleniania rdzenia steranu, natomiast w mniejszych ilościach znajdowane są produkty utleniania łańcucha bocznego takie jak 19-, 20-, 24- i 25-OH [Otaegui-Arrazola i in. 2010; Hur i in. 2007]. Potencjalnie największym źródłem utlenionych lipidów jest codzienna dieta zawierająca żywność wstępnie przetworzoną lub produkty z restauracji typu „fast food” [Hur i in. 2007; Bałasińska, Mazur 2004].

Obróbka termiczna produktu powoduje zwiększenie się zawartości oksysteroli. Żywność, która była poddana głębokiemu smażeniu, wchłania tłuszcz, który ostatecznie może stanowić nawet 33% suchej masy produktu. Używanie oleju podczas przygotowywania posiłku implikuje najsilniejsze utlenianie tłuszczów zawartych w produkcie [Bałasińska, Mazur 2004]. W trakcie smażenia oleju mamy do czynienia z bardzo wysoką temperaturą i ciągłym dostępem powietrza, co intensyfikuje reakcje utleniania. Implikuje to powstanie ok. 200 lotnych oraz nielotnych produktów rozkładu hydroksynadtlenków lipidowych [Bałasińska, Mazur 2004; Linseisen, Wolfram 1998; Frankel i in. 1984]. W konsekwencji w żywności poddanej głębokiemu smażeniu stężenie nadtlenków może osiągnąć nawet 600 ng/kg. Wielu naukowców badało wpływ obróbki termicznej na zawartość oksysteroli. Xu wraz ze współpracownikami [2009] udowodnili, że PUF są nietrwałe termicznie. Proces utleniania fitosterolu był podobny do utleniania zoosterolu pod względem czasu i produktów. Głównymi pochodnymi zarówno cholesterolu, jak i β -sitosterolu były: 7K, 7OH, EPOX. Zaobserwowano, że spożycie tłuszczów (olej sojowy, olej kukurydziany, bekon, jaja) poddanych uprzednio działaniu wysokich temperatur powoduje wzrost stężenia nadtlenków lipidowych po posiłku w osoczu krwi nawet do 700% [Ursini i in. 1998; Staprans i in. 1994; Naruszewicz i in. 1987]. Wyniki badań pokazują także, że produkty utleniania tłuszczów (kwasów tłuszczowych, cholesterolu) są łatwo wchłaniane w układzie pokarmowym na poziomie jelita cienkiego oraz że po spożytym posiłku ich stężenie w osoczu istotnie wzrasta. Jak wcześniej wspomniano, zostało udowodnione naukowo, że istnieje silne powiązanie między oksysterolami przyjmowanymi z pożywieniem a ich obecnością w osoczu i zwiększonym ryzykiem występowania jednostek chorobowych (np. zawałów serca, miażdżycy).

Świeża żywność zawiera małe ilości PUF oraz PUC. Większość oksysteroli zostało znalezionych w żywności przetworzonej lub poddanej obróbce cieplnej. Powstawanie produktów utleniania steroli jest zależne od jakości surowca, ilości dodanych przeciwutleniaczy, sposobu i warunkach przetwarzania, długości dojrzewania i przechowywania. Dodatkowo różnice te mogą wynikać z odmiennych procedur ekstrakcji i metod oznaczania stosowanych w badaniach. Oksyfitosterole badane były głównie w olejach roślinnych. Najwyższe wartości oznaczane są w olejach rafinowanych, najniższe zaś w tych otrzymywanych z tłoczenia na zimno [Rudzińska i in. 2005, 2001]. Dla przykładu poniżej podano zawartości PUF z poszczególnych etapów produkcji: olej tłoczony: 42-48 $\mu\text{g g}^{-1}$ oleju; olej ekstrakcyjny: 52-59 $\mu\text{g g}^{-1}$ oleju; olej odśluzowany: 66-72 $\mu\text{g g}^{-1}$ oleju; olej neutralizowany: 75-78 $\mu\text{g g}^{-1}$ oleju; olej bielony: 90-99 $\mu\text{g g}^{-1}$ oleju; olej rafinowany: 100-110 $\mu\text{g g}^{-1}$ oleju; olej tłoczony na zimno: 8 $\mu\text{g g}^{-1}$ oleju [Rudzińska i in. 2005]. Oksyzoosterole analizowane są w produktach mięsnych, jajach, mleku, serach, rybach. Wyższe zawartości tych związków są widoczne po procesach termicznych: w surowej wołowinie całkowita zawartość PUC wynosiła 8,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ tłuszczu, natomiast po procesach termicznych wartość ta wzrosła do 30,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ tłuszczu [Ferioli i in. 2010]. Analogiczne wyniki przynoszą analizy surowych hamburgerów wołowych oraz drobiowych, kotletów wieprzowych i wołowych oraz mielonej wołowiny, cielęciny i wieprzowiny [Echarte i in. 2003; Derewiaka, Obiedziński 2009; Pie i in. 1991]. Podobne wyniki uzyskano podczas analiz PUC w łososiu: w surowym materiale oznaczono 0,74 $\mu\text{g g}^{-1}$ tłuszczu, w smażonym w oliwie z oliwek 2,98 $\mu\text{g g}^{-1}$ tłuszczu, a w smażonym w oleju sojowym 3,35 $\mu\text{g g}^{-1}$ tłuszczu, natomiast podczas podpieczenia zawartość PUC wzrosła do 7,38 $\mu\text{g g}^{-1}$ tłuszczu [Echarte i in. 2001]. W produktach mlecznych, takich jak masło, masło klarowane, jogurty czy sproszkowane mleko, produkty utleniania cholesterolu są również obecne [Derewiaka, Obiedziński 2009; Angulo i in. 1997; Pie i in. 1990].

PODSUMOWANIE

Przedstawione wyniki badań na zwierzętach wykazują, że różne produkty utleniania steroli z diety mogą być wchłaniane w układzie pokarmowym. Należy zaznaczyć, że absorpcja różnych oksysteroli jest inna, np. produkty utleniania cholesterolu takie jak 7 β OH, 7K czy α -EPOX wykrywane są na wyższym poziomie niż 25OH lub β -EPOX [Otaegui-Arrazola i in. 2010]. Korelacja pomiędzy poziomem oksysteroli w osoczu i z diety została potwierdzona. Z tego powodu bardzo istotne jest kontrolowanie stężenia związków toksycznych w pożywieniu, aby uniknąć ich negatywnego wpływu na zdrowie konsumenta.

Jakkolwiek w ostatnich latach badania związane z analizą produktów utleniania steroli intensywnie się rozwijają, nadal brakuje badań, których celem byłoby wyjaśnienie, czy oksysterole powstają z cholesterolu wolnego czy też z cholesterolu związanego. Możliwe, że gdyby ten fakt został wyjaśniony, nawet wysoka zawartość oksysteroli z pożywienia zanalizowana po zmydleniu próbki nie będzie aż tak groźna, gdyż zawartość wolnego cholesterolu, z którego „powinny” powstać oksysterole, będzie znikoma. Dlatego też należy dołożyć wszelkich starań, aby opracować metodę oznaczania związanych i wolnych oksysteroli, w celu ustalenia, czy związki te pochodzą z wolnego czy zestryfikowanego cholesterolu, oraz oznaczyć zawartości PUC w produktach wchodzących w skład codziennej diety.

PIŚMIENNICTWO

1. Angulo A. J., Romera J. M., Ramirez M., Gil A. (1997). Determination of Cholesterol Oxides in Dairy Products. Effect of Storage Conditions. *J Agric Food Chem*, 45 (11), 4318-4323
2. Bae J. H., Bassenge E., Kim K. B. (2001). Postprandial hypertriglyceridemia impairs endothelial function by enhanced oxidant stress. *Atherosclerosis*, 154, 517-523
3. Bałasińska B., Mazur A. (2004). Oxidized dietary lipids may participate in the development of atherosclerosis. *Postepy Hig Med Dosw*, 58, 176-182
4. Breuer O., Björkhem I. (1990). Simultaneous quantification of several cholesterol autoxidation and monohydroxylation products by isotope-dilution mass spectrometry. *Steroids*, 55 (4), 185-192
5. Brooks C. J. W., Harland W. A., Steel G. (1966). Squalene, 26-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in human atheromatous plaques. *Biochim Biophys Acta*, 125 (3), 620-622
6. Brooks C. J. W., McKenna R. M., Cole J., MacLachlan J., Lawrie T. D. (1983). 'Profile' analysis of oxygenated sterols in plasma and serum. *Biochem Soc Trans*, 11 (6), 700-701
7. Brown A. J., Jessup W. (1999). Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 142 (1), 1-28
8. Busch T. P., King A. J. (2009). Artifact generation and monitoring in analysis of cholesterol oxide products. *Anal Biochem*, 388 (1), 1-14
9. De Jong A., Plat J., Mensink R. (2003). Metabolic effects of plant sterols and stanols (review). *J Nutr Biochem*, 14 (7), 362-369
10. Derewiaka D., Obiedziński M. (2009). Oxysterol content in selected meats and meat products. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, 8 (3), 5-13
11. Derewiaka D., Obiedziński M. (2009). Determination of sterols and oxysterols in selected fruity yoghurts. *Bromat Chem Toksykol*, XLII (3), 564-568

12. Echarte M., Zulet M. A., Astiasaran I. (2001). Oxidation process affecting fatty acids and cholesterol in fried and roasted salmon. *J Agric Food Chem*, 49 (11), 5662-5667
13. Echarte M., Ansorena D., Astiasarán I. (2003). Consequences of microwave heating and frying on the lipid fraction of chicken and beef hamburgers. *J Agric Food Chem*, 51 (20), 5941-5945
14. European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (2012). European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). *Eur Heart J*, 33, 1635-1701
15. Ferioli F., Dutta C. P., Caboni M. F. (2010). Cholesterol and lipid oxidation in raw and pan-fried minced beef stored under aerobic packaging. *J Sci Food Agric*, 90 (6), 1050-1055
16. Frankel E. N., Smith L., Hamblin C., Creveling R., Clifford A. J. (1984). Occurrence of cyclic fatty acid monomers in frying oils used for fast foods. *J Am Oil Chem Soc*, 61 (1), 87-90
17. Gamba P., Leonarduzzi G., Tamagno E., Guglielmotto M., Testa G., Sottero B., Gargiulo S., Biasi F., Mauro A., Viña J., Poli G. (2011). Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid- β in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime. *Aging Cell*, 10 (3), 403-417
18. Grandgirard A., Demaison-Meloche J., Cordelet C., Demaison L. (2004). Incorporation of oxyphytosterols in tissues of hamster. *Reprod Nutr Dev*, 44 (6), 599-608
19. Grandgirard A., Martine L., Juaneda P., Cordelet C. (2004). Sitostanetriol is not formed in vivo from sitosterol in the rat. *Reprod Nutr Dev*, 44 (6), 609-616
20. Grandgirard A., Martine L., Demaison L., Cordelet C., Joffre C., Berdeaux O., Semon E. (2004). Oxyphytosterols are present in plasma of healthy human subjects. *Br J Nutr*, 91 (1), 101-106
21. Griffiths W. J., Crick P. J., Wang Y. (2013). Methods for oxysterol analysis: Past, present and future. *Biochem Pharmacol*, 86 (1), 3-14
22. Hovenkamp E., Demonty I., Plat J., Lütjohann D., Mensink R. P., Trautwein E. A. (2008). Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge. *Prog Lipid Res*, 47 (1), 37-49
23. Hur S. J., Park G. B., Joo S. T. (2007). Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. *Food Control*, 18 (8), 939-947
24. Jacobson M. S., Price M. G., Shamoo A. E., Heald F. P. (1985). Atherogenesis in White Carneau Pigeons Effects of Low-Level Cholestane-Triol Feeding. *Atherosclerosis*, 57 (2-3), 209-217
25. Jagla A., Schrezenmeir J. (2001). Postprandial triglycerides and endothelial function. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 109 (4), 533-547
26. Johnson C. B. (1996). Isolation of cholesterol oxidation products from animal fat using aminopropyl solid-phase extraction. *J Chromatogr, A* 736 (1-2), 205-210

27. Katan M. B., Grundy S. M., Jones P., Law M., Miettinen T., Paoletti R.; Stresa Workshop Participants. (2003). Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc*, 78 (8), 965-978
28. Khan B. V., Parthasarathy S. S., Alexander R. W., Medford R. (1995). Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*, 95 (3), 1262-1270
29. Linseisen J., Wolfram G. (1998). Absorption of cholesterol oxidation products from Ordinary Foodstuff in Humans. *Ann Nutr Met*, 42 (4), 221-230
30. Meynier A., Lherminier J., Demaison-Meloche J., Ginies C., Grandgirard A., Demaison L. (2002). Effects of dietary oxysterols on coronary arteries in hyperlipidaemic hamsters. *Br J Nutr*, 87 (5), 447-458
31. Naruszewicz M., Woźny E., Mirkiewicz E., Nowicka G., Szostak W. B. (1987). The effect of thermally oxidized soya bean oil on metabolism of chylomicrons: increased uptake and degradation of oxidized chylomicrons in cultured mouse macrophages. *Atherosclerosis*, 66 (1-2), 45-53
32. Nichols M., Townsend N., Luengo-Fernandez R., Leal J., Gray A., Scarborough P., Rayner M. (2012). *European Cardiovascular Disease Statistics 2012*. European Heart Network, Brussels, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis
33. Otaegui-Arrazola A., Menéndez-Carreño M., Ansorena D., Astiasarán I. (2010). Oxysterols: A world to explore. *Food Chem Toxicol*, 48 (12), 3289-3303
34. Pie J. E., Spahis K., Seillan C. (1990). Evaluation of Oxidative Degradation of Cholesterol in Food and Food Ingredients: Identification and Quantification of Cholesterol Oxides. *J Agric Food Chem*, 38 (4), 973-979
35. Pie J. E., Spahis K., Seillan C. (1991). Cholesterol Oxidation in Meat Products during Cooking and Frozen Storage. *J Agric Food Chem*, 39 (2), 250-254
36. Plat J., Brzezinka H., Lütjohann D., Mensink R. P., von Bergmann K. (2001). Oxidized plant sterols in human serum and lipid infusions as measured by combined gasliquid chromatography-mass spectrometry. *J Lipid Res*, 42 (12), 2030-2038
37. Poli G., Biasi F., Leonarduzzi G. (2013). Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. *Redox Biol*, 1 (1), 125-130
38. Rudzińska M., Kazuś T., Wąsowicz E. (2001). Sterols and their oxidized derivatives in refined and cold pressed seed oils. *Rośliny Oleiste*, XXII, 477-494
39. Rudzińska M., Uchman W., Wąsowicz E. (2005). Plant sterols in food technology. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, 4 (1), 147-156
40. Schött H. F., Husche C., Friedrichs S., Miller C. M., McCarthy F. O., Laufs U., Plat J., Weingärtner O., Lütjohann D. (2015). 7 β -hydroxysitosterol crosses the blood-brain barrier more favored than its substrate sitosterol in ApoE –/– mice. *Steroids*, 99 (Pt B), 178-182
41. Skoczyńska A. (2005). Rola lipidów w powstawaniu miażdżycy. *Postępy Hig Med Dosw*, 59, 346-357

42. Steinberg D., Witztum J. L. (1990). Lipoproteins and Atherogenesis. *Current Concepts*. JAMA, 264 (23), 3047-3052
43. Staprans I., Rapp J. H., Pan X. M., Kim K. Y., Feingold K. R. (1994). Oxidized lipids in diet are a source of oxidized lipid in chylomicrons of human serum. *Arterioscler. Thromb*, 14 (12), 1900-1905
44. Staprans I., Pan X. M., Rapp J. H., Feingold K. R. (1998). Oxidized Cholesterol in the Diet Accelerates the Development of Aortic Atherosclerosis in Cholesterol-Fed Rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18 (6), 977-983
45. Staprans I., Pan X. M., Rapp J. H., Grunfeld C., Feingold K. R. (2000). Oxidized Cholesterol in the Diet Accelerates the Development of Atherosclerosis in LDL Receptor- and Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20 (3), 708-714
46. Tabas I. (2002). Lipids and atherosclerosis. In Vance DE, Vance JE, editors. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 4th Edition. Amsterdam: Elsevier, 573-597
47. Tabee E. (2008). Lipid and Phytosterol Oxidation in Vegetable Oils and Fried Potato Products. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences: Uppsala
48. Tonello A. (2006). Letter to the editor: serum phytosterols not only from dietary intake. *Br J Nutr*, 96 (4), 791-792
49. Ursini F., Zamburlini A., Cazzolato G., Maiorino M., Bon G. B., Sevanian A. (1998). Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, 25 (2), 250-252
50. Weingärtner O., Husche C., Schött H. F., Speer T., Böhm M., Miller C. M., McCarthy F., Plat J., Lütjohann D., Laufs U. (2015). Vascular effects of oxysterols and oxyphytosterols in apoE ^{-/-} mice. *Atherosclerosis*, 240 (1), 73-9
51. Vine D. F., Mamo C. L., Beilin L. J., Mori T. A., Croft K. D. (1998). Dietary oxysterols are incorporated in plasma triglyceride-rich lipoproteins, increase their susceptibility to oxidation and increase aortic cholesterol concentration of rabbits. *J Lipid Res*, 39 (10), 1995-2004
52. Xu G., Guan L., Sun J., Chen Z. Y. (2009). Oxidation of Cholesterol and β -Sitosterol and Prevention by Natural Antioxidants. *J Agric Food Chem*, 57 (19), 9284-9292
53. Zilversmit D. B. (1979). Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation*, 60 (3), 473-485