

Plant stanol esters: Effects on cardiovascular risk markers and cholesterol metabolism

Citation for published version (APA):

Plat, J. (2001). Plant stanol esters: Effects on cardiovascular risk markers and cholesterol metabolism. Maastricht: Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2001

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Improvement of an unfavorable lipoprotein profile is a proven strategy for lowering the risk of coronary heart diseases (CHD). Current dietary recommendations are therefore based on decreasing low-density lipoprotein (LDL) cholesterol concentrations or the total cholesterol : HDL cholesterol ratio. For a large majority of the people this can be achieved by changing the intake of dietary fat and type of fatty acids. However, despite strict dietary compliance, the target values for these two lipid parameters are not reached by a substantial part of the population. For these people functional foods may offer new possibilities. Functional foods contain (or miss) one or more food components (whether nutrients or not) that affects one or more target functions in the body. Plant stanol esters incorporated into margarines are one of the first examples of a functional food with proven scientific effectiveness. Plant stanols are structurally related to cholesterol and are in the intestinal lumen incorporated into the mixed micelles. In this way, plant stanols replace cholesterol from the mixed micelles, which results in a reduced intestinal cholesterol absorption and consequently into lower serum LDL cholesterol concentrations. Many effects of plant stanol esters are however unknown, while its hypocholesterolemic mechanism has only been partly elucidated. Therefore, in this thesis studies are presented that have not only examined the effects of plant stanol esters on various parameters associated with coronary heart disease, but have also analyzed effects on cholesterol metabolism at the molecular level.

Lipids and (apo)lipoproteins

Plant stanols can be derived from pine wood or vegetable oils. These two sources of plant stanols differ in their sitostanol : campestanol ratios. It has been postulated that the less absorbable plant sterols reduces cholesterol absorption more effectively. As humans absorb sitostanol less than campestanol, differences in plant stanol ester composition may affect a mixtures effects on the serum lipoprotein profile. In our first study with 112 non-hypercholesterolemic volunteers, however, we have demonstrated that a daily intake of 4.0 g wood based (92% sitostanol and 8% campestanol) or 3.8 g vegetable oil based (68% sitostanol and 32% campestanol) plant stanols as its fatty acid esters lowered serum LDL cholesterol concentrations to the same extent, respectively with 12.8% and 14.6%. This suggests that the sitostanol : campestanol ratio is not an important determinant for the hypocholesterolemic capacity of a plant stanol ester mixture.

The second intervention trial examined if it was necessary to consume plant stanol esters with each cholesterol-containing meal. For this, 39 non-hypercholesterolemic subjects consumed in random order no plant stanols, 2.5 g plant stanols at lunch, or 2.5 g plant stanols divided over the three meals (breakfast 0.42 g, lunch 0.84 g, and dinner 1.25 g, which is proportional to dietary cholesterol intake). Plant stanols were given as its fatty acid esters. Consumption of plant stanol esters at lunch only resulted in a similar LDL cholesterol reduction (-9.4%) as compared to consumption of plant stanol esters divided over the three meals (-10.4%). Based on these results it is concluded that it is not necessary to consume plant stanols at each meal or simultaneously with dietary cholesterol. This suggests that the reduced incorporation of cholesterol into mixed micelles may not be the only mechanism by which plant stanols lower LDL cholesterol. We therefore hypothesize that plant stanols affect lipoprotein metabolism in the intestinal cells as well.

Decreasing cholesterol absorption by lowering dietary cholesterol intake normally lowers HDL cholesterol. In our two intervention studies, however, the plant stanol ester induced decreases in cholesterol absorption were not accompanied by a change in serum HDL cholesterol concentrations, which is an interesting finding. Since the intestine is an important site for apo A-I synthesis, it reinforces our suggestion of an effect of plant stanols on lipoprotein metabolism in the intestinal cells themselves. The lack of effect on HDL cholesterol concentrations also led to a significant improvement in the total cholesterol : HDL cholesterol ratio. It was further found that changes in apoB and apo A-I paralleled those in LDL and HDL cholesterol, while serum triacylglycerol concentrations were not affected.

Cholesterol metabolism and interaction with genetic background

Like in all other studies, plant stanol ester consumption lowered serum cholesterol-standardized campesterol concentrations, a validated marker for cholesterol absorption. A lower supply of exogenous cholesterol into the body triggers cells to increase their endogenous synthesis, which was shown by a significant increase in serum cholesterol-standardized lathosterol concentrations, an established marker for whole body cholesterol synthesis. Despite this increased cholesterol synthesis, the overall effect is a lower serum LDL cholesterol concentration. Whether changes in LDL-receptor expression also contributed to the LDL-cholesterol lowering effect of plant stanol esters was not known. We have now shown that plant stanol ester consumption increased

LDL receptor mRNA concentrations in mononuclear blood cells. Also LDL-receptor protein expression on the surface of mononuclear blood cells was significantly higher, which correlated negatively with changes in serum LDL cholesterol. We now hypothesize that the increased LDL receptor expression not only increases LDL clearance, but also contributes to a lower LDL formation along the apoB-100 cascade. Further, we found that the increased endogenous cholesterol synthesis is probably not regulated only at a transcriptional level: HMG-CoA reductase mRNA concentrations were not significantly increased and - more importantly - changes in HMG-CoA reductase did not correlate with changes in serum cholesterol-standardized lathosterol concentrations.

Differences in genetic constitution affect cholesterol metabolism and responses to diet. Identification of common variations in genes related to dietary responsiveness is therefore an attractive goal to be able to prescribe individually tailored diets for the treatment of an unfavorable lipoprotein profile. However, we found that common polymorphisms of 5 candidate genes - apo A-IV, SR-BI, CETP, HMG-CoA reductase, and apoE - do not explain to a significant extent variation in serum LDL cholesterol responses between individuals.

Hemostasis and fat-soluble antioxidants

Besides lipid and lipoprotein concentrations, other parameters associated with the risk for CHD were examined in our first intervention trial. Coagulation and fibrinolytic parameters, such as fibrinogen, F-VIIIc, F-VIIIa, AT-III, PAI-I, and t-Pa remained essentially the same during plant stanol ester consumption. Concerning effects on fat-soluble antioxidants, tocopherol (vitamin E) and carotenoid concentrations were lowered. A part of this effect can be explained by a lower number of LDL particles, the carriers for fat-soluble antioxidants. However, after LDL-cholesterol standardization, concentrations of the lipophylic hydrocarbon carotenoids (β -carotene, α -carotene, and lycopene) were still lowered, while LDL-cholesterol standardized concentrations of the more polar oxygenated carotenoids (lutein/zeaxanthin and β -cryptoxanthin) and tocopherols were not. We have also shown that the reduction of the lipophylic hydrocarbon carotenoids was associated with the lowered cholesterol absorption. Although serum concentrations of all hydrocarbon carotenoids studied remained the normal range, the clinical importance of these reductions is not known, but certainly warrants attention. Vitamin A concentrations did not change.

Oxidation of plant sterols

Not only plant stanols, but also plant sterols show a large structural similarity with cholesterol. Since oxysterols (oxidation products of cholesterol) are atherogenic and cytotoxic compounds, we wondered whether - like cholesterol - oxidized plant sterols (oxyphytosterols) are also found in the serum. Therefore, we first developed a sensitive gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) assay, which enabled us to measure oxyphytosterol concentrations. We found that approximately 1.4% of sitosterol in the serum was present in its oxidized form in serum from phytosterolemic patients. Phytosterolemia is a rare inheritable disease in which patients have highly elevated serum plant sterol concentrations. Although this value of 1.4% is rather high compared to the approximate 0.01% percent oxidatively modified cholesterol normally seen in human serum the relevance of these findings remains to be elucidated. However, *in vitro* studies have indicated that oxidized plant sterols showed the same cytotoxic effects as oxysterols. It remains to be determined, however, whether in plasma of healthy subjects also oxidized plant sterols can be detected. We could not demonstrate oxyphytosterols in the plasma of healthy volunteers, which may be due to the relatively high detection limit of our assay.

Conclusions

Based on these studies we conclude that the incorporation of functional foods containing plant stanol esters into a recommended diet can be useful in the dietary management of unfavorable serum lipoprotein profiles. A daily intake of 2.0 to 2.5 grams of plant stanols lowers serum LDL cholesterol concentrations by 10% to 14%, hereby leaving HDL cholesterol levels unaffected. We further hypothesize that plant stanol esters lower LDL cholesterol, not only by lowering cholesterol solubilization into mixed micelles, but also by affecting lipoprotein metabolism in the intestinal cells. To better understand the effects of plant stanols, detailed studies at the molecular level, especially in intestinal cells, are therefore needed. Although plant stanol esters do not have detrimental effects on several other risk markers for CHD such as fat-soluble antioxidants and markers for coagulation and fibrinolysis, the ultimate question is whether plant stanol esters indeed lower cardiovascular risk. Therefore, human studies with different patient groups, looking at functional endpoints are also needed.

Samenvatting

Het verbeteren van een ongunstig lipoproteïenprofiel verlaagt het risico op hart- en vaatziekten. De huidige voedingsrichtlijnen zijn er dan ook met name opgericht om het cholesterolgehalte in de atherogene lage dichtheidslipoproteïnen (LDL) of om de totaal cholesterol : HDL cholesterol verhouding te verlagen. Dit kan worden bereikt door de inname van vet en het type vetzuren te veranderen. Echter, ondanks strikte dieetrouw, zal het lipoproteïenprofiel van een groot deel van de bevolking te ongunstig blijven. Voor deze mensen bieden "functional foods" nieuwe mogelijkheden. Functional foods bevatten (of missen) een of meerdere bestanddelen die een gunstig effect hebben op één of meerdere (patho)fysiologische. Margarine verrijkt met plantaardige stanolesters zijn één van de eerste voorbeelden van een functional food met een wetenschappelijk onderbouwde effectiviteit. De moleculaire structuur van plantaardige stanolen vertoont grote overeenkomsten met die van cholesterol. In het darmlumen worden zij dan ook - net zoals cholesterol - ingebouwd in micellen. De plantaardige stanolen verdringen echter het cholesterol uit de micellen, hetgeen resulteert in een verlaagde cholesterolabsorptie in de darm. Hierdoor daalt de LDL-cholesterolconcentratie in het serum. Vele effecten van plantaardige stanolen zijn echter nog onbekend, terwijl het mechanisme dat ten grondslag ligt aan de cholesterolverlagende werking slechts ten dele is ontrafeld. Het doel van de studies, die in dit proefschrift staan beschreven, was dan ook niet alleen om effecten van plantaardige stanolen op diverse risico-indicatoren voor hart- en vaatziekten te bestuderen, maar ook om deze effecten op moleculair niveau te verklaren.

Lipiden en (apo)lipoproteïnen

Plantaardige stanolesters kunnen afkomstig zijn van verschillende bronnen, zoals houtpulp en plantaardige oliën. De verkregen mengsels van plantaardige stanolen verschillen echter in de sitostanol : campestanol verhouding. Het is gesuggereerd dat plantaardige stanolen, die minder goed in de darm worden opgenomen, de cholesterolabsorptie sterker remmen. Aangezien de mens minder sitostanol dan campestanol opneemt, zou de samenstelling een effect kunnen hebben op cholesterolverlagende werking van het mengsel. In onze eerste studie, waaraan 112 mensen met een niet-verhoogd cholesterolgehalte deelnamen, hebben wij echter aangetoond dat een dagelijkse inname van 4,0 gram plantaardige stanolen gewonnen uit houtpulp (92% sitostanol en 8% campestanol) of 3,8 gram stanolen gewonnen uit

plantaardige olie (68% sitostanol en 32% campestanol) een vergelijkbaar effect hadden op het LDL-cholesterolgehalte: de dalingen waren respectievelijk 12,8% en 14,6%. Dit suggereert dat de sitostanol : campestanol verhouding geen groot effect heeft op de cholesterolverlagende werking van een mengsel van plantaardige stanolen.

In een tweede interventie studie is bestudeerd of het noodzakelijk is om plantaardige stanolesters bij elke maaltijd te consumeren. Hiervoor kregen 39 mensen met een niet-verhoogd cholesterolgehalte in willekeurige volgorde verschillende margarines en bak- en braadvetten verstrekt. De samenstelling van de margarines en bak- en braadvetten was zodanig, dat er of geen extra plantaardige stanolen werden gegeten, of 2,5 gram extra plantaardige stanolen bij de lunch, of 2,5 gram extra plantaardige stanolen verdeeld over de drie maaltijden van de dag (0,42 gram bij het ontbijt, 0,84 gram bij de lunch, en 1,25 gram bij het diner). Gedurende deze laatste voeding was de stanol : cholesterol verhouding in de drie maaltijden vergelijkbaar. Het bleek dat het cholesterolgehalte met -9,4% daalde, indien de stanolen alleen bij de lunch werden gegeten, hetgeen vergelijkbaar was met de daling van -10,4%, indien bij alle maaltijden stanolen werden gegeten. Uit deze studie werd dan ook geconcludeerd, dat het niet noodzakelijk is om de plantaardige stanolesters bij elke cholesterolbevattende maaltijd te gebruiken. Dit suggereert dat de verlaging van de inbouw van cholesterol in de micellen door plantaardige stanolen niet het enige werkingsmechanisme is, waardoor stanolen het LDL-cholesterolgehalte verlagen. Daarom hebben wij gesuggereerd dat stanolen ook een effect hebben op het lipoproteïnenmetabolisme in de darmcel zelf.

Een verlaging van de cholesterolabsorptie door een lagere cholesterolinname met de voeding verlaagt het cholesterolgehalte in de hoge dichtheidslipoproteïnen (HDL). Uit onze studies bleek echter dat plantaardige stanolesters het HDL cholesterol niet verlaagden, ondanks het feit dat stanolen de cholesterolabsorptie verlagen. Dit is een interessante bevinding. Aangezien de darm een belangrijke rol speelt bij de synthese van apo A-I (een belangrijk eiwit van het HDL), versterkt dit onze hypothese dat plantaardige stanolen een effect hebben op het lipoproteïnenmetabolisme in de darmcellen. De bevinding dat serum HDL-cholesterolconcentraties niet dalen, betekent verder dat de totaal cholesterol : HDL cholesterol verhouding sterk verbetert. Tenslotte bleek dat de veranderingen in apoB en apo A-I vergelijkbaar waren aan die van LDL en HDL cholesterol. Serum triacylglycerolconcentraties bleven onveranderd.

Cholesterolmetabolisme en de interactie met genetische achtergrond

In overeenstemming met andere studies vonden wij dat consumptie van plantaardige stanolesters de serum cholesterol-gestandaardiseerde campesterolconcentraties, een gevalideerde indicator voor veranderingen in cholesterolabsorptie, verlagen. Een lagere toevoer van exogeen cholesterol in het lichaam heeft een verhoging van de synthese van cholesterol tot gevolg, hetgeen bleek uit een toename van de cholesterol-gestandaardiseerde lathosterol concentraties, een geaccepteerde indicator voor de cholesterol synthese in het lichaam. Ondanks de toegenomen cholesterol synthese daalde het serum LDL-cholesterolgehalte. Of veranderingen in de LDL-receptorexpressie ook hebben bijgedragen aan het LDL-cholesterol verlagend effect van plantaardige stanolesters was onbekend. Wij hebben nu getoond dat consumptie van plantaardige stanolesters de LDL-receptor mRNA concentraties in mononucleaire bloedcellen verhoogde. Ook de LDL-receptor eiwitexpressie op het oppervlak van mononucleaire bloedcellen was significant hoger en deze toename correleerde bovendien negatief met de verandering in serum LDL-cholesterolconcentraties. Dit leidde tot de hypothese dat de verhoogde LDL-receptor expressie niet alleen de LDL klaring uit de circulatie verhoogt, maar dat deze toename ook heeft bijgedragen aan een lagere LDL vorming. Bovendien hebben wij aangetoond dat de toegenomen cholesterol synthese waarschijnlijk niet op transcriptie niveau gereguleerd is. De mRNA concentraties van HMG-CoA reductase – het snelheidsbepalende enzym in de cholesterol synthese - waren niet significant verhoogd en nog belangrijker, de veranderingen in HMG-CoA reductase correleerden niet met de veranderingen in cholesterol-gestandaardiseerde lathosterolconcentraties.

Verschillen in genetische achtergrond tussen mensen beïnvloeden het cholesterolmetabolisme en verklaren mogelijk waarom sommige mensen sterker op een cholesterolverlagende voeding reageren dan andere mensen. Identificatie van frequent voorkomende variaties in genen, die gerelateerd zijn aan de response ten gevolge van voedingsveranderingen, is derhalve een belangrijke stap om een individueel voedingsadvies op te stellen in de behandeling van een ongunstig lipoproteïnenprofiel. Echter analyse van variaties in vijf verschillende kandidaatgenen - apoA-IV, SR-BI, CETP, HMG-CoA reductase en apoE - heeft tot de conclusie geleid, dat deze genen geen grote bijdrage leveren aan het verklaren van verschillen in veranderingen van

serum LDL-cholesterolconcentraties gedurende plantaardige stanolester consumptie.

Hemostase en vetoplosbare antioxidanten

Naast lipiden en lipoproteïnenconcentraties zijn ook effecten op andere parameters, die geassocieerd zijn met het risico op hart- en vaatziekten bestudeerd. Concentraties van parameters betrokken bij de bloedstolling en de fibrinolyse, zoals fibrinogeen, F-VIIc, F-VIIam, AT-III, PAI-1 en t-Pa, veranderden niet door de consumptie van plantaardige stanolesters. Wat betreft de vetoplosbare antioxidanten, daalden alle tocoferol (vitamine E) en carotenoïdenconcentraties. Een deel van dit effect kan worden verklaard door een daling in het aantal LDL deeltjes, die de vetoplosbare antioxidanten door de bloedbaan vervoeren. Echter na standardizatie voor LDL-cholesterolconcentraties waren de concentraties van de lipofiele hydrocarbon carotenoïden (β -carotene, α -carotene, lycopene) nog steeds verlaagd, terwijl concentraties van de meer polaire geoxygeneerde carotenoïden en de tocoferolen niet meer verlaagd waren. De verlaging van de lipofiele hydrocarbon carotenoïdenconcentraties was geassocieerd met de verlaagde cholesterolabsorptie, hetgeen suggereert dat plantaardige stanolesters ook de opname van andere vetoplosbare componenten kan beïnvloeden. Vitamine A concentraties bleven onveranderd. Ondanks het feit dat de verlaagde serumconcentraties van de hydrocarbon carotenoïden nog steeds binnen de normaalwaarden lagen, is het klinische belang van deze dalingen onbekend.

Oxidatie van plantaardige sterolen

Niet alleen plantaardige stanolen, maar ook plantaardige sterolen vertonen een grote structurele gelijkenis met cholesterol. Aangezien oxysterolen (oxidatie producten van cholesterol) atherogene en cytotoxische componenten zijn, vroegen wij ons af of geoxideerde plantaardige sterolen (oxyfytesterolen), evenals geoxideerd cholesterol, ook in het plasma aantoonbaar zouden zijn. Daartoe hebben wij eerst een gevoelige GC-MS methode opgezet, die het mogelijk maakte om oxyfytesterolconcentraties in het plasma te meten. Wij hebben aangetoond dat 1,4% van het sitosterol in het plasma van een fytesterolemische patiënt - een zeldzame erfelijke aandoening, waarbij plant sterolconcentraties in het bloed sterk verhoogd zijn - in geoxideerde vorm aanwezig is. Ondanks het feit dat deze waarde van 1,4% hoog is ten opzichte van de 0,01% oxidatief gemodificeerd cholesterol wat normaal in het plasma aanwezig is, is de relevantie van deze bevinding

vooral nog niet geheel duidelijk. Echter *in vitro* studies hebben aangetoond dat geoxideerde plantaardige sterolen dezelfde cytotoxische eigenschappen bezitten als oxysterolen. Of geoxideerde plantaardige sterolen ook in het bloed van gezonde vrijwilligers aantoonbaar zijn, blijft voornamelijk een vraag. Wij konden in ieder geval geen oxysterolen in het plasma van gezonde personen aantonen, hetgeen echter te maken kan hebben met de relatief hoge detectielimiet van de huidige analyse methode.

Conclusies

Op basis van deze studies concluderen wij dat voedingsmiddelen verrijkt met plantaardige stanolesters als onderdeel van een gezonde voeding een bijdrage kunnen leveren tot het verbeteren van een ongunstig lipoproteïnenprofiel. Een dagelijkse consumptie van 2,0 - 2,5 gram plantaardige stanolen kunnen het LDL-cholesterolgehalte met 10% tot 14% verlagen, terwijl het HDL-cholesterolgehalte onveranderd blijft. Verder postuleren wij dat plantaardige stanolesters het LDL-cholesterolgehalte niet alleen verlagen door een verminderde inbouw van cholesterol in de micellen, maar dat ze ook zelf een effect uitoefenen op het lipoproteïnenmetabolisme in de darmcellen. Om de effecten van plantaardige stanolen beter te begrijpen moeten daarom gedetailleerde studies op moleculair niveau, met name gericht op effecten in de darm, worden uitgevoerd. Ondanks het feit dat plantaardige stanolesters geen nadelige effecten lijken te hebben op andere risicoindicatoren voor hart- en vaatziekten, zoals de vetoplosbare antioxidanten, en indicatoren betrokken bij de bloedstolling en de fibrinolyse, blijft uiteindelijk de vraag of plantaardige stanolesters het risico op hart- en vaatziekten daadwerkelijk verlagen. Hiervoor zijn studies bij verschillende patiëntengroepen nodig, waarbij naar het atherosclerotische proces zelf moet worden gekeken.