

Wybrany artykuł

Produkty utlenienia cholesterolu w produktach pochodzenia zwierzęcego – wpływ na zdrowie zwierząt i ludzi**Jacek Wilczak, Gustaw Kulasek**z Zakładu Dietetyki Katedry Nauk Fizjologicznych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Cholesterol oxidation products – the influence on the animal and human health. Wilczak J., Kulasek G., Division of Dietetics, Department of Animal Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw Agricultural University. Cholesterol oxidation products, termed oxysterols, are present in the diet as contaminants of cholesterol-containing foods, and are increasingly considered of potential interest in the pathogenesis of atherosclerotic lesions. They can enter the circulation through the diet or they are generated through peroxidation of lipoproteins or enzymatic oxidation of cholesterol. Like a cholesterol, oxysterols are transported in serum with lipoproteins but, unlike cholesterol, they may also be transported by serum albumin. It has been suggested that the physiologic regulation of cholesterol metabolism may be through generation of oxysterols. Oxysterols potentially play a role in aspects of various diseases such as atherosclerosis and cancer, either as contributory or protective agents, most likely through their action as potent modulators of cholesterol metabolism and their direct effects on membrane structure and function. Keywords: cholesterol oxidation products, oxysterols, cholesterol oxidation, pet foods.

Badania cholesterolu pod kątem jego struktury, właściwości i możliwości oddziaływania na żywe organizmy było i jest jednym z czołowych celów badawczych ostatnich dziesięcioleci. Niewiele wiadomo było o cholesterolu przed pionierskimi badaniami Windausa i Wileanda na początku XX w. (1). Strukturę cząsteczki cholesterolu dokładnie zbadano dopiero w 1932 r. Dalsze odkrycia polegały na określeniu prekursorów cholesterolu – skwalenu, mewalonianu oraz wyjaśnieniu mechanizmów regulatorowych w transporcie i syntezie cholesterolu opierających się na receptorach lipoprotein niskiej gęstości (LDL- low-density lipoprotein) i białkowych czynnikach steroidowych (2). Powyższe odkrycia pozwalają obecnie sterować zawartością cholesterolu w osoczu ludzkim w celu ograniczenia ryzyka chorób naczyniowo-sercowych i układu krążenia.

Cholesterol znajdujący się w organizmie jest pochodzenia zarówno endogennego (syntetyzowany w wątrobie), jak i egzogennego (wchłaniany w jelitach). Dużą zawartość cholesterolu ogólnego w pokarmach pochodzenia zwierzęcego kojarzy się zwykle z zagrożeniem rozwoju miażdżycy. Istnieją dowody wskazujące korelację między wysoką zawartością

cholesterolu w osoczu a ryzykiem zachorowania na choroby sercowo-naczyniowe (3). Obecnie wiadomo, że cholesterol jest mało reaktywną molekułą, a zmiany aterogenne w naczyniach krwionośnych przypisywać należy głównie pośrednim produktom jego utlenienia, które w największej części pochodzą z przetwarzanej i przechowywanej w warunkach dostępu tlenu żywności zawierającej cholesterol.

Produkty utleniania cholesterolu (PUCh) są grupą steroli nieodbiegających strukturą od cząsteczki cholesterolu – posiadają grupę funkcyjną zawierającą tlen (np. grupę hydroksylową), grupę ketonową, epoksydową. Część PUCh powstaje również w tkankach wyniku działania endogennych i egzogennych układów utleniaczy (4) oraz w wyniku wysokiej aktywności enzymatycznej, głównie hydroksylaz (5,6; tab. 1). Produkty utleniania cholesterolu, podobnie jak sam cholesterol, wbudowują się w dwuwarstwowe białkowo-lipidowe struktury błonowe komórek. Reagując z białkami, wywierają wpływ na homeostazę białek i lipidów, w tym również cholesterolu (7).

Tabela 1. Pochodzenie tlenków cholesterolu w osoczu krwi i tkankach (15)

Źródła egzogenne

Dieta

- w pokarmach pochodzenia zwierzęcego (mięso, jaja, mleko)
- powstające w czasie przechowywania i przetwarzania pokarmów zawierających cholesterol (dostęp tlenu, ogrzewanie, światło)

Źródła endogenne

Udział enzymów

- 7 α -hydrolaza
- 27-hydrolaza
- 7-ketodehydrogenaza
- 5 α -, 6 α -epoksydaza

Reakcje nieenzymatyczne

- działanie reaktywnych form tlenu
- działanie produktów peroksydacji lipidów
- neutrofile w trakcie „wybuchu tlenowego” ($H_2O_2/HOCl$)

W żywych komórkach PUCh znajdują się na ogół w niskich stężeniach. Dzięki wysokiej reaktywności PUCh są skutecznymi inicjatorami procesów wolnorodnikowych, których konsekwencjami są zmiany aterogenne i nowotworowe. Dzięki możliwości oddziaływania na komórkowy metabolizm i transport kwasów tłuszczowych mogą zmieniać skład i transport trójglicerydów do komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych oraz całkowicie zmieniać strukturę fosfolipidów, dzięki czemu przyczyniają się do uszkodzeń błon komórkowych (8).

Produkty utleniania cholesterolu wpływają także na metabolizm kwasu arachidonowego i jego utlenionych metabolitów – eikozanoidów, które bez aktywacji cyklooksygenaz i kanałów wapniowych przyczyniają się do rozwoju zmian zapalnych (9). W obszernych pracach przeglądowych Browna i Jessupa (10) oraz Bochkova i Leitnera (11) przytoczone są również dane podważające wyniki niektórych doświadczeń o prozapalnym i aterogennym działaniu PUCh.

Produkty utleniania cholesterolu powstają z cholesterolu i dlatego w ocenie żywieniowej produktów spożywczych powinniśmy znać ich zawartość, jak również samego cholesterolu. W ocenie stopnia utleniania cholesterolu i innych lipidów w pokarmach i tkankach stosujemy głównie metody chromatograficzne – chromatografię cieczową i gazową. W analizach tych pomocne jest oznaczanie również stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). Produkty mięsne nie powinny zawierać więcej TBARS niż 0,1–0,3 mg aldehydu dimalonowego/kg (12). Średnie zawartości cholesterolu w mięsie i produktach mięsnych przedstawiono w tabeli 2.

O ile wyniki doświadczeń odnośnie do szkodliwości spożywania zwiększonych ilości cholesterolu są rozbieżne (13), o tyle od dawna panuje zgodność poglądów o toksyczności PUCh (10,14,15,). Mimo małej aktywności cząsteczek cholesterolu, niewłaściwe przechowywanie i głębokie przetwarzanie pokarmów pochodzenia zwierzęcego doprowadza do ich utleniania. Przetwarzanie produktów zawierających cholesterol, a szczególnie ogrzewanie, np. suszenie

Tabela 2. Zawartość tłuszczu i cholesterolu w mięsie i produktach mięsnych (12)

Produkt	Tłuszcz, g/100 g	Cholesterol, mg/100 g
Mięso wołowe	1,90	60
Cielęcina	0,81	70
Wieprzowina	1,86	65
Baranina, filety	3,41	70
Drób, średnio	5,60	81
Indyk, średnio	15,00	74
Hamburgery	13,01	44
Frankfurtery wieprzowe	24,40	65
Frankfurtery wołowe	25,50	40
Frankfurtery drobiowe	23,40	94
Salami (Milano)	31,00	71
Mortadela	27,00	81
Szynka (Parma)	16,00	80

rozpyłowe, głębokie smażenie zwiększa zawartość PUCH. Pokarmy świeże pochodzenia zwierzęcego zawierają znacznie mniejsze ich ilości aniżeli przechowywane i/lub przetwarzane. Najwięcej PUCH (od 1 do 15 mg/100 g suchej masy) znajdziemy w proszku z żółtek jaj, mrożonym mięsie, tłustym serze (szczególnie rozdrobnionym, np. parmezan). W klarowanym maśle (ghee) produkty utlenienia cholesterolu mogą stanowić kilkadziesiąt procent ogólnej zawartości cholesterolu (ogrzewanie masła w około 150°C przez 20–30 minut bez utleniaczy i wielomiesięczne przechowywanie). W doświadczeniu na szczurach wykazano, że stosowanie w żywieniu wysoce utlenionego ghee powodowało obniżenie płynności błon komórkowych i nasilało agregację płytek krwi (działanie aterogenne; 16). Zawartość PUCH w pokarmach można ograniczać przez stosowanie pokarmowych przeciwutleniaczy. W badaniach *in vitro* wykazano, że proces powstawania produktów utlenienia cholesterolu w największym stopniu był hamowany przez butylohydroksyanizol (BHA) – syntetyczny przeciwutleniacz, w mniejszym stopniu α - tokoferol i w najmniejszym stopniu butylohydroksytoluen (BHT; 17).

Szkodliwość pokarmowych tlenków cholesterolu dla człowieka i zwierząt

W pracach poglądowych dotyczących poprawy jakości mięsa pod względem zdrowotnym postuluje się zmniejszenie stężenia cholesterolu w mięsie i produktach mięsnych (18,19) – potencjalnych źródeł PUCH. Tlenki cholesterolu są biologicznie aktywne i w organizmie zakłócają wiele procesów metabolicznych. Scolari i wsp. (20) cytują wiele prac wykonanych *in vitro* i *in vivo*, z których wynika, że PUCH wpływają na metabolizm steroli, zakłócają metabolizm kwasu arachidonowego, działają cytotoksycznie, angiotoksycznie, wykazują działanie mutagenne i karcinogenne. Najbardziej bioaktywne molekuły PUCH to 25-hydroksycholesterol, cholestantriol i epoksydowe pochodne cholesterolu. U zwierząt laboratoryjnych w warunkach *in vivo* PUCH działają szkodliwie w stężeniach od 1 do 500 mg/kg masy ciała (14).

W przewodzie pokarmowym tlenki cholesterolu są łatwiej wchłaniane niż cholesterol (21). Po dostaniu się do krwi krążą w LDL, które przenikają przez śródbłonek naczyń i są tam wychwytywane przez makrofagi, z których w wyniku działania utleniaczy powstają tak zwane komórki piankowe. Komórki te działają lokalnie toksycznie i w wyniku procesu zapalnego tworzą się w naczyniach blaszki aterogenne zwięzające stopniowo światło naczyń krwionośnych, co utrudnia swobodny przepływ krwi. Salonen i wsp. (22) wykazali, dodatnią korelację między stężeniem 7 β -hydroksycholesterolu a szybkością rozwoju zmian aterogennych w tętnicach szyjnych. Zhou i wsp. (23) stwierdzili, że stężenie PUCH w osoczu pacjentów (n = 105) z chorobą niedokrwienną mięśnia sercowego było znacznie wyższe niż u pacjentów w podobnym wieku (n = 105), ale nie wykazujących zaburzeń krążenia krwi w mięśni

sercowym (227 vs 156 $\mu\text{g/l}$). Istotne różnice w stężeniu poszczególnych PUCH dotyczyły: 7 β -hydroksycholesterolu, 5,6 β -epoksycholesterolu, 5,6 α -epoksycholesterolu i 7-ketocholesterolu. Cholesterol i jego utlenione postacie są wydalane głównie z żółcią.

Chizzolini i wsp. (12), analizując wyniki prac wielu autorów, uznali za najbardziej cytotoksyczny dla komórek człowieka cholestantrion i 25-hydroksycholesterol; ten ostatni hamuje syntezę cholesterolu w wątrobie poprzez hamowanie aktywności reduktazy HMG-CoA – kluczowego enzymu w syntezie cholesterolu. Leonarduzzi i wsp. (15) w pracy przeglądowej przytaczają obszernie piśmiennictwo, z którego wynika, że tlenki cholesterolu indukują apoptozę (programowaną śmierć fizjologiczną) i martwicę komórek oraz działają prozapalnie.

Przy dużym udziale w diecie długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, szczególnie z rodziny n-3 (np. oleju z łososia), obniża się ogólny potencjał przeciwutleniający (wyrażony jako stężenie TBARS – tab. 3) i nasila utlenianie cholesterolu w organizmie. Dodatkowe podanie w diecie dwuwartościowego żelaza w ilości 500 mg/kg karmy zwiększało stężenie w wątrobie 7-ketocholesterolu ponad dwukrotnie (24; tab. 3). Podawanie diety zawierającej olej rybi bez dostatecznej ilości witaminy E (<10 mg α -tokoferolu/kg paszy), zwiększa również stężenie 7 β -hydroksycholesterolu w tkankach oraz w LDL – najbardziej aterogenicznej frakcji lipidów (25). Wyniki te wskazują, że utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych generuje produkty reagujące z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), które z kolei utleniają cholesterol głównie do tlenków cholesterolu.

Tabela 3. Stężenie żelaza, związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) i sumy oznaczanych tlenków cholesterolu* w wątrobie szczurów karmionych przez 12 tygodni dietami z udziałem łożu lub oleju z łososia (10%) i dodatkiem żelaza dwuwartościowego (50 lub 500 mg/kg karmy) ($x \pm \text{SD}$, n = 10; 24)

Wskaźniki wątrobowe	Dieta z udziałem			
	łożu (10%)		oleju z łososia (10%)	
Dodatek żelaza, mg/kg diety	50	500	50	500
Zawartość żelaza, mmol/kg s.m.	8,0 ^b	9,7 ^a	6,6 ^b	7,9 ^b
TBARS, $\mu\text{mol/kg}$ świeżej tkanki	38,0 ^b	42,1 ^b	62,4 ^a	64,8 ^a
Suma tlenków cholesterolu, $\mu\text{mol/kg}$ świeżej tkanki*	33,1 ^c	33,8 ^c	69,7 ^b	103,5 ^a

a,b,c – różne litery w rzędach wskazują na istotność różnic między średnimi przy $p < 0,05$
* 7- β -hydroksycholesterol + 7-ketocholesterol + 5,6 α -epoksycholesterol + 5,6 β epoksycholesterol + cholestentriol + 25-hydroksycholesterol

W mięsie tuczników otrzymujących dietę z 0,5% dodatkiem oleju lnianego (zawiera ponad 50% kwasu linolenowego podatnego na procesy utleniania) zaobserwowano zwiększone procesy utleniania, zwłaszcza po poddaniu mięsa obróbce termicznej. Zwiększenie w mięsie zawartości α -tokoferolu obniżało powstawanie tlenków cholesterolu (26). W konserwach z tuńczyka tlenki cholesterolu występowały w ilości od 40 do 350 $\mu\text{g/g}$ tłuszczu (27). Według tych autorów oznaczanie 7-ketocholesterolu może być dobrym wskaźnikiem zawartości tlenków cholesterolu w konserwach rybnych.

W żywieniu zwierząt stosowane są często mączki rybne jako źródło cennego białka, które ponadto nie zwiększają zagrożeń przeniesienia chorób zakaźnych na zwierzęta i odzwierzęcych na człowieka (np. BSE). Scolari i wsp. (20) zbadali 22 próbki mączki rybnej dostępne na rynku (z Norwegii, Chile i Peru) na zawartość cholesterolu i jego tlenków w czasie ich przechowywania. Zawartość cholesterolu w badanych próbkach wynosiła od 25 do 65 g/kg lipidów przy zawartości lipidów od 8 do 11%. Warto zauważyć, że w mączkach rybnych znajduje się więcej tłuszczu niż to wynika z zawartości w mięśniach ryb, ponieważ do produkcji mączek wykorzystuje się całe tuszki ryb, a narządy wewnętrzne zawierają więcej tłuszczu niż mięśnie. Z tlenków cholesterolu tylko 7 β -hydroksycholesterol i 7-ketocholesterol występowały w znaczących ilościach.

Stężenie 7 β -hydroksycholesterolu wahało się od 3,9 do 105,6 mg/kg lipidów (0,4–9,4 mg/kg s.m), zaś 7-ketocholesterolu od 2,0 do 56 mg/kg lipidów (0,2–5,0 mg/kg s.m.). W czasie przechowywania jednej z próbek przez 42 dni (temp. około 25°C i 50% wilgotności) stężenie 7 β -hydroksycholesterolu i 7-ketocholesterolu wzrosło odpowiednio do 345 i 376% wartości wyjściowej. Wynika z tego, że w przypadku mączek rybnych przechowywanie, poza przetwarzaniem, może być kluczowym czynnikiem pogarszającym wartość karmy z mączką rybną.

Zawartość produktów utlenienia cholesterolu w pokarmach i paszach

Produkty mleczarskie. W badaniach wykonanych w Australii stwierdzono, że w pełnym mleku może znajdować się 20–30 mg PUCh/kg (28). Proszek mleczny wytwarzany w obecności gazów obojętnych lub wytwarzany przy zastosowaniu niskiej temperatury suszenia, a następnie przechowywany w opakowaniach gazoszczelnych zawiera tylko śladowe ilości produktów utlenienia cholesterolu (29). Badania Scolari i wsp. (20) wskazują, że w prawidłowo przygotowanych preparatach mlekozastępczych (suszenie w atmosferze azotu) zawartość 7-ketocholesterolu może być znacznie mniejsza aniżeli w świeżym mleku kobyecym. Świeże masło wytwarzane w nowoczesnych przetwórnich zawiera ślady 7-ketocholesterolu (30). Masło z dodatkiem olejów roślinnych (dairy spreads) zawiera większe ilości PUCh, które powstają w czasie mieszania surowców w warunkach dostępu tlenu. Niska temperatura obniża tempo utleniania cholesterolu i dlatego masło przechowywane w temperaturze –18°C, nawet przez 13 tygodni, zawierało tylko ślady tlenków cholesterolu (31). Hiesberger i Luf (32) badali generowanie tlenków cholesterolu w maśle przechowywanym w temperaturze pokojowej (ok. 20°C) lub w lodówce (ok. 4°C) w obecności światła zwykłego lub UV. Masło do doświadczenia było mrożone przez 6 miesięcy w chłodni przemysłowej. W maśle takim stwierdzono tylko ślady PUCh. Po rozmrożeniu próbki masła rozsmarowywano w cienkich warstwach (5 mm) w płytkach Petriego bez przykrycia. Przechowywanie próbek w lodówce z oświetleniem dopiero po 3 tygodniach, a w temperaturze pokojowej już po kilku dniach powodowało powstawanie znaczących ilości PUCh.

Miękkie i twarde sery żółte zawierają tylko ślady PUCh, ale ser rozdrobniony (np. Parmezan, Romano) – 0,5–2,2 mg PUCh /kg frakcji lipidowej. W serach tłustych przechowywanych przez rok tylko przy dostępie światła i w temperaturze 37°C wytwarzany był w znaczących ilościach 7-ketocholesterol (3,3 mg/kg; 33).

Jaja. Szczególnie ich żółtka zawierają dużo cholesterolu (około 200 mg/żółtko). We wczesnych badaniach wykonanych w Australii wykazano, że w świeżych lub przechowywanych w lodówce jajach nie stwierdza się tlenków cholesterolu (28). Również Paniangvait i wsp. (34) w świeżych jajach stwierdzili tylko ślady PUCh. Smażenie świeżych jaj przez 1 min zwiększało zawartość tlenków cholesterolu do 8,4, a przy smażeniu przez 2 minuty do 12,4 mg/100 g porcję (28). Gotowanie, a szczególnie proszkowanie jaj zwiększa istotnie zawartość PUCh. W proszku jajecznym stwierdzano od 55 do 113 mg PUCh/kg, z tego najwięcej epoksydów (28). Na zawartość PUCh w przetwarzanych jajach wpływa głównie żywienie kur niosek. W jednym z doświadczeń kury nioski karmiono dietą zawierającą olej słonecznikowy lub z siemienia lnianego z dodatkiem lub bez octanu α -tokoferolu. Jaja od tych kur były suszone metodą rozpyłową. Proszek przechowywano w ciemności w temperaturze pokojowej. Stężenie tlenków cholesterolu wynosiło tuż po suszeniu 18,1 i 39,3 μ g/g po 12 miesiącach przechowywania. Dodatek witaminy E do karmy dla kur niosek obniżał powstawanie PUCh w czasie przechowywania proszku jajecznego (35). Dodatek do już sproszkowanych żółtek jaj ekwimolarnych ilości BHA, askorbinianu palmitynowego lub mieszaniny tokoferoli wykazało, że tylko tokoferole i BHA hamowały wytwarzanie PUCh i jedynie 7-ketocholesterolu w czasie przechowywania próbek w temperaturze pokojowej (36). Również Li i wsp. (37) stwierdzili, że dodatek witaminy E do diet dla kur niosek ograniczał powstawanie tlenków cholesterolu w czasie proszkowania i przechowywania proszku jajecznego pochodzącego z jaj kur niosek otrzymujących w diecie dodatki tokoferoli.

Mięso. W produktach mięsnych spotykamy najczęściej 7 β -hydroksycholesterol, 5,6 α -epoksycholesterol, 7-ketocholesterol i 25-hydroksycholesterol. W świeżym mięsie PUCh występują na ogół w ilościach śladowych (38), ale ponieważ mięso przetwarzane (gotowanie, smażenie) zawiera znaczące ilości PUCh, to jest ono na ogół głównym źródłem tlenków cholesterolu w naszych dietach. W czasie przetwarzania mięsa na produkty gotowe do spożycia zwiększa się w nich stężenie PUCh. Procesy te przyspiesza kontakt z tlenem (powietrze, wysoka temperatura przetwarzania, dostęp światła, jony metali, promieniowanie jonizujące, niski poziom przeciwutleniaczy itp.). Również przy długim przechowywaniu produktów pochodzenia zwierzęcego rośnie w nich stężenie PUCh. Szczególnie dużo PUCh powstaje w produktach poddanych wstępnie obróbce cieplej (np. smażenie) i następnie po wychłodzeniu przechowywane w lodówce; w takich warunkach ilość PUCh może się zwiększyć nawet 10-krotnie (30). Hernández i wsp. (39) wykazali, że mięso wieprzowe zamknięte w opakowaniu próżniowym i przechowywane w chłodni w -18°C przez 6 miesięcy podlegało w niewielkim stopniu procesom utleniania.

Tabela 4. Zawartość tłuszczu i cholesterolu w świeżym mięsie prosiąt i dorosłych tuczników (40)

Pochodzenie próbki	Liczba badanych próbek	Ogólny tłuszcz g/100g	Cholesterol mg/100 g
Prosięta ssące 15-dniowe	5	3,8 ^a	98 ^a
Prosięta ssące 21-dniowe	5	3,2 ^{ab}	95 ^a
Polędwica z dorosłego tuczniaka	3	2,4 ^b	44 ^b
Szynka z dorosłego tuczniaka	3	3,5 ^{ab}	49 ^b

a,b,c – różne litery wskazują na istotność różnic między średnimi przy $p < 0,05$

Stężenie cholesterolu w mięsie wieprzowym zmniejsza się z wiekiem ubijanych zwierząt (tab. 4) i u 15–21-dniowych ssących prosiąt jest w przybliżeniu dwukrotnie wyższe w porównaniu do stężenia w mięsie dorosłych tuczników (40). W baraninie w Indiach stwierdzono około 1 g cholesterolu/kg mięsa (41). Z tlenków cholesterolu najwięcej stwierdzono α i β epoksydów cholesterolu i 7-ketocholesterolu, a więc podobnie jak w mięsie wołowym (42). Novelli i wsp. (43) badali stężenie tlenków cholesterolu w świeżej oraz mrożonej i przechowywanej przez 1, 3 i 6 miesięcy wieprzowinie oraz wytwarzanych z niej wędlin (salami i mortadela). W badanych próbkach przygotowywanych w laboratorium, jak i kupionych w sklepach stwierdzono duże wahania w zawartości tlenków cholesterolu, ale zawsze znacznie poniżej wartości niebezpiecznych dla konsumenta. Przy przechowywaniu w lodówce przy dostępie tlenu mięsa z indyka, wieprzowego i wołowego najwięcej tlenków cholesterolu powstało w mięsie z indyka, a najmniej w mięsie wołowym (tab. 5). W mięsie z indyka i wieprzowym najwięcej było 7 α -hydroksycholesterolu, 7 β -hydroksycholesterolu i 7-ketocholesterolu, w mięsie wołowym najwięcej zaś było epoksydowych pochodnych (5,6 α - i 5,6 β -epoksycholesterol) i 20 α -hydroksycholesterolu (tab. 6). W mięsie o podwyższonej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych nasilone jest wytwarzanie PUCh. Proces ten można hamować dodatkiem azotynu sodowego lub dodatkiem roślinnych przeciwutleniaczy, np. katechin z jabłek (44). Naturalne przeciwutleniacze jeszcze w małym stopniu są wykorzystywane w przemyśle spożywczym, w tym również do ograniczenia powstawania PUCh w produktach mięsnych.

Już dawno wykazano, że w tłuszczu (tłój lub oleju) używanym do głębokiego smażenia kilkadziesiąt procent cholesterolu i kwasów tłuszczowych podlega utlenianiu (45).

W czasie ogrzewania olejów roślinnych podobnym zmianom ulegają znajdujące się w nich fitosterole, ale ich ewentualne szkodliwe działanie na organizmy ssaków jest mniej rozpoznane (46). Surowe oleje roślinne poddawane są rafinacji i dodatkowemu oczyszczaniu (bleaching) i już w czasie tej obróbki część fitosteroli podlega utlenianiu. Najwięcej fitooksysterolu znaleziono w olejach słonecznikowym i kukurydzianym – od 4 do ponad 60 mg/kg (47).

Tabela 5. Stężenie produktów utleniania cholesterolu* (mg/kg) w mięsie z indyka, wołowym i wieprzowym wstępnie gotowanych (85°C przez 25 min) i przechowywanych przez 7 dni w opakowaniach próżniowych lub przy dostępie tlenu (58)

	Dzień 0		Po 7 dniach przechowywania w 4°C	
	opakowanie próżniowe	opakowanie z dostępem tlenu	opakowanie próżniowe	opakowanie z dostępem tlenu
Mięso z indyka – nogi				
TBARS, mg MDA/kg	3,95	4,55	4,44	10,87
Suma tlenków cholesterolu	74,4	53,8	160,1 ^b	568,1 ^a
Polędwiczka wieprzowa				
Suma tlenków cholesterolu	61,9	63,2	43,8 ^b	170,4 ^a
Polędwica wołowa				
Suma tlenków cholesterolu	29,9	63,2	14,0 ^b	252,2 ^a

a,b,c – różne litery wskazują na istotność różnic między średnimi przy p<0,05

Tłuszcze używane do głębokiego smażenia można częściowo regenerować, przepuszczając gorący olej przez specjalne filtry zawierające na przykład krzemiany magnezu zatrzymujące te szkodliwe produkty utleniania (48). Wpływ głębokiego w oleju słonecznikowym w temperaturze od 160 do 180°C na wytwarzanie tlenków cholesterolu badali Echarte i wsp. (49). W świeżej polędwicy stwierdzono poniżej 1 mg PUCh/kg, zaś po smażeniu od 9 do 11 mg/kg; głównymi tlenkami cholesterolu był 7-ketocholesterol i 7β-hydroksycholesterol.

Zanieczyszczenie produktów pochodzenia zwierzęcego, szczególnie mięsa, patogennymi mikroorganizmami stanowi poważny problem w ochronie zdrowia publicznego. Ostatnie badania wskazują, że problem ten można częściowo rozwiązać przez poddawanie mięsa wysokiemu ciśnieniu hydrostatycznemu (HHP– high hydrostatic pressure). Wysokie ciśnienie może jednak zwiększać utlenianie lipidów, w tym również cholesterolu. Ostatnio wykonano doświadczenie z mięsem indykiem pozyskiwanym w procesie mechanicznego odkostnienia (50). Próbkę mięsa poddawano ciśnieniu 400 MPa przez 20 min i następnie przechowywano przez 8 miesięcy. Traktowanie takie zmniejszyło istotnie zawartość bakterii, ale nasiliło równocześnie procesy utleniania. Po 8 miesiącach przechowywania takiego mięsa (-20°C) stężenie tlenków cholesterolu wynosiło w próbkach kontrolnych około 15 mg/kg, a w próbkach poddanych wysokiemu ciśnieniu – 20 mg/kg. Głównymi tlenkami cholesterolu były: 7β-hydroksycholesterol i 7-ketocholesterol oraz w mniejszych ilościach 5,6α-epoksycholesterol i cholestantriol. Autorzy sugerują, że dodatek do mięsa przeciwutleniaczy może ograniczyć utlenianie lipidów przy stosowaniu HHP.

Tabela 6. Zawartość tlenków cholesterolu (μg/g tłuszczu) w mielonym mięsie przechowywanym przez 7 dni w lodówce (4°C) przy dostępie tlenu (42)

Tlenki cholesterolu	Mięso z indyka (noga)	Polędwiczka wieprzowa	Polędwica wołowa
7α- i 7β-hydroksycholesterol	51,9	29,2	11,8
5,6α-epoksycholesterol	6,4	7,6	16,1
5,6β-epoksycholesterol	ślady	ślady	3,7
20α-hydroksycholesterol	ślady	ślady	5,3
Cholestanetriol	ślady	1,1	0,3
7-ketocholesterol	19,0	15,0	8,4

Tabela 7. Wpływ zawartości witaminy E w karmie brojlerów na stężenie α -tokoferolu oraz 20 α -hydroksycholesterolu w rozmrożonych i zmielonych mięśni piersiowych ptaków. Zmielone próbki przechowywano przez 12 dni w lodówce w 4°C (53)

Octan α -tokoferylu w mg/kg karmy	α -tokoferol mg/kg świeżo zmielonych próbek	Stężenie po 12 dniach przechowywania w lodówce (4°C)	
		TBARS, mg MDA/kg	20 α -hydroksy-cholesterol
20	4,8a	4,3c	1,4c
200	19,8b	1,8b	0,6b
800	47,9c	0,9a	0,3a

a,b,c – różne litery wskazują na istotność różnic między średnimi przy $p < 0,05$

Przeciwutleniacze w paszach dla zwierząt gospodarskich

Ograniczenie zawartości cholesterolu w tuszkach drobiowych (do 30%) uzyskano przez wprowadzenie do diety pasty czosnkowej (51). Ograniczenie utleniania cholesterolu można również uzyskać przez żywienie zwierząt paszami zawierającymi naturalne przeciwutleniacze. Maddock i wsp. (52) żywili opasy młodego bydła przez ostatnie 100 dni przed ubojem mieszankami pasz wzbogaconymi w przeciwutleniacze: witaminę E (50, 150, 250 lub 500 mg/kg) i etoksykinę (150 mg/kg). Po wychłodzeniu tusz przygotowywano steki, które przechowywano w 4°C warunkach tlenowych przez 3 lub 7 dni. Steki w dniu ich przyrządzenia miały niskie stężenie TBARS, po 7 dniach przechowywania stężenie TBARS w stekach z grupy kontrolnej (50 mg/kg wit. E) wynosiło nieco ponad 2 mg MDA/kg, zaś z grupy otrzymującej 500 mg witaminy E cztery razy mniej. Galvin i wsp. (53) żywili brojlery dietą standardową z dodatkiem 20, 200 lub 800 mg octanu tokoferylu/kg karmy. Wzrastające ilości witaminy E w karmie zwiększały stężenie α -tokoferolu w tuszce, również w czasie przechowywania tuszek w lodówce, jak i przy późniejszym gotowaniu (tab. 7) Skutecznym sposobem ograniczenia procesów utleniania przetwarzanego i przechowywanego mięsa jest podawanie zwierzętom w paszy witaminy E nawet do 600 g/kg paszy, co zostało obszernie omówione w pracy przeglądowej Jensen i wsp. (54). Papageorgiou i wsp. (55) wykazali, że dodatek do diety dla indyków olejku z lebiodki pospolitej (*Origanum vulgare*) i octanu tokoferylu (każdy po 100 g/kg paszy) zwiększało potencjał przeciwutleniający w tkankach, co powodowało ograniczenie utleniania lipidów. Wpływ dodatków octanu α -tokoferylu i/lub kwasu askorbinowego do karm dla brojlerów na stabilność cholesterolu i kwasów tłuszczowych w czasie przechowywania i gotowania badali Grau i wsp. (56). Podawanie diety zawierającej 225 mg octanu α -tokoferylu/kg karmy istotnie ograniczało powstawanie tlenków cholesterolu i utlenianie kwasów tłuszczowych,

Tabela 8. Sposoby obniżania zawartości produktów utleniania cholesterolu w pokarmach (29)

1. Obniżanie zawartości cholesterolu w pokarmach spożywczych
2. Unikanie używania do smażenia tłuszczów zawierających cholesterol
3. Stosowanie przeciwutleniaczy (np. α -tokoferol) do karmienia zwierząt i/lub w czasie procesów technologicznych
4. Stosowanie przeciwutleniaczy w czasie przetwarzania produktów, jeśli zezwalają na to odpowiednie normy prawne
5. Ograniczanie czasu przechowywania żywności, szczególnie wstępnie przetworzonej
6. **Przetwarzanie termicznie produktów w jak najniższej temperaturze**
7. Stosowanie opakowań uniemożliwiających lub ograniczających dostęp tlenu
8. Przechowywanie produktów spożywczych bez dostępu światła i w niskiej temperaturze
9. Ocenianie nowych technologii przetwarzania pokarmów pod kątem ich **ewentualnego działania sprzyjającego procesom utleniania**

podczas gdy kwas askorbinowy (110 mg/kg karmy) nie wykazywało tego efektu. Lopez-Bote i wsp. (57) dodawali do diet dla brojlerów olejek z rozmarynu lub z szałwi (500 mg/kg) lub octan tokoferylu (200 mg/kg). W mięsie ptaków otrzymujących olejki z roślin przyprawowych stężenie tlenków cholesterolu było niższe w porównaniu do próbek z ptaków kontrolnych. W największym stopniu stężenie PUCh obniżał dodatek witaminy E.

Rey i wsp. (26) podawali tucznikom diety z udziałem olejów roślinnych do 20/kg paszy (słonecznikowy, oliwa z oliwek, siemię lniane) z udziałem octanu α -tokoferylu (10 lub 200 mg/kg karmy). Doświadczenie trwało 42 dni (od 50 kg do uboju). Większe dodatki witaminy E istotnie ograniczały zawartość PUCh w gotowanym mięsie.

Sposoby ograniczania zawartości produktów utleniania cholesterolu w produktach spożywczych

Uznając szkodliwe działanie tlenków cholesterolu na organizm powinniśmy ograniczać ich zawartość w produktach pochodzenia zwierzęcego oraz przetwarzanie tych produktów, zwłaszcza przy dostępie tlenu oraz ograniczać czas przechowywania, szczególnie produktów poddanych wstępnej obróbce cieplnej. Bardziej szczegółowe zalecenia przedstawiono w tabeli 8 (29). Duże znaczenie w ograniczaniu ich powstawania w pokarmach pochodzenia zwierzęcego może mieć suplementacja diet dla zwierząt w przeciwutleniacze pochodzenia naturalnego – witaminę E i związki polifenolowe.

Piśmiennictwo

1. Brown A., Jessup W.: Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999, **142**, 1–28.
2. Vance D., Bosch H.: Cholesterol in the year 2000. *Biochem. Biophys. Acta* 2000, **1529**, 1–8.
3. Obara A., Kotczak T.: Biologiczna rola produktów utleniania cholesterolu w organizmie człowieka i zwierząt. *Medycyna Wet.* 2004, **60**, 573–578.
4. Lee J.H., Shoeman D.W., Kim S.-S., Csallany A.S.: The effect of superoxide anion in the production of seven major cholesterol oxidation products in aprotic and protic conditions. *Intern. J. Food Sci. Nutr.* 1997, **48**, 151–159.
5. Russell D.: Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochem. Biophys. Acta* 2000, **1529**, 126–135.
6. Morei D., Lin C.: Cellular biochemistry of oxysterols derived from the diet or oxidation in vivo. *Nutritional Biochem.* 1996, **7**, 495–506.
7. Wolf G.: The role of oxysterols in cholesterol homeostasis. *Nutr. Rev.* 1999, **57**, 196–198.
8. Drevon C.A., Weinstein D.B., Steinberg D.: Regulation of cholesterol esterification and biosynthesis in monolayer cultures of normal adult rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 1980, **255**, 9128–9137.
9. LaHoua Z., Astruc M.E., Crastes A.: Serum-induced arachidonic acid release and prostaglandin biosynthesis are potentiated by oxygenated sterols in NRK 49F cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1988, **958**, 396–404.
10. Brown A., Jessup W.: Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999, **142**, 1–28.
11. Bochkov V.N., Leitinger N.: Anti-inflammatory properties of lipid oxidation products. *J. Mol. Med.* 2003, **81**, 613–626.
12. Chizzolini R., Novelli E., Zanardi E.: Oxidation in traditional Mediterranean meat products. *Meat Sci.* 1998, **49** (Suppl. 1), S87–S99.
13. Chizzolini R., Zanardi E., Dorigoni V., Ghidini S.: Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat meat and meat products. *Trends Food Sci. Technol.* 1999, **10**, 119–128.
14. Guardiola F., Codony R., Addis B.P., Rafecas M., Boatella J.: Effects of oxysterols: current status. *Food Chem. Toxicol.* 1996, **34**, 193–211.
15. Leonarduzzi G., Sottero B., Poli G.: Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *J. Nutr. Biochem.* 2000, **13**, 700–710.
16. Niranjana T.G., Krishnakanth T.P.: Effect of ghee on rat platelets. *Nutr. Res.* **20**, 1125–1138.
17. Csallany A.S., Lee J.H., Shoeman D.W.: Protection of superoxide-induced cholesterol oxidation by antioxidant condition. *Intern. J. Food Sci. Nutr.* 2002, **53**, 403–409.
18. Tai C.Y., Chen Y.C., Chen B.H.: Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: an overview. *J. Food Drug Analysis.* 1999, **7**, 234–257.
19. Jiménez-Colmenero F., Carballo J., Cofrades S.: Healthier meat products: their role as functional foods. *Meat Sci.* 2001, **59**, 3–13.

20. Scolari M., Luzzana U., Stefani L., Mentasti T., Moretti T., Velfre F., Lopez C., Hardy R.W.: Quantification of cholesterol oxidation products in commercial fish meals and their formation during storage. *Aquaculture Res.* 2000, **31**, 785–791.
21. Krut L.H., Schonfeld G., Ostlund R.E.: The effect of oxidizing cholesterol on gastrointestinal absorption, plasma clearance, tissue distribution, and processing by endothelial cells. *Atheroscler. Thrombosis* 1997, **17**, 778–785.
22. Salonen J.T., Nyyssonen K., Salonen R., Porkkala-Sarataho E., Tuomainen T.P., Diczfalusy U., Bjorkhem I.: Lipoprotein oxidation and progression of carotenoid Atherosclerosis. *Circulation* 1997, **95**, 840–845.
23. Zhou Q., Wasowicz E., Handler B., Fleicher L., Kummerow F.A.: An excess concentration of oxysterols in plasma is cytotoxic to cultured endothelial cells. *Atherosclerosis* 2000, **149**, 191–197.
24. Brandsch C., Ringseis R., Eder K.: High dietary iron concentration enhance the formation of cholesterol oxidation products in the liver of adult rats fed salmon oil with minimal effects on antioxidant status. *J. Nutr.* 2002, **132**, 2263–2269.
25. Ringseis R., Eder K.: Insufficient dietary vitamin E increases the concentration of 7 β -hydroxycholesterol in tissues of rats fed salmon oil. *J. Nutr.* 2002, **132**, 3732–3735.
26. Rey I., Kerry J.P., Lynch P.B., Lopez-Bote C.J., Buckley D.J., Morrissey P.A.: Effect of dietary oils and alpha-tocopheryl acetate supplementation on lipid (TBARS) and cholesterol oxidation in cooked pork. *J. Anim. Sci.* 2001, **79**, 1201–1208.
27. Zunin P., Boggia R., Evangelisti F.: Identification and quantification of cholesterol oxidation products in canned tuna. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 2001, **78**, 1035–1040.
28. Sarantinos J., O'Dea K., Sinclair A.J.: Cholesterol oxides in Australian food: identification and quantification. *Food Austr.* 1993, **45**, 485–490.
29. Savage G.O., Dutta P.C., Rodriguez-Estrada M.T.: Cholesterol oxides: their occurrence and methods to prevent their generation in foods. *Asia Pacific J. Clin Nutr.* 2002, **11**, 72–78.
30. Larkeson B., Dutta P.C., Hansson I.: Effects of frying and storage on cholesterol oxidation in minced products. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 2000, **77**, 675–680.
31. Nielson J.H., Olsen C.E., Jensen C., Skipsted L.H.: Cholesterol oxidation of butter and dairy spread during storage. *J. Dairy Res.* 1996, **63**, 159–167.
32. Hiesberger J., Luf W.: Oxidation of cholesterol in butter during storage – effects of light and temperature. *Eur. Food Res. Technol.* 2000, **211**, 161–164.
33. Kristensen D., Hansen E., Arndal A., Trinderub R.A., Skibsted L.H.: Influence of light and temperature on the colour and oxidative stability of processed cheese. *Intern. Dairy J.* 2001, **11**, 837–843.
34. Paniangvait P., King A.J., Jones A.D., German B.G.: Cholesterol oxides in foods of animal origin. *J. Food Sci.* 1995, **60**, 1159–1174.
35. Galobart J., Guardiola F., Barroeta A.C., Lopez-Ferrer S., Baucells M.D.: Influence of dietary supplementation with α -tocopheryl acetate and canthaxantin on cholesterol oxidation in α -3 and α -6 fatty acid-enriched spray-dried eggs. *J. Food Sci.* 2002, **67**, 2460–2066.
36. Brinkerhoff B.E., Huber K.C., Huber C.S., Pike O.A.: Effect antioxidants on cholesterol oxidation in spray-dried egg yolk during extended ambient storage. *J. Food Sci.* 2002, **67**, 2857–2859.
37. Li S.X., Cherian G., Sim J.S.: Cholesterol oxidation in egg yolk powder during storage and heating as affected by dietary oils and tocopherol. *J. Food Sci.* 1996, **81**, 721–725.
38. Hwang K.T., Maeker G.: Quantification of oxidation products in unirradiated and irradiated meats. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 1993, **70**, 371–376.
39. Hernández P., Navarro J., Toldrá F.: Effect of frozen storage on lipids and lipolytic activities in the longissimus dorsi muscle of the pig. *Z. Lebensm. Untwrs Forsch. A.* 1999, **208**, 110–115.
40. Bragagnolo N., Rodrigues-Amaya D.B. Simultaneous determination of total lipid, cholesterol and fatty acids in meat and backfat of suckling and adult pigs. *Food Chem.* 2002, **79**, 255–260.
41. Kowale B.N., Rao K., Babu P., Sharma N., Bisht G.S.: Lipid oxidation and cholesterol oxidation in mutton during cooking and storage. *Meat Sci.* 1996, **43**, 195–202.
42. Nam K.C., Du M., Jo C., Ahn D.U.: Cholesterol oxidation products in irradiated raw meat with different packing and storage time. *Meat Sci.* 2001, **58**, 431–435.
43. Novelli E., Zanardi E., Ghirelli G.P., Campanini G., Dazzi G., Madarena G., Chizzolini R.: Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame Milano and mortadella. *Meat Sci.* 1998, **48**, 29–40.
44. Kyoichi O., Shinichi H., Shingo N., Michihiro S.: Cholesterol oxidation in meat products and its regulation by supplementation of sodium nitrite and apple polyphenol before processing. *J. Agr. Food Chem.* 2000, **48**, 3823–3829.
45. Bascoul J., Domergue N., Olle M., Paulet A.C.: Autoxidation of cholesterol in tallows heated under deep frying conditions: evaluation of oxysterols by GLC and TLC-FID. *Lipids* 1986, **21**, 383–387.

46. Ostlund R.E., Racette S.B., Swenson W.F.: Effects of trace components of dietary fat on cholesterol metabolism: phytosterol, oxysterols, and squalene. *Nutr. Rev.* 2002, **60**, 349–359.
47. Bortolomeazzi R., Cordaro F., Pizzale L., Conte L.S.: Presence of phytosterol oxides in crude oils and their fate during refining. *J. Agric. Food Chem.* 2003, **51**, 2394–2401.
48. Yates R.A., Caldwell J.D.: Regeneration of oils used for deep frying: a comparison of active filter aids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 1993, **70**, 507–511.
49. Echarte M., Ansorena D., Astiasaran I.: Fatty acid modification and cholesterol oxidation in pork loin during frying at different temperatures. *J. Food Protection.* 2001, **67**, 1062–1066.
50. Tuboly E., Lebovics V.K., Gaál Ö., Mészáros L., Farkas J.: Microbiological and lipid oxidation on mechanically deboned turkey meat treated by high hydrostatic pressure. *J. Food Engineering.* 2003, **56**, 241–244.
51. Chowdhury S.R., Chowdhury S.D., Smith T.K.: Effects of dietary garlic on cholesterol metabolism in laying hens. *Poultry Sci.* 2002, **81**, 1856–1862.
52. Maddock R.J., Wule D.M., McKenna D.R.: The effect of ethoxyquin and vitamin E supplementation on the display life of beef steacks. *J. Food Sci.* 2003, **68**, 1072–1074.
53. Galvin K., Morrissey P.A., Buckley D.J.: Cholesterol oxides in processed chicken muscle is influenced by dietary α -tocopherol supplementation. *Meat Sci.* 1998, **48**, 1–9.
54. Jensen C., Lauridsen C., Bertelsen G.: Dietary vitamin E quality and storage stability of pork and poultry. *Trends Food Sci. Technol.* 1998, **9**, 62–72.
55. Papageorgiou G., Botsoglou N., Govaris A., Iliadis S., Botsoglou E.: Effect of dietary oregano oil and α -tocopheryl acetate supplementation on iron-induced lipid oxidation of turkey breast, thigh, liver and heart tissues. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2003, **87**, 324–335.
56. Grau A., Codony R., Grimpa S., Baucells M.D., Guarola F.: Cholesterol oxidation in frozen dark chicken meat: influence of dietary source, and α -tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Meat Sci.* 2001, **57**, 197–208.
57. Lopez-Bote C.J., Gray J.I., Goma E.A., Flegal C.J.: Effect of dietary administration of oil extract from rosemary and seed on lipid oxidation in broiler meat. *Brit. Poultry Sci.* 1998, **39**, 235–240.
58. Ahn D.U., Nam K.C., Du M., Jo C.: Effect of irradiation and packing conditions after cooking on the formation of cholesterol and lipid oxidation products in meat during storage. *Meat Sci.* 2001, **57**, 413–418.

Dr inż. J. Wilczak, Zakład Dietetyki Katedry Nauk Fizjologicznych,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-787 Warszawa
e-mail: wilczak@alpha.sggw.waw.pl