

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Stanovení metabolitů nekalorických sladidel
v biologických tekutinách s pomocí ^1H NMR**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Veronika Karnetová

Studijní program: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.

Konzultantka: Chandrama Roy Chowdhury

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci " Stanovení metabolitů nekalorických sladidel v biologických tekutinách s pomocí $^1\text{H NMR}$ " vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Byl použit chat GPT, ale pouze jako prostředek pro úpravu stylistiky, a ne jako generativní umělá inteligence. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19.4.2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D a své konzultantce Chandramě Roy Chowdhury za užitečné a cenné rady při zpracovávání diplomové práce a za ochotu pomoci s jakýmkoliv problémem, týkajícím se právě této práce. Dále bych ráda poděkovala všem svým dobrovolníkům, kteří byli ochotni přispět ke vzniku této práce a bez kterých by nebylo možné studii provést. V neposlední řadě mé obrovské díky patří mé rodině a přátelům, kteří mi byli neuvěřitelnou oporou nejen při zpracovávání této diplomové práce, ale i po celou dobu mých studií.

Stanovení metabolitů nekalorických sladidel v biologických tekutinách s pomocí ^1H NMR

Souhrn

V diplomové práci „Stanovení metabolitů nekalorických sladidel v biologických tekutinách s pomocí ^1H NMR“ byl zkoumán způsob exkrece acesulfamu K (ACK) močí a slinami u lidí a jeho vliv na metabolický profil těchto tělních tekutin.

Studie se účastnilo 16 dobrovolníků (9 žen a 7 mužů). Každý z nich odevzdal 2 kontrolní vzorky moči i slin, poté zkonzumoval 0,5 l Coca-Coly Zero (proběhla intervence) a dále poskytl vzorky moči a slin odebírané během 24 hodin. Odebrané vzorky byly následně zpracovány a podrobeny NMR analýze. V této diplomové práci byly nakonec využity pouze vzorky moči, z důvodu nedostatečného objemu jednotlivých vzorků slin, které pak musely být naředěny destilovanou vodou. V důsledku toho klesla koncentrace ACK pod detekční limit NMR.

Ve vzorcích moči bylo kvantifikováno celkem 21 metabolitů. Koncentrace těchto metabolitů byly porovnány mezi pohlavími subjektů. Výsledky ukázaly, že ženská moč obsahovala větší množství jednotlivých metabolitů. Statisticky signifikantní rozdíl byl pozorován u fruktosy ($p = 0,0499$; $q = 0,1892$), glukosy ($p = 0,0379$; $q = 0,1892$), hippurátu ($p = 0,0207$; $q = 0,1791$), sukcinátu ($p = 0,0038$; $q = 0,0909$) a močoviny ($p = 0,0070$; $q = 0,0909$), ale ne však po korekci míry falešně pozitivních výsledků (FDR). Dále byl sledován vliv tělesné hmotnosti a výšky na koncentraci některých metabolitů v moči. S oběma tělesnými proporcemi koreloval ACK ($r_{\text{výška}} = -0,58$; $r_{\text{hmotnost}} = -0,61$) a kreatin ($r_{\text{výška}} = -0,66$; $r_{\text{hmotnost}} = -0,63$). S výškou koreloval pouze *N,N*-dimethylglycin ($r_{\text{výška}} = -0,7$; $r_{\text{hmotnost}} = -0,35$). V další fázi byly získány výsledky související s intervencí. Byly porovnány průměry koncentrací jednotlivých metabolitů před a po intervenci. Průměrný nárůst koncentrace byl pozorován u ACK (násobný rozdíl (FC) = 1255,6; $p = 0,000031$; $q = 0,00061$), acetonu (FC = 3,2; $p = 0,0010$; $q = 0,0104$), fruktosy (FC = 1,4; $p = 0,0017$; $q = 0,0108$) a metanolu (FC = 3,4; $p = 0,0022$; $q = 0,0108$).

V této diplomové práci bylo zjištěno, že koncentrace metabolitů a ACK v moči se liší mezi muži a ženami a současně je ovlivněna i tělesnou hmotností a výškou subjektů. Nelze však přesně zjistit, jestli změny koncentrací metabolitů souvisely přímo s ACK, jelikož mohly být ovlivněny i jinými faktory. Pro pochopení tohoto tématu je nutné provést další výzkumy, nicméně tato diplomová práce přispívá k rozšíření znalostí o vlivu nízkokalorických sladidel na lidský organismus a vhodnosti využití metody NMR pro účely kvantifikace ACK.

Klíčová slova: acesulfam K; syntetická sladidla; metabolismus; metabolomika; moč; sliny

Determination of metabolites of non-caloric sweeteners in biofluids using ^1H NMR

Summary

In the thesis "Determination of Non-Caloric Sweetener Metabolites in Biological Fluids using ^1H NMR," the excretion method of acesulfame K (ACK) through urine and saliva in humans and its impact on the metabolic profile of these body fluids was investigated.

Sixteen volunteers (9 women and 7 men) participated in the study. They each submitted 2 control urine and saliva samples, then consumed 0.5 l of Coca-Cola Zero (the intervention) and further provided urine and saliva samples collected over 24 hours. Then the samples were processed and subjected to NMR analysis. Only urine samples were used in this thesis due to insufficient volume of individual saliva samples. Then they had to be diluted with distilled water. Consequently, the concentration of ACK fell below the NMR detection limit.

A total of 21 metabolites were quantified in urine samples. The concentrations of these metabolites were compared between a gender. Female urine contained higher amounts of each metabolite. A statistically significant difference was observed for fructose ($p = 0.0499$; $q = 0.1892$), glucose ($p = 0.0379$; $q = 0.1892$), hippurate ($p = 0.0207$; $q = 0.1791$), succinate ($p = 0.0038$; $q = 0.0909$) and urea ($p = 0.0070$; $q = 0.0909$), but not after correction for false-discovery rate (FDR). The effect of body weight and height on the concentration of some metabolites in urine was also investigated. ACK ($r_{\text{height}} = -0.58$; $r_{\text{weight}} = -0.61$) and creatine ($r_{\text{height}} = -0.66$; $r_{\text{weight}} = -0.63$) were correlated with both body proportions. *N,N*-dimethylglycine ($r_{\text{height}} = -0.7$; $r_{\text{weight}} = -0.35$) was correlated only with height. Intervention-related results were obtained afterwards. Average concentrations of individual metabolites before and after the intervention were compared. Average concentration increases were observed for ACK (fold change (FC) = 1255.6; $p = 0.000031$; $q = 0.00061$), acetone (FC = 3.2; $p = 0.0010$; $q = 0.0104$), fructose (FC = 1.4; $p = 0.0017$; $q = 0.0108$) and methanol (FC = 3.4; $p = 0.0022$; $q = 0.0108$).

In the thesis, there was found that urinary metabolite and ACK concentrations differ between males and females and are also affected by body weight and height of the subjects. It could not be determined if the changes in the concentrations were directly related to ACK. They may have been influenced by other factors. Further research is needed to understand this topic. However, this thesis contributes to the knowledge of the effect of low-calorie sweeteners on the human body and the suitability of using NMR for the purpose of ACK quantification.

Keywords: acesulfame K; synthetic sweeteners; metabolism; metabolomics; urine; saliva

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Syntetická sladidla	10
3.1.1 Trávení a metabolismus syntetických sladidel	12
3.1.2 Vliv syntetických sladidel na lidský organismus.....	12
3.1.3 Syntetická sladidla v moči nebo ve stolici jako biomarkery životního stylu....	16
3.1.4 Pohled spotřebitelů na syntetická sladidla	17
3.2 Acesulfam K (E 950)	17
3.2.1 Senzorické vlastnosti ACK.....	18
3.2.2 Metabolismus ACK a jeho vylučování.....	19
3.2.3 Vliv ACK na zdraví	20
3.2.4 Přijatelná denní dávka ACK	22
3.3 Moč a metabolom moči	23
3.3.1 Stabilita moči pro NMR metabolomiku	25
3.3.2 Syntetická sladidla v moči	25
3.4 Sliny a metabolom slin	25
3.4.1 Stabilita slin pro NMR metabolomiku.....	26
3.4.2 Syntetická sladidla v slinách.....	27
3.5 Nukleární magnetická rezonance	27
3.5.1 Popis zařízení a princip metody.....	27
3.5.2 NMR v metabolomice.....	28
3.5.3 Další analytické využití NMR	28
3.5.4 Další analytické metody pro kvantifikaci syntetických sladidel v biologických tekutinách.....	29
4 Metodika	30
4.1 Etické schválení	30
4.2 Odběr vzorků	30
4.3 Stravování dobrovolníků během odběrů vzorků	30
4.4 Přeprava a skladování vzorků	31
4.5 Analýza vzorků	31
4.5.1 Použité laboratorní pomůcky a chemikálie.....	31
4.5.2 Příprava vzorků na NMR analýzu	32
4.5.3 Měření na NMR spektrometru a analýza dat v softwarech	32
4.5.4 Vyhodnocení.....	33
5 Výsledky a diskuse	34
5.1 Stanovení ACK ve slinách	34
5.2 Stanovení ACK v moči	34

5.2.1	Vhodnost metody NMR.....	34
5.2.2	Exkrece ACK močí.....	37
5.2.3	Rozdíly mezi jednotlivými skupinami respondentů	38
5.2.4	Výsledky související s intervencí	41
6	Závěr	45
7	Literatura.....	46
8	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	57
9	Seznam obrázků	58
10	Seznam tabulek	58
11	Seznam příloh.....	58
12	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Vyspělé země spolu s ekonomicky rychle se rozvíjejícími zeměmi řeší problémy spojené s nadváhou a obezitou. Jednou z možností, ke které přistoupili výrobci potravin slazených nápojů, je použití nízkokalorických sladidel jako alternativy k tradičnímu cukru, jehož používání v poslední době nabývá masivních rozměrů. Náhradní sladidla představují širokou paletu látek, která zahrnuje jak syntetická sladidla, jako je sacharin, ACK, aspartam nebo sukralosa, tak i přírodní sloučeniny, např. stévíi a erythritol. Nabízejí sladkost bez významného příspěvku kalorií. Ačkoli jsou tato sladidla široce přijímána jako bezpečná, sílí diskuze o jejich dlouhodobém vlivu na lidské zdraví.

NMR představuje významnou metodu v biochemickém a klinickém výzkumu. Tato metoda nabízí jedno z řešení pro kvantitativní analýzu vybraných sloučenin v biologických tekutinách a umožňuje zároveň získávat informace o metabolickém profilu během jediné analýzy. V kontextu nízkokalorických sladidel, jako je ACK, NMR představuje slibný nástroj pro prozkoumání jejich metabolismu a kinetiky v těle, stejně jako pro posouzení potenciálního vlivu na metabolický profil.

Tato diplomová práce se zaměřuje na kvantitativní stanovení ACK v biologických tekutinách a zkoumání jeho potenciálního nepřímého vlivu na metabolity přítomné v moči nebo slinách. Přítomnost nízkokalorických sladidel v moči, ve slinách a dalších tělních exkretech může sloužit jako významný biomarker příjmu slazených sycených nápojů, což podporuje potřebu hlubšího pochopení jejich metabolismu a interakcí v těle.

Tato práce přispěje k rozšíření znalostí o vlivu nízkokalorických sladidel, konkrétně ACK, na lidský organismus a ověří možnost využití NMR pro účely kvantifikace tohoto sladidla.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Nízkokalorická sladidla poskytují sladkost bez významného příspěvku kalorií a jsou populární jako náhrada cukru pro management kalorií a hmotnosti. Zahrnují umělé i přírodní sloučeniny, jako je sacharin, ACK, aspartam, sukralosa, stévie a erythritol. Většinou projdou tělem s minimálním metabolismem. Jejich přítomnost ve stolici či moči může být významným biomarkerem příjmu slazených sycených nápojů. NMR je robustní metoda pro kvantitativní stanovení vybraných látek nebo léčiv v biologických tekutinách, která také zároveň v jediné analýze může nabídnout informace o metabolickém profilu, zahrnujícím až 60 sloučenin. Tato metoda zatím nebyla použita pro určení kinetiky ACK, ani k zodpovězení vědecké otázky, zda konzumace ACK může nepřímo ovlivnit metabolický otisk moči nebo slin.

Hypotéza: NMR je dostatečně citlivá metoda pro kvantitativní stanovení běžného dietního příjmu ACK a příjem ACK neovlivňuje metabolický profil moči ani slin, svědčící o jeho bezpečnosti.

Cílem této diplomové práce je zhodnotit použitelnost NMR jako metody pro kvantitativní stanovení ACK v biologických tekutinách (moč a sliny). Dále se práce zaměřuje na zkoumání vlivu konzumace ACK na metabolický profil zmiňovaných tělních tekutin.

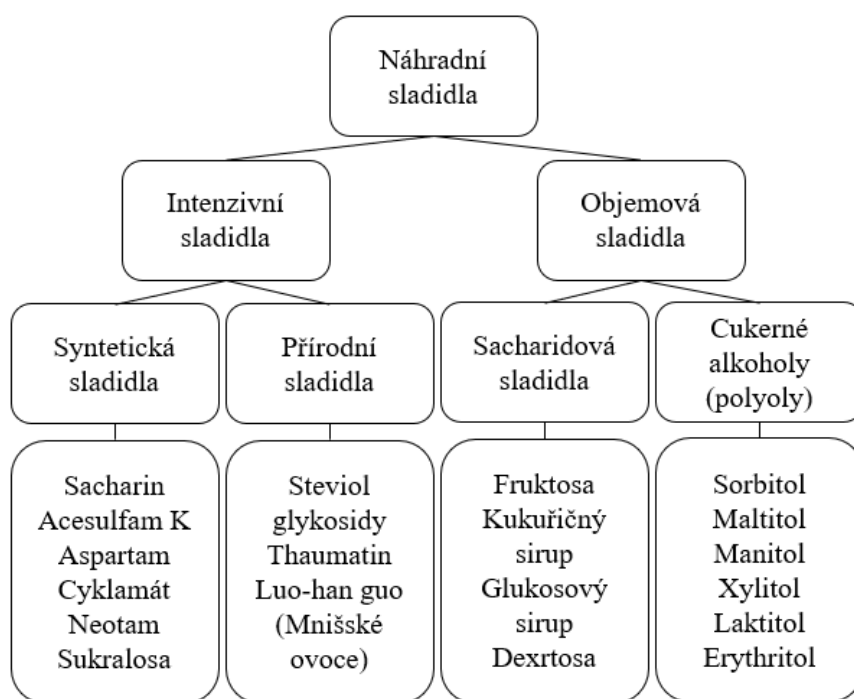
3 Literární rešerše

3.1 Syntetická sladidla

Syntetická sladidla patří mezi přídatné látky. Často se využívají jako stolní sladidla nebo se přidávají přímo do potravin při jejich výrobě. Stejně tak, jako ostatní přídatné látky, musí syntetická sladidla projít hodnocením bezpečnosti dříve, než mohou být uvedena na trh (EFSA 2019).

Hlavním důvodem pro použití syntetických sladidel v potravinářství je nízký obsah kalorií. Stále diskutovaným tématem je vliv a bezpečnost syntetických sladidel na lidský organismus (O'Brien-Nabors 2016).

Jedním ze způsobů dělení náhradních sladidel je dělení na intenzivní a objemová sladidla (obr. 1).



Obrázek č. 1 Rozdělení náhradních sladidel (Jain & Grover 2015)

Intenzivní sladidla jsou charakterizována tím, že poskytují minimální až nulový energetický příjem, zatímco objemová sladidla, ačkoliv obsahují více energie než intenzivní sladidla, mají stále nižší energetickou hodnotu ve srovnání se sacharosou (Jain & Grover 2015).

Tabulka č. 1 Hodnoty u vybraných náhradních sladidel schválených Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) (Dwyer et al. 2015)

Sladidlo	aspartam	ACK	sacharin	sukralosa	steviosidy
* Relativní sladkost ve srovnání se sacharosou	180	200	300	600	200-300
Kcal/g	4	0	0	0	0
Přijatelný denní příjem (mg/kg/den)	50	15	5	5	4
Rok schválení FDA	1981	1988	1958, znovu v roce 2000	1998	2008

* Relativní sladkost ve srovnání se sacharosou (stolní cukr). 1 = referenční hodnota, což je sladkost sacharózy.

Ačkoli jsou náhradní sladidla téměř bez kalorií, ne vždy mohou plně substituovat běžný cukr. To může být způsobeno např. jejich senzoryckými vlastnostmi. I když byla náhradní sladidla vytvořena s cílem co nejlépe napodobit chuť sacharózy, často vykazují další chutě, než pouze sladkou (DuBois & Prakash 2012). Při srovnání chuti některých sladidel se sacharosou bylo zjištěno, že aspartam, erythritol, palatinosa a sukralosa měly nejbližší chuťovou podobnost sacharóze. Naopak ACK, stévie a luo han guo měly odlišné chuťové charakteristiky, zahrnující hořkost, chemickou chuť a nízkou sladkost (Wee et al. 2018). Při senzoryckém hodnocení syntetických sladidel je často zmiňována chuť hořká, kovová, suchá, lékořicová, křídová a medová (Withers et al. 2016; Tan et al. 2020).

Syntetická sladidla, která jsou schválena pro použití v potravinách, jsou distribuována pod obchodními značkami (tab. 2) (FDA 2023).

Tabulka č. 2 Značky vybraných náhradních sladidel schválených FDA (Dwyer et al. 2015)

Sladidlo	aspartam	ACK	sacharin	sukralosa	steviosidy
Značka	NutraSweet®, Equal®, další	Sunett®, Sweet One®	Sweet'N Low®, Sweet Twin®, Sugar Twin®, Necta Sweet®	Splenda®	Stevia®, Truvia™, Sun Crystals®, PureVia™, Sweetleaf Sweetener™

3.1.1 Trávení a metabolismus syntetických sladidel

Syntetická sladidla dále vykazují, v porovnání se sacharosou, i rozdíly v metabolismu (Hakimzadeh & Sardarodiyani 2016). Pro detekci sladké chuti v chuťových pohárcích v ústní dutině se nacházejí primární receptory T1R2/T1R3. Dále je možné tyto receptory nalézt i v jiných částech lidského těla, např. ve střevní sliznici (Dyer et al. 2005), β -buňkách slinivky břišní (Nakagawa et al. 2009) nebo ve žlučových cestách (Toyono et al. 2007).

Tyto receptory sladké chuti se dále podílejí na homeostáze glukosy a uvolňování hormonu sytosti. Tím přispívají k fyziologické regulaci. Jejich dysfunkce může vést k rozvoji nadváhy a obezity nebo k rozvoji diabetes mellitus II. typu. Ve slinivce břišní se tyto receptory mimo jiné podílejí na uvolňování insulinu (Neiers et al. 2016).

Receptory T1R2/T1R3 se aktivují při navázání cílových molekul cukrů ale zároveň i při navázání syntetických sladidel. Tato interakce je základem pro přenos signálů sladké chuti do mozku (Jain & Grover 2015; Lee & Owyang 2019; Tan et al. 2020; Gómez-Fernández et al. 2021). Výzkumy poukazují na to, že z důvodu stimulace jmenovaných chuťových receptorů, mají syntetická sladidla značný vliv na celkový metabolismus (Laffitte et al. 2014). Sukralosa, která je odvozena od cukru, ale není lidským tělem vnímána jako cukr a není v těle metabolizována. Podobně je to u sacharinu (Dwyer et al. 2015). Sacharin je absorbován a distribuován v těle bez významného metabolismu a je vylučován hlavně močí. Aspartam je naopak tráven v tenkém střevě, kde je hydrolyzován na své základní komponenty (na asparagovou kyselinu, fenylalanin a metanol). Ty jsou následně absorbovány a metabolizovány v běžných metabolických drahách. Steviol glykosidy jsou fermentovány mikrobiotou v tlustém střevě na steviol, který je absorbován do jater a vyloučen močí (Pang et al. 2021).

3.1.2 Vliv syntetických sladidel na lidský organismus

3.1.2.1 Vliv syntetických sladidel na tělesnou hmotnost

Celosvětová spotřeba cukru v posledních letech dosahuje vrcholu (Basu et al. 2013), což je jeden z mnoha důvodů rostoucích zdravotních problémů dnešní populace, jako je obezita (Friedrich 2017), diabetes mellitus II. typu a další metabolická onemocnění (Alcaire et al. 2017). Z důvodu eliminace těchto onemocnění se přistoupilo ke snižování přidaných cukrů v potravinách nebo jeho úplnému vynechání. Tento krok vedl k nahrazování cukru syntetickými

sladidly, která jsou méně kalorická až nekalorická (Magnuson et al. 2016; Oliveira et al. 2016; Popkin & Hawkes 2016).

Nahrazení běžného cukru nekalorickými sladidly předpokládalo mírný úbytek hmotnosti v důsledku sníženého příjmu energie sladidel. Bylo prokázáno, že tento úbytek ale není tak významný, aby se syntetická sladidla využívala přímo při redukčních dietách (Stevens et al. 2006; Miller & Perez 2014). Toto zjištění je ovšem v rozporu s výsledky jiné studie, která tvrdí, že konzumace potravin a nápojů s nízkokalorickými sladidly může vést, díky jejich sladké chuti, k nadměrnému příjmu těchto potravin a nápojů. Spotřebitelé mají tedy nutkání se těmito potravinami přejídat a jejich nadměrná konzumace vede poté k nadváze a obezitě (Rogers et al. 2016).

Dle výsledků další studie lidé s nadváhou i lidé s normální tělesnou hmotností, kteří po dobu šesti měsíců konzumovali potraviny a nápoje obsahující umělá sladidla, nezaznamenali v tělesné hmotnosti větší změny než ti, co jedli jídlo s vysokým obsahem sacharidů nebo dostávali placebo (Toews et al. 2019).

V roce 2023 byla vydána nová směrnice Světové zdravotnické organizace (WHO). „WHO navrhuje, aby se necukerná sladidla nepoužívala jako prostředek k dosažení kontroly hmotnosti nebo snížení rizika nepřenositelných nemocí (podmíněné doporučení)“ (WHO 2023a). Nekalorická sladidla totiž nepřinášejí dlouhodobý přínos při snižování tělesného tuku u dospělých a dětí (WHO 2023b). To potvrzuje metaanalýza z roku 2023, která do svého výzkumu zahrnuje pět randomizovaných kontrolovaných studií se 1498 účastníky. Ti byli náhodně přiřazeni k množství příjmu syntetických sladidel (2400-2500 mg/den). Takovéto množství naznačovalo nižší přírůstek tělesné hmotnosti ve srovnání s příjmem cukru z potravin a nápojů (Espinosa et al. 2023).

Rostoucí používání syntetických sladidel může být v budoucnu příčinou zdravotních a dietních problémů. Jejich využití jako alternativy k přidanému cukru by mělo být pečlivě zváženo v rámci formulace politiky veřejného zdraví týkající se výživy (Ardalan et al. 2017; Russell et al. 2023).

3.1.2.2 Vliv syntetických sladidel na glykémii

V současné době je často diskutována otázka vlivu syntetických sladidel na glykémii. Například sacharin, cyklamát, steviosid a ACK může stimulovat uvolňování insulinu z Langerhansových ostrůvků u potkanů. Naopak u aspartamu toto pozorováno nebylo (Malaisse et al. 1998). Po podání syntetických sladidel (zejména sacharinu) bylo zaznamenáno zvýšení

koncentrace insulinu v plazmě, zatím co hladina glukosy v krvi zůstala nezměněna (Just et al. 2008). Sekrece insulinu byla spíše zaznamenána při vyšších dávkách milimolární koncentrace syntetických sladidel, tj. více 50. Takováto dávka zvýšila sekreci insulinu prostřednictvím aktivace chuťových receptorů (Nakagawa et al. 2013). Z výsledků rozsáhlé kohortové studie NutriNet-Santé vyplývá, že existuje pozitivní souvislost mezi příjmem umělých sladidel a zvýšeným rizikem diabetes mellitus II. typu (Debras et al. 2023). Některé studie zjistily opak, a to že po konzumaci syntetických sladidel nebyly pozorovány žádné významné změny glykémie, postprandiální glykémie nebo insulinové odpovědi (Mathur & Bakshi 2023).

Běžná nekalorická sladidla mohou způsobit glukosovou intoleranci změnou střevního mikrobiomu (Suez et al. 2014; Gerasimidis et al. 2020; Mora & Dando 2021; Debras et al. 2022a). Pokud jsou syntetická sladidla dlouhodobě podávána pacientům s diabetes mellitus II. typu, může to mít přímý dopad na insulinovou rezistenci (Mathur et al. 2020).

3.1.2.3 Vliv syntetických sladidel na riziko vzniku kardiovaskulárního onemocnění

Existuje přímá souvislost mezi hyperinsulinémií, insulinovou rezistencí a kardiovaskulárním onemocněním (KVO) (Lambie et al. 2021) jako je mrtvice, ischemická choroba srdeční a úmrtnost z těchto příčin (Mossavar-Rahmani et al. 2019). Každé syntetické sladidlo může způsobovat jiný druh KVO. ACK a sukralosa byly spojeny s rizikem ischemické choroby srdeční, zatímco aspartam byl spojen s cerebrovaskulárním onemocněním (Debras et al. 2022a). Byl proveden pokus na potkanech, kdy jim po dobu deseti dní byla podávána sukralosa a ACK v různých koncentracích (1-15 mg/kg/den). V tomto období bylo sledováno složení jejich tělesného tuku. Bylo zjištěno, že potkani, kteří konzumovali syntetická sladidla v koncentraci přijatelné denní dávky (ADI) vykazovali významnou vaskulární endoteliální dysfunkci ve srovnání s ostatními skupinami (Risdon et al. 2020).

3.1.2.4 Vliv syntetických sladidel na riziko vzniku nádorového onemocnění

Výzkumy hodnotící vliv syntetických sladidel na riziko vzniku nádorových onemocnění u lidí poskytují smíšené výsledky, což naznačuje složitost této problematiky a potřebu dalších výzkumů. Studie zahrnující 102 865 dospělých z francouzské kohorty NutriNet-Santé naznačuje, že vyšší konzumace syntetických sladidel, zejména aspartamu a ACK, je spojena s vyšším rizikem celkového výskytu nádorového onemocnění ($n = 3\,358$ případů, $p = 0,002$). Konkrétně byla zjištěna větší rizika pro nádorové onemocnění prsu ($n = 979$ případů, $p = 0,036$).

a nádorové onemocnění související s obezitou ($n = 2\,023$ případů, $p = 0,036$) (Debras et al. 2022a).

Jiná studie, zahrnující celkem 25 observačních studií s celkovým počtem 3 739 775 subjektů, dospěla k názoru, že příjem umělých sladidel neměl žádnou zjevnou souvislost s celkovým výskytem nádorového onemocnění a mortalitou. Ve studii bylo dále zjištěno, že u lidí, kteří konzumovali umělá sladidla, bylo pozorováno mírně vyšší riziko úmrtí z jiných příčin ve srovnání s lidmi, kteří je nekonzumují (Yan et al. 2022).

3.1.2.5 Vliv syntetických sladidel na orální mikrobiom

V ústní dutině se nachází druhý největší a nejrozmanitější mikrobiom v těle člověka hned po střevě. Skládá se přibližně ze 700 druhů mikroorganismů. Tyto mikroorganismy kolonizují tvrdé tkáně zubů a měkké tkáně ústní sliznice (Zhao et al. 2017). Stejně tak, jako ve střevním mikrobiomu, byly při konzumaci syntetických sladidel pozorovány i změny v orálním mikrobiomu, např. u proteobakterií, rodu *Staphylococcus*, *Acinetobacter* a *Lactobacillus* bylo pozorováno zvýšení jejich počtu. Tyto bakterie jsou spojeny s kvašením potravin, nejčastěji cukrů v nich obsažených (Cheng et al. 2021). Kvašení je často doprovázena tvorbou kyselin (např. mléčnou nebo octovou), které mohou následně poškodit zubní sklovinu (Bretz et al. 2005) a zapříčinit rozvoj zubního kazu (Pitts et al. 2017).

Vliv umělých sladidel na ústní mikrobiom byl testován na potkanech. Celkem 24 potkanů bylo rozděleno do čtyř skupin a byla jim podávána sacharosa, sacharin, xylosa nebo čistá voda. Každá skupina konzumovala předloženou látku po dobu osmi týdnů. Výsledky naznačily, že náhradní sladidla ovlivnila imunitu, složení, metabolické funkce a diverzitu bakterií dutiny ústní a tím narušila orální mikrobiom. Ve všech analyzovaných vzorcích byly identifikovány imunoglobuliny (Ig) typu IgA, IgM a IgG, avšak imunoglobulin IgE nebyl zjištěn v žádném z nich. Ve srovnání s kontrolní skupinou byly ve skupině s xylosou a sacharosou významně vyšší průměrné koncentrace sekretorického IgA a IgG. Co se týče složení orálního mikrobiomu, např. ve skupině xylosy bylo celkem detekováno 284 rodů, ve skupině sacharinu 186 rodů a ve skupině sacharosy 372 rodů (Cheng et al. 2021).

3.1.2.6 Vliv syntetických sladidel na střevní mikrobiom

Studie naznačují různé účinky na složení a funkci střevního mikrobiomu. Střevní mikrobiom je složitá komunita mikroorganismů žijících v trávicím traktu, která hraje klíčovou roli v udržování normální fyziologie střev a celkového zdraví (Conz et al. 2023). Jeho složení

a funkci mohou ovlivňovat různé faktory jako je např. genetika (Goodrich et al. 2014), věk (Odamaki et al. 2016), antibiotická léčba (Zhang et al. 2014), strava (Voigt et al. 2014), atd. Významný vliv má především strava, jelikož může upravovat některé bakteriální druhy a ovlivňovat metabolity produkované ve střevním prostředí (David et al. 2014).

Jiná intervenční studie, zahrnující 31 subjektů a trvající 14 dnů, pozorovala bakteriální abundanci a diverzitu u konzumentů a nekonzumentů aspartamu a ACK. Mezi těmito dvěma skupinami byly nalezeny rozdíly ve složení bakteriální komunity aspartamu ($p < 0,01$) a ACK ($p = 0,03$), s použitím metody UniFrac (Frankenfeld et al. 2015).

Naopak studie z roku 2018 dospěla k výsledku, že sukralosa má bakteriostatický účinek na *E. coli in vitro*. Přítomnost sukralosy v agaru vedla k poklesu počtu kolonie tvořících jednotek (CFU) o 30 % v případě 1,25 % sukralosy a o 74 % méně kolonií v případě 2,5 % sukralosy. Podobně tomu bylo v případě AKC a sacharinu, kdy na miskách s pevným médiem a s 2,5 % sladidel bylo pozorováno v průměru o 96 % méně kolonií. Na základě těchto výsledků došla studie k závěru, že syntetická sladidla mají schopnost selektivně inhibovat růst střevních bakteriálních druhů (Wang et al. 2018).

Protože střevní mikrobiom hraje klíčovou roli v regulaci metabolismu a imunitních funkcí, může být jeho narušení důsledkem vzniku různých onemocnění. Změny střevního mikrobiomu jsou spojovány jak s rizikem rozvoje obezity a diabetes mellitus II. typu, tak i s rizikem KVO (Debras et al. 2022a).

3.1.3 Syntetická sladidla v moči nebo ve stolici jako biomarkery životního stylu

Biomarkery jsou indikátory normálních biologických nebo patogenních procesů, tedy indikátor zdravotního stavu člověka. Lze je přesně a reprodukovatelně měřit (FDA 2021). Jiný zdroj popisuje biomarkery jako buněčné, biochemické nebo molekulární změny, které jsou měřitelné v biologických tekutinách a exkretech, jako jsou lidské tkáně, buňky nebo tekutiny (Hulka & Wilcosky 1988).

K identifikaci biologicky aktivních molekul s potenciálními vlastnostmi biomarkerů slouží obor zvaný metabolomika. K nalezení nejlepších robustních biomarkerů onemocnění využívá metabolomika modely, jako jsou *in vitro* nebo pokusná zvířata. Dále jsou využívány různé analytické metody, z nichž jsou nejvíce používané hmotnostní spektrometrie (MS), plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), infračervená (IR) a ultrafialovo-viditelná spektrometrie (UV-VIS) a NMR (Kruk et al. 2017).

Syntetická sladidla lze detekovat v moči a mohou sloužit jako biomarkery pro hodnocení životního stylu a stravovacích návyků. V této tělní tekutině lze současně stanovit

pět nízkokalorických sladidel: ACK, sacharin, cyklamát, sukralosa a steviolglykosidy. Důkazem je studie, ve které bylo zjištěno, že více než 96 % vzorků obsahovalo alespoň jedno syntetické sladidlo a téměř 60 % vzorků obsahovalo tři a více sladidel. Ve studii byla navíc pomocí biomarkerů prokázána mnohem vyšší expozice nízkokalorickým sladidlům (92 %), než byla zjištěna skutečná spotřeba nápojů obsahujících syntetická sladidla (6 %). Tato studie naznačuje rozšířené vystavení nízkokalorickým sladidlům a poukazuje na potenciál použití biomarkerů v moči pro širší výzkum v této oblasti (Logue et al. 2020).

3.1.4 Pohled spotřebitelů na syntetická sladidla

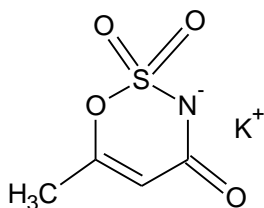
Nejstarším syntetickým sladidlem je sacharin, který byl náhodně objeven v roce 1879. Ve 2. polovině 20. století se začal hojně přidávat do potravin pro diabetiky. V tomto období se ve Spojených státech amerických syntetická sladidla nejvíce používala do nealkoholických kolových nápojů, do konzerv, žvýkaček a bonbónů a v neposlední řadě do stolních výrobků určených pro slazení čaje nebo kávy. Do těchto typů potravin byly používány nejčastěji cyklamát-sacharinové směsi (Inglett 1976). Tyto směsi byly ale ve Spojených státech amerických zakázány FDA v roce 1969. Společnost Abbott Laboratories oznámila, že syntetické sladidlo cyklamát (ve dříve zmiňované směsi) způsobilo nádory jater u potkanů (FDA 2020).

Většina konzumentů má nedostatečné povědomí o aditivních látkách, a navíc je mohou znepokojovat částečné nebo nepřesné informace. Spotřebitelé čelí každodenně mnoha potravinovým rozhodnutím, které jsou spojené s přídatnými látkami. Pokud mluvíme o slazení, musí se rozhodovat, zda si koupí potravinu s cukrem, přírodním sladidlem nebo náhradním sladidlem (Bearth et al. 2014). Byl proveden průzkum obeznamenosti a míry pozitivních nebo negativních názorů u spotřebitelů na běžně používaná syntetická sladidla, přírodní sladidla a sacharosu. Na sacharosu převažoval u konzumentů nejvíce pozitivní názor ze všech syntetických sladidel (Mora & Dando 2021). Z tohoto důvodu je žádoucí nabídnout zainteresovaným nebo obávajícím se spotřebitelům nějaké vodítko, aby věděli, jaké potraviny volit (Bearth et al. 2014).

3.2 Acesulfam K (E 950)

ACK (obr. 2) je jedno z nejrozšířenějších syntetických sladidel dnešní doby. Je to bílý krystalický prášek bez zápachu a je přibližně 200 × sladší než sacharosa. Byl objeven náhodně v roce 1967 (Klug & Lipinski 2012). Byl schválen FDA pro použití v určitých potravinách

v roce 1988 a v roce 2003 ho FDA schválil jako univerzální sladidlo a zvýrazňovač chuti v potravinách, s výjimkou masa (Mora & Dando 2021; FDA 2023). Dnes se využívá zejména jako stolní sladidlo, v nápojích, v pečivu, v mražených dezertech, v bonbónech, v kapkách proti kašli nebo v mentolových bonbonech (Dwyer et al. 2015). Je termostabilní, a i přes zahřátí vysokými teplotami zůstává stále sladký. Je ho tedy možné využít mimo jiné i do vaření a pečení. (Arora et al. 2013).

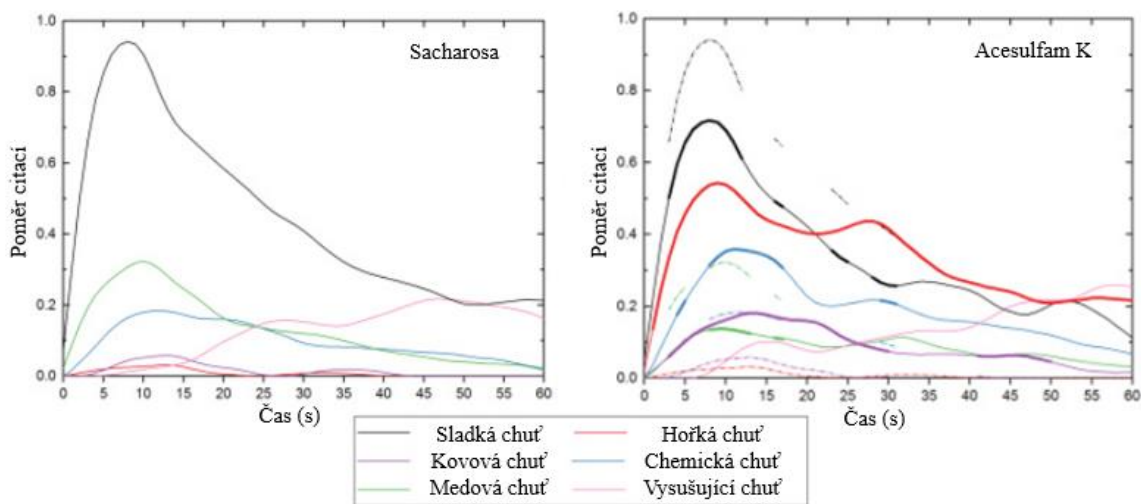


Obrázek č. 2 Acesulfam K

3.2.1 Senzorické vlastnosti ACK

ACK byl v minulosti považován za chuťově nejlepší sladidlo (von Rymon Lipinski 1985). Později se ale ukázalo, že i toto sladidlo vykazuje vedlejší chuťové profily jako je hořký, kovový a chemický (Dwyer et al. 2015; Tan et al. 2019). Většina studií na tyto typy hodnocení využívala tradičních přístupů časové intenzity, kdy hodnotitelé museli zaznamenávat změny intenzity specifických sensorických atributů během pevně stanoveného časového intervalu. Tato metoda se obvykle zaměřovala na hodnocení intenzity jednotlivých atributů nezávisle na sobě a vyžadovala vyškolené hodnotitele (Tan et al. 2019). Nedávno byl vyvinut nový přístup zvaný časově omezený výběr všech odpovídajících možností (TCATA), jako spotřebitelsky přívětivý způsob hodnocení. Je to metoda sensorické analýzy, která umožňuje hodnotitelům označovat všechny vnímané atributy současně v průběhu času. Co se týče syntetických sladidel, je metoda využívána pro analýzu různorodých chutí, umožňující identifikaci primární sladké chuti a sekundárních chutí v průběhu času, tzn. umožňuje výběr jak sladké, tak vedlejších chutí tak, jak jsou vnímány. Tento proces vede k vytvoření „citačních poměrů“, které představují frekvenci, s jakou byl určitý atribut (např. sladkost, hořkost) vybrán účastníky testu v určitém časovém okamžiku během degustace. Přestože nejsou přímou mírou intenzity vnímání, obvykle korelují s úrovní intenzity. Vyšší citace bývají často spojovány s intenzivnějšími pocity. TCATA poskytuje srovnání parametrů jednotlivých sladidel, přičemž se často provádí porovnávání jednotlivých sladidel se sacharosou (Castura et al 2016).

ACK dosahuje nižší maximální sladkosti a medové chuti ve srovnání se sacharosou (obr. 3). Na druhou stranu ale dosahuje vyšší maximální hořké, kovové a chemické chuti (Tan et al. 2019).



Obrázek č. 3 Porovnání jednotlivých chutí ACK se sacharosou (Tan et al. 2019)

ACK je často používán ve směsích s aspartamem, sukralosou a sacharinem. Výhodou této kombinace je skutečnost, že každé z těchto sladidel maskuje nežádoucí chutě ostatních. Vykazují tedy společně synergický účinek a směs je sladší než její složky (Chattopadhyay et al. 2014; FDA 2023). Pokud je ACK smíchán pouze se sacharinem, hořká chuť není zmírněna nebo potlačena. Pokud je ale popisované sladidlo smícháno s aspartamem je sladká chuť vyšší, než kdyby bylo každé sladidlo použito samostatně (O'Brien-Nabors 2016).

3.2.2 Metabolismus ACK a jeho vylučování

ACK je biologicky inertní, nepodléhá významnému metabolismu u zvířat ani lidí a po absorpci je jednoduše vyloučen v nezměněné formě močí, stolicí a dalšími tělními exkrety. ACK je téměř kompletně absorbován v tenkém střevě jako nezměněná molekula a distribuován do krve a později různých tkání (Dwyer et al. 2015; O'Brien-Nabors 2016). Následně je do 24 hodin po požití 99 % ACK vyloučeno ledvinami a zbylé 1 % je vyloučeno stolicí a dalšími tělními exkrety (Pang et al. 2021). Tento fakt naznačuje minimální metabolismus nebo interakci s mikrobiomem dolního gastrointestinálního traktu při běžném denním příjmu (O'Brien-Nabors 2016).

Zmiňované syntetické sladidlo sice obsahuje draslík, ale množství této minerální látky je v něm tak nízké, že nemá vliv na celkový denní příjem draslíku v lidské stravě (Sollid 2022).

3.2.3 Vliv ACK na zdraví

3.2.3.1 Vliv ACK na tělesnou hmotnost, střevní mikrobiom a glykémii

ACK se nemetabolizuje, takže by se dalo předpokládat, že jeho konzumace nezpůsobuje přírůstek tělesné hmotnosti. I přes to ale výzkumy na zvířatech ukazují, že příjem ACK může zvyšovat tělesnou hmotnost u samců potkanů, ale ne u samic. V tomto výzkumu byl pozorován vyšší přírůstek tělesné hmotnosti u samců, kteří po dobu čtrnácti dnů požívali ACK, než u kontrolní skupiny samců (10,28 g versus 5,44 g, $p < 0,01$) (Bian et al. 2017). Jiná studie ze stejného roku naopak po konzumaci ACK neprokázala žádné změny tělesné hmotnosti (Uebanso et al. 2017). Po požití ACK byly také pozorovány změny složení střevního mikrobiomu a aktivita genů souvisejících s energetickým metabolismem, což bylo také závislé na pohlaví. U samců byly aktivovány funkční geny zapojené do energetického metabolismu, zatímco u samic byly tyto geny inhibovány (Bian et al. 2017).

Při dlouhodobé konzumaci ACK v rámci jeho přijatelného denního příjmu (ADI) není pravděpodobné, že by toto sladidlo dosáhlo dolního traktu gastrointestinálního systému a ovlivnil střevní mikrobiom (O'Brien-Nabors 2016). Existují ale i výzkumy na zvířatech, které dospěly k závěru, že konzumace ACK může mít vliv na změnu složení střevních bakterií u samců i samic potkanů. V tomto výzkumu bylo po aplikaci ACK pozorováno zvýšení rodu *Bacteroides* ($p < 0,01$) u samců a u samic naopak pokles rodů *Lactobacillus* ($p < 0,05$) nebo *Clostridium* ($p < 0,001$). Narušením střevních bakterií může toto sladidlo zvýšit riziko rozvoje chronického zánětu střev (Bian et al. 2017). Pozdější studie ale uvádí, že se ACK rychle vstřebává a je vylučován převážně ledvinami do moči (Pang et al. 2021).

Existuje možný vztah mezi konzumací ACK a výskytem diabetes mellitus II. typu. Byl zkoumán dopad dvoutýdenní konzumace nápoje obsahujícího ACK a aspartam na schopnost organismu regulovat hladinu glukosy u normálně vážících, nadváhových a obézních subjektů. Bylo zjištěno, že konzumace nápoje neměla škodlivý vliv na homeostázu glukosy u zdravých subjektů (Kim et al. 2020). Výsledky rozsáhlé kohorty NutriNet-Santé také ukazují pozitivní souvislost mezi příjmem ACK (i jiných umělých sladidel) a zvýšeným rizikem diabetes mellitus II. typu. Do studie byli zapojeni nekonzumenti a konzumenti syntetických sladidel, kteří dostávali vyšší dávky těchto látek (tzn. vyšší než medián pohlavně specifických 16,4 mg/den u mužů a 18,5 mg/den u žen). Konzumenti s takovými a vyššími dávkami syntetických sladidel měli vyšší riziko rozvoje diabetes mellitus II. typu. Pozitivní asociace byla pozorována také konkrétně u ACK (poměr rizik (HR) = 1,70; 95% interval spolehlivosti (CI)

1,42–2,04; $p < 0,001$). Tyto důkazy posilují myšlenku, že obecně syntetická sladidla nemusí být bezpečnými alternativami cukru (Debras et al. 2023).

Studii zaměřených na souvislost mezi konzumací ACK, tělesnou hmotností a glykemií v lidském organismu je však v současné době relativně málo. Toto téma představuje oblast, která doposud nebyla důkladně prozkoumána (Solomi et al. 2019). Přestože existují obavy týkající se potenciálního dopadu syntetických sladidel na nárůst tělesné hmotnosti a rozvoj diabetes mellitus II. typu, důkazy jsou nejednoznačné (Pang et al. 2021).

3.2.3.2 Vliv ACK na riziko vzniku KVO

Výsledky publikované v rámci studie NutriNet-Santé naznačují potenciální přímou souvislost mezi vyšší konzumací umělých sladidel, včetně ACK, a zvýšeným rizikem KVO. Konkrétně byl příjem ACK asociován se zvýšeným rizikem koronárních srdečních onemocnění (Debras et al. 2022).

V rámci výzkum byl potkanům podáván ACK, který zvýšil aterosklerotický plak v cévách. Dále byl zkoumán vliv ACK na metabolismus lipidů. Spotřeba ACK zvýšila jaterní lipogenezi a snížila β -oxidaci. I přes toto zjištění zůstává souvislost mezi konzumací ACK a KVO stále nejasná (Lin et al. 2021).

3.2.3.3 Vliv ACK na riziko vzniku nádorového onemocnění

Výzkumy o vlivu ACK na riziko vzniku nádorového onemocnění u lidí nabízejí různé pohledy. Systematický přehled dat studií zaměřených na ACK vedl k závěru, že toto sladidlo pravděpodobně nepředstavuje riziko karcinogeneze. V tomto přehledu bylo posouzeno přes 800 mechanistických ukazatelů z různých *in vitro* a *in vivo* testů, které byly integrovány do celkového hodnocení důkazů. Výsledky ukazují, že ACK nevykazuje aktivitu napříč charakteristikami známých karcinogenů. Ve spojení s absencí nádorových efektů na hlodavcích podporuje závěr, že ACK pravděpodobně neindukuje karcinogenní odpověď (Chappell et al. 2020).

Naopak novější studie založená na francouzské populační kohortě NutriNet-Santé, která zahrnovala 102 865 dospělých osob, sledovaných v průměru 7,8 let, naznačila, že vyšší konzumace ACK byla spojena s mírně zvýšeným rizikem vzniku nádorových onemocnění. Tato studie konkrétně uvádí, že konzumenti ACK měli vyšší riziko vzniku nádorů obecně ($n = 3\ 358$ případů, HR = 1,13; 95% CI 1,03-1,25; $p = 0,002$). S vyšším rizikem vzniku celkového nádorového onemocnění byl spojen zejména ACK (HR = 1,13; 95% CI 1,01-1,26;

$p = 0,007$) a aspartam (HR = 1,15; 95% CI 1,03-1,28; $p = 0,002$). Byla zaznamenána také specifická spojení s vyšším rizikem vzniku nádorů prsu ($n = 979$ případů; HR = 1,22; 95% CI 1,01-1,48; $p = 0,036$, pro aspartam) a nádorů souvisejících s obezitou ($n = 2\ 023$ případů; HR = 1,13; 95% CI 1,00-1,28; $p = 0,036$, pro celková umělá sladidla a HR = 1,15; 95% CI 1,01-1,32; $p = 0,026$, pro aspartam) (Debras et al. 2022b).

3.2.3.4 Vliv ACK na chuťové preference a metabolické zdraví potomstva při prenatální a postnatální expozici

Studie naznačují, že expozice ACK během těhotenství a kojení může mít významný dopad na chuťové preference a metabolické zdraví potomstva. ACK byl podáván březím potkanům a byl pozorován vliv na preference sladké chuti u exponované skupiny a jejich potomků. Byla totiž detekována přítomnost ACK v plodové vodě a v mateřském mléce. To naznačuje, že ACK přechází z matky na potomstvo buď v prenatálním období nebo po narození a ovlivňuje to poté jejich preference sladké chuti v dospělosti. Sledování potomci i jejich matky, které byly během březosti nebo při laktaci vystaveny působení ACK, vykazovali nižší prahové hodnoty detekce pro roztoky ACK a sacharosy a dále měli zvýšenou preferenci pro sladké roztoky ACK nebo sacharosy vzhledem k vodě. To naznačuje, že po expozici ACK měli silnější sklony k volbě sladké chuti (Zhang et al. 2011; Rother et al. 2018).

Další studie se zabývala vlivem maternálního příjmu ACK na metabolické a reprodukční výsledky u potomstva potkanů. Zjistilo se, že zvířata, kterým byl během březosti a laktace podáván ACK, měla potomstvo s odlišnými metabolickými a reprodukčními výsledky. Expozice ACK prostřednictvím mateřské stravy byla spojena se zhoršením glukosové tolerance a ovlivněním velikosti adipocytů způsobem specifickým pro pohlaví. Expozice má také signifikantní účinky na estrální cykly a přidružené genové markery u ženského potomstva. To naznačuje možný dopad na zdraví potomstva, pokud je matka konzumentkou ACK během těhotenství a kojení (Bridge-Comer et al. 2021).

3.2.4 Přijatelná denní dávka ACK

Přijatelná denní dávka (ADI) pro ACK byla stanovena na 9 mg/kg tělesné hmotnosti. Po studiích na potkanech byla ADI stanovena na 15 mg na kilogram tělesné hmotnosti. Tato dávka vychází z doporučení WHO a Food Agriculture Organisation (FAO) – při Organizaci spojených národů (OSN) prostřednictvím jejich Společného výboru odborníků FAO/WHO pro

potravinářská aditiva (JECFA) (JECFA 1990). Používání tohoto sladidla v potravinách pro malé děti není v Evropské unii povoleno (EFSA 2016).

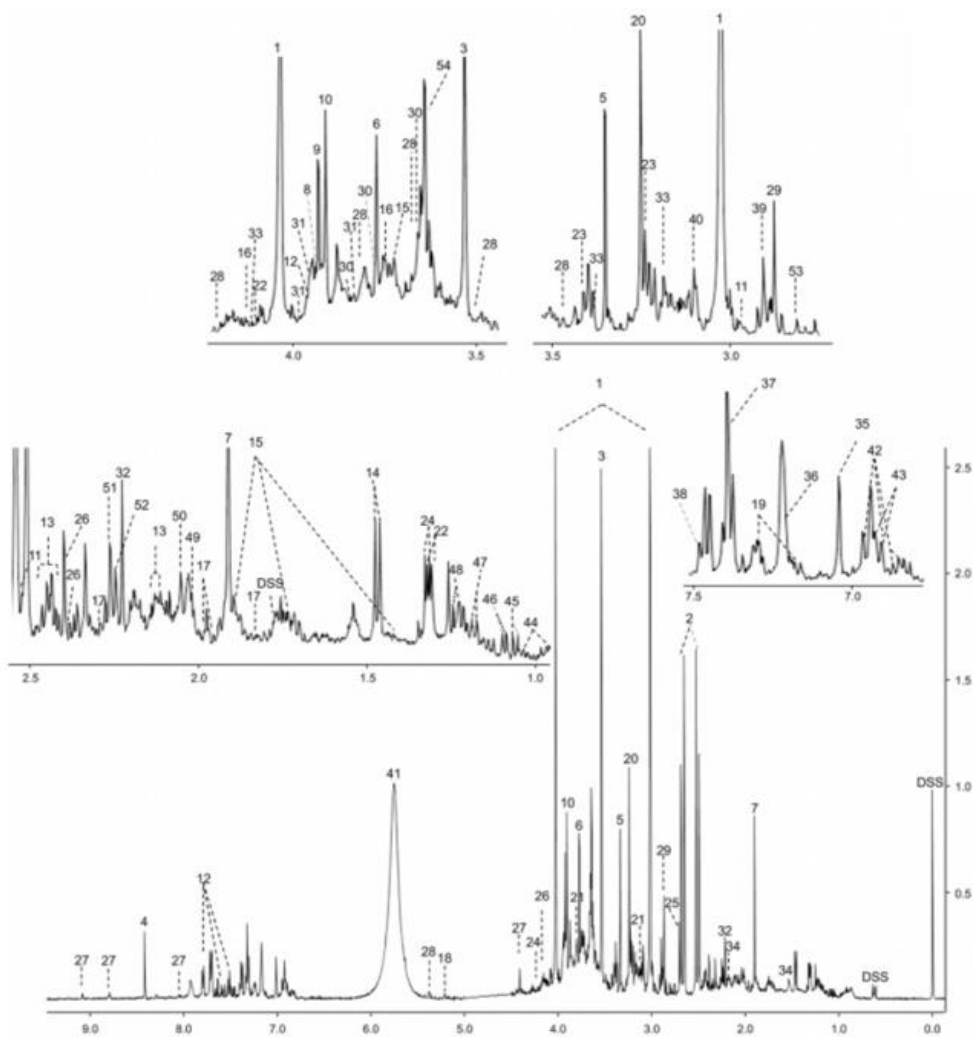
3.3 Moč a metabolom moči

Moč je biologická tekutina, která je složena z přebytečné vody a dalších látek rozpustných ve vodě jako je močovina (produkt metabolismu aminokyselin), cukry, anorganické soli (chloridy, soli draslíku a sodíku), kreatinin, amoniak, organické kyseliny, různé ve vodě rozpustné toxiny a pigmentové produkty rozpadu hemoglobinu (např. urobilin, díky kterému má moč charakteristickou barvu). Průměrný dospělý člověk vyprodukuje 1,5-2,0 litru moči denně (Bouatra et al. 2013).

Metabolomika je výzkumná disciplína, která se věnuje systematickému studiu chemických molekul (metabolitů), nacházejících se např. v moči. Hrají klíčovou roli v různých biologických procesech (Rinschen et al. 2019). Soubor metabolitů v organismu se nazývá metabolom. Přestože je moč odpadním produktem, může sloužit jako diagnostická tekutina. V dnešní době lze v moči identifikovat několik stovek, uvádí se až 300, metabolitů. Kvantifikovat pak lze přibližně 100 látek. Metabolity moči se dají stanovit různými metodami. Mezi vybrané patří např. NMR, hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií (GC-MS), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) a HPLC s technikami ultrafialové (UV) nebo fluorescenční detekce (FD).

Metabolom lidské moči je složitý a obsahuje stovky metabolitů, které se dělí na endogenní (produkované lidským tělem) a exogenní (pocházející z vnějšího prostředí, např. z potravin, nápojů, léků nebo environmentálních kontaminantů). Příkladem některých specifických metabolitů moči jsou kreatinin, citrát, glycin, formiát, metanol, acetát, L-cystein a mnoho dalších (obr. 4) (Bouatra et al. 2013).

K profilování metabolitů v moči 348 dětí a 315 dospělých byla v jednom z výzkumů využita metoda tandemové hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS). Studie identifikovala celkem 2357 metabolitů, z toho 1831 endogenních a 526 exogenních. Močové metabolity byly produkovány hlavně při metabolismu aminokyselin a lipidů. Výsledky po analyzování metabolitů v moči naznačily, že tato tělní tekutina u dospělých obsahuje více metabolitů zapojených do imunitní odpovědi než dětská (Xu et al. 2022).



Obrázek č. 4 Reprezentativní 500 MHz¹H – NMR spektrum lidské moči
(Bouatra et al. 2013)

Čísla označují následující metabolity: 1: kreatinin; 2: citronová kyselina; 3: glycin; 4: formiát; 5: metanol; 6: guanidoctová kyselina; 7: acetát; 8: L-cystein; 9: glykolová kyselina; 10: kreatin; 11: isocitronová kyselina; 12: hippurát; 13: L-glutamin; 14: L-alanin; 15: L-lysin; 16: glukonová kyselina; 17: 2-hydroxyglutarová kyselina; 18: D-glukosa; 19: indoxylsulfát; 20: trimethyl-N-oxid; 21: ethanolamin; 22: L-mléčná kyselina; 23: taurin; 24: L-threonin; 25: dimethylamin; 26: pyroglutamová kyselina; 27: trigonelín; 28: sacharosa; 29: trimethylamin; 30: mannitol; 31: L-serin; 32: aceton; 33: L-cystin; 34: adipová kyselina; 35: L-histidin; 36: L-tyrosin; 37: imidazol; 38: mandlová kyselina; 39: dimethylglycin; 40: cis-akonitová kyselina; 41: močovina; 42: 3-(3-hydroxyfenyl)-3-hydroxypropanová kyselina (HPHPA); 43: fenol; 45: isomáselná kyselina; 46: methyljantarová kyselina; 47: 3-aminoisomáselná kyselina; 48: L-fukosa; 49: N-acetylasparagová kyselina; 50: N-acetylneuraminová kyselina; 51: acetooctová kyselina; 52: alfa-aminoadipová kyselina; 53: methylguanidin; 54: fenylacetylglutamin

3.3.1 Stabilita moči pro NMR metabolomiku

Profil metabolitů závisí na délce a teplotě skladování vzorku. Bylo zjištěno, že vzorky moči skladované při pokojové teplotě (22 °C) vykazují významné změny v koncentraci metabolitů. Uchování těchto vzorků v chladničce při 4 °C po stejnou dobu mělo za následek mírné snížení stupně změn v koncentraci metabolitů. Avšak optimálního zachování původního profilu metabolitů bylo dosaženo při skladování vzorků moči v mrazáku při teplotě –80 °C. Vzorky, které byly po dobu 4 týdnů pravidelně zmrazovány (do teploty –80 °C) a rozmrazovány (do pokojové teploty) měly střední stupeň změny metabolitů ve srovnání s původní koncentrací (Saude & Sykes 2007).

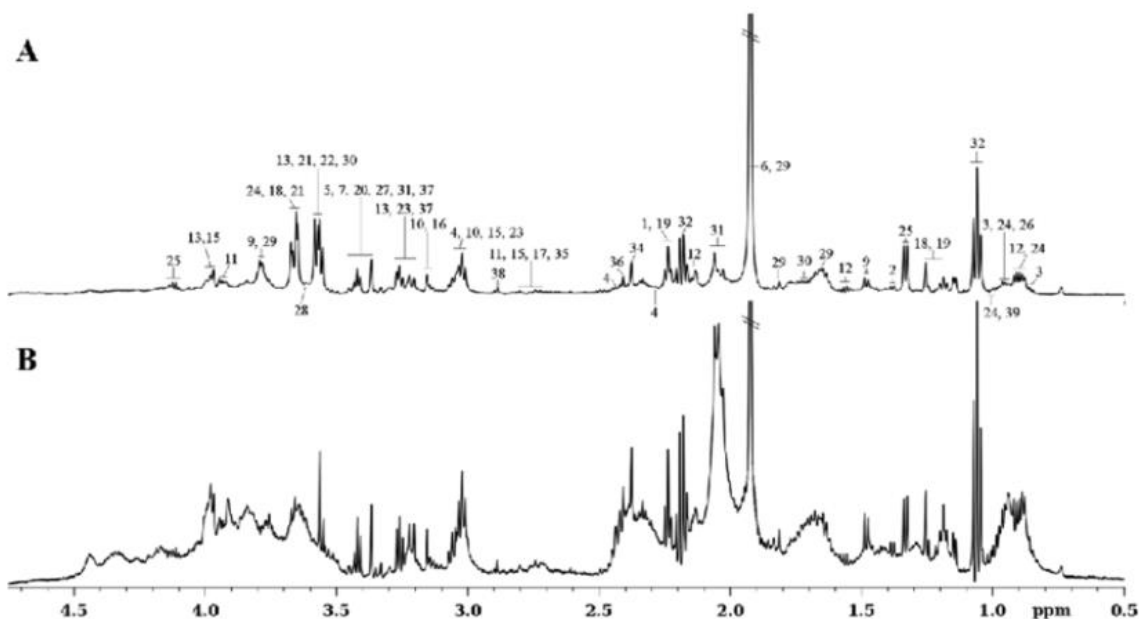
Jiná studie doporučuje vzorky lidské moči skladovat při teplotách –25 °C a nižších po dobu maximálně 26 týdnů. Pokud jsou vzorky skladovány při nižších teplotách, je nutné do nich přidat konzervační činidlo (např. NaN₃ nebo NaF) (Lauridsen et al. 2007).

3.3.2 Syntetická sladidla v moči

Byla zkoumána denní variabilita umělých sladidel v moči a jejich spojení s biomarkery oxidativního stresu. Bylo zjištěno, že koncentrace umělých sladidel ACK a sacharin v moči se významně liší u různých jedinců. Zjistilo se, že pro odhad průměrné expozice konkrétního účastníka studie bylo potřeba analyzovat alespoň 20 vzorků moči. Studie také poukázala na významnou interakci umělých sladidel s biomarkery oxidativního stresu, což naznačuje možné toxické mechanismy těchto sladidel (Shi et al. 2022).

3.4 Sliny a metabolom slin

Sliny jsou biologické tekutiny, které obsahují vodu, hlen, bílkoviny a metabolity s malou molekulovou hmotností. Koncentrace metabolitů ve slinách může měnit např. kouření nebo pohlaví. Příkladem některých specifických metabolitů slin je citrát, laktát, pyruvát, sacharosa, formiát, glycin, metanol (obr. 5) (Takeda et al. 2009).



Obrázek č. 5 Reprezentativní 600 MHz ^1H NMR spektrum lidských slin
(Figueira et al. 2016)

Čísla označují následující metabolity: A: Přiřazené 1D NOESY spektrum filtrovaného vzorku; B: 1D protonové spektrum nefiltrovaného vzorku: 1: 2-aminoadipát; 2: 2-hydroxyisobutyrát; 3: 2-hydroxyizovalerát; 4: 2-oxoglutarát; 5: 4-hydroxyfenylacetát; 6: acetát; 7: acetoacetát; 8: aceton; 9: alanin; 10: anserin; 11: aspartát; 12: butyrát; 13: kofein; 14: cholin; 15: kreatin; 16: dimethylsulfon; 17: dimethylamin; 18: ethanol; 19): fukosa; 20: glukosa; 21: glycerol; 22: glycin; 23: histamin; 24: isoleucin; 25: laktát; 26: leucin; 27: metanol; 28: O-fosfocholin; 29: ornithin; 30: fenylacetát; 31: prolin; 32: propionát; 33: putrescin; 34: pyruvát; 35: sarkosin; 36: sukcinát; 37: taurin; 38: trimethylamin; 39: valin

3.4.1 Stabilita slin pro NMR metabolomiku

Profil metabolitů ve slinách závisí na délce a teplotě skladování. Jestliže byly vzorky ponechány při teplotě 4 °C, daly se rozeznat malé změny. Při uchovávání vzorků v pokojové teplotě bylo po určitých časových odstupech zaznamenáno snížení koncentrací některých metabolitů např. methylu, laktátu nebo alaninu. Pokud vzorky slin byly skladovány v teplotě –20 °C, nebyly zaznamenány žádné změny v koncentracích metabolitů. Dle uváděného výzkumu mohou být sliny skladovány při pokojové teplotě až 6 hodin a při –20 °C po dobu nejméně 4 týdnů. Po přípravě na NMR analýzu jsou vzorky vysoce stabilní při 25 °C až 8 hodin a při 4 °C až 48 hodin (Duarte et al. 2020).

3.4.2 Syntetická sladidla v slinách

Výskyt syntetických sladidel ve slinách, resp. aspartamu, byl poprvé prozkoumán v roce 2023 (Finassi et al. 2023). K výzkumu byla použita analytická metoda HPLC, která byla již dříve navržena jako metoda vhodná pro analýzu syntetických sladidel (Trandafir et al. 2009). Tato metody přispěla k separaci analytů v uvedené tělní tekutině a byla schopna v ní detekovat i zkoumaný aspartam. Studie mimo jiné zkoumala i možnou degradaci zmiňovaných sladidel v ústní dutině. Došla k závěru, že konkrétně aspartam ve slinách není metabolizován ani degradován (Finassi et al. 2023).

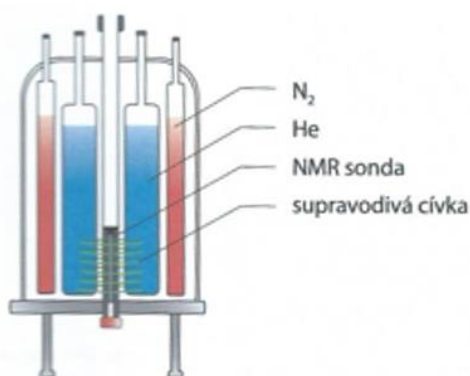
3.5 Nukleární magnetická rezonance

NMR je analytická metoda, která umožňuje detailně zkoumat strukturu molekul (neinvazivně, nedestruktivně a kvantitativně) (Dračinský 2021).

3.5.1 Popis zařízení a princip metody

V NMR spektrometrech určených pro měření kapalných vzorků je magnetické pole vytvářeno supravodivou cívkou. Ta je schopná snášet vysoké magnetické pole, ale kritickou teplotu má jen několik málo stupňů nad absolutní nulou. Z důvodu udržení velmi nízké teploty je zařízení složeno ze dvou plášťů (obr. 6). Svrchní plášť je naplněný dusíkem a vnitřní heliem. V kapalném heliu je ponořena supravodivá cívka.

Doprostřed supravodivé cívky se vkládá analyzovaný vzorek a zařízení se soustředí na atomy vodíku v daném vzorku. Vytvoří se magnetické pole a atomy vodíku se zorientují v jeho směru. V této chvíli je dodán elektrický pulz, který vodíky opět vychýlí. Je měřen čas, za který se atomy vodíku zorientují zpět do polohy orientované magnetem (Dračinský 2021).



Obrázek č. 6 Schéma NMR magnetu (Dračinský 2021)

3.5.2 NMR v metabolomice

NMR je klíčovou analytickou metodou v metabolomice. Poskytuje rychlé a komplexní hodnocení biologických vzorků na lidských modelech (Silva et al. 2020). Tato metoda je dobře reprodukovatelná a nedestruktivní povahy. To umožňuje identifikaci neznámých metabolitů a jejich kvantifikaci někdy i dokonce bez nutnosti interního standardu. Přestože je NMR méně citlivá metoda než MS, její schopnost poskytnout absolutní koncentrace detekovaných metabolitů je velmi ceněna, zvláště v aplikacích zaměřených na kvantitativní analýzu (Gowda & Raftery 2022).

I přes rostoucí popularitu metod založených na MS v metabolomice, NMR zaznamenala v roce 2021 největší počet publikací v jednom roce. To naznačuje její stále rostoucí význam a přínos pro vědeckou komunitu. Tento trend ukazuje na kontinuální rozvoj a význam NMR v metabolomice, s důrazem na nedávný pokrok v technologiích NMR a jejich aplikace (Wishart et al. 2022).

NMR metody v metabolomických studiích se neomezeně používají nejen jednorozměrné (1D, např. NOESY), ale také na dvourozměrné (2D, např. COSY, DOSY, JRES, HETCORE, HMQS) a třírozměrné (3D, např. DART-MS, HRMAS, HSQC, HMBC), které umožňují podrobnější charakterizaci a identifikaci metabolitů. NMR využívá magnetické vlastnosti určitých jader, jako jsou ^1H , ^{13}C , ^{31}P a ^{19}F , zejména jejich schopnosti absorbovat a emitovat energii, což je zásadní pro analýzu vzorků (Kruk et al. 2017).

Výzkum a vývoj v oblasti NMR a metabolomiky pokračuje ve snaze zlepšit rozlišovací schopnost a citlivost této metody pro detekci širšího spektra metabolitů, včetně labilních metabolitů jako jsou koenzymy redoxního stavu, energetické koenzymy a antioxidanty. Tento pokrok má zásadní význam pro rozšíření poznatků o komplexních biologických směsích a pro identifikaci a kvantifikaci nových, dosud neznámých metabolitů (Gowda & Raftery 2022).

3.5.3 Další analytické využití NMR

Novým nástrojem v analytické spektrometrii je ultrafast 2D NMR. Umožňuje rychlou a efektivní analýzu vzorků s vysokým rozlišením. Díky této technologii jsou 2D spektra zaznamenávána v jediném skenu, což je užitečné pro rychlou charakterizaci složitých směsí a monitorování chemických reakcí v reálném čase (Giraudeau & Frydman 2014). Zatím co u 1D NMR dochází k nežádoucímu překrývání píků ve spektrech komplexních směsí,

2D NMR umožňuje lepší separaci mezi překrývajícími se rezonancemi a zároveň poskytuje přesnější kvantitativní data (Martineau & Giraudeau 2019).

NMR, konkrétně qNMR, je možné využít také ve farmaceutickém průmyslu pro identifikaci a kvantifikaci léčivých látek. Tato metoda je zásadní pro určování čistoty léčivých látek, produktů a pro stanovení identity a úrovně nečistot. Ve farmacii nalézá využití díky rychlosti a přesnosti provedení (Jaki et al. 2021; Khalil & Kashif 2023).

Dále NMR nachází dobré využití v metabolickém profilování léčivých rostlin. Její analytická kapacita zde poskytuje informace pro snadné kvalitativní a kvantitativní hodnocení endogenních i exogenních metabolitů přítomných v biologických vzorcích. Tato metoda se používá pro chemické profilování, metabolomiku a kontrolu kvality rostlin a jejich odvozených léčiv, potravin a dalších produktů (Kumar 2016; de León-Solis et al. 2023).

3.5.4 Další analytické metody pro kvantifikaci syntetických sladidel v biologických tekutinách

HPLC je široce používána pro analýzu sladidel v biologických vzorcích díky své vysoké přesnosti, specifičnosti a schopnosti oddělit složky v komplexních směsích (Shoeb et al. 2022).

GC se používá pro analýzu těkavých a polotěkavých sloučenin. Pro analýzu sladidel v biologických tekutinách může být GC kombinována s masovou spektrometrií (GC-MS) pro zvýšení specifičnosti a citlivosti (Sylvetsky et al. 2016).

MS, často v kombinaci s HPLC (LC-MS/MS), poskytuje vysokou citlivost a specifičnost pro identifikaci a kvantifikaci sladidel. Je to důležitá metoda pro stanovení nízkých koncentrací sladidel v biologických tekutinách (Sakai et al. 2015).

Nově vyvinutá metoda pro kvantifikaci syntetických sladidel v biologických tekutinách je ultratlaková kapalinová chromatografie spojená s metodou tandemové hmotnostní spektroskopie (UPLC-MS/MS). Tato metoda je schopna kvantifikovat cukry (glukosu, fruktosu a sacharosu) a sladidla (sukralosu, sacharin, ACK, cyklamát a steviol-glukuronid). Metoda je dostatečně citlivá, přesná, robustní a kompatibilní s různými konzervačními činidly, která jsou doporučena při skladování vzorků. Metoda byla schopna kvantifikovat velice nízké koncentrace analytu v moči (v řádech ng/ml) a byla prohlášena za vhodnou metodu pro kvantifikaci cukrů a sladidel v lidské moči (Diepeveen-de Bruin et al. 2023).

Jednou z nejnovějších metod, která stanovovala náhradní sladidla (konkrétně ACK a erythritol) je metoda ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie s detekcí nabitého aerosolu (UHPLC-CAD). Tato metoda se osvědčila jako univerzální a dokáže detekovat všechny typy sladidel (Cheng et al. 2024).

4 Metodika

4.1 Etické schválení

Pro tuto diplomovou práci udělila dne 23.11.2023 Etická komise Všeobecné fakultní nemocnice v Praze souhlasné stanovisko (č.j. 155/23 S-IV) k provedení individuálního výzkumu na ČZU (příloha IV).

Vzorky všech účastníků studie byly uchovávány v pseudonymizované formě. Každému dobrovolníkovi a každému jeho vzorku byl přiřazen kód, který dokázala zpětně rozklíčovat pouze diplomantka, příp. její školitel. Všechny subjekty, které se zúčastnily této studie, poskytly písemný informovaný souhlas (příloha III) a dále souhlas se zpracování osobních údajů (GDPR) (příloha II). Dále byly subjekty informovány, že ze studie mohou kdykoli odstoupit bez udání důvodu.

Studie se zúčastnilo celkem 16 dobrovolníků (9 žen a 7 mužů ve věkovém rozmezí 18-53 let). Byly od nich získány informace o pohlaví, věku, tělesné hmotnosti a výšce. Z hmotnosti a výšky byl vypočteno index tělesné hmotnosti (BMI). Každý dobrovolník odevzdal vzorky moči a slin a v průběhu odběrů zaznamenával svůj 24hodinový jídelníček. Počet vzorků každého subjektu se lišil z důvodů popisovaných dále v textu.

4.2 Odběr vzorků

Každý účastník studie odebral 2 vzorky moči i slin před intervencí (tj. požití 0,5 l Coca-Coly Zero během maximálně 1 hodiny) a dále odebíral tyto tělní tekutiny během 24 hodin od intervence. Tyto vzorky byly odebírány podle přesně daných pravidel, o kterých byl každý dobrovolník předem informován (příloha I). Vzorky moči byly odebírány do jednorázových mikrozkušavek a vzorky slin do jednorázových odběrových sad, přičemž byl vždy zapsán čas do odběrového formuláře. Tyto vzorky byly označeny specifickým kódem a okamžitě zmrazeny.

4.3 Stravování dobrovolníků během odběrů vzorků

Před začátkem odběrů byli dobrovolníci informováni o způsobu stravování během odběrového dne. Kromě nápojů a potravin obsahující AKC bylo dovoleno stravovat se běžným způsobem a vše zkonsumované zapisovat (příloha I).

4.4 Přeprava a skladování vzorků

Dobrovolníci uchovávali vzorky v domácích mrazácích (cca $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nejpozději do sedmi dnů od jejich odebrání byly převezeny na ČZU ve speciálním chladícím boxu, kde byly uchovávány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do jejich zpracování.

4.5 Analýza vzorků

4.5.1 Použité laboratorní pomůcky a chemikálie

Laboratorní pomůcky na analýzu moči

- jednorázové zkumavky na odběr vzorků
- 1,5ml mikrozkušavky na skladování vzorků
- domácí mrazák na přechodné uchování vzorků
- chladicí box s chladicími vložkami na převoz vzorků
- mrazák s teplotou $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- stojan na zkumavky
- automatické pipety VWR
- vortex VWR VV3
- centrifuga VWR MicroStar 17/17R
- skleněné kyvety pro NMR
- nukleární magnetická rezonance

Chemikálie na analýzu moči

- pufr TSP ((3-(trimethylsilyl)-propionate-2,2,3,3-*d*₄) s pH 7,4

Laboratorní pomůcky na analýzu slin

- jednorázové odběrové sety na odběr vzorků
- domácí mrazák na přechodné uchování vzorků
- chladicí box s chladicími vložkami na převoz vzorků
- mrazák s teplotou $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- stojan na zkumavky
- automatické pipety VWR
- centrifuga Rotanta 460/460R Hettich zentrifugen
- centrifuga VWR MicroStar 17/17R

- skleněné kyvety pro NMR
- nukleární magnetická rezonance

Chemikálie na analýzu slin

- pufr TSP ((3-(trimethylsilyl)-propionate-2,2,3,3-*d*₄) s pH 7,4
- destilovaná voda

4.5.2 Příprava vzorků na NMR analýzu

4.5.2.1 Moč

Vzorky moči byly rozmrazovány při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Následně byly v původních 1,5ml mikrozkušnicích centrifugovány. Centrifugace probíhala též při pokojové teplotě, po dobu 5 minut a otáčkách 13 300 rpm. Poté bylo do čistých mikrozkušnic z každého vzorku pipetováno 720 μ l a přidáno 80 μ l TSP pufru. Roztok byl dále 1 minutu vortexován a opět za stejných podmínek centrifugován. Po dokončení centrifugace bylo z každé mikrozkušnice pipetováno 600 μ l do skleněných kyvet pro NMR.

4.5.2.2 Sliny

Vzorky slin byly v původních odběrových sadách rozmrazovány při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Poté byly centrifugovány po dobu 10 minut, při teplotě 4 °C a otáčkách 1 500 rpm. Následně bylo do skleněných kyvet pro NMR pipetováno 200 μ l vzorku. Ke vzorku bylo přidáno 340 μ l destilované vody a 60 μ l TSP pufru. Roztok byl ručně protřepán a vložen do NMR.

4.5.3 Měření na NMR spektrometru a analýza dat v softwarech

4.5.3.1 Moč

Každý vzorek měřen na NMR spektrometru Bruker Avance III, při protonové sekvenci 500 MHz, při teplotě 25 °C (298 K), metodou 1D NOESY s potlačením signálu vody 4,7003 ppm. Bylo pořízeno 128 skenů s počtem datových bodů 64 k a šířkou spektra 16 ppm. Doba akvizice byla 4 s, doba presaturace 1 s a doba směšování 100 ms.

Po naměření vzorků NMR spektrometrem byla spektra upravena programem Topspin (ver. 3.6.5, USA). Byla provedena Fourierova transformace a exponenciální amplifikace. Dále byla provedena manuální korekce fáze a baseline.

Upravená spektra byla importována do programu MestReNova (ver. 14.2.1-27684, Mestrelab Research, ES). Zde byla opět provedena korekce baseline prostřednictvím algoritmu Whitaker smoother. Spektra byla ve formátu JCAMP importována do software Chenomx (ver. 9.01, Chenomx, CA). Zde bylo anotováno a kvantifikováno celkem 20 metabolitů dle knihovny spekter Chenomx. ACK bylo do knihovny přidáno na podkladu měření standardu. Získaná data byla vyhodnocena v softwaru Microsoft Office Excel a MetaboAnalyst (ver. 6.0) (MetaboAnalyst 6.0 2024).

4.5.3.2 Sliny

Každý vzorek podstoupil měření na NMR spektrometru Bruker Avance III, při protonové sekvenci 500 MHz, při teplotě 25 °C (298 K), metodou 1D NOESY s potlačením signálu vody 4,7007 ppm. Bylo pořízeno 256 skenů s počtem datových bodů 64 k a šířkou spektra 16 ppm. Doba akvizice byla 4 s, doba presaturace 1 s a doba směšování 100 ms.

Dále bylo se spektry nakládáno stejně jako se spektry vzorků moči, viz výše. V software Chenomx byl proveden pokus o kvantifikaci sledovaného syntetického sladidla ACK.

4.5.4 Vyhodnocení

Koncentrace ACK a ostatních metabolitů byla normalizována na kreatinin. Následně byla data vyhodnocena statistickými testy (Wilcoxonův test a korelační analýza) a výsledky byly porovnány mezi jednotlivými skupinami subjektů dle vybraných parametrů (pohlaví, tělesná hmotnost a výška). Dále byly vytvořeny jednotlivé grafy pro názornou demonstraci dílčích výsledků.

5 Výsledky a diskuse

Do výzkumu bylo zahrnuto celkem 16 dobrovolníků (9 žen a 7 mužů). Muži vykazovali průměrnou výšku a hmotnost větší než ženy, ale průměrné BMI bylo vyšší u žen. Průměrně byli muži mladší než ženy (tab. 3). Všichni účastníci poskytli 2 kontrolní vzorky moči i slin před intervencí. Po intervenci odebírali vzorky těchto tělních tekutin po dobu 24 hodin.

Tabulka č. 3 Obecné charakteristiky dobrovolníků

	Celkově (n = 16)	Ženy (n = 9)	Muži (n = 7)
Průměrný věk (let)	31	32	28
Průměrná hmotnost (kg)	71	68	74
Průměrná výška (m)	1,74	1,68	1,82
Průměrné BMI	23,04	23,85	21,99

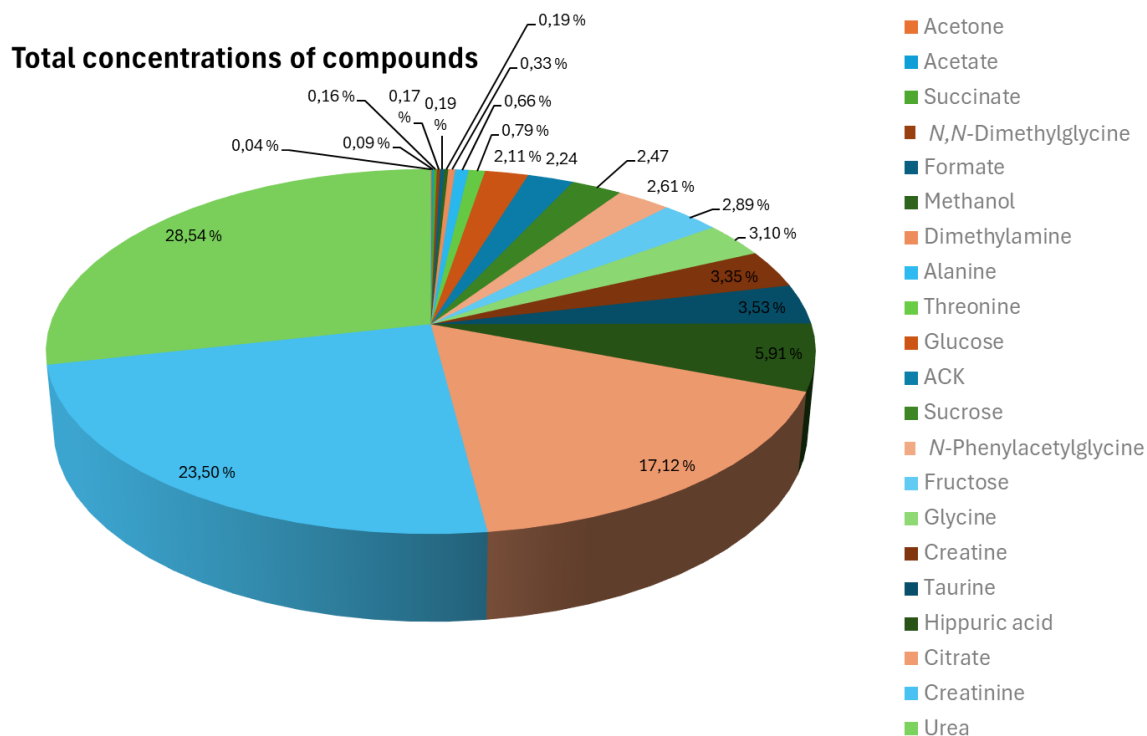
5.1 Stanovení ACK ve slinách

Pro účely této studie dobrovolníci poskytli celkem 144 vzorků slin. Z důvodu nedostatečného objemu poskytnutých vzorků některými dobrovolníky nebylo možné ACK ve slinách prokazatelně stanovit. Tyto biologické tekutiny bylo nutné naředit destilovanou vodou, což vedlo k poklesu koncentrace ACK pod detekční limit NMR, a tudíž nebylo možné ho kvantifikovat. Pro další výzkum, týkající se kvantitativního stanovení ACK ve slinách, by bylo nutné získat větší objemy jednotlivých vzorků a tím se vyhnout nutnosti jejich ředění před analýzou. Nicméně spektra vzorků slin byla získána, ale data těchto spekter nebudou zahrnuta v této diplomové práci. Mohou však být použita pro další výzkumy nebo studie, které budou do budoucna pro pochopení tohoto tématu nutná.

5.2 Stanovení ACK v moči

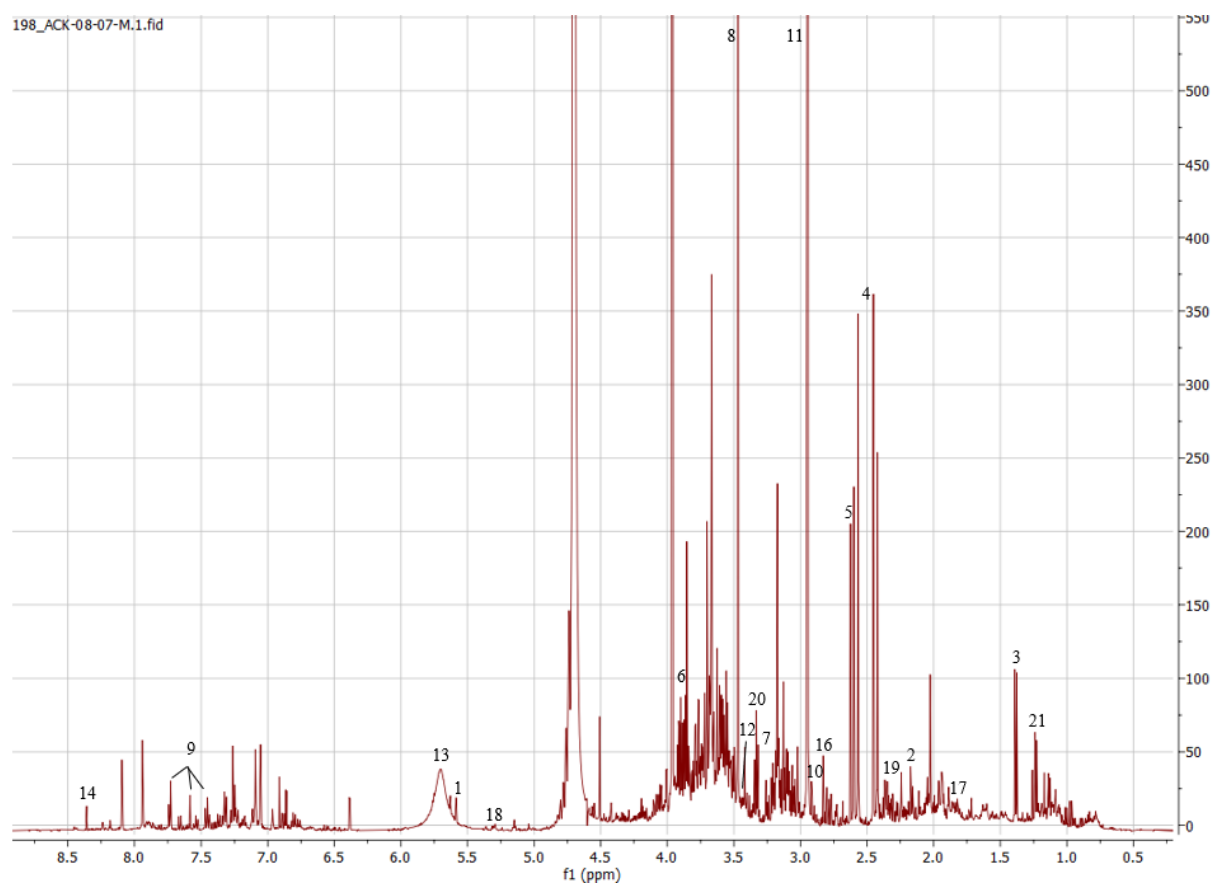
5.2.1 Vhodnost metody NMR

Výsledkem zkoumání bylo 144 spekter moči jednotlivých dobrovolníků. S pomocí softwaru Chenomx bylo kvantifikováno 21 sloučenin (20 metabolitů a ACK) (obr. 7). Nejvíce zastoupena byla močovina následována kreatininem a citrátem, které dohromady vykazovaly 69,16 % z celého množství kvantifikovaných metabolitů. Nejméně zastoupený byly ve vzorcích moči naopak: aceton, acetát, sukcinát, *N,N*-dimethylglycin, formiát, metanol, dimethylamin, které dohromady dávaly 1,18 %.



Obrázek č. 7 Koláčový graf průměrných koncentrací všech kvantifikovaných metabolitů v mg

Kvantifikace ACK a dalších metabolitů v moči metodou NMR se jevila jako vysoce správná a přesná (obr. 8, tab. 4). To potvrzují konzistentní výsledné hodnoty mezi různými vzorky a měřeními. Metoda NMR je obecně používána k identifikaci neznámých metabolitů (Garcia-Perez et al. 2020), proto by bylo vhodné ji rozvinout i pro kvantitativní stanovení ACK (a dalších náhradních sladidel) v moči. Do budoucna bude nutné provést další výzkumy, které se budou zabývat stanovením syntetických sladidel ve slinách, zejména ACK.



Obrázek č. 8 Náhodně vybrané vzorové spektrum moči

Čísla označují následující metabolity: 1: ACK; 2: aceton; 3: alanin; 4: citrát; 5: dimethylamin; 6: fruktosa; 7: glukosa; 8: glycin; 9: hippurát; 10: kreatin; 11: kreatinin; 12: metanol; 13: močovina; 14: formiát; 15: *N*-phenylacetylglycin; 16: *N,N*-dimethylglycin; 17: acetát; 18: sacharosa; 19: sukcinát; 20: taurin; 21: threonin

Tabulka č. 4 Kvantifikované metabolity a ACK v programu Chenomx a jejich hodnota chemického posunu

Metabolit (resp. sladidlo)	Hodnota chemického posunu (ppm)
ACK	5,7; 2,1
Aceton	2,2
Alanin	3,8; 1,5
Citrát	2,7; 2,5
Dimethylamin	2,7
Fruktosa	4,1; 4,0; 3,9; 3,8; 3,7; 3,6
Glukosa	5,2; 4,6; 3,9; 3,8; 3,7; 3,5; 3,4; 3,2
Glycin	3,6
Hippurát	8,5; 7,8; 7,6; 7,5; 4,0
Kreatin	3,9; 3,0
Kreatinin	4,0; 3,0
Metanol	3,4
Močovina	5,8
Formiát	8,4
<i>N</i> -Phenylacetylglycin	8,0; 7,4; 7,3; 3,7;
<i>N,N</i> -Dimethylglycin	3,7; 2,9
Acetát	1,9
Sacharosa	5,4; 4,2; 4,0; 3,9; 3,8; 3,7; 3,6; 3,5
Sukcinát	2,4
Taurin	3,4; 3,3
Threonin	4,2; 3,6; 1,3

5.2.2 Exkrece ACK močí

Detekovatelná koncentrace ACK byla ve vzorcích moči zaznamenána průměrně 0,86 hodin po intervenci. Údaj byl u obou pohlaví prakticky stejný (u žen 0,92 hodin a u mužů 0,78 hodin), u mužů byla zjištěna dřívější exkrece o 0,14 hodiny. To naznačuje rychlou absorpci a exkreci této látky u obou pohlaví.

Maximální koncentrace ACK vykazovala individuální variabilitu mezi subjekty. Průměrná maximální koncentrace ACK všech dobrovolníků byla 0,28. Nejvyšší zaznamenaná maximální koncentrace ACK byla 0,57. Toto odlišné maximum mohlo být způsobeno řadou faktorů, včetně individuálních rozdílů v metabolismu a clearanci ACK, jeho rozdílů v absorpci a distribuci v organismu nebo variací v hydrataci a diuretické aktivitě subjektu. Dalším

faktorem mohly být odlišné stravovací návyky a celkový zdravotní stav. Nejnižší zaznamenaná maximální koncentrace ACK byla 0,14.

Časový interval absolutní exkrece ACK močí nebylo možné u některých dobrovolníků určit vzhledem k individuálním rozdílům v metabolických rychlostech eliminace daného subjektu. Tato variabilita byla zkomplikována skutečností, že někteří účastníci poskytli poslední vzorek moči ještě před tím, než došlo k absolutní exkreci sladidla. Přestože odborné zdroje uvádějí, že ACK by mělo být z lidského organismu vyloučeno do 24 hodin (Pang et al. 2021), bylo zjištěno, že minimální doba potřebná pro eliminaci ACK v moči se pohybovala okolo 10 hodin od začátku intervence a maximální doba vyloučení byla identifikována přibližně ve 14. hodině od počátku intervence.

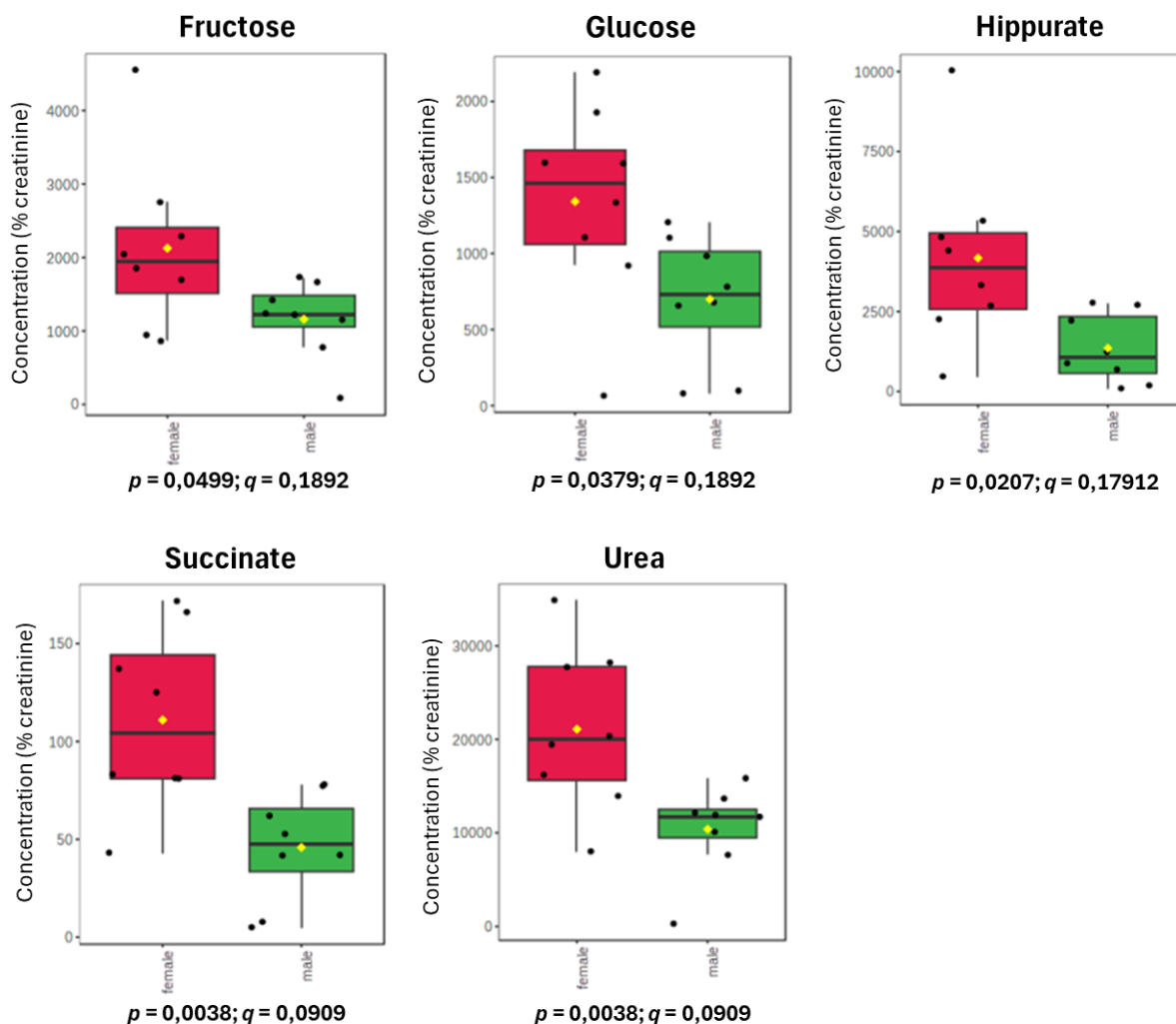
5.2.3 Rozdíly mezi jednotlivými skupinami respondentů

Celkové množství ACK (popř. i jiných látek), které prošlo organismem během sledovaného časového období, bylo stanoveno výpočtem plochy pod křivkou prostřednictvím lichoběžníkové metody. Plochy pod křivkou jednotlivých metabolitů byly porovnány podle pohlaví, výšky a tělesné hmotnosti.

5.2.3.1 Porovnání profilů metabolitů vzorků moči u žen a mužů

Aby bylo možné porovnat profily metabolitů vzorků moči žen a mužů, byla provedena statistická analýza Wilcoxonův test. Fruktosa, glukosa, hippurát, močovina a sukcinát (normalizované na kreatinin) byly signifikantně rozdílné, ne však po korekci FDR (obr. 9). U uvedených pěti metabolitů byla zjištěna vyšší průměrná koncentrace u žen než u mužů.

Rozdíly v koncentracích těchto metabolitů mezi pohlavími byly v literatuře již dříve popsány. Důvodem těchto rozdílů může být normalizace na kreatinin, protože ženy mají v moči méně této látky než muži. Tato metoda normalizace pak může vnášet do těchto srovnání chybu. Dále tento zdroj prokázal vyšší koncentraci např. leucinu, dimethylaminu, chloridu, sodíku a 2-hydroxyfenyloctové kyseliny u mužů a citrátu, fruktosy a p-kresolu u žen (Rist et al. 2017).



Obrázek č. 9 Porovnání koncentrací vybraných metabolitů u mužů a žen

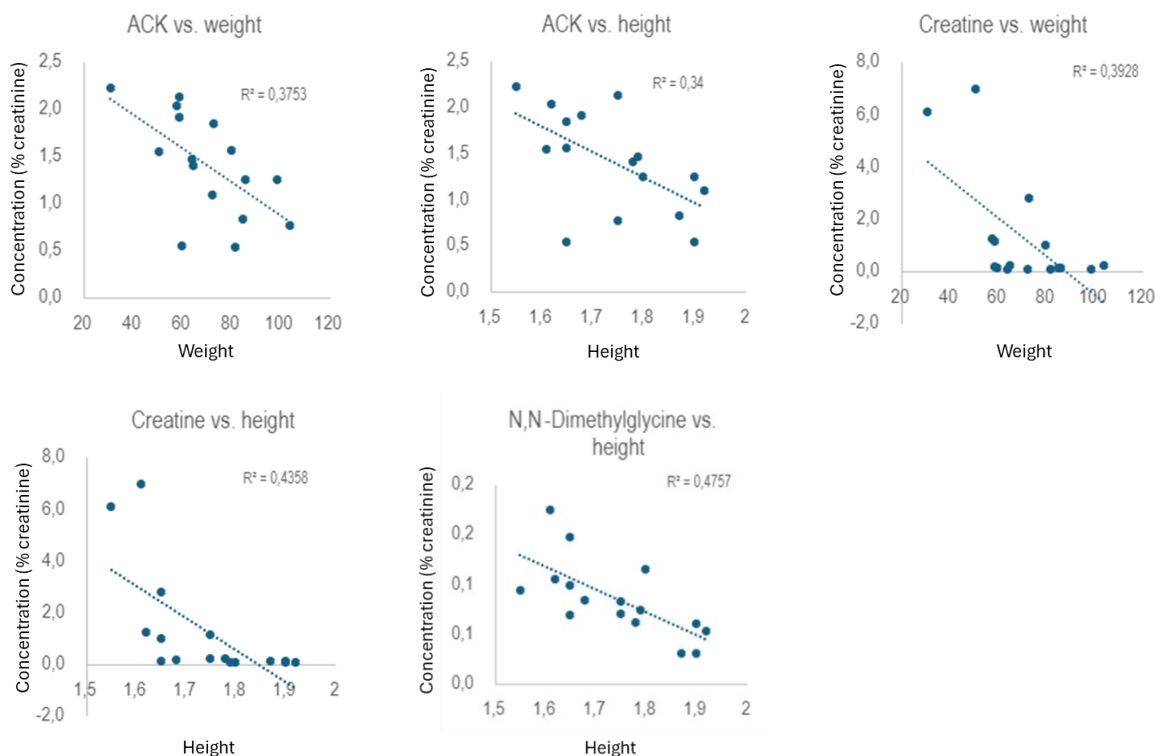
Významně změněné metabolity rozlišující mužskou a ženskou moč byly získány na základě podmínek $p < 0,05$. Statisticky signifikantní výsledek vykazoval sukcinát ($p = 0,0038$; $q = 0,0909$), u kterého byla průměrná koncentrace vyšší u žen než u mužů a to o 84 %. Tento rozdíl v koncentracích sukcinátu v moči mezi pohlavími byl již dříve potvrzen (Fan et al. 2018). Dále byl v diplomové práci zjištěn rozdíl v koncentracích hippurátu ($p = 0,0207$; $q = 0,1791$) mezi pohlavími. Moč žen obsahovala o 180 % více hippurátu než mužská. Vyšší koncentrace sukcinátu i hippurátu by mohla souviset s vyšší konzumací ovoce a zeleniny. Tyto potraviny konzumují obecně ve větším množství ženy než muži. Uvedené metabolity (spolu s citrátem, fenylalaninem, formiátem a glycinem) byly identifikovány jako indikátory rostlinné stravy a mohly by úzce souviset i s vegetariánskou stravou. Dle odborné literatury může mít strava větší vliv na množství metabolitů v moči než pohlaví (Xu et al. 2010).

Dále byl zjištěný vliv na glukosu ($p = 0,0379$; $q = 0,1892$) a fruktosu ($p = 0,0449$; $q = 0,1892$). Obě tyto látky se opět vyskytovaly ve větší koncentraci v moči žen. Vliv umělých sladidel na metabolismus glukosy a fruktosy není zcela jasný. Bylo však zjištěno, že mohou ovlivnit absorpci glukosy ve střevním traktu a sekreci inzulinu a inkretinů (Iizuka 2022). Bylo prokázáno, že mohou ovlivňovat složení střevního mikrobiomu a zhoršovat regulaci glukosy v krvi v důsledku změn v mikrobiomu střev (Suez et al. 2014). Koncentrace močoviny byla u žen vyšší o 96 % ($p = 0,0070$; $q = 0,0909$).

5.2.3.2 Rozdíly v koncentracích metabolitů v moči v závislosti na výšce a tělesné hmotnosti

V rámci výzkumu byla pozornost věnována také vlivu tělesné hmotnosti a výšky na rozdíly v koncentracích jednotlivých metabolitů. K získání těchto výsledků byla využita korelační analýza. Nejvýznamnější korelaci s výškou nebo hmotností ($r \leq -0,6$) vykazoval ACK, kreatin a *N,N*-dimethylglycin (obr. 10). Bylo zjištěno, že ACK a kreatin korelují s oběma zmiňovanými tělesnými proporcemi, zatímco *N,N*-dimethylglycin prokázal korelaci pouze s výškou.

U všech sledovaných látek byla hodnota korelačního koeficientu negativní ($r < -0,3$). Korelace mezi tělesnými proporcemi a ACK ($r_{\text{výška}} = -0,58$; $r_{\text{hmotnost}} = -0,61$) byla slabě negativní. Stejně tomu bylo u kreatinu ($r_{\text{výška}} = -0,66$; $r_{\text{hmotnost}} = -0,63$), zatímco korelace mezi *N,N*-dimethylglycinem a výškou byla středně negativní ($r_{\text{výška}} = -0,7$; $r_{\text{hmotnost}} = -0,35$). Výsledky ukázaly, že s rostoucí hmotností a výškou subjektů docházelo ke zpomalení vylučování pozorovaných látek, což odráží vliv distribučního objemu. Toto téma doposud nebylo prozkoumáno ve spojení s náhradními sladidly, resp. s ACK, tudíž je třeba dalších výzkumů pro jeho hlubší pochopení.



Obrázek č. 10 Korelace mezi tělesnou hmotností a výškou a jednotlivými metabolity

5.2.4 Výsledky související s intervencí

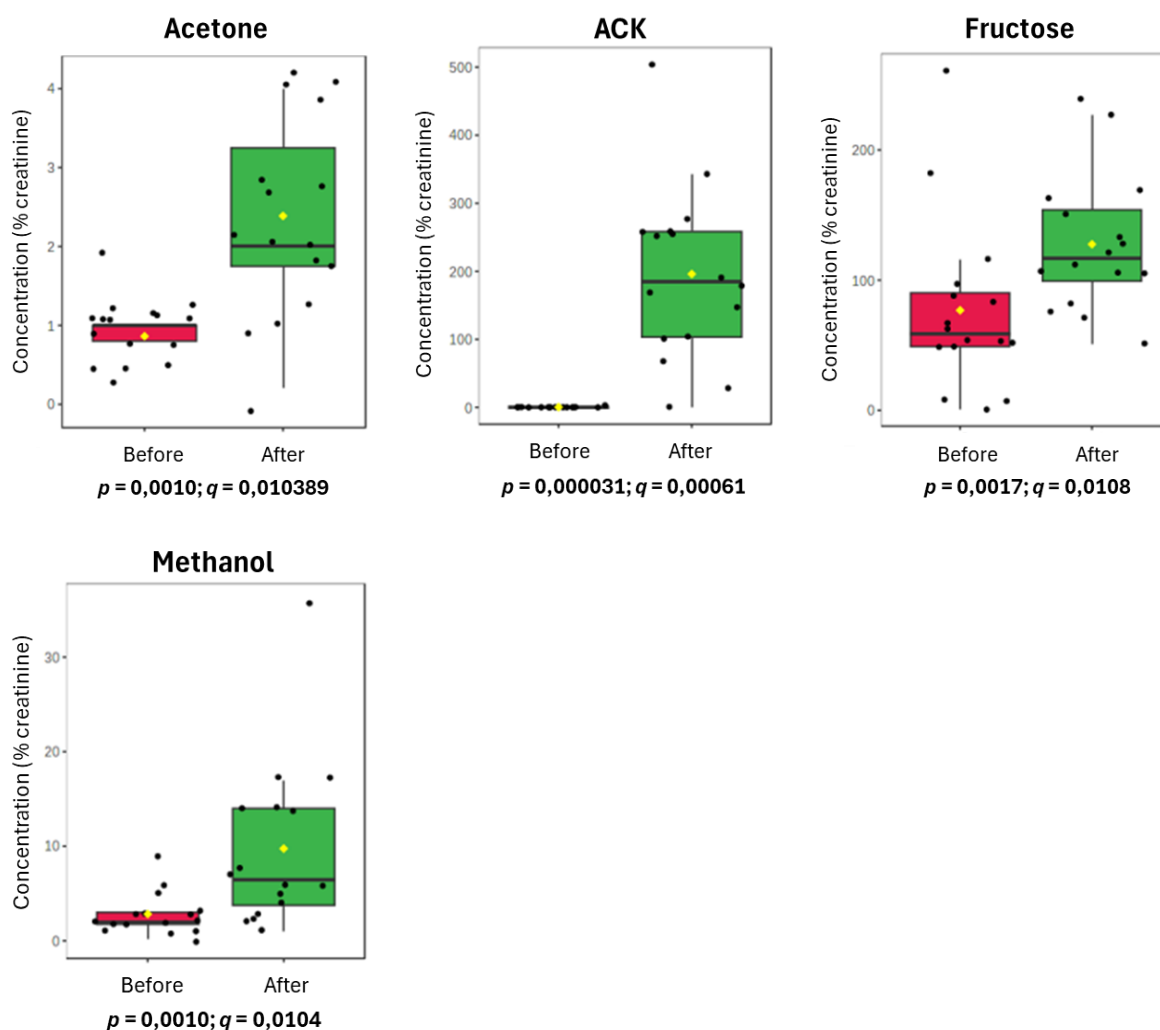
Výsledky související s intervencí byly získány z rozdílu průměrných koncentrací před intervencí a po intervencí (mezi 1.-6. hodinou). Ke stanovení významnosti byl zvolen Wilcoxonův test. Statisticky signifikantní rozdíly byly identifikovány u látek ACK, aceton, fruktosa, metanol, močovina, kreatin, glycin, *N*-phenylacetylglycin, sacharosa a threonin (obr. 11). Po aplikaci korekce pro mnohonásobné testování s využitím FDR zůstaly statisticky signifikantní pouze ACK, aceton, fruktosa a metanol. Byl pozorován průměrný nárůst koncentrace ACK (FC = 1255,6), acetonu (FC = 3,2), fruktosy (FC = 1,4) a metanolu (FC = 3,4).

Z výsledků není možné zcela určit, zda příčinou zvýšení koncentrací jednotlivých metabolitů bylo působení ACK. Tato změna koncentrací mohla být způsobena i ostatními látkami z podané Coca-Coly Zero. Např. aspartam mohl zapříčinit zvýšení koncentrace metanolu, jelikož se jeho molekula rozkládá na asparagovou kyselinu, fenylalanin a právě metanol. Již dříve bylo prokázáno, že koncentrace metanolu (po požití 34 mg/kg tělesné hmotnosti) v krvi byla pod úrovní detekce (0,4 mg/dl). Čím vyšší dávku aspartamu účastníci studie konzumovali (100, 150 a 200 mg/kg tělesné hmotnosti), tím bylo detekováno větší

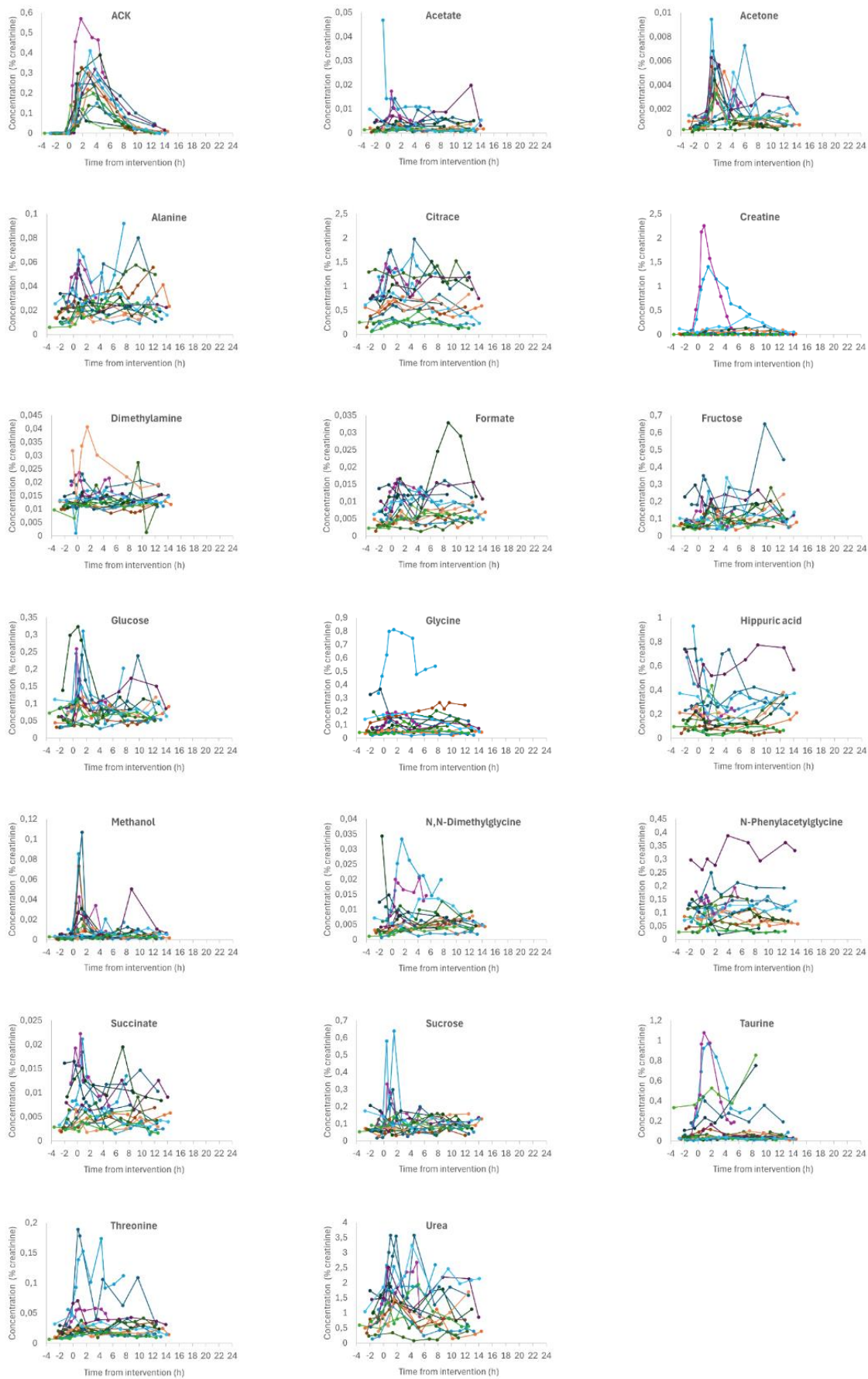
množství metanolu v jejich krvi (Stegink et al. 1981). Z tohoto tvrzení by se dalo předpokládat, že se zvýšené množství metanolu z krve později vyloučí ledvinami do moči.

V odborné literatuře bylo zjištěno, že konzumace syntetických sladidel souvisí s glykemickou odpovědí na zkonsumované potraviny během dne (Young et al. 2017). Stejný poznatek vyplývá i z diplomové práce, kde byla zjištěna zvýšená koncentrace fruktosy. Novější studie ale souvislost konzumace syntetických sladidel s glykemickou odpovědí, v dávkách přijímaných v každodenním životě, neprokázala (Orku et al. 2023). Z toho vyplývá, že toto téma není v současné době ještě zcela prozkoumáno, proto by bylo do budoucna zapotřebí se této oblasti hlouběji věnovat.

V této práci byla dále pozorována vyšší exkrece acetonu. Toto zjištění by mohlo být také spojeno s glykemickou odezvou, protože zvýšená koncentrace této látky je totiž obvykle častou neinvazivní diagnostikou diabetes mellitus (pacientům je cítit aceton z dechu) (Righettoni et al. 2012).



Obrázek č. 11 Porovnání koncentrací vybraných metabolitů před a po intervenci



Obrázek č. 12 Koncentrace metabolitů (% kreatininu) v moči dobrovolníků po intervenci

Během dne se u jednotlivých dobrovolníků často měnily koncentrace jednotlivých metabolitů včetně ACK (obr. 12). Změny v koncentracích ACK jsou jednoduše vysvětlitelné. U každého dobrovolníka byla v moči před intervencí zjištěna nulová koncentrace ACK. Asi 1 hodinu po intervenci se množství ACK v moči začalo zvyšovat. Po dosažení maximální koncentrace ACK začaly křivky v grafech klesat, dokud nedošlo k absolutní exkreci ACK močí z těla. Z výsledků této diplomové práce ale nelze přesně určit, zda má ACK vliv na změny koncentrací ostatních metabolitů anebo tyto změny souvisí i s ostatními složkami (např. aspartam) obsaženými v Coca-Cole Zero, popř. s potravinami zkonsumovanými před intervencí.

6 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit použitelnost NMR pro kvantitativní stanovení ACK v biologických tekutinách (moč a sliny) a prozkoumat jeho vliv na metabolický profil zmiňovaných tělních tekutin. Zjištění ukázala, že NMR je dostatečně citlivá metoda pro kvantitativní stanovení běžného dietního příjmu ACK, nicméně z provedených analýz nebylo možné zcela rozpoznat, zda příjem ACK ovlivňuje metabolický profil moči a slin. Analyzovány byly pouze vzorky moči. Stanovení ACK ve slinách nebylo v tomto výzkumu možné provést z důvodu malého objemu poskytnutých vzorků. Bylo nutné vzorky naředit destilovanou vodou a tím se ACK dostal pod detekční limit NMR.

Ve vzorcích moči bylo kvantifikováno celkem 21 sloučenin. Statistické zpracování pomocí Wilcoxonova testu odhalilo rozdíly v koncentracích metabolitů související s pohlavím, přičemž bylo zjištěno, že ženská moč obsahovala větší množství jednotlivých metabolitů. Statisticky signifikantních bylo pět sloučenin (fruktosa, glukosa, hippurát, sukcinát a močovina). Dále byly prozkoumány rozdíly v koncentracích sloučenin v závislosti na tělesné hmotnosti a výšce. Signifikantní korelaci s oběma tělesnými proporcemi vykazovaly ACK a kreatin. *N,N*-dimethylglycinem byl statisticky signifikantní pouze s výškou. Tyto výsledky však nesouvisely s intervencí. Dalo by se z nich ale usoudit, že množství některých metabolitů (a také ACK) v moči závisí na pohlaví a dále na výšce a tělesné hmotnosti.

V diplomové práci bylo provedeno porovnání koncentrací jednotlivých metabolitů a ACK před a po intervenci. Dle Wilcoxonova testu vyšly statisticky signifikantní čtyři sloučeniny (ACK, aceton, fruktosa a methanol). Výsledky neumožnily jednoznačně určit, zda byly pozorované změny koncentrací důsledkem konzumace ACK nebo dalších faktorů. Zvyšování hladiny určitých metabolitů v moči po intervenci mohly ovlivnit i ostatní látky Coca-Coly Zero (např. aspartam) nebo potraviny konzumované před intervencí. Dále mohly hrát v tomto ohledu významnou roli individuální rozdíly v metabolismu a clearanci látek, rozdíly v jejich absorpci a distribuci v organismu nebo variace v hydrataci a diuretické aktivitě. V neposlední řadě mohly být faktorem, ovlivňujícím změny koncentrací, odlišné stravovací návyky subjektů a jejich celkový zdravotní stav. Tato zjištění podtrhují potřebu dalších výzkumů v této oblasti.

Co se týče vlivu ACK i jiných syntetických sladidel na zdraví, je nutné toto téma ještě kvalitně prozkoumat. V dnešní době existuje malé množství studií, které se tímto tématem zabývají a jejich výsledky jsou rozporuplné. Syntetická sladidla se na trhu čím dál tím více rozšiřují, proto je nezbytné více prozkoumat jejich vliv na lidský organismus.

7 Literatura

- Alcaire F, Antúnez L, Vidal L, Giménez A, Ares G. 2017. Aroma-related cross-modal interactions for sugar reduction in milk desserts: Influence on consumer perception. *Food Research International*. **97**:45-50.
- Ardalan MR, Tabibi H, Attari VE, Mahdavi AM. 2017. Nephrotoxic Effect of Aspartame as an Artificial Sweetener. *Iranian Journal of Kidney Diseases*. 339-343.
- Arora S, Shendurse AM, Sharma V, Wadhwa BK, Singh AK. 2013. Assessment of stability of binary sweetener blend (aspartame x acesulfame-K) during storage in whey lemon beverage. *Journal of Food Science and Technology*. **50**:770-776.
- Basu S, McKee M, Galea G, Stuckler D. 2013. Relationship of Soft Drink Consumption to Global Overweight, Obesity, and Diabetes: A Cross-National Analysis of 75 Countries. *American Journal of Public Health*. **103**:2071-2077.
- Bearth A, Cousin ME, Siegrist M. 2014. The consumer's perception of artificial food additives: Influences on acceptance, risk and benefit perceptions. *Food Quality and Preference*. **38**:14-23.
- Bian X, Chi L, Gao B, Tu P, Ru H, Lu K. 2017. The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice. *PLOS ONE*. **12** (6): e0178426.
- Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, Knox C, Bjorndahl TC, Krishnamurthy R, Saleem F, Liu P, Dame ZT, Poelzer J, Huynh J, Yallou FS, Psychogios N, Dong E, Bogumil R, Roehring C, Wishart DS. 2013. The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE*. **8**: e73076.
- Bretz WA, Corby PMA, Hart TC, Costa S, Coelho MQ, Weyant RJ, Robinson M, Schork NJ. 2005. Dental Caries and Microbial Acid Production in Twins. *Caries Research*. **39**: 168-172.
- Bridge-Comer PE, Vickers MH, Morton-Jones J, Spada A, Rong J, Reynolds CM. 2021. Impact of Maternal Intake of Artificial Sweetener, Acesulfame-K, on Metabolic and Reproductive Health Outcomes in Male and Female Mouse Offspring. *Frontiers in Nutrition*. **8**.
- Castura JC, Antúnez L, Giménez A, Ares G. 2016. Temporal Check-All-That-Apply (TCATA): A novel dynamic method for characterizing products. *Food Quality and Preference*. **47**: 79-90.

- Conz A, Salmona M, Diomede L. 2023. Effect of Non-Nutritive Sweeteners on the Gut Microbiota. *Nutrients*. **15**:1869.
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin A S, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. **505**:559-563.
- de León-Solis C, Casasola V, Monterroso T. 2023. Metabolomics as a tool for geographic origin assessment of roasted and green coffee beans. *Heliyon*. **9**:e21402.
- Debras C, Deschasaux-Tanguy M, Chazelas E, Sellem L, Druesne-Pecollo N, Esseddik Y, Szabo de Edelenyi F, Agaësse C, De Sa A, Lutchia R, Julia C, Kesse-Guyot E, Allès B, Galan P, Hercberg S, Huybrechts I, Cosson E, Tatulashvili S, Srouf B, Touvier M. 2023. Artificial Sweeteners and Risk of Type 2 Diabetes in the Prospective NutriNet-Santé Cohort. *Diabetes Care*. **46**:1681-1690.
- Debras C, Chazelas E, Sellem L, Porcher R, Druesne-Pecollo N, Esseddik Y, de Edelenyi FS, Agaësse C, De Sa A, Lutchia R, Fezeu LK, Julia C, Kesse-Guyot E, Allès B, Galan P, Hercberg S, Deschasaux-Tanguy M, Huybrechts I, Srouf B, Touvier M. 2022a. Artificial sweeteners and risk of cardiovascular diseases: results from the prospective NutriNet-Santé cohort. *BMJ*. e071204.
- Debras C, Chazelas E, Srouf B, Druesne-Pecollo N, Esseddik Y, Szabo de Edelenyi F, Agaësse C, De Sa A, Lutchia R, Gigandet S, Huybrechts I, Julia C, Kesse-Guyot E, Allès B, Andreeva VA, Galan P, Hercberg S, Deschasaux-Tanguy M, Touvier M. 2022b. Artificial sweeteners and cancer risk: Results from the NutriNet-Santé population-based cohort study. *PLOS Medicine*. **19**:e1003950.
- Diepeveen-de Bruin M, Maho W, Buso MEC, Naomi ND, Brouwer-Brolsma EM, Feskens EJM, Balvers MGJ. 2023. Development and validation of a UPLC-MS/MS method for the quantification of sugars and non-nutritive sweeteners in human urine. *Journal of Chromatography B*. **1225**:123741.
- Dračinský M. 2021. NMR Spektroskopie pro chemiky. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha.
- Duarte D, Castro B, Pereira JL, Marques JF, Costa AL, Gil AM. 2020. Evaluation of Saliva Stability for NMR Metabolomics: Collection and Handling Protocols. *Metabolites*. **10**:515.
- DuBois GE, Prakash I. 2012. Non-Caloric Sweeteners, Sweetness Modulators, and Sweetener Enhancers. *Annual Review of Food Science and Technology*. **3**:353-380.
- Dwyer JT, Melanson KJ, Sriprachy-anunt U 2015. Dietary Treatment of Obesity.

- Dyer J, Salmon KSH, Zibrik L, Shirazi-Beechey SP. 2005. Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochemical Society Transactions*. **33**:302-305.
- EFSA. 2016. Safety of the proposed extension of use of acesulfame K (E 950) in foods for special medical purposes in young children. *EFSA Journal*. **14**.
- EFSA. 2019. Sweeteners. Available from <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/sweeteners> (accessed october 2023).
- Espinosa A, Mendoza K, Laviada-Molina H, Rangel-Méndez JA, Molina-Segui F, Sun, Q, Tobias DK, Willett WC, Mattei J. 2023. Effects of non-nutritive sweeteners on the BMI of children and adolescents: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and prospective cohort studies. *The Lancet Global Health*. **11**:S8.
- Fan S, Yeon A, Shahid M, Anger JT, Eilber KS, Fiehn O, Kim J. 2018. Sex-associated differences in baseline urinary metabolites of healthy adults. *Scientific Reports*. **8**:11883.
- FDA. 2020. Herbert Ley. Available from <https://www.fda.gov/about-fda/fda-leadership-1907-today/herbert-ley> (accessed november 2023).
- FDA. 2021. About Biomarkers and Qualification. Available from <https://www.fda.gov/drugs/biomarker-qualification-program/about-biomarkers-and-qualification#what-is> (accessed november 2023).
- FDA 2023. Available from <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/aspartame-and-other-sweeteners-food> (accessed july 2023).
- Figueira J, Jonsson P, Nordin Adolfsson A, Adolfsson R, Nyberg L, Öhman A. 2016. NMR analysis of the human saliva metabolome distinguishes dementia patients from matched controls. *Molecular BioSystems*. **12**:2562-2571.
- Finassi CM, Calixto LA, Segura W, Bocato MZ, Barbosa Júnior F, Fonseca FLA, Lamy E, Castelo PM. 2023. Effect of sweetened beverages intake on salivary aspartame, insulin and alpha-amylase levels: A single-blind study. *Food Research International*. **173**:113406.
- Frankenfeld CL, Sikaroodi M, Lamb E, Shoemaker S, Gillevet PM. 2015. High-intensity sweetener consumption and gut microbiome content and predicted gene function in a cross-sectional study of adults in the United States. *Annals of Epidemiology*. **25**:736-742.e4.
- Friedrich MJ. 2017. Global Obesity Epidemic Worsening. *JAMA*. **318**:603.

- Garcia-Perez I, Posma JM, Serrano-Contreras JI, Boulangé CL, Chan Q, Frost G, Stamler J, Elliott P, Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. 2020. Identifying unknown metabolites using NMR-based metabolic profiling techniques. *Nature Protocols*. **15**:2538-2567.
- Gerasimidis K, Bryden K, Chen X, Papachristou E, Verney A, Roig M, Hansen R, Nichols B, Papadopoulou R, Parrett A. 2020. The impact of food additives, artificial sweeteners and domestic hygiene products on the human gut microbiome and its fibre fermentation capacity. *European Journal of Nutrition*. **59**:3213-3230.
- Giraudeau P, Frydman L. 2014. Ultrafast 2D NMR: An Emerging Tool in Analytical Spectroscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry*. **7** (1):129-161.
- Gómez-Fernández AR, Santacruz A, Jacobo-Velázquez DA. 2021. The complex relationship between metabolic syndrome and sweeteners. *Journal of Food Science*. **86**:1511-1531.
- Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, Beaumont M, Van Treuren W, Knight R, Bell JT, Spector TD, Clark AG, Ley RE. 2014. Human Genetics Shape the Gut Microbiome. *Cell*. **159**:789-799.
- Hakimzadeh V, Sardarodiyani M. 2016. Artificial sweeteners. *International Journal of PharmTech Research*. 357-363.
- Hulka BS, Wilcosky T. 1988. Biological Markers in Epidemiologic Research. *Archives of Environmental Health: An International Journal*. **43**:83-89.
- Chappell GA, Wikoff DS, Doepker CL, Borghoff SJ. 2020. Lack of potential carcinogenicity for acesulfame potassium – Systematic evaluation and integration of mechanistic data into the totality of the evidence. *Food and Chemical Toxicology*. **141**:111375.
- Chattopadhyay S, Raychaudhuri U, Chakraborty R. 2014. Artificial sweeteners – a review. *Journal of Food Science and Technology*. **51**:611-621.
- Cheng S, Wang S, Zheng M, Jin Y, Li J, Zhang M, Li XL, Min JZ. 2024. Simultaneous analysis of natural and artificial sweeteners in sugar-free drinks and urine samples by column-switching UHPLC-charged aerosol detection method. *Journal of Chromatography A*. **1713**:464533.
- Cheng X, Guo X, Huang F, Lei H, Zhou Q, Song C. 2021. Effect of different sweeteners on the oral microbiota and immune system of Sprague Dawley rats. *AMB Express*. **11**:8.
- Iizuka K. 2022. Is the Use of Artificial Sweeteners Beneficial for Patients with Diabetes Mellitus? The Advantages and Disadvantages of Artificial Sweeteners. *Nutrients*. **14**:4446.
- Inglett GE. 1976. A history of sweeteners-natural and synthetic. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. **2**:207-214.

- Jain T, Grover K. 2015. Sweeteners in Human Nutrition. *International Journal of Health Sciences and Research*. 439-451.
- Jaki BU, Bzhelyansky A, Pauli GF. 2021. Quantitative NMR (qNMR) for pharmaceutical analysis: The pioneering work of George Hanna at the US FDA. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **59**:7-15.
- JECFA (FAO/WHO). 1990. Acesulfame potassium. Evaluation of certain food additives. Available from <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/Home/Chemical/926>.
- Just T, Pau HW, Engel U, Hummel T. 2008. Cephalic phase insulin release in healthy humans after taste stimulation? *Appetite*. **51**:622-627.
- Khalil A, Kashif M. 2023. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Quantitative Analysis: A Review for Its Application in the Chemical, Pharmaceutical and Medicinal Domains. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. **53**:997-1011.
- Kim Y, Keogh JB, Clifton PM. 2020. Consumption of a Beverage Containing Aspartame and Acesulfame K for Two Weeks Does Not Adversely Influence Glucose Metabolism in Adult Males and Females: A Randomized Crossover Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. **17**:9049.
- Klug C, von Rymon Lipinski G. 2012. Acesulfame K. In: *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*. s. 91-115. Wiley.
- Kruk J, Doskocz M, Jodłowska E, Zacharzewska A, Łakomiec J, Czaja K, Kujawski J. 2017. NMR Techniques in Metabolomic Studies: A Quick Overview on Examples of Utilization. *Applied Magnetic Resonance*. **48**:1-21.
- Kumar D. 2016. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy For Metabolic Profiling of Medicinal Plants and Their Products. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. **46**:400-412.
- Laffitte A, Neiers F, Briand L. 2014. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. **17**:379-385.
- Lambie M, Bonomini M, Davies SJ, Accili D, Arduini A, Zammit V. 2021. Insulin resistance in cardiovascular disease, uremia, and peritoneal dialysis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. **32**:721-730.
- Lauridsen M, Hansen SH, Jaroszewski JW, Cornett C. 2007. Human Urine as Test Material in ¹H NMR-Based Metabonomics: Recommendations for Sample Preparation and Storage. *Analytical Chemistry*. **79**:1181-1186.

- Lee AA, Owyang C. 2019. Sugars, sweet taste receptors, and brain responses. In: *Molecular Nutrition: Carbohydrates*. s. 265-283. Elsevier.
- Lin CH, Li HY, Wang SH, Chen YH, Chen YC, Wu HT. 2021. Consumption of Non-Nutritive Sweetener, Acesulfame Potassium Exacerbates Atherosclerosis through Dysregulation of Lipid Metabolism in ApoE^{-/-} Mice. *Nutrients*. **13**:3984.
- Logue C, Dowey LRC, Verhagen H, Strain J, O'Mahony M, Kapsokefalou M, Athanasatou A, Gallagher AM. 2020. A Novel Urinary Biomarker Approach Reveals Widespread Exposure to Multiple Low-Calorie Sweeteners in Adults. *The Journal of Nutrition*. **150**:2435-2441.
- Magnuson BA, Carakostas MC, Moore NH, Poulos SP, Renwick AG. 2016. Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutrition Reviews*. **74**:670-689.
- Malaisse WJ, Vanonderbergen A, Louchami K, Jijakli H, Malaisse-Lagae F. 1998. Effects of Artificial Sweeteners on Insulin Release and Cationic Fluxes in Rat Pancreatic Islets. *Cellular Signalling*. **10**:727-733.
- Martineau E, Giraudeau P. 2019. Fast Quantitative 2D NMR for Untargeted and Targeted Metabolomics. s. 365-383.
- Mathur K, Agrawal R, Nagpure S, Deshpande D. 2020. Effect of artificial sweeteners on insulin resistance among type-2 diabetes mellitus patients. *Journal of Family Medicine and Primary Care*. **9**:69.
- Mathur P, Bakshi A. 2023. Effect of non-nutritive sweeteners on insulin regulation, glycemic response, appetite and weight management: a systematic review. *Nutrition & Food Science*.
- MetaboAnalyst 6.0 2024. MetaboAnalyst 6.0 - from raw spectra to biomarkers, patterns, functions and systems biology. Jianguo Xia, *Nucleic Acids Research*. Available from <https://www.metaboanalyst.ca/>
- Miller PE, Perez V. 2014. Low-calorie sweeteners and body weight and composition: a meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **100**:765-777.
- Mora MR, Dando R. 2021. The sensory properties and metabolic impact of natural and synthetic sweeteners. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **20**:1554-1583.
- Mossavar-Rahmani Y, Kamensky V, Manson JE, Silver B, Rapp SR, Haring B, Beresford SAA, Snetselaar L, Wassertheil-Smoller S. 2019. Artificially Sweetened Beverages and Stroke,

- Coronary Heart Disease, and All-Cause Mortality in the Women's Health Initiative. *Stroke*. **50**:555-562.
- Nagana Gowda GA, Raftery D. 2022. Quantitative NMR Methods in Metabolomics. s. 143-164.
- Nakagawa Y, Nagasawa M, Mogami H, Lohse M, Ninomiya Y, Kojima I. 2013. Multimodal function of the sweet taste receptor expressed in pancreatic β -cells: generation of diverse patterns of intracellular signals by sweet agonists. *Endocrine Journal*. **60**:1191-1206.
- Nakagawa Y, Nagasawa M, Yamada S, Hara A, Mogami H, Nikolaev VO, Lohse MJ, Shigemura N, Ninomiya Y, Kojima I. 2009. Sweet Taste Receptor Expressed in Pancreatic β -Cells Activates the Calcium and Cyclic AMP Signaling Systems and Stimulates Insulin Secretion. *PLoS ONE*. **4**:e5106.
- Neiers F, Canivenc-Lavier MC, Briand L. 2016. What Does Diabetes "Taste" Like? *Current Diabetes Reports*. **16**:49.
- O'Brien-Nabors, L. 2016. *Alternative Sweeteners*. Taylor & Francis Group.
- Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao J, Abe F, Osawa R. 2016. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiology*. **16**:90.
- Oliveira D, Reis F, Deliza R, Rosenthal A, Giménez A, Ares G. 2016. Difference thresholds for added sugar in chocolate-flavoured milk: Recommendations for gradual sugar reduction. *Food Research International*. **89**:448-453.
- Orku SE, Suyen G, Bas M. 2023. The effect of regular consumption of four low- or no-calorie sweeteners on glycemic response in healthy women: A randomized controlled trial. *Nutrition*. **106**:111885.
- Pang MD, Goossens GH, Blaak EE. 2021. The Impact of Artificial Sweeteners on Body Weight Control and Glucose Homeostasis. *Frontiers in Nutrition*. **7**.
- Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A. 2017. Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers*. **3**:17030.
- Popkin BM, Hawkes C. 2016. Sweetening of the global diet, particularly beverages: patterns, trends, and policy responses. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. **4**:174-186.
- Righettoni M, Tricoli A, Gass S, Schmid A, Amann A, Pratsinis SE. 2012. Breath acetone monitoring by portable Si:WO₃ gas sensors. *Analytica Chimica Acta*. **738**:69-75.
- Rinschen MM, Ivanisevic J, Giera M, Siuzdak G. 2019. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **20**:353-367.

- Risdon S, Meyer G, Marziou A, Riva C, Roustit M, Walther G. 2020. Artificial sweeteners impair endothelial vascular reactivity: Preliminary results in rodents. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. **30**:843-846.
- Rist MJ, Roth A, Frommherz L, Weinert CH, Krüger R, Merz B, Bunzel D, Mack C, Egert B, Bub A, Görling B, Tzvetkova P, Luy B, Hoffmann I, Kulling SE, Watzl B. 2017. Metabolite patterns predicting sex and age in participants of the Karlsruhe Metabolomics and Nutrition (KarMeN) study. *PLOS ONE*. **12**:e0183228.
- Rogers PJ, Hogenkamp PS, de Graaf C, Higgs S, Lluch A, Ness AR, Penfold C, Perry R, Putz P, Yeomans MR, Mela DJ. 2016. Does low-energy sweetener consumption affect energy intake and body weight? A systematic review, including meta-analyses, of the evidence from human and animal studies. *International Journal of Obesity*. **40**:381-394.
- Rother KI, Sylvetsky AC, Walter PJ, Garraffo HM, Fields DA. 2018. Pharmacokinetics of Sucralose and Acesulfame-Potassium in Breast Milk Following Ingestion of Diet Soda. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. **66**:466-470.
- Russell C, Baker P, Grimes C, Lindberg R, Lawrence MA. 2023. Global trends in added sugars and non-nutritive sweetener use in the packaged food supply: drivers and implications for public health. *Public Health Nutrition*. **26**:952-964.
- Sakai H, Yamashita A, Tamura M, Uyama A, Mochizuki N. 2015. Simultaneous determination of sweeteners in beverages by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **32**:808-816.
- Saude EJ, Sykes BD. 2007. Urine stability for metabolomic studies: effects of preparation and storage. *Metabolomics*. **3**:19-27.
- Shi Y, Zhu H, Wang F, Chen S, Xu K, Wang L, Sun H. 2022. Daily Variability in Urinary Artificial Sweeteners and Its Association with Oxidative Stress Biomarkers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **70**:14264-14271.
- Shoeb M, Islam Md M, Reza Md S, Nahar N, Islam Md M. 2022. HPLC analysis of artificial preservatives, stimulants and sweeteners in carbonated beverages in Bangladesh. *Current Research on Biosciences and Biotechnology*. **3**:215-221.
- Silva RA, Pereira TCS, Souza AR, Ribeiro PR. 2020. 1H NMR-based metabolite profiling for biomarker identification. *Clinica Chimica Acta*. **502**:269-279.
- Sollid K. 2022. What is Acesulfame Potassium (Ace-K)?. Available from <https://foodinsight.org/what-is-acesulfame-potassium-ace-k/> (accessed march 2022)

- Solomi L, Rees GA, Redfern KM. 2019. The acute effects of the non-nutritive sweeteners aspartame and acesulfame-K in UK diet cola on glycaemic response. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **70**:894-900.
- Stegink LD, Brummel MC, McMartin K, Martin-Amat G, Filer LJ, Baker GL, Tephly TR. 1981. Blood methanol concentrations in normal adult subjects administered abuse doses of aspartame. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. **7**:281-290.
- Stevens J, Truesdale KP, McClain JE, Cai J. 2006. The definition of weight maintenance. *International Journal of Obesity*. **30**:391-399.
- Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, Israeli D, Zmora N, Gilad S, Weinberger A, Kuperman Y, Harmelin A, Kolodkin-Gal I, Shapiro H, Halpern Z, Segal E, Elinav E. 2014. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. **514**:181-186.
- Sylvetsky AC, Brown RJ, Blau JE, Walter M, Rother KI. 2016. Hormonal responses to non-nutritive sweeteners in water and diet soda. *Nutrition & Metabolism*. **13**:71.
- Takeda I, Stretch C, Barnaby P, Bhatnager K, Rankin K, Fu H, Weljie A, Jha N, Slupsky C. 2009. Understanding the human salivary metabolome. *NMR in Biomedicine*. **22**:577-584.
- Tan VWK, Wee MSM, Tomic O, Forde CG. 2019. Temporal sweetness and side tastes profiles of 16 sweeteners using temporal check-all-that-apply (TCATA). *Food Research International*. **121**:39-47.
- Tan VWK, Wee MSM, Tomic O, Forde CG. 2020. Rate-All-That-Apply (RATA) comparison of taste profiles for different sweeteners in black tea, chocolate milk, and natural yogurt. *Journal of Food Science*. **85**:486-492.
- Toews I, Lohner S, Küllenberg de Gaudry D, Sommer H, Meerpohl JJ. 2019. Association between intake of non-sugar sweeteners and health outcomes: systematic review and meta-analyses of randomised and non-randomised controlled trials and observational studies. *BMJ*. k4718.
- Toyono T, Seta Y, Kataoka S, Toyoshima K. 2007. CCAAT/Enhancer-binding protein β regulates expression of human T1R3 taste receptor gene in the bile duct carcinoma cell line, HuCCT1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. **1769**:641-648.
- Trandafir I, Nour V, Ionică ME. 2009. Development and validation of an HPLC method for simultaneous quantification of acesulfame-k, saccharin, aspartame, caffeine and benzoic acid in cola soft drinks. *Scientific Study & Research*. **2**:185-194.

- Uebanso T, Ohnishi A, Kitayama R, Yoshimoto A, Nakahashi M, Shimohata T, Mawatari K, Takahashi A. 2017. Effects of Low-Dose Non-Caloric Sweetener Consumption on Gut Microbiota in Mice. *Nutrients*. **9**:560.
- Voigt RM, Forsyth CB, Green SJ, Mutlu E, Engen P, Vitaterna MH, Turek FW, Keshavarzian A. 2014. Circadian Disorganization Alters Intestinal Microbiota. *PLoS ONE*. **9**:e97500.
- von Rymon Lipinski GW. 1985. The new intense sweetener Acesulfame K. *Food Chemistry*. **16**:259-269.
- Wang QP, Browman D, Herzog H, Neely GG. 2018. Non-nutritive sweeteners possess a bacteriostatic effect and alter gut microbiota in mice. *PLOS ONE*. **13**:e0199080.
- Wee M, Tan V, Forde C. 2018. A Comparison of Psychophysical Dose-Response Behaviour across 16 Sweeteners. *Nutrients*. **10**:1632.
- WHO 2023a. Use of non-sugar sweeteners: WHO guideline. Available from Use of non-sugar sweeteners: WHO guideline (accessed may 2023).
- WHO 2023b. WHO advises not to use non-sugar sweeteners for weight control in newly released guideline. Available from <https://www.who.int/news/item/15-05-2023-who-advises-not-to-use-non-sugar-sweeteners-for-weight-control-in-newly-released-guideline> (accessed november 2023).
- Wishart DS, Cheng LL, Copié V, Edison AS, Eghbalnia HR, Hoch JC, Gouveia GJ, Pathmasiri W, Powers R, Schock TB, Sumner LW, Uchimiya M. 2022. NMR and Metabolomics - A Roadmap for the Future. *Metabolites*. **12**:678.
- Withers C, Barnagaud C, Mehring P, Ferris S, Thomson DMH. 2016. Adapting and enhancing sequential profiling to understand the effects of successive ingestion, using the sensory characteristics of high intensity sweeteners as a case study. *Food Quality and Preference*. **47**:139-147.
- Xu Jingjing Yang S, Cai S, Dong J, Li X, Chen Z. 2010. Identification of biochemical changes in lactovegetarian urine using 1H NMR spectroscopy and pattern recognition. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **396**:1451-1463.
- Xu Jiyu Zheng S, Li M, Liu X, Sun H, Guo Z, Wei J, Jia L, Sun W. 2022. A Comprehensive 2D-LC/MS/MS Profile of the Normal Human Urinary Metabolome. *Diagnostics*. **12**:2184.
- Yan S, Yan F, Liu L, Li B, Liu S, Cui W. 2022. Can Artificial Sweeteners Increase the Risk of Cancer Incidence and Mortality: Evidence from Prospective Studies. *Nutrients*. **14**:3742.

- Young RL, Isaacs NJ, Schober G, Cvijanovic N, Wu T, Pezos N, Bound M, Keating DJ, Rayner CK, Horowitz M. 2017. Impact of artificial sweeteners on glycaemic control in healthy humans. Flinders University.
- Zhang GH, Chen ML, Liu SS, Zhan YH, Quan Y, Qin YM, Deng SP. 2011. Effects of Mother's Dietary Exposure to Acesulfame-K in Pregnancy or Lactation on the Adult Offspring's Sweet Preference. *Chemical Senses*. **36**:763-770.
- Zhang Y, Limaye PB, Renaud HJ, Klaassen CD. 2014. Effect of various antibiotics on modulation of intestinal microbiota and bile acid profile in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **277**:138-145.
- Zhao H, Chu M, Huang Z, Yang X, Ran S, Hu B, Zhang C, Liang J. 2017. Variations in oral microbiota associated with oral cancer. *Scientific Reports*. **7**:11773.

Literatura byla generována pomocí volně dostupného citačního manažeru Mendeley - <https://www.mendeley.com/download-desktop/>

8 Seznam použitých zkratk a symbolů

ACK	acesulfam K
ADI	přijatelný denní příjem
BMI	index tělesné hmotnosti
CFU	kolonie tvořící jednotky
CI	interval spolehlivosti
FAO	organizace pro výživu a zemědělství
FC	násobný rozdíl
FD	fluorescenční detekce
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FDR	míra falešně pozitivních výsledků
GC	plynová chromatografie
GC-MS	hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií
GDPR	obecné nařízení o ochraně osobních údajů
¹ H NMR	protonová nukleární magnetická rezonance
HPLC	kapalinová chromatografie
HR	poměr rizik
LC-MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IR	infračervená spektrometrie
JECFA	Společný výbor odborníků FAO/WHO pro potravinová aditiva
KVO	kardiovaskulární onemocnění
TCATA	časově omezený výběr všech odpovídajících možností
UHPLC-CAD	ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie s detekcí nabitého aerosolu
UPLC-MS/MS	ultratlaková kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
UV	ultrafialová detence (ultrafialové zářené)
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná spektrometrie
WHO	Světová zdravotnická organizace

9 Seznam obrázků

Obrázek č. 1 Rozdělení náhradních sladidel

Obrázek č. 2 Acesulfam K

Obrázek č. 3 Porovnání jednotlivých chutí ACK se sacharosou

Obrázek č. 4 Reprezentativní 500 MHz¹H – NMR spektrum lidské moči

Obrázek č. 5 Reprezentativní 600 MHz ¹H NMR spektrum lidských slin

Obrázek č. 6 Schéma NMR magnetu

Obrázek č. 7 Koláčový graf průměrných koncentrací všech kvantifikovaných metabolitů v mg

Obrázek č. 8 Náhodně vybrané vzorové spektrum moči

Obrázek č. 9 Porovnání koncentrací vybraných metabolitů u mužů a žen

Obrázek č. 10 Korelace mezi tělesnou hmotností a výškou a jednotlivými metabolity

Obrázek č. 11 Porovnání koncentrací vybraných metabolitů před a po intervenci

Obrázek č. 12 Koncentrace metabolitů (% kreatininu) v moči dobrovolníků po intervenci

10 Seznam tabulek

Tabulka č. 1 Hodnoty u vybraných náhradních sladidel schválených Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA)

Tabulka č. 2 Značky vybraných náhradních sladidel schválených FDA

Tabulka č. 3 Obecné charakteristiky dobrovolníků

Tabulka č. 4 Kvantifikované metabolity a ACK v programu Chenomx a jejich hodnota chemického posunu

11 Seznam příloh

Příloha č. I Informace pro dobrovolníky

Příloha č. II Informace o zpracování osobních údajů

Příloha č. III Informovaný souhlas

Příloha č. IV Souhlasné stanovisko

12 Samostatné přílohy

Příloha č. I Informace pro dobrovolníky

Informace pro dobrovolníky

Diplomová práce: Stanovení metabolitů nekalorických sladidel v biologických tekutinách s pomocí ^1H NMR

Vážení dobrovolníci,

obracím se na vás jako diplomantka řešící pilotní studii pro svou diplomovou práci s názvem „Stanovení metabolitů nekalorických sladidel v biologických tekutinách s pomocí ^1H NMR“. Předmětem práce je zjistit v jaké koncentraci se vylučují náhradní sladidla z těla člověka a jaká je variabilita mezi jedinci. Bude zjišťováno, jestli má na variabilitu v koncentraci vylučovaných syntetických sladidel vliv rozdílné BMI jedinců. Tato pilotní studie bude řešena na České zemědělské univerzitě v Praze, Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Prosím, před provedením odběrů čtěte tento dokument pozorně až do konce.

Cíl studie

Nízkokalorická sladidla jsou látky, které poskytují sladkou chuť potravinám a nápojům, aniž by přispívaly významným množstvím kalorií. Tato sladidla se často používají jako alternativa ke klasickému cukru, protože mohou pomoci snížit příjem kalorií a přispět k udržování zdravého tělesného hmotnosti.

Existuje několik typů nízkokalorických sladidel, z nichž některá jsou umělá a jiná jsou přírodního původu. Mezi nejznámější nízkokalorická sladidla patří sacharin, acesulfam K, aspartam, sukralóza, stevie a erythritol.

Metabolismus nízkokalorických sladidel je obecně minimální, přičemž mnoho z nich projde tělem bez rozkladu nebo významného energetického příjmu. Individuální reakce na tato sladidla se mohou lišit, málo prozkoumaná je degradace mikroorganismy dutiny ústní a vylučování do slin. Ve stolici nebo moči mohou sloužit jako významné biomarkery životního stylu a stravy. Roli v kinetice mohou hrát antropometrické parametry ¹a životní styl.

Pro tyto studie by bylo vhodné vyvinout robustní metodu založenou na spektroskopii nukleární magnetické rezonance, využitelnou pro monitoring příjmu nebo pochopení rozdílů v jejich metabolismu.

Metody odběru vzorků

Pro realizaci cíle je potřeba získat malé vzorky moči a slin od každého dobrovolníka.

Odběr vzorku moči provede dobrovolník pomocí jednorázové zkumavky s víčkem, ze které následně část vzorku přelije do jednorázové malé 1,5 ml zkumavky. Odběr by měl být proveden ze středního proudu moči. Bude potřeba odebrat 2 vzorky moči ještě před vypitím Coca Coly Zero, které budou odebrány při dvou po sobě jdoucích návštěvách toalety. Po odebrání se vzorky v malých 1,5 ml zkumavkách okamžitě zmrazí. Dále dobrovolník vypije během 1 h 0,5 l předložené Coca Coly Zero. To by měl provést do 12:00 hodin. Jakmile

¹ Antropometrická měření dávají přesné informace o tělesných rozměrech a tělesném složení. Mezi nejzákladnější antropometrické parametry patří tělesná hmotnost, výška, množství svalové hmoty a procenta podkožního tuku.

dobrovolník tento úkol splní bude dále odebírat výše uvedeným způsobem vzorky moči při každé návštěvě toalety až do konce dne. Pokaždé bude zapisovat čas odběru vzorku do předloženého formuláře.

Odběr vzorku slin provede dobrovolník pomocí jednorázového odběrového setu. Ze setu vyjme tampón, který vloží do úst (např. na vnitřní stěnu tváře). V tomto místě ho ponechá 4 minuty bez žvýkání. Po uplynutí času tampón vyjme z úst a vloží zpět do odběrového setu. Set pevně uzavře. Ihned po odebrání vzorek uloží do mrazáku a zapíše čas odběru do předloženého formuláře. Odběry slin jsou prováděny současně s odběry moči!

Přidělené zkumavky budou označeny kódem, který obsahuje číslo dobrovolníka, číslo pořadí vzorku a zda-li se jedná o vzorek moči nebo slin. Musí být využívány v přesném pořadí dle označení od nejnižšího čísla k nejvyššímu. Své zmražené vzorky následně dobrovolník odevzdá odpovědné osobě do 7 dnů. Ty budou převezeny v chladícím boxu na FAPPZ, kde budou dále zpracovány.

Dále bude dobrovolník v den odběrů zapisovat svůj 24hodinový jídelníček (potraviny i nápoje). V den odběru vzorků je nutné dodržovat nekonsumování jiných potravin či nápojů s obsahem acesulfamu K nebo aspartamu. Výsledky by byly zkráceny.

Nakládání s osobními daty a biologickým materiálem

Od dobrovolníků budou sbírány údaje o pohlaví, věku, výšce, váze a Body Mass Index (BMI). Dále bude zaznamenán jídelníček v období 1 dne a to právě při provádění odběrů. Osobní data nebudou ve studii zveřejněna, data budou uchovávána v anonymizované podobě. Kromě osoby odpovědné (diplomantka, příp. školitel diplomové práce) nebude nikdo moci anonymizované údaje zpětně rozklíčovat. Biologický materiál bude po ukončení laboratorních testů zlikvidován.

V Praze dne 1.11.2023

Příloha č. II Informace o zpracování osobních údajů

Informace o zpracování osobních údajů

Vážení dobrovolníci,

byla Vám nabídnuta účast ve studii k diplomové práci s názvem „*Stanovení metabolitů nekalorických sladidel v biologických tekutinách s pomocí ¹H NMR*“, která bude zpracována na České zemědělské univerzitě v Praze (Kamýcká 129, Praha 6 - Suchbátka, 16500, IČO: 60460709, DIČ: CZ60460709, ID schránky: 3hdj9cb (dále jen ČZU)), Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. V tomto dokumentu jsou uvedeny základní informace o ochraně osobních údajů, o kterých je třeba Vás informovat a které jsou nezbytné k provedení studie. Studie se můžete účastnit pouze tehdy, pokud budete souhlasit se shromažďováním a zpracováním osobních údajů tak, jak je popsáno v tomto formuláři.

Váš výslovný souhlas se zpracováním těchto údajů by měl být udělen po sdělení, pro jaký účel zpracování a k jakým osobním údajům je souhlas dáván, jakému správci a na jaké období. Vaše osobní údaje budou zpracovávány ČZU v Praze, která je správcem osobních údajů ve smyslu GDPR, zastupovanou diplomantkou.

Tyto informace jsou sepsány v souladu s Všeobecnou deklarací lidských práv, Helsinskou deklarací, Zákonem o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování (zejména ustanovení § 28 odst. 1 zákona č. 372/2011 Sb.), Úmluvou o lidských právech a biomedicíně č. 96/2001, jsou-li aplikovatelné, Nařízením EU č. 2016/679 o ochraně fyzických osob v souvislosti se zpracováním osobních údajů a o volném pohybu těchto údajů (GDPR) a Zákonem č. 110/2019 Sb., o zpracování osobních údajů.

Diplomantka bude zaznamenávat Vaše osobní údaje v rozsahu: jméno a příjmení, pohlaví, věk, výška, váha a BMI. Veškeré údaje budou uchovávány pouze pro účely studie a v souladu s platnou právní úpravou. Bez zpracování osobních údajů by nebylo možné provést a ani vyhodnotit prováděnou studii.

Osobní údaje nebudou ve studii zveřejněny. Všechny údaje a odebrané vzorky získané ve studii budou uchovávány v pseudonymizované podobě. Údaje umožňující zjistit Vaši totožnost neopustí pracoviště ČZU. Kromě osoby odpovědné (diplomantka, příp. školitel diplomové práce) nebude mít nikdo možnost spojit kód s Vaším jménem, a tak Vás zpětně identifikovat.

Prostřednictvím diplomantky máte právo na přístup k informacím, které byly o Vás shromážděny a případně požádat i o jejich opravu. Další obecné informace o zpracování OÚ na ČZU naleznete na webu: gdpr.czu.cz. Máte navíc nárok stěžovat si na to, jakým způsobem bylo s Vašimi osobními údaji zacházeno. Stížnost můžete vznést k Úřadu na ochranu osobních údajů, se sídlem Pplk. Sochora 27, 170 00 Praha 7. Tento Úřad je odpovědný za prosazování práva na ochranu osobních údajů.

Po ukončení studie nebo po ukončení Vaší účasti ve studii zůstávají údaje správci, aby nebyla narušena validita dat získaných ve studii, a to po dobu nezbytnou k dosažení účelu prováděné studie. Pokud byste odstoupili ze studie předčasně, údaje shromážděné před odstoupením mohou být zpracovány společně s dalšími údaji shromážděnými v rámci této studie, ve studijní databázi se však již nebudou shromažďovat žádné další informace.

Tento souhlas se zpracováním osobních údajů vyjadřujete na dobu nezbytně nutnou pro řádné vyhodnocení této studie.

Výsledky této studie mohou být publikovány v odborném tisku, mohou sloužit k výukovým a vědeckým účelům. Chtěli bychom zdůraznit, že se vždy bude jednat o souhrnné výsledky studie, ze kterých nebude možné Vás identifikovat. A také se nikde ve vyhodnocení studie neobjeví Vaše jméno či jiná informace, která by mohla vést k odhalení Vaší totožnosti.

VDne:

Jméno a příjmení účastníka studie:

Podpis účastníka studie:

Příloha č. III Informovaný souhlas

Informovaný souhlas subjektu hodnocení u klinického hodnocení studie

Diplomová práce: Stanovení metabolitů nekalorických sladidel v biologických tekutinách s pomocí ^1H NMR

Vážení dobrovolníci,

žádám Vás o účast ve studii k diplomové práci s názvem „*Stanovení metabolitů nekalorických sladidel v biologických tekutinách s pomocí ^1H NMR*“ řešené na České zemědělské univerzitě v Praze, Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, příp. ve vědeckém časopisu.

Já, níže podepsaný(á) souhlasím s účastí ve studii. Je mi více než 18 let.

Byl(a) jsem podrobně informován(a) o cíli studie, o jejích postupech, a o tom, co se ode mě očekává. Zkoušející mi vysvětlila očekávané přínosy a případná zdravotní rizika, která by se mohla vyskytnout během mé účasti ve studii. Beru na vědomí, že prováděná studie je výzkumnou činností.

Informoval(a) jsem zkoušejícího o všech lécích, které jsem užíval(a) v posledních 28 dnech, i o těch, které v současnosti užívám. V průběhu studie budu se zkoušejícím spolupracovat a v případě výskytu jakéhokoliv neobvyklého nebo nečekaného účinku či změně zdravotního stavu ho budu neprodleně informovat.

Po celou dobu studie a další 4 týdny po jejím ukončení nebudu dárce krve a jejích složek (plazma, krevní destičky).

Moje účast ve studii je dobrovolná. Porozuměl(a) jsem tomu, že svou účast ve studii mohu kdykoliv přerušit či odstoupit.

Souhlasím s tím, že budu včas informován, pokud by se vyskytla informace, která by mohla mít význam pro mé rozhodnutí pokračovat v účasti ve studii.

Při zařazení do studie budou osobní údaje zpracovávány dle platné právní úpravy. Osobní údaje jsou tzv. pseudonymizovány. Tímto postupem dochází ke skrytí identity subjektu hodnocení. Díky tomu je možné získávat a dále zpracovávat další údaje týkající se stejné osoby, aniž by bylo nutné znát její totožnost. Příkladem pseudonymizace je kódování údajů pomocí určitého klíče.

S mojí účastí ve studii není spojeno poskytnutí žádné kompenzace.

Souhlasím s tím, že záznamy, podle nichž lze mě identifikovat jako subjekt hodnocení, budou uchovávány jako důvěrné a nebudou, v míře zaručené právními předpisy, veřejně zpřístupněny; budou-li výsledky studie publikovány, moje totožnost nebude zveřejněna.

Od zkoušejícího obdržím stejnopis tohoto podepsaného informovaného souhlasu s účastí ve studii.

VDne:

Jméno, příjmení a podpis dobrovolníka:

Podpis zkoušejícího: *Naomelova*

Příloha č. IV Souhlasné stanovisko



ETICKÁ KOMISE VŠEOBECNÉ FAKULTNÍ NEMOCNICE V PRAZE

Na Bojišti 1, 128 08 Praha 2 | eticka.komise@vfn.cz | tel. 224964131

Vážená paní
Bc. Veronika Karnetová
Česká zemědělská univerzita v Praze
Kamýčká 129, 165 00 Praha 6 - Suchdol

23.11.2023
č.j.: 155/23 S-IV

Vážená paní bakalářko,
Etická komise VFN projednávala na svých zasedáních dne 19.10.2023 a 16.11.2023 Vámi předložený individuální výzkumný projekt **č.j. 155/23 S-IV - diplomová práce**.

Název studie/Title of CT: Stanovení metabolitů nekalorických sladidel v biologických tekutinách s pomocí 1H NMR

Žadatel/Applicant: Bc. Veronika Karnetová, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýčká 129, 165 00 Praha 6 - Suchdol, e-mail: xkarv024@studenti.czu.cz

Úhrada nákladů spojených s posouzením žádosti a vydáním stanoviska /Reimbursement of costs related to assessment of the EC:
 Ano/Yes Ne, důvod/No, reasons: nesponzorovaný projekt

Datum doručení žádosti / Date of submission of the Application Form: 6.10.2023

Datum jednání EK+čas/Date and time of Ethics Committee's session:

1) **19.10.2023** (15:30 –17:20 hod.) - pozastaveno, připomínky odeslány emailem. Opravené dokumenty přijaty dne 1.11.2023 pod čj. 1524/23 IS (IS GDPR)

2) **16.11.2023** (15:30 –17:20 hod.)- opět pozastaveno, připomínky odeslány emailem. Opravené dokumenty přijaty dne 22.11.2023 pod čj 1598/23 IS. Po kontrole vydáno 23.11.2023 **souhlasné stanovisko**.

Seznam míst hodnocení s označením míst, ke kterým se EK vyjádřila jako místní EK a kde vykonává dohled

Místo hodnocení / Jméno zkoušejícího Trial Site / Name of Investigator	Místní EK Local EC	Adresa místní EK Address
Bc. Veronika Karnetová, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýčká 129, 165 00 Praha 6 - Suchdol	<input checked="" type="checkbox"/>	EK při VFN, Na Bojišti 1, 128 08 Praha 2

Seznam hodnocených dokumentů / List of all submitted documents:

Název dokumentu, verze, datum Document title, version, date	Schváleno/ Approved		Na vědomí / Taken into account	
	ANO Yes	NE No	ANO Yes	NE No
Průvodní dopis ze 14.9.2023	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dotazník – Víceúčelový formulář EK VFN, 6.10.2023	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Protokol studie	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Informace pro dobrovolníky, bez data	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Informovaný souhlas, bez data	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Žádost o prominutí poplatku za projednání studie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Životopis hlavní zkoušející: Bc. Veronika Karnetová 1524/23 IS (IS GDPR)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Průvodní dopis ze dne 1.11.2023	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Informace pro dobrovolníky, 1.11.2023	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Informovaný souhlas, bez data	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Informace o zpracování osobních údajů 1598/23 IS	doručeno			
Informovaný souhlas, bez data	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Stanovisko etické komise:

EK vydává / EC issues

- Souhlasné stanovisko/Favourable opinion**
 Nesouhlasné stanovisko/Unfavourable opinion

EK VFN vydává **souhlasné stanovisko** k provedení individuálního výzkumu na České zemědělské univerzitě v Praze.

Podpis předsedy / zástupce EK VFN
Signature of Chairperson / Vice-Chairperson
PharmDr. Zbyněk Sklenář, Ph.D.

PharmDr.
Zbyněk
Sklenář, Ph.D.

Digitálně podepsal
PharmDr. Zbyněk
Sklenář, Ph.D.
Datum: 2023.11.24
13:24:14 +01'00'

1/2



VFN PRAHA

ETICKÁ KOMISE VŠEOBECNÉ FAKULTNÍ NEMOCNICE V PRAZE

Na Bojišti 1, 128 08 Praha 2 | eticka.komise@vfn.cz | tel. 224964131

Seznam členů etické komise/ List of the Ethics Committee Members:

	Muž/ Žena Male/ Female	Odbornost Specialist	Zaměstnanec zřizovatele EK*		Funkce v EK Role in EC	Přítomen Attendance		Hlasoval Voted	
			Ano Yes	Ne No		Ano Yes	Ne No	Ano Yes	Ne No
PharmDr. Zbyněk Sklenář, Ph.D., MBA	M/M	Pharmacist Pharmacologist	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Předseda/ Chairperson	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MUDr. Magda Šišková, CSc.	Ž/F	Haematologist	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Mistopřed- seda/Vice- chairperson	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jana Farkačová	Ž/F	Lab. Technician	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Doc. MUDr. Pavel Freitag, CSc.	M/M	Gynaecologist	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ing. Antonín Grošpic, CSc.	M/M	Engineer	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Člen/Member	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Prof. MUDr. Eva Kubala Havrdová, CSc.	Ž/F	Neurologist	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MUDr. Hana Honová	Ž/F	Oncologist	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
MUDr. Jiří Humhal	M/M	Cardiologist	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MUDr. Anna Jedličková	Ž/F	Microbiologist	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Člen/Member	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
MUDr. Ladislav Korábek, CSc., MBA	M/M	Dental surgeon	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mgr. Bc. Inka Dvořáková, MBA	Ž/F	Lawyer	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. MUDr. Jan Roth, CSc.	M/M	Neurologist	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mgr. Libuše Roytová Mgr. ThLic. of Theologie	Ž/F	Member of clergy	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doc. PharmDr. Martin Šíma, Ph.D.	M/M	Clinical Pharmacist	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
JUDr. Šárka Špeciánová	Ž/F	Lawyer	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Člen/Member	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
MUDr. Marcela Trojánková	Ž/F	Privat Nefrologist	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Člen/Member	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
MUDr. Jiří Valenta	M/M	Anesthesiologist -Intensive Med.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc.	M/M	Paediatrist – AdolescentMed	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

pozn: *Zaměstnanec zřizovatele EK/ Employee of EC appointing authority)

Etická komise prohlašuje, že byla ustavena a pracuje v souladu se správnou klinickou praxí (GCP) a platnými právními předpisy. Poslední sloupec udává, zda členové EK byli přítomni hlasování, ale nikoli jak hlasovali ve věci. /The Ethics Committee hereby declares that it was established and operates in accordance with its Rules of Procedure in compliance with GCP and valid legal regulations. EC members personally presented the voting procedure (and NOT their individual voting result to or against the cause) are indicated in the last column:

Ano/Yes Ne/No Komentář/Comments:

Datum/Date: 16.11.2023

Etická komise
Všeobecné fakultní nemocnice
v Praze
Na Bojišti 1, 128 08 Praha 2

Podpis předsedy EK nebo zástupce
Signature of Chairperson or Vice-Chairperson
PharmDr. Zbyněk Sklenář, Ph.D., v.r.