



**Vpliv umetnih sladil na jetrne celice sferoidov in oksidativen stres ter  
ozaveščenost mladih**

PODROČJE MEDICINA  
RAZISKOVALNA NALOGA

**Teja KLJUN**  
**3. letnik**

Mentor: Špela Tršek, prof. kemije

Somentor: dr. Martina Štampar

Somentor: dr. Katja Kološa

Ljubljana, 2025  
Gimnazija Bežigrad

## KAZALO

KAZALO .....	i
SEZNAM SLIK.....	iii
SEZNAM PREGLEDNIC.....	iii
SEZNAM PRILOG .....	iii
ZAHVALA .....	iv
POVZETEK .....	v
1 UVOD .....	1
2 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE.....	2
3 TEORETIČNI DEL NALOGE - PREGLED OBJAV.....	3
3.1 Sladila .....	3
3.1.1 Naravna sladila.....	3
3.1.2 Umetna sladila .....	4
3.2 Odobritev umetnih sladil za uporabo v živilih in njihovo označevanje .....	4
3.3 Najpogosteje uporabljena umetna sladila .....	4
3.3.1 Acesulfam K (E950) .....	5
3.3.2 Advantam (E969) .....	5
3.3.3 Aspartam (E951) .....	6
3.3.4 Ciklamat (E952).....	6
3.3.5 Neotam (E961).....	7
3.3.6 Saharin (E954) .....	8
3.3.7 Sukraloza (E955) .....	9
3.4 Varnost umetnih sladil: Koristni in škodljivi učinki umetnih sladil na zdravje.....	10
3.5 In vitro dvodimenzionalni (2D) in tridimenzionalni (3D) celični modeli .....	13
4. EKSPERIMENTALNI DEL - MATERIALI IN METODE .....	13
4.1 ANKETA - UMETNA SLADILA .....	13
4.2 EKSPERIMENTALNI DEL NALOGE - VPLIV IZBRANIH UMETNIH SLADIL NA ŽIVOST CELIC HepG2 IN NASTANEK OKSIDATIVNEGA STRESA .....	14
4.2.1 Material in pomembnejša oprema, potrebna za izvedbo poskusov .....	14
4.2.2 Eksperimentalen pristop.....	15
4.2.3 Gojenje celic HepG2 in priprava sferoidov .....	15
4.2.4 Priprava raztopin umetnih sladil, acesulfama-K in aspartama.....	16
4.2.5 Obdelava podatkov .....	16
4.2.6 Določanje vpliva acesulfama-K in aspartama na velikost površine sferoidov .....	16
4.2.7 Določanje vpliva acesulfama-K in aspartama na živost celic HepG2 sferoidov .....	17

---

4.2.8 Določanje vpliva acesulfama-K in aspartama na nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti .....	17
5. REZULTATI .....	18
5.1 ANKETA - UMETNA SLADILA .....	18
5.2 EKSPERIMENTALNI DEL NALOGE - VPLIV IZBRANIH UMETNIH SLADIL NA ŽIVOST CELIC HEPG2 IN NASTANEK OKSIDATIVNEGA STRESA .....	24
5.2.1 Vpliv umetnih sladil acesulfama-K in aspartama na velikost tlorisne površine sferoidov .....	24
5.2.2 Vpliv umetnih sladil acesulfam-K in aspartam na živost celic HepG2 sferoidov ...	25
5.2.3 Vpliv umetnih sladil acesulfama-K in aspartama na nastanek oksidativnega stresa	25
6. RAZPRAVA IN ZAKLJUČEK .....	26
7. SKLEPI IN HIPOTEZE .....	29
8. LITERATURA .....	31

## SEZNAM SLIK

<i>Slika 1: Delitev sladil in prednosti ter slabosti posamezne skupine sladil.</i>	3
<i>Slika 2: Strukturna formula acesulfam-K.</i>	5
<i>Slika 3: Strukturna formula advantama.</i>	5
<i>Slika 4: Strukturna formula aspartama.</i>	6
<i>Slika 5: Strukturna formula A) ciklamat, B) natrijev ciklamat, C) kalcijev ciklamat.</i>	7
<i>Slika 6: Strukturna formula neotama.</i>	7
<i>Slika 7: Strukturna formula saharina.</i>	8
<i>Slika 8: Strukturna formula sukraloze.</i>	9
<i>Slika 9: Grafična predstavitev dolgodobnih učinkov umetnih sladil.</i>	12
<i>Slika 10: Razlike med in vitro 2D in 3D celičnimi modeli.</i>	13
<i>Slika 11: Celice HepG2.</i>	15
<i>Slika 12: Sferoid pri starosti 96 ur.</i>	15
<i>Slika 13: Mikroskopiranje.</i>	16
<i>Slika 14: Meritve z napravo Cytation 5 (BioTek, ZDA).</i>	16
<i>Slika 15: Delo s celičnimi kulturami pri sterilnih pogojih v laminariju.</i>	17
<i>Slika 16: Eksperimentalni pristop uporabljen v raziskovalni nalogi.</i>	18
<i>Slika 17: Spolna (A) in starostna (B) sestava anketirancev.</i>	19
<i>Slika 18: Vprašanje 3: Kolikokrat na teden zaužiješ hrano in pijačo, ki vsebuje umetna sladila?</i>	19
<i>Slika 19: Vprašanje 4: Na embalaži hrane in pijače vedno preverim vsebnost umetnih sladil.</i>	19
<i>Slika 20: Vprašanje 5: Katere vrste hrane ali pijače z umetnimi sladili najpogosteje uživaš?</i>	20
<i>Slika 21: Vprašanje 6: Kako misliš, da umetna sladila vplivajo na tvoje zdravje?</i>	20
<i>Slika 22: Vprašanje 7: Kateri vir najpogosteje uporabljaš za informacije o vplivu umetnih sladil na zdravje?</i>	21
<i>Slika 23: Vprašanje 8: Katera izmed spodaj naštetih snovi je umetno sladilo?</i>	21
<i>Slika 24: Vprašanje 9: Katera izmed spodnjih izjav najbolje opiše tvoje razmišljanje o umetnih sladilih?</i>	22
<i>Slika 25: Vprašanje 10: Kaj meniš, da je bolj škodljivo za zdravje?</i>	22
<i>Slika 26: Vprašanje 11: Ali bi se izogibal/-a umetnim sladilom, če bi vedel/-a, da so škodljiva?</i>	22
<i>Slika 27: Vprašanje 12: Zakaj po tvojem mnenju ljudje izberejo živila z umetnimi sladili?</i>	23
<i>Slika 28: Vprašanje 13: Ali si že slišal/-a, da bi umetna sladila lahko povzročala bolezni (npr. rak, presnovne motnje, sladkorno bolezen)?</i>	23
<i>Slika 29: Vpliv acesulfama-K in aspartama na tlorisno površino HepG2 sferoidov.</i>	24
<i>Slika 30: Vpliv acesulfama-K in aspartama na živost celic HepG2 v sferoidu.</i>	25
<i>Slika 31: Vpliv acesulfama-K (A) in aspartama (C) na nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti v HepG2 sferoidih po 180 minutah izpostavitve.</i>	26

## SEZNAM PREGLEDNIC

<i>Preglednica 1: Kemikalije in oprema uporabljena v eksperimentalnem delu raziskovane naloge.</i>	14
<i>Preglednica 2: Število dijakinj, dijakov in število neopredeljenih (ostalo), ki so izpolnili spletno Anketo »Umetna sladila« iz sedmih slovenskih gimnazij.</i>	18

## SEZNAM PRILOG

<i>Priloga 1: A</i>	34
---------------------	----

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem vsem dijakinjam in dijakom, ki so si vzeli čas za reševanje spletne ankete in s tem prispevali k moji raziskavi. Brez vaše pomoči ta naloga ne bi bila mogoča.

Posebna zahvala gre profesorjem, ki so mi pomagali pri razširjanju ankete med gimnazijskimi dijaki: dr. Samu Repolusku, ravnatelju Škofijske gimnazije Maribor, Ireni Smole, profesorici na I. gimnaziji Maribor, Mihaeli Petek, profesorici na III. gimnaziji Maribor, dr. Klari Hercog, ki je anketo posredovala na Gimnazijo Celje, Veroniki Babič, Ini Kretič in Sonji Kačar, profesoricom na Gimnaziji Ledina, ter Zorici Potisk, profesorici na Gimnaziji Kočevje. Hvala vam za vašo prijaznost in podporo pri izvedbi raziskave.

Iskreno se zahvaljujem tudi svoji mentorici, prof. Špeli Tršek, za vodenje, pomoč pri pisanju, dragocene nasvete in popravke, ki so pomembno prispevali k oblikovanju te naloge.

Posebna zahvala gre tudi so-mentoricama, dr. Martini Štampar in dr. Katji Kološa kot tudi Evi Kanalec, za pomoč pri izvedbi eksperimentalnega laboratorijskega dela raziskovalne naloge. Hvala vam za vso znanje, ki ste mi ga predale. So-mentoricama sem zelo hvaležna za pomoč pri obdelavi podatkov, izdelavi raziskovalne naloge in vse nasvete, ki so prispevali k nastanku te raziskave.

Zahvaljujem se tudi Karolini Belingar, Sonji Žabkar, Špeli Rozman ter Vitu Hamu za vso praktično znanje, ki so ga name prenesli v laboratoriju, ter dobro počutje in vzdušje v laboratoriju. Vaša strokovnost in podpora so mi omogočile uspešno izvedbo laboratorijskih poskusov.

Vaša pomoč mi je bila v veliko oporo in mi je omogočila uspešno zaključiti to raziskovalno delo. Hvala!

## **POVZETEK**

Umetna sladila, kot so acesulfam-K, aspartam, ciklomat, sukraloza in saharin, se pogosto uporabljajo kot nadomestki za saharozo, za uravnavanje vnosa kalorij in nadzor ravni krvnega sladkorja. Vendar raziskave nakazujejo na njihove možne škodljive učinke, kot so motnje ravnovesja črevesne mikrobiote, inzulinska rezistenca in povečano tveganje za razvoj sladkorne bolezni tipa 2. Poleg tega so povezana z vplivom na apetit, telesno težo in povečanim tveganjem za razvoj srčno-žilnih bolezni in raka.

Raziskovalna naloga je sestavljena iz dveh delov, ankete in laboratorijskih poskusov. Cilj prvega dela je bil oceniti ozaveščenost gimnazijskih dijakov o morebitnih škodljivih učinkih umetnih sladil. Cilj drugega dela je bil na *in vitro* tridimenzionalnem celičnem modelu (sferoid) jetrnega hepatocelularnega karcinoma (celice HepG2) proučiti vpliv dveh umetnih sladil, acesulfama-K in aspartama, na živost celic in oksidativen stres. Rezultati ankete so pokazali, da so umetna sladila del vsakodnevne prehrane dijakov. Kljub prepričanju, da negativno vplivajo na zdravje, odgovori ne kažejo poglobljenega razumevanja problematike. Drugi del je pokazal, da acesulfam-K zmanjša velikost HepG2 sferoidov ter poveča ATP, medtem ko aspartam zmanjša vsebnost ATP. Nobeno od proučevanih umetnih sladil ni povzročilo oksidativnega stresa. Rezultati kažejo, da umetni sladili različno vplivata na celične procese. Nadaljnje raziskave so potrebne za boljše razumevanje njihovega vpliva in dolgoročne varnosti.

**Ključne besede:** umetna sladila, acesulfam-K, aspartam, živost celic, sferoidi

## **I UVOD**

Sladila so snovi, ki nadomeščajo saharozo zaradi sladkega okusa in potencialnih zdravstvenih koristi, kot je nižji glikemični indeks, kar pomeni manjše nihanje sladkorja v krvi. To je pomembno za ljudi, kot so diabetiki oziroma tisti, ki se borijo s prekomerno telesno težo. Sladila delimo na naravna, pridobljena iz rastlin, in umetna, sintetizirana v laboratorijih. Med najpogostejša umetna sladila spadajo acesulfam-K, aspartam, ciklamat, saharin in sukraloza, ki se razlikujejo po kemijski strukturi, intenzivnosti sladkosti in senzoričnih lastnostih.

Umetna sladila so vse bolj prisotna v prehranskih izdelkih, saj omogočajo zmanjšanje vnosa sladkorja brez izgube sladkega okusa. Kljub temu pa še vedno obstajajo vprašanja o njihovem vplivu na zdravje človeka. Nekatere študije nakazujejo, da dolgotrajna uporaba umetnih sladil lahko povzroči negativne učinke, kot so spremembe v črevesni mikrobioti in vpliv na metabolizem, prisotna pa je tudi potencialna povezava z boleznimi, kot so sladkorna bolezen tipa 2 in srčno-žilne bolezni, morda tudi rakava obolenja. Umetna sladila sicer vsebujejo 0 kalorij, vendar lahko povečajo apetit zaradi sladkega okusa, kar vodi v povečanje vnosa kalorij in s tem povečanje telesne mase. Poleg tega lahko negativno vplivajo na črevesno floro, kar pripelje do porušenega ravnovesja med dobrimi in slabimi bakterijami ter povečanega deleža odvečnih maščob, slabše presnove in oslabiljenega imunskega sistema. Zaradi teh potencialnih tveganj je priporočljivo osredotočiti se na uživanje čim bolj naravnih, nepredelanih živil, ki so osnovna sestavina zdravega življenjskega sloga.

Raziskovalna naloga je bila sestavljena iz dveh delov. V prvem delu smo izvedli anketo med gimnazijskimi dijaki, da bi ocenili njihovo ozaveščenost o uporabi umetnih sladil in njihovem poznavanju možnega škodljivega vpliva umetnih sladil na zdravje. Rezultati so pokazali nizko ozaveščenost, saj dijaki pogosto ne preverjajo sestave izdelkov, čeprav mnogi menijo, da umetna sladila negativno vplivajo na zdravje. V drugem delu smo eksperimentalno proučevali vpliv acesulfama-K in aspartama na živost celic in oksidativni stres v tridimenzionalnem (3D) modelu človeških jetrnih celic HepG2. Ugotovili smo, da acesulfam-K pri visokih koncentracijah povečuje vsebnost ATP in zmanjšuje velikost sferoidov, kar nakazuje na spremembe v celičnem metabolizmu, medtem ko aspartam zmanjšuje vsebnost ATP, kar kaže na citotoksične učinke. Nobeno od proučevanih umetnih sladil ni povzročilo statistično značilnega povišanja oksidativnega stresa, čeprav smo pri aspartamu opazili trend povišanja nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti. Raziskava nakazuje potrebo po nadaljnjih študijah za boljše razumevanje vplivov umetnih sladil na zdravje človeka in njihovo varnost za uporabnika predvsem po dolgotrajni izpostavitvi.

## 2 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen raziskovalne naloge je oceniti ozaveščenost gimnazijskih dijakov o uporabi umetnih sladil in njihovih možnih tveganjih na zdravje. S kombinacijo anketne in eksperimentalne raziskave želimo bolje razumeti njihovo biološko delovanje ter potencialne učinke na celične procese.

V prvem delu naloge želimo oceniti ozaveščenost gimnazijskih dijakov glede uporabe umetnih sladil ter njihovega možnega škodljivega vpliva na zdravje. V drugem delu naloge bomo na eksperimentalnem *in vitro* tridimenzionalnem (3D) celičnem modelu (sferoidu) razvitem iz jetrne celične linije humanega hepatocelularnega karcinoma (HepG2 celice) ugotavljali, ali izbrani umetni sladili (acesulfam-K in aspartam) vplivata na delitev in živost celic HepG2 ter ali umetni sladili povišata nastanek oksidativnega stresa v celicah.

### **Cilji raziskovalne naloge so ugotoviti:**

- *kakšno je znanje gimnazijskih dijakov o problematiki umetnih sladil;*
- *kakšne so navade gimnazijskih dijakov povezane z uživanjem hrane in pijače, ki vsebujejo umetna sladila;*
- *ali izbrani umetni sladili, acesulfam-K in aspartam, vplivata na živost celic HepG2 sferoidov;*
- *ali izbrani umetni sladili, acesulfam-K in aspartam, povzročata oksidativen stres v celicah HepG2 sferoidov.*

### **Z omenjenim eksperimentalnim pristopom bomo preverili naslednje hipoteze:**

**Hipoteza 1:** *Gimnazijski dijaki se zanimajo za problematiko umetnih sladil.*

**Hipoteza 2:** *Gimnazijski dijaki pogosto preverjajo vsebnosti umetnih sladil v hrani in pijači, ki jo uživajo.*

**Hipoteza 3:** *Gimnazijski dijaki so dobro ozaveščeni o škodljivem delovanju umetnih sladil na zdravje človeka.*

**Hipoteza 4:** *Umetni sladili acesulfam-K in aspartam vplivata na živost celic HepG2 sferoidov.*

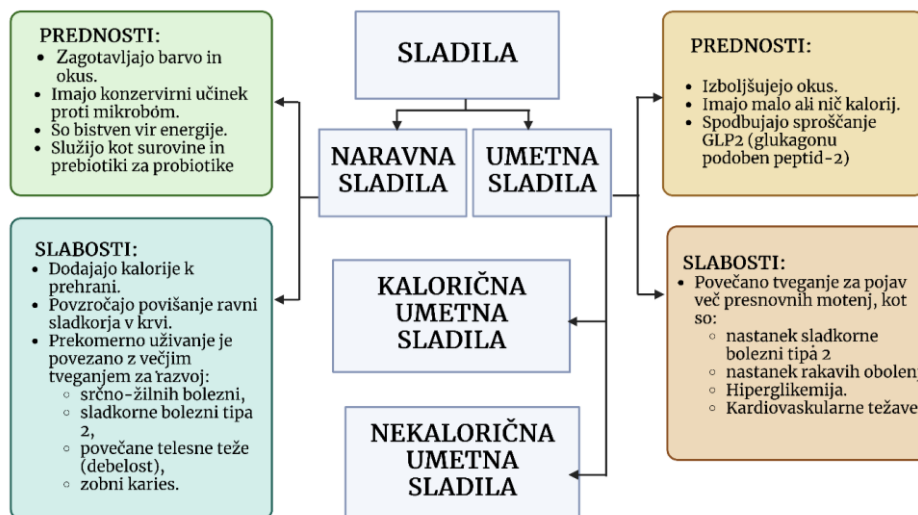
**Hipoteza 5:** *Umetni sladili acesulfam-K in aspartam povzročata oksidativen stres v celicah HepG2 sferoidov.*

**Hipoteza 6:** *Umetni sladili acesulfam-K in aspartam imata različen vpliv na celične funkcije tridimenzionalnega (3D) jetrnega in vitro modela celic HepG2.*

### 3 TEORETIČNI DEL NALOGE - PREGLED OBJAV

#### 3.1 Sladila

Sladila so snovi, ki nadomeščajo saharozo (namizni sladkor) zaradi svojega sladkega okusa in nižjega glikemičnega indeksa, kar pomeni manjši vpliv na raven sladkorja v krvi. So veliko slajša od saharoze (Angelin s sod., 2024). Sladila lahko razvrstimo glede na izvor (naravna ali umetna) ter energijsko vrednost (Slika 1). Naravna sladila izvirajo iz naravnih virov, najpogosteje rastlin, medtem ko so umetna sladila sintetično proizvedena s pomočjo posebnih tehnoloških postopkov. Drug način razvrstitve sladil temelji na njihovi energijski vrednosti. Ogljikohidratna sladila (kalorična) vključujejo sladkorje in sladkorne alkohole, kot so eritritol, sorbitol, manitol, ksilitol, maltitol, medtem ko neogljikohidratna sladila (nekalorična ali nehranilna) vključujejo spojine z nizko kalorično vrednostjo in intenzivno sladkostjo, ki se pogosto uporabljajo kot nadomestek za sladkor v živilih in pijačah.



Slika 1: Delitev sladil in prednosti ter slabosti posamezne skupine sladil.

Slika je pripravljena s programom BioRender (<https://www.biorender.com/>) iz lastne zbirke pripravila kandidatka.

Sladila lahko razvrstimo tudi glede na intenziteto sladkosti. Intenzivna sladila, kot so aspartam, sukraloza in acesulfam-K, so izjemno sladka (do 1000-krat slajša od saharoze), brez kalorij, ne vplivajo na raven sladkorja v krvi in se ne absorbirajo. Neintenzivna sladila, kot so alkoholni sladkorji (ksilitol, sorbitol, eritritol, in manitol), imajo sladkost podobno sladkorju, a z nižjo kalorično vrednostjo in manjšim vplivom na krvni sladkor in se naravno pojavljajo v sadju.

##### 3.1.1 Naravna sladila

Naravna sladila so tista, ki jih ustvarja narava brez uporabe kemikalij ali zapletenih tehnoloških postopkov. Sem spadajo sladkorni alkoholi kot so eritritol, ksilitol, sorbitol, manitol, ter drugi kot so npr. kokosov sladkor, datljev sladkor, med, stevija in javorjev sirup. Poleg slajenja imajo v prehranbeni industriji še druge funkcije, kot so ohranjanje vlage in preprečevanje

karamelizacije. Naravne sladkorje najdemo v rastlinah, sadju in zelenjavi. Saharoza je najpogosteje uporabljeno sladilo, vendar prekomerno uživanje sladkorja povečuje tveganje za nastanek bolezni srca in ožilja, sladkorno bolezen tipa 2, debelost, zobni karies in druge nenalezljive bolezni (Saraiva s sod., 2020).

Raziskovalna naloga se osredotoča zgolj na umetna sladila, zato naravna sladila ne bodo obravnavana v podrobnostih.

### ***3.1.2 Umetna sladila***

Intenzivna ali umetna sladila so industrijsko pridobljena in so bistveno slajša od saharoze. Njihova uporaba se je v zadnjih dveh desetletjih znatno povečala. Kemično so sintetizirana iz organskih spojin, nimajo kalorij, zato je njihov glikemični indeks nič. Povečana uporaba teh sladil se povezuje z bojem proti debelosti, saj omogočajo sladek okus brez dodatnih kalorij (Siervo s sod., 2014).

### ***3.2 Odobritev umetnih sladil za uporabo v živilih in njihovo označevanje***

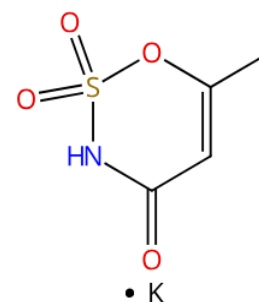
Umetna sladila niso namenjena le ljudem s presnovnimi boleznimi, temveč so prisotna v številnih živilih in so pogosta v prehrani splošnega prebivalstva. Pred odobritvijo za uporabo se preveri njihova varnost, določijo se dovoljene koncentracije v živilih in pijačah, kar ščiti potrošnike pred tveganjem prekomernega uživanja. Vsa sladila, dovoljena v Evropski uniji, so prestala oceno tveganja. Sladila so aditivi za živila, označena z E-številkami, in morajo biti navedena na seznamu sestavin predpakiranih izdelkov, ki pogosto nosijo oznake, kot so "brez sladkorja" ali "zmanjšana energijska vrednost" (Lewis in Tzilivakis, 2021). Uživanje umetnih sladil mora biti v skladu z dovoljeno dnevno mejo (ADI), ki je določena v mg na kg telesne teže in predstavlja količino, ki je varna za dnevno uživanje skozi vse življenje (Chattopadhyay s sod., 2014). Evropska agencija za varnost hrane (EFSA) in ameriška Uprava za hrano in zdravila (FDA) sta določili ADI za različna sladila. Zaradi uporabe več umetnih sladil v izdelkih je malo verjetno, da bi posamezno sladilo preseglo ADI, kar pomeni, da EFSA ocenjuje, da uživanje umetnih sladil ni varnostno problematično (Kossiva s sod., 2024). Vendar pa ostaja vprašanje glede kombiniranih učinkov pri uživanju več umetnih sladil hkrati. V Sloveniji se najpogosteje uporabljajo acesulfam-K, aspartam in saharin.

### ***3.3 Najpogosteje uporabljena umetna sladila***

EFSA v Evropski uniji odobrava uporabo umetnih sladil, kot so acesulfam-K, aspartam, neotam, saharin, sukraloza in ciklamat, medtem ko FDA ne odobrava ciklamata. V nadaljevanju bomo na kratko povzeli lastnosti posameznih umetnih sladil, ki se pogosto uporabljajo v izdelkih za človekovo uporabo.

### 3.3.1 Acesulfam K (E950)

Acesulfam-K (kalijev acesulfam) je kalijeva sol acesulfama (*Slika 2*), brez energijske vrednosti in 200-krat slajša od saharoze. Odkril ga je Karl Clauss leta 1967 (Clauss in Jensen, 1973). Zaradi rahlega grenkega okusa se pogosto uporablja v kombinaciji z drugimi sladili, kot sta aspartam ali sukraloza. Stabilen je pri visokih temperaturah (do 250 °C) in se uporablja v številnih prehranskih (sladkarije, brezalkoholne pijače in žvečilni gumiji) in neživilskih izdelkih (vitaminski dodatki, zobne paste) (Patel in Kumaresan, 2022). V telesu se ne presnavlja in se izloči nespremenjen z urinom (Iizuka, 2022). EFSA priporoča dovoljeni dnevni vnos 9 mg/kg telesne mase, FDA pa 15 mg/kg (Patel in Kumaresan, 2022). Acesulfamu-K vsebuje metilen klorid, ki je rakotvoren, vendar se v telesu redko kopiči. Prekomerno uživanje lahko povzroči glavobole, slabost, duševne motnje, depresijo ter težave z jetri in ledvicami (Kroger s sod., 2006).

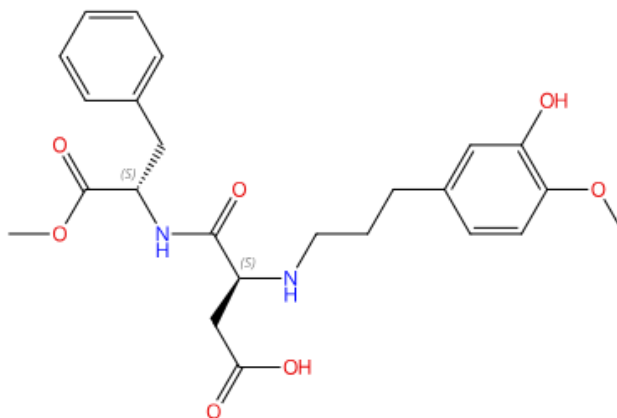


*Slika 2:* Strukturna formula acesulfam-K.

(vir: [https://commonchemistry.cas.org/detail?cas\\_rn=55589-62-3](https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=55589-62-3)).

### 3.3.2 Advantam (E969)

Advantam je novo sladilo, derivat aspartama in vanilina, približno 100-krat slajše od aspartama in 20.000-krat od saharoze (*Slika 3*) (Satyavathi s sod., 2010). Nima grenkega ali kislega priokusa, zato se uporablja kot ojačevalec okusa (Otabe s sod., 2011). Stabilen je pri nizkem pH in visokih temperaturah ter se uporablja v mlečnih izdelkih, pijačah, žvečilnih gumijih in sadnih izdelkih (Iizuka, 2022). Primeren je za diabetike, saj ne vpliva na homeostazo glukoze (Otabe s sod., 2011). V telesu se ne absorbira, 89 % se ga izloči z blatom, 6,2 % z urinom (Iizuka, 2022). Toksikološke študije niso pokazale negativnih učinkov na zdravje, teratogenih, rakotvornih ali mutagenih lastnosti (EFSA, 2013). Povprečen dnevni vnos je 21 µg/kg telesne mase (Otabe s sod., 2011).

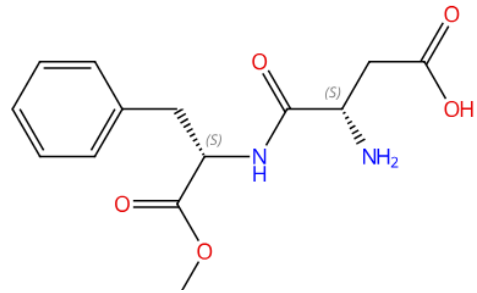


*Slika 3:* Strukturna formula advantama.

(vir: [https://commonchemistry.cas.org/detail?cas\\_rn=245650-17-3](https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=245650-17-3)).

### 3.3.3 Aspartam (E951)

Aspartam, ki ga je odkril James Schlatte leta 1965 (Shankar s sod., 2013), je sestavljen iz dveh aminokislin, L-fenilalanina in L-asparaginske kisline (Slika 4) (FDA, 2024). Približno 200-krat je slajši od sladkorja, vendar ima energijsko vrednost 4 kcal/g, a je zaradi nizke uporabe v živilih njegova dejanska energijska vrednost zanemarljiva (Iizuka, 2022). Uporablja se v dietnih



**Slika 4:** Strukturna formula aspartama. (vir: [https://commonchemistry.cas.org/detail?cas\\_rn=22839-47-0](https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=22839-47-0)).

pijačah, sladkarijah, žvečilnih gumijih, mlečnih izdelkih, jogurtih, energijskih ploščicah in zdravilih. Pri visokih temperaturah se hitro razgradi, kar povzroči izgubo sladkosti. Razpade na asparaginsko kislino, fenilalanin in metanol, vendar ne pomeni tveganja za zdravje ljudi (EFSA, 2023). Ljudje s fenilketonurijo se morajo izogibati aspartamu zaradi tveganja za poškodbe živčnega sistema (van Spronsen s sod., 2021). V EU je odobren z dovoljeno dnevno mejo 40 mg/kg telesne teže (Whitehouse s sod., 2008). Aspartam je FDA odobrila leta 1974, nato pa 1981 kot namizno sladilo ter za uporabo v gaziranih pijačah in drugih izdelkih. Kljub številnim raziskavam o varnosti aspartama so poročila deljena (EFSA, 2006); nekateri navajajo neželene učinke, kot so omotica, glavoboli, spremembe razpoloženja in prebavne težave (Whitehouse s sod., 2008). Sprva je veljal za rakotvorno sladilo, vendar so študije pokazale, da v zmernih količinah ni škodljiv, saj ni dokazano, da povzroča možganske tumorje (EFSA, 2006). Kljub temu je Mednarodna agencija za raziskave raka (IARC) leta 2023 aspartam uvrstila v skupino 2B, kar pomeni možno rakotvornost za ljudi, zato študije še vedno potekajo.

### 3.3.4 Ciklamat (E952)

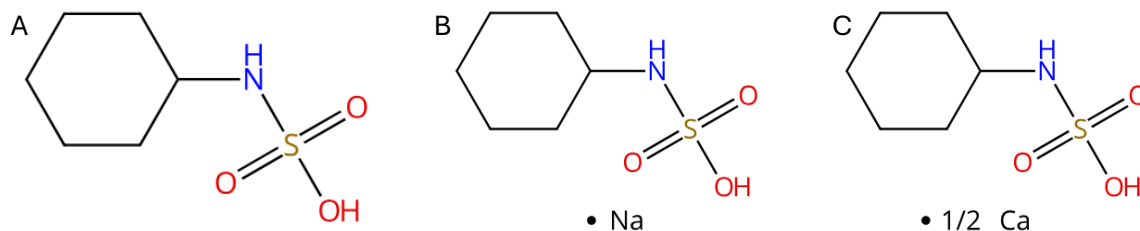
Ciklamat se pogosto uporablja v prehrabeni industriji zaradi svoje intenzivne sladkosti in nizke kalorične vrednosti. Njegova sladkost je približno 30-krat večja od sladkorja (saharoze). Ima grenak okus, vendar ta ni tako izrazit kot pri sladilu acesulfam-K. Za preprečevanje grenkobe se ciklamat pogosto uporablja v kombinaciji s sukralozo (Chattopadhyay s sod., 2014).

Ciklamat je bil odkrit leta 1937, vendar se kot sladilo uporablja od leta 1950 (Schiano s sod., 2021). Najpogosteje je na voljo v obliki natrijeve soli, kalcijeva sol pa je priljubljena pri dietah z nizko vsebnostjo natrija (Slika 5). Oba sta visoko topna v vodi in toplotno obstojna, kar omogoča njuno uporabo pri kuhanju, peki in predelavi hrane (Chattopadhyay s sod., 2014).

Ciklamat se uporablja za sladkanje številnih prehrabnih izdelkov in pijač - predelani sadni proizvodi, kot so sadni sokovi, marmelade, konzervirano sadje in sladkani namazi - žvečilnih gumijev, slaščic, pekovskih in mlečnih izdelkov, marinad, žitaric za zajtrk ter omak in prelivov.

V farmacevtskih izdelkih se uporablja pri oblaganju tablet in kapsul, sladkanju sirupov in kot sladilo za bolnike s sladkorno boleznijo ter v izdelkih za osebno higieno (zobne paste in ustne vodice) (Lewis in Tzilivakis, 2021).

Ciklamat se v telesu večinoma ne presnovi in se izloči z urinom. Črevesne bakterije pri nekaterih posameznikih lahko pretvorijo majhen delež v cikloheksilamin, presnovek, ki ima višjo toksičnost. Sam ciklamat je netoksičen (Renwick s sod., 2004). Raziskave na živalih so pokazale povečano tveganje za razvoj raka mehurja, kar je leta 1970 vodilo do njegove prepovedi v ZDA (Pavanello s sod., 2023). Kasnejše raziskave niso potrdile povezave med ciklamatom in rakom pri ljudeh, zato je bil kasneje ponovno odobren (Lewis in Tzilivakis, 2021). Sprejemljivi dnevni vnos znaša 7 mg/kg telesne teže (Kossiva s sod., 2024). Mednarodna agencija za raziskave raka (IARC) je ciklamat uvrstila v skupino 3, kar pomeni, da ga ni mogoče razvrstiti glede na rakotvornost za ljudi, saj za klasifikacijo ni na voljo dovolj podatkov.

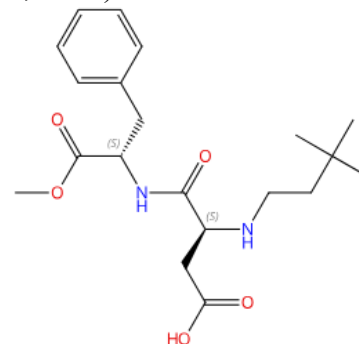


**Slika 5:** Strukturna formula A) ciklamat, B) natrijev ciklamat, C) kalcijev ciklamat. (vir: [https://commonchemistry.cas.org/detail?cas\\_rn=139-05-9](https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=139-05-9))

### 3.3.5 Neotam (E961)

Neotam (Slika 6) je eno izmed novejših umetnih sladil, ki je bil sintetiziran leta 1991 (Nofre in Tinti, 2000). Je derivat aspartama, ki ga pridobijo z N-alkiliranjem aspartama. Po sestavi je precej podoben aspartamu, a se od njega razlikuje po prosti amski skupini, ki preprečuje presnovo v fenilalanin, kar je pomembno za ljudi, ki imajo fenilketonurijo (Shrivastava in Singh, 2020). Sladkost neotama variira od 7.000 do 13.000-kratne sladkosti saharoze. Nima nezaželenega grenkega okusa in ne vsebuje kalorij (Nofre in Tinti, 2000).

Leta 2002 je FDA neotam odobrila kot umetno sladilo za splošno uporabo. Leta 2010 so ga kot sladilo odobrili tudi v Evropski uniji, kjer je sprejemljiv dnevni vnos 2 mg/kg telesne mase, medtem ko ta v ZDA znaša 0,3 mg/kg telesne mase (Nofre in Tinti, 2000). Uporablja se kot sladilo v pijačah, žvečilnih gumijih, jogurtih, marmeladah, želatini, pečenih živilih in številnih drugih izdelkih, z izjemo perutnine in mesnih izdelkov.



**Slika 6:** Strukturna formula neotama. (vir: [https://commonchemistry.cas.org/detail?cas\\_rn=165450-17-9](https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=165450-17-9)).

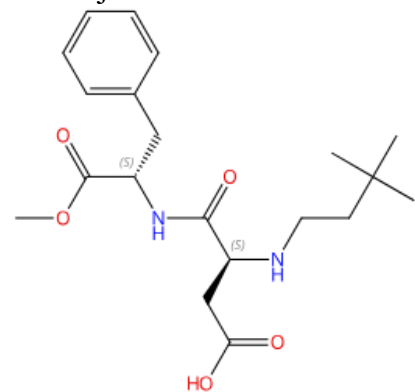
Neotam se v človeškem telesu slabo absorbira in se v celoti izloči iz telesa, zaradi česar je umetno sladilo, ki ga varno lahko zaužijejo tudi bolniki s sladkorno boleznijo tipa 2 in tisti, s fenilketonurijo (Nofre in Tinti, 2000). Glede na razpoložljive literaturne podatke velja, da neotam ni kancerogen, genotoksičen, oziroma ni reproduktivno/ razvojno toksičen (EFSA, 2007). Kljub temu pa lahko prekomerno uživanje neotama povzroča toksičnost v jetrih in druge negativne učinke, kot je sprememba telesne teže, blag glavobol in izguba apetita (Nofre in Tinti, 2000).

### 3.3.6 Saharin (E954)

Saharin je najstarejše nizkokalorično umetno sladilo, ki sta ga naključno odkrila Fahlberg in Remsen leta 1878. Je približno 300-500-krat slajši od saharoze in je zelo stabilen tudi pri visokih temperaturah (Lewis in Tzilivakis, 2021; Iizuka, 2022). Saharinsko sladilo vključuje tri glavne spojine: saharinsko kislino, natrijev saharin (E954(ii)) in kalcijev saharin (E954(iii)) (Slika 7). Kalijev saharin (E954(iv)) je manj pogosto uporabljen. Saharini so brez kalorij (Lewis in Tzilivakis, 2021; EFSA, 2024). Zaradi svojega nekoliko grenkega okusa se saharin pogosto uporablja v kombinaciji z drugimi umetnimi sladili v nizkokaloričnih živilih, pijačah, sladkarijah ter kot sladilo v zobnih pastah, ustnih vodicah in farmacevtskih izdelkih (žvečljive vitaminske tablete, prevleke tablet, sirupi za kašelj) (Lewis in Tzilivakis, 2021).

V človeškem telesu se saharin ne presnavlja (Scheurer s sod., 2014). Večina (85-96 %) zaužitega saharina se absorbira v prebavnem traktu in se izloči z urinom. Preostanek se skozi prebavni trakt nespremenjen izloči z blatom. Določeni dnevni vnos, ki ga dovolijo mednarodne oblasti je 5 mg/kg telesne teže (Lewis in Tzilivakis, 2021).

Študije o kancerogenosti saharina na živalih so pokazale nasprotujoče si rezultate. Pri podganah je v dvo-generacijski študiji povzročil tumorje mehurja (Schoenig in Anderson, 1985), medtem ko eno-generacijske študije in raziskave na drugih vrstah niso potrdile kancerogenosti (Pavanello s sod., 2023). FDA je leta 1977 uvedla opozorilno oznako in leta 1997 začasno prepovedala saharin. Kasnejše raziskave so pokazale, da je učinek specifičen za podgane in nerelevanten za ljudi, zato je bila leta 2000 zahteva po opozorilu odpravljena (US National Toxicology Program, 2021). Zgodnje *in vitro* študije genotoksičnosti saharina so poročale o kromosomskih aberacijah (SCF, 1997), *in vivo* testi so pokazali fragmentacijo DNK celic želodca in debelega črevesa miši, ne pa tudi celic drugih tkiv (Sasaki s sod., 2002).

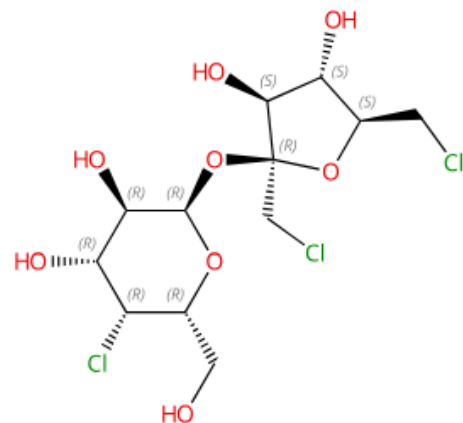


Slika 7: Strukturna formula saharina. ([https://commonchemistry.cas.org/detail?cas\\_rn=81-07-2](https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=81-07-2)).

Nedavne raziskave so preučevale vpliv saharina na črevesni mikrobiom. Opisali so, da saharin spreminja ravnotežje med anaerobnimi in aerobnimi črevesnimi bakterijami (Walbolt in Koh, 2020; Ruiz-Ojeda s sod., 2019). To lahko prispeva k debelosti in inzulinski odpornosti. Saharin, skupaj z drugimi nekaloričnimi sladili, vpliva na raven glukoze s spreminjanjem črevesne mikrobiote (Suez s sod., 2022). Saharin je dandanes ob trenutnih dovoljenih ravneh zaužitja obravnavan kot varen za ljudi (EFSA, 2024). IARC je leta 1998 za saharin znižala oceno iz skupine 2A „verjetno rakotvoren za ljudi“ v skupino 3, kar pomeni, da ga ni mogoče razvrstiti glede na rakotvornost za ljudi. Leta 2000 je tudi US NTP umaknil saharin iz seznama rakotvornih snovi (US National Toxicology Program, 2021).

### 3.3.7 Sukraloza (E955)

Sukraloza je eden od najpogosteje uporabljenih nadomestkov sladkorja in spada med visoko intenzivne sladkorne nadomestke (Slika 8) (Patel in Kumaresan, 2022). Pridobljena je s kloriranjem saharoze. Je 600-krat slajša od saharoze, trikrat slajša od aspartama in acesulfama-K ter dvakrat slajša od saharina (Lewis in Tzilivakis, 2021). Je nekalorično sladilo. Topna je v vodi,



Slika 8: Strukturna formula sukraloze.  
(vir: [https://commonchemistry.cas.org/detail?cas\\_rn=56038-13-2](https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=56038-13-2)).

je toplotno stabilna in se ne presnavlja v telesu. Večina se je izloči nespremenjena z blatom in urinom (Lambert s sod., 2010). Sukraloza je priljubljena tudi zaradi odsotnosti grenkega priokusa. Prisotna je v številnih izdelkih kot so pijače, pekovski izdelki, zamrznjene sladice, bonboni, žvečilni gumiji in dietni izdelki kot tudi izdelki za športnike, hujšanje in diete z malo ogljikovih hidratov (Gujral s sod., 2021). Uporablja se tudi v medicini za maskiranje grenkega okusa zdravil in v osebni higieni (zobne paste, ustne vodice) (Gupta s sod., 2012). V ZDA je bila odobrena leta 1998, nato pa 1999 dovoljena v vseh živilih (Chattopadhyay s sod., 2014). Čeprav je sukraloza splošno priznana kot varna, raziskave kažejo na možne negativne učinke. Študije na miših so jo povezale s povečanim tveganjem za nastanek malignih tumorjev (Soffritti s sod., 2016), vnetjem jeter in nealkoholno zamaščenostjo jeter (Mohammadpour s sod., 2018). Poleg tega vpliva na sestavo črevesne mikrobiote, kar lahko vpliva na presnovo glukoze in povzroči inzulinsko odpornost (Del Pozo s sod., 2022). Povzroča migrene (Bigal in Krymchantowski, 2006). Toksičnost pri glodavcih ni bila potrjena, vendar lahko višji odmerki vplivajo na presnovo in telesno maso (Goldsmith, 2000).

### **3.4 Varnost umetnih sladil: Koristni in škodljivi učinki umetnih sladil na zdravje**

Umetna sladila so vse bolj prisotna v prehrani, a njihovi učinki na zdravje ostajajo predmet razprav. Čeprav zmanjšujejo energijsko vrednost živil, raziskave kažejo, da uporabniki pogosto zaužijejo enako količino kalorij kot tisti, ki sladil ne uporabljajo. Prav tako njihova uporaba ni nujno povezana z zmanjšanjem telesne mase ali nižjim tveganjem za presnovni sindrom. Kljub tem dvomom so sladila koristna za specifične skupine, kot so sladkorni bolniki.

Nekatera umetna sladila, kot so aspartam, saharin in sukraloza, lahko prispevajo k preprečevanju kariesa, saj zmanjšujejo rast bakterij v ustni votlini. Vendar študije opozarjajo, da lahko negativno vplivajo na zobno sklenino (Luo s sod., 2024). Kljub preventivnim učinkom je potrebnih več raziskav, zlasti pri otrocih.

Vpliv umetnih sladil na telesno težo ostaja sporen. Nekatere študije kažejo, da zamenjava sladkanih pijač z nekaloričnimi pri otrocih in mladostnikih zmanjšuje indeks telesne mase (BMI) in telesno težo (Ebbeling s sod., 2020). Druge raziskave pa niso pokazale učinka, ali so pokazale celo porast telesne mase pri uživalcih sladil. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) in Ameriška akademija za pediatrijo (AAP) navajata, da sladila ne povzročajo pomembne izgube telesne teže pri otrocih, a opozarjata na omejene podatke (WHO, 2023).

Študije o vplivu sladil med nosečnostjo so prav tako neenotne. Nekatere raziskave nakazujejo povečano tveganje za prezgodnji porod ter možne dolgoročne učinke na potomce, kot so astma, alergije in slabše kognitivno delovanje, čeprav je zanesljivost teh dokazov nizka. Ni bilo ugotovljene povezave med uporabo sladil in gestacijskim diabetesom. Zaradi pomanjkanja trdnih dokazov WHO priporoča omejeno uporabo umetnih sladil pri nosečnicah, še posebej pri tistih s sladkorno boleznijo ali inzulinsko rezistenco. Umetna sladila, kot so acesulfam-K, saharin, ciklamat in sukraloza, prehajajo v materino mleko, zato se njihova uporaba med dojenjem odsvetuje (WHO, 2023). Stališče o varnosti naravnih sladil pri nosečnicah in majhnih otrocih se spreminja, saj ni dovolj podatkov o njihovih dolgoročnih učinkih.

Aktivacija receptorjev za sladko z umetnimi sladili vpliva na izločanje inzulina, absorpcijo glukoze in okusne preference. Posledično lahko umetna sladila zmanjšajo privlačnost hranilno bogatih živil in spodbudijo prenehanje. Pri otrocih dolgoročni učinki na presnovo in apetit ostajajo premalo raziskani (Kossiva s sod., 2024).

Umetna sladila vplivajo na absorpcijo glukoze in lahko spremenijo homeostazo glukoze v telesu. WHO je ugotovila povezavo med njihovim uživanjem in povišano glukozo na tešče, kar povečuje tveganje za sladkorno bolezen tipa 2. Nekatere študije kažejo, da umetna sladila vplivajo na črevesno mikrobioto in povzročajo inzulinsko rezistenco, medtem ko druge ne potrjujejo negativnega vpliva na glikemično kontrolo. Dolgotrajna uporaba pri zdravih

posameznikov lahko poveča tveganje za nastanek sladkorne bolezni tipa 2, vendar so potrebne dodatne raziskave (WHO, 2023). Študije pri otrocih so omejene, vendar prve ugotovitve kažejo na možne presnovne učinke (Kossiva s sod., 2024), kar zahteva nadaljnjo preučitev.

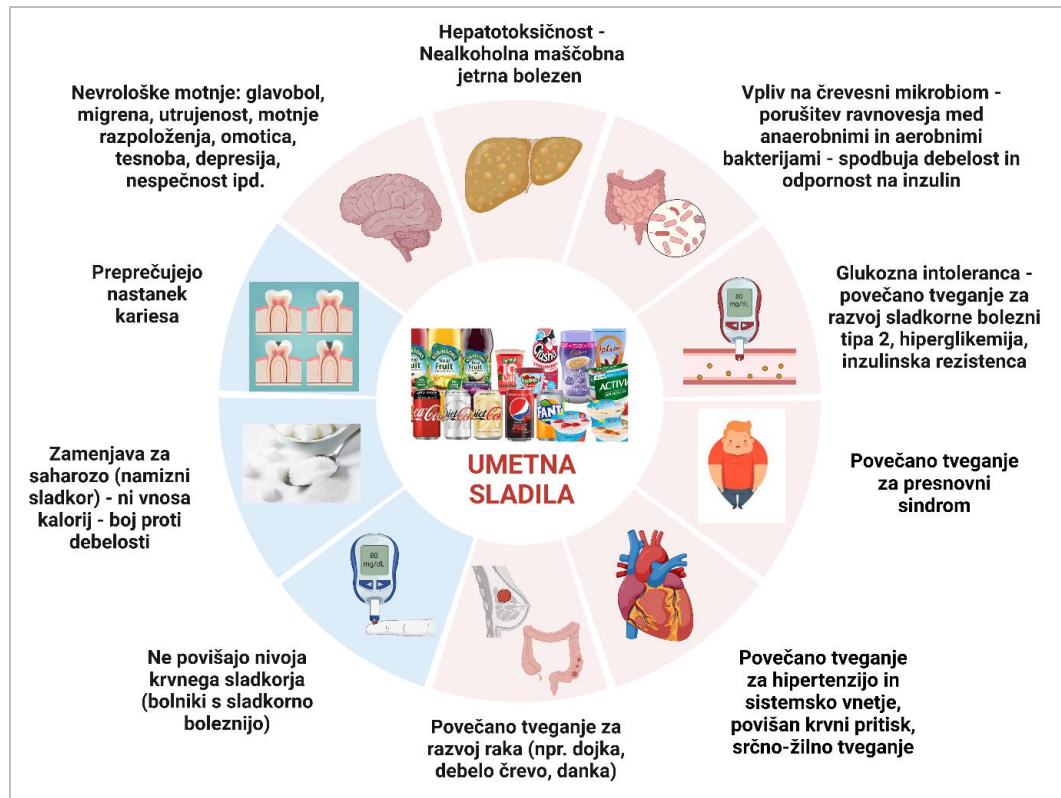
Vpliv kronične uporabe nekaloričnih umetnih sladil pri bolnikih s sladkorno boleznijo ostaja nejasen. Nekatere študije potrjujejo njihovo varnost, a brez izboljšanja glikemičnega nadzora, medtem ko druge opozarjajo na poslabšanje glikemične kontrole, povečano raven kortizola in inzulinsko rezistenco (Iizuka, 2022). Intervencijske raziskave niso dale prepričljivih dokazov o njihovem vplivu na glikemijo in telesno težo, a so poročale o neželenih učinkih (Nadolsky, 2021). Nasprotno, zamenjava sladkanih pijač z umetnimi sladili, je pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 (T2DM) ali debelostjo, prispevala k izgubi telesne teže zaradi energijskega primanjkljaja. Umetna sladila lahko vplivajo na apetit in inzulinsko izločanje, kar dolgoročno spodbuja presnovne motnje in razvoj T2DM (WHO, 2023).

Umetna sladila lahko motijo črevesni mikrobiom, kar je povezano s preddiabetesom. Črevesna flora, ki vključuje bakterije, viruse in glive, pomembno vpliva na presnovo in imunski sistem. Nekalorična sladila spreminjajo sestavo mikrobiote, kar lahko vodi v presnovne motnje. Študije so pokazale, da acesulfam-K in aspartam povzročata glukozno intoleranco, saharin, sukraloza in neotam pa spreminjajo razmerje med ključnimi bakterijami (Suez s sod., 2022).

Raziskave nakazujejo, da umetna sladila lahko spodbujajo debelost in inzulinsko rezistenco ter vplivajo na presnovo aminokislin v črevesni flori, kar lahko vodi v nastanek rakotvornih snovi. Možni mehanizmi, povezani z razvojem debelosti zaradi umetnih sladil, vključujejo ločevanje sladkega okusa od kalorij, spremembe v mikrobioti in sprožanje vnetnih procesov, kar vpliva na presnovno zdravje (Kossiva s sod., 2024).

Raziskave umetnih sladil so sprva preučevale njihovo povezavo z rakom na živalskih modelih. V 70. letih so študije na miših povezale saharin z rakom na mehurju, kar je privedlo do prepovedi ciklamata, vendar kasnejše raziskave te korelacije niso potrdile (Pavanello s sod., 2023). Kohortna študija NutriNet-Santé je pokazala, da večje uživanje aspartama in acesulfama-K lahko poveča tveganje za raka dojke in z debelostno povezane rake (Debras s sod., 2022), medtem ko druge študije te povezave niso potrdile (Hodge s sod., 2018). Rezultati populacijskih raziskav so mešani – pri ženskah po menopavzi v ZDA so zaznali večje tveganje za ledvičnega raka (Ringel s sod., 2023), evropske študije pa tega niso potrdile. Metaanalize so pokazale šibko povezavo med umetnimi sladili in nekaterimi vrstami raka, vendar sukraloza, neotam in advantam niso bili povezani z rakom (Kossiva s sod., 2024).

Študija na podganah je nakazala rakotvornost aspartama in povečano tveganje pri potomcih, vendar tega pri ljudeh niso potrdili. FDA in EFSA umetna sladila še vedno ocenjujeta kot varna pri dovoljenem dnevnem vnosu. Dolgotrajno uživanje umetnih sladil lahko povzroči poškodbe jeter pri živalih, predvsem pod vplivom aspartama in saharina (EFSA, 2020).



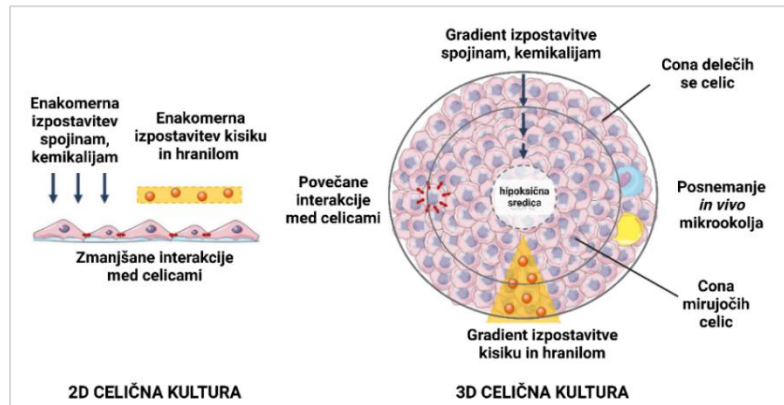
**Slika 9:** Grafična predstavitev dolgodobnih učinkov umetnih sladil.

(modra barva – koristni učinki; rdeča barva - škodljivi učinki). Slika je pripravljena s programom BioRender (<https://www.biorender.com/>) iz lastne zbirke - pripravila kandidatka.

Trenutno se povečuje zanimanje za preučevanje stranskih učinkov umetnih sladil, kot je vpliv na razvoj nealkoholne maščobne jetrne bolezni (NAFLD), ki je pogostejša pri debelih posameznikih in lahko vodi v cirozo ter rak jeter. NAFLD se lahko razvije že v otroštvu in nastane zaradi motenj v presnovi lipidov v jetrih (Emamat s sod., 2020). Študije na miših in ljudeh nakazujejo povezavo med uživanjem umetno sladkanih pijač in NAFLD (Naomi s sod., 2023). Sukraloza, eno najbolj preučenihih umetnih sladil, vpliva na jetra z aktiviranjem vnetnih procesov, povečano lipogenezo, stresom endoplazemskega retikuluma in motnjami v presnovi lipoproteinov, kar vodi do kopičenja trigliceridov in razvoja NAFLD. Prav tako spreminja črevesno mikrobioto in povečuje nastanek žolčnih kislin, kar vpliva na jetra (Del Pozo s sod., 2022). Poleg omenjenih učinkov nekatera umetna sladila povzročajo tudi nevrološke težave, kot so glavobol, migrena, utrujenost, motnje razpoloženja, tesnoba, napadi, depresija in nespečnost (Choudhary in Lee, 2018). Koristni in škodljivi učinki umetnih sladil so prikazani na *Sliki 9*.

### 3.5 *In vitro* dvodimenzionalni (2D) in tridimenzionalni (3D) celični modeli

Tradicionalno se v toksikologiji uporabljajo dvodimenzionalni (2D) celični modeli, predvsem človeške celične linije, za proučevanje mehanizmov delovanja spojin in njihovega vpliva na celične procese. Ti *in vitro* modeli prinašajo prednosti, kot so zmanjšana uporaba živali v raziskovalne



Slika 10: Razlike med *in vitro* 2D in 3D celičnimi modeli.

Povzeto po: (Fontana s sod., 2020). Slika je iz lastne zbirke pripravljena s programom BioRender (<https://www.biorender.com/>).

namene, večja relevantnost rezultatov za človeka, nižji stroški in hitrejši testni postopki. Vendar pa imajo 2D modeli omejitve v primerjavi z *in vivo* pristopi na živalih. Primarne človeške jetrne celice so zlati standard za testiranje varnosti, vendar imajo omejeno dostopnost, visoke stroške in hitro izgubljajo funkcionalnost gojene v kulturi. Kot alternativa so pogosteje uporabljene trajne celične linije, ki omogočajo enostavnejše vzdrževanje in neomejeno delitev, vendar imajo nižje ravni presnovnih encimov, kar zmanjšuje njihovo napovedno vrednost pri oceni toksičnosti ksenobiotikov (Štampar in Žegura, 2024). Slabost pa je, da 2D celični modeli ne posnemajo naravnega tridimenzionalnega okolja celic v tkivih, saj so celice pritrjene na trdno podlago (Slika 10). V zadnjem desetletju so tridimenzionalni (3D) celični modeli postali naprednejši modeli in se široko uporabljajo v predkliničnih raziskavah, toksikologiji, testiranju zdravil ter proučevanju mehanizmov delovanja kemikalij. Ti modeli omogočajo boljše medcelične interakcije, procese podobne tkivu, ter povečano presovno aktivnost celic in izražanje jetrnih funkcij. Razviti so različni tipi 3D modelov, kot so na primer sferoidi, ki zagotavljajo za človeka bolj relevantne in napovedne podatke (Fontana s sod., 2020).

## 4. EKSPERIMENTALNI DEL - MATERIALI IN METODE

### 4.1 ANKETA - UMETNA SLADILA

V prvem delu raziskovalne naloge smo izvedli spletno anketo, s katero smo želeli oceniti ozaveščenost gimnazijskih dijakov o uporabi umetnih sladil, njihovih značilnostih in možnih škodljivih učinkih. Anketa z naslovom „Umetna sladila“ je bila zasnovana na spletni platformi 1Ka, ki omogoča preprosto pripravo in izvedbo vprašalnikov ter zbiranje podatkov. Vabilo k sodelovanju v anketi smo poslali dijakom naslednjih slovenskih gimnazij: Gimnazija Bežigrad, Gimnazija Ledina, Škofijska gimnazija Maribor, I. gimnazija Maribor, III. gimnazija Maribor, Gimnazija Celje-Center in Gimnazija Kočevje.

Dijakom smo po e-pošti poslali povezavo do ankete: <https://www.1ka.si/a/f2bbe0b1>. Anketa je bila sestavljena iz 13 vprašanj, ki so bila zasnovana tako, da so zajela osnovne demografske podatke in vsebinske informacije o umetnih sladilih. V prvih treh vprašanjih smo dijake povprašali o spolu, starosti in gimnaziji, ki jo obiskujejo. Preostalih 10 vprašanj je bilo osredotočenih na naslednje teme: 1.) Poznavanje umetnih sladil in njihove uporabe v prehrabnih izdelkih. 2.) Mnenje o škodljivosti umetnih sladil za zdravje. 3.) Pogostost uporabe izdelkov, ki vsebujejo umetna sladila. 4.) Poznavanje razlik med umetnimi sladili in naravnimi sladili. 5.) Zaupanje v varnost umetnih sladil.

Anketna vprašanja so bila pripravljena v obliki zaprtih vprašanj, kar nam je omogočilo kvantitativno analizo zbranih podatkov. Celotna vprašanja so vključena v *Prilogi 1*, kjer so podana v natančni obliki, kot so bila zastavljena anketirancem.

#### **4.2 EKSPERIMENTALNI DEL NALOGE - VPLIV IZBRANIH UMETNIH SLADIL NA ŽIVOST CELIC HepG2 IN NASTANEK OKSIDATIVNEGA STRESA**

V drugem delu naloge smo na eksperimentalnem tridimenzionalnem (3D) jetrnem *in vitro* celičnem modelu (sferoid) človeškega hepatocelularnega karcinoma (celice HepG2) proučili, kako izbrani umetni sladili, acesulfam-K in aspartam, vplivata na tlorisno površino HepG2 sferoidov, živost celic HepG2, in ali proučevani umetni sladili v celicah povzročata oksidativen stres (*Slika 16*). Laboratorijsko delo je bilo izvedeno na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani in je potekalo pod strokovnim mentorstvom dr. Martine Štampar in dr. Katje Kološa.

##### **4.2.1 Material in pomembnejša oprema, potrebna za izvedbo poskusov**

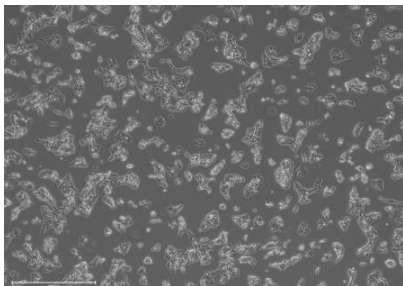
**Preglednica 1:** Kemikalije in oprema uporabljena v eksperimentalnem delu raziskovane naloge.

<b>Kemikalije</b>	<b>Kataloška številka</b>	<b>Proizvajalec</b>
Acesulfam-K	W700544-SAMPLE-K	Merck, ZDA
Aspartam	W700655	Sigma, ZDA
Penicilin/Streptomycin (1 %)	P0781-100 mL	Sigma, ZDA
Serum govejega zarodka (FBS)	10500-064	Gibco, ZDA
Tripansko modrilo	T8154-100 mL	Sigma, ZDA
Trypsin (0,25 % Trypsin-EDTA)	25200-056	Gibco, ZDA
CellTiter-Glo® 3D Cell viability assay	G9668A	Promega, ZDA
Dimetil sulfoksid (DMSO)	414880010	Acros organics, Belgija
DPBS (10x)	14200-067	Gibco, ZDA
MEM (1x) (Minimal essential medium)	10370-047	Gibco, ZDA
Metilceluloza	10370-047	Sigma, ZDA
DCFH-DA	D399	Invitrogen, TermoFisher
Luperox® TBH70X, tert-Butyl hydroperoxide	458139-25	Aldrich Chemistry, ZDA
Gojitvene plošče velikosti 25 cm <sup>2</sup> (T25)		Corning Costar ZDA
Stripete (volumna 5, 10, 25 mL)		Corning Costar, ZDA
Plastični nastavki za pipete (tipsi) (10-200 µl, 100-1000 µl, 5 mL)		Corning Costar, ZDA
Prozorne, črne in bele mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami v obliki črke U		Corning Costar, ZDA
<b>Oprema in pripomočki za laboratorijsko delo</b>		
Cytation 5 (programska oprema Gen 5)		BioTek, Winooski, ZDA

Spektrofluorimeter	Synergy Mx, BioTek, ZDA
Avtomatski števec celic Countess 3 FL	Thermo Scientific™, ZDA

#### 4.2.2 Eksperimentalen pristop

V raziskavi smo za proučevanje morebitnega škodljivega delovanja umetnih sladil uporabili celično linijo HepG2 (Slika 11), izolirano iz rakavega tkiva leta 1979. Celice HepG2 imajo ohranjene presnovne encime faze I in II, kar je ključno za toksikološke študije. Komercialno so



**Slika 11:** Celice HepG2.

(4x povečava) Foto: lastna zbirka kandidatke.

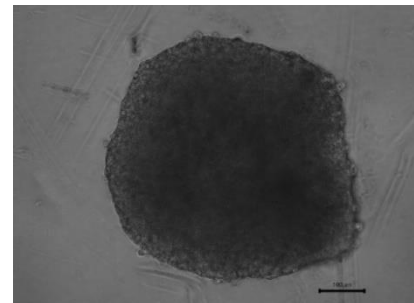
dostopne pri ameriški celični banki (ATCC; HB-8065) in shranjene v tekočem dušiku na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

Preučevali smo vpliv dveh umetnih sladil, acesulfama-K in aspartama, na živost in delitev celic HepG2 ter oksidativni stres v *in vitro* 3D celičnem modelu (sferoidu). Sferoide smo gojili 72 ur, in jih nato izpostavili različnim koncentracijam (0, 1, 10, 100, 1000 in 10000  $\mu$ M) sladil za 24 oziroma 96 ur. Pri

96-urni izpostavitvi smo po 48 urah zamenjali gojišče in ga nadomestili z gojiščem z ustreznimi koncentracijami umetnih sladil. Velikost (tlorisno površino) sferoidov smo merili s planimetrijo, ATP vrednosti s »CellTiter-Glo® 3D Cell viability assay«, oksidativni stres pa s testom DCFH-DA po 180 minutah izpostavitve.

#### 4.2.3 Gojenje celic HepG2 in priprava sferoidov

Celice HepG2 smo gojili v celičnem gojišču v sterilnih plastenkah (25 cm<sup>2</sup>) pri 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> in vlažni atmosferi. Celično gojišče (100 mL) je vsebovalo medij MEM z neesencialnimi aminokislinami (86,54 mL), 10 % serum govejega zarodka (FBS), 1 % natrijevega piruvata (100 mM), 1 % penicilin/streptomycin in 1 mL L-glutamina (1



**Slika 12:** Sferoid pri starosti 96 ur. (20x povečava) Foto: lastna zbirka kandidatke.

10000  $\mu$ M) L-glutamina (1 %). Celice smo gojili 2-3 dni do 70-80 % preraščenosti površine plastenke, jih nato z encimom tripsinom (0,25 %) odlepili od podlage, centrifugirali (5 minut, 1000 obratov/min) in nato celice v celični usedlini ločili na posamezne celice. Prešteli smo jih s pomočjo barvila tripan modro in nato ustrezno gostoto prenesli v novo platenko, ali uporabili za pripravo 3D celičnih kultur (sferoidov).

Sferoide smo pripravili s prisilno plavajočo metodo s centrifugiranjem. Celice HepG2 (30.000 celic/mL) smo v gojišču s 4 % metilcelulozo (4 °C) nanесли v 200  $\mu$ L na mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami v obliki črke U (6000 celic/vdolbinico). Po centrifugiranju (90 min, 28 °C, 850

g) so se celice zbrale na dnu vdolbinic. Nato smo jih 72 ur inkubirali (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, vlažna atmosfera) in nastale sferoide, uporabili v nadaljnjih poskusih (Slika 12).

#### 4.2.4 Priprava raztopin umetnih sladil, acesulfama-K in aspartama

Založno raztopino acesulfama-K (1000 mM) smo pripravili v sterilni ddH<sub>2</sub>O, aspartama (30 mM) pa v MEM mediju. Umetni sladili smo v celičnem gojišču razredčili do končne koncentracije (0, 1, 10, 100, 1000 in 10000 μM) ter HepG2 sferoide izpostavili 24 ali 96 ur. Pri 96-urni izpostavitvi smo po 48 urah zamenjali gojišče s svežim. Meritve smo izvedli na vsaj treh sferoidih v treh neodvisnih bioloških ponovitvah, z vključitvijo kontrol: gojišče, topilo (2 % sterilna ddH<sub>2</sub>O) in pozitivna kontrola (15 % DMSO).



*Slika 13: Mikroskopiranje.  
Foto: lastna zbirka kandidatke.*

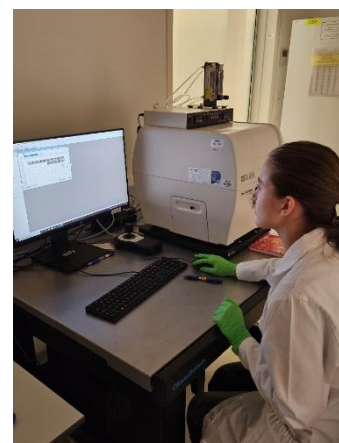
#### 4.2.5 Obdelava podatkov

Za vsak merjeni končni učinek (opisano v sledečih poglavjih) smo najprej izračunali povprečne vrednosti znotraj posameznih ponovitev ter jih primerjali s kontrolno skupino, pri čemer smo izračunali razmerje med izpostavljenimi in kontrolnimi sferoidi. Nato smo določili povprečja teh razmerij iz treh neodvisnih bioloških ponovitev za vsako koncentracijo umetnih sladil in kontrol. Kontrolnim sferoidom smo določili 100 % preživetje celic in na podlagi tega izračunali delež preživelosti pri posameznih koncentracijah umetnih sladil. Statistično analizo smo izvedli v programu GraphPad Prism (verzija 9, GraphPad Software, Inc., ZDA) z uporabo enosmerne analize variance (one-way ANOVA) in Dunnetovega primerjalnega testa. Statistično značilne razlike smo označili z \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.2.6 Določanje vpliva acesulfama-K in aspartama na velikost površine sferoidov

Vpliv različnih koncentracij umetnih sladil, acesulfam-K in aspartam, na velikost tlorisne površine sferoidov smo določali z napravo Cytation 5 (BioTek, ZDA) in programom Gen5 (BioTek, ZDA, verzija 3.11) (Slika 14).

Sferoide smo najprej gojili 72 ur pri ustreznih pogojih, kot je opisano v poglavju 4.2.3, ter jih nato izpostavili acesulfamu-K in aspartamu (poglavje 4.2.4). Po določenem času izpostavitve smo s pomočjo programa Gen5 izmerili površino oziroma »tloris« kontrolnih in izpostavljenih sferoidov pri 4x povečavi. Ta metoda kvantifikacije površine sferoidov se imenuje planimetrija.



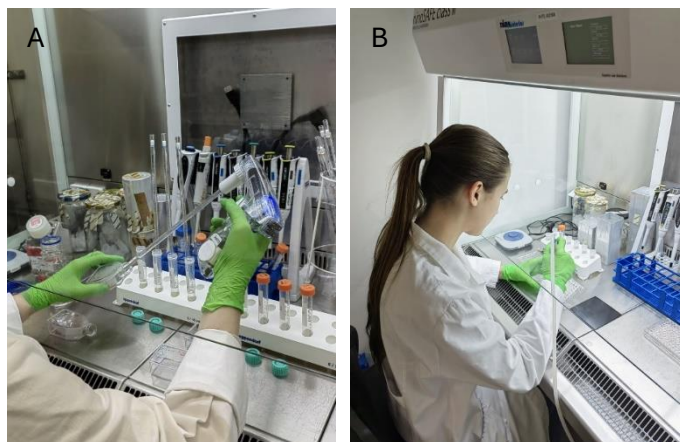
*Slika 14: Meritve z napravo Cytation 5 (BioTek, ZDA).  
Foto: lastna zbirka kandidatke.*

#### 4.2.7 Določanje vpliva acesulfama-K in aspartama na živost celic HepG2 sferoidov

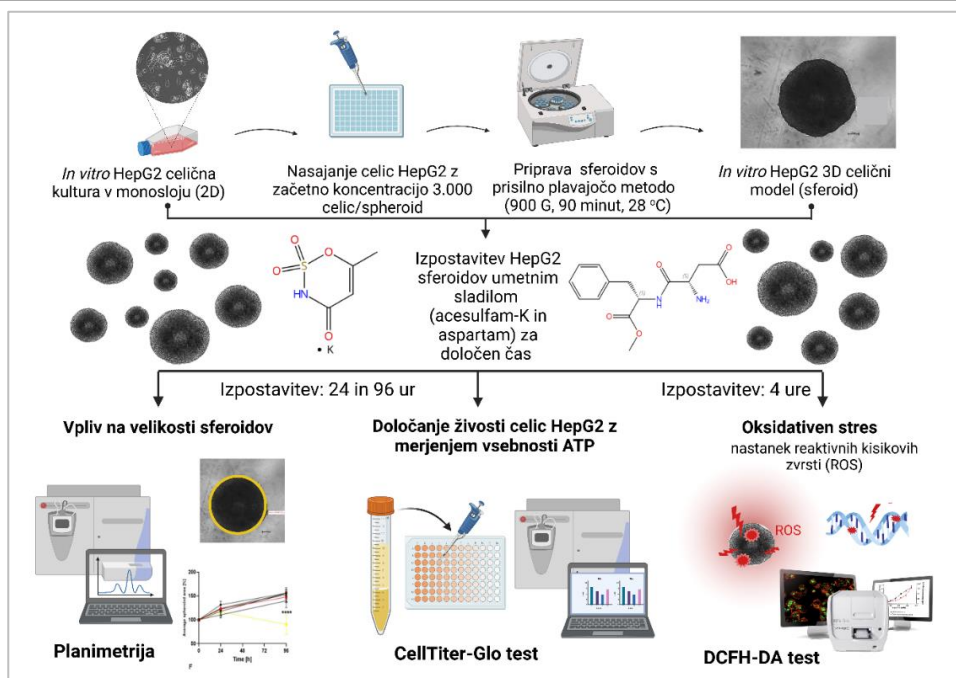
Po izvedenih meritvah velikosti tlorisne površine celic s planimetrijo (opisano v poglavju 5.2.6) smo izvedli še meritve živosti celic posameznih sferoidov, kar smo določali s pomočjo CellTiter-Glo® luminiscenčnega testa po navodilih proizvajalca (Promega, Madison, Wisconsin, ZDA), kjer smo določali vsebnost ATP na podlagi izmerjene luminiscence (Promega, 2023). Posamezen sferoid določene luknjice smo s pomočjo odrezanega tipsa v približno 50 µL gojišča prenesli v sterilno belo mikrotitrsko ploščo z 96 vdolbinicami (Thermo Scientific™, Waltham, MA, ZDA), ter nato v temi pri sobni temperaturi dodali 50 µL reagenta CellTiter-Glo®. Ko smo dodali reagent, smo vsebino luknjice nežno premešali s pomočjo pipete, da je sferoid razpadel (celice so se lizirale) in raztopina v luknjici se je obarvala rumeno. Mikrotitrsko ploščo s sferoidi in reagentom smo 5 minut nežno stresali ter nato pustili 20 minut na 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Sledilo je merjenje luminiscence (povprečna RLU/sekunda) z napravo Cytation 5 (BioTek, ZDA) in programom Gen5. Določili smo, da je pri kontrolnih sferoidih količina ATP (preživetje celic) 100 % in glede na izmerjene oziroma izračunane vrednosti posameznih ponovitev izračunali delež preživelosti celic posameznih koncentracij umetnih sladil. Izmerjene podatke smo statistično obdelali, kot je opisano v poglavju 4.2.5.

#### 4.2.8 Določanje vpliva acesulfama-K in aspartama na nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti

Morebiten povišan nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) zaradi delovanja umetnih sladil smo določali z DCFH-DA testom (Invitrogen, ThermoFisher). Sferoide smo pripravili po opisnem postopku (poglavje 5.2.4) in jih gojili 72 ur. Reagent DCFH-DA smo raztopili v HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution; 20 µM) ter poskuse izvajali v temi. Pripravili smo umetni sladili (1, 10, 100, 1000, in 10000 µM). Sferoide smo z 200 µl tipsom prenesli v črno mikrotitrsko ploščo, dodali 100 µl DCFH-DA in inkubirali 35 min (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Nato smo reagent odsesali, sferoide sprali s PBS in jih izpostavili pripravljenim koncentracijam sladil (Slika 15). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili tert-butil hidroperoksid (0,07 µM), sintetičen analog vodikovega peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Plošče smo inkubirali pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> v napravi Cytation 5, meritve pa izvedli po 180 minutah inkubacije.



Slika 15: Delo s celičnimi kulturami pri sterilnih pogojih v laminariju. (A) delo s pipetboy-em; (B) delo z Vacuboy-em.  
Foto: lastna zbirka kandidatke.



**Slika 16:** Eksperimentalni pristop uporabljen v raziskovalni nalogi.

Priprava *in vitro* 3D celičnega modela (sferoid) iz celic HepG2 ter določanje i) vpliva acesulfam-K in aspartama na rast sferoidov, ii) vpliva na živost HepG2 celic sferoidov na podlagi merjenja ATP ter iii) vpliva na oksidativen stres merjeno s testom DCFH-DA. Slika je pripravljena s programom BioRender (<https://www.biorender.com/>) iz lastne zbirke - pripravila kandidatka.

## 5. REZULTATI

### 5.1 ANKETA - UMETNA SLADILA

Spletno anketo »Umetna sladila« je izpolnilo 636 dijakov iz sedmih gimnazij (Preglednica 2).

**Preglednica 2:** Število dijakinj, dijakov in število neopredeljenih (ostalo), ki so izpolnili spletno Anketo »Umetna sladila« iz sedmih slovenskih gimnazij.

	Število dijakinj	Število dijakov	Število neopredeljenih	Skupaj
<b>Gimnazija Bežigrad</b>	138	56	1	195
<b>Gimnazija Ledina</b>	35	12	0	47
<b>I. Gimnazija Maribor</b>	22	6	0	28
<b>III. Gimnazija Maribor</b>	119	41	2	162
<b>Škofijska gimnazija Maribor</b>	60	23	2	85
<b>Gimnazija Kočevje</b>	54	24	1	79
<b>Gimnazija Celje</b>	38	2	0	40

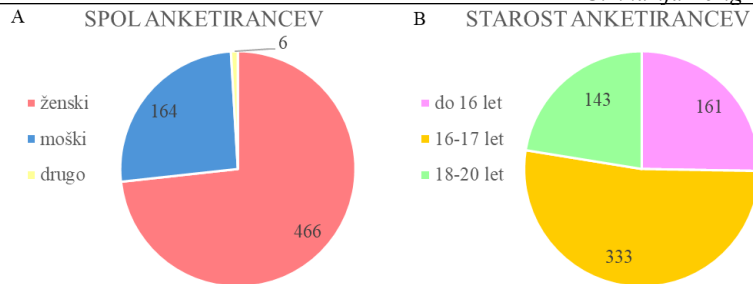
Z anketo smo preverjali poznavanje umetnih sladil med mladimi, njihovo mnenje o varnosti ter pogostost uživanja izdelkov, ki jih vsebujejo. Rezultati kažejo osnovno poznavanje, a različne stopnje ozaveščenosti o učinkih. V nadaljevanju predstavljamo podrobno analizo podatkov. Anketo je izpolnilo 466 dijakinj (73,3 %), 164 dijakov (25,8 %) in 6 spolno neopredeljenih posameznikov (0,9 %) (Slika 17A). Večina anketirancev je bila stara 16–17 let (52,4 %), sledili so mlajši od 16 let (25,3 %), in nato dijaki, stari 18–20 let (22,3 %) (Slika 17B). V starostni skupini do 16 let je bilo 110 dijakinj (23,6 % vseh dijakinj), 49 dijakov (29,9 % vseh dijakov) in 2 spolno neopredeljena (33,3 % vseh neopredeljenih). Med anketiranci, starimi 16-17 let, je

bilo 247 dijakinj (53 % vseh

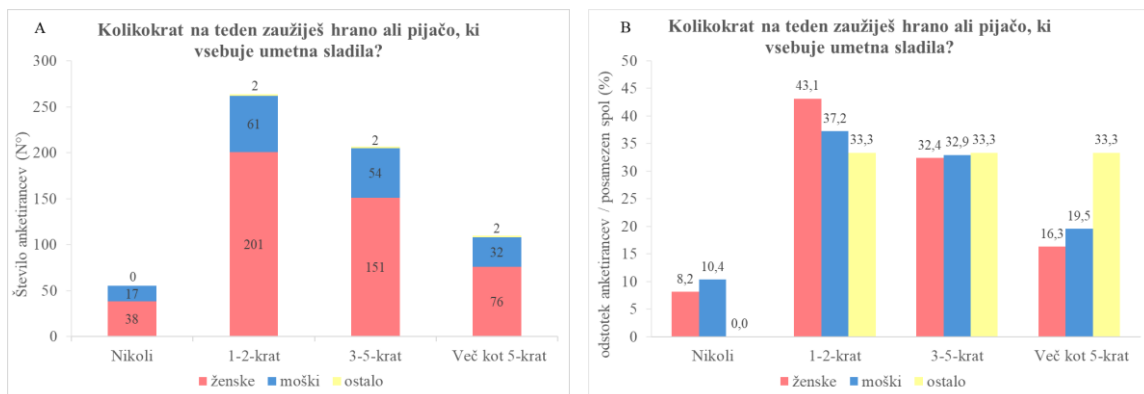
dijakinj), 84 dijakov (51,2 % vseh dijakov) in 2 neopredeljena (33,3 % vseh spolno neopredeljenih). V

starostni skupini 18-20 let je bilo 109 dijakinj (22,3 % vseh

dijakinj), 31 dijakov (18,9 % vseh dijakov) in 2 neopredeljena (33,3 % spolno neopredeljenih). Ker je bilo spolno neopredeljenih le 6 posameznikov (< 1 % sodelujočih), njihovih rezultatov ne opisujemo in se osredotočamo le na odgovore dijakinj in dijakov. Vsi podatki so prikazani na pripadajočih slikah (Slika 17 – Slika 28).

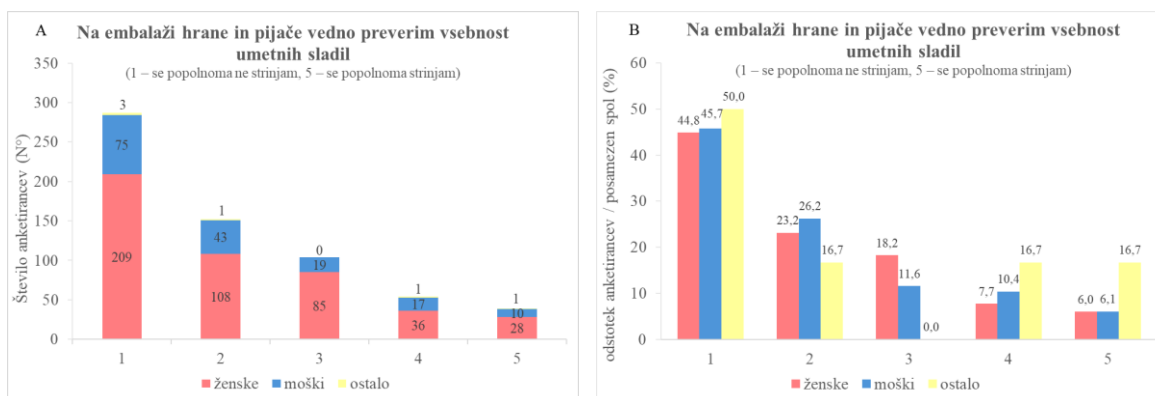


Slika 17: Spolna (A) in starostna (B) sestava anketirancev.



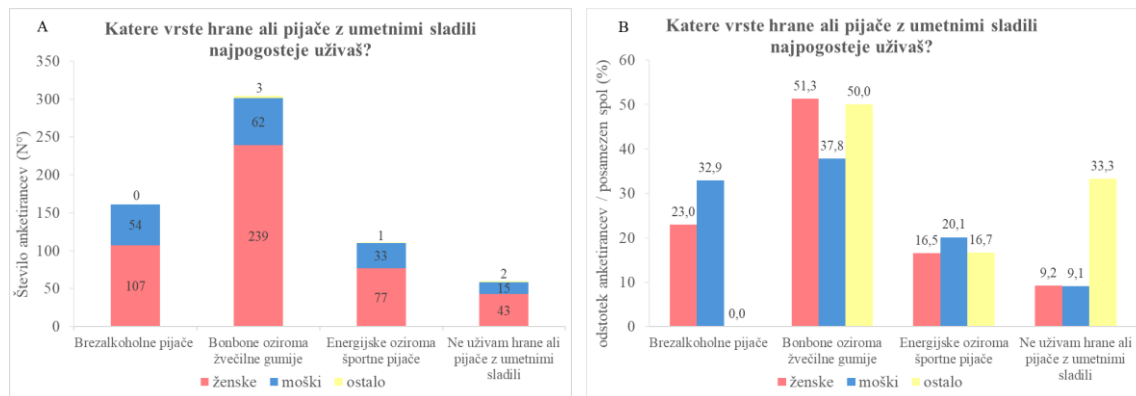
Slika 18: Vprašanje 3: Kolikokrat na teden zaužiješ hrano in pijačo, ki vsebuje umetna sladila? (A) Število anketiranih glede na posamezen odgovor. (B) Delež dijakinj, dijakov in spolno neopredeljenih glede na posamezen odgovor (dijakinje - rdeča, dijaki-modra, spolno neopredeljenih - rumeno).

Največ anketirancev zaužije umetna sladila 1-2 krat na teden (264; 41,1 %), sledijo tisti s pogostostjo 2-5 krat na teden (207; 32,5 %). Več kot 5-krat tedensko jih uživa 110 (17,3 %), medtem ko jih 56 (8,8 %) umetnih sladil sploh ne uživa. Iz Slike 18 je razvidno, da je pogostost uživanja umetnih sladil zelo podobna med spoloma. Rezultati ankete kažejo, da se 287 anketirancev (45,1 %) popolnoma ne strinja s trditvijo, da vedno preverjajo vsebnost umetnih



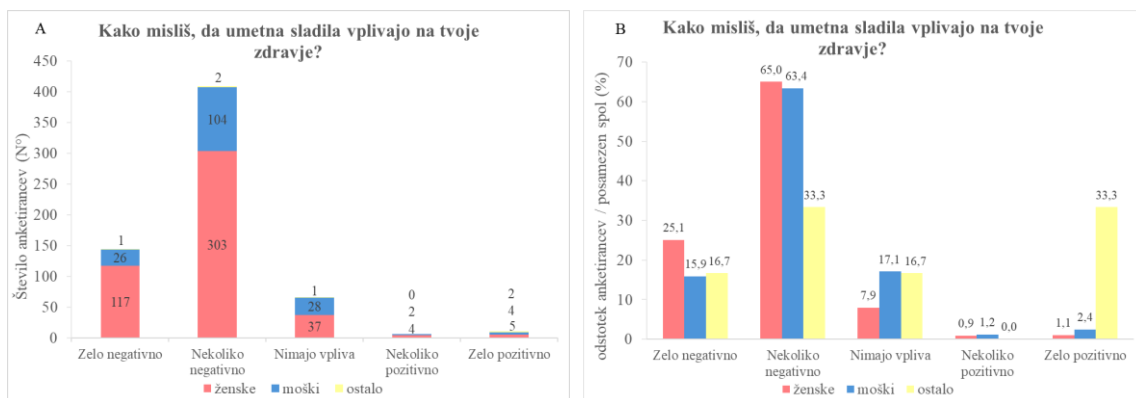
Slika 19: Vprašanje 4: Na embalaži hrane in pijače vedno preverim vsebnost umetnih sladil. Legendo glej Slika 18.

sladil na embalaži. Delno se ne strinja 152 (23,9 %), nevtralnih je 104 (16,4 %), delno se strinja 54 anketirancev (8,5 %), medtem ko jih le 40 (6,1 %) preverja vsebnost umetnih sladil (Slika 19A in 19B). Trend je med spoloma podoben (Slika 19B).



Slika 20: Vprašanje 5: Katere vrste hrane ali pijače z umetnimi sladili najpogosteje uživaš? Legendo glej Slika 18.

Najpogosteje uživani izdelki z umetnimi sladili so bonboni in žvečilni gumiji (304; 47,8 %), sledijo brezalkoholne pijače (161; 25,3 %) ter energijske pijače (111; 17,5 %). Hrane in pijače z umetnimi sladili ne uživa 60 anketirancev (9,4 %) (Slika 20A). Med dijakinjami jih več kot polovica najpogosteje uživa bonbone in žvečilne gumije, sledijo brezalkoholne in energijske pijače. Pri dijakih je vrstni red podoben, le da tretjina najpogosteje uživa brezalkoholne pijače. Približno 10 % obeh spolov ne uživa izdelkov z umetnimi sladili (Slika 20B).

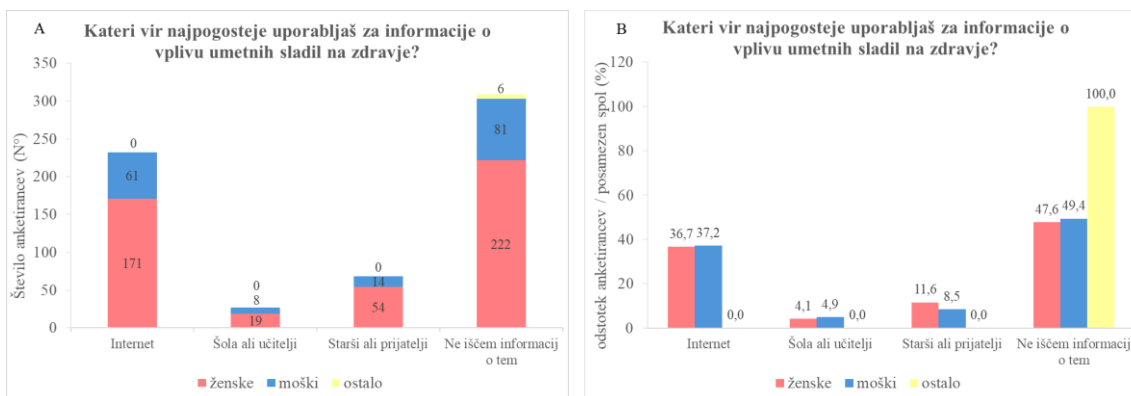


Slika 21: Vprašanje 6: Kako misliš, da umetna sladila vplivajo na tvoje zdravje? Legendo glej Slika 18.

Na vprašanje o vplivu umetnih sladil na zdravje je 409 anketirancev (64,3 %) odgovorilo, da imajo nekoliko negativne učinke, 144 (22,6 %) pa jih vidi kot zelo škodljive. Nevtralen vpliv je izbralo 66 (10,4 %), medtem ko le 17 anketirancev meni, da imajo nekoliko ali zelo pozitiven učinek (Slika 21A). Dijakinje in dijaki imajo podobno mnenje – več kot 90 % dijakinj in 80 % dijakov umetna sladila dojema kot bolj škodljiva kot koristna (Slika 21B).

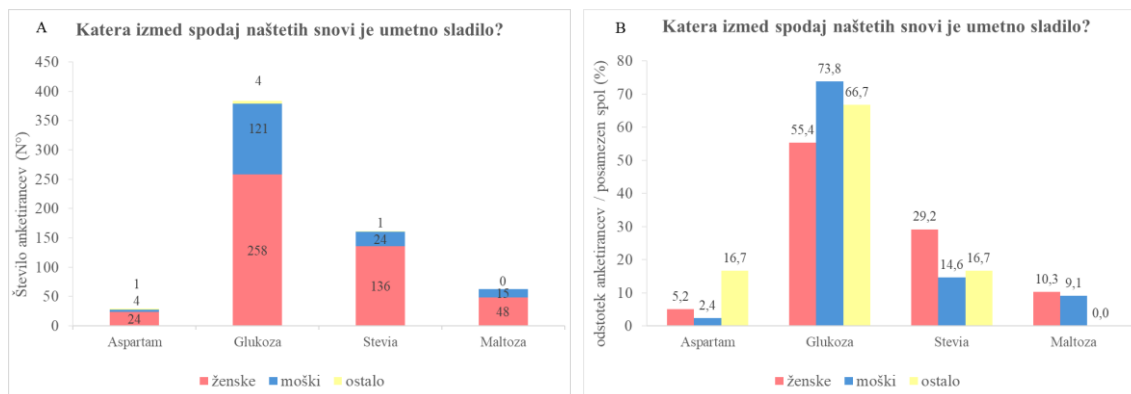
Rezultati ankete kažejo, da je internet glavni vir informacij o umetnih sladilih (36,5 % anketirancev), pri čemer je delež dijakinj (36,7 %) in dijakov (37,2 %) skoraj enak. Le manjši

delež pridobiva informacije v šoli (4,2 %), ali od staršev ali prijateljev (10,7 %). Skoraj polovica anketirancev (309; 48,6 %) teh informacij sploh ne išče, pri čemer ni bistvenih razlik med spoloma (Slika 22A in Slika 22B).



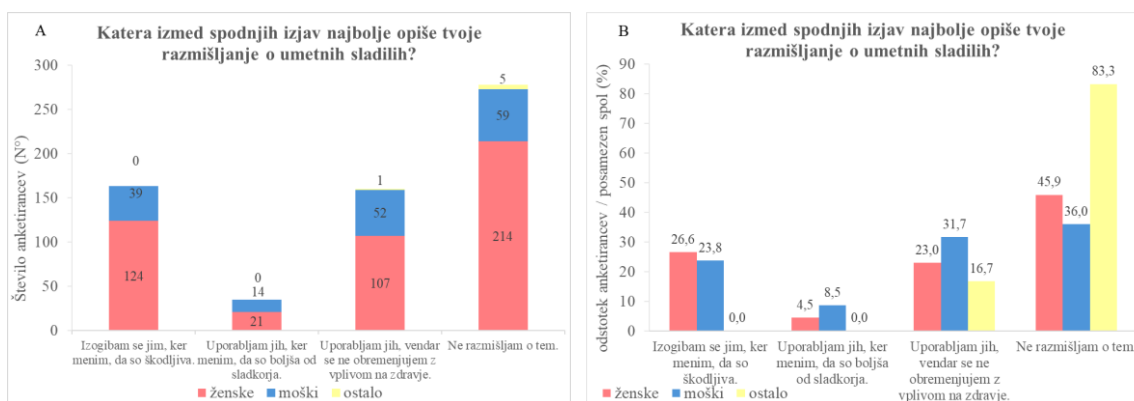
Slika 22: Vprašanje 7: Kateri vir najpogosteje uporabljaš za informacije o vplivu umetnih sladil na zdravje? Legendo glej Slika 18.

Na vprašanje o prepoznavanju umetnih sladil je 383 anketirancev (60,2 %) napačno izbralo glukozo, 161 stevijo (25,3 %), 63 maltozo (9,9 %), medtem ko je le 29 (4,6 %) sodelujočih pravilno prepoznalo aspartam (Slika 232A). Dijaki so pogosteje napačno izbrali glukozo (73,8 %) kot dijakinje (55,4 %), medtem ko so dijakinje pogosteje izbrale stevijo (29,2 % v primerjavi s 14,6 % pri dijakih). Aspartam je pravilno prepoznalo le 5,2 % dijakinj in 2,4 % dijakov (Slika 23B).



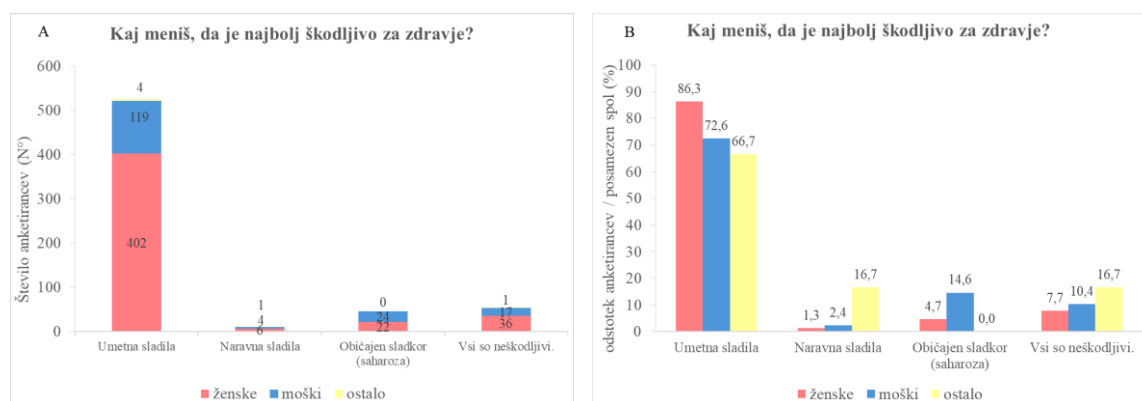
Slika 23: Vprašanje 8: Katera izmed spodaj naštetih snovi je umetno sladilo? Legendo glej Slika 18.

Na vprašanje, katera izmed izjav najbolje opisuje njihovo razmišljanje o umetnih sladilih, jih je 278 (43,7 %) odgovorilo, da o tej temi ne razmišlja, pri čemer je ta delež nekoliko višji pri dijakinjah (skoraj 46 %) kot pri dijakih (35 %). Približno četrtnina anketirancev (25,7 %; 26,6 % dijakinj in 23,8 % dijakov) se umetnim sladilom izogiba, ker menijo, da so škodljiva. Četrtnina anketirancev (25,2 %; 23 % dijakinj in 31,7 % dijakov) umetna sladila uporablja, vendar se ne obremenjuje s tem, ali vplivajo na njihovo zdravje. Le 35 anketirancev (5,5 %) umetna sladila uporablja, ker menijo, da so boljša od sladkorja (Slika 24A in Slika 24B).



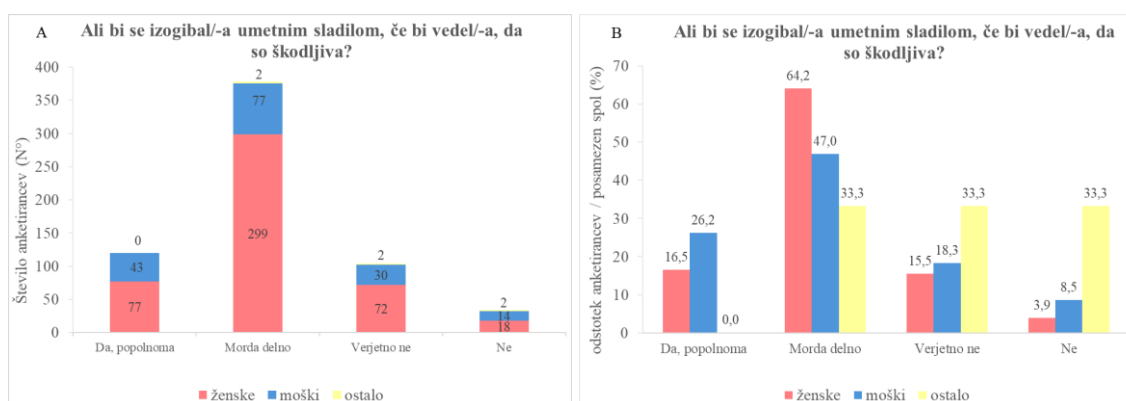
Slika 24: Vprašanje 9: Katera izmed spodnjih izjav najbolje opiše tvoje razmišljanje o umetnih sladilih? Legendo glej Slika 18.

Rezultati desetega vprašanja so pokazali, da 525 vprašanih (82,5 %) meni, da so umetna sladila najbolj škodljiva za zdravje, pri čemer so tega mnenja bolj dijakinje (86,3 %) kot dijaki (72,6 %).



Slika 25: Vprašanje 10: Kaj meniš, da je bolj škodljivo za zdravje? Legendo glej Slika 18.

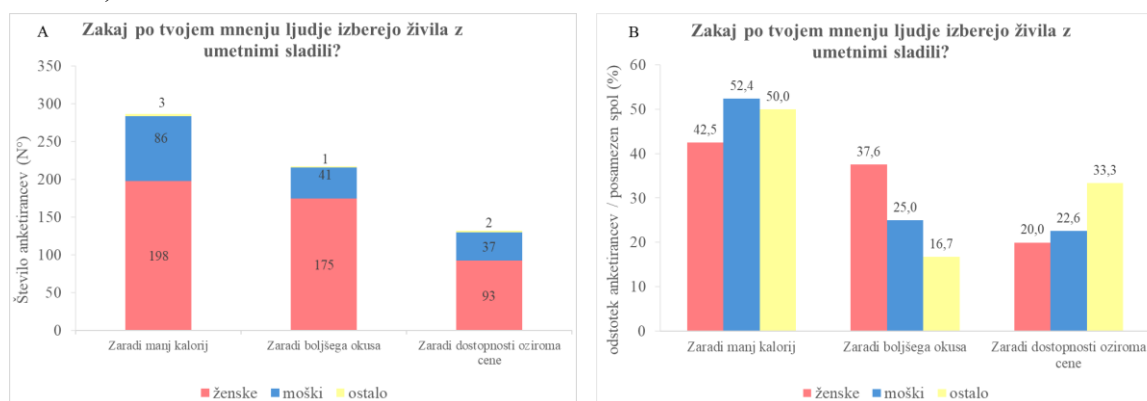
Saharozo je kot bolj škodljivo prepoznalo le 7,2 %, pri čemer je delež pri dijakih (14,6 %) večji kot pri dijakinjah (4,7 %). 54 (8,5 %) jih meni, da nobena izmed naštetih snovi ni škodljiva,



Slika 26: Vprašanje 11: Ali bi se izogibal/-a umetnim sladilom, če bi vedel/-a, da so škodljiva? Legendo glej Slika 18.

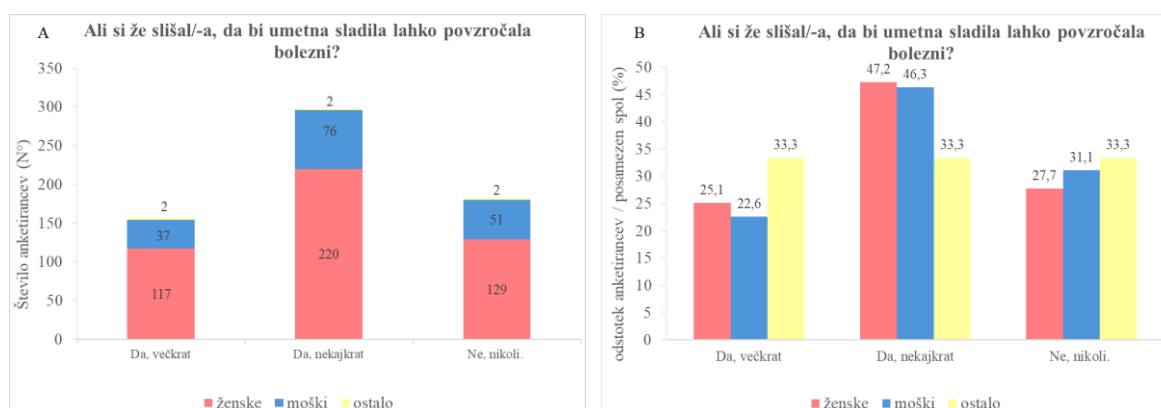
pogosteje pri dijakih (10,4 %) kot dijakinjah (7,7 %). Le 11 anketirancev (1,7 %, med njimi 6 dijakinj in 4 dijaki) meni, da so naravna sladila bolj škodljiva (Slika 25A in Slika 25B).

Rezultati enajstega vprašanja so pokazali, da bi se 378 anketirancev (59,4 %) izogibalo umetnim sladilom, če bi vedeli, da so škodljiva, pri čemer bi 64,2 % dijakinj in 47 % dijakov omejilo njihovo uporabo. 18,9 % vprašanih bi jih popolnoma izločilo iz prehrane, večji delež so predstavljali dijaki (26,2 %) v primerjavi z dijakinjami (16,5 %). 104 (16,4 %) ne bi omejilo uživanja umetnih sladil (18,3 % dijakov in 15,5 % dijakinj). Kljub vedenju, da so škodljiva, se jim ne bi izogibalo 34 (5,3 %), večinoma dijaki (8,5 %) manj dijakinje (3,9 %) (Slika 26A in Slika 26B).



Slika 27: Vprašanje 12: Zakaj po tvojem mnenju ljudje izberejo živila z umetnimi sladili? Legendo glej Slika 18.

Na vprašanje »Zakaj ljudje izberejo živila z umetnimi sladili?« je 45,1 % anketirancev odgovorilo, da je razlog zmanjšana vsebnost kalorij, pri čemer je 52,4 % dijakov in 42,5 % dijakinj izbralo ta razlog. Drugi najpogostejši razlog je izboljššan okus (34,1 %), ki so ga pogosteje navajale dijakinje (37,6 %) kot dijaki (25 %). 20,8 % anketirancev je navedlo dostopnost, ali ugodno ceno umetno slajenih živil, pri čemer ni bilo večjih spolnih razlik (22,6 % dijakov, 20 % dijakinj) (Slika 27A in Slika 27B). Večina anketirancev (454; 71,4 %) je že slišala, da umetna sladila lahko povzročajo zdravstvene težave. 24,5 % je to slišalo večkrat, 46,9 % pa nekajkrat. 28,6 % anketirancev tega še ni slišalo (Slika 28A). Analiza po spolih ni pokazala pomembnih razlik med spoloma (Slika 28B).



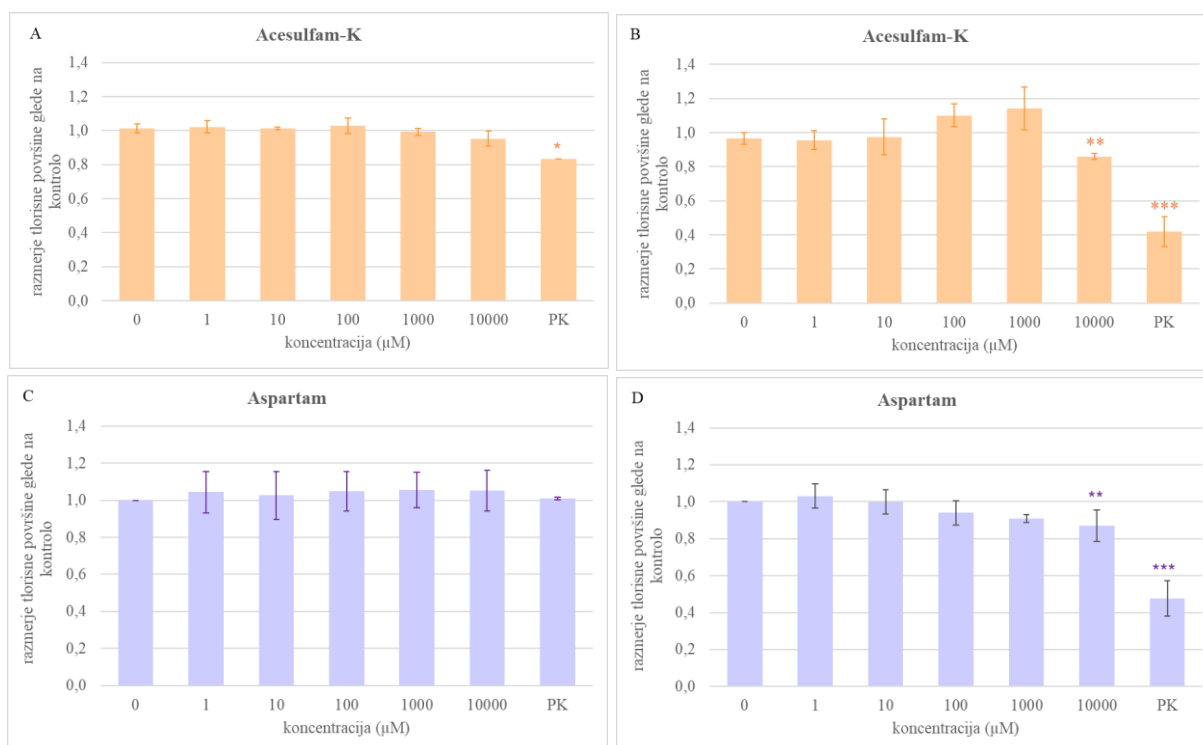
Slika 28: Vprašanje 13: Ali si že slišal/-a, da bi umetna sladila lahko povzročala bolezni (npr. rak, presnovne motnje, sladkorno bolezen)? Legendo glej Slika 18. 23

## 5.2 EKSPERIMENTALNI DEL NALOGE - VPLIV IZBRANIH UMETNIH SLADIL NA ŽIVOST CELIC HEPG2 IN NASTANEK OKSIDATIVNEGA STRESA

V drugem delu raziskovalne naloge smo na 3D jetrnem *in vitro* celičnem modelu človeškega hepatocelularnega karcinoma (celice HepG2) preučili vpliv umetnih sladil, acesulfama-K in aspartama, na velikost tlorisne površine sferoidov, živost celic in na oksidativen stres.

### 5.2.1 Vpliv umetnih sladil acesulfama-K in aspartama na velikost tlorisne površine sferoidov

Vpliv umetnih sladil acesulfama-K in aspartama na rast sferoidov HepG2 smo ocenili s planimetrijo. Velikost tlorisne površine smo merili z napravo Cytation 5 (BioTek, ZDA). Sferoide smo pripravili kot je opisano v poglavju 4.2.3, in izpostavili različnim koncentracijam umetnih sladil za 24 in 96 ur, kot je opisano v poglavju 4.2.4.



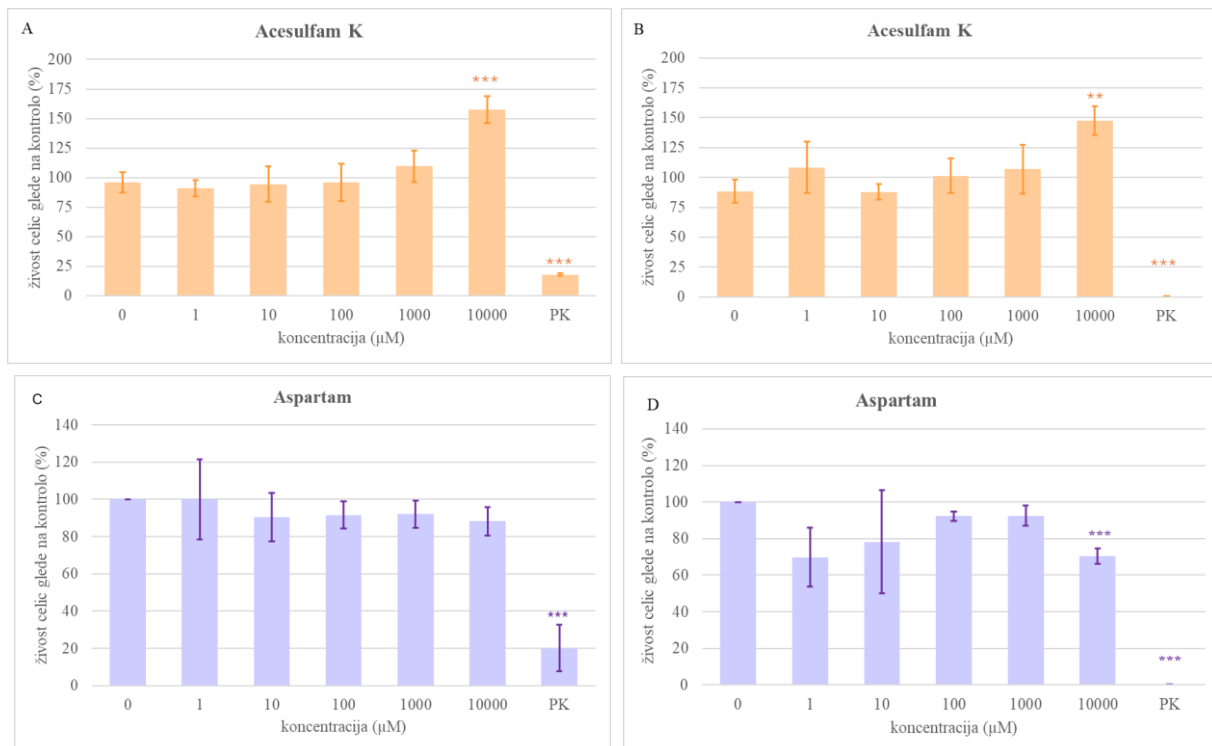
**Slika 29:** Vpliv acesulfama-K in aspartama na tlorisno površino HepG2 sferoidov.

Sferoide smo izpostavili različnim koncentracijam acesulfama-K in aspartama (0, 1, 10, 100, 1000 in 10000 µM) za 24 (A, C) in 96 (B, D) ur. Pozitivna kontrola je na grafu označena s PK (15 % DMSO).

Rezultati so pokazali, da tako acesulfam-K (Slika 29A) kot tudi aspartam (Slika 29C) po 24 urah nista vplivala na velikost tlorisne površine sferoidov. Po 96 urah je pri 1000 µM acesulfama-K prišlo do rahlega povečanja glede na kontrolo, vendar brez statistične značilnosti, medtem ko je pri 10000 µM prišlo do statistično značilnega zmanjšanja velikosti tlorisne površine v primerjavi s kontrolo (Slika 29B). Tudi aspartam je pri 10000 µM zmanjšal velikosti tlorisne površine v primerjavi s kontrolo (Slika 29D). Pozitivna kontrola je statistično značilno zmanjšala površino sferoidov, kar pomeni, da je vplivala na živost oziroma delitev celic.

### 5.2.2 Vpliv umetnih sladil acesulfam-K in aspartam na živost celic HepG2 sferoidov

Po meritvi tlorisne površine sferoidov (poglavje 5.2.1) smo s testom CellTiter-Glo (vsebnost ATP) na istih sferoidih ocenili vpliv acesulfama-K in aspartama na živost celic. Rezultati so pokazali, da je acesulfam-K po 24-urni izpostavitvi povzročil od koncentracije odvisno povečanje ATP v celicah, pri 10000  $\mu\text{M}$  pa je bila zaznana statistično značilna razlika (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ) v primerjavi s kontrolo (1,5-krat povečano vsebnost ATP) (Slika 30A). Po 96 urah izpostavitve je pri tej koncentraciji prav tako prišlo do statistično značilnega povečanja ATP (Slika 30B).



**Slika 30:** Vpliv acesulfama-K in aspartama na živost celic HepG2 v sferoidu.

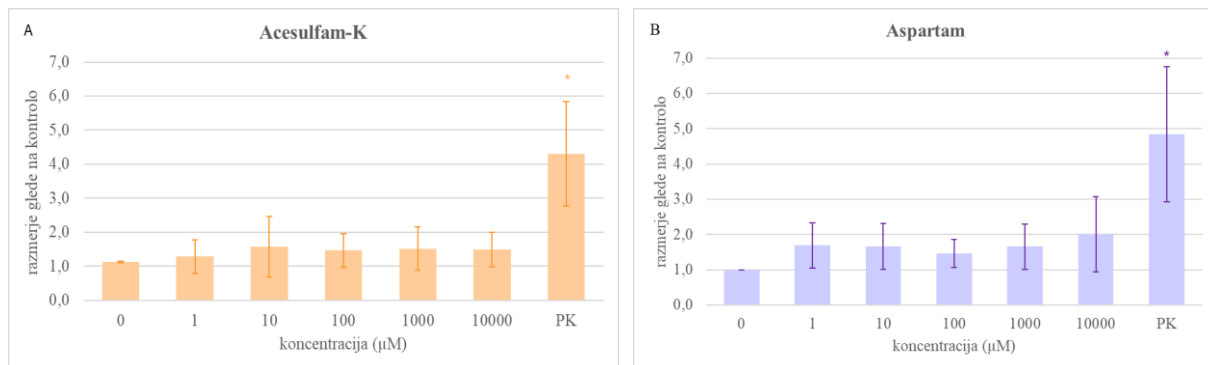
Sferoide smo izpostavili različnim koncentracijam acesulfama-K in aspartama (0, 1, 10, 100, 1000 in 10000  $\mu\text{M}$ ) za 24 (A, C) in 96 (B, D) ur. Pozitivna kontrola je na grafu označena s PK (15 % DMSO).

Aspartam je v nasprotju z acesulfamom-K zmanjšal živost celic HepG2, kar je povzročilo nižjo vsebnost ATP. Po 24-urni izpostavitvi razlika v primerjavi s kontrolo ni bila statistično značilna, vendar je bil opazen trend zmanjšanja celične živosti (Slika 30C). Po 96 urah je aspartam pri 10000  $\mu\text{M}$  statistično značilno znižal živost celic, pri čemer je bilo preživetje celic 70 %  $\pm$  4,3 v primerjavi s kontrolo (Slika 30D) (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). Pozitivna kontrola je značilno znižala živost celic po obeh časovnih izpostavitvah.

### 5.2.3 Vpliv umetnih sladil acesulfama-K in aspartama na nastanek oksidativnega stresa

Vpliv acesulfama-K in aspartama na nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) v sferoidih smo preučevali s testom DCFH-DA. Sferoide, stare 72 ur, smo izpostavili različnim koncentracijam umetnih sladil (0, 1, 10, 100, 1000 in 10000  $\mu\text{M}$ ), nastanek ROS pa smo merili po 180 minutah

inkubacije (Cytation 5). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili Luperox® TBH70X (0,07  $\mu\text{M}$ ). Rezultati so pokazali, da acesulfam-K (Slika 31A) ni statistično značilno povečal nastanka ROS v celicah HepG2 po 180 minutah izpostavitve. Aspartam je rahlo povečal nastanek ROS, vendar razlike v primerjavi s kontrolno skupino niso bile statistično značilne (Slika 31B). Pri koncentraciji 10000  $\mu\text{M}$  smo opazili povišanje ROS za  $2,0 \pm 1,1$ -krat po 180 minutah izpostavitve. Pozitivna kontrola je povzročila statistično značilno povečanje ROS ( $4,8 \pm 1,9$ -krat po 180 minutah).



**Slika 31:** Vpliv acesulfama-K (A) in aspartama (C) na nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti v HepG2 sferoidih po 180 minutah izpostavitve. Pozitivna kontrola je na grafu označena s PK (0,07  $\mu\text{M}$  Luperox® TBH70X).

## 6. RAZPRAVA IN ZAKLJUČEK

Umetna sladila so sintetične spojine, ki se uporabljajo kot nadomestki sladkorja v številnih živilih in pijačah, saj omogočajo sladek okus brez dodatnih kalorij. Vse bolj so prisotna v prehranskih izdelkih, kot so gazirane pijače, slaščice, jogurti in številni drugi izdelki, kar omogoča zmanjšanje vnosa sladkorja, vendar hkrati pomeni, da smo jim dnevno izpostavljeni, pogosto ne da bi se tega zavedali. Čeprav so umetna sladila odobrena kot varna za uživanje (EFSA, 2020), raziskave nakazujejo, da lahko dolgotrajna in ponavljajoča se izpostavljenost vpliva na zdravje. Nekatere študije poročajo o možnih negativnih učinkih, kot so spremembe v črevesni mikrobioti (Ruiz-Ojeda s sod., 2019), vpliv na metabolizem in pojav debelosti (Kossiva s sod., 2024) ter potencialna povezava s sladkorno boleznijo tipa 2 (Fagherazzi s sod., 2013), srčno-žilnimi boleznimi in morda celo nekaterimi vrstami raka. Zato je ključno, da so mladi ozaveščeni o morebitnih tveganjih ponavljajoče se uporabe umetnih sladil.

V anketi o umetnih sladilih, ki je zajela 636 dijakov iz sedmih slovenskih gimnazij, je 73,3 % anketirancev predstavljalo dijakinje, 25,8 % dijaki, preostali (0,9 %) pa so se opredelili kot »drugi«. V analizi smo slednje sicer upoštevali (< 1 %), vendar njihovih odgovorov nismo podrobneje obravnavali. Anketa je vključevala vprašanja o osnovnih demografskih podatkih (gimnazija, spol in starost), navadah uživanja hrane in pijače z umetnimi sladili ter o zavedanju vplivov umetnih sladil na zdravje človeka.

Pri večini anketirancev se je pokazalo, da so umetna sladila pogosto vključena v njihov vsakdanji jedilnik, saj so mnogi navedli, da uživajo izdelke z umetnimi sladili večkrat na teden. To lahko pripišemo široki uporabi umetnih sladil v številnih vsakodnevnih živilih, kot so pijače, jogurti in drugi predelani izdelki, ki so priljubljeni med mladostniki. Poleg tega so nekateri navedli, da jih uživajo skoraj vsak dan, kar kaže na to, da so umetna sladila postala običajen del prehranjevalnih navad. Po drugi strani pa je manjši del anketirancev navedel, da umetnih sladil ne uživajo, kar lahko pomeni, da so nekateri bolj pozorni na sestavine v prehrani, ali pa so preprosto izbrali naravne alternative oziroma se sploh ne zavedajo, da uživajo hrano z umetnimi sladili. Večina anketirancev namreč ni posebej pozorna na informacije o vsebnosti umetnih sladil na embalaži izdelkov. To lahko kaže na pomanjkanje zanimanja ali zavesti o vplivih teh sladil, saj mnogi preprosto ne preverjajo sestavin. Le majhen delež anketirancev redno spremlja tovrstne informacije, kar kaže na nizko stopnjo zavedanja o možnih tveganjih, povezanih z umetnimi sladili. Rezultati niso presenetljivi, saj so mladi pogosto manj pozorni na podrobnosti embalaže.

Najpogosteje uživani izdelki z umetnimi sladili so bonboni in žvečilni gumiji, kar kaže na priljubljenost sladkarij med mladimi, kljub morebitnim tveganjem. Prav tako so brezalkoholne pijače pogosto na seznamu izbire, čeprav v nekoliko manjšem obsegu. To potrjuje ugotovitve prejšnjih raziskav, ki kažejo, da mladi pogosto posegajo po sladkih pijačah z umetnimi sladili. Delež anketirancev, ki sploh ne uživa hrane ali pijače z umetnimi sladili, nakazuje, da obstaja skupina mladih, ki se tem snovem izogiba zaradi morebitnih zdravstvenih tveganj, ali pa so zanje bolj ozaveščeni. Presenetljivo ni bilo večjih razlik med spoloma, kar pomeni, da dekleta in fantje enako pogosto uživajo izdelke z umetnimi sladili.

Večina anketirancev meni, da umetna sladila negativno vplivajo na zdravje, kar nakazuje zaskrbljenost med dijaki glede njihovih morebitnih škodljivih učinkov, čeprav ostali odgovori ankete tega stališča ne podpirajo v celoti. Ta skrb je lahko posledica pomanjkanja celovitih informacij o dolgoročnih učinkih teh snovi. Le majhen delež anketirancev meni, da umetna sladila nimajo vpliva, ali pa imajo pozitiven učinek, kar kaže na nezadostno ozaveščenost o njihovem delovanju. Večina mladih ne išče informacij o vplivu umetnih sladil na zdravje, kar lahko kaže na pomanjkanje interesa ali izpostavljenosti tej temi. Tisti, ki iščejo informacije, se najpogosteje zatečejo k internetu, manj pa k staršem, prijateljem ali šoli, kar kaže na potrebo po večjem vključevanju te teme v izobraževalni proces.

Pri vprašanju, katera snov je umetno sladilo, so dijaki najpogosteje izbrali glukozo, čeprav gre v resnici za preprost sladkor, ne pa umetno sladilo. Ta odgovor je presenetljiv in nekoliko nepričakovan, saj bi pričakovali, da so gimnazijci seznanjeni z osnovnimi informacijami o

glukozi, ki je naravno prisoten v telesu in ključnega pomena za energijo celic. Glukoza ni umetno sintetizirana in ne spada med umetna sladila. Le malo anketirancev je prepoznalo aspartam kot umetno sladilo, kar je presenetljivo, saj gre za eno najbolj znanih sladil. Ta pomanjkljivost v prepoznavanju je v skladu z dejstvom, da dijaki redko iščejo informacije o umetnih sladilih, ali preverjajo njihove vsebnosti v hrani in pijači. Čeprav večina anketirancev meni, da uživa hrano z umetnimi sladili, jih ne zna prepoznati. Razkorak med porabo in ozaveščenostjo kaže na potrebo po boljšem izobraževanju o teh snoveh. Poleg tega je stevia, naravno sladilo, ki je pogosto napačno obravnavano kot umetno, izbrana kot umetno sladilo, kar kaže na zmedo med naravnimi in umetnimi sladili. To je lahko posledica obdelave stevie v komercialnih izdelkih ali marketinških pristopih, ki jo povezujeta z zdravimi alternativami sladkorju, kar lahko vpliva na prepoznavanje sladil. Potrebno je bolj jasno ločevanje med naravnimi in umetnimi sladili ter zagotavljanje natančnejših informacij za potrošnike.

Mnenja dijakov o umetnih sladilih so mešana, kar je povezano z različnimi dejavniki, kot so pomanjkanje informacij, vpliv trženja in zaskrbljenost glede zdravja. Večina dijakov o umetnih sladilih sploh ne razmišlja, kar odraža pomanjkanje interesa. Kljub temu pa nekateri menijo, da so škodljiva, medtem ko jih skoraj četrtina uporablja, ne da bi se preveč obremenjevali z njihovimi učinki. Zanimivo je, da bi se mnogi izognili umetnim sladilom, če bi vedeli, da so škodljiva, kar nakazuje, da bi večje ozaveščanje lahko vplivalo na njihove prehranjevalne navade. Ko gre za izbiro živil z umetnimi sladili, je večina dijakov izbrala živila zaradi nižjih kalorij, kar je lahko marketinški vpliv. Okus je prav tako pomemben dejavnik, medtem ko so stroški v tem primeru manj pomembni, saj so dijaki bolj osredotočeni na okus in kalorije kot na ceno, kljub temu da izdelki z umetnimi sladili pogosto niso bistveno cenejši. Kar zadeva zavedanje o tveganjih umetnih sladil, je skoraj polovica anketirancev že slišala, da umetna sladila lahko povzročajo bolezni, vendar tretjina še ni naletela na takšne informacije, kar ponovno kaže na pomanjkanje znanja. Za izboljšanje ozaveščenosti bi bilo potrebno vključiti te teme v izobraževalne programe, da bi dijaki bolje razumeli vrste sladil in njihove vplive, predvsem dolgoročne, na zdravje.

V drugem delu raziskave smo preučili vpliv dveh umetnih sladil, acesulfama-K in aspartama, na *in vitro* 3D jetrnem celičnem modelu (sferoid celic HepG2), s poudarkom na spremembah velikosti tlorisne površine, živosti celic in nastanku oksidativnega stresa. Rezultati so razkrili pomembne vpogled v celične odzive na izpostavljenost tem sladilom, pri čemer smo opazili razlike v mehanizmih delovanja posameznih spojin.

Rezultati so pokazali, da acesulfam-K po krajšem času ni vplival na velikost sferoidov, vendar pa je po dolgotrajnejši izpostavitvi (96 ur) pri visokih koncentracijah zmanjšal tlorisno

površino, kar nakazuje na morebitne spremembe v celičnem metabolizmu ali celični delitvi oziroma proliferaciji. V nasprotju s tem aspartam ni povzročil statistično značilnih sprememb v velikosti sferoidov. Pri oceni živosti celic je acesulfam-K povzročil povečanje ATP, kar lahko kaže na povišano celično presnovo, medtem ko je aspartam pri visokih koncentracijah povzročil zmanjšanje ATP, kar nakazuje na citotoksičnost. Nobeno od sladil ni povzročilo oksidativnega stresa, čeprav smo pri višjih koncentracijah opazili trend povišanja ROS pri aspartamu. Ti rezultati so ključni za nadaljnje ocenjevanje varnosti umetnih sladil, zlasti pri dolgotrajni izpostavitvi in visokih koncentracijah.

Če povzamemo izsledke raziskave, lahko rečemo, da so nadaljnje raziskave nujno potrebne za celovito razumevanje dolgoročnih učinkov umetnih sladil na celične funkcije in vpliva na zdravje predvsem po ponavljajoči se dolgodobni izpostavitvi. Čeprav so umetna sladila odobrena kot varna, naši rezultati in druge raziskave nakazujejo, da lahko dolgotrajna izpostavljenost vpliva na celični metabolizem in vitalnost. Ker so ta sladila vse bolj prisotna v prehrani, je ključno, da nadaljnje študije raziščejo njihove dolgoročne učinke in možne povezave z razvojem kroničnih bolezni. Le s poglobljenim znanstvenim pristopom in ozaveščanjem potrošnikov lahko zagotovimo varnejše prehranske izbire v prihodnosti.

## **7. SKLEPI IN HIPOTEZE**

**Hipoteza 1: Gimnazijski dijaki se zanimajo za problematiko umetnih sladil.**

Na podlagi odgovorov ankete lahko ugotovimo, da skoraj polovica dijakov (48,6 %) ne išče informacij o umetnih sladilih, prav tako jih 43,7 % ne išče dodatnih podatkov o tej temi. Poleg tega jih je le 4,6 % pravilno prepoznalo aspartam kot umetno sladilo, kar nakazuje na pomanjkanje ozaveščenosti in interesa za to problematiko. Ti zaključki kažejo nizko stopnjo zanimanja za problematiko umetnih sladil, zato **Hipotezo 1 OVRŽEMO**.

**Hipoteza 2: Gimnazijski dijaki pogosto preverjajo vsebnosti umetnih sladil v hrani in pijači, ki jo uživajo.**

Rezultati ankete kažejo, da 70 % dijakov (skupaj 439 anketirancev) redko ali nikoli ne preverja vsebnosti umetnih sladil na embalaži živil. To kaže na nizko stopnjo ozaveščenosti o prisotnosti teh snovi v prehrani in potrjuje, da dijaki temu vidiku prehranjevanja ne posvečajo posebne pozornosti. Na podlagi teh zaključkov lahko **Hipotezo 2 OVRŽEMO**.

**Hipoteza 3: Gimnazijski dijaki so dobro ozaveščeni o škodljivem delovanju umetnih sladil na zdravje človeka.**

Rezultati ankete kažejo, da večina dijakov umetna sladila dojema kot škodljiva (82,5 % jih meni, da so bolj škodljiva kot saharoza), vendar njihovo poznavanje mehanizmov delovanja in specifičnih učinkov ostaja omejeno. Kljub temu, da bi se 59,4 % anketirancev umetnim sladilom izogibalo, če bi vedeli, da so škodljiva, kar 16,4 % ne bi spremenilo prehranskih navad, 5,3 % pa bi jih še naprej uživalo. Ti podatki kažejo na pomanjkljivo razumevanje razsežnosti tveganj ter potrebo po boljšem informiranju dijakov o vplivih umetnih sladil na zdravje. Na podlagi teh informacij lahko zaključimo, da je **Hipoteza 3 je DELNO POTRJENA**, saj rezultati kažejo, da dijaki umetna sladila dojemajo kot škodljiva, vendar njihovo znanje o specifičnih učinkih in mehanizmih delovanja ostaja omejeno.

**Hipoteza 4: Umetni sladili acesulfam-K in aspartam vplivata na živost celic HepG2 sferoidov.**

Rezultati so pokazali, da je acesulfam-K zmanjšal velikost sferoidov in povečal vsebnost ATP v celicah, kar kaže na spremembe v celični presnovi, medtem ko je aspartam zmanjšal vsebnost ATP, kar nakazuje rahle citotoksične učinke. Tako je **Hipoteza 4 POTRJENA**, saj sta acesulfam-K in aspartam vplivala na živost celic HepG2 sferoidov, vendar na različne načine - acesulfam-K je spremenil metabolizem, medtem ko je aspartam povzročil rahle citotoksične učinke.

**Hipoteza 5: Umetni sladili acesulfam-K in aspartam povzročata oksidativen stres v celicah HepG2 sferoidov.**

Nobeno od proučevanih umetnih sladil ni povzročilo statistično značilnega oksidativnega stresa v HepG2 sferoidih. Pri aspartamu smo sicer opazili trend povišanja reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), vendar ta učinek ni bil statistično značilen. **Hipotezo 5 OVRŽEMO**, saj acesulfam-K in aspartam v eksperimentalnih pogojih nista povzročila statistično značilnega oksidativnega stresa v celicah HepG2 sferoidov.

**Hipoteza 6: Umetni sladili acesulfam-K in aspartam imata različen vpliv na celične funkcije tridimenzionalnega (3D) jetrnega in vitro modela celic HepG2**

Acesulfam-K je zmanjšal velikost HepG2 sferoidov in povečal vsebnost ATP, kar kaže na spremembe v celičnem metabolizmu. Aspartam je zmanjšal vsebnost ATP, kar nakazuje na rahle citotoksične učinke. Nobeno od proučevanih umetnih sladil ni povzročilo statistično značilnega oksidativnega stresa, čeprav smo pri aspartamu opazili trend povišanja reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Na podlagi eksperimentalnih rezultatov lahko **Hipotezo 6 POTRDIMO**, saj sta acesulfam-K in aspartam vplivala na celične funkcije HepG2 sferoidov na različne načine.

## 8. LITERATURA

- Angelin M, Kumar J, Vajravelu LK, Satheesan A, Chaithanya V, Murugesan R. Artificial sweeteners and their implications in diabetes: a review. *Front Nutr* 2024;11:1411560.
- Bigal ME, Krymchantowski A V. Migraine triggered by sucralose—a case report. *Headache J Head Face Pain* 2006;46:515–7.
- Chattopadhyay S, Raychaudhuri U, Chakraborty R. Artificial sweeteners—a review. *J Food Sci Technol* 2014;51:611–21.
- Choudhary AK, Lee YY. Neurophysiological symptoms and aspartame: What is the connection? *Nutr Neurosci* 2018;21:306–16.
- Clauss K, Jensen H. Oxathiazinone Dioxides—A New Group of Sweetening Agents. *Angew Chemie Int Ed English* 1973;12:869–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.197308691>.
- Debras C, Srour EC, Druesne- N, Gigandet, Huybrechts I, Sa A De, et al. Artificial sweeteners and cancer risk : Results from the NutriNet-Sante cohort study. *Plos Med* 2022:1–20.
- Ebbeling CB, Feldman HA, Steltz SK, Quinn NL, Robinson LM, Ludwig DS. Effects of sugar-Sweetened, artificially Sweetened, and Unsweetened beverages on cardiometabolic risk factors, body composition, and sweet taste preference: a randomized controlled trial. *J Am Heart Assoc* 2020;9:e015668.
- EFSA. Re-evaluation of saccharin and its sodium, potassium and calcium salts (E 954) as food additives. *EFSA J* 2024;22:e9044.
- EFSA. Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food). Scientific opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive. *EFSA J*. 2013; 11: 263. Kass and Lodi. *Arch Public Heal* 2020;78:2.
- EFSA. Neotame as a sweetener and flavour enhancer-Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food. *EFSA J* 2007;5:581.
- EFSA. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to a new long-term carcinogenicity study on aspartame. *EFSA J* 2006;4:356.
- Emamat H, Ghalandari H, Tangestani H, Abdollahi A, Hekmatdoost A. Artificial sweeteners are related to non-alcoholic fatty liver disease: Microbiota dysbiosis as a novel potential mechanism. *Excli J* 2020;19:620.
- Fagherazzi G, Vilier A, Sartorelli DS, Lajous M, Balkau B, Clavel-Chapelon F. Consumption of artificially and sugar-sweetened beverages and incident type 2 diabetes in the Etude Epidemiologique aupres des femmes de la Mutuelle Generale de l'Education Nationale–European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Am J Clin Nutr* 2013;97:517–23.
- Fontana F, Raimondi M, Marzagalli M, Sommariva M, Gagliano N, Limonta P. Three-dimensional cell cultures as an in vitro tool for prostate cancer modeling and drug discovery. *Int J Mol Sci* 2020;21:6806.
- Goldsmith LA. Acute and subchronic toxicity of sucralose. *Food Chem Toxicol* 2000;38:53–69.
- Gujral J, Carr J, Tonucci D, Darwen C, Grotz VL. Use of sucralose in foods heated during manufacturing does not pose a risk to human health. *Toxicol Res Appl* 2021;5.
- Gupta C, Prakash D, Gupta S, Goyal S. Role of low calorie sweeteners in maintaining dental health. *Middle East J Sci Res* 2012;11:342–6.
- Hodge AM, Bassett JK, Milne RL, English DR, Giles GG. Consumption of sugar-sweetened and artificially sweetened soft drinks and risk of obesity-related cancers. *Public Health Nutr* 2018;21:1618–26.
- Iizuka K. Is the Use of Artificial Sweeteners Beneficial for Patients with Diabetes Mellitus? The Advantages and Disadvantages of Artificial Sweeteners. *Nutrients* 2022;14:4446.

Kossiva L, Kakleas K, Christodouli F, Soldatou A, Karanasios S, Karavanaki K. Chronic Use of Artificial Sweeteners : Pros and Cons 2024;1–16.

Kroger M, Meister K, Kava R. Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2006;5:35–47.

Lambert N, Rostock C, Hetland S. Environmental risks associated to plasticizers and sweeteners in the Nordic countries. Nord Screen Group, Bergfald Miljørådgivere, Oslo 2010.

Lewis K, Tzilivakis J. Review and synthesis of data on the potential environmental impact of artificial sweeteners. *EFSA Support Publ* 2021;18:6918E.

Luo BW, Liang NL, Townsend JA, Lo ECM, Chu CH, Duangthip D. Sugar substitutes on caries prevention in permanent teeth among children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *J Dent* 2024:105069.

Mohammadpour A, Arjmand S, Lotfi AS, Tavana H, Kabir-Salmani M. Promoting hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using a novel laminin-containing gelatin cryogel scaffold. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;507:15–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.121>.

Nadolsky KZ. COUNTERPOINT: Artificial Sweeteners for Obesity—Better than Sugary Alternatives; Potentially a Solution. *Endocr Pract* 2021;27:1056–61.

Naomi ND, Ngo J, Brouwer-Brolsma EM, Buso MEC, Soedamah-Muthu SS, Pérez-Rodrigo C, et al. Sugar-sweetened beverages, low/no-calorie beverages, fruit juice and non-alcoholic fatty liver disease defined by fatty liver index: the SWEET project. *Nutr Diabetes* 2023;13:6.

Nofre C, Tinti J-M. Neotame: discovery, properties, utility. *Food Chem* 2000;69:245–57.

Otabe A, Fujieda T, Masuyama T, Ubukata K, Lee C. Advantame – An overview of the toxicity data. *Food Chem Toxicol* 2011;49:S2–7.

Patel C, Kumaresan S. Artificial sweeteners - A review. *Int J Community Dent* 2022;10:13–7. <https://doi.org/10.56501/intjcommunitydent.v10i1.41>.

Pavanello S, Moretto A, La C, Alicandro G. Non-sugar sweeteners and cancer : Toxicological and epidemiological evidence. *Regul Toxicol Pharmacol* 2023;139:105369.

Del Pozo S, Gómez-Martínez S, Díaz LE, Nova E, Urrialde R, Marcos A. Potential effects of sucralose and saccharin on gut microbiota: a review. *Nutrients* 2022;14:1682.

Promega. CellTiter-Glo ® Luminescent Cell Viability Assay Cell Viability Assay 2023:1–39.

Renwick AG, Thompson JP, O'shaughnessy M, Walter EJ. The metabolism of cyclamate to cyclohexylamine in humans during long-term administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;196:367–80.

Ringel NE, Hovey KM, Andrews CA, Mossavar-Rahmani Y, Shadyab AH, Snetselaar LG, et al. Association of Artificially Sweetened Beverage Consumption and Urinary Tract Cancers in the Women's Health Initiative Observational Study. *Eur Urol Open Sci* 2023;47:80–6.

Ruiz-Ojeda FJ, Plaza-Díaz J, Sáez-Lara MJ, Gil A. Effects of sweeteners on the gut microbiota: a review of experimental studies and clinical trials. *Adv Nutr* 2019;10:S31–48.

Saraiva A, Carrascosa C, Raheem D, Ramos F, Raposo A. Natural sweeteners: The relevance of food naturalness for consumers, food security aspects, sustainability and health impacts. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17:6285.

Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 2002;519:103–19.

Satyavathi K, Raju P, Bupesh K V, Kiran TNR. Neotame: High intensity low caloric sweetener. *Asian J Chem* 2010;22:5792–6.

SCF. Opinion on saccharin and its sodium, potassium and calcium salts. *Eur Comm* 1997.

Scheurer M, Brauch H, Lange FT. Transformation products of artificial sweeteners. *Transform Prod Emerg Contam Environ* 2014;525–44.

Schiano C, Grimaldi V, Scognamiglio M, Costa D, Soricelli A, Francesco G, et al. Soft drinks and sweeteners intake : Possible contribution to the development of metabolic syndrome and cardiovascular diseases . Beneficial or detrimental action of alternative sweeteners ? *Food Res Int* 2021;142:110220.

Schoenig GP, Anderson RL. The effects of high dietary levels of sodium saccharin on mineral and water balance and related parameters in rats. *Food Chem Toxicol* 1985;23:465–74.

Shankar P, Ahuja S, Sriram K. Non-nutritive sweeteners: review and update. *Nutrition* 2013;29:1293–9.

Shrivastava AK, Singh P. *Sugar and Sugar Derivatives: Changing Consumer Preferences* 2020.

Siervo M, Montagnese C, Mathers JC, Soroka KR, Stephan BCM, Wells JCK. Sugar consumption and global prevalence of obesity and hypertension: an ecological analysis. *Public Health Nutr* 2014;17:587–96.

Singh P, Ban YG, Kashyap L, Siraree A, Singh J. Sugar and sugar substitutes: recent developments and future prospects. *Sugar Sugar Deriv Chang Consum Prefer* 2020:39–75.

Soffritti M, Padovani M, Tibaldi E et al, Falcioni L, Manservigi F, Lauriola M, et al. Sucralose administered in feed, beginning prenatally through lifespan, induces hematopoietic neoplasias in male swiss mice. *Int J Occup Environ Health* 2016;22:7.

van Spronsen FJ, Blau N, Harding C, Burlina A, Longo N, Bosch AM. Phenylketonuria. *Nat Rev Dis Prim* 2021;7:36.

Štampar M, Žegura B. In vitro hepatic 3D cell models and their application in genetic toxicology: A systematic review. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 2024:503835.

Suez J, Cohen Y, Valdés-Mas R, Mor U, Dori-Bachash M, Federici S, et al. Personalized microbiome-driven effects of non-nutritive sweeteners on human glucose tolerance. *Cell* 2022;185:3307–28.

US National Toxicology Program N. Substances Delisted from the Report on Carcinogens. 15th Rep. *Carcinog.* [Internet], National Toxicology Program; 2021.

Walbolt J, Koh Y. Non-nutritive sweeteners and their associations with obesity and type 2 diabetes. *J Obes Metab Syndr* 2020;29:114.

Whitehouse CR, Boullata J, McCauley LA. The potential toxicity of artificial sweeteners. *AaohnJ* 2008;56:251–9.

WHO. Steering Group, Guideline Development, Use of non-sugar sweeteners: WHO guideline. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240073616> 2023.

## Priloga 1: A

### Anketa "Umetna sladila"

#### 1. Spol

- A) Ženski      B) Moški      C) Drugo

#### 2. Starost

- A) Do 16 let      B) 16-17 let      C) 18-20 let

#### 3. Kolikokrat na teden zaužiješ hrano ali pijačo, ki vsebuje umetna sladila?

- A) Nikoli      B) 1-2-krat      C) 3-5-krat      D) Več kot 5-krat

#### 4. Na embalaži hrane in pijače vedno preverim vsebnost umetnih sladil. (1 – se popolnoma ne strinjam, 5 – se popolnoma strinjam)

1 \_\_\_\_\_ 2 \_\_\_\_\_ 3 \_\_\_\_\_ 4 \_\_\_\_\_ 5 \_\_\_\_\_

#### 5. Katere vrste hrane ali pijače z umetnimi sladili najpogosteje uživaš?

- A) Brezalkoholne pijače (npr. dietne pijače: *zero sugar, light, diet*).  
B) Bonbone oziroma žvečilne gumije.  
C) Energijske oziroma športne pijače.  
D) Ne uživam hrane ali pijače z umetnimi sladili.

#### 6. Kako misliš, da umetna sladila vplivajo na tvoje zdravje?

- A) Zelo negativno      B) Nekoliko negativno      C) Nimajo vpliva  
D) Nekoliko pozitivno      E) Zelo pozitivno

#### 7. Kateri vir najpogosteje uporabljaš za informacije o vplivu umetnih sladil na zdravje?

- A) Internet      B) Šola ali učitelji  
C) Starši ali prijatelji      D) Ne iščem informacij o tem

#### 8. Katera izmed spodaj naštetih snovi je umetno sladilo?

- A) Aspartam      B) Glukoza      C) Stevia      D) Maltoza

#### 9. Katera izmed spodnjih izjav najbolje opiše tvoje razmišljanje o umetnih sladilih?

- A) Izogibam se jim, ker menim, da so škodljiva.  
B) Uporabljam jih, ker menim, da so boljše od sladkorja.  
C) Uporabljam jih, vendar se ne obremenjujem z vplivom na zdravje.  
D) Ne razmišljam o tem.

#### 10. Kaj meniš, da je bolj škodljivo za zdravje?

- A) Umetna sladila      B) Naravna sladila  
C) Običajen sladkor (saharoza)      D) Vsi so neškodljivi.

#### 11. Ali bi se izogibal/-a umetnim sladilom, če bi vedel/-a, da so škodljiva?

- A) Da, popolnoma      B) Morda delno      C) Verjetno ne      D) Ne.

#### 12. Zakaj po tvojem mnenju ljudje izberejo živila z umetnimi sladili?

- A) Zaradi manj kalorij      B) Zaradi boljšega okusa  
C) Zaradi dostopnosti oziroma cene.

#### 13. Ali si že slišal/-a, da bi umetna sladila lahko povzročala bolezni (npr. rak, presnovne motnje, sladkorno bolezen)?

- A) Da, večkrat      B) Da, nekajkrat      C) Ne, nikoli.