

Utjecaj steviol glikozida na apsorpciju etanola u štakora

Zekan, Paulo

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:148140>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Paulo Zekan

Utjecaj steviol glikozida na apsorpciju etanola u
štakora

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Alenke Boban Blagaić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./2019.

POPIS KRATICA

ADH	alkohol dehidrogenaza
ALDH	aldehid dehidrogenaza
AUC	površina ispod krivulje (eng. <i>area under curve</i>)
BEC	koncentracija etanola u krvi (eng. <i>blood ethanol concentration</i>)
EEK	enteroendokrine stanice
GLP-1	glukagonu sličan peptid-1 (eng. <i>glucagon-like peptide-1</i>)
i.g.	intragstričan
i.v.	intravenski
v/v	volumni udio

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Etanol i metabolizam etanola	1
1.2. Utjecaj želučanog pražnjenja na apsorpciju etanola	2
1.3. Zasladaivači	3
1.3.1. Steviol glikozidi	3
1.3.2. Ciklamat	3
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	5
2.1. Opći cilj rada	5
2.2. Specifični ciljevi rada	5
3. MATERIJALI I METODE	6
3.1. Eksperimentalne životinje	6
3.2. Alkoholne otopine	6
3.3. Uzorkovanje krvi i određivanje koncentracije etanola u krvi	6
3.4. Farmakokinetički parametri	7
3.5. Statistička analiza	7
3.6. Etička načela	8
4. REZULTATI	9
5. RASPRAVA	11
6. ZAKLJUČAK	12
7. ZAHVALE	13
8. POPIS LITERATURE	14
9. SAŽETAK	17
10. ABSTRACT	18
11. ŽIVOTOPIS	19

1. UVOD

Niskokalorični napitci su zaslađeni s umjetnim niskokaloričnim zaslađivačima poput aspartama (primjerice u *Coca Cola Zero*) ili, u novije vrijeme, sa sve popularnijim prirodnim niskokaloričnim zaslađivačem steviol glikozidima (primjerice u *Coca Cola Green*). Obje se vrste niskokaloričnih napitaka koriste i u pripremi raznih alkoholnih koktela. Utjecaj umjetnih niskokaloričnih zaslađivača na apsorpciju etanola u eksperimentalnih životinja i čovjeka već je opisan u znanstvenoj literaturi, za razliku od učinaka prirodnih niskokaloričnih zaslađivača. Farmakokinetičke promjene u apsorpciji etanola, koje nastaju kao posljedica različitih vrsta sladila u napitcima, upućuju na mogućnost da bi kod ljudi koji konzumiraju isti tip alkoholnog koktela, vrsta zaslađivača mogla biti od značajne važnosti u njihovom svakodnevnom životu, poput sposobnosti upravljanja motornim vozilima. Stoga se u ovom radu po prvi put ispituje učinak steviol glikozida na apsorpciju etanola u štakora, a dobiveni učinci su uspoređivani s učincima umjetnog zaslađivača ciklamata i visokokaloričnog sladila saharoze.

1.1. Etanol i metabolizam etanola

Konzumacija alkohola poznata je ljudima još od 10 000 godina prije Krista i nastavila se sve do današnjeg dana. Alkoholna pića razlikuju se po volumnom udjelu etanola kojeg sadrže – primjerice od oko 12 posto u vinima do 40 i više posto u žestokim pićima.

Tijekom uobičajene, oralne konzumacije alkohola, apsorpcija etanola u sistemsku cirkulaciju je jako brza i doseže maksimalnu koncentraciju oko 30 minuta nakon konzumacije. Apsorpcija se primarno događa u proksimalnom jejunumu procesom jednostavne difuzije koja je ovisna o koncentracijskom gradijentu (Bruton, Chabner, and Knollman 2011).

U organizmu se etanol metabolizira u acetaldehid i octenu kiselinu. Prvo se etanol oksidira u acetaldehid posredstvom enzima alkohol dehidrogenaze (ADH), a zatim se acetaldehid posredstvom enzima aldehid dehidrogenaze (ALDH) oksidira u octenu kiselinu. Metabolizam etanola odvija se primarno u jetri, ali i u želucu. Naime, osim u hepatocitima enzim ADH izražen je i u stanicama želučane sluznice, pa se već u želucu etanol razgrađuje u acetaldehid, što doprinosi i metabolizmu prvog prolaska etanola (Bruton, Chabner, and Knollman 2011).

Udio etanola metaboliziranog u želucu pod djelovanjem želučane ADH kreće se od 20-80%, a ovisi o dozi etanola. Smanjenje bioraspoloživosti etanola kod intragastrične (i.g.) primjene u odnosu na intravensku (i.v.) primjenu poglavito je prisutno kod malih doza etanola (< 3 g/kg). Naime, pri primjeni većih doza udio etanola metaboliziranog u želucu se smanjuje zbog toga što ADH ima kinetiku nultog reda neovisnu o koncentraciji etanola (Julkunen et al. 1985).

Za oksidaciju etanola u metaboličke produkte enzimi ADH i ALDH zahtijevaju prisutnost NAD⁺ kofaktora. Upravo zbog ograničene dostupnosti NAD⁺, eliminacija etanola prati kinetiku nultog reda tj. ovisnost koncentracije etanola u krvi o vremenu je linearna (Bruton, Chabner, and Knollman 2011).

1.2. Utjecaj želučanog pražnjenja na apsorpciju etanola

Pražnjenjem želuca obrok iz želuca odlazi u duodenum, a cijeli je proces kontroliran tonusom piloričnog sfinktera. Molekularni mehanizam želučanog pražnjenja uključuje primarno hormone grelin i glukagonu-sličan peptid 1 (GLP-1, eng. *glucagon-like peptide 1*), gdje grelin potiče kontrakcije želuca i relaksaciju sfinktera, a GLP-1 radi suprotno. Osim toga u kontroli želučanog pražnjenja sudjeluju i signali koji enteričkim živčanim sustavom iz crijeva dolaze u želudac (Jacobsson 2006). Smatra se da je jedna od osnovnih uloga pražnjenja želuca osiguravanje konstantnog dotoka glukoze u tanko crijevo odnosno sistemsku cirkulaciju, stoga na taj način želučano pražnjenje sudjeluje u homeostazi glukoze u krvi (Holst et al. 2016). Također, želučano pražnjenje osigurava konstantan dotok kalorija iz želuca u duodenum (Hunt and Stubbs 1975; Brener, Hendrix, and Mchugh 1983).

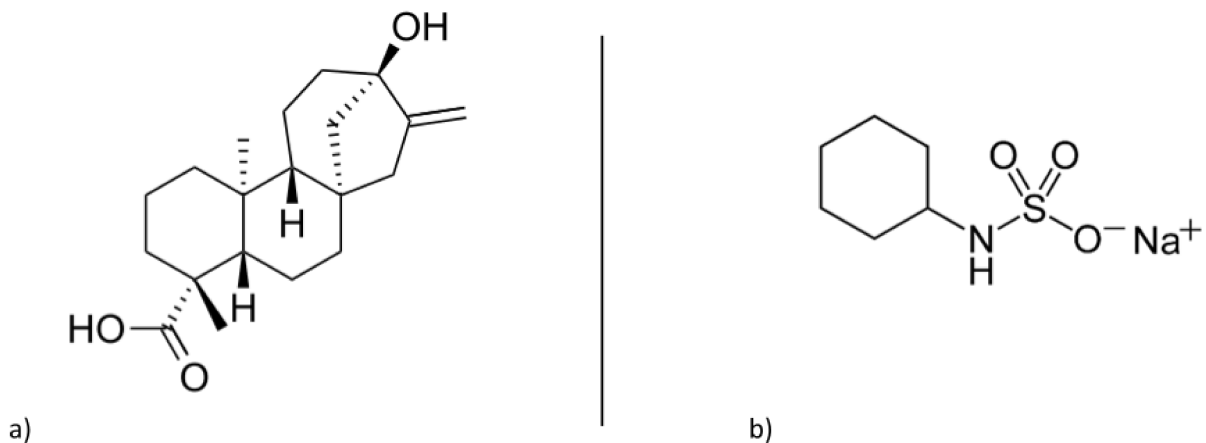
Zbog ekspresije ADH na sluznici želuca, metabolizam prvog prolaska etanola započinje već u želucu i proporcionalan je vremenu koje on provede u želucu nakon konzumacije. Stoga bioraspoloživost etanola ovisi o brzini pražnjenja želuca u duodenum (Oneta et al. 1998). Također, pražnjenjem želuca kontrolira se i brzina apsorpcije etanola jer se etanol u portalnu cirkulaciju primarno asporbira u proksimalnom jejunumu, čija je površine sluznice puno veća u odnosu na sluznicu želuca (DiPadova et al. 1987; Julkunen et al. 1985; Caballeria et al. 1989).

Do sada je provedeno nekoliko istraživanja na području farmakokinetike etanola u kojima se dobiveni rezultati tumače mehanizmom želučanog pražnjenja. U jednoj humanoj studiji pokazano je da su maksimalna koncentracija etanola u krvi i bioraspoloživost etanola viši nakon konzumacije alkoholnog koktela zaslađenog niskokaloričnim umjetnim zaslađivačima aspartamom i acesulfam kalijem nego nakon konzumacije alkoholnog koktela zaslađenog saharozom (Wu et al. 2006). U tom istraživanju ultrazvučno je praćena i brzina želučanog pražnjenja koja je u prisutnosti saharoze bila smanjena, te su autori navedene rezultate pripisali usporenu želučanog pražnjenja u prisutnosti saharoze, a izostanku tog učinka u prisutnosti aspartama i acesulfam kalija.

Druga grupa autora pokazala je da koncentracija etanola u alkoholnom piću i stanje sitosti utječu na brzinu apsorpcije jednake količine etanola u krv u ljudi i u štakora (R. Roine 2000; R. P. Roine et al. 1993). U stanju gladovanja žestoka alkoholna pića (npr. *whiskey*) se brže apsorbiraju od razrijeđenih alkoholnih pića (npr. pivo), a suprotno se događa u stanju sitosti. Naime, u stanju gladovanja pražnjenje želuca u duodenum je ubrzano te i žestoka i razrijeđena alkoholna pića u proksimalni jejunum dolaze jednako brzo gdje se žestoka pića brže apsorbiraju zbog većeg koncentracijskog gradijenta. S druge strane, u stanju sitosti želučano pražnjenje je usporeno i ovisno o volumenu unesenog alkoholnog pića. Zbog toga veliki volumen razrijeđenih alkoholnih pića (npr. 0,5 l pive, 3,5-5,5 % alkohola) puno brže dolazi u proksimalni jejunum i brže se apsorbira u odnosu na mali volumen žestokog alkoholnog pića (npr. 0,03 l *whiskeya*, 42% alkohola).

1.3. Zasladivači

Zasladivači se mogu klasificirati prema kalorijskoj vrijednosti i porijeklu. Prema kalorijskoj vrijednosti dijele se na visokokalorične (poput saharoze, glukoze, fruktoze, sorbitola ili manitola) i niskokalorične (poput aspartama, acesulfam kalija, ciklamata ili steviol glikozida). Također, ovsino o porijeklu zasladivači se dijele na prirodne (poput steviol glikozida, taumatina ili monelina) koji su dobiveni ekstrakcijom iz prirodnih produkata i umjetno sintetizirane zasladivače (poput ciklamata, acesulfam kalija i aspartama) (Carocho, Morales, and Ferreira 2017).



Slika 1 a) Strukturna formula steviolnog prstena b) Strukturna formula natrijevog ciklamata

1.3.1. Steviol glikozidi

Steviol glikozidi su skupina molekula koje potenciraju slatki okus a dobivaju se ekstrakcijom iz biljke *Stevia rebaudiana* Bertoni. Postoji deset temeljnih glikozida kojima je u molekularnom smislu zajednički steviolni prsten (Slika 1). U listu biljke najviše su zastupljeni steviozid i rebaudiozid A, koji su ujedno i komercijalno najvažniji steviol glikozidi. Slatkoća pojedinih steviol glikozida se razlikuje, a kreće se u rasponu od 30 do 300 puta slatkoće saharoze. Slatki okus najviše potencira rebaudiozid A. (Fry 2012)

Nakon konzumacije, iz u kolonu se pod djelovanjem crijevne flore iz steviol glikozida oslobađa steviolni prsten koji se potom apsorbira. Steviol se u jetri metabolizira u steviol glukuronid, koji se iz organizma izlučuje mokraćom. (Fry 2012)

1.3.2. Ciklamat

Ciklamat je otkriven 1937 na Sveučilištu u Illinoisu. Kao umjetni zasladivač koristi se u obliku soli natrijevog ciklamata (Slika 1) čija je slatkoća 30 puta veća od slatkoće saharoze (Carocho, Morales, and Ferreira 2017).

Najvažniji metabolički produkt ciklamata je cikloheksamin koji nastaje u probavnom traktu pod djelovanjem crijevne flore (Chattopadhyay, Raychaudhuri, and Chakraborty 2014). Cikloheksamin je dokazano toksičan (Bopp et al. 1986), ali se metaboliziranje ciklamata u cikloheksamin događa u vrlo malom dijelu populacije (Carocho, Morales, and Ferreira 2017).

Upravo zbog toksičnosti ciklamata Agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Agency*) zabranila je upotrebu ciklamata u SAD-u, dok je u EU upotreba dozvoljena (Carocho, Morales, and Ferreira 2017). Vjerojatno je zabrana uzrok činjenice da u literaturi postoji jako malo radova koji proučavaju primjenu ciklamata kao umjetnog zaslađivača.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

2.1. Opći cilj rada

S obzirom da su prethodna istraživanja proučavala utjecaj umjetnih niskokaloričnih zaslađivača na apsorpciju etanola, cilj je ovog istraživanja proučiti utjecaj prirodnog niskokaloričnih zaslađivača steviol glikozida na apsorpciju etanola, te ga usporediti sa utjecajem visokokaloričnog sladila saharoze i umjetnog niskokaloričnog zaslađivača ciklamata.

2.2. Specifični ciljevi rada

1. Podijeliti štakore u 4 skupine tako da svaka skupina primi jednu od alkoholni otopina prema shemi iz Tablice 1.

Tablica 1 Shema i.g. aplikacije alkoholnih otopina prema skupinama životinja.

SKUPINA	ALKOHOL	VODA	SLADILO
Kontrola (K)	+	+	-
Saharoza (S)	+	+	saharoza
Ciklamat (C)	+	+	ciklamat
Steviol glikozidi (ST)	+	+	steviol glikozidi

2. I.g. sondom primijeniti štakoru alkoholnu otopinu, te iz uzorka krvi iz repne vene odrediti koncentracije etanola u krvi u sljedećim vremenskim intervalima nakon i.g. primjene alkoholne otopine: 10, 20, 40, 60, 90 i 120 minuta
3. Odrediti sljedeće farmakokinetičke parametre: koncentraciju etanola u krvi 10 minuta nakon primjene (C_{10}), maksimalnu koncentracija etanola u krvi (C_{MAX}) i površinu ispod krivulje ovisnosti koncentracije etanola o vremenu (AUC, eng. *area under curve*)
4. Dobivene rezultate obraditi relevantnom statističkom metodom

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

U istraživanju su se koristili mužjaci *Wistar* štakora (uzgoj Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Nastamba za laboratorijske životinje HR-POK-007). Životinje su nasumičnim odabirom životinje se podijelilo u četiri skupine (N=36) u ovisnosti o alkoholnoj otopini koju su primile (etanol, etanol+saharoza, etanol+ciklamat, etanol+steviol glikozidi). Svaka je životinja prije pokusa bila izvagana kako bi joj se obzirom na tjelesnu masu (varijacija ± 70 g) odredio točan volumen alkoholne otopine koju je potom jednokratno primila i.g. Životinjama se 5h prije početka pokusa uskratila hrana, ali im se omogućio slobodan pristup vodi do samog početka pokusa. Pokus se provodio uvijek u isto doba dana (u 13h) kako bi se izbjegle varijacije rezultata obzirom na životni ciklus životinje.

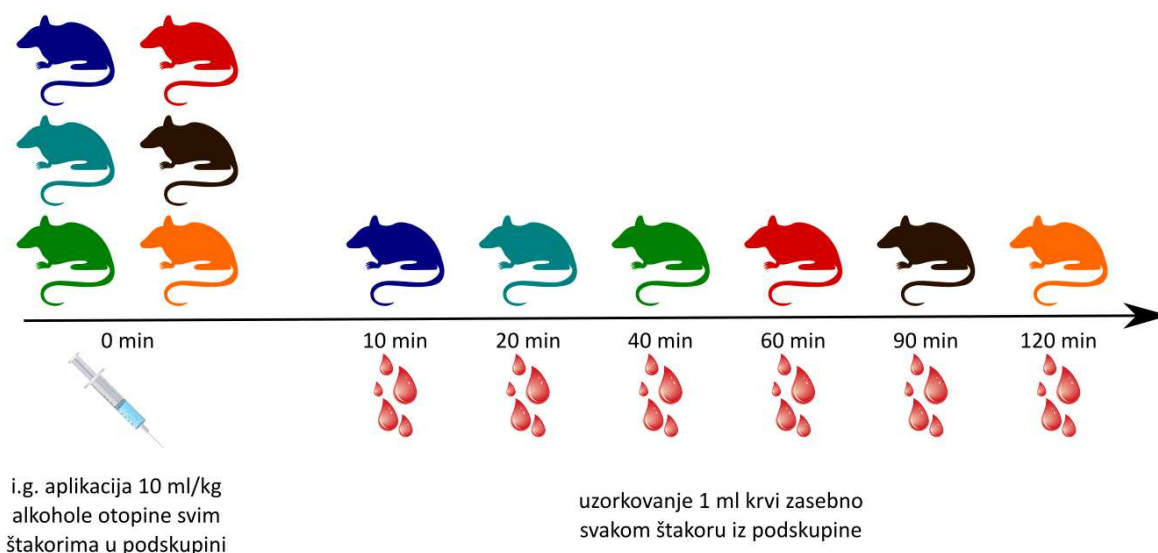
3.2. Alkoholne otopine

Štakori iz svih skupina primili su 10 ml/kg alkoholne otopine sa volumnim udjelom (v/v) etanola od 16%. Doza etanola iznosila je 1500 mg/kg („Etanol apsolutni p.a.“[®], T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska). Svaka skupina primila je različito zaslađenu alkoholnu otopinu: Grupa K (kontrola) nezaslađenu; Grupa S (saharoza) zaslađenu stolnim šećerom („Šećer Kristal“[®], Konzum d.d., Zagreb, Hrvatska); Grupa C (ciklamat) zaslađenu ciklamatom („Natreen Classic“[®], D.E. Master Blenders, Amsterdam, Nizozemska); Grupa ST (steviol glikozidi) zaslađenu steviol glikozidima („Sussina Stevia“[®], INSTANTINA Ges.m.b.H., Durnkrut, Austria).

Otopina saharoze pripremljena je tako da je 24 g saharoze otopljeno u 200 ml vode. Otopine ciklamata i steviol glikozida pripremljene su prema uputama proizvođača, „Natreen Classic“[®] i „Sussina Stevia“[®], tako da budu jednake slatkoće kao otopina saharoze. Prema uputama proizvođača 1 tableta oba sladila zamjenjuje 4 g stolnog šećera. Stoga su otopine ciklamata i steviol glikozida pripremljene tako da je 6 tableta Natreen Classic[®] odnosno 6 tableta Sussina Stevia[®] otopljeno u 200 ml vode. Od tako pripremljenih temeljnih zaslađenih otopina naknadno su pripremljene odgovarajuće alkoholne otopine volumnog udjela etanola 16% (v/v=16%). Sve alkoholne otopine pripremljene su 30 minuta prije početka pokusa.

3.3. Uzorkovanje krvi i određivanje koncentracije etanola u krvi

Štakori iz svake skupine podijeljeni su u 6 podskupina po 6 štakora za 6 vremenskih intervala: 10, 20, 40, 60, 90 i 120 minuta (Slika 2). Uzorci krvi za analizu vađeni su iz lateralne repne vene štakora putem i.v. kanile. Svakom štakoru jednokratno je izvađeno 0,8 ml krvi u jednom od šest vremenskih intervala.



Slika 2 Shematski prikaz vremenskih intervala u kojima je krv uzorkovana štakorima.

Za uzorkovanje krvi korištene su epruvete bez aditiva (VACUETTE® Z Serum Sep Clot Activator®, Greiner Bio-One Italia S.r.l., Cassina de Pecchi, Italija). Nakon jednosatnog stajanja na sobnoj temperaturi uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 10 000 rpm (Eppendorf® Minispin) te su serumi odmah odvojeni od ostatka stanica. Iz seruma je određen koncentracija etanola u krvi (BEC, eng. *blood ethanol concentration*) primjenom automatizirane enzimske metode s ADH te je konačni produkt izmjeren spektrofotometrijski (AU400®, Beckman Coulter, Dublin, Irska). Proizvođač korištenih reagensa je Roche®, Mannheim, Njemačka.

3.4. Farmakokinetički parametri

Farmakokinetički parametri određeni su zasebno za svaku podskupinu i to tako su BEC određene u različitim vremenskim intervalima na različitim štakorima grupirani. Određivani farmakokinetički parametri bili su: BEC 10 min nakon i.g. aplikacije alkoholne otopine (C_{10}), maksimalna BEC (C_{MAX}) i površina ispod krivulje koncentracija-vrijeme (AUC). U statističku analizu bile su uključene samo one podskupine u kojima je BEC uspješno određen u svih šest vremenskih intervala.

3.5. Statistička analiza

Za usporedbu farmakokinetičkih parametara između skupina korišten je Kruskal-Wallis test sa *post-hoc* Mann-Whitney testom. *P*-vrijednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom. Za statističku analizu korišten je MedCalc® Version 17.7 (MedCalc Software, Ostend, Belgija). U prikazima podataka medijan je korišten kao mjera centralne tendencije te je za svaki farmakokinetički parameter naznačen i interkvartilni raspon (IQR). Za grafički prikaz je Microsoft Excel 2016® (Microsoft, Redmond, Washington, SAD)

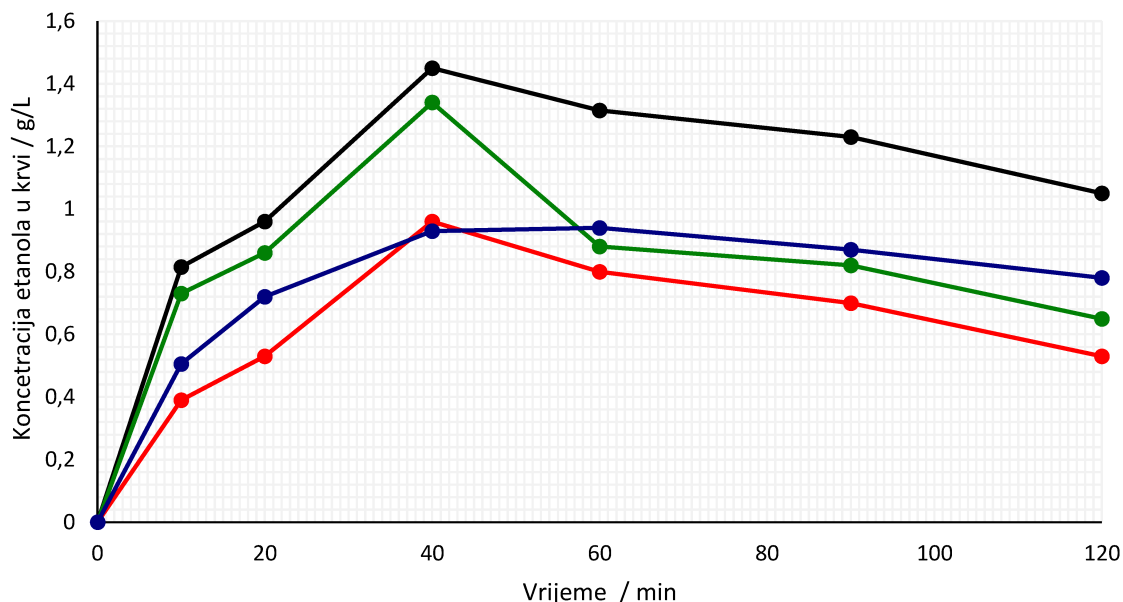
3.6. Etička načela

Osiguranje etičkih načela u istraživanju osigurano je pridržavanjem europske direktive 2010/63/EU, Zakona o izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti životinja (NN 37/13), Zakona o zaštiti životinja (NN 135/06), Pravilnika o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13), FELASA preporuka i preporuka Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ovo istraživanje odobrilo je Povjerenstvo za dobrobit životinja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4. REZULTATI

U statističku analizu uključeno je svih 6 podskupina iz K i C skupine, te 5 od 6 podskupina iz S i ST skupine. Dvije podskupine iz S i ST skupine se nije moglo analizirati zbog premalog volumena krvi (u 60 odnosno 90 minuti). (Slika 3)



Slika 3 Ovisnost koncentracije etanola u krvi štakora o vremenu. Svaka točka na krivulji predstavlja medijan vrijednosti za sve podskupine iz pripadajuće skupine. ● kontrola (K, N=6) ● saharoza (S, N=5) ● ciklamat (C, N=6) ● steviol glikozidi (ST, N=5) N: broj podskupina uključenih u statističku analizu

Svi farmakokinetički parametri statistički značajno su se razlikovali među skupinama. (C_{10} : $p=0,003$; C_{MAX} : $p=0,007$; AUC: $p=0,008$). C_{10} je bila značajno viša u K nego u S i C skupini (K vs. S: $p=0,006$; K vs. C: $p=0,020$) i u ST skupini u odnosu na S i C skupine (ST vs. S: $p=0,014$; ST vs. C: $p=0,019$), ali nije bilo statistički značajne razlike između ST i C skupina iako je C_{10} bila niža u C skupini. Također, C_{MAX} je bila značajno viša u K nego u S i C skupini (K vs. S: $p=0,006$; K vs. C: $p=0,025$) i u ST skupini u odnosu na S i C skupine (ST vs. S: $p=0,014$; ST vs. C: $p=0,033$) ali nije bilo statistički značajne razlike između ST i C skupina iako je C_{MAX} bila niža u C skupini. AUC je bila značajno niža u S, C i ST skupini u odnosu na K skupinu (S vs. K: $p=0,006$; C vs. K: $p=0,010$; ST vs. K: $p=0,033$), ali nije bilo statistički značajne razlike između S, C i ST skupina (Tablica 1).

Tablica 2 Medijani i interkvartilni rasponi farmakokinetskih parametara za 6 podskupina iz K i C skupina i 5 kohorti iz S i ST skupina. N: Broj podskupina uključenih u statističku analizu. C₁₀: Koncentracija etanola u krvi štakora 10 min nakon i.g. aplikacije alkoholne otopine. C_{MAX}: Maksimalna koncentracija etanola u krvi. AUC: Površina ispod krivulje koncentracija-vrijeme od 0 do 120 min * p<0,05 vs. K (post-hoc Mann-Whitney test). ** p<0,05 vs. S (post-hoc Mann-Whitney test). ° p<0,05 vs. C (post-hoc Mann-Whitney test) °° C vs. S vs. C vs. ST (Kruskal-Wallis test)

SKUPINA	C ₁₀ (g/L)	C _{MAX} (g/L)	AUC (g×min/L)
KONTROLA (N=6)	0,82 (0,75-0,87)	1,65 (1,22-1,74)	286 (230-300)
SAHAROZA (N=5)	0,39* (0,27-0,45)	0,96* (0,84-1,05)	157* (123-187)
CIKLAMAT (N=6)	0,51* (0,37-0,55)	0,97* (0,78-1,30)	195* (131-211)
STEVIOL GLIKOZIDI (N=5)	0,74**.*° (0,65-0,76)	1,4**.*° (1,30-1,49)	196* (174-226)
<i>p</i> -vrijednost °°	0,003	0,007	0,008

5. RASPRAVA

U ovom je istraživanju pokazano da različiti zaslađivač u i.g. primijenjenoj alkoholnoj otopini utječu na farmakokinetiku etanola. Farmakokinetika se može promijeniti na razini apsorpcije i na razini eliminacije. Iz literature je poznato da eliminacija etanola prati farmakokinetiku nultog reda tj. ovisnost koncentracije o vremenu je linearna. Na slici 3 vidljivo je da je nagib grafa ovisnosti koncentracije o vremenu u intervalu od 60 do 120 minute gotovo jednak za sve skupine, pa se može zaključiti da niti jedan zaslađivač nije značajno utjecao na brzinu eliminacije. Stoga se u daljnjoj raspravi pretpostavlja da su razlike u farmakokinetičkim parametrima posljedica različitih brzina apsorpcije alkoholnih otopina.

Prisutnost saharoze u alkoholnoj otopini dovela je do smanjenja svih promatranih farmakokinetičkih parametara u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 3, Tablica 2). Prethodna istraživanja su pokazala da visoka kalorijska vrijednost obroka utječe na apsorpciju etanola (Wu et al. 2006; R. Roine 2000) putem usporenja želučanog pražnjenja u duodenum (Oneta et al. 1998; Brener, Hendrix, and Mchugh 1983). Iako navedena istraživanja nisu proučavala direktni utjecaj saharoze na apsorpciju etanola, rezultati ovog istraživanja su u skladu s prethodnim s obzirom na visoku kalorijsku vrijednost saharoze.

Nadalje, prema dobivenim rezultatima ciklamat pokazuje jednak utjecaj na farmakokinetiku etanola kao i saharoza (Slika 3, Tablica 2) što se razlikuje u odnosu na prethodno provedenu humanu studiju (Wu et al. 2006). U navedenom istraživanju je pokazano su C_{MAX} i AUC bili su viši nakon konzumacije koktela zaslađenog umjetnim zaslađivačem u odnosu na koktel zaslađen saharozom. Navedena razlika u rezultatima može biti posljedica upotrebe različitih umjetnih zaslađivača i različitog načina primjene alkoholnih otopina. Naime, u navedenom istraživanju Wu et al. kao zaslađivače koristili su aspartam i acesulfam kalij, a alkoholna otopina primjena je oralno.

S druge strane, rezultati pokazuju da steviol glikozidi utječu na farmakokinetiku etanola, te da je njihov učinak specifičan u odnosu na učinke ciklamata i saharoze (Slika 3, Tablica 2). Učinak steviol glikozida na C_{10} i C_{MAX} značajno se razlikovao od učinka ciklamata i saharoze dok se učinak na AUC nije. Također, u odnosu na kontrolnu skupinu steviol glikozidi značajno snižavaju AUC ali nemaju učinak na C_{10} i C_{MAX} .

Molekularni mehanizam odgovoran za dobivene rezultate nije bio predmet ovog istraživanja, ali literaturni podaci sugeriraju da su interakcije zaslađivača s receptorima za slatki okus u probavnom traktu štakora barem djelomično odgovorne za dobivene rezultate. Receptori za slatki okus postoje na jeziku, ali tek odnedavno je pokazano da oni postoje na enteroendokrinim stanicama različitih vrsta uključujući čovjeka i štakora (Höfer, Püschel, and Drenckhahn 1996; Meyer-Gerspach, Wölnerhanssen, and Beglinger 2016; Meyer-Gerspach, Wölnerhanssen, and Beglinger 2014). Također, pokazano je da interakcije zaslađivača i tih receptora ne sudjeluju u percepciji slatkog okusa, nego u lučenju hormona poput inkretinskih hormona koji usporavaju pražnjenje želuca (Steinert et al. 2011; Gerspach et al.

2011). Nadalje, učinak pojedinih zaslađivača na receptore za slatki okus je specifičan. U literaturi je već pokazano da molekularni mehanizam odgovoran za usporavanje pražnjenja želuca u prisutnosti saharoze uključuje i lučenje inkretinskih hormona putem receptora za slatki okus (Little et al. 2009). Međutim, steviol glikozidi u humanom i štakorskom modelu nisu pokazali stimulirajući učinak na lučenje inkretinskih hormona (Brown and Rother 2012; Fujita et al. 2008). Stoga, se razlika u učincima saharoze i steviol glikozida na apsorpciju etanola može barem djelomično objasniti činjenicom da saharoza i steviol glikozidi različito djeluju na receptore za slatki okus na EEK stanicama. Unatoč tome što su i steviol glikozidi i ciklamat niskokalorični zaslađivači oni su pokazali različiti učinak na apsorpciju etanola. Niti jedna studija do sada nije ispitivala utjecaj ciklamata na sekreciju inkretinskih hormona putem receptora za slatki okus na EEK stanicama, pa se ne može reći u kojoj je mjeri taj mehanizam odgovoran za dobivene rezultate.

Također, i samo istraživanje je imalo određena ograničenja. Kao prvo, korištenje štakorskog modela otežalo je usporedbu rezultata s humanim studijama zbog toga što je učinak istih zaslađivača na lučenje inkretinskih hormona putem receptora za slatki okus ovisan o vrsti (Bachmanov, Tordoff, and Beauchamp 2008; Meyer-Gerspach, Wölnerhanssen, and Beglinger 2016). Drugo moguće ograničenje je korištenje podsupina (šest štakora umjesto jednog štakora) za određivanje farmakokinetičkih parametara. Iako se tako varijabilnost rezultata povećala, vađenjem velikog volumena krvi pojedinačnoj životinji ($6 \times 0,8$ ml) riskira se razvoj hipovolemijskog šoka u životinje i uklanja se etanol iz krvi, što bi sigurno utjecalo valjanost tako dobivenih rezultata.

6. ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje po prvi put na *in vivo* modelu opisuje učinak niskokaloričnih prirodnih zaslađivača steviol glikozida na apsorpciju etanola nakon i.g. primjene. Dobiveni rezultati pokazuju da steviol glikozidi utječu na apsorpciju etanola u krv štakora, smanjujući njegovu bioraspoloživost. Ovaj se učinak razlikuje od učinaka visokokaloričnog zaslađivača saharoze i umjetnog niskokaloričnog zaslađivača ciklamata koji uz smanjenje bioraspoloživosti smanjuju i brzinu apsorpcije etanola. Farmakokinetička interakcije navedenih zaslađivača i etanola znanstveno su važne jer dobiveni rezultati pokazuju da nakon konzumacije alkoholnih pića varijabilnost koncentracije etanola u krvi značajno ovisi i o vrsti zaslađivača.

7. ZAHVALE

Prije svega zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Alenki Boban Blagaić bez čijeg truda, entuzijazma i podrške ne bi bilo ovog rada. Zahvaljujem prof. dr. sc. Ana-Marii Šimundić na trudu pri analizi uzoraka krvi i doc. dr. sc. Mirjani Stupnišek na trudu pri nabavi materijala za istraživanje. Također zahvaljujem i Ljiljani Krznar, Ivanu Gražibovskom i Marijani Blagaić na pomoći pri izvođenju pokusa. Na kraju veliko hvala i mojoj obitelji: majci Nataši i ocu Petru.

8. POPIS LITERATURE

- Bachmanov, Alexander A, Michael G Tordoff, and Gary K Beauchamp. 2008. "Erratum: Sweetener Preference of C57BL/6ByJ and 129P3/J Mice (Chemical Senses)." *Chemical Senses*. doi:10.1093/chemse/bjn046.
- Bopp, Barbara A., Robert C. Sonders, James W. Kesterson, and A. G. Renwick. 1986. "Toxicological Aspects of Cyclamate and Cyclohexylamine." *Critical Reviews in Toxicology* 16 (3): 213–306. doi:10.3109/10408448609037465.
- Brener, William, Thomas R Hendrix, and Paul R Mchugh. 1983. "Regulation of the Gastric Emptying of Glucose." *Gastroenterology* 85: 76–82. doi:10.1016/S0016-5085(83)80232-7.
- Brown, Rebecca J., and Kristina I. Rother. 2012. "Non-Nutritive Sweeteners and Their Role in the Gastrointestinal Tract." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97 (8): 2597–2605. doi:10.1210/jc.2012-1475.
- Bruton, Laurence, Bruce Chabner, and Bjorn Knollman. 2011. "Ethanol and Methanol." In *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12th ed., 629–32.
- Caballeria, Joan, Enrique Baraona, Miquel Rodamilans, and Charles S. Lieber. 1989. "Effects of Cimetidine on Gastric Alcohol Dehydrogenase Activity and Blood Ethanol Levels." *Gastroenterology* 96 (2): 388–92. doi:10.1016/0016-5085(89)91562-X.
- Carocho, Márcio, Patricia Morales, and Isabel C.F.R. Ferreira. 2017. "Sweeteners as Food Additives in the XXI Century: A Review of What Is Known, and What Is to Come." *Food and Chemical Toxicology* 107. Elsevier Ltd: 302–17. doi:10.1016/j.fct.2017.06.046.
- Chattopadhyay, Sanchari, Utpal Raychaudhuri, and Runu Chakraborty. 2014. "Artificial Sweeteners - A Review." *Journal of Food Science and Technology* 51 (4): 611–21. doi:10.1007/s13197-011-0571-1.
- DiPadova, C, T M Worner, R J Julkunen, and C S Lieber. 1987. "Effects of Fasting and Chronic Alcohol Consumption on the First-Pass Metabolism of Ethanol." *Gastroenterology* 92 (5 Pt 1): 1169–73. doi:S0016508587001574 [pii].
- Fry, John C. 2012. *Natural Low-Calorie Sweeteners. Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings*. Woodhead Publishing Limited. doi:10.1016/B978-1-84569-811-9.50003-7.
- Fujita, Y., R. D. Wideman, M. Speck, A. Asadi, D. S. King, T. D. Webber, M. Haneda, and T. J. Kieffer. 2008. "Incretin Release from Gut Is Acutely Enhanced by Sugar but Not by Sweeteners in Vivo." *AJP: Endocrinology and Metabolism* 296 (3): E473–79. doi:10.1152/ajpendo.90636.2008.
- Gerspach, A. C., R. E. Steinert, L. Schonenberger, A. Graber-Maier, and C. Beglinger. 2011. "The Role

- of the Gut Sweet Taste Receptor in Regulating GLP-1, PYY, and CCK Release in Humans.” *AJP: Endocrinology and Metabolism* 301 (2): E317–25. doi:10.1152/ajpendo.00077.2011.
- Höfer, D, B Püschel, and D Drenckhahn. 1996. “Taste Receptor-like Cells in the Rat Gut Identified by Expression of Alpha-Gustducin.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (13): 6631–34. doi:10.1073/pnas.93.13.6631.
- Holst, Jens Juul, Fiona Gribble, Michael Horowitz, and Chris K. Rayner. 2016. “Roles of the Gut in Glucose Homeostasis.” *Diabetes Care* 39 (6): 884–92. doi:10.2337/dc16-0351.
- Hunt, J N, and D F Stubbs. 1975. “The Volume and Energy Content of Meals as Determinants of Gastric Emptying.” *The Journal of Physiology* 245 (1): 209–25. doi:10.1113/jphysiol.1975.sp010841.
- Jacobsson, Hans. 2006. “The Physiology of Gastric Emptying.” *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 20 (3): 397–407. doi:10.1016/j.bpa.2006.02.002.
- Julkunen, R. J K, L. Tannenbaum, E. Baraona, and C. S. Lieber. 1985. “First Pass Metabolism of Ethanol: An Important Determinant of Blood Levels after Alcohol Consumption.” *Alcohol* 2 (3): 437–41. doi:10.1016/0741-8329(85)90111-9.
- Little, T. J., N. Gupta, R. M. Case, D. G. Thompson, and J. T. McLaughlin. 2009. “Sweetness and Bitterness Taste of Meals per Se Does Not Mediate Gastric Emptying in Humans.” *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 297 (3): R632–39. doi:10.1152/ajpregu.00090.2009.
- Meyer-Gerspach, A. C., B. Wölnerhanssen, and C. Beglinger. 2016. “Functional Roles of Low Calorie Sweeteners on Gut Function.” *Physiology and Behavior* 164. Elsevier B.V.: 479–81. doi:10.1016/j.physbeh.2016.01.045.
- Meyer-Gerspach, A.C., B. Wölnerhanssen, and C. Beglinger. 2014. “Gut Sweet Taste Receptors and Their Role in Metabolism.” In *Frontiers of Hormone Research*, 42:123–33. doi:10.1159/000358321.
- Oneta, C M, U A Simanowski, M Martinez, A Allali-Hassani, X Parés, N Homann, C Conradt, et al. 1998. “First Pass Metabolism of Ethanol Is Strikingly Influenced by the Speed of Gastric Emptying.” *Gut* 43: 612–19.
- Roine, R P, R T Gentry, R T Lim, E Helkkonen, M Salaspuro, and C S Lieber. 1993. “Comparison of Blood Alcohol Concentrations after Beer and Whiskey.” *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 17 (3): 709–11. doi:10.1111/j.1530-0277.1993.tb00824.x.
- Roine, Risto. 2000. “Interaction of Prandial State and Beverage Concentration on Alcohol Absorption.” *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 24 (4): 411–12. doi:10.1111/j.1530-

0277.2000.tb02000.x.

Steinert, R. E., A. C. Gerspach, H. Gutmann, L. Asarian, J. Drewe, and C. Beglinger. 2011. "The Functional Involvement of Gut-Expressed Sweet Taste Receptors in Glucose-Stimulated Secretion of Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) and Peptide YY (PYY)." *Clinical Nutrition* 30 (4). Elsevier Ltd: 524–32. doi:10.1016/j.clnu.2011.01.007.

Wu, Keng-Liang, Reawika Chaikomin, Selena Doran, Karen L. Jones, Michael Horowitz, and Christopher K. Rayner. 2006. "Artificially Sweetened Versus Regular Mixers Increase Gastric Emptying and Alcohol Absorption." *The American Journal of Medicine* 119 (9): 802–4. doi:10.1016/j.amjmed.2006.02.005.

9. SAŽETAK

Utjecaj steviol glikozida na apsorpciju etanola u štakora

Paulo Zekan

Cilj istraživanja bio je odrediti utjecaj prirodnih niskokaloričnih zaslađivača steviol glikozidi na apsorpciju etanola u krv štakora i usporediti taj utjecaj s utjecajem saharoze i umjetnog niskokaloričnog zaslađivača ciklamata.

U istraživanje su bila uključena 144 *Wistar* štakora koja su raspoređena u 4 skupine, te je svakom štakoru intragastrički aplicirano 1500 mg/kg etanola u obliku v/v=16% alkoholne otopine, koja je ovisno o skupini bila zaslađena različitim zaslađivačem: nezaslađene (K skupina), saharoza (S skupina), ciklamat (C skupina) i steviol glikozidi (ST skupina). Uzorkovanjem iz repne vene određivali smo koncentraciju alkohola u krvi 10, 20, 40, 60, 90 i 120 minuta nakon i.g. aplikacije otopine. Određivani farmakokinetički parametri bili su: koncentracija etanola u krvi 10 min nakon primjene (C_{10}), maksimalna koncentracija etanola u krvi (C_{MAX}) i površina ispod krivulje ovisnosti koncentracije etanola o vremenu (AUC).

Parametri C_{10} i C_{MAX} bili su značajno viši u K i ST skupinama u odnosu na S i C skupine, a parametar AUC je bio značajno viši u K skupini u odnosu na S, C i ST skupine među kojima nije bilo statistički značajne razlike.

Učinak steviol glikozida je specifičan u odnosu na druge zaslađivače i predstavlja prvi opis farmakokinetičke interakcije etanola i steviol glikozida u *in vivo* modelu.

KLJUČNE RIJEČI: etanol, steviol glikozidi, ciklamat, saharoza, štakor

10. ABSTRACT

Effect of steviol glycoside on ethanol absorption in rats

Paulo Zekan

Steviol glycoside is increasingly being used as a non-caloric natural sweetener. The aim of this study was to assess whether steviol glycoside affects ethanol absorption in rats and to compare its effect with the effect of sucrose and artificial non-caloric sweetener cyclamate.

The study included 144 male Wistar rats which were divided into 4 groups each being intragastrically administered 1500 mg/kg of ethanol in the form of the differently sweetened v/v=16% alcoholic solutions: non-sweetened (C), sucrose sweetened (S), cyclamate sweetened (CY), steviol glycoside sweetened (ST). The rats were blood sampled from the tail vein at t=10,20,40,60,90,120 min after ethanol administration. Pharmacokinetic parameters determined included: blood ethanol concentration at 10 min (C_{10}), maximum blood ethanol concentration (C_{MAX}) and area under concentration vs. time curve (AUC).

All pharmacokinetic values significantly differed between groups. Post hoc analysis revealed C_{10} and C_{MAX} were both significantly higher in C and ST group than in S and CY group. On the other hand, AUC was significantly higher in C than in all other groups.

Steviol glycoside affects ethanol absorption uniquely compared to other sweeteners studied. This research represents first description of pharmacokinetic interaction of ethanol and steviol glycoside in an *in vivo* model.

KEY WORDS: ethanol, steviol glycoside, cyclamate, sucrose, rat

11. ŽIVOTOPIS

ŠKOLOVANJE

- 2013.-** Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Studij medicine, 6. godina
- 2014.-** Open University Milton Keynes, Ujedinjeno Kraljevstvo
BSc in Mathematics, Level 3

ZNANSTVENO – ISTRAŽIVAČKI RAD

- 2016.-** Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za farmakologiju
Rad na studentskom znanstvenom radu 'Utjecaj steviol glikozida na apsorpciju alkohola u štakora'
MENTOR: izv.prof.dr.sc. Alenka Boban-Blagaić
- 2014.-2016.** Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za kemiju i biokemiju
Rad na projektu 'Nukleazna i tioesterolitička aktivnost odabranih piridinijevih oksima'
MENTOR: doc.dr.sc. Igor Picek
- 2014.-2014.** Universidade Nove de Julho, Brazil, Laboratory of Pulmonary and Exercise Immunology
Rad na projektu 'Metabolic and inflammatory profile evaluation in different resistance training protocols'
MENTOR: prof.dr.sc. Rodolfo de Paula Vieira

NAGRADE

- 2014.** Dekanova nagrada za najboljeg studenta 1. godine

CERTIFIKATI

- 2017.** Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu: Potvrda o osposobljenosti osoba odgovornih za planiranje i provođenje pokusa na životinjama (kategorija C)