

Vraag

Is neotaam schadelijk voor de darmen?

Studie

Shil A, Ladeira Faria LM, Walker CA, Chichger H. The artificial sweetener neotame negatively regulates the intestinal epithelium directly through T1R3-signaling and indirectly through pathogenic changes to model gut bacteria. *Front. Nutr.* (2024) 11:1366409.

Antwoord

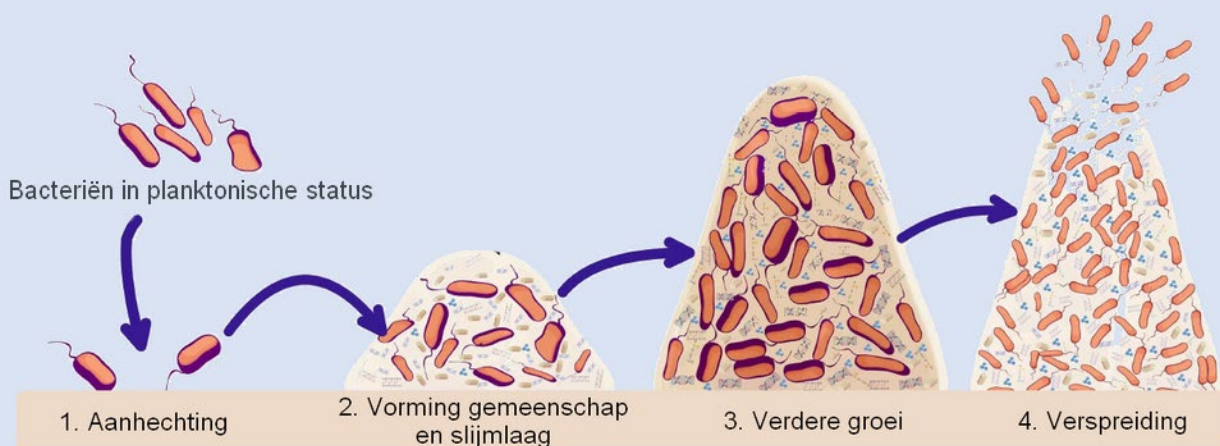
Wat is de aanleiding en hoofdvraag van de onderzoekers?

Verschillende reageerbuis- en dierstudies hebben in het verleden gekeken naar de effecten van zoetstoffen op de gezondheid. Ook de onderzoekers van deze studie hebben daarnaar gekeken en erover gepubliceerd. Met name over het effect van zoetstoffen op de darmmicrobiota [1, 2]. Soms werden er aanwijzingen voor nadelige effecten gevonden, zoals de vorming van een biofilm (**zie kader**) bij blootstelling aan de bacteriën *E. coli* en *E. faecalis*. Deze studies zijn echter telkens gedaan met de bekende zoetstoffen acesulfaam K, aspartaam, sucralose en saccharine. Dat was een reden voor de onderzoekers om te kijken naar het effect van de zoetstof neotaam (**zie kader**) op darmbacteriën en de darmwand [3].

Wat is een biofilm?

Een biofilm is een stapsgewijze opeenstapeling van micro-organismen (veelal bacteriën) die zich aan een oppervlak vasthechten en slijm produceren (**zie figuur 1**). Zo ontstaat er een compacte samenleving van micro-organismen die door de slijmlaag beschermd wordt (tegen onder andere antibiotica) en moeilijk te verwijderen is. Het begint met losse bacteriën die zich aan een oppervlak kunnen gaan hechten (planktonische status).

Er zijn verschillende soorten biofilms en ze komen bijna overal wel voor. Bijvoorbeeld op vloeren, in leidingen, op medische apparatuur, in tandplak en in de darmen. In de darmen kunnen biofilms tot infecties en gezondheidsproblemen leiden.



Figuur 1: De vorming van een biofilm [4].

Wat is neotaam (E961)?

Neotaam is een betrekkelijk nieuwe zoetstof die is afgeleid van aspartaam. De zoetkracht is 7.000 tot 13.000 sterker dan die van suiker, afhankelijk van de toepassing. Het bevat ongeveer 3 kcal per gram [5], maar omdat je er door de hoge zoetkracht zo weinig van nodig hebt, is de calorische waarde verwaarloosbaar. Het heeft een smaak die sterk lijkt op die van suiker, zonder bittere of metaalachtige nasmaak. Het kan beter tegen verhitting dan aspartaam waardoor het ook in gebakken producten gebruikt kan worden.

In 2007 heeft de 'European Food and Safety Authority' (EFSA) alle gegevens bestudeerd over de stabiliteit, de afbraakproducten en de toxicologie van neotaam. Ze concludeerden dat een aanvaardbare dagelijkse inname (ADI) tot 2 mg/kg lichaamsgewicht/dag geen gevaar oplevert voor de veiligheid [6]. De Europese Commissie heeft dat advies opgevolgd en neotaam in 2010 toegelaten op de Europese markt [7].

Welke onderzoeksmethode is gebruikt?

De onderzoekers hebben een model gebruikt van menselijke darmwandcellen om de darm in het laboratorium na te bootsen (in vitro). Ze hebben gekozen voor Caco-2-cellen, die vaker worden gebruikt voor onderzoek naar het menselijke maagdarmkanaal. Dit zijn onsterfelijk gemaakte dikkedarmkankercellen die in 1977 zijn afgenomen van een 72-jarige blanke man. Onder gecontroleerde omstandigheden kunnen deze cellen zich vermenigvuldigen, waardoor het klonen van elkaar zijn. Vervolgens is er gekeken naar het directe en indirecte effect van neotaam op de darmwandcellen. Voor het indirecte effect is er eerst gekeken naar het effect van neotaam op bepaalde soorten darmbacteriën en naar het effect van die darmbacteriën op de darmwandcellen. Zo is er gekeken naar het effect van neotaam:

1. Op de functie van darmwandcellen (direct effect).

Hiervoor is onder andere gekeken naar het effect van neotaam op de dood van darmwandcellen (Caco-2-cellen) en de darmdoorlaatbaarheid. Voor het meten van de darmdoorlaatbaarheid is gebruik gemaakt van één cellaag-dikke darmwandcellen (monolayer). Vervolgens is gekeken naar het percentage van een stof (dextraan) dat na 24 uur door de cellaag is gegaan vergeleken met water. Daarbij is speciaal gekeken naar de 'zoete-smaak-receptor' (T1R3) in de darmwandcellen. Dit is een receptor die in darmwandcellen zit en gevoelig is voor zoete moleculen, waaronder suiker en zoetstoffen. Je kunt er niet mee proeven, zoals met de tong, maar het stimuleert processen in het lichaam die helpen bij de spijsvertering en stofwisseling. De T1R3-receptor is geassocieerd met glucose-intolerantie en metabole gezondheidsproblemen, vandaar dat de onderzoekers daar interesse in hadden.

2. Op darmbacteriën (zie kader).

Hiervoor is onder andere gekeken of de darmbacteriën (*E. coli* en *E. faecalis*) die blootgesteld zijn aan neotaam een biofilm kunnen vormen en pathogene eigenschappen krijgen.

3. Op de interactie tussen darmwandcellen en darmbacteriën (indirect effect).

Hiervoor zijn twee soorten darmbacteriën (*E. coli* en *E. faecalis*) behandeld met neotaam en is er gekeken naar het effect dat ze hebben op de aanhechting (adhesie) aan en het binnendringen in (invasie) darmwandcellen. Dit wordt als ongunstig gezien.

Wat zijn *Escherichia coli* en *Enterococcus faecalis*?

Escherichia coli

Escherichia coli (*E. coli*) is bij de meeste mensen een vaste bewoner van de darm, hoewel die niet zo heel rijk aanwezig is. De bacterie staat bekend als 'poepbacterie' en heeft een slechte naam, maar is belangrijk voor een goede (darm)gezondheid. Zo is het één van de weinige darmbacteriën die zuurstof kan gebruiken. Zo draagt die bij aan een zuurstofarme omgeving waar andere darmbacteriën zich prettig bij voelen. De meeste stammen zijn ongevaarlijk, maar sommige kunnen tot (voedsel)infectie leiden.

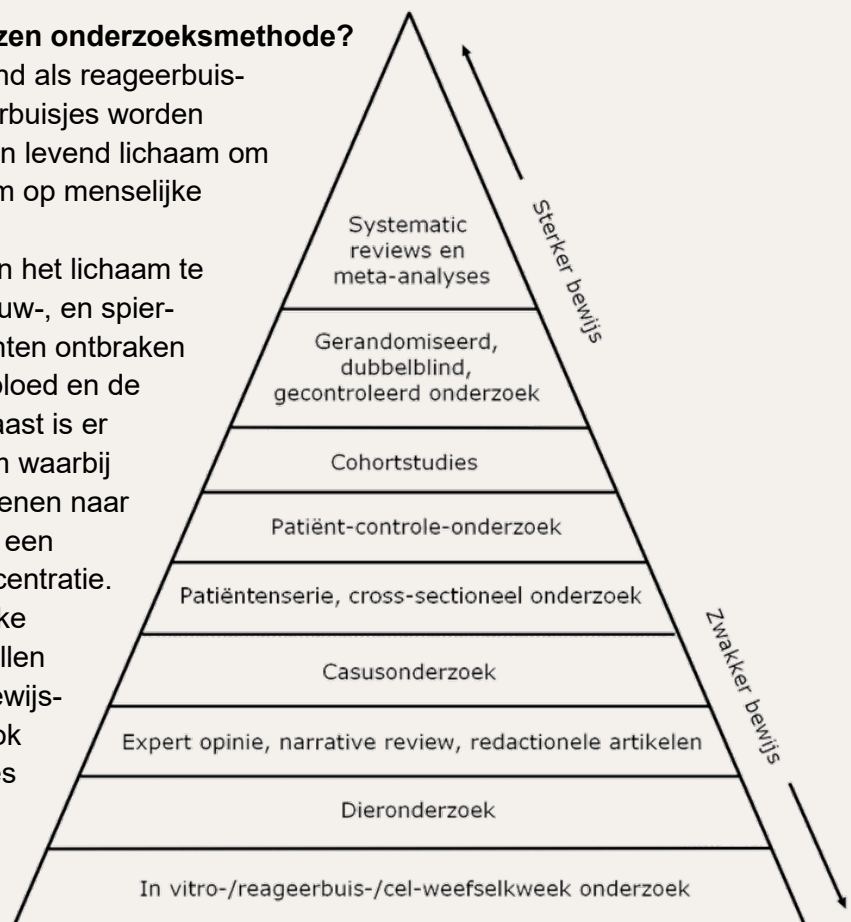
Enterococcus faecalis

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) is bij nagenoeg iedereen een vaste bewoner van de darm. Het is in de meeste gevallen een 'goede' bacterie die helpt bij de vertering van voedsel. In sommige gevallen is het een 'slechte' bacterie en kan het gevaarlijke infecties veroorzaken. Dit is een zorg in ziekenhuizen waar resistentie tegen deze bacterie voorkomt.

Wat is de bewijskracht van de gekozen onderzoeksmethode?

Dit is een in vitro-studie, ook wel bekend als reageerbuisstudie, hoewel niet altijd alleen reageerbuisjes worden gebruikt. Dat betekent dat er buiten een levend lichaam om is gekeken naar het effect van neotaam op menselijke darmwandcellen.

Wat in vitro gebeurt, hoeft echter niet in het lichaam te gebeuren. Het slijm in de darmen, zenuw-, en spierweefsel en immunologische componenten ontbraken bijvoorbeeld, evenals de toevoer van bloed en de interactie met andere organen. Daarnaast is er gekeken naar de *concentratie* neotaam waarbij effecten optreden. Dit is niet om te rekenen naar een percentage van de ADI omdat dat een eenheid van *massa* is en niet van concentratie. Bovendien kun je niet zeggen aan welke concentratie neotaam de darmwandcellen worden blootgesteld na inname. De bewijslast van een dergelijke studie is dan ook erg laag (zie figuur 2). Dit soort studies kunnen een begin zijn van een onderzoekstraject, maar vervolgonderzoek is nodig om de resultaten te bevestigen. Voedingsadviezen worden niet gebaseerd op resultaten uit in vitro-onderzoek.



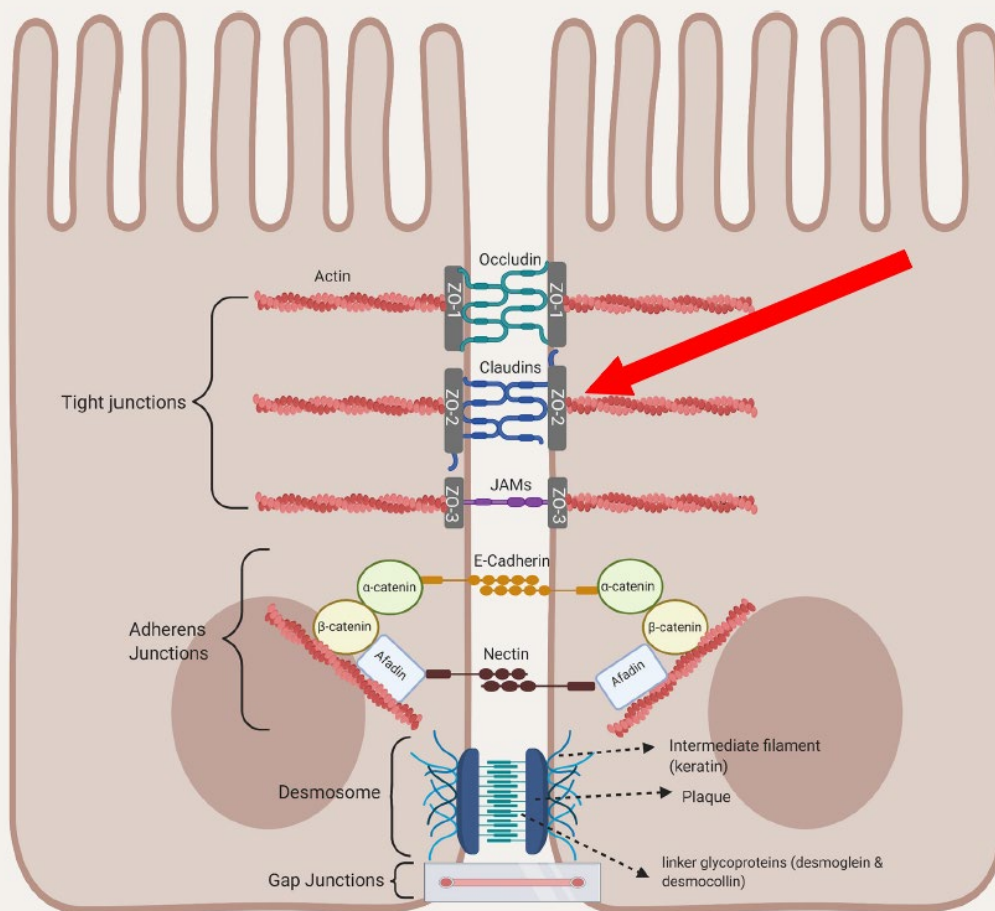
Figuur 2: Piramine van bewijslast.

Welke resultaten zijn er gevonden?

De volgende resultaten zijn er gevonden (zie figuur 4 voor gedeeltelijke samenvatting):

1. Op de functie van darmwandcellen (direct effect)

- Bij toenemende concentraties neotaam werd gevonden:
 - Meer sterfte van darmwandcellen.
 - Een toegenomen doorlaatbaarheid van de darmwand via de T1R3-receptor (zie figuur 4).
 - Een afname van een stof (claudine 3) die onderdeel uitmaakt van een complex (tight junction) dat darmwandcellen bij elkaar houdt (zie figuur 3).



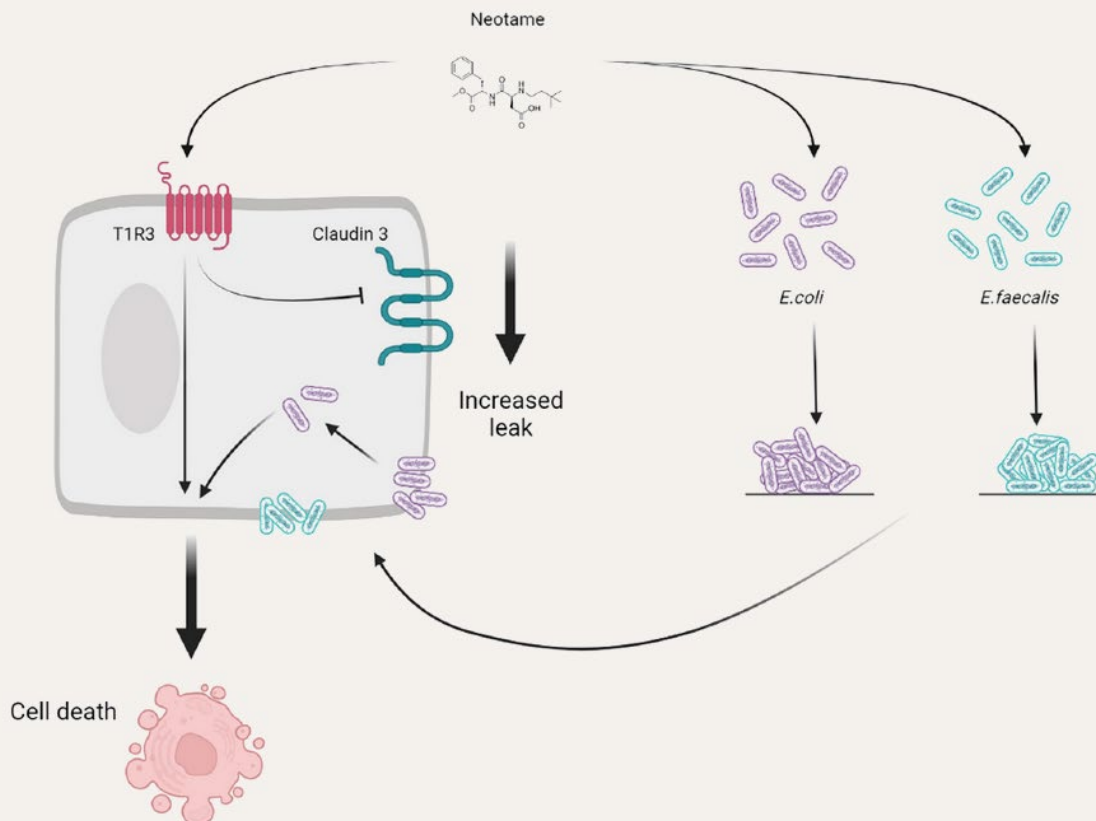
Figuur 3: Schematische weergave van twee darmwandcellen met daartussen complexen die de twee darmwandcellen met elkaar verbinden [8]. Belangrijke complexen voor de doorlaatbaarheid zijn de tight junctions die zijn opgebouwd uit o.a. claudines (zie rode pijl), waaronder claudine-3.

2. Op darmbacteriën

- Neotaam had geen effect op de dood van beide soorten darmbacteriën (*E. coli* en *E. faecalis*).
- Beide soorten darmbacteriën vormden bij blootstelling aan neotaam een biofilm.
- Na 96 uur werd er geen effect gevonden van neotaam op de (planktonische) groei van verschillende darmbacteriën (*Shigella*, *E. coli* ESBL, *E. coli* MG1655, *E. faecium*).

3. Op de interactie tussen darmwandcellen en darmbacteriën (*E. coli* en *E. faecalis*)

- Beide soorten darmbacteriën die behandeld waren met neotaam lieten een grotere aanhechting zien aan darmwandcellen.
- *E. faecalis* die behandeld was met neotaam liet geen toenemende invasiecapaciteit zien.
- *E. coli* die behandeld was met neotaam liet een toenemende invasiecapaciteit zien.



Figuur 4: Schematische weergave van de directe (T1R3-afhankelijke) en indirecte (bacterie-afhankelijke) impact van neotaam op darmwandcellen en van de directe manier (T1R3-afhankelijke) van neotaam op claudine 3 [3].

Wat zijn de conclusies van de onderzoekers?

De onderzoekers concluderen dat hun experimenten met neotaam nieuwe pathogene mechanismen laten zien die betrekking hebben op darmwandcellen en darmbacteriën. Deze bevindingen zouden de noodzaak aantonen om voedseladditieven en hun moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan mogelijk negatieve effecten op de gezondheid beter te begrijpen.

Ze geven wel aan dat beter onderzoek nodig is om hun bevindingen te bevestigen.

Wat zijn de sterke punten van de studie?

- Het is de eerste studie die naar het effect van neotaam op darmwandcellen en darmbacteriën gekeken heeft.
- Er is gebruik gemaakt van Caco 2-cellen wat, voor in vitro-studies, een geschikte cellijn is om de vragen van de onderzoekers mee te beantwoorden.

Wat zijn de zwakke punten van de studie?

- Dit is een in vitro-studie. De bewijslast van een dergelijke studie is erg laag, ongeacht de resultaten (**zie figuur 2**).
- In de studie is gekeken naar de effecten van verschillende concentraties neotaam op de darmwandcellen. Onduidelijk is echter wat de concentratie neotaam is waar darmwandcellen in de praktijk aan worden blootgesteld.
- De concentraties neotaam waar de darmwandcellen en darmbacteriën aan zijn blootgesteld zijn niet om te rekenen naar een bepaalde hoeveelheid. Dat komt omdat een hoeveelheid en een concentratie in verschillende eenheden worden uitgedrukt (respectievelijk mg en mg/l). Een afstand (in km) kun je ook niet omrekenen naar een snelheid (in km/uur). Daarmee is het appels met peren vergelijken en niet te vertalen naar praktijksituaties.
- De darmwandcellen zijn 24 uur aan neotaam blootgesteld. De transporttijd door de darm duurt echter 5 uur [9]. Dat betekent dat darmwandcellen en darmbacteriën in de praktijk minder lang aan neotaam worden blootgesteld dan in de experimenten is gebeurd. De blootstellingsduur is daarmee onrealistisch.

Wat laten andere studies zien?

Dit is de eerste studie waarin gekeken is naar het effect van *neotaam* op a) darmwandcellen en b) de pathogene capaciteit van darmbacteriën op darmwandcellen. In 2018 is wel gekeken naar het effect van neotaam bij muizen op de samenstelling van de darmmicrobiota (**zie kader**).

2018

In deze studie werden 10 muizen gedurende 4 weken in twee groepen verdeeld [10]. De ene groep (n=5) kreeg gewoon water (controlegroep) en de andere groep (n=5) kreeg water met neotaam (0,75 mg/kg lichaamsgewicht/dag). Na 4 weken was de bacteriële diversiteit in de darmen van de muizen die neotaam kregen lager dan in de controlegroep. Daarnaast nam de bacteriegroep Bacteroidetes toe en die van Firmicutes af. Wat dit concreet betekent is onduidelijk omdat er verschillende families en stammen onder vallen.

Belangrijke beperkingen waren het kleine aantal muizen dat gebruikt is en de reeltief korte duur. De onderzoekers geven zelf ook aan dat meer studies nodig zijn om de langetermijn-effecten bij de mens te onderzoeken. Bovendien zeggen deze resultaten niet iets over het effect van neotaam op de darmwand.

Wat is de darmmicrobiota?

In en op ons lichaam zitten miljarden bacteriën. Sommige bacteriën kunnen ziekten veroorzaken, maar de meeste zijn goedaardig en leven in symbiose met ons. Veruit de meeste bacteriën zitten in de dikke darm. Dit wordt de darmmicrobiota genoemd (vroeger darmflora). Daar zijn ze niet alleen betrokken bij de afbraak van onverteerbare voedselresten (voedingsvezels), maar ook bij het goed functioneren van onder andere het immuunsysteem, de hersenen en het glucosemetabolisme [11].

We weten steeds beter dat de darmmicrobiota een belangrijke rol speelt bij gezondheid en ziekte. Het is echter nog niet goed mogelijk om aan te geven wat een gezonde darmmicrobiota is. Wel is een eenzijdige samenstelling (lage bacteriële diversiteit) geassocieerd met gezondheidsproblemen en vice versa [11]. Of er dan ook altijd sprake is van een oorzakelijk verband moet verder onderzocht worden [12].

Wat betekent het concreet voor het gebruik van zoetstoffen in de praktijk?

De bewijskracht van deze studie is erg laag (in vitro) en de resultaten zijn niet naar de praktijk toe te vertalen. Daardoor heeft deze studie geen gevolgen voor het gebruik van neotaam. Daarvoor is meer en beter onderzoek nodig.

Opmerking

De 'European Food and Safety Authority' (EFSA) heeft als taak om alle voedingsadditieven (inclusief zoetstoffen) die vóór 20 januari 2009 zijn goedgekeurd opnieuw te beoordelen op veiligheid. Momenteel is de EFSA bezig om acesulfaam-K en neotaam te beoordelen [13]. Wanneer dit is afgerond worden de resultaten gepubliceerd.

Referenties

1. Shil A, Chichger H. Artificial sweeteners negatively regulate pathogenic characteristics of two model gut bacteria, *E. coli* and *E. faecalis*. *Int J Mol Sci.* (2021) 22:5228.
2. Shil A, Olusanya O, Ghufloor Z, Forson B, Marks J, Chichger H. Artificial sweeteners disrupt tight junctions and barrier function in the intestinal epithelium through activation of the sweet taste receptor, T1R3. *Nutrients.* (2020) 12:1862.
3. Shil A, Ladeira Faria LM, Walker CA, Chichger H. The artificial sweetener neotame negatively regulates the intestinal epithelium directly through T1R3-signaling and indirectly through pathogenic changes to model gut bacteria. *Front. Nutr.* (2024) 11:1366409.
4. Ma R, Hu X, Zhang X, Wang W, Sun J, Su Z, Zhu C. Strategies to prevent, curb and eliminate biofilm formation based on the characteristics of various periods in one biofilm life cycle. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Sep 21;12:1003033.
5. Nofrea C, Tinti JM. Neotame: discovery, properties, utility. *Food Chemistry* 69 (2000) 245-257.
6. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from European Commission on Neotame as a sweetener and flavour enhancer. *The EFSA Journal* (2007) 581, 1-43.
7. Publicatieblad van de Europese Unie. Richtlijn 163/EU van de Commissie van 22 december 2009 tot wijziging van Richtlijn 94/35/EG van het Europees Parlement en van de Raad inzake zoetstoffen die in levensmiddelen mogen worden gebruikt, wat neotaam betreft.
8. Mohammad S, Thiemermann C. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. *Front Immunol.* 2021 Jan 11;11:594150.
9. Sensoy I. A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. *Curr Res Food Sci.* 2021 Apr 14;4:308-319.
10. Chi L, Bian X, Gao B, Tu P, Lai Y, Ru H, Lu K. Effects of the Artificial Sweetener Neotame on the Gut Microbiome and Fecal Metabolites in Mice. *Molecules.* 2018 Feb 9;23(2):367.
11. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, Zhu D, Koya JB, Wei L, Li J, Chen ZS. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Apr 23;7(1):135.
12. McBurney MI, Davis C, Fraser CM, Schneeman BO, Huttenhower C, Verbeke K, Walter J, Latulippe ME. Establishing What Constitutes a Healthy Human Gut Microbiome: State of the Science, Regulatory Considerations, and Future Directions. *J Nutr.* 2019 Nov 1;149(11):1882-1895.
13. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/sweeteners> Geraadpleegd: 29-04-2024