



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

**Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών**

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
«ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ»**

**Συμβολή στη βελτιστοποίηση της γαστρεντερικής απορρόφησης  
φαρμάκων που χορηγούνται per os σε νήπια**

**Ρωμανός Ιωάννης**

**A.M. 170606**

**ΑΘΗΝΑ 2019**



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
**Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών**

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
«ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ»**

**Συμβολή στη βελτιστοποίηση της γαστρεντερικής απορρόφησης  
φαρμάκων που χορηγούνται per os σε νήπια**

**Ρωμανός Ιωάννης**

**A.M. 170606**

**ΑΘΗΝΑ 2019**

***Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή***

Ρέππας Χρήστος, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Ρούσσης Βασίλειος, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Βερτζώνη Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το πόνημα αυτό συντάχθηκε στα πλαίσια της διπλωματικής μου εργασίας στον Τομέα της Φαρμακευτικής Τεχνολογίας.

Στην διεκπεραίωσή του συνέβαλαν πολλοί άνθρωποι τους οποίους ευχαριστώ βαθύτατα. Από αυτούς τους θα ήθελα να ξεχωρίσω τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Ρέππα Χρήστο για την ανάθεση αυτού του ενδιαφέροντος θέματος που συνδυάζει πειραματικό και υπολογιστικό κομμάτι, καθώς και για την διαρκή βοήθεια και την καθοδήγησή του.

Ένα απλό ευχαριστώ δεν φτάνει για την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Βερτζώνη Μαρία. Το επιστημονικό της έργο απετέλεσε πηγή έμπνευσης και επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την υπομονή της, την συνεργασία, την καθοδήγηση και τις συμβουλές της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διδάκτορα Κικιώνη Στέφανο για την παρασκευή των νανοϊνών, την παροχή φωτογραφιών από το μικροσκόπιο και την πολύτιμη βοήθειά του σε όλη την διάρκεια της μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Ρούσση Βασίλειο για τις συμβουλές στην παρασκευή των νανοϊνών και για τις υποδείξεις και παρατηρήσεις ως μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, ακόμη, την υποψήφια Διδάκτορα Τσακιρίδου Γεωργία για τη συμβολή της στην ταυτοποίηση της μορφολογίας των κρυσταλλικών φάσεων με χρήση ανάλυσης ακτινών X (X-Ray Diffraction (XRD) Analysis).

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ιωάννου Ευσταθία για τις πολύτιμες συμβουλές της στην παρασκευή των νανοϊνών.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τις υποψήφιες Διδάκτορες Πενταφράγκα Χριστίνα, Statelova Marina και Κωνσταντίνη Χριστίνα για την βοήθεια τους κατά την διεκπεραίωση των πειραμάτων, την Κόντη Ελένη για όλη την στήριξη κατά τη διάρκεια των Μεταπτυχιακών Σπουδών μου, καθώς επίσης και τους γονείς, που έδωσαν τη συγκατάθεσή τους για τη συμβολή των νηπίων στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης.

*Αθήνα, Ιούλιος 2019*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός:** Η προκαταρκτική *in vitro* διερεύνηση της χρησιμότητας διασπορών σε παρασκευαζόμενες με ηλεκτροϊνοποίηση νανοϊνες πολυμερών, ως μεθοδολογία παρασκευής προϊόντων με αυξημένες δυνατότητες (enabling drug products) για *per os* χορήγηση σε νήπια, φαρμάκων των οποίων η απορρόφηση ρυθμίζεται από την ενδοαυλική διαλυτότητα. Η εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης σε υλικό από κόπρανα νηπίων, φαρμάκων για τα οποία υπάρχουν ήδη δεδομένα σε παρόμοιο υλικό από ενήλικες και παιδιά σχολικής ηλικίας.

**Μέθοδοι:** Αρχικά παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν στερεές διασπορές δύο ευδιάλυτων φαρμάκων (καφεΐνη και ρανιτιδίνη) σε νανοϊνες για την προκαταρκτική εκτίμηση της σημασίας της υδατοδιαλυτότητας του πολυμερούς στη διάλυση του φαρμάκου. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν στερεές διασπορές της αλβενδαζόλης σε νανοϊνες διαφόρων πολυμερών, ως προς τη χρησιμότητά τους στη βελτίωση των χαρακτηριστικών διάλυσης σε συνθήκες, που προσομοιώνουν τα περιεχόμενα του στομάχου κατά τη διαπεπτική περίοδο. Επιπρόσθετα, για την εκτίμηση της συμπεριφοράς μετά από απευθείας χορήγηση του υλικού με ένα ποτήρι νερό, δηλαδή, εναιωρήματος για χορήγηση σε νήπια, τα δεδομένα συγκρίθηκαν με τα δεδομένα ενός εμπορικά διαθέσιμου εναιωρήματος της αλβενδαζόλης με ενισχυμένες δυνατότητες (enhanced oral suspension, Zentel®). Η βακτηριακή αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης και ολσαλαζίνης μελετήθηκε σε υλικό από κόπρανα, που παρασκευάστηκε από κόπρανα επτά (7) νηπίων (εύρος ηλικιών: 2-5 ετών). Υπό αναερόβιες συνθήκες, το υλικό παρασκευάστηκε με αραίωση των κοπράνων με φυσιολογικό ορό (0,9 % χλωριούχο νάτριο) σε αναλογία 1:3,8 w/v. Τα πειράματα έγιναν σε αναερόβιες συνθήκες.

**Αποτελέσματα:** Τα δεδομένα διάλυσης διασπορών καφεΐνης και ρανιτιδίνης έδειξαν ότι η υδατοδιαλυτότητα του πολυμερούς δεν είναι επαρκής για την επιλογή του κατάλληλου πολυμερούς για παρασκευή διασποράς ενός φαρμάκου σε πολυμερικές νανοϊνες. Συγκριτικά με δεδομένα από άλλες πολυμερικές νανοϊνες, η διάλυση της αλβενδαζόλης από νανοϊνες πολυβινυλοπυρρολιδόνης (PVP) σε FaSSGF Level III ήταν πληρέστερη. Στις νανοϊνες αυτές η αλβενδαζόλη ήταν κατανεμημένη σε άμορφη κατάσταση. Σε συνθήκες προσομοίωσης απευθείας χορήγησης διασποράς αλβενδαζόλης σε νανοϊνες PVP, ο ρυθμός διάλυσης ήταν

ελαφρώς αργότερος και η μέγιστη συγκέντρωση παρόμοια με τα δεδομένα του εμπορικά διαθέσιμου εναιωρήματος με ενισχυμένες δυνατότητες. Η μέση τιμή του χρόνου ημίσειας ζωής στο υλικό από κόπρανα των νηπίων για τη μετρονιδαζόλη και την ολσαλαζίνη ήταν 5,6 min και 23 min, αντίστοιχα.

**Συμπεράσματα:** Με βάση τα δεδομένα για την αλβενδαζόλη, πολυμερικές νανοΐνες που έχουν παρασκευασθεί με ηλεκτροϊονοποίηση θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμη μεθοδολογία παρασκευής προϊόντων με αυξημένες δυνατότητες για per os χορήγηση σε νήπια, φαρμάκων των οποίων η απορρόφηση ρυθμίζεται από την ενδοαυλική διαλυτότητα. Ωστόσο, πληροφορίες σχετικές με τις κρίσιμες ιδιότητες ενός πολυμερούς για τη συγκεκριμένη εφαρμογή είναι πολύ περιορισμένες. Επιπρόσθετα, η σταθερότητα της άμορφης κατάστασης και η παρασκευή σχετικών προϊόντων σε βιομηχανική κλίμακα αποτελούν θέματα για περαιτέρω διερεύνηση. Η βακτηριακή αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα νηπίων ήταν υψηλής μεταβλητότητας, μεγαλύτερης από αυτή που έχει παρατηρηθεί στο παρελθόν σε παρόμοια υλικά από ενήλικες και από παιδιά σχολικής ηλικίας.

## ABSTRACT

**Purpose:** The preliminary in vitro investigation of the usefulness of electrospun polymeric nanofibers as an enabling drug product formulating technology for the oral administration of drugs with solubility limited absorption to toddlers. The evaluation of bacterial degradation in fecal material prepared from toddlers using drugs previously investigated in similar material from adults and school-children.

**Methods:** Solid dispersions of two highly soluble drugs, caffeine and ranitidine were initially prepared and tested for evaluating the importance of polymer aqueous solubility on the dissolution kinetics. Solid dispersions of albendazole in nanofibers of various polymers were then prepared and tested for their usefulness in facilitating the dissolution process under conditions simulating the intragastric environment in the fasted state. In addition, to evaluate the performance, after direct administration of the nanofiber material with a glass of water, i.e. of a suspension for administration to toddlers, data were compared with those of an enhanced, commercially available albendazole suspension (Zentel®). Bacterial degradation of metronidazole and olsalazine was investigated in fecal material prepared from stools of seven healthy toddlers (age range: 2-5 years). Under anaerobic conditions, fecal material was prepared by dilution with saline (0.9% sodium chloride) at a ratio of 1:3.8 w/v. Experiments were performed under anaerobic conditions.

**Results:** Data with caffeine and ranitidine solid dispersions in polymeric nanofibers revealed that aqueous solubility of the polymer is inadequate for selecting the most appropriate polymer. Compared with data in other polymeric nanofibers, albendazole dissolution from polyvinylpyrrolidone (PVP) nanofibers in FaSSGF Level III was more complete. Albendazole was dispersed in an amorphous state PVP nanofibers. Under conditions simulating direct administration of the albendazole dispersion in PVP nanofibers, the dissolution rates were slightly lower and the extent of dissolution was similar to those with Zentel® suspension. Mean values for the half-life of metronidazole and olsalazine in faecal material were 5.6 min and 23 min, respectively.

**Conclusions:** Based on the albendazole data, electrospun polymeric nanofibers could be considered as an enabling drug product platform for administering oral suspensions of drugs with solubility limited absorption to toddlers. However, today information on the critical properties of polymers to be considered for such application remain largely unknown. In addition, stability of the amorphous state of the drug dispersed in nanofibers and manufacturing process of relevant products on an industrial scale are areas requiring further investigation. Metronidazole and olsalazine degradation data in fecal material from toddlers were highly variable. Variability seems to be higher than that previously observed in similar material from adults or school-children.



## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

|  |    |
|--|----|
| A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....   | 12 |
| A. 1 Per os χορήγηση φαρμακευτικών προϊόντων σε νήπια .....  | 12 |
| A. 2 Στερεές διασπορές φαρμάκων για per os χορήγηση.....   | 14 |
| A. 3 Στερεές διασπορές φαρμάκων σε νανοΐνες .....  | 20 |
| A. 3. 1 Παραλαβή νανοϊνών με ηλεκτροϊνοποίηση .....  | 20 |
| A. 3. 2 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραλαβή νανοϊνών με ηλεκτροϊνοποίηση...22   |    |
| A. 3. 3 Εφαρμογές νανοϊνών με ηλεκτροϊνοποίηση στη χορήγηση φαρμάκων .....   | 24 |
| A. 4 Το μικροβίωμα του εντερικού αυλού .....   | 25 |
| A. 4. 1 Διαφοροποίηση του μικροβιώματος με την ηλικία.....   | 26 |
| A. 4. 2 Εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων.....   | 28 |
| A. 5 Στόχοι της παρούσας μελέτης.....  | 30 |
| A. 5. 1 Προκαταρκτική διερεύνηση της χρησιμότητας διασπορών σε νανοΐνες στην per os χορήγηση δυσδιάλυτων φαρμάκων σε νήπια ..... | 30 |
| A. 5. 2 Βακτηριακή αποικοδόμηση φαρμάκων σε υλικό από κόπρανα νηπίων.....  | 33 |
| B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....  | 35 |
| B. 1 Οργανολογία .....   | 35 |
| B. 2 Αντιδραστήρια .....   | 36 |
| B. 3 Δραστικές Ουσίες-Φαρμακευτικά Προϊόντα.....   | 37 |
| B. 4 Αναλυτικές Τεχνικές.....  | 38 |
| B. 5 Προκαταρκτική διερεύνηση της χρησιμότητας των νανοϊνών στην per os χορήγηση δυσδιάλυτων φαρμάκων σε νήπια .....             | 38 |
| B. 5. 1 Παρασκευή διασπορών φαρμάκων σε νανοΐνες .....   | 38 |
| B. 5. 2 Υγρό που προσομοιώνει το περιβάλλον του στομάχου κατά τη διαπεπτική περίοδο (FaSSGF Level III) .....                     | 43 |
| B. 5. 3 Πειράματα διάλυσης .....   | 44 |
| B. 6 Βακτηριακή αποικοδόμηση φαρμάκων σε υλικό από κόπρανα νηπίων.....   | 46 |
| B. 6. 1 Μεθοδολογία συλλογής κοπράνων .....  | 48 |
| B. 6. 2 Πειράματα βακτηριακής αποικοδόμησης μετρονιδαζόλης και ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα .....                            | 52 |
| B. 6. 3 Ανάλυση Δεδομένων.....   | 54 |

|   |     |
|---|-----|
| Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ .....  | 55  |
| Γ. 1 Προκαταρκτική διερεύνηση της χρησιμότητας διασπορών σε ναοΐνες στην per os χορήγηση δυσδιάλυτων φαρμάκων σε νήπια .....                                  | 55  |
| Γ. 1. 1 Διασπορές καφεΐνης και ρανιτιδίνης σε ναοΐνες .....   | 55  |
| Γ. 1. 2 Διασπορές αλβενδαζόλης σε ναοΐνες.....  | 57  |
| Γ. 2 Βακτηριακή αποικοδόμηση μετρονιδαζόλης και ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα νηπίων.....  | 70  |
| Γ. 2. 1 Δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης μετρονιδαζόλης.....  | 70  |
| Γ. 2. 2 Δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης ολσαλαζίνης .....  | 74  |
| Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....   | 79  |
| Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....   | 82  |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....  | 88  |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....  | 88  |
| Αναλυτικές τεχνικές.....  | 88  |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....   | 106 |
| Αντίγραφο της άδειας για την πραγματοποίηση της μελέτης αποικοδόμησης φαρμάκων σε υλικό από κόπρανα νηπίων .....  | 106 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ .....   | 108 |
| Ερωτηματολόγιο που απαντήθηκε από γονείς υποψηφίων νηπίων.....  | 108 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV .....  | 112 |
| Δήλωση συγκατάθεσης γονέα για την συλλογή κοπράνων νηπίων .....   | 112 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V .....   | 121 |
| Φύλλο καταγραφής γευμάτων των νηπίων από τα οποία συλλέχθηκαν κόπρανα .....   | 121 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI.....   | 124 |
| Συνθήκες και έλεγχος καλής λειτουργίας αναερόβιου θαλάμου που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας .....   | 124 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII.....  | 127 |
| Πρωτογενή δεδομένα από τη μελέτη της προκαταρκτικής διερεύνησης της χρησιμότητας διασπορών σε ναοΐνες στην per os χορήγηση δυσδιάλυτων φαρμάκων σε νήπια..... | 127 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VIII .....  | 136 |

Πρωτογενή δεδομένα από τη μελέτη βακτηριακής αποικοδόμησης μετρονιδαζόλης και ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα νηπίων..... 136

## **A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **A. 1 Per os χορήγηση φαρμακευτικών προϊόντων σε νήπια**

Οι παιδικοί πληθυσμοί διακρίνονται στις εξής κατηγορίες (EMA 2012):

- Νεογνά (0-27 μέρες)
- Βρέφη (1-23 μήνες)
- Νήπια/παιδιά προσχολικής ηλικίας (2-5 ετών)
- Παιδιά σχολικής ηλικίας (6-11 ετών)
- Έφηβοι (12-17 ετών)

Τα χορηγούμενα από του στόματος (per os) παιδιατρικά προϊόντα περιέχουν συνήθως δραστικά συστατικά, τα οποία έχουν μελετηθεί σε ενήλικες (υγρά, στερεά ή ημιστερεά προϊόντα).

Λόγω της δυσκολίας κατάποσης στερεών από του στόματος φαρμακευτικών προϊόντων, υπάρχει τάση χορήγησης υγρών ή ημιστερεών προϊόντων (Πίνακας Α.1). Επειδή τα τελευταία χρόνια υπάρχουν πολλά δυσδιάλυτα νέα φάρμακα, είναι συχνή η χορήγηση προϊόντων με αυξημένες δυνατότητες (enabling drug products), που σε νήπια θα ήταν επιθυμητό να είναι υγρής ή ημιστερεής μορφής (π.χ. διαλύματα, γαλακτώματα, εναιωρήματα).

Μια σημαντική εξέλιξη, που αφορά στα παιδιατρικά εναιωρήματα, σχετίζεται με την έμφαση που δίνεται σε εναιωρήματα μιας χρήσης με στόχο την αποφυγή χρήσης συντηρητικών (Strickley 2018).

**Πίνακας Α.1:** Φαρμακευτικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται στους παιδικούς πληθυσμούς (Strickley 2018)

| <b>Ηλικία</b> | <b>Βάρος (kg)</b> | <b>Ηλικιακή κατάταξη</b>         | <b>Χρησιμοποιούμενα φαρμακευτικά προϊόντα ανάλογα με την ηλικία</b>  | <b>Προτεινόμενα φαρμακευτικά προϊόντα ανάλογα με την ηλικία</b>          |
|---------------|-------------------|----------------------------------|--|--|
|               | < 3               | Πρόωρα νεογνά                    | Ρινογαστρικός σωλήνας (nasogastric tube) για χορήγηση διαλύματος ή εναιωρήματος [έτοιμου προς χρήση ή σε σκόνη (powder) ή σε κοκκία (granules) για ανασύσταση] | Ρινογαστρικός σωλήνας με χρήση δισκίων για χορήγηση πόσιμου εναιωρήματος |
| 0-27 ημερών   | 3-5               | Νεογνά                           | Διάλυμα ή εναιώρημα (έτοιμο προς χρήση ή σε σκόνη ή σε κοκκία για ανασύσταση)  | Δισκία για χορήγηση πόσιμου εναιωρήματος                                 |
| 1-23 μηνών    | 5-10              | Βρέφη                            | Διάλυμα, εναιώρημα, mini δισκία (mini-tablets), διασπειρόμενα στο στόμα δισκία (orally disintegrated tablets (ODTs))   | Mini δισκία  |
| 2-5 ετών      | 10-25             | Νήπια/παιδιά προσχολικής ηλικίας | Mini δισκία, διασπειρόμενα στο στόμα δισκία, χορηγούμενα per os κοκκία, ψεκασμός φαρμάκου σε μορφή σκόνης (sprinkle powder)                                    |  |
| 6-12 ετών     | < 25              | Παιδιά σχολικής ηλικίας          | Μασώμενα δισκία (chewable tablets), διασπειρόμενα στο στόμα δισκία   | Μασώμενα δισκία, διασπειρόμενα στο στόμα δισκία, mini δισκία             |
| 12-17 ετών    | > 25              | Έφηβοι                           | Μικρά δισκία (small tablets), καψάκια (capsules)   | Δισκία, διασπειρόμενα στο στόμα δισκία, mini δισκία                      |

## **A. 2 Στερεές διασπορές φαρμάκων για per os χορήγηση**

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη φαρμακευτικών προϊόντων με αυξημένες δυνατότητες (enabling drug products), ιδιαίτερα για μόρια τα οποία είναι ελάχιστα διαλυτά στο νερό. Αυτό συμβαίνει, διότι η πλειοψηφία των νέων φαρμάκων είναι μόρια ελάχιστα διαλυτά στο νερό. Τα μόρια αυτά μπορεί να υφίστανται τόσο σε διαφορετικές πολυμορφικές ή επιδιαλυτωμένες κρυσταλλικές καταστάσεις, όσο και στην άμορφη κατάσταση, όπου παρατηρείται αυξημένη διάλυση και βιοδιαθεσιμότητα συγκριτικά με τις κρυσταλλικές μορφές (Hancock and Zografi, 1997).

Μειώνοντας το μέγεθος των σωματιδίων ή/και αλλάζοντας τη μορφολογία η απορρόφησή του μπορεί να είναι σημαντικά βελτιωμένη (Abuzara et al., 2017).

Τα στερεά προϊόντα υψηλής ενέργειας (π.χ. στερεά που περιέχουν το δραστικό συστατικό στην άμορφη κατάσταση) μπορεί να δημιουργήσουν υπέρκορα διαλύματα. Αυτή η στρατηγική μπορεί να αυξήσει την από του στόματος ή/και την τοπική απορρόφηση. Επίσης, είναι χρήσιμη για τον έλεγχο της αποδέσμευσης του φαρμάκου, αν επιλεγθούν τα κατάλληλα πολυμερή που θα συνεισφέρουν στην ελεγχόμενη αποδέσμευση. Ωστόσο, ένα υπέρκορο διάλυμα είναι θερμοδυναμικά ασταθές και έχει την τάση να μεταπέσει στην κατάσταση ισορροπίας μέσω της καθίζησης. Το γεγονός αυτό αποτελούσε για μεγάλο χρονικό διάστημα το βασικό πρόβλημα στην ανάπτυξη φαρμακευτικών στερεών προϊόντων υψηλής ενέργειας. Η σταθεροποίηση ενός υπέρκορου διαλύματος μπορεί να επιτευχθεί με την χρησιμοποίηση κατάλληλων πολυμερών (αναστολείς καθίζησης), που μπορεί να δράσουν με διάφορους μηχανισμούς. Ένα έκδοχο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αναστολέας καθίζησης είναι η υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη (HPMC) (Brouwers et al., 2009).

Ο συνδυασμός συστημάτων στερεής διασποράς και εκδόχων ελεγχόμενης αποδέσμευσης αποτελεί μία καινοτόμα προσέγγιση και στρατηγική ανάπτυξης προϊόντων ελεγχόμενης αποδέσμευσης για μόρια τα οποία δεν είναι ιδιαίτερα διαλυτά στο νερό. Τα συστήματα που προκύπτουν από τον παραπάνω συνδυασμό φέρουν τα πλεονεκτήματα τόσο των συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης, όσο και των συστημάτων στερεής διασποράς (Paaver et al., 2015).

Η ανακάλυψη πολλών μορίων της τάξης II και IV του BCS (Biopharmaceutical Classification System) σε συνδυασμό με την τεχνολογική ανάπτυξη οδήγησε στην αυξημένη χρήση μορίων σε άμορφη κατάσταση (Serajuddin 1999, Bikiaris 2011, Janssens and Van Den Mooter 2009). Ο αυξημένος ρυθμός διάλυσης και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου ενδοαυτικά, μετά από χορήγηση άμορφης αντί της κρυσταλλικής φάσης, αποδίδονται στη μεγαλύτερη ελεύθερη ενέργεια της άμορφης κατάστασης έναντι της κρυσταλλικής. Όταν ένα μόριο βρίσκεται στην άμορφη κατάσταση, είναι σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη και έχει μεγαλύτερη μοριακή κινητικότητα σε σχέση με την κρυσταλλική κατάσταση. Επομένως, εμφανίζει ταχύτερη κινητική αποικοδόμησης της κατάστασης και ευκολότερη ενσωμάτωσή του σε διάλυμα.

Ωστόσο, υπάρχουν τρία βασικά εμπόδια για την ανάπτυξη προϊόντων, που περιέχουν τη δραστική ουσία σε άμορφη κατάσταση (Murdande et al., 2011):

- Οι προβληματικές μέθοδοι ταυτοποίησης άμορφων δραστικών ουσιών
- Η αδυναμία πρόβλεψης της βιοδιαθεσιμότητας άμορφων δραστικών ουσιών, λόγω πιθανής επανακρυστάλλωσης που οφείλεται σε κινητικούς και σε θερμοδυναμικούς παράγοντες (Aso et al., 2001, Ngai et al., 2000)
- Η περιορισμένη διαθεσιμότητα υλικών, που αυξάνουν τη θερμοδυναμική σταθερότητα των άμορφων δραστικών ουσιών

Εδώ και περίπου μισό αιώνα πολλές επιστημονικές ομάδες έχουν ασχοληθεί με τη μορφοποίηση άμορφων δραστικών ουσιών, με στόχο τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητάς τους, κατά την από του στόματος χορήγηση.

Ανάλογα με την φυσική κατάσταση του φορέα, ο οποίος μπορεί να είναι κρυσταλλικός ή άμορφος, οι στερεές διασπορές κατηγοριοποιούνται σε κρυσταλλικές στερεές διασπορές και σε άμορφες στερεές διασπορές, αντιστοίχως. Οι στερεές διασπορές μπορούν, επίσης, να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις γενιές με βάση τη σύνθεση (Vo et al., 2013).

Οι στερεές διασπορές πρώτης γενιάς ήταν κρυσταλλικές στερεές διασπορές. Στις κρυσταλλικές στερεές διασπορές, ένα κρυσταλλικό φάρμακο διασπείρεται εντός ενός κρυσταλλικού φορέα που σχηματίζει εύτηκτο μίγμα (Sekiguchi and Obi 1961). Το σημείο

τήξης του μίγματος είναι χαμηλότερο από το σημείο τήξης του φαρμάκου και του φορέα. Οι κρυσταλλικοί φορείς στις στερεές διασπορές πρώτης γενιάς περιλαμβάνουν την ουρία (Sekiguchi and Obi 1961) και σάκχαρα, όπως είναι η σορβιτόλη και η μαννιτόλη (Jachowicz 1987). Αυτοί οι φορείς, ειδικά τα σάκχαρα, έχουν υψηλό σημείο τήξης, που δεν είναι ευνοϊκό για την παρασκευή στερεών διασπορών με την μέθοδο της τήξης. Επίσης, η ουρία παρουσιάζει υψηλή διαλυτότητα στο νερό και σε πολλούς κοινούς οργανικούς διαλύτες, ενώ τα σάκχαρα έχουν μικρή διαλυτότητα στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Ως εκ τούτου, τα σάκχαρα χρησιμοποιήθηκαν λιγότερο από άλλους κρυσταλλικούς φορείς. Οι Sekiguchi και Obi (1961) παρασκεύασαν τις πρώτες στερεές διασπορές για φαρμακευτική εφαρμογή, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε ως φορέας η ουρία για να σχηματίσει εύτηκτο μίγμα με την σουλφαθειαζόλη. Οι Zajc και συνεργάτες (2005) παρασκεύασαν στερεές διασπορές νιφεδιπίνης και μαννιτόλης σε διαφορετικές αναλογίες με την μέθοδο της τήξης. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντικά αυξημένο ρυθμό διάλυσης της νιφεδιπίνης σε σύγκριση με το φυσικό μείγμα αν και η κρυσταλλική κατάσταση της νιφεδιπίνης δεν άλλαξε (Zajc et al., 2005). Άλλοι ερευνητές προσπάθησαν, επίσης να βελτιώσουν τον ρυθμό διάλυσης της οφλοξασίνης μέσω συστημάτων στερεής διασποράς με ουρία και μαννιτόλη. Ο ρυθμός διάλυσης της οφλοξασίνης αυξήθηκε σημαντικά στα συστήματα στερεής διασποράς με ουρία και μαννιτόλη. Οι στερεές διασπορές με βάση την ουρία έδειξαν υψηλότερη διαλυτότητα σε σχέση με τις στερεές διασπορές με βάση την μαννιτόλη, επειδή η ουρία μείωσε την κρυσταλλικότητα της οφλοξασίνης. Γενικά, στην πρώτη γενιά η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων, η βελτίωση της διαβροχής και η πολυμορφική αλλαγή είναι οι κύριοι λόγοι για την αύξηση της διαλυτότητας του φαρμάκου και του ρυθμού διάλυσης. Το κύριο μειονέκτημα των κρυσταλλικών στερεών διασπορών είναι η υψηλή θερμοδυναμική σταθερότητα των φορέων γεγονός που οδηγεί σε μειωμένους ρυθμούς διάλυσης σε σύγκριση με τις άμορφες στερεές διασπορές (Vo et al., 2013).

Οι στερεές διασπορές δεύτερης γενιάς περιέχουν άμορφους φορείς, οι οποίοι είναι κυρίως πολυμερή. Οι άμορφες στερεές διασπορές μπορεί να κατηγοριοποιηθούν σε άμορφα στερεά διαλύματα και σε άμορφα στερεά εναιωρήματα, ανάλογα με την φυσική



κατάσταση του φαρμάκου. Στα άμορφα στερεά διαλύματα το φάρμακο και ο άμορφος φορέας είναι πλήρως αναμίξιμα και σχηματίζουν ομοιογενή διαλύματα, ενώ τα άμορφα στερεά εναιωρήματα αποτελούνται από δύο ξεχωριστές φάσεις. Τα άμορφα στερεά εναιωρήματα σχηματίζονται όταν το φάρμακο έχει περιορισμένη διαλυτότητα στον φορέα ή εξαιρετικά υψηλό σημείο τήξης (Van Drooge et al., 2006). Σε αυτά τα συστήματα, τα μικρά σωματίδια του φαρμάκου βρίσκονται κυρίως στην άμορφη κατάσταση και διασπείρονται στους άμορφους φορείς. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το δραστικό συστατικό μπορεί συχνά να υφίσταται σε περισσότερες από μία καταστάσεις. Για παράδειγμα, ένα δραστικό συστατικό μπορεί να διαλύεται και να διασπείρεται σε έναν φορέα ή να υφίσταται τόσο σε άμορφη όσο και σε κρυσταλλική κατάσταση. Στις άμορφες στερεές διασπορές το δραστικό συστατικό διασπείρεται σε σωματίδια με πολύ μικρό μέγεθος και υπάρχει σε υπέρκορη κατάσταση στους άμορφους φορείς (Tanaka et al., 2006). Οι άμορφοι φορείς μπορούν, επίσης, να βελτιώσουν τη διαβροχή και τη διασπορά των φαρμάκων, καθώς και να αναστείλουν την διαδικασία καθίζησης των φαρμάκων όταν άμορφες στερεές διασπορές διαλύονται σε νερό (Chauhan et al., 2013). Αυτές οι ιδιότητες μαζί με τον ταχύ ρυθμό διάλυσης των άμορφων φορέων λόγω της χαμηλής θερμοδυναμικής τους σταθερότητας αυξάνουν την διαλυτότητα και τον ρυθμό διάλυσης του φαρμάκου. Οι άμορφοι φορείς μπορούν να είναι συνθετικά και φυσικά πολυμερή. Τα συνθετικά πολυμερή περιλαμβάνουν την πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP) και την πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), ενώ τα φυσικά πολυμερή περιλαμβάνουν κυρίως παράγωγα κυτταρίνης, όπως είναι η υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη (HPMC), η υδροξυπροπυλοκυτταρίνη (HPC), η φθαλική υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη (HPMCP), αλλά και παράγωγα αμύλου (άμυλο καλαμποκιού, άμυλο πατάτας) και, τέλος, σάκχαρα (σουκρόζη, ινουλίνη). Μεταξύ αυτών το HPMC, το PEG και το PVP χρησιμοποιούνται ευρύτερα (Bialleck and Rein 2011). Σε αντίθεση με άλλα άμορφα πολυμερή που αναφέρονται παραπάνω, το PEG έχει ημικρυσταλλική δομή, αλλά πολύ χαμηλό σημείο τήξης (κάτω από τους 65°C) ανεξάρτητα από το μοριακό του βάρος. Επομένως, το PEG είναι κατάλληλο για την παραγωγή στερεών διασπορών με την μέθοδο της τήξης, ειδικά όταν το φάρμακο είναι ευαίσθητο στη θερμοκρασία. Αντίθετα, το PVP έχει σχετικά υψηλή

θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης και γι' αυτό δεν χρησιμοποιείται ευρέως στην μέθοδο τήξης (Leuner and Dressman 2000). Γενικά, στη δεύτερη γενιά μπορεί να προκύψει υπερκορεσμός, γεγονός που αυξάνει την ρυθμό διάλυσης. Ο υπερκορεσμός, όμως, μπορεί να συνοδευτεί με καθίζηση, η οποία δεν είναι επιθυμητή (Vo et al., 2013).

Στην τρίτη γενιά στερεών διασπορών, εισάγονται οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες ή οι αυτογαλακτωματοποιητές (self-emulsifiers) ως φορείς ή απλά ως πρόσθετα συστατικά στα προϊόντα της δεύτερης γενιάς και εμφάνισαν σημαντική βελτίωση ξεπερνώντας προβλήματα των προϊόντων της δεύτερης γενιάς, όπως η καθίζηση και η επανακρυστάλλωση. Η εισαγωγή επιφανειοδραστικών ή γαλακτωματοποιητών σε στερεές διασπορές βελτιώνει όχι μόνο τα χαρακτηριστικά της διάλυσης, αλλά και τη φυσική και χημική σταθερότητα του φαρμάκου. Στην πραγματικότητα, τα επιφανειοδραστικά με αμφίφιλη δομή μπορούν να ενισχύσουν την αναμιξιμότητα φαρμάκων και φορέων και έτσι να μειώσουν τον ρυθμό επανακρυστάλλωσης των φαρμάκων. Επιπλέον, τα επιφανειοδραστικά και οι γαλακτωματοποιητές μπορούν να αυξήσουν την διαβροχή των φαρμάκων και να αποτρέψουν την καθίζησή τους ενσωματώνοντας φάρμακα στα μικκύλια τους (Vo et al., 2013). Οι φορείς που χρησιμοποιούνται στα προϊόντα τρίτης γενιάς είναι μόρια με έντονες επιφανειοδραστικές ιδιότητες (π.χ. Poloxamer, Solurplus<sup>®</sup>, Gelucire 44/14). Το Poloxamer είναι ένα πολύ κοινό πολυμερές, που έχει χρησιμοποιηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα σε στερεές διασπορές σαν φορέας ή σαν πρόσθετο συστατικό, ενώ το Solurplus<sup>®</sup> χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια και εμφανίζει καλύτερη απόδοση (Shah et al., 2012). Οι Ali και οι συνεργάτες (2010) παρασκεύασαν στερεές διασπορές ιβουπροφαίνης και κετοπροφαίνης σε διαφορετικές γραμμομοριακές αναλογίες χρησιμοποιώντας Poloxamer 407 και Poloxame 188. Τα αποτελέσματα έδειξαν την διάσπαση του διμερούς της ιβουπροφαίνης και της κετοπροφαίνης που συνοδεύει το σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ του φαρμάκου και του φορέα. Οι στερεές διασπορές με γραμμομοριακή αναλογία 2:1 δεν είχαν φάρμακο σε κρυσταλλική κατάσταση, ενώ σε υψηλότερη αναλογία το φάρμακο συνυπάρχει και σε άμορφη και σε κρυσταλλική κατάσταση. Όλες οι στερεές διασπορές βελτίωσαν σημαντικά την διάλυση της ιβουπροφαίνης και της κετοπροφαίνης (Ali et al., 2010). Γενικά, τα προϊόντα τρίτης γενιάς

φαίνεται πως είναι μια πολύ ελπιδοφόρα προσέγγιση, αλλά απαιτούνται περισσότερα δεδομένα σχετικά με τον ενδοαυλικό υπερκορεσμό γιατί η γνώση μέχρι σήμερα είναι πολύ περιορισμένη (Vo et al., 2013).

Οι στερεές διασπορές τέταρτης γενιάς είναι στερεές διασπορές ελεγχόμενης αποδέσμευσης (controlled release solid dispersions), που περιέχουν ελάχιστα υδατοδιαλυτά φάρμακα με βραχύ χρόνο ημίσειας ζωής. Οι στερεές διασπορές ελεγχόμενης αποδέσμευσης ελάχιστα υδατοδιαλυτών φαρμάκων έχουν ως στόχο την ενίσχυση της διαλυτότητας, αλλά και την παρατεταμένη αποδέσμευση με ελεγχόμενο τρόπο. Η μοριακή διασπορά των ελάχιστα διαλυτών φαρμάκων μέσα στους φορείς θα βελτιώσει την διαλυτότητα του φαρμάκου, ενώ αδιάλυτα πολυμερή μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καθυστερήσουν την αποδέσμευση του φαρμάκου στο μέσο διάλυσης. Επίσης, τα προϊόντα αυτής της γενιάς μπορούν να μεταφέρουν επαρκή ποσότητα φαρμάκου για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, γεγονός που προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως είναι η βελτιωμένη συμμόρφωση του ασθενούς λόγω μειωμένης συχνότητας χορήγησης, οι μειωμένες παρενέργειες και το σταθερό ή παρατεταμένο θεραπευτικό αποτέλεσμα για τα ελάχιστα υδατοδιαλυτά φάρμακα (Desai et al., 2006). Τα πολυμερή, που χρησιμοποιούνται για την επιβράδυνση της αποδέσμευσης ελάχιστα υδατοδιαλυτών φαρμάκων στις στερεές διασπορές τέταρτης γενιάς είναι η αιθυλοκυτταρίνη (EC), η υδροξυπροπυλοκυτταρίνη (HPC), το Eudragit<sup>®</sup>, το πολυαιθυλενοξείδιο (PEO) και το Carborol<sup>®</sup>. Αυτά τα πολυμερή μπορούν να διατηρήσουν την αποδέσμευση φαρμάκων με ελάχιστη υδατοδιαλυτότητα στο νερό. Τα προϊόντα τέταρτης γενιάς έχουν δύο κύριους μηχανισμούς αποδέσμευσης του φαρμάκου: διάχυση και διαβροχή (Ozeki et al., 2000).

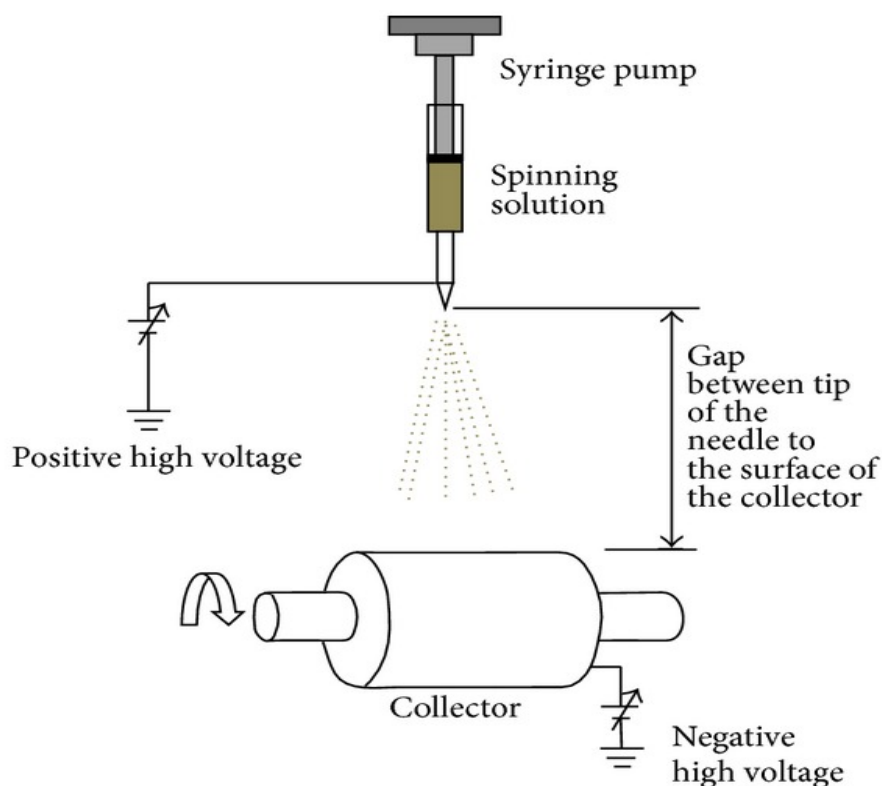
### **A. 3 Στερεές διασπορές φαρμάκων σε νανοϊνες**

Μία σχετικά πρόσφατη τεχνική στερεής διασποράς του φαρμάκου σε φορέα αποτελεί η διασπορά σε νανοϊνες. Ως νανοϊνες χαρακτηρίζονται οι ίνες με διάμετρο μικρότερη από ή ίση με 1000 nm (Tanioka et al., 2016).

#### *A. 3. 1 Παραλαβή νανοϊνών με ηλεκτροϊνοποίηση*

Η ηλεκτροϊνοποίηση (electrospinning) είναι μια τεχνική παραγωγής πολύ λεπτών ινών από πολυμερή μέσω εφαρμογής ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Έχει ευρύ πεδίο εφαρμογών σε διάφορους τομείς, όπως στην ιατρική, στην τεχνολογία αισθητήρων, στην κατάλυση και στην διήθηση και πρόκειται για την μόνη μέθοδο που επιτρέπει παραγωγή συνεχών ινών με διάμετρο μέχρι και μερικά nm (Greiner and Wendorff 2007). Η αύξηση της έκτασης της επιφάνειας μπορεί να αποτελέσει έναν αποτελεσματικό τρόπο για τον έλεγχο του ρυθμού διάλυσης του δραστικού συστατικού (Li and Xia, 2014).

Η διάταξη για τη μέθοδο της ηλεκτροϊνοποίησης αποτελείται από μια τροφοδοσία ρεύματος, έναν περιστρεφόμενο συλλέκτη νανοϊνών (τύμπανο) και μια αντλία σύριγγας για να ωθηθεί το διάλυμα πολυμερούς. Εφαρμόζεται υψηλή τάση μεταξύ του τριχοειδούς άκρου της σύριγγας και του περιστρεφόμενου συλλέκτη των νανοϊνών (Σχήμα A.1). Στον περιστρεφόμενο συλλέκτη, οι νανοϊνες σχηματίζονται με εξάτμιση του διαλύτη προκειμένου να φτιαχτεί ένα πολύ λεπτό νήμα. Ο περιστρεφόμενος συλλέκτης μπορεί να έχει οποιοδήποτε σχήμα ανάλογα με τις ανάγκες, όπως επίπεδη πλάκα ή περιστρεφόμενος κύλινδρος (Hamori et al., 2015).



**Σχήμα Α. 1:** Σχηματική απεικόνιση της διάταξης ηλεκτροϊνοποίησης (Hamori et al., 2015)

Με τη μέθοδο της ηλεκτροϊνοποίησης παράγονται νανοϊνες σε θερμοκρασία δωματίου, άρα είναι εφικτή η παραγωγή με βάση φυσικά ή/και τεχνητά πολυμερή, πρωτεΐνες και υλικά που είναι ευαίσθητα σε ακραίες θερμοκρασίες (Hamori et al., 2015).

Η βασική αρχή της ηλεκτροϊνοποίησης είναι η εφαρμογή της βέλτιστης τάσης στο διάλυμα πολυμερούς, η οποία υπερνικά την επιφανειακή τάση του συγκεκριμένου διαλύματος με σκοπό τον δημιουργία πίδακα. Την διάμετρο και το σχήμα των νανοϊνών επηρεάζουν παράγοντες όπως η τάση, το ιξώδες, το μοριακό βάρος του πολυμερούς, η αγωγιμότητα, ο ρυθμός ροής, αλλά και περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και η ροή αέρα. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο να σχεδιαστεί ο βέλτιστος εξοπλισμός για την ηλεκτροϊνοποίηση και να καθοριστούν οι ακριβείς παράμετροι για να λαμβάνονται ομοιόμορφες ίνες με τις επιθυμητές φυσικές ιδιότητες (Hamori et al., 2015).

### *A. 3. 2 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραλαβή νανοϊνών με ηλεκτροϊνοποίηση*

Η ηλεκτροϊνοποίηση είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία με αποτέλεσμα να είναι ευάλωτη σε μικρές τροποποιήσεις και να απαιτούνται ελεγχόμενες συνθήκες για να προκύψουν επαναλήψιμα αποτελέσματα.

Τα μοριακά βάρη των πολυμερών επηρεάζουν άμεσα τις ρεολογικές και ηλεκτρικές ιδιότητές τους, καθώς και τη μορφολογία των παραγόμενων ινών. Συνήθως, επιλέγονται πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους γιατί οδηγούν στον σχηματισμό ομοιόμορφων ινών με μεγαλύτερη διάμετρο (Bhardwaj and Kundu 2010).

Πολύ χαμηλό ιξώδες δεν οδηγεί σε σχηματισμό συνεχών ινών, διότι ο πίδακας που σχηματίζεται δεν προλαβαίνει να φτάσει στον συλλέκτη, ώστε παραληφθούν ίνες μετά την εξάτμιση του διαλύτη. Όμως, πολύ υψηλό ιξώδες δυσχεραίνει την εκροή του πίδακα από το πολυμερικό διάλυμα. Το ιξώδες ενός διαλύματος καθορίζει και την συγκέντρωση αυτού ώστε να σχηματιστούν οι επιθυμητές ίνες. Οι τιμές του ιξώδους των υλικών που μπορούν να ηλεκτροϊνοποιηθούν κυμαίνονται από 1 έως 215 Pa·s (Li and Wang 2013).

Ο σχηματισμός των ινών είναι άμεσα συνδεδεμένος με την συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος προς ινοποίηση. Μελέτες έχουν δείξει ότι αραιά διαλύματα πολυμερούς δίνουν πολυμερικά σταγονίδια πριν προλάβει το διάλυμα να φτάσει στον συλλέκτη, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις δεν διατηρείται η ροή του διαλύματος στην άκρη της βελόνας, με αποτέλεσμα να μην σχηματίζονται συνεχείς ίνες (Bhardwaj and Kundu 2010, Huang et al., 2011).

Υψηλή επιφανειακή τάση του διαλύματος προς ινοποίηση οδηγεί σε αστάθεια του πίδακα, άρα αναστέλλεται η ηλεκτροϊνοποίηση. Η μείωσή της έχει ως αποτέλεσμα την λήψη ινών χωρίς πολυμερικά σφαιρίδια (Bhardwaj and Kundu 2010).

Διαλύματα, τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή αγωγιμότητα, οδηγούν σε παραγωγή ινών μικρότερης διαμέτρου. Τα ιοντικά άλατα μπορούν να ρυθμίσουν την ηλεκτρική αγωγιμότητα ενός διαλύματος και να οδηγήσουν σε ομοιόμορφες ίνες μικρότερης διαμέτρου. Επίσης, τα οργανικά οξέα μπορούν να συμβάλλουν στην αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας (Bhardwaj and Kundu 2010).

Η εφαρμοζόμενη τάση πρέπει να είναι υψηλότερη από μια κρίσιμη τιμή, ώστε να αρχίσει η εκτόξευση του πίδακα για να ξεκινήσει ο σχηματισμός των ινών. Κάθε τύπος πολυμερικού διαλύματος έχει διαφορετική κρίσιμη τιμή και υπάρχει ένα εύρος τιμών εντός των οποίων πραγματοποιείται η ηλεκτροϊνοποίηση. Τιμές μικρότερες ή μεγαλύτερες από αυτό το εύρος είτε αναστέλλουν την ηλεκτροϊνοποίηση είτε οδηγούν στον σχηματισμό ινών με σφαιρίδια (Bhardwaj and Kundu 2010).

Συνήθως προτιμάται χαμηλή ταχύτητα εξερχόμενης ροής από τη σύριγγα, γεγονός που εξασφαλίζει στον διαλύτη τον απαιτούμενο χρόνο, ώστε να εξατμιστεί. Υψηλή ταχύτητα ροής μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό ινών μεγάλης διαμέτρου και με σφαιρίδια γιατί δεν προλαβαίνουν να στεγνώσουν πριν φτάσουν στον συλλέκτη (Bhardwaj and Kundu 2010).

Είναι σημαντικό η απόσταση μεταξύ της βελόνας και του συλλέκτη να επαρκεί, ώστε οι ίνες να στεγνώσουν πριν φτάσουν στον συλλέκτη. Η αύξηση της απόστασης οδηγεί σε σχηματισμό μικρότερων ινών. Σε πολύ μικρές ή πολύ μεγάλες αποστάσεις παράγονται ίνες με σφαιρίδια (Bhardwaj and Kundu 2010).

Τέλος, η διάμετρος των ινών επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και την υγρασία του περιβάλλοντος. Αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε μείωση της διαμέτρου παραγόμενων, λόγω μείωσης του ιξώδους του πολυμερικού διαλύματος. Αύξηση της υγρασίας οδηγεί σε σχηματισμό κυκλικών πόρων στην επιφάνεια των ινών, ενώ μείωση αυτής οδηγεί σε γρήγορο ρυθμό εξάτμισης του διαλύτη με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ο απαιτούμενος χρόνος για τον σχηματισμό των ινών (Bhardwaj and Kundu 2010).

### *A. 3. 3 Εφαρμογές ναοϊνών με ηλεκτροϊνοποίηση στη χορήγηση φαρμάκων*

Η μεγάλη έκταση επιφάνειας των ναοϊνών επιτρέπει τη γρήγορη και αποτελεσματική εξάτμιση του διαλύτη, η οποία παρέχει στο ενσωματωμένο φάρμακο περιορισμένο χρόνο για να ανακρυσταλλωθεί και ευνοεί έτσι τον σχηματισμό άμορφων διασπορών ή στερεών διαλυμάτων. Ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο πολυμερές, η αποδέσμευση της δόσης μπορεί να σχεδιαστεί ως ταχεία, άμεση, καθυστερούμενη ή τροποποιημένη διάλυση. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ναοϊνες είναι κατάλληλοι φορείς τόσο για υδρόφιλα, όσο και για υδρόφοβα φάρμακα και ότι ο ρυθμός αποδέσμευσης τους μπορεί να ρυθμιστεί με διαμόρφωση της μορφολογίας, του πορώδους και της σύστασης των ναοϊνών (Bhardwaj & Kundu 2010, Vasita & Kati 2006).

Οι ναοϊνες έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς άμορφων δραστικών φαρμάκων με σκοπό την αύξηση της διαλυτότητας και της διάλυσης ελάχιστα διαλυτών στο νερό μορίων, αφού η ηλεκτροϊνοποίηση μπορεί να σταθεροποιήσει μόρια στην άμορφη κατάσταση (Paaver et al., 2015). Επιπρόσθετα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ελέγξουν την αποδέσμευση του φαρμάκου, αφού μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολυμερή που επιτρέπουν την αποδέσμευση φαρμάκου σε όξινο ή σε αλκαλικό pH (Thakkar and Misra 2017).

Υπάρχουν αρκετές μελέτες σε εξέλιξη, ώστε να επιβεβαιωθεί η χρησιμότητα των ναοϊνών σε μια πληθώρα ασθενειών. Για παράδειγμα, γίνονται μελέτες για ενσωμάτωση της δονεπεξίλης σε ναοϊνες για αντιμετώπιση της νόσου του Alzheimer μέσω διαδερμικής χορήγησης (Gencturk et al., 2016) και μελέτες για παραγωγή ναοϊνών βανκομυκίνης προκειμένου να αντιμετωπιστούν λοιμώξεις των αυτιών από στελέχη του *Staphylococcus aureus* (Jang et al., 2015). Τέλος, οι Cejkova και συνεργάτες (2016) έχουν αποδείξει θεραπεία αλκαλικά τραυματισμένου κερατοειδούς χιτώνα από ναοϊνες κυκλοσπορίνης A (Cejkova et al., 2016).

Όμως, μέχρι στιγμής η χρήση των ναοϊνών περιορίζεται σε φαρμακευτικά προϊόντα τοπικής χρήσης και δεν υπάρχουν στερεές διασπορές φαρμάκων σε ναοϊνες για per os χορήγηση, παρά μόνο σε ερευνητικό επίπεδο.



#### A. 4 Το μικροβίωμα του εντερικού αυλού

Με τον όρο «μικροβιακή χλωρίδα» εννοούμε τους μικροοργανισμούς φυτικής προέλευσης, που αποικούν στις επιφάνειες του σώματος, συμπεριλαμβανομένου του γαστρεντερικού σωλήνα. Στη μικροβιακή χλωρίδα δεν εντάσσονται μη βακτηριακής προέλευσης μικροοργανισμοί, όπως αρχαία, ιοί και μύκητες, οι οποίοι ζουν επίσης φυσιολογικά στο έντερο. Το σύνολο των μικροοργανισμών, που αποικούν στον γαστρεντερικό σωλήνα, αποτελούν το «μικροβίωμα» (microbiome).

Οι μικροοργανισμοί που αποικούν στο κατώτερο έντερο είναι στην πλειονότητά τους αναερόβια βακτήρια και υπερσχύουν των αερόβιων κατά  $10^3$ - $10^4$  φορές. Η βακτηριακή συγκέντρωση στο παχύ έντερο ανέρχεται σε  $10^{11}$ - $10^{12}$ /mL (Shamat, 1993). Κατά μήκος του κατώτερου εντέρου αυξάνονται τα βακτήρια σε αριθμό και είδος (McConnell et al. 2008).

Πρόσφατα ήρθαν στο φως δεδομένα που αναδεικνύουν 3 διαφορετικά είδη μικροβιώματος, αποκαλούμενα και «εντερότυποι». Η διάκριση αυτή προήλθε από την παρατήρηση ότι σε κάθε εντερότυπο κυριαρχούσε η παρουσία ενός είδους βακτηρίου: Prevotella, Ruminococcus και Bacteroides αντίστοιχα. Η παρουσία ή μη του κάθε εντερότυπου φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από την εθνικότητα, το φύλο, την ηλικία, το βάρος (Quigley, 2013).

Το μικροβίωμα του εντέρου επιτελεί καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του ανθρώπου-ξενιστή με διάφορους μηχανισμούς:

- Εμποδίζει την αποίκιση του σώματος από παθογόνους μικροοργανισμούς
- Εμφανίζει ανοσολογική δράση. Συγκεκριμένα, ενεργοποιεί την παραγωγή ανοσοσφαιρίνης A, επάγει τα T-λεμφοκύτταρα και ρυθμίζει την παραγωγή κυτοκινών, αυξάνοντας εκείνες με αντιφλεγμονώδη δράση και μειώνοντας εκείνες με προφλεγμονώδη δράση
- Προάγει την αποσύζευξη των χολικών οξέων
- Παρουσιάζει σημαντική μεταβολική δράση. Ειδικότερα, συμμετέχει στην παραγωγή των αμινοξέων αργινίνη και γλουταμίνη και των λιπαρών οξέων βραχείας αλυσού. Επιπρόσθετα, συμμετέχει στη σύνθεση βιταμίνης K και

φολικού οξέος και εξοικονομεί ενέργεια για λογαριασμό του ξενιστή. Τέλος, εξαιρετικής σημασίας είναι η παρουσία των βακτηρίων του εντέρου για τη βιομετατροπή φαρμάκων (Quigley, 2013).

#### *A. 4. 1 Διαφοροποίηση του μικροβιώματος με την ηλικία*

Ο αρχικός αποικισμός του εντέρου είναι σημαντικός για το μελλοντικό μικροβίωμα και τη λειτουργία του. Κατά τη γέννηση, το έντερο είναι στείρο και ο βακτηριακός αποίκισμος αρχίζει με τη ρήξη της αμνιακής μεμβράνης. Τα βακτήρια που προέρχονται από το έντερο και τον κόλπο της μητέρας, καθώς και από το εξωτερικό περιβάλλον, αποικούν στο έντερο του νεογνού μέσα σε λίγες ώρες από την γέννηση και στη συνέχεια εμφανίζονται στα περιττώματα. Αρχικά εντοπίζονται στελέχη *Escherichia coli* και *Streptococci*, τα οποία είναι αναερόβια και έχουν λίγες απαιτήσεις σε θρεπτικές ύλες, επιτρέποντας έτσι την σταδιακή αύξηση του μικροβιώματος σε αριθμό και ποικιλότητα (Sousa et al. 2008). Μετά την εγκατάσταση των βακτηρίων στον οργανισμό, κατά την βρεφική ηλικία (περίπου 2 ετών), το μικροβίωμα παραμένει περίπου σταθερό σε ατομικό επίπεδο. Αυτό συμβαίνει τουλάχιστον μέχρι πολύ αργότερα στη ζωή του ατόμου, οπότε και πιθανές αλλαγές στην υγεία και τη διατροφή πιθανώς να μεταβάλουν, μεταξύ άλλων, και τη φυσιολογία του εντέρου (O'Toole, 2009).

Τα παιδιά που γεννούνται με φυσιολογικό τοκετό έχουν μεγαλύτερη αφθονία στα είδη *Bacteroides* και *Bifidobacterium* σε σχέση με τα παιδιά που γεννούνται με καισαρική τομή (Penders et al. 2006). Τα παιδιά, που γεννούνται με καισαρική τομή, εμφανίζουν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης διαταραχών του ανοσοποιητικού συστήματος (van Nimwegen et al. 2011). Άλλοι σημαντικοί παράγοντες, που συμβάλλουν στην οικοδόμηση του μικροβιώματος, είναι τα αντιβιοτικά, η κατάσταση υγείας και τα «λειτουργικά τρόφιμα», που όλο και περισσότερο χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια κατά τη βρεφική ηλικία.

Η χρονική περίοδος του αρχικού βακτηριακού αποικισμού είναι σημαντική, όπως φάνηκε και σε ζωικά μοντέλα (Hansen et al. 2012). Σε πρόωρα γεννημένα νεογνά ο

βακτηριακός αποικισμός καθυστερεί και ο αριθμός των ειδών, που αποικούν, είναι περιορισμένος. Αυξημένη ποικιλομορφία του εντερικού μικροβιώματος παρατηρήθηκε τις πρώτες 8 εβδομάδες σε πρόωρα γεννημένα βρέφη, με τα πιο συχνά παρατηρούμενα κύρια είδη να είναι ο σταφυλόκοκκος και το Bifidobacterium (Jacquot et al. 2011).

Η διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο τόσο κατά τη γέννηση, όσο και μετά από αυτή. Το μητρικό γάλα είναι σημαντικό όχι μόνο γιατί προσφέρει υποστρώματα για βακτηριακή ανάπτυξη (Gabielli et al. 2011), αλλά και γιατί αποτελεί ένα φυσικό εμβόλιο, που επηρεάζει το νεογνικό αποικισμό (Albesharat et al. 2011). Στα βρέφη που θηλάζουν βρέθηκε σχεδόν διπλάσιος αριθμός στελεχών του είδους Bifidobacterium, ενώ σε αυτά που δεν θηλάζουν, βρέθηκαν τα είδη Atorium και Bacteroides σε μεγάλες ποσότητες. Επίσης, τα βρέφη που δεν θηλάζουν εμφανίζουν μικρότερη ποικιλομορφία σε σχέση με αυτά που θηλάζουν (Bezirtzoglou et al. 2011). Ο θηλασμός έχει συσχετιστεί με μία σειρά από βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες ευεργετικές επιδράσεις και είναι πιθανόν το μικροβίωμα να συμβάλλει σε πολλές από αυτές. Αργότερα, ο απογαλακτισμός και η εισαγωγή στερεής τροφής στη διατροφή των παιδιών συμβάλλουν στην εμφάνιση μικροβιώματος, το οποίο μοιάζει με αυτό ενός ενήλικα (Koenig et al. 2011), ενώ πολύ σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και τα θεραπευτικά συστατικά στην τελική σύνθεση του μικροβιώματος (Wu et al. 2011).

Το μικροβίωμα στους ενήλικες είναι σχετικά σταθερό (Jalanka-Tuovinen et al. 2011). Η σταθερότητα αντικατοπτρίζει την ανθεκτικότητα του μικροβιώματος των ενηλίκων και διαταραχές, όπως αντιβιοτική θεραπεία, έχουν μόνο παροδικές επιπτώσεις στο μικροβίωμα. Συνολικά, το μικροβίωμα ενός ενήλικα είναι πιο πολύπλοκο από αυτό ενός βρέφους, αν και γενικά θεωρείται πως είναι σταθερό με την πάροδο του χρόνου και παρόμοιο μεταξύ των ατόμων (Claesson et al. 2011). Το εντερικό μικροβίωμα ενός βρέφους έχει απλή δομή, αλλά είναι σχετικά ασταθές με την πάροδο του χρόνου. Το μικροβίωμα στα παιδιά επηρεάζεται από λίγες μεταβλητές και είναι λιγότερο εκτεθειμένο σε παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να αλλάξουν τη σύστασή του, σε σχέση με τους ενήλικες (Hooper et al. 2012).

#### A. 4. 2 Εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων

Μεθοδολογίες που περιλαμβάνουν τη χρήση υλικού από ανθρώπινα κόπρανα μπορούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά βακτηριακής αποικοδόμησης μορίων με φαρμακολογική δράση στον αυλό του παχέος εντέρου (Basit et al. 2001). Σε σχέση με τις μεθοδολογίες που περιλαμβάνουν τοπική χορήγηση στο παχύ έντερο και εκτίμηση της παρουσίας του φαρμάκου στο πλάσμα (Nyberg et al. 2007) είναι σημαντικά οικονομικότερη.

Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες με στόχο τον προσδιορισμό της έκτασης της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμακευτικών ουσιών στις κατώτερες περιοχές του γαστρεντερικού σωλήνα. Η μεγαλύτερη πρόκληση για την διεξαγωγή των πρώτων μελετών ήταν η προσομοίωση των συνθηκών που επικρατούν στο παχύ έντερο. Η δύσκολη προσβασιμότητα του ανθρώπινου εντέρου δημιουργεί προβλήματα στη χρήση δείγματος που λαμβάνεται απευθείας από το κατώτερο έντερο. Έτσι, το πιο συνηθισμένο υλικό που χρησιμοποιείται ως μέσο για τη μελέτη της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων είναι το υλικό από κόπρανα ανθρώπων, καθώς πιστεύεται ότι προσομοιάζει εξαιρετικά στις συνθήκες που επικρατούν στο παχύ έντερο (Sousa et al, 2008).

Για την παρασκευή υλικού από κόπρανα, τα κόπρανα, αμέσως μετά τη συλλογή τους, μεταφέρονται σε αναερόβιο θάλαμο και αραιώνονται με φυσιολογικό ορό (Tannergren et al. 2014) ή με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Sousa et al. 2014). Το προκύπτον υλικό από κόπρανα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων *ex vivo*.

Υλικό από κόπρανα μπορεί να τοποθετηθεί σε απλό ζυμωτήριο κλειστής καλλιέργειας για τη μελέτη της διάσπασης φαρμακομορίων. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης εισαγωγής στο ζυμωτήριο πολλών διαφορετικών φιαλιδίων με μια δραστική ουσία το καθένα. Έτσι μπορεί να υπολογιστεί το προφίλ της βακτηριακής αποικοδόμησης πολλών ουσιών σε σύντομο χρονικό διάστημα (Sousa et al, 2008).

Αντίστοιχες μελέτες έχουν επίσης πραγματοποιηθεί σε συνεχείς καλλιέργειες, στις οποίες οι βακτηριακές αποικίες ανανεώνονται συνεχώς, προσομοιάζοντας το σύστημα συνεχούς ροής που επικρατεί στο παχύ έντερο (Sousa et al, 2008).

Ο Sousa και οι συνεργάτες του (2014) υπολόγισαν τη βακτηριακή αποικοδόμηση παραγώγων του 5-αμινοσαλικυλικού οξέος (5-ASA) σε υλικό από κόπρανα, το οποίο παρέλαβαν από πέντε υγιείς εθελοντές. Συγκεκριμένα, υπολόγισαν τη βακτηριακή αποικοδόμηση της ολσαλαζίνης και σουλφασαλαζίνης και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε αναερόβιο θάλαμο. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν προφάρμακα, τα οποία πρέπει να υποστούν αναγωγική διάσπαση του διπλού αζωτοδεσμού αποδίδοντας το δραστικό 5-ASA.

Έχει αναφερθεί μία μελέτη κατά την οποία μελετήθηκε *ex vivo* η βακτηριακή αποικοδόμηση φαρμακευτικών ουσιών σε περιεχόμενα ανιόντος παχέος εντέρου. Τα περιεχόμενα είχαν αναρροφηθεί μέσω κολονοσκόπησης από το ανιόν παχύ έντερο επτά υγιών ενηλίκων (ηλικίας 18 έως 60 ετών) κατά τη διαπεπτική περίοδο και κατά την περίοδο πέψης. Από τη μελέτη αυτή προέκυψε ότι η βακτηριακή αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης ήταν μεγαλύτερη στα περιεχόμενα του ανιόντος παχέος εντέρου, όταν αυτά ελήφθησαν κατά τη διαπεπτική περίοδο σε σχέση με αυτά που ελήφθησαν κατά την περίοδο πέψης (Vertzoni et al. 2011). Ακολούθησε σύγκριση με δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα, που είχαν ληφθεί από τρεις υγιείς ενήλικες (ηλικίας 18 έως 60 ετών) και είχαν αραιωθεί 1:3,8 w/v με φυσιολογικό ορό. Σε κάθε περίπτωση, τα υπό μελέτη φάρμακα αποικοδομούνταν πιο γρήγορα στο υλικό από κόπρανα απ' ό,τι στα περιεχόμενα του ανιόντος παχέος εντέρου. Πρόσφατα, προτάθηκε διαφορετική αραιώση των κοπράνων και τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με τα δεδομένα στο κατώτερο έντερο (Vertzoni et al., 2018).

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν τυποποιημένες διαδικασίες για τον χειρισμό υλικού από κόπρανα και επίσης έχει αυξηθεί η γνώση όσον αφορά την βακτηριακή αποικοδόμηση των φαρμάκων στα κατώτερα τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα (Karatza et al., 2016). Πρόσφατα, οι Sulaiman και συνεργάτες (2018) εκτίμησαν τη βακτηριακή αποικοδόμηση

της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα παιδιών ηλικίας 6 έως 11 ετών και σε υλικό από κόπρανα υπερηλίκων και την συνέκριναν με δεδομένα σε υλικό από κόπρανα ενηλίκων. Η υψηλή μεταβλητότητα των δεδομένων δεν επέτρεψε την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σε ποσοτική βάση (Sulaiman et al., 2018).

## **A. 5 Στόχοι της παρούσας μελέτης**

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν δύο:

- i. Η προκαταρκτική διερεύνηση της χρησιμότητας διασπορών σε ναοΐνες στην *per os* χορήγηση δυσδιάλυτων φαρμάκων σε νήπια
- ii. Η μελέτη της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων σε υλικό από κόπρανα νηπίων με στόχο τον εμπλουτισμό των υπάρχοντων δεδομένων (Sulaiman et al., 2018) και την εκτίμηση τυχόν διαφορών σε σχέση με την αποικοδόμηση σε υλικό από κόπρανα ενηλίκων

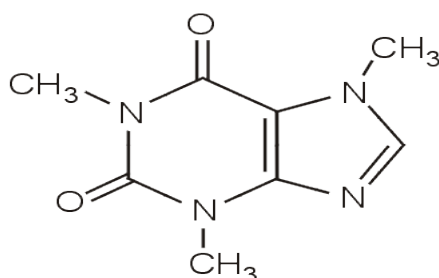
### *A. 5. 1 Προκαταρκτική διερεύνηση της χρησιμότητας διασπορών σε ναοΐνες στην *per os* χορήγηση δυσδιάλυτων φαρμάκων σε νήπια*

Αρχικά παρασκευάστηκαν ναοΐνες που περιείχαν δύο ευδιάλυτα μόρια, την καφεΐνη και τη ρανιτιδίνη, για να διερευνηθεί κατά πόσο είναι εφικτή η *a priori* πρόβλεψη της σημασίας της υδατοδιαλυτότητας του πολυμερούς στη διάλυση διασπορών φαρμάκων σε ναοΐνες. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν ναοΐνες διαφόρων πολυμερών, που περιείχαν ένα εξαιρετικά δυσδιάλυτο φάρμακο (αλβενδαζόλη) για την αρχική διερεύνηση της χρήσης ναοϊνών για την παρασκευή εναιωρημάτων με αυξημένες δυνατότητες (enabling drug products).

Η καφεΐνη (caffeine) (Σχήμα A.2) είναι μία μεθυλοξανθίνη και είναι το περισσότερο χρησιμοποιούμενο διεγερτικό στον κόσμο. Προκαλεί μείωση της κόπωσης, αύξηση της πνευματικής εγρήγορσης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για χαλάρωση των λείων μυών των βρογχιολίων. Όμως, δεν χρησιμοποιείται ευρέως θεραπευτικά. Βρίσκεται σε

συγκριτικά υψηλή συγκέντρωση στον καφέ, αλλά υπάρχει και στο τσάι, στα αναψυκτικά τύπου κόλα, στα γλυκά με σοκολάτα και στο κακάο.

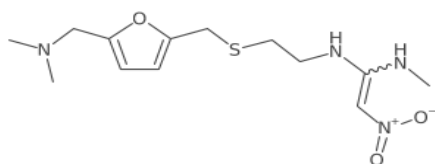
Οι μεθυλοξανθίνες (όπως και η καφεΐνη) απορροφώνται καλά μετά από χορήγηση από το στόμα. Η καφεΐνη κατανέμεται σε όλο το σώμα, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου. Διαπερνά τον πλακούντα προς το έμβρυο και απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα. Μεταβολίζεται στο ήπαρ και οι μεταβολίτες της απεκκρίνονται στα ούρα (Harvey and Champe 1992).



**Σχήμα A.2:** Δομή καφεΐνης

Η ρανιτιδίνη (ranitidine) (Σχήμα A.3) είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός H<sub>2</sub>-ανταγωνιστής της ισταμίνης, με πολύ γρήγορη δράση. Αναστέλλει την βασική και την μετά από διέγερση γαστρική έκκριση, μειώνοντας τον όγκο και την περιεκτικότητά της σε οξύ και πεψίνη.

Μετά από του στόματος χορήγηση 150 mg ρανιτιδίνης, οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα (300 έως 550 ng/mL) εμφανίσθηκαν μετά από 1-3 ώρες (Harvey and Champe 1992).

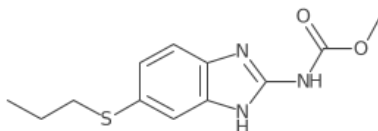


**Σχήμα A.3:** Δομή ρανιτιδίνης

Η αλβενδαζόλη (albendazole) (Σχήμα A.4) είναι μια βενζιμιδαζόλη η οποία αναστέλλει τη σύνθεση των μικροσωληνίσκων. Η κύρια θεραπευτική εφαρμογή της όμως είναι στη θεραπεία των λοιμώξεων από κεστώδεις, όπως η κυστικέρωση (από τις προνύμφες της *Taenia solium*) και η υδατιδική νόσος (από τον *Echinococcus granulosis*).

Όταν χρησιμοποιείται σε βραχεία θεραπεία (1 έως 3 ημέρες) για νηματώδεις λοιμώξεις, οι ανεπιθύμητες ενέργειες είναι ήπιες και παροδικές και περιλαμβάνουν κεφαλαλγία και ναυτία. Η θεραπεία της υδατιδικής νόσου (τρίμηνη) έχει τον κίνδυνο της ηπατοτοξικότητας και, σπανίως, ακοκκιοκυτταραιμίας ή παγκυτταροπενίας. Το φάρμακο δεν πρέπει να χορηγείται κατά την κύηση ή σε παιδιά μικρότερα των δύο ετών.

Η απορρόφηση μετά από per os χορήγηση ενισχύεται από ένα γεύμα πλούσιο σε λιπαρά. Υφίσταται έντονο μεταβολισμό πρώτης διόδου που περιλαμβάνει τον σχηματισμό του σουλφοξειδίου της, το οποίο είναι επίσης δραστικό. Η αλβενδαζόλη και οι μεταβολίτες της απεκκρίνονται κυρίως στα ούρα (Harvey and Champe 1992).



**Σχήμα A.4:** Δομή αλβενδαζόλης



#### *A. 5. 2 Βακτηριακή αποικοδόμηση φαρμάκων σε υλικό από κόπρανα νηπίων*

Πρόσφατα οι Sulaiman και συνεργάτες (2018) εκτίμησαν την βακτηριακή αποικοδόμηση της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα παιδιών ηλικίας 6 έως 12 ετών και σε υλικό από κόπρανα υπερηλίκων και την συνέκριναν με δεδομένα σε υλικό από κόπρανα ενηλίκων. Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλή μεταβλητότητα.

Για αυτό τον λόγο στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκε η κινητική της διάσπασης μετρονιδαζόλης και ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα υγιών νηπίων (ηλικίας 2 έως 5 ετών).

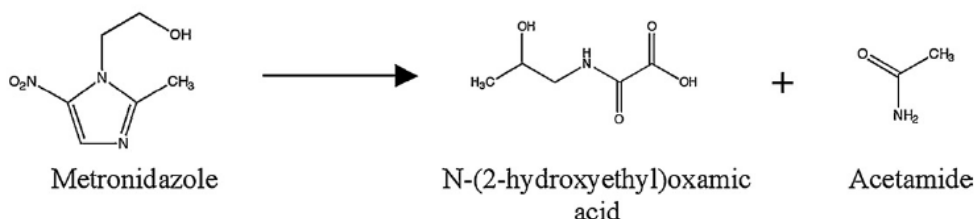
Η μετρονιδαζόλη (metronidazole) είναι ένα νιτροϊμιδαζολικό αντιπρωτοζωικό φάρμακο, το οποίο διαθέτει επίσης ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι των αναερόβιων, περιλαμβανομένων των βακτηριοειδών (*Bacteroides*) και των ειδών του κλοστριδίου (*Clostridium*).

Η μετρονιδαζόλη ενδείκνυται για τη θεραπεία αναερόβιων ή μικτών ενδο-κοιλιακών λοιμώξεων, της κολπίτιδας (τριχομοναδική, βακτηριακή κολπίτις), της σχετιζόμενης με τα αντιβιοτικά εντεροκολίτιδας και του εγκεφαλικού αποστήματος. Η τυπική δοσολογία είναι τα 500 mg τρεις φορές ημερησίως από του στόματος ή ενδοφλεβίως (30 mg/ kg/ ημερησίως). Η κολπίτιδα μπορεί να ανταποκριθεί προς μία εφ' άπαξ δόση των 2 g.

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν τη ναυτία, διάρροια, στοματίτιδα και περιφερική νευροπάθεια με την παρατεταμένη χρήση. Η μετρονιδαζόλη έχει μία όμοια της δισουλφιράμης ενέργεια και οι ασθενείς πρέπει να καθοδηγούνται ώστε να αποφεύγουν το οινόπνευμα. Αν και τερατογόνος σε μερικά ζώα, η μετρονιδαζόλη δεν έχει σχετιστεί με την ενέργεια αυτή στους ανθρώπους.

Απορροφάται καλώς μετά από του στόματος χορήγηση και κατανέμεται ευρέως στους ιστούς. Επίσης, μπορεί να δοθεί είτε ενδοφλεβίως είτε μέσω υποθέτων από το ορθό. Το φάρμακο διεισδύει καλώς εντός του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, φθάνοντας επίπεδα που είναι παρόμοια με εκείνα του ορού. Η μετρονιδαζόλη μεταβολίζεται στο ήπαρ και μπορεί να συσσωρευθεί επί ηπατικής ανεπάρκειας.

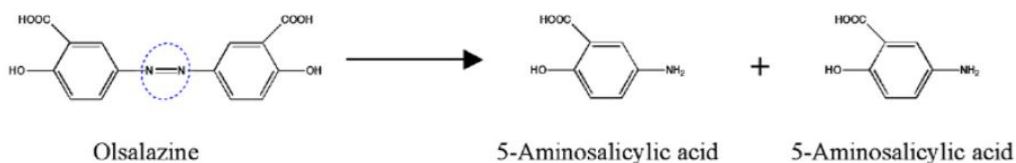
Η νιτρο-ομάδα της μετρονιδαζόλης ανάγεται χημικά παρουσία αναερόβιων βακτηρίων (Σχήμα Α.5). Τα αναγωγικά προϊόντα φαίνεται ότι ευθύνονται για την αντιμικροβιακή δραστηριότητα (Scully 1988).



**Σχήμα Α.5:** Αντίδρασης αναγωγικής διάσπασης μετρονιδαζόλης (Sousa et al. 2008)

Η ολσαλαζίνη (olsalazine) ανήκει σε μια κατηγορία φαρμάκων γνωστών ως σαλικυλικο-αντιφλεγμονώδη φάρμακα, τα οποία αναστέλλουν την παραγωγή προσταγλανδινών, βοηθώντας έτσι να αποφευχθεί ο πόνος και η φλεγμονή. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ελκώδους κολίτιδας και του πόνου στον στόμαχο, της διάρροιας και της πρωκτικής αιμορραγίας, που προκαλείται από αυτή την κατάσταση. Επιπλέον, χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της νόσου του Crohn.

Αποτελεί ένα προφάρμακο, το οποίο αποτελείται από δύο μόρια 5-αμινοσαλικυλικών οξέων, τα οποία συνενώνονται με έναν δεσμό αζώτων. Μικρό μόνο μέρος της ολσαλαζίνης μεταβολίζεται πριν την άφιξη στο παχύ έντερο. Εκεί, βακτήρια που διαθέτουν το ένζυμο αζωτοαναγωγή ανάγουν το δεσμό μεταξύ των δύο αζώτων χωρίζοντας την μη απορροφημένη ολσαλαζίνη στα δύο 5-αμινοσαλικυλικά οξέα (Sousa et al. 2008).



**Σχήμα Α.6:** Αντίδραση αναγωγικής διάσπασης ολσαλαζίνης (Sousa et al. 2008)

## **B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **B. 1 Οργανολογία**

- Αναδευτήρας περιδίνησης, model MS 3 basic, IKA<sup>®</sup> Works, Inc. (Wilmington, U.S.A.)
- Αναερόβιος Θάλαμος, Electrotek AW 500TG Dual Gas Version, Electrotek (West Yorkshire, United Kingdom)
- Αναλυτικός ζυγός, Kern 770, Kern & Sohn GmbH (Albstadt, Germany)
- Αναμκτήρας, Moulinex (Paris, France)
- Γεννήτρια παροχής υψηλής τάσης (Gamma High Voltage Research, Ormond Beach, FL , U.S.A.)
- Διάταξη διάλυσης περιστρεφόμενου μικρού περυσίου Distek<sup>®</sup> (mini-paddle apparatus, model 2100B, Distek<sup>®</sup>, New Brunswick, NJ, USA)
- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (PhenomWorld, Eindhoven, The Netherlands)
- Θερμοστατούμενη ανακινούμενη διάταξη, Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf AG (Hamburg, Germany)
- Κόσκινο, διάμετρος 20 cm, μέγεθος οπών 350  $\mu\text{m}$ , Retsch (Haan, Germany)
- Λουτρό υπερήχων, Elmasonic S100H, Elma Schmidbauer GmbH (Singer, Germany)
- Μαγνητική πλάκα ανάδευσης, model RH basic, IKA<sup>®</sup> Works, INC. (Wilmington, U.S.A.)
- Περιθλασίμετρο ακτινών X (Rigaku MiniFlex 600, Rigaku, Texas, U.S.A.)
- Περιστρεφόμενος συλλέκτης RC 6000 (NaBond Technologies, Hong Kong)
- Πεχάμετρο Schott, model CG842 (Mainz, Germany)
- Προγραμματιζόμενη αντλία (Harvard Apparatus, Holliston, MA, U.S.A.)
- Προστήλη BDS-C<sub>18</sub> (150 × 4.0 mm ID, 5  $\mu\text{m}$ ) Hypersil<sup>™</sup>, Thermo Fisher Scientific<sup>™</sup> (Waltham, Massachusetts, U.S.A.)

- Στήλη C<sub>18</sub> (150 × 3.0 mm ID, 5μm, SN: H01173006-1) Fortis™, Fortis™ Technologies Ltd (Cheshire, U.K.)
- Στήλη C<sub>18</sub> (150 × 3.0 mm ID, 5μm, SN: H02162809-2) Fortis™, Fortis™ Technologies Ltd (Cheshire, U.K.)
- Στήλη C<sub>18</sub> (150 × 3.0 mm ID, 5μm, SN: H08141208-2) Fortis™, Fortis™ Technologies Ltd (Cheshire, U.K.)
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελούμενο από αντλία Spectra System P1000, ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού Spectra System UV2000, αυτόματο δειγματολήπτη AS1000, σύστημα ελέγχου Spectra system controller SN4000 και λογισμικό Chromquest, ThermoQuest Inc. (San Jose, U.S.A.)
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελούμενο από αντλία Spectra System P4000 (ThermoQuest Inc., San Jose, USA), ανιχνευτή υπεριώδους UV1000, αυτόματο δειγματολήπτη AS3000 (ThermoQuest Inc., San Jose, USA) και λογισμικό EZChrom Agilent® version 3.2 (Agilent Technologies, Inc, Pleasanton, C.A., U.S.A.)
- Φυγόκεντρος ψυχόμενη, Universal 32R, Hettich (Tottlingen, Germany)

## B. 2 Αντιδραστήρια

- 2-προπανόλη, βαθμού καθαρότητας HPLC, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Ακετονιτρίλιο, βαθμού καθαρότητας HPLC, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Γλυκόζη, BioXtra, ≥ 99,5 % (GC), Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Καρβοξυλική Μεθυλοκυτταρίνη (Carboxymethylcellulose, CMC), Μοριακό Βάρος 90500, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Μεθανόλη, Βαθμού καθαρότητας HPLC, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Μπλε του μεθυλενίου, Merck (New Jersey, U.S.A.)
- Μυρμηκικό αμμώνιο, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Μυρμηκικό οξύ, 98-100 %, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)

- Νερό, βαθμού καθαρότητας HPLC, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Οξική κυτταρίνη (Cellulose acetate, CA), Μοριακό βάρος: 50000, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Όξινο ανθρακικό νάτριο, Panreac (Barcelona, Spain)
- Πολυαιθυλενοξίδιο (Polyethylene oxide, PEO), Μοριακό Βάρος 900000, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (Polyvinylpyrrolidone, PVP), Μοριακό Βάρος 1300000, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Πολυκαπρολακτόνη (Polycaprolactone, PCL), Μοριακό Βάρος 80000, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Τριφθοροξικό οξύ, 99 %, Reagent Plus, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Φυσιολογικός ορός 0,9 % Χλωριούχο νάτριο, DEMO (Κρυονέρι, Ελλάδα)

### **B. 3 Δραστικές Ουσίες-Φαρμακευτικά Προϊόντα**

- Αλβενδαζόλη (Albendazole, ABZ), LOT# 081M1540V, CAS# 54965-21-8, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Καφεΐνη (Caffeine, CAF), LOT# SLBQ5205V, CAS# 58-08-2, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Μετρονιδαζόλη, LOT# SVBG3C33V, CAS# 443-48-1, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Ολσαλαζίνη (μετά νατρίου άλας της ολσαλαζίνης), LOT# F140001, CAS# 6054-98-4, Farchemia S.R.L. (Treviglio, Italy)
- Ρανιτιδίνη υπό την μορφή του υδροχλωρικού άλατος (Ranitidine, RNT), LOT# 12071510107, Unipharma (Ελλάδα)
- Zentel<sup>®</sup>, albendazole oral suspension 0,4 g/10 mL, GlaxoSmithKline (GSK), Ware, United Kingdom (UK)

#### **B. 4 Αναλυτικές Τεχνικές**

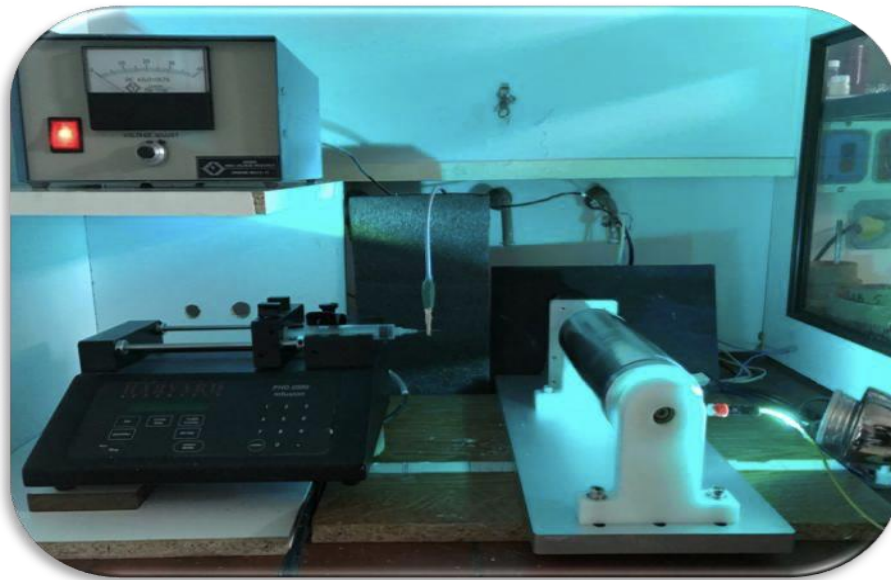
Οι αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό των δραστικών ουσιών περιγράφονται στο Παράρτημα Ι.

#### **B. 5 Προκαταρκτική διερεύνηση της χρησιμότητας των νανοϊνών στην per os χορήγηση δυσδιάλυτων φαρμάκων σε νήπια**

##### *B. 5. 1 Παρασκευή διασπορών φαρμάκων σε νανοΐνες*

##### *Οργανολογία*

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροϊονοποίηση αποτελείται από τρία βασικά μέρη: μία γεννήτρια παροχής υψηλής τάσης (Gamma High Voltage Research, Ormond Beach, FL, USA) η οποία παρέχει τάση έως 50kV, μία προγραμματιζόμενη αντλία (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) και έναν περιστρεφόμενο συλλέκτη (NaBond Technologies, Hong Kong). Η διάταξη βρίσκεται σε έναν ηλεκτρικά μονωμένο θάλαμο (Σχήμα Β.1).



**Σχήμα Β.1:** Η εργαστηριακή διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή των νανοϊνών στην παρούσα μελέτη

## Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης

Παρασκευάστηκε διάλυμα του δραστικού συστατικού και του πολυμερούς (ή των πολυμερών) σε διαλύτη (ή σύστημα διαλυτών) με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα εντός 24 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφέρθηκε συγκεκριμένη ποσότητα διαλύματος σε σύριγγα μιας χρήσεως με βελόνα 23 G. Η σύριγγα τοποθετήθηκε στην προγραμματιζόμενη αντλία της πειραματικής διάταξης. Οι συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης για κάθε συνδυασμό δραστικού συστατικού και πολυμερούς (-ών) αναφέρονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας B.1 έως B.8). Οι ναοΐνες συλλέγονταν σε φύλλο αλουμινίου το οποίο ήταν τοποθετημένο στον περιστρεφόμενο συλλέκτη και αποθηκεύονταν σε κλειστά δοχεία σε θερμοκρασία δωματίου ( $25\pm 2$  °C).

**Πίνακας B.1:** Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης ναοΐνων αποτελούμενες από καφεΐνη και PCL σε αναλογία 29,4:70,6 w/w

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| <b>Σύστημα διαλυτών</b>                | DCM:DMF 4:1 v/v               |
| <b>Διάλυμα ηλεκτροϊνοποίησης</b>       | 5 % w/v Καφεΐνη, 12 % w/v PCL |
| <b>Διαλυτότητα πολυμερούς στο νερό</b> | Μη υδατοδιαλυτό               |
| <b>Μοριακό βάρος πολυμερούς</b>        | 80000                         |
| <b>Εφαρμοζόμενη τάση</b>               | 20 kV                         |
| <b>Ταχύτητα ροής</b>                   | 0,5 mL/h                      |
| <b>Απόσταση από τον συλλέκτη</b>       | 10 cm                         |
| <b>Ταχύτητα περιστροφής</b>            | 400 rpm                       |

**Πίνακας Β.2:** Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης νανοϊνών αποτελούμενες από καφεΐνη και PEO σε αναλογία 83,3:16,7 w/w

|  |                              |
|--|------------------------------|
| <b>Σύστημα διαλυτών</b>                | DCM:DMF 4:1 v/v              |
| <b>Διάλυμα ηλεκτροϊνοποίησης</b>       | 5 % w/v Καφεΐνη, 1 % w/v PEO |
| <b>Διαλυτότητα πολυμερούς στο νερό</b> | Υδατοδιαλυτό                 |
| <b>Μοριακό βάρος πολυμερούς</b>        | 900000                       |
| <b>Εφαρμοζόμενη τάση</b>               | 24 kV                        |
| <b>Ταχύτητα ροής</b>                   | 0,5 mL/h                     |
| <b>Απόσταση από τον συλλέκτη</b>       | 20 cm                        |
| <b>Ταχύτητα περιστροφής</b>            | 400 rpm                      |

**Πίνακας Β.3:** Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης νανοϊνών αποτελούμενες από ρανιτιδίνη, CMC και PEO σε αναλογία 50:25:25 w/w/w

|  |   |
|--|---|
| <b>Σύστημα διαλυτών</b>                | Νερό  |
| <b>Διάλυμα ηλεκτροϊνοποίησης</b>       | 8 % w/v Ρανιτιδίνη, 4 % w/v CMC,<br>4 % w/v PEO |
| <b>Διαλυτότητα πολυμερούς στο νερό</b> | PEO: Υδατοδιαλυτό<br>CMC: Υδατοδιαλυτό          |
| <b>Μοριακό βάρος πολυμερούς</b>        | PEO: 900000<br>CMC: 90500                       |
| <b>Εφαρμοζόμενη τάση</b>               | 25 kV   |
| <b>Ταχύτητα ροής</b>                   | 0,1 mL/h  |
| <b>Απόσταση από τον συλλέκτη</b>       | 20 cm   |
| <b>Ταχύτητα περιστροφής</b>            | 400 rpm   |



**Πίνακας Β.4:** Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης νανοϊνών αποτελούμενες από αλβενδαζόλη, CA σε αναλογία 9,09:90,91 w/w

|  |                                  |
|--|----------------------------------|
| <b>Σύστημα διαλυτών</b>                | DCM:DMSO 4:1 v/v                 |
| <b>Διάλυμα ηλεκτροϊνοποίησης</b>       | 1 % w/v Αλβενδαζόλη, 10 % w/v CA |
| <b>Διαλυτότητα πολυμερούς στο νερό</b> | Μη υδατοδιαλυτό                  |
| <b>Μοριακό βάρος πολυμερούς</b>        | 50000                            |
| <b>Εφαρμοζόμενη τάση</b>               | 27 kV                            |
| <b>Ταχύτητα ροής</b>                   | 0,5 mL/h                         |
| <b>Απόσταση από τον συλλέκτη</b>       | 15 cm                            |
| <b>Ταχύτητα περιστροφής</b>            | 400 rpm                          |

**Πίνακας Β.5:** Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης νανοϊνών αποτελούμενες από αλβενδαζόλη, PCL σε αναλογία 5,88:94,12 w/w

|  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| <b>Σύστημα διαλυτών</b>                | DCM:DMSO 4:1 v/v                  |
| <b>Διάλυμα ηλεκτροϊνοποίησης</b>       | 1 % w/v Αλβενδαζόλη, 16 % w/v PCL |
| <b>Διαλυτότητα πολυμερούς στο νερό</b> | Μη υδατοδιαλυτό                   |
| <b>Μοριακό βάρος πολυμερούς</b>        | 80000                             |
| <b>Εφαρμοζόμενη τάση</b>               | 20 kV                             |
| <b>Ταχύτητα ροής</b>                   | 0,5 mL/h                          |
| <b>Απόσταση από τον συλλέκτη</b>       | 15 cm                             |
| <b>Ταχύτητα περιστροφής</b>            | 400 rpm                           |

**Πίνακας Β.6:** Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης νανοϊνών αποτελούμενες από αλβενδαζόλη, PEO σε αναλογία 20:80 w/w

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
| <b>Σύστημα διαλυτών</b>                | DCM:DMSO 4:1 v/v                   |
| <b>Διάλυμα ηλεκτροϊνοποίησης</b>       | 0,5 % w/v Αλβενδαζόλη, 2 % w/v PEO |
| <b>Διαλυτότητα πολυμερούς στο νερό</b> | Υδατοδιαλυτό                       |
| <b>Μοριακό βάρος πολυμερούς</b>        | 900000                             |
| <b>Εφαρμοζόμενη τάση</b>               | 25 kV                              |
| <b>Ταχύτητα ροής</b>                   | 0,5 mL/h                           |
| <b>Απόσταση από τον συλλέκτη</b>       | 25 cm                              |
| <b>Ταχύτητα περιστροφής</b>            | 400 rpm                            |

**Πίνακας Β.7:** Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης νανοϊνών αποτελούμενες από αλβενδαζόλη, PVP σε αναλογία 33,3:66,6 w/w

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
| <b>Σύστημα διαλυτών</b>                | EtOH:Formic acid 1:1 v/v           |
| <b>Διάλυμα ηλεκτροϊνοποίησης</b>       | 10 % w/v Αλβενδαζόλη, 20 % w/v PVP |
| <b>Διαλυτότητα πολυμερούς στο νερό</b> | Υδατοδιαλυτό                       |
| <b>Μοριακό βάρος πολυμερούς</b>        | 1300000                            |
| <b>Εφαρμοζόμενη τάση</b>               | 25 kV                              |
| <b>Ταχύτητα ροής</b>                   | 0,5 mL/h                           |
| <b>Απόσταση από τον συλλέκτη</b>       | 15 cm                              |
| <b>Ταχύτητα περιστροφής</b>            | 400 rpm                            |

**Πίνακας Β.8:** Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης νανοϊνών αποτελούμενες από αλβενδαζόλη, PVP σε αναλογία 50:50 w/w

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
| <b>Σύστημα διαλυτών</b>                | EtOH:Formic acid 1:1 v/v           |
| <b>Διάλυμα ηλεκτροϊνοποίησης</b>       | 20 % w/v Αλβενδαζόλη, 20 % w/v PVP |
| <b>Διαλυτότητα πολυμερούς στο νερό</b> | Υδατοδιαλυτό                       |
| <b>Μοριακό βάρος πολυμερούς</b>        | 1300000                            |
| <b>Εφαρμοζόμενη τάση</b>               | 25 kV                              |
| <b>Ταχύτητα ροής</b>                   | 0,5 mL/h                           |
| <b>Απόσταση από τον συλλέκτη</b>       | 15 cm                              |
| <b>Ταχύτητα περιστροφής</b>            | 400 rpm                            |

*B. 5. 2 Υγρό που προσομοιώνει το περιβάλλον του στομάχου κατά τη διαπεπτική περίοδο (FaSSGF Level III)*

Σε ποτήρι ζέσεως του ενός λίτρου προστίθεται 1,66 mL πυκνό υδροχλωρικό οξύ (π. HCl), 1,9986 g χλωριούχο νάτριο (NaCl) και περίπου 800 mL απιονισμένου νερού. Η ογκομετρική φιάλη τοποθετείται σε συσκευή υπερήχων μέχρι πλήρους διάλυσης των περιεχομένων στερεών και η τιμή του pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 1,6, χρησιμοποιώντας περίπου 1,5 mL αραιωμένου HCl. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη του ενός λίτρου και αραιώνεται, μέχρι τη χαραγή, με απιονισμένο νερό. Ζυγίζονται 0,0600 g SIF powder και μεταφέρονται σε υάλινο περιέκτη του ενός λίτρου, όπου προστίθενται 500 mL του παραπάνω υδροχλωρικού διαλύματος. Ακολουθεί ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα και προστίθεται και η υπόλοιπη ποσότητα του υδροχλωρικού διαλύματος. Το διάλυμα που έχει προκύψει αφήνεται 2 ώρες για εξισσορόπηση, προστίθενται 0,5464 g πεψίνη και ακολουθεί ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι πλήρους διάλυσης της πεψίνης.

### *B. 5. 3 Πειράματα διάλυσης*

Σε όλα τα πειράματα διάλυσης χρησιμοποιήθηκε η διάταξη του περιστρεφόμενου μικρού πτερυγίου στους  $37,0 \pm 0,5$  °C. Η χωρητικότητα του υάλινου μικρού ποτηριού ήταν 100 mL. Η ταχύτητα περιστροφής του μικρού πτερυγίου ήταν 100 rpm και σε χρόνο  $t=0$  το μέσο αποδέσμευσης ήταν FaSSGF Level III ( $V=40$  mL). Η δειγματοληψία γινόταν με υάλινη σύριγγα των 5 mL η οποία προσαρμόζεται κατάλληλα σε ανοξείδωτο σωλήνα, ώστε η τεχνική της δειγματοληψίας να είναι επαναλήψιμη. Η δειγματοληψία γινόταν από το μέσο της απόστασης μεταξύ της επιφάνειας του υγρού και του μικρού πτερυγίου και μεταξύ του μικρού πτερυγίου και του τοιχώματος του υάλινου ποτηριού.

Η δειγματοληψία στην περίπτωση της καφεΐνης γινόταν κάθε 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 min, της ρανιτιδίνης κάθε 5, 10, 15, 20, 30 min και της αλβενδαζόλης κάθε 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 min. Κατά τη δειγματοληψία λαμβάνονταν 3 mL δείγματος και μεταφέρονταν μέσω ενός ηθμού με διάμετρο αποκοπής 0,2  $\mu\text{m}$  σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια γινόταν αναπλήρωση των 3 mL με 3 mL FaSSGF Level III. Μετά την ολοκλήρωση της δειγματοληψίας γινόταν ανάμιξη του δείγματος με κινητή φάση, ώστε να γίνει ανάλυση των δειγμάτων σύμφωνα με τις κατάλληλες χρωματογραφικές συνθήκες (Παράρτημα I).

### *Πειράματα διάλυσης καψακίων που περιείχαν σκόνη καφεΐνης, ρανιτιδίνης και αλβενδαζόλης*

Πριν από κάθε πείραμα, κατάλληλη ποσότητα δραστικού συστατικού σε μορφή σκόνης (16 mg καφεΐνης, 48 mg ρανιτιδίνης και 8 mg αλβενδαζόλης) εισάγονταν σε ένα καψάκιο μεγέθους 0, και στη συνέχεια το καψάκιο τοποθετούταν σε μεταλλικό εξάρτημα καταβύθισης (sinker). Η επιλογή της ποσότητας του κάθε δραστικού συστατικού, που τοποθετήθηκε σε κάθε καψάκιο, έγινε μετά από αναγωγή της ποσότητας που θα χρησιμοποιούταν σε 250 mL FaSSGF Level III. Συγκεκριμένα, τα 16 mg καφεΐνης που χρησιμοποιήθηκαν σε 40 mL FaSSGF Level III αντιστοιχούσαν σε 100 mg καφεΐνης σε 250 mL FaSSGF Level III, τα 48 mg ρανιτιδίνης που χορηγήθηκαν σε 40 mL FaSSGF Level III αντιστοιχούσαν σε 300 mg ρανιτιδίνης σε 250 mL FaSSGF Level III και τα 8 mg

αλβενδαζόλης που χορηγήθηκαν σε 40 mL FaSSGF Level III αντιστοιχούσαν σε 50 mg αλβενδαζόλης σε 250 mL FaSSGF Level III. Στο ποτήρι εισάγονταν 40 mL FaSSGF Level III, το εξάρτημα καταβύθισης που περιείχε το καψάκιο και ξεκινούσε το πείραμα.

#### *Πειράματα διάλυσης διασπορών με καφεΐνη, ρανιτιδίνη και αλβενδαζόλη σε νανοΐνες*

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα, όπου οι νανοΐνες με το δραστικό συστατικό εισάγονταν σε καψάκιο (μεγέθους 0) και στη συνέχεια σε εξάρτημα καταβύθισης και ρίχνονταν στο μέσο διάλυσης ή εισάγονταν σε καψάκιο και χωρίς το εξάρτημα καταβύθισης ρίχνονταν στο μέσο διάλυσης ή ρίχνονταν απευθείας (χωρίς καψάκιο) στο μέσο διάλυσης. Σε κάθε περίπτωση η ποσότητα του δραστικού συστατικού στις νανοΐνες ήταν ίδια με την ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα διάλυσης της κρυσταλλικής σκόνης του αντίστοιχου δραστικού συστατικού.

#### *Πειράματα διάλυσης εμπορικά διαθέσιμου εναιωρήματος με αυξημένες δυνατότητες (Zentel®)*

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα, όπου προστέθηκαν 0,2 mL από το εναιώρημα σε υγρό μέσο διάλυσης FaSSGF Level III, διότι αυτή η ποσότητα του δραστικού συστατικού στο εναιώρημα αντιστοιχούσε στην ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα διάλυσης της κρυσταλλικής σκόνης αλβενδαζόλης. Το Zentel® είναι ένα εναιώρημα με αυξημένες δυνατότητες (enhanced formulation) και αποτελείται από τα παρακάτω έκδοχα: πυριτικό άλας μαγνησίου και αλουμινίου (silicate of magnesium and aluminum), νατριούχος κροσκαρμελόζη (sodium croscarmellose), γλυκερόλη (glycerol), πολυσορβιτόλη 80 (polysorbate 80), μονολαουρική σορβιτάνη (sorbitan monolaurate), σορβικό κάλιο (potassium sorbate), βενζοϊκό οξύ (benzoic acid), σορβικό οξύ (sorbic acid), νατριούχος σακχαρίνη (saccharine sodium) και αρωματικές ουσίες (flavouring agents) (Georgaka et al., 2017).

## **B. 6 Βακτηριακή αποικοδόμηση φαρμάκων σε υλικό από κόπρανα νηπίων**

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε μετά από αδειοδότηση από την Επιτροπή Βιοηθικής του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Παράρτημα II).







### *Κριτήρια συμμετοχής*

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η βακτηριακή ενεργότητα των κοπράνων επηρεάζεται από τη δίαιτα και τη λήψη φαρμάκων (Quigley 2013), αρχικά οι γονείς των υποψήφιων νηπίων υποβλήθηκαν σε συνέντευξη (Παράρτημα III) με στόχο να εξασφαλιστεί ότι θα πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια για να συμμετάσχει ένα νήπιο στην έρευνα.

Το νήπιο πρέπει να:

- i. Είναι πρόθυμο να παρέχει κόπρανα για τους σκοπούς της μελέτης, όπως θα αποδεικνύεται από γραπτή δήλωση συγκατάθεσης
- ii. Είναι ηλικίας 2-5 ετών με σωματικό βάρος όχι πέραν του  $\pm 20$  % του ιδανικού βάρους του, όπως αυτό καθορίζεται από τους πίνακες Metropolitan
- iii. Ανήκει στην λευκή φυλή
- iv. Τρέφεται κυρίως με Μεσογειακή διατροφή (ελαιόλαδο, ψάρι, κρέας, γαλακτοκομικά προϊόντα, όσπρια, φρούτα, λαχανικά κ.α)
- v. Μην έχει κάνει χρήση αντιβιοτικού φαρμάκου τους τελευταίους 6 μήνες τουλάχιστον (Sousa et al. 2014)
- vi. Μην έχει κάνει χρήση προβιοτικών ή/ και πρεβιοτικών [συμπληρώματα διατροφής, λειτουργικά τρόφιμα (functional foods) κ.α.] τις τελευταίες 30 ημέρες τουλάχιστον (De Angelis et al. 2013)
- vii. Μην έχει κάνει χρήση φαρμάκων τα οποία επηρεάζουν τη λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος για διάστημα 7 ημερών πριν τη μελέτη (Mastromarino et al. 1978)
- viii. Έχει συνηθισμένες εντερικές συνήθειες τον τελευταίο μήνα και τα κόπρανα να είναι Τύπου 2, 3, ή 4 σύμφωνα με την κλίμακα Bristol (Lewis and Heaton 1997) (Σχήμα B. 1)

Η κλίμακα Bristol είναι μία μέθοδος για το χαρακτηρισμό των κοπράνων και οι τύποι των κοπράνων παρουσιάζονται στο Σχήμα Β.2.

| Περιγραφή  |   |
|--|---|
|  <p>Τύπος 1</p>   | Μικρά σκληρά κομμάτια με μέγεθος παρόμοιο με ξηρούς καρπούς (δύσκολα περνούν) |
|  <p>Τύπος 2</p>   | Σχήμα παρόμοιο με λουκάνικο αλλά σε σχήμα σβώλου                              |
|  <p>Τύπος 3</p>   | Σαν λουκάνικο αλλά με ρωγμές στην επιφάνεια                                   |
|  <p>Τύπος 4</p>   | Σαν λουκάνικο ή φίδι, λείο και μαλακό   |
|  <p>Τύπος 5</p>   | Μαλακή άμορφη μάζα με διαμορφωμένα όρια (περνά εύκολα)                        |
|  <p>Τύπος 6</p>   | Κομμάτια με επιφάνεια σχεδόν χνουδωτή με τραχιά όρια, πολτώδη κόπρανα         |
|  <p>Τύπος 7</p> | Υδαρή κόπρανα χωρίς στερεά κομμάτια   |

**Σχήμα Β.2:** Χαρακτηρισμός των κοπράνων με βάση την κλίμακα Bristol (Lewis and Heaton 1997)

#### *Κριτήρια αποκλεισμού*

- i. Ύπαρξη σοβαρού προβλήματος υγείας (π.χ. καρδιαγγειακού, παγκρεατικού, ηπατικού, θυρεοειδικού κ.λ.π.) ή/ και χρόνιων παθήσεων, τα οποία απαιτούν μακρόχρονη χρήση συνταγογραφούμενων φαρμάκων
- ii. Δεν αποκλείεται από το διαιτολόγιο του νηπίου κάποια σημαντική ομάδα τροφίμων (π.χ. είναι χορτοφάγος, αποφεύγει κατανάλωση χοιρινού κρέατος, αποφεύγει γαλακτοκομικά προϊόντα, αποφεύγει φρούτα ή/και λαχανικά)
- iii. Ιστορικό γαστρεντερικού προβλήματος
- iv. Οι εντερικές συνήθειες παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση από την άποψη της συχνότητας και του τύπου των κοπράνων (κλίμακα Bristol, Σχήμα Β.2)

### Εθελοντές

Έγινε συλλογή κοπράνα από 7 υγιή νήπια με μέση ηλικία 4,4 ετών (εύρος 3-5,5 ετών) μετά από γραπτή συγκατάθεση των γονέων τους. Στο Παράρτημα IV παρουσιάζεται αντίγραφο της δήλωσης συγκατάθεσης του γονέα στην οποία είναι ενσωματωμένο το πρωτόκολλο της μελέτης.

Στον Πίνακα Β.9 παρουσιάζονται τα βασικά δημογραφικά δεδομένα των παιδιών που έλαβαν μέρος στη μελέτη. Ο δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI) υπολογίστηκε με βάση την Εξίσωση Β.1.

$$BMI = \frac{\text{Βάρος (kg)}}{\text{Ύψος}^2 (\text{m}^2)} \quad \text{Εξίσωση Β.1}$$

**Πίνακας Β.9:** Δημογραφικά δεδομένα των νηπίων που έλαβαν μέρος στη μελέτη

| Αριθμός νηπίου | Φύλο    | Ηλικία(έτη) | Βάρος(kg) | Ύψος(m) | BMI* (kg/m <sup>2</sup> ) |
|----------------|---------|-------------|-----------|---------|---------------------------|
| 1              | Αγόρι   | 3           | 16        | 1,02    | 15,38                     |
| 2              | Κορίτσι | 3,5         | 14        | 0,94    | 15,82                     |
| 3              | Κορίτσι | 5,5         | 15        | 1,05    | 13,61                     |
| 4              | Αγόρι   | 3,5         | 19        | 1,00    | 19,01                     |
| 5              | Αγόρι   | 5,5         | 20        | 1,20    | 13,89                     |
| 6              | Κορίτσι | 4,5         | 17        | 1,00    | 17,04                     |
| 7              | Αγόρι   | 5           | 19        | 1,14    | 14,61                     |

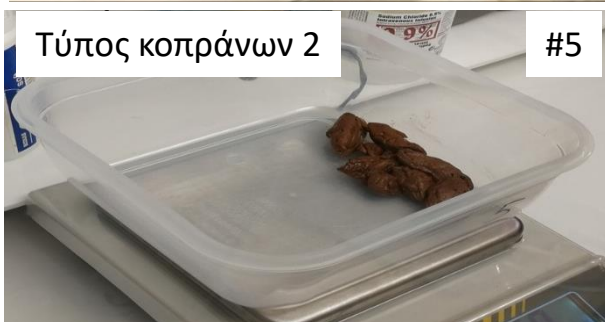
\*BMI: Δείκτης μάζας σώματος (Εξίσωση Β.1)

#### Β. 6. 1 Μεθοδολογία συλλογής κοπράνων

Την ημέρα της συλλογής, το κάθε νήπιο καταναλώνει κανονικά το πρωινό ή/και το μεσημεριανό του γεύμα. Τα γεύματα, που κατανάλωσε το νήπιο 3 ημέρες πριν τη συλλογή των κοπράνων, καταγράφονται σε ειδικό φύλλο, στο οποίο επίσης καταγράφεται και η



εντερική δραστηριότητα (Παράρτημα V), ώστε να βεβαιωθεί ότι τα νήπια κατανάλωσαν κανονικά τα γεύματα τους και δεν έγινε λήψη φαρμάκων. Επιπρόσθετα, τις 3 τελευταίες ημέρες πριν την ημέρα της συλλογής, ο τύπος των κοπράνων των νηπίων κατά την κλίμακα Bristol κυμαινόταν από 2 έως 4. Γίνεται συλλογή κοπράνων της πρώτης κένωσης της ημέρας. Η συλλογή γίνεται σε προζυγισμένους πλαστικούς περιέκτες. Ο πλαστικός περιέκτης με τα κόπρανα τοποθετείται, εντός χρονικού διαστήματος μικρότερου των 30 min, σε αναερόβιο θάλαμο (θερμοκρασία 37 °C, σχετική υγρασία 70 % και ατμόσφαιρα περιεκτικότητας 80 % v/v N<sub>2</sub>, 10 % v/v H<sub>2</sub> και 10 % v/v CO<sub>2</sub>, Παράρτημα VI). Τα κόπρανα χαρακτηρίζονται με βάση την κλίμακα Bristol (Σχήμα B.2) και ο χαρακτηρισμός των κοπράνων κάθε παιδιού φαίνεται στον Πίνακα B.10. Επίσης, στο Σχήμα B.3 παρουσιάζονται φωτογραφίες των κοπράνων κάθε νηπίου.



**Σχήμα Β.3:** Φωτογραφίες των κοπράνων κάθε νηπίου και χαρακτηρισμός τους με βάση την κλίμακα Bristol. Πάνω δεξιά αναφέρεται και ο αριθμός κάθε νηπίου.

### Μεθοδολογία παρασκευής υλικού από κόπρανα

Μέσα στον αναερόβιο θάλαμο, τα κόπρανα ζυγίζονται με την βοήθεια αναλυτικού ζυγού (Σχήμα Β.4Α), αραιώνονται με φυσιολογικό ορό (0,9 % Χλωριούχο νάτριο) σε αναλογία 1:3.8 w/v (Πίνακας Β.10) και ομογενοποιούνται με την βοήθεια ενός αναμικτήρα (Σχήμα Β.4Β). Στη συνέχεια, τα κόπρανα διηθούνται από κόσκινο με μέγεθος οπών 350  $\mu\text{m}$ , ώστε να απομακρυνθούν τα κομμάτια που δεν ομογενοποιήθηκαν (Σχήμα Β.4Γ) (Tannergren et al. 2014, Sousa et al. 2014, Yadav et al. 2013). Ακολουθεί πλήρωση υάλινων περιεκτών (Σχήμα Β.4Δ) και μετράται το pH του υλικού από κόπρανα κάθε παιδιού. Οι περιέκτες αποθηκεύονται στους  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Tannergren et al. 2014). Με βάση τη βιβλιογραφία, η βακτηριακή ενεργότητα του υλικού από κόπρανα μειώνεται μετά από δεύτερο κύκλο πήξης-τήξης (Karatza et al. 2016). Για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία κάθε περιέκτης θα χρησιμοποιηθεί μόνο μετά από έναν κύκλο πήξης-τήξης.

Στο Σχήμα Β.4 παρουσιάζονται τα βασικά στάδια επεξεργασίας των κοπράνων κάθε παιδιού εντός του αναερόβιου θαλάμου. Η επεξεργασία λαμβάνει χώρα εντός του αναερόβιου θαλάμου.



**Σχήμα Β.4:** Στάδια επεξεργασίας κοπράνων για την παρασκευή υλικού από κόπρανα (Α: ζύγιση, Β: ανάμιξη με φυσιολογικό ορό (0,9% χλωριούχο νάτριο), Γ: διήθηση, Δ: πλήρωση υάλινων περιεκτών)

Στον Πίνακα Β. 10 παρουσιάζονται τα στοιχεία συλλογής που αφορούν το κάθε νήπιο.

**Πίνακας Β.10:** Βάρος κοπράνων που συλλέχθηκε από 7 υγιή νήπια, τύπος κοπράνων κατά Bristol, προκύπτον όγκος και τιμή pH του υλικού από κόπρανα που προκύπτει

| Αριθμός νηπίου | Τύπος κοπράνων κατά Bristol | Βάρος κοπράνων (g) | Όγκος φυσιολογικού ορού (mL) | Όγκος υλικού από κόπρανα (mL) | pH υλικού από κόπρανα |
|----------------|-----------------------------|--------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| 1              | 2                           | 106,2              | 379                          | 425                           | 6,23                  |
| 2              | 2                           | 27,4               | 104                          | 130                           | 6,41                  |
| 3              | 2                           | 20,9               | 80                           | 82                            | 6,12                  |
| 4              | 3                           | 26,4               | 100                          | 111                           | 6,35                  |
| 5              | 2                           | 26,5               | 101                          | 103                           | 6,58                  |
| 6              | 2                           | 31,7               | 120                          | 104                           | 6,84                  |
| 7              | 2                           | 74,7               | 274                          | 312                           | 5,73                  |

Το μέσο βάρος κοπράνων που συλλέχθηκε από τα 7 ήταν ήταν 44,8 g (εύρος τιμών 20,9-106,2 g), ενώ ο όγκος του υλικού από κόπρανα που παρασκευάστηκε κυμαίνεται από 82 έως 425 mL (μέση τιμή 181 mL). Τέλος, οι τιμές pH του υλικού από κόπρανα κυμαίνονται από 5,73 έως 6,84.

*Β. 6. 2 Πειράματα βακτηριακής αποικοδόμησης μετρονιδαζόλης και ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα*

*Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης μετρονιδαζόλης σε φυσιολογικό ορό*

Για την παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης της μετρονιδαζόλης, που θα χρησιμοποιηθεί σε πειράματα σταθερότητας σε υλικό από κόπρανα, ζυγίζονται 10 mg μετρονιδαζόλης, μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστίθεται φυσιολογικός ορός. Το διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 100 µg/mL.

### *Μεθοδολογία για τη μέτρηση της κινητικής της διάσπασης μετρονιδαζόλης*

Η πειραματική διαδικασία για τη μέτρηση της κινητικής διάσπασης της μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα υγιών νηπίων λαμβάνει χώρα στον αναερόβιο θάλαμο και κάτω από τις ίδιες συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του υλικού από κόπρανα (Παράρτημα VI). Το υλικό από κόπρανα μεταφέρεται από τους -70 °C στον αναερόβιο θάλαμο, όπου και παραμένει για 2 ώρες πριν την έναρξη των πειραμάτων μελέτης σταθερότητας της μετρονιδαζόλης, διότι αυτός ο χρόνος έχει αποδειχθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι είναι ικανός να επαναφέρει τη βακτηριακή ενεργότητα στο υλικό από κόπρανα (Karatza et al. 2016). Σε πλαστικό περιέκτη τύπου erpendorf μεταφέρονται 125 μL από το διάλυμα παρακαταθήκης της μετρονιδαζόλης, προστίθεται 1 mL του υλικού από κόπρανα και το προκύπτον υλικό τοποθετείται σε θερμοστατούμενη ανακινούμενη διάταξη στους 37°C και σε 1000 rpm (χρόνος 0). Δείγματα όγκου 100 μL λαμβάνονται 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45 και 60 min από την έναρξη της προσθήκης της μετρονιδαζόλης, μεταφέρονται σε νέο πλαστικό περιέκτη τύπου erpendorf και προστίθενται 300 μL κρύου ακετονιτρίλιου, ώστε να σταματήσει ακαριαία η ενεργότητα των βακτηρίων. Τα δείγματα μεταφέρονται εκτός του αναερόβιου θαλάμου και ακολουθεί φυγοκέντρηση [10 °C, 10 min, 10000 rpm]. Μετά την φυγοκέντρηση, λαμβάνονται 100 μL από το υπερκείμενο υγρό κάθε δείγματος και αναμιγνύονται με 900 μL κινητής φάσης. Ακολουθεί ανάμιξη σε αναδευτήρα περιδίνησης και τα δείγματα ενίονται στο χρωματογραφικό σύστημα (Παράρτημα I).

### *Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης ολσαλαζίνης σε φυσιολογικό ορό*

Για την παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης της ολσαλαζίνης, που θα χρησιμοποιηθεί στα πειράματα σταθερότητας σε υλικό από κόπρανα, ζυγίζονται 140 mg ολσαλαζίνης, τα οποία μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστίθεται φυσιολογικός ορός. Το διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 140 μg/mL.

### *Μεθοδολογία για τη μέτρηση της διάσπασης ολσαλαζίνης*

Η μεθοδολογία για τη μέτρηση της κινητικής διάσπασης της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα είναι ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε για τη μετρονιδαζόλη. Οι χρόνοι δειγματοληψίας για την αξιολόγηση της κινητικής διάσπασης είναι 0, 10, 20, 30, 60, 90 και 120 min.

### *B. 6. 3 Ανάλυση Δεδομένων*

Σε όλες τις περιπτώσεις, για την αξιολόγηση της κινητικής διάσπασης ακολουθείται πρωτοταξικό μοντέλο, με βάση την Εξίσωση B.2.

$$X = X_0 \times e^{-kt} \quad \text{Εξίσωση B. 2}$$

*X*: η ποσότητα που παραμένει στο υλικό από κόπρανα κάθε χρονική στιγμή

*X*<sub>0</sub>: το ποσοστό φαρμάκου στο υλικό από κόπρανα σε χρόνο 0

*k*: σταθερά του ρυθμού διάσπασης του φαρμάκου

*t*: χρόνος

Το πρωτοταξικό μοντέλο προσαρμόζεται στα δεδομένα, που συλλέχθηκαν από το κάθε νήπιο, με τη χρήση του λογισμικού SigmaPlot® (SigmaPlot®, Systat Inc., San Jose, CA, U.S.A). Σε όλες τις περιπτώσεις, για τον έλεγχο της επιτυχούς προσαρμογής παρουσιάζεται ο συντελεστής συσχέτισης (*r*<sup>2</sup>). Για κάθε δραστική ουσία, με βάση τη σταθερά του ρυθμού διάσπασης, υπολογίζονται οι χρόνοι ημιζωής (*t*<sub>1/2</sub>) από την Εξίσωση B.3.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Εξίσωση B. 3}$$

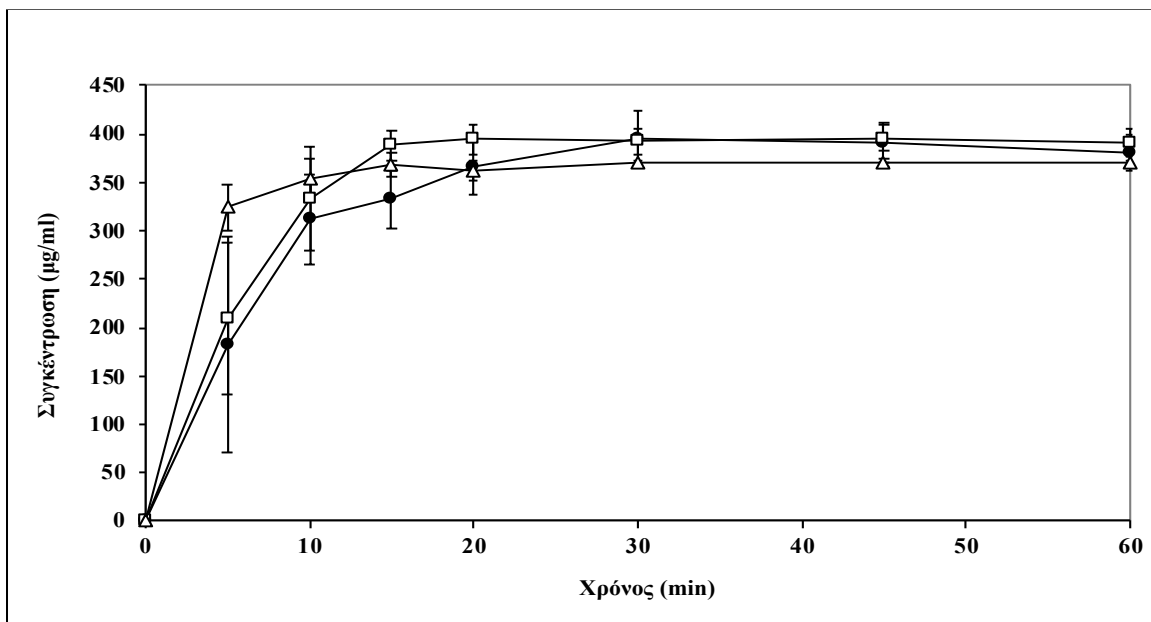
## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

### Γ. 1 Προκαταρκτική διερεύνηση της χρησιμότητας διασπορών σε νανοΐνες στην *per os* χορήγηση δυσδιάλυτων φαρμάκων σε νήπια

Στο Παράρτημα VII παρουσιάζονται τα πρωτογενή δεδομένα.

#### Γ. 1. 1 Διασπορές καφεΐνης και ρανιτιδίνης σε νανοΐνες

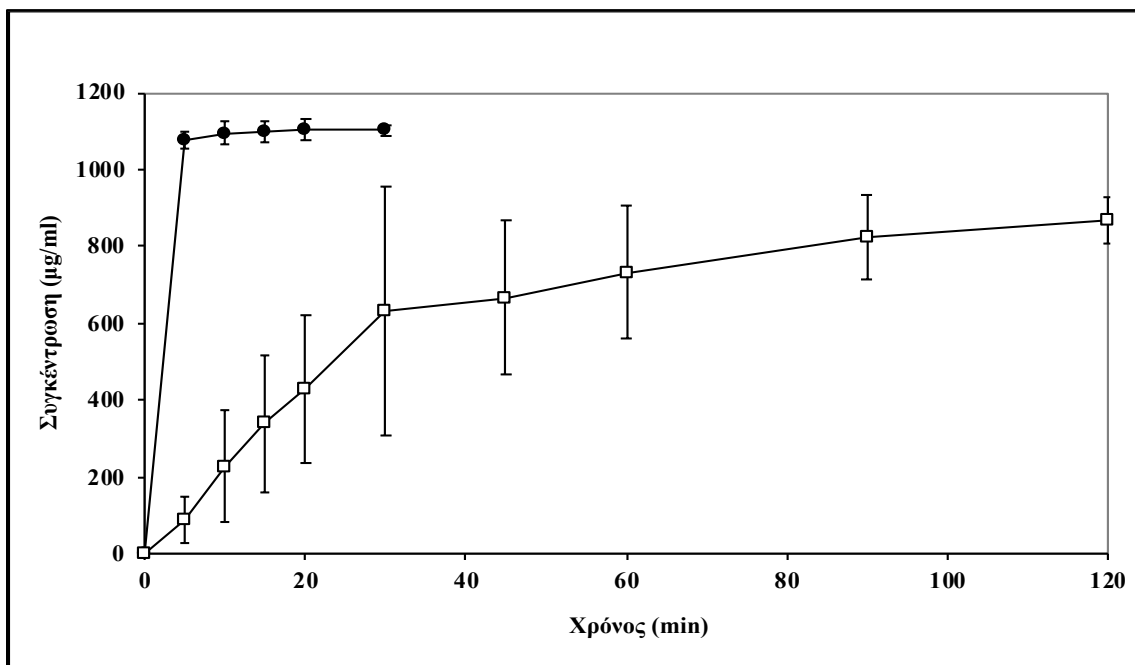
Στο Σχήμα Γ.1 παρουσιάζονται τα δεδομένα διάλυσης καψακίων που περιείχαν κρυσταλλική καφεΐνη και νανοΐνες καφεΐνης.



**Σχήμα Γ.1:** Απεικόνιση της συγκέντρωσης της καφεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) ( $n=3$ ) στη διάρκεια των πειραμάτων διάλυσης καψακίων καφεΐνης (16 mg καφεΐνης ανά καψάκιο) που είχαν τοποθετηθεί σε εξάρτημα καταβύθισης του καψακίου (sinket) σε 40 mL FaSSGF Level III με τη διάταξη του περιστρεφόμενου μικρού πτερυγίου [• καψάκιο με σκόνη καφεΐνης, □ καψάκιο με διασπορά καφεΐνης σε PEO (αναλογία CAF:PEO 83,3:16,7 w/w), Δ καψάκιο με διασπορά καφεΐνης σε PCL (αναλογία CAF:PCL 29,4:70,6 w/w)]

Η συγκέντρωση της καφεΐνης στο μέσο διάλυσης ήταν περίπου 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  σε όλες τις περιπτώσεις, δηλαδή όση περίπου αναμενόταν μετά από πλήρη διάλυσης της δόσης (16 mg) σε συμφωνία με την υψηλή διαλυτότητα της καφεΐνης σε υδατικά μέσα. Αυτό συνέβη παρόλο που το ένα πολυμερές ήταν υδατοδιαλυτό (PEO), ενώ το άλλο όχι (PCL).

Στο Σχήμα Γ.2 παρουσιάζονται τα δεδομένα διάλυσης καψακίων που περιείχαν κρυσταλλική ρανιτιδίνη και νανοϊνες ρανιτιδίνης.



**Σχήμα Γ.2:** Απεικόνιση της συγκέντρωσης της ρανιτιδίνης (μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση) ( $n=3$ ) στη διάρκεια των πειραμάτων διάλυσης καψακίων ρανιτιδίνης (48 mg ανά καψάκιο) που είχαν τοποθετηθεί σε εξάρτημα καταβύθισης του καψακίου (sinker) σε 40 mL FaSSGF Level III με τη διάταξη του περιστρεφόμενου μικρού πτερυγίου [ $\bullet$  καψάκιο με σκόνη ρανιτιδίνης,  $\square$  καψάκιο με διασπορά ρανιτιδίνης σε CMC-PEO (αναλογία RNT:CMC:PEO 50:25:25 w/w/w)]

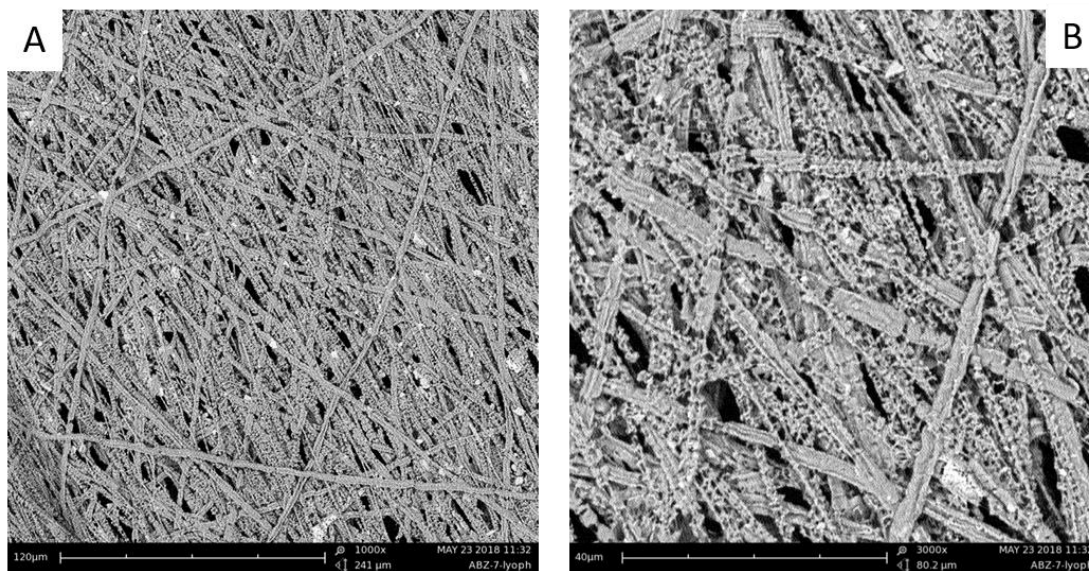


Η συγκέντρωση της ρανιτιδίνης στο μέσο διάλυσης ήταν περίπου 1200  $\mu\text{g/mL}$ , δηλώνοντας πλήρη διάλυση της δόσης (48 mg), σε συμφωνία με την υψηλή διαλυτότητα της ρανιτιδίνης σε υδατικά μέσα, στην περίπτωση των καψακίων που περιείχαν σκόνη ρανιτιδίνης. Το CMC και το PEO είναι δύο πολυμερή, που μπορούν να παρατείνουν την αποδέσμευση φαρμάκων (Ozeki et al., 2000), γεγονός που επιβεβαιώνεται από τα δεδομένα του Σχήματος Γ.2.

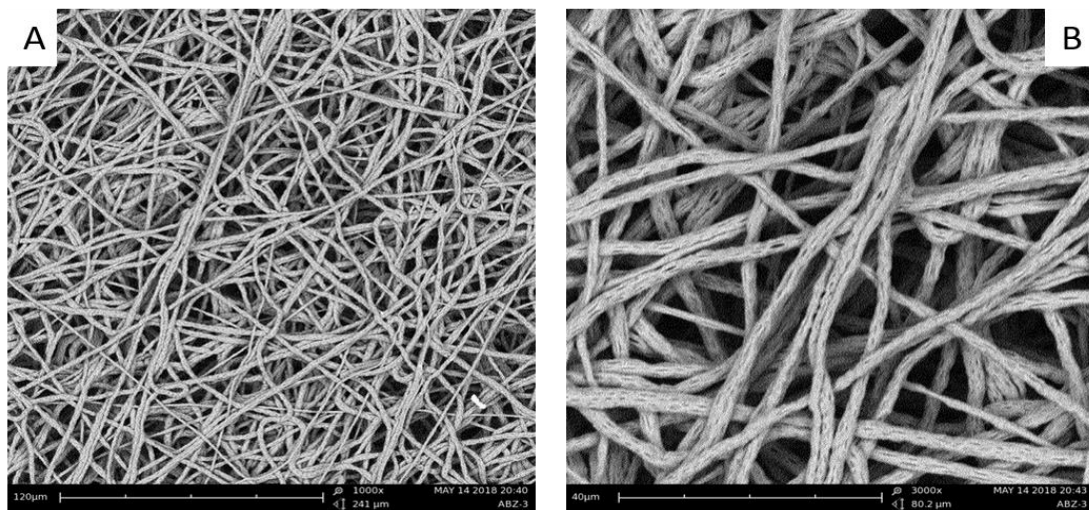
Τα δεδομένα αυτά επιβεβαίωσαν ότι η *in vitro* διάταξη που χρησιμοποιήθηκε δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα και ότι είναι δύσκολη η *a priori* πρόβλεψη της επίδρασης της υδατοδιαλυτότητας του πολυμερούς στη διάλυση του φαρμάκου (Σχήμα Γ.1), ενώ υδατοδιαλυτά πολυμερή είναι δυνατόν είτε να παρατείνουν τη διάλυση (Σχήμα Γ.2), είτε να μην έχουν καμία επίδραση στη διάλυση (Σχήμα Γ.1).

#### *Γ. 1. 2 Διασπορές αλβενδαζόλης σε νανοϊνες*

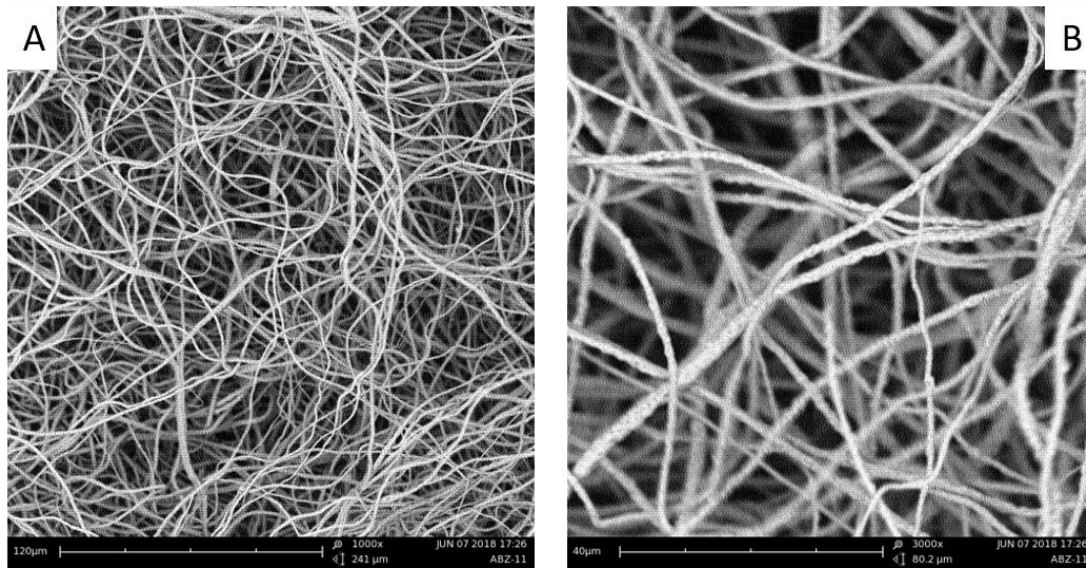
Στα Σχήματα Γ.3 έως Γ.6 παρουσιάζονται οι εικόνες που προέκυψαν από την ανάλυση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης των διασπορών αλβενδαζόλης σε πολυαιθυλενοξείδιο (PEO), πολυκαπρολακτόνη (PCL), οξική κυτταρίνη (CA) και πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP), αντίστοιχα. Ακόμη, μέσω της ανάλυσης με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης υπολογίστηκε και η διάμετρος των νανοϊνών. Η μέση διάμετρος των νανοϊνών που περιείχαν ABZ:PEO σε αναλογία 20:80 w/w δεν μπόρεσε να υπολογιστεί, διότι δεν ήταν εύκολη η παρατήρηση των νανοϊνών στο μικροσκόπιο (Σχήμα Γ.3). Αντίθετα, η μέση διάμετρος των νανοϊνών που περιείχαν ABZ:PCL σε αναλογία 5,88:94,12 w/w ήταν 873,3 nm (Σχήμα Γ.4), ενώ η μέση διάμετρος των νανοϊνών που περιείχαν ABZ:CA σε αναλογία 9,09:90,91 w/w ήταν 1  $\mu\text{m}$  (Σχήμα Γ.5). Τέλος, η μέση διάμετρος των νανοϊνών που περιείχαν ABZ:PVP σε αναλογία 33,3:66,6 w/w ήταν 754,5 nm (Σχήμα Γ.6).



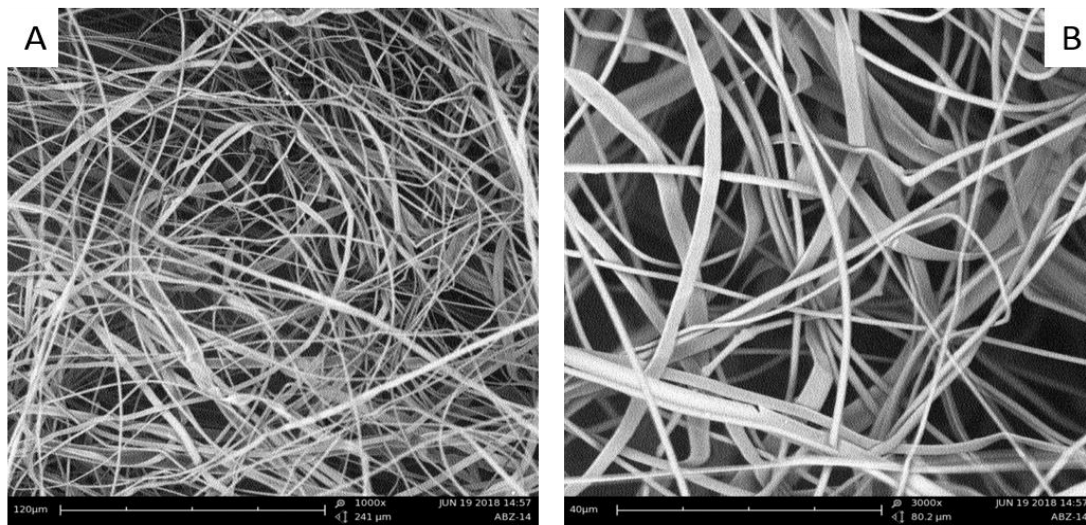
**Σχήμα Γ.3:** Ανάλυση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης της διασποράς αλβενδαζόλης σε πολυαιθυλενοξείδιο (PEO) σε αναλογία 20:80 w/w (A) SEM 1000x, (B) SEM 3000x



**Σχήμα Γ.4:** Ανάλυση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης της διασποράς αλβενδαζόλης σε πολυκαπρολακτόνη (PCL) σε αναλογία 5,88:94,12 w/w (A) SEM 1000x, (B) SEM 3000x

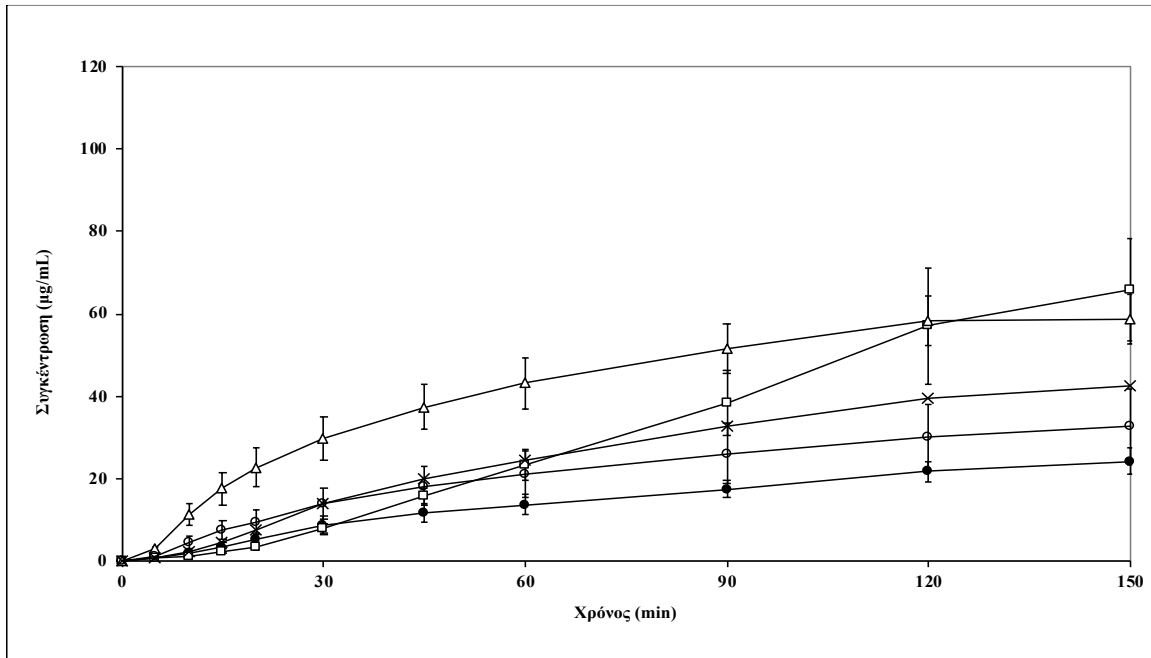


**Σχήμα Γ.5:** Ανάλυση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης της διασποράς αλβενδαζόλης σε οξική κυτταρίνη (CA) σε αναλογία 9,09:90,91 w/w (A) SEM 1000x, (B) SEM 3000x



**Σχήμα Γ.6:** Ανάλυση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης της διασποράς αλβενδαζόλης σε πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP) σε αναλογία 33,3:66,6 w/w (A) SEM 1000x, (B) SEM 3000x

Στο Σχήμα Γ.7 παρουσιάζονται τα δεδομένα διάλυσης καψακίων που περιείχαν κρυσταλλική αλβενδαζόλη και ναοΐνες αλβενδαζόλης.



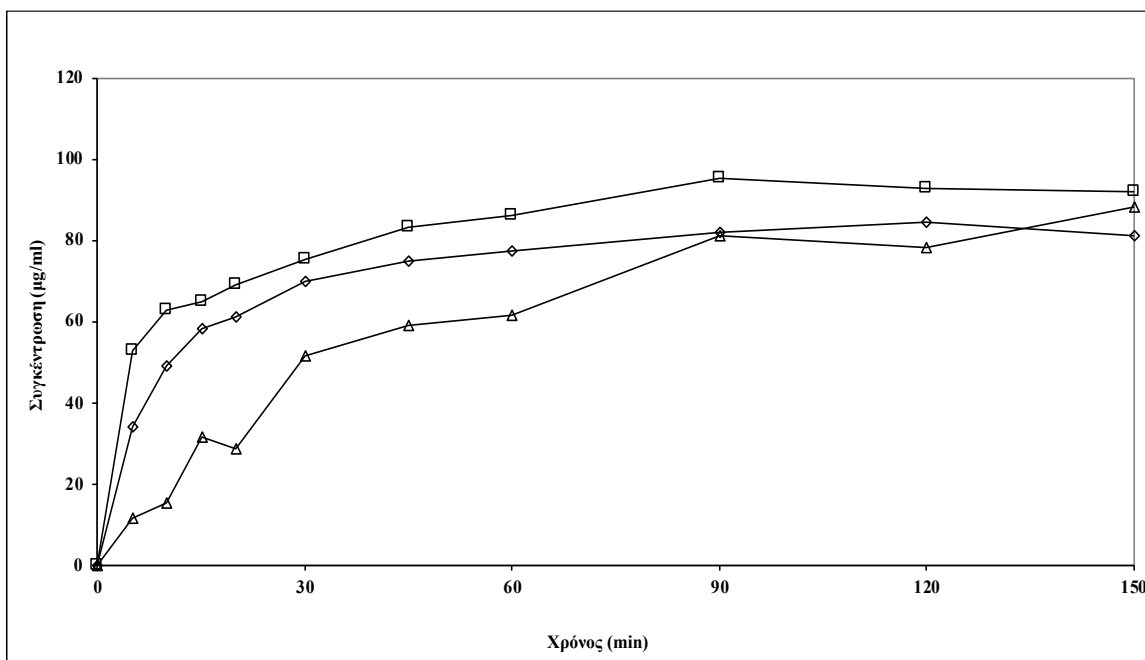
**Σχήμα Γ.7:** Απεικόνιση της συγκέντρωσης της αλβενδαζόλης (μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση) ( $n=3$  για όλες τις περιπτώσεις, εκτός από PVP που είναι  $n=1$ ) στη διάρκεια των πειραμάτων διάλυσης καψακίων αλβενδαζόλης (8 mg ανά καψάκιο) που είχαν τοποθετηθεί σε εξάρτημα καταβύθισης του καψακίου (sinker) σε 40 mL FaSSGF Level III με τη διάταξη του περιστρεφόμενου μικρού πτερυγίου [ $\bullet$  καψάκιο με σκόνη αλβενδαζόλης,  $\square$  καψάκιο με διασπορά αλβενδαζόλης σε PEO (αναλογία ABZ:PEO 20:80 w/w),  $\Delta$  καψάκιο με διασπορά αλβενδαζόλης σε PCL (αναλογία ABZ:PCL 5,88:94,12 w/w),  $\circ$  καψάκιο με διασπορά αλβενδαζόλης σε CA (αναλογία ABZ:CA 9,09:90,91 w/w),  $\times$  καψάκιο με διασπορά αλβενδαζόλης σε PVP (αναλογία ABZ:PVP 33,3:66,6 w/w)]

Η διαλυτότητα της αλβενδαζόλης σε FaSSGF Level III είναι 128,86  $\mu\text{g/mL}$ , ενώ η μέγιστη συγκέντρωση με βάση την ποσότητα της αλβενδαζόλης (8 mg), που ενσωματώθηκε στα καψάκια σε κάθε περίπτωση, ήταν 200  $\mu\text{g/mL}$  (Kourentas et al., 2016). Με βάση τα δεδομένα (Σχήμα Γ.7), η διάλυση της κρυσταλλικής αλβενδαζόλης γίνεται με

αργούς ρυθμούς. Παρόμοια παρατήρηση μπορεί να γίνει και για όλες τις διασπορές αλβενδαζόλης σε νανοΐνες (Σχήμα Γ.7). Ενθαρρυντικά αποτελέσματα ελήφθησαν με το PEO (υδατοδιαλυτό πολυμερές), όπου και σε αυτή την περίπτωση υπήρξε παράταση της αποδέσμευσης, αλλά με δυναμική για σημαντική αύξηση της διαλυτότητας. Η παράταση της αποδέσμευσης είναι σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα, που αναφέρουν ότι το PEO είναι ένα πολυμερές, που μπορεί να παρατείνει την αποδέσμευση φαρμάκων (Ozeki et al., 2000). Ενθαρρυντικά αποτελέσματα υπήρξαν, επίσης, για τη διασπορά αλβενδαζόλης σε PCL, παρά το γεγονός ότι πρόκειται για ένα ελάχιστα διαλυτό στο νερό πολυμερές. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις που προέκυψαν τόσο στη διασπορά αλβενδαζόλης σε CA (μη υδατοδιαλυτό πολυμερές) ήταν αρκετά χαμηλές, ενώ στη διασπορά της σε PVP (υδατοδιαλυτό πολυμερές) παρατηρήθηκαν ενδιάμεσες συγκεντρώσεις. Για τους παραπάνω λόγους, αποφασίστηκε να ακολουθήσουν πειράματα διάλυσης σε διασπορές αλβενδαζόλης σε PEO, σε PCL και σε PVP.

Στο Σχήμα Γ.8 παρουσιάζονται τα δεδομένα διάλυσης της αλβενδαζόλης σε πειράματα, όπου οι διασπορές της αλβενδαζόλης στα τρία παραπάνω πολυμερή εισήχθησαν απευθείας στο υγρό μέσο διάλυσης.

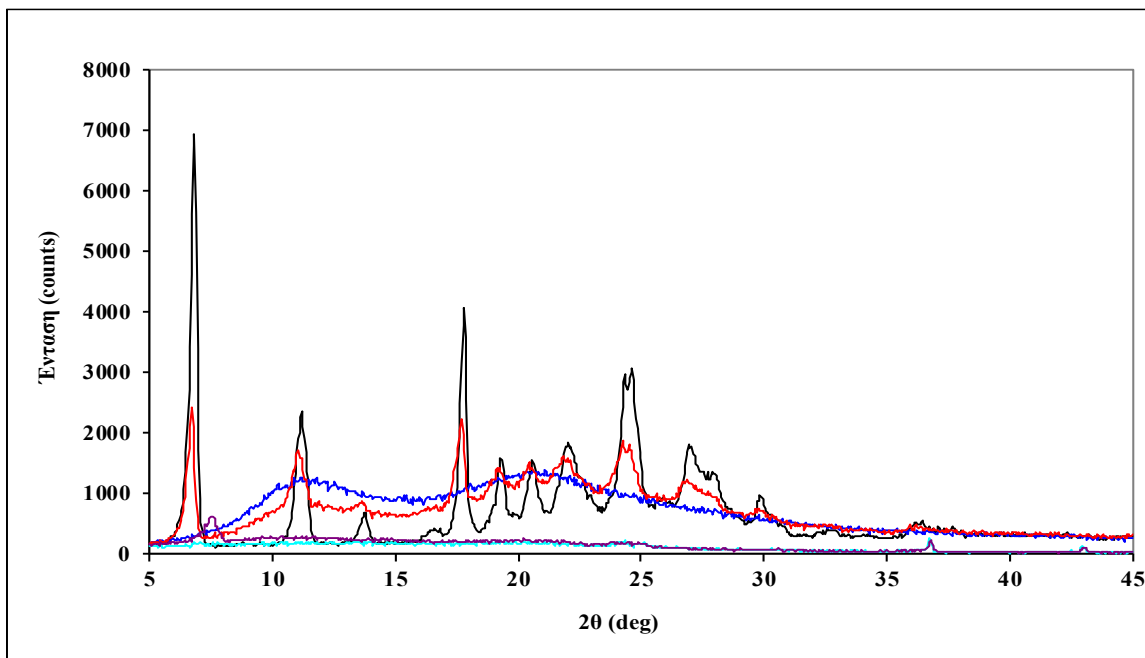
Παραμονή σωματιδίων στην επιφάνεια του γαστρικού υγρού έχει παρατηρηθεί, όταν εναιώρημα αλβενδαζόλης χορηγείται με ένα ποτήρι νερό κατά τη διαπεπτική περίοδο σε ενήλικες (Kourentas et al., 2016).



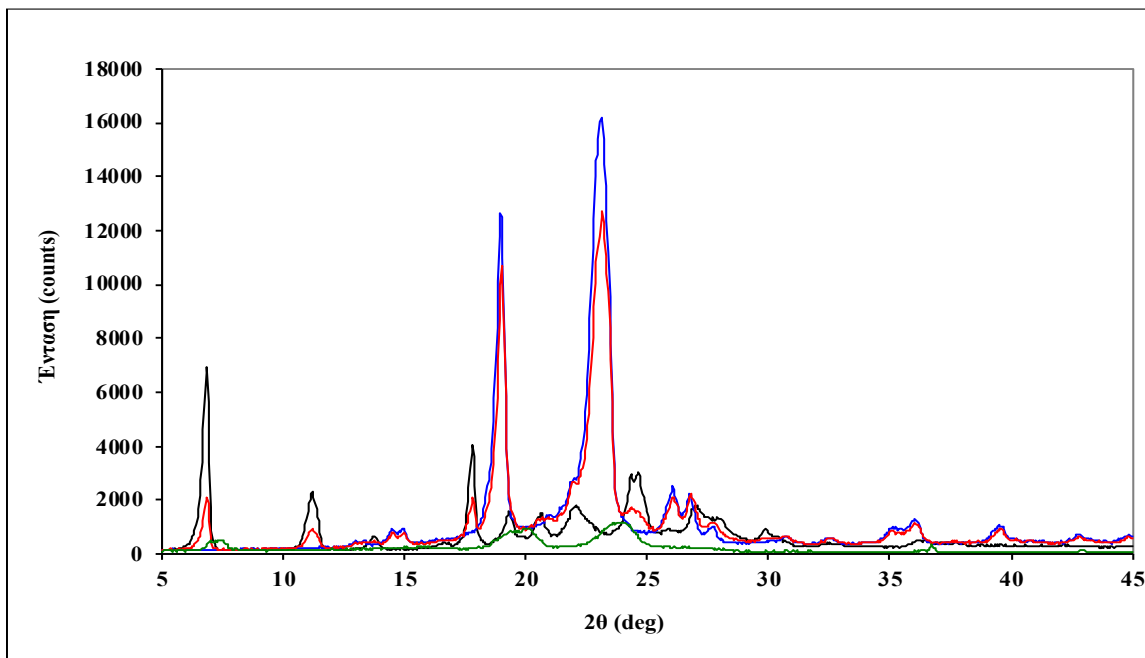
**Σχήμα Γ.8:** Απεικόνιση της συγκέντρωσης της αλβενδαζόλης (n=1) στη διάρκεια των πειραμάτων διάλυσης ελεύθερων ναοϊνών σε 40 mL FaSSGF Level III με τη διάταξη του περιστρεφόμενου μικρού πετυργίου [Δ διασπορά αλβενδαζόλης σε PEO (αναλογία ABZ:PEO 20:80 w/w), ◇ διασπορά αλβενδαζόλης σε PCL (αναλογία ABZ:PCL 5,88:94,12 w/w), □ διασπορά αλβενδαζόλης σε PVP (αναλογία ABZ:PVP 33,3:66,6 w/w)]

Με βάση τα δεδομένα (Σχήμα Γ.8), υπήρξε καλύτερη διασπορά, που οδήγησε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ιδιαίτερα για τη διασπορά αλβενδαζόλης στο υδατοδιαλυτό πολυμερές PVP.

Πράγματι, με βάση τα φάσματα περίθλασης ακτίνων X, μόνο στη διασπορά της αλβενδαζόλης σε PVP η αλβενδαζόλη ήταν σε άμορφη κατάσταση (Σχήμα Γ.9). Αντιθέτως, η διασπορά της αλβενδαζόλης σε PEO ήταν σε κρυσταλλική κατάσταση (Σχήμα Γ.10).



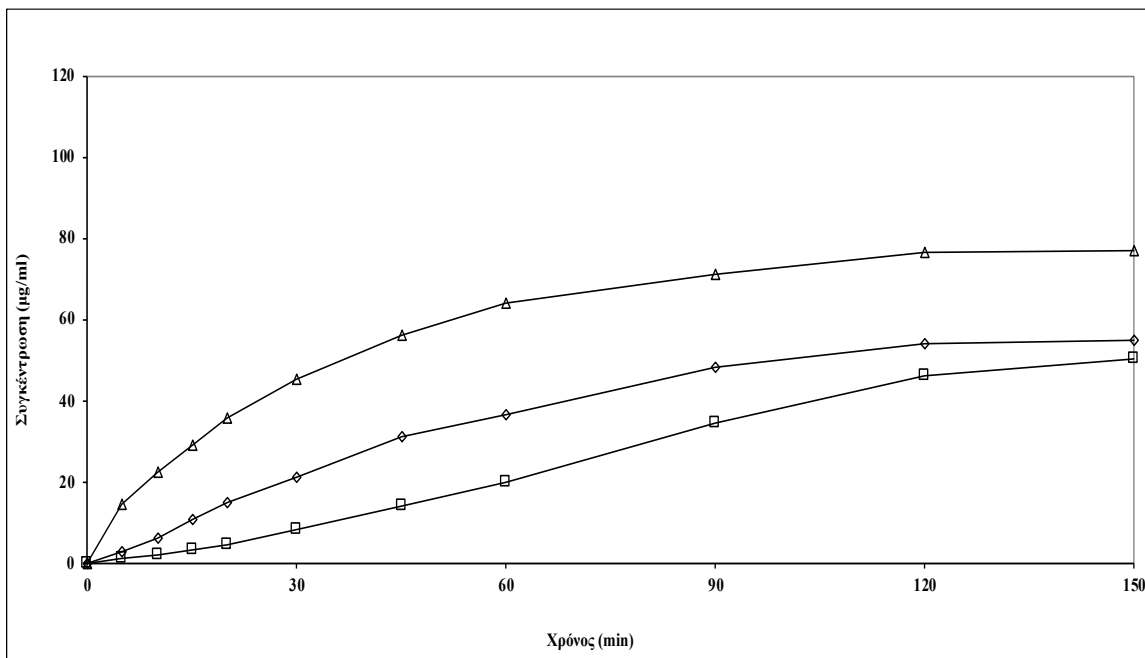
**Σχήμα Γ.9:** Φάσματα περίθλασης ακτίνων X σε σκόνη αλβενδαζόλης (—), σε σκόνη πολυμερούς PVP (—), σε μίγμα σκόνης αλβενδαζόλης και σκόνης πολυμερούς PVP (—) και σε δύο παρτίδες ναοϊνών που περιείχαν ABZ:PVP σε αναλογία 33,3:66,6 w/w παρασκευασμένες κάτω από τις ίδιες συνθήκες (—, —)



**Σχήμα Γ.10:** Φάσματα περίθλασης ακτίνων X σε σκόνη αλβενδαζόλης (—), σε σκόνη πολυμερούς PEO (—), σε μίγμα σκόνης αλβενδαζόλης και σκόνης πολυμερούς PEO (—) και σε νανοϊνες που περιείχαν ABZ:PEO σε αναλογία 20:80 w/w (—)

Η σημασία της διασποράς νανοϊνών PVP, που περιείχαν αλβενδαζόλη, στο υγρό μέσο διάλυσης επιβεβαιώθηκε με πρόσθετα πειράματα των οποίων τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα Γ.11.

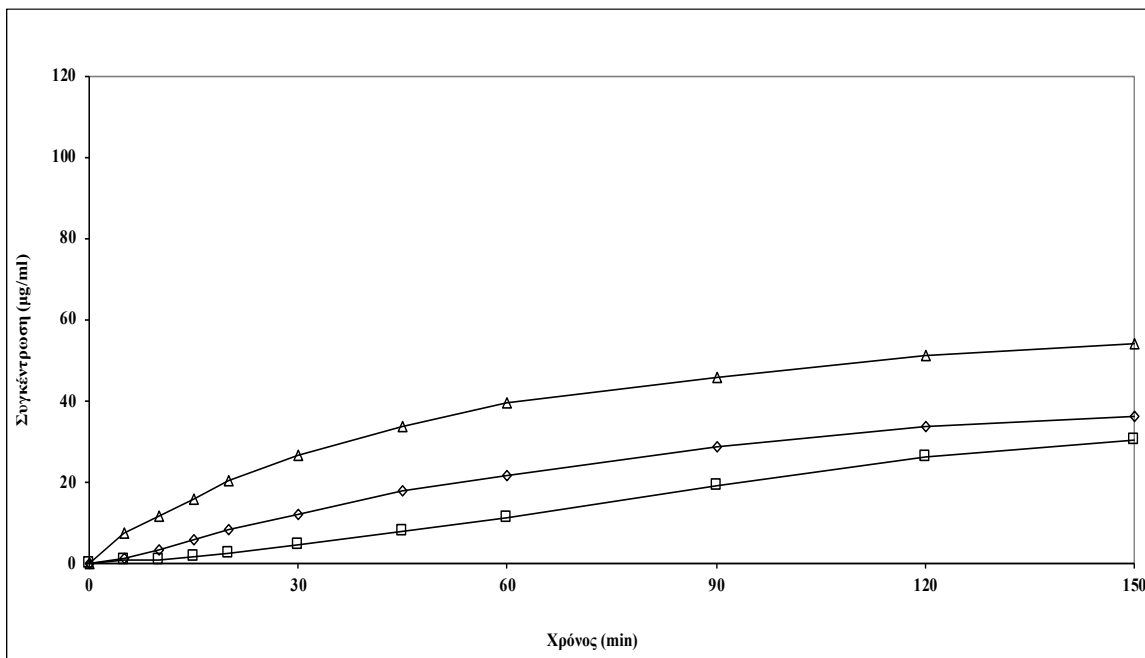




**Σχήμα Γ.11:** Απεικόνιση της συγκέντρωσης της αλβενδαζόλης (n=1) στη διάρκεια των πειραμάτων διάλυσης διασποράς αλβενδαζόλης σε PVP (αναλογία ABZ:PVP 33,3:66,6 w/w) σε 40 mL FaSSGF Level III με τη διάταξη του περιστρεφόμενου μικρού περυγίου (Δ ελεύθερες νανοϊνες, ◇ καψάκιο με διασπορά αλβενδαζόλης σε PVP χωρίς εξάρτημα καταβύθισης, □ καψάκιο με διασπορά αλβενδαζόλης σε PVP με εξάρτημα καταβύθισης)

Τα δεδομένα του Σχήματος Γ.11 είναι σε συμφωνία με τα προηγούμενα δεδομένα (Verreck et al., 2003), όπου η διάλυση ήταν πληρέστερη όταν τα κομμάτια αφέθηκαν ελεύθερα στην επιφάνεια του υγρού μέσου διάλυσης.

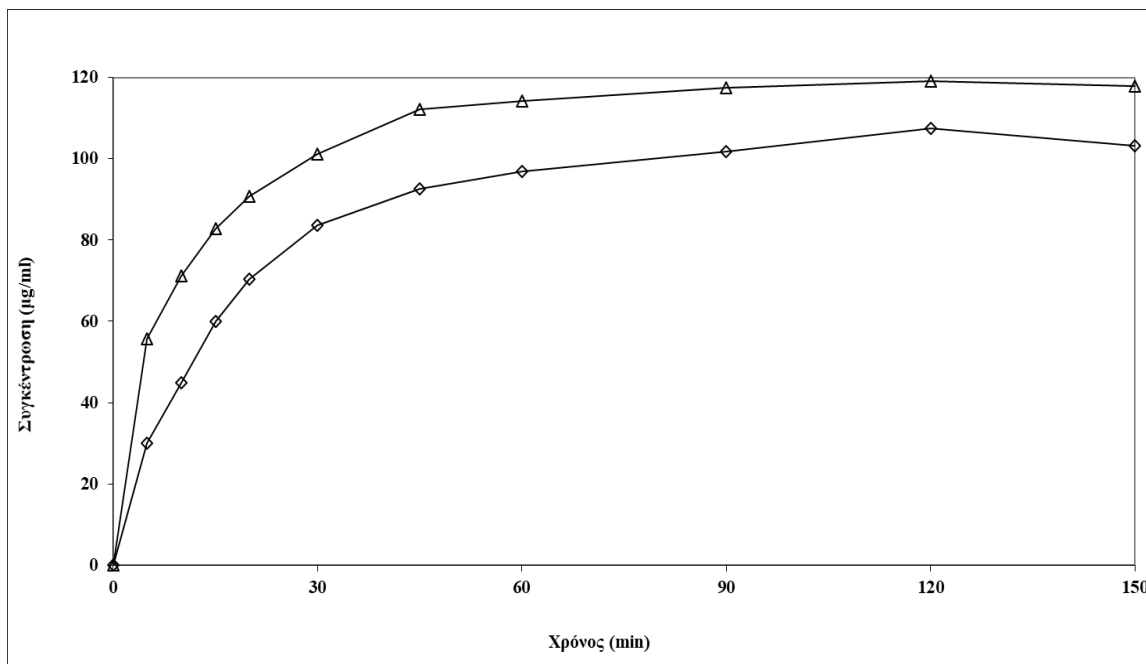
Στη συνέχεια, εξετάστηκε η σημασία του μεγέθους των κομματιών των νανοϊών PVP, που περιείχαν αλβενδαζόλη στη διαβροχή τους στο FaSSGF Level III (Σχήμα Γ.12).



**Σχήμα Γ.12:** Απεικόνιση της συγκέντρωσης της αλβενδαζόλης (n=1) στη διάρκεια των πειραμάτων διάλυσης διασποράς αλβενδαζόλης σε PVP (αναλογία ABZ:PVP 33,3:66,6 w/w) σε 40 mL FaSSGF Level III με τη διάταξη του περιστρεφόμενου μικρού περυγίου [Δ ελεύθερες νανοϊνες σε μικρά κομμάτια (μέγεθος κομματιών περίπου 2x2 cm), ◇ καψάκιο με διασπορά αλβενδαζόλης σε PVP σε μικρά κομμάτια (μέγεθος κομματιών περίπου 2x2 cm) χωρίς εξάρτημα καταβύθισης, □ καψάκιο με διασπορά αλβενδαζόλης σε PVP σε μικρά κομμάτια (μέγεθος κομματιών περίπου 2x2 cm) με εξάρτημα καταβύθισης]

Τα δεδομένα του Σχήματος Γ.12 δείχνουν ότι μείωση του μεγέθους των κομματιών εντείνει το πρόβλημα της διαβροχής τους, αφού οι συγκεντρώσεις στο Σχήμα Γ.12 (μέγεθος κομματιών περίπου 2x2 cm) είναι μικρότερες από τις συγκεντρώσεις στο Σχήμα Γ.11 (μέγεθος κομματιών μεγαλύτερο ή ίσο από 10x10 cm).

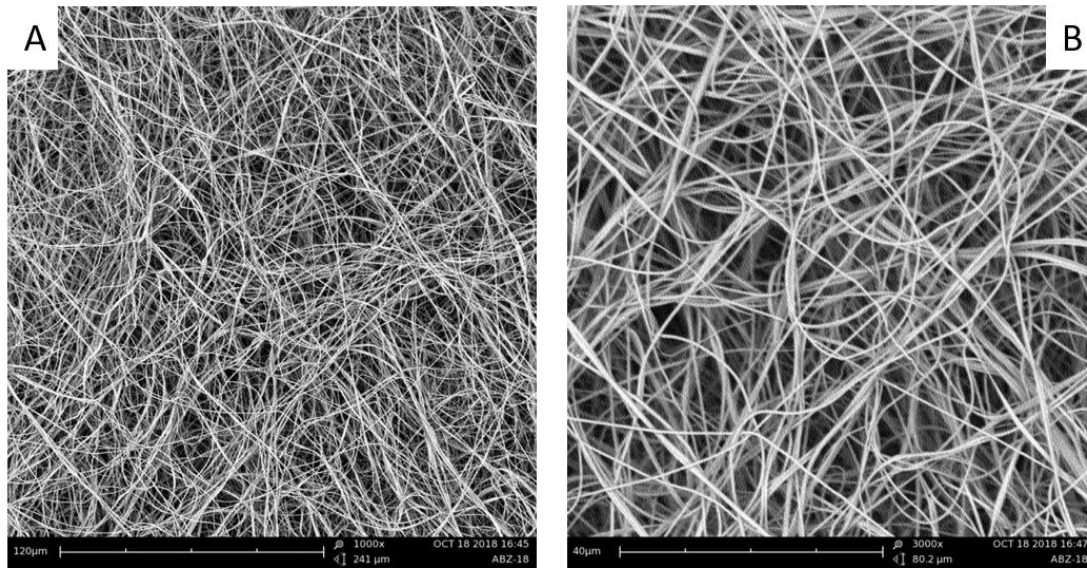
Τέλος, εξετάστηκε η σημασία της περιεκτικότητας των ναοϊνών PVP σε αλβενδαζόλη στη διάλυση της αλβενδαζόλης (Σχήμα Γ.13).



**Σχήμα Γ.13:** Απεικόνιση της συγκέντρωσης της αλβενδαζόλης (n=1) στη διάρκεια των πειραμάτων διάλυσης διασποράς αλβενδαζόλης σε PVP (αναλογία ABZ:PVP 50:50 w/w) σε 40 mL FaSSGF Level III με τη διάταξη του περιστρεφόμενου μικρού πτερυγίου (Δ ελεύθερες ναοΐνες σε μεγάλα κομμάτια, ◇ ελεύθερες ναοΐνες σε μικρά κομμάτια)

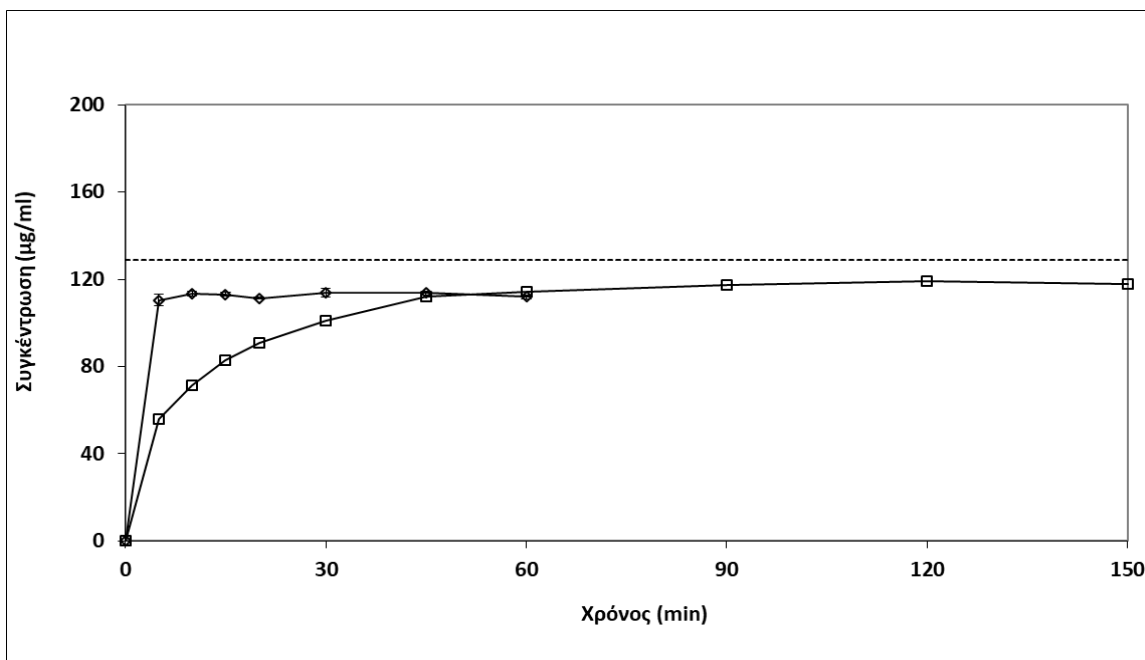
Οι συγκεντρώσεις ήταν υψηλότερες και πλησίαζαν τη διαλυτότητα κορεσμού σε FaSSGF Level III (περίπου 120 µg/mL) (Kourentas et al., 2016), όταν η περιεκτικότητα των ναοϊνών PVP σε αλβενδαζόλη ήταν υψηλότερη (αναλογία ABZ:PVP 50:50 w/w), σε σχέση με τις συγκεντρώσεις, που πετυχαίνονται όταν η αναλογία είναι ABZ:PVP 33,3:66,6 w/w, ανεξάρτητα από τα μεγέθη των κομματιών. Η ανάλυση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης έδειξε ότι η διάμετρος των ναοϊνών, που περιείχαν την αλβενδαζόλη σε μεγαλύτερη αναλογία (αναλογία ABZ:PVP 50:50 w/w) ήταν μικρότερη (388,8 nm)

(Σχήμα Γ.14) συγκριτικά με τη μέση διάμετρο των νανοϊνών, που περιείχαν την αλβενδαζόλη σε μικρότερη αναλογία (αναλογία ABZ:PVP 33,3:66,6 w/w) (754,5 nm) (Σχήμα Γ.6) και αυτή η διαφοροποίηση πιθανότατα αποτελεί το σημαντικότερο λόγο των διαφορών στη διάλυση μεταξύ των δύο αναλογιών.



**Σχήμα Γ.14:** Ανάλυση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης της διασποράς αλβενδαζόλης σε πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP) σε αναλογία 50:50 w/w (A) SEM 1000x, (B) SEM 3000x

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί, ότι η μέγιστη συγκέντρωση αλβενδαζόλης στο υγρό μέσο διάλυσης, που προέκυψε από πειράματα διάλυσης του εμπορικά διαθέσιμου εναιωρήματος με ενισχυμένες δυνατότητες (Zentel®) και της συγκέντρωσης που προέκυψε μετά από πειράματα διάλυσης της διασποράς αλβενδαζόλης σε PVP σε αναλογία ABZ:PVP 50:50 w/w, η οποία ήταν κομμένη σε μεγάλα κομμάτια, είναι παρόμοιες, αλλά η διάλυση της διασποράς σε νανοΐνες PVP (ABZ:PVP 50:50 w/w) ήταν βραδύτερη (Σχήμα Γ.15).



**Σχήμα Γ.15:** Απεικόνιση της διαλυτότητας της αλβενδαζόλης σε FaSSGF Level III (--), της συγκέντρωσης της αλβενδαζόλης (n=1) στη διάρκεια των πειραμάτων διάλυσης διασποράς αλβενδαζόλης σε PVP (αναλογία ABZ:PVP 50:50 w/w) σε 40 mL FaSSGF Level III με τη διάταξη του περιστρεφόμενου μικρού πτερυγίου (□ ελεύθερες νανοΐνες σε μεγάλα κομμάτια) και της συγκέντρωσης της αλβενδαζόλης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) (n=3) στη διάρκεια των πειραμάτων διάλυσης του εμπορικά διαθέσιμου εναιωρήματος αλβενδαζόλης με ενισχυμένες ιδιότητες (Zentel<sup>®</sup>) σε 40 mL FaSSGF Level III με τη διάταξη του περιστρεφόμενου μικρού πτερυγίου (◇)

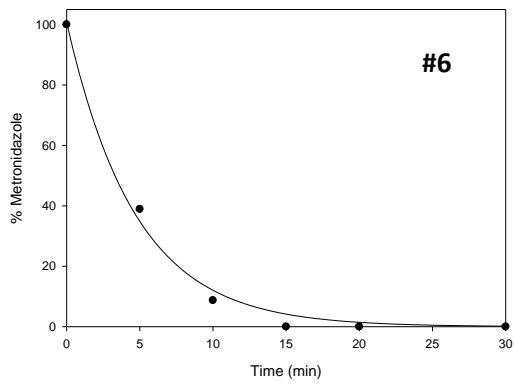
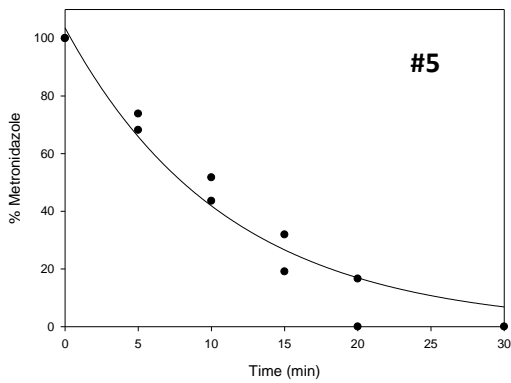
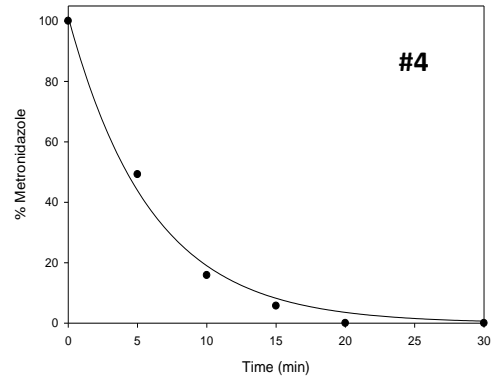
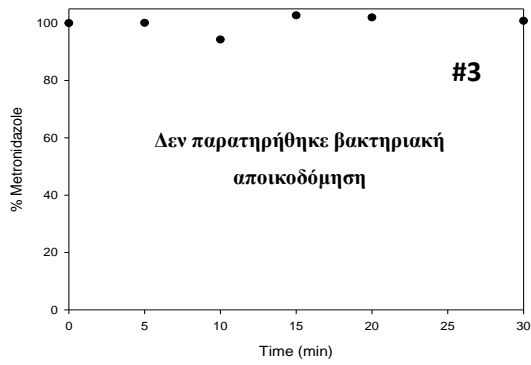
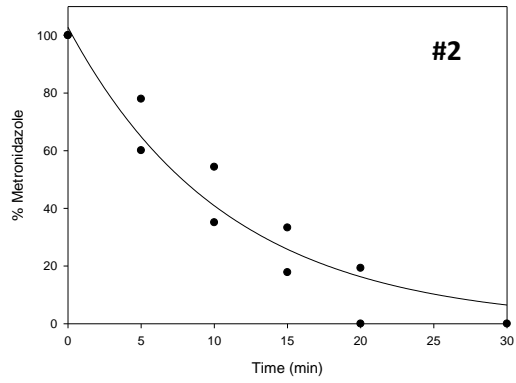
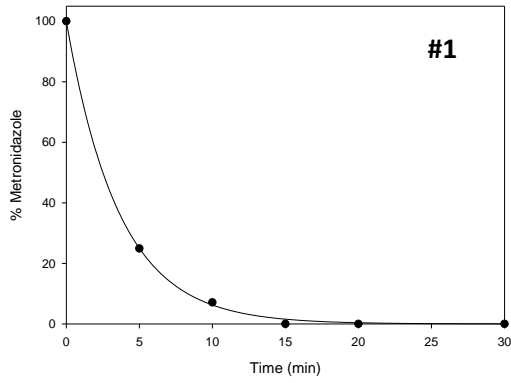
## **Γ. 2 Βακτηριακή αποικοδόμηση μετρονιδαζόλης και ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα νηπίων**

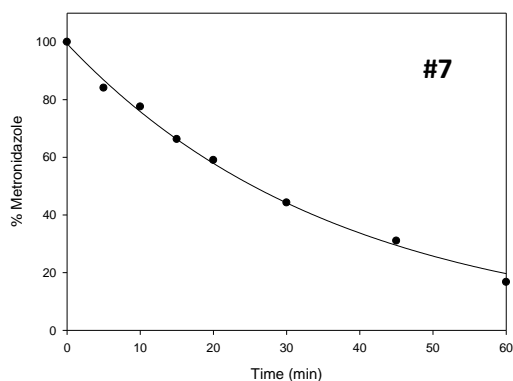
Στο Παράρτημα VIII παρουσιάζονται τα πρωτογενή δεδομένα.

### *Γ. 2. 1 Δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης μετρονιδαζόλης*

Στο Σχήμα Γ.16 παρουσιάζεται το ποσοστό της μετρονιδαζόλης, που παρέμεινε στο υλικό από κόπρανα σε σχέση με τον χρόνο επώασης σε αναερόβιες συνθήκες και η καλύτερα προσαρμοσμένη καμπύλη πρωτοταξικής αποικοδόμησης (Εξίσωση Β.2) για κάθε νήπιο.

Στον Πίνακα Γ.1 παρουσιάζονται οι τιμές των σταθερών των ρυθμών αποικοδόμησης και οι χρόνοι ημίσειας ζωής στο υλικό από κόπρανα κάθε νηπίου, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Στο νήπιο με αριθμό 3 (#3) δεν παρατηρήθηκε βακτηριακή αποικοδόμηση.





**Σχήμα Γ.16:** Δεδομένα της βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης στο υλικό από κόπρανα και η καλύτερα προσαρμοσμένη καμπύλη πρωτοταξικής αποικοδόμησης για κάθε νήπιο (εκτός του νηπίου #3)

**Πίνακας Γ.1:** Σταθερά του ρυθμού βακτηριακής αποικοδόμησης (τυπικό σφάλμα), χρόνος ημίσειας ζωής και συντελεστής προσδιορισμού ( $r^2$ ) της μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα 7 νηπίων

| Αριθμός Νηπίου | k (Τυπικό σφάλμα)<br>( $\text{min}^{-1}$ ) | Χρόνος Ημίσειας<br>Ζωής (min) | Συντελεστής<br>Προσδιορισμού ( $r^2$ ) |
|----------------|--|-------------------------------|--|
| 1              | 0,2772 (0,0066)                            | 2,5                           | 0,9996                                 |
| 2              | 0,092 (0,011)                              | 7,5                           | 0,93                                   |
| 3              | 0  | *                             | *                                      |
| 4              | 0,167 (0,013)                              | 4,2                           | 0,992                                  |
| 5              | 0,0906 (0,0092)                            | 7,6                           | 0,95                                   |
| 6              | 0,212 (0,016)                              | 3,3                           | 0,994                                  |
| 7              | 0,02701 (0,00093)                          | 26                            | 0,996                                  |

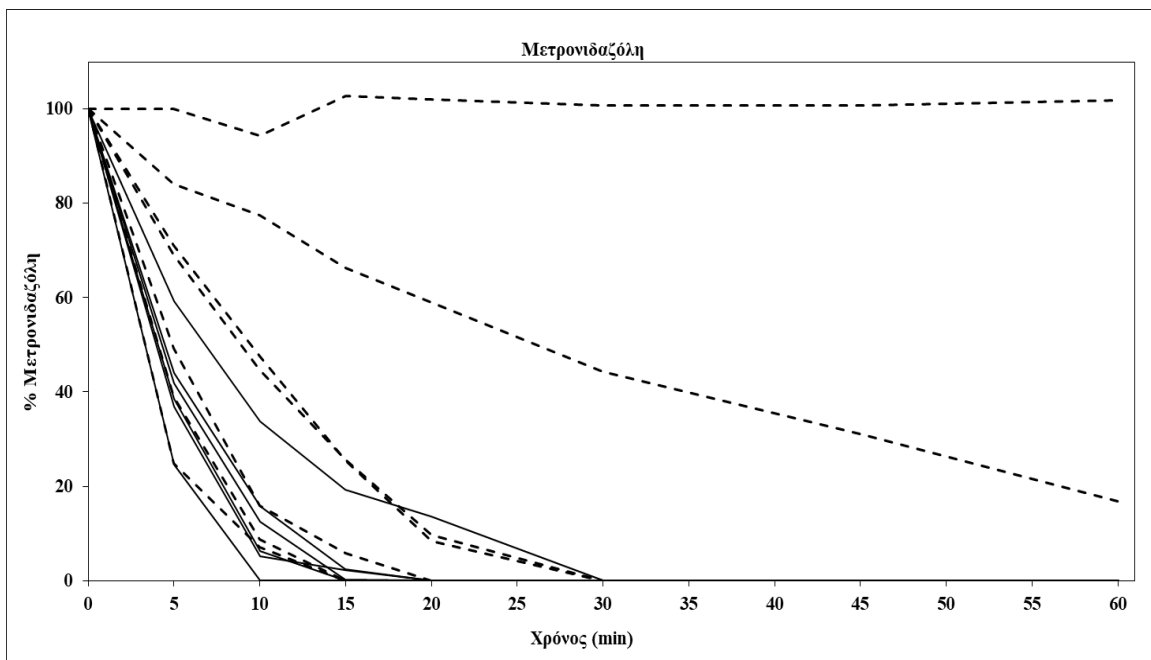
\*Δεν παρατηρήθηκε βακτηριακή αποικοδόμηση



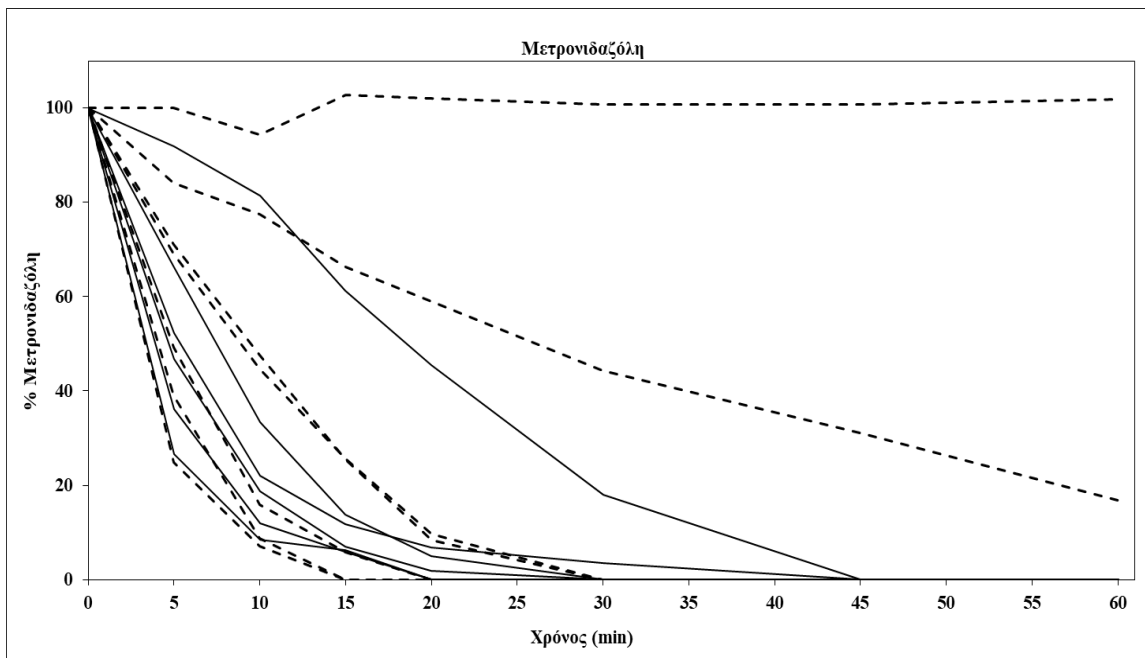
Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα Γ.1, υπολογίζεται η μέση τιμή (τιπική απόκλιση) της σταθεράς βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης [0,12 (0,10)] που αντιστοιχεί σε μέσο χρόνο ημίσειας ζωής 5,6 min.

Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται συγκριτικά τα δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης στο υλικό από κόπρανα εφτά υγιών νηπίων, σε σχέση με τα αντίστοιχα δεδομένα που είχαν ληφθεί στο υλικό από κόπρανα έξι υγιών παιδιών ηλικίας 6-11 ετών (Σχήμα Γ.17) και σε σχέση με τα αντίστοιχα δεδομένα που είχαν ληφθεί στο υλικό από κόπρανα έξι υγιών ενηλίκων (Σχήμα Γ.18).

Σε όλες τις ηλικιακές ομάδες παρατηρείται υψηλή διατομική μεταβλητότητα, ωστόσο, φαίνεται ότι η μεταβλητότητα στα νήπια είναι υψηλότερη.



**Σχήμα Γ.17:** Ποσοστό βακτηριακής αποικοδόμησης μετρονιδαζόλης σε σχέση με το χρόνο στο υλικό από κόπρανα υγιών νηπίων (-----) (n=7) και υγιών παιδιών ηλικίας 6-11 ετών (—) (n=6)

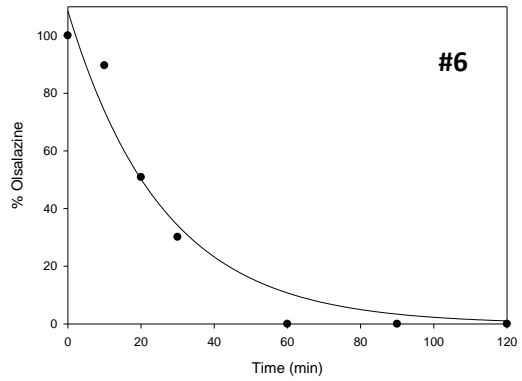
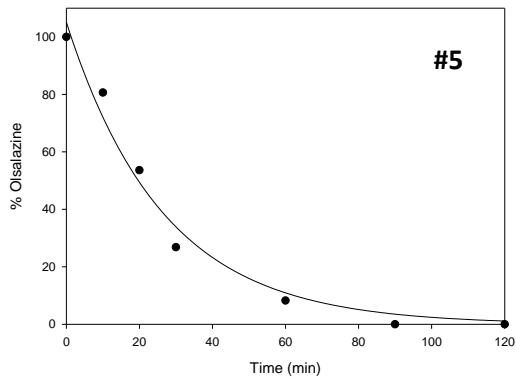
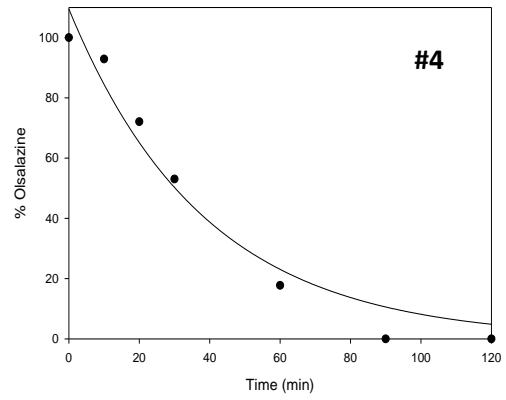
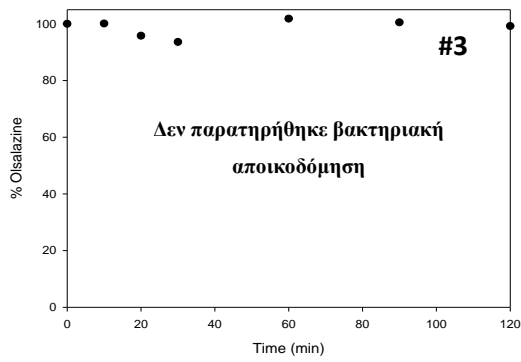
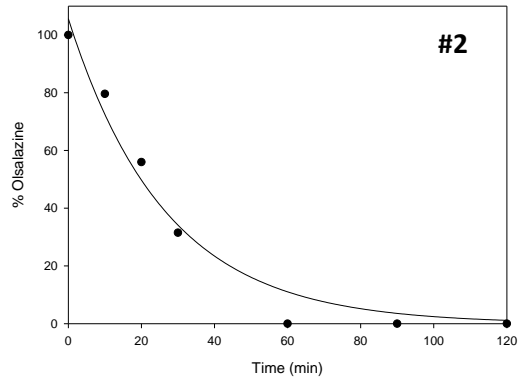
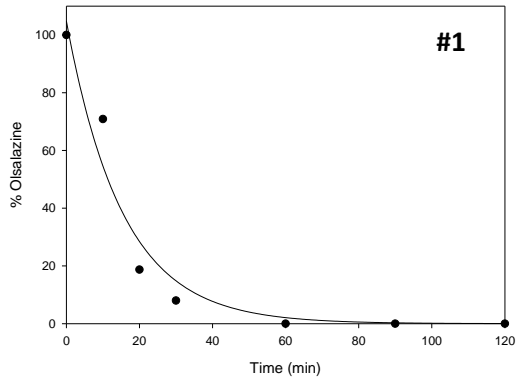


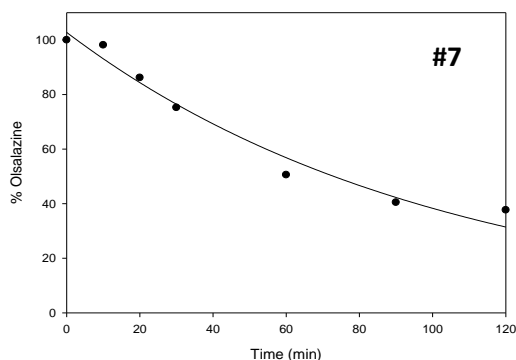
**Σχήμα Γ.18:** Ποσοστό βακτηριακής αποικοδόμησης μετρονιδαζόλης σε σχέση με το χρόνο στο υλικό από κόπρανα υγιών νηπίων (-----) (n=7) και υγιών ενηλίκων (—) (n=6)

### Γ. 2. 2 Δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης ολσαλαζίνης

Στο Σχήμα Γ.19 παρουσιάζεται το ποσοστό της ολσαλαζίνης, που παρέμεινε στο υλικό από κόπρανα σε σχέση με τον χρόνο επώασης σε αναερόβιες συνθήκες και η καλύτερα προσαρμοσμένη καμπύλη πρωτοταξικής αποικοδόμησης (Εξίσωση B.2) για κάθε νήπιο.

Στον Πίνακα Γ.2 παρουσιάζονται οι τιμές των σταθερών των ρυθμών αποικοδόμησης και οι χρόνοι ημίσειας ζωής στο υλικό από κόπρανα κάθε νηπίου, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Στο νήπιο με αριθμό 3 (#3) δεν παρατηρήθηκε βακτηριακή αποικοδόμηση.





**Σχήμα Γ.19:** Δεδομένα της βακτηριακής αποικοδόμησης της ολσαλαζίνης στο υλικό από κόπρανα και η καλύτερα προσαρμοσμένη καμπύλη πρωτοταξικής αποικοδόμησης για κάθε νήπιο (εκτός του νηπίου #3)

**Πίνακας Γ.2:** Σταθερά του ρυθμού βακτηριακής αποικοδόμησης (τυπικό σφάλμα), χρόνος ημίσειας ζωής και συντελεστής προσδιορισμού ( $r^2$ ) της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα 7 νηπίων

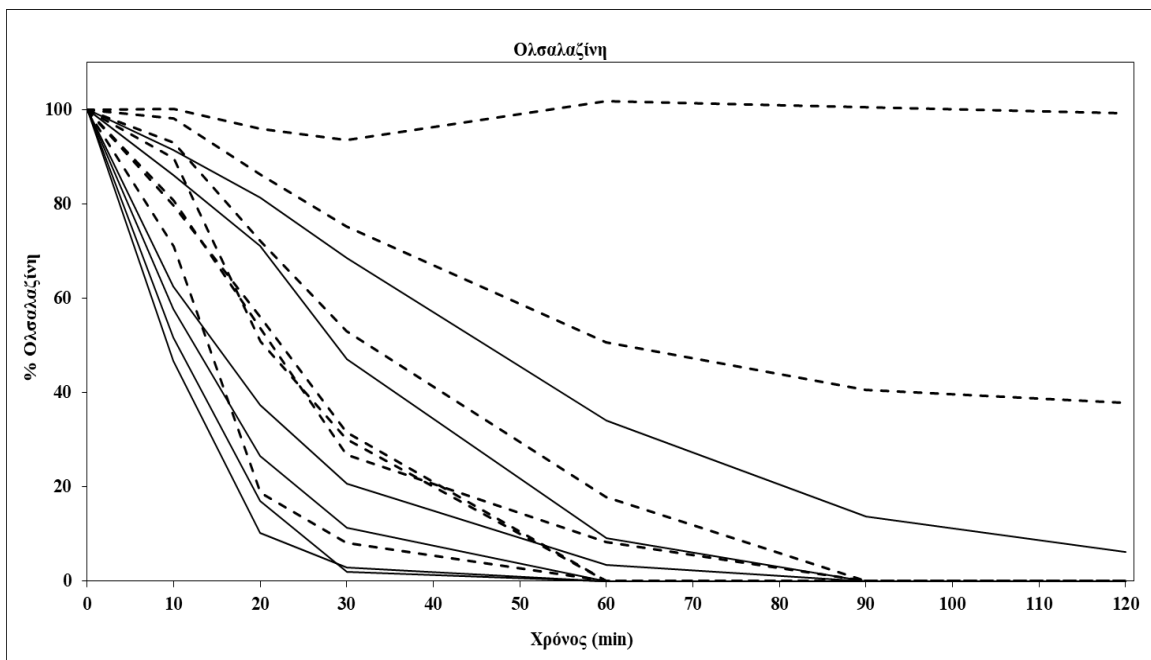
| Αριθμός νηπίου | k (Τυπικό σφάλμα)<br>( $\text{min}^{-1}$ ) | Χρόνος Ημίσειας<br>Ζωής (min) | Συντελεστής<br>Προσδιορισμού ( $r^2$ ) |
|----------------|--|-------------------------------|--|
| 1              | 0,065 (0,012)                              | 11                            | 0,96                                   |
| 2              | 0,0377 (0,0050)                            | 18                            | 0,97                                   |
| 3              | 0  | *                             | *                                      |
| 4              | 0,0260 (0,0039)                            | 27                            | 0,96                                   |
| 5              | 0,0377 (0,0043)                            | 18                            | 0,98                                   |
| 6              | 0,0385 (0,0067)                            | 18                            | 0,96                                   |
| 7              | 0,0099 (0,0009)                            | 70                            | 0,97                                   |

\*Δεν παρατηρήθηκε βακτηριακή αποικοδόμηση

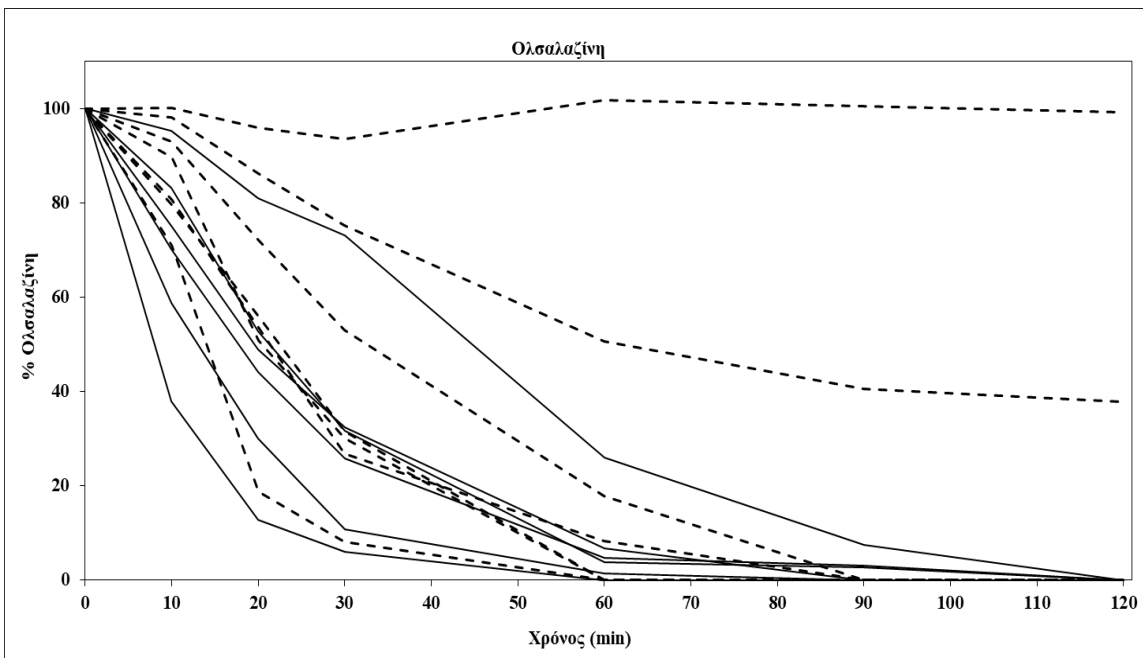
Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα Γ.2, υπολογίστηκε η μέση τιμή της σταθεράς βακτηριακής αποικοδόμησης της ολσαλαζίνης [0,031 (0,021)] που ισοδυναμεί σε μέσο χρόνο ημίσειας ζωής 23 min.

Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται συγκριτικά τα δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης της ολσαλαζίνης στο υλικό από κόπρανα επτά υγιών νηπίων, σε σχέση με τα αντίστοιχα δεδομένα που είχαν ληφθεί στο υλικό από κόπρανα έξι υγιών παιδιών ηλικίας 6-11 ετών (Σχήμα Γ.20) και σε σχέση με τα αντίστοιχα δεδομένα που είχαν ληφθεί στο υλικό από κόπρανα έξι υγιών ενηλίκων (Σχήμα Γ.21).

Σε όλες τις ηλικιακές ομάδες παρατηρείται υψηλή διατομική μεταβλητότητα, ωστόσο, φαίνεται ότι η μεταβλητότητα στα νήπια είναι υψηλότερη.



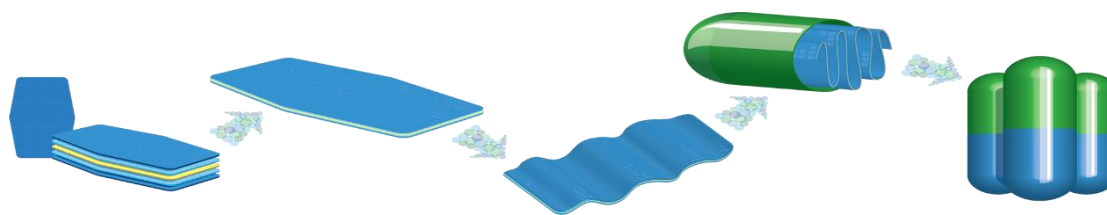
**Σχήμα Γ.20:** Ποσοστό βακτηριακής αποικοδόμησης ολσαλαζίνης σε σχέση με το χρόνο στο υλικό από κόπρανα υγιών νηπίων (-----) (n=7) και υγιών παιδιών ηλικίας 6-11 ετών (—) (n=6)



**Σχήμα Γ.21:** Ποσοστό βακτηριακής αποικοδόμησης ολσαλαζίνης σε σχέση με το χρόνο στο υλικό από κόπρανα υγιών νηπίων (-----) (n=7) και υγιών ενηλίκων (—) (n=6)

## Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, τα πειράματα διάλυσης των άμορφων στερεών διασπορών αλβενδαζόλης σε ναοΐνες πολυβινυλοπυρρολιδόνης (PVP) έδειξαν πιο αργή διάλυση από αυτή του εμπορικά διαθέσιμου εναιωρήματος αλβενδαζόλης (Zentel®). Βελτιστοποίηση του μεγέθους των κομματιών των ναοΐνων σε σχέση με την περιεκτικότητα σε αλβενδαζόλη, είναι πιθανό να οδηγήσει σε επιτάχυνση της διάλυσης και το εναιώρημα ναοΐνων να μπορεί να αποτελεί ένα προϊόν με αυξημένες δυνατότητες, που θα μπορούσε να χορηγηθεί σε νήπια. Θέματα σταθερότητας της άμορφης κατάστασης του φαρμάκου στις ναοΐνες και παρασκευή σχετικών εναιωρημάτων σε βιομηχανική κλίμακα αποτελούν τομείς για περαιτέρω διερεύνηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή την περίοδο ένα σύστημα χορήγησης φαρμάκων, το οποίο βασίζεται σε βιοδιασπώμενα πολυμερικά υμένα, βρίσκεται στη Φάση III κλινικών μελετών για χρήση στη θεραπεία της νόσου του Parkinson (Accordion Pill®). Το σύστημα αυτό διπλώνεται σε κυματιστό σχήμα και στη συνέχεια τοποθετείται σε ένα καψάκιο (Σχήμα Δ.1). Στόχος του συστήματος είναι η παρατεταμένη παραμονή του προϊόντος στο στόμαχο. Η παράταση του χρόνου παραμονής στο στόμαχο οδηγεί σε παράταση της διάρκειας της απορρόφησης, ενώ είναι χρήσιμη στην αύξηση της απορρόφησης φαρμάκων, όπως είναι οι β-λακτάμες. Σύμφωνα με την παραγωγό εταιρεία, η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα του Accordion Pill® έχουν δοκιμαστεί σε περισσότερες από 30 κλινικές μελέτες με περισσότερες από δέκα χιλιάδες χορηγήσεις (<https://www.intecpharma.com/technology/> ημερομηνία πρόσβασης 31-05-2019).

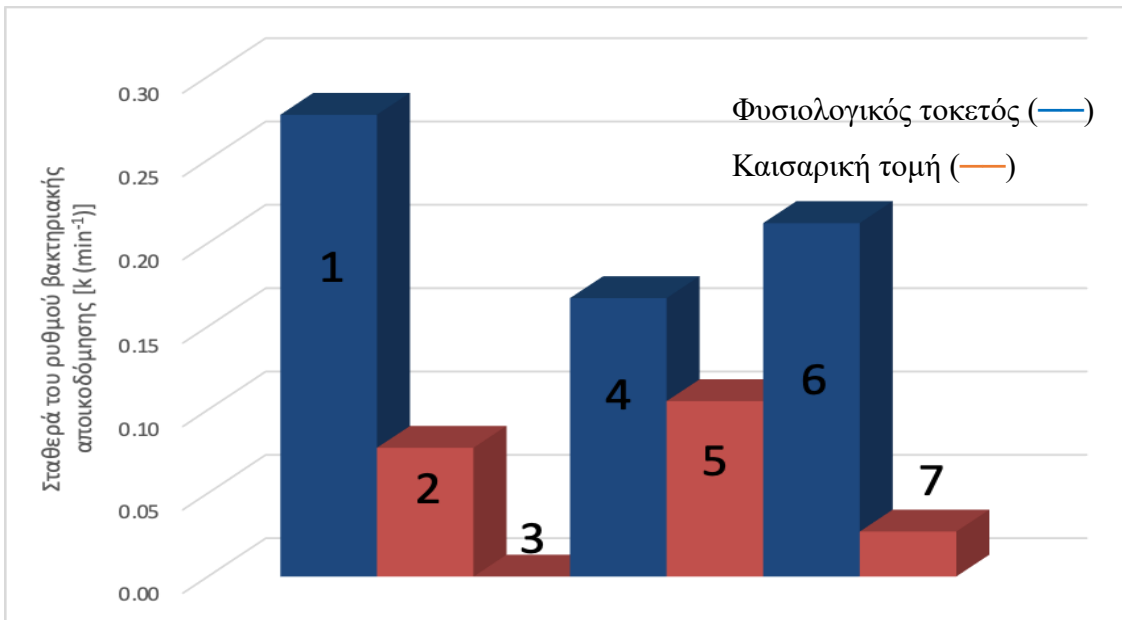


**Σχήμα Δ.1:** Διαδικασία παραγωγής του Accordion Pill®

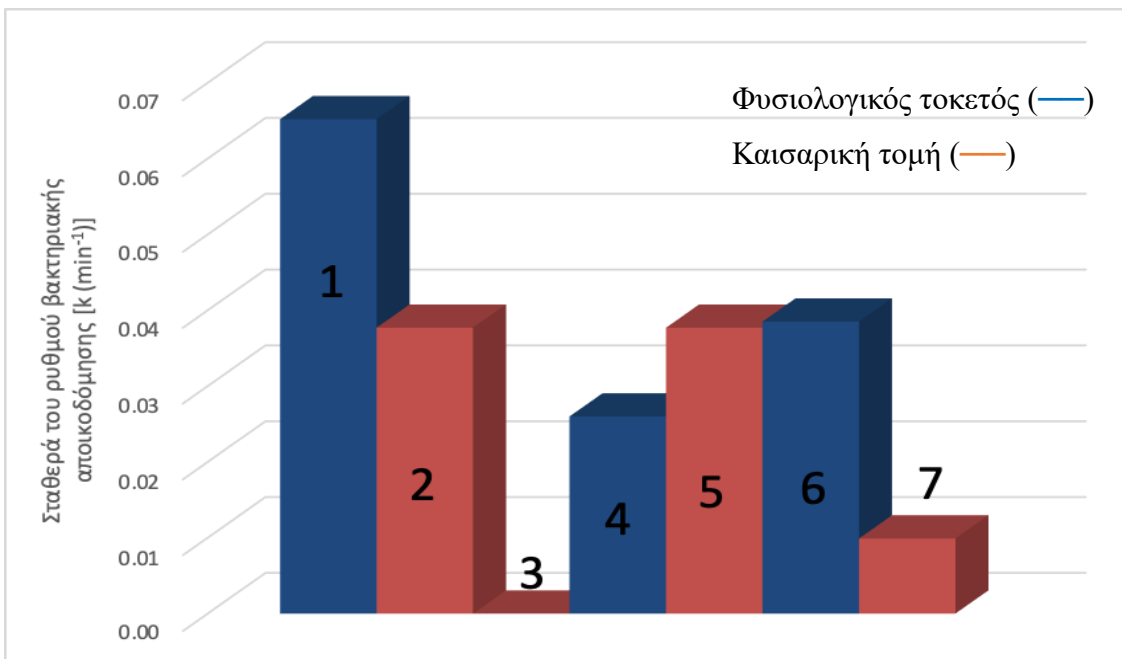
(<https://www.intecpharma.com/technology/> ημερομηνία πρόσβασης 31-05-2019)

Με βάση τα αποτελέσματα της βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης, είναι δύσκολη η εξαγωγή συμπερασμάτων σε στατιστική βάση για πιθανές διαφορές στη βακτηριακή αποικοδόμηση της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης με την ηλικία, λόγω της υψηλής μεταβλητότητας που παρατηρείται σε όλες τις ηλικιακές ομάδες και ιδιαίτερα στα νήπια. Αξίζει να σημειωθεί ότι το νήπιο με αριθμό 3 (#3), στο οποίο δεν παρατηρήθηκε βακτηριακή αποικοδόμηση των δύο φαρμάκων, λάμβανε «φυτικά σκευάσματα» (σιρόπι Grintuss®) και η λήψη αυτών των σκευασμάτων δεν είχε συμπεριληφθεί στα κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη (Σχήματα Δ.2 και Δ.3). Η παρατήρηση αυτή έρχεται να επιβεβαιώσει τα βιβλιογραφικά δεδομένα, που επισημαίνουν τη σημασία της λήψης «φυτικών σκευασμάτων» στη διαφοροποίηση του μικροβιώματος των νηπίων (Gabielli et al. 2011, Hansen et al. 2012). Επίσης, η γέννηση των νηπίων με καισαρική τομή οδήγησε σε αυξημένες τιμές της σταθεράς του ρυθμού βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης στο υλικό από κόπρανα (Σχήματα Δ.2 και Δ.3). Στην περίπτωση της μετρονιδαζόλης, η διαφορά στις τιμές της σταθεράς του ρυθμού βακτηριακής αποικοδόμησης ήταν μεγάλη ανάμεσα σε αυτές τις δύο κατηγορίες, ενώ στην ολσαλαζίνη ήταν μικρότερη. Αυτό συμβαίνει, διότι έχει αποδειχθεί ότι τα παιδιά που γεννούνται με φυσιολογικό τοκετό έχουν μεγαλύτερη αφθονία σε διαφορετικά βακτήρια σε σχέση με τα παιδιά που γεννούνται με καισαρική τομή (Penders et al. 2006). Με βάση την παρούσα μελέτη, στα νήπια εμφανίζεται μεγαλύτερη διακύμανση στη σύσταση του μικροβιώματος, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγαλύτερη διακύμανση στη βακτηριακή αποικοδόμηση φαρμάκων.





**Σχήμα Δ.2:** Απεικόνιση της σταθεράς του ρυθμού βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης σε σχέση με τη μέθοδο γέννησης για κάθε νήπιο



**Σχήμα Δ.3:** Απεικόνιση της σταθεράς του ρυθμού βακτηριακής αποικοδόμησης της ολσαλαζίνης σε σχέση με τη μέθοδο γέννησης για κάθε νήπιο

## E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abu Shamat M, The role of gastrointestinal microflora in the metabolism of drugs, *International Journal of Pharmaceutics*. 1993; 97: 1-13.
- Abuzara S, Sang-Min Hyun, Jun-Hee Kim, Hee Jun Park, Min-Soo Kim, Jeong-Sook Park, Sung-Joo Hwang. Enhancing the solubility and bioavailability of poorly water-soluble drugs using supercritical antisolvent (SAS) process, *International Journal of Pharmaceutics* (2010)
- Albesharat R, Ehrmann M, Korakli M, et al. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Syst Appl Microbiol* 2011; 34: 148–155.
- Ali W, Williams AC, Rawlinson CF. Stochiometrically governed molecular interactions in drug: poloxamer solid dispersions, *Int. J. Pharm.* 2010; 391: 162–168.
- Aso Y, Yoshioka S, Kojima S. Explanation of the crystallization rate of amorphous nifedipine and phenobarbital from their molecular mobility as measured by C-13 nuclear magnetic resonance relaxation time and the relaxation time obtained from the heating rate dependence of the glass transition temperature. *J Pharm Sci*. 2001; 90(6): 798-806.
- Basit AW. Advances in colonic drug delivery. *Drugs* 2005; 65: 1991-2007
- Bezirtzoglou E, Tsiotsias A, Welling GW. Microbiota profile in feces of breastandformula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe* 2011; 17: 478–482.
- Bhardwaj N., Kundu S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol. Adv.*, 2010; 28: 325-347.
- Bialleck S, Rein H. Preparation of starch-based pellets by hot-melt extrusion, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011; 79: 440–448.
- Bikiaris DN. Solid dispersions, Part I: recent evolutions and future opportunities in manufacturing methods for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs. *Journal*. 2011; 8 (11)
- Brouwers J, Brewster ME, Augustijns P. Supersaturating drug delivery systems: the answer to solubility-limited oral bioavailability? *J. Pharm Sci*. 2009; 98(8): 2549-2572
- Cejkova, J. Treatment of alkali-injured cornea by cyclosporine A-loaded electrospun nanofibers—An alternative mode of therapy. *Exp. eye Res*. 2016; 147: 128-137.

- Chau Le-Ngoc Vo, Chulhun Park, Beom-Jin Lee. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2013)
- Chauhan B, Shimpi S, Paradkar A. Preparation and evaluation of 1360 glibenclamide-polyglycolized glycerides solid dispersions with silicon dioxide by spray drying technique, *Eur. J. Pharm. Sci.* 26 2005; 1362: 219–230.
- Claesson MJ, Cusack S, O’Sullivan O, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 4586–4591.
- De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Giacomo A, Serrazanetti DI, Cristofori F, Guerzoni ME, Gobbetti M, Francavilla R. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified *PLoS One*. 2013; 8 (10)
- Desai J, Alexander K, Riga A, Characterization of polymeric dispersions of dimenhydrinate in ethyl cellulose for controlled release, *Int. J. Pharm.* 2006; 308: 115–123.
- Eamonn M. M. Quigley, Gut Bacteria in Health and Disease, *Gastroenterology & Hepatology* 2013; 9 (9)
- Gabrielli O, Zampini L, Galeazzi T, et al. Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics* 2011; 128: 1520–1531.
- Gencturk, A. Polyurethane/hydroxypropyl cellulose electrospun nanofiber mats as potential transdermal drug delivery system: characterization studies and in vitro assays. *Artif. Cell Nanomed. Biotechnol.* 2016; 1-10.
- Georgaka D, Butler J, Kesisoglou F, Reppas C, Vertzoni M. Evaluation of Dissolution in the Lower Intestine and Its Impact on the Absorption Process of High Dose Low Solubility Drugs. *Molecular Pharmaceutics*. (2017)
- Greiner A. & Wendorff J. H. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 2007; 46: 5670-5703.
- Hamori, M., Yoshimatsu, S., Hukuchi, Y., Shimizu, Y., Fukushima, K., Sugioka, N., Nishimura, A., Shibata, N.: Preparation and pharmaceutical evaluation of nano-fiber matrix supported drug delivery system using the solvent-based electrospinning method. *Int. J. Pharm.* 2014; 464(1–2): 243–251.

- Hancock BC, Zografi G. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *J Pharm Sci.* 1997; 86(1): 1-12.
- Hansen CHF, Nielsen DS, Kverka M, et al. Patterns of early gut colonization shape future immune responses of the host. *PLoS One* 2012; 7: 340-343.
- Harvey R.A., Champe P.C. *Pharmacology*. Lippincott Company, New York (1992)
- Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012; 336: 1268–1273.
- Huang C., Soenen S. J., Rejman J., Lucas B., Braeckmans K., Demeester J., De Smedt S. C. Stimuli-responsive electrospun fibers and their applications. *Chem. Soc. Rev.* 2011; 40: 2417-2434.
- Jachowicz R. Dissolution rates of partially water-soluble drugs from solid dispersion systems. I. Prednisolone, *Int. J. Pharm.* 1987; 35: 1–5.
- Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, et al. Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *J Pediatr* 2011; 158: 390–396.
- Jalanka-Tuovinen J, Salonen A, Nikkila J, et al. Intestinal microbiota in healthy adults: temporal analysis reveals individual and common core and relation to intestinal symptoms. *PLoS One* 2011; 6: 230-235.
- Jang, C.H. Antibacterial effect of electrospun polycaprolactone/polyethylene oxide/vancomycin nanofiber mat for prevention of periprosthetic infection and biofilm formation. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2015; 79: 1299-1305.
- Janssens S, Van den Mooter G. Review: physical chemistry of solid dispersions. *J Pharm Pharmacol.* 2009; 61(12): 1571-86.
- Jung IH, Lee JH, Hyun YJ, Kim DH. Metabolism of ginsenoside Rb1 by human intestinal microflora and cloning of its metabolizing  $\beta$ -D-glucosidase from *Bifidobacterium longum* H-1. *Biol Pharm Bull.* 2012; 35(4): 573-81.
- Karatzas E, Vertzoni M, Muenster U, Reppas C. The Impact of Handling and Storage of Human Fecal Material on Bacterial Activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2016; 1-4.
- Koenig JE, Spor A, Scalfone N, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 4578–4585.

- Kourentas A, Vertzoni M, Symillides M, Goumas K, Gibbon R, Butler J, Reppas C. Effectiveness of supersaturation promoting excipients on albendazole concentrations in upper gastrointestinal lumen of fasted healthy adults. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016; 91: 11-19.
- Leuner C, Dressman J, Improving drug solubility for oral delivery using solid 1375 dispersions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000; 50: 47–60.
- Lewis SJ, Heaton KW Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time *Scand J Gastroenterol.* 1997; 32(9): 920-4.
- Li D, Xia Y. Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel? *Adv. Mater.* 2004; 16: 1151-1170.
- Li Z., Wang C. *One-Dimensional nanostructures: Electrospinning Technique and Unique Nanofibers*, Berlin, Springer Berlin Heidelberg, 2013; 15-28.
- Mastromarino AJ, Reddy BS, Wynder EL. Fecal profiles of anaerobic microflora of large bowel cancer patients and patients with nonhereditary large bowel polyps *Cancer Res* 1978; 38(12):4458-62.
- McConnell EL, Short MD, Basit AW. An in vivo comparison of intestinal pH and bacteria as physiological trigger mechanisms for colonic targeting in man. *J Control Release* 2008; 130: 154-60.
- Murdande S, Pikal M, Shanker R, Bogner R. Solubility advantage of amorphous pharmaceuticals, part III: Is maximum solubility advantage experimentally attainable and sustainable? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013; 100(10): 4349-4356.
- Ngai KL, Magill JH, Plazek DJ. Flow, diffusion and crystallization of supercooled liquids: revisited. *J Chem Phys.* 2000; 112(4): 1887-1892.
- O'Toole PW, Claesson MJ, Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly, *International Dairy Journal* 2010; 20: 281-291.
- Ozeki T, Yuasa H, Kanaya Y. Controlled release from solid dispersion composed of poly (ethylene oxide)–Carbopol Ò interpolymer complex with various cross-linking degrees of Carbopol Ò, *J. Controlled Release* 2000; 63: 287–295.
- Paaver U, Heinamaki J, Laidmae I, Lust A, Kozlova J, Sillaste E, Kirsimae K, Veski P, Kogermann K. Electrospun nanofibers as a potential controlled-release solid dispersion system for poorly water-soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 2015; 479: 252-260.

- Penders J, Thijs C, Vink C, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; 118: 511–521.
- Scully BE: Metronidazole. *Med Clin North Am* 1988; 72: 623.
- Sekiguchi K, Obi N, Studies on absorption of eutectic mixture. I. A comparison of the behavior of eutectic mixture of sulfathiazole and that of ordinary sulfathiazole in man, *Chem. Pharm. Bull.* 1961; 9: 866–872.
- Serajuddin AT. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *J Pharm Sci.* 1999; 88(10): 1058-66.
- Shah, S. Maddineni, J. Lu, M.A. Repka, Melt extrusion with poorly soluble drugs, *Int. J. Pharm.* (2012)
- Sousa T, Paterson R, Moore V, Carlsson A, Abrahamsson B, Basit AW, The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs, *International Journal of Pharmaceutics* 2008; 363: 1-25.
- Sousa T, Yadav V, Zann V, Borde A, Abrahamsson B, Basit AW. On the colonic bacterial metabolism of azo-bonded prodrugs of 5-aminosalicylic acid *J Pharm Sci.* 2014; 103(10): 3171-5.
- Strickley RG. Pediatric Oral Formulations: An updated Review of Commercially Available Pediatric Oral Formulations Since 2007. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2018; 1-31.
- Sulaiman S., G. Romanos, E. Gkolfi, K. Goumas, M. Koursari, E. Kersten, U. Muenster, C. Reppas, M. Vertzoni. Fecal material for evaluating age related differences in bacterial degradation of drugs in the lower intestine? An exploratory study with olsalazine. *EUFEPS Annual Meeting 2018: Crossing Barriers for Future Medicines* (2018)
- Tanaka N, Imai K, Okimoto K, Ueda S, Tokunaga Y, Ibuki Higaki R, Kimura T, Development of novel sustained-release system, disintegration-controlled matrix tablet (DCMT) with solid dispersion granules of nilvadipine (II): in vivo evaluation, *J. Controlled Release.* 2006; 112: 51–56.
- Tanioka A, Takashi M. *High-performance and speciality fibers.* Springer. 2016; 273- 283.
- Tannergen C, Bergendal A, Lennernäs H, Abrahamsson B. Toward an increased understanding of the barriers to colonic drug absorption in humans: implications for early controlled release candidate assessment. *Mol Pharm.* 2009; 6:60-73.

- Tannergren C, Borde A, Boreström C, Abrahamsson B, Lindahl A. Evaluation of an in vitro faecal degradation method for early assessment of the impact of colonic degradation on colonic absorption in humans Eur J Pharm Sci. 2014; 57: 200-6.
- Thakkar S, Misra M. Electrospun polymeric nanofibers: New horizons in drug delivery. European Journal of Pharmaceutical Sciences (2017)
- Van Drooge D, Hinrichs W, Visser M, Frijlink H, Characterization of the molecular distribution of drugs in glassy solid dispersions at the nano-meter scale, using differential scanning calorimetry and gravimetric water vapour sorption techniques, Int. J. Pharm. 2006; 310: 220–229.
- van Nimwegen FA, Penders J, Stobberingh EE. Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. J Allergy Clin Immunol 2011; 128: 948–955.
- Vasita R, Katti DS. Nanofibers and their applications in tissue engineering. Int. J. Nanomed., 2006; 1: 15-30.
- Verreck G, Chun I, Peeters J, Rosenblatt J, Brewster ME. Preparation and Characterization of Nanofibers Containing Amorphous Drug Dispersions Generated by Electrostatic Spinning. Pharm Res. 2003; 20: 810-817.
- Vertzoni M, Carlsson A, Abrahamsson B, Goumas K, Reppas C. Degradation kinetics of metronidazole and olsalazine by bacteria in ascending colon and in feces of healthy adults. Int J Pharm 2011; 413(1-2): 81-6.
- Vertzoni M, Kersten E, van der Mey D, Muenster U, Reppas C. Evaluating the clinical importance of bacterial degradation of therapeutic agents in the lower intestine of adults using adult fecal material. Eur J Pharm Sci. 2018; 125(1): 142-150.
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. Science 2011; 334: 105–108.
- Yadav V, Gaisford S, Merchant HA, Basit AW. Colonic bacterial metabolism of corticosteroids. Int J Pharm. 2013; 457(1): 268-74.
- Zajc N, Obreza A, Bele M, Srcic S, Physical properties and dissolution behaviour of nifedipine/mannitol solid dispersions prepared by hot melt method, Int. J. Pharm. 2005; 291: 51–58.

Ηλεκτρονικές Διευθύνσεις:

- <https://www.intecpharma.com/technology/>

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ**

### **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι**

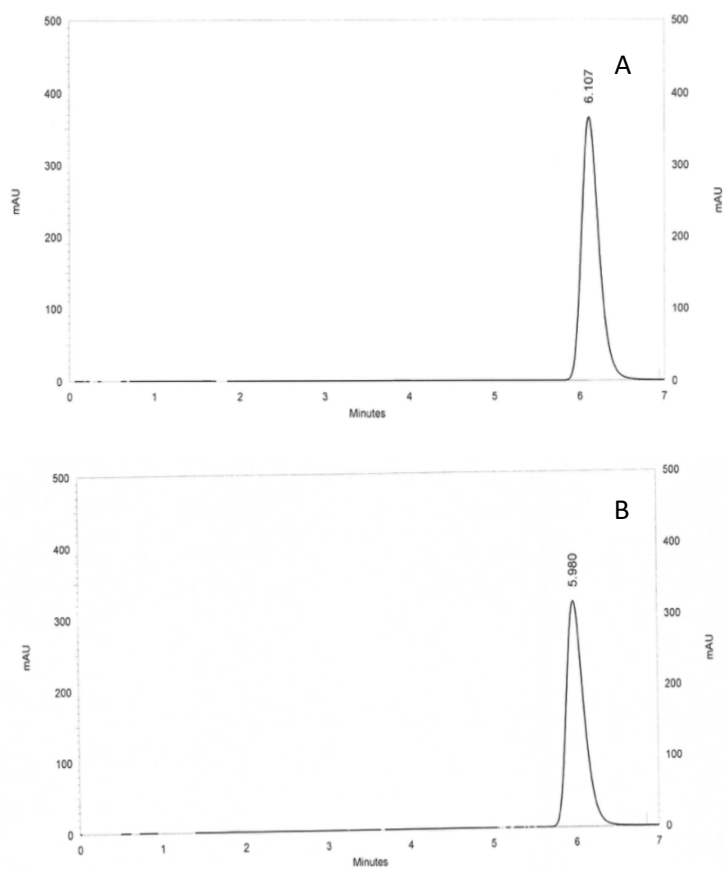
*Αναλυτικές τεχνικές*



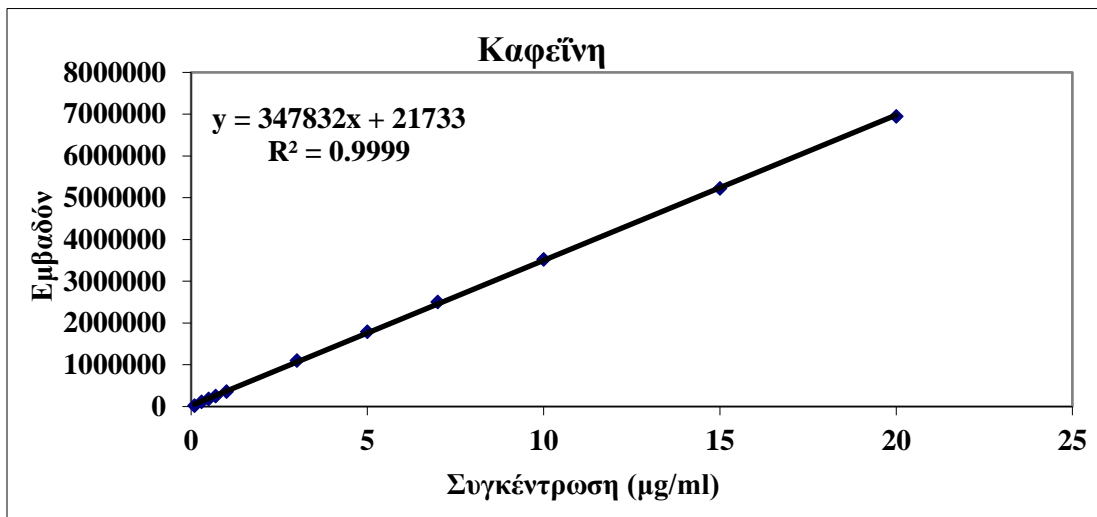
### *ΠΙ. 1 Καφεΐνη*

#### *Χρωματογραφικές Συνθήκες*

Οι αναλύσεις πραγματοποιούνται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με χρωματογραφική στήλη C<sub>18</sub> (150 × 3,0 mm ID, 5μm) Fortis™. Η ανάλυση πραγματοποιείται σε ισοκρατικές συνθήκες. Η κινητή φάση αποτελείται από νερό βαθμού καθαρότητας HPLC και μεθανόλη (MeOH) βαθμού καθαρότητας HPLC σε αναλογία 30:70 v/v. Η ανάλυση διεξάγεται σε θερμοκρασία δωματίου με ροή 0,5 mL/min. Ο όγκος δείγματος είναι 50 μL και η ανίχνευση πραγματοποιείται στο υπεριώδες (UV) 270 nm. Ο χρόνος έκλουσης είναι περίπου στα 6 min και το όριο ποσοτικοποίησης είναι 0,1 μg/mL. Το όριο ποσοτικοποίησης είναι 100 ng/mL. Στο Σχήμα ΠΙ.1 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα και στο Σχήμα ΠΙ.2 παρουσιάζεται ενδεικτικά μία καμπύλη αναφοράς της καφεΐνης σε κινητή φάση, η οποία κατασκευαζόταν πριν από κάθε πείραμα διάλυσης.



**Σχήμα ΠΙ.1:** A: Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος καφεΐνης (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) σε κινητή φάση, B: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης καφεΐνης 15 min από την έναρξη του πειράματος διάλυσης



**Σχήμα ΠΙ.2:** Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της καφεΐνης

#### *Κατασκευή καμπύλης αναφοράς*

Ζυγίζονται 10 mg καφεΐνης, μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστίθεται απιονισμένο νερό. Το διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 100 μg/mL και αποτελεί το διάλυμα παρακαταθήκης. Τα πρότυπα, που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και έχουν συγκέντρωση από 3 μg/mL έως 20 μg/mL, παρασκευάζονται με ανάμιξη του διαλύματος παρακαταθήκης καφεΐνης (100 μg/mL) και της κινητής φάσης με βάση τον Πίνακα ΠΙ.1. Αντιθέτως, τα πρότυπα, που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και έχουν συγκέντρωση από 0,1 μg/mL έως 1 μg/mL, παρασκευάζονται με ανάμιξη του διαλύματος καφεΐνης 10 μg/mL και της κινητής φάσης με βάση τον Πίνακα ΠΙ.1.

**Πίνακας ΠΙ.1:** Συγκέντρωση πρότυπων διαλυμάτων καφεΐνης για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

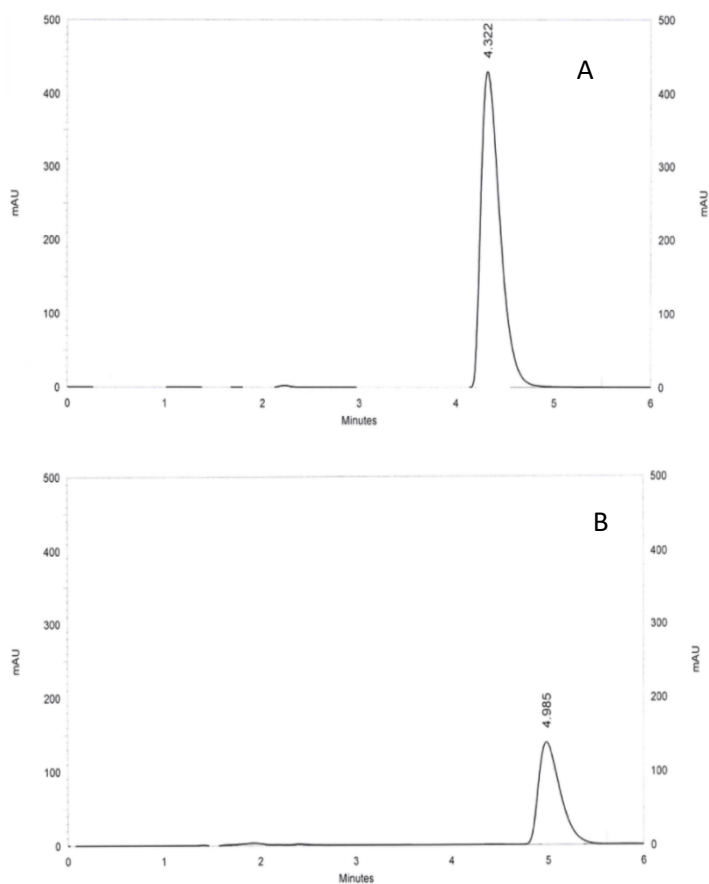
| Συγκέντρωση Καφεΐνης (μg/mL) | Όγκος διαλύματος παρακαταθήκης Καφεΐνης (100 μg/mL) (μL) | Όγκος διαλύματος Καφεΐνης (10 μg/mL) (μL) | Όγκος κινητής φάσης (μL) |
|------------------------------|--|---|--------------------------|
| 0,1                          | -  | 10  | 990                      |
| 0,3                          | -  | 30  | 970                      |
| 0,5                          | -  | 50  | 950                      |
| 0,7                          | -  | 70  | 930                      |
| 1                            | -  | 100                                       | 900                      |
| 3                            | 30   | -   | 970                      |
| 5                            | 50   | -   | 950                      |
| 7                            | 70   | -   | 930                      |
| 10                           | 100  | -   | 900                      |
| 15                           | 150  | -   | 850                      |
| 20                           | 200  | -   | 800                      |

### ΠΙ. 2 Ρανιτιδίνη

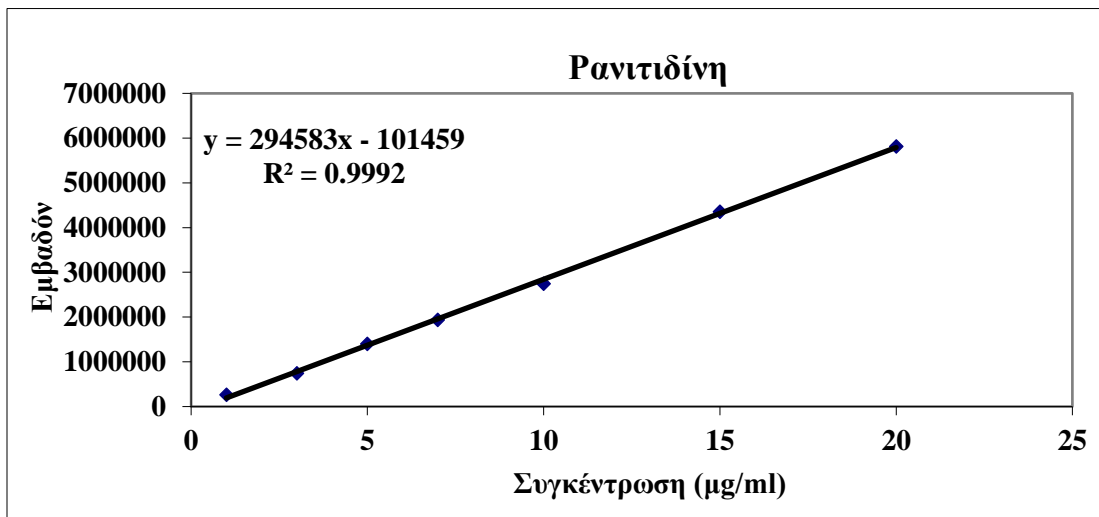
#### Χρωματογραφικές Συνθήκες

Οι αναλύσεις πραγματοποιούνται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με χρωματογραφική στήλη C<sub>18</sub> (150 × 3,0 mm ID, 5μm) Fortis™. Η ανάλυση πραγματοποιείται σε ισοκρατικές συνθήκες. Η κινητή φάση αποτελείται από μυρμηκικό αμμώνιο 10 mM (pH 4,7), που παρασκευάστηκε διαλύοντας συγκεκριμένη ποσότητα μυρμηκικού αμμωνίου σε νερό καθαρότητας HPLC και ακετονιτρίλιο (ACN) βαθμού καθαρότητας HPLC σε αναλογία 90:10 v/v. Η ανάλυση διεξάγεται σε θερμοκρασία

δωματίου με ροή 0,5 mL/min. Ο όγκος δείγματος είναι 50  $\mu$ L και η ανίχνευση πραγματοποιείται στο υπεριώδες (UV) 230 nm. Ο χρόνος έκλουσης είναι περίπου στα 9 min και το όριο ποσοτικοποίησης είναι 1  $\mu$ g/mL. Το όριο ποσοτικοποίησης είναι 1000 ng/mL. Στο Σχήμα ΠΙ.3 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα και στο Σχήμα ΠΙ.4 παρουσιάζεται ενδεικτικά μία καμπύλη αναφοράς της ρανιτιδίνης σε κινητή φάση, η οποία κατασκευαζόταν πριν από κάθε πείραμα διάλυσης.



**Σχήμα ΠΙ.3:** A: Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος ρανιτιδίνης (20  $\mu$ g/ml) σε κινητή φάση, B: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ρανιτιδίνης 30 min από την έναρξη του πειράματος διάλυσης



**Σχήμα ΠΙ.4:** Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της ρανιτιδίνης

*Κατασκευή καμπύλης αναφοράς*

Ζυγίζονται 10 mg ρανιτιδίνης, μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστίθεται απιονισμένο νερό. Το διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 100 µg/mL και αποτελεί το διάλυμα παρακαταθήκης. Τα πρότυπα, που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς παρασκευάζονται με ανάμιξη του διαλύματος παρακαταθήκης καφεΐνης (100 µg/mL) και της κινητής φάσης με βάση τον Πίνακα ΠΙ.2.

**Πίνακας ΠΙ.2:** Συγκέντρωση πρότυπων διαλυμάτων ρανιτιδίνης για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

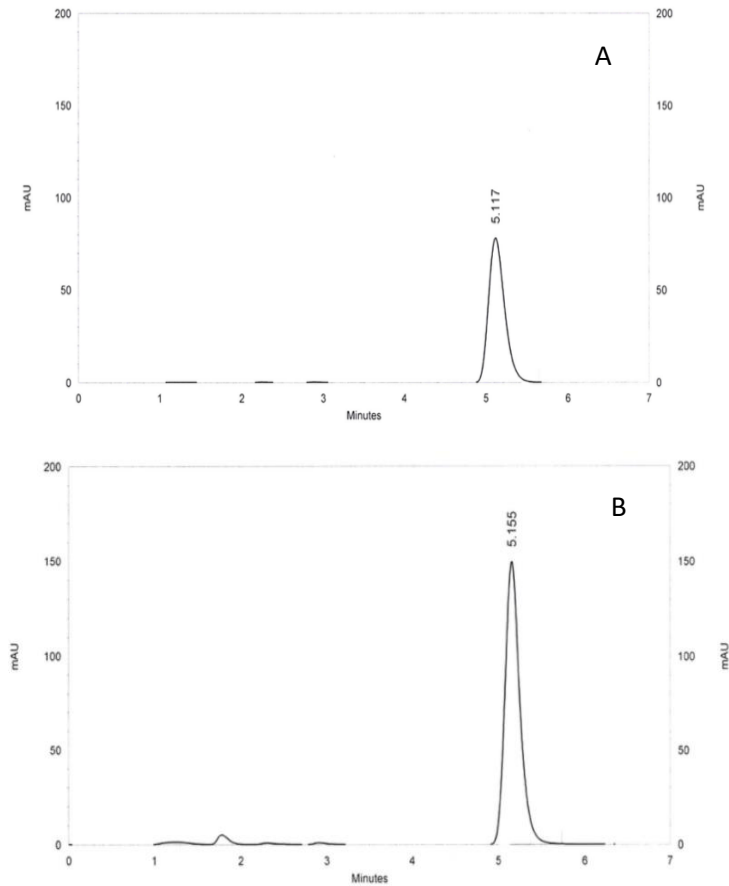
| <b>Συγκέντρωση<br/>Ρανιτιδίνης (μg/mL)</b> | <b>Όγκος διαλύματος<br/>παρακαταθήκης<br/>Ρανιτιδίνης (1 μg/mL)<br/>(μL)</b> | <b>Όγκος κινητής φάσης<br/>(μL)</b> |
|--|--|-------------------------------------|
| 1  | 10   | 990                                 |
| 3  | 30   | 970                                 |
| 5  | 50   | 950                                 |
| 7  | 70   | 930                                 |
| 10   | 100  | 900                                 |
| 15   | 150  | 850                                 |
| 20   | 200  | 800                                 |

### *ΠΙ. 3 Αλβενδαζόλη*

#### *Χρωματογραφικές Συνθήκες*

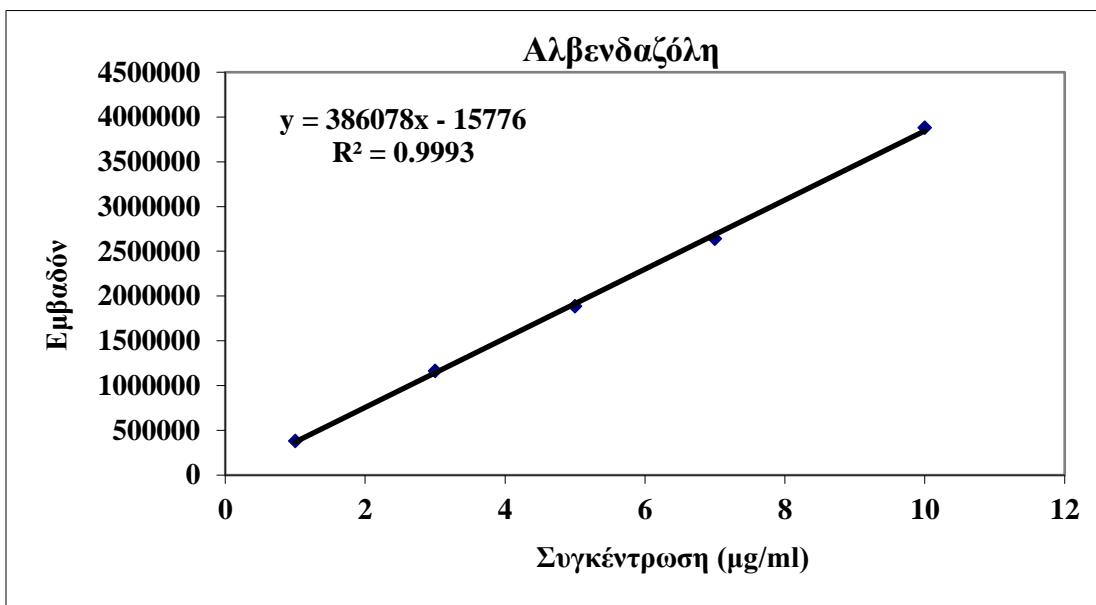
Οι αναλύσεις πραγματοποιούνται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με χρωματογραφική στήλη C<sub>18</sub> (150 × 3,0 mm ID, 5μm) Fortis™. Η ανάλυση πραγματοποιείται σε ισοκρατικές συνθήκες. Η κινητή φάση αποτελείται από μυρμηκικό αμμώνιο 50 mM, που παρασκευάστηκε διαλύοντας συγκεκριμένη ποσότητα μυρμηκικού αμμωνίου σε νερό καθαρότητας HPLC και ακετονιτρίλιο (ACN) βαθμού καθαρότητας HPLC σε αναλογία 50:50 v/v. Η ανάλυση διεξάγεται σε θερμοκρασία δωματίου με ροή 0,5 mL/min. Ο όγκος δείγματος είναι 50 μL και η ανίχνευση πραγματοποιείται στο υπεριώδες (UV) 292 nm. Ο χρόνος έκλουσης είναι περίπου στα 7 min και το όριο ποσοτικοποίησης είναι 1 μg/mL. Το όριο ποσοτικοποίησης είναι 1000 ng/mL. Στο Σχήμα ΠΙ.5 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα και στο Σχήμα ΠΙ.6 παρουσιάζεται

ενδεικτικά μία καμπύλη αναφοράς της αλβενδαζόλης σε κινητή φάση, η οποία κατασκευαζόταν πριν από κάθε πείραμα διάλυσης.



**Σχήμα ΠΙ.5:** A: Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος αλβενδαζόλης (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) σε κινητή φάση, B: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αλβενδαζόλης 45 min από την έναρξη του πειράματος διάλυσης





**Σχήμα ΠΙ.6:** Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της αλβενδαζόλης

*Κατασκευή καμπύλης αναφοράς*

Ζυγίζονται 10 mg αλβενδαζόλης, μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και ακετονιτρίλιο. Το διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 100 μg/mL και αποτελεί το διάλυμα παρακαταθήκης. Τα πρότυπα, που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς παρασκευάζονται με ανάμιξη του διαλύματος παρακαταθήκης καφεΐνης (100 μg/mL) και της κινητής φάσης με βάση τον Πίνακα ΠΙ.3.

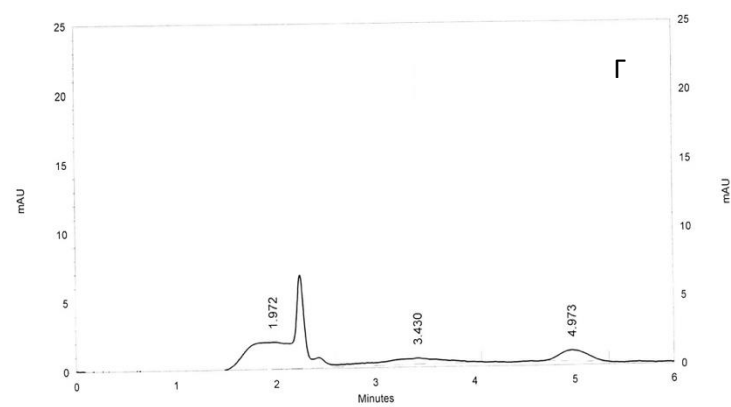
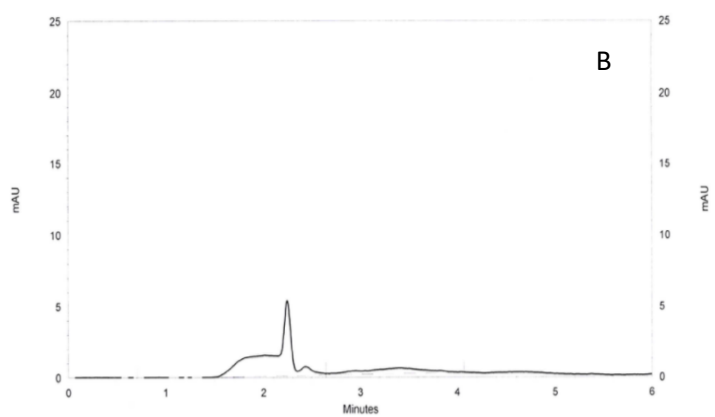
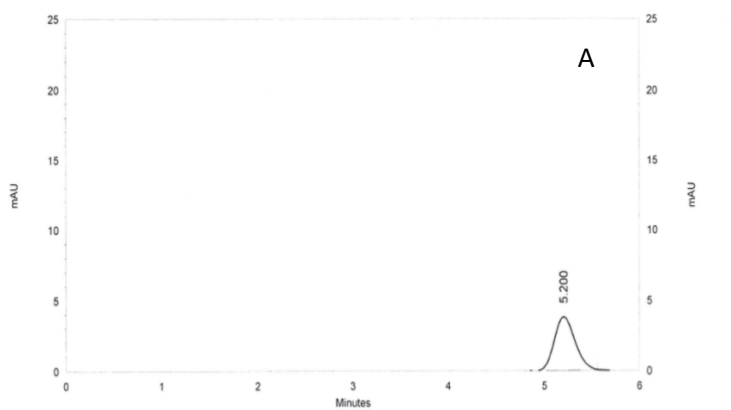
**Πίνακας ΠΙ.3:** Συγκέντρωση πρότυπων διαλυμάτων αλβενδαζόλης για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

| Συγκέντρωση<br>Αλβενδαζόλης (μg/mL) | Όγκος διαλύματος<br>παρακαταθήκης<br>Αλβενδαζόλης (1 μg/mL)<br>(μL) | Όγκος κινητής φάσης<br>(μL) |
|-------------------------------------|---|-----------------------------|
| 1                                   | 10  | 990                         |
| 3                                   | 30  | 970                         |
| 5                                   | 50  | 950                         |
| 7                                   | 70  | 930                         |
| 10                                  | 100   | 900                         |

### ΠΙ. 4 Μετρονιδαζόλη

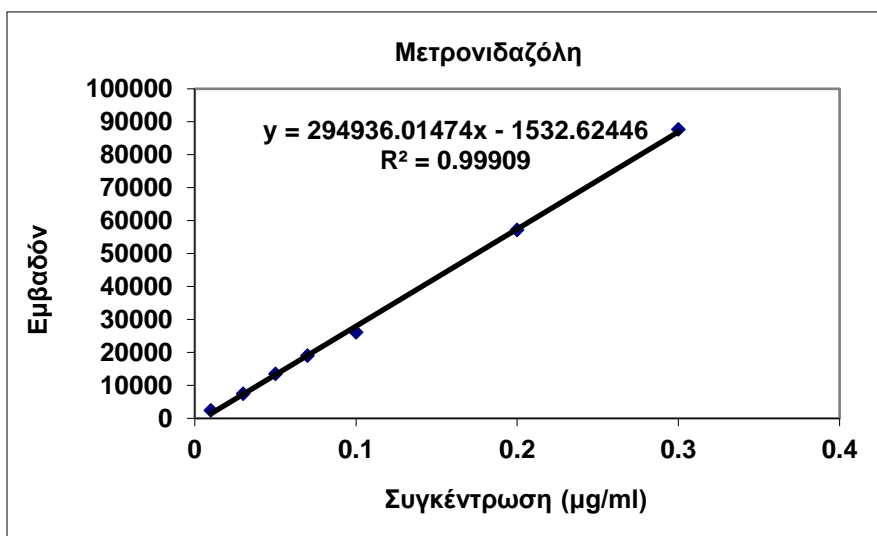
#### Χρωματογραφικές Συνθήκες

Οι αναλύσεις πραγματοποιούνται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με χρωματογραφική στήλη C<sub>18</sub> (150 × 3,0 mm ID, 5μm) Fortis™ εξοπλισμένη με μία προστήλη Hypersil BDS-C18 (10 mm × 4 mm, 5 μm). Η ανάλυση πραγματοποιείται σε ισοκρατικές συνθήκες. Η κινητή φάση αποτελείται από νερό βαθμού καθαρότητας HPLC, ακετονιτρίλιο (ACN) βαθμού καθαρότητας HPLC και μυρμηκικό οξύ σε αναλογία 90: 10: 0,1 v/v/v. Η ανάλυση διεξάγεται σε θερμοκρασία δωματίου με ροή 0,5 mL/min. Ο όγκος δείγματος είναι 20 μL και η ανίχνευση πραγματοποιείται στο υπεριώδες (UV) 318 nm. Ο χρόνος έκλουσης είναι περίπου στα 5 min και το όριο ποσοτικοποίησης είναι 0,01 μg/mL. Στο Σχήμα ΠΙ.7 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα και στο Σχήμα ΠΙ.8 παρουσιάζεται ενδεικτικά μία καμπύλη αναφοράς της μετρονιδαζόλης σε κινητή φάση, η οποία κατασκευαζόταν πριν από κάθε πείραμα διάλυσης.



**Σχήμα ΠΙ.7:** Α: Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μετρονιδαζόλης (0,3 μg/ml) σε κινητή φάση, Β: Ενδεικτικό χρωματογράφημα δείγματος υλικού από κόπρανα

παιδιού 1, Γ: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα (παιδί 1) 5 min από την έναρξη του πειράματος



**Σχήμα III.8:** Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα

#### *Διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας μετρονιδαζόλης*

Ζυγίζονται 10 mg μετρονιδαζόλης, μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστίθεται απιονισμένο νερό. Το διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 100 µg/mL και αποτελεί το διάλυμα παρακαταθήκης. Το διάλυμα εργασίας έχει συγκέντρωση 1 µg/mL. Επομένως, σε 100 µL του παραπάνω διαλύματος προστίθενται 900 µL κινητής φάσης (H<sub>2</sub>O: ακετονιτρίλιο: μυρμηκικό οξύ 90: 10: 0,1 v/v/v) και μετά από ανάδευση προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 10 µg/mL. Από αυτό το διάλυμα λαμβάνονται 100 µL, προστίθενται 900 µL κινητής φάσης και μετά από ανάδευση προκύπτει διάλυμα που έχει συγκέντρωση 1 µg/mL.

#### *Κατασκευή καμπύλης αναφοράς*

Η ποσοτικοποίηση της μετρονιδαζόλης σε όλα τα δείγματα που προέκυψαν από τα πειράματα σταθερότητας έγινε με καμπύλη αναφοράς. Για την ποσοτικοποίηση των

δεδομένων, καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε από πρότυπα διαλύματα που είχαν παρασκευαστεί σε κινητή φάση. Έχει βρεθεί ότι τα χαρακτηριστικά της καμπύλης αναφοράς σε υλικό από κόπρανά δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από αυτά που λαμβάνονται όταν χρησιμοποιηθεί κινητή φάση (Vertzoni et al. 2011). Τα πρότυπα, που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, παρασκευάζονται με ανάμιξη του διαλύματος εργασίας μετρονιδαζόλης (1 µg/mL) και της κινητής φάσης με βάση τον Πίνακα ΠΙ.4.

**Πίνακας ΠΙ.4:** Συγκέντρωση πρότυπων διαλυμάτων μετρονιδαζόλης για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

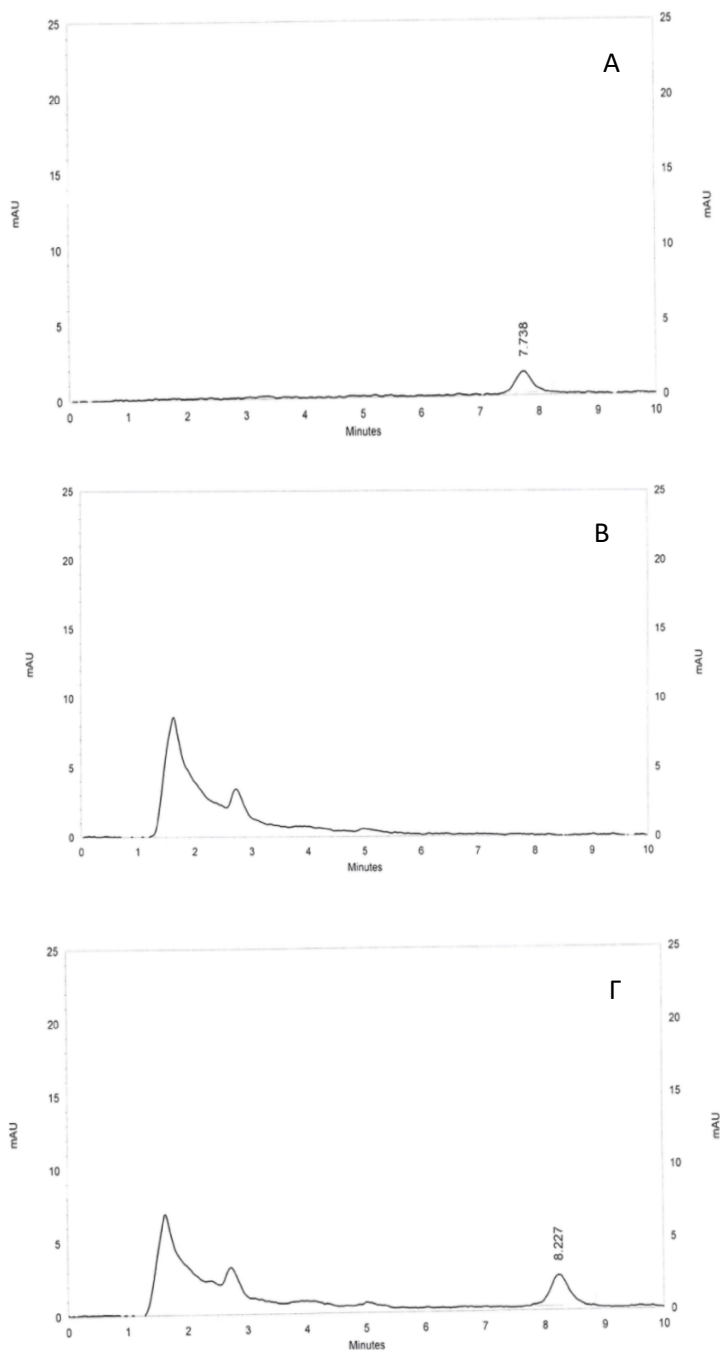
| Συγκέντρωση<br>Μετρονιδαζόλης (µg/mL) | Όγκος διαλύματος<br>εργασίας Μετρονιδαζόλης<br>(1 µg/mL) (µL) | Όγκος κινητής φάσης<br>(µL) |
|---------------------------------------|---|-----------------------------|
| 0,01                                  | 10  | 990                         |
| 0,03                                  | 30  | 970                         |
| 0,05                                  | 50  | 950                         |
| 0,07                                  | 70  | 930                         |
| 0,1                                   | 100   | 900                         |
| 0,2                                   | 200   | 800                         |
| 0,3                                   | 300   | 700                         |

### ΠΙ. 5 Ολσαλαζίνη

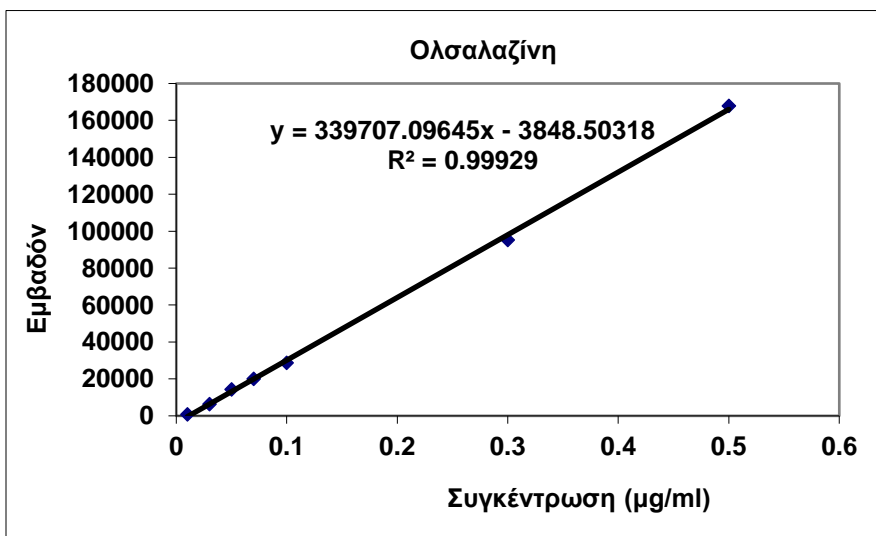
#### Χρωματογραφικές Συνθήκες

Οι αναλύσεις πραγματοποιούνται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με χρωματογραφική στήλη C<sub>18</sub> (150 × 3,0 mm ID, 5µm) Fortis™ εξοπλισμένη με μία προστήλη Hypersil BDS-C18 (10 mm × 4 mm, 5 µm). Η ανάλυση πραγματοποιείται σε ισοκρατικές συνθήκες. Η κινητή φάση αποτελείται από νερό βαθμού καθαρότητας

HPLC, ακετονιτρίλιο (ACN) βαθμού καθαρότητας HPLC και τριφθοροξικό οξύ σε αναλογία 55: 45: 0,1 v/v/v. Η ανάλυση διεξάγεται σε θερμοκρασία δωματίου με ροή 0,5 mL/min. Ο όγκος δείγματος είναι 50  $\mu$ L και η ανίχνευση πραγματοποιείται στο υπεριώδες (UV) 365 nm. Ο χρόνος έκλουσης είναι περίπου στα 10 min και το όριο ποσοτικοποίησης είναι 0,01  $\mu$ g/mL. Στο Σχήμα ΠΙ.9 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα και στο Σχήμα ΠΙ.10 παρουσιάζεται ενδεικτικά μία καμπύλη αναφοράς της ολσαλαζίνης σε κινητή φάση, η οποία κατασκευαζόταν πριν από κάθε πείραμα διάλυσης.



**Σχήμα ΠΙ.9:** Α: Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος ολσαλαζίνης (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) σε κινητή φάση, Β: Ενδεικτικό χρωματογράφημα δείγματος υλικού από κόπρανα παιδιού 1, Γ: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα (παιδί 1) 10 min από την έναρξη του πειράματος



**Σχήμα ΠΙ.10:** Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα

#### *Διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας ολσαλαζίνης*

Ζυγίζονται 10 mg ολσαλαζίνης, τα οποία μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστίθεται απιονισμένο νερό. Το διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 100 µg/mL. Το διάλυμα εργασίας έχει συγκέντρωση 1 µg/mL. Επομένως, σε 100 µL του παραπάνω διαλύματος προστίθενται 900 µL κινητής φάσης (H<sub>2</sub>O: ακετονιτρίλιο: τριφθοροξικό οξύ 55: 45: 0,1 v/v/v) και μετά από ανάδευση, προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 10 µg/mL. Από αυτό το διάλυμα λαμβάνονται 100 µL, προστίθενται 900 µL κινητής φάσης και μετά από ανάδευση προκύπτει διάλυμα που έχει συγκέντρωση 1 µg/mL.

#### *Κατασκευή καμπύλης αναφοράς*

Η ποσοτικοποίηση της ολσαλαζίνης σε όλα τα δείγματα που προέκυψαν από τα πειράματα σταθερότητας έγινε με καμπύλη αναφοράς. Για την ποσοτικοποίηση των δεδομένων, καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε από πρότυπα διαλύματα που είχαν παρασκευαστεί σε κινητή φάση. Έχει βρεθεί ότι τα χαρακτηριστικά της καμπύλης



αναφοράς σε υλικό από κόπρανα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από αυτά που λαμβάνονται όταν χρησιμοποιηθεί κινητή φάση (Vertzoni et al. 2011). Τα πρότυπα, που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, παρασκευάζονται με ανάμιξη του διαλύματος εργασίας ολσαλαζίνης (1 µg/mL) και της κινητής φάσης με βάση τον Πίνακα ΠΙ.6.

**Πίνακας ΠΙ.6:** Συγκέντρωση πρότυπων διαλυμάτων ολσαλαζίνης για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

| Συγκέντρωση<br>Ολσαλαζίνης (µg/mL) | Όγκος διαλύματος<br>εργασίας Ολσαλαζίνης (1<br>µg/mL) (µL) | Όγκος κινητής φάσης<br>(µL) |
|------------------------------------|--|-----------------------------|
| 0,01                               | 10   | 990                         |
| 0,03                               | 30   | 970                         |
| 0,05                               | 50   | 950                         |
| 0,07                               | 70   | 930                         |
| 0,1                                | 100  | 900                         |
| 0,3                                | 300  | 700                         |
| 0,5                                | 500  | 500                         |

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ**

*Αντίγραφο της άδειας για την πραγματοποίηση της μελέτης αποικοδόμησης φαρμάκων σε υλικό από κόπρανα νηπίων*



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικών και Καποδιστριακών  
Πανεπιστήμιων Αθηνών

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
Πανεπιστημιόπολη, Ζωγράφου, Ζωγράφου 157 71

Αθήνα, 5-10-2018

Προς τη Γραμματεία του Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Θέμα: Έγκριση πρωτοκόλλου πειραματισμού

Τα παρακάτω υπογράφοντα μέλη της Επιτροπής Βιοηθικής του Τμήματος Φαρμακευτικής, συνεδρίασαν την Παρασκευή 5-10-2018 με θέμα την από 6-9-2018 (Αρ. πρωτ. 23/06-09-18) αίτηση του Καθηγητή κ. Χ. Ρέππα για έγκριση μελέτης με τίτλο «Σταθερότητα δραστικών συστατικών σε υλικό που έχει παρασκευαστεί από κόπρανα παιδιών ηλικίας 2-5 ετών» στο Τμήμα Φαρμακευτικής.  
Μετά από έλεγχο του πρωτοκόλλου και των επισυναπτόμενων εγγράφων, κρίνουν ότι πληροί τις προϋποθέσεις έγκρισης.

Με τιμή,

Αγγελική Κουρουνάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Νικόλαος Δρακούλης, Επίκουρος Καθηγητής

Νεκτάριος Αλιγιάννης, Επίκουρος Καθηγητής

Μαρία Βερτζιώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια

### **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ**

*Ερωτηματολόγιο που απαντήθηκε από γονείς υποψηφίων νηπίων*



**Εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων  
σε υλικό από κόπρανα υγιών παιδιών ηλικίας 2-5 ετών**

Όνοματεπώνυμο παιδιού: -----

Όνοματεπώνυμο γονέα: -----

Τηλέφωνο: -----

Ημερομηνία: ----- - ----- - -----

**ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ**

1. Ποια είναι η ηλικία του παιδιού σας, ποιο είναι το βάρος του και ποιο το ύψος του;

ετών

kg

m

2. Έχει ή είχε στο παρελθόν κάποιο γαστρεντερολογικό πρόβλημα;

Ναι

Όχι

3. Έχει ή είχε στο παρελθόν κάποιο χρόνια πρόβλημα υγείας (π.χ. από το καρδιαγγειακό σύστημα, το θυρεοειδή, το πάγκρεας ή το ήπαρ);

Ναι

Όχι

Πως αντιμετωπίστηκε;

4. Έχει υποβληθεί σε κάποια σημαντική χειρουργική επέμβαση;

Ναι

Όχι

5. Τι φάρμακα έχει καταναλώσει τις τελευταίες 30 μέρες;

6. Παίρνει συνταγογραφούμενα φάρμακα;  Ναι  Όχι

Αν ναι ποια;

---

7. Έχει κάνει χρήση αντιβιοτικού μέσα στους τελευταίους 6 μήνες;  Ναι  Όχι

---

8. Έχει κάνει χρήση κάποιου καθαρτικού την τελευταία εβδομάδα;  Ναι  Όχι

---

9. Παίρνει μη συνταγογραφούμενα φάρμακα;  Ναι  Όχι

Αν ναι ποια και πόσο συχνά;

---

10. Κάνει χρήση συμπληρωμάτων διατροφής ή άλλων σκευασμάτων τον τελευταίο μήνα;

Αν ναι, ποια; (Περιέχουν προβιοτικά ή/και πρεβιοτικά);  Ναι  Όχι

---

11. Είναι σε θέση να απέχει από την κατανάλωση συνταγογραφούμενων και μη συνταγογραφούμενων φαρμάκων τουλάχιστον για 3 ημέρες;  Ναι  Όχι

12. Είναι το παιδί σασαποκλειστικά χορτοφάγο;  Ναι  Όχι

13. Έχει αποκλείσει κάποια σημαντική ομάδα τροφίμων (κρέας, γαλακτοκομικά, φρούτα, λαχανικά κ.τ.λ.) από το διαιτολόγιό σας;  Ναι  Όχι

Αν ναι, ποια;

---

14. Έχει πάρει πρόσφατα μέρος σε κάποια μελέτη που περιλαμβάνει φάρμακα;

Ναι

Όχι

15. Έχει σταθερές εντερικές συνήθειες όσον αφορά στην συχνότητα των κενώσεων;

Ναι








Όχι

Πόσες κενώσεις έχει την ημέρα κατά μέσο όρο;

16. Τι τύπου ήταν τα κόπρανά του τον τελευταίο μήνα βάσει την εικόνα;

---

*Εικόνα: Κλίμακα Bristol για τον τύπο των κοπράνων.*

| Περιγραφή   |   |
|---|---|
| Τύπος 1    | Μικρά σκληρά κομμάτια με μέγεθος παρόμοιο με ξηρούς καρπούς (δύσκολα περνούν) |
| Τύπος 2    | Σχήμα παρόμοιο με λουκάνικο αλλά σε σχήμα σβώλου                              |
| Τύπος 3  | Σαν λουκάνικο αλλά με ρωγμές στην επιφάνεια                                   |
| Τύπος 4  | Σαν λουκάνικο ή φίδι, λείο και μαλακό   |
| Τύπος 5  | Μαλακή άμορφη μάζα με διαμορφωμένα όρια (περνά εύκολα)                        |
| Τύπος 6  | Κομμάτια με επιφάνεια σχεδόν χνουδωτή με τραχιά όρια, πολτώδη κόπρανα         |
| Τύπος 7  | Υδαρή κόπρανα χωρίς στερεά κομμάτια   |

**Παρατηρήσεις**

---

---

---

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV**

*Δήλωση συγκατάθεσης γονέα για την συλλογή κοπράνων νηπίων*





**Εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων  
σε υλικό από κόπρανα υγιών παιδιών ηλικίας 2-5 ετών**

**ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΓΟΝΕΑ  
ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΟΥ ΠΑΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ**

Ερευνητές

Χ. Ρέππας, Ph.D., Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μ. Βερτζώνη, Ph.D., Επικ. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και  
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ι. Ρωμανός, Μεταπτυχιακός Φοιτητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και  
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

*Καλείστε να επιτρέψετε στο παιδί σας να συμμετάσχει σε μια μελέτη που περιλαμβάνει τη συλλογή κοπράνων σε πλαστικό περιέκτη. Πριν αποφασίσετε για τη συμμετοχή του παιδιού σας, είναι σημαντικό να κατανοήσετε το σκοπό, καθώς και τι περιλαμβάνει η μελέτη. Ρωτήστε μας, εάν δεν καταλαβαίνετε κάτι ή αν επιθυμείτε περισσότερες πληροφορίες. Αφιερώστε χρόνο πριν αποφασίσετε, για το εάν θέλετε να επιτρέψετε τη συμμετοχή του παιδιού σας στη διαδικασία επιλογής εθελοντών και, στην περίπτωση που επιλεγεί, να συμμετάσχει στη μελέτη.*

Ποιος είναι ο σκοπός της μελέτης;

Πολλά φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα έχουν στόχο την αποδέσμευση της δραστικής ουσίας στο παχύ έντερο. Στον αυλό του παχέος εντέρου υπάρχει πληθώρα βακτηρίων που αποτελεί τη φυσιολογική μικροχλωρίδα. Τα βακτήρια μέσω του μεταβολισμού τους μπορούν να διασπάσουν/ αποικοδομήσουν την δραστική ουσία.

Ο στόχος της μελέτης είναι η συσχέτιση της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων σε υλικό από ανθρώπινα κόπρανα υγιών παιδιών (ηλικίας 2-5 ετών) σε σχέση με αυτά που έχουν ήδη γίνει γνωστά χρησιμοποιώντας υλικό από ανθρώπινα κόπρανα υγιών ενηλίκων και υγιών παιδιών (ηλικίας 6-11 ετών).

Γιατί έχω κληθεί να συμμετάσχω και ποια είναι η διαδικασία;

Ανταποκριθήκατε εθελοντικά σε μια πρόσκληση, σύμφωνα με την οποία ζητούνται υγιή παιδιά (ηλικίας 2-5 ετών) για τη συγκεκριμένη μελέτη. Αρχικά, θα υποβληθείτε σε συνέντευξη, που στόχο έχει να εκτιμηθεί αδρά η υγεία του παιδιού σας σε σχέση με τα κριτήρια επιλογής και αποκλεισμού συμμετοχής στην παρούσα μελέτη, που παρουσιάζονται πιο κάτω:

### *Κριτήρια συμμετοχής*

Το παιδί πρέπει να:

- i. Είναι πρόθυμο να παρέχει κόπρανα για τους σκοπούς της μελέτης, όπως θα αποδεικνύεται από γραπτή δήλωση συγκατάθεσης
- ii. Είναι ηλικίας 2-5 ετών με σωματικό βάρος όχι πέραν του  $\pm 20\%$  του ιδανικού βάρους του, όπως αυτό καθορίζεται από τους πίνακες Metropolitan
- iii. Ανήκει στην λευκή φυλή
- iv. Τρέφεται κυρίως με Μεσογειακή διατροφή (ελαιόλαδο, ψάρι, κρέας, γαλακτοκομικά προϊόντα, όσπρια, φρούτα, λαχανικά κ.α)
- v. Δεν έχει κάνει χρήση αντιβιοτικού φαρμάκου τους τελευταίους 6 μήνες τουλάχιστον (Sousa et al. 2014)
- vi. Δεν έχει κάνει χρήση προβιοτικών ή/και πρεβιοτικών [συμπληρώματα διατροφής, λειτουργικά τρόφιμα (functional foods) κ.α.] τις τελευταίες 30 ημέρες τουλάχιστον (De Angelis et al. 2013)
- vii. Δεν έχει κάνει χρήση φαρμάκων τα οποία επηρεάζουν τη λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος για διάστημα 7 ημερών πριν τη μελέτη (Mastromarinoetal. 1978)
- viii. Έχει συνηθισμένες εντερικές συνήθειες τον τελευταίο μήνα και τα κόπρανα να είναι Τύπου 2, 3, ή 4 σύμφωνα με την κλίμακα Bristol (Παράρτημα I) (Lewis and Heaton 1997)

### *Κριτήρια αποκλεισμού*

- i. Ύπαρξη σοβαρού προβλήματος υγείας (π.χ. καρδιαγγειακού, παγκρεατικού, ηπατικού, θυροειδικού κ.λ.π.) ή/και χρόνιων παθήσεων, τα οποία απαιτούν μακρόχρονη χρήση συνταγογραφούμενων φαρμάκων

- ii. Δεν αποκλείεται από το διαιτολόγιο του παιδιού κάποια σημαντική ομάδα τροφίμων (π.χ. είναι χορτοφάγο, αποφεύγει κατανάλωση χοιρινού κρέατος, αποφεύγει γαλακτοκομικά προϊόντα, αποφεύγει φρούτα ή/και λαχανικά)
- iii. Ιστορικό γαστρεντερικού προβλήματος
- iv. Οι εντερικές συνήθειες παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση από την άποψη της συχνότητας και του τύπου των κοπράνων

Εάν το παιδί σας επιλεγεί, εξαρτάται από εσάς, αν το παιδί σας θα συμμετάσχει ή όχι. Μετά την συνέντευξη και την επιλογή του θα πρέπει να υπογράψετε την παρούσα δήλωση συγκατάθεσης. Εάν αποφασίσετε να λάβει μέρος, είναι ελεύθερο να αποχωρήσει οποιαδήποτε στιγμή χωρίς να εξηγήσετε τους λόγους. Για την ολοκλήρωση της μελέτης είναι απαραίτητη η συμμετοχή 6 παιδιών. Οι ερευνητές δεν πληρώνονται για να σας συμπεριλάβουν στη μελέτη. Δεν πρόκειται να αποζημιωθείτε για τη συμμετοχή σας στη μελέτη.

Τι θα συμβεί, αν λάβω μέρος;

Πρέπει να επισκεφθείτε μαζί με το παιδί σας το Τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και να συλλέξετε σε προζυγισμένους πλαστικούς περιέκτες την πρώτη κένωση της ημέρας. Ο λόγος που η συλλογή θα πρέπει να γίνει στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών είναι, ότι θα πρέπει όσο το δυνατόν συντομότερα τα κόπρανα να τοποθετηθούν σε αναερόβια ατμόσφαιρα προκειμένου τα αναερόβια βακτήρια της φυσιολογικής μικροχλωρίδας να διατηρήσουν τις ζωτικές τους λειτουργίες.

Τα κόπρανα θα χρησιμοποιηθούν αποκλειστικά για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης. Τα κόπρανα δεν θα χρησιμοποιηθούν για κανένα άλλο λόγο.

Ποια είναι τα πιθανά οφέλη από τη συμμετοχή σας;

Δεν πρόκειται να έχετε κάποιο προσωπικό όφελος ούτε εσείς ούτε το παιδί σας από τη συμμετοχή του στην παρούσα μελέτη. Με την παρούσα συγκατάθεσή σας, οι ερευνητές

θα έχουν την αποκλειστική κυριότητα των αποτελεσμάτων της έρευνας. Τα αποτελέσματα της έρευνας θα γίνουν διαθέσιμα στην επιστημονική κοινότητα μέσω επιστημονικών δημοσιεύσεων.

Η συμμετοχή μου στην έρευνα θα παραμείνει μυστική;

Όλες οι πληροφορίες, οι οποίες θα συλλεχθούν σχετικά με εσάς και το παιδί σας κατά τη διάρκεια του ερευνητικού προγράμματος, θα παραμείνουν αυστηρά εμπιστευτικές. Η μόνη πιθανότητα εμφάνισης των προσωπικών σας δεδομένων είναι αν ζητηθούν νομικά και μόνο αν η Ελληνική Ανεξάρτητη Αρχή για την Προστασία Προσωπικών Δεδομένων συμφωνήσει σχετικά.

Κάθε πληροφορία σχετική με εσάς και το παιδί σας, δε θα φέρει το όνομα ή τη διεύθυνσή σας έτσι, ώστε να μην μπορείτε να αναγνωριστείτε από αυτήν. Για προστασία της ανωνυμίας σας, τα κόπρανά του παιδιού σας και κάθε προσωπικό δεδομένο που θα γίνει γνωστό στους ερευνητές πλαίσια της συνέντευξης θα επισημαίνεται μόνο με τον αριθμό του παιδιού και όχι το ονοματεπώνυμό του. Μόνο οι ερευνητές θα έχουν αντιστοιχία του αριθμού με το ονοματεπώνυμό του.

Τι θα γίνουν τα αποτελέσματα της έρευνας;

Ελπίζουμε να δημοσιεύσουμε τα αποτελέσματα, έτσι ώστε όσο το δυνατόν περισσότερα ευρήματα να γίνουν διαθέσιμα στην επιστημονική κοινότητα. Η χρονική στιγμή της δημοσίευσης εξαρτάται, κυρίως, από την ταχύτητα συλλογής των δεδομένων και δεν μπορεί να προβλεφθεί με σιγουριά.

Το Ε.Κ.Π.Α. μπορεί να ζητήσει προστασία των πνευματικών δικαιωμάτων σχετικά με τα αποτελέσματα που θα προκύψουν από τα δείγματα που συλλέχθηκαν. Δεν δικαιούστε ούτε εσείς ούτε το παιδί σας κανένα οικονομικό όφελος ή μερίδιο από αυτήν την πνευματική

ιδιοκτησία. Επίσης, δεν θα έχετε ούτε εσείς ούτε το παιδί σας κανένα πνευματικό δικαίωμα στην πνευματική ιδιοκτησία που αναφέρθηκε.

Περισσότερες πληροφορίες

Χρήστος Ρέππας (Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.ΠΑ.)

Τηλέφωνο: 210 727 4678

Email: [reppas@pharm.uoa.gr](mailto:reppas@pharm.uoa.gr)

## ΦΥΛΛΟ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΓΟΝΕΑ

Όνοματεπώνυμο παιδιού: -----

Όνοματεπώνυμο γονέα: -----

|  |                          |
|--|--------------------------|
| <p><b>1.</b> Διαβεβαιώνω, ότι έχω διαβάσει και κατανοήσει πλήρως τις πληροφορίες, καθώς και τους όρους σχετικά με τη συμμετοχή του παιδιού μου στη συγκεκριμένη μελέτη όπως αυτά διατυπώνονται προηγούμενες σελίδες του παρόντος κειμένου και είχα την ευκαιρία να κάνω ερωτήσεις.</p>   | <input type="checkbox"/> |
| <p><b>2.</b> Κατανοώ, ότι η συμμετοχή του παιδιού μου είναι εθελοντική και είναι ελεύθερο να εγκαταλείψει όποια χρονική στιγμή κρίνω εγώ, χωρίς να αναφέρω το λόγο και χωρίς να επηρεαστούν τα νόμιμα δικαιώματά τόσο τα δικά μου όσο και του παιδιού μου.</p>   | <input type="checkbox"/> |
| <p><b>3.</b> Κατανοώ τις παραγράφους, στις οποίες αναφέρεται ή υπονοείται, ότι τα προσωπικά δεδομένα τόσο τα δικά μου όσο και του παιδιού μου θα γίνουν γνωστά στην ερευνητική ομάδα. Έχω διαβεβαιωθεί, ότι όλα τα δεδομένα τα οποία σχετιζόμενα με το πρόσωπό μου και το παιδί μου θα χρησιμοποιηθούν με απόλυτη μυστικότητα και δε θα δημοσιοποιηθούν.</p> | <input type="checkbox"/> |
| <p><b>4.</b> Συμφωνώ να συμμετάσχει το παιδί μου στη μελέτη.</p>   | <input type="checkbox"/> |
| <p><b>5.</b> Κατανοώ ότι το παρόν έγγραφο υπογράφεται εις διπλούν. Ένα έγγραφο θα δοθεί στον εθελοντή και ένα έγγραφο θα κρατηθεί από τον επιστημονικό υπεύθυνο (Ε.Υ.) της μελέτης για το Ε.Κ.Π.Α., Καθηγητή, Χ. Ρέππα.</p>  | <input type="checkbox"/> |

Όνοματεπώνυμο γονέα

Ημερομηνία & Υπογραφή

\_\_\_\_\_

-----

Όνοματεπώνυμο Μάρτυρα

Ημερομηνία & Υπογραφή

\_\_\_\_\_

-----








Δρ. Χ. Ρέππας

Ημερομηνία & Υπογραφή

\_\_\_\_\_

-----

Π.Ι. Πίνακας κλίμακας Bristol για κόπρανα

| Περιγραφή  |   |
|--|---|
| <p>Τύπος 1 </p> | Μικρά σκληρά κομμάτια με μέγεθος παρόμοιο με ξηρούς καρπούς (δύσκολα περνούν) |
| <p>Τύπος 2 </p> | Σχήμα παρόμοιο με λουκάνικο αλλά σε σχήμα σβώλου                              |
| <p>Τύπος 3 </p> | Σαν λουκάνικο αλλά με ρωγμές στην επιφάνεια                                   |
| <p>Τύπος 4 </p> | Σαν λουκάνικο ή φίδι, λείο και μαλακό   |
| <p>Τύπος 5 </p> | Μαλακή άμορφη μάζα με διαμορφωμένα όρια (περνά εύκολα)                        |
| <p>Τύπος 6 </p> | Κομμάτια με επιφάνεια σχεδόν χνουδωτή με τραχιά όρια, πολτώδη κόπρανα         |
| <p>Τύπος 7 </p> | Υδαρή κόπρανα χωρίς στερεά κομμάτια   |



## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V**

*Φύλλο καταγραφής γευμάτων των νηπίων από τα οποία συλλέχθηκαν κόπρανα.*

**Καταγραφή γευμάτων και της εντερικής δραστηριότητας τρεις μέρες πριν τη  
συλλογή του δείγματος**

**Όνοματεπώνυμο παιδιού** -----

**Όνοματεπώνυμο γονέα** -----

**Τηλέφωνο** -----

**Ημερομηνία (συλλογής)** ----- - ----- - -----








**ΓΕΥΜΑΤΑ**

|   |  |
|---|--|
| <p align="center"><b>Ημέρα -3</b><br/>Ημερομηνία<br/>-- - -- - --</p> | <p><i>Πρωί</i>-----</p> <p><i>Μεσημέρι</i>-----</p> <p><i>Βράδυ</i>-----</p> |
| <p align="center"><b>Ημέρα -2</b><br/>Ημερομηνία<br/>-- - -- - --</p> | <p><i>Πρωί</i>-----</p> <p><i>Μεσημέρι</i>-----</p> <p><i>Βράδυ</i>-----</p> |
| <p align="center"><b>Ημέρα -1</b><br/>Ημερομηνία<br/>-- - -- - --</p> | <p><i>Πρωί</i>-----</p> <p><i>Μεσημέρι</i>-----</p> <p><i>Βράδυ</i>-----</p> |

## ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

|   | Ώρα                              | Τύπος                            |
|---|----------------------------------|----------------------------------|
| <b>Ημέρα -3</b><br>Ημερομηνία<br>-- - - - - | -----<br>-----<br>-----<br>----- | -----<br>-----<br>-----<br>----- |
| <b>Ημέρα -2</b><br>Ημερομηνία<br>-- - - - - | -----<br>-----<br>-----<br>----- | -----<br>-----<br>-----<br>----- |
| <b>Ημέρα -1</b><br>Ημερομηνία<br>-- - - - - | -----<br>-----<br>-----<br>----- | -----<br>-----<br>-----<br>----- |

*Εικόνα 1: Κλίμακα Bristol για τους Τύπους κοπράνων.*

| Περιγραφή   |   |
|---|---|
| Τύπος 1  | Μικρά σκληρά κομμάτια με μέγεθος παρόμοιο με ξηρούς καρπούς (δύσκολα περνούν) |
| Τύπος 2  | Σχήμα παρόμοιο με λουκάνικο αλλά σε σχήμα σβώλου                              |
| Τύπος 3  | Σαν λουκάνικο αλλά με ρωγμές στην επιφάνεια                                   |
| Τύπος 4  | Σαν λουκάνικο ή φίδι, λείο και μαλακό   |
| Τύπος 5  | Μαλακή άμορφη μάζα με διαμορφωμένα όρια (περνά εύκολα)                        |
| Τύπος 6  | Κομμάτια με επιφάνεια σχεδόν χνουδωτή με τραχιά όρια, πολτώδη κόπρανα         |
| Τύπος 7  | Υδαρή κόπρανα χωρίς στερεά κομμάτια   |

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI**

*Συνθήκες και έλεγχος καλής λειτουργίας αναερόβιου θαλάμου που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας*

Στο Σχήμα ΠVI.1 παρουσιάζεται ο αναερόβιος θάλαμος (Σχήμα ΠVI.1A), ο οποίος φέρει και έναν προθάλαμο (Σχήμα ΠVI.1B), όπου τοποθετούνται τα αντικείμενα πριν εισέλθουν στο αναερόβιο περιβάλλον του θαλάμου.



**Σχήμα ΠVI.1:** Αναερόβιος Θάλαμος (A) και Προθάλαμος του αναερόβιου θαλάμου (B)

Οι συνθήκες στον αναερόβιο θάλαμο είναι (Vertzoni et al. 2011, Tannergren et al. 2014, Sousa et al. 2014):

- θερμοκρασία 37 °C
- σχετική υγρασία 70 %
- ατμόσφαιρα από 80 % v/v N<sub>2</sub>, 10 % v/v H<sub>2</sub> και 10 % v/v CO<sub>2</sub>

Η ατμόσφαιρα του θαλάμου για πιθανή ύπαρξη οξυγόνου μπορεί να ελεγχθεί από την απλή εναλλαγή του διακόπτη στον Πίνακα Ελέγχου σε "ON". Ο συγκεκριμένος έλεγχος μπορεί να γίνεται κατά τη διάρκεια κάθε εργαστηριακής ημέρας. Για τον έλεγχο της ύπαρξης οξυγόνου εντός του αναερόβιου θαλάμου χρησιμοποιείται ένας δείκτης. Το διάλυμα του δείκτη διατηρείται σε ένα γυάλινο περιέκτη στο μπροστινό μέρος και στη δεξιά γωνία του θαλάμου (Σχήμα ΠVI.1B). Το μίγμα των αερίων που κυκλοφορεί εντός του αναερόβιου θαλάμου διοχετεύεται στον περιέκτη μέσω μιας μικρής αντλίας. Παρουσία οξυγόνου λαμβάνει κυανό χρώμα, ενώ απουσία οξυγόνου είναι άχρωμος. Για την παρασκευή του δείκτη χρησιμοποιούνται τα διαλύματα 1 και 2 σε αναλογία 9:1. Τα διαλύματα 1 και 2 παρασκευάζονται ως εξής:

*Διάλυμα 1:* Ζυγίζονται 50 g  $\text{NaHCO}_3$  και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL. Στην ογκομετρική φιάλη προστίθεται νερό και η φιάλη τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για να διαλυθεί το  $\text{NaHCO}_3$ .

*Διάλυμα 2:* Ζυγίζεται 0.1 g μπλε του μεθυλενίου και αναμιγνύεται με 10 mL νερό. Λαμβάνονται 0.5 mL από το παραπάνω διάλυμα και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Ζυγίζονται 20 g γλυκόζης, που μεταφέρονται και αυτά στην ογκομετρική φιάλη και προστίθεται νερό. Η φιάλη τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για να διαλυθεί η γλυκόζη.

Για την παρασκευή του δείκτη, σε υάλινο περιέκτη αναμιγνύονται 45 mL από το διάλυμα 1 και 5 mL από το διάλυμα 2. Ακολουθεί θέρμανση του προκύπτοντος διαλύματος μέχρι να απομακρυνθεί το οξυγόνο που περιέχεται στο διάλυμα και να προκύψει άχρωμο διάλυμα.

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII**

*Πρωτογενή δεδομένα από τη μελέτη της προκαταρκτικής διερεύνησης της χρησιμότητας διασπορών σε ναοΐνες στην per os χορήγηση δυσδιάλυτων φαρμάκων σε νήπια*

VII. 1 Καφεΐνη

| Χρόνος<br>(min) | % Διάλυση σκόνης καφεΐνης |      |       |              |                    |                            |
|-----------------|---------------------------|------|-------|--------------|--------------------|----------------------------|
|                 | 1                         | 2    | 3     | Μέση<br>Τιμή | Τυπική<br>Απόκλιση | Σχετική Τυπική<br>Απόκλιση |
| 0               | 0,0                       | 0,0  | 0,0   | <b>0,0</b>   | <b>0,0</b>         |                            |
| 5               | 50,3                      | 15,7 | 70,7  | <b>45,5</b>  | <b>27,7</b>        | <b>60,9</b>                |
| 10              | 76,1                      | 67,3 | 90,2  | <b>77,9</b>  | <b>11,5</b>        | <b>14,8</b>                |
| 15              | 82,3                      | 76,1 | 91,1  | <b>83,2</b>  | <b>7,5</b>         | <b>9,0</b>                 |
| 20              | 90,0                      | 85,3 | 100,1 | <b>91,8</b>  | <b>7,5</b>         | <b>8,2</b>                 |
| 30              | 100,5                     | 91,3 | 104,8 | <b>98,9</b>  | <b>6,9</b>         | <b>6,9</b>                 |
| 45              | 96,7                      | 93,3 | 103,3 | <b>97,8</b>  | <b>5,1</b>         | <b>5,2</b>                 |
| 60              | 94,7                      | 91,1 | 100,3 | <b>95,4</b>  | <b>4,6</b>         | <b>4,8</b>                 |

| Χρόνος<br>(min) | % Διάλυση καφεΐνης από νανοΐνες CAF:PEO 83,3:16,7 w/w |      |       |              |                    |                            |
|-----------------|---|------|-------|--------------|--------------------|----------------------------|
|                 | 1   | 2    | 3     | Μέση<br>Τιμή | Τυπική<br>Απόκλιση | Σχετική Τυπική<br>Απόκλιση |
| <b>0</b>        | 0,0   | 0,0  | 0,0   | <b>0,0</b>   | <b>0,0</b>         |                            |
| <b>5</b>        | 72,6  | 50,4 | 33,5  | <b>52,2</b>  | <b>19,6</b>        | <b>37,6</b>                |
| <b>10</b>       | 97,9  | 81,2 | 70,9  | <b>83,3</b>  | <b>13,6</b>        | <b>16,4</b>                |
| <b>15</b>       | 101,3   | 93,5 | 96,5  | <b>97,1</b>  | <b>4,0</b>         | <b>4,1</b>                 |
| <b>20</b>       | 101,5   | 94,3 | 100,1 | <b>98,6</b>  | <b>3,8</b>         | <b>3,9</b>                 |
| <b>30</b>       | 97,5  | 95,1 | 101,6 | <b>98,1</b>  | <b>3,3</b>         | <b>3,4</b>                 |
| <b>45</b>       | 97,5  | 96,6 | 102,6 | <b>98,9</b>  | <b>3,2</b>         | <b>3,3</b>                 |
| <b>60</b>       | 99,8  | 93,4 | 99,7  | <b>97,6</b>  | <b>3,6</b>         | <b>3,7</b>                 |



| Χρόνος<br>(min) | % Διάλυση καφεΐνης από νανοΐνες CAF:PCL 29,4:70,6 w/w |      |      |           |                 |                         |
|-----------------|---|------|------|-----------|-----------------|-------------------------|
|                 | 1   | 2    | 3    | Μέση Τιμή | Τυπική Απόκλιση | Σχετική Τυπική Απόκλιση |
| 0               | 0,0   | 0,0  | 0,0  | 0,0       | 0,0             |                         |
| 5               | 87,6  | 79,4 | 76,2 | 81,1      | 5,8             | 7,2                     |
| 10              | 92,0  | 90,8 | 82,2 | 88,3      | 5,3             | 6,0                     |
| 15              | 94,4  | 93,2 | 88,7 | 92,1      | 2,9             | 3,4                     |
| 20              | 92,2  | 91,8 | 87,3 | 90,5      | 2,7             | 2,9                     |
| 30              | 92,6  | 92,9 | 92,1 | 92,5      | 0,4             | 0,4                     |
| 45              | 92,9  | 93,6 | 91,7 | 92,7      | 0,9             | 1,0                     |
| 60              | 93,2  | 92,5 | 92,4 | 92,7      | 0,4             | 0,4                     |

VII. 2 Ρανιτιδίνη

| Χρόνος<br>(min) | % Διάλυση σκόνης ρανιτιδίνης |      |      |           |                 |                         |
|-----------------|------------------------------|------|------|-----------|-----------------|-------------------------|
|                 | 1                            | 2    | 3    | Μέση Τιμή | Τυπική Απόκλιση | Σχετική Τυπική Απόκλιση |
| 0               | 0,0                          | 0,0  | 0,0  | 0,0       | 0,0             |                         |
| 5               | 91,7                         | 87,7 | 89,9 | 89,8      | 2,0             | 2,2                     |
| 10              | 94,1                         | 89,1 | 90,9 | 91,3      | 2,5             | 2,8                     |
| 15              | 93,8                         | 89,2 | 91,3 | 91,4      | 2,3             | 2,5                     |
| 20              | 94,8                         | 91,0 | 90,2 | 92,0      | 2,4             | 2,7                     |
| 30              | 92,5                         | 90,6 | 92,4 | 91,8      | 1,1             | 1,2                     |

| Χρόνος<br>(min) | % Διάλυση ρανιτιδίνης από νανοϊνες RNT:CMC:PEO 50:25:25 w/w/ |      |      |             |                 |                         |
|-----------------|--|------|------|-------------|-----------------|-------------------------|
|                 | 1  | 2    | 3    | Μέση Τιμή   | Τυπική Απόκλιση | Σχετική Τυπική Απόκλιση |
| <b>0</b>        | 0,0  | 0,0  | 0,0  | <b>0,0</b>  | <b>0,0</b>      |                         |
| <b>5</b>        | 12,6   | 2,1  | 7,4  | <b>7,4</b>  | <b>5,2</b>      | <b>70,9</b>             |
| <b>10</b>       | 31,9   | 8,2  | 16,8 | <b>19,0</b> | <b>12,0</b>     | <b>63,4</b>             |
| <b>15</b>       | 44,0   | 14,3 | 26,7 | <b>28,4</b> | <b>14,9</b>     | <b>52,6</b>             |
| <b>20</b>       | 53,1   | 21,5 | 33,0 | <b>35,9</b> | <b>16,0</b>     | <b>44,5</b>             |
| <b>30</b>       | 83,3   | 31,5 | 43,2 | <b>52,7</b> | <b>27,2</b>     | <b>51,6</b>             |
| <b>45</b>       | 73,8   | 41,4 | 51,7 | <b>55,7</b> | <b>16,6</b>     | <b>29,7</b>             |
| <b>60</b>       | 76,8   | 48,5 | 57,9 | <b>61,0</b> | <b>14,4</b>     | <b>23,6</b>             |
| <b>90</b>       | 78,3   | 59,9 | 67,5 | <b>68,6</b> | <b>9,2</b>      | <b>13,4</b>             |
| <b>120</b>      | 77,1   | 67,1 | 72,6 | <b>72,3</b> | <b>5,0</b>      | <b>6,9</b>              |

### VII. 3 Αλβενδαζόλη

| Χρόνος<br>(min) | % Διάλυση σκόνης αλβενδαζόλης |      |      |             |                 |                         |
|-----------------|-------------------------------|------|------|-------------|-----------------|-------------------------|
|                 | 1                             | 2    | 3    | Μέση Τιμή   | Τυπική Απόκλιση | Σχετική Τυπική Απόκλιση |
| <b>0</b>        | 0,0                           | 0,0  | 0,0  | <b>0,0</b>  | <b>0,0</b>      |                         |
| <b>5</b>        | 0,7                           | 0,3  | 0,5  | <b>0,5</b>  | <b>0,2</b>      | <b>38,6</b>             |
| <b>10</b>       | 1,5                           | 0,7  | 1,1  | <b>1,1</b>  | <b>0,4</b>      | <b>35,1</b>             |
| <b>15</b>       | 2,6                           | 1,4  | 1,8  | <b>1,9</b>  | <b>0,6</b>      | <b>33,1</b>             |
| <b>20</b>       | 3,9                           | 2,1  | 2,6  | <b>2,9</b>  | <b>0,9</b>      | <b>31,8</b>             |
| <b>30</b>       | 6,2                           | 3,8  | 4,5  | <b>4,8</b>  | <b>1,2</b>      | <b>24,9</b>             |
| <b>45</b>       | 8,1                           | 5,5  | 6,2  | <b>6,6</b>  | <b>1,3</b>      | <b>20,4</b>             |
| <b>60</b>       | 9,7                           | 6,8  | 7,7  | <b>8,1</b>  | <b>1,5</b>      | <b>18,5</b>             |
| <b>90</b>       | 12,1                          | 9,3  | 10,2 | <b>10,5</b> | <b>1,4</b>      | <b>13,5</b>             |
| <b>120</b>      | 14,7                          | 11,5 | 13,7 | <b>13,3</b> | <b>1,6</b>      | <b>12,4</b>             |
| <b>150</b>      | 17,1                          | 13,0 | 15,9 | <b>15,3</b> | <b>2,2</b>      | <b>14,0</b>             |

| Χρόνος<br>(min) | % Διάλυση αλβενδαζόλης από νανοϊνες ABZ:PEO 20:80 w/w |      |      |           |                    |                            |
|-----------------|---|------|------|-----------|--------------------|----------------------------|
|                 | 1   | 2    | 3    | Μέση Τιμή | Τυπική<br>Απόκλιση | Σχετική Τυπική<br>Απόκλιση |
| 0               | 0,0   | 0,0  | 0,0  | 0,0       | 0,0                |                            |
| 5               | 0,4   | 0,3  | 0,5  | 0,4       | 0,1                | 26,3                       |
| 10              | 0,5   | 0,6  | 0,9  | 0,7       | 0,2                | 28,5                       |
| 15              | 1,0   | 1,3  | 1,6  | 1,3       | 0,3                | 24,8                       |
| 20              | 1,5   | 2,0  | 2,4  | 2,0       | 0,5                | 23,1                       |
| 30              | 3,7   | 4,5  | 4,8  | 4,3       | 0,6                | 13,8                       |
| 45              | 8,5   | 7,4  | 9,6  | 8,5       | 1,1                | 12,9                       |
| 60              | 14,2  | 10,8 | 14,0 | 13,0      | 1,9                | 14,9                       |
| 90              | 19,9  | 17,9 | 25,9 | 21,2      | 4,2                | 19,7                       |
| 120             | 32,5  | 24,3 | 39,4 | 32,1      | 7,6                | 23,6                       |
| 150             | 33,2  | 36,0 | 46,6 | 38,6      | 7,1                | 18,3                       |

| Χρόνος<br>(min) | % Διάλυση αλβενδαζόλης από νανοϊνες ABZ:PCL 5,88:94,12 w/w |      |      |           |                    |                            |
|-----------------|--|------|------|-----------|--------------------|----------------------------|
|                 | 1  | 2    | 3    | Μέση Τιμή | Τυπική<br>Απόκλιση | Σχετική Τυπική<br>Απόκλιση |
| 0               | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0       | 0,0                |                            |
| 5               | 1,7  | 1,6  | 1,2  | 1,5       | 0,2                | 16,2                       |
| 10              | 7,4  | 5,3  | 4,7  | 5,8       | 1,4                | 24,4                       |
| 15              | 11,7   | 8,6  | 7,8  | 9,3       | 2,1                | 22,2                       |
| 20              | 15,5   | 11,7 | 10,6 | 12,6      | 2,6                | 20,4                       |
| 30              | 20,4   | 15,8 | 14,5 | 16,9      | 3,1                | 18,2                       |
| 45              | 25,7   | 20,4 | 19,5 | 21,9      | 3,4                | 15,4                       |
| 60              | 30,7   | 24,1 | 23,8 | 26,2      | 3,9                | 14,9                       |
| 90              | 36,7   | 29,9 | 29,4 | 32,0      | 4,1                | 12,8                       |
| 120             | 42,3   | 34,8 | 34,7 | 37,3      | 4,4                | 11,7                       |
| 150             | 44,8   | 36,9 | 37,1 | 39,6      | 4,5                | 11,4                       |

| Χρόνος<br>(min) | % Διάλυση αλβενδαζόλης από νανοΐνες ABZ:CA 9,09:90,91 w/w |      |      |             |                 |                         |
|-----------------|---|------|------|-------------|-----------------|-------------------------|
|                 | 1   | 2    | 3    | Μέση Τιμή   | Τυπική Απόκλιση | Σχετική Τυπική Απόκλιση |
| <b>0</b>        | 0,0   | 0,0  | 0,0  | <b>0,0</b>  | <b>0,0</b>      |                         |
| <b>5</b>        | 0,8   | 0,5  | 0,7  | <b>0,7</b>  | <b>0,2</b>      | <b>26,9</b>             |
| <b>10</b>       | 3,1   | 1,7  | 2,4  | <b>2,4</b>  | <b>0,7</b>      | <b>30,7</b>             |
| <b>15</b>       | 5,3   | 2,9  | 3,7  | <b>4,0</b>  | <b>1,2</b>      | <b>30,7</b>             |
| <b>20</b>       | 7,1   | 4,0  | 4,7  | <b>5,3</b>  | <b>1,6</b>      | <b>30,6</b>             |
| <b>30</b>       | 10,4  | 6,5  | 6,9  | <b>7,9</b>  | <b>2,1</b>      | <b>27,0</b>             |
| <b>45</b>       | 13,7  | 8,9  | 8,9  | <b>10,5</b> | <b>2,8</b>      | <b>26,3</b>             |
| <b>60</b>       | 16,6  | 10,8 | 10,6 | <b>12,7</b> | <b>3,4</b>      | <b>27,2</b>             |
| <b>90</b>       | 21,1  | 13,9 | 12,9 | <b>16,0</b> | <b>4,5</b>      | <b>28,0</b>             |
| <b>120</b>      | 24,6  | 16,7 | 15,1 | <b>18,8</b> | <b>5,1</b>      | <b>27,0</b>             |
| <b>150</b>      | 28,0  | 19,1 | 16,8 | <b>21,3</b> | <b>5,9</b>      | <b>27,8</b>             |

| Χρόνος<br>(min) | % Διάλυση αλβενδαζόλης από νανοΐνες ABZ:PVP 33,3:66,6 w/w |                     |                                |
|-----------------|---|---------------------|--------------------------------|
|                 | Ελεύθερες νανοΐνες  | Νανοΐνες σε καψάκιο | Νανοΐνες σε καψάκιο και sinker |
| <b>0</b>        | 0,0   | 0,0                 | 0,0                            |
| <b>5</b>        | 12,4  | 0,5                 | 0,5                            |
| <b>10</b>       | 19,0  | 1,1                 | 1,1                            |
| <b>15</b>       | 28,7  | 1,8                 | 2,4                            |
| <b>20</b>       | 46,1  | 2,8                 | 4,1                            |
| <b>30</b>       | 46,7  | 4,9                 | 7,6                            |
| <b>45</b>       | 54,4  | 6,9                 | 11,1                           |
| <b>60</b>       | 61,8  | 9,3                 | 14,1                           |
| <b>90</b>       | 71,2  | 13,7                | 19,1                           |
| <b>120</b>      | 76,4  | 17,4                | 23,8                           |
| <b>150</b>      | 80,3  | 20,4                | 26,7                           |

| Χρόνος<br>(min) | % Διάλυση αλβενδαζόλης από ελεύθερες νανοϊνες |                        |                       |
|-----------------|---|------------------------|-----------------------|
|                 | ABZ:PEO 20:80 w/w                             | ABZ:PCL 5,88:94,12 w/w | ABZ:PVP 33,3:66,6 w/w |
| 0               | 0,0   | 0,0                    | 0,0                   |
| 5               | 5,8   | 17,1                   | 26,4                  |
| 10              | 8,1   | 25,8                   | 33,3                  |
| 15              | 16,8  | 32,1                   | 36,7                  |
| 20              | 16,5  | 35,8                   | 41,3                  |
| 30              | 29,1  | 42,6                   | 47,0                  |
| 45              | 34,8  | 47,6                   | 53,7                  |
| 60              | 38,2  | 51,8                   | 58,3                  |
| 90              | 50,3  | 56,8                   | 66,1                  |
| 120             | 51,9  | 61,3                   | 68,5                  |
| 150             | 59,9  | 62,8                   | 71,6                  |

| Χρόνος<br>(min) | % Διάλυση αλβενδαζόλης από ελεύθερες νανοϊνες σε μικρά κομμάτια<br>ABZ:PVP 33,3:66,6 w/w |                     |                                   |
|-----------------|--|---------------------|-----------------------------------|
|                 | Ελεύθερες νανοϊνες   | Νανοϊνες σε καψάκιο | Νανοϊνες σε καψάκιο και<br>sinker |
| 0               | 0,0  | 0,0                 | 0,0                               |
| 5               | 7,3  | 1,4                 | 0,6                               |
| 10              | 11,7   | 3,1                 | 1,0                               |
| 15              | 15,9   | 5,6                 | 1,7                               |
| 20              | 20,3   | 8,1                 | 2,6                               |
| 30              | 26,5   | 11,9                | 4,6                               |
| 45              | 33,5   | 17,7                | 7,7                               |
| 60              | 39,6   | 21,5                | 11,2                              |
| 90              | 45,7   | 28,7                | 19,2                              |
| 120             | 50,9   | 33,5                | 26,3                              |
| 150             | 53,9   | 35,9                | 30,2                              |

| Χρόνος<br>(min) | % Διάλυση αλβενδαζόλης από ελεύθερες νανοϊνες σε μεγάλα κομμάτια ABZ:PVP<br>50:50 w/w |      |      |             |                    |                            |
|-----------------|---|------|------|-------------|--------------------|----------------------------|
|                 | 1   | 2    | 3    | Μέση Τιμή   | Τυπική<br>Απόκλιση | Σχετική Τυπική<br>Απόκλιση |
| <b>0</b>        | 0,0   | 0,0  | 0,0  | <b>0,0</b>  | <b>0,0</b>         |                            |
| <b>5</b>        | 30,5  | 18,1 | 34,9 | <b>27,8</b> | <b>8,7</b>         | <b>31,2</b>                |
| <b>10</b>       | 41,6  | 24,4 | 46,9 | <b>37,6</b> | <b>11,8</b>        | <b>31,3</b>                |
| <b>15</b>       | 51,8  | 31,2 | 55,4 | <b>46,1</b> | <b>13,1</b>        | <b>28,3</b>                |
| <b>20</b>       | 61,7  | 36,2 | 62,0 | <b>53,3</b> | <b>14,8</b>        | <b>27,8</b>                |
| <b>30</b>       | 73,6  | 43,8 | 68,1 | <b>61,8</b> | <b>15,8</b>        | <b>25,6</b>                |
| <b>45</b>       | 84,0  | 52,3 | 77,1 | <b>71,1</b> | <b>16,6</b>        | <b>23,4</b>                |
| <b>60</b>       | 89,3  | 58,3 | 81,5 | <b>76,4</b> | <b>16,1</b>        | <b>21,1</b>                |
| <b>90</b>       | 94,5  | 66,2 | 86,2 | <b>82,3</b> | <b>14,5</b>        | <b>17,7</b>                |
| <b>120</b>      | 99,8  | 71,8 | 90,8 | <b>87,5</b> | <b>14,3</b>        | <b>16,3</b>                |
| <b>150</b>      | 105,0   | 75,2 | 94,0 | <b>91,4</b> | <b>15,0</b>        | <b>16,5</b>                |

| Χρόνος<br>(min) | % Διάλυση αλβενδαζόλης από ελεύθερες νανοϊνες σε μεγάλα κομμάτια ABZ:PVP<br>50:50 w/w |      |      |             |                    |                               |
|-----------------|---|------|------|-------------|--------------------|-------------------------------|
|                 | 1   | 2    | 3    | Μέση Τιμή   | Τυπική<br>Απόκλιση | Σχετική<br>Τυπική<br>Απόκλιση |
| <b>0</b>        | 0,0   | 0,0  | 0,0  | <b>0,0</b>  | <b>0,0</b>         |                               |
| <b>5</b>        | 16,3  | 10,4 | 18,5 | <b>15,1</b> | <b>4,2</b>         | <b>27,6</b>                   |
| <b>10</b>       | 26,9  | 17,5 | 26,4 | <b>23,6</b> | <b>5,2</b>         | <b>22,2</b>                   |
| <b>15</b>       | 35,1  | 27,7 | 35,7 | <b>32,8</b> | <b>4,4</b>         | <b>13,4</b>                   |
| <b>20</b>       | 40,6  | 36,2 | 43,9 | <b>40,2</b> | <b>3,9</b>         | <b>9,6</b>                    |
| <b>30</b>       | 50,4  | 43,4 | 54,6 | <b>49,5</b> | <b>5,7</b>         | <b>11,4</b>                   |
| <b>45</b>       | 59,0  | 54,0 | 58,3 | <b>57,1</b> | <b>2,7</b>         | <b>4,8</b>                    |
| <b>60</b>       | 64,9  | 59,7 | 63,7 | <b>62,7</b> | <b>2,7</b>         | <b>4,3</b>                    |
| <b>90</b>       | 71,4  | 66,0 | 69,0 | <b>68,8</b> | <b>2,7</b>         | <b>3,9</b>                    |
| <b>120</b>      | 76,8  | 74,1 | 75,6 | <b>75,5</b> | <b>1,4</b>         | <b>1,8</b>                    |
| <b>150</b>      | 79,2  | 77,0 | 76,1 | <b>77,4</b> | <b>1,6</b>         | <b>2,1</b>                    |

| Χρόνος<br>(min) | % Διάλυση αλβενδαζόλης από εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα (Zentel®<br>suspension) |      |      |             |                    |                            |
|-----------------|--|------|------|-------------|--------------------|----------------------------|
|                 | 1  | 2    | 3    | Μέση Τιμή   | Τυπική<br>Απόκλιση | Σχετική Τυπική<br>Απόκλιση |
| <b>0</b>        | 0,0  | 0,0  | 0,0  | <b>0,0</b>  | <b>0,0</b>         |                            |
| <b>5</b>        | 56,6   | 54,1 | 55,0 | <b>55,2</b> | <b>1,3</b>         | <b>2,3</b>                 |
| <b>10</b>       | 61,4   | 60,3 | 60,8 | <b>60,8</b> | <b>0,6</b>         | <b>0,9</b>                 |
| <b>15</b>       | 65,5   | 64,7 | 64,5 | <b>64,9</b> | <b>0,5</b>         | <b>0,8</b>                 |
| <b>20</b>       | 68,7   | 68,0 | 68,2 | <b>68,3</b> | <b>0,3</b>         | <b>0,5</b>                 |
| <b>30</b>       | 75,0   | 73,5 | 72,8 | <b>73,8</b> | <b>1,1</b>         | <b>1,5</b>                 |
| <b>45</b>       | 78,7   | 77,5 | 77,4 | <b>77,9</b> | <b>0,7</b>         | <b>1,0</b>                 |
| <b>60</b>       | 81,9   | 80,5 | 81,4 | <b>81,3</b> | <b>0,7</b>         | <b>0,9</b>                 |

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VIII**

*Πρωτογενή δεδομένα από τη μελέτη βακτηριακής αποικοδόμησης μετρονιδαζόλης και ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα νηπίων*



VIII. 1 Μετρονιδαζόλη

| Χρόνος<br>(min) | Ποσοστό μετρονιδαζόλης που παρέμεινε στο υλικό από κόπρανα (%) |        |        |        |        |        |        |
|-----------------|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                 | #1pCHI   | #2pCHI | #3pCHI | #4pCHI | #5pCHI | #6pCHI | #7pCHI |
| 0               | 100,0  | 100,0  | 100,0  | 100,0  | 100,0  | 100,0  | 100,0  |
| 5               | 24,9   | 44,7   | 100,1  | 49,3   | 71,0   | 38,9   | 84,1   |
| 10              | 7,1  | 25,6   | 94,3   | 15,9   | 47,6   | 8,7    | 77,5   |
| 15              | 0,0  | 9,6    | 102,7  | 5,7    | 25,5   | 0,0    | 66,3   |
| 20              | 0,0  | 0,0    | 102,0  | 0,0    | 0,0    | 0,0    | 59,0   |
| 30              | 0,0  | 0,0    | 100,8  | 0,0    | 0,0    | 0,0    | 44,3   |
| 45              | 0,0  | 0,0    | 100,9  | 0,0    | 0,0    | 0,0    | 31,0   |
| 60              | 0,0  | 0,0    | 101,9  | 0,0    | 0,0    | 0,0    | 16,7   |

VIII. 2 Ολσαλαζίνη

| Χρόνος<br>(min) | Ποσοστό ολσαλαζίνης που παρέμεινε στο υλικό από κόπρανα (%) |        |        |        |        |        |        |
|-----------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                 | #1pCHI  | #2pCHI | #3pCHI | #4pCHI | #5pCHI | #6pCHI | #7pCHI |
| 0               | 100,0   | 100,0  | 100,0  | 100,0  | 100,0  | 100,0  | 100,0  |
| 10              | 70,9  | 79,6   | 100,1  | 92,9   | 80,6   | 89,6   | 98,1   |
| 20              | 18,7  | 56,0   | 95,8   | 72,1   | 53,6   | 50,9   | 86,2   |
| 30              | 8,0   | 31,5   | 93,6   | 53,1   | 26,8   | 30,1   | 75,23  |
| 60              | 0,0   | 0,0    | 101,8  | 17,8   | 8,2    | 0,0    | 50,6   |
| 90              | 0,0   | 0,0    | 100,5  | 0,0    | 0,0    | 0,0    | 40,5   |
| 120             | 0,0   | 0,0    | 99,2   | 0,0    | 0,0    | 0,0    | 37,7   |