



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
**Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών**

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ»

**Αξιολόγηση της δυνατότητας ανάπτυξης προϊόντος  
τροποποιημένης αποδέσμευσης του συνδυασμού δραστικών ουσιών  
Α και διερεύνηση της μεταβλητότητας της βακτηριακής ενεργότητας  
υλικού από κόπρανα ενηλίκων**

**Διπλωματική Εργασία**

**Γκόλφη Ευγενία**

Φαρμακοποιός

Αθήνα 2020





ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
**Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών**

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ»

**Αξιολόγηση της δυνατότητας ανάπτυξης προϊόντος  
τροποποιημένης αποδέσμευσης του συνδυασμού δραστικών ουσιών  
Α και διερεύνηση της μεταβλητότητας της βακτηριακής ενεργότητας  
υλικού από κόπρανα ενηλίκων**

**Διπλωματική Εργασία**

**Γκόλφη Ευγενία**

Φαρμακοποιός

Αθήνα 2020

***Τριμελής εξεταστική επιτροπή***

Ρέππας Χρήστος, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Συμιλλίδου Μοίρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Βερτζώνη Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

## **Πρόλογος**

*Μετά από πολλές αντιξοότητες και αναβολές, έφτασε η στιγμή να γραφούν αυτές οι πιο «ανάλαφρες» γραμμές, σηματοδοτώντας την ολοκλήρωση ενός μικρότερου κύκλου – του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης – και ενός μεγαλύτερου – της φοίτησης στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.*

*Ευχαριστώ τις εξαιρετικές συναδέλφους και υποψήφιες διδάκτορες Χριστίνα Κωνσταντίνη, Χριστίνα Πενταφράγκα και Μαρίνα Στατελόβα για την έμπρακτη και – προπάντων – ηθική υποστήριξη όλο αυτό το χρονικό διάστημα,*

*Τον Καθηγητή Χρήστο Ρέππα για την μακρόχρονη εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου, την καθοδήγηση και τις συμβουλές,*

*Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την Επίκουρη Καθηγήτρια Μαρία Βερτζώνη για την καθοριστικής σημασίας βοήθεια και υποστήριξη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοίρα Συμιλλίδου,*

*Την εταιρεία Novartis Pharma, AG (Basel, Switzerland), χωρίς τη συμβολή της οποίας δεν θα ήταν δυνατή η υλοποίηση της συγκεκριμένης μελέτης.*

*Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους δικούς μου ανθρώπους που με στήριξαν αυτό το χρονικό διάστημα, και κυρίως τη μαμά μου, Καίτη.*

*Αθήνα, Σεπτέμβριος 2020*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός:** Η παρούσα μελέτη είχε δύο στόχους. Πρώτος στόχος ήταν η αξιολόγηση της δυνατότητας ανάπτυξης προϊόντος τροποποιημένης αποδέσμευσης του συνδυασμού δραστικών ουσιών Α. Ο δεύτερος στόχος ήταν η διερεύνηση της μεταβλητότητας της βακτηριακής ενεργότητας υλικού από κόπρανα υγιών ενηλίκων με βάση δεδομένα αποικοδόμησης της ολσαλαζίνης και μετρονιδαζόλης.

**Μέθοδοι:** Η εκτίμηση της διάλυσης του προϊόντος άμεσης αποδέσμευσης του συνδυασμού θεραπευτικών παραγόντων Α έγινε με τη διάταξη περιστρεφόμενου πτερυγίου. Η εκτίμηση της αποδέσμευσης του Α από τρία διαφορετικά πρωτότυπα προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης (MR1, MR2, MR3) έγινε με τη διάταξη συνεχούς ροής. Τα πειράματα έγιναν σε μέσα που προσομοιώνουν σε επίπεδο II τις συνθήκες στο γαστρεντερικό σωλήνα κατά τη διαπεπτική περίοδο και κατά την περίοδο πέψης. Η σταθερότητα του των θεραπευτικών παραγόντων του Α στο μικροβίωμα του παχέος εντέρου μελετήθηκε σε βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων (Simulated Colonic Bacteria, SCoB) (Vertzoni *et al.*, 2018). Η συγκέντρωση των κοπράνων στο SCoB ήταν 8.3%.

Η μεταβλητότητα της βακτηριακής ενεργότητας υλικού από κόπρανα υγιών ενηλίκων (Karatza *et al.*, 2016) μελετήθηκε συγκρίνοντας δεδομένα της παρούσας μελέτης με δεδομένα προηγούμενης μελέτης και ελέγχοντας εάν η διατήρηση του υλικού στους -70 °C για 48 μήνες επηρεάζει σημαντικά τη βακτηριακή ενεργότητα. Η συγκέντρωση των κοπράνων που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης ήταν 25%.

**Αποτελέσματα:** Με βάση τα *in vitro* πειράματα, από το προϊόν άμεσης αποδέσμευσης, το μέγιστο ποσοστό του συνδυασμού θεραπευτικών παραγόντων Α που αναμένεται να διαλυθεί στο στομάχο είναι ~ 20% στη διαπεπτική περίοδο και ~ 60% στην περίοδο πέψης. Ανεξάρτητα από τις συνθήκες χορήγησης, η αποδέσμευση του MR3 προβλέπεται να διαρκέσει μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από του MR1 και η αποδέσμευση του MR2 προβλέπεται περίπου στο 60% της συνολικής δόσης στο τέλος της νήστιδας.

Οι δύο δραστικές ουσίες από τις οποίες αποτελείται το Α είναι σταθερές σε βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα.

Οι μέσοι χρόνοι ημίσειας ζωής της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης στο υλικό από κόπρανα ενηλίκων που παρασκευάστηκε για την παρούσα μελέτη ήταν 4.89 και 16.74 min. Οι τιμές αυτές είναι παρόμοιες με τις τιμές που έχουν εκτιμηθεί σε παλαιότερη μελέτη (6.28 και 17.49 min, αντίστοιχα, Karatza *et al.*, 2016).

Η επίδραση της διατήρησης του υλικού (-70 °C/48mo) βρέθηκε ότι δεν είναι σημαντική για τη μετρονιδαζόλη ή την ολσαλαζίνη.

**Συμπεράσματα:** Με βάση τα *in vitro* πειράματα, αναμένεται με το MR3 να παρατείνεται σημαντικά η αποδέσμευση του A και ολοκληρώνεται μέχρι το τέλος του λεπτού εντέρου. Με το MR1 η αποδέσμευση ολοκληρώνεται πιο γρήγορα, ενώ με το MR2 η αποδέσμευση ολοκληρώνεται στο παχύ έντερο, γεγονός που ίσως δημιουργήσει προβλήματα στην απορρόφηση της χαμηλής διαπερατότητας του θεραπευτικού παράγοντα A1.

Οι θεραπευτικοί παράγοντες A1 και A2 αναμένεται να μην παρουσιάζουν κλινικά σημαντικά προβλήματα βακτηριακής αποικοδόμησης στο κατώτερο έντερο. Προτείνεται η ανάπτυξη του προϊόντος MR3.

Το υλικό από κόπρανα που παρασκευάστηκε για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης δεν παρουσιάζει σημαντικά διαφορετική βακτηριακή ενεργότητα από υλικό που είχε παρασκευασθεί με παρόμοιο τρόπο από άλλους εθελοντές για τις ανάγκες διαφορετικής μελέτης. Επίσης, διατήρηση υλικού από κόπρανα στους -70 °C για 48 μήνες δεν οδηγεί σε σημαντική διαφοροποίηση της βακτηριακής ενεργότητας.

## Περιεχόμενα

Περιεχόμενα .....	1
<b>A . Εισαγωγή</b> .....	3
<b>A.1 Απορρόφηση φαρμάκων από το κατώτερο έντερο (τελικό ειλεό και παχύ έντερο)</b> 3	
<i>A.1.1 Διάλυση του φαρμάκου στον αυλό του κατώτερου εντέρου .....</i>	3
<i>A.1.2 Σταθερότητα του φαρμάκου στο μικροβίωμα του κατώτερου εντέρου .....</i>	10
<b>A.2. Στόχοι της παρούσας μελέτης</b> .....	16
<b>B. Πειραματικό Μέρος</b> .....	18
<b>B.1 Οργανολογία</b> .....	18
<b>B.2 Αντιδραστήρια</b> .....	19
<b>B.3 Δραστικές ουσίες - Φαρμακευτικά προϊόντα</b> .....	20
<b>B.4 Υλικά</b> .....	21
<b>B.5 Εκτίμηση της διάλυσης του συνδυασμού δραστικών ουσιών A από μικροδισκία άμεσης αποδέσμευσης και δοκιμαστικά προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης σε συνθήκες που προσομοιώνουν τη διαπεπτική περίοδο και την περίοδο πέψης</b> .....	22
<i>B.5.1 Παρασκευή των μέσων που προσομοιώνουν τη σύσταση των περιεχομένων του γαστρεντερικού αυλού .....</i>	22
<i>B.5.2. Προκαταρκτικά πειράματα με τη διάταξη συνεχούς ροής (USP Apparatus IV) .....</i>	26
<i>B.5.3 Πειράματα με τη διάταξη περιστρεφόμενου πτερυγίου (USP Apparatus II) και μικρού περιστρεφόμενου πτερυγίου .....</i>	30
<i>B.5.4 Πειράματα διάλυσης των δοκιμαστικών προϊόντων τροποποιημένης αποδέσμευσης .....</i>	33
<b>B.6 Υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων</b> .....	36
<i>B.6.1 Κριτήρια Ένταξης .....</i>	36
<i>B.6.2 Κριτήρια αποκλεισμού .....</i>	37
<i>B.6.3 Εθελοντές που συμμετείχαν στη μελέτη .....</i>	38
<i>B.6.4 Συλλογή κοπράνων, παρασκευή υλικού από κόπρανα και συνθήκες διατήρησης....</i>	38
<b>B.7 Εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης του συνδυασμού δραστικών ουσιών A σε βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων</b> .....	41
<b>B.8 Εκτίμηση της μεταβλητότητας της βακτηριακής ενεργότητας υλικού από κόπρανα υγιών ενηλίκων</b> .....	43
<i>B.8.1 Βακτηριακή αποικοδόμηση μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα που παρασκευάστηκε στην παρούσα μελέτη .....</i>	43
<i>B.8.2 Βακτηριακής αποικοδόμηση ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα που παρασκευάστηκε στην παρούσα μελέτη .....</i>	44

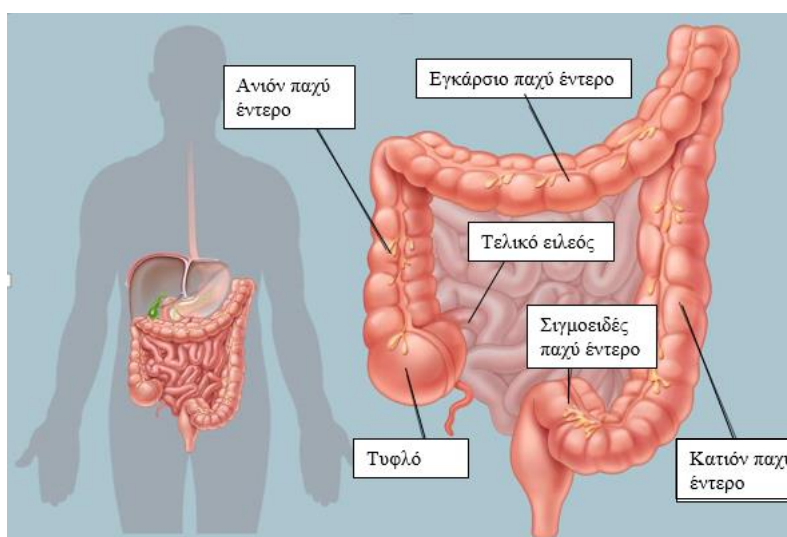


<i>B.8.3 Βακτηριακή αποικοδόμηση μετρονιδαζόλης και ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα που είχε συλλεχθεί σε παλαιότερη μελέτη (Karatza et al., 2016).....</i>	45
<b>B.9 Μέθοδοι προσδιορισμού δραστικών ουσιών .....</b>	<b>45</b>
<i>B.9.1 Συνδυασμού δραστικών ουσιών A (Ένυδρο, μετά νατρίου άλας του A1 και του A2) .....</i>	45
<i>B.9.2 Μετρονιδαζόλη .....</i>	55
<i>B.9.3 Ολσαλαζίνη.....</i>	58
<b>B.10 Ανάλυση πειραματικών δεδομένων βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων... 62</b>	
<b>Γ. Αποτελέσματα και Σχολιασμός..... 64</b>	
<b>Γ.1 Διάλυση του A από μικροδισκία άμεσης αποδέσμευσης και από πρωτότυπα προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης σε συνθήκες που προσομοιώνουν τη διαπεπτική περίοδο και την περίοδο πέψης..... 64</b>	
<i>Γ.1.1 Μικροδισκία άμεσης αποδέσμευσης.....</i>	64
<i>Γ.1.2 Δοκιμαστικά προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης.....</i>	64
<b>Γ.2 Σταθερότητα του A στο μικροβίωμα του κατώτερου εντέρου με βάση δεδομένα από βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα ενηλίκων..... 69</b>	
<b>Γ.3 Μεταβλητότητα της βακτηριακής ενεργότητας υλικού από κόπρανα υγιών ενηλίκων με βάση δεδομένα αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης .....</b>	<b>71</b>
<i>Γ.3.1 Βακτηριακή αποικοδόμηση μετρονιδαζόλης και ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα που παρασκευάστηκε στην παρούσα μελέτη σε σχέση με δεδομένα από προηγούμενη μελέτη.....</i>	71
<i>Γ.3.2 Επίδραση της διατήρησης υλικού από κόπρανα ενηλίκων (-70 οC / 48 mo, Karatza et al. 2016) στη βακτηριακή ενεργότητα με βάση δεδομένα αποικοδόμησης της ολσαλαζίνης και μετρονιδαζόλης.....</i>	74
<b>Δ. Συμπεράσματα..... 78</b>	
<b>Ε. Βιβλιογραφία..... 80</b>	
<b>ΣΤ. Παραρτήματα .....</b>	<b>84</b>
<i>Παράρτημα I: Έγκριση του πρωτοκόλλου πειραματισμού με υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων από την Επιτροπή Βιοηθικής του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ .....</i>	84
<i>Παράρτημα II: Πρωτόκολλο συλλογής κοπράνων και δήλωση συγκατάθεσης εθελοντών .</i>	85
<i>Παράρτημα III: Ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιήθηκε για τη συνέντευξη υποψήφιων εθελοντών .....</i>	99
<i>Παράρτημα IV: Έλεγχος καλής λειτουργίας αναερόβιου θαλάμου .....</i>	102
<i>Παράρτημα V: Πρωτογενή δεδομένα διάλυσης A.....</i>	103
<i>Παράρτημα VI: Πρωτογενή δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης συνδυασμού ουσιών A .....</i>	113
<i>Παράρτημα VII: Πρωτογενή δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης Μετρονιδαζόλης... 114</i>	
<i>Παράρτημα VIII: Πρωτογενή δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης Ολσαλαζίνης.....</i>	115

## A . Εισαγωγή

### A.1 Απορρόφηση φαρμάκων από το κατώτερο έντερο (τελικό ειλέο και παχύ έντερο)

Οι λόγοι που πολλές φορές καθιστούν προβληματική την απορρόφηση φαρμάκων από το κατώτερο έντερο (Σχήμα A.1) σχετίζονται με προβλήματα διάλυσης, βακτηριακής αποικοδόμησης, και μεταφοράς του φαρμάκου μέσω του επιθηλίου. Γενικά, η ανάπτυξη ενός προϊόντος τροποποιημένης αποδέσμευσης θεωρείται προβληματική, αν το κλάσμα της δόσης που απορροφάται από τον αυλό του παχέος εντέρου είναι μικρότερο από 60% ( $F_{\text{colon}} < 60\%$ ) (Xu *et al.*, 2017).

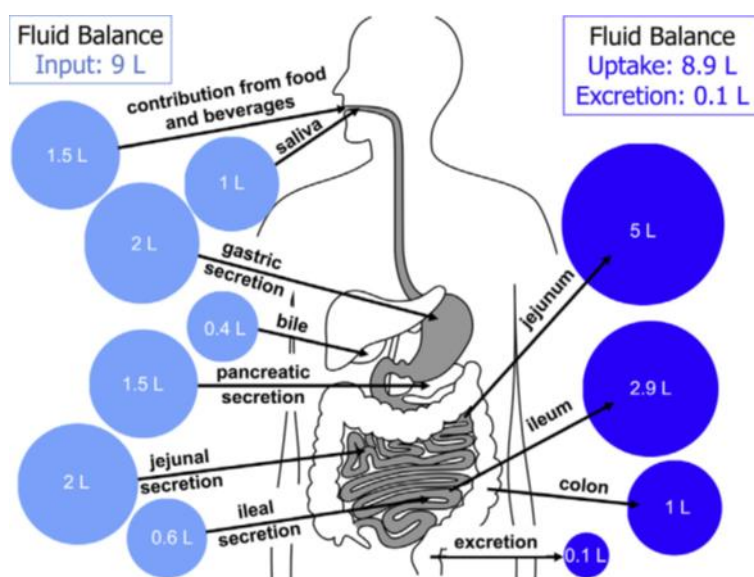


Σχήμα A.1: Απεικόνιση του κατώτερου εντέρου (Με βάση ανάλογο σχήμα <https://biniaris-surgery.gr>, πρόσβαση 25 Αυγούστου 2020).

#### A.1.1 Διάλυση του φαρμάκου στον αυλό του κατώτερου εντέρου

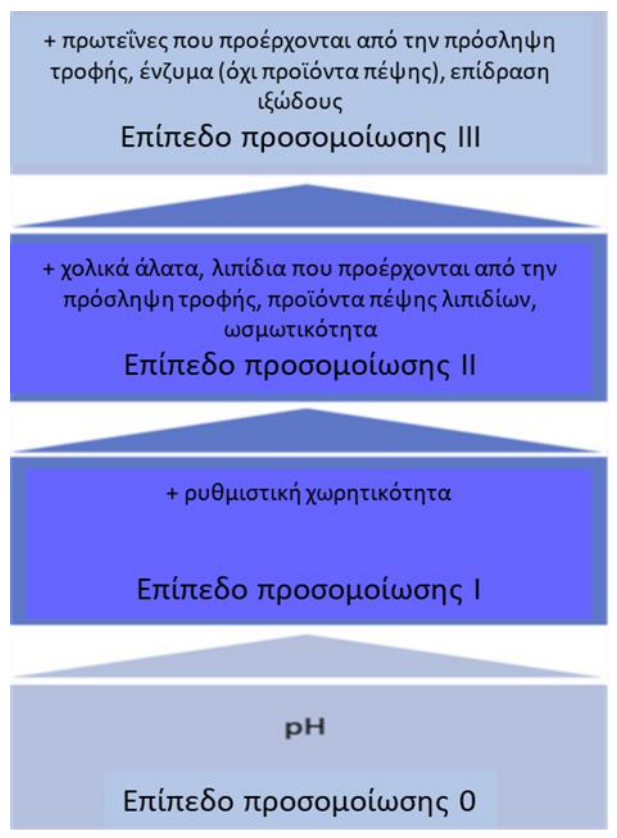
Η διαδικασία της διάλυσης στις κατώτερες περιοχές του εντερικού αυλού μπορεί να αποτελέσει περιοριστικό βήμα για την απορρόφηση μιας ουσίας, ειδικά μάλιστα σε περιπτώσεις όπου η ουσία είναι εν γένει δυσδιάλυτη. Στο κατώτερο έντερο επαναπορροφάται μεγάλη ποσότητα ύδατος, έχοντας ως αποτέλεσμα την παρουσία μικρότερων διαθέσιμων ποσοτήτων νερού για να διαλύσουν την εκάστοτε ουσία. Το αιόν παχύ έντερο είναι η κύρια περιοχή ενδιαφέροντος στο κατώτερο έντερο,

λαμβάνοντας υπόψιν τους μεγαλύτερους χρόνους παραμονής σε αυτό και τους πολύ περιορισμένους όγκους ελεύθερου νερού στο εγκάρσιο και το κατιόν κόλον (Reppas and Vertzoni, 2012 και Σχήμα Α.2). Επιπλέον στο κατώτερο έντερο τα περιεχόμενα έχουν μεγαλύτερο ιξώδες και η ανάδευση είναι περιορισμένη. Το περιβάλλον που δημιουργείται δυσχεραίνει τη διάλυση στερεών, ειδικότερα μάλιστα όταν πρόκειται για δυσδιάλυτα μόρια, όπως τα περισσότερα που αναπτύσσονται τελευταία (Xu *et al.*, 2017).



Σχήμα Α.2: Ισορροπία υγρών κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα (Sjörger *et al.*, 2014).

Συνήθως η εκτίμηση της διάλυσης των φαρμάκων στο κατώτερο έντερο γίνεται με *in vitro* πειράματα. Έχει προταθεί η θεώρηση τεσσάρων επιπέδων προσομοίωσης της ενδοαυλικής σύστασης κατά μήκος του γαστρεντερικού αυλού, και του κατώτερου εντέρου ειδικότερα, στη διαπεπτική περίοδο, αλλά και στην περίοδο πέψης, (Σχήμα Α.3). Στη σχετική ταξινόμηση δε λαμβάνονται υπόψιν διαδικασίες όπως προσρόφιση σε στερεά σωματίδια του αυλού ή βακτηριακή αποικοδόμηση της διαλυμένης δραστικής ουσίας (Markopoulos *et al.*, 2015).



Σχήμα Α.3: Επίπεδα προσομοίωσης των περιεχομένων του γαστρεντερικού αυλού (Markopoulos et al, 2015).

Το επίπεδο προσομοίωσης 0 περιλαμβάνει απλά υδατικά διαλύματα, στα οποία το pH είναι ρυθμισμένο έτσι, ώστε να προσομοιώνει το pH συγκεκριμένης περιοχής του αυλού. Αυτό το επίπεδο προσομοίωσης είναι επαρκές για την πρόβλεψη συμπεριφοράς προϊόντων με δραστικές ουσίες υψηλής διαλυτότητας. Στο επίπεδο προσομοίωσης I εκτός από το pH λαμβάνεται υπόψιν και η ρυθμιστική χωρητικότητα των περιεχομένων του αυλού. Αυτό το επίπεδο προσομοίωσης θεωρείται επαρκές για την εκτίμηση της συμπεριφοράς φαρμάκων που ανήκουν στις Τάξεις I και III του συστήματος ταξινόμησης DCS (Developability Classification System, Butler and Dressman, 2010). Στο επίπεδο προσομοίωσης II λαμβάνεται επιπρόσθετα υπόψιν η παρουσία χολικών αλάτων, η ωσμωτικότητα, η παρουσία λιπιδίων που προέρχονται από την λήψη τροφής, καθώς και τα βασικά προϊόντα πέψης. Το επίπεδο προσομοίωσης II είναι απαραίτητο για την αξιολόγηση φαρμάκων που ανήκουν στις Τάξεις II και IV του συστήματος ταξινόμησης DCS. Τέλος, στα μέσα που προσομοιώνουν το περιεχόμενο του γαστρεντερικού σωλήνα σε επίπεδο III

περιλαμβάνονται επιπλέον πρωτεΐνες, τα ένζυμα που είναι συνήθως παρόντα στην υδατική φάση των περιεχομένων του αυλού και παράγοντες που επιδρούν στο ιξώδες. Αυτό το επίπεδο προσομοίωσης είναι απαραίτητο για την αξιολόγηση λιπιδικών προϊόντων ή για τον έλεγχο της σταθερότητας ενδοαυλικών χαρακτηριστικών, τόσο της δραστικής ουσίας όσο και του φαρμακευτικού προϊόντος.

Για την εκτίμηση της ενδοαυλικής συμπεριφοράς προϊόντων τροποποιημένης αποδέσμευσης εκτός από την προσομοίωση των περιεχομένων στο ανώτερο έντερο είναι απαραίτητη και η προσομοίωση του περιβάλλοντος στο κατώτερο έντερο. Σε περίπτωση που χρησιμοποιούνται κλειστά συστήματα για την *in vitro* προσομοίωση του περιβάλλοντος στο στόμαχο ή στο ανώτερο έντερο προτείνεται η χρήση όγκων 250-500 mL για τη διαπεπτική περίοδο και την περίοδο πέψης. Για το κατώτερο έντερο προτείνεται να χρησιμοποιούνται 200 mL ανεξαρτήτως συνθηκών χορήγησης (Markopoulos *et al.*, 2015). Για την παρασκευή των μέσων απαιτείται η χρήση απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού, ώστε να εξασφαλίζεται η επαναληψιμότητα ως προς τη σύσταση (Markopoulos *et al.*, 2015).

### Διαπεπτική περίοδος

Σήμερα, για την προσομοίωση του περιβάλλοντος στο στόμαχο, κατά τη διαπεπτική περίοδο, χρησιμοποιείται το υγρό μέσο Fasted State Simulating Gastric Fluid (FaSSGF). Ανάλογα με το επιθυμητό επίπεδο προσομοίωσης είναι εφικτή η προσομοίωση του pH και των συγκεντρώσεων χολικών αλάτων και φωσφατιδυλοχολίνης. Παρόλο που υπάρχει λιπάση στη διαπεπτική περίοδο στο στόμαχο, δε χρειάζεται να συμπεριληφθεί καθώς είναι ενεργή μόνο σε εύρος τιμών pH 3-6, υψηλότερες δηλαδή από αυτές που επικρατούν συνήθως στο στόμαχο κατά τη διαπεπτική περίοδο (Πίνακας A.1) (Vertzoni *et al.*, 2005).

Για την προσομοίωση του περιβάλλοντος του λεπτού εντέρου κατά τη διαπεπτική περίοδο συνήθως χρησιμοποιείται το υγρό μέσο Fasted State Simulating Fluid (FaSSIF) (Πίνακας A.1). Στο μέσο αυτό λαμβάνονται υπόψιν τα ενδοαυτικά επιφανειοδραστικά συστατικά, καθώς περιλαμβάνονται χολικά άλατα και φωσφατιδυλοχολίνη (σε αναλογία 4:1), τα οποία μειώνουν την επιφανειακή τάση και δημιουργούνται μικκύλια, προάγοντας τη διαλυτοποίηση λιπόφιλων μορίων, σε βαθμό που προσομοιώνει τις συνθήκες στον ανώτερο εντερικό αυλό. Στο FaSSIF

εμπεριέχονται ταυροχολικό νάτριο και φωσφατιδυλογολίνη αυγού. Επιπρόσθετα, προσομοιώνεται η ρυθμιστική χωρητικότητα και η ωσμωτικότητα στο ανώτερο λεπτό έντερο (Markopoulos *et al.*, 2015).

Οι Jantratic *et al.* (2008) πρότειναν ένα νέο μέσο, το FaSSIF-V2 (Πίνακας Α.1) το οποίο παρουσιάζει κάποιες βελτιστοποιήσεις σε σχέση με το FaSSIF. Σε αυτό το μέσο, το pH και η ρυθμιστική χωρητικότητα ρυθμίστηκαν με τη χρήση μηλεϊνικού ρυθμιστικού διαλύματος και όχι φωσφορικών, όπως έγινε στο FaSSIF. Το FaSSIF-V2 φαίνεται πιο χρήσιμο στην πρόβλεψη διάλυσης ουδέτερων ενώσεων, ενώ στην περίπτωση ιοντισμένων ενώσεων και τα δύο μέσα φαίνονται εξίσου αποτελεσματικά (Reppas and Vertzoni, 2012).

Σε νεότερη δημοσίευση των Markopoulos *et al.* (2015) προτάθηκε για πρώτη φορά το FaSSIF<sub>midgut</sub> για την προσομοίωση των περιεχομένων της περιοχής της νήστιδας, καθώς και το SIF<sub>ileum</sub> για την προσομοίωση της περιοχής του ειλεού.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η απορρόφηση των από του στόματος χορηγούμενων φαρμάκων ολοκληρώνεται στο λεπτό έντερο και για το λόγο αυτό έχει δοθεί περισσότερη έμφαση στην ανάπτυξη υγρών μέσων για την προσομοίωση των περιεχομένων του λεπτού εντέρου. Ωστόσο, σε περιπτώσεις όπου:

α) το φάρμακο έχει χαμηλή διαπερατότητα στο λεπτό έντερο

β) γίνεται χορήγηση προϊόντος τροποποιημένης αποδέσμευσης

γ) χορηγείται προϊόν για τοπική δράση στη βλεννογόνο του κατώτερου εντέρου,

το περιβάλλον του ανιόντος παχέος εντέρου επηρεάζει σημαντικά την απορρόφηση του φαρμάκου. Για την προσομοίωση της περιοχής του ανιόντος παχέος εντέρου κατά τη διαπεπτική περίοδο χρησιμοποιείται το FaSSCoF (Fasted State Simulating Colonic Fluid) (Πίνακας Α.1).

Πίνακας Α.1: Σύσταση και pH υγρών μέσων που προσομοιώνουν τα ενδοαυλικά περιοχόμενα σε επίπεδο προσομοίωσης ΙΙ, κατά τη διαπεπτική περίοδο (Markopoulos *et al.*, 2015; Reppas *et al.*, 2020; Georgaka *et al.*, 2017)

	FaSSGF	FaSSIF-V <sub>2</sub>	FaSSIF <sub>midgut</sub>	SIF <sub>ileum</sub>	FaSSCoF
Ταυροχολικό νάτριο (mM)	0.08	3	1.5	0.8	-
Χολικό νάτριο (mM)	-	-	-	-	0.15
Φωσφατιδυλοχολίνη (mM)	0.02	0.2	0.1	0.2	0.3
Ελαϊκό νάτριο (mM)	-	-	-	-	0.1
Trizma (mM)	-	-	-	-	45.4
Μηλεϊνικό οξύ (mM)	-	19.1	19.3	52.8	75.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mM)	-	-	-	-	-
NaOH (mM)	-	34.8	36.5	105	120
HCl (mM)	qs pH 1.6	-	-	-	-
NaCl (mM)	34.2	68.6	76.1	30.1	-
pH	1.6	6.5	6.8	8.0	7.8

### Περίοδος πέψης

Για προσομοίωση των περιεχομένων του στομάχου κατά την περίοδο πέψης έχουν προταθεί τα FeSSGF και FeSSGF<sub>late</sub> (Fed State Simulating Gastric Fluid) (Πίνακας Α.2) (Reppas *et al.*, 2020). Στα FeSSGF και FeSSGF<sub>late</sub> επιπέδου προσομοίωσης ΙΙ εμπεριέχεται ποσότητα Lipofundin® MCT 20 (εμπορικά διαθέσιμο γαλάκτωμα ο/w που χρησιμοποιείται για παρεντερική διατροφή) τέτοια ώστε να επιτυγχάνονται λιπιδικές συγκεντώσεις παρόμοιες με εκείνες που παρατηρούνται στο στόμαχο μετά από χορήγηση γεύματος (Markopoulos *et al.*, 2015).

Το FeSSIF-V<sub>2</sub> (Fed State Simulating Intestinal Fluid) έχει προταθεί για την προσομοίωση των περιεχομένων του αυλού του ανώτερου λεπτού εντέρου (Πίνακας Α.3). Το FeSSIF<sub>midgut</sub> έχει προταθεί για την προσομοίωση του περιεχομένου της νήστιδας και το SIF<sub>ileum</sub>, το οποίο είναι το ίδιο που χρησιμοποιείται στην διαπεπτική περίοδο, αλλά και σε προσομοίωση επιπέδου Ι, χρησιμοποιείται για την προσομοίωση του περιεχομένου του ειλεού (Πίνακας Α.3). Το FeSSCoF (Fed State Simulating

Colonic Fluid) έχει προταθεί για την προσομοίωση των περιεχομένων του ανιόντος παχέος εντέρου (Πίνακας A.3.) (Markopoulos *et al.*, 2015).

Πίνακας A.2: Σύσταση και pH υγρών μέσων που προσομοιώνουν τα περιεχόμενα του αυλού του στομάχου σε επίπεδο προσομοίωσης II σε συνθήκες πέψης (Markopoulos *et al.*, 2015; Reppas *et al.*, 2020).

	FeSSGF	FeSSGF <sub>late</sub>
Οξικό οξύ (mM)	18.31	-
Οξικό νάτριο (mM)	32.98	-
Ορθοφωσφορικό οξύ (mM)	-	5.5
Δισόξινο φωσφορικό νάτριο (mM)	-	32
Lipofundin®/ρυθμιστικό διάλυμα	8.75:91.25	4.375:95.625
HCl/NaOH (mM)	qs pH 5.0	qs pH 3.0
NaCl (mM)	181.7	127.5
pH	5	3



Πίνακας Α.3: Σύσταση και pH υγρών μέσων που προσομοιώνουν τα ενδοαυλικά περιεχόμενα του ανώτερου/μεσαίου/κατώτερου λεπτού και του ανιόντος παχέος εντέρου σε επίπεδο προσομοίωσης II σε συνθήκες πέψης (Markopoulos *et al.*, 2015; Reppas *et al.* 2020; Georgaka *et al.*, 2017).

	FeSSIF-V <sub>2</sub>	FeSSIF <sub>midgut</sub>	SIF <sub>ileum</sub>	FeSSCoF
Ταυροχολικό νάτριο (mM)	10	5	0.8	-
Χολικό νάτριο (mM)	-	-	-	0.6
Λεκιθίνη (mM)	2	1	0.2	0.5
Γλυκεριδικός μονοεστέρας του ελαϊκού οξέος (mM)	5	2.5	-	-
Ελαϊκό νάτριο (mM)	0.8	0.4	-	0.2
Γλυκόζη (mg/mL)	-	-	-	14
Tris (mM)	-	-	-	30.5
Μηλεϊνικό οξύ (mM)	71.9	46.5	52.8	30.15
NaOH (mM)	102.4	83	105	16.5
NaCl (mM)	125.5	102.6	30.1	34
pH	5.8	6.5	8	6

#### A.1.2 Σταθερότητα του φαρμάκου στο μικροβίωμα του κατώτερου εντέρου

Ο όρος «μικροβιακή χλωρίδα» έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει το σύνολο των μικροοργανισμών που αποικούν στις επιφάνειες του σώματος, συμπεριλαμβανομένου και του γαστρεντερικού σωλήνα. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, ο συνολικός αριθμός βακτηρίων που αποικίζουν το σώμα - συμπεριλαμβανομένης της επιδερμίδας και της στοματικής κοιλότητας - ενός ενήλικα ηλικίας 20-30 ετών, βάρους 70 κιλών και ύψους 170 εκατοστών εκτιμήθηκε κατά προσέγγιση ότι ανέρχεται στα  $4 \times 10^{13}$  (Haller *et al.*, 2018).

Ο όρος «χλωρίδα» επικράτησε λόγω της αρχικής υπόθεσης ότι οι μικροοργανισμοί ήταν φυτικής προέλευσης, κάτι που σήμερα γνωρίζουμε πως δεν ισχύει. Για το λόγο αυτό, πλέον έχει καθιερωθεί ο όρος «μικροβίωμα» που περιγράφει το σύνολο των μικροοργανισμών σε μια περιοχή. Το ανθρώπινο μικροβίωμα

αποτελείται από βακτήρια (κυρίως), αρχαία, ιούς, μύκητες, που φυσιολογικά αποικίζουν το ανθρώπινο σώμα, και κυρίως την περιοχή του εντέρου (Shreiner *et al.*, 2015).

Το μικροβίωμα στο γαστρεντερικό σωλήνα συνολικά περιλαμβάνει περισσότερα από 400 είδη βακτηρίων, συγκροτώντας ένα εξαιρετικά πολύπλοκο μικροοικοσύστημα (Shamat, 1993). Η βακτηριακή συγκέντρωση στο δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα και τον ειλέο κυμαίνεται εντός ενός εύρους  $10^3 \sim 10^4$  CFU/ml. Στο παχύ έντερο η συγκέντρωση των βακτηρίων φτάνει τα  $10^{11} \sim 10^{12}$  CFU/ml, καθιστώντας το ως την πυκνότερη σε μικροβίωμα περιοχή, όχι μόνο στον γαστρεντερικό σωλήνα, αλλά και σε ολόκληρο το σώμα (Xu *et al.*, 2017).

Τα βακτήρια που αποικίζουν το κατώτερο, κυρίως, έντερο παράγουν ένζυμα που εμφανίζουν έντονη μεταβολική ενεργότητα. Υποστρώματα αυτών των ενζύμων αποτελούν κυρίως θρεπτικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες και υδατάνθρακες που δεν έχουν διασπαστεί στα αρχικά τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα, αλλά και ξενοβιοτικές ουσίες, όπως τα φάρμακα (Shamat, 1993). Έχει βρεθεί ότι περισσότερα από 50 φάρμακα βιομετατρέπονται από το μικροβίωμα του κατώτερου εντέρου, χωρίς να συμπεριλαμβάνονται στον αριθμό αυτόν τα αντιβιοτικά. Οι αντιδράσεις αυτές αφορούν:

- α) σε διάσπαση του δραστικού μορίου σε ανενεργούς μεταβολίτες, π.χ. στην περίπτωση της μετρονιδαζόλης,
- β) σε διάσπαση προς το δραστικό μεταβολίτη όταν πρόκειται για προφάρμακο, π.χ. στην περίπτωση της ολσαλαζίνης,
- γ) στην παραγωγή τοξικών μεταβολιτών, όπως στην περίπτωση της σουλφασαλαζίνης και του τοξικού μεταβολίτη σουλφαπυριδίνης,
- δ) στην παραγωγή μεταβολιτών που προκαλούν τερατογένεση, όπως στην περίπτωση της νιτραζεπάμης
- ε) στην παραγωγή μεταβολιτών που αλληλεπιδρούν με άλλα φάρμακα, ενισχύοντας την τοξικότητά τους, όπως ο μεταβολίτης του αντικού φαρμάκου σοριβουδίνη, ο οποίος παράγεται από τα βακτήρια και παρεμποδίζει τη βιομετατροπή του αντικαρκινικού φαρμάκου φθοροουρακίλη στο ήπαρ. Μάλιστα, η συγχορήγηση αυτών των δύο φαρμάκων προκάλεσε περισσότερους από 15 θανάτους στη δεκαετία του 1990 (Karatza *et al.*, 2017).

Σε ορισμένες μάλιστα περιπτώσεις οι κίνδυνοι τοξικότητας και τερατογένεσης έγιναν γνωστοί μετά την κυκλοφορία του προϊόντος.

Εκτός από την άμεση συμμετοχή βακτηρίων του εντέρου στη βιομετατροπή φαρμάκων, έχει παρατηρηθεί και έμμεση επίδραση σε φαρμακοκινητικές παραμέτρους (Zhang *et al.*, 2018). Επιπλέον, εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η επίδραση των β-γλυκουρονιδασών, βακτηριακών ενζύμων που διασπούν τα γλυκουρονίδια που έχουν σχηματιστεί στο ήπαρ στα πλαίσια της ηπατικής κάθαρσης, αυξάνοντας την ποσότητα του μητρικού φαρμάκου στον εντερικό αυλό. Τα γλυκουρονίδια εκκρίνονται στη χολή μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας και, μέσω των β-γλυκουρονιδασών των βακτηρίων του κατώτερου εντέρου, διασπώνται προς το μητρικό φάρμακο. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί σε μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως η δικλοφενάκη και η ινδομεθακίνη (μη εκλεκτικοί αναστολείς κυκλοοξυγενάσης), αλλά και σε αντικαρκινικά, όπως η ιρινοτεκάνη, και θεωρείται ότι συμβάλλει στην τοξική δράση (π.χ. αιμορραγική εντεροπάθεια) που παρουσιάζουν τα φάρμακα αυτά στο κατώτερο έντερο (Zhang *et al.*, 2018).

Η βακτηριακή αποικοδόμηση *per os* χορηγούμενων φαρμάκων στο κατώτερο έντερο έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην περίπτωση όπου το θεραπευτικό αποτέλεσμα προϋποθέτει απορρόφηση και από εκείνη την περιοχή, π.χ. σε προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης και σε προϊόντα που ασκούν τοπική δράση στο κατώτερο έντερο. Επίσης έχει ιδιαίτερη σημασία, όταν το χορηγούμενο φαρμακευτικό προϊόν είναι προφάρμακο, οπότε επιδιώκεται η αποικοδόμηση του από τα βακτήρια του κατώτερου εντέρου προς το δραστικό συστατικό, όπως στην περίπτωση της ολσαλαζίνης που διασπάται στο δραστικό σαλικυλικό οξύ. Επιπρόσθετα, είναι χρήσιμη για την αξιολόγηση της επικινδυνότητας αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκων, όπως στην περίπτωση συγχορήγησης του αντικού φαρμάκου σοριβουδίνη και του αντιμεταβολίτη 5-φθοροουρακίλη (Karatzia *et al.*, 2017).

Δεδομένης της δύσκολης προσβασιμότητας του παχέος εντέρου, το πιο συνηθισμένο υλικό για τη μελέτη βακτηριακής διάσπασης είναι το υλικό από κόπρανα ανθρώπων (Sousa *et al.*, 2008). Στις μελέτες αυτές κόπρανα από υγιείς ενήλικες συλλέγονται και μεταφέρονται σε θάλαμο, στον οποίο υπάρχουν κατάλληλες συνθήκες, ώστε να διατηρηθεί η βιωσιμότητα των αναερόβιων βακτηρίων.

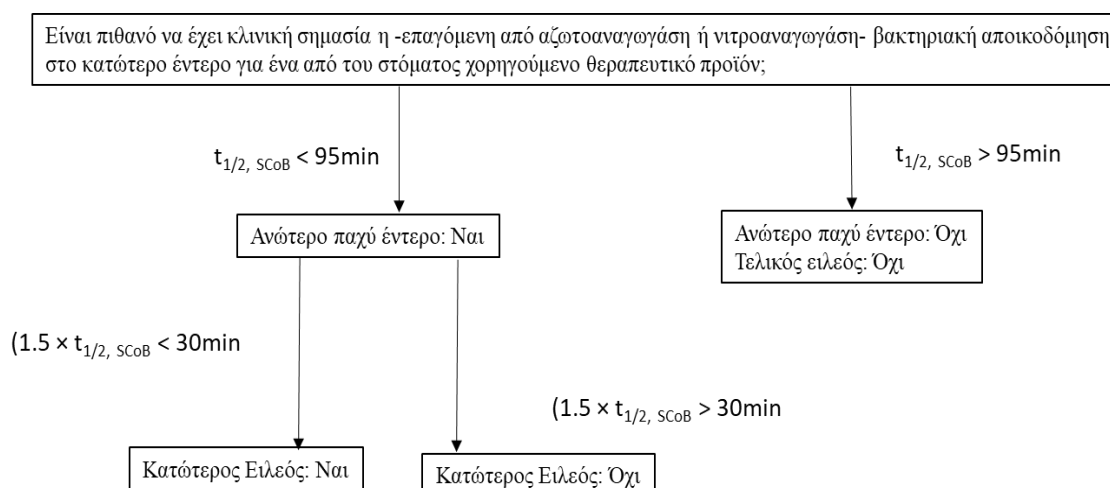
Τα κόπρανα αραιώνονται με φυσιολογικό ορό (Tannergrén *et al.*, 2014) ή με ρυθμιστικό διάλυμα (Sousa *et al.*, 2014). Υλικό από κόπρανα ενηλίκων έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτη βακτηριακής σταθερότητας τουλάχιστον 30 φαρμακευτικών ουσιών (Sousa *et al.*, 2008, Vertzoni *et al.*, 2011, Yadav *et al.*, 2013, και Sousa *et al.*, 2014).

Εκ νίνο μελέτη βακτηριακής σταθερότητας έχει γίνει και σε υλικό που έχει συλλεχθεί από τα περιεχόμενα του ανιόντος παχέος εντέρου υγιών ενηλίκων κατά την διαπεπτική περίοδο και κατά την περίοδο πέψης (Vertzoni *et al.*, 2011). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν, ότι, για τις φαρμακευτικές ουσίες μετρονιδαζόλη και ολσαλαζίνη, η βακτηριακή ενεργότητα στα περιεχόμενα του ανιόντος παχέος εντέρου που συλλέχθηκαν κατά την διαπεπτική περίοδο ήταν μεγαλύτερη από αυτή που εκτιμήθηκε στα περιεχόμενα που συλλέχθηκαν από την ίδια περιοχή κατά την περίοδο πέψης. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην εν λόγω μελέτη, η βακτηριακή ενεργότητα σε υλικό από κόπρανα που είχαν συλλεχθεί από υγιείς ενήλικες ήταν μεγαλύτερη από αυτήν που εκτιμήθηκε στα περιεχόμενα του ανιόντος παχέος εντέρου.

Μελέτη της βακτηριακής σταθερότητας των ίδιων ουσιών έχει γίνει και σε υλικό που έχει συλλεχθεί από τα περιεχόμενα του τελικού τμήματος του ειλεού και του τυφλού υγιών ενηλίκων κατά τη διαπεπτική περίοδο και κατά την περίοδο πέψης (Karatzas *et al.*, 2017). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η βακτηριακή ενεργότητα στα περιεχόμενα του τελικού ειλεού δεν επηρεάστηκε από τη λήψη τροφής, ενώ η βακτηριακή ενεργότητα στα περιεχόμενα του τυφλού που συλλέχθηκαν κατά την περίοδο πέψης ήταν μικρότερη από αυτή που εκτιμήθηκε στα περιεχόμενα που συλλέχθηκαν από την ίδια περιοχή κατά τη διαπεπτική περίοδο. Πιθανότατα, τα υπολείμματα τροφής μειώνουν την βακτηριακή διάσπαση των φαρμάκων, μέσω ενός μηχανισμού συναγωνιστικής παρεμπόδισης της βακτηριακής ενζυμικής δραστηριότητας. Επιπλέον, σε κάθε περίπτωση, η κινητική διάσπασης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης σε περιεχόμενα που συλλέχθηκαν από το τυφλό ήταν ταχύτερη από αυτήν που εκτιμήθηκε σε περιεχόμενα του τελικού ειλεού, ενώ δεν διέφερε στατιστικά από εκείνη που είχε εκτιμηθεί στα περιεχόμενα του ανιόντος παχέος εντέρου σε προηγούμενη μελέτη (Vertzoni *et al.*, 2011, Karatzas *et al.*, 2017).

Σε μελέτη βακτηριακής διάσπασης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης που διεξήγαγαν οι Sulaiman *et al* (2018) φάνηκε ότι η διατομική μεταβλητότητα της βακτηριακής ενεργότητας σε υλικό από κόπρανα ξεπερνούσε το 50% και στους 3 πληθυσμούς που μελετήθηκαν [(παιδιά, ενήλικες, υπερήλικες) (Sulaiman *et al.*, 2018)]. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται σε πολυάριθμες πηγές η μεγάλη διατομική μεταβλητότητα που παρουσιάζει το μικροβίωμα κατά μήκος του εντερικού αυλού (π.χ. Lavelle *et al.*, 2016).

Οι Vertzoni *et al* (2018) χρησιμοποίησαν αποτελέσματα από τις παραπάνω μελέτες, σε συνδυασμό με την αξιολόγηση της βακτηριακής διάσπασης σε υλικό από κόπρανα 6 φαρμάκων που λειτούργησαν ως πρότυπα, για να προτείνουν ένα βελτιστοποιημένο, με κλινική σημασία, υλικό από κόπρανα. Συγκεκριμένα πρότειναν το SIB (Simulated Ileal Bacteria), το οποίο αποτελείται από 5.5% (w/v) κόπρανα σε φυσιολογικό ορό και το SCoB (Simulated Colonic Bacteria), το οποίο αποτελείται από 8.3% (w/v) κόπρανα σε φυσιολογικό ορό. Οι συγκεκριμένες συστάσεις είναι τέτοιες ώστε να προσομοιάζουν τη βακτηριακή ενεργότητα στην περιοχή του ειλεού και του ανιόντος παχέος εντέρου αντίστοιχα. Επιπλέον, πρότειναν έναν αλγόριθμο για την αξιολόγηση της κλινικής σημασίας της βακτηριακής διάσπασης στο SCoB (Σχήμα A.4).



Σχήμα A.4: Αξιολόγηση της πιθανότητας για κλινικώς σημαντική βακτηριακή διάσπαση θεραπευτικών προϊόντων στον κατώτερο ειλεό και το ανώτερο παχύ έντερο (Vertzoni *et al.*, 2018).

#### A.1.3 Μεταφορά του φαρμάκου μέσω του επιθηλίου του κατώτερου εντέρου

Το τοίχωμα του κατώτερου εντέρου, και πιο συγκεκριμένα του παχέος εντέρου, παρουσιάζει μορφολογικές διαφορές συγκριτικά με το εντερικό τοίχωμα στο δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα αλλά και τον ειλεό, με βασική την απουσία αναδιπλώσεων (λάχνες) στο παχύ έντερο, και αποτέλεσμα τη μικρότερη διαθέσιμη για απορρόφηση έκταση επιφάνειας. Εκτιμάται, ότι ο γαστρεντερικός σωλήνας έχει έκταση επιφάνειας

που ανέρχεται κατά μέσο όρο στα 32 m<sup>2</sup>, από τα οποία μόλις περίπου τα 2 m<sup>2</sup> αφορούν σε ολόκληρο το κατώτερο έντερο, δηλαδή στον τελικό ειλεό και το παχύ έντερο, ενώ μόνο η επιφάνεια του παχέος εντέρου προσεγγίζει τα 0.34 m<sup>2</sup> (Helander and Fändriks, 2014). Έτσι, ενώ η απορρόφηση από κατώτερο έντερο ευνοείται από μεγαλύτερους χρόνους παραμονής σε σχέση με τα ανώτερα τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα, δυσκολεύεται εξαιτίας και της μικρότερης επιφάνειας (Xu et al, 2017).

Σε μελέτη των Dahlgren *et al* (2016) φάνηκε σημαντική διαφοροποίηση στη διαπερατότητα της ατενολόλης, φαρμάκου χαμηλής διαπερατότητας κατά BCS, τόσο ανάμεσα στη νήστιδα και το παχύ έντερο, όσο και ανάμεσα στον ειλεό και το παχύ έντερο. Για την εκτίμηση της ενδοαυλικής διαπερατότητας έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης στο αίμα μετά από ενδοφλέβια χορήγηση και μετά από ενδοαυλική χορήγηση δόσης φαρμάκου σε μορφή διαλύματος, και αποσυνέλιξη. Μέσα από τη συγκεκριμένη μελέτη, η διαφοροποίηση φαίνεται να είναι στατιστικά μη σημαντική σε ουσίες με υψηλή διαπερατότητα, όπως είναι η μετοπρολόλη. Δεδομένης της μεγάλης μεταβλητότητας στα δεδομένα είναι σημαντικό να επεκταθούν οι βάσεις δεδομένων με δεδομένα διαπερατότητας και να αξιολογούνται σε ευρεία κλίμακα με τη βοήθεια *in silico* μοντέλων (Dahlgren *et al.*, 2016).

Σήμερα η διαπερατότητα της εντερικής βλεννογόνου εκτιμάται *in vitro* σε κυτταρικές σειρές π.χ σειρές κυττάρων από αδenoκαρκίνωμα του παχέος εντέρου, που έχουν περιορισμένη έκφραση φορέων και ενζύμων του κυτοχρώματος (Caco-2 κυτταρικές σειρές) ή τεχνητές μεμβράνες που προτιμώνται για ουσίες που μεταφέρονται με παθητική απορρόφηση, διότι δεν έχουν καθόλου φορείς (PAMPA: Parallel Artificial Membrane Permeability Assay, AMI: Artificial Membrane Insert) (Rosenberger *et al.*, 2019). Επιπλέον μπορεί να εκτιμηθεί *in situ* σε εντερικό ιστό πειραματοζώου και λιγότερο συχνά με διαπύση εντέρου σε πειραματόζωο ή διαπύση εντέρου στον άνθρωπο (σπάνια). Η εκτίμηση της διαπερατότητας μπορεί να γίνει και με βάση το % απορροφηθέν ποσοστό της χορηγούμενης δόσης μετά από ενδοαυλική και ενδοφλέβια χορήγηση, αντίστοιχα (Dahlgren and Lennernäs., 2019).

## A.2. Στόχοι της παρούσας μελέτης

Η παρούσα μελέτη είχε δυο στόχους.

Ο πρώτος ήταν η αξιολόγηση της πιθανότητας ανάπτυξης προϊόντος τροποποιημένης αποδέσμευσης του συνδυασμού δραστικών ουσιών A. Το A αποτελεί συνδυασμό 2 δραστικών ουσιών, της A1 και της A2, υπό μορφή ενός ένυδρου άλατος.

Το μόριο A1 ανήκει στην κλάση III κατά BCS, είναι δηλαδή ουσία υψηλής διαλυτότητας και χαμηλής διαπερατότητας ([www.accessdata.fda.gov](http://www.accessdata.fda.gov)). Είναι αμφιπρωτικό μόριο με τιμές  $pK_a=3.9$  για την όξινη ομάδα και  $pK_a=4.7$  για τη βασική ομάδα. Ο  $\log D$  του A1 βρέθηκε ίσος με  $-1.49$ , ενώ η διαλυτότητα σε νερό, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ( $pH=6.8$ ) και κιτρικών ( $pH=3$  και  $5$ ) είναι  $>100$ ,  $>50$ ,  $3.8$  και  $10.1$  mg/mL, αντίστοιχα (δεδομένα Novartis στο αρχείο). Αξίζει να σημειωθεί, ότι η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα του απο του στόματος χορηγούμενου A1 είναι μεγαλύτερη όταν χορηγείται υπό τη μορφή του A, παρά ως ιδιοσκεύασμα, χωρίς ωστόσο οι λόγοι να είναι σαφείς ([www.accessdata.fda.gov](http://www.accessdata.fda.gov)).

Το μόριο A2 είναι ευδιάλυτο και, χορηγούμενο υπό τη μορφή A, εμφανίζει ταχείς ρυθμούς απορρόφησης και μεγάλη έκταση απορρόφησης (70-90% απορρόφηση σε ποντίκια, αρουραίους και σκύλους, και 40% σε πιθήκους ([www.ema.europa.eu/en/](http://www.ema.europa.eu/en/)). Το A2 έχει  $pK_a=4.6$ ,  $\log D=1.29$  και η διαλυτότητα που παρουσιάζει σε νερό, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ( $pH=6.8$ ) και κιτρικών ( $pH=3$  και  $5$ ) είναι  $>100$ ,  $>50$ ,  $0.38$  και  $1.4$  mg/mL, αντίστοιχα (δεδομένα Novartis).

Η πιθανότητα ανάπτυξης προϊόντος τροποποιημένης αποδέσμευσης συνδυασμού θεραπευτικών παραγόντων A αξιολογήθηκε με βάση δεδομένα

- αποδέσμευσης του συνδυασμού δραστικών ουσιών A από δοκιμαστικά προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης σε συνθήκες που προσομοιώνουν τη διαπεπτική περίοδο και την περίοδο πέψης (Reppas *et al.*, 2020), και
- σταθερότητας των δραστικών ουσιών του A στο μικροβίωμα του κατώτερου εντέρου χρησιμοποιώντας βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα ενηλίκων (Vertzoni *et al.*, 2018).

Ο δεύτερος στόχος ήταν η διερεύνηση της μεταβλητότητας της βακτηριακής ενεργότητας υλικού από κόπρανα υγιών ενηλίκων με βάση δεδομένα αποικοδόμησης της ολσαλαζίνης και μετρονιδαζόλης (Karatza *et al.*, 2016). Συγκεκριμένα μελετήθηκαν:

- κατά το πόσο υλικό που παρασκευάστηκε για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης παρουσιάζει σημαντικά διαφορετική βακτηριακή ενεργότητα από υλικό που είχε παρασκευασθεί με παρόμοιο τρόπο από άλλους εθελοντές για τις ανάγκες προηγούμενης μελέτης (Karatza *et al.*, 2016), και

- κατά πόσο η βακτηριακή ενεργότητα υλικού από κόπρανα, που έχει διατηρηθεί στους -70 °C για 48 μήνες (Karatza *et al.*, 2016), παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις στη βακτηριακή ενεργότητα.



## B. Πειραματικό Μέρος

### B.1 Οργανολογία

- Αναδευτήρας περιδίνησης, MS 3 basic, IKA® Works, Inc. (Wilmington, U.S.A.)
- Αναερόβιος θάλαμος, Elektrotek Anaerobic Workstation – AW 500TG Two Gas Version (West Yorkshire, U.K.)
- Αναλυτικός ζυγός, Kern 770, Kern & Sohn GmbH (Albstadt, Germany)
- Αναμικτήρας, Izzy Chopper Multi, Intertek (London, U.K.)
- Διάταξη περιστρεφόμενου πτερυγίου Erweka®, Erweka GmbH (Heusenstamm, Germany)
- Διάταξη συνεχούς ροής Erweka®, model DFZ60, Erweka GmbH, (Heusenstamm, Germany) με κύτταρα 22.6mm και αντλία πιστονιού Erweka
- Θερμοστατούμενη ανακινούμενη διάταξη, Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf AG (Hamburg, Germany)
- Κόσκινο, διάμετρος 20 cm, μέγεθος οπών 355μm, Retsch (Haan, Germany)
- Λουτρό υπερήχων, Elmasonic S100H, Elma Schmidbauer GmbH (Singer, Germany)
- Μαγνητική πλάκα ανάδευσης, RH basic, IKA® Works, INC. (Wilmington, U.S.A.)
- Πεχάμετρο, CG842, Schott (Mainz, Germany)
- Πιπέττες ακριβείας
- Προστήλη Hypersil BDS-C18 (10 mm×4 mm, 5 μm), Thermo Fisher Scientific Inc., (Massachusetts, U.S.A.)
- Στήλη C18 (150 x 3.0 mm ID, 5 μm) Fortis™, Fortis™ Technologies Ltd (Cheshire, U.K.)
- Στήλη Hypersil BDS-C18 ((250 x 4.6 mm, 5 μm), Thermo Fisher Scientific Inc., (Massachusetts, U.S.A.)
- 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 UV 1000, 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, Universal 32R, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Germany)

## **B.2 Αντιδραστήρια**

- FaSSCoF Powder [Fasted State Biorelevant Dissolution Medium for Colon], biorelevant.com
- FeSSCoF Powder [Fed State Biorelevant Dissolution Medium for Colon], biorelevant.com
- FaSSIF-V2 Powder [ Fasted State Biorelevant Dissolution Medium (Version 2)], biorelevant.com
- FeSSIF-V2 Powder [Fed State Biorelevant Dissolution Medium (Version 2)], biorelevant.com
- FaSSIF/FeSSIF/FaSSGF Powder (SIF powder) [Fasted and Fed State Biorelevant Dissolution Medium], biorelevant.com
- Lipofundin® MCT 20%, B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Germany)
- Trizma® Base, τρι-υδροξυ-μεθυλο-αμινομεθανίου,  $C_4H_{11}NO_3$ , κατάλληλο για χημικό αντιδραστήριο, Minimum 99.9%, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Ακετονιτρίλιο, βαθμού καθαρότητας HPLC, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Γλυκόζη, BioXtra  $\geq 99,5\%$  (GC) , Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Ισοπροπανόλη, βαθμού καθαρότητας HPLC, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Μπλε του μεθυλενίου, Merck (New Jersey, U.S.A.)

- Μυρμηκικό οξύ, 98-100%, Reag ACS, Reag.Ph.Eur., Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Νερό, βαθμού καθαρότητας HPLC, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Οξικό νάτριο, Sodium Acetate Anhydrous, Fisher Scientific U.K. (Leicestershire, U.K.)
- Όξινο οξύ (πυκνό), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Merck KgaA (Darmstadt, Germany)
- Όξινο ανθρακικό νάτριο, Panreac (Barcelona, Spain)
- Τριφθοροξικό οξύ, 99%, Reagent Plus, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Υδροξείδιο του νατρίου, puriss. P.a. AU reagent, reag.Ph.Eur.  $K \leq 0.02\%$ ,  $\geq 98\%$ , σφαιρίδια, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)
- Υδροχλωρικό οξύ, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, SG 1.18, ~ 37%, Fisher Scientific U.K. (Leicestershire, U.K.)
- Φυσιολογικός ορός, 0,9% χλωριούχο νάτριο, Demo Pharmaceuticals (Krioneri, Greece)
- Χλωριούχο νάτριο, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας,  $\geq 99.8\%$ , Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.)

### **B.3 Δραστικές ουσίες - Φαρμακευτικά προϊόντα**

- Ένυδρο, μετά νατρίου άλας του A1 και του A2 (A) (Batch # C061, καθαρότητα 99.5%), Novartis, Basel, Switzerland
- Μετρονιδαζόλη, Lot No SLBG3633V, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, U.S.A.
- Μετά νατρίου άλας της ολσαλαζίνης, Lot No F140001, Farchemia S.R.L, Treviglio, Italy
- Μικροδισκία άμεσης αποδέσμευσης του μετά νατρίου άλατος του A1 και του A2 (A) (200mg / 64 μικροδισκία, Batch: 1010023605), Novartis, Basel, Switzerland

- Μικροδισκία τροποποιημένης αποδέσμευσης του μετά νατρίου άλατος του A1 και του A2 (A) (MR1, (200mg / 64 μικροδισκία), Novartis, Basel, Switzerland
- Μικροδισκία τροποποιημένης αποδέσμευσης του μετά νατρίου άλατος του A1 και του A2 (A) (MR2, 200mg / 64 μικροδισκία), Novartis, Basel, Switzerland
- Μικροδισκία τροποποιημένης αποδέσμευσης του μετά νατρίου άλατος του A1 και του A2 (A) (MR3, 200mg / 64 μικροδισκία), Novartis, Basel, Switzerland

#### **B.4 Υλικά**

- Γυάλινα σφαιρίδια (1mm και 5mm), διάταξης συνεχούς ροής Erweka<sup>®</sup>, Erweka GmbH (Heusenstamm, Germany)
- Ηθμοί GF/F διαμέτρου 25 mm, με μέσο μέγεθος πόρων 0.7 μm, GE Healthcare Whatman, Germany
- Ηθμοί GF/D διαμέτρου 25 mm, με μέσο μέγεθος πόρων 2.7 μm, GE Healthcare Whatman, Germany
- Ηθμοί MNGF-5 διαμέτρου 25 mm, με μέσο μέγεθος πόρων 0.4 μm, Macherey-Nagel, Germany
- Οξείδιο του αργιλίου (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), Sigma Aldrich, Germany
- Υαλοβάμβακας, Sigma Aldrich, Germany

## **B.5 Εκτίμηση της διάλυσης του συνδυασμού δραστικών ουσιών Α από μικροδισκία άμεσης αποδέσμευσης και δοκιμαστικά προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης σε συνθήκες που προσομοιώνουν τη διαπεπτική περίοδο και την περίοδο πέψης**

### *B.5.1 Παρασκευή των μέσων που προσομοιώνουν τη σύσταση των περιεχομένων του γαστρεντερικού αυλού*

#### Διαπεπτική Περίοδος

**FaSSGF Επιπέδου Προσομοίωσης II (1 L):** Σε ποτήρι ζέσεως (1 L) προστίθενται περίπου 900 mL απιονισμένου νερού (H<sub>2</sub>O) και διαλύθηκαν 1.9986 g χλωριούχου νατρίου (NaCl). Προστέθηκε 1.65 mL πυκνού υδροχλωρικού οξέος (HCl). Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 1.6 με προσθήκη, αν απαιτείται, στάγδην αραιωμένου διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (HCl). Ακολουθεί πλήρωση με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Σε 500 mL από το διάλυμα που προκύπτει, διαλύονται 0.06 g SIF Powder (για την ενσωμάτωση της ποσότητας του ταυροχολικού νατρίου και της φωσφατιδυλοχολίνης) και έπειτα προστίθενται τα υπόλοιπα 500 mL. Το τελικό διάλυμα πρέπει να παραμείνει για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου προτού χρησιμοποιηθεί. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες (Markopoulos *et al.*, 2015).

**FaSSIF-V2 Επιπέδου Προσομοίωσης II (1 L):** Σε ποτήρι ζέσεως (1 L) προστίθενται περίπου 800 mL απιονισμένου νερού (H<sub>2</sub>O) και διαλύονται 2.2169 g μηλεϊνικού οξέος (maleic acid) και 4.0089 g χλωριούχου νατρίου (NaCl). Το pH του διαλύματος που προκύπτει ρυθμίζεται στην τιμή 6.5 με στάγδην προσθήκη διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0.5 M (περίπου 70 mL). Ακολουθεί μεταφορά σε ογκομετρική φιάλη και συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. Σε 500 mL από το διάλυμα αυτό διαλύονται 1.7900 g FaSSIF-V2 Powder (για την ενσωμάτωση της κατάλληλης ποσότητας του ταυροχολικού νατρίου και της φωσφατιδυλοχολίνης) και έπειτα προστίθενται τα υπόλοιπα 500 mL. Ακολουθεί μεταφορά του περιεχομένου στην ογκομετρική φιάλη και συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό, αν η στάθμη είναι χαμηλότερη. Το τελικό διάλυμα πρέπει να παραμείνει για 2 ώρες σε

θερμοκρασία δωματίου προτού χρησιμοποιηθεί. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες (Markopoulos *et al.*, 2015).

**FaSSIF-V2<sub>midgut</sub> Επιπέδου Προσομοίωσης II** (1 L): Σε ποτήρι ζέσεως (1 L) προστίθενται περίπου 850 mL απιονισμένου νερού (H<sub>2</sub>O) και διαλύονται 2.2402 g μηλεϊνικού οξέος (maleic acid) και 4.4473 g χλωριούχου νατρίου (NaCl). Το pH του διαλύματος που προκύπτει ρυθμίζεται στην τιμή 6.8 με προσθήκη στάγδην διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0.5 M (περίπου 70 mL). Ακολουθεί μεταφορά σε ογκομετρική φιάλη και συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. Σε 500 mL από το διάλυμα αυτό διαλύονται 0.8950 g FaSSIF-V2 Powder (για την ενσωμάτωση της κατάλληλης ποσότητας του ταυροχολικού νατρίου και της φωσφατιδυλογολίνης) και έπειτα προστίθενται τα υπόλοιπα 500 mL. Ακολουθεί μεταφορά του περιεχομένου στην ογκομετρική φιάλη και συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό, αν η στάθμη είναι χαμηλότερη. Το τελικό διάλυμα πρέπει να παραμείνει για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου προτού χρησιμοποιηθεί. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες (Markopoulos *et al.*, 2015).

**SIF<sub>ileum</sub> -V2 Επιπέδου Προσομοίωσης I/II** (1 L) : Σε ποτήρι ζέσεως (1 L) προστίθενται περίπου 450 mL απιονισμένου νερού (H<sub>2</sub>O) και διαλύονται 13.9284 g μηλεϊνικού οξέος (maleic acid). Το pH του διαλύματος που προκύπτει ρυθμίζεται στην τιμή 8.0 με προσθήκη στάγδην διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0.5 M (περίπου 483 mL). Ακολουθεί μεταφορά του περιεχομένου στην ογκομετρική φιάλη και συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό (Georgaka *et al.*, 2017; Reppas *et al.*, 2020).

Στην περίπτωση του μέσου SIF<sub>ileum</sub>, που προσομοιώνει τα ενδοαυτικά χαρακτηριστικά του τελικού ειλεού, έχει βρεθεί η παραπάνω σύσταση, η οποία είναι ίδια για τα επίπεδα προσομοίωσης I και II της Διαπεπτικής Περιόδου και της Περιόδου Πέψης (Georgaka *et al.*, 2017; Reppas *et al.*, 2020).

**FaSSCoF Επιπέδου Προσομοίωσης II** (1 L): Σε ποτήρι ζέσεως (1 L) προστίθενται περίπου 700 mL απιονισμένου νερού (H<sub>2</sub>O) και διαλύονται 8.7981 g μηλεϊνικού οξέος (maleic acid) και 5.4950 g τρι-υδροξυ-μεθυλο-αμινομεθανίου (Trizma<sup>®</sup> Base). Το pH του διαλύματος που προκύπτει ρυθμίζεται στην τιμή 7.8 με προσθήκη στάγδην διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0.5 M (περίπου 240 mL).

Ακολουθεί μεταφορά του περιεχομένου στην ογκομετρική φιάλη και συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. Σε 500 mL από το διάλυμα που προκύπτει διαλύονται 0.34 g σκόνης FaSSCoF μέχρι πλήρους διάλυσης και έπειτα προστίθενται τα υπόλοιπα 500 mL. Το τελικό διάλυμα πρέπει να παραμείνει για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου προτού χρησιμοποιηθεί. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες (Markopoulos *et al.*, 2015; Reppas *et al.*, 2020).

### Περίοδος Πέψης

**FeSSGF Επιπέδου Προσομοίωσης II (1 L):** Σε ποτήρι ζέσεως (1 L) προστίθενται περίπου 900 mL απιονισμένου νερού (H<sub>2</sub>O) και διαλύονται 2.7053 g οξικού νατρίου (sodium acetate), 10.6185 g χλωριούχου νατρίου (NaCl) και 18.3 mL διαλύματος οξικού οξέος συγκέντρωσης 1 M (παρασκευάζεται με αραιώση 5.73 mL πυκνού οξικού οξέος σε 100 mL απιονισμένου νερού). Το pH του διαλύματος που προκύπτει ρυθμίζεται στην τιμή 5.0 με προσθήκη στάγδην διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0.5 M (απαιτούνται περίπου 8 ml). Ακολουθεί μεταφορά του περιεχομένου στην ογκομετρική φιάλη και συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. 500 mL του διαλύματος αυτού μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως (1 L) και προστίθενται, υπό μαγνητική ανάδευση, 90 mL Lipofundin<sup>®</sup>. Στη συνέχεια προστίθενται σταδιακά 300 mL, περίπου, του ρυθμιστικού διαλύματος που παρασκευάστηκε ωρρίτερα. Ακολουθεί ρύθμιση του pH του διαλύματος, εντός του ποτηριού ζέσεως, στην τιμή 5.0, εφόσον χρειάζεται, με προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) ή οξικού οξέος (CH<sub>3</sub>COOH). Ακολουθεί μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη και συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με ρυθμιστικό διάλυμα (Markopoulos *et al.*, 2015; Reppas *et al.*, 2020).

**FeSSGF<sub>late</sub> Επιπέδου Προσομοίωσης II (1 L):** Σε ποτήρι ζέσεως (1 L) προστίθενται περίπου 800 mL απιονισμένου νερού (H<sub>2</sub>O) και διαλύονται 4.9920 g ένυδρου δισόξινου φωσφορικού νατρίου (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O) και 7.4511 g χλωριούχου νατρίου (NaCl). Το pH του διαλύματος που προκύπτει ρυθμίζεται στην τιμή 3.0 με προσθήκη στάγδην διαλύματος φωσφορικού οξέος (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (παρασκευάζεται με αραιώση 3.37 mL πυκνού φωσφορικού οξέος σε 100 mL απιονισμένου νερού). Ακολουθεί μεταφορά του περιεχομένου στην ογκομετρική φιάλη και συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. 500 mL του διαλύματος αυτού μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως (1

L) και προστίθενται, υπό μαγνητική ανάδευση, 45 mL Lipofundin®. Στη συνέχεια, προστίθενται σταδιακά περίπου 300 mL του ρυθμιστικού διαλύματος που παρασκευάστηκε νωρίτερα. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 3.0, εφόσον χρειάζεται, με προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) ή οξικού οξέος (CH<sub>3</sub>COOH). Ακολουθεί μεταφορά του διαλύματος που προκύπτει σε ογκομετρική φιάλη και συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με ρυθμιστικό διάλυμα (Markopoulos et al, 2015; Reppas *et al.*, 2020).

**FeSSIF-V2 Επιπέδου Προσομοίωσης II (1 L):** Σε ποτήρι ζέσεως (1 L) προστίθενται περίπου 750 mL απιονισμένου νερού (H<sub>2</sub>O) και διαλύονται 8.3454 g μηλεϊνικού οξέος (maleic acid) και 7.3342 g χλωριούχου νατρίου (NaCl). Το pH του διαλύματος που προκύπτει ρυθμίζεται στην τιμή 5.8 με προσθήκη στάγδην διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0.5 M (απαιτούνται περίπου 200 mL). Ακολουθεί μεταφορά του περιεχομένου στην ογκομετρική φιάλη και συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, σε 500 mL του διαλύματος αυτού, διαλύονται 9.760 g FeSSIF-V2 Powder (για την ενσωμάτωση της κατάλληλης ποσότητας του ταυροχολικού νατρίου και της φωσφατιδυλοχολίνης) και μετά προστίθενται τα υπόλοιπα 500 mL. Το τελικό διάλυμα πρέπει να παραμείνει για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου προτού χρησιμοποιηθεί. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες (Markopoulos *et al.*, 2015; Reppas *et al.*, 2020).

**FeSSIF<sub>midgut</sub> -V2 Επιπέδου Προσομοίωσης II (1 L):** Σε ποτήρι ζέσεως (1 L) προστίθενται περίπου 700 mL απιονισμένου νερού (H<sub>2</sub>O) και διαλύονται 5.3973 g μηλεϊνικού οξέος (maleic acid) και 5.9959 g χλωριούχου νατρίου (NaCl). Το pH του διαλύματος που προκύπτει ρυθμίζεται στην τιμή 6.5 με προσθήκη στάγδην διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0.5 M (απαιτούνται περίπου 160 mL). Ακολουθεί μεταφορά του περιεχομένου στην ογκομετρική φιάλη και συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, σε 500 mL του διαλύματος αυτού, διαλύονται 4.880 g FeSSIF-V2 Powder (για την ενσωμάτωση της κατάλληλης ποσότητας του ταυροχολικού νατρίου και της φωσφατιδυλοχολίνης), αναδεύονται μέχρι πλήρους διάλυσης και μετά προστίθενται τα υπόλοιπα 500 mL. Το τελικό διάλυμα πρέπει να παραμείνει για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου προτού χρησιμοποιηθεί. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες (Markopoulos *et al.*, 2015; Reppas *et al.*, 2020).



**FeSSCoF-V2 Επιπέδου Προσομοίωσης II (1 L):** Σε ποτήρι ζέσεως (1 L) προστίθενται περίπου 850 mL απιονισμένου νερού (H<sub>2</sub>O) και διαλύονται 7.5446 g μηλεϊνικού οξέος (maleic acid) και 7.8715 g τρι-υδροξυ-μεθυλο-αμινομεθανίου (Trizma<sup>®</sup> Base). Το pH του διαλύματος που προκύπτει ρυθμίζεται στην τιμή 6.0 με προσθήκη στάγδην διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0.5 M (απαιτούνται περίπου 74 mL). Ακολουθεί μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη του 1 L και αραίωση μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. Σε περίπου 500 mL από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται 0.74 g FeSSCoF Powder (για την ενσωμάτωση της κατάλληλης ποσότητας του ταυροχολικού νατρίου και της φωσφατιδυλοχολίνης), αναδεύονται μέχρι πλήρους διάλυσης και μετά προστίθενται τα υπόλοιπα 500 mL. Το τελικό διάλυμα πρέπει να παραμείνει για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου προτού χρησιμοποιηθεί. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες (Georgaka *et al.*, 2017; Reppas *et al.*, 2020).

#### *B.5.2. Προκαταρκτικά πειράματα με τη διάταξη συνεχούς ροής (USP Apparatus IV)*

Η διάταξη συνεχούς ροής συνίσταται στα ακόλουθα διακριτά τμήματα: μια δεξαμενή στην οποία τοποθετείται το υγρό μέσο διάλυσης, μια αντλία πιστονίων, η οποία προωθεί το υγρό μέσο από τη δεξαμενή στο εσωτερικό των κυττάρων, ένα υδατόλουτρο, για τη διατήρηση του συστήματος (μέσα διάλυσης κατά τη διανομή τους προς τα κύτταρα και περιεχόμενο κυττάρων) σε θερμοκρασία που προσομοιώνει εκείνη του ανθρωπίνου σώματος ( $37.0 \pm 0.5$  °C), καθώς και κύτταρα, εντός των οποίων και επί στερεωμένης σε εσωτερικές εγκοπές μεταλλικής υποδοχής (holder), τοποθετούνται τα φαρμακευτικά προϊόντα.

Στη διάταξη που χρησιμοποιήθηκε υπάρχουν έξι κύτταρα (Σχήμα B.1.). Τα κύτταρα εφαρμόζονταν στη διάταξη εντός κυλίνδρων, μέσα στους οποίους υπάρχει διαρκής ροή θερμοστατούμενου από το υδατόλουτρο νερού, με σκοπό τη ρύθμιση της θερμοκρασίας των περιεχομένων των κυττάρων. Τα κύτταρα στεγανοποιούνται και σταθεροποιούνται στη θέση τους με τη βοήθεια ελαστικών δακτυλίων τοποθετημένων στη βάση και στο επάνω μέρος τους και κοχλία στην κορυφή τους. Σε κάθε κύτταρο διαμέτρου 22.6 mm υπάρχουν κάθε στιγμή περίπου 20 mL μέσου διάλυσης. Στη βάση των κυττάρων τοποθετήθηκε ένα γυάλινο σφαιρίδιο διαμέτρου 5 mm και πάνω από αυτό ως τη χαραγή γυάλινα σφαιρίδια μικρότερης διαμέτρου (1 mm) έτσι, ώστε να

εξασφαλιστεί η κατά το δυνατόν ομαλότερη ροή αλλά και να αποφευχθεί η είσοδος στερεών, που τυχόν υπάρχουν, από το υγρό μέσο διάλυσης εντός του κυττάρου.



Σχήμα Β.1: Διάταξη συνεχούς ροής (Apparatus IV) (USP, 2000) Erweka που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Κατά τη διενέργεια των πειραμάτων με τη διάταξη συνεχούς ροής, αρχικά, τοποθετείται η δοσολογική μονάδα στο κύτταρο και ρυθμίζεται το υδατόλουτρο στη θερμοκρασία  $37.0 \pm 0.5$  °C. Στη συνέχεια, τίθεται σε λειτουργία η αντλία και το μέσο διάλυσης εισέρχεται στο κύτταρο από τη βάση του (με ορισμένη ταχύτητα ροής). Το μέσο, πριν εισέλθει στο κύτταρο, διέρχεται από το υδατόλουτρο και θερμοστατείται στην επιθυμητή θερμοκρασία (37.0 °C για τα per os χορηγούμενα προϊόντα). Με βάση τις προδιαγραφές η ταχύτητα ροής του μέσου μπορεί να κυμανθεί από 5 μέχρι 50 mL/min. Το μέσο εξέρχεται του κυττάρου μέσω ενός συστήματος ηθμών προσαρμοσμένων στο επάνω μέρος του, ώστε να αποφεύγεται η απώλεια μη διαλυμένων σωματιδίων.

Τα προϊόντα MR1, MR2, MR3 είναι μη αποσαθρούμενα και έχουν μέγεθος μικρότερο των 2 mm, επομένως η διάταξη συνεχούς ροής είναι χρήσιμη για την εκτίμηση της ενδοαυλικής συμπεριφοράς (Reppas *et al.*, 2020). Αντίθετα, δεδομένα αποδέσμευσης μεγάλων, μη αποσαθρούμενων προϊόντων, τα οποία αποδεσμεύουν σημαντικό

ποσοστό του φαρμάκου στο κατώτερο έντερο και έχουν συλλεχθεί με τη διάταξη συνεχούς ροής, πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή, γιατί οι υδροδυναμικές συνθήκες είναι ήπιες σε σχέση με τις ενδοαυλικές (Garbacz *et al.*, 2008).

Για την εύρεση του συνδυασμού ηθμών ώστε να εξασφαλισθεί η επάρκεια της διήθησης πραγματοποιήθηκαν πειράματα με το προϊόν άμεσης αποδέσμευσης. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων διάλυσης από μικροδισκία άμεσης αποδέσμευσης. Μια δοσολογική μονάδα (64 μικροδισκία) τοποθετήθηκε στο εσωτερικό του κυττάρου, διασκορπισμένη πάνω στα γυάλινα σφαιρίδια μικρότερης διαμέτρου, όπως φαίνεται στο Σχήμα Β.2.

Κάθετα προς τη ροή του μέσου διάλυσης και στο εσωτερικό άνω μέρος κάθε κυττάρου τοποθετήθηκαν κατά σειρά από το άνω στο κάτω μέρος του κυττάρου οι εξής συνδυασμοί μέσων διήθησης:

1. ηθμός μεγέθους πόρων 0.7  $\mu\text{m}$ , 1 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , ηθμός μεγέθους πόρων 2.7  $\mu\text{m}$
2. ηθμός μεγέθους πόρων 0.7  $\mu\text{m}$ , 1 g υαλοβάμβακας, ηθμός μεγέθους πόρων 2.7  $\mu\text{m}$
3. ηθμός μεγέθους πόρων 0.4  $\mu\text{m}$ , 0.7  $\mu\text{m}$ , 1 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , ηθμός μεγέθους πόρων 0.4  $\mu\text{m}$
4. ηθμός μεγέθους πόρων 0.7  $\mu\text{m}$ , ( $\times 2$ ) ηθμός μεγέθους πόρων 2.7  $\mu\text{m}$
5. ηθμός μεγέθους πόρων 0.4  $\mu\text{m}$ , 0.7  $\mu\text{m}$ , ( $\times 2$ ) ηθμός μεγέθους πόρων 2.7  $\mu\text{m}$
6. ( $\times 2$ ) ηθμός μεγέθους πόρων 0.7  $\mu\text{m}$ , ( $\times 2$ ) ηθμός μεγέθους πόρων 2.7  $\mu\text{m}$

Σε κάθε περίπτωση μετρήθηκε η συνολική ποσότητα του Α που είχε διαλυθεί μία ώρα μετά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, καθώς επίσης και η αντίστοιχη ποσότητα μετά από διήθηση με ηθμό αναγεννημένης κυτταρίνης με μέγεθος πόρων 0.45  $\mu\text{m}$  (Πίνακας Β.1).

Πίνακας Β.1: Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων διάλυσης Α άμεσης αποδέσμευσης με τη διάταξη συνεχούς ροής

Συνδυασμός ηθμών*	1	2	3	4	5	6
Ολική ποσότητα Α**	173.3	200.9	200.0	169.2	173.1	171.0
Ολική ποσότητα Α***	125.3	121.0	90.7	116.0	112.6	115.2
% Απώλεια	27.3	39.7	54.6	31.4	39.4	32.7

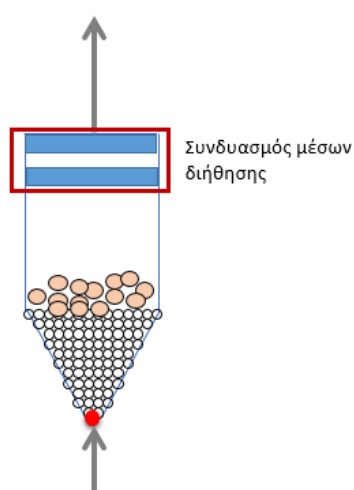
\* ο συνδυασμός που αντιστοιχεί σε κάθε αριθμό περιγράφεται στο κείμενο

\*\* που μετρήθηκε σε δείγματα που συλλέχθηκαν στην έξοδο από το κύτταρο

\*\*\* που μετρήθηκε μετά από διήθηση των δειγμάτων που εξέρχονταν από το κύτταρο μέσω ηθμών αναγεννημένης κυτταρίνης (0.45 μm)

Με βάση τον Πίνακα Β.1., η απώλεια στερού, αδιάλυτου Α κυμάνθηκε από 27.3 έως 54.6%, κι έτσι η διάταξη συνεχούς ροής κρίθηκε ακατάλληλη για τη διεξαγωγή πειραμάτων διάλυσης του σκευάσματος άμεσης αποδέσμευσης.

Αντίστοιχο προκαταρκτικό πείραμα με το συνδυασμό διήθησης 1 πραγματοποιήθηκε και για τα 3 προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης. Σε αυτή την περίπτωση, η απώλεια δεν ξεπερνούσε το 1%, κι έτσι ο συνδυασμός 1 κρίθηκε κατάλληλος για τα πειράματα διάλυσης με τη διάταξη συνεχούς ροής και δεν χρειάστηκαν επιπλέον προκαταρκτικά πειράματα για τα σκευάσματα τροποποιημένης αποδέσμευσης.



Σχήμα Β.2: Απεικόνιση κυττάρου διάταξης συνεχούς ροής με διασκορπισμένα μικροδισκία

### *B.5.3 Πειράματα με τη διάταξη περιστρεφόμενου πτερυγίου (USP Apparatus II) και μικρού περιστρεφόμενου πτερυγίου*

Η διάταξη του περιστρεφόμενου πτερυγίου αποτελείται από ένα καλυμμένο γυάλινο περιέκτη (ποτήρι) χωρητικότητας 1 L και από έναν αναδευτήρα, δηλαδή μια μεταλλική ράβδος από ανοξείδωτο ατσάλι με συγκεκριμένες διαστάσεις, οι οποίες αναγράφονται στο Σχήμα B.3. Η ράβδος περιστρέφεται συνεχώς με τη βοήθεια κατάλληλου κινητήρα με καθορισμένο αριθμό στροφών και είναι συνήθως 75 έως 150 στροφές ανά λεπτό (rpm). Το πτερύγιο θα πρέπει να βρίσκεται σε απόσταση 2.5 cm από τον πυθμένα του ποτηριού. Το ποτήρι είναι κυλινδρικού σχήματος με ημισφαιρική βάση, ύψους 16 cm, εσωτερικής διαμέτρου 10 cm και βυθίζεται μερικώς σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $37.0 \pm 0.5$  °C. Η απόσταση του πτερυγίου από τη βάση του ποτηριού διατηρείται στα  $25 \pm 2$  mm κατά τη διάρκεια του πειράματος. Η ράβδος βρίσκεται σε τέτοια θέση, ώστε ο άξονας να μην απέχει περισσότερο από 2 mm από τον κάθετο άξονα του ποτηριού. Στη διάταξη του πτερυγίου το προϊόν αφήνεται να βυθιστεί στη βάση του ποτηριού, ενώ εάν επιπλέον χρησιμοποιείται κατάλληλος υποδοχέας από έλασμα από ανοξείδωτο ατσάλι, ώστε να εξασφαλιστεί η βύθιση (Stage 6 Harmonization Monograph, [www.usp.org](http://www.usp.org), ημερομηνία πρόσβασης 25-3-2020).

Η διάταξη του μικρού περιστρεφόμενου πτερυγίου βασίζεται στην διάταξη του περιστρεφόμενου πτερυγίου, με διαστάσεις που αντιστοιχούν στα 2/3 των διαστάσεων του περιστρεφόμενου πτερυγίου (Σχήμα B.3).

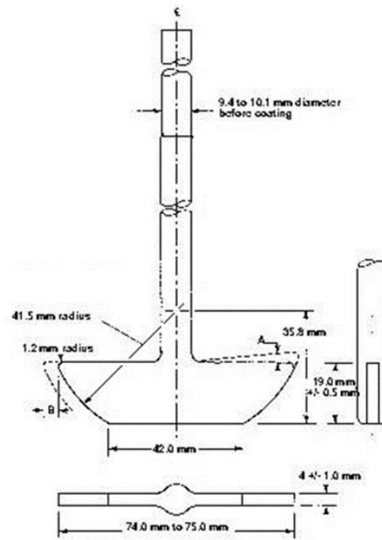
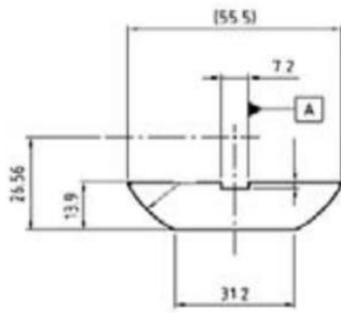
Για την μελέτη της διάλυσης προϊόντων άμεσης αποδέσμευσης A σε μέσα που προσομοιώνουν το περιεχόμενο του γαστρεντερικού σωλήνα κατά τη διαπεπτική περίοδο χρησιμοποιήθηκε η διάταξη του περιστρεφόμενου μικρού πτερυγίου κι έγιναν δύο πειράματα. Στο πρώτο τοποθετήθηκαν 250 mL FaSSGF σε κάθε ένα από τρία ποτήρια (Σχήμα B.3). Όταν το υδατόλουτρο έφθασε την θερμοκρασία  $37.0 \pm 0.5$  °C, τότε σε κάθε ένα από τα ποτήρια τοποθετήθηκε μια δοσολογική μονάδα (64 μικροδισκία) και ξεκίνησε η περιστροφή των πτερυγίων. Στους προβλεπόμενους χρόνους 2 mL δείγματος λαμβανόταν από κάθε ποτήρι, διηθούνταν και τοποθετούνταν σε δοκιμαστικό σωλήνα. Αμέσως, ίδιος όγκος FaSSGF τοποθετούνταν σε κάθε ποτήρι. Τα διηθήματα αραιώνονταν με κινητή φάση και ακολουθούσε ένεση στο χρωματογραφικό σύστημα. Οι συντελεστές αραιώσεως που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 5

και 10 κατά περίπτωση. Δείγματα λήφθηκαν 2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 120 min από την έναρξη του πειράματος.

Στο δεύτερο πείραμα, η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση FaSSiF-V2. Ο συντελεστής αραίωσης ήταν 50 και οι χρόνοι δειγματοληψίας ήταν οι ίδιοι.

Για την εκτίμηση της διάλυσης προϊόντων άμεσης αποδέσμευσης A σε μέσα που προσομοιώνουν το περιεχόμενο του γαστρεντερικού σωλήνα κατά την περίοδο πέψης χρησιμοποιήθηκε η διάταξη του περιστρεφόμενου πτερυγίου κι έγιναν δύο πειράματα, με παρόμοια μεθοδολογία. Στην πρώτη τοποθετήθηκαν 500 mL FeSSGF<sub>late</sub> σε κάθε ένα από τρία ποτήρια. Τα διηθήματα αραιώθηκαν με ακετονιτρίλιο, και ακολούθησε καλή ανάδευση στη συσκευή περιδίνησης και φυγοκέντρωση (10 min, 10000 rpm), προκειμένου να επιτευχθεί καλός διαχωρισμός των δύο φάσεων (Reppas *et al.*, 2020). Το υπερκείμενο υγρό αραιώθηκε καταλλήλως, με κινητή φάση και ακολουθούσε ανάδευση στη συσκευή περιδίνησης και ένεση στο χρωματογραφικό σύστημα. Οι συντελεστές αραίωσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 10, 20, 25 και 50, κατά περίπτωση. Δείγματα λήφθηκαν 2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 120 min από την έναρξη του πειράματος.

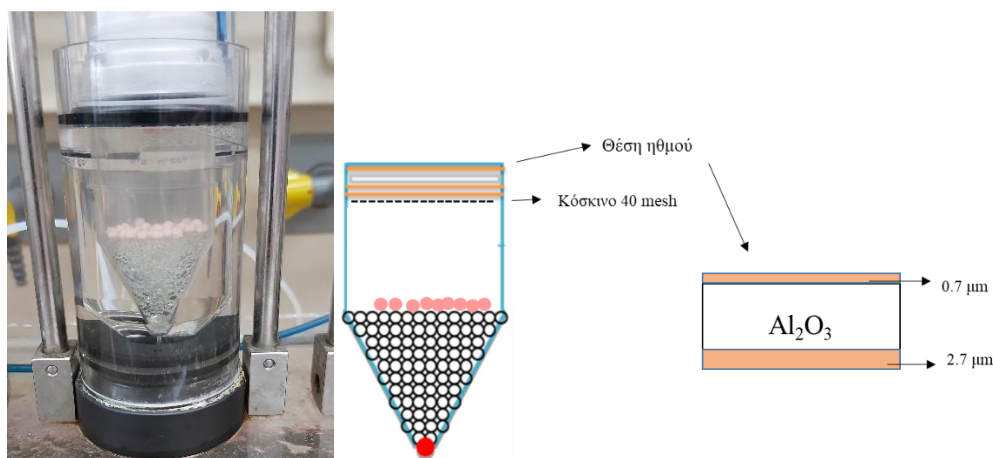
Στο δεύτερο πείραμα, η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση FeSSiF-V2, και χωρίς να γίνει φυγοκέντρωση. Ο συντελεστής αραίωσης ήταν 20 και οι χρόνοι δειγματοληψίας ήταν οι ίδιοι.



Σχήμα Β.3: Πάνω: Διαστάσεις μικρού περιστρεφόμενου περυγίου (Erweka GmbH) και διάταξη μικρού περιστρεφόμενου περυγίου κατά την διεξαγωγή πειράματος σε FaSSIF-V<sub>2</sub> | Κάτω: Διαστάσεις περιστρεφόμενου περυγίου, όπως αναγράφονται στην Αμερικάνικη Φαρμακοποιία.

#### B.5.4 Πειράματα διάλυσης των δοκιμαστικών προϊόντων τροποποιημένης αποδέσμευσης

Τα πειράματα στα φαρμακευτικά προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης του συνδυασμού δραστικών ουσιών Α πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα μεγάλων δισκίων (διαμέτρου 22.6 mm). Κάθετα προς τη ροή του μέσου διάλυσης και στο εσωτερικό άνω μέρος κάθε κυττάρου τοποθετήθηκαν κατά σειρά από το άνω μέρος του κυττάρου προς τα κάτω ένας ηθμός (διαμέτρου 25 mm, με μέσο μέγεθος πόρων 0.7 μm), 1g οξείδιο του αργιλίου ( $Al_2O_3$ ), και άλλος ένας ηθμός (διαμέτρου 25 mm, με μέσο μέγεθος πόρων 2.7 μm). Ο συγκεκριμένος συνδυασμός ενδείκνυται βάσει προκαταρκτικών πειραμάτων, προκειμένου να μην απομακρύνεται αδιάλυτη δραστική ουσία ή/και τμήματα του υπό έλεγχο προϊόντος από το κύτταρο. Μια δοσολογική μονάδα (64 μικροδισκία τροποποιημένης αποδέσμευσης) τοποθετήθηκε στο εσωτερικό του κυττάρου, διασκορπισμένη πάνω στα γυάλινα σφαιρίδια μικρότερης διαμέτρου, όπως φαίνεται στο Σχήμα Β.4.



Σχήμα Β.4: Αριστερά: Κύτταρο προσαρμοσμένο μέσα στον κύλινδρο της διάταξης κατά την έναρξη πειράματος διάλυσης προϊόντος τροποποιημένης αποδέσμευσης | Δεξιά: Σχηματική απεικόνιση του κυττάρου και του συνδυασμού διήθησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Για κάθε φαρμακευτικό προϊόν τα πειράματα διάλυσης διενεργήθηκαν εις τριπλούν, σε συνθήκες που προσομοιώνουν τη διαπεπτική περίοδο και την περίοδο πέψης. Οι συνθήκες κάθε πειραματικού πρωτοκόλλου αναγράφονται στους πίνακες Β.3 και Β.4.



Η συλλογή δειγμάτων έγινε σε ογκομετρικούς κυλίνδρους 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360 min από την έναρξη του πειράματος για τα πειράματα που αφορούν στη διαπεπτική περίοδο και στην περίοδο πέψης. Μετά από κάθε δειγματοληψία καταγράφηκαν οι όγκοι που είχαν συγκεντρωθεί στους ογκομετρικούς κυλίνδρους και οι ογκομετρικοί κύλινδροι ανακινήθηκαν καλά, πωματισμένοι. Στη συνέχεια τα δείγματα αραιώθηκαν με κινητή φάση, τοποθετήθηκαν στη συσκευή περιδίνησης και ακολούθησε ένεση στο χρωματογραφικό σύστημα HPLC. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά περίπτωση ήταν οι εξής:

-200:800: 200  $\mu\text{L}$  δείγματος μεταφέρθηκαν με πιπέττα ακριβείας εντός φιαλιδίου HPLC και αραιώθηκαν με 800  $\mu\text{L}$  κινητής φάσης (Συντελεστής Αραίωσης/ Dilution Factor=5)

-100:900: 100  $\mu\text{L}$  δείγματος μεταφέρθηκαν με πιπέττα ακριβείας εντός φιαλιδίου HPLC και αραιώθηκαν με 900  $\mu\text{L}$  κινητής φάσης (Συντελεστής Αραίωσης/ Dilution Factor=10)

-50:950: 50  $\mu\text{L}$  δείγματος μεταφέρθηκαν με πιπέττα ακριβείας εντός φιαλιδίου HPLC και αραιώθηκαν με 950  $\mu\text{L}$  κινητής φάσης (Συντελεστής Αραίωσης/ Dilution Factor=20)

-20:980: 20  $\mu\text{L}$  δείγματος μεταφέρθηκαν με πιπέττα ακριβείας εντός φιαλιδίου HPLC και αραιώθηκαν με 980  $\mu\text{L}$  κινητής φάσης (Συντελεστής Αραίωσης/ Dilution Factor=50)

Τα δείγματα που είχαν υπόλειμμα του μέσου που προσομοιάζει τις συνθήκες στο στόμαχο κατά την περίοδο πέψης (υπόλειμμα Lirofundin) αραιώθηκαν με ακετονιτρίλιο, και ακολούθησε καλή ανάδευση στη συσκευή περιδίνησης και φυγοκέντρηση (10 min, 10 °C, 10000 rpm), προκειμένου επιτευχθεί καλός διαχωρισμός των δύο φάσεων (Reppas *et al.*, 2020). Το υπερκείμενο υγρό αραιώθηκε καταλλήλως με κινητή φάση και ακολούθησε ανάδευση στη συσκευή περιδίνησης και ένεση στο χρωματογραφικό σύστημα.

Πίνακας Β.2: Πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν για τα πειράματα με τη διάταξη συνεχούς ροής στην παρούσα μελέτη για τα φαρμακευτικά προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης. Οι συνθήκες αφορούν στη διαπεπτική περίοδο (37 °C), (Reppas *et al.*, 2020).

Περιοχή του αυλού που προσομοιώνεται	Μέσο προσομοίωσης επιπέδου II	pH του μέσου	Διάρκεια (min)	Ρυθμός ροής (ml/min)
Στόμαχος	FaSSGF	1.6	30	8
Ανώτερο Λεπτό Έντερο	FaSSIF-V2	6.5	40	4
Νήστιδα- Αρχικός Ειλεός	FaSSIF-V2 <sub>midgut</sub>	6.8	80	4
Τελικός Ειλεός	SIF <sub>ileum</sub>	8.0	60	4
Ανιόν Παχύ Έντερο	FaSSCoF	7.8	150	4

Πίνακας Β.3: Πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν για τα πειράματα με τη διάταξη συνεχούς ροής στην παρούσα μελέτη για τα φαρμακευτικά προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης. Οι συνθήκες αφορούν στην περίοδο πέψης (37 °C) (Reppas *et al.*, 2020).

Περιοχή του αυλού που προσομοιώνεται	Μέσο προσομοίωσης επιπέδου II	pH του μέσου	Διάρκεια (min)	Ρυθμός ροής (mL/min)
Στόμαχος	FeSSGF	5.0	20	6
	FeSSGF <sub>late</sub>	3.0	70	6
Ανώτερο Λεπτό Έντερο	FeSSIF-V2	5.8	40	4
Νήστιδα- Αρχικός Ειλεός	FeSSIF-V2 <sub>midgut</sub>	6.5	80	4
Τελικός Ειλεός	SIF <sub>ileum</sub>	8.0	60	4
Ανιόν Παχύ Έντερο	FeSSCoF	6.0	80	4








## **B.6 Υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων**

Ύστερα από αδειοδότηση από την Επιτροπή Βιοηθικής του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ (Παράρτημα I) πραγματοποιήθηκε συλλογή κοπράνων από υγιείς ενήλικες εθελοντές. Η επιλογή των εθελοντών έγινε κατόπιν τηλεφωνικών συνεντεύξεων (Παράρτημα III) και βάσει προκαθορισμένων κριτηρίων καταλληλότητας για τη συμμετοχή του εκάστοτε ατόμου στη μελέτη.

### *B.6.1 Κριτήρια Ένταξης*

Για να ενταχθεί στη μελέτη πρέπει ο εθελοντής:

- i. Να είναι πρόθυμος να παρέχει κόπρανα για τους σκοπούς της μελέτης, όπως θα αποδεικνύεται από γραπτή δήλωση συγκατάθεσης
- iii. Να τρέφεται κυρίως με μεσογειακή διατροφή (ελαιόλαδο, ψάρι, κρέας, γαλακτοκομικά προϊόντα, όσπρια, φρούτα, λαχανικά κ.α)
- iii. Να είναι σε θέση να απέχει από το κάπνισμα και τα οινόπνευματώδη ποτά 3 μέρες πριν την ημέρα της συλλογής των κοπράνων
- iv. Να μην έχει κάνει χρήση αντιβιοτικού φαρμάκου τους τελευταίους 6 μήνες τουλάχιστον (Sousa et al. 2014)
- v. Να 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)
- vi. Να μην έχει κάνει χρήση φαρμάκων τα οποία επηρεάζουν τη λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος για διάστημα 7 ημερών πριν τη μελέτη (Mastromarino et al. 1978)
- vii. Να έχει συνηθισμένες εντερικές συνήθειες τον τελευταίο μήνα και τα κόπρανα να είναι Τύπου 2, 3, 4 ή 5 σύμφωνα με την κλίμακα Bristol (Σχήμα B.5.)

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

Σχήμα Β.5: Ταξινόμηση του τύπου των κοπράνων σύμφωνα με την κλίμακα Bristol (Lewis and Heaton 1997)

### B.6.2 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. Ο εθελοντής έχει αποκλείσει κάποια σημαντική ομάδα τροφίμων από το διαιτολόγιό του (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

### B.6.3 Εθελοντές που συμμετείχαν στη μελέτη

Στη μελέτη συμμετείχαν έξι υγιείς ενήλικες εθελοντές μετά από γραπτή συγκατάθεση (Παράρτημα II). Στον Πίνακα Β.3 παρουσιάζονται τα δημογραφικά δεδομένα των έξι ενηλίκων που συμμετείχαν στην μελέτη. Η αρίθμηση των εθελοντών έγινε έτσι ώστε να υποδηλώσει την ύπαρξη παρόμοιας προηγούμενης μελέτης, στην οποία τα δεδομένα είχαν υψηλή μεταβλητότητα (Karatza *et al.*, 2017).

Πίνακας Β.3. Δημογραφικά δεδομένα των εθελοντών που έλαβαν μέρος στην παρούσα μελέτη

Αριθμός εθελοντή	Φύλο	Ηλικία (έτη)	Ύψος (m)	Βάρος (kg)	Δ.Μ.Σ.* kg/ m <sup>2</sup>
7	Θήλυ	29	1.58	58	23.23
8	Άρρεν	26	1.88	86	24.33
9	Άρρεν	31	1.82	87	26.26
10	Άρρεν	36	1.80	84	25.92
11	Θήλυ	19	1.59	51	20.17
12	Θήλυ	19	1.54	63	26.56

\*Η τιμή του Δείκτη Μάζας Σώματος (Δ.Μ.Σ) υπολογίστηκε ως εξής: Δ.Μ.Σ= βάρος (kg) / ύψος<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>)

Οι ενήλικες που συμμετείχαν στη μελέτη ακολούθησαν το πρωτόκολλο (Παράρτημα II), το οποίο περιλάμβανε την καταγραφή των γευμάτων τους και τον τύπο των κοπράνων (σύμφωνα με την κλίμακα Bristol) (Σχήμα Β.1.) για διάστημα από δύο έως και τρεις μέρες πριν τη συλλογή των κοπράνων.

### B.6.4 Συλλογή κοπράνων, παρασκευή υλικού από κόπρανα και συνθήκες διατήρησης

Η συλλογή κοπράνων έγινε κατά την πρώτη κένωση της ημέρας, μέσα σε προζυγισμένο, πλαστικό περιέκτη. Ο πλαστικός περιέκτης με τα κόπρανα τοποθετήθηκε σε αναερόβιο περιβάλλον (Tannergren *et al.* 2014, Sousa *et al.* 2014), σε χρονικό διάστημα μικρότερο των 30 min από τη συλλογή. Οι αναερόβιες συνθήκες εντός του θαλάμου επετεύχθησαν με την κυκλοφορία μίγματος αερίων (10% H<sub>2</sub>, 10%

CO<sub>2</sub>, 80% N<sub>2</sub>). Η θερμοκρασία ήταν ρυθμισμένη στους 37 °C και η σχετική υγρασία ήταν στο 70%. Η απουσία οξυγόνου παρακολουθείτο με τη βοήθεια κατάλληλου δείκτη (Παράρτημα IV).

Τα κόπρανα ζυγίστηκαν και υπολογίστηκε ο απαιτούμενος όγκος φυσιολογικού ορού (χλωριούχο νάτριο 0,9% w/v) για την παρασκευή του υλικού από κόπρανα (αραίωση 1:3.8 w/v) (Karatza *et al*, 2016).

Ο φυσιολογικός ορός και τα κόπρανα μεταφέρθηκαν σε αναμικτήρα ανά δόσεις, ώστε να αποφευχθεί η υπερχειλίση, και πολτοποιήθηκαν προς σχηματισμό ομοιογενούς μίγματος.

Στην συνέχεια, το μίγμα διηθήθηκε μέσα από κόσκινο με μέγεθος οπών 355 μm (Tannergren *et al*. 2014, Sousa *et al*. 2014, Yadav *et al*. 2013).

Το διήθημα, το οποίο αποτέλεσε το υλικό από κόπρανα (bulk fecal material), τοποθετήθηκε σε γυάλινους περιέκτες στους οποίους επικολλήθηκαν ετικέτες. Στην κάθε ετικέτα αναγράφηκε ο όγκος του περιεχόμενου υλικού από κόπρανα, η ημερομηνία συλλογής, και ο αριθμός του εθελοντή. Τέλος, μετρήθηκε το pH του διηθήματος.

Στο Σχήμα Β.6 παρουσιάζονται τα στάδια της μεθοδολογίας παρασκευής του υλικού από κόπρανα.



Σχήμα Β.6: Διαδικασία παρασκευής υλικού από κόπρανα (Α: ζύγιση, Β: ανάμιξη, Γ: διήθηση, Δ: πλήρωση υάλινων περιεκτών

Οι γυάλινοι περιέκτες με το υλικό από κόπρανα τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη στους  $-70^{\circ}\text{C}$ , όπου και παρέμειναν ως την ημέρα διεξαγωγής των πειραμάτων βακτηριακής διάσπασης. Έχει βρεθεί ότι το υλικό από κόπρανα μπορεί να διατηρηθεί σε αυτήν την θερμοκρασία για τουλάχιστον δώδεκα μήνες, χωρίς να επηρεαστεί η ενεργότητα των αναερόβιων βακτηρίων (Karatza *et al.*, 2016). Ωστόσο, περισσότεροι του ενός κύκλοι ψύξης-απόψυξης δεν είναι επιθυμητοί, διότι έχει αποδειχθεί ότι η βακτηριακή ενεργότητα του υλικού από κόπρανα μειώνεται μετά από τον δεύτερο κύκλο ψύξης-απόψυξης (Karatza *et al.*, 2016).

Στον Πίνακα Β.4. παρουσιάζονται τα στοιχεία συλλογής κοπράνων, καθώς και ο όγκος και το pH του υλικού από κόπρανα που παρασκευάστηκε.

Πίνακας Β.4: Βάρος κοπράνων που συλλέχθηκαν από έξι ενήλικες, τύπος κοπράνων κατά Bristol, προκύπτων όγκος και τιμή pH του υλικού από κόπρανα

Αριθμός εθελοντή	Τύπος κοπράνων κατά Bristol	Βάρος κοπράνων (g)	Προκύπτων όγκος υλικού από κόπρανα (mL)	pH
7	2 ή 3	208	833	6.4
8	5	234	918	6.3
9	3 ή 4	115	460	6.2
10	3	50	195	6.8
11	2 ή 3	79	499	6.5
12	3 ή 4	39	148	6.6

Για τα πειράματα βακτηριακής αποικοδόμησης του Α χρησιμοποιήθηκε υλικό που παρασκευάστηκε στον αναερόβιο θάλαμο με ανάμιξη 1 mL υλικού από κόπρανα, (bulk fecal material) από κάθε εθελοντή – συνολικά 6-, αραιώση με 12 mL φυσιολογικού ορού και καλή ανάδευση στη συσκευή περιδίνησης. Το bulk fecal material είχε προηγουμένως παραμείνει για 2 ώρες στον αναερόβιο θάλαμο, προκειμένου να αποψυχθεί, καθώς έχει βρεθεί ότι αυτός είναι ο βέλτιστος χρόνος απόψυξης του υλικού από κόπρανα, προκειμένου να επανέλθει η βακτηριακή ενεργότητα (βλ Β.8, Karatza *et al.*, 2016). Το βελτιστοποιημένο υλικό (SCoB, Simulated Colonic Bacteria) που προέκυψε είχε βακτηριακή συγκέντρωση τέτοια, ώστε να προσομοιώνει τη συγκέντρωση των βακτηρίων στο κατώτερο έντερο, και ειδικότερα στο κόλον (Vertzoni *et al.*, 2018).

### **Β.7 Εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης του συνδυασμού δραστικών ουσιών Α σε βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων**

Τα πειράματα διεξήχθησαν εντός του αναερόβιου θαλάμου (Σχήμα Β.7).





Σχήμα Β.7: Αναερόβιος θάλαμος. Αριστερά: εξωτερική άποψη αναερόβιου θαλάμου Δεξιά: το εσωτερικό του θαλάμου κατά τη διάρκεια διεξαγωγής πειράματος αποικοδόμησης.

Για τα πειράματα βακτηριακής αποικοδόμησης του Α χρησιμοποιήθηκε βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα, το οποίο παρασκευάστηκε την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος (βλ. Β.6.4).

#### Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης Α σε φυσιολογικό ορό

Ζυγίστηκαν 20 mg σκόνης Α, τα οποία αντιστοιχούν σε περίπου ίσες ποσότητες δραστικής ουσίας Α1 και Α2, στον αναλυτικό ζυγό και μεταφέρθηκαν ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100mL. Προστέθηκε όγκος φυσιολογικού ορού και η φιάλη τοποθετήθηκε στο λουτρό υπερήχων. Τέλος, συμπληρώθηκε όγκος φυσιολογικού ορού μέχρι τη χαραγή. Το διάλυμα που προέκυψε είχε συνολική συγκέντρωση 200 μg/mL.

#### Μεθοδολογία για την μέτρηση της διάσπασης του συνδυασμού δραστικών ουσιών Α

Στον αναερόβιο θάλαμο, 1000 μL από το βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα που παρασκευάστηκε μεταφέρθηκαν σε περιέκτη τύπου Eppendorf (Α), στο οποίο προστέθηκαν 125 μL από το διάλυμα παρακαταθήκης του Α. Ακολούθησε ανάμιξη σε αναδευτήρα περιδίνησης. Αμέσως, μεταφέρθηκαν 100 μL από το μίγμα σε νέο περιέκτη τύπου Eppendorf (Β) και προστέθηκαν 300 μL παγωμένο ακετονιτρίλιο, ώστε να σταματήσει η διαδικασία της διάσπασης. Αυτός ο χρόνος ορίστηκε ως ο χρόνος

μηδέν για τη δειγματοληψία. Αμέσως μετά, ο περιέκτης (A) μεταφέρθηκε σε θερμοστατούμενη, ανακινούμενη διάταξη (37 °C /1000 rpm). Δείγματα όγκου 100 μL λήφθηκαν 15, 30, 60, 90, 120, 180 και 240 min από την έναρξη του πειράματος. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

Αφού ολοκληρώθηκε η παραπάνω διαδικασία, οι περιέκτες τύπου Eppendorf τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο (10 min, 10 °C, 10000 rpm). Έπειτα, 100 μL από αυτό το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια HPLC και προστέθηκαν 300 μL κινητής φάσης. Ακολούθησε καλή ανάδευση σε vortex και ανάλυση στο χρωματογραφικό σύστημα.

## **B.8 Εκτίμηση της μεταβλητότητας της βακτηριακής ενεργότητας υλικού από κόπρανα υγιών ενηλίκων**

Για τα πειράματα βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης χρησιμοποιήθηκε το υλικό κάθε εθελοντή ξεχωριστά το οποίο είχε φυλαχθεί στην κατάψυξη. Έχει βρεθεί ότι ο βέλτιστος χρόνος παραμονής προκειμένου να αποψυχθεί το υλικό από κόπρανα στον αναερόβιο θάλαμο και να επανέλθει η βακτηριακή ενεργότητα είναι δύο ώρες. Αν το πείραμα της βακτηριακής αποικοδόμησης των υπό μελέτη ουσιών αρχίσει πριν τις δύο ώρες, τότε τα βακτήρια θα εμφανίσουν μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα, και αυτό διότι τα βακτήρια χρειάζονται αυτό το χρονικό διάστημα για να αποκτήσουν την αρχική ενεργότητα μετά την απόψυξη (Karatza *et al.*, 2016).

### *B.8.1 Βακτηριακή αποικοδόμηση μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα που παρασκευάστηκε στην παρούσα μελέτη*

#### Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης μετρονιδαζόλης σε φυσιολογικό ορό

Ζυγίστηκαν 10 mg μετρονιδαζόλης σε αναλυτικό ζυγό και μεταφέρθηκαν ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Προστέθηκε όγκος φυσιολογικού ορού και η φιάλη τοποθετήθηκε στο λουτρό υπερήχων. Τέλος, συμπληρώθηκε όγκος φυσιολογικού ορού μέχρι τη χαραγή. Το διάλυμα που προέκυψε είχε συγκέντρωση 100 μg/mL.

### Μεθοδολογία για την εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης

Στον αναερόβιο θάλαμο, 1000  $\mu\text{L}$  από το υλικό από κόπρανα μεταφέρθηκαν σε περιέκτη τύπου Eppendorf (A), στο οποίο προστέθηκαν 125  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα παρακαταθήκης της μετρονιδαζόλης. Ακολούθησε ανάμιξη σε αναδευτήρα περιδίνησης. Αμέσως, μεταφέρθηκαν 100  $\mu\text{L}$  από το μίγμα σε νέο περιέκτη τύπου Eppendorf (B) και προστέθηκαν 300  $\mu\text{L}$  παγωμένο ακετονιτρίλιο, ώστε να σταματήσει η διαδικασία της διάσπασης. Αυτός ο χρόνος ορίστηκε ως ο χρόνος μηδέν για τη δειγματοληψία. Αμέσως μετά, ο περιέκτης (A) μεταφέρθηκε σε θερμοστατούμενη, ανακινούμενη διάταξη ( $37^\circ\text{C}$  /1000 rpm). Δείγματα όγκου 100  $\mu\text{L}$  λήφθηκαν 5, 10, 15, 20, 30, 45 και 60 min από την έναρξη του πειράματος (Vertzoni *et al*, 2011).

Μετά την ολοκλήρωση της παραπάνω διαδικασίας, οι περιέκτες τύπου Eppendorf μεταφέρθηκαν προς φυγοκέντριση (10 min,  $10^\circ\text{C}$ , 10000 rpm). Κατόπιν, 100  $\mu\text{L}$  από αυτό το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια HPLC και προστέθηκαν 300  $\mu\text{L}$  κινητής φάσης. Ακολούθησε καλή ανάδευση και ανάλυση στο χρωματογραφικό σύστημα.

### *B.8.2 Βακτηριακής αποικοδόμηση ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα που παρασκευάστηκε στην παρούσα μελέτη*

#### Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης ολσαλαζίνης σε φυσιολογικό ορό

Ζυγίστηκαν 14 mg ολσαλαζίνης σε αναλυτικό ζυγό και μεταφέρθηκαν ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Προστέθηκε όγκος φυσιολογικού ορού και η φιάλη τοποθετήθηκε στο λουτρό υπερήχων για καλή ανάδευση. Τέλος, συμπληρώθηκε όγκος φυσιολογικού ορού μέχρι τη χαραγή. Το τελικό διάλυμα είχε συγκέντρωση 140  $\mu\text{g/mL}$ .

### Μεθοδολογία για την εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης της ολσαλαζίνης

Όπως και στην περίπτωση της μετρονιδαζόλης, 1000  $\mu\text{L}$  από το υλικό από κόπρανα μεταφέρθηκαν σε περιέκτη τύπου Eppendorf (A), στο οποίο προστέθηκαν 125  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα παρακαταθήκης της ολσαλαζίνης. Ακολούθησε ανάμιξη σε αναμικτήρα περιδίνησης. Αμέσως, μεταφέρθηκαν 100  $\mu\text{L}$  από το μίγμα σε νέο περιέκτη τύπου

Erpendorf (B) και προστέθηκαν εκεί 300  $\mu\text{L}$  παγωμένο ακετονιτρίλιο, ώστε να σταματήσει η διαδικασία της διάσπασης. Αυτός ο χρόνος ορίστηκε ως ο χρόνος μηδέν για τη δειγματοληψία. Αμέσως μετά ο περιέκτης (A) μεταφέρθηκε σε συσκευή επώασης ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  /1000rpm). Δείγματα λαμβάνονταν 10, 20, 30, 60, 90 και 120 min από την έναρξη του πειράματος (Vertzoni *et al.*, 2011).

Αφού ολοκληρώθηκε η παραπάνω διαδικασία, οι περιέκτες τύπου Erpendorf τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο (10 min,  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10000 rpm). Έπειτα, 100  $\mu\text{L}$  από αυτό το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια HPLC και προστέθηκαν 300  $\mu\text{L}$  κινητής φάσης. Ακολούθησε καλή ανάδευση σε vortex και ανάλυση στο χρωματογραφικό σύστημα.

### *B.8.3 Βακτηριακή αποικοδόμηση μετρονιδαζόλης και ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα που είχε συλλεχθεί σε παλαιότερη μελέτη (Karatza *et al.*, 2016)*

Η διαδικασία που περιγράφηκε στα κεφάλαια B.8.1 και B.8.2 πραγματοποιήθηκε ξανά σε υλικό από κόπρανα που είχαν συλλεχθεί από έξι υγιείς ενήλικες εθελοντές το 2015, και είχε διατηρηθεί στον υπερκαταψύκτη ( $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) για 48 μήνες.

## **B.9 Μέθοδοι προσδιορισμού δραστικών ουσιών**

### *B.9.1 Συνδυασμού δραστικών ουσιών A (Ενυδρο, μετά νατρίου άλας του A1 και του A2)*

#### Χρωματογραφικές συνθήκες

Η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε βασίστηκε σε αναλυτική μέθοδο που προτάθηκε από την εταιρεία Novartis.

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με χρωματογραφική στήλη αντίστροφης φάσης εξοπλισμένη με μία προστήλη Hypersil BDS-C18 (10 mm $\times$ 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). Χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη στήλης: α) Fortis-C18 (150 mm $\times$ 3 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας στα φαρμακευτικά προϊόντα άμεσης και τροποποιημένης αποδέσμευσης και β) Hypersil C-18 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας στο βελτιστοποιημένο υλικό

από κόπρανα. Ο όγκος δείγματος ήταν 50μl. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ισοκρατικές συνθήκες. Η κινητή φάση αποτελείτο από νερό, ακετονιτρίλιο και τριφθοροξικό οξύ, σε αναλογία 50:50:0.05 (v/v/v). Η ανάλυση διεξήχθη σε θερμοκρασία δωματίου με ροή 1.0 ml/min και 0.5 ml/min για τις στήλες α) και β) αντίστοιχα. Η απορρόφηση των δραστικών ουσιών του Α μετρήθηκε σε μήκος κύματος 254 nm και ο χρόνος έκλουσης ήταν περίπου 7.6 λεπτά για το Α1 και 10.1 λεπτά για το Α2.

#### Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης

Ζυγίστηκαν 20 mg συνδυασμού δραστικών ουσιών Α στον αναλυτικό ζυγό και μεταφέρθηκαν ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Προστέθηκε όγκος νερού και η φιάλη τοποθετήθηκε στο λουτρό υπερήχων για καλή ανάδευση. Συμπληρώθηκε όγκος νερού μέχρι τη χαραγή. Το διάλυμα που προέκυψε είχε ολική συγκέντρωση 200 μg/ml και περίπου 100 μg/ml ως προς την καθεμία από τις δύο ουσίες.

#### Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

##### *α) για τα πειράματα διάλυσης*

Η ποσοτικοποίηση του συνδυασμού δραστικών ουσιών Α σε όλα τα δείγματα που προέκυψαν από τα πειράματα διάλυσης έγινε με καμπύλη αναφοράς σε κινητή φάση. Για την ποσοτικοποίηση των δεδομένων η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε από πρότυπα διαλύματα που είχαν παρασκευαστεί σε κινητή φάση και σε μέσα που προσομοιάζουν τις συνθήκες στο γαστρεντερικό σωλήνα (biorelevant media).

Συγκεκριμένα, 100 μl από το διάλυμα παρακαταθήκης (περίπου 100 μg/ml ανά ουσία) και 900 μl κινητής φάσης μεταφέρθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο HPLC και με ανάδευση σε συσκευή περιδίνησης προέκυψε διάλυμα συγκέντρωσης 10 μg/ml (ανά ουσία). Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν από το διάλυμα εργασίας (10 μg/ml) και την κινητή φάση σύμφωνα με τον Πίνακα Β.5. Τα πρότυπα διαλύματα για τις καμπύλες αναφοράς στα μέσα που προσομοιάζουν το περιεχόμενο του γαστρεντερικού σωλήνα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τον Πίνακα Β.6.

Πίνακας Β.5: Συγκέντρωση προτύπων διαλυμάτων συνδυασμού δραστικών ουσιών Α για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς σε κινητή φάση

<b>Συγκέντρωση για κάθε δραστική ουσία του Α (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Όγκος διαλύματος εργασίας Α (10 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> για κάθε ουσία του Α) (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Όγκος Κινητής Φάσης (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
0.1	10	990
0.3	30	970
0.5	50	950
0.7	70	930
	<b>Όγκος διαλύματος παρακαταθήκης Α (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	
1	10	990
3	30	970
5	50	950
7	70	930
10	100	900

Πίνακας Β.6: Συγκέντρωση προτύπων διαλυμάτων συνδυασμού δραστικών ουσιών Α για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς στο εκάστοτε μέσο που προσομοιάζει το περιεχόμενο του γαστρεντερικού σωλήνα

Συγκέντρωση για κάθε δραστική ουσία του Α (μg/mL)	Όγκος διαλύματος παρακαταθήκης Α (μL)	Όγκος Μέσου (μL)	Όγκος Κινητής Φάσης (μL)
1	10	200	790
3	30	200	770
5	50	200	750
7	70	200	730
10	100	200	700

Στους Πίνακες Β.7 και Β.8 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά ενδεικτικών καμπυλών αναφοράς του Α σε κινητή φάση και σε μέσα που προσομοιάζουν το περιεχόμενο του γαστρεντερικού σωλήνα, κατά τη διαπεπτική περίοδο και κατά την περίοδο πέψης, αντίστοιχα.

Η απουσία παρεμποδίσεων στα μέσα που προσομοιώνουν τα περιεχόμενα στο γαστρεντερικό αυλό, σε συνδυασμό με την καλή ανάκτηση των δραστικών ουσιών Α1 και Α2 σε αυτά (Πίνακας Β.7 και Β.8) καθιστούν εφικτή την ποσοτικοποίηση με καμπύλες αναφοράς που κατασκευάστηκαν σε κινητή φάση.

Πίνακας Β.7: Χαρακτηριστικά καμπυλών αναφοράς συνδυασμού δραστικών ουσιών Α σε κινητή φάση και σε μέσα που προσομοιάζουν το περιεχόμενο του γαστρεντερικού σωλήνα κατά τη διαπεπτική περίοδο

Δραστική ουσία	Μέσο στο οποίο κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς	Κλίση (SE)	Τομή (SE)	Συντελεστής προσδιορισμού ( $r^2$ )
A1	Κινητή Φάση n=5	239808 (1198)	25356 (7270)	0.999
	FaSSGF n=5	234847 (7390)	-151 (44832)	0.997
	FaSSIF n=5	238672 (840)	33993 (5097)	1
	FaSSIF <sub>midgut</sub> n=5	242234 (1051)	15214 (6380)	0.999
A2	Κινητή Φάση n=5	418009 (1590)	46835 (9646)	1
	FaSSGF n=5	409532 (12770)	1017 (77467)	0.997
	FaSSIF n=5	417145 (1425)	63585 (8646)	1
	FaSSIF <sub>midgut</sub> n=5	424485 (1128)	29183 (6846)	1



Πίνακας Β.8: Χαρακτηριστικά καμπυλών αναφοράς συνδυασμού δραστικών ουσιών Α σε κινητή φάση και σε μέσα που προσομοιώνουν το περιεχόμενο του γαστρεντερικού σωλήνα κατά την περίοδο πέψης

Δραστική ουσία	Μέσο στο οποίο κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς	Κλίση (SE)	Τομή (SE)	Συντελεστής προσδιορισμού (r <sup>2</sup> )
A1	Κινητή Φάση n=9	241318 ± 828	-4472 ± 3756	1
	FeSSGF n=5	243117 ± 1460	9967 ± 8857	1
	FeSSIF <sub>late</sub> n=5	257092 ± 6896	-31366 ± 41835	0.998
	FeSSIF-V2 n=5	224780 ± 7174	28398 ± 43523	0.997
	FeSSIF <sub>midgut</sub> -V2 n=5	207930 ± 6383	51470 ± 38722	0.997
	SIF <sub>ileum</sub> n=5	228457 ± 3444	-1563 ± 20892	1
	FeSSCoF n=5	283195 ± 30237	-160098 ± 183429	0.97
A2	Κινητή Φάση n=9	418280 ± 2005	-8823 ± 9086	1
	FeSSGF n=5	424449 ± 2484	15465 ± 15073	1
	FeSSIF <sub>late</sub> n=5	449393 ± 11895	-50216 ± 72159	0.998
	FeSSIF-V2 n=5	392005 ± 12016	56618 ± 72892	0.997
	FeSSIF <sub>midgut</sub> -V2 n=5	364586 ± 10515	87393 ± 63787	0.998
	SIF <sub>ileum</sub> n=5	395384 ± 7059	2622 ± 42827	1
	FeSSCoF n=5	497651 ± 54272	-290582 ± 329245	0.97

*β) για τα πειράματα βακτηριακής αποικοδόμησης*

Η ποσοτικοποίηση του Α σε όλα τα δείγματα που προέκυψαν από τα πειράματα σταθερότητας έγινε με καμπύλη αναφοράς. Για την ποσοτικοποίηση των δεδομένων η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε από πρότυπα διαλύματα που είχαν παρασκευαστεί σε κινητή φάση.

Συγκεκριμένα, 100 μl από το διάλυμα παρακαταθήκης (περίπου 100 μg/ml ανά ουσία) και 900 μl κινητής φάσης μεταφέρθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο HPLC και με ανάδευση σε συσκευή περιδίνησης προέκυψε διάλυμα συγκέντρωσης 10 μg/ml (ανά ουσία). Σε 100 μl από το διάλυμα εργασίας (10 μg/ml) προστέθηκαν 900 μl κινητής φάσης και μετά από ανάδευση προέκυψε το διάλυμα εργασίας, το οποίο είχε συγκέντρωση 1 μg/ml ανά ουσία. Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν από το διάλυμα εργασίας (1 μg/ml) και την κινητή φάση σύμφωνα με τον Πίνακα Β.5.

Πίνακας Β.9: Συγκέντρωση προτύπων διαλυμάτων Α για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς σε κινητή φάση

<b>Συγκέντρωση για κάθε δραστική ουσία του Α (μg/ml)</b>	<b>Όγκος διαλύματος εργασίας Α (1 μg/ml για κάθε δραστική ουσία του Α) (μl)</b>	<b>Όγκος κινητής φάσης (μl)</b>
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

Επιπλέον κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς σε SCoB. Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν από το διάλυμα εργασίας (10 μg/ml ανά δραστική ουσία) και το διάλυμα παρακαταθήκης όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα Β.10. Από κάθε δείγμα 100 μL αναμίχθηκαν με 300 μL ακετονιτρίλιο και αναδεύτηκαν στη συσκευή περιδίνησης.

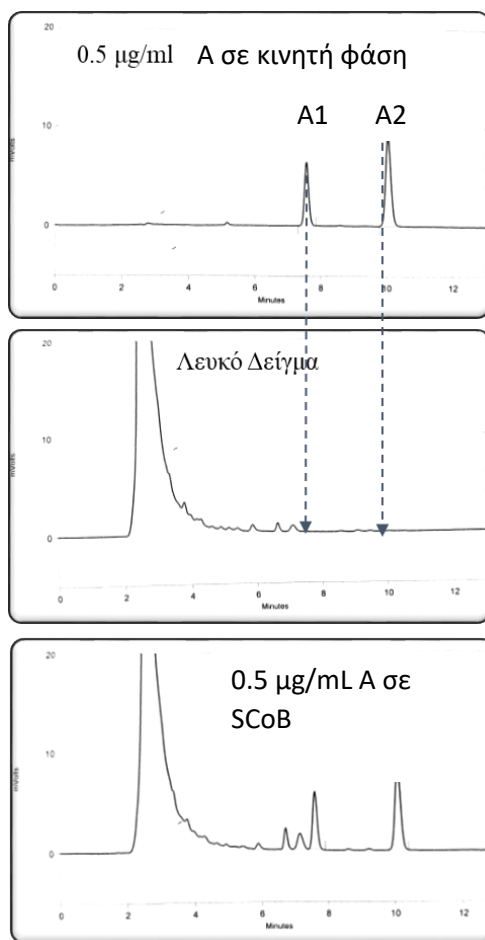
Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγοκέντρωση των δειγμάτων, αραίωση του υπερκείμενου με κινητή φάση σε αναλογία 1:1, και ένεση στο χρωματογραφικό σύστημα.

Πίνακας Β.10: Συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων Α σε SCoB

<b>Συγκέντρωση για κάθε δραστική ουσία του Α (μg/ml)</b>	<b>Όγκος διαλύματος εργασίας Α (10 μg/ml για κάθε δραστική ουσία) (μl)</b>	<b>Όγκος SCoB (μl)</b>
0.01	40	960
0.03	120	880
0.05	200	800
	<b>Όγκος διαλύματος παρακαταθήκης Α (μl)</b>	
0.0625	25	975
0.1	40	960
0.3	120	880
0.5	200	800

Στο Σχήμα Β.8 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος Α (0.5 μg/ml) σε κινητή φάση, πρότυπου διαλύματος Α (0.5 μg/ml) σε SCoB και δείγματος υλικού από κόπρανα πριν την προσθήκη Α (λευκό δείγμα).

Στον Πίνακα Β.11 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς του Α σε κινητή φάση και σε SCoB. Για την κατασκευή όλων των καμπυλών χρησιμοποιήθηκαν 7 σημεία. Στο Σχήμα Β.8 παρουσιάζονται οι αντίστοιχες διαγραμματικές απεικονίσεις.

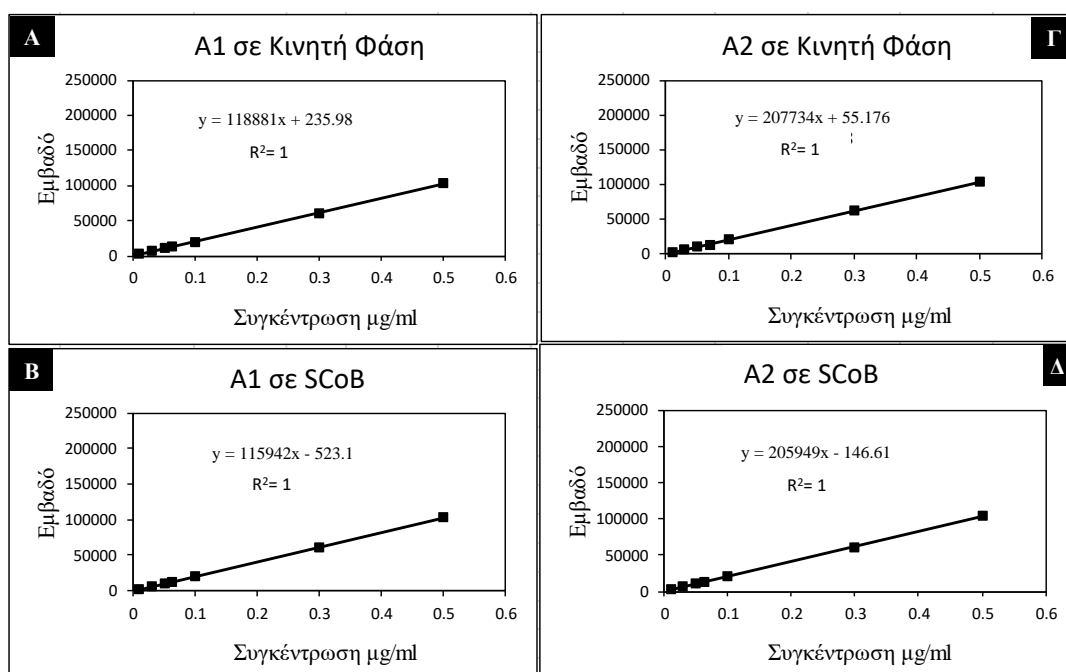


Σχήμα Β.8: Α: Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος Α (0.5 µg/mL) σε κινητή φάση, Β: Ενδεικτικό χρωματογράφημα λευκού δείγματος υλικού από κόπρανα, Γ: Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος Α σε βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα, SCoB (0.5 µg/mL)

Η απουσία παρεμποδίσεων στο βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα (Σχήμα Β.8) σε συνδυασμό με την καλή ανάκτηση των δραστικών ουσιών Α1 και Α2 στο βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα (Πίνακας Β.11) καθιστούν εφικτή την ποσοτικοποίηση με καμπύλες αναφοράς που κατασκευάστηκαν σε κινητή φάση.

Πίνακας Β.11: Χαρακτηριστικά καμπυλών αναφοράς Α κινητή φάση και σε βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα

Δραστική ουσία	Μέσο στο οποίο κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς	Κλίση (SE)	Τομή (SE)	Συντελεστής προσδιορισμού ( $r^2$ )
Α1	Κινητή Φάση	118881 (693)	236 (157)	1
	SCoB	115942 (990)	-523 (223)	1
Α2	Κινητή Φάση	207734 (1278)	55 (289)	1
	SCoB	205949 (1541)	-147 (338)	1



Σχήμα Β.8: Καμπύλες αναφοράς Α σε κινητή φάση και βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα (SCoB)

## B.9.2 Μετρονιδαζόλη

### Χρωματογραφικές συνθήκες

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με χρωματογραφική στήλη αντίστροφης φάσης Fortis -C18 (150 mm×3mm, 5 μm) εξοπλισμένη με μία προστήλη Hypersil BDS-C18 (10 mm×4 mm, 5 μm). Ο όγκος δείγματος ήταν 20 μl. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ισοκρατικές συνθήκες. Η κινητή φάση αποτελείτο από νερό, ακετονιτρίλιο και μυρμηκικό οξύ σε αναλογία 10:90:0,1 (v/v/v). Η ανάλυση διεξήχθη σε θερμοκρασία δωματίου με ροή 0.5 ml/min. Η απορρόφηση της μετρονιδαζόλης μετρήθηκε σε μήκος κύματος 315 nm και ο χρόνος έκλουσης ήταν περίπου 5 λεπτά.

### Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης

Ζυγίστηκαν 10 mg μετρονιδαζόλης στον αναλυτικό ζυγό και μεταφέρθηκαν ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Προστέθηκε όγκος νερού και η φιάλη τοποθετήθηκε στο λουτρό υπερήχων για καλή ανάδευση. Συμπληρώθηκε όγκος νερού μέχρι τη χαραγή. Το διάλυμα που προέκυψε είχε συγκέντρωση 100 μg/ml.

### Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

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 της μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από αυτά που λαμβάνονται όταν η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με πρότυπα διαλύματα σε κινητή φάση (Vertzoni *et al.*, 2011).

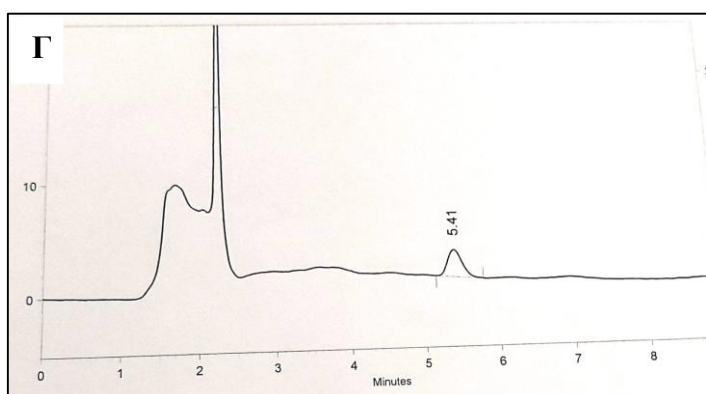
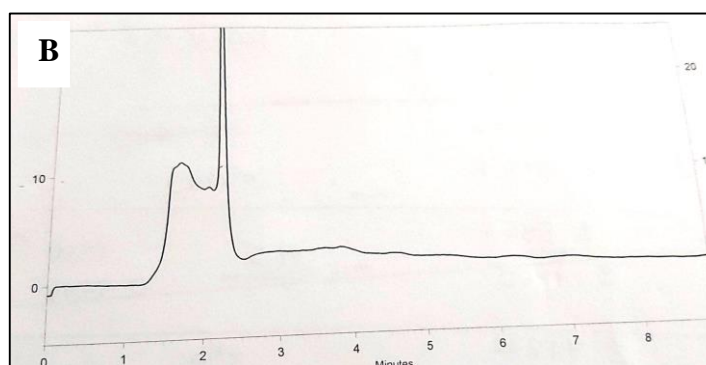
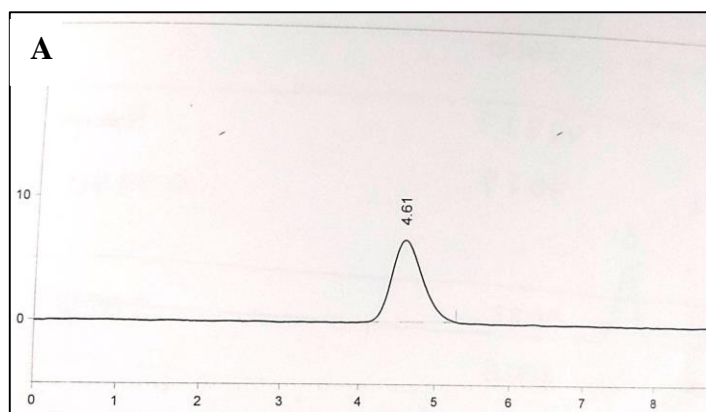
Συγκεκριμένα, 100 μl από το διάλυμα παρακαταθήκης (100 μg/ml) και 900 μl κινητής φάσης μεταφέρθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο HPLC και με ανάδευση σε συσκευή περιδίνησης (vortex) προέκυψε διάλυμα συγκέντρωσης 10 μg/ml. Σε 100 μl από το διάλυμα εργασίας (10 μg/ml) προστέθηκαν 900 μl κινητής φάσης και μετά από

ανάδευση προέκυψε το διάλυμα εργασίας, το οποίο είχε συγκέντρωση 1 µg/ml. Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν από το διάλυμα εργασίας (1 µg/ml) σύμφωνα με τον Πίνακα Β.12.

Πίνακας Β.12: Συγκέντρωση πρότυπων διαλυμάτων μετρονιδαζόλης για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς

<b>Συγκέντρωση μετρονιδαζόλης (µg/ml)</b>	<b>Όγκος διαλύματος εργασίας μετρονιδαζόλης (1 µg/ml) (µl)</b>	<b>Όγκος κινητής φάσης (µl)</b>
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

Στο Σχήμα Β.9 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος μετρονιδαζόλης (0,1 µg/ml) σε κινητή φάση, δείγματος υλικού από κόπρανα υπερήλικα πριν την προσθήκη μετρονιδαζόλης (λευκό δείγμα εθελοντής 7) και δείγματος υλικού από κόπρανα (εθελοντής 7) 5 min μετά την προσθήκη μετρονιδαζόλης. Στον Πίνακα Β.13. παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς της μετρονιδαζόλης σε κινητή φάση και στο Σχήμα Β.11. παρουσιάζονται οι αντίστοιχες διαγραμματικές απεικονίσεις. Το όριο ποσοτικοποίησης ήταν 10 ng/ml.

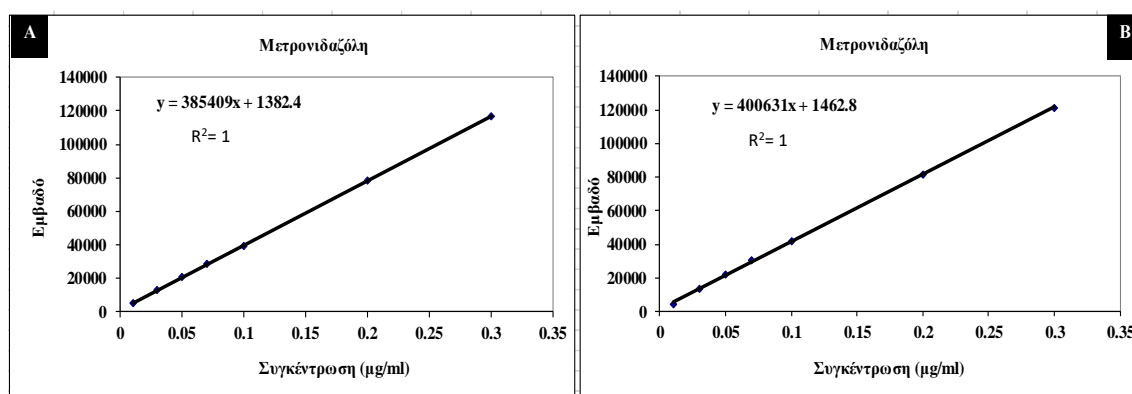


Σχήμα Β.9: Α: Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μετρονιδαζόλης (0.3 μg/ml) σε κινητή φάση, Β: Ενδεικτικό χρωματογράφημα λευκού δείγματος υλικού από κόπρανα (εθελοντής 7), Γ: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα (εθελοντής 7) min από την έναρξη του πειράματος. Η κορυφή στα 5.41 min αντιστοιχεί στη μετρονιδαζόλη.



Πίνακας Β.13: Χαρακτηριστικά καμπυλών αναφοράς της μετρονιδαζόλης σε κινητή φάση

Εύρος συγκεντρώσεων πρότυπων διαλυμάτων μετρονιδαζόλης (Αριθμός σημείων)	Κλίση (SE)	Τομή (SE)	Συντελεστής προσδιορισμού ( $r^2$ )
0.01-0.3 $\mu\text{g/ml}$ (7)	385409 (1585)	1382 (230)	1
0.01-0.3 $\mu\text{g/ml}$ (7)	400631 (3180)	1462 (463)	1



Σχήμα Β.10: Καμπύλες αναφοράς μετρονιδαζόλης σε κινητή φάση

### B.9.3 Ολοσολαζίνη

#### Χρωματογραφικές συνθήκες

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με χρωματογραφική στήλη αντίστροφης φάσης Fortis-C18 (150 mm×3 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) εξοπλισμένη με μία προστήλη Hypersil BDS-C18 (10 mm×4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). Ο όγκος δείγματος ήταν 50 $\mu\text{l}$ . Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ισοκρατικές συνθήκες. Η κινητή φάση αποτελείται από νερό, ακετονιτρίλιο και τριφθοροξικό οξύ, σε αναλογία 55:45:0,1 (v/v/v). Η ανάλυση διεξήχθη σε θερμοκρασία δωματίου με ροή 0.5 ml/min.

Η απορρόφηση της ολσαλαζίνης μετρήθηκε σε μήκος κύματος 365 nm και ο χρόνος έκλουσης ήταν περίπου 9 λεπτά.

#### Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης

Ζυγίστηκαν 10 mg ολσαλαζίνης στον αναλυτικό ζυγό και μεταφέρθηκαν ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Προστέθηκε όγκος νερού και η φιάλη τοποθετήθηκε στο λουτρό υπερήχων για καλή ανάδευση. Συμπληρώθηκε όγκος νερού μέχρι τη χαραγή. Το διάλυμα που προέκυψε είχε συγκέντρωση 100 µg/ml.

#### Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Η ποσοτικοποίηση της ολσαλαζίνης σε όλα τα δείγματα που προέκυψαν από τα πειράματα σταθερότητας έγινε με καμπύλη αναφοράς. Για την ποσοτικοποίηση των δεδομένων η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε από πρότυπα διαλύματα που είχαν παρασκευαστεί σε κινητή φάση. Έχει βρεθεί ότι τα χαρακτηριστικά της καμπύλης αναφοράς της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανά δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από αυτά που λαμβάνονται όταν η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με πρότυπα διαλύματα σε κινητή φάση (Vertzoni *et al.*, 2011).

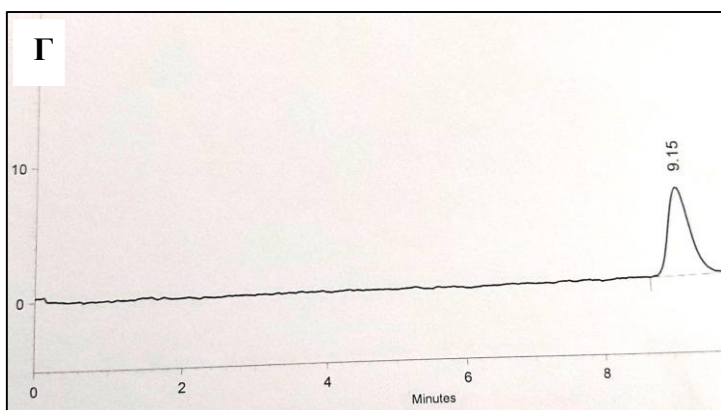
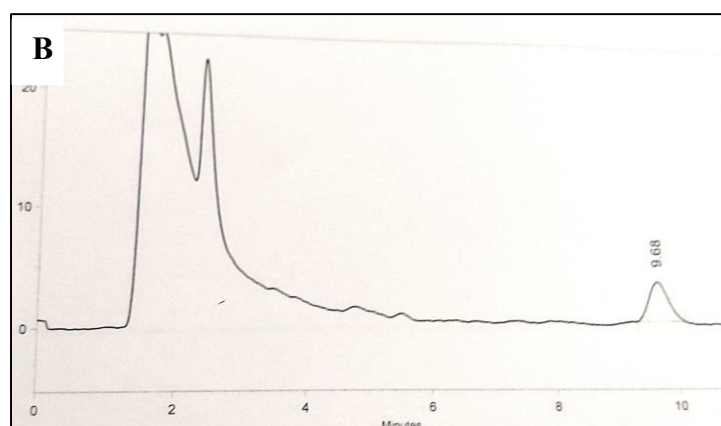
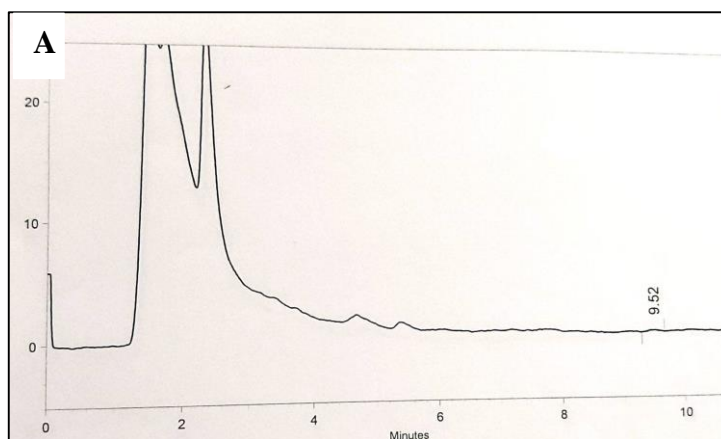
Συγκεκριμένα, 100 µl από το διάλυμα παρακαταθήκης (100 µg/ml) και 900 µl κινητής φάσης μεταφέρθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο HPLC και με ανάδευση σε συσκευή περιδίνησης προέκυψε διάλυμα συγκέντρωσης 10 µg/ml. Σε 100 µl από το διάλυμα εργασίας (10 µg/ml) προστέθηκαν 900 µl κινητής φάσης και μετά από ανάδευση προέκυψε το διάλυμα εργασίας, το οποίο είχε συγκέντρωση 1 µg/ml. Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν από το διάλυμα εργασίας (1 µg/ml) και την κινητή φάση σύμφωνα με τον Πίνακα Β.14.

Πίνακας Β.14: Συγκέντρωση πρότυπων διαλυμάτων ολσαλαζίνης για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Συγκέντρωση ολσαλαζίνης (μg/ml)	Όγκος διαλύματος εργασίας ολσαλαζίνης (1 μg/ml) (μl)	Όγκος κινητής φάσης (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

Στο Σχήμα Β.11 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος ολσαλαζίνης (0.3 μg/ml) σε κινητή φάση, δείγματος υλικού από κόπρανα υπερήλικα πριν την προσθήκη ολσαλαζίνης (λευκό δείγμα εθελοντής 7) και δείγματος υλικού από κόπρανα (εθελοντής 7) 10 min μετά την προσθήκη ολσαλαζίνης

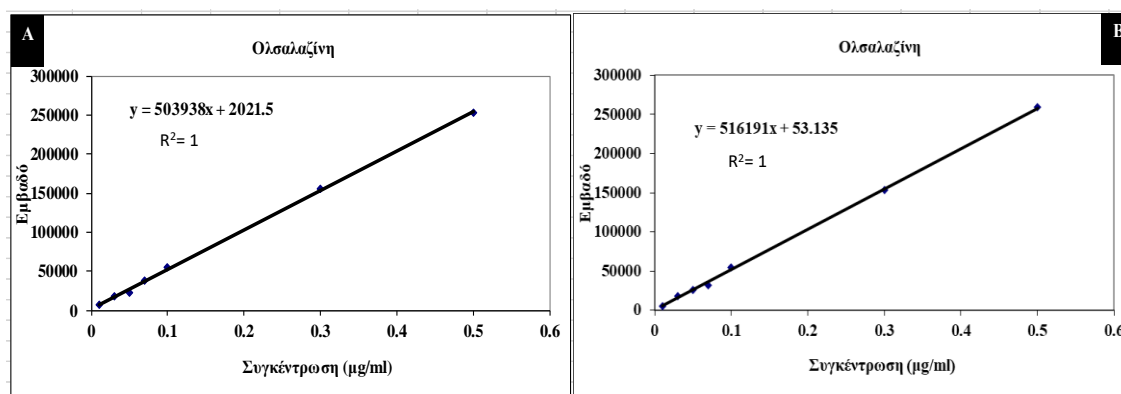
Στον Πίνακα Β.15 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς της ολσαλαζίνης σε κινητή φάση και στο Σχήμα Β.12. παρουσιάζονται οι αντίστοιχες διαγραμματικές απεικονίσεις. Το όριο ποσοτικοποίησης ήταν 10 ng/ml.



Σχήμα Β.11: Α: Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος ολσαλαζίνης (0.3 µg/ml) σε κινητή φάση, Β: Ενδεικτικό χρωματογράφημα λευκού δείγματος υλικού από κόπρανα (εθελοντής 7), Γ: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα (εθελοντής 7) 10 min από την έναρξη του πειράματος.

Πίνακας Β.15: Χαρακτηριστικά καμπυλών αναφοράς ολσαλαζίνης σε κινητή φάση

Εύρος συγκεντρώσεων πρότυπων διαλυμάτων Ολσαλαζίνης (Αριθμός σημείων)	Κλίση (SE)	Τομή (SE)	Συντελεστής προσδιορισμού (r <sup>2</sup> )
0.01-0.5 µg/ml (7)	503938 (5504)	2021 (1245)	1
0.01-0.5 µg/ml (7)	516191 (5986)	53 (1354)	1



Σχήμα Β.12: Καμπύλες αναφοράς ολσαλαζίνης σε κινητή φάση

### Β.10 Ανάλυση πειραματικών δεδομένων βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων

Για την μελέτη της κινητικής της βακτηριακής αποικοδόμησης χρησιμοποιήθηκε το πρωτοταξικό μοντέλο (Vertzoni *et al.*, 2011, Karatza *et al.*, 2016) με βάση την εξίσωση (1) και έγινε υπολογισμός της τιμής της σταθεράς του ρυθμού αποικοδόμησης στο υλικό από κόπρανα κάθε εθελοντή.

$$X = X_0 e^{-kt} \quad (1)$$

X: το ποσοστό του φαρμάκου που έχει παραμείνει στο υλικό από κόπρανα σε χρόνο t

X<sub>0</sub>: 100

k: η σταθερά του ρυθμού βακτηριακής αποικοδόμησης

t: ο χρόνος από την έναρξη της επώασης

Η προσαρμογή έγινε με τη χρήση λογισμικού SigmaPlot® (Systat Software Inc, San Jose, USA). Σε όλες τις περιπτώσεις ο έλεγχος της επιτυχούς προσαρμογής έγινε με βάση το συντελεστή προσδιορισμού (r<sup>2</sup>).

Με βάση τη σταθερά του ρυθμού αποικοδόμησης, υπολογίστηκε ο χρόνος ημίσειας ζωής σε υλικό από κόπρανα κάθε εθελοντή (εξίσωση 2).

$$t_{1/2} = \ln 2 / k \quad (2)$$

Μετά από έλεγχο της κανονικότητας, οι σταθερές των ρυθμών αποικοδόμησης που υπολογίστηκαν από τα πειράματα στο υλικό από κόπρανα των έξι εθελοντών συγκρίθηκαν με τις τιμές που είχαν υπολογιστεί σε υλικό από κόπρανα που είχαν συλλεχθεί από έξι υγιείς ενήλικες σε προηγούμενη μελέτη (Karatza *et al.*, 2016) με τη δοκιμασία t-test για ανεξάρτητες παρατηρήσεις. Παρόμοια, οι σταθερές του ρυθμού αποικοδόμησης που υπολογίστηκαν από τα πειράματα σε υλικό από κόπρανα, που είχε παρασκευασθεί 48 μήνες πριν και διατηρηθεί στους -70 °C, συγκρίθηκαν με τις τιμές που είχαν μετρηθεί αμέσως μετά την παρασκευή του υλικού (Karatza *et al.*, 2016) με paired t-test ή δοκιμασία Wilcoxon, ανάλογα με το αποτέλεσμα της δοκιμασίας κανονικότητας.

Όλες οι δοκιμασίες έγιναν με τη χρήση του λογισμικού SigmaPlot® (Systat Software Inc, San Jose, USA).

## **Γ. Αποτελέσματα και Σχολιασμός**

### **Γ.1 Διάλυση του Α από μικροδισκία άμεσης αποδέσμευσης και από πρωτότυπα προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης σε συνθήκες που προσομοιώνουν τη διαπεπτική περίοδο και την περίοδο πέψης**

Τα πρωτογενή δεδομένα από τα πειράματα διάλυσης των φαρμακευτικών προϊόντων του συνδυασμού δραστικών ουσιών Α παρουσιάζονται στο Παράρτημα V.

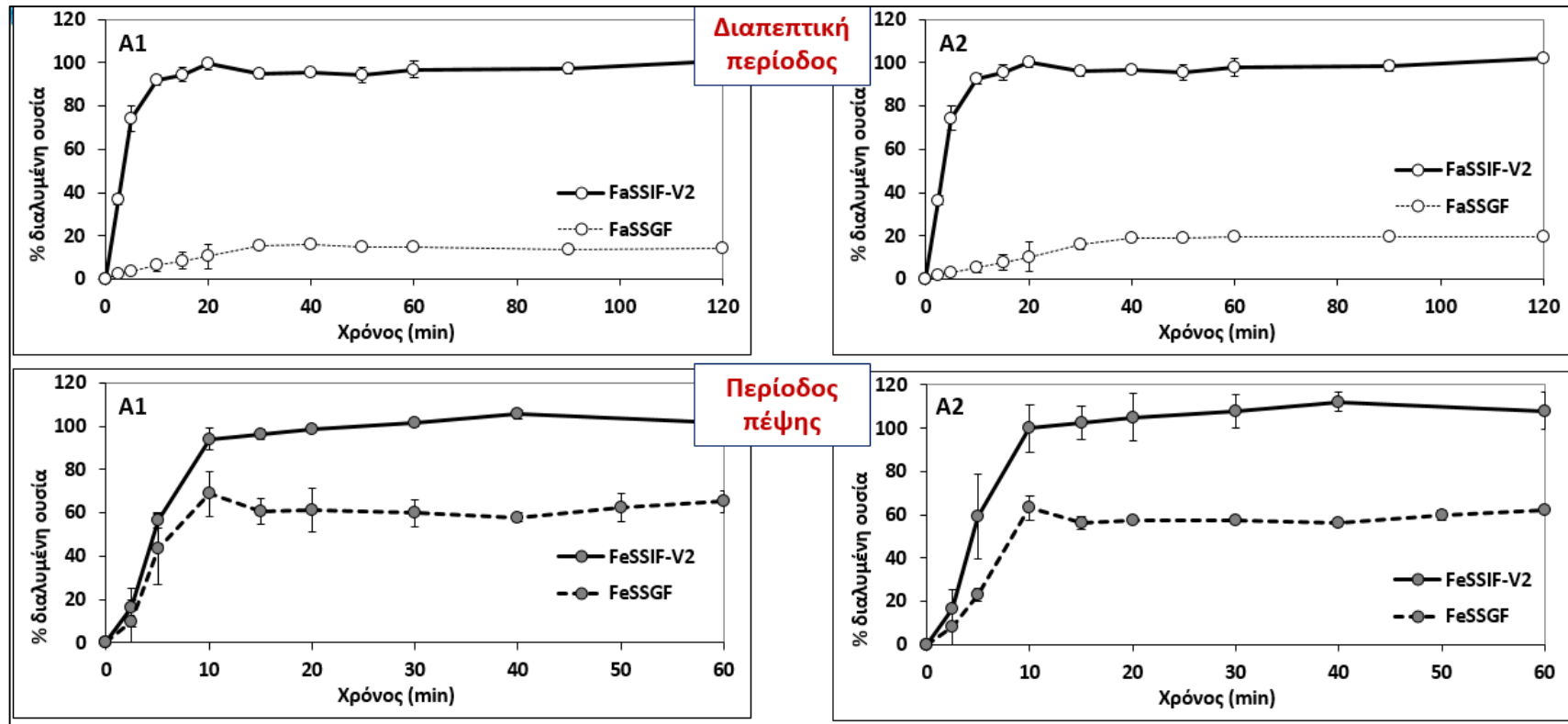
#### *Γ.1.1 Μικροδισκία άμεσης αποδέσμευσης*

Στο Σχήμα Γ.1. παρουσιάζεται το αθροιστικό % ποσοστό διάλυσης σε μέσα που προσομοιώνουν σε επίπεδο II τις συνθήκες στο στόμαχο και στο δωδεκαδάκτυλο, του Α1 και του Α2 από μικροδισκία άμεσης αποδέσμευσης Α, όταν χρησιμοποιείται η διάταξη του περιστρεφόμενου πτερυγίου και προσομοιώνεται η διαπεπτική περίοδος και η περίοδος πέψης.

Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε γρήγορη διάλυση. Το μέγιστο ποσοστό φαρμάκου που αναμένεται να διαλυθεί στο στόμαχο είναι ~ 20% στη διαπεπτική περίοδο και ~ 60% στην περίοδο πέψης.

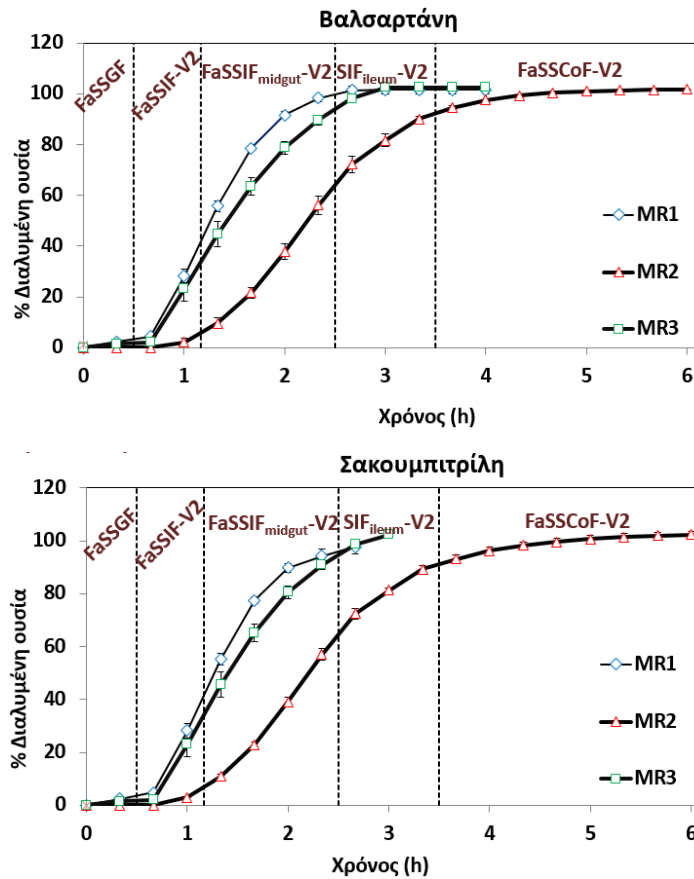
#### *Γ.1.2 Δοκιμαστικά προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης*

Στο Σχήμα Γ.2. παρουσιάζεται το ποσοστό των δραστικών ουσιών του Α που διαλύεται από τα τρία προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης σε συνάρτηση με το χρόνο, όταν χρησιμοποιείται η διάταξη συνεχούς ροής και προσομοιώνεται η διαπεπτική περίοδος. Η αποδέσμευση του MR3 διαρκεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από του MR1 (Σχήμα Γ.2.). Η αποδέσμευση του MR2 προβλέπεται περίπου στο 60% της συνολικής δόσης στο τέλος της νήστιδας (Σχήμα Γ.6), γεγονός το οποίο ενδεχομένως προκαλέσει προβλήματα απορρόφησης στο κατώτερο έντερο, λόγω της χαμηλής διαπερατότητας της δραστικής ουσίας Α1.



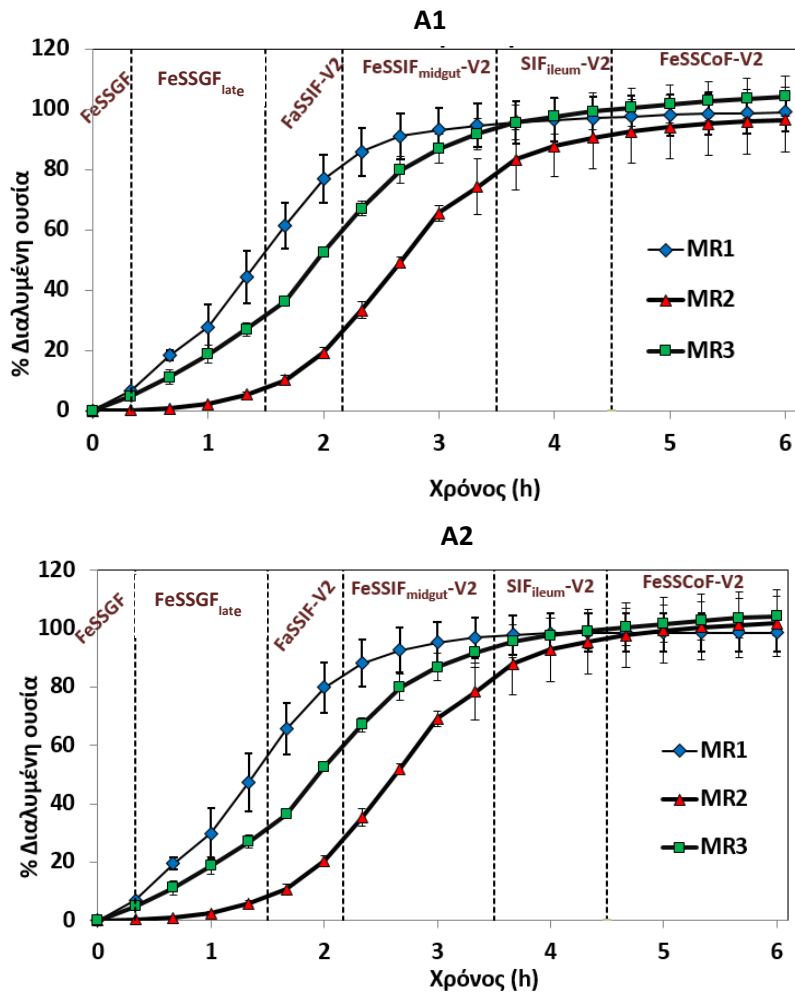
Σχήμα Γ.1. % A1 (Αριστερά) και % A2 (Δεξιά) (Μέσοι±SD, n=3) που διαλύεται από μικροδισκία άμεσης αποδέσμευσης σε συνάρτηση με το χρόνο, όταν προσομοιώνεται η διαπεπτική περίοδος (Πάνω) και η περίοδος πέψης (Κάτω) και χρησιμοποιείται η διατάξη του περιστρεφόμενου πτερυγίου.





Σχήμα Γ.2. % A1 (Πάνω) και % A2 (Κάτω) (Μέσοι±SD, n=3) που διαλύεται από προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης A σε συνάρτηση με το χρόνο, όταν χρησιμοποιείται η διατάξη συνεχούς ροής και προσομοιώνεται η διαπεπτική περίοδος. Οι κάθετες γραμμές δείχνουν τους χρόνους αλλαγής του υγρού μέσου διάλυσης.

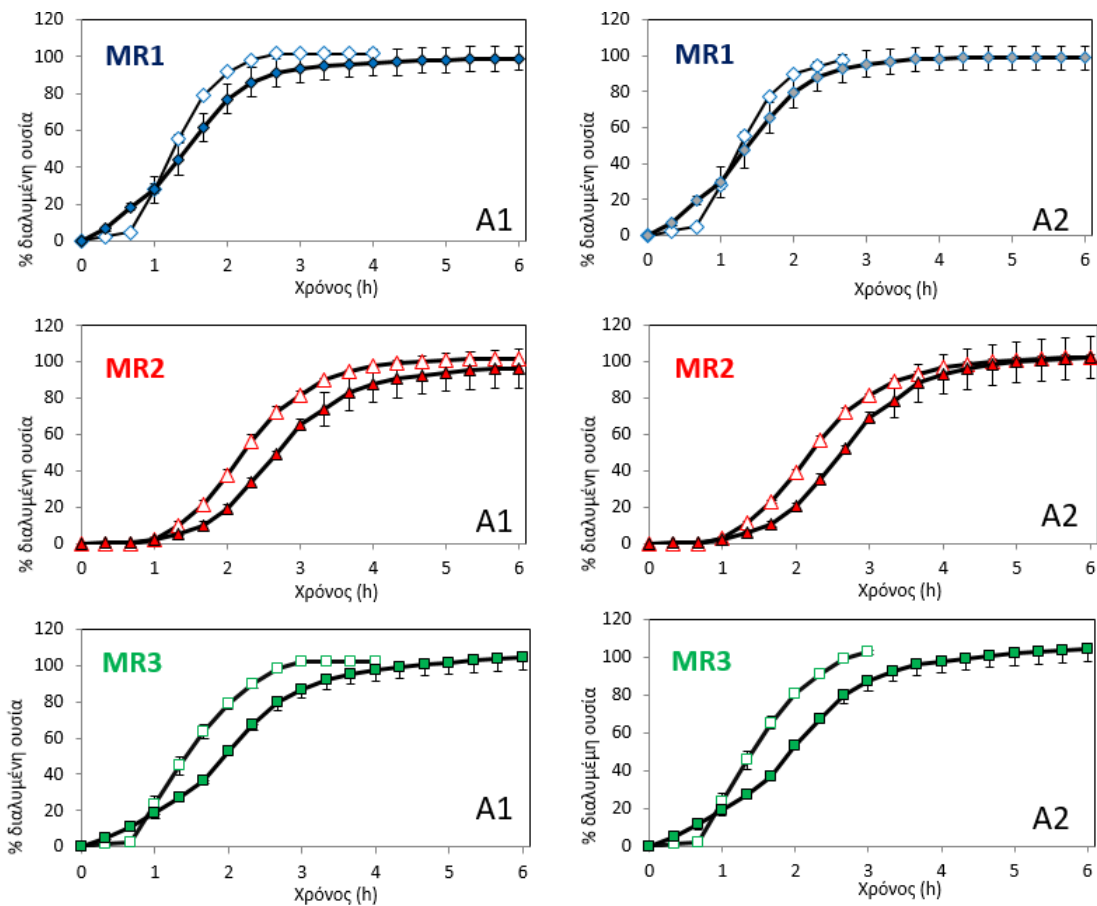
Στο Σχήμα Γ.3. παρουσιάζεται το ποσοστό των δραστικών ουσιών του A που διαλύεται από τρία προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης, σε συνάρτηση με το χρόνο, όταν χρησιμοποιείται η διάταξη συνεχούς ροής και προσομοιώνεται η περίοδος πέψης. Οι κάθετες γραμμές οριοθετούν τις εναλλαγές των μέσων που προσομοιώνουν τα περιεχόμενα του γαστρεντερικού αυλού κατά την περίοδο πέψης.



Σχήμα Γ.3. % A1 (Πάνω) και % A2 (Κάτω) (Μέσοι±SD, n=3) που διαλύεται από προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης A σε συνάρτηση με το χρόνο, όταν χρησιμοποιείται η διατάξη συνεχούς ροής και προσομοιώνεται η περίοδος πέψης. Οι κάθετες γραμμές δείχνουν τους χρόνους αλλαγής του υγρού μέσου διάλυσης.

Παρόμοια με τα δεδομένα που ελήφθησαν όταν προσομοιώθηκε η διαπεπτική περίοδος (Σχήμα Γ.2), η αποδέσμευση από το προϊόν MR3 παρατείνεται λίγο περισσότερο, σε σχέση με το MR1 και η αποδέσμευση από το MR2 στο τέλος της νήστιδας ανέρχεται περίπου στο 60% της συνολικής δόσης, γεγονός που ίσως δημιουργήσει προβλήματα απορρόφησης στο κατώτερο έντερο, λόγω της χαμηλής διαπερατότητας της δραστικής ουσίας A1.

Στο Σχήμα Γ.4. παρουσιάζεται διαγραμματικά η επίδραση της τροφής στην αποδέσμευση των τριών προϊόντων τροποποιημένης αποδέσμευσης. Και για τα 3 προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης παρατηρείται ελαφρώς πιο αργή αποδέσμευση παρουσία τροφής,

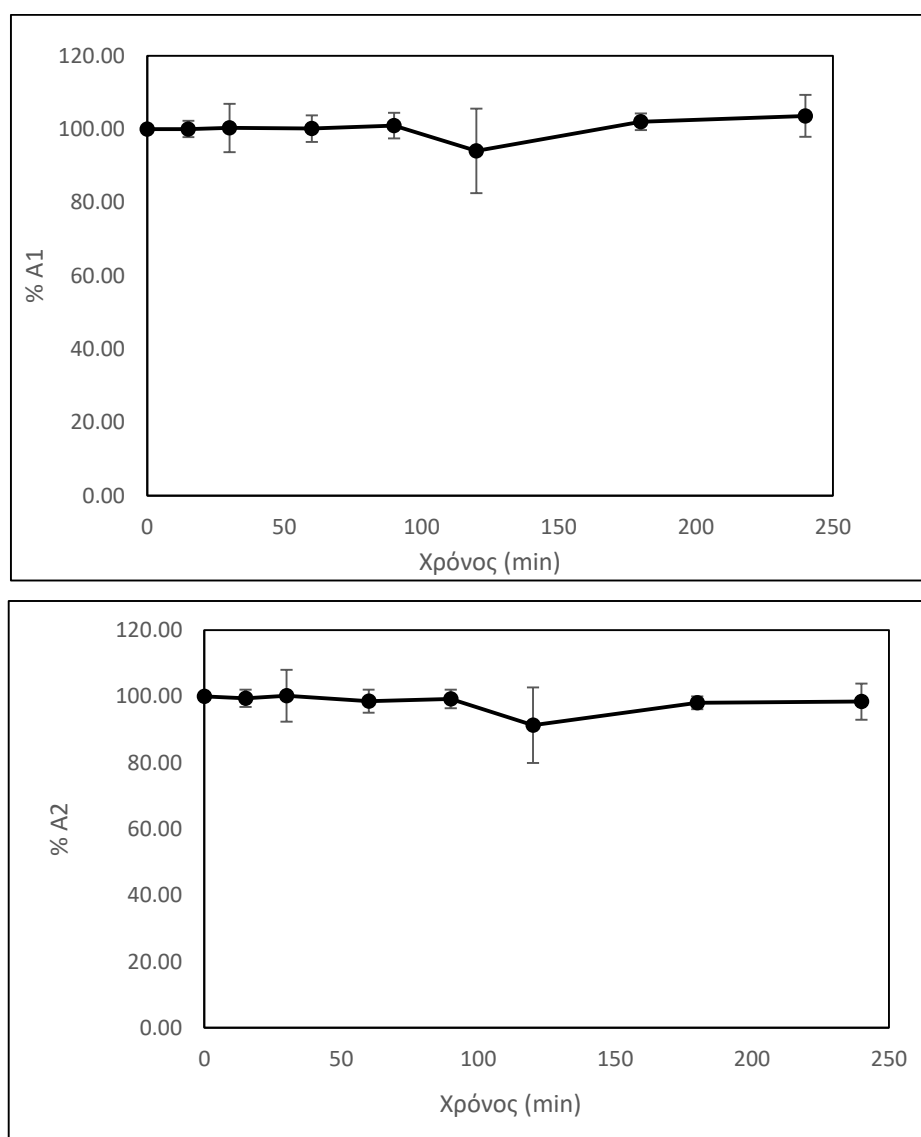


Σχήμα Γ.4. % A1 (Αριστερά) και % A2 (Δεξιά) που διαλύεται από καθένα από τα 3 προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης σε συνάρτηση με το χρόνο (mean ± SD, n=3), όταν προσομοιώνεται η διαπεπτική περίοδος (□◇) και όταν προσομοιώνεται η περίοδος πέψης (▲■◆).

## Γ.2 Σταθερότητα του Α στο μικροβίωμα του κατώτερου εντέρου με βάση δεδομένα από βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα ενηλίκων

Τα πρωτογενή δεδομένα παρουσιάζονται στο Παράρτημα VI.

Στο Σχήμα Γ.5. παρουσιάζεται η μεταβολή του ποσοστού της εμπεριεχόμενης στο Α ουσίας Α1 (πάνω) και Α2 (κάτω) ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ,  $n=3$ ), που παραμένει σε βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων μετά από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, σε συνάρτηση με το χρόνο.



Σχήμα Γ.5. % A1 (πάνω) και % A2 (κάτω) σε βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ,  $n=3$ ) σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης σε αναερόβιες συνθήκες (37 °C).

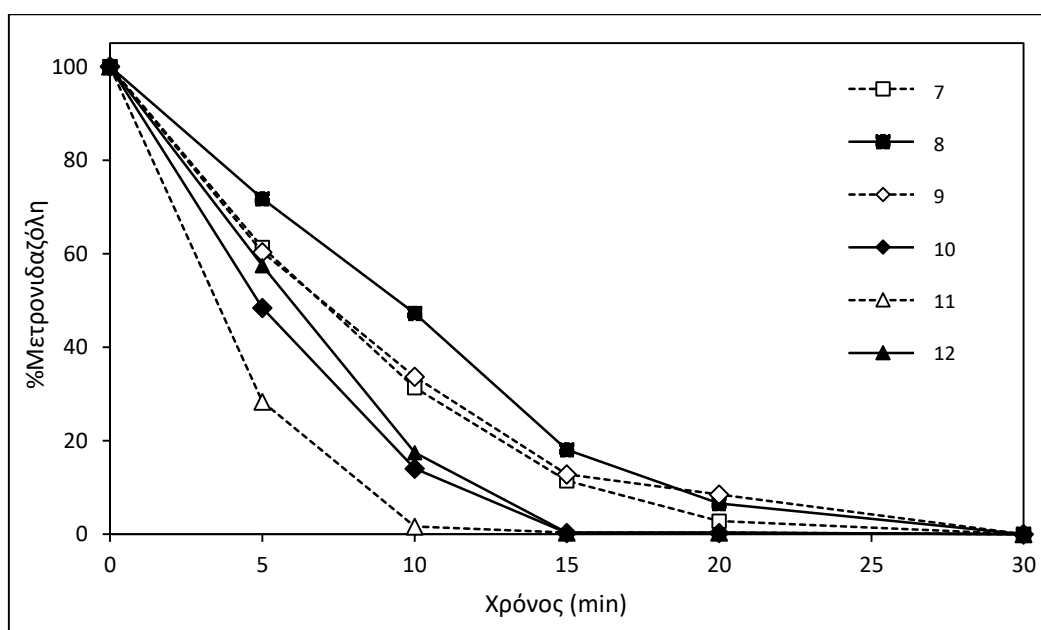
Με βάση το Σχήμα Γ.5, οι δύο δραστικές ουσίες από τις οποίες αποτελείται το προϊόν Α είναι σταθερές σε υλικό από κόπρανα και δεν υφίστανται αποικοδόμηση από τα βακτήρια του εντερικού αυλού.

### Γ.3 Μεταβλητότητα της βακτηριακής ενεργότητας υλικού από κόπρανα υγιών ενηλίκων με βάση δεδομένα αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης

Γ.3.1 Βακτηριακή αποικοδόμηση μετρονιδαζόλης και ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα που παρασκευάστηκε στην παρούσα μελέτη σε σχέση με δεδομένα από προηγούμενη μελέτη

Τα πρωτογενή δεδομένα παρουσιάζονται στα Παραρτήματα VII και VIII.

Στο Σχήμα Γ.6. παρουσιάζεται η μεταβολή του ποσοστού της μετρονιδαζόλης, που παραμένει σε υλικό από κόπρανα κάθε ενήλικα (#7-#12) μετά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, σε συνάρτηση με το χρόνο.



Σχήμα Γ.6: % Μετρονιδαζόλη σε υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης σε αναερόβιες συνθήκες (37 °C) .

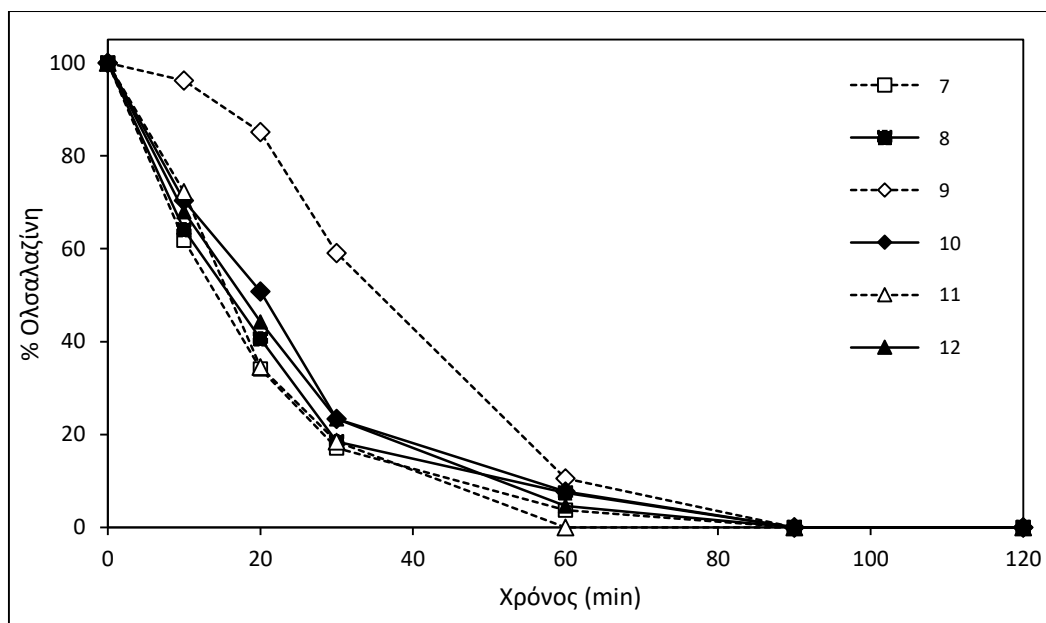
Στον Πίνακα Γ.1 παρουσιάζονται τα δεδομένα, που προέκυψαν από την προσαρμογή του πρωτοταξικού μοντέλου για την εκτίμηση της κινητικής αποικοδόμησης.

Πίνακας Γ.1: Σταθερά του ρυθμού αποικοδόμησης (τυπικό σφάλμα) [k (SE)], χρόνος ημίσειας ζωής ( $t_{1/2}$ ) και συντελεστής προσδιορισμού ( $r^2$ ) της μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα ενηλίκων μετά από προσαρμογή του πρωτοταξικού μοντέλου στα μεμονωμένα δεδομένα.

Αριθμός Εθελοντή	k (SE) ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	$r^2$
7	0.124 (0.012)	5.6	0.99
8	0.098 (0.014)	7.1	0.96
9	0.117 (0.008)	5.9	0.993
10	0.178 (0.019)	3.9	0.98
11	0.273 (0.021)	2.5	0.996
12	0.158 (0.024)	4.4	0.97

Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα Γ.1, η μέση τιμή (τυπική απόκλιση) της σταθεράς του ρυθμού αποικοδόμησης και του χρόνου ημίσειας ζωής της μετρονιδαζόλης είναι  $0.158 (0.063) \text{ min}^{-1}$  και  $4.89 (1.62) \text{ min}$ , αντίστοιχα. Σε προηγούμενη μελέτη οι αντίστοιχες τιμές ήταν  $0.154 (0.074) \text{ min}^{-1}$  και  $6.28 (5.10) \text{ min}$  (Karatzá et al., 2016). Οι σταθερές του ρυθμού βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα των εθελοντών #7 - #12 (παρούσα μελέτη) συγκρίθηκαν (unpaired t-test) με τις σταθερές του ρυθμού βακτηριακής αποικοδόμησης σε υλικό από κόπρανα των εθελοντών #1 - #6 (Karatzá et al., 2016). Δεν ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων εθελοντών ( $P=0.913$ ). Ωστόσο, η ισχύς της στατιστικής δοκιμασίας ήταν χαμηλή ( $\text{power}=0.05$ ).

Στο Σχήμα Γ.7 παρουσιάζεται η μεταβολή του ποσοστού της ολσαλαζίνης, που παραμένει σε υλικό από κόπρανα κάθε ενήλικα (#7-#12) μετά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, σε συνάρτηση με το χρόνο.



Σχήμα Γ.7: % Ολσαλαζίνη σε υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης σε αναερόβιες συνθήκες (37 °C)

Στον Πίνακα Γ.2 παρουσιάζονται τα δεδομένα, που προέκυψαν από την προσαρμογή του πρωτοταξικού μοντέλου για την εκτίμηση της κινητικής αποικοδόμησης.

Πίνακας Γ.2: Σταθερά του ρυθμού αποικοδόμησης (τυπικό σφάλμα) [ $k$  (SE)], χρόνος ημίσειας ζωής ( $t_{1/2}$ ) και συντελεστής προσδιορισμού ( $r^2$ ) της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα ενηλίκων μετά από προσαρμογή του πρωτοταξικού μοντέλου στα μεμονωμένα δεδομένα.

Αριθμός Εθελοντή	$k$ (SE) ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	$r^2$
7	0.054 (0.002)	12.8	0.998
8	0.047 (0.003)	14.3	0.995
9	0.025 (0.006)	27.5	0.92
10	0.041 (0.003)	16.9	1
11	0.051 (0.006)	13.5	0.98
12	0.045 (0.002)	15.5	0.996

Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα Γ.2., η μέση τιμή (τυπική απόκλιση) της σταθεράς του ρυθμού αποικοδόμησης και του χρόνου ημίσειας ζωής της ολσαλαζίνης είναι 0.044



(0.010) min<sup>-1</sup> και 16.74 (5.47) min, αντίστοιχα.. Σε προηγούμενη μελέτη οι αντίστοιχες τιμές ήταν 0.050 (0.027) min<sup>-1</sup> και 17.48 (9.10) min (Karatza et al., 2016).

Οι σταθερές του ρυθμού αποικοδόμησης της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα των εθελοντών #7 - #12 (παρούσα μελέτη) συγκρίθηκαν (unpaired t-test) με τις σταθερές του ρυθμού αποικοδόμησης σε υλικό από κόπρανα των εθελοντών #1 - # 6 (Karatza et al., 2016). Δεν ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων εθελοντών (P=0.646). Ωστόσο, η ισχύς της στατιστικής δοκιμασίας ήταν χαμηλή (power=0.05).

*Γ.3.2 Επίδραση της διατήρησης υλικού από κόπρανα ενηλίκων (-70 οC / 48 mo, Karatza et al. 2016) στη βακτηριακή ενεργότητα με βάση δεδομένα αποικοδόμησης της ολσαλαζίνης και μετρονιδαζόλης.*

Στους Πίνακες Γ.3 και Γ.4 παρουσιάζονται τα δεδομένα που προέκυψαν μετά την προσαρμογή του πρωτοταξικού μοντέλου για την εκτίμηση της κινητικής αποικοδόμησης για την μετρονιδαζόλη και την ολσαλαζίνη, αντίστοιχα.

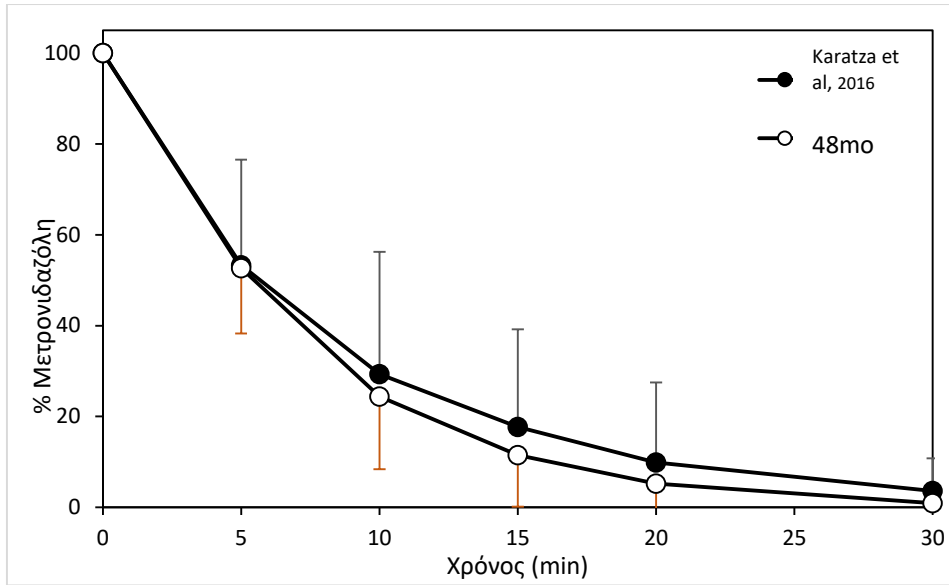
Πίνακας Γ.3: Σταθερά του ρυθμού αποικοδόμησης (τυπικό σφάλμα) [k (SE)], χρόνος ημίσειας ζωής (t<sub>1/2</sub>) και συντελεστής προσδιορισμού (r<sup>2</sup>) της μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα ενηλίκων, 48 μήνες μετά την παρασκευή και διατήρηση του υλικού στους -70 °C (Karatza et al. 2016).

<b>Αριθμός Εθελοντή</b>	<b>k (SE) (min<sup>-1</sup>)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (min)</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
1 <sub>48mo</sub>	0.122 (0.009)	5.7	0.991
2 <sub>48mo</sub>	0.078 (0.009)	8.9	0.97
3 <sub>48mo</sub>	0.160 (0.005)	4.3	1
4 <sub>48mo</sub>	0.144 (0.008)	4.8	0.994
5 <sub>48mo</sub>	0.194 (0.014)	3.6	0.994
6 <sub>48mo</sub>	0.213 (0.006)	3.3	1

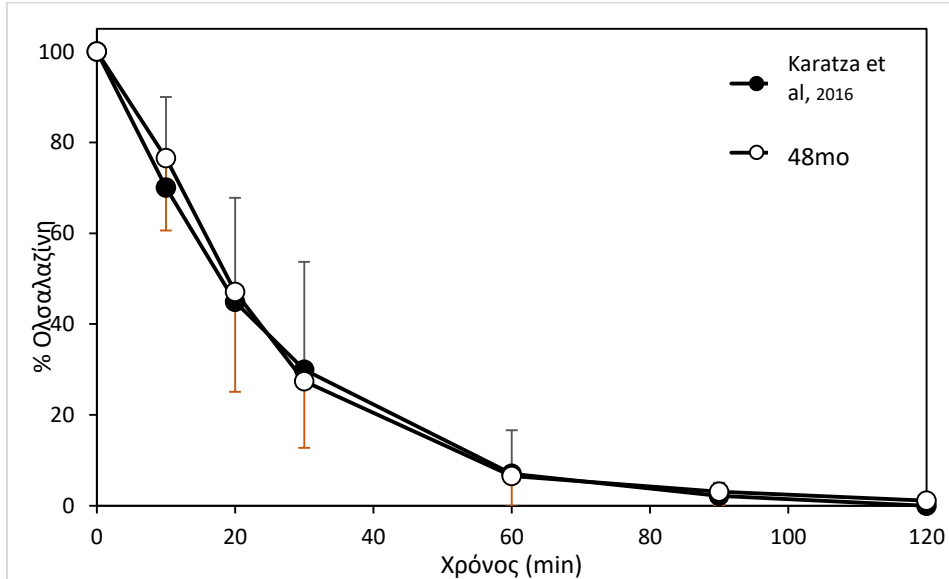
Πίνακας Γ.4: Σταθερά του ρυθμού αποικοδόμησης (τυπικό σφάλμα) [k (SE)], χρόνος ημίσειας ζωής ( $t_{1/2}$ ) και συντελεστής προσδιορισμού ( $r^2$ ) της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα ενηλίκων 48 μήνες μετά την παρασκευή και διατήρηση του υλικού στους -70 °C (Karatza *et al.* 2016)

<b>Αριθμός Εθελοντή</b>	<b>k (SE) (min<sup>-1</sup>)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (min)</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
148mo	0.038 (0.004)	18.15	0.99
248mo	0.023 (0.004)	29.75	0.94
348mo	0.067 (0.005)	10.41	0.99
448mo	0.038 (0.003)	18.05	0.993
548mo	0.042 (0.007)	16.43	0.96
648mo	0.057 (0.001)	12.12	1

Στα Σχήματα Γ.8 και Γ.9 παρουσιάζονται η μεταβολή του ποσοστού της μετρονιδαζόλης (α) και της ολσαλαζίνης (β) σε συνάρτηση με το χρόνο από την έναρξη της επώασης σε υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων αμέσως μετά την παρασκευή του υλικού (Karatza *et al.*, 2016) και 48 μήνες μετά από διατήρηση του υλικού στους -70 °C (παρούσα μελέτη)



Σχήμα Γ.8: % Μετρονιδαζόλη σε υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων [mean (+ ή - SD), n=6] σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης σε αναερόβιες συνθήκες (37 °C). (-●-) Δεδομένα αμέσως μετά την παρασκευή του υλικού (Karatza, et al. 2016) (-○-) Δεδομένα μετά από διατήρηση του υλικού σε -70 °C για 48 μήνες.



Σχήμα Γ.9: % Ολσαλαζίνη σε υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων [mean (+ ή - SD), n=6] σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης σε αναερόβιες συνθήκες (37 °C). (-●-) Δεδομένα αμέσως μετά την παρασκευή του υλικού (Karatza, et al. 2016) (-○-) Δεδομένα μετά από διατήρηση του υλικού σε -70 °C για 48 μήνες.

Μετά από προσαρμογή του πρωτοταξικού μοντέλου για την εκτίμηση της κινητικής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων που διατηρήθηκε στους  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 48 μήνες, η μέση τιμή της σταθεράς του ρυθμού αποικοδόμησης  $k$  ( $\pm$  τυπική απόκλιση) είναι **0.152 (0.049)  $\text{min}^{-1}$** . Ο χρόνος ημίσειας ζωής που υπολογίζεται από την τιμή αυτή είναι **5.09 min**. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της μετρονιδαζόλης αμέσως μετά την παρασκευή του υλικού είχε βρεθεί ίσος με 6.28 min. Η επίδραση της διατήρησης του υλικού (48mo/ $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) στη σταθερά του ρυθμού βακτηριακής αποικοδόμησης  $k$  δε βρέθηκε σημαντική ( $p=0.928$ , paired t-test), αλλά η ισχύς ήταν πολύ χαμηλή (power=0.05).

Μετά από προσαρμογή του πρωτοταξικού μοντέλου για την εκτίμηση της κινητικής αποικοδόμησης της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων που διατηρήθηκε στους  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 48 μήνες, η μέση τιμή της σταθεράς του ρυθμού αποικοδόμησης  $k$  ( $\pm$  τυπική απόκλιση) είναι **0.044 (0.015)  $\text{min}^{-1}$** . Ο χρόνος ημίσειας ζωής που υπολογίζεται από την τιμή αυτή είναι **17.48 min**. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της ολσαλαζίνης αμέσως μετά την παρασκευή του υλικού είχε βρεθεί ίσος με 17.49 min. Η επίδραση της διατήρησης του υλικού (48mo/ $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) στη σταθερά του ρυθμού βακτηριακής αποικοδόμησης δε βρέθηκε σημαντική ( $p=0.688$ , Wilcoxon test, η δοκιμασία κανονικότητας απέτυχε), αλλά η ισχύς ήταν πολύ χαμηλή (power=0.05).

## Δ. Συμπεράσματα

Αναφορικά με τον πρώτο στόχο της παρούσας μελέτης, που ήταν η αξιολόγηση της πιθανότητας ανάπτυξης προϊόντος τροποποιημένης αποδέσμευσης του συνδυασμού δραστικών ουσιών Α (MR1, MR2, MR3) τα δεδομένα συνοψίζονται ως εξής:

Και τα τρία δοκιμαστικά προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης που μελετήθηκαν *in vitro* επιτυγχάνουν σημαντική παράταση της αποδέσμευσης σε συνθήκες που προσομοιώνουν τη διαπεπτική περίοδο και την περίοδο πέψης.

Ανεξάρτητα από τις συνθήκες χορήγησης, από το MR2, σημαντικό ποσοστό (~40%) αναμένεται να αποδεσμευθεί στον ειλέο και το παχύ έντερο, όπου η απορρόφηση ίσως είναι προβληματική για τη χαμηλής διαπερατότητας δραστικής ουσίας Α1.

Η αποδέσμευση του Α από το MR1 ή MR3 δεν αναμένεται να επηρεαστεί σημαντικά από τις συνθήκες χορήγησης. Φαίνεται, ότι με το MR3 επιτυγχάνεται συνολικά μεγαλύτερη διάρκεια αποδέσμευσης συγκριτικά με το MR1.

Με βάση τα δεδομένα αποικοδόμησης των δραστικών ουσιών Α1 και Α2 σε βελτιστοποιημένο υλικό από κόπρανα ενηλίκων ο συνδυασμός δραστικών ουσιών Α αναμένεται να μην παρουσιάζει κλινικά σημαντικά προβλήματα βακτηριακής αποικοδόμησης στο κατώτερο έντερο.

Συνολικά, προϊόντα τροποποιημένης αποδέσμευσης του συνδυασμού δραστικών ουσιών Α αναμένεται να είναι θεραπευτικά αποτελεσματικά. Με βάση τα δεδομένα της παρούσας μελέτης προτείνεται η ανάπτυξη του προϊόντος MR3.

Ο δεύτερος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της μεταβλητότητας της βακτηριακής ενεργότητας υλικού από κόπρανα υγιών ενηλίκων. Διαπιστώθηκε ότι:

-Το υλικό που παρασκευάστηκε για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης δεν παρουσιάζει σημαντικά διαφορετική βακτηριακή ενεργότητα από υλικό που είχε παρασκευασθεί με παρόμοιο τρόπο από άλλους εθελοντές για τις ανάγκες διαφορετικής μελέτης (Karatza *et al.*, 2016).

-Η διατήρηση υλικού από κόπρανα στους  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 48 μήνες (Karatza *et al.*, 2016) δεν οδηγεί σε σημαντική διαφοροποίηση της βακτηριακής ενεργότητας.

## E. Βιβλιογραφία

### Διεθνής

- **Butler J.** & Dressman J., The Developability Classification System: Application of Biopharmaceutics Concepts to Formulation Development, *J. Pharm. Sci.* **99** 4940-4954 (2010)
- **Dahlgren D.**, Roos C., Lundqvist A., Abrahamsson B., Tannergren C. 2, Hellström P.M., Sjögren E., Lennernäs H., Regional Intestinal Permeability of Three Model Drugs in Human, *Mol Pharm* **13** 3013-3021 (2016)
- **Dahlgren D.**, Lennernäs H., Intestinal Permeability and Drug Absorption: Predictive Experimental, Computational and In Vivo Approaches. *Pharmaceutics.*, **11** 411 (2019)
- **Garbacz G.**, Wedemeyer RS., Nagel S., Nagel, Giessmann T., Mönnikes H., Wilson CW., Siegmund W., Weitschies W., Irregular absorption profiles observed from diclofenac extended release tablets can be predicted using a dissolution test apparatus that mimics in vivo physical stresses. *Eur J Pharm Biopharm.*, **70** 421-428 (2008)
- **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, *Mol Pharm.* **14** 4181-4191 (2017)
- **Haller** et al, *The Gut Microbiome in Health and Disease*, Springer International Publishing (2018)
- **Helander HF.**, Fändriks L., Surface area of the digestive tract - revisited. *Scand J Gastroenterol.*, **49** 681-689 (2014)
- **Jantratid E.**, Janssen N., Reppas C., Dressman J., Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update, *Pharm. Res.* **25** 1663-76 (2008)
- **Karatza E.**, Vertzoni M., Muenster U., Reppas C., The Impact of Handling and Storage of Human Fecal Material on Bacterial Activity, *J. Pharm Sci.* **105** 3458-3461 (2016)

- **Karatza E.**, Goumas C., Muenster U., Reppas C., Vertzoni M., Ex vivo evaluation of degradation rates of metronidazole and olsalazine in distal ileum and in cecum: The impact of prandial state, *Int. J. Pharm.* **534** 237-241 (2017)
- **Lavelle A**, Lennon G, Winter DC, O'Connell PR., Colonic biogeography in health and ulcerative colitis., *Gut Microbes* **7** 435-442 (2016)
- **Markopoulos C.**, Cord J.A., Vertzoni M., Dressman J., Reppas C., In vitro simulation of luminal conditions for evaluation and performance of oral drug products: Choosing the appropriate test media, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **93** 173-182 (2015)
- **Reppas C.**, Vertzoni M., Biorelevant in-vitro performance testing of orally administered dosage forms, *J Pharm Pharmacol* **64** 919-930 (2012)
- **Reppas C.**, Vrettos N-N., Dressman J., Cord JA., Yoshihiro M., Brown J., Etherson K., Hanley S., Karkossa F., Karlsson E., Klein S., Maier G-M., McAllister M., Mistry N., Rosenblatt K., Schäfer KJ., Smith KL., Tomaszewska I., Williams J., Winge F., Vertzoni M. Dissolution testing of modified release products with biorelevant media: An OrBiTo ring study using the USP apparatus III and IV *Eur. J. Pharm. Biopharm.* in press (2020)
- **Rosenberger J.**, Butler J., Muenster U., Dressman J., Application of a Refined Developability Classification System., *J Pharm Sci.*, **108** 1090-1100 (2019)
- **Sjögren E.**, Abrahamsson B., Augustijns P., Becker D., Bolger M.B., Brewster M. f, Brouwers J., Flanagan T., Harwood M., Heinen C., Holm R., Juretschke H., Kubbinga M., Lindahlm A., Lukacova V., Münster U., Neuhoff S., M.A. Nguyen , van Peer A., Reppas C., Hodjegan A.R., Tannergren C., Weitschies W., Wilson C., Zane P., Lennernäs H., Langguth P., In vivo methods for drug absorption – Comparative physiologies, model selection, correlations with in vitro methods (IVIVC), and applications for formulation/API/excipient characterization including food effects, *Eur. J. Pharm.* **57** 99-151 (2014)
- **Shamat M.A.**, The role of gastrointestinal microflora in the metabolism of drugs, *Int. J. Pharmaceut.* **97** 1-13 (1993)



- **Shi J.**, Wang X., Nguyen J., Wu A.H., Bleske B.E., Zhu H.J., Sacubitril Is Selectively Activated by Carboxylesterase 1 (CES1) in the Liver and the Activation Is Affected by CES1 Genetic Variation, *Drug Metab. Dispos.* **44** 554-9 (2016)
- **Shreiner AB.**, Kao JY., Young VB.. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol.* **31** 69-75 (2015)
- **Sousa T.**, Yadav V., Zann V., Borde A., Abrahamsson B., Basit A.W., On the colonic bacterial metabolism of azo-bonded prodrugs of 5-aminosalicylic acid, *J. Pharm. Sci.* **103** 3171-3175 (2014)
- **Sousa T.**, Paterson R., Moore V., Carlsson A., Abrahamsson B., Basit A.W., The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs, *Int. J. Pharmaceut.* **363** 1-25 (2008)
- **Sulaiman S.**, Romanos G., Gkolfi E., Goumas K., Koursari M., Kersten E., Muenster U., Reppas C., Vertzoni M., 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)
- **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.* **57** 200-206 (2014)
- **Vertzoni M.**, Dressman J., Butler J., Hempenstall J., Reppas C., Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **60** 413-417 (2005)
- **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. Pharmaceut* **413** 81-86 (2011)
- **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.* **125** 142-150 (2018)
- **Xu J.**, Lin Y., Boulas P., Peterson M.L., Low colonic absorption drugs: Risks and opportunities in the development of oral extended release products, *Expert Opinion on Drug Delivery* (2017)

- **Yadav V.**, Gaisford S., Merchant H.A., Basit A.W. Colonic bacterial metabolism of corticosteroids. *Int. J. Pharmaceut.* **457** 268-274 (2013)
- **Zhang Juan.**, Zhang Jun., Wang R., Gut microbiota modulates drug pharmacokinetics, *Drug Metabolism Reviews* (2018)

*Ηλεκτρονικές διευθύνσεις*

- <https://www.accessdata.fda.gov/> (τελευταία ημερομηνία πρόσβασης: 17-4-2020)
- <https://biniaris-surgery.gr> (τελευταία ημερομηνία πρόσβασης: 20-12-2019)
- <https://www.ema.europa.eu/en> (τελευταία ημερομηνία πρόσβασης: 13-4-2020)
- <https://www.fda.gov/> (τελευταία ημερομηνία πρόσβασης: 19-4-2020)
- <https://www.usp.org/> (τελευταία ημερομηνία πρόσβασης: 20-3-2020)

## ΣΤ. Παραρτήματα

**Παράρτημα Ι:** Έγκριση του πρωτοκόλλου πειραματισμού με υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων από την Επιτροπή Βιοηθικής του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικών και Καποδιστριακών  
Πανεπιστημίων Αθηνών

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
Πανεπιστημιόπολη, Ζωγράφου, Ζωγράφου 157 01



Αθήνα, 25-6-2019

Προς τη Γραμματεία του Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Θέμα: Έγκριση πρωτοκόλλου πειραματισμού

Τα παρακάτω υπογράφοντα μέλη της Επιτροπής Βιοηθικής του Τμήματος Φαρμακευτικής, συνεδρίασαν την Τρίτη 25-6-2019 με θέμα την από 3-6-2019 (Αρ. πρωτ. 1458, την 4-6-2016) αίτηση του Καθηγητή κ. Χ. Ρέππα για έγκριση μελέτης με τίτλο «Εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων σε υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων και υπερηλίκων» στο Τμήμα Φαρμακευτικής.  
Μετά από έλεγχο του πρωτοκόλλου και των επισυναπτόμενων εγγράφων, κρίνουν ότι πληροί τις προϋποθέσεις έγκρισης.

Με τιμή,

  
Αγγελική Κουφούνγκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

  
Νικόλαος Δρακούλης, Αναπληρωτής Καθηγητής

  
Νεκτάριος Αλογόσκουφης, Αναπληρωτής Καθηγητής

  
Μαρία Χαλαμπαλάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια

*Παράρτημα II: Πρωτόκολλο συλλογής κοπράνων και δήλωση συγκατάθεσης  
εθελοντών*



**Εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων σε υλικό από  
κόπρανα υγιών ενηλίκων και υπερηλίκων**

**ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΚΟΠΡΑΝΩΝ  
ΥΓΙΩΝ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΥΠΕΡΗΛΙΚΩΝ**

**ΚΑΙ**

**ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΕΘΕΛΟΝΤΗ ΓΙΑ ΤΗ  
ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**Ερευνητική Ομάδα**

Χρήστος Ρέππας, Ph.D., Καθηγητής

Μαρία Βερτζώνη, Ph.D., Επίκουρη Καθηγήτρια

Ευγενία Γκόλφη, Μεταπτυχιακή φοιτήτρια, ΠΜΣ Βιομηχανική Φαρμακευτική

Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

## Πρωτόκολλο συλλογής κοπράνων από υγιείς ενήλικες και υπερηλίκες

### Εισαγωγή-Σκοπός

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

Σε πρόσφατα ολοκληρωθείσα εργασία, έγινε σύγκριση της κινητικής διάσπασης διαφόρων φαρμάκων σε υλικό από ανθρώπινα κόπρανα υγιών ενηλίκων και σε υλικά από ανθρώπινα κόπρανα υπερηλίκων (Sulaiman et al. 2018). Η σχετική μελέτη έδειξε μικρές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δυο ηλικιακών ομάδων, αλλά η μεταβλητότητα των δεδομένων δεν επέτρεψε τη στατιστική αξιολόγηση των διαφορών. Κατά συνέπεια είναι απαραίτητη η συλλογή δεδομένων από περισσότερους εθελοντές.

Για την ολοκλήρωση της μελέτης είναι απαραίτητη η συμμετοχή 6 ενηλίκων και 6 υπερηλίκων.

### Μεθοδολογία

#### Κριτήρια συμμετοχής

Ο εθελοντής πρέπει να :

- i. Είναι πρόθυμος να παρέχει κόπρανα για τους σκοπούς της μελέτης, όπως θα αποδεικνύεται από γραπτή δήλωση συγκατάθεσης
- ii. Είναι ηλικίας 18-55 ετών (ενήλικες) ή  $\geq 65$  ετών (υπερήλικες)
- iii. Ζυγίζει όχι πέραν του  $\pm 20\%$  του ιδανικού βάρους του, όπως αυτό καθορίζεται από τους πίνακες Metropolitan
- iv. Ανήκει στην λευκή φυλή
- v. Τρέφεται κυρίως με Μεσογειακή διατροφή (ελαιόλαδο, ψάρι, κρέας, γαλακτοκομικά προϊόντα, όσπρια, φρούτα , λαχανικά κ.α)

- vi. Είναι σε θέση να απέχει από το κάπνισμα και τα οينوπνευματώδη ποτά 3 μέρες πριν την ημέρα της συλλογής των κοπράνων
- vii. Δεν έχει κάνει χρήση αντιβιοτικού φαρμάκου τους τελευταίους 3 μήνες τουλάχιστον (Sousa et al. 2014)
- viii. Δεν έχει κάνει χρήση προβιοτικών ή/και πρέβιοτικών [συμπληρώματα διατροφής, λειτουργικά τρόφιμα (functional foods) κ.α.] τις τελευταίες 30 ημέρες τουλάχιστον (De Angelis et al. 2013)
- ix. Έχει συνηθισμένες εντερικές συνήθειες τον τελευταίο μήνα και τα κόπρανα να είναι Τύπου 2, 3 ή 4 σύμφωνα με την κλίμακα Bristol (Παράρτημα Ι) (Lewis and Heaton 1997)
- x. Δεν έχει κάνει χρήση φαρμάκων τα οποία επηρεάζουν τη λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος για διάστημα 7 ημερών πριν τη μελέτη (Mastromarino et al. 1978)

#### *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. Ο εθελοντής έχει αποκλείσει κάποια σημαντική ομάδα τροφίμων από το διαιτολόγιό του (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

#### *Μεθοδολογία συλλογής και επεξεργασίας κοπράνων*

Την ημέρα της συλλογής ο εθελοντής θα καταναλώσει κανονικά το πρωινό ή/και το μεσημεριανό του γεύμα.

Θα γίνει συλλογή κοπράνων κατά τη διάρκεια της πρώτης κένωσης της ημέρας.

Η συλλογή θα γίνει σε προζυγισμένους, πλαστικούς περιέκτες.

Ο πλαστικός περιέκτης με τα κόπρανα θα τοποθετείται άμεσα σε αναερόβιο περιβάλλον (Tannergren et al. 2014, Sousa et al. 2014, Karatza et al 2016). Ο αναερόβιος θάλαμος θα έχει θερμοκρασία 37 °C και υγρασία 70%.

Μέσα στον αναερόβιο θάλαμο, τα κόπρανα θα ζυγίζονται, θα αραιώνονται με φυσιολογικό ορό και θα ομογενοποιούνται με την βοήθεια ενός mixer.

Στην συνέχεια θα περνούν μέσα από κόσκινο με μέγεθος οπών 350μm (Tannergren et al. 2014, Sousa et al.2014, Yadav et al. 2013, Karatza et al 2016) ώστε να απομακρυνθούν τα κομμάτια, που δεν ομογενοποιήθηκαν. Το μίγμα που προκύπτει θα αποθηκεύεται σε υάλινους περιέκτες στους -70 °C (Tannergren et al. 2014, Karatza et al 2016), μέχρι να χρησιμοποιηθεί στη μελέτη σταθερότητας ενός φαρμάκου.

## Βιβλιογραφία

[Basit AW](#), [Lacey LF](#) Colonic metabolism of ranitidine: implications for its delivery and absorption *Int J Pharm* 227(1-2):157-65 (2001)

[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*. 8(10):e76993 (2013)

Karatza E, Vertzoni M, Muenster U, Reppas C. The Impact of Handling and Storage of Human Fecal Material on Bacterial Activity. *J Pharm Sci*. 2016 Nov;105(11):3458-3461.

[Lewis SJ](#), Heaton [KW](#) Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time *Scand J Gastroenterol*. 32(9):920-4 (1997)

[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* 38(12):4458-62. (1978)

[Nyberg L](#), [Månsson W](#), [Abrahamsson B](#), [Seidegård J](#), [Borgå O](#). A convenient method for local drug administration at predefined sites in the entire gastrointestinal tract: experiences from 13 phase I studies. *Eur J Pharm Sci*. 30(5):432-40 (2007)

[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*. 103(10):3171-5 (2014)

Sulaiman S., Romanos G., Gkolfi E., Goumas K., Koursari M., Kersten E., Muenster U., Reppas C., Vertzoni M. 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, Athens, 24-26 May, 2018

[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*. 57:200-6 (2014)

[Yadav V](#), [Gaisford S](#), [Merchant HA](#), [Basit AW](#). Colonic bacterial metabolism of corticosteroids. *Int J Pharm*. 457(1):268-74 (2013)





**Εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων σε υλικό από  
κόπρανα υγιών ενηλίκων**

**ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΕΘΕΛΟΝΤΗ ΓΙΑ ΤΗ  
ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**Ερευνητική Ομάδα**

Χρήστος Ρέππας, Ph. D., Καθηγητής

Μαρία Βερτζώνη, Ph.D., Επίκουρη Καθηγήτρια

Ευγενία Γκόλφη, Μεταπτυχιακή φοιτήτρια, ΠΜΣ Βιομηχανική Φαρμακευτική

Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

*Καλείστε να συμμετάσχετε σε μια μελέτη που περιλαμβάνει τη συλλογή κοπράνων σε πλαστικό περιέκτη. Η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος ενός ερευνητικού προγράμματος του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.*

*Πριν αποφασίσετε για τη συμμετοχή 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 συμμετάσχετε στη διαδικασία επιλογής εθελοντών και, στην περίπτωση που επιλεγείτε, να συμμετάσχετε στη μελέτη.*

### Ποιος είναι ο σκοπός της μελέτης;

Πολλά φάρμακα, που χορηγούνται από το στόμα, έχουν στόχο να φτάσουν στη γενική κυκλοφορία του αίματος από τον αυλό του παχέος εντέρου ή να δράσουν τοπικά στο παχύ έντερο. Όμως, στον αυλό του παχέος εντέρου υπάρχει πληθώρα βακτηρίων, τα οποία είναι πιθανό να διασπασούν το φάρμακο. Σε πρόσφατα ολοκληρωθείσα εργασία, έγινε σύγκριση της κινητικής διάσπασης διαφόρων φαρμάκων σε υλικό από ανθρώπινα κόπρανα υγιών ενηλίκων και σε υλικά από ανθρώπινα κόπρανα υπερηλίκων. Η σχετική μελέτη έδειξε μικρές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δυο ηλικιακών ομάδων, αλλά η μεταβλητότητα των δεδομένων δεν επέτρεψε τη στατιστική αξιολόγηση των διαφορών. Κατά συνέπεια είναι απαραίτητη η συλλογή δεδομένων από περισσότερους εθελοντές.

### Γιατί έχω κληθεί να συμμετάσχω και ποια είναι η διαδικασία;

Ανταποκριθήκατε εθελοντικά σε μια πρόσκληση, σύμφωνα με την οποία ζητούνται υγιείς εθελοντές για τη συγκεκριμένη μελέτη. Αρχικά, θα υποβληθείτε σε συνέντευξη, που στόχο έχει να εκτιμηθεί αδρά η υγεία σας σε σχέση με τα κριτήρια επιλογής και αποκλεισμού συμμετοχής στην παρούσα μελέτη, που παρουσιάζονται πιο κάτω:

#### *Κριτήρια συμμετοχής*

Ο εθελοντής πρέπει να :

- i. Είναι πρόθυμος να παρέχει κόπρανα για τους σκοπούς της μελέτης, όπως θα αποδεικνύεται από γραπτή δήλωση συγκατάθεσης
- ii. Είναι 18-55 ετών και ζυγίζει όχι πέραν του  $\pm 20\%$  του ιδανικού βάρους του, όπως αυτό καθορίζεται από τους πίνακες Metropolitan
- iii. Ανήκει στη λευκή φυλή
- iv. Είναι σε θέση να απέχει από το κάπνισμα και τα οινόπνευματώδη ποτά 3 μέρες πριν την ημέρα της συλλογής των κοπράνων
- v. Δεν έχει κάνει χρήση αντιβιοτικού φαρμάκου τους τελευταίους 6 μήνες τουλάχιστον (Sousa et al. 2014)
- vi. Δεν έχει κάνει χρήση προβιοτικών ή/και πρέβιοτικών [συμπληρώματα διατροφής, λειτουργικά τρόφιμα (functional foods) κ.α.] τις τελευταίες 30 ημέρες τουλάχιστον (De Angelis et al. 2013)
- vii. Έχει συνηθισμένες εντερικές συνήθειες τον τελευταίο μήνα και τα κόπρανα να είναι Τύπου 2, 3 ή 4 σύμφωνα με την κλίμακα Bristol (Παράρτημα Ι) (Lewis and Heaton 1997)
- viii. Δεν έχει κάνει χρήση φαρμάκων τα οποία επηρεάζουν τη λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος για διάστημα 7 ημερών πριν τη μελέτη (Mastromarino et al. 1978)

#### *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. Ο εθελοντής έχει αποκλείσει κάποια σημαντική ομάδα τροφίμων από το διαιτολόγιό του (π.χ. είναι χορτοφάγος, αποφεύγει κατανάλωση χοιρινού κρέατος, αποφεύγει γαλακτοκομικά προϊόντα, αποφεύγει φρούτα ή/και λαχανικά)
- iii. Ιστορικό γαστρεντερικού προβλήματος
- iv. Λήψη οποιουδήποτε φαρμάκου για οποιοδήποτε λόγο τις τελευταίες δύο εβδομάδες
- v. Οι εντερικές συνήθειες παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση από την άποψη της συχνότητας και του τύπου των κοπράνων

Εάν επιλεγείτε, εξαρτάται από εσάς, αν θα συμμετάσχετε ή όχι. Μετά την συνέντευξη και την επιλογή σας θα πρέπει να υπογράψετε την παρούσα δήλωση συγκατάθεσης. Εάν αποφασίσετε να λάβετε μέρος, είστε ελεύθερος/η να αποχωρήσετε οποιαδήποτε στιγμή χωρίς να εξηγήσετε τους λόγους. Για την ολοκλήρωση της μελέτης είναι απαραίτητη η συμμετοχή 6 εθελοντών. 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 συλλέξετε σε προζυγισμένους πλαστικούς περιέκτες την πρώτη κένωση της ημέρας. 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 από τη συμμετοχή σας 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 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, 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 σας και κάθε προσωπικό δεδομένο που θα γίνει γνωστό στους ερευνητές ιατρικό στοιχείο πλαίσια της συνέντευξης θα επισημαίνεται μόνο με τον αριθμό εθελοντή και όχι το ονοματεπώνυμό σας. Μόνο οι ερευνητές θα έχουν αντιστοιχία του αριθμού με το ονοματεπώνυμό σας.

## 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 Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών μπορεί να ζητήσει προστασία των πνευματικών δικαιωμάτων σχετικά με τα αποτελέσματα που θα προκύψουν από τα δείγματα που συλλέχθηκαν. Δεν δικαιούστε κανένα οικονομικό όφελος ή μερίδιο από αυτήν την πνευματική ιδιοκτησία. Επίσης, δεν θα έχετε κανένα πνευματικό δικαίωμα στην πνευματική ιδιοκτησία που αναφέρθηκε.

## Περισσότερες πληροφορίες

Μ. Βερτζώνη (Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής Ε.Κ.ΠΑ.)

Τηλέφωνο: 210 727 4445, 693 71 98 260

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

Χρήστος Ρέππας (Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)

Τηλέφωνο: 210 727 4678

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

Εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων σε υλικό από κόπρανα υγιών  
ενηλίκων

**ΦΥΛΛΟ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ**

Όνοματεπώνυμο εθελοντή: \_\_\_\_\_

1. Διαβεβαιώνω, ότι έχω διαβάσει και κατανοήσει πλήρως τις πληροφορίες, καθώς και τους όρους σχετικά με τη συμμετοχή μου στη συγκεκριμένη μελέτη όπως αυτά διατυπώνονται προηγούμενες σελίδες του παρόντος κειμένου και είχα την ευκαιρία να κάνω ερωτήσεις.	<input type="checkbox"/>
2. Κατανώ, ότι η συμμετοχή μου είναι εθελοντική και είμαι ελεύθερος/η να εγκαταλείψω όποια χρονική στιγμή επιθυμώ, χωρίς να αναφέρω το λόγο και χωρίς να επηρεαστούν τα νόμιμα δικαιώματά μου.	<input type="checkbox"/>
3. Κατανώ τις παραγράφους, στις οποίες αναφέρεται ή υπονοείται, ότι προσωπικά μου δεδομένα θα γίνουν γνωστά στην ερευνητική ομάδα. Έχω διαβεβαιωθεί, ότι όλα τα σχετιζόμενα με το πρόσωπό μου δεδομένα θα χρησιμοποιηθούν με απόλυτη μυστικότητα και δε θα δημοσιοποιηθούν.	<input type="checkbox"/>
4. Συμφωνώ να συμμετάσχω στη μελέτη.	<input type="checkbox"/>
5. Κατανώ 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 (Μ. Βερτζώνη).	<input type="checkbox"/>

Όνοματεπώνυμο εθελοντή

Ημερομηνία & Υπογραφή

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Όνοματεπώνυμο Μάρτυρα

Ημερομηνία & Υπογραφή

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Μαρία Βερτζώνη

Ημερομηνία & Υπογραφή

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Οδηγίες σχετικά με τις τρεις ημέρες πριν τη συλλογή του δείγματος

Σας παρακαλούμε, τρεις ημέρες πριν τη συλλογή κοπράνων:

1. Να μην καταναλώσετε καθόλου φάρμακα, κυρίως αυτά που επηρεάζουν την εντερική δραστηριότητα (καθαρτικά, αντιβιοτικά, αντιδιαρροϊκά κ.τ.λ.)
2. Να μην κάνετε χρήση συμπληρωμάτων διατροφής ή άλλων προϊόντων ιδιαίτερα πλούσια σε προβιοτικά ή/και πρεβιοτικά
3. Να συνεχίσετε τις φυσιολογικές του διατροφικές συνήθειες. Σας παρακαλούμε να τις καταγράφετε τακτικά στο φύλλο καταγραφής
4. Να μην καταναλώσετε: παντζάρια, σουσάμι και φλοιό ντομάτας
5. Να προσκομίσετε συμπληρωμένο το φύλλο καταγραφής γευμάτων και εντερικής δραστηριότητας την ημέρα της συλλογής του δείγματος

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

**Όνοματεπώνυμο** -----

**Τηλέφωνο** -----

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

**ΓΕΥΜΑΤΑ**

<p><b>Ημέρα -3</b> Ημερομηνία -- - - - -</p>	<p><i>Πρωί</i> ----- ----- <i>Μεσημέρι</i> ----- ----- <i>Βράδυ</i> ----- -----</p>
<p><b>Ημέρα -2</b> Ημερομηνία -- - - - -</p>	<p><i>Πρωί</i> ----- ----- <i>Μεσημέρι</i> ----- ----- <i>Βράδυ</i> ----- -----</p>
<p><b>Ημέρα -1</b> Ημερομηνία -- - - - -</p>	<p><i>Πρωί</i> ----- ----- <i>Μεσημέρι</i> ----- ----- <i>Βράδυ</i> ----- -----</p>



ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

	<b>Ωρα</b>	<b>Τύπος</b>
<b>Ημέρα -3</b> Ημερομηνία -- - - - - -- - - - -	----- ----- ----- -----	----- ----- ----- -----
<b>Ημέρα -2</b> Ημερομηνία -- - - - - -- - - - -	----- ----- ----- -----	----- ----- ----- -----
<b>Ημέρα -1</b> Ημερομηνία -- - - - - -- - - - -	----- ----- ----- -----	----- ----- ----- -----

*Παράρτημα III: Ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιήθηκε για τη συνέντευξη υποψήφιων εθελοντών*



**Εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων  
σε υλικό από κόπρανα υγιών εθελοντών**

**HAF**

**#**

**Όνοματεπώνυμο:** \_\_\_\_\_

**Τηλέφωνο:** \_\_\_\_\_

**Ημερομηνία:** \_\_\_\_\_

**ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ**

1. Καπνίζετε;  Ναι  Όχι Πόσα τσιγάρα την ημέρα;
- Είστε σε θέση να απέχετε από το κάπνισμα τουλάχιστον για 3 ημέρες;  Ναι  Όχι
2. Είστε σε θέση να απέχετε από την κατανάλωση αλκοόλ τουλάχιστον για 3 ημέρες;  Ναι  Όχι
3. Ποια είναι η ηλικία σας, ποιο είναι το βάρος και ποιο το ύψος σας;
- ετών  kg  m
4. Έχετε ή είχατε στο παρελθόν κάποιο γαστρεντερολογικό πρόβλημα;  Ναι  Όχι
- \_\_\_\_\_
5. Έχετε ή είχατε στο παρελθόν κάποιο χρόνια πρόβλημα υγείας (π.χ. από το καρδιαγγειακό σύστημα, το θυρεοειδή, το πάγκρεας ή το ήπαρ);  Ναι  Όχι
- Πως το αντιμετωπίσατε;
- \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
6. Έχετε υποβληθεί σε κάποια σημαντική χειρουργική επέμβαση;
- \_\_\_\_\_
7. Τι φάρμακα έχετε καταναλώσει τις τελευταίες 30 μέρες;

---

8. Παίρνετε συνταγογραφούμενα φάρμακα;

 Ναι Όχι

Αν ναι ποια;

---

9. Έχετε κάνει χρήση αντιβιοτικού μέσα στους τελευταίους 6 μήνες;

 Ναι Όχι

10. Έχετε κάνει χρήση κάποιου καθαρτικού την τελευταία εβδομάδα;

 Ναι Όχι

11. Παίρνετε μη συνταγογραφούμενα φάρμακα;

 Ναι Όχι

Αν ναι ποια και πόσο συχνά;

---

12. Κάνετε χρήση συμπληρωμάτων διατροφής ή άλλων σκευασμάτων τον τελευταίο μήνα;

 Ναι Όχι

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

---

13. Είστε σε θέση να απέχετε από την κατανάλωση συνταγογραφούμενων και μη συνταγογραφούμενων φαρμάκων τουλάχιστον για 3 ημέρες;

 Ναι Όχι

14. Είστε αποκλειστικά χορτοφάγος;

 Ναι Όχι

15. Έχετε αποκλείσει κάποια σημαντική ομάδα τροφίμων (κρέας, γαλακτοκομικά, φρούτα, λαχανικά κ.τ.λ.) από το διαιτολόγιό σας;

 Ναι Όχι

Αν ναι ποια;

---

16. Έχετε πάρει πρόσφατα μέρος σε κάποια μελέτη που περιλαμβάνει φάρμακα;

 Ναι Όχι

17. Έχετε σταθερές εντερικές συνήθειες όσον αφορά στην συχνότητα των κενώσεων;








Ναι

Όχι

Πόσες κενώσεις έχετε την ημέρα κατά μέσο όρο;

18. Τι τύπου ήταν τα κόπρανά σας τον τελευταίο μήνα βάσει την εικόνα σελ. 3;

*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

---

---

---

---

#### *Παράρτημα IV: Έλεγχος καλής λειτουργίας αναερόβιου θαλάμου*

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

- θερμοκρασία 37 °C
- σχετική υγρασία 70% και
- 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. 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.

##### Διάλυμα 1

Για την παρασκευή του διαλύματος 1, ζυγίζονται 50 g NaHCO<sub>3</sub> και μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 500 ml. Στην ογκομετρική φιάλη προστίθεται νερό και η φιάλη τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για να διαλυθεί το NaHCO<sub>3</sub>.

##### Διάλυμα 2

Για την παρασκευή του διαλύματος 2 ζυγίζεται 0.1 g μπλε του μεθυλενίου και διαλύεται με 10 ml νερό. 0.5 ml από το προκύπτον διάλυμα μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Ακολούθως, ζυγίζονται 20 g γλυκόζης, τα οποία επίσης μεταφέρονται στην ογκομετρική φιάλη, όπου προστίθεται νερό. Η φιάλη τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για να διαλυθεί η γλυκόζη.

##### Παρασκευή Δείκτη

Σε υάλινο περιέκτη αναμιγνύονται 45 ml από το διάλυμα 1 και 5 ml από το διάλυμα 2

**Παράρτημα V: Πρωτογενή δεδομένα διάλυσης Α**

Στους πίνακες ΠIV.1.- ΠIV.10. παρουσιάζονται τα πρωτογενή δεδομένα διάλυσης των προϊόντων άμεσης (**IR**) και παρατεταμένης αποδέσμευσης (**MR1-MR3**) συνδυασμού θεραπευτικών παραγόντων Α.

Πίνακας ΠIV.1: Δεδομένα διάλυσης IR σε FaSSGF

t (min)	% A1					
	1	2	3	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	% Τυπική απόκλιση
2.5	2.22	2.55	2.31	2.36	0.17	7.25
5	4.40	3.18	3.03	3.54	0.75	21.20
10	8.89	3.89	6.21	6.33	2.50	39.51
15	10.04	4.09	11.14	8.42	3.79	45.05
20	11.25	4.41	15.77	10.48	5.72	54.58
30	14.64	15.37	16.33	15.45	0.85	5.50
40	16.28	14.75	16.21	15.75	0.86	5.46
50	14.99	14.29	14.61	14.63	0.35	2.40
60	15.19	14.24	14.54	14.66	0.48	3.30
90	14.07	13.75	13.73	13.85	0.19	1.36
120	14.67	13.14	14.09	13.97	0.77	5.53

t (min)	% A2					
	1	2	3	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	% Τυπική απόκλιση
2.5	1.77	2.11	1.88	1.92	0.18	9.19
5	3.79	2.72	2.57	3.03	0.67	22.09
10	7.88	3.28	5.40	5.52	2.31	41.76
15	9.06	3.53	9.98	7.52	3.49	46.41
20	10.27	3.85	16.97	10.36	6.56	63.33
30	13.84	15.90	18.25	15.99	2.21	13.80
40	17.88	18.62	19.54	18.68	0.83	4.44
50	19.07	18.93	19.42	19.14	0.25	1.30
60	19.85	19.68	19.67	19.73	0.10	0.53
90	19.55	19.61	19.09	19.42	0.28	1.46
120	20.12	19.19	19.78	19.70	0.47	2.37

Πίνακας ΠΙV.2: Δεδομένα διάλυσης IR σε FaSSIF-V2

t (min)	% A1					
	1	2	3	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	% Τυπική απόκλιση
2.5	34.25	37.95	38.28	36.83	2.24	6.09
5	70.47	80.91	71.27	74.21	5.81	7.83
10	91.97	94.40	89.43	91.93	2.48	2.70
15	98.19	91.89	93.61	94.56	3.26	3.45
20	100.62	100.87	96.46	99.32	2.48	2.49
30	93.17	94.01	97.29	94.82	2.18	2.30
40	96.78	93.97	95.11	95.29	1.41	1.48
50	98.13	92.63	92.03	94.27	3.36	3.56
60	100.90	96.25	93.07	96.74	3.94	4.07
90	99.79	95.79	96.00	97.19	2.25	2.32
120	99.33	102.04	101.15	100.84	1.38	1.37

t (min)	% A2					
	1	2	3	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	% Τυπική απόκλιση
2.5	33.78	37.33	37.44	36.18	2.08	5.75
5	70.67	81.15	71.36	74.40	5.86	7.88
10	92.69	95.18	90.31	92.72	2.44	2.63
15	99.39	92.67	94.47	95.51	3.48	3.64
20	101.55	101.83	97.45	100.28	2.45	2.45
30	94.37	94.74	98.44	95.85	2.25	2.35
40	97.77	94.94	96.35	96.35	1.41	1.47
50	99.52	93.47	93.11	95.37	3.60	3.77
60	102.03	97.12	94.10	97.75	4.00	4.10
90	100.98	96.79	96.82	98.20	2.41	2.45
120	100.15	102.98	102.27	101.80	1.47	1.45

Πίνακας ΠΙV.3: Δεδομένα διάλυσης IR σε FeSSGF

t (min)	% A1					
	1	2	3	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	% Τυπική απόκλιση
2.5	21.26	4.19	3.05	9.50	10.20	107.36
5	56.57	48.94	24.90	43.47	16.53	38.02
10	76.22	73.06	57.07	68.78	10.26	14.92
15	65.86	62.44	54.34	60.88	5.92	9.72
20	72.53	58.20	53.27	61.34	10.01	16.31
30	64.53	61.74	53.00	59.76	6.02	10.07
40	60.40	56.22	57.08	57.90	2.21	3.81
50	68.47	63.79	55.53	62.60	6.55	10.46
60	69.90	65.69	59.72	65.11	5.12	7.86

t (min)	% A2					
	1	2	3	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	% Τυπική απόκλιση
2.5	18.34	3.25	2.23	7.94	9.02	113.58
5	4.60	43.32	21.12	23.01	19.43	84.42
10	70.94	67.82	50.46	63.07	11.04	17.50
15	61.88	59.17	47.35	56.13	7.72	13.76
20	69.16	56.19	47.19	57.51	11.04	19.20
30	63.61	60.11	48.75	57.49	7.77	13.52
40	61.42	53.82	53.30	56.18	4.54	8.09
50	67.40	61.78	50.62	59.93	8.54	14.25
60	68.56	62.72	55.25	62.18	6.67	10.73



Πίνακας ΠΙV.4: Δεδομένα διάλυσης IR σε FeSSIF-V2

<b>t (min)</b>	<b>% A1</b>					
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Μέση Τιμή</b>	<b>Τυπική απόκλιση</b>	<b>% Τυπική απόκλιση</b>
2.5	26.45	11.85	10.32	16.21	8.90	54.92
5	58.59	57.15	52.83	56.19	3.00	5.34
10	96.59	97.12	88.11	93.94	5.05	5.38
15	98.96	95.37	94.18	96.17	2.49	2.59
20	99.72	98.83	97.45	98.67	1.15	1.16
30	101.59	99.87	102.51	101.32	1.34	1.32
40	103.20	106.26	106.77	105.41	1.93	1.83
60	100.44	103.29	100.40	101.38	1.66	1.63

<b>t (min)</b>	<b>% A2</b>					
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Μέση Τιμή</b>	<b>Τυπική απόκλιση</b>	<b>% Τυπική απόκλιση</b>
2.5	27.43	11.72	10.18	16.45	9.54	58.02
5	61.71	60.25	55.51	59.16	3.24	5.48
10	102.69	103.25	93.45	99.80	5.51	5.52
15	105.43	101.57	100.00	102.33	2.79	2.73
20	106.41	105.28	103.65	105.11	1.38	1.32
30	108.08	106.21	108.86	107.72	1.36	1.27
40	109.94	113.04	113.35	112.11	1.89	1.68
60	107.03	110.46	106.14	107.88	2.28	2.12

Πίνακας ΠΙV.5: Δεδομένα διάλυσης **MR1** κατά τη διαπεπτική περίοδο

<b>t (h)</b>	<b>% A1</b>					
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Μέση Τιμή</b>	<b>Τυπική απόκλιση</b>	<b>% Τυπική απόκλιση</b>
0.33	2.479	2.44	2.27	2.40	0.11	4.54
0.67	3.826	4.70	4.96	4.49	0.59	13.19
1.00	26.995	31.42	26.30	28.24	2.78	9.84
1.33	55.628	57.86	53.68	55.72	2.09	3.75
1.67	78.243	79.69	77.95	78.63	0.93	1.18
2.00	90.163	92.52	92.19	91.62	1.28	1.39
2.33	96.701	99.24	98.81	98.25	1.36	1.38
2.67	99.684	102.45	102.03	101.39	1.49	1.47
3.00	99.806	102.59	102.19	101.53	1.51	1.48
3.33	99.845	102.64	102.25	101.58	1.51	1.49
3.67	99.848	102.65	102.26	101.59	1.52	1.49
4.00	99.843	102.65	102.26	101.58	1.52	1.50

<b>t (h)</b>	<b>% A2</b>					
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Μέση Τιμή</b>	<b>Τυπική απόκλιση</b>	<b>% Τυπική απόκλιση</b>
0.33	2.627	2.61	2.43	2.56	0.11	4.28
0.67	4.126	5.07	5.24	4.81	0.60	12.51
1.00	26.891	31.44	26.36	28.23	2.79	9.90
1.33	54.777	57.54	53.29	55.20	2.16	3.91
1.67	76.624	78.90	76.99	77.51	1.22	1.58
2.00	87.866	91.06	90.58	89.83	1.72	1.92
2.33	94.178	91.64	96.94	94.25	2.65	2.81
2.67	97.608	95.18	100.46	97.75	2.65	2.71

Πίνακας ΠΙV.6: Δεδομένα διάλυσης **MR1** κατά την περίοδο πέψης

t (h)	% A1					
	1	2	3	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	% Τυπική απόκλιση
0.33	7.195	5.64	7.67	6.83	1.06	15.53
0.67	21.245	17.11	20.13	19.50	2.14	10.96
1.00	39.424	23.11	26.78	29.77	8.56	28.75
1.33	58.470	40.05	43.46	47.33	9.80	20.70
1.67	74.986	57.59	64.20	65.59	8.78	13.39
2.00	88.102	70.81	80.76	79.89	8.68	10.86
2.33	95.858	79.62	89.19	88.22	8.16	9.25
2.67	99.661	84.48	93.98	92.71	7.67	8.27
3.00	101.766	87.56	96.54	95.29	7.18	7.54
3.33	103.052	89.42	98.26	96.91	6.92	7.14
3.67	103.746	90.51	99.38	97.88	6.75	6.89
4.00	104.142	91.08	100.07	98.43	6.69	6.79
4.33	104.301	91.33	100.23	98.62	6.64	6.73
4.67	104.234	91.33	100.23	98.60	6.61	6.70
5.00	104.166	91.33	100.42	98.64	6.60	6.69
5.33	104.100	91.33	100.48	98.64	6.58	6.67
5.67	104.067	91.33	100.49	98.63	6.57	6.66
6.00	104.034	91.33	100.49	98.62	6.56	6.65

t (h)	% A2					
	1	2	3	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	% Τυπική απόκλιση
0.33	7.048	5.41	7.35	6.61	1.04	15.78
0.67	19.674	16.39	18.96	18.34	1.73	9.41
1.00	36.205	21.93	25.03	27.72	7.51	27.09
1.33	54.221	38.07	40.83	44.37	8.64	19.47
1.67	69.808	54.55	59.97	61.44	7.74	12.59
2.00	84.440	68.60	77.63	76.89	7.94	10.33
2.33	93.332	77.61	86.85	85.93	7.90	9.19
2.67	97.948	82.90	92.26	91.04	7.60	8.35
3.00	100.700	86.38	92.26	93.11	7.20	7.73
3.33	102.641	88.90	92.34	94.63	7.15	7.56
3.67	103.899	90.77	92.49	95.72	7.14	7.46
4.00	104.768	92.00	92.71	96.49	7.18	7.44
4.33	105.207	92.77	93.01	96.99	7.11	7.33
4.67	105.521	93.89	93.38	97.60	6.87	7.04
5.00	106.060	94.55	93.82	98.14	6.87	7.00
5.33	106.379	94.86	94.33	98.53	6.81	6.91
5.67	106.469	94.94	94.92	98.77	6.66	6.75
6.00	106.518	94.97	95.57	99.02	6.50	6.57

Πίνακας ΠΙV.7: Δεδομένα διάλυσης **MR2** κατά τη διαπεπτική περίοδο

<b>t (h)</b>	<b>% A1</b>					
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Μέση Τιμή</b>	<b>Τυπική απόκλιση</b>	<b>% Τυπική απόκλιση</b>
0.33	0.024	0.03	0.09	0.05	0.04	73.71
0.67	0.068	0.05	0.10	0.07	0.02	31.06
1.00	0.299	2.87	3.24	2.14	1.60	74.98
1.33	7.454	10.38	11.31	9.72	2.01	20.71
1.67	19.022	22.91	22.94	21.62	2.25	10.42
2.00	34.230	40.12	39.25	37.86	3.18	8.39
2.33	52.140	59.15	57.29	56.19	3.63	6.46
2.67	68.827	75.45	72.50	72.26	3.32	4.59
3.00	78.863	83.44	82.63	81.65	2.45	2.99
3.33	89.178	89.57	91.26	90.00	1.10	1.23
3.67	93.864	94.09	95.27	94.41	0.75	0.80
4.00	97.023	97.23	98.12	97.46	0.58	0.60
4.33	98.924	99.03	99.78	99.24	0.47	0.47
4.67	100.245	100.16	100.75	100.39	0.32	0.32
5.00	100.957	100.82	101.43	101.07	0.32	0.32
5.33	101.356	101.22	101.79	101.46	0.30	0.29
5.67	101.529	101.39	101.96	101.63	0.30	0.29
6.00	101.606	101.46	102.03	101.70	0.30	0.29

<b>t (h)</b>	<b>% A2</b>					
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Μέση Τιμή</b>	<b>Τυπική απόκλιση</b>	<b>% Τυπική απόκλιση</b>
0.33	0.034	0.06	0.11	0.07	0.04	56.24
0.67	0.095	0.09	0.12	0.10	0.01	13.27
1.00	2.811	3.05	3.39	3.08	0.29	9.44
1.33	10.285	10.84	11.78	10.97	0.76	6.91
1.67	22.059	23.48	23.47	23.00	0.82	3.56
2.00	37.108	40.44	39.62	39.06	1.74	4.45
2.33	54.728	59.06	57.22	57.00	2.18	3.82
2.67	70.770	74.77	71.72	72.42	2.09	2.89
3.00	80.603	81.83	81.63	81.36	0.66	0.81
3.33	90.294	87.28	89.94	89.17	1.65	1.85
3.67	94.426	91.46	93.52	93.14	1.52	1.63
4.00	97.527	94.82	96.44	96.26	1.36	1.41
4.33	99.479	96.86	98.26	98.20	1.31	1.33
4.67	101.036	98.41	99.44	99.63	1.32	1.33
5.00	102.073	99.51	100.40	100.66	1.30	1.29
5.33	102.827	100.34	101.02	101.40	1.28	1.27
5.67	103.355	100.89	101.44	101.90	1.29	1.27
6.00	103.772	101.29	101.76	102.27	1.32	1.29

Πίνακας ΠΙV.8: Δεδομένα διάλυσης **MR2** κατά την περίοδο πέψης

<b>t (h)</b>	<b>% A1</b>					
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Μέση Τιμή</b>	<b>Τυπική απόκλιση</b>	<b>% Τυπική απόκλιση</b>
0.33	0.091	0.25	0.15	0.16	0.08	49.43
0.67	0.397	0.70	0.76	0.62	0.20	31.55
1.00	1.744	2.09	2.75	2.19	0.51	23.24
1.33	4.844	2.31	6.73	4.63	2.22	47.88
1.67	8.928	8.45	11.93	9.77	1.88	19.29
2.00	18.334	16.81	21.93	19.02	2.63	13.81
2.33	39.921	29.80	33.22	34.31	5.15	15.01
2.67	54.827	48.50	49.85	51.06	3.33	6.52
3.00	73.601	65.82	66.71	68.71	4.26	6.20
3.33	88.585	78.82	79.31	82.24	5.50	6.69
3.67	99.642	89.06	88.72	92.47	6.21	6.72
4.00	105.564	93.18	93.65	97.47	7.02	7.20
4.33	109.090	96.05	96.74	100.62	7.34	7.29
4.67	111.542	97.98	98.88	102.80	7.58	7.38
5.00	112.830	98.92	99.90	103.88	7.76	7.47
5.33	113.436	99.33	100.41	104.39	7.85	7.52
5.67	113.774	99.56	100.70	104.68	7.90	7.55
6.00	113.941	99.68	100.85	104.82	7.92	7.55

<b>t (h)</b>	<b>% A2</b>					
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Μέση Τιμή</b>	<b>Τυπική απόκλιση</b>	<b>% Τυπική απόκλιση</b>
0.33	0.208	0.40	0.28	0.30	0.10	33.15
0.67	0.539	0.89	0.96	0.80	0.22	28.21
1.00	1.841	2.25	2.91	2.33	0.54	23.05
1.33	4.847	5.74	6.71	5.77	0.93	16.18
1.67	8.750	11.74	11.69	10.72	1.71	15.95
2.00	18.488	20.55	22.15	20.39	1.83	9.00
2.33	38.785	33.51	33.49	35.26	3.05	8.65
2.67	53.634	52.38	50.02	52.01	1.84	3.53
3.00	71.874	69.16	66.35	69.13	2.76	4.00
3.33	86.192	81.59	67.42	78.40	9.78	12.48
3.67	96.558	91.20	76.23	88.00	10.53	11.97
4.00	102.089	95.11	80.99	92.73	10.75	11.59
4.33	105.184	97.70	83.71	95.53	10.90	11.41
4.67	107.696	99.78	85.89	97.79	11.04	11.29
5.00	109.537	101.29	87.42	99.42	11.18	11.24
5.33	110.831	102.26	88.51	100.54	11.26	11.20
5.67	111.762	102.93	89.33	101.34	11.30	11.15
6.00	112.356	103.41	89.87	101.88	11.32	11.11

Πίνακας ΠΙV.9: Δεδομένα διάλυσης **MR3** κατά τη διαπεπτική περίοδο

<b>t (h)</b>	<b>% A1</b>					
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Μέση Τιμή</b>	<b>Τυπική απόκλιση</b>	<b>% Τυπική απόκλιση</b>
0.33	1.283	0.92	2.36	1.52	0.75	49.08
0.67	1.889	1.33	3.05	2.09	0.88	42.10
1.00	22.944	18.43	28.15	23.17	4.87	21.00
1.33	44.111	40.11	50.02	44.75	4.99	11.15
1.67	63.170	60.28	67.28	63.58	3.52	5.53
2.00	78.882	76.20	81.32	78.80	2.56	3.25
2.33	90.142	87.62	91.07	89.61	1.78	1.99
2.67	98.550	96.98	98.95	98.16	1.04	1.06
3.00	103.014	101.64	103.18	102.61	0.84	0.82

<b>t (h)</b>	<b>% A2</b>					
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Μέση Τιμή</b>	<b>Τυπική απόκλιση</b>	<b>% Τυπική απόκλιση</b>
0.33	1.267	0.95	2.38	1.53	0.75	48.99
0.67	1.948	1.41	3.19	2.19	0.91	41.74
1.00	22.939	18.54	28.11	23.20	4.79	20.64
1.33	44.882	41.12	50.69	45.56	4.82	10.59
1.67	64.810	62.12	68.72	65.22	3.32	5.10
2.00	80.588	78.02	82.93	80.51	2.46	3.05
2.33	91.315	88.87	92.36	90.85	1.79	1.97
2.67	98.852	97.33	99.67	98.62	1.19	1.21
3.00	102.510	101.14	103.28	102.31	1.09	1.06

Πίνακας ΠΙV.10: Δεδομένα διάλυσης **MR3** κατά την περίοδο πέψης

t (h)	% A1					
	1	2	3	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	% Τυπική απόκλιση
0.33	3.941	6.15	6.25	5.45	1.31	23.96
0.67	8.996	13.20	14.31	12.17	2.81	23.05
1.00	16.302	20.42	23.16	19.96	3.45	17.29
1.33	26.231	27.89	31.36	28.50	2.62	9.18
1.67	36.122	37.94	39.84	37.97	1.86	4.89
2.00	51.919	53.51	55.83	53.75	1.97	3.66
2.33	64.794	70.03	68.18	67.67	2.65	3.92
2.67	75.129	81.10	84.81	80.35	4.89	6.08
3.00	82.226	89.77	91.96	87.99	5.11	5.80
3.33	87.296	96.68	97.04	93.67	5.52	5.90
3.67	90.799	102.10	100.58	97.83	6.13	6.27
4.00	92.808	105.13	102.66	100.20	6.52	6.51
4.33	94.282	107.36	104.15	101.93	6.82	6.69
4.67	95.273	108.94	105.38	103.20	7.09	6.87
5.00	96.113	110.35	106.28	104.25	7.33	7.03
5.33	96.623	111.35	106.86	104.94	7.55	7.19
5.67	96.941	112.03	107.24	105.40	7.71	7.32
6.00	97.133	112.47	107.47	105.69	7.82	7.40

t (h)	% A2					
	1	2	3	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	% Τυπική απόκλιση
0.33	3.594	5.29	5.68	4.85	1.11	22.86
0.67	8.527	11.93	13.19	11.22	2.41	21.50
1.00	15.611	18.96	21.52	18.70	2.96	15.86
1.33	25.358	26.32	29.46	27.05	2.14	7.92
1.67	35.035	36.29	37.75	36.36	1.36	3.74
2.00	51.360	52.43	54.26	52.68	1.46	2.78
2.33	64.588	69.46	67.21	67.09	2.44	3.64
2.67	74.956	80.80	83.84	79.87	4.52	5.66
3.00	81.395	88.76	90.32	86.83	4.77	5.49
3.33	85.920	94.94	94.92	91.93	5.20	5.66
3.67	89.106	99.67	98.13	95.64	5.71	5.97
4.00	90.920	102.21	99.94	97.69	5.97	6.11
4.33	92.349	104.09	101.31	99.25	6.14	6.18
4.67	93.483	105.55	102.63	100.55	6.29	6.26
5.00	94.577	106.97	103.64	101.73	6.42	6.31
5.33	95.491	108.22	104.52	102.74	6.55	6.37
5.67	96.283	109.27	105.29	103.61	6.65	6.42
6.00	96.979	110.11	105.93	104.34	6.71	6.43

*Παράρτημα VI: Πρωτογενή δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης συνδυασμού ουσιών A*

Στον πίνακα ΠVI.1 παρουσιάζονται τα δεδομένα διάσπασης σε υλικό από κόπρινα των ουσιών του A (SCoB, pooled).

Πίνακας ΠVI.1: Δεδομένα αποικοδόμησης A

t (min)	% A1					
	1	2	3	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	% Τυπική απόκλιση
0	100.00	100.0	100.0	100.00	0.00	0.00
15	97.46	101.0	101.6	100.04	2.25	2.25
30	100.69	106.7	93.5	100.32	6.60	6.58
60	96.22	101.0	103.3	100.15	3.59	3.59
90	97.61	100.6	104.6	100.93	3.49	3.46
120	97.22	97.7	103.7	100.47	4.60	0.00
180	99.36	103.27	103.33	101.99	2.28	1.00
240	97.66	104.14	109.08	103.63	5.72	2.00

t (min)	% A2					
	1	2	3	Μέση Τιμή	Τυπική απόκλιση	% Τυπική απόκλιση
0	100.00	100.0	100.0	100.00	0.00	0.00
15	96.46	101.2	100.7	99.48	2.63	2.64
30	100.80	107.8	92.2	100.24	7.82	7.80
60	94.70	99.5	101.5	98.57	3.50	3.55
90	96.61	99.0	102.2	99.25	2.79	2.81
120	94.63	97.7	100.8	97.72	4.38	4.48
180	95.94	98.89	99.54	98.13	1.92	1.95
240	92.73	99.16	103.58	98.49	5.45	5.54



*Παράρτημα VII: Πρωτογενή δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης Μετρονιδαζόλης*

Στους πίνακες ΠVII.1. και ΠVII.2. παρουσιάζονται τα δεδομένα αποικοδόμησης σε υλικό από κόπρανα της μετρονιδαζόλης σε κάθε εθελοντή

Πίνακας ΠVII.1: Δεδομένα αποικοδόμησης για τους εθελοντές 7 - 12

t (min)	% Μετρονιδαζόλη								
	# 7	# 8	# 9	# 10	# 11	# 12	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	% Σχετική τυπική απόκλιση
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0,00
5	61.31	71.73	60.33	48.40	28.35	57.42	54.59	14.88	27.26
10	31.35	47.25	33.68	14.05	1.62	17.44	24.23	16.31	67.31
15	11.39	18.07	12.76	0.27	0.30	0.34	7.19	7.87	109.46
20	2.78	6.57	8.51	0.27	0.30	0.34	3.13	3.60	115.02
30	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Πίνακας ΠVII.2: Δεδομένα αποικοδόμησης για τους εθελοντές 148 - 648

t (min)	% Μετρονιδαζόλη								
	# 148	# 248	# 348	# 448	# 548	# 648	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	% Σχετική τυπική απόκλιση
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0,00
5	60.95	76.22	46.15	53.57	43.03	36.09	52.67	14.38	27.30
10	29.96	53.50	19.17	22.05	11.39	10.31	24.40	15.99	65.53
15	14.01	32.92	7.90	8.43	1.71	3.88	11.47	11.33	98.78
20	4.11	17.17	6.27	4.51	-0.31	-0.25	5.25	6.42	122.29
30	1.84	0.87	-0.31	3.72	-0.31	-0.25	0.93	1.62	174.19

*Παράρτημα VIII: Πρωτογενή δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης Ολσαλαζίνης*

Στους πίνακες ΠVIII.1. και ΠVIII.2. παρουσιάζονται τα δεδομένα αποικοδόμησης σε υλικό από κόπρανα της ολσαλαζίνης σε κάθε εθελοντή

Πίνακας ΠVIII.1: Δεδομένα αποικοδόμησης για τους εθελοντές 7 - 12

t (min)	% Ολσαλαζίνη								
	# 7	# 8	# 9	# 10	# 11	# 12	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	% Σχετική τυπική απόκλιση
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
10	61.84	64.1	96.19	70.36	72.22	67.92	72.11	12.4	17.20
20	34.12	40.6	85.12	50.78	34.50	44.23	48.23	19.1	39.60
30	17.12	18.5	59.07	23.34	18.46	23.35	26.64	16.1	60.44
60	3.74	7.4	10.54	7.73	0.00	4.62	5.68	3.69	64.96
90	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Πίνακας ΠVIII.2: Δεδομένα αποικοδόμησης για τους εθελοντές 1<sub>48</sub> - 6<sub>48</sub>

t (min)	% Ολσαλαζίνη								
	# 1 <sub>48</sub>	# 2 <sub>48</sub>	# 3 <sub>48</sub>	# 4 <sub>48</sub>	# 5 <sub>48</sub>	# 6 <sub>48</sub>	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	% Σχετική τυπική απόκλιση
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
10	75.06	95.2	37.92	70.11	83.12	58.77	70.03	19.94	28.47
20	48.90	80.9	12.76	44.08	52.75	30.05	44.90	22.92	51.05
30	32.38	73.1	6.00	25.74	31.55	10.80	29.93	23.78	79.45
60	6.71	26.0	0.00	4.62	3.68	1.37	7.06	9.57	135.55
90	0.00	7.4	0.00	3.01	2.58	0.00	2.16	2.91	134.72