

**ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ»**

**Επίδραση της ηλικίας στη βακτηριακή αποικοδόμηση
φαρμάκων σε υλικό από κόπρανα**

**Σκαβάτσος Δημήτρης
Α.Μ.: 190906**

ΑΘΗΝΑ 2021

**ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ»**

**Επίδραση της ηλικίας στη βακτηριακή αποικοδόμηση
φαρμάκων σε υλικό από κόπρανα**

**Σκαβάτσος Δημήτρης
Α.Μ.: 190906**

ΑΘΗΝΑ 2021

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Βερτζώνη Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ (επιβλέπουσα)

Ρέππας Χρήστος, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ.

Βλάχου Μαριλένα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Μετά από πολλές δυσκολίες και αναβολές λόγω της πανδημίας η οποία ταλαιπωρεί όλο το πλανήτη έφτασε η στιγμή της ολοκλήρωσης αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Στη διεκπεραίωση της συνέβαλαν πολλοί άνθρωποι τους οποίους ευχαριστώ ολόψυχα. Από αυτούς που θα ήθελα να ξεχωρίσω και να ευχαριστήσω είναι η επιβλέπουσα Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Βερτζώνη για την ανάθεση αυτού του θέματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης, τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, το Καθηγητή Χρήστο Ρέππα καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαριλένα Βλάχου.

Επιπρόσθετα, ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου τον Επίκουρο Καθηγητή Τριάντη Χαράλαμπου, καθώς και τη Λέκτορα Χαραλάμπους Δέσποινα του τμήματος Φαρμακευτικής του πανεπιστημίου Frederick, όπου διεκπεραίωσα τις προπτυχιακές μου σπουδές, για τη συνεχή τους στήριξη σε όλη την πορεία αυτού μεταπτυχιακού του προγράμματος.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους εθελοντές οι οποίοι δέχτηκαν να συμμετάσχουν στη μελέτη αυτή και που χωρίς αυτούς δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί αυτή η διπλωματική εργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και να αφιερώσω τη διπλωματική εργασία στην ανιψιά μου η οποία έρχεται στο κόσμο σε λίγους μήνες.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε δύο στόχους. Ο πρώτος στόχος ήταν η αξιολόγηση της βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα υπερηλικών (ηλικίας >65 ετών). Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης συγκεντρώθηκαν από έξι υπερηλικες εθελοντές. Ωστόσο, στα αποτελέσματα περιλαμβάνονται επιπλέον έξι εθελοντές από παλαιότερη εργασία (Γκόλφη 2017). Ο δεύτερος στόχος ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της ηλικίας στη σταθερότητα φαρμάκων σε υλικό από κόπρανα. Τα δεδομένα που προέκυψαν από τους υπερηλικες (εύρος ηλικίας 65-91 ετών) συγκρίθηκαν με δεδομένα βακτηριακής διάσπασης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα που παρασκευάστηκε με το ίδιο τρόπο που είχαν συλλεχθεί από 12 παιδιά (εύρος ηλικίας 3-8,5 ετών) (Ρωμανός 2017, Ρωμανός 2019) και 12 ενήλικες (εύρος ηλικίας 19-55 ετών) (Karatza *et al.* 2016, Γκόλφη 2020).

Μέθοδοι: Συλλέχθηκαν κόπρανα έξι υπερηλικών (εύρος ηλικίας 70-86 ετών) κατόπιν αδειοδότησης από την Επιτροπή Βιοηθικής του Τμήματος Φαρμακευτικής. Υπό αναερόβιες συνθήκες (10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂, θερμοκρασία 37 °C, σχετική υγρασία 70%), παρασκευάστηκε υλικό από κόπρανα, μετά από αραίωση με φυσιολογικό ορό (0,9% χλωριούχο νάτριο) σε αναλογία 1:3,8 w/v. Η *ex vivo* κινητική αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης εκτιμήθηκε στο υλικό από κόπρανα, σε αναερόβιες συνθήκες.

Αποτελέσματα: Η μέση τιμή (τυπική απόκλιση) της σταθεράς του ρυθμού αποικοδόμησης (τυπική απόκλιση) της μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα σε υλικό από κόπρανα 6 υγιών εθελοντών ηλικίας >65 ετών ήταν 0,169 (0,070) min⁻¹ ενώ η μέση τιμή της σταθεράς διάσπασης του ρυθμού αποικοδόμησης (τυπική απόκλιση) της ολσαλαζίνης ήταν 0,042 (0,014) min⁻¹. Οι τιμές αυτές δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική διαφορά από τις σταθερές του ρυθμού αποικοδόμησης σε υλικό από κόπρανα άλλων 6 υγιών εθελοντών ηλικίας >65 ετών παλαιότερης μελέτης 0,093 (0,79) min⁻¹ και 0,037 (0,019) min⁻¹, αντίστοιχα (Γκόλφη 2017). Συνολικά οι τιμές του ρυθμού αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα που είχε συλλεγεί από παιδιά (n=12), ενήλικες (n=12) και υπερηλικες (n=12)

δεν παρουσίαζαν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, $P=0,430$ και $P=0,509$ αντίστοιχα)

Συμπεράσματα: Το υλικό από κόπρανα υπερηλίκων που παρασκευάστηκε για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικά διαφορα στη βακτηριακή ενεργότητα από το υλικό που είχε παρασκευαστεί με παρόμοιο τρόπο από άλλους υπερήλικες για τις ανάγκες παλαιότερης μελέτης (Γκόλφη 2017). Με βάση τα δεδομένα της βακτηριακή αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα παιδιών, ενηλίκων και υπερηλίκων δε διέφερε στατιστικά σημαντικά. Ωστόσο, η ισχύ του στατιστικού ελέγχου υπόθεσης ήταν χαμηλή και το συμπέρασμα διατυπώνεται με επιφύλαξη.

ABSTRACT

Aim: The present study had two objectives. Firstly, evaluate the bacterial degradation of metronidazole and olsalazine in fecal material of elderly subjects (age > 65 years). Data were collected with previously collected data from another 6 elderly subject (Gkolfi 2017). The second objective, was the impact of ageing on drug bacterial degradation. Data from 12 elderly subjects (n=12, 65-91 y, this study, Gkolfi 2017) was evaluated vs data collected from pediatric populations (n=12, 3-8,5 y, Romanos 2017, Romanos 2019) and data collected from adults (n=12, 19-55 y, Karatza *et al.* 2016, Gkolfi 2020).

Methods: Stools of six elderly people (age range 70-86 years) were collected upon approval by the Bioethical Committee of the Department of Pharmacy. Fecal material was prepared under anaerobic conditions, (10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂, 37°C, relative humidity 70%), after diluting with saline (0.9% sodium chloride) in a ratio of 1:3.8 w/v. The *ex vivo* degradation kinetic profile of metronidazole and olsalazine was assessed in fecal material under anaerobic conditions.

Results: The mean bacterial degradation rate constant (standard deviation) (n=6) of metronidazole in the fecal material of elderly subjects was 0,169 (0,070) min⁻¹, while the corresponding value for olsalazine was 0,042 (0,014) min⁻¹. There is no statistically significant difference from previously collected data in elderly subjects (n=6) 0,093 (0,79) min⁻¹ and 0,037(0,019) min⁻¹, respectively (Gkolfi 2017). Based on data collected in 12 elderly subjects (this study, Gkolfi 2017), 12 pediatric populations (Romanos 2017, Romanos 2019) and 12 adults (Karatza 2016, Gkolfi 2020). The impact of ageing on bacterial degradation of metronidazole and olsalazine in fecal material is not statistically significant (Analysis of variance, P= 0,430) and P=0,509 respectively).

Conclusions: Data collected in fecal materials prepared for the needs of the present study did not show statistically significant differences from data collected previously. with similar methodology by other volunteers for the needs of previous study (Gkolfi 2017). Based on data collected in this and previous studies, the impact of ageing on the bacterial degradation of metronidazole and olsalazine is not significant. However, the

power of the applied of statistical hypothesis test was low and this conclusion is reported cautiously.

Πίνακας περιεχομένων

A. Εισαγωγή.....	1
<i>A.1 Το ανθρώπινο μικροβίωμα του εντέρου</i>	<i>1</i>
<i>A.2 Μεταβολές του ανθρώπινου μικροβιώματος του εντέρου από τη βρεφική ηλικία ως το γήρας.....</i>	<i>3</i>
A.2.1 Βρέφη	3
A.2.2 Παιδιά και Έφηβοι.....	5
A.2.3 Ενήλικες.....	6
A.2.4 Υπερήλικες.....	7
<i>A.3. Βακτηριακή διάσπαση φαρμάκων.....</i>	<i>11</i>
<i>A.4 Ενεργότητα αζοαναγωγίας και νιτροαναγωγίας.....</i>	<i>12</i>
<i>A.5. Ex vivo μελέτη της βακτηριακής διάσπασης</i>	<i>14</i>
<i>A.6 Στόχοι της παρούσας μελέτης</i>	<i>15</i>
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	17
<i>B.1 Οργανολογία.....</i>	<i>17</i>
<i>B.2 Αντιδραστήρια</i>	<i>17</i>
<i>B.3 Δραστικές Ουσίες-Φαρμακευτικά Προϊόντα.....</i>	<i>18</i>
<i>B.4 Αναλυτικές Τεχνικές</i>	<i>18</i>
<i>B.5 Υλικό από κόπρανα υπερηλίκων.....</i>	<i>19</i>
B.5.1 Κριτήρια Συμμετοχής	19
B.5.2 Κριτήρια Αποκλεισμού.....	20
B.5.3 Εθελοντές που συμμετείχαν στη μελέτη.....	21
B.5.4 Μεθοδολογία συλλογής κοπράνων.....	23
B.5.5 Μεθοδολογία παρασκευής υλικού από κόπρανα.....	25
<i>B.6 Εκτίμηση της μεταβλητότητας της βακτηριακής ενεργότητας υλικού από κόπρανα υπερηλίκων... 27</i>	
B.6.1 Βακτηριακή αποικοδόμηση μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα που παρασκευάστηκε στη παρούσα μελέτη.....	27
B.6.2 Βακτηριακή αποικοδόμηση ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα που παρασκευάστηκε στη παρούσα μελέτη.....	28
<i>B.7 Ανάλυση πειραματικών δεδομένων βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων.....</i>	<i>29</i>
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
<i>Γ.1 Βακτηριακή αποικοδόμηση μετρονιδαζόλης και ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα υπερηλίκων >65 ετών.....</i>	<i>32</i>
Γ.1.1 Δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης μετρονιδαζόλης	32

Γ.1.2 Δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης ολσαλαζίνης.....	36
Γ.2 Επίδραση της ηλικίας στη σταθερότητα της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα.....	39
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	45
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	46
ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	51
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I.....	51
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II.....	60
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III.....	62
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV.....	67
Περισσότερες πληροφορίες.....	72
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V.....	75
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI.....	78
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII.....	81

A. Εισαγωγή

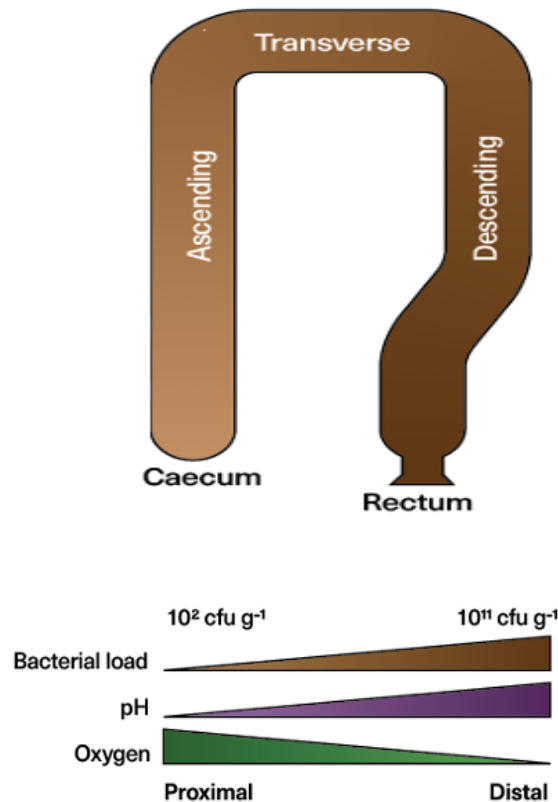
A.1 Το ανθρώπινο μικροβίωμα του εντέρου

Ο όρος «μικροβιακή χλωρίδα» έχει χρησιμοποιηθεί προκειμένου 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 και της επιδερμίδας καθώς και της στοματικής κοιλότητας ενός ενήλικα ηλικίας 20-30 ετών, βάρους 70 κιλών και ύψους 170 εκατοστών εκτιμήθηκε κατά προσέγγιση ότι ανέρχεται στα 4×10^{13} (Haller 2018).

Ο όρος «χλωρίδα» επικράτησε λόγω της αρχικής υπόθεσης ότι οι μικροοργανισμοί είναι φυτικής προέλευσης, μία υπόθεση που ωστόσο δεν ισχύει. Για το λόγο αυτό έχει καθιερωθεί ο όρος «μικροβίωμα» που περιγράφει το σύνολο των μικροοργανισμών σε μία περιοχή. Το ανθρώπινο μικροβίωμα αποτελείται από βακτήρια (κυρίως), αρχαία, ιούς (φάγους), μύκητες καθώς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς που αποικίζουν το ανθρώπινο σώμα και κυρίως την εντερική περιοχή (Shreiner et al. 2015).

Ο γαστρεντερικός σωλήνας αποτελείται από το στόμαχο, το λεπτό και το παχύ έντερο και αποικίζεται από ένα ευρύ φάσμα μικροβίων που συνθέτουν το γαστρεντερικό μικροβίωμα. Κατά μήκος αυτού του σωλήνα υπάρχει ετερογένεια τόσο στα είδη όσο και στον αριθμό των μικροοργανισμών (Donaldson et al. 2015). Το pH, το οποίο διαφοροποιείται κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, επηρεάζει τη βακτηριακή συγκέντρωση στις επιμέρους περιοχές. Οι χαμηλές τιμές pH που επικρατούν στο στομάχο καταστρέφουν τα περισσότερα βακτήρια με αποτέλεσμα η παρουσία τους να είναι περιορισμένη (Sekirov et al. 2010). Στο δωδεκαδάκτυλο, τα χολικά οξέα γίνονται η κινητήρια δύναμη της διαμόρφωσης των μικροβίων στο λεπτό έντερο (Islam et al. 2011). Ο βακτηριακός πληθυσμός και η ποικιλομορφία των βακτηρίων είναι χαμηλοί αλλά και οι δύο αυτοί παράγοντες αυξάνονται κατά μήκος του εντερικού σωλήνα (Sekirov et al. 2010). Ωστόσο, σε αντίθεση με το στομάχο, το εσωτερικό του κατώτερου εντερικού σωλήνα και συγκεκριμένα το τελικό τμήμα του ειλεού, είναι πλούσιο σε μικροοργανισμούς. Η παρουσία των βακτηρίων αυτών αυξάνεται διαδοχικά σε αριθμό και είδος όσο οδεύουμε πιο χαμηλά στο παχύ έντερο δηλαδή από το ανιόν κόλον, προς το εγκάρσιο κόλον με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να εντοπίζονται στο ορθό. Αξίζει να αναφερθεί ότι περίπου το 60% της στερεάς μάζας

των κοπράνων ενός υγιή ενήλικα αποτελείται από βακτήρια. Σημειώνεται πως λόγω έλλειψης οξυγόνου, τα βακτήρια που αποικούν το κατώτερο έντερο, είναι στη πλειονότητα τους αναερόβια και υπερισχύουν κατά 10^3 - 10^4 φορές έναντι των αερόβιων (Shamat 1993). Στο Σχήμα A1 συνοψίζονται όλες οι παραπάνω πληροφορίες σχετικά με το βακτηριακό φορτίο, το pH και την περιεκτικότητα σε οξυγόνο.



Σχήμα A1: Βακτηριακός πληθυσμός βακτηριών, pH και παρουσία οξυγόνου κατά μήκος του παχέος εντέρου. *Τροποποιημένο σχήμα από Donaldson et al. 2015*

A.2 Μεταβολές του ανθρώπινου μικροβιώματος του εντέρου από τη βρεφική ηλικία ως το γήρας.

A.2.1 Βρέφη

Ο αποικισμός του εντέρου κατά τη γέννηση είναι σημαντικός για τη διαμόρφωση και τη λειτουργία του του μικροβιώματος. Σε αυτό το στάδιο, ο εντερικός αυλός είναι στείρος και ο βακτηριακός αποικισμός αρχίζει με τη ρήξη της αμνιακής μεμβράνης. Τα βακτήρια που προέρχονται από τον εντερικό αυλό και τον κόλπο της μητέρας, καθώς και από το εξωτερικό περιβάλλον, αποικούν στο έντερο του νεογνού μέσα σε λίγες ώρες από τη γέννηση και στη συνέχεια εμφανίζονται στα περιττώματα.

Γενικά, ο εντερικός αυλός ενός νεογέννητου κατά τη γέννηση αποτελεί ένα αερόβιο περιβάλλον στο οποίο συναντάμε και κάποια αναερόβια βακτήρια, όπως μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (π.χ *Echerichia Coli*) καθώς και μέλη της οικογένειας *Streptococcaceae* (π.χ *Streptococci*) που μπορούν να αναπτυχθούν. Σε λίγες μέρες ωστόσο, στον εντερικό αυλό επικρατούν αναερόβιες συνθήκες επιτρέποντας τον αποικισμό αποκλειστικά αναερόβιων βακτηρίων όπως των *Bifidobacterium*, *Clostridium* και *Bacteroides*. που έχουν λίγες απαιτήσεις σε θρεπτικές ύλες, επιτρέποντας έτσι την σταδιακή αύξηση του μικροβιώματος σε αριθμό και ποικιλότητα (Sousa et al. 2008, Matamoros et al. 2013).

Μετά την εγκατάσταση των βακτηρίων στον οργανισμό, κατά την βρεφική ηλικία (περίπου 2 ετών), το μικροβίωμα παραμένει περίπου σταθερό σε ατομικό επίπεδο. Συγκρίνοντας το μικροβίωμα των βρεφών ηλικίας μέχρι και 2 ετών, με αυτό των ενηλίκων, παρουσιάζεται υψηλή διατομική μεταβλητότητα και χαμηλός δείκτης ποικιλομορφίας με ~1000 λειτουργικές ταξινομικές ομάδες να ανιχνεύονται κατά το πρώτο έτος της ζωής και με ~2000 κατά το δεύτερο (Yatsunenکو et al. 2012).

Πιθανές αλλαγές στην υγεία και στη διατροφή του ατόμου που μπορούν να συμβούν πολύ αργότερα στη ζωή του, μεταβάλλουν τη φυσιολογία του μικροβιώματος (O'Toole and Claesson 2010).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στο μικροβίωμα των βρεφών που γεννήθηκαν με φυσιολογικό τοκετό σε σχέση με αυτά που γεννήθηκαν με καισαρική τομή. Τα βρέφη που γεννιούνται με φυσιολογικό τοκετό έχουν μεγαλύτερη αφθονία στα γένη *Bacteroides*, *Bifidobacterium* και *Clostridium* σε σχέση με τα παιδιά που γεννιούνται με καισαρική τομή (Penders et al. 2006). Αντίθετα, τα βρέφη, που

γεννιούνται με καισαρική τομή, έχουν περιορισμένο αριθμό βακτηρίων στον εντερικό αυλό, αφού φαινομενικά δεν είναι εκτεθειμένα στο μικροβίωμα της μητέρας τους, με αποτέλεσμα να είναι ευάλωτα σε διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος (Van Nimwegen et al. 2011).

Η χρονική περίοδος του αρχικού βακτηριακού αποικισμού είναι σημαντική, όπως φάνηκε και σε ζωικά μοντέλα (Hansen et al. 2012). Σε πρόωρα γεννημένα νεογνά έχει παρατηρηθεί ότι ο βακτηριακός αποικισμός καθυστερεί και ο αριθμός των ειδών που αποικούν είναι περιορισμένος. Δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι το μικροβίωμα ενός πρόωρου νεογνού διαφέρει από αυτό ενός υγιούς βρέφους (Arboleya et al. 2012, Grześkowiak et al. 2015). Σε σύγκριση με ένα υγιές βρέφος, το πρόωρο νεογνό εμφανίζει τροποποιημένο εντερικό μικροβίωμα, με υψηλή διατομική μεταβλητότητα και μειωμένη ποικιλομορφία (Arboleya et al. 2012). Έρευνες κατέδειξαν ότι τα πρόωρα νεογνά κατέχουν αυξημένα επίπεδα μικροοργανισμών, όπως *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, and *Lactobacillus* spp ενώ έχουν μειωμένα επίπεδα αναερόβιων βακτηρίων, όπως *Bifidobacterium* (παραδείγματος χάριν *B. longum*), *Bacteroides* και *Atopobium* spp.(Arboleya et al. 2012, Grześkowiak et al. 2015).

Η διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο τόσο κατά τη γέννηση, όσο και μετά από αυτή. Το μητρικό γάλα είναι σημαντικό όχι μόνο γιατί προσφέρει υποστρώματα για βακτηριακή ανάπτυξη (Gabrielli et al. 2011) αλλά και γιατί αποτελεί ένα φυσικό εμβόλιο, που επηρεάζει το νεογνικό αποικισμό (Albesharat et al. 2011).

Ο θηλασμός έχει συσχετιστεί με μία σειρά από βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες ευεργετικές επιδράσεις και είναι πιθανόν το μικροβίωμα να συμβάλλει σε πολλές από αυτές. Συγκεκριμένα, στα βρέφη που θηλάζουν παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ποικιλομορφία βακτηρίων σε σχέση με αυτά που δεν θηλάζουν. Επίσης διαπιστώθηκε σχεδόν διπλάσιος αριθμός στελεχών του είδους *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* στα βρέφη που θηλάζουν ενώ σε αυτά που δεν θηλάζουν βρέθηκαν μεγάλες συγκεντρώσεις των γενών *Atopobium* και *Bacteroides*.

Αργότερα, ο απογαλακτισμός και η εισαγωγή στέρεης τροφής στη διατροφή των παιδιών συμβάλλουν στην εμφάνιση μικροβιώματος, το οποίο μοιάζει με αυτό ενός ενήλικα, ενώ πολύ σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και τα θρεπτικά συστατικά στην τελική σύνθεση του μικροβιώματος. Ειδικότερα συνδέεται με υψηλή επικράτηση βακτηρίων που παράγουν βουτυρικό οξύ όπως η ομάδα *Clostridium coccoides* (Martin et al. 2016). Η αυξημένη παρουσία αυτών των βακτηρίων μετά την εισαγωγή στερεών

τροφών μπορεί να εξηγηθεί από την ικανότητά τους να μεταβολίζουν εύκολα τους σύνθετους υδατάνθρακες που έχουν εισαχθεί στη διατροφή (Wu et al. 2011).

A.2.2 Παιδιά και Έφηβοι

Νέες μελέτες δείχνουν πως το μικροβίωμα συνεχίζει να αναπτύσσεται και να ωριμάζει και πέρα της βρεφικής ηλικίας των 2 ετών. Το μικροβίωμα ενός παιδιού είναι πλούσιο σε βακτήρια που ανήκουν στα *Bacteroidetes* και *Firmicutes* και η αναλογία των δύο αυτών ειδών ποικίλει σημαντικά μεταξύ των ατόμων (Hollister et al. 2015). Σε αντίθεση με τον ενήλικα, το υγιές παιδί κατέχει στο μικροβίωμά του χαμηλό ποσοστό *Bacteroidetes* αλλά μεγαλύτερο ποσοστό *Firmicutes* και *Actinobacteria* (Ringel-Kulka et al. 2013, Hollister et al. 2015). Παρά το γεγονός, ότι πολλές τάξεις βρίσκονται από κοινού στους ενήλικες και στα παιδιά, η ποικιλομορφία τους διαφέρει σημαντικά. Οι ενήλικες παρουσιάζουν μεγαλύτερο ποσοστό βακτηρίων του γένους *Bacteroides*, αλλά μικρότερο ποσοστό του γένους *Bifidobacterium* (Ringel-Kulka et al. 2013). Συνολικά, η κύρια διαφορά του ανθρώπινου μικροβιώματος μεταξύ των παιδιών και των ενηλίκων είναι η μικροβιακή ποικιλομορφία. Όσο αυξάνεται η ηλικία, τόσο αυξάνεται και η ποικιλομορφία (Hollister et al. 2015, Ringel-Kulka et al. 2013). Αν και οι λόγοι για τη χαμηλή μικροβιακή ποικιλομορφία των παιδιών δεν είναι γνωστοί, πιθανότατα να σχετίζονται από τις περιορισμένες περιβαλλοντικές και διατροφικές εκθέσεις.

Το ανθρώπινο μικροβίωμα σε ένα υγιές παιδί είναι χρήσιμο και από λειτουργικής άποψης. Πιο συγκεκριμένα, συγκρίνοντας το μικροβίωμα των παιδιών και των ενηλίκων, τα παιδιά διαθέτουν μικροβιακές ομάδες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη φυσιολογική ανάπτυξη (Hollister et al. 2015) με το βακτηριακό τους σύνολο να είναι εμπλουτισμένο με τα γένη *Bifidobacterium*., *Faecalibacterium* και μέλη των *Lachnospiraceae*.

Μία από τις πιο σημαντικές διαφορές περιλαμβάνει τον εμπλουτισμό των γονιδίων που εμπλέκονται στις συνθέσεις της βιταμίνης B9 (φυλλικού οξέος) και της βιταμίνης B12 (κοβαλαμίνης). Στην περίπτωση της βιταμίνης B9, οι μικροβιακές ομάδες των παιδιών είναι εμπλουτισμένες με γένη που συμβάλλουν στη σύνθεση, στην αντιγραφή και στην επιδιόρθωση του DNA καθώς και στη διατήρηση των T-ρυθμιστικών κυττάρων, διαδικασίες που είναι σημαντικές για την ανάπτυξη. Επιπλέον, το μικροβίωμα παράγει τη βιταμίνη B12, μία βιταμίνη με αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, απαραίτητη για την λειτουργία του αιμοποιητικού και νευρικού συστήματος. Παρόλο που οι συγκεντρώσεις της κοβαλαμίνης στον ενήλικα

υπερβαίνουν αυτές των βρεφών, η κοβαλαμίνη φτάνει το μέγιστο της διάρκειας ζωής της περίπου στα 7 χρόνια ζωής του. Το μέγιστο της πιθανής παραγωγής κοβαλαμίνης στο εντερικό μικροβίωμα και στο αίμα κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας υποδηλώνει τη δυνατότητα του μικροβιώματος να υποστηρίξει ένα πλήθος διαδικασιών που αφορούν άλλες ανάγκες του ενήλικου π.χ. τη νευρολογική λειτουργία (Hollister et al. 2015).

Μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Agans et al., επιβεβαίωσε ότι το μικροβίωμα του γαστρεντερικού σωλήνα των εφήβων (ηλικίας 11-18 ετών) διαφέρει από εκείνο των ενηλίκων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση των μελών του γένους *Bifidobacterium* στους εφήβους (σχεδόν διπλάσια) έναντι των ενηλίκων (Agans et al. 2011).

A.2.3 Ενήλικες

Το μικροβίωμα στους ενήλικες είναι σχετικά σταθερό. Συνολικά, το μικροβίωμα ενός ενήλικα είναι πιο πολύπλοκο από αυτό ενός βρέφους, αν και γενικά θεωρείται πως είναι σταθερό με τη πάροδο του χρόνου και παρόμοιο μεταξύ των ατόμων. Για παράδειγμα, οι Faith et al διαπίστωσαν ότι σε ένα δείγμα 37 υγιών ενηλίκων, το 60% των αρχικών στελεχών που αποικίζουν το μικροβίωμα παρέμειναν σταθερά ύστερα από 5 χρόνια. Η σταθερότητα αντικατοπτρίζει την ανθεκτικότητα του μικροβιώματος των ενηλίκων και διαταραχές όπως λοιμώξεις, διατροφικές αλλαγές και αντιβιοτική θεραπεία ή άλλα φάρμακα, έχουν μόνο παροδικές επιπτώσεις στο μικροβίωμα (Faith et al. 2013).

Βακτήρια τα οποία ανήκουν στις οικογένειες Lachnospirace και Ruminococcaceae είναι αυτά που κυριαρχούν στα κόπρανα των υγιών ενηλίκων. Αναλυτικότερα, το 10%-45% των βακτηρίων που αποικίζουν τα κόπρανα αποτελεί η οικογένεια Lachnospirace και το 16%-27% η οικογένεια Ruminococcaceae. Μέλη της οικογένειας Bacteroidaceae/Prevotellaceae απαρτίζουν το υπόλοιπο 12%-60% του μικροβιώματος. Σε ταξινομικό επίπεδο, τα φύλα, Firmicutes (οικογένειες Lachnospiraceae και Ruminococcaceae), Bacteroidetes (Bacteroidaceae, Prevotellaceae και Rikenellaceae) και Actinobacteria (Bifidobacteriaceae και Coriobacteriaceae) αντιπροσωπεύουν την πλειονότητα των βακτηρίων. Τα είδη *Bifidobacterium*, ομάδες του *Lactobacillus*, και βακτήρια της οικογένειας

Coriobacteriaceae είναι λιγότερα στην ενηλικίωση από ότι στην παιδική ηλικία (Maukonen and Saarela 2015).

A.2.4 Υπερήλικες

Το μικροβίωμα υφίσταται σημαντικές αλλαγές με τη γήρανση αλλάζοντας σταδιακά με τη πάροδο του χρόνου. Αν και έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά λίγες μελέτες σε αυτούς τους πληθυσμούς, είναι προφανές ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη μικροβιακή σύνθεση στους ηλικιωμένους σε σχέση με τις άλλες ηλικίες (Claesson et al. 2011, Claesson et al. 2012, O'Toole and Claesson 2010). Η γήρανση σχετίζεται με μία δραματική αλλαγή στο μικροβίωμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η έρευνα των Hopkins and Macfarlane (2002) οι οποίοι ποσοτικοποίησαν τους βακτηριακούς πληθυσμούς από δείγματα κοπράνων νέων ενηλίκων (21-34 ετών), υπερηλίκων (67-88 ετών) και ασθενών που διαγνώστηκαν με διάρροια που σχετίζεται με το *Clostridium Difficile*. Οι πληθυσμοί αυτοί αναλύθηκαν στατιστικά με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς και εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος του πληθυσμού \log_{10} CFU \pm SE (μονάδα σχηματισμού αποικιών σε πλάκες άγαρ ανά γραμμάριο υγρών κοπράνων)⁻¹. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο μέσος όρος των *Bifidobacterium* στην ομάδα των ενηλίκων ήταν 9.1 \pm 0.2, ενώ στην ομάδα των υπερηλίκων ήταν 7.3 \pm 1.0 και η μείωση αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική ($p < 0,05$) (Hopkins, Sharp, and Macfarlane 2002). Η μείωση αυτή μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη προσκόλληση στον βλεννογόνο του εντέρου που οδηγεί σε μειωμένη ανοσολογική απόκριση του εντέρου και κατ'επέκταση σε συχνότερη εμφάνιση γαστρεντερικών λοιμώξεων (Woodmansey et al. 2004). Αντίστοιχα, ο μέσος όρος των γενών *Lactobacillus* εμφάνισε μία τάση μείωσης στην ομάδα των ενηλίκων (6.7 \pm 0.6) σε σχέση με την ομάδα των υπερηλίκων (5.4 \pm 1.0). Παρόλα αυτά υπήρχε μία αύξηση στους υπερηλικές που διαγνώστηκαν με διάρροια με μέσο όρο 8.8 \pm 0.7, η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική σε σχέση με τους υγιείς υπερηλικές (Hopkins et al. 2002).

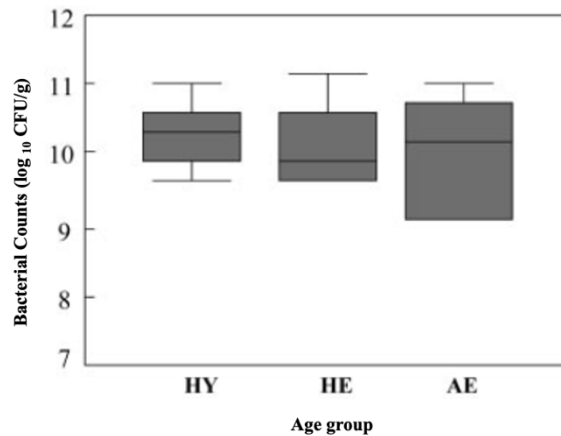
Επιπλέον, ο Woodmansey et al., χαρακτήρισε λεπτομερώς τις κύριες ομάδες βακτηρίων (με βάση τα κυτταρικά προφίλ των λιπαρών οξέων) και αιτιολόγησε τις μεταβολικές ενεργότητες, σε υλικό από κόπρανα υγιών ενηλίκων, υγιών υπερηλίκων και νοσηλευόμενων υπερηλίκων που λάμβαναν αντιβιοτικά. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με t-test για ανεξάρτητες παρατηρήσεις ανάμεσα σε υγιείς ενήλικες και υγιείς υπερηλικές και εκφράζονται ως ο μέσος όρος του πληθυσμού \log_{10} CFU \pm SE (μονάδα σχηματισμού αποικιών σε πλάκες άγαρ ανα γραμμάριο υγρών κοπράνων)⁻¹

του μέσου όρου κάθε ομάδας (Woodmansey et al. 2004). Πιο συγκεκριμένα, μετά από σύγκριση του πληθυσμού των *Bacteroides* μεταξύ υγιών ενηλίκων και υπερηλικών εθελοντών φάνηκε ότι ο συγκεκριμένος βακτηριακός πληθυσμός μειώθηκε στους υπερηλικές. Ειδικότερα, ο μέσος όρος των βακτηρίων της οικογένειας *Bacteroides* στην ομάδα των ενηλίκων ήταν 9.9 ± 0.1 , ενώ στην ομάδα των υπερηλικών ήταν 6.5 ± 2.1 (Woodmansey et al. 2004).

Αντίθετα, παρατηρούνται αυξήσεις σε ομάδες αερόβιων βακτηρίων και προαιρετικά αναερόβιων βακτηρίων. Συγκεκριμένα, η ίδια ερευνητική ομάδα συνέκρινε τον συνολικό βακτηριακό πληθυσμό των *Enterobacteria*, *Streptococci* και *Staphylococci*. Για τα *Enterobacteria* ο μέσος όρος των βακτηρίων για την ομάδα των ενηλίκων ήταν 5.8 ± 0.6 , ενώ για την ομάδα των υπερηλικών ήταν 7.3 ± 0.4 . Με την αύξηση των βακτηρίων αυτών, αυξάνεται η πρωτεολυτική δραστηριότητα ειδικά στους υπερηλικές που λαμβάνουν αντιβίωση. Για τα *Streptococci*, ο μέσος όρος των βακτηρίων για την ομάδα των ενηλίκων ήταν 1.2 ± 0.2 , ενώ για την ομάδα των υπερηλικών ήταν 2.8 ± 1.8 . Τέλος, για τα *Staphylococci* ο μέσος όρος των βακτηρίων για την ομάδα των ενηλίκων ήταν 2.2 ± 0.8 , ενώ για την ομάδα των υπερηλικών ήταν 5.1 ± 1.6 .

Το μικροβίωμα των υπερηλικών εμφανίζει μεγαλύτερη διατομική μεταβλητότητα από αυτή των ενηλίκων (Enck et al. 2009, Odamaki et al. 2016). Η μεταβλητότητα αυτή μπορεί να αιτιολογηθεί από τη τροποποίηση των διατροφικών συνηθειών, της απορρόφησης και του χρόνου διέλευσης των τροφών στον εντερικό σωλήνα. (Andrieux et al. 2002).

Η σύσταση και η ποικιλομορφία του μικροβιώματος υπερηλικών ηλικίας 70 ετών ήταν αρκετά παρόμοια με αυτή των ενηλίκων (Biagi et al. 2010). Σε μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Woodmansey et al., συγκρίθηκαν όλα τα δεδομένα που λήφθηκαν από τα κόπρανα υγιών ενηλίκων, υπερηλικών και υπερηλικών που λάμβαναν αντιβίωση. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως παρόλο που ο μέσος αριθμός των αναερόβιων μικροβίων ήταν παρόμοιος και στις τρεις ομάδες, το εύρος των τιμών \log_{10} CFU ήταν αισθητά αυξημένο στους υπερηλικές που λάμβαναν αντιβίωση (Σχήμα Α.3), (Woodmansey et al. 2004).



Σχήμα A.3: Βακτηριακός πληθυσμός μεταξύ υγιών ενηλίκων (HY), υγιών υπερηλίκων (HE) και υπερηλίκων που λάμβαναν αντιβίωση (AE) (Woodmansey et al. 2004).

Πιο έντονες αλλαγές του ανθρώπινου μικροβιώματος φαίνεται να εμφανίζονται σε αρκετά μεγάλες ηλικίες όπως είναι αυτές των 100 ετών. Το μικροβίωμα ενός ατόμου 100 ετών διαφέρει από αυτό ενός ηλικιωμένου ηλικίας 70 ετών. Συγκεκριμένα, το μικροβίωμα ενός ατόμου 100 ετών χαρακτηρίζεται από χαμηλή ποικιλομορφία σε βακτήρια καθώς και από αυξημένα επίπεδα Proteobacteria, μία ομάδα στην οποία ανήκουν πολλά βακτήρια που πρόσφατα ονομάστηκαν “παθοβιωτικά” (π.χ. τα είδη *Fusobacterium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*). Τα βακτήρια αυτά αποτελούν τύπους μικροβίων που σχετίζονται με χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες. Επιπλέον παρατηρείται μείωση των βακτηρίων που παράγουν βουτυρικό οξύ όπως είναι τα *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *E. hallii*, and *E. Ventriosum*. Μεταξύ του 2008 και 2013 η κοινοπραξία ELDERMET εξέτασε τις σχέσεις μεταξύ του μικροβιώματος, της διατροφής και της υγείας σε 500 υγιείς ηλικιωμένους εθελοντές. Αυτό το έργο στηρίχθηκε σε προηγούμενα ευρήματα, τα οποία ανέφεραν ότι η σύσταση του μικροβιώματος των ηλικιωμένων ασθενών (>65 ετών) ήταν εξαιρετικά μεταβλητή από άτομο σε άτομο και ότι ο πυρήνας και η ποικιλία των βακτηρίων διέφεραν από αυτά των ενηλίκων. Τα δεδομένα από αυτή την έρευνα απέδειξαν ότι ο τρόπος ζωής σε αυτή την ηλικιακή ομάδα έχει μεγαλύτερη επίδραση στο μικροβίωμα από ότι η γήρανση αυτή κάθε - αυτή.

Η διαμονή ενός ηλικιωμένου (π.χ. σε μία κοινότητα, νοσοκομείο, κέντρο αποκατάστασης ή χώρο για μακροχρόνια περίθαλψη) έχει επίπτωση στην ολική μικροβιακή ποικιλομορφία. Για παράδειγμα, το μικροβίωμα των ηλικιωμένων στη

μακροχρόνια περίθαλψη είναι λιγότερο διαφορετικό από αυτό των κατοίκων μίας κοινότητας. Οι κύριες διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν ότι οι ηλικιωμένοι στη μακροχρόνια περίθαλψη, καθώς και ο τύπος διατροφής τους αποτελούν το κλειδί για τη διαμόρφωση του μικροβιώματός τους. Συγκεκριμένα, ένας ηλικιωμένος που ζει σε μία κοινωνία και καταναλώνει μία ποικιλία τροφίμων χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και υψηλής περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες, έχει μεγαλύτερη μικροβιακή ποικιλομορφία σε σύγκριση με έναν ηλικιωμένο που καταναλώνει την ίδια διατροφή και ζει σε χώρο μακροχρόνιας περίθαλψης. Οι ερευνητές παρατήρησαν πως οι ένοικοι σε χώρο μακροχρόνιας περίθαλψης, οι οποίοι καταναλώνουν τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και χαμηλής περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες, εμφανίζουν τη μικρότερη μικροβιακή εντερική ποικιλομορφία (Claesson et al. 2012).

Υπάρχει μία θεωρία που αναπτύχθηκε από τους Di Sabatino et al., η οποία συσχετίζει τις αλλαγές που συμβαίνουν στη φυσιολογία του γαστρεντερικού αυλού με τις νευρολογικές παθήσεις, όπως τη νόσο του Alzheimer και τη νόσο του Parkinson. Στους ασθενείς μεγάλης ηλικίας υπάρχει αλλαγή στη σύσταση του μικροβιώματος που μπορεί να οφείλεται στη λήψη αντιβιοτικών, στη νοσηρότητα και στην ανεπαρκή στοματική φροντίδα. Η αλλαγή του μικροβιώματος σε συνδυασμό με την αύξηση ή τη μείωση ορισμένων εντεροτύπων οδηγεί σε αύξηση ορισμένων προφλεγμονωδών παραγόντων, αλλά και στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών παθήσεων. Στην περίπτωση της νόσου Parkinson εμφανίστηκαν αυξημένα επίπεδα *Enterobacteriaceae* καθώς και μειωμένα επίπεδα *Prevotellaceae*. Στη περίπτωση της νόσου του Alzheimer παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα *E.rectale* και αυξημένα επίπεδα *Escherichia* και *Shigella* (Di Sabatino et al. 2018).

A3. Βακτηριακή διάσπαση φαρμάκων

Η κύρια λειτουργία των περισσότερων βακτηρίων που αποικίζουν το κατώτερο έντερο είναι η ζύμωση των θρεπτικών συστατικών όπως είναι οι υδατάνθρακες και οι πρωτεΐνες που δεν έχουν διασπαστεί στα αρχικά τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα. Επιπλέον, οι μεταβολικές αντιδράσεις που εκτελούνται από αυτά τα βακτήρια και τα αντίστοιχα ένζυμα έχουν τη δυνατότητα να μεταβολίζουν φάρμακα και άλλες ξενοβιοτικές ουσίες πολύ πιο εκτεταμένα από οποιοδήποτε άλλο μέρος του σώματος (Mikov 1994, Shamat 1993).

Έχει βρεθεί ότι περισσότερα από 50 φάρμακα βιομετατρέπονται από το ανθρώπινο μικροβίωμα μέσω του άμεσου μηχανισμού ενζυμικής τροποποίησης. Οι άμεσοι μηχανισμοί σχετίζονται με τη βιομετατροπή των φαρμάκων ή των μεταβολιτών τους σε προϊόντα με τροποποιημένη δράση.

Η επίδραση των βακτηρίων στον μεταβολισμό των φαρμάκων πραγματοποιείται μέσω διαφόρων ειδών άμεσων αντιδράσεων, με κυριότερες την αναγωγή και την υδρόλυση. Συγκεκριμένα, η αναγωγική ενζυμική δραστηριότητα αφορά στη διάσπαση ενός προφαρμάκου προς το δραστικό μεταβολίτη όπως στη περίπτωση της ολσαλαζίνης. Επιπλέον, άλλο παράδειγμα αφορά στη διάσπαση ενός δραστικού μορίου σε ανενεργούς μεταβολίτες όπως στη περίπτωση της μετρονιδαζόλης. Από την άλλη πλευρά εντοπίζεται και η παραγωγή τοξικών μεταβολιτών όπως στη περίπτωση της σουλφασαλαζίνης και του τοξικού μεταβολίτη σουλφοπυραζόνη. Αντίστοιχα συμβαίνει και στη περίπτωση των βενζοδιαζεπινών που κατά την αναγωγή τους παράγονται μεταβολίτες που προκαλούν τερατογένεση. Τέλος, σε ορισμένους ασθενείς παρατηρείται μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του φαρμάκου όπως στη περίπτωση της διγοξίνης κατά τη μετατροπή της στο μη δραστικό προϊόν αναγωγής, τη διωδροδιγοξίνη (Shamat 1993).

Αντιθέτως, η υδρόλυση παρέχει υποστρώματα για τη μικροβιακή ανάπτυξη. Για παράδειγμα, πολλά διαιτητικά συστατικά γλυκοζυλιώνονται και η υδρόλυσή τους απελευθερώνει σάκχαρα που θα μπορούσαν να απομακρυνθούν μέσω της γλυκόλυσης (Novel, Didier Fichet, and Stoeber 1974).

Επιπλέον, εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η επίδραση των γλυκουρονιδασών, που αποτελούν μία γενικευμένη οικογένεια ενζύμων που εκφράζονται από τα βακτήρια του εντέρου και επηρεάζουν τόσο τη βιολογική όσο και την τοξική δράση ενός ευρέως φάσματος φαρμάκων, διαιτητικών συστατικών και

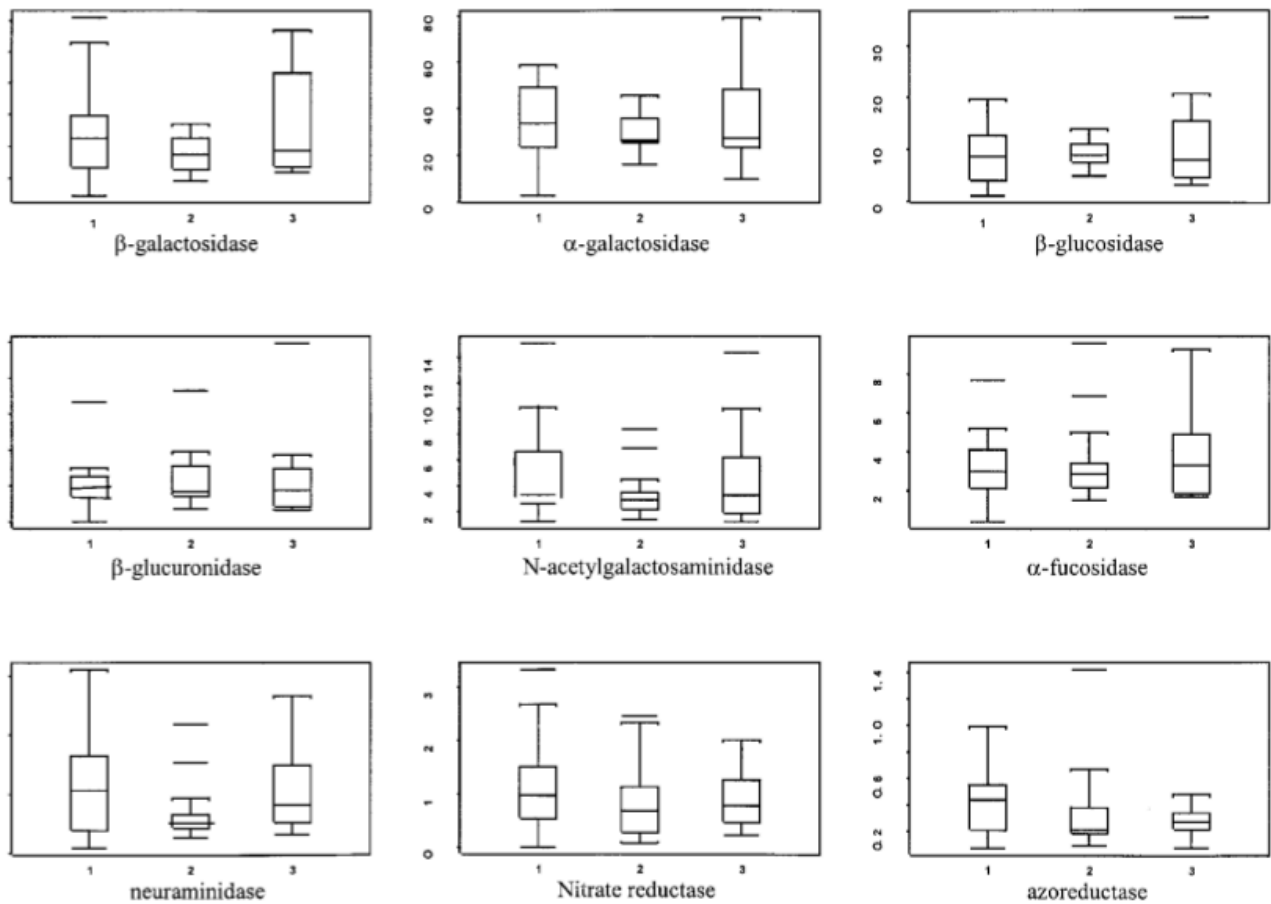
ενδογενών μεταβολιτών. Τα ένζυμα αυτά διασπούν τα γλυκουρονίδια που έχουν σχηματιστεί στο ήπαρ στα πλαίσια της ηπατικής κάθαρσης, αυξάνοντας τη ποσότητα του μητρικού φαρμάκου στον εντερικό αυλό. Τα γλυκουρονίδια εκκρίνονται στη χολή μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας και, μέσω των β-γλυκουρονιδασών των βακτηρίων του κατώτερου εντέρου διασπώνται προς το μητρικό φάρμακο. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί στο αντικαρκινικό φάρμακο ιρινοτεκάνη που θεωρείται ότι επιτείνει την τοξική δράση (π.χ αιμορραγική εντεροπάθεια), καθώς και σε μη στερεοειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα όπως η δικλοφενάκη, η ινδομεθακίνη και η κετοπροφαίνη (Zhang, et al. 2018).

A.4 Ενεργότητα αζοαναγωγής και νιτροαναγωγής.

Οι αζοαναγωγάσες αποτελούν ένζυμα τα οποία παράγονται από το μικροβίωμα του παχέους εντέρου και είναι υπεύθυνες για τη διάσπαση δεσμών αζώτου-αζώτου (-N=N-). Οι νιτροαναγωγάσες αποτελούν τα επόμενα κοινά παραγόμενα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των φαρμάκων στο παχύ έντερο. Τα από του στόματος χορηγούμενα φάρμακα τα οποία διαθέτουν στη δομή τους μία νίτρο-ομάδα ανάγεται σε αμινομάδα μέσω νιτρο- και υδροξυλάμινο- προϊόντων (Joufona, et al 2016). Λίγες πληροφορίες είναι γνωστές για την επίδραση της ηλικίας στο βακτηριακό μεταβολισμό και τη συνεισφορά έκαστων στο μεταβολισμό των φαρμάκων (Andrieux et al. 2002). Η δραστηριότητα της αζοαναγωγής έχει βρεθεί σε Eubacteria, Clostridia, Bacteroides, Enterococcus faecalis και λιγότερο συχνά στα είδη Lactobacillus. Αντίστοιχα, η δραστηριότητα της νιτροαναγωγής έχει βρεθεί επανειλημμένα στα Enterobacteria (π.χ Escherichia coli), στα είδη Clostridia, Bacteroides και Lactobacillus (Karatza et al. 2016). Σε μελέτη βακτηριακής διάσπασης της μετρονιδαζόλης (υπόστρωμα νιτροαναγωγής) και της ολσαλαζίνης (υπόστρωμα αζοαναγωγής) φάνηκε ότι η διατομική μεταβλητότητα της βακτηριακής ενεργότητας σε υλικό από κόπρανα ξεπερνούσε το 50% και στους τρεις πληθυσμούς (Sulaiman et al., 2018). Σε μία διαφορετική μελέτη που διενεργήθηκε από τους Andrieux et al. σε Γάλλους υγιείς εθελοντές, αναφέρεται πως δεν έχει παρατηρηθεί κάποια διαφορά μεταξύ των ηλικιακών ομάδων ως προς την ενεργότητα αυτών των ενζύμων. Συγκεκριμένα 9 ενζυματικές δραστηριότητες (α-γαλακτοσιδάση, β γαλακτοσιδάση, β-γλυκοσιδάση, β-γλυκουρονιδάση, N-ακετυλογαλακταμινιδάση, α-φουκοσιδάση, νευραμινιδάση, νιτροαναγωγής και αζοαναγωγής) και 11 μεταβολίτες αναλύθηκαν σε υλικό από

κόπρανα από 21 ηλικιωμένων (69-89 ετών), 15 ενηλίκων (30-46 ετών) και 14 παιδιών (3-15 ετών). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δραστηριότητα των ενζύμων αυτών δεν εμφάνισε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις 3 ηλικιακές ομάδες (Σχήμα Α.6) (Andrieux et al. 2002).

Σχήμα Α.6: Βακτηριακές ενζυμικές δραστηριότητες σε δείγματα από κόπρανα 14 παιδιών (ομάδα 1), 15 ενηλίκων (ομάδα 2) και 21 ηλικιωμένων (ομάδα 3).



A5. Ex vivo μελέτη της βακτηριακής διάσπασης

Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες με στόχο τον προσδιορισμό της έκτασης της βακτηριακής διάσπασης των φαρμακευτικών ουσιών στις κατώτερες περιοχές του γαστρεντερικού σωλήνα. Το πιο συνηθισμένο υλικό που χρησιμοποιείται ως μέσο για τη μελέτη της βακτηριακής διάσπασης φαρμάκων είναι το υλικό από κόπρανα ανθρώπων καθώς η προσβασιμότητα στο παχύ έντερο και η λήψη των περιεχομένων από το ανιόν παχύ έντερο είναι δύσκολη (Sousa et al. 2008). Στις μελέτες αυτές τα κόπρανα τα οποία συλλέγονται από υγιείς εθελοντές συλλέγονται και μεταφέρονται σε κατάλληλο θάλαμο, στον οποίο υπάρχουν αναερόβιες συνθήκες, ώστε να διατηρηθεί η βιωσιμότητα των αναερόβιων βακτηρίων.

Τα κόπρανα αραιώνονται είτε με φυσιολογικό ορό (Tannergren et al. 2014) είτε με ρυθμιστικό διάλυμα (Sousa et al. 2014). Τουλάχιστον για 30 φαρμακευτικές ουσίες, έχει χρησιμοποιηθεί υλικό από κόπρανα για μελέτη βακτηριακής σταθερότητας (Sousa et al. 2008, Vertzoni et al. 2011, Yadav et al. 2013, Sousa et al. 2014).

Ex vivo μελέτη βακτηριακής σταθερότητας έχει πραγματοποιηθεί και σε υλικό που έχει συλλεχθεί από τα περιεχόμενα του ανιόντος παχέος εντέρου υγιών ενηλίκων κατά τη διαπεπτική περίοδο και την περίοδο πέψης (Vertzoni et al. 2011). Τα περιεχόμενα αυτά είχαν αναρροφηθεί από το ανιόν παχύ έντερο επτά υγιών ενηλίκων (ηλικίας 18 έως 60 ετών) μέσω κολονοσκόπησης. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, κατέδειξαν πως η βακτηριακή ενεργότητα των φαρμάκων μετρονιδαζόλη και ολσαλαζίνη στα περιεχόμενα του ανιόντος παχέος εντέρου της διαπεπτικής περιόδου ήταν μεγαλύτερη από αυτή που εκτιμήθηκε στα περιεχόμενα από την ίδια περιοχή κατά την περίοδο πέψης. Αξίζει να σημειωθεί, πως η βακτηριακή ενεργότητα σε υλικό από κόπρανα που είχε συλλεχθεί από υγιείς ενήλικες εθελοντές ήταν μεγαλύτερη από αυτή που εκτιμήθηκε στα περιεχόμενα του ανιόντος παχέος εντέρου.

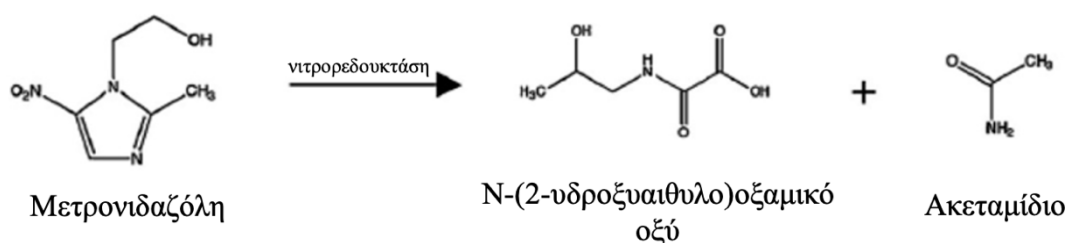
A.6 Στόχοι της παρούσας μελέτης

Η παρούσα μελέτη είχε δύο στόχους:

- i. Τη μελέτη της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων σε υλικό από κόπρανα εθελοντών ηλικίας >65 ετών με στόχο τον εμπλουτισμό των υπαρχόντων δεδομένων (Γκόλφη 2017).
- ii. Τη μελέτη της επίδρασης της ηλικίας στη σταθερότητα φαρμάκων σε υλικό από κόπρανα με βάση τα δεδομένα που είχαν συλλεχθεί σε παιδιά (Ρωμανός 2017, Ρωμανός 2019), σε ενήλικες (Karatza *et al.* 2016, Γκόλφη 2020) και σε υπερήλικες (Γκόλφη 2017, παρούσα μελέτη).

Μετρονιδαζόλη

Η μετρονιδαζόλη (metronidazole) αποτελεί ένα αντιπρωτοζωικό φάρμακο, το οποίο παρουσιάζει ισχυρή αντιβακτηριακή δράση σε αναερόβιους κόκκους και σε αναερόβια Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια. Έτσι χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση λοιμώξεων από αναερόβια βακτήρια, όπως π.χ. των γενών *Bacteroides* και *Clostridium*. Το φάρμακο αυτό αποτελεί ένα 5-νιτροϊμιδαζολικό παράγωγο. Εκτός από τη βιομετατροπή του στο ήπαρ, η οποία περιλαμβάνει οξείδωση πλευρικής αλύσου και γλυκουρονιδίωση, μπορεί να υποστεί και αναγωγικό μεταβολισμό. Τα ένζυμα των αναερόβιων βακτηρίων του γαστρεντερικού σωλήνα διασπούν τη μετρονιδαζόλη, μέσω αναγωγικών αντιδράσεων με αποτέλεσμα την απώλεια του ιμιδαζολικού δακτυλίου και τη μετατροπή της σε προϊόντα διάσπασης που είναι το ακεταμίδιο και σε N-(2-υδροξυαιθυλο)οξαμικό οξύ (Σχήμα A.5) (Sousa *et al.* 2008).

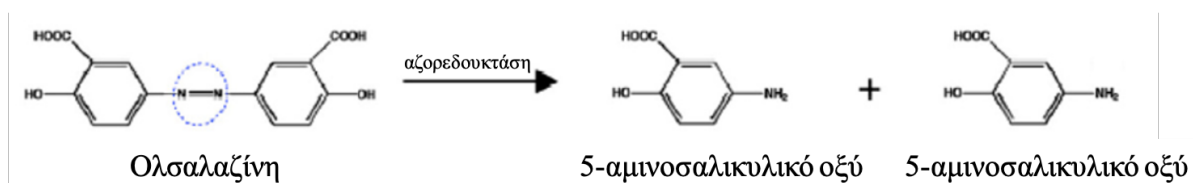


Σχήμα A.5: Αντίδραση αναγωγικής διάσπασης μετρονιδαζόλης (Sousa *et al.* 2008).

Ολσαλαζίνη

Η ολσαλαζίνη ανήκει σε μία κατηγορία φαρμάκων γνωστών ως σαλικυλικό-αντιφλεγμονώδη φάρμακα, τα οποία αναστέλλουν τη παραγωγή προσταγλαδινών, βοηθώντας έτσι να αποφευχθεί ο πόνος και η φλεγμονή. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ελκώδους κολίτιδας και του πόνου στο στομάχο, της διάρροιας και της πρωκτικής αιμορραγίας, που προκαλείται από αυτή τη κατάσταση. Τέλος, χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της νόσου του Chron.

Αποτελεί ένα προφάρμακο που ενεργοποιείται στο παχύ έντερο και δομικά αποτελείται από δύο μόρια 5-αμινοσαλικυλικών οξέων συνδεδεμένων με αζωτομάδα (-N=N-). Μόλις το προφάρμακο αυτό, φθάσει στο παχύ έντερο, τα βακτηριακά ένζυμα που ονομάζονται διαζωτοαναγωγάσες καταλύουν την αναγωγή της αζωτομάδας προκαλώντας την αποδέσμευση των δύο δραστικών μορίων του 5-αμινοσαλικυλικού οξέος, οδηγώντας έτσι, τοπική δράση στο σημείο αυτό (Σχήμα Α.6). Στο ανώτερο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα δεν υπάρχει δραστηριότητα των διαζωτοαναγωγασών και γίνεται περιορισμένη απορρόφηση του προφαρμάκου στο λεπτό έντερο (Sousa et al. 2008).



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

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1 Οργανολογία

- Αναδευτήρας περιδίνησης, model MS 3 basic, IKA[®] Works, Inc. (Wilmington U.S.A.).
- Αναερόβιος θάλαμος, Elecktrotek Anaerobic Workstation- AW 500TG Two Gas Version (West Yorkshire, U.K.).
- Αναλυτικός ζυγός, Kern 770, Kern & Sohn GmbH (Albstadt, Germany).
- Θερμοστατούμενη ανακινούμενη διάταξη, Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf AG (Hamburg, Germany).
- Κόσκινο, διάμετρος 20 cm, μέγεθος οπών 355 μm, Retsch (Haan, Germany).
- Λουτρό υπερήχων, Elmasonic S100H, Elma Sxhmidbauer GmbH (Singer, Germany).
- Μαγνητική πλάκα ανάδευσης, RH basic, IKA[®] Works, Inc. (Wilmington U.S.A.).
- Πεχάμετρο, CG842, Schott (Mainz, Germany).
- Προστήλη Hypersil BDS-C18(10 mm × 4mm, 5μm), Thermo Fisher Scientific Inc., (Massachusetts, U.S.A.).
- Στήλη C18 (150 × 3.0 mm ID, 5μm) FortisTM, FortisTM Technologies Ltd (Cheshire, U.K.).
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελούμενο από αντλία Spectra System P4000,(ThermoQuest Inc., San Jose, USA), ανιχνευτή υπεριώδους UV1000, αυτόματο δειγματολήπτη AS3000 (ThermoQuest Inc., San Jose, USA), SN4000 και λογισμικό EZChrom Agilent[®] version 3.2 (Agilent Technologies, Inc, Pleasanton, C.A., U.S.A.)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος, Universal 32R, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Germany).

B.2 Αντιδραστήρια

- 2-προπανόλη, βαθμού καθαρότητας HPLC, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.).
- Ακετονιτρίλιο, βαθμού καθαρότητας HPLC, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.).
- Γλυκόζη, BioXtra $\geq 99,5\%$ (GC), Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.).
- Μπλε του μεθυλενίου, Merck (New Jersey, U.S.A.).

- Μυρμηκικό Οξύ, 98-100%, Reah ACS, Reag.Ph.Eur., Sigma-Aldrich Co. (St Louis, U.S.A.).
- Νερό βαθμού καθαρότητας HPLC, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.).
- Όξινο ανθρακικό νάτριο, Panreac (Barcelona, Spain).
- Τριφθορικό Οξύ, 99%, Reagent Plus, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.).
- Φυσιολογικός ορός, 0,9% χλωριούχο νάτριο, Demo Pharmaceuticals (Krioneri, Greece).

B.3 Δραστικές Ουσίες-Φαρμακευτικά Προϊόντα

- 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.

B.4 Αναλυτικές Τεχνικές

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

B.5 Υλικό από κόπρανα υπερηλίκων








Ύστερα από αδειοδότηση από την Επιτροπή Βιοηθικής του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών πραγματοποιήθηκε (Παράρτημα II) συλλογή κοπράνων από εθελοντές ηλικίας >65 ετών. Η επιλογή των εθελοντών έγινε κατόπιν τηλεφωνικών συνεντεύξεων (Παράρτημα III) και βάσει προκαθορισμένων κριτηρίων καταλληλότητας για τη συμμετοχή του ατόμου στη μελέτη.

B.5.1 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 >65 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 οινοπνευματώδη 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 πρεβιοτικών [συμπληρώματα διατροφής, λειτουργικά τρόφιμα (functional foods) κ.ά.] 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 (Σχήμα B.1)
- viii. Δεν έχει κάνει χρήση φαρμάκων τα οποία επηρεάζουν τη λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος για διάστημα 7 ημερών πριν τη μελέτη (Reddy and Wynder 1978)

Η κλίμακα Bristol αποτελεί μία μέθοδο για το χαρακτηρισμό των κοπράνων και οι τύποι των κοπράνων παρουσιάζονται στο Σχήμα Β.1.

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.1: Χαρακτηρισμός των κοπράνων με βάση την κλίμακα Bristol (Lewis and Heaton 1997)

B.5.2 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. 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

B.5.3 Εθελοντές που συμμετείχαν στη μελέτη

Στη συγκεκριμένη μελέτη συμμετείχαν έξι εθελοντές ηλικίας >65 ετών ύστερα από γραπτή συγκατάθεση (Παράρτημα IV). Στο πίνακα B.1 παρουσιάζονται τα δημογραφικά δεδομένα των έξι εθελοντών που έλαβαν μέρος στη μελέτη. Ο δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI) υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση B.1.

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

Πίνακας B.1: Δημογραφικά δεδομένα των εθελοντών που έλαβαν μέρος στη παρούσα μελέτη.

Αριθμός Εθελοντή	Φύλο	Ηλικία (έτη)	Βάρος (kg)	Ύψος (m)	BMI (kg/m ²)
1	Γυναίκα	76	78	1,68	27,63
2	Άνδρας	81	94	1,71	32,14
3	Γυναίκα	80	65	1,58	26,23
4	Άνδρας	86	66	1,70	22,83
5	Γυναίκα	79	64	1,50	28,44
6	Άνδρας	70	64	1,63	24,28

BMI: Δείκτης μάζας σώματος (Εξίσωση B.1)

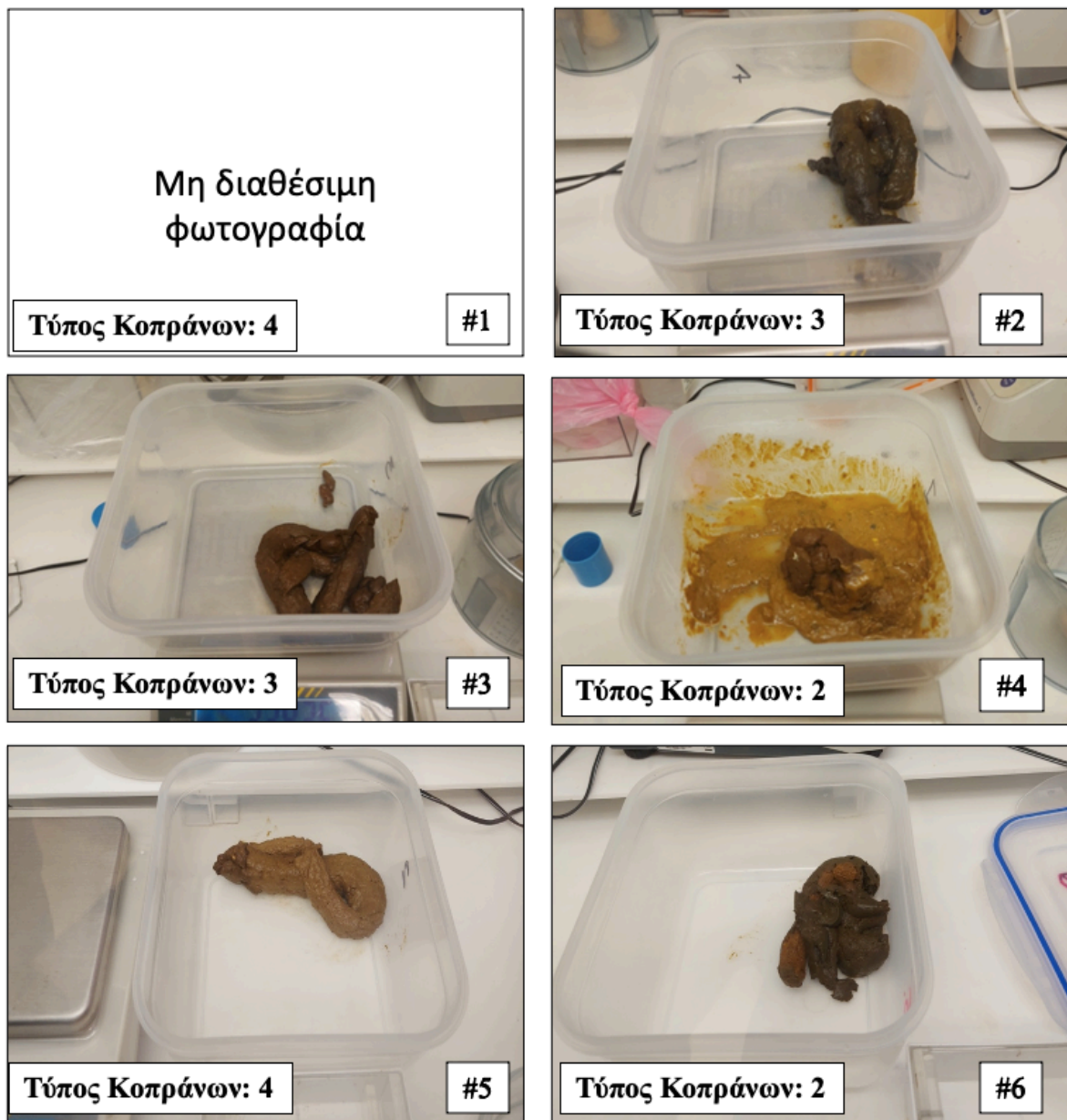
Αξίζει να αναφερθεί ότι όλοι οι εθελοντές έκαναν λήψη φαρμάκων σε καθημερινή βάση. Στον Πίνακα B.2. συνοψίζονται οι κατηγορίες φαρμάκων και οι δραστικές ουσίες που λάμβαναν οι εθελοντές οι οποίοι συμμετείχαν στη μελέτη.

Πίνακας Β.2: Φάρμακα που λάμβαναν οι εθελοντές που συμμετείχαν στη μελέτη

Κατηγορία Δραστικής Ουσίας	Δραστική Ουσία	Αριθμός Εθελοντή που λαμβάνει την δραστική Ουσία
Αντιαιμοπεταλιακό	Κλοπιδογρέλη	1
Αντιυπερτασικό	Αμλοδιπίνη	1
	Κατεσαρτάνη	5
Αντιυπερλιπιδαιμικό	Ατορβαστατίνη	1
	<i>Δεν αναφέρθηκε</i>	4
Αγγολυτικό	Κλοβαζάμη	1
Φάρμακο κατά της ουρικής αρθρίτιδας	Αλλοπουρινόλη	1
Φάρμακο κατά της νόσου Alzheimer	Μεμαντίνη	2
Θυροειδούς	Λεβοθυροξίνη	3
Οφθαλμικές Σταγόνες	<i>Δεν αναφέρθηκε</i>	4
Αντιυπεργλυκαιμικό	<i>Δεν αναφέρθηκε</i>	4
Διουρητικό	Υδροχλωροθειαζίδη	5
Στοματική Γέλη	Κορτιζόνη	5

B.5.4 Μεθοδολογία συλλογής κοπράνων

Τρεις ημέρες πριν τη συλλογή των κοπράνων, ο εθελοντής καταγράφει τα γεύματα που κατανάλωσε ο υπερήλικας καθώς επίσης και την εντερική του δραστηριότητα. (Παράρτημα V) Την ημέρα της συλλογής, ο κάθε εθελοντής καταναλώνει κανονικά τα ημερήσια γεύματά του και λαμβάνει τα φάρμακά του. Με αυτό το τρόπο μπορεί να γίνει επιβεβαίωση ότι οι εθελοντές κατανάλωσαν κανονικά τα γεύματά τους. Η συλλογή κοπράνων γίνεται κατά τη πρώτη κένωση της ημέρας μέσα προζυγισμένο, πλαστικό περιέκτη. Ο πλαστικός περιέκτης με τα κόπρανα τοποθετείται σε αναερόβιο περιβάλλον (Tannergren et al. 2014, Sousa et al. 2014) (10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂) σε χρονικό διάστημα μικρότερο των 45 λεπτών. Η θερμοκρασία του θαλάμου είναι ρυθμισμένη στους 37 °C και η σχετική υγρασία είναι στο 70%. Η απουσία οξυγόνου παρακολουθείται με τη βοήθεια κατάλληλου δείκτη (Παράρτημα VI). Τα κόπρανα χαρακτηρίζονται με βάση την κλίμακα Bristol (Σχήμα B.1). Στο Σχήμα B.2 παρουσιάζονται φωτογραφίες των κοπράνων κάθε εθελοντή καθώς και ο χαρακτηρισμός τους με βάση την κλίμακα Bristol.

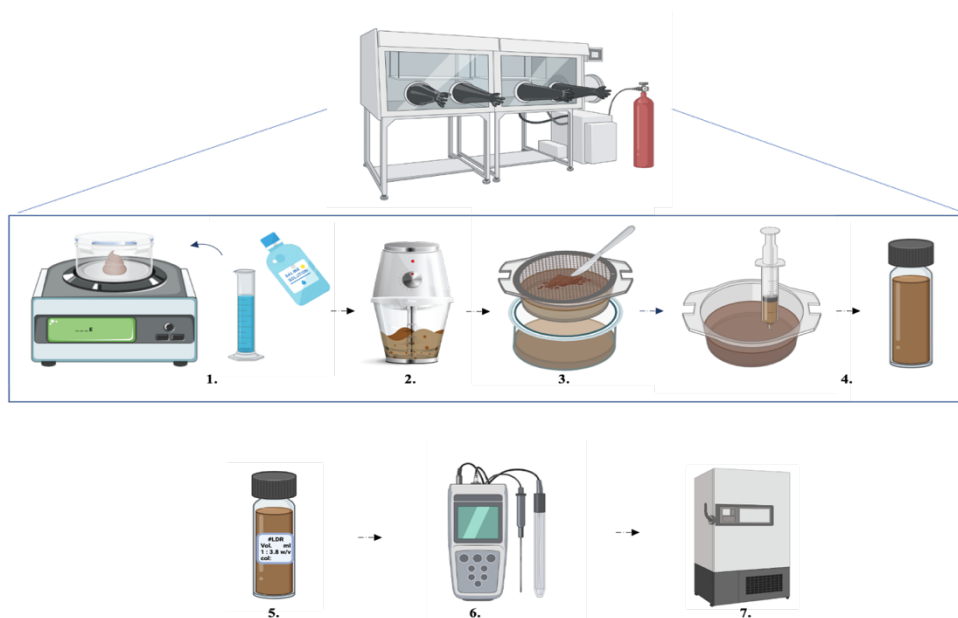


Σχήμα Β.2 : Φωτογραφίες των κοπράνων κάθε εθελοντή και χαρακτηρισμός τους με βάση τη κλίμακα Bristol (κάτω αριστερά). Κάτω δεξιά αναφέρεται ο αριθμός κάθε εθελοντή.

B5.5 Μεθοδολογία παρασκευής υλικού από κόπρανα

Τα κόπρανα ζυγίζονται με τη βοήθεια ενός αναλυτικού ζυγού. Υπολογίζεται ο απαιτούμενος όγκος φυσιολογικού ορού (χλωριούχο νάτριο 0,9% w/v) για την παρασκευή υλικού από κόπρανα (αραίωση 1:3,8 w/v). Η χρήση του φυσιολογικού ορού αποσκοπεί στην αποφυγή πλασμόλυσης των βακτηρίων. Τα κόπρανα και ο φυσιολογικός ορός μεταφέρονται σε αναμικτήρα ανά δόσεις με στόχο να αποφευχθεί η υπερχειλίση, και πολτοποιούνται προς σχηματισμό ομοιογενούς μίγματος. Έπειτα, το μίγμα διηθείται από κόσκινο με μέγεθος οπών 355 μm , έτσι ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κομμάτια που δεν ομογενοποιήθηκαν (Tannergren et al. 2014, Sousa et al. 2014, Yadav et al. 2013). Ακολουθεί πλήρωση του υλικού από κόπρανα σε υάλινους περιέκτες και στη συνέχεια η επικόλληση ετικετών. Στην κάθε ετικέτα αναγράφεται ο κωδικός του εθελοντή, ο όγκος του περιεχόμενου υλικού από κόπρανα και η ημερομηνία συλλογής. Τέλος μετράται το pH του υλικού από κόπρανα και οι γυάλινοι περιέκτες τοποθετούνται στον υπερκαταψύκτη (-70 °C).

Στο Σχήμα B.3 παρουσιάζονται τα βασικά στάδια της μεθοδολογίας παρασκευής υλικού από κόπρανα κάθε εθελοντή εντός και εκτός του αναερόβιου θαλάμου.



Σχήμα B.3: Διαδικασία παρασκευής υλικού από κόπρανα :**1.** Ζύγιση, **2.** Ανάμειξη με φυσιολογικό ορό (0,9% χλωριούχο νάτριο), **3.** Διήθηση, **4.** Πλήρωση υάλινων περιεκτών, **5.** Τοποθέτηση ετικέτας, **6.** Μέτρηση pH, **7.** Τοποθέτηση σε υπερκαταψύκτη.

Οι περιέκτες αυτοί παραμένουν στον υπερκαταψύκτη μέχρι την ημέρα διεξαγωγής των πειραμάτων βακτηριακής διάσπασης. Έχει βρεθεί ότι το υλικό από κόπρανα μπορεί να διατηρηθεί σε αυτή τη θερμοκρασία για τουλάχιστον δώδεκα μήνες, χωρίς να επηρεαστεί η ενεργότητα των αναερόβιων βακτηρίων. Παρόλα αυτά περισσότεροι του ενός κύκλου ψύξης-απόψυξης δεν είναι επιθυμητοί, καθώς έχει αποδειχθεί ότι η βακτηριακή ενεργότητα του υλικού από κόπρανα μειώνεται ύστερα από το δεύτερο κύκλο ψύξης-απόψυξης (Karatzas et al. 2016).

Στον Πίνακα Β.2 παρουσιάζονται τα στοιχεία συλλογής κοπράνων καθώς και ο όγκος και το pH του υλικού από κόπρανα που παρασκευάστηκε.

Πίνακας Β.2: Βάρος κοπράνων που συλλέχθηκε από 6 υπερήλικες, τύπος κατά Bristol, προκύπτων όγκος και τιμή pH του υλικού από κόπρανα

Αριθμός Εθελοντή	Τύπος Κοπράνων Κατά Bristol	Βάρος Κοπράνων (g)	Όγκος Φυσιολογικού Ορού (mL)	Ολικός Όγκος υλικού από κόπρανα (mL)	pH υλικού από κόπρανα
1	4	38,35	145,73	143	6,90
2	3	115,69	421,648	464	6,82
3	3	91,27	336,756	314	6,70
4	2	122,54	392,73	420	6,60
5	4	144,42	456,682	487	6,56
6	2	101,06	375,25	401	6,48

Το μέσο βάρος κοπράνων που συλλέχθηκε από τους 6 εθελοντές ήταν 102.2 g (εύρος τιμών 38.35-144.42 g), ενώ ο όγκος του υλικού από κόπρανα που παρασκευάστηκε κυμαίνεται από 143 έως 487 mL (μέση τιμή 371.5 mL). Τέλος, οι τιμές pH του υλικού από κόπρανα κυμαίνονται από 6.5 έως 6.9.

B.6 Εκτίμηση της μεταβλητότητας της βακτηριακής ενεργότητας υλικού από κόπρανα υπερηλίκων.

Για τα πειράματα βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης χρησιμοποιείται το υλικό από κόπρανα κάθε εθελοντή ξεχωριστά, το οποίο έχει φυλαχθεί στους $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Το υλικό αυτό μεταφέρεται στον αναερόβιο θάλαμο κάτω από τις ίδιες συνθήκες που έλαβαν χώρα για τη παρασκευή του. Έχει αποδειχθεί ότι ο βέλτιστος χρόνος παραμονής προκειμένου να αποψυχθεί το υλικό από κόπρανα μέσα στον αναερόβιο θάλαμο και να επανέλθει η βακτηριακή ενεργότητα είναι δύο ώρες. Αν το πείραμα της βακτηριακής αποικοδόμησης των υπό μελέτη ουσιών ξεκινήσει πριν το πέρας δύο ωρών τότε εμφανίζουν μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα καθώς τα βακτήρια χρειάζονται αυτό το χρονικό διάστημα των δύο ωρών προκειμένου να επανακτήσουν την αρχική τους ενεργότητα μετά την απόψυξη (Karatzá et al. 2016).

B.6.1 Βακτηριακή αποικοδόμηση μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα που παρασκευάστηκε στη παρούσα μελέτη.

Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης μετρονιδαζόλης σε φυσιολογικό ορό.

Ζυγίζονται 10 mg μετρονιδαζόλης σε αναλυτικό ζυγό και μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Προστίθεται όγκος φυσιολογικού ορού και η φιάλη τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων. Τέλος, συμπληρώνεται όγκος φυσιολογικού ορού μέχρι τη χαραγή. Το τελικό διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/mL}$.

Μεθοδολογία για την εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης

Μέσα στον αναερόβιο θάλαμο, λαμβάνονται 1000 μL του υλικού από κόπρανα τα οποία μεταφέρονται σε έναν πλαστικό περιέκτη τύπου Eppendorf (A). Στη συνέχεια, στον ίδιο πλαστικό περιέκτη προστίθενται 125 μL διαλύματος παρακαταθήκης της μετρονιδαζόλης. Ακολουθεί ανάμιξη σε αναδευτήρα περιδίνησης (vortex). Ο περιέκτης μεταφέρεται σε θερμοστατούμενη ανακινούμενη διάταξη, έτσι ώστε να διατηρηθεί σε θερμοκρασία $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε ανακίνηση 1000 rpm. Έπειτα, 100 μL του μίγματος μεταφέρονται σε νέο πλαστικό περιέκτη τύπου Eppendorf (B) και προστίθενται 300 μL παγωμένο ακετονιτρίλιο, με σκοπό να σταματήσει απότομα η διαδικασία της διάσπασης. Ο χρόνος αυτός ορίζεται ως ο χρόνος μηδέν για τη δειγματοληψία. Αμέσως

μετά, ο περιέκτης (A) επιστρέφει στη θερμοστατούμενη ανακινούμενη διάταξη. Δείγματα όγκου 100 μL λαμβάνονται 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 λεπτά από την έναρξη του πειράματος με τη βοήθεια χρονομέτρου.

Μετά την ολοκλήρωση της παραπάνω διαδικασίας, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται (10 $^{\circ}\text{C}$, 10000 rpm, 10 λεπτά). Έπειτα, 100 μL από το διαυγές υπερκείμενο διάλυμα, μεταφέρονται σε φιαλίδια HPLC και προστίθενται 900 μL κινητής φάσης. Ακολουθεί ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνησης. Τέλος, τα δείγματα ενίονται στο χρωματογραφικό σύστημα (Παράρτημα I).

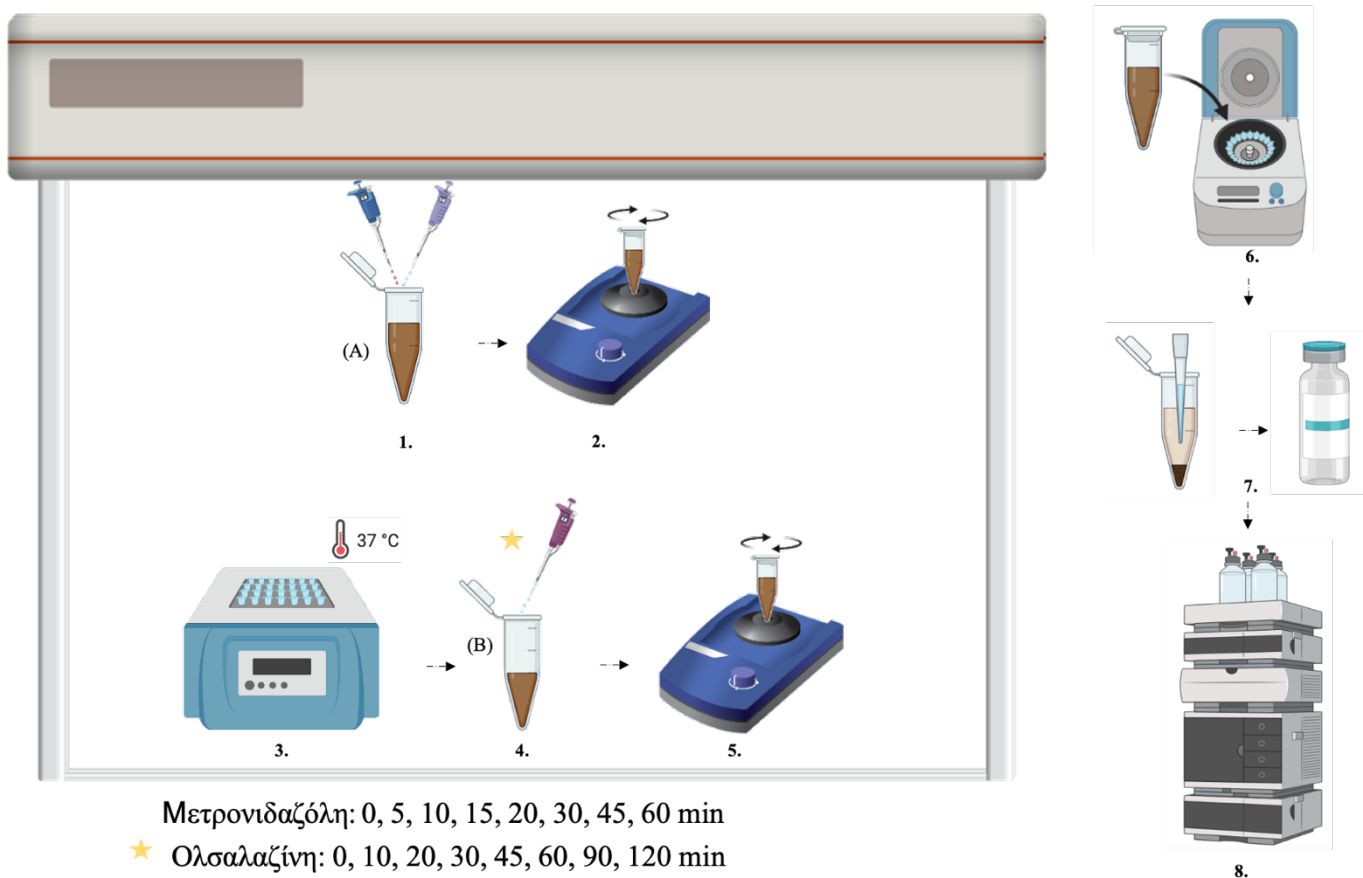
B.6.2 Βακτηριακή αποικοδόμηση ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα που παρασκευάστηκε στη παρούσα μελέτη.

Ζυγίζονται 14 mg ολσαλαζίνης σε αναλυτικό ζυγό και μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Προστίθεται όγκος φυσιολογικού ορού και η φιάλη τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων. Τέλος, συμπληρώνεται όγκος φυσιολογικού ορού μέχρι τη χαραγή. Το τελικό διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Μεθοδολογία για την εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης της ολσαλαζίνης

Η μεθοδολογία για τη μέτρηση της κινητικής διάσπασης της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα είναι ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε για τη μετρονιδαζόλη. Οι χρόνοι δειγματοληψίας για την αξιολόγηση της κινητικής διάσπασης είναι 10, 20, 30, 45, 60, 90, και 120 min.

Στο Σχήμα B.4 παρουσιάζονται τα στάδια της μεθοδολογίας της βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης μέσα στον αναερόβιο θάλαμο, καθώς και οι διαδικασίες που πραγματοποιούνται έξω από αυτόν.



Σχήμα Β.4 : Διαδικασία βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης.

Εντός Αναερόβιου Θαλάμου: **1:** Προσθήκη 1000 µL από υλικό από κόπρανα σε 125 µL διαλύματος της δραστικής ουσίας σε Eppendorf (A) **2:** Ανάμιξη **3:** Τοποθέτηση του περιέκτη σε θερμοστατούμενη ανακινούμενη διάταξη **4:** Λήψη 100 µL δείγματος και προσθήκη 300 µL Ακετονιτριλίου **5:** Ανάμιξη

Εκτός Αναερόβιου Θαλάμου: **6:** Υπερφυγοκέντρηση, **7:** Αραίωση, **8:** Εισαγωγή στο χρωματογραφικό σύστημα

B.7 Ανάλυση πειραματικών δεδομένων βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων

Για την αξιολόγηση της κινητικής διάσπασης της μετρονιδαζόλης καθώς και της ολσαλαζίνης χρησιμοποιείται η εξίσωση B.2 που αντιπροσωπεύει το πρωτοταξικό μοντέλο κινητικής. Υπολογίστηκε η τιμή της σταθεράς διάσπασης k του κάθε φαρμάκου στο υλικό από κόπρανα που συλλέχθηκε από κάθε εθελοντή.

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

X: η ποσότητα του φαρμάκου που παραμένει σε υλικό από κόπρανα κάθε χρονική στιγμή.

X₀: το ποσοστό του φαρμάκου στο υλικό από κόπρανα σε χρόνο 0.

k: η σταθερά του ρυθμού διάσπασης του φαρμάκου.

t: χρόνος από την έναρξη της επώασης.

Σε όλες τις περιπτώσεις για τον έλεγχο της επιτυχούς προσαρμογής ελέγχεται ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2). Για κάθε δραστική ουσία, με βάση τη σταθερά ρυθμού διάσπασης, υπολογίζονται οι χρόνοι ημιζωής ($t_{1/2}$) με βάση τη παρακάτω εξίσωση (Εξίσωση B.3):

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

Μετά από τον έλεγχο της κανονικότητας, οι σταθερές των ρυθμών αποικοδόμησης που υπολογίστηκαν από τα πειράματα στο υλικό από κόπρανα 6 εθελοντών ηλικίας >65 ετών συγκρίθηκαν με τις τιμές που είχαν υπολογιστεί σε υλικό από κόπρανα που είχαν συλλεχθεί από έξι υγιείς εθελοντές ηλικίας >65 ετών σε προηγούμενη μελέτη (Γκόλφη 2017) με τη δοκιμασία t-test για ανεξάρτητες παρατηρήσεις.

Οι τιμές των σταθερών του ρυθμού αποικοδόμησης που υπολογίστηκαν από τα πειράματα στο υλικό από κόπρανα 12 εθελοντών ηλικίας >65 ετών συγκρίθηκαν με τις τιμές των σταθερών ρυθμών αποικοδόμησης που είχαν υπολογιστεί από πειράματα σε υλικό από κόπρανα 12 υγιών παιδιών (Ρωμανός 2017, Ρωμανός 2019) και 12 υγιών ενηλίκων (Karatza et al. 2016, Γκόλφη 2020), με τη δοκιμασία One-Way ANOVA.

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

Η παρουσίαση των τιμών της σταθεράς διάσπασης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης γίνεται με τη χρήση θηκογραμμάτων. Σε κάθε θηκόγραμμα φαίνεται η

διάμεση τιμή, το 10° , 25° , 75° και 90° εκατοστημόριο, οι εξωκείμενες παρατηρήσεις και με διακεκομμένη γραμμή η μέση τιμή.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

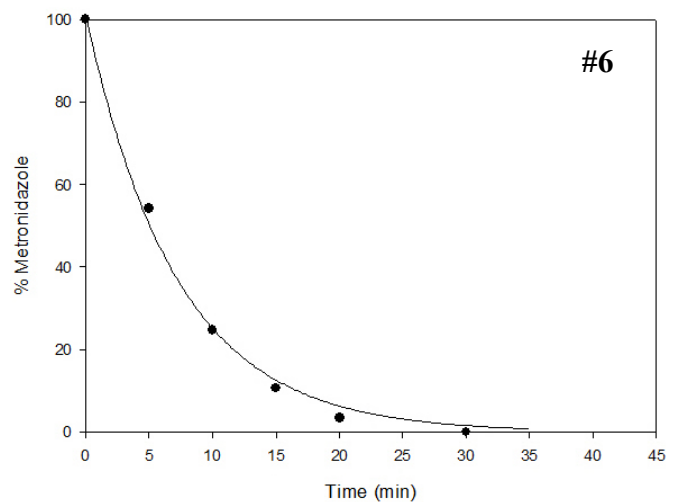
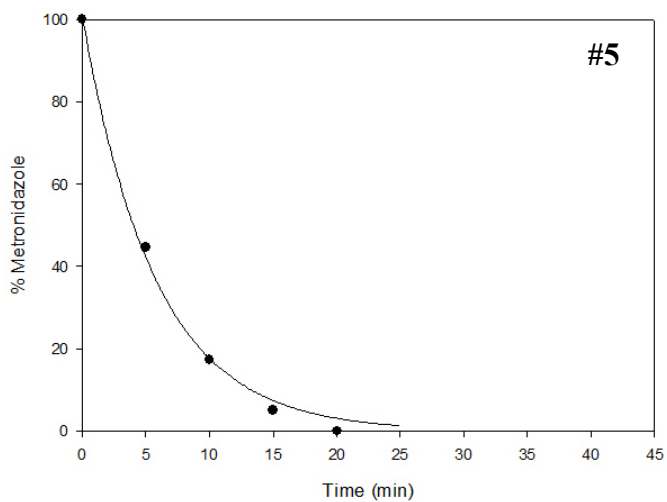
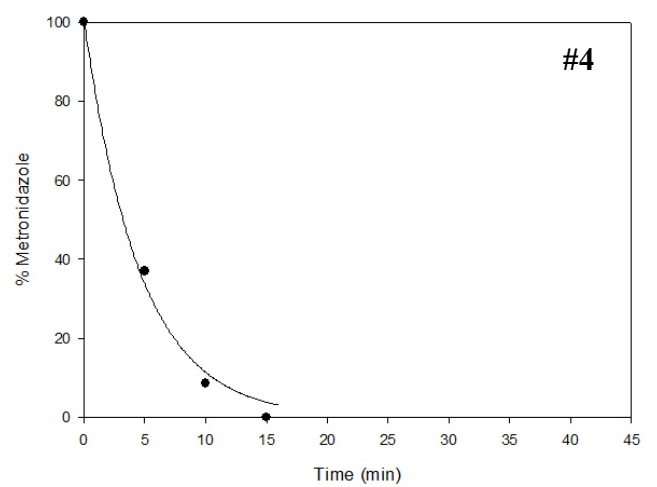
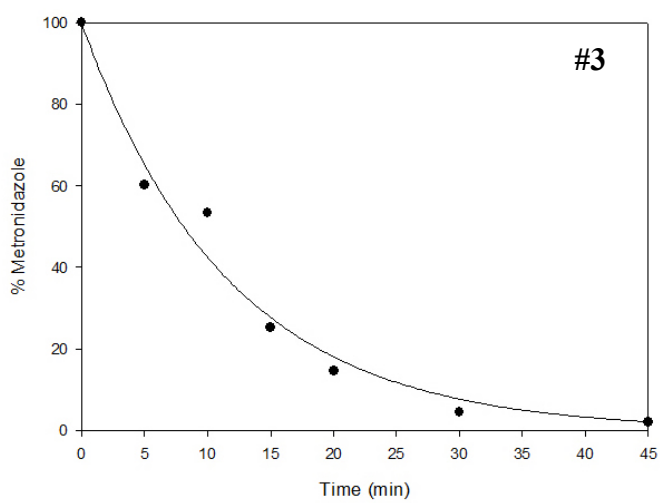
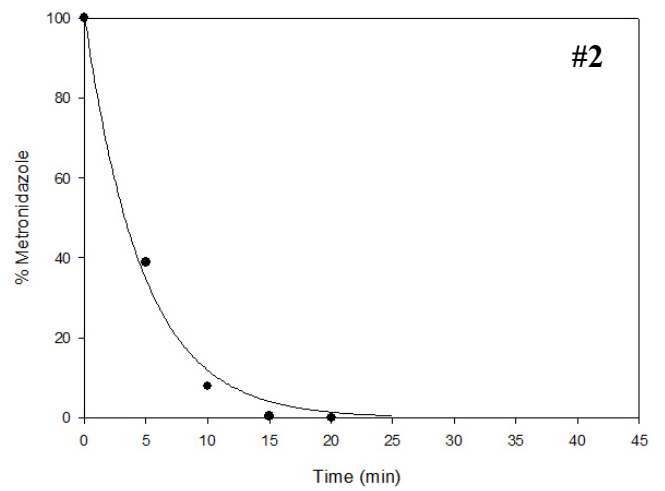
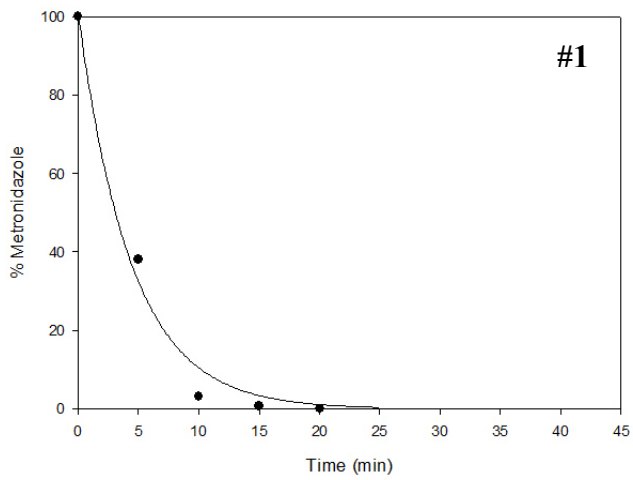
Γ.1 Βακτηριακή αποικοδόμηση μετρονιδαζόλης και ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα υπερηλίκων >65 ετών.

Τα πρωτογενή δεδομένα των πειραμάτων της μελέτης της κινητικής διάσπασης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης παρουσιάζονται στο Παράρτημα VII.

Γ.1.1 Δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης μετρονιδαζόλης

Στο σχήμα Γ.1 παρουσιάζεται το ποσοστό της μετρονιδαζόλης, που παρέμεινε στο υλικό από κόπρανα σε σχέση με το χρόνο επώασης σε αναερόβιες συνθήκες καθώς και η καλύτερα προσαρμοσμένη καμπύλη πρωτοταξικής αποικοδόμησης (Εξίσωση Β.2) για κάθε εθελοντή.

Στον Πίνακα Γ.1 παρουσιάζονται οι τιμές των σταθερών των ρυθμών αποικοδόμησης (πρωτοταξική κινητική) και οι χρόνοι ημίσειας ζωής στο υλικό από κόπρανα κάθε εθελοντή, που συμμετείχε στη παρούσα μελέτη.



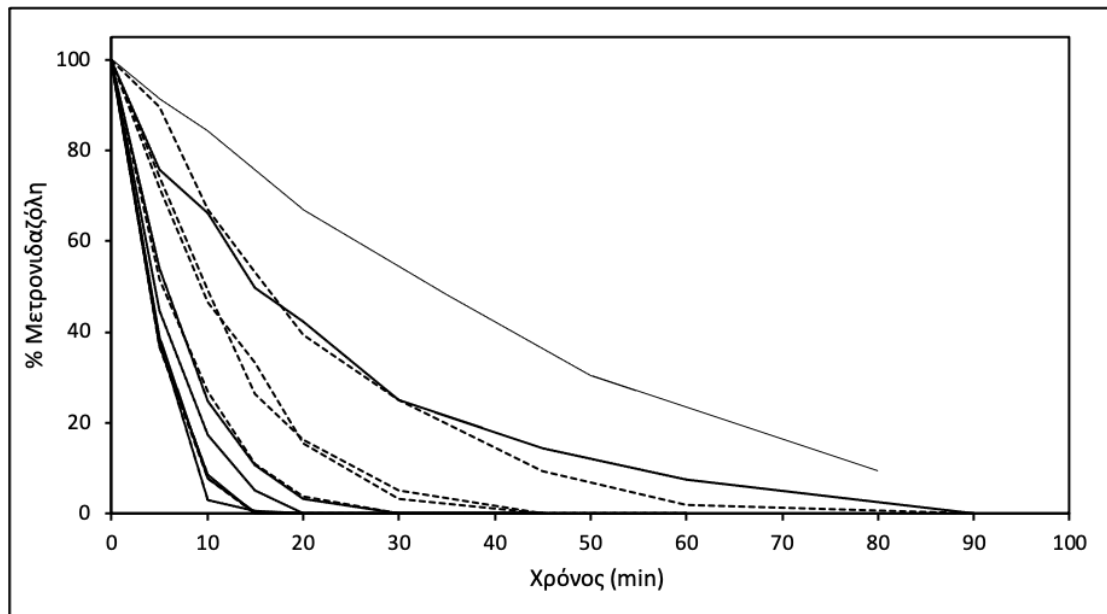
Σχήμα Γ.1: Δεδομένα της βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα και η καλύτερα προσαρμοσμένη καμπύλη πρωτοταξικής κινητικής για κάθε εθελοντή

Πίνακας Γ.1: Σταθερά του ρυθμού βακτηριακής αποικοδόμησης (τυπικό σφάλμα), χρόνος ημίσειας και συντελεστής προσδιορισμού (r^2) της μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα 6 εθελοντών ηλικίας >65 ετών (σε κάθε περίπτωση έγινε προσαρμογή του πρωτοταξικού μοντέλου).

Αριθμός Υπερήλικα	k (Τυπικό σφάλμα) (min^{-1})	Χρόνος Ημίσειας Ζωής (min)	Συντελεστής Προσδιορισμού (r^2)
1	0,227 (0,050)	3,05	0,994
2	0,214 (0,020)	3,24	0,993
3	0,044 (0,002)	15,75	0,996
4	0,218 (0,020)	3,48	0,995
5	0,174 (0,010)	3,98	0,997
6	0,139 (0,007)	4,99	0,996

Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα Γ.1, υπολογίζεται η μέση τιμή (τυπική απόκλιση) της σταθεράς βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης $0.169 (0.070) \text{ min}^{-1}$ που αντιστοιχεί σε μέσο χρόνο ημίσειας ζωής (τυπική απόκλιση) $5.70(4,977) \text{ min}$.

Στο Σχήμα Γ.2 συγκρίνονται τα δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης στο υλικό από κόπρανα 6 εθελοντών ηλικίας >65 ετών της παρούσας εργασίας σε σχέση με τα αντίστοιχα δεδομένα που είχαν ληφθεί σε παλαιότερη πτυχιακή εργασία από κόπρανα 6 εθελοντών ηλικίας >65 ετών (Γκόλφη 2017) σε συνάρτηση με το χρόνο.



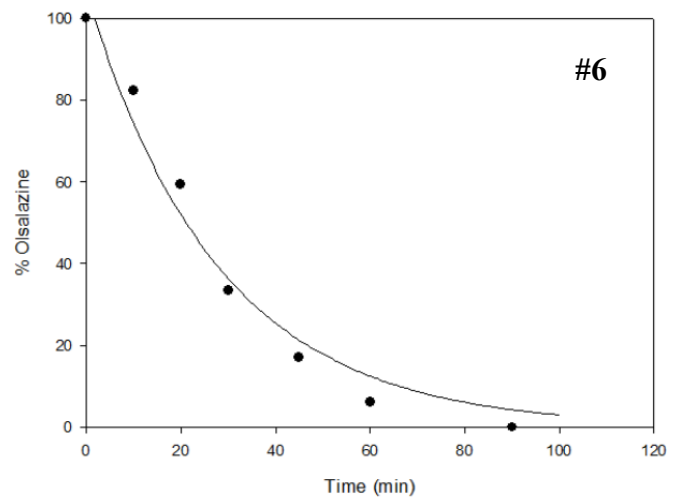
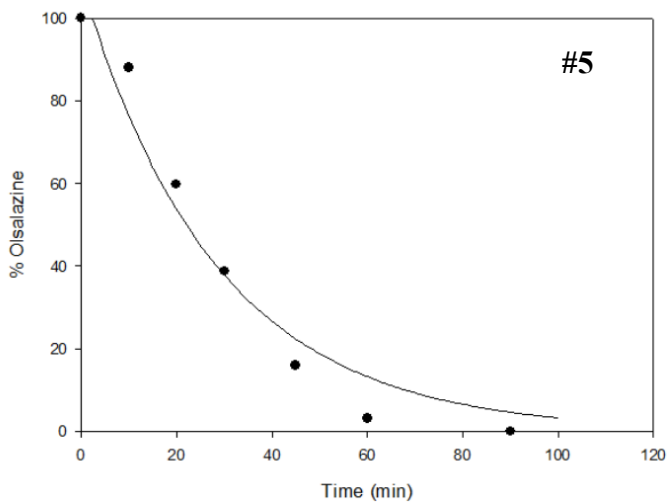
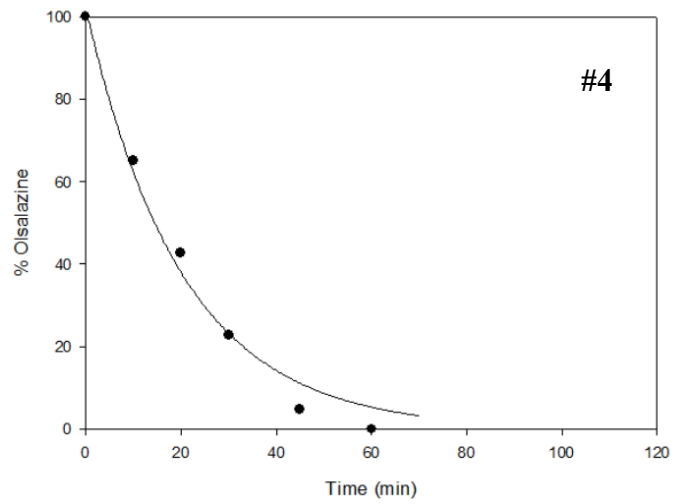
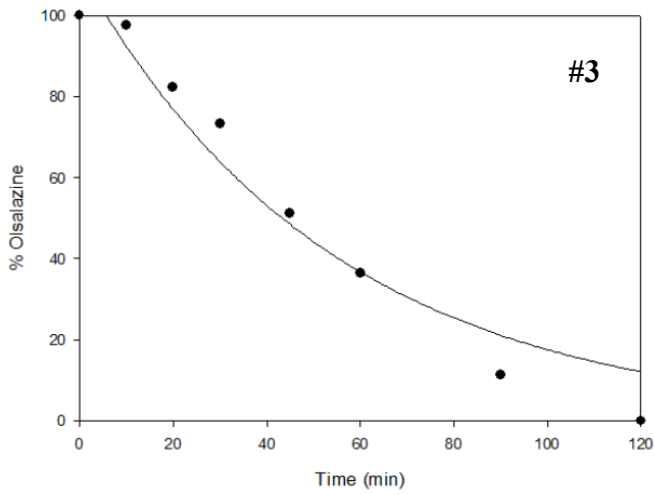
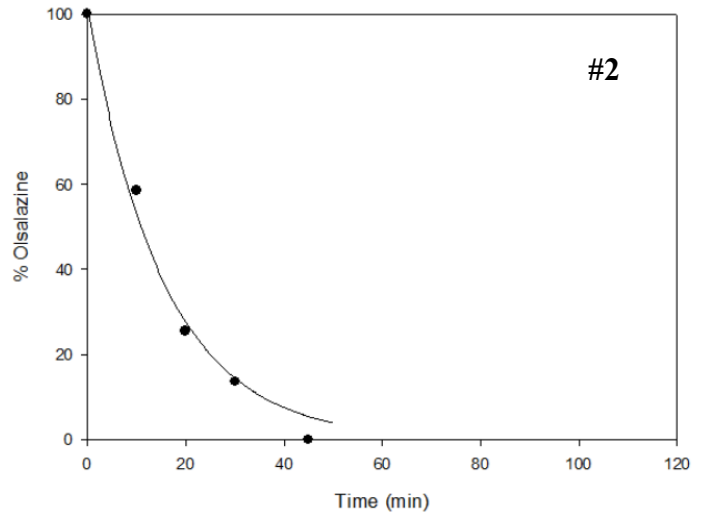
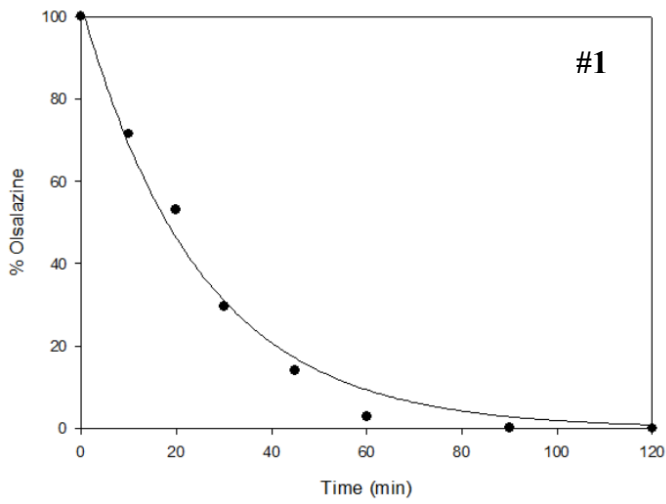
Σχήμα Γ.2: Ποσοστό βακτηριακής αποικοδόμησης μετρονιδαζόλης σε σχέση με το χρόνο στο υλικό από κόπρανα υπερηλίκων (—) (n=6) (παρούσα μελέτη) και υπερηλίκων (---) (n=6) (Γκόλφη, 2017).

Οι σταθερές του ρυθμού αποικοδόμησης (τυπική απόκλιση) της μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα 6 εθελοντών ηλικίας >65 ετών της παρούσας εργασίας $0.169 (0.070) \text{ min}^{-1}$ συγκρίθηκαν με τις σταθερές ρυθμού αποικοδόμησης (τυπική απόκλιση) σε υλικό από κόπρανα άλλων 6 εθελοντών ηλικίας >65 ετών παλαιότερης πτυχιακής εργασίας $0,098 (0,071) \text{ min}^{-1}$ (Γκόλφη 2017) με τη δοκιμασία t-test. Δεν ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων εθελοντών ($P=0.119$).

Γ.1.2 Δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης ολσαλαζίνης

Στο Σχήμα Γ.3 παρουσιάζεται το ποσοστό της ολσαλαζίνης, που παρέμεινε στο υλικό από κόπρανα σε σχέση με τον χρόνο επώασης σε αναερόβιες συνθήκες και η καλύτερα προσαρμοσμένη καμπύλη πρωτοταξικής αποικοδόμησης (Εξίσωση Β.2) για κάθε εθελοντή.

Στον Πίνακα Γ.2 παρουσιάζονται οι τιμές των σταθερών των ρυθμών αποικοδόμησης (πρωτοταξική κινητική) και οι χρόνοι ημίσειας ζωής στο υλικό από κόπρανα κάθε εθελοντή, που συμμετείχε στη παρούσα μελέτη.



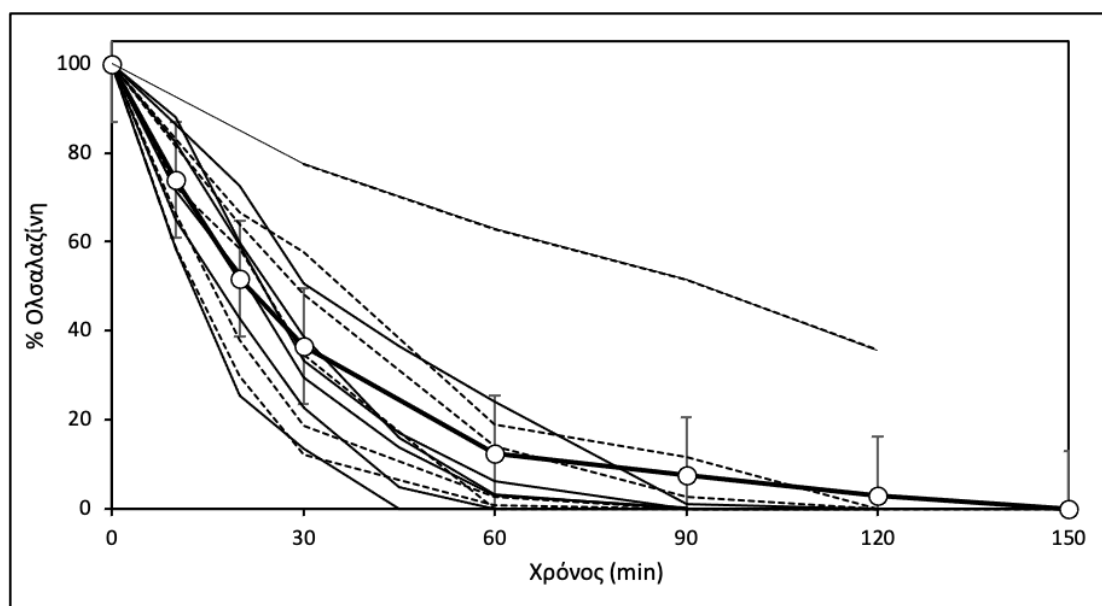
Σχήμα Γ.3: Δεδομένα της βακτηριακής αποικοδόμησης της ολσαλαζίνης στο υλικό από κόπρανα και η καλύτερα προσαρμοσμένη καμπύλη πρωτοταξικής αποικοδόμησης για κάθε εθελοντή

Πίνακας Γ.2: Σταθερά του ρυθμού βακτηριακής αποικοδόμησης (τυπικό σφάλμα), χρόνος ημίσειας και συντελεστής προσδιορισμού (r^2) της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα 6 εθελοντών ηλικίας >65 ετών (σε κάθε περίπτωση έγινε προσαρμογή του πρωτοταξικού μοντέλου).

Αριθμός Υπερήλικα	k (Τυπικό σφάλμα) (min^{-1})	Χρόνος Ημίσειας Ζωής (min)	Συντελεστής Προσδιορισμού (r^2)
1	0,04 (0,003)	17,33	0,987
2	0,065 (0,006)	10,66	0,989
3	0,025 (0,003)	27,72	0,975
4	0,049 (0,004)	14,14	0,986
5	0,035 (0,005)	19,80	0,958
6	0,036 (0,004)	19,25	0,973

Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα Γ.2, υπολογίζεται η μέση τιμή (τυπική απόκλιση) της σταθεράς βακτηριακής αποικοδόμησης της ολσαλαζίνης 0,042 (0,014) min^{-1} που αντιστοιχεί σε μέσο χρόνο ημίσειας ζωής (τυπική απόκλιση) 18.15(5,802) min.

Στο σχήμα Γ.4 συγκρίνονται τα δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης της ολσαλαζίνης στο υλικό από κόπρανα 6 εθελοντών ηλικίας >65 ετών της παρούσας εργασίας σε σχέση με τα αντίστοιχα δεδομένα που είχαν ληφθεί σε παλαιότερη πτυχιακή εργασία από κόπρανα 6 εθελοντών ηλικίας >65 ετών (Γκόλφη 2017).



Σχήμα Γ.4: Ποσοστό βακτηριακής αποικοδόμησης ολσαλαζίνης σε σχέση με το χρόνο στο υλικό από κόπρανα 6 εθελοντών ηλικίας >65 ετών (—) (n=6) (παρούσα μελέτη) και 6 εθελοντών ηλικίας >65 ετών(---) (n=6) (Γκόλφη, 2017).

Οι σταθερές του ρυθμού αποικοδόμησης (τυπική απόκλιση) της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα 6 εθελοντών ηλικίας >65 ετών της παρούσας εργασίας $0,042(0,014) \text{ min}^{-1}$ συγκρίθηκαν με τις σταθερές ρυθμού αποικοδόμησης (τυπική απόκλιση) σε υλικό από κόπρανα που είχαν ληφθεί από άλλους 6 εθελοντές ηλικίας >65 ετών παλαιότερης πτυχιακής εργασίας $0,037(0,019) \text{ min}^{-1}$ (Γκόλφη 2017) με τη δοκιμασία t-test. Δεν ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων εθελοντών ($P=0.482$).

Γ.2 Επίδραση της ηλικίας στη σταθερότητα της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα

Για την εκτίμηση της επίδρασης της ηλικίας στη σταθερότητα της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα, έγινε σύγκριση των σε υλικό από κόπρανα 12 υγιών παιδιών (εύρος ηλικίας 3-8,5 ετών) (Ρωμανός 2017, Ρωμανός 2019), 12 υγιών ενηλίκων (εύρος ηλικίας 19-55 ετών) (Karatzá *et al.* 2016, Γκόλφη 2020) και 12 υγιών υπερηλίκων (εύρος ηλικίας 65-91 ετών) (Γκόλφη 2017, παρούσα διπλωματική) μέσω της στατιστικής ανάλυσης One Way Anova.

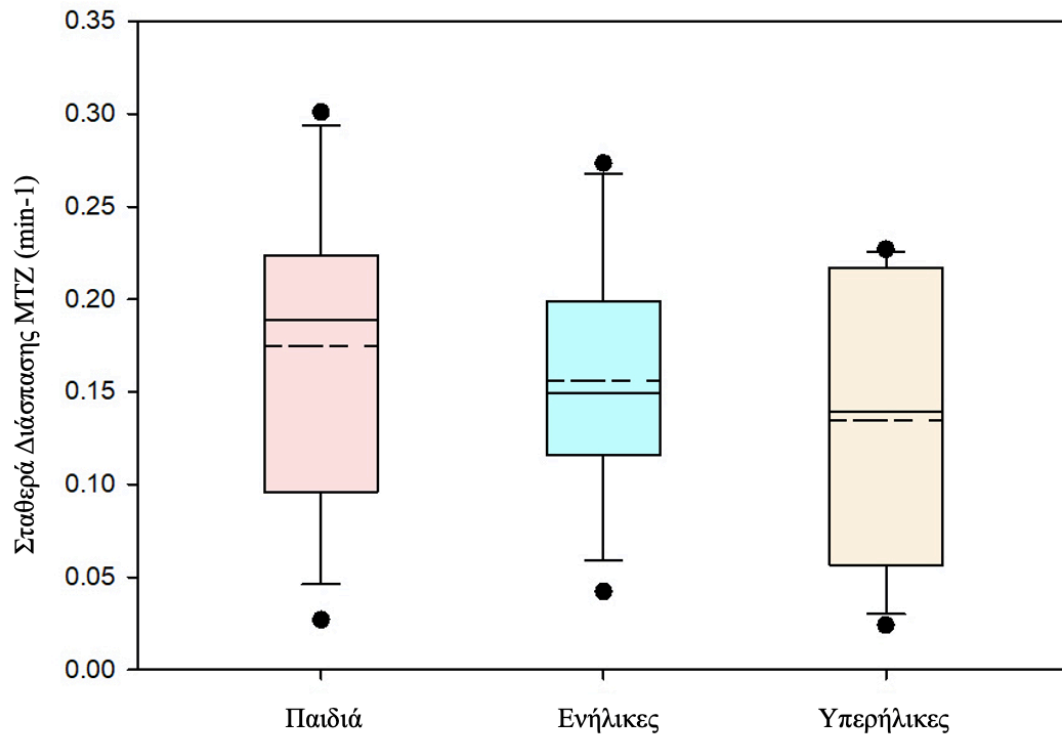
Στον Πίνακα Γ.3 συνοψίζονται οι μέσες τιμές της σταθερών των ρυθμών αποικοδόμησης καθώς οι μέσες τιμές του χρόνου ημίσειας ζωής της μετρονιδαζολής στο υλικό από κόπρανα όλων των εθελοντών από κάθε πληθυσμιακή ομάδα.

	Αριθμός εθελοντών (n)	Ηλικία (Εύρος)	Σταθερά Διάσπασης (min-1) Μέση τιμή ± SD	Χρόνος Ημιζωής (min) Μέση τιμή ±SD
Παιδιά	12	3-8,5 ετών	0,175 ± 0,086	6,09 ± 6,49
Ενήλικες	12	19-55 ετών	0,156 ± 0,066	5,527 ± 3,68
Υπερήλικες	12	65-91 ετών	0,135 ± 0,076	8,53 ± 7,76

Πίνακας Γ.3: Εύρος ηλικίας, μέση τιμή των τιμών σταθεράς του ρυθμού βακτηριακής αποικοδόμησης (τυπικό σφάλμα), μέση τιμή χρόνου ημίσειας ζωής(τυπικό σφάλμα) της μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα 12 παιδιών, 12 ενηλίκων και 12 υπερηλίκων.

Σε ό,τι αφορά τη μετρονιδαζόλη δεν ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών πληθυσμιακών ομάδων ($P=0,430$). Ωστόσο, η ισχύς της στατιστικής σημασίας ήταν χαμηλή ($p=0,049$).

Στο Σχήμα Γ.5 συγκρίνονται οι τιμές της σταθεράς διάσπασης της μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα 12 παιδιών, 12 ενηλίκων και 12 υπερηλίκων.



Σχήμα Γ5: Θηκογράμματα τιμών σταθεράς διάσπασης της μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα παιδιών (n=12), ενηλίκων (n=12) και υπερηλίκων (n=12)

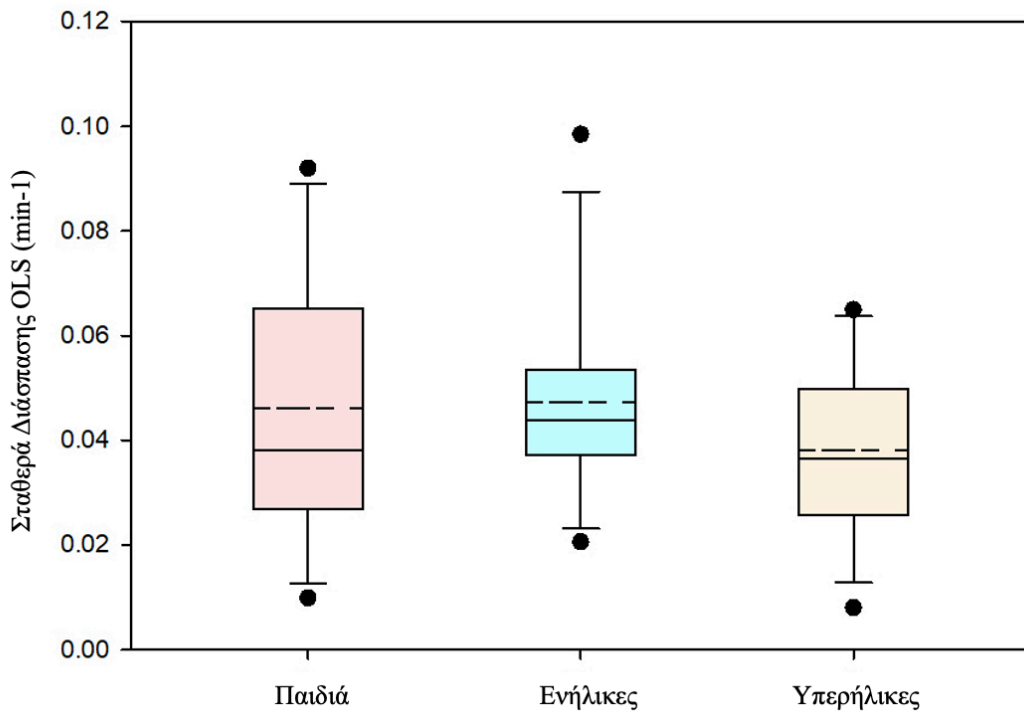
Στον Πίνακα Γ.4 συνοψίζονται οι μέσες τιμές της σταθερών των ρυθμών αποικοδόμησης καθώς οι μέσες τιμές του χρόνου ημίσειας ζωής της ολσαλαζίνης στο υλικό από κόπρανα όλων των εθελοντών από κάθε πληθυσμιακή ομάδα.

	Αριθμός εθελοντών (n)	Ηλικία (Εύρος)	Σταθερά Διάσπασης (min-1) Μέση τιμή ± SD	Χρόνος Ημιζωής (min) Μέση τιμή ±SD
Παιδιά	12	3-8,5 ετών	0,046 ± 0,025	21,88 ± 17,32
Ενήλικες	12	19-55 ετών	0,047 ± 0,019	16,81 ± 6,755
Υπερήλικες	12	65-91 ετών	0,038 ± 0,016	24,43 ± 20,46

Πίνακας Γ.4: Εύρος ηλικίας, μέση τιμή των τιμών σταθεράς του ρυθμού βακτηριακής αποικοδόμησης (τυπικό σφάλμα), μέση τιμή χρόνου ημίσειας ζωής(τυπικό σφάλμα) της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα 12 παιδιών, 12 ενηλίκων και 12 υπερηλίκων.

Όπως και στη μετρονιδαζόλη, έτσι και στην ολσαλαζίνη, δεν ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών πληθυσμιακών ομάδων ($P=0,509$). Ωστόσο, η ισχύς της στατιστικής σημασίας ήταν χαμηλή ($p=0,049$).

Στο Σχήμα Γ.6 συγκρίνονται οι τιμές της σταθεράς διάσπασης της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα 12 παιδιών, 12 ενηλίκων και 12 υπερηλίκων.



Σχήμα Γ.6: Θηκογράμματα τιμών σταθεράς διάσπασης της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα παιδιών (n=12), ενηλίκων (n=12) και υπερηλίκων (n=12)

Ύστερα από τη σύγκριση των τιμών της σταθεράς διάσπασης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα που είχε συλλεχθεί από παιδιά, ενήλικες και υπερήλικες δεν παρουσίαζαν στατιστικώς σημαντική διαφορά. Επιπλέον, με βάση τα παραπάνω θηκογράμματα των τιμών σταθεράς διάσπασης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα παρατηρείται μία μειωμένη ενδοατομική μεταβλητότητα στη βακτηριακή αποικοδόμηση της ολσαλαζίνης στο υλικό κοπράνων ενηλίκων κάτι, το οποίο δεν φαίνεται στους υπόλοιπους δύο πληθυσμούς.

Το ανθρώπινο μικροβίωμα υφίσταται εναλλαγές στο φορτίο των βακτηρίων τόσο σε αριθμό όσο και σε ποικιλία κατά τη πάροδο του χρόνου. Αναλυτικότερα, ο μικροβίωμα ενός μέσου υγιούς παιδιού εμφανίζει χαμηλότερα επίπεδα Bacteroidetes (συμπεριλαμβανομένων των Bacteroides) και υψηλότερα επίπεδα Firmicutes και Actinobacteria (π.χ Bifidobacteria). Αντίθετα, σε ένα μέσο υπερήλικα σε σχέση με μέσο έναν μέσο ενήλικα παρατηρούνται μειώσεις στους πληθυσμούς των Bacteroidetes (συμπεριλαμβανομένων των Bacteroides) και των Actinobacteria (π.χ Bifidobacteria). Παρατηρούνται επίσης εναλλαγές ορισμένων βακτηριακών πληθυσμών, όπως μειώσεις

των Lactobacillus και Enterococci και αυξήσεις των Clostridia, που ανήκουν στα Firmicutes αλλά και αυξήσεις των Proteobacteria.

Η ενεργότητα της νιτροαναγωγής παρουσιάζεται στα βακτήρια Enterobacteria (π.χ. Escherichia Coli), Clostridia, Bacteroides και σε είδη Lactobacillus ενώ η ενεργότητα της αζοαναγωγής παρουσιάζεται στα βακτήρια Eubacteria, Clostridia, Bacteroides, στο είδος Enterococcus Fecalis καθώς και σε μερικά είδη Lactobacillus (λιγότερο συχνά)(Karatza et al. 2016).

Με βάση τις δύο παραπάνω παραγράφους και τα αποτελέσματα της διπλωματικής αυτής εργασίας καταλήγουμε πως η βακτηριακή διάσπαση της μετρονιδαζόλης, η οποία οφείλεται στο ένζυμο νιτροαναγωγής καθώς αντίστοιχα και η βακτηριακή διάσπαση της ολσαλαζίνης, η οποία οφείλεται στο ένζυμο αζοαναγωγής, δεν επηρεάζεται από την ηλικία, καθώς από τη παιδική ηλικία μέχρι το γήρας, υπάρχουν εναλλαγές σε κυρίαρχα βακτηριακά είδη που εκφράζουν τα ένζυμα αυτά. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία η οποία αναφέρει πως ανάμεσα στη δραστηριότητα 9 ενζύμων((α-γαλακτοσιδάση, β γαλακτοσιδάση, β-γλυκοσιδάση, β-γλυκουρονιδάση, N-ακετυλογαλακταμινιδάση, α-φουκοσιδάση, νευραμινιδάση, νιτροαναγωγής και αζοαναγωγής), η αζοαναγωγής και η νιτροαναγωγής δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα παιδιά, στους ενήλικες και τους υπερήλικες(Andrieux et al. 2002).

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αναφορικά με το πρώτο στόχο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, οι σταθερές του ρυθμού αποικοδόμησης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα σε υλικό από κόπρανα 6 υγιών εθελοντών ηλικίας >65 ετών δεν παρουσίασαν στατιστικών σημαντική διαφορά από τις σταθερές του ρυθμού αποικοδόμησης σε υλικό από κόπρανα άλλων 6 υγιών εθελοντών ηλικίας >65 ετών παλαιότερης μελέτης (Γκόλφη 2017).

Ως προς το δεύτερο στόχο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, με βάση τα χαρακτηριστικά της σταθεράς διάσπασης της μετρονιδαζόλης και της ολσαλαζίνης που συνοψίστηκαν στη παρούσα διπλωματική εργασία, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη βακτηριακή ενεργότητα των κοπράνων μεταξύ των παιδιών (Ρωμανός 2017, Ρωμανός 2019), των ενηλίκων (Karatza *et al.* 2016, Γκόλφη 2020) και των υπερηλίκων (Γκόλφη 2017, παρούσα διπλωματική).

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Διεθνή Βιβλιογραφία:

Agans R., Rigsbee L., Kenche H., Michail S., Khamis HJ., Paliy O., Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults, *FEMS Microbiol Ecol*, **77** 404–12 (2011)

Albesharat R., Ehrmann M., Korakli M., Yazaji S., Vogel RF., Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies, *Syst Appl Microbiol* **34** 148–55 (2011)

Andrieux C., Membre J., Cayuela C., Antoine J., Metabolic characteristics of the faecal microflora in humans from three age groups, *Scand J Gastroenterol*, **37** 792–8 (2002)

De Angelis M., Piccolo M., Vannini L., Siragusa S., De Giacomo A., Serrazanetti D., Fecal Microbiota and Metabolome of Children with Autism and Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified. *PLoS One*. **8** 1–18 (2013)

Arbolea S., Binetti A., Salazar N., Fernández N., Solís G., Hernández-Barranco A., et al. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol Ecol*. **79** 763–72 (2012)

Arrieta M., Stiemsma L., Amenyogbe N., Brown E., Finlay B., The intestinal microbiome in early life: Health and disease. *Front Immunol*, **5** 1–19 (2014)

Biagi E., Nylund L., Candela M., Ostan R., Bucci L., Pini E., et al. Through ageing, and beyond: Gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One*, **5** (2010)

Björkholm B., Bok C., Lundin A., Rafter J., Hibberd M., Pettersson S., Intestinal microbiota regulate xenobiotic metabolism in the liver. *PLoS One*, **4** (2009)

Claesson M., Cusack S., O’Sullivan O., Greene-Diniz R., De Weerd H., Flannery E., Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108** 4586–91 (2011)

Claesson M., Jeffery I., Conde S., Power S., O’connor E., Cusack S., Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*. **488** 178–84. (2012)

Donaldson G., Lee S., Mazmanian SK., Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*. **14** 20–32 (2015)

Enck P., Zimmermann K., Rusch K., Schwiertz A., Klosterhalfen S., Frick J., The effects of ageing on the colonic bacterial microflora in adults. *Z Gastroenterol* ,**47** 653–8 (2009)

Faith J., Guruge J., Charbonneau M., Subramanian S., Seedorf H., Goodman A., The long-term stability of the human gut microbiota. *Science* **341** (2013)

Gabrielli O., Zampini L., Galeazzi T., Padella L., Santoro L., Peila C., Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics*.**128** (2011)

Grzeškowiak Ł., Sales Teixeira T., Bigonha S., Lobo G., Salminen S., Ferreira CL de LF. Gut Bifidobacterium microbiota in one-month-old Brazilian newborns. *Anaerobe* **35** 54–8. (2015)

Haller D. The gut microbiome in health and disease. *The Gut Microbiome in Health and Disease*. 1–356 p. (2018)

Hansen C., Nielsen D., Kverka M., Zakostelska Z., Klimesova K., Hudcovic T., Patterns of early gut colonization shape future immune responses of the host. *PLoS One*, **7** 1–7. (2012)

Hollister E., Riehle K., Luna R., Weidler E., Rubio-Gonzales M., Mistretta T., Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome*, **3** 36. (2015)

Hopkins M.J., Sharp R., Macfarlane. G.T., Variation in Human Intestinal Microbiota with Age. *Digestive and Liver Disease* **34** 12-18 (2002)

Islam K., Fukiya S., Hagio M, Fujii N., Ishizuka S., Ooka T., Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology*, **141** 1773–81 (2011)

Jourova L., Anzenbacher P., Anzenbacherova E., Human gut microbiota plays a role in the metabolism of drugs. *Biomed Pap.*,**160** 317–26 (2016)

Kaddurah-Daouk R., Baillie R., Zhu H., Zeng Z., Wiest M., Nguyen U., Enteric microbiome metabolites correlate with response to simvastatin treatment. *PLoS One.*, **6**. (2011)

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** 237–41(2017)

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** 3458–61 (2016)

Lewis S., Heaton K., Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol*, **32** 920–4 (1997)

Martin R., Makino H., Yavuz A., Ben-Amor K., Roelofs M., Ishikawa E., Early-Life events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota, *PLoS One*.**11** 1–30 (2016)

Matamoros S., Gras-Leguen C., Le Vacon F., Potel G., De La Cochetiere M. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol*, **21** 167–73 (2013)

Maukonen J., Saarela M., Human gut microbiota: Does diet matter? *Proc Nutr Soc*,**74** 23–36 (2015)

Mikov M. The metabolism of drugs by the gut flora. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*.**19** 201–7 (1994)

Van Nimwegen F., Penders J., Stobberingh E., Postma D., Koppelman G., Kerkhof M., Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol*. **128** 948-955 (2011)

Novel G., Didier Fichet M., Stoeber F., Inducibility of β glucuronidase in wild type and hexuronate negative mutants of *Escherichia coli* K 12, *J Bacteriol*. **120** 89–95 (1974)

O’Toole P., Claesson M., Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly, *Int Dairy J*. **20** 281–91 (2010)

Odamaki T., Kato K., Sugahara H., Hashikura N., Takahashi S., Xiao J., Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: A cross-sectional study. *BMC Microbiol*, **16** 1–13 (2016)

Penders J., Thijs C., Vink C., Stelma F., Snijders B., Kummeling I., Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, **118** 511–21 (2006)

Reddy B., Wynder E., Fecal Profiles of Anaerobic Microflora of Large Bowel Cancer Patients and Patients with Nonhereditary Large Bowel Polyps. *Cancer Res*, **38** 4458–62 (1978)

Di Sabatino A., Lenti M., Cammalleri L., Corazza G., Pilotto A., Frailty and the gut. *Dig Liver Dis*, **50** 533–41 (2018)

Sekirov I., Russell S., Caetano M Antunes L., Finlay B., Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*, **90** 859–904 (2010)

Shamat M.A., The role of the gastrointestinal microflora in the metabolism of drugs. *Int J Pharm.* 971–13 (1993)

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)

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** 3171–5 (2014)

Spanogiannopoulos P., Bess E.N., Carmody R.N., Turnbaugh P.J. The microbial pharmacists within us: A metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Nat Rev Microbiol.***14** 273–87 (2016)

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** 200–6 (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** 81–6 (2011)

Wallace B.D., Wang H., Lane K.T., Scott J.E., Orans J., Koo J.S., Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science* **330** 831–5 (2010)

Wikoff W.R., Anfora A.T, Liu J., Schultz P.G., Lesley S.A., Peters E.C., Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106** 3698–703 (2009)

Woodmansey E., McMurdo M., Macfarlane G., Macfarlane S., Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects. *Appl Environ Microbiol.* **70** 6113–22 (2004)

Wu G., Chen J., Hoffmann C., Bittinger K., Chen Y., Keilbaugh S., Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* (80-) **334** 105–8 (2011)

Yadav V., Gaisford S., Merchant H., Basit A., Colonic bacterial metabolism of corticosteroids. *Int J Pharm* **457** 268–74 (2013)

Yatsunenکو T., Rey F., Manary M., Trehan I., Dominguez-Bello M., Contreras M., Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. **486** 222–7 (2012)

Zhang J., Zhang J., Wang R., Gut microbiota modulates drug pharmacokinetics. *Drug Metab Rev*, **50** 357–68. (2018)

Ελληνική Βιβλιογραφία:

Γκόλφη Ε., Εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων σε υλικό από κόπρανα υπερηλίκων, Πτυχιακή Εργασία, ΕΚΠΑ (2017)

Γκόλφη Ε., Αξιολόγηση της δυνατότητας ανάπτυξης προϊόντος τροποποιημένης αποδέσμευσης του συνδυασμού δραστικών ουσιών Α και διερεύνηση της βακτηριακής ενεργότητας υλικού από κόπρανα ενηλίκων, Διπλωματική Εργασία, ΕΚΠΑ (2020)

Ρωμανός Ι., Εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων σε υλικό από κόπρανα παιδιών σχολικής ηλικίας, Πτυχιακή εργασία, ΕΚΠΑ (2017)

Ρωμανός Ι., Συμβολή στη βελτιστοποίηση της γαστρεντερικής απορρόφησης φαρμάκων που χορηγούνται per os σε νήπια, Διπλωματική εργασία, ΕΚΠΑ (2019)

ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Αναλυτικές Τεχνικές

Μετρονιδαζόλη

Χρωματογραφικές Συνθήκες

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της μετρονιδαζόλης, εφαρμόστηκε μέθοδος ανάλυσης HPLC που παρουσιάζεται στο πίνακα ΠΙ.1:

Πίνακας ΠΙ.1: Χρωματογραφικές συνθήκες ανάλυσης μετρονιδαζόλης.

Στήλη	Fortis TM C18 (150 × 3mm, 5μm)
Προστήλη	Hypersil BDS- C18 (10 mm × 4nm 5μm)
Ταχύτητα Ροής	0.5 mL/min
Μήκος Κύματος	318 nm
Όγκος Ένεσης	50 μL
Θερμοκρασία	Δωματίου
Κινητή Φάση	H ₂ O : Ακετονιτρίλιο : Μυρμηκικό Οξύ (90%: 10%: 0,1 % v/v/v)
Διάλυμα Έκπλυσης	H ₂ O: Ακετονιτρίλιο (90:10 v/v)
Χρόνος Ανάσχεσης	5 min

Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης

Ζυγίζονται 10 mg μετρονιδαζόλης σε αναλυτικό ζυγό και μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Προστίθεται όγκος νερού βαθμού καθαρότητας HPLC και η φιάλη τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων. Τέλος, συμπληρώνεται όγκος νερού μέχρι τη χαραγή. Το τελικό διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 100 μg/mL.

Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

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

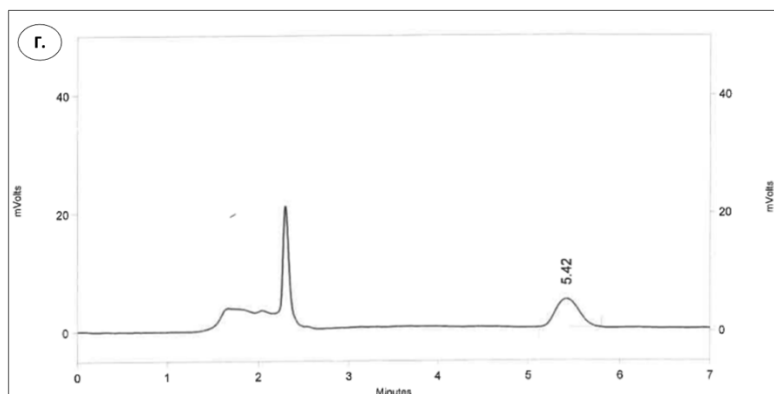
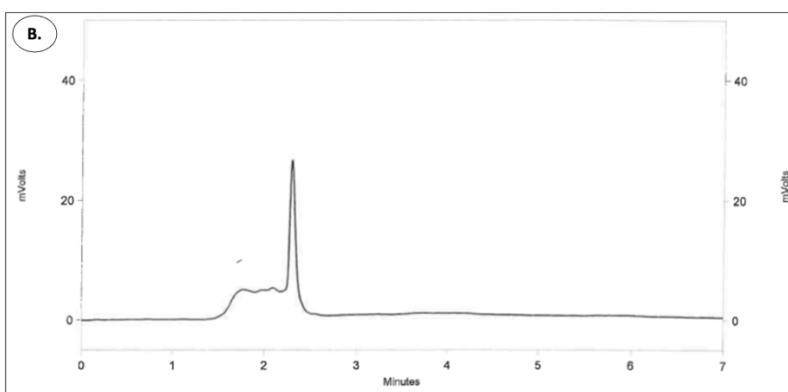
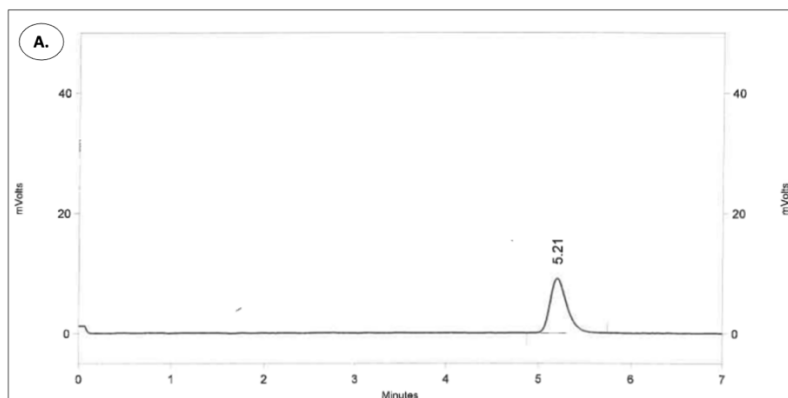
Πιο συγκεκριμένα, 100 μL από το διάλυμα παρακαταθήκης (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και 900 μL κινητής φάσης μεταφέρθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο HPLC και με ανάδευση σε συσκευή περιδίνησης προέκυψε διάλυμα συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Σε 100 μL από το διάλυμα εργασίας (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) προστέθηκαν 900 μL κινητής φάσης και μετά από ανάδευση προέκυψε το διάλυμα εργασίας, το οποίο είχε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν από το διάλυμα εργασίας (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) σύμφωνα με τον πίνακα ΠΙ.2.

Πίνακας ΠΙ.2:: Συγκέντρωση προτύπων διαλυμάτων μετρονιδαζόλης για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.

Συγκέντρωση Μετρονιδαζόλης ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Όγκος διαλύματος εργασίας Μετρονιδαζόλης (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (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
0,2	200	800
0,3	300	700

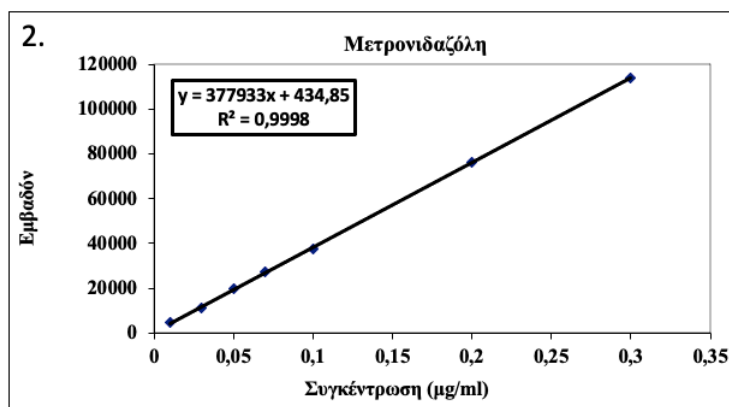
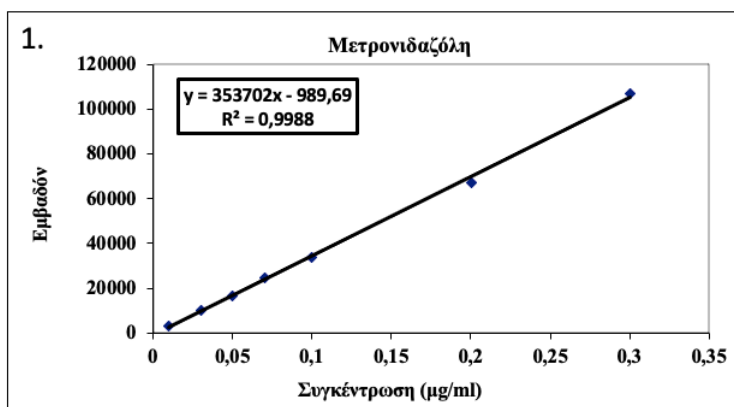
Στο σχήμα ΠΙ.1 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος μετρονιδαζόλης (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) σε κινητή φάση, δείγματος υλικού από κόπρανα υπερήλικα πριν τη προσθήκη μετρονιδαζόλης (λευκό δείγμα εθελοντής 3) και δείγματος υλικού από κόπρανα (εθελοντής 3) 5 min μετά την προσθήκη μετρονιδαζόλης. Στο πίνακα ΠΙ.3 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς της μετρονιδαζόλης σε κινητή φάση και στο Σχήμα ΠΙ.1 παρουσιάζονται οι αντίστοιχες διαγραμματικές απεικονίσεις.



Σχήμα Π.Ι.1:Α:Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μετρονιδαζόλης (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) σε κινητή φάση. **Β:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα λευκού δείγματος υλικού από κόπρανα (εθελοντής 3). **Γ:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης μετρονιδαζόλης σε υλικό από κόπρανα (εθελοντής 3) 5 min μετά την έναρξη του πειράματος. Η κορυφή στα 5.42 min αντιστοιχεί στη μετρονιδαζόλη.

Πίνακας Π.Ι.3 : Χαρακτηριστικά καμπυλών αναφοράς της μετρονιδαζόλης σε κινητή φάση

Εύρος Συγκεντρώσεων (μg/ml)	Εργαστηριακή Μέρα	Κλίση±SE	Τομή±SE	Συντελεστής Προσδιορισμού (R ²)	Αριθμός Πειραματικών Σημείων
0.01-0.3	A.	353702±798	-989,69±5480	0,9988	6
0.01-0.3	B.	377933±338	434,85±2321	0,9998	6



Σχήμα. Π.Ι.2.: Καμπύλες αναφοράς μετρονιδαζόλης σε κινητή φάση

Ολσαλαζίνη

Χρωματογραφικές Συνθήκες

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ολσαλαζίνης, εφαρμόστηκε μέθοδος ανάλυσης HPLC που παρουσιάζεται στο πίνακα Π.Ι.4:

Πίνακας Π.Ι.4: Χρωματογραφικές συνθήκες ανάλυσης ολσαλαζίνης

Στήλη	Fortis TM C18 (150 × 3mm, 5μm)
Προστήλη	Hypersil BDS- C18 (10 mm × 4nm 5μm)
Ταχύτητα Ροής	0,5 mL/min
Μήκος Κύματος	365 nm
Όγκος Ένεσης	50 μL
Θερμοκρασία	Δωματίου
Κινητή Φάση	H ₂ O : Ακετονιτρίλιο : Τριφθορικό Οξύ (55%: 45%: 0,01 % v/v/v)
Διάλυμα Έκπλυσης	H ₂ O: Ακετονιτρίλιο (90:10 v/v)
Χρόνος Ανάσχεσης	9 min

Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης ολσαλαζίνης.

Ζυγίζονται 10 mg ολσαλαζίνης σε αναλυτικό ζυγό και μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Προστίθεται όγκος απιονισμένου νερού και η φιάλη τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων. Τέλος, συμπληρώνεται όγκος νερού καθαρότητας HPLC μέχρι τη χαραγή. Το τελικό διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 100 μg/mL.

Κατασκευή καμπύλης αναφοράς.

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

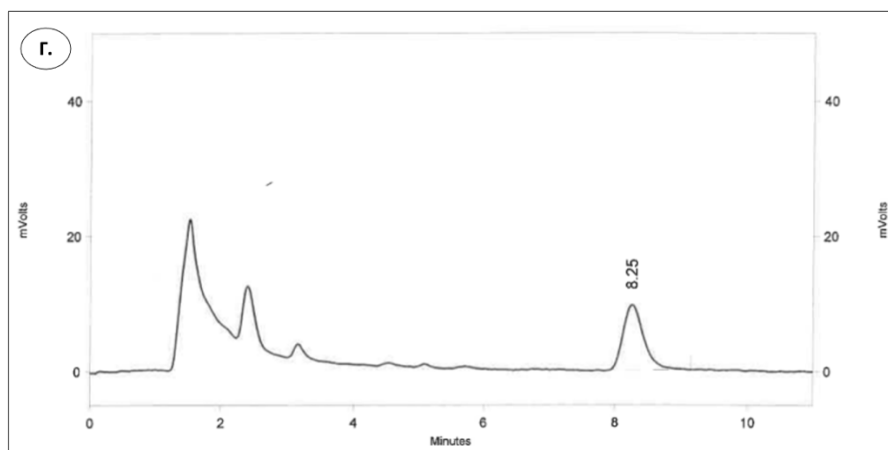
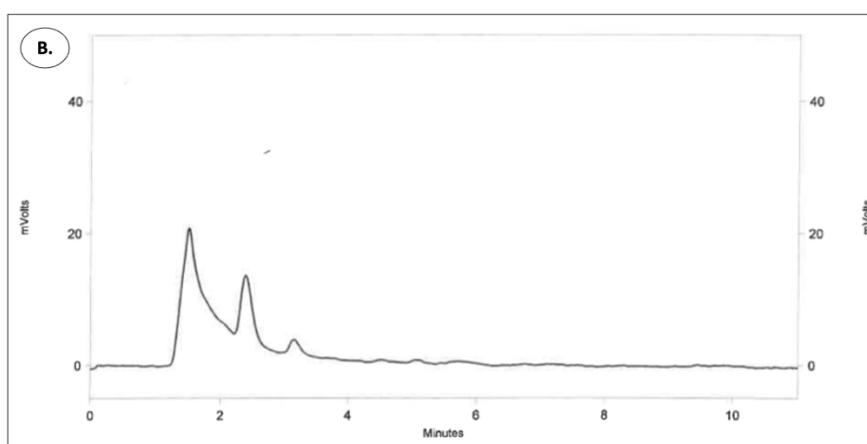
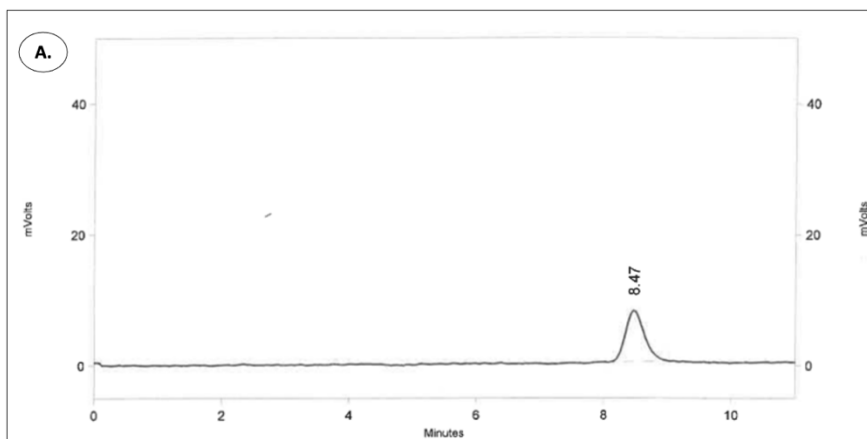
Πιο συγκεκριμένα, 100 mL από το διάλυμα παρακαταθήκης (100 µg/mL) και 900 µL κινητής φάσης μεταφέρθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο HPLC και με ανάδευση σε συσκευή περιδίνησης προέκυψε διάλυμα συγκέντρωσης 10 µg/mL. Σε 100 µL από το διάλυμα εργασίας (10 µg/mL) προστέθηκαν 900 µL κινητής φάσης και μετά από ανάδευση προέκυψε το διάλυμα εργασίας, το οποίο είχε συγκέντρωση 1 µg/mL.

Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν από το διάλυμα εργασίας (1µg/mL) σύμφωνα με τον πίνακα Π.Ι.3.

Πίνακας Π.Ι.3: Συγκέντρωση προτύπων διαλυμάτων μετρονιδαζόλης για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.

Συγκέντρωση Ολσαλαζίνης (µg/mL)	Όγκος διαλύματος εργασίας Ολσαλαζίνης (1µg/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

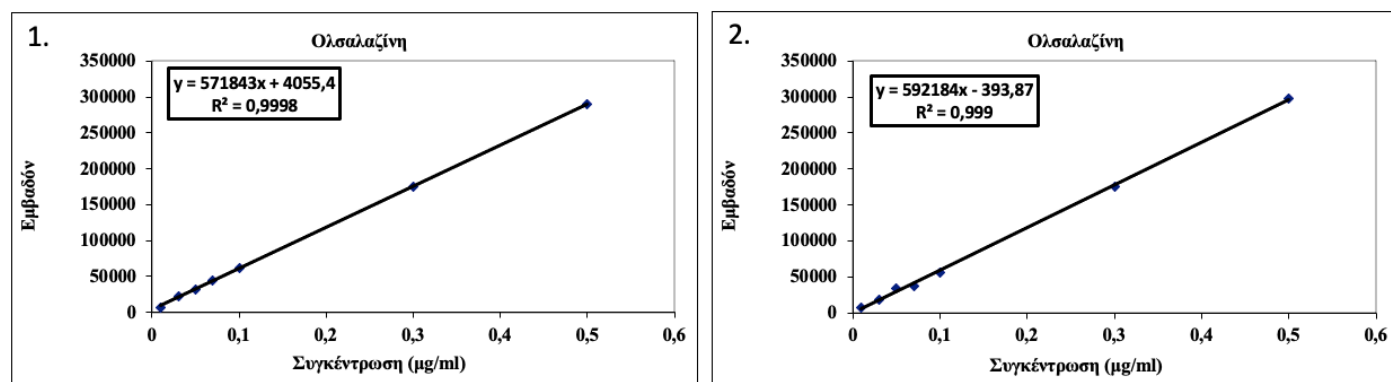
Στο σχήμα Π.Ι.3 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος ολσαλαζίνης (0,1 µg/mL) σε κινητή φάση, δείγματος υλικού από κόπρανα υπερήλικα πριν τη προσθήκη ολσαλαζίνης (λευκό δείγμα εθελοντής 3) και δείγματος υλικού από κόπρανα (εθελοντής 3) 10 min μετά την προσθήκη ολσαλαζίνης. Στον πίνακα Π.Ι.4 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς της ολσαλαζίνης σε κινητή φάση και στο Σχήμα Π.Ι.3 παρουσιάζονται οι αντίστοιχες διαγραμματικές απεικονίσεις.



Σχήμα. Π.1.3: **A:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος ολσαλαζίνης (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) σε κινητή φάση. **B:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα λευκού δείγματος υλικού από κόπρανα (εθελοντής 3) **Γ:** Ενδεικτικό χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ολσαλαζίνης σε υλικό από κόπρανα (εθελοντής 3) 10 min από την έναρξη του πειράματος.

Πίνακας Π.Ι.4: Χαρακτηριστικά καμπυλών αναφοράς ολσαλαζίνης σε κινητή φάση

Εύρος Συγκεντρώσεων (μg/ml)	Εργαστηριακή Μέρα	Κλίση±SE	Τομή±SE	Συντελεστής Προσδιορισμού (R ²)	Αριθμός Πειραματικών Σημείων
0.01-0.5	1.	571843±816	-989,69±3608	0,9998	7
0.01-0.5	2.	592184±1902	434,85±8407	0,999	7



Σχήμα Π.Ι.4: Καμπύλες αναφοράς ολσαλαζίνης σε κινητή φάση

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Άδεια από την Επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημίου για τη διεξαγωγή της κλινικής μελέτης.

Αθήνα, 25-6-2019

Προς τη Γραμματεία του Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Θέμα: Έγκριση πρωτοκόλλου παραματισμού

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 Κουρούνακη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια



Νικόλαος Δρακούλης, Αναπληρωτής Καθηγητής



Νεκτάριος Αλιγιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής



Μαρία, Χαλαμπαλάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Ερωτηματολόγιο που απαντήθηκε από τους εθελοντές



Εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων
σε υλικό από κόπρανα υπερηλίκων εθελοντών

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

Παρατηρήσεις

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Δήλωση συγκατάθεσης εθελοντών



**Εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων σε υλικό από
κόπρανα υπερηλίκων**

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

Ερευνητική Ομάδα

Χρήστος Ρέππας, Ph. D., Καθηγητής

Μαρία Βερτζώνη, Ph.D., Επίκουρη Καθηγήτρια

Δημήτρης Σκαβάτσος, Μεταπτυχιακός Φοιτητής, 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 διασπάσουν 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 >65 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 οιοπνευματώδη 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

Χρήστος Ρέππας (Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)

Τηλέφωνο: 210 727 4678, 693 71 79 155

Email: reppas@pharm.uoa.gr

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

Τηλέφωνο: 210 727 4445, 693 71 98 260

Email: vertzoni@pharm.uoa.gr

**Εκτίμηση της βακτηριακής αποικοδόμησης φαρμάκων σε υλικό από
κόπρανα υπερηλίκων**

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. Κατανοώ, 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. Κατανοώ 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. Κατανοώ ότι το παρόν έγγραφο υπογράφεται εις διπλούν. Ένα έγγραφο θα δοθεί στον εθελοντή και ένα έγγραφο θα κρατηθεί από τον επιστημονικό υπεύθυνο (Ε.Υ.) της μελέτης για το Ε.Κ.Π.Α (Χ. Ρέππας).	<input type="checkbox"/>

Όνοματεπώνυμο εθελοντή

Ημερομηνία & Υπογραφή

Όνοματεπώνυμο Μάρτυρα








Ημερομηνία & Υπογραφή

Χρήστος Ρέππας

Ημερομηνία & Υπογραφή

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Π.Ι. Πίνακας κλίμακας Bristol για κόπρανα

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

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

Φύλλο καταγραφής γευμάτων των εθελοντών από τους οποίους συλλέχθηκαν τα κόπρανα

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

Όνοματεπώνυμο -----

Τηλέφωνο -----

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








ΓΕΥΜΑΤΑ

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

ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

	Ωρα	Τύπος
Ημέρα -3 Ημερομηνία -- - - - -	----- ----- ----- -----	----- ----- ----- -----
Ημέρα -2 Ημερομηνία -- - - - -	----- ----- ----- -----	----- ----- ----- -----
Ημέρα -1 Ημερομηνία -- - - - -	----- ----- ----- -----	----- ----- ----- -----

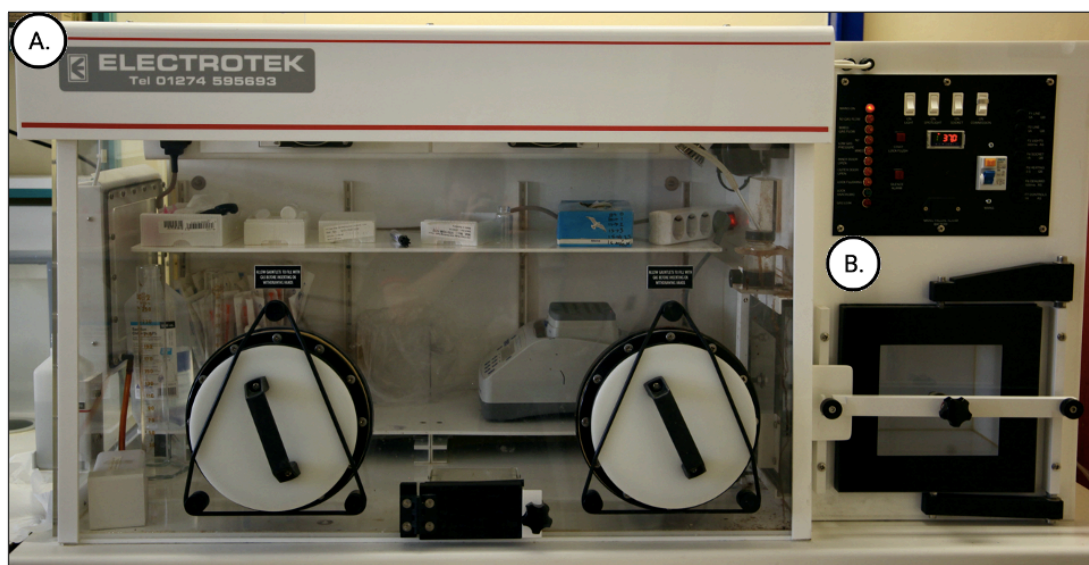
Εικόνα 1: Κλίμακα Bristol για τους Τύπους κοπράνων.

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

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI

Συνθήκες και έλεγχος καλής λειτουργίας αναερόβιου θαλάμου που χρησιμοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας.

Στο Σχήμα ΠVI.1 παρουσιάζεται ο αναερόβιος θάλαμος (Σχήμα ΠVI 1A). Δίπλα από τον αναερόβιο θάλαμο βρίσκεται ένας προθάλαμος (Σχήμα ΠVI.1B) μέσα στον οποίο τοποθετούνται τα αντικείμενα πριν εισέλθουν εντός του αναεροβίου θαλάμου.



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

Οι συνθήκες οι οποίες πρέπει να επικρατούν μέσα στον αναερόβιο θάλαμο είναι (Vertzoni et al. 2011, Tannergen et al. 2014, Sousa et al. 2014):

- Θερμοκρασία 37 °C.
- Σχετική υγρασία 70%.
- Ατμόσφαιρα από 80% v/v N₂, 10% v/v H₂ και 10% v/v CO₂.

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 (duran) που τοποθετείται στο μπροστινό μέρος και στη δεξιά γωνία του θαλάμου. Το μίγμα των αερίων που κυκλοφορεί εντός του αναερόβιου θαλάμου

διοχετεύεται στον περιέκτη μέσω μίας μικρής αντλίας. Με την ύπαρξη οξυγόνου, ο δείκτης αυτός αποκτά κυανό χρώμα, ενώ απουσία του, διατηρεί διαυγές χρώμα.

Παρασκευή Δείκτη για τον αναερόβιο θάλαμο:

Για την παρασκευή του δείκτη χρησιμοποιούνται τα Διαλύματα 1 και 2 σε αναλογία 9:1. Πιο συγκεκριμένα:

Διάλυμα 1

Για τη παρασκευή του Διαλύματος 1, ζυγίζονται 50 g NaHCO_3 και μεταφέρονται ποσοτικά με τη βοήθεια μίας ογκομετρικής φιάλης των 500 mL. Στην ογκομετρική φιάλη προστίθεται νερό και η φιάλη τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων προκειμένου να διαλυθεί το NaHCO_3 .

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 100 mL. Στη συνέχεια, ζυγίζονται 20 g γλυκόζης, τα οποία επίσης προστίθενται στην ογκομετρική φιάλη με νερό. Η φιάλη τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων προκειμένου να διαλυθεί η γλυκόζη.

Για την παρασκευή του δείκτη, σε υάλινο περιέκτη των 100 mL αναμιγνύονται 45 mL από το Διάλυμα 1 και 5 mL από το Διάλυμα 2. Μεταφέρονται 45 mL διαλύματος NaHCO_3 σε μία ογκομετρική φιάλη 50 mL. Ακολουθεί θέρμανση και μαγνητική ανάδευση του προκύπτοντος διαλύματος μέχρι να απομακρυνθεί το οξυγόνο που περιέχεται στο διάλυμα και να προκύψει άχρωμο διάλυμα. Τέλος, το καπάκι του υάλινου περιέκτη κλείνεται καλά και μεταφέρεται στον αναερόβιο θάλαμο.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII

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

Στο πίνακα ΠVII.1. παρουσιάζονται τα δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης σε υλικό από κόπρανα της μετρονιδαζόλης σε κάθε εθελοντή.

Πίνακας ΠVII.1: Δεδομένα αποικοδόμησης για του εθελοντές 1-6

Χρόνος (min)	Ποσοστό μετρονιδαζόλης που παρέμεινε στο υλικό από κόπρανα (%)							
	2LDR#1	2LDR#2	2LDR#3	2LDR#4	2LDR#5	2LDR#6	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση
0	100	100	100	100	100	100	100,00	-
5	38,12	38,78	75,71	36,94	44,66	54,10	48,05	14,97
10	3,08	7,88	66,19	8,66	17,20	24,62	21,27	23,30
15	0,55	0,41	49,71	0,00	4,99	10,60	11,04	19,38
20	0,00	0,00	42,24	0,00	0,00	3,32	7,59	17,03
30	0,00	0,00	24,89	0,00	0,00	0,00	4,15	10,16
45	0,00	0,00	14,27	0,00	0,00	0,00	2,38	5,82
60	0,00	0,00	7,54	0,00	0,00	0,00	1,26	3,08
90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Στο πίνακα ΠVII.2. παρουσιάζονται τα δεδομένα βακτηριακής αποικοδόμησης σε υλικό από κόπρανα της ολσαλαζίνης σε κάθε εθελοντή.

Πίνακας ΠVII.2: Δεδομένα αποικοδόμησης για του εθελοντές 1-6

Χρόνος (min)	Ποσοστό ολσαλαζίνης που παρέμεινε στο υλικό από κόπρανα (%)							
	2LDR#1	2LDR#2	2LDR#3	2LDR#4	2LDR#5	2LDR#6	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση
0	100	100	100	100	100	100	100	-
10	71,51	58,6	86,51	65,03	88,05	82,29	75,33	12,13
20	53,20	25,5	72,50	42,66	59,80	59,40	52,18	16,29
30	29,62	13,6	50,51	22,85	38,70	33,40	31,44	12,78
45	13,92	0,00	36,59	4,75	15,89	16,95	14,68	12,66
60	2,88	0,00	24,06	0,00	3,19	6,15	6,05	9,12
90	0,15	0,00	1,01	0,00	0,00	0,00	0,19	0,41
120	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00