ΜΕΛΑΤΟΝΙΝΗ, Η ΟΡΜΟΝΗ ΤΗΣ ΕΠΙΦΥΣΗΣ: ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΑΠΟ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΝΑΝΟΪΝΩΝ

Βλάχου Μ.[1], Κικιώνης Σ.[2], Σιαμίδη Α.[1],Τράγου Κ.[1], Καπότη Σ.[1], Ιωάννου Ε.[2], Ρούσσης Β.[2], Τσοτίνης Α.[3]

Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας[1], Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων[2], Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας[3], Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 15784 Αθήνα, Ελλάδα

e-mail: vlachou@pharm.uoa.gr

Περίληψη

Οι διαταραχές του κιρκαδιανού ρυθμού, που επηρεάζουν τον κύκλο ύπνου-αφύπνισης (CRSWDs), χαρακτηρίζονται από επίμονες ή επαναλαμβανόμενες μοτίβα διαταραχής του ύπνου, τα οποία σχετίζονται κυρίως με αλλοιώσεις του κιρκαδιανού συστήματος ή με την απώλεια συγχρονισμού μεταξύ του ενδογενούς κιρκαδιανού ρυθμού και των εξωγενών παραγόντων που επηρεάζουν το χρόνο ή τη διάρκεια του ύπνου. Η μελατονίνη είναι μία ορμόνη, η οποία βιοσυντίθενται και εκκρίνεται από τον αδένα της επίφυσης κατά τη διάρκεια της νύχτας και έχει βρεθεί ότι συγχρονίζει το βιολογικό ρολόι του οργανισμού όταν ευρίσκεται σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, η συγκέντρωση της ορμόνης στους ηλικιωμένους είναι κατά πολύ χαμηλότερη με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαταραχών του ύπνου. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, η ερευνητική μας ομάδα έχει ασχοληθεί με την παρασκευή στερεών φαρμακοτεχνολογικών μορφών της μελατονίνης, κατάλληλες για την αντιμετώπιση των προβλημάτων της έναρξης και/ή την ποιότητά του (Vlachou et al. 2015). Με στόχο την προσομοίωση του φυσιολογικού ρυθμού και ποσότητας αποδέσμευσης της μελατονίνης στον οργανισμό, παρασκευάστηκαν συστήματα νανοϊών με μελατονίνη, μέσω της διαδικασίας της ηλεκτροϊνοποίησης (Kikionis et al. 2015), τα οποία τοποθετήθηκαν σε κάψουλες σκληρής ζελατίνης. Η αποδέσμευση της μελατονίνης από τα εν λόγω συστήματα σε υδατικό μέσο με pH 1.2 είναι ταχύτατη, γεγονός το οποίο τα καθιστά κατάλληλα για την αντιμετώπιση προβλημάτων έναρξης του ύπνου. Μετά από αυτή την αυξημένη αρχική αποδέσμευση της μελατονίνης, σε pH 1.2, σημειώνεται επιβράδυνση (pH 6.8). Ο μειωμένος αυτός ρυθμός καθιστά τη συγκεκριμένη φαρμακοτεχνολογική μορφή ιδανική για χρήση σε καταστάσεις ασυνέχειας του ύπνου. Η αποδέσμευση της μελατονίνης από εντεροδιαλυτά καψάκια βρέθηκε ότι συντελεί στην αντιμετώπιση προβλημάτων όσον αφορά μόνο στη διάρκεια του ύπνου. Η αποδέσμευση της ορμόνης από καψάκια που περιείχαν τη μελατονίνη σε διπλάσια ποσότητα παρουσίασε υψηλότερο ρυθμό και στα δύο pH. Οι νανοΐνες που παρασκευάστηκαν μέσω της διαδικασίας της ηλεκτροϊνοποίησης βρέθηκαν ότι είναι κατάλληλα συστήματα μεταφοράς της μελατονίνης στον οργανισμό. *In vivo* μελέτες αποδέσμευσης της μελατονίνης με τη χρήση αυτών των καινοτόμων συστημάτων βρίσκονται ήδη σε εξέλιξη.

Λέξεις-Κλειδιά: Μελατονίνη, τροποποιημένη αποδέσμευση, νανοΐνες.

Abstract

Circadian rhythm sleep-wake disorders (CRSWDs) are characterized by persistent or recurrent patterns of sleep disturbance related primarily to alterations of the circadian rhythm system or the misalignment between the endogenous circadian rhythm and exogenous factors that affect the timing or duration of sleep. Melatonin, a hormone synthesized and secreted from the pineal gland at night, has been shown to synchronize the biological clock, when released in physiological concentrations. However, the hormone's concentration is drastically decreased in the elderly, resulting to sleep problems. During the last decade, we have sought to develop novel matrix tablets formulations of melatonin suitable for treating sleep onset and/or sleep maintenance dysfunctions (Vlachou et al. 2015). Aiming at mimicking the physiological release profile of melatonin, we now report on its aqueous dissolution (pH 1.2 and 6.8) from capsules filled with electrospun nanofibers (Kikionis et al. 2015) incorporating melatonin. The results from the *in vitro* release experiments, presented herein, suggest that at pH 1.2, melatonin is almost instantaneously released from hard gelatin capsules containing melatonin-loaded nanofibers, thus making these formulations suitable for promoting sleep onset. Melatonin's release after this initial burst becomes well regulated at pH 6.8, showing a dissolution profile capable of dealing with poor sleep maintenance. The release of melatonin from enteric coated capsules is suitable for addressing only sleep maintenance problems, whilst higher dose melatonin formulation systems showed faster dissolution rates at both pHs. The electrospun nanofibers were found to be suitable drug delivery systems for melatonin. *In vivo* studies, using these systems, are currently underway.

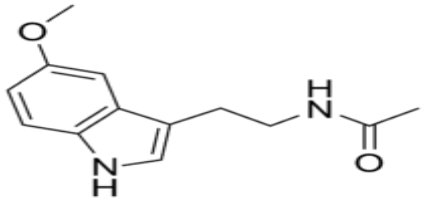
Key words: Melatonin, modified release, nanofibers.

1. Εισαγωγή

1.1 Μελατονίνη

Η μελατονίνη (MLT) (*N*-ακετυλο-5-μεθοξυθρυπταμίνη), η οποία αποτελεί ένα παράγωγο του απαραίτητου αμινοξέος θρυπτοφάνη, απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον αδένα της επίφυσης βοοειδών το 1958 (Tan et al. 2006). Σύμφωνα με μελέτες, η μελατονίνη είναι ένα αναπτυξιακά συντηρημένο μόριο, το οποίο συναντάται σε διαφορετικά είδη οργανισμών, όπως φύκη και θηλαστικά (Tan et al. 1993). Μεγάλες ποσότητες της μελατονίνης παράγονται κυρίως την επίφυση, αλλά και σε άλλες περιοχές του σώματος, όπως στα κύτταρα του μυελού των οστών, στα λεμφοκύτταρα, αλλά και σε όργανα, όπως ο γαστρεντερικός σωλήνας, το δέρμα και ο αμφιβληστροειδής χιτώνας. Σε αυτά, η έκκριση της μελατονίνης είναι ανεξάρτητη από τον κύκλο ημέρας-νύχτας, ενώ φαίνεται να ασκεί κυρίως περιφερειακές δράσεις (Tan et al. 2006, Srinivasan et al. 2008, Iriti et al. 2010).

Βλάχου Μ., Τράγου Κ.., Σιαμίδη Α., Κικιώνης Σ., Καπότη Σ., Ιωάννου Ε., Ρούσσης Β., Τσοτίνης Α.
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 15784 Αθήνα, Ελλάδα



Σχήμα 1: Χημική δομή της μελατονίνης

Η έκκριση της μελατονίνης από τον αδένα της επίφυσης ακολουθεί ένα κιρκαδιανό ρυθμό με περιοδικότητα περίπου 24 ωρών, ο οποίος ελέγχεται μέσω του υπερχιασματικού πυρήνα του πρόσθιου υποθαλάμου σε ανταπόκριση στις εναλλαγές ημεράς και νύχτας (Boutin et al. 2005, Mills et al. 2005, Malhotra et al. 2014, Touitou et al. 2017). Η παραγωγή και η έκκριση της νευρορμόνης είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την προσαρμογή του οργανισμού στον κύκλο φωτός-σκότους. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της ημέρας, ο υπερχιασματικός πυρήνας του εγκεφάλου λαμβάνει φωτεινά σήματα που εμποδίζουν την παραγωγή της μελατονίνης. Αντίθετα, τη νύχτα τα ένζυμα που καταλύουν τη σύνθεση της μελατονίνης ενεργοποιούνται από το σκότος και έτσι η επίφυση παράγει και εκκρίνει την ορμόνη σε αφθονία (Auld et al. 2016, Altun et al. 2007, Malhotra et al. 2014, Touitou et al.2017). Η παραγωγή της μελατονίνης από την επίφυση διατηρεί το εσωτερικό ρολόι του οργανισμού, υποδηλώνοντας κατά αυτό τον τρόπο πως η μελατονίνη είναι μια «χρονοβιοτική ορμόνη» υπεύθυνη για τον κύκλο ύπνου-αφύπνισης (Arendt et al. 2008, Malhotra et al. 2014).

Σε ότι αφορά τα θηλαστικά, η μελατονίνη ασκεί πολλές από τις φυσιολογικές της δράσεις συνδεόμενη στους μεμβρανικούς υποδοχείς MT1 και MT2 (Iriti et al. 2010). Συγκεκριμένα, η μελατονίνη συνδεόμενη σε αυτούς του υποδοχείς συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, όπως είναι η ρύθμιση του κιρκαδιανού ρυθμού, η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, η ογκογένεση, η φυσιολογία του αμφιβληστροειδούς και των ωοθηκών, η εποχική αναπαραγωγή και η ανοσολογική λειτουργία (Altun et al.2007). Η μελατονίνη ασκεί επίσης πολλές από τις λειτουργίες της συνδεόμενη με κάποιες πρωτεΐνες, όπως είναι η καλμοδουλίνη και η τουμπουλίνη, καθώς και με τους πυρηνικούς υποδοχείς του ρητινοϊκού οξέος: $ROR_{\alpha 1}$, $ROR_{\alpha 2}$ και RZR_{β} (Srinivasan et al. 2008). Έκτος από τα παραπάνω, η μελατονίνη συμμετέχει και σε πολλές φυσιολογικές δραστηριότητες χωρίς να απαιτείται η πρόσδεσή της με κάποιο μόριο ή υποδοχέα, κυρίως λόγω της έντονης αντιοξειδωτικής της δράσης (Iriti et al. 2010).

Τα επίπεδα της μελατονίνης είναι πολύ χαμηλά σε άτομα με διαταραχές του κιρκαδιανού κύκλου (άτομα με χρόνια αϋπνία, jet lag ή άτομα με μειωμένη όραση), υποδηλώνοντας έτσι πως η μελατονίνη συνδέεται με διαταραχές στην έναρξη και στη διάρκεια του ύπνου (Arendt et al.2008, Altun et al. 2007). Μελέτες έχουν δείξει πως η εξωγενώς χορηγούμενη μελατονίνη σε χαμηλές δόσεις μπορεί να προκαλέσει μετατοπίσεις φάσης στον κιρκαδιανό ρυθμό βελτιώνοντας έτσι σημαντικά την ποιότητα του ύπνου (Auld et al.2016, Altun et al.2007, Pagel et al. 2001). Επιπλέον, η μελατονίνη φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και σε πολλά νευρολογικά σύνδρομα, όπως είναι η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Parkinson, η εποχιακή συναισθηματική διαταραχή (SAD), ενώ φαίνεται να εμπλέκεται και σε πολλούς τύπους καρκίνου, ως αντιοξειδωτικός παράγοντας (Malhotra et al.2014, Vlachou et al.2006).

1.2 Νανοΐνες

Μία σημαντική εφαρμογή πολλών φυσικών και συνθετικών πολυμερών, η οποία έχει αποκτήσει αυξανόμενο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια στα συστήματα χορήγησης, είναι η παρασκευή καινοτόμων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων υπό τη μορφή νανοϊνών (nanofibers) (Toskas et al.2011, Garg et al. 2014). Οι νανοΐνες είναι εξαιρετικά λεπτές στερεές ίνες, με διαμέτρους της τάξεως των 1-1000 nm και μπορούν να παραχθούν με τη χρήση πολλών διαφορετικών πολυμερών και ως εκ τούτου να αποκτήσουν διαφορετικές φυσικές ιδιότητες και δυνατότητες εφαρμογής (Kumbar et al. 2006). Λόγω των αξιοσημείωτων αυτών ιδιοτήτων, οι νανοΐνες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη μεταφορά μορίων φαρμάκου στην κατάλληλη θέση του σώματος, κάτι που τις καθιστά ιδανικές ως συστήματα αποδέσμευσης φαρμάκων (Kumbar et al.2006, Garg et al.2014, Sharifi et al.2016).

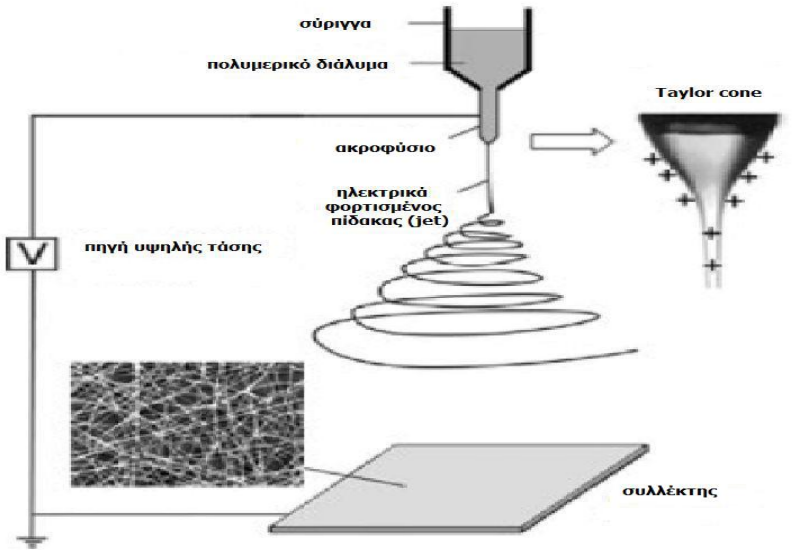
Οι νανοΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά ενός ευρέος φάσματος υδρόφιλων και υδρόφοβων φαρμακομορίων, καθώς και μακρομορίων, όπως το DNA και οι πρωτεΐνες. Η χορήγησή τους γίνεται, ως επί το πλείστον διαδερμικά, υποδόρια και με εμφύτευση (Garg et al. 2014). Η ενσωμάτωση της δραστικής ουσίας σε αυτές τις νανοδομές μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με άμεση ενσωμάτωση του φαρμάκου στο εσωτερικό των ινών, είτε με έμμεση εναπόθεση του φαρμάκου στην επιφάνειά τους (surface-immobilization), κάθε μία από τις οποίες διαφοροποιεί το προφίλ της αποδέσμευσης (Son et al.2014, Garg et al.2014, Sharifi et al.2016).

Οι νανοΐνες χαρακτηρίζονται από άριστες ικανότητες εγκλεισμού φαρμάκων και εκδόχων εντός της δομής τους, αποφεύγοντας σε μεγάλο βαθμό την αρχική αυξημένη αποδέσμευση του φαρμάκου στον οργανισμό και κατ΄ επέκταση τον κίνδυνο εμφάνισης τοξικότητας, γεγονός εξαιρετικά σύνηθες στις συμβατικές πολυμερικές μήτρες. Η μοναδική ευελιξία των νανοϊνών επιτρέπει την ανάπτυξη νανο-οχημάτων που παρέχουν ένα προφίλ αποδέσμευσης μηδενικής τάξης του φαρμάκου και συνεπώς παρατεταμένη συμπεριφορά αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας στον οργανισμό (Garg et al. 2014). Συγκεκριμένα, λόγω των δομικών τους πλεονεκτημάτων οι νανοΐνες συντελούν σε μια ταχεία αποδέσμευση, μετά τη χορήγηση, ακολουθούμενη από μια βραδύτερη και παρατεταμένη αποδέσμευση τις επόμενες ημέρες (Cardoso et al. 2016, Sharifi et al. 2016).

Τα κύρια πλεονεκτήματα των νανοϊνών που καθιστούν την εφαρμογή τους ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων ιδιαίτερα σημαντική είναι: η ελάχιστη τοξικότητα, η καλύτερη στόχευση του φαρμάκου στην περιοχή δράσης, η υψηλή ικανότητα ενσωμάτωσης φαρμάκων, η ενσωμάτωση ενός ευρέος φάσματος φαρμάκων, η προστασία του φαρμάκου από το περιβάλλον, μέσω της ενσωμάτωσή του στο εσωτερικό των ινών, και η καταλληλότητα των νανοϊνών για θερμοευαίσθητα φάρμακα (Garg et al.2014).

Υπάρχουν πολλές τεχνικές για την παραγωγή νανοϊνών, με την πιο επιτυχημένη να είναι αυτή της ηλεκτροϊνοποίησης (electrospinning) (Kumbar et al. 2006). Η ικανότητα ενσωμάτωσης βιοδραστικών θεραπευτικών μορίων σε δομές νανοϊνών,χρησιμοποιώντας την ήπια τεχνική της ηλεκτροϊνοποίησης, επιτρέπει τη διατήρηση της δομικής και βιολογικής ακεραιότητας των ινών και έχει εξελίξει σημαντικά την ανάπτυξη συστημάτων χορήγησης φαρμάκων βασισμένων σε

πολυμερικές νανοΐνες. Η τεχνολογία της ηλεκτροϊνοποίησης βασίζεται στην ικανότητα ενός φορτισμένου πολυμερικού διαλύματος να οδηγεί στην παραγωγή ινών επιθυμητού μεγέθους, με στόχο τη δημιουργία εύκαμπτων δομών, των λεγόμενων "νανοϊνωδών φύλλων" (nanofiber-sheets), που εγκλείουν στο εσωτερικό τους τη δραστική ουσία και επιτρέπουν την ελεγχόμενη αποδέσμευσή της από το σύστημα (Hamori et al. 2014, Frenot et al. 2003). Η διαδικασία της ηλεκτροϊνοποίησης ξεκινά με την εφαρμογή ενός ηλεκτρικού πεδίου υψηλής τάσης (10-20 kV) σε μία σταγόνα πολυμερικού διαλύματος που διανέμεται μέσω ενός ακροφυσίου. Η επιφανειακή τάση και οι ιξωδοελαστικές δυνάμεις του διαλύματος του πολυμερούς τείνουν να διατηρήσουν το ημισφαιρικό σχήμα της σταγόνας, ενώ αντίθετα το φορτίο που δημιουργείται, λόγω του ηλεκτρικού πεδίου, τείνει να μετατρέψει το σχήμα της σταγόνας από ημισφαιρικό σε ένα κωνικό που ονομάζεται "Taylor cone". Όταν η εφαρμοζόμενη τάση υπερβεί μία κρίσιμη τιμή, τότε επικρατούν οι ηλεκτρικές δυνάμεις στο σύστημα, με αποτέλεσμα να φορτίζεται το διάλυμα του πολυμερούς και να αποκτά τελικά ένα κωνικό σχήμα (Taylor cone). Στην περίπτωση πολυμερικών διαλυμάτων κατάλληλου ιξώδους δημιουργείται ένας ηλεκτρικά φορτισμένος πίδακας (jet) από πολυμερές, ο οποίος κινείται διαμέσου του αέρα σε μια σχεδόν ευθεία γραμμή. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της πορείας του, λόγω της ύπαρξης απωθητικών δυνάμεων, ο πολυμερικός πίδακας φτάνει γρήγορα σε ένα σημείο αστάθειας, με αποτέλεσμα να κάμπτεται συνεχώς εμπρός και πίσω και έτσι η δέσμη του πολυμερούς να παραμένει συνεχώς τεντωμένη, οδηγώντας στο σχηματισμό λεπτών μακριών ινών. Οι παραγόμενες νανοΐνες συλλέγονται σε ειδικό στατικό ή περιστρεφόμενο συλλέκτη (Kumbar et al.2006).



Σχήμα 2: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της ηλεκτροϊνοποίησης (electrospinning) ενός πολυμερικού διαλύματος για το σχηματισμό νανοϊνών (Ibrahim et al. 2015).

Η διαδικασία της ηλεκτροϊνοποίησης είναι ευπροσάρμοστη, καθώς επιτρέπει τη χρήση ενός ευρέος φάσματος πολυμερικών ουσιών, τόσο φυσικών όσο και συνθετικών (π.χ. οξική κυτταρίνη (CA), πολυ αιθυλενοξείδιο) (PEO), πολυβινυλική αλκοόλη (PVA)), για το σχηματισμό των ινών (Frenot et al. 2003). Συνήθως, για την κατασκευή των νανοϊνών προτιμάται συχνά ένας συνδυασμός φυσικών και συνθετικών πολυμερών, προκειμένου να ξεπεραστούν οι "πτωχές" ρεολογικές ιδιότητες και τα προβλήματα

βιοσυμβατότητας των φυσικών πολυσακχαριτών και των συνθετικών πολυμερών, αντίστοιχα (Frenot et al. 2003, Kikionis et al. 2015).

2. Μεθοδολογία

2.1 Ηλεκτροϊνοποίηση

Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροϊνοποίηση παρασκευάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 24 ώρες, προκειμένου να εξασφαλιστεί η ομοιογένειά τους. Η ηλεκτροϊνοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μίας γεννήτριας τροφοδοσίας (Gamma High Voltage Research, Ormond Beach, FL, USA) με μέγιστη τάση 50 kV. Τα πολυμερικά διαλύματα μεταφέρθηκαν σε μίας χρήσεως σύριγγες των 10 mL, εξοπλισμένες με βελόνες τύπου 23G και τοποθετήθηκαν σε μία οριζόντια τοποθετημένη αντλία Harvard PHD 2000 (Harvard Apparatus, Holliston, MA,USA). Οι παραχθείσες νανοΐνες συλλέχθηκαν σε ένα φύλλο αλουμινίου, τυλιγμένο στο εξωτερικό ενός περιστρεφόμενου κυλίνδρου τυμπάνου RC-6000 (NaBond Technologies) με ταχύτητα περιστροφής 400 rpm και απόσταση της κορυφής από το συλλέκτη 10 cm. Η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία ήταν 20 ± 2 ° C και 60 ± 5%, αντίστοιχα.

2.2 Ηλεκτροϊνοποίηση οξικής κυτταρίνης (CA) και μελατονίνης

Διαλύματα οξικής κυτταρίνης συγκέντρωσης 10% (w/v) και μελατονίνης συγκέντρωσης 0,1% (w/v) διαλύθηκαν σε ακετόνη. Η εφαρμοζόμενη τάση, η απόσταση άκρου προς συλλέκτη και ο ρυθμός τροφοδοσίας του διαλύματος σταθεροποιήθηκαν στα 20 kV, 10 cm και 4 mL/h, αντίστοιχα.

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας συνταγών μελατονίνης.

Συστατικά (mg)	Συνταγή 1	Συνταγή 2
Μελατονίνη	1	2
Οξική κυτταρίνη	99	98
Σύνολο	*100*	*100*

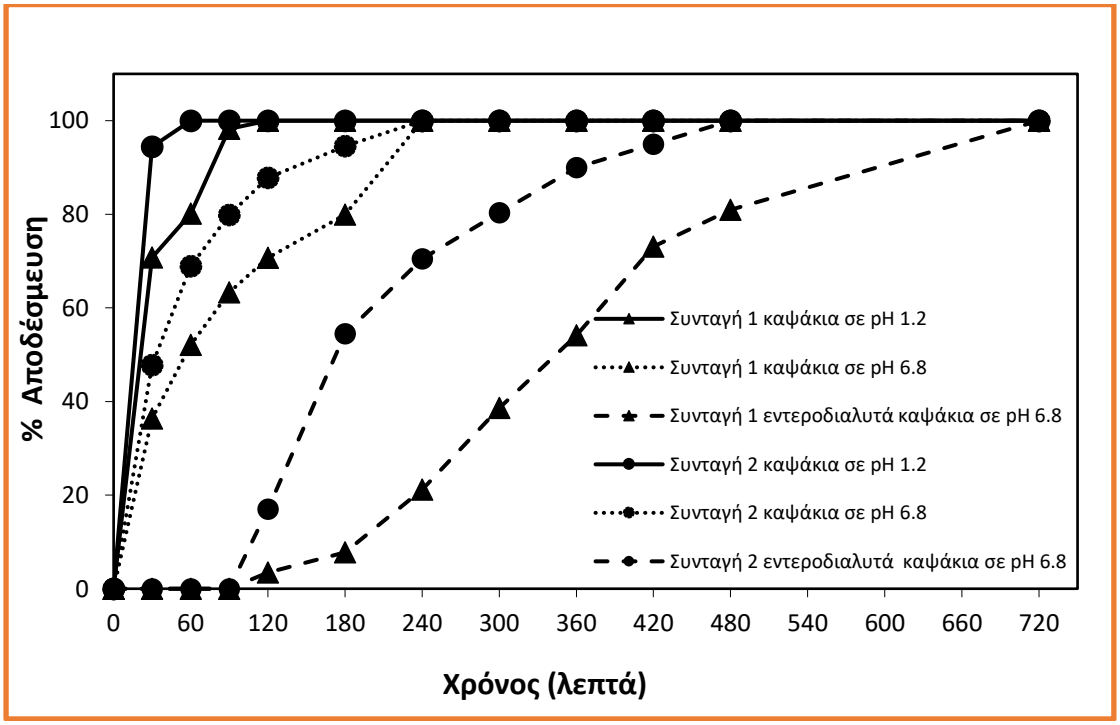
2.3 Παρασκευή καψακίων και έλεγχος διάλυσης

Οι νανοΐνες εισήχθησαν στο εσωτερικό απλών και εντεροδιαλυτών καψακίων, όπου και πραγματοποιήθηκαν μελέτες αποδέσμευσης. Στα πειράματα αυτά μελετήθηκε η αποδέσμευση της μελατονίνης από τα καψάκια, σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 1.2 και ρυθμιστικό διάλυμα με pH 6.8. Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή διάλυσης Pharma Test Apparatebau GmbH (Hainburg, Germany) χρησιμοποιώντας περιστρεφόμενα πτερύγια USP Apparatus I, με ταχύτητα περιστροφής 50 στροφές/λεπτό. Η δειγματοληψία, αρχικά, ελάμβανε χώρα κάθε μισή ώρα για τις πρώτες 2.5 ώρες και στη συνέχεια κάθε μία ώρα μέχρι τη συμπλήρωση των 8 ωρών. Ο όγκος του δείγματος ήταν 5 ml και μετά από κάθε δειγματοληψία η ποσότητα αυτή

αναπληρώνετο με 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος, προκειμένου να παραμείνει ο όγκος σταθερός καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Στη συνέχεια, ακολούθησε διήθηση των δειγμάτων από φίλτρα κυτταρίνης, διαμέτρου 0.45 mm και προσδιορισμός της απορρόφησης του διηθήματος με φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Η μέτρηση της μέγιστης απορρόφησης των διαλυμάτων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος λ_{max}=278nm και στη συνέχεια μετά από σύγκριση με τη μέγιστη απορρόφηση της αντίστοιχης συγκέντρωσης του διαλύματος αναφοράς, προσδιορίστηκε ποσοτικά η αποδεσμευμένη μελατονίνη.

3. Συμπεράσματα – Πρόταση

Τα αποτελέσματα από τα *in vitro* πειράματα αποδέσμευσης, τα οποία και παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία, υποδεικνύουν ότι σε pH 1.2 η μελατονίνη αποδεσμεύεται ταχέως από τα καψάκια σκληρής ζελατίνης, τα οποία περιέχουν τη μελατονίνη ενσωματωμένη στο εσωτερικό των νανοϊνών, καθιστώντας έτσι αυτά τα συστήματα κατάλληλα για να προάγουν την έναρξη του ύπνου. Μετά από αυτή την αυξημένη αρχική αποδέσμευση της μελατονίνης σε pH 1.2, η αποδέσμευση της ορμόνης επιβραδύνεται σε pH 6.8 (Σχήμα 3, Πίνακας 2), παρουσιάζοντας ένα προφίλ διάλυσης ικανό για να αντιμετωπιστούν προβλήματα που σχετίζονται με την ποιότητα του ύπνου. Η αποδέσμευση της μελατονίνης από εντεροδιαλυτά καψάκια είναι κατάλληλη για την αντιμετώπιση προβλημάτων μόνο ως προς τη διάρκεια του ύπνου, ενώ από απλά καψάκια με υψηλότερη δόση μελατονίνης, οι ρυθμοί της αποδέσμευής της, και στα δύο pH, ήταν σαφώς υψηλότεροι.



Σχήμα 3: % Αποδέσμευση μελατονίνης από τις συνταγές 1 και 2 από απλά και εντεροδιαλυτά καψάκια σε pH 1.2 και 6.8

Πίνακας 2: Φαρμακοκινητικές παράμετροι απλών και εντεροδιαλυτών καψακίων μελατονίνης σε διάφορα pH.

	$t_{20\%}$	$t_{50\%}$	$t_{90\%}$	MDT	DE (%)
Καψάκια pH 1.2					
Συνταγή **1**	9	22	70	30.26	95.80
Συνταγή **2**	5	15	30	16.67	97.68
Καψάκια pH 6.8					
Συνταγή **1**	15	61	208	77.31	87.74
Συνταγή **2**	11	31	38	51.33	92.39
EC Καψάκια pH 6.8					
Συνταγή **1**	233	340	589	247.71	49.98
Συνταγή **2**	121	170	356	171.65	71.08

4. Βιβλιογραφία

Altun A. and Ugur-Altun B., "*Melatonin: therapeutic and clinical utilization, International Journal of Clinical Practic"*, Vol, 5, pp 835-845, 2007, Edime

Arendt J., Van Someren E.J.W., Appleton R., Skene D.J., Akerstedt T., "*Clinical update: melatonin and sleep disorders"*, Clinical Medicine, 8, 4, pp 381-383, 2008, Wilford.

Auld F., Maschauer E.L., Morrison I., Skene D.J., Riha R.L., "*Evidence for the efficacy of melatonin in the treatment of primary adult sleep disorders"*, Sleep Medicine Reviews, pp 1-31, 2016, Edinburgh.

Boutin J.A., Audinot V., Ferry G., Delagrange P., "*Molecular tools to study melatonin pathways and actions"*, TRENDS in Pharmacological Sciences, 26, 8, pp 412-419, 2005, Croissy - Sur – Seinne.

Cardoso M.J., Costa R.R., Mano J.F., "*Marine Origin Polysaccharides in Drug Delivery Systems"*, Marine Drugs, 14, 34, pp 1-27, 2016, Barco.

Frenot A., Chronakis I.S., "*Polymer nanofibers assembled by electrospinning"*, Current Opinion in Colloid and Interface Science, 8, pp 64-75, 2003, Molndal.

Garg T., Rath G., Goyal A.K., "*Biomaterials-based nanofiber scaffold: targeted and controlled carrier for cell and drug delivery"*, Journal of Drug Target, pp 1-20, 2014, Punjab.

Hamori M., Yoshimatsu S., Hukuchi Y., Shimizu Y., Fukushima K., Sugioka N., Nishimura A., Shibata N., "*Preparation and pharmaceutical evaluation of nano-fiber matrix supported drug delivery system using the solvent-based electrospinning method"*, International Journal of Pharmaceutics, 464, pp 243-251, 2014, Kioto.

Ibrahim H.M., El-Zairy E.M.R., "*Chitosan as a Biomaterial- Structure, Properties, and Electrospun Nanofibers"*, Concepts, in Dr Varaprasad Bobbarala (ed) Compounds and the Alternatives of Antibacterials, Intech, 4, pp 81-101, 2015, Cairo.

Iriti M., Varoni E.M., Vitalini S., "*Melatonin in traditional Mediterranean diets"*, Journal of Pineal Research, 49, pp 101-105, 2010, Milan.

Kikionis S., Ioannou E., Toskas G., Roussis V., *"Electrospun biocomposite nanofibers of ulvan/PCL and ulvan/PEO"*, Journal of Applied Polymer Science, pp 1-5, 2015, Athens.

Βλάχου Μ., Τράγου Κ.., Σιαμίδη Α., Κικιώνης Σ., Καπότη Σ., Ιωάννου Ε., Ρούσσης Β., Τσοτίνης Α.
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 15784 Αθήνα, Ελλάδα

Μελατονίνη, η ορμόνη της επίφυσης: μελέτες τροποποιημένης αποδέσμευσης από πολυμερικά συστήματα νανοϊνών.

Kumbar S.G., Nair L.S., Bhattacharyya S., Laurencin C.T., "*Polymeric Nanofibers as Novel Carriers for the Delivery of Therapeutic Molecules"*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 6, 9/10, pp 2591-2607, 2006, Virginia.
Malhotra S., Sawhney G., Pandhi P., "*The Therapeutic Potential of Melatonin: A Review of the Science"*, Medscape General Medicine, 6, 2, pp 1-46, 2004, Chandigarh.
Mills E., Wu P., Seely D., Guyatt G., "*Melatonin in the treatment of cancer: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis"*, Journal of Pineal Research, 39, pp 360-366, 2005, Hamilton.
Pagel J.F., Bennett L.P., "*Medications for the Treatment of Sleep Disorders: An Overview"*, Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry, 3, 3, pp 118-125, 2001, Colorado.
Sharifi F., Sooriyarachchi A.C., Altural H., Montazami R., Rylander M.N., Hashemi N., "*Fiber-Based Approaches as Medicine Delivery Systems, ACS Biomaterials Science and Engineering"*, pp 1-64, 2016, Amesh.
Srinivasan V., Spence D.W., Pandi-Perumal SR., Trakht I., Cardinali DP., "*Therapeutic Actions of Melatonin in Cancer: Possible Mechanisms"*, Integrative Cancer Therapies, 7, 3, pp 189-203, 2008, Kelantan.
Tan D.X., Chen L.D., Poeggeler B., Manchester L.C., Reiter R.J., "*Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger"*, Endocrine Journal, 1, pp 57-60, 1993, San Antonio.
Tan D.X., Manchester L.C., Terron M.P., Flores L.J., Reiter R.J,. "*One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species"*, Journal of Pineal Research, 42, pp 28-42, 2006, San Antonio.
Toskas G., Hund R.D., Laourine E., Cherif C., Smyrniotopoulos V., Roussis V., "*Nanofibers based on polysaccharides from the green seaweed Ulva Rigida"*, Carbohydrate Polymers, 84, pp 1093-1102, 2011, Dresden.
Touitou Y., Reinberg A., Touitou D., "*Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of cicardian disruption"*, Life Sciences, 173, pp 94-106, 2017, Paris.
Vlachou, M., Eikosipentaki, A., Xenogiorgis, V., "*Pineal hormone melatonin: Solubilization studies in model aqueous gastrointestinal environments",* Current Drug Delivery 3(3), pp. 255-265, Athens.
Vlachou, M., Ioannidou, V., Vertzoni, M., Tsotinis, A., Afroudakis, P.A., Sugden, D., "*Controlled release from solid pharmaceutical formulations of two nalkanoyl-4-methoxybicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-ethanamines with melatoninergic",* Letters in Drug Design and Discovery 12(4), pp :259-262, 2015, Athens.