

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

ALISA PALAVENIENĖ

**SEPIJOS KAULO APIBŪDINIMAS IR PRITAIKYMAS  
BIOMEDICININIŲ BEI FARMACINIŲ KOMPOZICIJŲ  
KŪRIMUI**

Daktaro disertacijos santrauka  
Fiziniai mokslai, chemija (03P)

2018, Kaunas

Disertacija rengta 2013-2017 metais Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakultete, Polimerų chemijos ir technologijos katedroje. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba ir Regeneracinės medicinos McGowan institutas, JAV.

**Mokslinis vadovas:**

Prof. dr. Jolanta LIESIENĖ (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, chemija, 03P).

**Redagavo:** Aurelija Gražina Rukšaitė (Leidykla „Technologija“)

**Chemijos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba:**

Prof. habil. dr. Algirdas ŠAČKUS (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, chemija, 03P) – **pirmininkas**;

Prof. dr. Saulius GRIGALEVIČIUS (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, chemija, 03P);

Prof. dr. Jolita OSTRAUSKAITĖ (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, chemija, 03P);

Dr. Aiva PLOTNIECE (Latvijos organinės sintezės institutas, fiziniai mokslai, chemija, 03P);

Prof. dr. Nijolė SAVICKIENĖ (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, farmacija, 09B).

Disertacija bus ginama viešame chemijos mokslo krypties disertacijos gynimo tarybos posėdyje 2018 m. birželio 8 d. 10 val. Kauno technologijos universiteto Rektorato salėje.

Adresas: K. Donelaičio g. 73-402, 44249 Kaunas, Lietuva.

Tel. (370) 37 300 042; faks. (370) 37 324 144; el. paštas doktorantura@ktu.lt.

Disertacijos santrauka išsiųsta 2018 m. gegužės 8 d.

Su disertacija galima susipažinti internetinėje svetainėje <http://ktu.edu> ir Kauno technologijos universiteto bibliotekoje (K. Donelaičio g. 20, 44239 Kaunas).

# 1. ĮVADAS

## Darbo pagrindimas

Biomedicininų technologijų vystymosi tendencijoms didelę įtaką turi naujas vartotojų požiūris į sveikatos apsaugos klausimus, ekologijos, darnios plėtos ir kitas globalias problemas. Dėl to šiuolaikinėje biomedicinoje ir farmacijoje vis dažniau pastebimas grįžimas prie gamtinių išteklių panaudojimo. Vystant naujas technologijas, neretai naudojami bioimitacijos principai. Net šiuolaikiniai patentai dažnai remiasi medicinos paveldo receptūromis. Tūkstantmetė žmonijos patirtis rodo, kad ligoms ir įvairiems negalavimams gydyti sėkmingai naudojamos natūralios gamtinės medžiagos. Viena tokių natūralių žaliavų yra jūros galvakojo moliusko sepijos (*Sepia officinalis*) kaulas. Sepijos kaulas buvo naudojamas daugelį amžių tradicinėje Kinijos ir Indijos medicinoje. Jis buvo vertinamas gydant dermatologines, gastrologines, ginekologines, otorinolaringologines ir kitas ligas. Pastaruosius penkerius metus pastebimas atgimstantis tyrėjų susidomėjimas šia jūros kilmės žaliava, pritaikant ją biomedicininiam tikslams. Naujausiuose tyrimuose didelis dėmesys yra skiriamas sepijos kaulo pritaikymui kaulo audinio inžinerijoje, rečiau – žaizdoms gydyti.

Tačiau sepijos kaulo cheminė sudėtis nėra visiškai ištirta. Taip pat trūksta *in vitro* ir *ex vivo* biosuderinamumo tyrimų bei galimo sepijos kaulo panaudojimo mokslinio pagrindimo. Taigi vienas iš šio darbo iššūkių yra atlikti išsamius tyrimus, įrodant sepijos kaulo gydomąjį potencialą ir saugumą. Pasitelkiant bioimitacijos principus, taip pat norima sukurti produktus su sepijos kaulu, skirtus naudoti kaulo audinio inžinerijoje, ir parodyti jo tinkamumą kuriant farmacinės vaisto formas įvairioms ligoms gydyti.

## Darbo tikslas

Šio darbo tikslas buvo ištirti sepijos kaulo savybes ir pritaikyti jį kuriant įvairias biomedicininės bei farmacinės kompozicijas.

## Tikslui pasiekti keliami uždaviniai:

1. Nustatyti ir įvertinti sepijos kaulo charakteristikas: pilną elementinę lamelinės ir dorsalinės dalių sudėtį, poveikį keratinocitų ląstelėms, hemostatines ir antimikrobines savybes;

2. Parengti baltymų pašalinimo iš sepijos kaulo medžiagos metodiką;

3. Pagaminti kompozitus regeneruotos celiuliozės pagrindu, panaudojant deproteinizuotą sepijos kaulo medžiagą ir hidroksiapatitą, gautą iš sepijos kaulo medžiagos, bei ištirti jų morfologiją, atlikti bioimitacinę mineralizaciją, nustatyti citotoksiškumo lygį ir osteokondukcines savybes;

4. Sukurti ir ištirti kalcio alginato kapsules su sepijos kaulo medžiaga, skirtas nedideliams kaulo defektams burnos ertmėje užpildyti ir gydyti;

5. Sukurti ir ištirti puskiečių odos preparatų receptūras su sepijos kaulo mikrodalėmis, tokius kaip suspensiniai geliai hidroksietilceliuliozės pagrindu ir žvakutės su lidokaino hidrochloridu.

### **Mokslinio darbo naujumas ir praktinė vertė**

Detaliai ištirta sepijos kaulo cheminė sudėtis ir įvertinta jo sudedamųjų dalių nauda gydomiesiems tikslams. Pirmą kartą parengta baltymų šalinimo iš sepijos kaulo medžiagos metodika naudojant natrio dodecilsulfatą. Baltymų pašalinimas iš sepijos kaulo medžiagos leidžia išvengti imuninio atsako rizikos.

Pirmąkart pagaminti aktyti kompozitai iš regeneruotos celiuliozės ir sepijos kaulo medžiagos kaulo audinio inžinerijos tikslams naudojant deproteinizuotas sepijos kaulo medžiagos mikrodaleles arba iš sepijos kaulo gautą hidroksiapatitą. Bioimitacinės mineralizacijos rezultatai parodė, kad kompozitai pasižymi bioaktyvumu – jų paviršiuose kaupėsi kalcis, o jų necitotoksiškumas ir ostekondukcinės savybės buvo patvirtinti *ex vivo* tyrimais su hepatocitais ir žmogaus MG-63 ląstelėmis (osteoblastais). Kaulo audinio inžinerijos tikslams taip pat sukurtos kalcio alginato kapsulės su sepijos kaulo medžiaga ir deksametazono natrio fosfatu, skirtos smulkiems kaulo defekto pažeidimams užpildyti burnos ertmėje.

Pirmą kartą parodyta šarminio sepijos kaulo medžiagos apdorojimo įtaka jo hemostatinėms savybėms. Šis reiškinys pagrįstas chitino deacetiliniu, lygiagrečiai išsaugant neorganinius sepijos kaulo elementus. Pirmą kartą sukurtos puskiečių preparatų (suspenduotų gelių, žvakučių *Witepsol* pagrindu) receptūros su deproteinizuotomis sepijos kaulo mikrodalėmis ir ištirtos jų savybės.

### **Darbo apibavimas**

Darbo rezultatai paskelbti 6 publikacijose, iš jų 4 žurnaluose, esančiuose „Clarivate Analytics Web of Knowledge“ bazėje cituojamų leidinių sąraše: „Chemija“, „Marine Biotechnology“, „Cellulose Chemistry and Technology“ (priimta spaudai) ir „Materials Science“ (priimta spaudai). Dvi publikacijos – kituose „Clarivate Analytics Web of Knowledge“ duomenų bazėse referuojamuose leidiniuose (Proceedings).

### **Disertacijos struktūra ir turinys**

Disertacija susideda iš įvadinės dalies, literatūros apžvalgos, eksperimentinės dalies, rezultatų ir jų aptarimo, apibendrinimo ir išvadų, literatūros sąrašo (310), publikacijų sąrašo disertacijos tema. Disertacija pateikta 130 puslapiuose, įskaitant 22 lenteles ir 54 paveikslus.

## 2. METODINĖ DALIS

### Pagrindinės medžiagos

Sepijos kaulas (angl. *cuttlebone*, CB) – „Vital Pet Products Ltd“, Didžioji Britanija, maistinė rūšis. Acetilceliuliozė – „Sigma-Aldrich“, JAV, Mn~50000. Algino rūgšties natrio druska – „Sigma-Aldrich“, Didžioji Britanija. Deksametazono natrio fosfatas – „Sigma-Aldrich“, Vokietija, chemiškai švarus. Chitozanas – „Sigma-Aldrich“, Vokietija. *Witepsol H35* – „Farmalabor“, Italija. Lidokaino hidrochloridas monohidratas – „Farmalabor“, Italija, 99 proc.

### Tyrimų metodai

#### 2.1. Sepijos kaulo medžiagos ir jos kompozitų charakterizavimas

Sepijos kaulo (CB) medžiaga ir jos kaulo audinio inžinerijai skirti kompozitai buvo charakterizuojami naudojant infraraudonųjų spindulių molekulinę absorbcinę spektrinę analizę (IR, „Perkin-Elmer, Inc.“, JAV), rentgeno spinduliuotės difrakcinę analizę (RSDA, „Bruker AXS“, Vokietija), rentgeno spindulių fluorescencinę analizę (RSFA, „Bruker X-ray S8 Tiger WD“, „Bruker AXS“, Vokietija), skenuojamąją elektroninę mikroskopiją ir elektroninę dispersinę spektroskopiją (SEM/EDS, „FEI Quanta 200 FEG“, JAV).

Kompozitai celiuliozės pagrindu buvo gauti mechaniškai imobilizuojant sepijos kaulo mikrodaleles į regeneruotas celiuliozės gelį ir jį liofilizuojant („Christ Alpha 2-4 LSC“, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Vokietija). Kompozitų morfologiniai rodikliai nustatyti naudojant mikrokompiuterinės tomografijos sistemą ( $\mu$ CT, „Scanco Medical AG“, Brütisellen, Šveicarija). Bioimitacinė mineralizacija atlikta naudojant 1x ir 10x modelinį kūno skystį (MKS).

Baltymų šalinimo procedūrų efektyvumas įvertintas naudojant „Direct Detect™ IR“ sistemą („Merck“, Vokietija), automatinės elektroforezės sistemą „Agilent 2100 Bioanalyser“ („Agilent Technologies“, Vokietija) ir Bradfordo metodą. Hidroterminė hidroksiapatito sintezė iš sepijos kaulo mikrodalelių atlikta naudojant hidroterminio apdorojimo aukštame slėgyje sistemą („PARR Instrument Company“, JAV).

#### 2.2. Citotoksiškumo tyrimai

Kompozitų citotoksiškumo tyrimai, nustatant hepatocitų gyvybingumą, laktato dehidrogenazės aktyvumą, aldolazės aktyvumą ir *extensor digitorum longus* raumens ląstelių jautrumą insulinui, buvo atlikti Ontogenetinės fiziologijos katedroje, V. N. Karazino Charkovo nacionaliniame universitete (Ukraina). Sepijos kaulo medžiagos citotoksiškumo tyrimai su HaCaT eilės žmogaus odos ląstelėmis (keratinocitais) buvo atlikti Prahos Karolio universitete (Čekijos Respublika).

### 2.3. Osteokonduktyvumo tyrimai

Kompozitų osteokonduktyvumas įvertintas naudojant MG-63 ląsteles, tiriant šarminės fosfatazės aktyvumą taikant von Kossa ir Alizarino dažymo metodus. Tyrimai atlikti Cheminės inžinerijos katedroje, Izmiro technologijos universitete (Turkija).

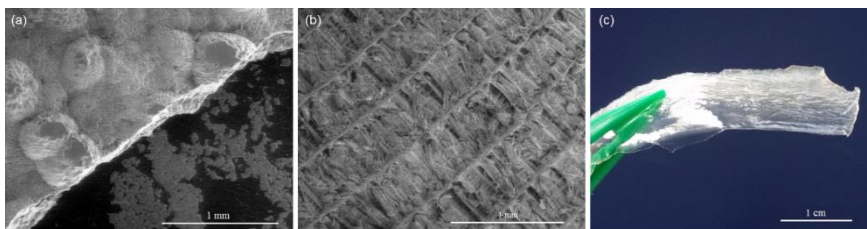
### 2.4. Farmacinių kompozicijų su sepijos kaulo medžiaga kūrimas

Kalcio alginato kapsulės su sepijos kaulo medžiaga ir deksametazono natrio fosfatu buvo gautos taikant joninės geliacijos metodą. Žvakutės su sepijos kaulo medžiaga ir lidokaino hidrokloridu gautos liejimo būdu, naudojant *Witepsol H35* žvakučių pagrindą. Paruošti hidroksietilceliuliozės pagrindu su sepijos kaulo mikrodalelėmis suspenduoti geliai. Taip pat tirtos hemostatinės savybės ir antibakterinis poveikis *Staphylococcus aureus* ir *Pseudomona aeruginosa* bakterijų rūšims.

## 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

### 3.1. Sepijos kaulo apibūdinimas

Sepijos kaulas susideda iš dorsalinės ir lamelinės dalių. Iš sepijos kaulo struktūros fragmentų (3.1 pav.) matyti, kad šios dalys turi ryškiai pastebimus struktūros skirtumus.



**3.1 pav.** Sepijos kaulo struktūros fragmentai: (a) viršutinio ir žemiau esančio dorsalinės dalies sluoksnių skenuojamosios elektroninės mikroskopijos (SEM) nuotrauka; (b) skersinio lamelinės dalies pjūvio SEM nuotrauka; (c) demineralizuotos dorsalinės dalies makroskopinė sandara

Sepijos kaulo karkasą sudaro  $\beta$ -chitino skaidulos, tačiau jų išsidėstymas dorsalinėje ir lamelinėje dalyse kardinaliai skiriasi. Išorinis dorsalinės dalies sluoksnis turi pumpuro formos iškilimus su atviros šerdies 200  $\mu\text{m}$  skersmens struktūra, o pamatinis sluoksnis yra lygus ir neakytas (3.1 pav., a). Dorsalinę dalį sudaro tankus chitino pluoštas, apipintas mineralinių medžiagų sancaupų, kurių didžiąją dalį sudaro aragonitas (kalcio karbonato polimorfinė atmaina). Lamelinės dalies sienelės yra sudarytos iš plonų chitino vijų, apipintų mineralinių medžiagų sancaupų, ir sudaro akytą struktūrą (3.1 pav., b). Mechanškai atskirtą dorsalinę

dalį paveikus 0,5M HCl tirpalu, gaunama demineralizuota medžiaga, kurią sudaro tankus  $\beta$ -chitino pluoštas (3.1 pav., c).

Makro- ir mikroelementų, tokių kaip kalcis, magnis, fosforas, stroncis, geležis, natris, chloras, sierra, kalis, varis ir bromas, rasta abiejose sepijos kaulo dalyse (3.1 lentelė). Abiejų dalių sudėtis yra panaši, tačiau dorsalinėje dalyje geležies kiekis yra didesnis, taip pat randama chromo ir cinko, kurių nerasta lamelinėje dalyje. Savo ruožtu lamelinėje dalyje yra daugiau kalcio, o fosforo kiekis abiejose dalyse yra labai panašus. Taip pat buvo analizuojami sepijos kaulo bandiniai iš įvairių jūros pakrančių, tokių kaip Soharo miesto pakrantė (Omano Sultanatas, rinkta 2014 m. sausio mėn.), Trapanio miesto pakrantė (Sicilija, rinkta 2015 m. rugpjūčio mėn.), Kaldes d'Estirako miesto pakrantė (Ispanija, rinkta 2016 m. rugpjūčio mėn.) ir Pilos miesto pakrantė (Kipras, rinkta 2017 m. rugsėjį).

**3.1 lentelė.** Sepijos kaulo dalių (komercinis produktas, „Vital Pet Products Ltd“, Didžioji Britanija) elementinės analizės rezultatai

Elementas	Kiekis sepijos kaule, proc.	
	Dorsalinė dalis	Lamelinė dalis
Kalcis	43,90	50,80
Fosforas	0,07	0,08
Magnis	0,14	0,18
Stroncis	0,36	0,48
Cinkas	0,14	–
Geležis	0,02	0,004
Natris	0,37	0,65
Chloras	1,83	1,41
Sierra	0,44	0,22
Kalis	0,05	0,05
Varis*	56	46
Bromas*	97	45
Chromas	0,004	–
Silicis	0,01	–

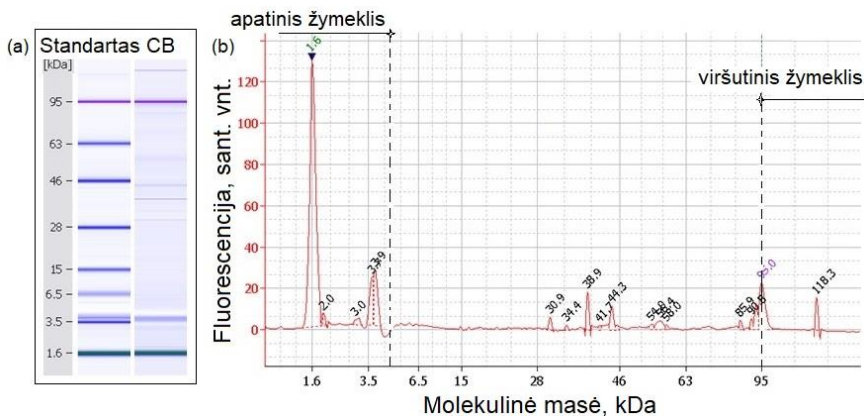
\* Vario ir bromo koncentracijos nurodytos milijoninėmis dalimis (m. d.)

Kalcio kiekis gamtoje rastų bandinių buvo maždaug 5 proc. didesnis nei komercinio produkto, o kitų elementų kiekiai buvo labai panašūs, nepriklausomai nuo rinkimo vietos ir laiko. Visi rasti bioneorganiniai elementai yra svarbūs įvairioms fermentų reakcijoms ir medžiagų apykaitos procesams gyvame organizme, taip pat ir kaulo audinio regeneravimui. Biologiškai nepageidaujamų sunkiųjų metalų, tokių kaip sidabras, kadmis, švinas ar vanadis, sepijos kaulo dorsalinės ar lamelinės dalių mėginiuose nerasta.

Sepijos kaulas yra vidinė moliusko sepijos struktūra, todėl mantijos (raumeninės kūno dalies) baltymų pėdsakai gali absorbuotis į kaulo karkasą. Norint panaudoti šią maisto pramonės atlieką kaip žaliavą biomedicinos ir

farmacijos tikslams, svarbu nustatyti ir pašalinti sudėtyje esančius baltymus ir / ar jų likučius, kurie gali sukelti alergines reakcijas, taip užtikrinant medžiagos saugumą ir biosuderinamumą.

Nustatyta, kad sepijos kaulo sudėtyje randama baltymų, kurių molekulinės masės yra nuo 30 kDa iki 90 kDa (3.2 pav.).



**3.2 pav.** Sepijos kaulo medžiagos baltymų molekulinės masės: (a) densitometrijos laukas; (b) elektroferograma

Iš literatūros duomenų žinoma, kad tropomiozino – potencialaus alergijų sukėlėjo – molekulinė masė yra 35–38 kDa, todėl gautos elektroferogramos smailės ties 34,4 kDa, 38,9 kDa ir 41,7 kDa gali būti priskirtos jūrinės kilmės tropomiozinui. Kiti baltymai, kurių molekulinė masė yra 30,9 kDa ir 44,3–58,0 kDa, priskirti struktūrinių kaulo baltymų grupei.

### 3.2. Baltymų šalinimas iš sepijos kaulo medžiagos

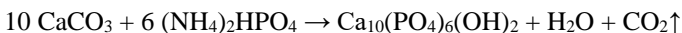
Baltymų šalinimo procedūros atliktos naudojant natrio dodecilsulfato, karbamido ir / ar natrio šarmo vandeninius tirpalus, esant skirtingoms temperatūroms. Reakcijos temperatūra ir tirpalo pH turi įtakos baltymų denatūravimui, tačiau vien šių sąlygų nepakanka, kadangi tropomiozinas yra termiškai atsparus baltymas. Nustatyta, kad baltymams soliubilizuoti buvo tinkamas tirpalas, sudarytas iš 35 mM natrio dodecilsulfato ir 2 mM karbamido, esant 80 °C temperatūrai.

### 3.3. Hidroksiapatito gavimas iš sepijos kaulo medžiagos ir jo charakterizavimas

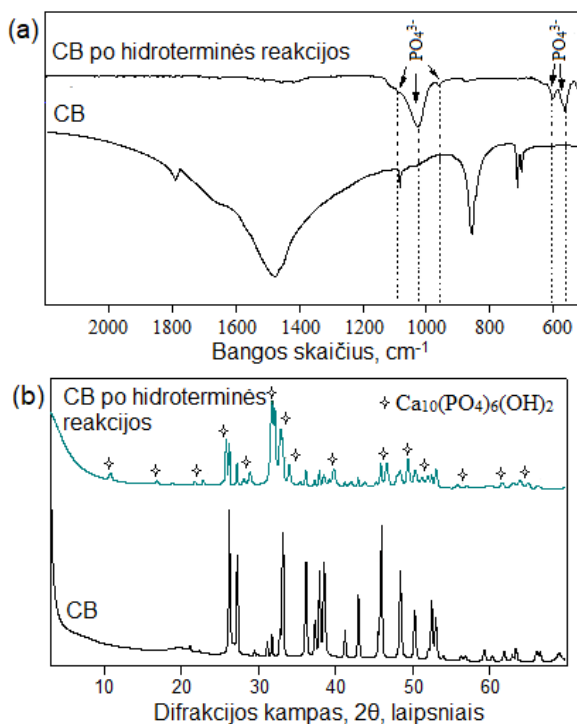
Kalcio karbonato, kuris sepijos kaulo medžiagoje yra aragonito formos, osteokondukcinės ir mechaninės savybės gali būti pagerintos paverčiant jį



hidroksiapatitu. Hidroksiapatitas gautas hidroterminės sintezės būdu, sepijos kaulo mikrodaleles veikiant amonio hidrofosfatu pagal lygtį:



Hidroterminės sintezės metu gautos medžiagos IR spektre matomas  $\text{PO}_4^{3-}$  grupių virpesiams būdingos absorbcijos smailės ties  $1090 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1029 \text{ cm}^{-1}$ ,  $960 \text{ cm}^{-1}$ ,  $606 \text{ cm}^{-1}$  ir  $565 \text{ cm}^{-1}$  atsiradimas, o aragonitui būdingos  $\text{CO}_3^{2-}$  grupės virpesių absorbcijos smailių intensyvumas ties  $1790 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1077 \text{ cm}^{-1}$ ,  $856 \text{ cm}^{-1}$ ,  $713 \text{ cm}^{-1}$  ir  $700 \text{ cm}^{-1}$  lieka labai nedidelis (3.3 pav., a).



**3.3 pav.** Sepijos kaulo (CB) ir hidroksiapatito, gauto iš sepijos kaulo medžiagos, (a) IR spektrai ir (b) rentgenodifraktogramos

Hidroterminės sintezės metu gautos medžiagos rentgenodifraktogramoje (3.3 pav., b) matomi difrakciniai maksimumai ties  $10,7^\circ$ ,  $22,8^\circ$ ,  $25,7^\circ$ ,  $28,0^\circ$ ,  $32,1^\circ$ ,  $34,0^\circ$ ,  $39,7^\circ$ ,  $46,6^\circ$ ,  $49,4^\circ$ ,  $56,9^\circ$ ,  $63,1^\circ$  ir  $64,9^\circ$ , kurie gali būti priskiriami hidroksiapatitui (PDF 01-089-4405). Šioje rentgenodifraktogramoje taip pat matomi mažo intensyvumo, aragonitui būdingi difrakciniai maksimumai ties  $26^\circ$ ,

33° ir 45°. Tiek IR spektroskopijos, tiek ir rentgenodifrakcinės analizės duomenys rodo, kad gautas karbonizuotas hidroksiapatitas.

Naudojantis rentgeno spindulių fluorescencinės analizės rezultatais apskaičiuota, kad kalcio ir fosforo santykis pradinėje ir gautoje medžiagoje yra atitinkamai 197,4 ir 4,05. Sepijos kaulo medžiagos, gautos po hidroterminės reakcijos, kalcio ir fosforo santykio vertė yra artima minėto santykio žmogaus kaulo sudėtyje vertei (1,67–2,29). Rezultatai taip pat parodė, kad sepijos kaulo medžiagoje išlieka gyvų organizmų fermentų veiklai ir medžiagų apykaitos procesų efektyviam vyksmui reikalingų bioneorganinių elementų, tokių kaip magnis, silicis, varis, stroncis, siera, geležis ir cinkas.

Apibendrinant gautus rezultatus galima daryti išvadą, kad hidroterminės sintezės metu (200 °C, 8 val.) gautas karbonizuotas kalcio hidroksiapatitas, savo struktūroje turintis natūraliam kaulo regeneravimui būtinų bioneorganinių elementų. Iš literatūros žinoma, kad kaulo audinio inžinerijos tikslams karbonizuotas kalcio hidroksiapatitas yra pranašesnis už gryną hidroksiapatitą, kadangi labiausiai atitinka žmogaus kaulo cheminę sudėtį.

### 3.4. Regeneruotos celiuliozės kompozitai su sepijos kaulo mikrodalelėmis

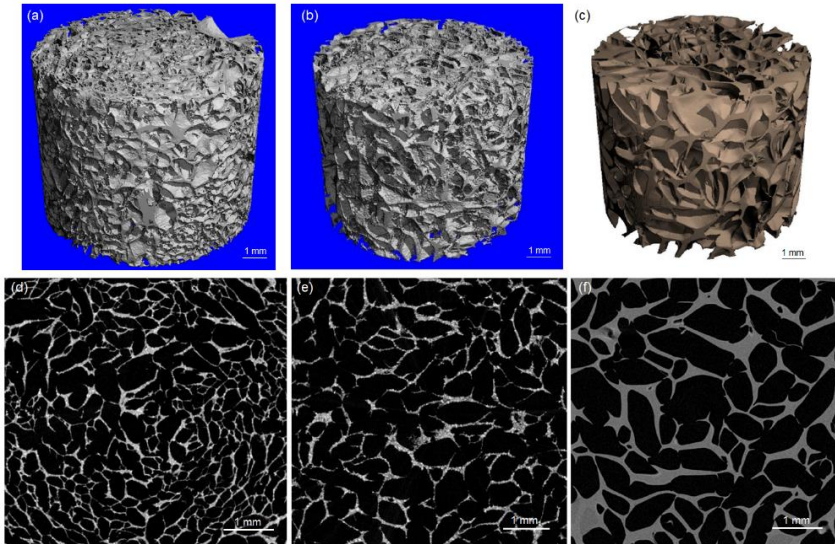
Kaulo audinio inžinerijoje yra vertinami kompozitiniai karkasai, kurių sudėtis ir struktūra labiausiai atitinka žmogaus kaulo sandarą. Polimeriniai karkasai su imobilizuotomis mineralinėmis medžiagomis gali atkartoti kaulo struktūrą ir jo fizikines-chemines savybes. Celiuliozė yra plačiai paplitęs gamtoje polisacharidas, pasižymintis biosuderinamumu, todėl, siekiant pagaminti kaulo karkasą iš natūralių medžiagų, buvo pasirinkta regeneruota celiuliozė (RC) ir sepijos kaulo medžiaga (3.2 lentelė).

3.2 lentelė. Kompozitų su sepijos kaulo medžiagos užpildais sudėtis

Kompozito pavadinimas	Rišamoji medžiaga	Armujamoji medžiaga	Pastabos
RC/CB	Regeneruota celiuliozė	CB po baltymų pašalinimo	Žr. 3.2 skyrių
RC/CB-SBF			Tai RC/CB kompozitai, papildomai mirkyti 10x MKS
RC/CB-HAp		CB-HAp	Žr. 3.3 skyrių
RC		–	Kontrolinė grupė

RC/CB kompozitas – tai regeneruotos celiuliozės ir sepijos kaulo kompozitas; RC/CB-SBF – regeneruotos celiuliozės ir sepijos kaulo kompozitas, padengtas MKS (modelinio kūno skysčio) mineralais; RC/CB-HAp – regeneruotos celiuliozės ir hidroksiapatito, gauto iš sepijos kaulo medžiagos, kompozitas; RC – regeneruotos celiuliozės karkasas, kontrolinė grupė. Imobilizavus sepijos kaulo medžiagas regeneruotos celiuliozės gelyje ir gelį liofilizavus, gauti aktyti trimačiai karkasai, kurių formą galima modeliuoti

priklausomai nuo individualaus poreikio kaulo defektui užpildyti. Tai cilindrinės, vamzdžio, blokelių, lazdelės, U formos arba L formos karkasai, kurie dažniausiai naudojami kaulo audinio inžinerijoje, ypač odontologinėje implantologijoje. Kompozitų trimatės (3D) ir dmatės (2D) projekcijos pateiktos 3.4 paveiksle.



**3.4 pav.** 3D ir 2D nuotraukos: (a, d) RC/CB kompozitų, (b, e) RC/CB-HAp kompozitų ir (c, f) RC karkasų

Iš 2D nuotraukų matyti, kad kompozitų RC/CB ir RC/CB-HAp struktūros yra labiau kompaktiškos nei karkaso be mineralinio užpildo (RC), t. y. kompozituose liofilizacijos metu susidaro mažesnės akutės.

Gautų kompozitų akytumo reikšmės yra artimos žmogaus įvairių akytų kaulų charakteristikoms (3.3 lent.). Karkaso struktūra yra ypač svarbi charakteristika, iš dalies užtikrinanti sėkmingą jo panaudojimą kaulo audinio inžinerijoje. Lemiantys faktoriai yra susiję su akyto kaulo morfologijos parametrais. Akytumas, akučių dydis, akučių geometrija yra svarbiausios morfologinės charakteristikos, nulemiančios kraujagyslių formavimosi karkase galimybes bei karkaso mechanines savybes. Lyginant gautų kompozitų ir žmogaus kaulo akytos dalies struktūrinius parametrus matyti, kad RC/CB-HAp kompozito akytumas yra didžiausias ir atitinka apatinio žandikaulio kaulo akytumo vertę (3.3 lent.). Sijų storis yra svarbus struktūrinis kaulo parametras, kadangi nulemia karkaso vidinį mechaninį stabilumą. Kaip matyti, RC/CB-HAp kompozito ir RC karkaso sijų storis atitinka įvairių rūšių natūralaus kaulo sijų storį, o RC/CB karkaso sijų storis nėra pakankamas. Polimerinių sijų storį taip pat galima įvertinti iš 2D nuotraukų (3.4 pav.). Kitų RC/CB ir RC/CB-HAp kompozitų struktūrinių

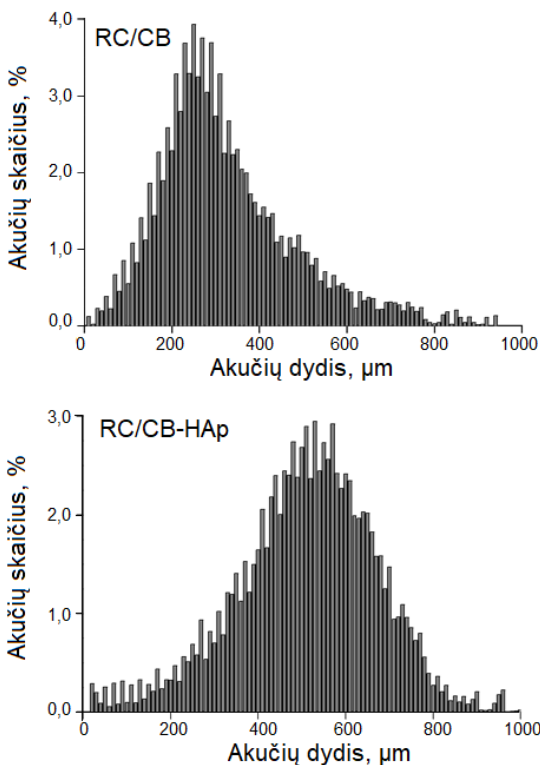
parametrų vertės nesutampa, tačiau yra artimos žmogaus kaulo struktūriniais parametrams.

**3.3 lentelė.** Šiame darbe pagamintų karkasų ir žinomi žmogaus kaulo struktūriniai parametrai

Struktūrinis parametras	Karkasas arba kaulo dalis					
	RC/CB	RC/CB-HAp	RC	5-ojo slankstelio kūnas	Ultra distalinis spindulys	Apatinio žandikaulio krumplys
Skeleto tūrio dalis, proc.	19,79	14,10	24,87	22,95	23,00	–
Savitasis paviršiaus plotas, mm <sup>-1</sup>	39,67	33,37	14,50	–	–	–
Sijų storis, mm	0,06	0,09	0,21	0,10	0,10	0,11–0,22
Sijų išdėstymo tarpas, mm	0,20	0,36	0,42	0,31	0,34	0,56–0,85
Sijų skaičius, mm <sup>-1</sup>	3,93	2,36	1,80	2,20	2,40	1,16–1,67
Vidutinis akučių skersmuo, μm	324	510	750	–	–	–
Vidutinis akytumas, proc.	80,21	85,90	75,13	–	–	72,6–87,4

Imobilizavus sepijos kaulo medžiagą RC gelyje, beveik dvigubai sumažėja susidarančio karkaso akutės. Vidutinis RC/CB, RC/CB-HAp ir RC karkasų akučių skersmuo yra atitinkamai 324 μm, 510 μm ir 750 μm.

Atlikus vyraujančių akučių skersmens procentinės dalies karkasų struktūroje skaičiavimus nustatyta, kad beveik 83 proc. RC/CB karkaso struktūroje sudaro 200–500 μm skersmens akutės, o RC/CB-HAp karkaso struktūroje 300–700 μm skersmens akutės sudaro 67 proc. visų akučių pagal tūrį (3.5 pav.). Akučių dydžio pasiskirstymas kompozituose su sepijos kaulo medžiagomis rodo, kad karkasuose mažiausiai aptinkama iki 100 μm skersmens akučių ir beveik nėra akučių, kurių skersmuo viršija 800 μm.

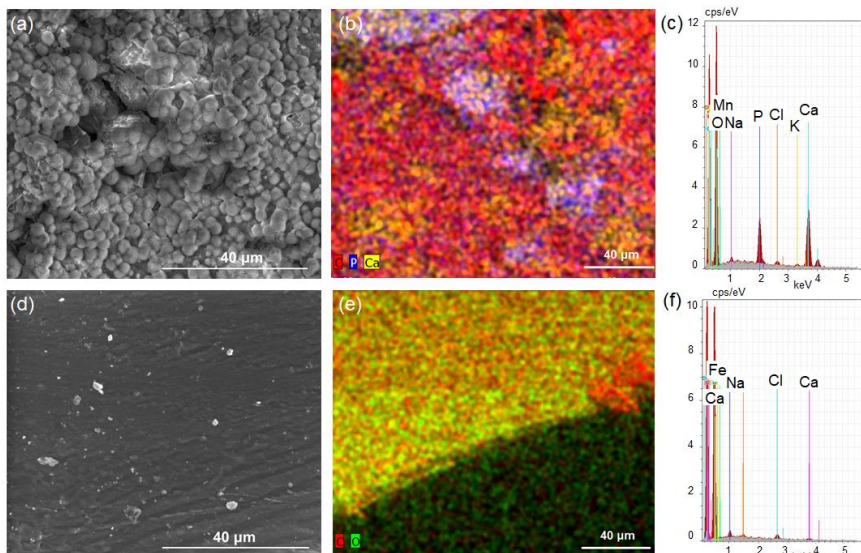


**3.5 pav.** RC/CB ir RC/CB-HAp kompozitų akučių dydžio pasiskirstymas

Gautų kompozitų akytumas atitinka reikalavimus medžiagoms, skirtoms kaulo audinio inžinerijos tikslams, kadangi mažesnės nei 100 μm akutės kaulo karkase trukdo formuotis kraujo kapiliarams, susidarant fibroziniam audiniui. O didelės akutės, kurių skersmuo viršija 800–900 μm, sumažina karkaso mechaninį atsparumą.

### **3.5. Kompozitų su sepijos kaulo medžiaga bioimitacinė mineralizacija**

Bioimitacinės mineralizacijos tyrimai atliekami siekiant įvertinti kuriamo karkaso bioaktyvumą, kurį parodo gebėjimas karkaso paviršiuje formuoti kalcio jonų centrus tolimesniam hidroksiapatito – pagrindinio kaulo mineralų junginio – susidarymui. Šiuose *in vitro* tyrimuose dažniausiai naudojamas MKS, atkartojantis kraujo plazmos cheminių elementų kokybinę ir kiekybinę sudėtį.

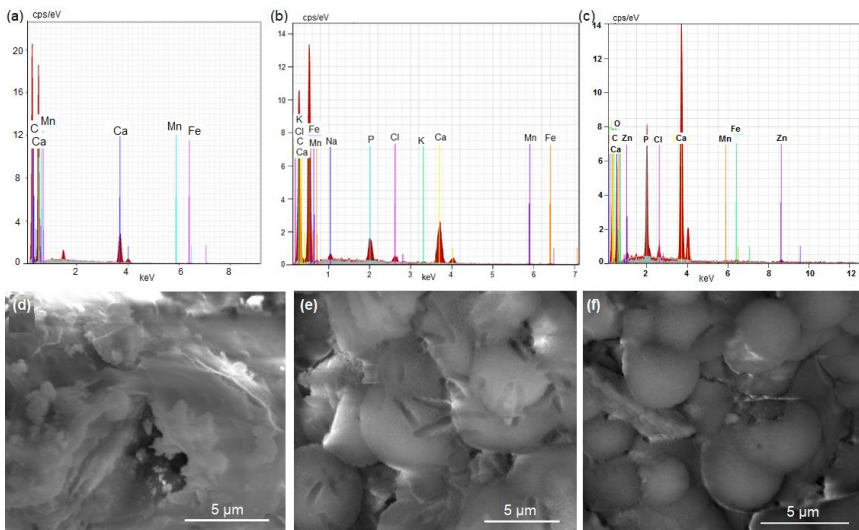


**3.6 pav.** Karkasų, vieną savaitę laikytų MKS, charakterizavimas: (a, d) atitinkamai RC/CB ir RC karkasų mikrofotografijos; (b, c) atitinkamai RC/CB karkaso elementų pasiskirstymo žemėlapis ir spektras; (e, f) atitinkamai RC karkaso elementų pasiskirstymo žemėlapis ir spektras

Jau po vienos savaitės karkasų laikymo MKS buvo matyti, kad RC/CB karkasų paviršiuje susidaro tankus mikrosferų formos sluoksnis (3.6 pav., a), būdingas hidroksiapatitui. Anglies, fosforo ir kalcio elementų pasiskirstymą karkaso paviršiuje SEM-EDS nuotraukoje taip pat patvirtina elementinės analizės spektras (3.6 pav., b, c). Priešingai, RC karkaso paviršiuje nėra pastebimas mikrosferų susidarymas (3.6 pav., d), tai patvirtina ir EDS analizės rezultatai (3.6 pav., e, f).

Prieš bioimitacinės mineralizacijos tyrimą RC/CB karkaso paviršiuje fosforo nerasta (3.7 pav., a). Elementų pasiskirstymo spektrų duomenimis buvo patvirtinta, kad bioneorganinių elementų, tokių kaip fosforas, manganas, geležis ir cinkas, randama RC/CB karkasų paviršiuje, laikant juos iki 24 savaičių MKS (3.7 pav., b ir 3.7 c). Įvairių autorių duomenimis, šie mikroelementai yra svarbūs kaulo audinio regeneravimui, kadangi pagerina osteoblastų ląstelių adheziją ir osteokalcino augimą.

Susidariusių mikrosferų morfologija atitiko vadinamojo apatito „žiedinio kopūsto“ struktūrą (*angl. „cauliflower-like“ morphology*), kuri yra būdinga hidroksiapatito pirmtakų struktūrai (3.7 pav., e, f). Adatų pavidalo įspaudai, rasti kai kurių mikrosferų paviršiuose (3.7 pav., e), parodo, kad plokštelių formos apatitai yra išsidėstę išilgai mikrosferų ir yra transformuoti iš šių apatito pirmtakų.



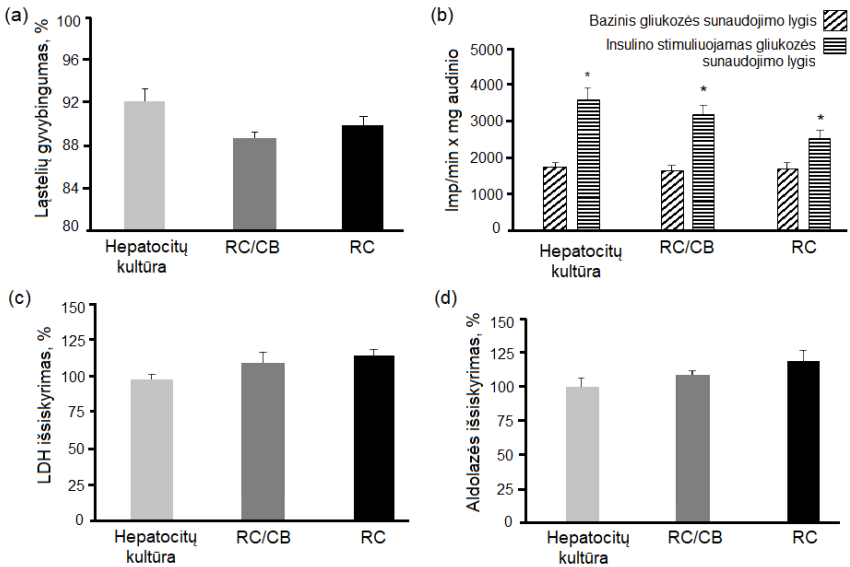
**3.7 pav.** RC/CB karkasų paviršiaus elementų pasiskirstymo žemėlapis ir spektras, atitinkamai: (a, d) prieš tyrimą; (b, e) po 2 savaičių laikymo MKS; (c, f) po 24 savaičių laikymo MKS

Sepijos kaulo mikrodalėlės taip pat turėjo teigiamos įtakos karkasų vandens sulaikymo, brinkimo laipsnio ir masės kitimo rodikliams. Nustatyta, kad MKS pH liko neutralus viso tyrimo metu (24 savaičių laikotarpiu), tai leidžia daryti prielaidą, jog karkasų irimo metu formuojasi tik neutralūs reakcijos tarpiniai produktai. Šis faktas yra palankus fizikinis veiksnys kaulo audinio inžinerijoje, kadangi taip gali būti išvengta uždegimo reakcijų *in vivo*.

Apibendrinant galima daryti išvadą, kad tyrimo MKS metu celiuliozės / sepijos kaulo karkasai pasižymėjo bioaktyvumu dėl jų paviršiuje besiformuojančių hidroksiapatito pirtakų.

### 3.6. Biosuderinamumo tyrimai

Biosuderinamumo (citotoksiškumo) tyrimai yra neatsiejama pradinių klinikinių tyrimų dalis, siekiant įvertinti karkasų tinkamumą ir pritaikomumą medicinos praktikoje. Šiame darbe karkasų įtakai ląstelių gyvybingumui įvertinti parinkti hepatocitai – kepenų ląstelės, kadangi jos ypač jautrios bet kokiems toksiniams ar fizinio pažeidimo veiksniams ir todėl yra geri šalutinių reakcijų ir / ar medžiagų apykaitos produktų irimo indikatoriai. Tyrimo metu pradinis izoliuotų hepatocitų gyvybingumas (95 proc.) po inkubavimo su RC/CB karkaso mėginiu buvo sumažėjęs labai nedaug (3.8 pav., a).



**3.8 pav.** RC/CB ir RC karkasų poveikis tyrimų parametrams: (a) hepatocitų gyvybingumui; (b) *extensor digitorum longus* raumens ląstelių insulino stimuliuojamam gliukozės sunaudojimui\*; (c) laktato dehidrogenazės išsiskyrimui iš hepatocitų į inkubavimo terpę; (d) aldolazės išsiskyrimui iš raumens ląstelių į inkubavimo terpę

\*  $P < 0,05$ , palyginti su baziniu gliukozės sunaudojimo lygiu

Palyginus mėginių poveikį hepatocitų gyvybingumui, buvo nustatyta, kad šis skirtumas buvo nedidelis ir neperžengė normos (leidžiamos ribos siekia 60 proc.). Tai rodo, kad sėpijos kaulo medžiaga, imobilizuota į celiuliozės karkasą, neturi neigiamos įtakos ląstelių gyvybingumui.

Insulino poveikis gliukozės sunaudojimui tirtas su *extensor digitorum longus*<sup>1</sup> (EDL) raumens ląstelėmis. Sumažėjęs jautrumas insulinui parodo, kad ląstelės yra veikiamos nenormalių fiziologinių veiksnių. Tyrimų metu nustatyta, kad po inkubacijos su RC/CB karkasu EDL raumens ląstelių jautrumas insulinui tik nedaug skyrėsi nuo bazinio lygio. Šis tyrimas įrodo, kad kompozitas neturi ardomojo poveikio raumens ląstelių vientisumui (3.8 pav., b).

Laktato dehidrogenazės ir aldolazės išsiskyrimas iš ląstelių į inkubavimo terpę liudija apie ląstelės membranos vientisumo pažeidimą, t. y. rodo, kad pro membranos plyšius praėina didelės baltymų molekulės. RC/CB ir RC karkasai neturėjo įtakos laktato dehidrogenazės išsiskyrimui (3.8 pav., c). Nedidelis fermentų aktyvumo pokytis po inkubacijos su RC/CB kompozitų mėginiais (3.8

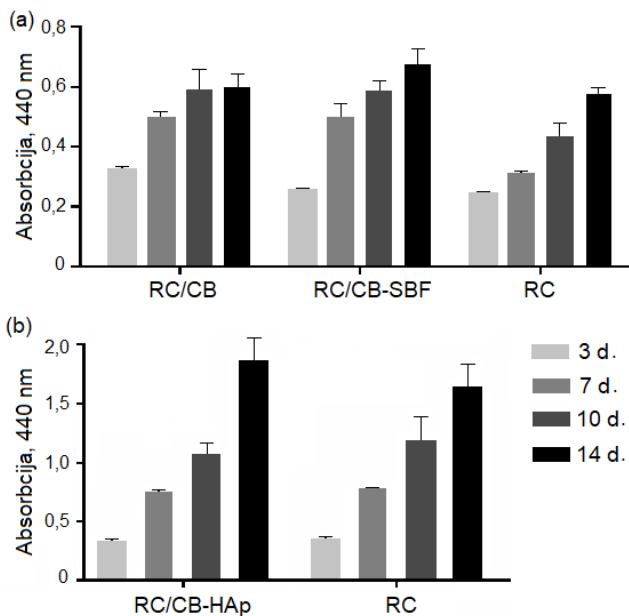
<sup>1</sup> *Extensor digitorum longus* – blauzdos priekinėje dalyje esantis raumuo, susidedantis iš trijų pagrindinių griaučių raumenų grupių (raudonųjų, baltųjų ir tarpinių raumenų skaidulų).



pav., d) aiškiai pademonstravo, kad sepijos kaulo medžiaga ir regeneruota celiuliozė karkaso sudėtyje neturi neigiamos įtakos gyvųjų ląstelių gyvybingumui ir ląstelės membranų vientisumui.

### 3.7. Osteokonduktyvumo tyrimai

Kaulo audinio inžinerijoje osteokondukcija – tai medžiagos gebėjimas skatinti naujo kaulo audinio augimą ir jo sukibimą su implantu (medžiagos karkasu). Naujo kaulo audinio formavimasis pažeidimo vietoje priklauso nuo tinkamos osteoblastų (kaulo ląstelių, formuojančių kaulo audinį) ir osteoklastų (kaulo ląstelių, ardančių kaulo audinį) veiklos. Siekiant nustatyti, ar osteoblastų ląstelės geba prisitvirtinti ir daugintis (proliferuoti) sukurtų karkasų paviršiuje, buvo atlikti tyrimai su žmogaus MG-63 osteoblastų ląstelėmis. Nustatyta, kad jau po 7 dienų inkubavimo, ląstelės sėkmingai dauginosi RC/CB, RC/CB-SBF ir RC/CB-HAp kompozitų paviršiuose (3.9 pav.).

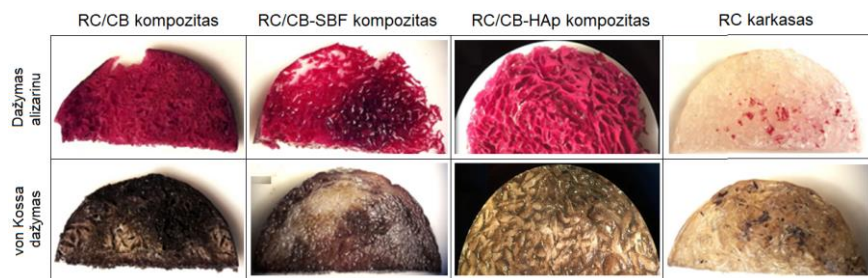


**3.9 pav.** MG-63 ląstelių proliferacija įvairių karkasų paviršiuje: (a) RC, RC/CB ir RC/CB-SBF karkasų ir (b) RC ir RC/CB-HAp karkasų

Pažymėtina, kad ant kontrolinio mėginio paviršiaus be sepijos kaulo medžiagos (RC karkaso) ląstelių proliferacija buvo mažesnė. RC/CB-SBF karkasuose, kurių paviršius buvo papildomai padengtas kalcio mineralais, ląstelių proliferacija vyko intensyviau nei RC/CB karkasų, kurių paviršius nebuvo papildomai modifikuotas.

Osteogeninis MG-63 ląstelių aktyvumas inkubuojant su karkasais papildomai įvertintas nustatant šarminės fosfatazės aktyvumą. Pirminėse natūralios mineralizacijos stadijose šarminė fosfatazė kontroliuoja osteoblastų diferenciaciją, reguliuodama neorganinių fosfatų formavimąsi. Po to, kai prasideda mineralizacija, fermento lygis nebekyla, ir prasideda mineralizuoto karkaso formavimasis, susidarant hidroksiapatito kristalams. Šarminės fosfatazės aktyvumas buvo kiek didesnis RC/CB tipo karkasuose, palyginti su RC karkasais, tačiau statistiškai ryškių skirtumų tarp visų karkasų grupių viso tyrimo metu nepastebėta. Mažiausias šarminės fosfatazės aktyvumas buvo pastebimas inkubuojant su RC/CB-HAp karkasais. Tai gali būti aiškinama tuo, kad hidroksiapatitas, esantis RC/CB-HAp karkaso sudėtyje, paskatino ir pagreitino mineralizacijos procesą jau pradinėse inkubavimo stadijose.

Mineralizacijos efektyvumas buvo įvertintas nustatant kalcio ir fosforo mineralų nusėdimą ant karkasų paviršiaus von Kossa ir alizarino dažymo metodais. Šie metodai parodo vadinamąjį „kalcifikacijos kiekį“.



**3.10 pav.** Karkasų paviršių stereomikroskopijos nuotraukos po 7 dienų inkubavimo

Dažai fiksuoja fosfatų nusėdimą, o tai bendruoju atveju siejama su „kalcifikacijos“ terminu ir naudojama kaulo audinio mineralų susidarymui apibūdinti (3.10 pav.). Mineralų nusėdimas buvo pastebimas kiekvienos tiriamosios grupės karkasų paviršiuose jau po 7-ių dienų inkubavimo (3.10 pav.). Didesnis mineralų kiekis buvo kompozitinių karkasų su sepijos kaulo medžiaga paviršiuose, palyginti su kontroline grupe. Karkasų padengimas kalcio mineralais (RC/CB-SBF karkasas) ir hidroksiapatito imobilizavimas (RC/CB-HAp karkasas) turėjo teigiamos įtakos jų mineralizacijai.

### **3.8. Kalcio alginato kapsulės su sepijos kaulu ir deksametazono natrio fosfatu**

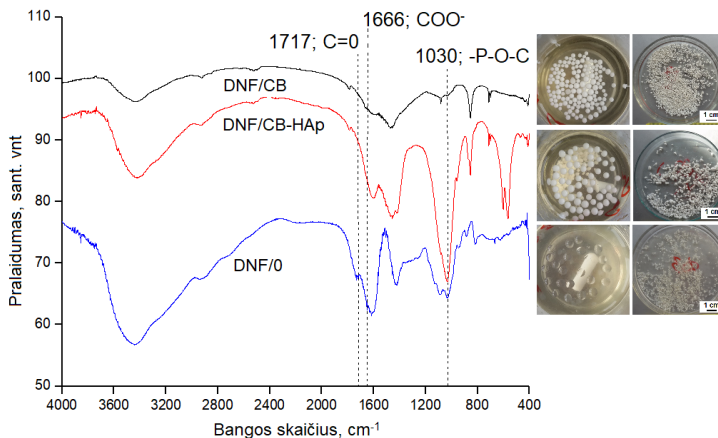
Kalcio alginato kapsulės su sepijos kaulo medžiaga buvo sukurtos norint jas panaudoti nedideliems kaulo defektams pašalinti. Tokios kapsulės tinka nedideliems kaulo audinio defektams, kurie atsiranda sergant endodonto arba periodonto ligomis, užpildyti ir gydyti. Trys kapsulių rūšys skyrėsi mineralinio užpildo sudėtimi, o kapsulių pagrindas visais atvejais buvo vienodas (3.4 lent.). Modelinio vaisto deksametazono natrio fosfato įkapsuliovimo efektyvumas

mineralais armuotose kapsulėse (DNF/CB ir DNF/CB-HAp) buvo beveik dvigubai didesnis nei kapsulėse be mineralinio užpildo (DNF/0): atitinkamai  $19,2 \pm 0,2$  proc.,  $24,2 \pm 0,3$  proc. ir  $12,3 \pm 0,1$  proc. Chitozano priedas tinklinimo tirpale sutvirtino kapsulių apvalkalo struktūrą. Kalcio chlorido tirpalas buvo naudotas kaip kalcio jonų šaltinis alginato geliacijai rūgščioje terpėje inicijuoti (joninė geliacija). Gliukono-delta-laktonas pagerina alginato hidrogelio geliacijos procesą, užtikrinamas laipsnišką pH sumažėjimą nuo neutralaus iki rūgštinio.

**3.4 lentelė.** Kalcio alginato kapsulių su sepijos kaulo medžiaga sudėtis

Kapsulių rūšis	Veiklioji medžiaga	Mineralinis užpildas	Kapsulių matrica	Tinklinimo tirpalas
DNF/CB	0,4 proc. DNF	10 proc. sepijos kaulo	2 proc. natrio alginato	1,0 proc. CaCl <sub>2</sub> + 5,0 proc. GDL + 1,5 proc. chitozano
DNF/CB-HAp		10 proc. HAp iš sepijos kaulo		
DNF/0		–		

Neintensyvios sugerties juostos ties  $1717\text{ cm}^{-1}$ ,  $1666\text{ cm}^{-1}$  ir  $1030\text{ cm}^{-1}$  bangos ilgiu, priskiriamos atitinkamai C=O grupės virpesiams, COO<sup>-</sup> grupės asimetriniams virpesiams ir P–O–C grupės virpesiams, pastebimos visų kapsulių IR spektruose (3.11 pav.). Intensyvios P–O–C grupės sugerties juostos pastebimos

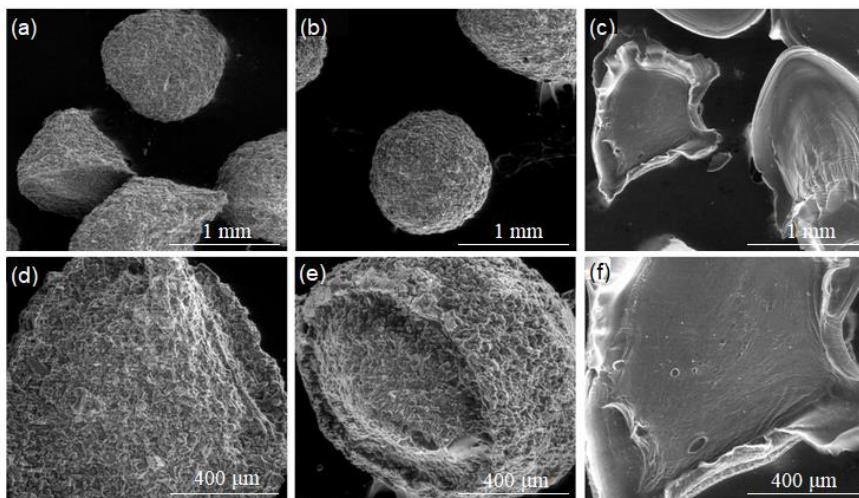


**3.11 pav.** Kalcio alginato kapsulių su CB ir deksametazono natrio fosfatu IR spektrai. Šlapių (kairėje) ir liofilizuotų (dešinėje) kapsulių nuotraukos pateiktos greta atitinkamų IR spektrų

tik DNF/CB-HAp kapsulių IR spektre dėl sudėtyje esančio hidroksiapatito. Visos paminėtos sugerties juostos yra būdingos DNF, ir tai įrodo sėkmingą DNF imobilizavimą kapsulių sudėtyje, o nedidelis kai kurių sugerties juostų

intensyvumas paaiškinamas persidengimu su kalcio alginato, chitozono ar sepijos kaulo medžiagos funkcinių grupių sugerties juostomis. Deksametazono natrio fosfato ( $\text{PO}_3^{4-}$ ) ir chitozono ( $\text{NH}^{3+}$ ) funkcinių grupių joninė sąveika turi įtakos bendram vaisto įkapsuliavimo laipsniui. Kita vertus, stipri vaisto molekulių ir struktūrinio polimero sąveika nėra rekomenduojama, kadangi gali sumažinti vaisto atpalaidavimą į biologinę terpę.

Vidutinis DNF/CB, DNF/CB-HAp ir DNF/0 kapsulių dydis atitinkamai buvo  $0,89\text{--}0,93 \pm 0,05$  mm,  $0,9\text{--}0,94 \pm 0,08$  mm ir  $0,98\text{--}1,2 \pm 0,04$  mm. Nors šlapios kapsulės turėjo sferinę struktūrą, ši struktūra pasikeitė po džiovavimo su pastebimais skirtumais tarp kapsulių su mineraliniu užpildu ir be jo (3.12 pav.).



**3.12 pav.** Sausų kalcio alginato kapsulių su deksametazono natrio fosfatu, padengtu chitozono sluoksniu, SEM nuotraukos: (a, d) su sepijos kaulo medžiaga (DNF/CB); (b, e) su hidroksiapatitu, gautu iš sepijos kaulo medžiagos (DNF/CB-HAp), ir (c, f) be jokio mineralinio užpildo (DNF/0)

Sepijos kaulo medžiaga sutvirtino kapsulių struktūrą, o kapsulių su mineraliniu užpildu po džiovavimo liofilizuojant forma pakito mažiausiai. Jų struktūroje matyti nedaug klosčių ir įdubų – tai neišvengiama dėl kontrakcijos ir polimerinio tirpalo klampos padidėjimo, esant bet kokiam džiovavimo procesui.

Iš nuotraukų matyti, kad kapsulių su mineraliniais užpildais paviršius yra guoblėtas ir padengtas tolygiai (3.12 pav., d, e). Galima daryti išvadą, kad armavimas mineraliniu užpildu ir kaip džiovavimo būdas pasirinkta liofilizacija neturėjo didelės įtakos kapsulių struktūros pokyčiams. Priešingai, kapsulių DNF/0 be jokio mineralinio užpildo struktūra ryškiai pasikeitė, jos prarado sferinę formą, o paviršiuje matėsi daug plyšių ir raukšlių (3.12 pav., f).

Brinkimo tyrimas *in vitro* buvo atliekamas siekiant nustatyti kapsulių funkcionalumą fiziologinėmis sąlygomis, t. y. esant 37 °C temperatūrai ir įvertinant burnos ertmės seilių pH (6,7–7,3) bei dantenu plyšių skysčio pH (7,5–8,7). Po 2 val. buvo pastebėtas visiškas DNF/CB-HAp kapsulių suirimas, rodantis greitą vaisto deksametazono natrio fosfato ir hidroksiapatito atpalaidavimą į inkubavimo terpę. DNF/CB kapsulių brinkumo laipsnis sumažėjo po 1 val., kapsulės dalinai suiro fosfatiname buferyje. Kapsulės be mineralinio užpildo (DNF/0) pasižymėjo didžiausiu brinkumo laipsniu, palyginti su DNF/CB ir DNF/CB-HAp kapsulėmis, kurių struktūra buvo stabilizuota mineraliniais užpildais. Atsižvelgiant į tai, kad vidiniai kaulo defektai sergant periodonto ligomis yra riboto tūrio, toks brinkimas yra labiau pageidautinas.

### 3.9. Hemostatinio, antibakterinio ir poveikio keratinocitams tyrimai

Tiriant hemostatinį sepijos kaulo medžiagų poveikį *in vitro* nustatyta, kad tiek deproteinizuota (CB-1), tiek ir medžiaga po apdoravimo šarmais (CB-2) turėjo teigiamos įtakos „egzoterminės reakcijos“ vertėms, krešulio susidarymo laikui ir keletui kitų kraujo krešulio susidarymui svarbių kokybinių rodiklių. Kraujo skystos terpės temperatūros padidėjimas („egzoterminė reakcija“) gali pasireikšti dėl kraujo forminių elementų koaguliacijos po sąlyčio su hemostatine medžiaga. Tai yra nepageidaujamas reiškinys, galintis sukelti pažeistos vietos skausmą, minkštųjų audinių nudegimą ar net nekrozę. Dėl šių priežasčių hemostatinų medžiagų „egzoterminės reakcijos“ vertės galėtų būti tik minimalios. Minimalus temperatūros padidėjimas liečiantis su kraujo mėginiu buvo matomas CB-1 medžiagos atveju ( $0,1 \pm 0,1$  °C), palyginti su kitomis mineralinės kilmės medžiagomis ir komerciniu produktu *Celox* (chitino / chitozano pagrindu). CB-2 medžiagos temperatūra kontaktuojant su kraujo mėginiu padidėjo  $1,1 \pm 0,2$  °C, tačiau ši vertė buvo mažesnė nei komercinio produkto *Celox* ( $1,3 \pm 0,3$  °C).

Kraujo mėginio su CB-1 medžiagos priedu koaguliacijos greitis, palyginti su kontroliniu mėginiu, sumažėjo nedaug (atitinkamai  $8,7 \pm 0,2$  min. ir  $8,8 \pm 0,1$  min.), o su CB-2 medžiagos priedu kraujo koaguliacijos greitis sumažėjo beveik dviem minutėmis ( $7,0 \pm 0,4$  min.) ir buvo mažesnis nei su komercinio hemostatiko *Celox* priedu ( $8,0 \pm 0,4$  min.).

Tyrimai su HaCaT eilės žmogaus keratinocitais (odos epidermio ląstelėmis) parodė, kad sepijos kaulo medžiagos milteliai nėra citotoksiški, ląstelių žūties nesukelia, tačiau ląstelių proliferavimo neskatina, kadangi sepijos kaulo milteliai nesudaro vientisos struktūros, o yra sudaryti iš atskirų nesujungtų mikrodalelių. Antimikrobinio poveikio *Staphylococcus aureus* ir *Pseudomonas aeruginosa* tyrimų metu buvo nustatyta, kad sepijos kaulo medžiaga nepasižymi bakteriostatinu ar baktericidiniu poveikiu šiems patogeninėms bakterijoms.

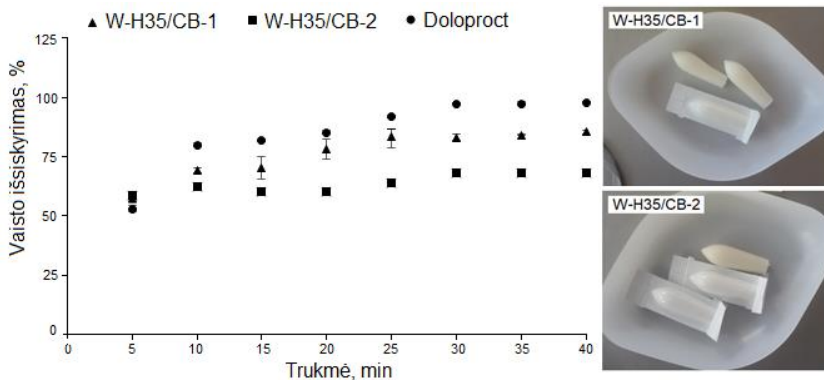
Tyrimai parodė, kad sepijos kaulo milteliai tinka naudoti žaizdoms ir nudegimams gydyti dermatologijoje ar stabdant kraujavimą, tačiau juos reiktų imobilizuoti į farmacinę laisvą dispersinę sistemą (pvz., kremai, geliai, tepalai) ar

surištą dispersinę sistemą (pvz., žvakutės). Sepijos kaulo milteliai taip pat tinka paviršinių žaizdų kraujavimui stabdyti.

### 3.10. Žvakutės su sepijos kaulo medžiaga

Hemostatinėmis ir anestetinėmis savybėmis pasižyminčių žvakučių receptūros buvo kuriamos su sepijos kaulo medžiaga ir lidokaino hidrochloridu, kaip pagrindą naudojant *Witepsol H35* (augalinės kilmės mono-, di- ir trigliceridų mišinys), kuris yra plačiai naudojamas farmacinėje pramonėje dėl tinkamų fizikinių ir cheminių savybių bei prieinamos kainos. *Witepsol* pagrindai atitinka daugelį žvakučių pagrindams keliamų reikalavimų: (a) lydosi, tirpsta ir disperguojasi, kai pasiekia 37 °C temperatūrą, (b) nedirgina gleivinės, (c) yra didelio fizinio stabilumo, dėl to yra patogus gaminti ir laikyti, (d) pasižymi cheminiu stabilumu ir inertiškumu, (e) patogus naudoti (netirpsta rankose, nelūžta), (f) ištirpusio klampa didelė (dėl ko neišteka iš tiesiosios žarnos). *Witepsol H35* kietųjų riebalų sudėtyje yra tik apie 15 proc. digliceridų ir 1 proc. monogliceridų, todėl jie pasižymi dideliu stabilumu. Norint išlieti *Witepsol* pagrindą, naudojamos automatinės liejimo mašinos. Šio žvakučių pagrindo lydymosi temperatūra yra 33,5–35,5 °C, jis skirtas naudoti žvakutėms gaminti, kai kietų aktyvių junginių yra < 25 proc.

Lyginant lidokaino hidrochlorido (vietinio anestetiko) atpalaidavimo kinetiką matyti, kad vaistinės medžiagos koncentracija fosfatiniame buferyje kito panašiai visose tiriamosiose grupėse: žvakučių su sepijos kaulo medžiaga CB-1 (W-H35/CB-1), žvakučių su sepijos kaulo medžiaga CB-2 (W-H35/CB-2) ir komercinių žvakučių *Doloproct* (3.13 pav.).



3.13 pav. Lidokaino hidrochlorido išsiskyrimas iš lipofilinių žvakučių

Lėčiausias lidokaino hidrochlorido išsiskyrimas buvo iš W-H35/CB-2 žvakučių, kurių sudėtyje yra chitozano. Farmacinėje ir biomedicininėje inžinerijoje chitozanas dažnai naudojamas vaistų atpalaidavimui kontroliuoti; tai

savo darbuose patvirtina ir kiti autoriai, tiriantys chitozano / lidokaino kompleksų efektyvumą pailgintam anestetiniam poveikiui pasiekti. Vaistinės medžiagos išsiskyrimo kinetika iki galo neatspindi rektalinių preparatų kokybės, nes vaisto bioprieinamumo mechanizmas yra sudėtingas. Bioprieinamumą (vaisto molekulių patekimą į sisteminę kraujotaką) lemia fizikinės-cheminės savybės, tokios kaip vaisto tirpumas fiziologinėje terpėje, dalelių dydis, žvakučių pagrindo sudėtis ir kt. Į šiuos faktorius atsižvelgta pasirenkant žvakučių komponentus: a) lidokaino hidrochlorido tirpumas vandenyje yra 50 mg/ml, tai užtikrintų jo tirpumą rektaliniame skystyje; b) vandenyje netirpios sepijos kaulo dalelės yra mikronų dydžio, tai pagerintų jų absorbciją; c) *Witepsol* žvakučių pagrindas lydosi kūno temperatūroje ir absorbuojasi gleivinėje; d) karbopolio priedas pagerintų mukoadheziją. Įvertinus pagamintų žvakučių savybes *in vitro* nustatyta, kad jų lydymosi temperatūra ir kiti fizikiniai-cheminiai parametrai atitinka keliamus reikalavimus.

## IŠVADOS IR APIBENDRINIMAI

1. Pirmą kartą atlikus nuodugnią sepijos kaulo elementinę analizę nustatyta, kad įvairūs makro-, mikroelementai ar jų pėdsakai – Ca, P, Na, Mg, Cu, Sr, Cl, K, S, Br, Fe ir Zn yra būdingi tiek lamelinei, tiek dorsalinei sepijos kaulo dalims, nustatyti jų kiekiai. Biologiškai nepalankių elementų, tokių kaip sidabras, kadmis, švinas ir vanadis, sepijos kaulo medžiagoje nerasta. Sepijos kaulo mikrodalelių necitotoksiškumas buvo įrodytas atlikus tyrimus su HaCaT keratinocitais. Tyrimais *in vitro* nustatyta, kad sepijos kaulo medžiaga ir aragonito / chitozano kompleksas, gautas iš sepijos kaulo po hidroterminio apdorojimo šarmais, pasižymi kraujavimą stabdančiomis savybėmis ir gali būti rekomenduojamas naudoti dermatologijoje. Antibakteriniu poveikiu *Staphylococcus aureus* ir *Pseudomona aeruginosa* smulkinta sepijos kaulo medžiaga nepasižymėjo.

2. Pirmą kartą nustatyta, kad natrio dodecilsulfato ir karbamido tirpalas, esant 80 °C temperatūrai, efektyviai pašalina baltymus iš sepijos kaulo medžiagos.

3. Nustatyta, kad sepijos kaulo mikrodalelių imobilizavimas į celiuliozės karkasą paskatina hidroksiapatito pirmtakų formavimąsi aktyvų kompozitų paviršiuje imersijos modeliniame kūno skystyje metu. Atlikti tyrimai patvirtino tai, kad kompozitai su sepijos kaulo mikrodalelėmis arba hidroksiapatitu, susintetintu iš sepijos kaulo, yra necitotoksiški. Tyrimais su MG-63 osteoblastų ląstelėmis įrodyta, kad kompozitai pasižymi osteokondukcinėmis savybėmis ir tinkami naudoti kaulo audinio inžinerijoje.

4. Kalcio alginato kapsulės su deksametazono natrio fosfatu ir mineraliniais užpildais iš sepijos kaulo mikrodalelių arba hidroksiapatito, susintetinto iš sepijos kaulo mikrodalelių, buvo sukurtos naudojant joninės geliacijos metodą. Vidutinis sausų kapsulių dydis buvo panašus į periodonto kišenių būdingą dydį, todėl kapsulės yra tinkamos smulkiems kaulo defektams burnos ertmėje užpildyti.

5. Tyrimo metu buvo nustatyta, kad hidroksietilceliuliozės pagrindu su sepijos kaulo mikrodalelėmis suspenduoti geliai pasižymi reikalingomis fizikinėmis-cheminėmis ir reologinėmis savybėmis ir gali būti panaudoti dermatologijoje. Tyrimo metu nustatyta, kad žvakutės *Witepsol* pagrindu su sepijos kaulo medžiagų mikrodalelėmis pasižymi reikalingomis fizikinėmis savybėmis ir laipsnišku lidokaino hidroklorido išsiskyrimu fosfatiniame buferyje.



## MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

### STRIPS NIAI

#### **Clarivate Analytics Web of Knowledge pagrindinio sąrašo leidiniuose**

1. Alisa Palavenienė, Kristina Glambaitė, Andrius Jaskūnas, Odeta Baniukaitienė, Jolanta Liesienė. Biomimetic mineralisation on cellulose/cuttlebone scaffolds // *Chemija*. 2017. 28(3), p. 148–153.

2. Alisa Palavenienė, Volodymyr Harkavenko, Vitalina Kharchenko, Povilas Daugėla, Mindaugas Pranskūnas, Gintaras Juodžbalys, Nataliya Babenko, Jolanta Liesiene. Cuttlebone as a Marine-derived Material for Preparing Bone Grafts // *Marine Biotechnology*. 2018. p. 1–12.

3. Odeta Baniukaitiene, Alisa Palaveniene, Nataliya Babenko, Vladimir Harkavenko, Vitalina Kharchenko, Arvydas Usas, Jolanta Liesiene. The impact of cellulose/hydroxyapatite composites on liver cells and skeletal muscle // *Cellulose Chemistry and Technology*. 2017 (priimtas spaudai).

4. Alisa Palaveniene, Migle Lebedevaite, Jolanta Liesiene. Alginate Capsules with Cuttlebone-derived Fillers as an Integrated Solution for Bone Repair // *Materials Science*. 2017 (priimtas spaudai).

#### **Kituose Clarivate Analytics Web of Knowledge duomenų bazėse referuojamuose leidiniuose [Proceedings ir kt.]**

1. Baniukaitienė, Odeta; Liesienė, Jolanta; Palavenienė, Alisa; Juodžbalys, Gintaras; Daugėla, Povilas; Pranskūnas, Mindaugas. Cellulose-based grafts for bone regeneration//*Biomedical Engineering-2015: Proceedings of 19<sup>th</sup> International conference: [Kaunas, Lithuania, 26-2 November 2015] / Kaunas University of Technology. Biomedical Engineering Institute. Lithuanian Society of Biomedical Engineering. Kaunas: Technologija. ISSN 2029-3380, p. 19-22.*

2. Palavenienė, Alisa; Glambaitė, Kristina; Baniukaitienė, Odeta. Fabrication of cellulose-based scaffolds containing cuttlebone microparticles // *Chemistry and chemical technology: proceedings of the international conference, 25 April, 2014 / Kaunas University of Technology. Kaunas: Technologija. ISSN 2351-5643. 2014, p. 321-324.*

#### **Konferencijų pranešimų medžiagoje**

1. Palavenienė, Alisa; Lebedevaite, Miglė. Cuttlebone-derived fillers for dexamethasone-loaded alginate capsules // *Advanced materials and technologies: book of abstracts of the 19th international conference-school, 27-31 August 2017, Palanga, Lithuania. Kaunas: Kaunas University of Technology. ISSN 1822-7759. 2017, P76, p. 103.*

2. Palavenienė, Alisa; Kunciuotė, A.; Liesienė, Jolanta. Topical semi-solid preparations with powdered cuttlebone for treatment of chemical burns//*NIBS Conference 2017: book of abstracts of the international conference*

„Nanotechnology and innovation in the Baltic Sea region“, 14-16 June 2017, Kaunas, Lithuania. Kaunas: Kaunas University of Technology, 2017. ISBN 9786090213452. p. 76.

3. Palavenienė, Alisa; Glambaitė, Kristina; Liesienė, Jolanta. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite from cuttlebone for filling bone defects//Chemistry and chemical technology 2017: proceedings of the international conference, April 28th, 2017. Kaunas: Kaunas University of Technology. ISSN 2538-7359. 2017, p. 51.

4. Palavenienė, Alisa; Kunciuūtė, A.; Danilovas, Paulius; Liesienė, Jolanta. Development and physicochemical characterisation of witepsol/cuttlebone suppositories with lidocaine//Chemistry and chemical technology 2017: proceedings of the international conference, April 28th, 2017, Kaunas. Kaunas: Kauno technologijos universitetas. ISSN 2538-7359. 2017, p. 59.

5. Palavenienė, Alisa; Petraitytė, Sigita; Budvytienė, Monika. Os Sepia as a versatile marine derived material for dermatological applications: preliminary study//Coins: International conference: abstract book. 2017, p. 46-47.

6. Palavenienė, Alisa; Lebedevaitė, Miglė. Preparation and characterisation of ionically cross-linked alginate/cuttlebone beads//Chemistry and chemical technology: international conference of Lithuanian Society of Chemistry: Lithuanian Academy of Science, Vilnius, Lithuania, April 28-29, 2016: book of abstracts / Fizinių ir technologijos mokslų centras, Vilniaus universitetas, Lietuvos mokslų akademija, KTU. 2016. ISBN 9786099551135. p. 195.

7. Palavenienė, Alisa; Smalinskaitė, Milda; Glambaitė, Kristina; Danilovas, Karolis. Jūrinės kilmės žaliavos taikymas dermatologijoje//Mokslas – sveikatai: IX nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija, 2016 m. balandžio 13 d., Kaunas: konferencijos tezių knyga/Lietuvos sveikatos mokslų universitetas. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Leidybos namai, 2016. ISBN 9789955154310. p. 10-11.

8. Palavenienė, Alisa; Glambaitė, Kristina; Baniukaitienė, Odeta. Biomimetic mineralization of cellulose-based scaffolds for bone tissue engineering // FBPS'15: 11th international symposium on frontiers in biomedical polymers, Riva del Garda, Italy, July 8-11, 2015. 2015, P2, p. 1.

9. Palavenienė, Alisa; Baltrukevičiūtė, Augustė. Physicochemical properties of suppositories with biologically active compounds//50-ųjų chemikų dienų konferencija = Conference for the 50th chemistry days, Vilnius, Lithuania, April 17-18, 2015: book of abstract. 2015. ISBN 9786094594960. p. 19.

10. Liesienė, Jolanta; Petrauskaitė, Odeta; Palavenienė, Alisa; Viškelis, Pranas. Tuning the morphology of cellulose/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering application//ECIS2014: 28th conference of The European Colloid and Interface Society, Limassol, Cyprus, September 7-12, 2014 / Israel Institute of Technology. 2014, PA-9, p. 11.

## CURRICULUM VITAE

Vardas, pavardė:	Alisa Palavenienė
Gimimo data:	1980 m. rugpjūčio 31 d.
El. paštas:	alisa.palavenis@gmail.com
Išsilavinimas:	
2008 birželis	Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas, chemijos magistrė
2009 kovas	Kauno medicinos universitetas, Farmacijos fakultetas, farmacijos magistrė
Darbo patirtis:	
2016 rugsėjis – iki dabar	Lektorė. Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas, Polimerų chemijos ir technologijos katedra
2015	Asistentė. Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas, Polimerų chemijos ir technologijos katedra
2014 – 2015	Asistentė. Kauno kolegija, Medicinos ir socialinių mokslų studijų centras
2014	Jaunesnioji mokslo darbuotoja. Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas, Polimerų chemijos ir technologijos katedra
2004–2016	Vaistininė, vaistinės vedėjos, vaistinės vedėjos-farmacinės veiklos vadovės pareigos visuomeninėse vaistinėse: UAB „Gintarinė vaistinė“, UAB „Aibės vaistinė“, UAB „Eurovaistinė“
1998–1999	Odontologinių prekių vadybininkė. UAB „Pardes“
Stažuotės:	
2017-06-05 – 2017-06-09	Vasaros mokykla <i>McGowan Institute Regenerative Medicine Summer School</i> , Pitsburgo universitetas, JAV
2017-09-11 – 2017-09-14	SCIENT antreprenerystės akademija ir verslo konkursas, Europos universitetas Kipras, Kipras
2017-08-21 – 2017-08-25	2oji tarptautinė doktorantų vasaros mokykla, Kauno technologijos universitetas, Palanga, Lietuva
2017-01-09 – 2017-01-13	Įmonė GenePreDit, Biocant technologijos parkas, Kantanjedė, Portugalija

Stažuotės (tęsinys):

- 2016-06-21 – 2016-10-06 Tyrejų antreprenerystės mokymai, Ekonomikos ir verslo fakultetas, Kauno technologijos universitetas, Lietuva
- 2015-07-06 – 2015-07-08 Vasaros mokykla *Summer school on Biomaterials and Regenerative Medicine*, Riva del Garda, Italija
- 2014-04-02 – 2014-04-05 COST Actions MP1106 and cm1101 Jungtinis mokymo kursas *Particles at Liquid Interfaces: Fundamentals and Applications*, Bonassola, Italija
- 2007-02-05 – 2017-08-15 Stažuotė pagal Erasmus mainų programą. *Instituto superior de engenharia de Lisboa, Departamento de engenharia química*, Lisabona, Portugalija

## **PADĖKA**

Esu dėkinga savo vyrui Donatui Palaveniui už stiprią paramą, pagalbą ir supratingumą. Nuoširdžiai dėkoju doktorantūros studijų darbo vadovei prof. dr. Jolantai Liesienei už perduotą patirtį ir visapusišką paramą.

Dėkoju kolegoms iš KTU Polimerų chemijos ir technologijos katedros, ypač dr. Julei Kiverienei, dr. Editai Mažonienei ir dr. Monikai Budvytienei, taip pat mgr. Kristinai Glambaitei, mgr. Miglei Lebedevaitei ir bkl. Mildai Smalinskaitei. Dėkoju kolegoms iš Silikatų technologijos katedros ir Maisto mokslo ir technologijos katedros už visapusišką pagalbą ir bendradarbiavimą.

Esu dėkinga kolegoms dr. Sedef Tamburaci iš Izmiro technikos universiteto (Turkija), dr. Vladimirui Harkavenko iš Charkovo nacionalinio V. Karazino vardo universiteto (Ukraina) ir dr. Julijai Pajorovai iš Prahos Karolio universiteto (Čekijos Respublika) už glaudų ir produktyvų tarptautinį bendradarbiavimą. Ypač dėkinga kolegei dr. Simonai Urnikaitei iš KTU Organinės chemijos katedros už įkvepiantį optimizmą ir nuoširdų palaikymą visų doktorantūros studijų metu.

## **REZUME**

### **Relevance of the Work**

Nowadays, natural materials are of great interest for a wide variety of biomedical applications. The development of biomedical technologies mediates the viewpoint of consumers on healthcare, ecological and other related problems. Alongside, the academic and industrial society makes every possible effort to develop and introduce the principles of green technology into daily application. Even contemporary patents are frequently based on the recipes sources of medicinal heritage thus supporting the millennial experience in the treatment of human diseases and health complaints by using curative materials of natural origin. One of these nature-derived materials is cuttlebone, the bone of mollusc *Sepia*. Cuttlebone has already been used for medical applications for many

centuries in the traditional medicine of China and India. It was established as a valuable component of medicines for treating various diseases including dermatological, gastrological, gynaecological, otorhinolaryngological and related health complaints. The physical-chemical structure of cuttlebone is unique, as it is composed of aragonite,  $\beta$ -chitin and a number of bioinorganic trace elements.

During the latest five-year period, a renascent interest towards cuttlebone as a marine-derived product for biomedical applications has been systematically observed. The main focus of the research has been directed towards the use of cuttlebone for bone tissue engineering, and, rarely, towards wound healing applications.

However, there is lack of data on the exact composition of cuttlebone – which is currently possible now to detect by the modern sophisticated analytical tools. Evaluation of the biocompatibility *in vitro* and *ex vivo*, as well as scientific substantiation of the potential biomedical applications of cuttlebone is also absent. Therefore, one of the key tasks of this work is to fulfil a comprehensive research on cuttlebone with the objective to demonstrate its high curative potential and safety for biomedical applications in the framework of *in vitro* and *ex vivo* analyses. Other tasks include the development of bioinspired materials with cuttlebone material for hard tissue repair and various pharmaceutical drug forms.

### **The Aim of the Work**

The aim of the work is to investigate the properties of cuttlebone material and apply it for the development of biomedical and pharmaceutical compositions. By taking into consideration the abovementioned facts and reasons, the tasks of the work were formulated as follows:

1. Evaluation of the characteristics of cuttlebone, such as in-depth elemental analysis of its dorsal and lamellar parts, its impact on keratinocytes, haemostatic and antimicrobial potential;
2. Development of an alternative method for protein removal from cuttlebone;
3. Preparation of three-dimensional porous cellulose-based composite scaffolds with cuttlebone or cuttlebone-derived hydroxyapatite for bone tissue engineering applications; evaluation of the morphology, bioactivity by means of *in vitro* mineralisation assay, physical-chemical, toxicological and osteoconductive characteristics of the scaffolds;
4. Development of dexamethasone-loaded calcium alginate capsules with cuttlebone or cuttlebone-derived hydroxyapatite for small-sized bone defects in the oral cavity;
5. Development and characterisation of novel semisolid compositions with cuttlebone microparticles, such as hydroxyethylcellulose-based suspended gels and *Witepsol*-based suppositories.

## **Scientific Novelty and Practical Value of the Work**

Systematic examination of the elemental composition of cuttlebone was performed, and the curative as well as regenerative potential of its separate elements was analysed. Protein removal from cuttlebone material by using sodium dodecylsulphate was developed for the first time. Here, deproteinisation aims to avoid the risk of immunoresponse and therefore to enhance the biocompatibility of the developed material.

Three-dimensional porous cellulose-based composites with cuttlebone materials, such as deproteinised cuttlebone microparticles or cuttlebone-derived carbonated hydroxyapatite, were developed for bone tissue engineering applications for the first time. *In vitro* mineralisation assay was used in order to show the bioactivity of the composites by means of calcium deposition on its surface. Non-cytotoxic and osteoconductive characteristics of the composites were proven by using hepatocytes and osteoblasts MG-63. Dexamethasone-loaded calcium alginate capsules with cuttlebone materials, such as deproteinised cuttlebone microparticles or cuttlebone-derived carbonated hydroxyapatite, were developed for treating small intrabony defects in the oral cavity for the first time.

The haemostatic characteristics of the cuttlebone microparticles *in vitro* were outlined for the first time. Semisolid compositions with deproteinised cuttlebone microparticles, such as suspended gels and *Witepsol*-based suppositories, were prepared and characterised for the first time.

## **Approval of the Research Results**

Four articles were published in the journals belonging to Clarivate Analytics database indexed in the Web of Science with impact factor: “Chemija”, “Marine Biotechnology”, “Cellulose Chemistry and Technology” (accepted) and “Materials Science” (accepted). Two publications were announced in Clarivate Analytics database as other peer reviewed research publications (conference proceedings).

## **Structure and Content of the Dissertation**

The dissertation consists of the introduction featuring the research objectives, the relevant scholarly literature overview, the experimental part, results and discussion, conclusions, a list of references (310), and a list of publications on the dissertation topic. The material of the dissertation is presented on 130 pages and illustrated by employing 22 tables and 54 figures.

## SUMMATION AND CONCLUSIONS

1. In-depth elemental analysis of cuttlebone was performed for the first time. Various macro-, microelements or trace elements – Ca, P, Na, Mg, Cu, Sr, Cl, K, S, Br, Fe and Zn are typical for the lamellar and dorsal parts of cuttlebone; their amounts were also determined. Biologically unfavourable heavy metals, such as Ag, Cd, Pb or V, were not detected in the cuttlebone material. Non-cytotoxicity of the cuttlebone material was proven on HaCaT keratinocytes. Testing *in vitro* revealed that the cuttlebone material and the aragonite/chitosan complex obtained from cuttlebone after hydrothermal treatment with alkali possesses haemostatic potential and could be recommended for dermatological applications. Powdered cuttlebone material demonstrated the absence of antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomona aeruginosa*.

2. Sodium dodecyl sulphate and carbamide solution at 80 °C temperature effectively solubilise proteins from the cuttlebone material.

3. Immobilisation of cuttlebone microparticles into the cellulose framework induces the formation of a hydroxyapatite precursor during the immersion in a simulated body fluid. The study revealed that porous composites with cuttlebone microparticles or cuttlebone-derived hydroxyapatite are non-cytotoxic. The osteoconductive characteristics of scaffolds were proven by study with MG-63 osteoblasts thus showing their suitability for bone tissue engineering.

4. Calcium alginate capsules with dexamethasone sodium phosphate and mineral fillers from cuttlebone microparticles or cuttlebone-derived hydroxyapatite were developed by using the ionic gelation method. The mean size of dry capsules showed conformity with the typical size of periodontal intrabone defects and therefore capsules are suitable for the filling of small-sized bone defects in the oral cavity.

5. Hydroxyethylcellulose-based suspended gels with deproteinised cuttlebone microparticles have demonstrated favourable physical-chemical and rheological properties and therefore could be suitable for dermatological applications. *Witepsol*-based suppositories with cuttlebone microparticles have demonstrated favourable physical properties and gradual release of lidocaine hydrochloride in the phosphate buffer.

UDK 591.471.24 + 615.454 + 615.46] (043.3)

SL344. 2018-04-12, 2 leidyb. apsk. 1. Tiražas 50 egz.

Išleido Kauno technologijos universitetas, K. Donelaičio g. 73, 44249 Kaunas  
Spausdino leidyklos „Technologija“ spaustuvė, Studentų g. 54, 51424 Kaunas