

УДК 608

БІОБЕЗПЕКА ВИРОБНИЦТВА БІОІМПЛАНТІВ СТЕГНОВИХ КІСТОК МЕТОДОМ 3D-БІОДРУКУ

Скубко Владислав Віталійович

v.skubko.zf41mp.fbmi25@lil.kpi.ua

Білошицька Оксана Костянтинівна

biloshytska.oksana@lil.kpi.ua

Національний технічний університет України

«Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського»

м. Київ, Україна

Анотація – Технологія 3D-біодруку відкриває нові горизонти у регенеративній медицині, зокрема у створенні персоналізованих біоімплантів для відновлення великих дефектів стегнової кістки, пропонуючи альтернативу традиційним методам з їхніми обмеженнями. Однак, цей інноваційний підхід, що поєднує інженерію, матеріалознавство та клітинні технології, водночас породжує комплексні виклики у сфері біобезпеки. Забезпечення безпеки пацієнта вимагає багатогранного контролю, що охоплює весь виробничий цикл – від вихідної сировини до готового до імплантації продукту.

У роботі системно проаналізовано ключові аспекти біобезпеки 3D-біодруку кісткових імплантатів. Розглянуто критичну важливість використання ретельно перевірених біоактивних та біосумісних матеріалів (гідроксиапатит, β -ТКФ, полімери), що не викликають токсичних чи імунних реакцій, мають контрольовану швидкість деградації та необхідні механічні властивості. Особливу увагу приділено клітинному компоненту: перевагам використання аутологічних клітин для уникнення відторгнення, суворим вимогам до скринінгу та обробки алогенних клітин, а також необхідності підтвердження життєздатності, проліферативного та остеогенного потенціалу клітин.

Наголошено на строгій вимозі у дотриманні стерильності на всіх етапах: використання чистих приміщень (ISO 14644), асептичних методів роботи персоналу, стерилізації обладнання та матеріалів, а також постійного моніторингу середовища відповідно до стандартів GMP. Підкреслено значення точного відтворення індивідуальної геометрії імплантату та оптимізації його пористості для успішної васкуляризації та інтеграції. Робота також охоплює вимоги до фінальної оцінки якості готового імплантату, включаючи тести на біосумісність, механічну міцність та довговічність, і безпеку утилізацію відходів виробництва.

Таким чином, на відміну від фрагментарних досліджень, представлена робота підкреслює необхідність цілісної, інтегрованої системи управління біобезпекою, що є невід'ємною умовою для безпечного та ефективного клінічного застосування 3D-біодрукованих кісткових імплантатів. Впровадження чітких стандартів та регуляторних протоколів є ключовим для подальшого розвитку та відповідального впровадження цієї перспективної технології.

Ключові слова: біобезпека, біоетика, імплант, кістка.

I. ВСТУП

Відновлення кісткової тканини, зокрема стегнової кістки, є критично важливим завданням у сучасній медицині. Традиційні методи імплантації часто супроводжуються високим ризиком ускладнень, таких як інфекції, відторгнення імплантату та тривалий період реабілітації. Ці ускладнення не лише погіршують якість життя пацієнтів, але й створюють значне навантаження на систему охорони здоров'я.

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) [1], захворювання опорно-рухового апарату, до яких належать і дефекти кісткової тканини, як причина інвалідності і смертності посідає 4 місце в світі. Зі старінням населення та зростанням

кількості травм, пов'язаних із сучасним способом життя, потреба в ефективних методах відновлення кісткової тканини лише зростатиме [1].

Зокрема, дефекти стегнової кістки, які часто виникають внаслідок травм або захворювань, таких як остеопороз, мають значний вплив на якість життя пацієнтів. За даними ВООЗ [1], остеопороз, який є однією з основних причин переломів стегнової кістки, вражає мільйони людей у всьому світі, особливо літніх жінок.

Враховуючи ці статистичні дані, розробка та впровадження біобезпечних технологій 3D-біодруку біоімплантів стегнових кісток є не лише науковою, але й соціально значущою задачею. Ці технології мають потенціал значно покращити

результати лікування пацієнтів, зменшити ризик ускладнень та скоротити період реабілітації.

Останні дослідження [2, 3] в галузі біоматеріалів та 3D-біодруку демонструють перспективність використання біоактивних матеріалів, таких як гідроксиапатит (ГАП), β -трикальційфосфат (β -ТКФ) та біосумісні полімери, для створення кісткових імплантатів. Ці матеріали забезпечують біосумісність та стимулюють ріст кісткової тканини. Також дослідження підтверджують ефективність використання аутологічних та стовбурових клітин для формування імплантатів, що мінімізує ризик імунної реакції. Проте питання забезпечення стерильності, механічної міцності та контрольованої біодеградації імплантатів залишаються актуальними.

Таким чином, дослідження біобезпечових аспектів виробництва біоімплантів стегнових кісток методом 3D-біодруку є актуальним та перспективним напрямком, що має важливе значення для покращення якості життя мільйонів людей у всьому світі..

II. ПОСТАНОВКА ЗАДАЧ

Метою дослідження є визначення і аналіз ключових аспектів біобезпеки, пов'язаних із виробництвом біоімплантів стегнових кісток методом 3D-біодруку. Робота спрямована на висвітлення основних вимог та процедур контролю, необхідних для мінімізації ризиків на етапах вибору та підготовки матеріалів і клітин, процесу біодруку, а також оцінки якості та функціональності готового імплантату для забезпечення його безпечного клінічного застосування.

III. БІОЕТИКА ТА БІОБЕЗПЕКА НА ВИРОБНИЦТВІ БІОІМПЛАНТІВ

Розвиток технологій біодруку дав змогу створювати складні біоімпланти, зокрема стегнові кістки, з високою точністю та індивідуалізацією під кожного пацієнта. Проте разом із технічним прогресом зростають і ризики, пов'язані з безпечністю таких виробів, зокрема мікробіологічні

загрози, які можуть виникнути на різних етапах виробництва. З огляду на це, питання біобезпеки стає критично важливим для забезпечення якості та клінічної ефективності надрукованих імплантів.

На відміну від традиційного протезування, у 3D-біодруці застосовуються клітинні матеріали, біополімери й різні добавки, які мають обмежену терmostійкість, чутливі до змін середовища та не завжди можуть бути оброблені класичними методами стерилізації [3]. Оскільки надруковані імпланти, як правило, є індивідуальними виробами, виготовленими в лабораторно-клінічних умовах, контроль за стерильністю стає більш ускладненим. Це створює потребу в системному підході до запобігання контамінаціям та ретельного моніторингу середовища на всіх етапах – від підготовки біочорнил до упаковки готового виробу.

Біоетичний контекст також відіграє значну роль [4, 5]. При використанні клітин людини, навіть якщо вони є аутологічними, необхідно дотримуватися принципів інформованої згоди, забезпечення прозорості щодо подальшого використання матеріалів, а також відповідності дослідження медичним і етичним нормам. У межах розробки біоімплантів надзвичайно важливо оцінювати не лише технологічну доцільність, а й потенційний ризик для здоров'я пацієнта, спричинений залишковими речовинами, продуктами розпаду полімерів чи неповною стерильністю.

Окрему загрозу становлять фізико-хімічні чинники, які можуть негативно впливати на структуру або функціональність клітин і тканин. Наприклад, компоненти біочорнил або матеріали каркасів можуть містити сліди токсичних реагентів, які не були повністю усунені після синтезу або модифікації. Стерилізаційні методи, в свою чергу, іноді змінюють фізичні властивості імплантата або призводять до загибелі клітин, якщо їх неправильно обрати. Це ставить завдання щодо розробки спеціалізованих, щадних методик знезараження, адаптованих до біопринтингових технологій.

Варто також звернути увагу на обмеженість доступних систем контролю чистоти середовища у виробничому просторі біодруку. У більшості лабораторних біопринтерів відсутні інтегровані рішення для активного контролю за аерозольними або мікробіологічними контамінаціями, що знижує надійність технологічного процесу. У зв'язку з цим виникає потреба у вдосконаленні обладнання, протоколів роботи та введенні стандартів, аналогічних належній виробничій практиці (Good Manufacturing Practice, GMP) для медичних біопродуктів.

IV. МАТЕРІАЛИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА БІОІМПЛАНТІВ

Біоактивні матеріали є одним із основних факторів безпеки і ефективності біоімплантів. На даний момент найпопулярнішим і найнадійнішим варіантом є кераміка, а саме: гідроксиапатит (ГАП) та β -трикальційфосфат (β -ТКФ) [2, 3].

ГАП відіграє роль остеointегратора завдяки своїй подібності до мінерального компонента кістки. Перевагою ГАП є також те, що його можна створити і синтетично модифікувати (гідроліз, співосадження, гідротермальний синтез, золь-гель процес). З природних джерел зі стехіометричним складом $\text{Ca/P} = 1,67$ ГАП імітує мінеральну складову кісток та зубів ссавців.

β -ТКФ використовується через його остеoіндуктивність, біорозкладність і біосумісність [2]. Це стимулює ріст нової кісткової тканини та забезпечує достатню міцність. А їх комбінація дозволяє налаштовувати швидкість резорбції і механічні властивості біоімпланту.

Для створення каркасу використовуються біосумісні полімери, такі як: колаген, полікапролактон (PCL) і полілактид (PLA), що забезпечує підтримку структури імплантату. Колаген в цій суміші відповідає за міцність і гнучкість як природний біополімер, який сприяє адгезії та проліферації клітин [4].

Ці матеріали поступово розкладаються в організмі, дозволяючи природним кістковим

клітинам замінювати імплантат. Важливою характеристикою полімерів є їхня контрольована швидкість деградації. Колаген піддається ферментативному розщепленню в організм, і швидкість його деградації залежить від ступеня зшивання та обробки матеріалу. Контрольована деградація колагену необхідна для забезпечення поступового заміщення імплантату природною кістковою тканиною. PCL має повільнішу швидкість деградації порівняно з PLA, зазвичай від 2 до 4 років, що робить його придатним для довготривалих імплантів. В той час як PLA розкладається в організмі шляхом гідролізу складнофірних зв'язків, перетворюючись на молочну кислоту, яка метаболізується в циклі Кребса. Швидкість деградації залежить від молекулярної маси, кристалічності та геометрії імплантату. Зазвичай, повна деградація займає від 6 місяців до 2 років [4].

Оптимальне співвідношення компонентів для біоімпланту стегнової кістки залежить від необхідних механічних характеристик, біодеградації та біосумісності. Згідно з науковими дослідженнями, рекомендовані пропорції основних матеріалів виглядають так:

- Колаген (Col): 20–30%;
- Гідроксиапатит (HA): 40–50%;
- Полілактид (PLA): 10–20%;
- Полікапролактон (PCL): 10–15%;
- β -трикальційфосфат (β -TCP): 5–10%.

Варто зазначити, що також можливе додавання невеликої кількості інших іонів для покращення властивостей, наприклад:

- Покращення біосумісності: Деякі іони, такі як магній (Mg^{2+}), можуть покращити біосумісність матеріалу та сприяти росту кісткової тканини.

- Іони, такі як фтор (F^-), можуть впливати на швидкість розкладання матеріалу в організмі.

- Стимуляція остеогенезу: Деякі іони, такі як стронцій (Sr^{2+}), можуть стимулювати ріст кісткової тканини.

- Покращення механічних властивостей: Деякі іони, такі як цинк (Zn^{2+}), можуть покращити механічні властивості матеріалу.

Тип і кількість доданих іонів повинні бути ретельно контрольовані, щоб уникнути токсичності [3].

Дослідження [3, 4] підтверджують, що біоактивні матеріали повинні мати високу чистоту та відсутність домішок, що можуть викликати запальні реакції. Для цього вони проходять ретельне тестування на токсичність, алергеність та механічні властивості, що забезпечує їхню безпеку в довгостроковій перспективі.

Чистота вихідних матеріалів є критичною. Сировина (керамічні порошки, полімерні гранули/смоли) повинна мати медичний ступінь чистоти, підтверджений сертифікатами аналізу від постачальника. Необхідний суворий контроль якості на всіх етапах виробництва для уникнення контамінації. Для виявлення шкідливих домішок застосовують високочутливі аналітичні методи: індуктивно-зв'язана плазмова мас-спектрометрія або атомно-абсорбційна спектроскопія для виявлення слідових кількостей важких металів та інших елементів; газова хроматографія-мас-спектрометрія або високоефективна рідинна хроматографія для ідентифікації залишкових мономерів, розчинників, пластифікаторів чи інших органічних контамінантів.

V. ДЖЕРЕЛО, ПІДГОТОВКА ТА БІОБЕЗПЕКА КЛІТИННОГО КОМПОНЕНТУ

Живі клітини є ключовим елементом біодруківаних імплантатів, оскільки саме вони відповідають за регенерацію кісткової тканини та інтеграцію імплантату в організмі. Забезпечення біобезпеки та функціональності клітинного компонента є критично важливим.

5.1 Джерело клітин

Найбезпечніший варіант – це використання аутологічних клітин, тобто безпосередньо з організму самого пацієнта [7]. Найчастіше – це мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), виділені з кісткового мозку, жирової тканини або інших джерел. Вибір цих клітин не є безпідставним і має наступні переваги: повна імунологічна сумісність, що виключає ризик

відторгнення, та відсутність ризику передачі інфекційних захворювань від донора, що значно підвищує біобезпеку процедури. Процес включає етап забору матеріалу у пацієнта (інвазивна процедура), транспортування до виробничої ділянки, ізоляцію клітин (наприклад, методом градієнтного центрифугування на Фіколлі для кісткового мозку або ферментативним розщепленням колагеназою для жирової тканини) та, як правило, *ex vivo* культивування (експансію) для отримання достатньої кількості клітин для заселення імплантату [7]. Культивування проводиться в спеціалізованих середовищах, що відповідають вимогам GMP, в умовах суворої асептики. Можливе використання як у вигляді недиференційованих МСК, так і після попередньої індукції остеогенної диференціації.

Є також менш безпечний метод – це відбір алогенних клітин, що передбачає використання донорських клітин, коли отримання аутологічних клітин ускладнене або неможливе. Хоча використання цих клітин пов'язане зі значно вищими ризиками біобезпеки воно має місце на існування, адже є ситуації в яких воно життєво необхідне. До ризиків цього методу можна віднести [8]:

- Ризик імунного відторгнення: Необхідність імунологічного підбору донора та реципієнта (наприклад, за системою HLA) або використання клітин з низькою імуногенністю (наприклад, МСК). Для мінімізації ризику відторгнення можуть використовуватись клітини біологічних родичів пацієнта.

- Ризик передачі інфекцій: Критично важливим є ретельний скринінг донорів на наявність вірусних (ВІЛ, гепатити В і С, цитомегаловірус та ін.), бактеріальних та інших інфекційних агентів згідно з міжнародними стандартами. Необхідні карантинізація клітин та повторне тестування донора через певний час.

Через зазначені ризики перевага завжди надається аутологічним клітинам, якщо це клінічно можливо. Процес включає отримання інформованої згоди від донора, забір матеріалу, скринінг донора на

інфекційні та генетичні захворювання. Ізольовані клітини культивуються *ex vivo* в умовах GMP для створення клітинних банків: Майстер-банку клітин (Master Cell Bank) та Робочого банку клітин (Working Cell Bank). Клітини з банків кріоконсервуються та зберігаються в рідкому азоті (зазвичай у паровій фазі для уникнення перехресної контамінації). Перед використанням клітини розморожуються, перевіряються на життєздатність та інші параметри якості. Цей підхід дозволяє створити «готовий до використання» (off-the-shelf) продукт зі стандартизованими характеристиками [5].

5.2 Перевірка клітин на здатність до виживання, розмноження та спрямованої диференціації у остеобласти

Контроль якості клітинного компоненту [8] є невід'ємною частиною виробництва біоімплантів. Цей контроль проводиться на різних етапах: після ізоляції клітин, під час *ex vivo* експансії (якщо вона проводиться), і обов'язково перед використанням клітин для створення фінального продукту (як частина критеріїв випуску партії).

Процедури контролю включають:

1) Оцінку життєздатності (Viability): Визначення відсотка живих клітин у популяції.

Методи, які використовуються при цьому: Найпростіший – це мікроскопія з використанням барвника трипанового синього, який проникає лише в клітини з пошкодженою мембраною (забарвлює мертві клітини в синій колір). Більш точні методи – проточна цитометрія з використанням флуоресцентних барвників, таких як пропідіум йодид (PI, забарвлює мертві клітини) та Анексин V (мітить клітини на ранніх стадіях апоптозу).

Значення: Низька життєздатність означає, що в імплантат буде внесено менше функціональних клітин, що може знизити ефективність. Мертві клітини також можуть вивільняти компоненти, що викликають запалення. Встановлюються мінімально допустимі рівні життєздатності (наприклад, >70% або >85%).

2) Оцінку здатності до розмноження (проліферації): Визначення того, чи здатні клітини ділитися та збільшувати свою кількість, що важливо для колонізації каркасу імплантату [5].

Методи, які використовуються при цьому: Прямий підрахунок клітин за допомогою гемоцитометра або автоматизованих лічильників клітин через певні проміжки часу культивування. Розрахунок часу подвоєння популяції (Population Doubling Time). Непрямі методи, що оцінюють метаболічну активність, яка корелює з кількістю живих клітин (наприклад, тести, які використовують колориметричну або флуоресцентну детекцію).

Значення: Здатність до проліферації важлива для досягнення достатньої щільності клітин на імплантаті. Зниження проліферативного потенціалу може свідчити про старіння клітин (senescence) під час культивування.

3) Оцінку потенціалу диференціації: Перевірка здатності клітин (особливо стовбурових/ стромальних) диференціюватися у потрібний тип клітин – остеобласти.

Методи, які використовуються при цьому: Для МСК стандартною практикою є підтвердження їх мультипотентності шляхом індукції диференціації *in vitro* в трьох напрямках: остеогенному, адипогенному (жирові клітини) та хондрогенному (хрящові клітини), згідно з мінімальними критеріями Міжнародного товариства клітинної терапії (ISCT).

Значення: Це ключовий показник функціональності клітин для цільового застосування – регенерації кістки. Якщо клітини втратили здатність диференціюватися в остеобласти, вони не зможуть виконати свою терапевтичну функцію.

Перевірка цих параметрів є критично важливою для забезпечення [7]:

- Ефективності продукту: Гарантує, що пацієнт отримує імплантат, що містить достатню кількість живих, функціональних клітин, здатних до проліферації та

формування кісткової тканини. Це безпосередньо впливає на ймовірність успішної регенерації.

- Консистентності (сталості) виробництва: Встановлення чітких критеріїв якості та їх регулярна перевірка дозволяють забезпечити відтворюваність характеристик продукту від партії до партії.

- Безпеки: Хоча основні ризики безпеки пов'язані з контамінацією або імуногенністю, використання клітин неналежної якості (наприклад, з низькою життєздатністю або зі зміненним фенотипом) також можна розглядати як аспект безпеки, оскільки це призводить до неефективного лікування та потенційно марної інвазивної процедури для пацієнта. Всі аналітичні методи, що використовуються для контролю якості клітин, повинні бути належним чином розроблені, оптимізовані та валідовані відповідно до принципів GMP та регуляторних настанов (наприклад, ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1) «Валідація аналітичних методик»). Встановлюються чіткі специфікації (критерії прийнятності) для кожного параметра, і жодна партія клітин не може бути використана для виробництва імплантату, якщо вона не відповідає цим специфікаціям. Принципи Good Cell Culture Practice (GCCP) також наголошують на важливості моніторингу характеристик клітин під час культивування.

5.3 Забезпечення правильного перетворення стовбурових клітин у клітини кісткової тканини

Якщо в біоімплантаті використовуються стовбурові або стромальні клітини (наприклад, МСК), їхня основна функція – диференціюватися в остеобласти, які потім будуть синтезувати новий кістковий матрикс. Забезпечення цього процесу включає [9]:

- 1) Підтвердження остеогенного потенціалу: перед використанням клітин необхідно *in vitro* підтвердити їхню принципову здатність диференціюватися в остеогенному напрямку при відповідній стимуляції.

- 2) Створення остеоіндуктивного мікрооточення: Навіть якщо клітини мають потенціал, для їхньої диференціації *in vivo* після імплантації потрібне сприятливе мікрооточення. Це може досягатися кількома шляхами:

- Використання остеоіндуктивних матеріалів: Деякі матеріали самі по собі можуть стимулювати остеогенну диференціацію (наприклад, біоактивна кераміка, що вивільняє іони Ca^{2+} та PO_4^{3-} , або матеріали з певною топографією поверхні).

- Включення факторів росту: До складу біочорнила або каркасу можуть бути інкорпоровані біологічно активні молекули, що стимулюють остеогенез. Найбільш вивченими є білки кісткового морфогенезу (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs), зокрема BMP-2 та BMP-7, які є потужними індукторами диференціації МСК в остеобласти. Їх можна додавати безпосередньо в біочорнило або іммобілізувати на каркасі для поступового вивільнення.

- Механічна стимуляція: Відомо, що механічне навантаження відіграє важливу роль в регуляції кісткового метаболізму та диференціації клітин. Архітектура імплантату та його механічні властивості повинні забезпечувати адекватну передачу фізіологічних навантажень на клітини всередині конструкції після імплантації.

- Попередня диференціація: В деяких стратегіях клітини перед змішуванням з біочорнилом або перед заселенням на каркас піддають частковій остеогенній диференціації *in vitro* шляхом культивування в остеогенному середовищі протягом певного часу. Це може прискорити процес формування кістки *in vivo*.

- Контроль процесу диференціації: На етапі розробки продукту проводяться дослідження *in vitro* та *in vivo* (на тваринних моделях) для підтвердження того, що обрана стратегія (матеріали, фактори росту, клітини) дійсно призводить до ефективної остеогенної диференціації та формування нової кісткової тканини в місці імплантації. Використовуються гістологічні методи

(забарвлення гематоксиліном та еозином (H&E), забарвлення трихромом по Массону (Masson's trichrome), імуногістохімія на остеогенні маркери), мікро-КТ аналіз для оцінки об'єму та щільності новоутвореної кістки.

Забезпечення правильної остеогенної диференціації є критичним не тільки для ефективності, але й для безпеки [7]:

1) Гарантія цільової дії: Перетворення стовбурових клітин саме в остеобласти є основною метою терапії. Якщо диференціація не відбувається або відбувається неефективно, імплантат не виконає свою функцію, що може призвести до його відторгнення, нестабільності або потреби в повторній операції.

2) Уникнення небажаної диференціації: Важливо, щоб клітини диференціювалися саме в кісткову тканину, а не в інші типи тканин (наприклад, хрящову, жирову або фіброзну), що могло б призвести до утворення гетеротопічних тканин в місці імплантації та порушення функції. Ризик особливо актуальний при використанні менш диференційованих клітин (наприклад, ембріональних стовбурових клітин або індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (Induced pluripotent stem cells, iPSCs)).

3) Ризик туморогенності: Хоча для МСК ризик утворення пухлин вважається дуже низьким, для iPSCs існує ризик утворення тератом, якщо в популяції залишаються недиференційовані клітини. Тому контроль повноти та спрямованості диференціації є істотним аспектом безпеки при використанні таких джерел.

4) Безпека факторів росту: Якщо використовуються фактори росту (наприклад, кісткові морфогенетичні білки (BMPs, bone morphogenetic proteins), необхідно ретельно контролювати їх дозу, чистоту та профіль вивільнення [8]. Надмірні дози BMP можуть викликати побічні ефекти, такі як гетеротопічна осифікація, запалення, набряк, резорбція навколишньої кістки. Чистота рекомбінантних білків повинна відповідати вимогам GMP. Перевірка та контроль процесу диференціації є частиною доклінічних досліджень безпеки та

ефективності, які вимагаються регуляторними органами (наприклад, Управління продовольства та медикаментів (Food and Drug Administration, FDA), Європейське агентство з лікарських засобів, (European Medicines Agency, EMA) перед дозволом на клінічні випробування. Валідація аналітичних методів для оцінки диференціації та встановлення критеріїв прийнятності є обов'язковими елементами системи якості.

VI. ПРОЦЕС 3D-БІОДРУКУ: ТЕХНОЛОГІЯ ТА СТЕРИЛЬНІСТЬ

6.1 Важливі етапи для збереження стерильності для біодруку.

Забезпечення стерильності під час самого процесу 3D-біодруку є одним з найскладніших і найважливіших завдань, оскільки на цьому етапі відбувається відкрита маніпуляція зі стерильними компонентами (біоматеріали, клітини, біочорнила). Виробничий процес повинен бути спроектований та контрольований таким чином, щоб мінімізувати ризик потрапляння мікроорганізмів (бактерій, грибків, дріжджів).

Ключовими елементами для збереження оптимальних умов для процесу є [8]:

1) Класифіковані чисті приміщення: Всі операції з відкритими стерильними матеріалами та продуктом повинні проводитися в чистих приміщеннях, що відповідають вимогам стандартів ДСТУ ISO 14644-1 щодо концентрації часток у повітрі та мікробної контамінації. Для асептичного виробництва (як біодрук) зазвичай вимагається:

- Зона класу А (за EU GMP Annex 1) / ISO 5: Зона безпосередньої роботи з відкритим продуктом (наприклад, робоча зона біопринтера, місце завантаження біочорнил, маніпуляції з клітинами). Зазвичай забезпечується ламінарним потоком повітря (LAF) або в ізоляторі.

- Фонова зона класу В / ISO 7: Приміщення, в якому розташована зона класу А.

- Допоміжні зони (клас С / ISO 8, клас D): Для менш критичних операцій,

переодягання персоналу, підготовки матеріалів. Необхідно підтримувати перепади тиску між зонами різної чистоти для запобігання потраплянню забруднень з менш чистих зон у більш чисті.

2) Обладнання (біопринтер): Сам 3D-біопринтер повинен бути спроектований для використання в чистих приміщеннях [10]: мати гладкі поверхні, що легко очищуються та дезінфікуються, бути виготовленим з матеріалів, стійких до стерилізуючих агентів. Частини принтера, що безпосередньо контактують з біочорнилом або імплантатом (насадки, картриджі, платформа), повинні бути або стерильними одноразовими, або піддаватися валідованій стерилізації (наприклад, автоклавуванню згідно ДСТУ ISO 17665, якщо дозволяють матеріали). Використання закритих або напівзакритих біопринтерних камер з ламінарним потоком та HEPA-фільтрацією дозволить мінімізувати ризик контамінацій у процесі друку.

3) Процедури та персонал: Персонал, що працює в чистих приміщеннях, повинен пройти ретельне навчання з асептичних методів роботи, правил поведінки та процедур переодягання (використання стерильного одягу, масок, рукавичок, окулярів). Всі маніпуляції повинні виконуватися технічно правильно для мінімізації генерації часток та ризику контамінації. Матеріали та обладнання передаються в чисті зони через спеціальні шлюзи з дотриманням процедур деконтамінації/стерилізації поверхонь.

4) Екологічний моніторинг (ЕМ): Проводження регулярного моніторингу мікробної та часткової контамінації повітря (за допомогою повітровідбірників та седиментаційних чашок) та поверхонь (контактні чашки, змиви) у всіх класифікованих зонах, а також моніторинг персоналу (відбитки пальців у рукавичках) для підтвердження того, що середовище відповідає встановленим вимогам ДСТУ ISO 14644 та GMP. Результати ЕМ аналізуються для виявлення тенденцій та своєчасного вжиття коригувальних дій.

Недотримання стерильних умов під час біодруку несе пряму загрозу безпеці пацієнта. Потрапляння навіть невеликої кількості мікроорганізмів у біочорнило або на імплантат може призвести до:

- Інфекцій у пацієнта: Імплантація контамінованого продукту може спричинити серйозну, потенційно життєзагрозливу інфекцію в місці операції або системну інфекцію (сепсис). Біоплівки, утворені мікроорганізмами на поверхні імплантату, важко піддаються лікуванню антибіотиками.

- Відторгнення імплантату: Мікробна контамінація викликає сильну запальну реакцію, що перешкоджає інтеграції імплантату та може призвести до його відторгнення.

- Невдалого лікування: Навіть якщо інфекція не розвивається, мікробна контамінація може негативно вплинути на життєздатність та функцію клітин в імплантаті, знижуючи його регенеративний потенціал.

- Утворення ендотоксинів: Бактеріальна контамінація (особливо грам-негативними бактеріями) призводить до накопичення ендотоксинів, які є сильними пірогенами та можуть викликати гарячку та запалення навіть після стерилізації продукту (якщо вона можлива). Тому забезпечення та підтримання стерильності протягом усього процесу біодруку є абсолютним пріоритетом. Це вимагає впровадження та суворого дотримання принципів GMP, зокрема вимог EU GMP Annex 1 (Виробництво стерильних лікарських засобів) або еквівалентних національних/міжнародних настанов). Управління ризиками контамінації повинно базуватися на принципах ICH Q9 (Quality Risk Management). Наявність надійної системи забезпечення стерильності, підтвердженої валідаційними даними та результатами моніторингу, є обов'язковою для отримання дозволу на виробництво та клінічне застосування таких продуктів [7].

6.2 Виробничий процес

Однією з головних переваг 3D-друку [10] є можливість створювати імплантати індивідуальної форми, що точно

відповідають унікальній анатомії пацієнта. Процес досягнення геометричної точності включає наступні етапи:

1) Медична візуалізація: Отримання високоякісних зображень дефекту стегнової кістки пацієнта за допомогою комп'ютерної томографії (КТ) або, рідше, магнітно-резонансної томографії (МРТ). КТ зазвичай надає кращу роздільну здатність для кісткових структур. Важливо використовувати стандартизовані протоколи сканування для забезпечення точності та відтворюваності даних (формат DICOM).

2) Сегментація зображень: Обробка отриманих DICOM-зображень за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення (наприклад, Mimics, 3D Slicer, Simpleware ScanIP). На цьому етапі відбувається виділення (сегментація) контурів кісткової тканини та створення тривимірної цифрової моделі дефекту та прилеглих структур. Точність цього етапу залежить від якості зображень та кваліфікації оператора.

3) Комп'ютерне проектування: Створена 3D-модель дефекту імпортується в систему автоматизованого проектування (Computer-aided design, CAD). Інженер або дизайнер проектує віртуальну модель імплантату, який точно заповнює дефект, забезпечуючи максимальний контакт з поверхнею кістки пацієнта. На цьому ж етапі проектується внутрішня пориста структура. Пориста структура імплантату є критично значущою для його успішної інтеграції. Пори забезпечують простір для вrostання клітин, дифузії поживних речовин та кисню, виведення продуктів метаболізму, а головне – для васкуляризації (проростання кровоносних судин) та остеоінтеграції. 3D-біодрук дозволяє точно контролювати розмір пор (оптимально 100-500 мкм для кісткової тканини), їх форму, розподіл та взаємозв'язок (інтерконнективність). Загальна пористість може варіювати від 50% до 90%, а точне значення може бути визначене по моделі кістки пацієнта.

4) Генерація файлу для друку: Готова CAD-модель імплантату зазвичай конвертується у формат STL (Standard Tessellation Language) або інший формат, що

використовується для 3D-друку (наприклад, AMF). Потім файл обробляється «слайсером» – програмою, яка розбиває модель на тонкі горизонтальні шари та генерує інструкції (G-код) для 3D-принтера, вказуючи траєкторії руху друкуючої головки, швидкість, параметри подачі матеріалу тощо.

5) Калібрування та друк: Перед друком 3D-біопринтер повинен бути ретельно відкалібрований для забезпечення точності позиціонування друкуючої головки та дозування матеріалу. Сам процес друку відбувається шар за шаром відповідно до згенерованого G-коду в контрольованих умовах.

6) Контроль якості геометрії: Після друку (і можливої пост-обробки) проводиться перевірка геометричних розмірів готового імплантату. Використовуються методи безконтактного сканування (лазерне, оптичне), координатно-вимірні машини (СММ) або мікро-КТ. Отримані розміри порівнюються з вихідною CAD-моделлю для підтвердження відповідності встановленим допускам.

Точна геометрія гарантує, що імплантат не буде тиснути на анатомічні структури, такі як нерви, кровоносні судини або суглобові поверхні, що могло б викликати біль, неврологічні порушення або обмеження функції. Таким чином, контроль геометричної точності є важливим елементом системи управління якістю (ISO 13485) для виробництва персоналізованих імплантів. Валідація всього процесу – від отримання зображень до контролю готового виробу – необхідна для гарантії того, що імплантат буде безпечним та ефективним для конкретного пацієнта.

Використання прецизійного, індивідуально виготовленого імплантату спрощує хірургічну процедуру, скорочує час операції та мінімізує потребу в інтраопераційній підгонці імплантату або додатковій резекції кістки пацієнта і забезпечує запобігання мікрорухам між імплантатом та кісткою, які можуть перешкоджати остеоінтеграції та призвести до утворення фіброзної тканини замість

кісткової, або навіть до розхитування імплантату. Скорочення часу операції знижує ризик інфекції та кровотечі. Правильна анатомічна форма сприяє більш фізіологічному розподілу механічних навантажень через імплантат на навколишню кістку, що знижує ризик концентрації напружень, які могли б призвести до руйнування імплантату або резорбції кістки

VII. РЕГУЛЮВАННЯ БІОЕТИЧНИХ АСПЕКТІВ І БІОБЕЗПЕКИ ПРОДУКЦІЇ

7.1 Перевірка імплантату на стійкість до механічного навантаження, зношування

Імплантат повинен витримувати фізіологічні навантаження. Перевірка включає комп'ютерне моделювання (Finite Element Analysis, FEA) на етапі проєктування та фізичні випробування надрукованого імплантату [10]. Проводяться статичні тести (на стиск, розтяг, згин, кручення) для визначення межі міцності та модуля пружності, а також динамічні (втомні) тести, що імітують мільйони циклів навантаження (ходьба, біг) для оцінки довговічності та ризику руйнування від втоми. Тестування проводиться згідно зі стандартами (наприклад, ASTM, ДСТУ/ISO) в умовах, що імітують фізіологічні (37°C, фізіологічний розчин). Для регенеративних імплантатів, які мають заміщуватися кісткою, стійкість до зношування менш критична, ніж для постійних металевих чи керамічних ендопротезів із парами тертя. Однак, якщо імплантат має елементи, що контактують під навантаженням, або якщо він зберігається в організмі тривалий час до повної регенерації, зносостійкість матеріалу та гладкість поверхні мають значення. Продукти зношування (мікрочастинки) можуть викликати запалення та остеоліз (руйнування кістки). Оцінка може проводитися за допомогою симуляторів суглобів (ДСТУ ISO 14242, ДСТУ ISO 14243), хоча для біодрукованих каркасів акцент робиться більше на втомній міцності та деградаційних характеристиках.

7.2 Перевірка безпечності імплантату

Необхідно переконатися, що ні самі вихідні матеріали, ні компоненти біочорнил (наприклад, залишкові фотоініціатори, крос-лінкери), ні продукти їхнього розкладання не є токсичними. Проводять тести на екстракти та вилуговані речовини (leachables & extractables) [9, 10]. Цитотоксичність *in vitro* оцінюють згідно з ДСТУ ISO 10993-5, використовуючи екстракти матеріалів, отримані в умовах, що імітують фізіологічні, або методом прямого контакту з клітинами. Аналізується хімічний склад продуктів деградації та їх вплив на клітини [8].

Продукти, що утворюються при розкладанні імплантату в організмі, повинні бути безпечними. Ідеально, це нетоксичні речовини, що легко метаболізуються або виводяться (наприклад, молочна кислота, іони кальцію та фосфату). Важливо контролювати швидкість виділення цих продуктів, оскільки їх висока локальна концентрація (наприклад, кислотних продуктів від швидкої деградації PLA/PGA) може спричинити запалення та пошкодження тканин [8]. Контроль здійснюється шляхом досліджень деградації *in vitro* (вимірювання зміни маси, pH середовища, хімічного складу рідини) та досліджень *in vivo* на тваринних моделях для оцінки локальної тканинної реакції та системних ефектів [8].

7.3 Утилізація залишкової продукції

Процес утилізації залишкової продукції здійснюється у 6 етапів:

1) Ідентифікація та класифікація відходів: Необхідно чітко ідентифікувати всі потоки відходів, що утворюються:

2) Біологічні/Біомедичні відходи: Клітинні культури (відпрацьовані середовища, суспензії клітин), матеріали, контаміновані клітинами або біологічними рідинками (піпетки, культуральні флакони, рукавички, халати), тканини тварин (з доклінічних досліджень).

3) Гострі предмети (Sharps): Голки, шприци, скальпелі, леза, предметні та покривні скельця, піпетки Пастера, будь-які предмети, що можуть проколоти шкіру і є контамінованими біологічним або хімічним матеріалом.

4) Хімічні відходи: Залишки розчинників, кислот, лугів, реагентів, фотоініціаторів, крос-лінкерів, дезінфікуючих засобів, фарбників (наприклад, для гістології), прострочені хімікати.

5) Тверді побутові/Загальні відходи: Пакувальні матеріали, офісне сміття, неконтаміновані витратні матеріали.

6) Сегрегація відходів: Впровадження системи роздільного збору відходів за їх типом та ступенем небезпеки безпосередньо в місцях їх утворення (лабораторії, виробничі зони). Використовуються спеціальні контейнери з чітким маркуванням та кольоровим кодуванням (наприклад, червоні або жовті мішки/контейнери для біомедичних відходів, стійкі до проколювання контейнери для гострих предметів, спеціальні ємності для хімічних відходів).

7.4. Обробка та знезараження

Для здійснення процесів обробки та знезараження відповідно до міжнародних стандартів відходи проходять наступний цикл:

Біомедичні відходи: Перед утилізацією повинні бути знезаражені для знищення потенційно інфекційних агентів. Найпоширеніший метод – автоклавування (обробка насиченою парою під тиском при температурі $\geq 121^{\circ}\text{C}$ протягом певного часу). Процес автоклавування повинен бути валідований з використанням біологічних індикаторів (наприклад, спор *Geobacillus stearothermophilus*) для підтвердження ефективності. Альтернативні методи – хімічна дезінфекція (для рідких відходів) або спалювання при високій температурі (зазвичай проводиться спеціалізованими компаніями).

Хімічні відходи: Обробка залежить від типу хімічної речовини. Деякі можуть потребувати нейтралізації або іншої хімічної обробки перед утилізацією. Інші передаються ліцензованим компаніям для спеціалізованої утилізації (наприклад, спалювання при високій температурі, захоронення на спеціальних полігонах). Слід керуватися інформацією з Паспортів Безпеки

(Safety Data Sheets - SDS) для кожної речовини. Несумісні хімікати не можна змішувати.

Зберігання та транспортування: Тимчасове зберігання оброблених та необроблених небезпечних відходів повинно здійснюватися в спеціально відведених, безпечних місцях. Транспортування небезпечних відходів за межі установи повинно здійснюватися ліцензованими перевізниками з дотриманням правил перевезення небезпечних вантажів.

Документація: Ведення обліку утворення, обробки та утилізації небезпечних відходів відповідно до вимог законодавства.

VIII. ВИСНОВКИ

Сучасна галузь тканинної інженерії демонструє активний розвиток 3D-біодруку як методу створення складних біоімплантів, зокрема для реконструкції великих кісткових дефектів. У численних дослідженнях обґрунтовано ефективність застосування біосумісних матеріалів (гідрогелів, композитів на основі ГАП, ПЛА, ПГА тощо), а також доведено можливість включення клітинних компонентів у каркасні структури. Однак, більшість робіт зосереджена переважно на функціональності і механічних властивостях

Фінансування. Дослідження виконано за грантової підтримки Національного фонду досліджень України в рамках проєкту 2023.04/0073 «Розроблення концепції поліфункціонального протезно-реабілітаційного центру з інноваційно-освітнім компонентом для пацієнтів з ампутацією кінцівок». Публікація підтримана також проєктом “Improving professional communication on biosecurity and biohazard management in medicine, pharmacy and biotechnology” в рамках програми EURIZON Європейського Союзу за грантовою угодою №871072.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

ORCID ID та внесок авторів.

0009-0009-1615-5801 (A, B, C) Skubko
Vladyslav

0000-0002-2901-9667 (D, E) Biloshytska
Oksana

A – концепція роботи та дизайн; B –
аналіз інформації; C – написання статті; D –
критичний огляд; E – остаточне схвалення
статті.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. WHO Scientific Group on the Prevention and Management of Osteoporosis (2000 : Geneva, Switzerland). (2003). Prevention and management of osteoporosis : report of a WHO scientific group. World Health URL: <https://iris.who.int/handle/10665/42841> (date of access: 03.01.2025)
2. Strategies for Controlled Delivery of Growth Factors and Cells for Bone Regeneration URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3358582/> (date of access: 03.01.2025)
3. Біоактивні матеріали для регенерації кісткової тканини : навч. посібник / О. В. Саввова, Г. К. Воронов, О. І. Фесенко, Ю. О. Смирнова ; Харків. нац. ун-т міськ. госп-ва ім. О. М. Бекетова. – Харків : ХНУМГ ім. О. М. Бекетова, 2021. – 142 с. URL: <https://eprints.kname.edu.ua/57433/1/2020%20%D0%BF%D0%B5%D1%87.%205%D0%9D%2B.pdf> (дата звернення: 09.01.2025)
4. Duane E. G. A Practical Guide to Implementing a BSL-2+ Biosafety Program in a Research Laboratory. Applied Biosafety. 2013. Vol. 18, no. 1. P. 30–36. URL: <https://doi.org/10.1177/153567601301800105>
5. M. A. Woodruff et al., Bone tissue engineering: from bench to bedside, Materials Today, vol. 15, no. 10, pp. 430–435, Oct. 2012, [https://doi.org/10.1016/s1369-7021\(12\)70194-3](https://doi.org/10.1016/s1369-7021(12)70194-3)
6. Q. Wang, Q. Wang, and C. Wan, Preparation and evaluation of a biomimetic scaffold with porosity gradients in vitro, Anais da Academia Brasileira de Ciências, vol. 84, no. 1, pp. 9–16, Mar. 2012, <https://doi.org/10.1590/s0001-37652012000100003>
7. Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A. et al. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 9, 18 (2014). <https://doi.org/10.1186/1749-799X-9-18>
8. World Health Organization. WHO Guidelines on Laboratory Biosafety. 4th ed. 2020. 124 p. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311> (date of access: 01.02.2025)

9. Сукач О. М., Іонов І. А., Всеволодська С. О. Вступ до біології стовбурової клітини. Біорізноманіття, екологія та експериментальна біологія, vol. 2, no. 23, pp. 47–60, 2021, <https://doi.org/10.34142/2708-5848.2021.23.2.09>.
10. J. Placone, A. Engler. Recent Advances in Extrusion-Based 3D Printing for Biomedical Applications. Advanced Healthcare Materials, vol. 7, no. 8, Dec. 2017, <https://doi.org/10.1002/adhm.201701161>

REFERENCES

1. WHO Scientific Group on the Prevention and Management of Osteoporosis (2000 : Geneva, Switzerland). (2003). Prevention and management of osteoporosis : report of a WHO scientific group. World Health URL: <https://iris.who.int/handle/10665/42841>
2. Strategies for Controlled Delivery of Growth Factors and Cells for Bone Regeneration URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3358582/>
3. BIOACTIVE MATERIALS FOR REGENERATION OF BONE TISSUE URL: <https://eprints.kname.edu.ua/57433/1/2020%20%D0%BF%D0%B5%D1%87.%205%D0%9D%2B.pdf>
4. Duane E. G. A Practical Guide to Implementing a BSL-2+ Biosafety Program in a Research Laboratory. Applied Biosafety. 2013. Vol. 18, no. 1. P. 30–36. URL: <https://doi.org/10.1177/153567601301800105> (date of access: 31.03.2025).
5. Bone tissue engineering: from bench to bedside URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702112701943>
6. Q. Wang, Q. Wang, and C. Wan, “Preparation and evaluation of a biomimetic scaffold with porosity gradients in vitro,” Anais da Academia Brasileira de Ciências, vol. 84, no. 1, pp. 9–16, Mar. 2012, doi: 10.1590/s0001-37652012000100003.
7. M. A. Woodruff et al., “Bone tissue engineering: from bench to bedside,” Materials Today, vol. 15, no. 10, pp. 430–435, Oct. 2012, doi: 10.1016/s1369-7021(12)70194-3
8. World Health Organization. WHO Guidelines on Laboratory Biosafety. 4th ed. 2020. 124 p.
9. О. М. Сукач, І. А. Іонов, and С. О. Всеволодська, “Вступ до біології стовбурової клітини,” Біорізноманіття, екологія та експериментальна біологія, vol. 2, no. 23, pp. 47–60, 2021, doi: 10.34142/2708-5848.2021.23.2.09.
10. J. K. Placone and A. J. Engler, “Recent Advances in Extrusion-Based 3D Printing for Biomedical Applications,” Advanced Healthcare Materials, vol. 7, no. 8, Dec. 2017, doi: 10.1002/adhm.201701161

УДК 608

BIOSAFETY OF FEMORAL BONE BIOIMPLANT PRODUCTION USING 3D BIOPRINTING

Vladyslav Skubko

v.skubko.zf41mp.fbmi25@lil.kpi.ua

Oksana Biloshytska

biloshytska.oksana@lil.kpi.ua

National Technical University of Ukraine
“Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”

Abstract - 3D bioprinting technology opens new horizons in regenerative medicine, particularly in creating personalized bioimplants for restoring large femoral bone defects, offering an alternative to traditional methods with their limitations. However, this innovative approach, combining engineering, materials science, and cellular technologies, simultaneously poses complex challenges in the field of biosafety. Ensuring patient safety requires multifaceted control encompassing the entire production cycle – from raw materials to the final implant-ready product.

This work systematically analyzes the key biosafety aspects of 3D bioprinting of bone implants. It addresses the critical importance of using thoroughly tested bioactive and biocompatible materials (hydroxyapatite, β -TCP, polymers) that do not cause toxic or immune reactions, possess controlled degradation rates, and have the necessary mechanical properties. Special attention is given to the cellular component: the advantages of using autologous cells to avoid rejection, stringent requirements for screening and processing allogeneic cells, and the necessity of confirming cell viability, proliferative capacity, and osteogenic potential.

The uncompromising need for maintaining sterility at all stages is emphasized: the use of cleanrooms (ISO 14644), aseptic techniques by personnel, sterilization of equipment and materials, and continuous environmental monitoring according to GMP standards. The significance of accurate reproduction of the implant's individual geometry and optimization of its porosity for successful vascularization and integration is highlighted. The work also covers the requirements for the final quality assessment of the finished implant, including tests for biocompatibility, mechanical strength, and durability, as well as the safe disposal of production waste.

Thus, unlike fragmented studies, this work underscores the necessity of a holistic, integrated biosafety management system, which is an indispensable condition for the safe and effective clinical application of 3D-bioprinted bone implants. The implementation of clear standards and regulatory protocols is key for the further development and responsible introduction of this promising technology.

Keywords: biosafety, bioethics, implant, bone.