НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
Факультет біомедичної інженерії
Кафедра трансляційної медичної біоінженерії

«На правах рукопису»
УДК 615.47:004.94:547.912

До захисту допущено:
Завідувач кафедри
_____ Олександр БЕСАРАБ
«___»_____ 2024 р.

Магістерська дисертація

на здобуття ступеня магістра
за освітньо-професійною програмою «Регенеративна та біофармацевтична інженерія»
зі спеціальності 163 «Біомедична інженерія»
на тему: «Розробка технічного файлу на напівпроникну мембрану гематоенцефалічного бар'єру методом 3D-біодруку для *in vitro* досліджень»

Виконала:
студентка ІІ курсу, групи ЗФ-31мп
Макляк Таїсія Олегівна

_____

Науковий керівник:
Доцент кафедри ТМБ, к.т.н
Луценко Тетяна Миколаївна

_____

Рецензент:
Асистент кафедри ББЕБ, доктор філософії
Колтишева Діна Сергіївна _____

Засвідчую, що у цій магістерській дисертації немає запозичень з праць інших авторів без відповідних посилань.
Студента/ки _____

Київ – 2024 року

Національний технічний університет України

«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біомедичної інженерії

Кафедра трансляційної медичної біоінженерії

Рівень освіти: другий (магістерський)

Спеціальність: 163 - Біомедична інженерія

Освітньо-професійна програма «Регенеративна та біофармацевтична інженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри трансляційної

медичної біоінженерії

_____Олександр БЕСАРАБ

«__» _____ 2024 р.

ЗАВДАННЯ

на магістерську дисертацію студенту

Макляк Таїсії Олегівні

1. Тема дисертації «Розробка технічного файлу на напівпроникну мембрану гематоенцефалічного бар'єру методом 3D-біодруку для *in vitro* досліджень», науковий керівник дисертації доцент кафедри трансляційної медичної біоінженерії, к.т.н. Луценко Тетяна Миколаївна, затверджені наказом по університету від 08.11.2024 р. № 5025-с.
2. Термін подання дисертації здобувачем «10» грудня 2024 р.
3. Об’єкт дослідження: науково-практичні засади розробки технічної документації на напівпроникну мембрану гематоенцефалічного бар'єру методом 3D-біодруку для *in vitro* досліджень.
4. Предмет дослідження: технологічні, інженерні, фізико-хімічні та медико- біологічні аспекти розробки документації для напівпроникної мембрани гематоенцефалічного бар'єру методом 3D-біодруку для *in vitro* досліджень.
5. Перелік завдань, які потрібно виконати: провести аналіз стану проблеми пошкоджень гематоенцефалічного бар’єру; обґрунтувати вибір матеріалів для напівпроникної PLGA-мембрани ГЕБ; розробити технічну документацію для виробництва та експлуатації напівпроникної PLGA-мембрани ГЕБ; змоделювати напівпроникну PLGA-мембрану ГЕБ методом 3D-біодруку для *in vitro* досліджень.
6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу: графічні зображення, креслення виробу, технологічна схема виробництва, схема компонування та потоків сировини у виробничих приміщеннях.
7. Орієнтовний перелік публікацій: не передбачено робочим навчальним планом.
8. Консультанти розділів дисертації: не передбачено робочим навчальним планом.
9. Дата видачі завдання: «02» вересня 2024

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1	Вибір здобувачем науково-практичного напрямку досліджень	02.09.2024 – 13.09.2024 рр.	
2	Формування проєкту теми магістерської дисертації (спільно з науковим керівником)	14.09.2024 – 23.09.2024 рр.	
3	Затвердження теми магістерської дисертації та наукового керівника наказом по університету	24.09.2024 – 08.11.2024 рр.	
4	Виконання магістерської дисертації згідно календарного плану, узгодженого із науковим керівником	09.11.2024 – 02.12.2024 рр.	
5	Перевірка магістерської дисертації на предмет запозичень та плагіату співробітником випускової кафедри	02.12.2024 – 03.12.2024 рр.	
8	Рецензування магістерської дисертації	04.12.2024 – 10.12.2024 рр.	
9	Захист магістерської дисертації	17.12.2024 – 18.12.2024 рр	

Здобувач _____ Т.О. Макляк

Науковий керівник дисертації _____ Т.М. Луценко

РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація складається з 146 сторінок, враховуючи 3 рисунка, 5 формул та 21 таблиць. Кількість використаної літератури становить 101 найменувань.

Актуальність: гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ) є складною фізіологічною структурою, яка обмежує проникнення різних молекул через кровоносну систему в мозок. Зважаючи на важливість досліджень, пов'язаних із моделюванням ГЕБ, розробка та виготовлення інноваційних мембран для *in vitro* досліджень методом 3D-біодруку відкриває нові можливості для тестування лікарських засобів, що в свою чергу може значно оптимізувати процеси розробки нових лікарських препаратів та їхню безпеку. Розробка технічного файлу для виробу є необхідною умовою для забезпечення відповідності міжнародним стандартам та нормативним вимогам щодо таких медичних виробів.

Мета роботи: провести науково-технічне та медико-біологічне обґрунтування структури і змісту технічного файлу на напівпроникну мембрану гематоенцефалічного бар'єру, виготовлену методом 3D-біодруку, для використання у *in vitro* дослідженнях лікарських засобів.

Об'єкт дослідження: науково-практичні засади розробки технічної документації на напівпроникну мембрану гематоенцефалічного бар'єру, виготовлену методом 3D-біодруку.

Предмет дослідження: медико-біологічні, фізико-хімічні, інженерні та технологічні аспекти розробки технічної документації на медичні вироби, що імітують гематоенцефалічний бар'єр та використовуються в *in vitro* тестуваннях для оцінки проникності лікарських засобів.

Наукова новизна: проведено науково-технічне та медико-біологічне обґрунтування використання 3D-біодруку для створення мембрани ГЕБ, яка може бути використана для *in vitro* тестування лікарських засобів. Обґрунтовано вибір матеріалів для виготовлення мембрани, досліджено їхні фізико-хімічні властивості та біосумісність. Розроблено підхід до створення технічної документації для медичних виробів, що відповідає міжнародним стандартам, та підтверджено ефективність і безпеку такого виробу для проведення доклінічних досліджень..

Практична значущість: розроблені підходи можуть значно підвищити ефективність досліджень лікарських засобів, зокрема шляхом зменшення залежності від *in vivo* моделей. Розроблений технічний файл може бути використаний для оформлення документації, проходження оцінки відповідності та виходу на ринки України та ЄС. Використання мембрани ГЕБ для *in vitro* досліджень дасть можливість значно спростити процес розробки лікарських засобів та підвищити рівень їх безпеки.

Ключові слова: гематоенцефалічний бар'єр, 3D-біодрук, напівпроникна мембрана, *in vitro* дослідження, PLGA, ендотеліальні клітини, нейрони, ЦНС, тестування лікарських засобів, технічна документація, регуляторні вимоги.

ABSTRACT

The master's thesis consists of 146 pages, including 3 figures, 5 formulas and 21 tables. The bibliography includes 101 references.

Relevance: The blood-brain barrier (BBB) is a complex physiological structure that limits the penetration of various molecules through the bloodstream into the brain. Given the importance of blood-brain barrier modelling research, the development and manufacture of innovative membranes for *in vitro* studies using 3D bioprinting opens up new opportunities for drug testing, which in turn can significantly optimize the development of new drugs and their safety. The development of a technical file for a product is a prerequisite for ensuring compliance with international standards and regulatory requirements for such medical devices.

Purpose: to conduct a scientific, technical and biomedical substantiation of the structure and content of the technical file for a semipermeable blood-brain barrier membrane manufactured by 3D bioprinting for use in *in vitro* drug trials.

Object of research: scientific and practical principles of developing technical documentation for a semipermeable blood-brain barrier membrane made by 3D bioprinting.

Subject of the study: biomedical, physical, chemical, engineering and technological aspects of the development of technical documentation for medical devices that mimic the blood-brain barrier and are used in *in vitro* tests to assess the permeability of drugs.

Scientific novelty: scientific, technical and biomedical substantiation of the use of 3D bioprinting for the creation of a BBB membrane that can be used for *in vitro* testing of drugs was carried out. The choice of materials for the membrane manufacturing was substantiated, and their physical and chemical properties and biocompatibility were investigated. An approach to the creation of technical documentation for medical devices that meets international standards has been developed, and the efficacy and safety of such a product for preclinical studies has been confirmed.

Practical significance: the developed approaches can significantly improve the efficiency of drug trials, in particular by reducing the dependence on *in vivo* models. The developed technical file can be used for documentation, conformity assessment and entry into the Ukrainian and EU markets. The use of the BBB membrane for *in vitro* studies will significantly simplify the drug development process and increase the level of safety.

Keywords: blood-brain barrier, 3D bioprinting, semipermeable membrane, *in vitro* studies, PLGA, endothelial cells, neurons, CNS, drug testing, technical documentation, regulatory requirements.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) – основний фактор росту фібробластів.

EBM-2 (Endothelial Basal Medium-2) – базове середовище для культивування ендотеліальних клітин.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) – імуноферментний аналіз.

FBS (Fetal Bovine Serum) – сироватка ембріонів великої рогатої худоби.

GA (Glycolic Acid) – гліколева кислота.

GC (Gas Chromatography) – газова хроматографія.

GMP (Good Manufacturing Practice) – Належна інженерна практика

HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) – високоефективна рідинна хроматографія.

LA (Lactic Acid) – молочна кислота.

NGF (Nerve Growth Factor) – нервовий фактор росту.

PBS (Phosphate-Buffered Saline) – фосфатно-буферний розчин.

PET (Polyethylene Terephthalate) – поліетилентерефталат.

PE (Polyethylene) – поліетилен.

PP (Polypropylene) – поліпропілен.

PVC (Polyvinyl Chloride) – полівінілхлорид.

SAL (Sterility Assurance Level) – рівень забезпечення стерильності.

АФІ (Активний фармацевтичний інгредієнт) – діюча речовина лікарських засобів.

ГЕБ (Гематоенцефалічний бар’єр) – фізіологічний бар'єр між кровоносною системою та ЦНС.

ІЧ-спектр (Інфрачервоний спектр) – метод інфрачервоної спектроскопії.

ПС (Поживне середовище) – середовище для культивування клітин.

ВСТУП

Актуальність

Розвиток біотехнологій та медичних досліджень вимагає постійного вдосконалення методів для моделювання складних біологічних процесів, зокрема функцій біологічних бар'єрів. Одним з найважливіших бар'єрів в організмі людини є гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ), який забезпечує захист мозку від шкідливих агентів, одночасно обмежуючи проникнення лікарських засобів та інших молекул [1–3]. Однак ця ж функція обмежує ефективність терапії деяких неврологічних захворювань, таких як хвороба Паркінсона, епілепсія, а також лікування або фармакологічну корекцію деяких афективних розладів, що вимагають специфічних лікарських засобів [4–5].

Для дослідження проникності лікарських засобів через ГЕБ та розробки нових методів лікування виникає необхідність у створенні модельних систем, які можуть імітувати природний бар'єр в лабораторних умовах. Одним із перспективних напрямків є використання 3D-біодруку для створення таких моделей. Ця технологія дозволяє отримувати структури, які максимально точно відображають фізіологічні умови, і на їх основі проводити дослідження проникності молекул і взаємодії лікарських засобів з клітинами мозку.

Розробка напівпроникної мембрани ГЕБ для *in vitro* досліджень за допомогою 3D-біодруку є важливим кроком у напрямку створення ефективних моделей для тестування лікарських засобів та вивчення фізіології гематоенцефалічного бар'єру. Технологія 3D-біодруку дає змогу створювати більш складні та функціональні конструкції, що значно підвищує точність і надійність досліджень у порівнянні з традиційними методами.

Існуючі методи тестування лікарських засобів на проникність через ГЕБ часто включають використання живих тварин, що є етичним і технічним обмеженням, а також дорогою та тривалою процедурою [6]. Мембрана ГЕБ для *in vitro* тестувань може значно знизити потребу у таких дослідженнях.

Мета магістерської дисертації: розробка технічного файлу для напівпроникної мембрани ГЕБ методом 3D-біодруку, яка призначена для використання в лабораторних *in vitro* дослідженнях.

Завдання:

1. Розробити технологію виробництва мембрани ГЕБ з використанням 3D-біодруку.
2. Визначити основні характеристики мембрани, такі як товщина, пористість, механічні властивості.
3. Підготувати технічний файл, що включає необхідну документацію для виробництва та контролю якості мембрани.
4. Оцінити біосумісність мембрани з клітинами (ендотеліальними клітинами, нейронами мишей).
5. Розробити інструкцію для використання мембрани в лабораторних дослідженнях та тестуваннях.
6. Розробити проєкт Декларації про відповідність медичних виробів

Дана робота сприятиме розвитку нових методів тестування лікарських засобів, що дозволить значно поліпшити ефективність терапії неврологічних захворювань та покращити процес розробки ліків, які можуть ефективно долати гематоенцефалічний бар'єр.

Гематоенцефалічний бар'єр — це фізіологічна структура, яка складається з ендотеліальних клітин, що формують щільні з’єднання і контролюють проникнення молекул з крові в мозок. Цей бар'єр захищає нервову систему від токсичних речовин та патогенів, однак він також обмежує ефективність деяких терапевтичних препаратів, що робить його важливою темою для досліджень [7].

Технологія 3D-біодруку дозволяє створювати складні структури, що складаються з живих клітин, біологічно активних компонентів та полімерних матеріалів, які можуть імітувати реальні біологічні бар'єри. За допомогою цієї

технології можна створювати мембрани з точним контролем над їх структурою та властивостями, що робить їх оптимальними для лабораторних тестів.

Існують дослідження, що використовують 3D-біодрук для створення фізіологічних структур, проте ця галузь активно розвивається і потребує подальших розробок і вдосконалення [8]. Розробка детального технічного файлу для мембрани ГЕБ є важливим етапом для забезпечення її надійності, безпеки та ефективності у лабораторних умовах.

Наукова новизна роботи полягає в розробці нової моделі гематоенцефалічного бар’єру за допомогою 3D-біодруку для проведення лабораторних досліджень, шляхом створення мембрани, що імітує природні бар’єрні функції, що складається з полімеру полі(молочна- ко -гліколева) кислота (PLGA), ендотеліальних клітин та нейронів мишей. Така модель може бути використана для тестування проникності різних молекул, зокрема лікарських засобів, та для вивчення механізмів їхнього впливу на мозок.

Практичне значення роботи полягає у можливості створення ефективних лабораторних моделей для тестування лікарських засобів і вивчення проникності молекул через бар'єр ГЕБ, а також модифікування виробу для інших наукових цілей, таких як моделювання специфічних пошкоджень ГЕБ. Ця розробка може стати основою для майбутніх досліджень у сфері медичних досліджень та розробки нових лікарських препаратів, що здатні долати гематоенцефалічний бар’єр.

РЕГУЛЯТОРНА ІНФОРМАЦІЯ ТА ОПИС ВИРОБУ

1.1. Регуляторна інформація

1.1.1. Класифікація напівпроникної PLGA-мембрани ГЕБ

Напівпроникна мембрана гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ), виготовлена методом 3D-біодруку, призначена для проведення лабораторних *in vitro* досліджень для моделювання бар'єрних функцій ГЕБ, тестування проникності лікарських засобів, малих, великих молекул та іонів, а також для аналізу клітинних взаємодій.

Виріб не призначений для прямого використання в організмі людини, що визначає його належність до класу виробів для *in vitro* застосування [9].

Згідно з Регламентом (EU) 2017/746 (IVDR) виріб класифікується як медичний виріб для діагностики *in vitro*, оскільки використовується виключно для досліджень проникності та взаємодії речовин у лабораторних умовах та не контактує з організмом людини або тварин [10].

Відповідно до Постанови Кабінету Міністрів України №753, мембрана належить до медичних виробів, які не підпадають під категорію активних імплантованих або терапевтичних пристроїв [11]. Відповідно до національної кваліфікації, напівпроникна PLGA-мембрана ГЕБ належить до категорії медичних виробів для лабораторних досліджень *in vitro*.

Матеріал мембрани PLGA – полімер молочно-гліколевої кислоти, що в даному випадку забезпечує фізичну структуру для клітин і досліджуваних молекул [12; 13]. Матеріал є виключно основою для моделювання ГЕБ, що обмежує застосування виробу тільки лабораторними експериментами.

Мембрана включає живі клітини, що забезпечують функціональність і моделювання реального гематоенцефалічного бар'єру.

Ендотеліальні клітини забезпечують бар'єрні властивості мембрани, але їх використання обмежується *in vitro* умовами.

Нейрони мишей забезпечують моделювання нервової тканини для аналізу впливу речовин на нейрони після проходження через бар’єр, але не застосовуються в клінічних умовах.

Таким чином, виріб призначений для моделювання бар’єрних функцій ГЕБ, дослідження проникності лікарських засобів та взаємодії речовин із клітинами ГЕБ, але не призначений для імплантації, лікування або діагностики пацієнтів, що обмежує його використання виключно лабораторними умовами.

1.2. Опис виробу

Напівпроникна мембрана гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) розроблена для лабораторних досліджень з метою моделювання бар’єрних функцій людського ГЕБ. Вона використовується для вивчення процесів проникності та транспортних механізмів молекул через бар’єр, а також для тестування нових лікарських засобів та оцінки їхньої ефективності й безпеки при взаємодії з ГЕБ.

Порушення ГЕБ сприяє проникненню імунних клітин і запальних молекул з крові в мозок, що може спричинити або посилити запалення в ЦНС. Хронічне запалення є одним з основних механізмів, які призводять до розвитку нейродегенеративних захворювань, таких як хвороба Альцгеймера і хвороба Паркінсона [14].

Дисфункція ГЕБ може бути причиною тривожних розладів та шизофренії, а також афективних розладів (розлади депресивного та біполярного спектрів). Бар'єрна дисфункція впливає на хімічний баланс у мозку, порушуючи регуляцію нейромедіаторів, таких як серотонін, дофамін та глутамат, що призводить до розвитку патологічних станів [15].

Під час виробництва напівпроникної PLGA-мембрани ГЕБ можливе виготовлення виробу у трьох конфігураціях відповідно до наукового інтересу дослідження із їх використанням:

- Стандартна пористість (імітація базових умов бар’єрної проникності);
- Підвищена проникність (моделювання дисфункції ГЕБ, що асоціюють із розвитком нейродегенеративних захворювань та афективних розладів);
- Змінна товщина мембрани (для різних експериментів та потреб клітинної взаємодії).

У якості подальшої розробки можливий випуск напівпроникної мембрани ГЕБ у наступних варіантах:

- Виріб із білковими покриттями (моделювання експериментів, що потребують специфічної клітинної адгезії);
- Мембрана, покрита антитілами або рецепторами (дослідження транспортних механізмів певних речовин або виготовлення моделі ГЕБ при певних захворюваннях);
- Мембрана із гідрофобним або гідрофільним покриттям (дослідження взаємодії напівпроникної мембрани з водорозчинними та жиророзчинними молекулами для тестування препаратів з різними фізико-хімічними властивостями);
- Динамічна модель з інтегрованими мікроканалами (моделювання потоку крові за допомогою мікрофлюїдики);
- Мембрана із наночастинками (підтримка довшого терміну функціональності мембрани.

2. ОБОВ'ЯЗКОВІ ВИМОГИ

2.1. Нормативні стандарти на виріб

ISO 13485 — «Система управління якістю для медичних виробів» встановлює вимоги до системи управління якістю для виробництва медичних виробів, включно із виробами для *in vitro* діагностики. Відповідно до даного стандарту виконується розробка технічної документації, валідація процесів виробництва, впровадження процедур оцінки ризиків, ведення документації [9].

Стандарт ISO 14971 «Управління ризиками для медичних виробів» описує методологію оцінки та управління ризиками для забезпечення безпечного використання виробу [16]. Відповідно до нього, проводять ідентифікацію потенційних ризиків та впроваджують заходи для їх мінімізації.

Європейський регламент для *in vitro* діагностичних виробів IVDR (EU 2017/746) визначає вимоги до *in vitro* виробів, включаючи дослідження проникності лікарських засобів [10].

Серія стандартів ISO 10993 «Оцінка біологічної безпеки матеріалів» регламентує тестування матеріалів, які контактують із біологічними системами [17]. Для PLGA-мембрани застосовуються:

ISO 10993-5 «Випробовування на цитотоксичність *in vitro*» для аналізу життєздатності ендотеліальних клітин та нейронів мишей [18],

ISO 10993-13 «Якісний та кількісний аналіз продуктів деградації полімерних медичних виробів» для контрою утворення молочної гліколевої кислот у процесі розкладу PLGA [19],

ISO 10993-18 «Хімічна характеристика матеріалів медичних виробів у процесі управління ризиками» для ідентифікації можливих залишкових хімічних речовин [20].

Стандарт ISO 11737-2 «Випробування на стерильність, що проводять під час визначення, валідації та підтримання процесу стерилізації» регламентує методи перевірки стерильності готового виробу [21].

Для класифікації приміщень за класами чистоти застосовують ISO 14644-1 «Чисті приміщення й пов`язані з ними контрольовані середовища» [22].

Також обов’язковим є дотримання настанов належної виробничої практики.

Для контролю якості під час аналізу проникності лікарських засобів через мембрану керуються стандартом ISO 15189:2015 «Медичні лабораторії – Вимоги до якості та компетентності» [23].

Дотримуються ДСТУ EN ISO 178:2019 «Пластмаси. Визначення властивостей у разі згинання» під час тестування міцності та пружності мембрани [24], ДСТУ EN ISO 11357-6:2022 – під час аналізу термічної стабільності PLGA [25].

Для тестування на хімічну сумісність компонентів ЛЗ із полімером мембрани керуються ДСТУ EN ISO 10993-18:2022 «Хімічна характеристика матеріалів медичних виробів у процесі управління ризиками» [26]. Також використовують статті ЄФ 2.2.3 «pH determination» [27], 2.2.44 «Total Organic Carbon» [28], Стаття 2.6.1 «Sterility» [29], Стаття 2.2.29 «Liquid Chromatography» [30], 2.2.25 «Absorption Spectrophotometry, UV-Visible» [31], 3.1.5 «Materials Based on Poly (lactic acid) (PLA) and Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA)» [32].

2.1. Відповідність вимогам маркування

Для вказання символів для стерильності, одноразового використання, умов зберігання тощо керуються ДСТУ EN ISO 15223-1:2018 «Вироби медичні. Символи, застосовані під час маркування на медичних виробах, етикетках та в супровідній документації. Загальні вимоги» [33], для складання інструкції – IVDR [10].

Відповідно до ДСТУ EN ISO 11607-1:2019 «Вироби медичні простерилізовані. Пакування. Основні вимоги до матеріалів, стерильних бар`єрних і пакувальних систем» та ДСТУ EN ISO 11607-2:2015 «Вироби медичні простерилізовані. Пакування. Валідаційні вимоги» встановлюють вимоги до герметичності первинної упаковки (блістер) та тестування на бар'єрні властивості вторинної упаковки (картонної коробки) [34; 35].

2.2. Реєстрація виробу

Для забезпечення правомірності використання виробу на території України та ЄС, він має бути зареєстрований у відповідності до таких нормативних документів:

- Постанова Кабінету Міністрів України №753 «Про затвердження Технічного регламенту щодо медичних виробів» [11].
- Технічний регламент щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затверджений постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013 № 754 Регламент (EU) 2017/746 (IVDR): Процедура оцінки відповідності [36].
- Призначення уповноваженого представника (Authorized Representative) для реєстрації у ЄС.

2.3. Відповідність вимогам GMP

Виробництво напівпроникної мембрани гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ), виготовленої методом 3D-біодруку, здійснюється відповідно до принципів Належної виробничої практики (GMP), що забезпечує якість, стерильність та безпечність виробу на кожному етапі його життєвого циклу.

Виробництво мембрани здійснюється відповідно до стандартів GMP:

- Контроль чистоти повітря у зоні класу Б (ISO 14644-1) [37].

- Стерильне додавання клітин у ламінарному боксі класу II.
- Валідація технологічних процесів (стерильність, герметичність упаковки) [38].

3. АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Складання розділу "Аналіз ризиків" базується на вимогах стандарту ISO 14971:2019 (ДСТУ EN ISO 14971:2015), який регламентує процес управління ризиками для медичних виробів [39]. У наступному розділі представлено систему ідентифікації, оцінювання, управління та моніторингу ризиків, які можуть виникнути на різних етапах життєвого циклу напівпроникної мембрани гематоенцефалічного бар’єру (ГЕБ), розробленої методом 3D-біодруку.

Метою управління ризиками є мінімізація небезпек, пов'язаних із розробкою, виробництвом, використанням та утилізацією мембрани ГЕБ, для забезпечення її ефективності, безпечності та відповідності нормативним вимогам.

3.1. Аналіз ризику

Аналіз ризику полягає в ідентифікації небезпек, що можуть виникнути протягом життєвого циклу мембрани ГЕБ, та визначенні їхнього впливу на ефективність і безпеку виробу.

Для ідентифікації небезпек складено таблицю 3.1, у якій наведено інформацію про категорії небезпек, їх опис та потенційні наслідки.

Таблиця 3.1. Ідентифікація небезпек

Категорія небезпеки	**Опис**	**Потенційні наслідки**
Біологічна небезпека	Контамінація клітин або поживного середовища.	Зниження життєздатності клітин, недостовірні результати досліджень
	Взаємодія між клітинами різних шарів мембрани, що не відповідає теоретичним значенням	Некоректне відтворення функцій ГЕБ, відхилення у результатах дослідження

Продовження табл. 3.1.

Хімічна небезпека	Вивільнення залишкових розчинників із PLGA або взаємодія із середовищем	Токсичність для клітин, спотворення дослідницьких даних
	Розкладання антиоксидантів у поживному середовищі	Погіршення умов для клітинної культури, підвищена деградація клітин
	Зміна кислотності (pH) середовища	Порушення функціональності клітин, нестабільність мембрани
Механічна небезпека	Руйнування мембрани під час маніпуляцій	Непридатність для досліджень, втрати матеріалів
	Нерівномірний розподіл пор або порушення цілісності пористої структури	Зниження функціональності мембрани, нерівномірна проникність
Експлуатаційна небезпека	Невідповідне використання виробу (недотримання умов зберігання або стерильності)	Контамінація, порушення функціональності мембрани
	Використання некоректної методики тестування ЛЗ	Недостовірні результати тестування, помилкові висновки
Небезпека порушення стабільності	Деградація PLGA або клітин під час зберігання	Зменшення ефективності мембрани, спотворення результатів
	Перевищення терміну придатності поживного середовища	Некоректна підтримка життєздатності клітин, контамінація

Продовження табл. 3.1.

Технологічна небезпека	Помилки під час 3D-друку мембрани (неточність розмірів, нерівномірна товщина)	Зниження механічної стійкості, невідповідність технічним характеристикам
	Неправильне нанесення шарів (біочорнил або клітин)	Некоректне відтворення функціональності мембрани
Ризики транспортування	Пошкодження виробу під час транспортування	Втрата стерильності, механічні пошкодження
	Коливання температури під час транспортування	Зміна фізико-хімічних властивостей мембрани та поживного середовища
Ризики маркування та інструкцій	Неправильне маркування умов зберігання або використання	Невідповідне зберігання, контамінація, неправильне застосування

3.2. Оцінка ймовірності та серйозності ризиків

Для побудови матриці ризиків необхідно визначити рівні вірогідності та якісні рівні тяжкості.

Якісні рівні вірогідності:

- Високий (ризик виникає регулярно або часто у виробничому процесі);
- Середній (виникнення ризику трапляється рідко);
- Низький (ризик виникає надзвичайно рідко або майже не виникає).

Рівні тяжкості:

- Незначний (ризик маж мінімальний вплив на якість виробу, без суттєвого впливу на функціональність або безпеку);
- Помірний (ризик призводить до зниження ефективності або виникнення дефекту, який можна виправити);
- Значний (ризик призводить до дефектів, що роблять виріб непридатним або небезпечним).

Під час зберігання або стерилізації поживного середовища через недотримання умов стерильності або пошкодження стерильного пакування виникає ризик контамінації поживного середовища (R1).

При неправильному налаштуванні 3D-біодруку виникає ризик помилок, пов’язаних із параметрами друку: швидкість, температура, геометрія тощо (R2).

Під час перенесення, обрізання або фіксації мембрани через механічні впливи або недотримання правил обережності виникає ризик її пошкодження (R3).

Низький клас чистоти приміщення може призвести до забруднення під час підготовки матеріалів (R4).

Через невідповідне транспортування, зберігання або попередню підготовку клітин у лабораторних умовах та порушення температурного режиму виникає ризик зниження життєздатності клітин (R5).

Через несправності 3D-принтера можуть статися відхилення в геометрій PLGA-мембрани (R6).

Стрес для клітин через невідповідність умов культивування або хімічного складу мембрани може стати причиною втрати біофункціональності ендотеліального шару (R7).

Невідповідність розміру пор до заданих може вплинути на результати тестування проникності (R8).

Через недостатньо точні або некалібровані методи тестування проникності можуть виникати помилки під час оцінки проникності PLGA-мембрани (R9).

Далі наведено складену матрицю ризиків виробничого процесу та експлуатації напівпроникної PLGA-мембрани ГЕБ для *in vitro* досліджень.

Таблиця 3.2. Матриця ризиків виробничого процесу та експлуатації виробу

		Якісні рівні тяжкості		
		незначний	помірний	значний
Якісні рівні вірогідності	Високий		R2, R6	R4, R8
	Середній		R1, R5	R3, R7, R9
	Низький	R1		

На основі проведеного аналізу визначено, що найбільш критичними контрольними точками у виробництві напівпроникної мембрани гематоенцефалічного бар'єру є:

- Підготовка поживного середовища та матеріалів (стерильність середовища та його відповідність необхідним фізико-хімічним характеристикам);
- Процес 3D-біодруку (точність параметрів друку, забезпечення геометрії мембрани, а також відповідність розміру пор);
- Посів клітин та їх культивування (підтримка життєздатності клітин та контроль умов культивування (температура, вологість, рівень CO_2));
- Обробка готової мембрани (уникнення механічних пошкоджень мембрани та забезпечення стерильності у процесі перенесення та пакування);

- Тестування готового виробу (точність оцінки проникності мембрани, яка є ключовим параметром її функціональності).

Для мінімізації ймовірності виникнення ризиків, важливо визначити основні параметри для контролю кожної з критичних точок та забезпечити належний моніторинг на всіх етапах технологічного процесу.

У Додатку А наведено перелік контрольних точок, які забезпечують дотримання технологічного режиму на найбільш критичних стадіях виробництва.

Для забезпечення моніторингу якості на різних етапах виробництва напівпроникної PLGA-мембрани, складено таблицю параметрів контролю для оцінки якості основної сировини, допоміжних продуктів та матеріалів (Додаток Б).

4. КРЕСЛЕННЯ ТА СПЕЦИФІКАЦІЇ

4.1. Креслення виробу

Для точного відображення технічних характеристик напівпроникної мембрани гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ), виготовленої методом 3D-біодруку, обрано виконання креслення у 2D-форматі (Додаток А). Даний підхід є найбільш доцільним і зручним для представлення ключових елементів виробу, його структури та функціональних характеристик.

Мембрана має багатошарову структуру (PLGA-основа, шар із ендотеліальними клітинами, шар із нейронами мишей), кожен із яких має свої функціональні особливості. 2D-креслення дозволяє детально показати горизонтальні площини кожного шару, їхній розмір, пористість та взаємне розташування [40]. У 2D-форматі розміри можуть бути чітко зазначені без перевантаження зображення тривимірними елементами, що спрощує інтерпретацію технічних даних для виробників, інженерів і контролю якості. 2D-креслення легко інтегрується у технічну документацію (звіти, технічні файли) та відповідає стандартам ISO, де креслення часто подаються у вигляді плоских проєкцій.

Використовується формат А4 (ISO 216) для зручності друку [41]. Основна проєкція – вид зверху, додаткові проєкції – вид збоку та розріз. Креслення виконується у масштабі 1:5.

Основна площина мембрани (вид зверху) – прямокутна форма із зазначенням точних розмірів: зовнішні – 15×20 мм, внутрішнє заглиблення – 10×15 мм (Рис. 4.1).

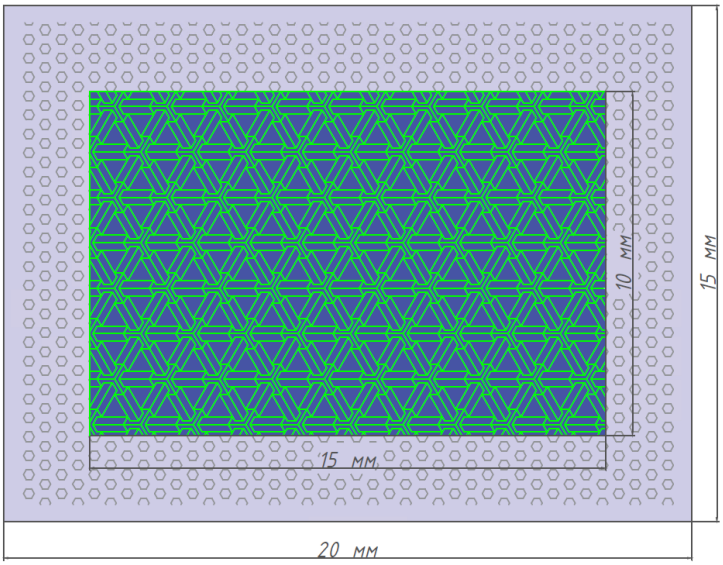


Рис. 4.1 – Основна площина виробу (вид зверху)

Вид збоку візуалізує зовнішню товщину мембрани, а також товщину центрального заглиблення для розміщення шарів ендотеліальних клітин та нейронів мишей (Рис. 4.2). Краї заглиблення округлені для зменшення механічного напруження. Зовнішня товщина складає 5±0,2 мм, товщина центрального заглиблення – 2,5±0,1 мм.

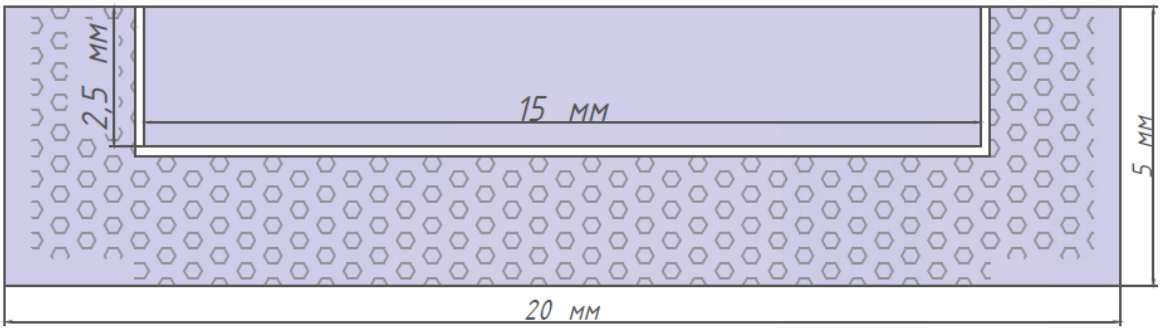


Рис. 4.2 – Візуалізація товщини виробу (вид збоку)

У кресленні напівпроникної мембрани ГЕБ для детального представлення її структури використовується поперечний розріз. Цей розріз дозволяє візуалізувати товщину мембрани, розподіл пор і шари, що складають мембрану (Рис. 4.3).

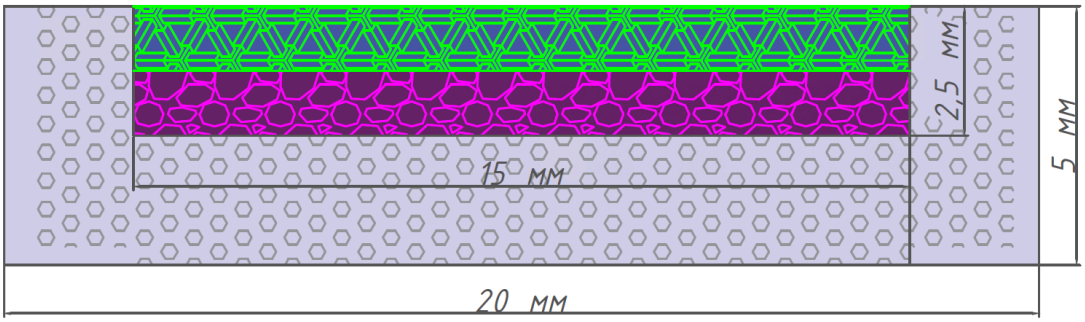


Рис. 4.3 – Поперечний переріз

Для чіткого виділення різних частин мембрани в розрізі використовується штрихування [42]. Це дозволяє розрізняти матеріали (PLGA, пори, клітини) і надає кресленню додаткову інформативність. Для демонстрації PLGA використовується суцільне штрихування, що дозволяє чітко виділити зовнішні та внутрішні шари мембрани. Для позначення пористості та функціональних шарів використовується штрихування різних форматів.

Легенда на кресленні пояснює умовні позначення, де суцільна лінія – зовнішній контур мембрани, пунктирна лінія – внутрішні грані заглиблення.

На кресленні додається таблиця основних розмірів (табл. 4.1)

Таблиця 4.1. Основні розміри напівпроникної PLGA-мембрани ГЕБ

Параметр	**Розмір, мм**	**Допуск, мм**
Довжина виробу	20	±0,5
Ширина виробу	15	±0,5
Товщина мембрани	5	±0,2
Розміри заглиблення	10×15	±0,1
Глибина заглиблення	2,5	±0,1

Креслення у програмі AutoCAD містить усі необхідні технічні деталі для виготовлення та аналізу готового виробу. Воно забезпечує точність розмірів, пористості та функціональності мембрани, необхідної для проведення лабораторних досліджень.

4.2. Специфікація якості

Назва виробу: *Напівпроникна PLGA-мембрана гематоенцефалічного бар'єру (PLGA-BBB)*

Код/номер партії*: BBB-0000/BBB-000001*

Мета використання**:** *Для лабораторних досліджень бар'єрних функцій та проникності через ГЕБ*

Таблиця 4.2. Специфікація якості виробу

№	Властивість	Параметри
	Напівпроникна PLGA-мембрана ГЕБ	
1	Зовнішній розмір мембрани	15×20±0,5 мм
2	Внутрішній розмір мембрани	10×15±0,1 мм
3	Зовнішня товщина	5±0,2 мм
4	Внутрішня товщина	2,5±01,1 мм
5	Відсоток пористості	50-70%
6	Діаметр пор	5-20 мкм
7	Тест на розтягнення	1-5 Н
8	Модуль пружності	10-50 кПа
9	Максимальне допустиме Навантаження	0,2-0,5 Н/см^2
10	Стійкість до проколів	0,5-1 Н
11	Рівень цитотоксичності	0-1 за шкалою цитотоксичності ISO 10993

Продовження табл. 4.2.

12	Рівень токсичних домішок у Матеріалі	Відсутні
13	Час збереження цілісності у поживному середовищі	7-14 діб
14	Мінімальна адгезія клітин	1000 кл/мм²
15	Оптимальна адгезія клітин	5000 - 10 000 кл/мм²
16	Проникність для малих молекул[1]	10^{-6} - 10^{-5} см/с
17	Проникність для іонів[2]	10^{-7} - 10^{-6} см/с
18	Проникність для великих молекул[3]	10^{-8} - 10^{-7} см/с
19	Проникність для маркерних молекул, що імітують ЛЗ[4]	10^{-7} - 10^{-5} см/с
20	Сталість початкової Проникності	95% початкової проникності протягом 7 діб
21	Індекс електричного опору	10^{6}-10^{12} Ом*см
22	Стерильність за ISO 11737 (індекс SAL)	10^{-6} (не більше ніж 1 живий мікроорганізм на мільйон виробів)
	Матеріали пакування	
23	Стерильність внутрішньої упаковки (індекс SAL)	10^{-6}
24	Внутрішня упаковка	непошкоджена
27	Зовнішня упаковка	непошкоджена
	Маркування	
28	Назва виробу	*Напівпроникна PLGA-мембрана гематоенцефалічного бар'єру (PLGA-BBB)*

Продовження табл. 4.2.

29	Код	*BBB-0000*
30	Дата виробництва	XX.XX.XXXX р.
31	Серійний номер	*BBB-000001*
	Умови зберігання та термін придатності	
32	Температурний режим	+2°C до +8°C
33	Вологість повітря	50-70%
34	Гарантований термін збереження якості	7 діб при дотриманні умов зберігання

Примітки:

[1] глюкоза, лактат

[2] іони натрію, кальцію, калію

[3] пептиди, альбумін

[4] ламотриджин, L-DOPA, Li^+

4.3. Обґрунтування специфікації

Мета використання

Метою використання напівпроникної PLGA-мембрани гематоенцефалічного бар'єру є проведення лабораторних досліджень бар'єрних функцій та проникності речовин через ГЕБ.

Для належного використання моделі необхідно дотримуватись відповідних діапазонів значень критичних параметрів.

Зовнішні та внутрішні розміри мембрани

Розмір мембрани складає 15×20 мм із допустимою похибкою в 0,5 мм у горизонтальній площині та 5±0,2 мм у вертикальній. Горизонтальний отвір повторює форму верхньої горизонтальної площини PLGA-мембрани та має розміри 10×15х2,5±0,1 мм.

Пористість

У PLGA-мембрані передбачено наявність пор у товщі матеріалу, які служать для стимуляції розростання тканин. Відносно висока пористість створює сприятливе середовище для проникнення клітин і розвитку тканин, що сприяє інтеграції мембрани з біологічними структурами.

На зовнішніх стінках мембрани пори розташовані лише в її нижній частині. Таке розміщення необхідне для запобігання прямому проникненню лікарських засобів (ЛЗ) у буферний розчин під час застосування мембрани. Це дозволяє забезпечити контрольований шлях проходження ЛЗ крізь мембрану, запобігаючи їхньому потраплянню в розчин без повного контакту з виробом.

Пористість 50-70% створює достатньо порожнього простору в мембрані для проникнення клітин та формування позаклітинного матриксу, що сприяє зростанню нових тканин у товщі мембрани. Висока пористість дає можливість для обміну молекулами і газами, необхідними для підтримки клітинної життєздатності, але водночас обмежує надмірне проникнення лікарських засобів.

Пористість до 70% дозволяє досягти балансу між підтримкою міцності та забезпеченням простору для росту тканин. При цьому мембрана залишається досить стійкою до деформацій і може виконувати захисну функцію.

Діаметр пор

Для PLGA-мембрани оптимальним діаметром пор є 5-20 мкм, що сприяє якісній адгезії клітин та створення мікросередовища для їх росту та розвитку [43].

Також пори такого діаметру забезпечують достатній простір для циркуляції поживних речовин, кисню та виведення метаболітів. Більше того, такі значення також дозволяють запобігати неконтрольованому вивільненню досліджуваних речовин у середовище, у якому знаходиться виріб.

Водночас, пори малих діаметрів мінімально впливають на міцність та структурну стабільність мембрани [44].

Тест на розтягнення

Оптимальна стійкість до розтягнення у межах 1-5 Н при розтягуванні в поздовжньому напрямку, дозволяє мембрані залишатися стійкою під час стандартних лабораторних маніпуляцій [45].

Модуль пружності

Модуль пружності в межах 10-50 кПа є достатнім для відтворення м'яких тканин, таких як мозкові капіляри. Така гнучкість забезпечує стабільність структури мембрани під час досліджень [46].

Максимальне допустиме навантаження

Мембрана повинна витримувати максимальне навантаження (до 0,2-0,5 Н/см²) , що імітує фізіологічні умови, в яких вона може зберігати свою форму, не деформуючись під час контакту з рідинами або клітинами.

Стійкість до проколів

Для того, щоб мембрана могла витримувати контакт з інструментами, оптимальною є стійкість до проколів у межах 0,5-1 Н. Це дозволяє уникнути механічного пошкодження під час обробки із використанням лабораторного посуду та інструментів.

Рівень цитотоксичності

Для напівпроникної мембрани гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ), призначеної для лабораторних досліджень, рівень цитотоксичності повинен

відповідати найнижчому можливому рівню, оскільки матеріал має бути біосумісним і не чинити токсичного впливу на клітини, що контактують із ним.

Згідно зі стандартами ISO 10993 (оцінка біологічної безпеки медичних виробів), рівень цитотоксичності оцінюється за шкалою від 0 до 4:

- 0 – немає реакції (нетоксичний)
- 1 – легка реакція
- 2 – помірна реакція
- 3 – середньо важка реакція
- 4 – сильна реакція

Для такого виробу, як напівпроникна мембрана ГЕБ, оптимальним є рівень цитотоксичності 0 або 1:

- 0 (нетоксичний) – мембрана не викликає жодних негативних клітинних реакцій;
- 1 (легка реакція) – допустимий рівень для матеріалів, що мають мінімальний вплив на клітини, який не впливає на їхню життєздатність та функціональність [14].

Рівень токсичних домішок у матеріалі

Відсутність токсичних домішок є стандартною вимогою, що прописана в регуляторних документах для матеріалів, що контактують з тканинами чи біологічними рідинами (ISO 10993) [14].

Токсичні домішки у матеріалі мають бути відсутніми, оскільки будь-які сторонні домішки можуть впливати на клітинну життєздатність та їх ріст. Токсини можуть викликати клітинний стрес та/або апоптоз, що унеможливлює якісне використання мембрани.

Також токсичні домішки можуть впливати на біосумісність матеріалу шляхом зміни властивостей поверхні матеріалу.

Вплив сторонніх домішок також може впливати на взаємодію із ЛЗ, змінюючи їх стабільність, ефективність та, зокрема, будь-які непередбачувані реакції з боку культури клітин.

Час збереження цілісності у поживному середовищі

Час збереження цілісності структури мембрани у поживному середовищі повинен становити 7-14 діб, оскільки тривала структурна цілісність забезпечує постійну підтримку клітинного розростання, створюючи необхідний каркас для адгезії та проліферації клітин без зміни властивостей мембрани.

Збереження цілісності впродовж 7-14 діб дозволяє проведення тривалих досліджень, що передбачають контрольоване вивільнення лікарських засобів для вивчення проникності ГЕБ.

Мінімальна адгезія клітин

Мінімальна адгезія становить 1000 кл/мм², що є достатнім рівнем для формування первинного моношару клітин, що важливо для досліджень базових бар'єрних функцій.

Оптимальна адгезія

Оптимальна адгезія: 5000 - 10 000 кл/мм² є більш бажаною, оскільки оптимальні умови дозволяють щільне розміщення клітин, наближене до природного стану ГЕБ, забезпечуючи більш точну модель бар’єрної функції. Така щільність підтримує контакт клітин одна з одною, що сприяє утворенню щільних з'єднань між клітинами, які важливі для моделювання проникності.

Проникність для малих молекул

Проникність для малих молекул (глюкоза, лактат) становить 10^{-6} - 10^{-5} см/с, оскільки даний діапазон є типовим для транспорту дрібних молекул через

напівпроникні бар’єри. Глюкоза і лактат є ключовими метаболітами для ЦНС, оскільки глюкоза є основним джерелом енергії для нейронів, а лактат відіграє важливу роль у метаболічному обміні між нейронами та гліальними клітинами [47]. ГЕБ природним чином контролює проникність для глюкози, а проникність лактату є показником підтримки енергетичного метаболізму. Перевірка проникності для цих молекул дозволяє оцінити, наскільки мембрана дозволяє обмін метаболітів, важливих для функціонування тканин.

Проникність для іонів

Проникність для іонів має становити (натрій, калій, кальцій) 10^{-7} - 10^{-6} см/с аналогічно до показників *in vivo*. Проникність на такому рівні дозволяє стабільне та контрольоване проходження іонів, при цьому зберігаючи електрохімічний градієнт.

Натрій і калій є важливими учасниками процесу генерації і проведення нервових імпульсів. Їх взаємодія із клітинними мембранами створює електричні сигнали, необхідні для нейронної комунікації. Іони кальцію беруть участь у багатьох клітинних процесах, таких як вивільнення нейромедіаторів у синапсах і модуляція багатьох внутрішньоклітинних сигнальних шляхів [48].

Низька проникність для великих молекул (пептиди, альбуміни) на рівні 10^{-8} - 10^{-7} см/с обумовлена моделюванням характеристик ГЕБ як бар’єра для багатьох білків, антитіл та інших великих молекул, які можуть викликати запальні реакції або пошкодження нейронів. Деякі пептиди та білки виконують специфічні функції в мозку, а надмірна проникність могла б призвести до дисбалансу та порушити сигнальні шляхи. Альбумін як маркер для бар’єрних властивостей у нормі не має проникати через ГЕБ, а низька проникність, що прямує до нуля, демонструє ефективність моделювання бар’єру [49]. Пептиди часто виконують функцію нейромедіаторів, контроль над проникністю яких є важливим для регуляції їх впливу на нейрони [50].

Проникність для маркерних молекул, що імітують ЛЗ

Проникність для маркерних молекул, що імітують ЛЗ (10^{-7} - 10^{-5} см/с) дозволяє вивчати бар'єрні функції ГЕБ для лікарських засобів, які використовують у лікуванні захворювань та розладів, які асоціюють із порушенням функції ГЕБ. Модулювання проникності обраних ЛЗ дозволяє вивчати фармакокінетику згаданих фармакологічних агентів. У якості маркерних молекул обрано ламотриджин (ламотригін), L-DOPA та іони Li^+ з наступних причин:

1. Ламотриджин був обраний як маркер для фармакологічної корекції епілепсії та біполярного афективного розладу, оскільки він здатний стабілізувати настрій та зменшувати амплітуду коливань між маніакальними і депресивними фазами [51; 52]. Його використання також обумовлене фармакологічною підтримкою при терапії межового розладу особистості [53].
2. L-DOPA використовується при хворобі Паркінсона для відновлення рівня дофаміну, що покращує моторні функції пацієнтів [54].
3. Іони літію обрані як частина лікування біполярного афективного розладу та великого депресивного розладу [55–57].

Сталість початкової проникності

Сталість початкової проникності (95% початкової проникності протягом 7 діб) є важливим показником підтримки стабільності фізико-хімічних властивостей протягом оптимального часу, необхідного для мінімальних досліджень із використанням виробу. Стабільність початкової проникності протягом визначеного терміну забезпечує ефективне моделювання природної бар'єрної функції та достовірність досліджень.

Індекс електричного опору

Індекс електричного опору визначає здатність мембрани проводити або ізолювати електричний струм. ГЕБ є не тільки фізичним бар'єром, а й має

специфічні електричні властивості, які регулюють потік іонів і молекул між кров’ю та мозковими тканинами [58]. Мембрана з таким електричним опором імітує ці властивості, обмежуючи проникнення електрично заряджених молекул і забезпечуючи відповідний контроль за їх рухом через бар'єр. Діапазон 106 - 10^{12} Ом·см вказує на високий рівень ізоляції, що важливо для забезпечення стабільного бар'єру, який мінімізує втручання зовнішніх електричних полів чи шуму в лабораторних умовах. Це також сприяє точності вимірювань під час досліджень проникності молекул та іонів через мембрану.

Стерильність виробу та упаковки за ISO 11737 (індекс SAL)

Стерильність за ISO 11737, а саме індекс SAL (Sterility Assurance Level) на рівні 10^{-6} гарантує, що на кожен мільйон одиниць продукції припадає не більше ніж один живий мікроорганізм [59]. Для мембрани, яка буде використовуватися у лабораторних дослідженнях і при моделюванні ГЕБ, дотримання цього стандарту є обов'язковим.

Внутрішня та зовнішня упаковка мають бути непошкодженими.

Маркування містить назву виробу, код, дату виробництва та серійний номер.

Умови зберігання та термін придатності

Виріб рекомендовано зберігати за стандартного температурного режиму для біоматеріалів –від +2 ºС до +8 ºС. Полімер PLGA, що використовується для виготовлення мембрани, є чутливим до підвищених температур, які можуть пришвидшити його гідролітичну деградацію [60]. Зберігання в межах +2°С до +8°С уповільнює процеси розпаду матеріалу, що дозволяє зберегти механічну цілісність та пористу структуру мембрани. Також низькі температури гальмують ріст і розмноження мікроорганізмів, що особливо важливо для підтримки стерильності виробу.

Вологість у межах 50-70% знижує ймовірність утворення конденсату, що може стати середовищем для розвитку мікроорганізмів, особливо за недотримання інших умов зберігання. Оптимальна вологість повітря запобігає надмірному висиханню або гідратації мембрани, які можуть вплинути на її фізичні властивості, такі як пористість, проникність і механічна міцність.

Протягом 7 діб мембрана зберігає свою проникність, механічну міцність та електричні властивості, що дозволяє проводити дослідження без суттєвих змін у характеристиках. Цей термін є достатнім для проведення лабораторних досліджень після виготовлення.

Гарантія якості на термін 7 діб дозволяє уникнути значної деградації матеріалу PLGA, яка може вплинути на результати експериментів.

5. ХІМІЧНІ, ФІЗИЧНІ ТА БІОЛОГІЧНІ ТЕСТИ

5.1. Доклінічні дослідження *in vitro*

Оскільки виріб класифікується як медичний виріб для проведення *in vitro* досліджень, обов'язкові доклінічні дослідження включають обсяг методів тестування *in vitro*, а саме візуальна оцінка, хімічні, біологічні, фізико-механічні тестування, оцінка ефективності, експлуатаційні випробування, дослідження старіння та тестування сумісності із лікарськими засобами.

5.1.1. Візуальна оцінка

Візуальну оцінку проводять перед початком використання виробу, під час експлуатаційних випробувань та тестування на старіння, оскільки даний метод дозволяє швидко оцінювати наявність дефектів поверхонь, механічних пошкоджень, значні зміни у структурі PLGA-мембрани, загальний зовнішній вигляд виробу та поживного середовища.

Первинний огляд проводять під денним та/або штучним світлом із інтенсивністю 1000–1500 люкс. Відстань між виробом та спостерігачем – 30-40 см. Виріб розміщують на білому фоні для кращого виявлення кольорових відхилень. Огляд за допомогою оптичних приладів виконують із використанням лупи зі збільшенням у 2-5 разів для більш детального аналізу пористості мембрани та можливих мікропошкоджень поверхні.

На поверхні мембрани мають бути відсутні тріщини, подряпини, плями та інші дефекти. Розподіл пор є рівномірним у структурі мембрани. Виріб має відповідати заявленій геометрії – розміри 15×20×5 мм із допустимим відхиленням ±0,2 мм. Колір та прозорість – однорідні.

Результати візуальної оцінки документують у формі контрольного листа, що включає фото- або відеофіксацію дефектів при виявленні, опис дефекту із зазначенням його типу та місця розташування, а також висновок про придатність виробу до подальшого використання.

Візуальну оцінку проводять на кожному етапі виготовлення та стерилізації, після доставки до місця проведення досліджень, під час перевірки цілісності виробу після реального або прискореного старіння.

5.1.2. Хімічне тестування

Хімічне тестування проводять з огляду на ймовірність небажаних хімічних реакцій між компонентами виробу та поживного середовища. Метою є виявлення наявності потенційних продуктів деградації PLGA-мембрани, оцінка стабільності поживного середовища та його сумісності із мембраною, а також перевірка хімічної інертності матеріалів.

Для оцінки хімічних показників PLGA-мембрани досліджують співвідношення молекул гліколіду та лактиду, наявність продуктів гідролітичного розпаду (молочна та гліколева кислоти) та потенційних забруднень залишковими розчинниками, каталізаторами тощо. Поживне середовище тестують на хімічну стабільність компонентів та рівень pH.

5.1.2.1. Дослідження PLGA-мембрани

У процесі санітарної обробки потенційним залишковим розчинником є етанол. Надлишковий етанол може впливати на життєздатність клітин у біочорнилах, стабільність желатину метакрилату та на функціональність нейронів мишей. Газова хроматографія (GC) є чутливим методом для виявлення залишкових розчинників [61].

З кожної партії відбирають тестові зразки друку PLGA розмірами 10×10 мм та поміщають у герметичні контейнери для збереження летких компонентів. Обирають контрольні зразки та стандартні розчини етанолу для побудови калібрувальної кривої.

У ході проведення хроматографічного аналізу екстрагують етанол зі зразків мембрани за температури 50 ºС для десорбції летких компонентів. Газову фазу відбивають автоматичним інжектором. Від стартової температури 40°С, її підвищують 10°С/хв до 200°С протягом 10 хв. Після реєстрації сигналів етанолу дані використовуються для кількісного визначення залишкового етанолу за допомогою калібрувальної кривої. Максимально допустимим рівнем залишкового етанолу для є фармацевтичних та медичних матеріалів ≤5000 ppm.

Якщо рівень етанолу перевищує нормативні значення, слід провести додаткове сушіння мембрани або змінити параметри обробки. Результати газової хроматографії оформлюють у вигляді протоколу.

PLGA є біодеградабельним полімером, який розкладається з утворення молочної кислоти (LA) та гліколевої кислоти (GA) [62]. Метою перевірки цих продуктів є оцінка стабільності мембрани та забезпечення відсутності токсичних концентрацій, що можуть негативно вплинути на ендотеліальні клітини та нейрони мишей. Тестування проводять після друку мембрани та після інкубації з біочорнилами та клітинами.

У ході підготовки зразків обирають зразки PLGA розміром 10×10 мм та витримують у буферному розчині PBS протягом 24 год для екстракції продуктів деградації; желатин метакрилат розчиняють у PBS; відбирають 1 мл поживного середовища перед та після контакту з мембраною та клітинами; відбирають 1 мл культурального супернатанту після інкубації нейронів для аналізу метаболітів.

Для проведення тестування використовують HPLC-хроматограф з УФ-детектором або мас-спектрометрією, силікагелевий сорбент із С18-неполярним покриттям, розчин води з 0.1% трифтороцтової кислоти та ацетонітрилу у якості рухомої фази.

Готують стандартні розчини: молочна кислота та гліколева кислоти у концентрації від 0.1 до 100 ppm та розчини глюкози, глутаміну. Параметри та значення хроматографічного режиму наведені у Таблиці 5.1.

Таблиця 5.1. Параметри та значення хроматографічного режиму

Параметр	**Значення**
Градієнт елюювання	
Початковий склад	90% водної фази/10% ацетонітрилу
Зміна складу	Поступове збільшення ацетонітрилу до 50% за 15 хв
Час утримання компонентів	
Молочна кислота	~3 хв
Гліколева кислота	~5 хв
Глюкоза	~10 хв
Глутамін	~8 хв

За допомогою калібрувальних кривих визначають концентрації молочної кислоти, гліколевої кислоти та інших компонентів у тестових зразках. Критерії прийнятності наведені у таблиці 5.2.

Таблиця 5.2. Критерії прийнятності для тестових зразків

Компонент	**Критерій прийнятності**
Молочна кислота	Концентрація не перевищує 5% від загальної маси мембрани або відповідає нормативам ISO 10993-18.
Гліколева кислота	Концентрація не перевищує 5% від загальної маси мембрани або відповідає нормативам ISO 10993-18.
Глюкоза	Зниження концентрації не більше, ніж 5% від початкового рівня після інкубації з мембраною чи клітинами.

Глутамін	Зниження концентрації не більше, ніж 5% від початкового рівня після інкубації з мембраною чи клітинами.

Надмірна концентрація молочної та гліколевої кислот може свідчити про деградацію PLGA та потенційно негативно впливати на клітинні культури. Стабільність глюкози є критичною, оскільки вона є важливим енергетичним джерелом для клітин. Глутамін забезпечує транспорт азоту для синтезу білків та підтримання клітинного метаболізму, тож його стабільність також є важливим показником.

Для дослідження молекулярної структури PLGA та оцінки змін в ній після 3D-друку або інкубації з біочорнилами використовують метод ІЧ-спектроскопії. Також дана методика слугує для визначення наявності залишкових мономерів (молочної та гліколевої кислот).

Метод ІЧ-спектроскопії заснований на вимірюванні поглинання інфрачервоних хвиль, коли молекули полімеру взаємодіють з інфрачервоним випромінюванням в діапазоні хвиль від 4000 до 400 $см^{-1}$. ІЧ-спектроскопія дозволяє виявити типи зв’язків та функціональних груп у молекулі та визначити, чи зазнавав полімер хімічних змін або деградації [63].

Під час підготовки відбирають зразки після 3D-друку, після обробки або інкубації з біочорнилами та контрольні зразки без впливу на матеріал (негативний контроль) або стандартні мономери PLGA.

Зразки розміщують у спектрофотометрі, піддають впливу опромінення у діапазоні 4000 до 400 $см^{-1}$ та аналізують сигнали, отримані в результаті поглинання ІЧ-випромінювання для визначення молекулярної структури та функціональних груп. Спектри порівнюють із базовими даними для визначення типу полімеру та наявності залишкових компонентів. Якщо на спектрі є пік, що відповідає молочній або гліколевій кислотам, це свідчить про

їх наявність у зразку. Для визначення концентрації залишкових мономерів проводять кількісне порівняння інтенсивності піків з відповідними стандартами за допомогою калібрувальної кривої. Критерії оцінки результатів наведені в наступній таблиці.

Таблиця 5.3. Критерії оцінки результатів

Критерій	**Значення**
Структура полімеру	Наявність характерних піків для PLGA, таких як пік для C=O (карбоксильна група) на 1750 $см^{-1}$; Відсутність піків, що вказують на неповну полімеризацію, залишкові мономери чи домішки.
Залишкові розчинники	Пік на 1050 $см^{-1}$ для етанолу свідчить про наявність залишкового розчинника у мембрані.
Залишкові мономери (LA, GA)	Наявність піків, характерних для молочної кислоти (1450 $см^{-1}$) або гліколевої кислоти (1720 $см^{-1}$) вказує на залишкові мономери.
Чистота матеріалу	Високий рівень чистоти полімеру підтверджується відсутністю побічних продуктів або забруднень у спектрі.

Результати документують у формі звіту, що містить спектри із зазначенням піків та їх інтерпретації, висновки щодо відповідності вимогам до залишкових мономерів та розчинників та, за необхідності, рекомендації щодо подальшої обробки зразків.

Для визначення кислотності проводять тестування pH, оскільки зміна кислотно-лужного балансу може впливати на біосумісність, стабільність і функціональність виробу, зокрема при інкубації з ендотеліальними клітинами та нейронами мишей.

Після відбору зразків PLGA-мембрани після 3D-друку (розмір зразка — 10×10 мм), їх промивають в стерильному фізіологічному розчині або PBS для

видалення залишків розчинників або часток. Готують відповідне поживне середовище для pH. Зразки PLGA-мембрани занурюють в 10 мл PBS та вимірюють pH за допомогою pH-метра, поміщаючи електрод безпосередньо в розчин. Вимірювання відбувається у прямому контакті із мембраною. Після інкубації клітин проводять вимірювання рівня кислотності аналогічно.

Тестування проводять за температури 37 °C, відносної вологості 50-70% через 1 год, 24 год та 48 год після поміщення мембрани в середовище.

Критерії оцінки результатів наведені в таблиці 5.4.

Таблиця 5.4. Критерії оцінки результатів

Компонент	**Критерій прийнятності**
pH мембрани до інкубації	В межах 7.2–7.4, що відповідає фізіологічному рівню
pH після інкубації	Не перевищує ±0.2 одиниць від початкового значення
Зміна pH після деградації	Підвищення кислотності не має бути значним, знижуватись нижче за 6.5

Мембрана повинна показати pH в межах 7.2–7.4 перед інкубацією. Це свідчить про стабільність матеріалу і його придатність до використання в біологічних середовищах. Після 24 і 48 годин інкубації pH не повинен змінюватися більше ніж на ±0.2 одиниці.

Це вказує на те, що мембрана не спричиняє значних змін в кислотно-лужному балансі навколишнього середовища, що є важливим для підтримки життєздатності клітин.

Якщо після інкубації мембрана зазнала гідролізу, pH середовища може знизитися через утворення молочної та гліколевої кислот. Однак, цей процес має бути контрольованим, і pH не повинно опуститися нижче 6.5 одиниць.

Результати документують у протоколі, що містить початкові значення pH для кожної партії PLGA-мембран, результати після інкубації з клітинами, висновки про стабільність матеріалів та їх біосумісність.

5.1.2.2. Дослідження поживного середовища

Тестування поживного середовища за допомогою HPLC (високоефективної рідинної хроматографії) або спектрофотометрії дозволяє якісно та кількісно визначити основні компоненти середовища.

Метою тестування є перевірка наявності та концентрації компонентів поживного середовища відповідно до встановлених значень, оцінка стабільності біологічно активних речовин після стерилізації та зберігання та виявлення можливих домішок або продуктів деградації. У таблиці 5.5 наведено компоненти ПС та їх функції.

Таблиця 5.5. Компоненти поживного середовища та їх функції

Поживне середовище для ендотеліальних клітин	
EBM-2 (Endothelial Basal Medium-2	базове середовище, яке містить мінеральні солі, вуглеводи (глюкозу), вітаміни та амінокислоти
FBS (10%-Fetal Bovine Serum)	білковий компонент, джерело факторів росту
VEGF (10 мг/мл)	фактор росту ендотеліальних клітин, стимулює ангіогенез
bFGF (10 мг/мл)	фактор проліферації та диференціації клітин
Аскорбінова кислота	антиоксидант, сприяє синтезу колагену
Пеніцилін	антибіотик для запобігання контамінації

Продовження табл. 5.5

Поживне середовище для нейронів	
Нейробазальне середовище (Neurobasal Medium)	базове середовище для нейронів, яке містить низький рівень антиоксидантів і сприяє росту нервових клітин
L-глутамін	амінокислота, необхідна для клітинного метаболізму
NGF	фактор росту нервів, сприяє виживанню нейронів
Аскорбінова кислота	Антиоксидант
Пеніцилін	антибіотик для запобігання контамінації

У ході тестування методом HPLC відбирають 1 мл поживного середовища, додають до нього дистильовану воду у співвідношенні 1:10 або 1:100 залежно від концентрації компонентів та пропускають через фільтр з пористістю 0.22 мкм для видалення частинок.

У наступній таблиці наведено параметри та значення хроматографічного режиму.

Таблиця 5.6. Параметри та значення хроматографічного режиму

Параметр	**Значення**
Стаціонарна фаза	Зворотньо-фазова колонка C18
Рухома фаза	Суміш ацетонітрилу та води (60:40) з додаванням 0.1% трифтороцтової кислоти
Швидкість потоку	1 мл/хв
Температура колонки	30°C

Продовження табл. 5.6

Довжина хвилі детектора		210–280 нм (залежно від компонента)
Час утримання (tR)	EBM-2	3-4 хв
	Neurobasal Medium	4-5 хв
	VEGF	6-7 хв
	bFGF	8-9 хв
	Аскорбінова кислота	2-3 хв
	NGF	7-8 хв

Вимірюють кількість піків, які відповідають концентрації компонентів ПС та використовують калібрувальні криві для кожного з них [64].

Для тестування методом спектрофотометрії до зразків ПС додають стерильну воду у співвідношенні (1:10) та вимірюють поглинання у кварцових кюветах. Параметри наведені у таблиці 5.7.

Таблиця 5.7. Параметри для спектрофотометрії зразків поживного середовища

Компонент	**Довжина хвилі (нм)**	**Розчинник**
EBM-2	260-280	Стерильна вода
Neurobasal Medium	280	Стерильна вода
Аскорбінова кислота	265	Стерильна вода
VEGF	280	Стерильна вода
bFGF	280	Стерильна вода
NGF	280	Стерильна вода

Критерії прийнятності допустимих концентрацій наведені нижче.

Таблиця 5.8. Критерії прийнятності концентрацій компонентів поживного середовища

Компонент	**Допустима концентрація**
EBM-2	Відповідно до специфікації виробника
Neurobasal Medium	Відповідно до специфікації виробника
VEGF	10 мг/мл
bFGF	10 мг/мл
Аскорбінова кислота	25-50 мг
NGF	10 нг/мл

В протокол вносять методи підготовки зразків, параметри приладів, отримані хроматограми та/або спектри. Додають графіки, калібрувальні криві для компонентів середовищ. Результати порівнюють із заявленими специфікаціями.

Тест на оксидацію для перевірки зміни концентрації антиоксидантів проводять з метою перевірки стабільності аскорбінової кислоти. Після підготовки зразки середовища з антиоксидантом зберігають при 37°C, +2°C до +8°C або піддають прискореному старінню при підвищених температурах (40°C) в умовах високої вологості для моделювання реальних умов зберігання. Після зазначених періодів зберігання зразки середовища відбирають для аналізу. Концентрація аскорбінової кислоти визначають за допомогою HPLC або спектрофотометрії [65].

Після вимірювання початкової концентрації через певні інтервали часу (наприклад, 1, 3, 7, 14 діб) визначають зміну концентрації аскорбінової кислоти. Використовують калібрувальну криву для визначення залишкової концентрації аскорбінової кислоти після кожного періоду зберігання.

HPLC дозволяє точно розділити компоненти середовища, зокрема аскорбінову кислоту, та визначити її концентрацію за допомогою калібрувальної кривої. Параметри аналізу наведені у таблиці 5.9.

Таблиця 5.9. Параметри аналізу

Параметр	**Значення**
Стаціонарна фаза	Зворотньо-фазова колонка C18
Рухома фаза	20% ацетонітрилу + 80% фосфатний буфер, pH 2.5
Швидкість потоку	1 мл/хв
Температура колонки	25°C
Довжина хвилі детектора	254 нм

Вимірюючи висоту піка на хроматограмі, визначають час утримання аскорбінової кислоти та її кількість.

При проведенні тестування методом спектрофотометрії оцінюють поглинання світла аскорбіновою кислотою при певній довжині хвилі, що дозволяє визначити її концентрацію. Оптимальна довжина хвилі – 265 нм, розчинник – стерильна вода або PBS [66].

Допустимою зміною концентрації аскорбінової кислоти є зменшення не більше ніж на 10-20% від початкової концентрації через 7 діб при зберіганні. При цьому, зміна концентрації інших компонентів повинна бути мінімальною, в межах допустимих стандартів для стабільності компонентів.

Результати документують, додають графіки змін концентрації аскорбінової кислоти протягом часу зберігання. Формують висновок про підтвердження стабільності антиоксидантів у середовищі протягом встановленого терміну зберігання.

Контроль кислотності (pH) проводять для забезпечення оптимальних умов для росту клітин у поживних середовищах. pH середовища впливає на стабільність компонентів середовища, активність ферментів та загальну життєздатність клітин [67].

Поживне середовище готують за стандартними процедурами, стерилізують та відбирають зразки. Для вимірювання pH використовують pH-метри з електродами, каліброваними за допомогою стандартних буферних розчинів (pH 4, 7, 10). Зразки середовища поміщають у чисту стерильну ємність. Електрод занурюють в середовище та вимірюють pH.

Для швидкої перевірки pH можна використовувати pH-індикаторні смужки або рідкі індикатори. Смужку або розчин занурюють в середовище, порівнюють колір з кольоровою шкалою для визначення pH.

Інтерпретація результатів наведена у таблиці 5.10.

Таблиця 5.10. Інтерпретація тестування pH поживного середовища

Значення pH	**Інтерпретація**
7.0–7.4	Оптимальний рівень для більшості клітинних культур (нормальне середовище для ендотеліальних клітин і нейронів)
7.5–8.0	Легке підвищення pH, що може спричинити зміни в активності ферментів або знижувати ефективність деяких компонентів середовища.
< 7.0	Знижене pH, що може вказувати на накопичення кислих продуктів метаболізму клітин (наприклад, молочної кислоти) або деградацію компонентів середовища. Необхідно коригувати.
> 8.0	Підвищена кислотність, що може бути результатом неконтрольованих змін або забруднення середовища. Потрібно перевірити умови зберігання та стерилізації.

До потенційних змін pH середовища, які необхідно контролювати, відносять:

- Метаболічні продукти клітин;
- Невідповідність умов зберігання;
- Деградація компонентів;
- Контамінація

Результати документують та складають протокол, що включає параметри середовища (тип середовища, час вимірювання), значення pH та умови зберігання. Додають графіки відстеження змін pH середовища протягом часу зберігання або стерилізації. Формують висновки щодо відповідності pH середовища оптимальним значенням.

Отже, критеріями прийнятності для PLGA-мембрани є відсутність продуктів деградації, що можуть впливати на функціональність та збереження хімічної структури PLGA, а для ПС – збереження стабільності pH та основних компонентів протягом гарантійного терміну, а також відсутність змін у складі, спричинених контактом із мембраною або первинною упаковкою.

5.1.3. Біологічні тестування

5.1.3.1. Методи біологічного тестування для PLGA-мембрани

Біологічне тестування PLGA-мембрани гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) та поживного середовища спрямоване на підтвердження їх безпеки та сумісності з клітинними культурами, а також забезпечення відсутності цитотоксичності, генотоксичності, імуногенності та інших небажаних біологічних ефектів.

Метою біологічного тестування є оцінка впливу PLGA на життєздатність ендотеліальних клітин та нейронів, перевірка сумісності виробу із компонентами ПС, виключення можливих токсичних ефектів, виявлення потенційної імуногенності та забезпечення стерильності.

Тест на цитотоксичність (ISO 10993-5) спрямований на оцінку впливу PLGA-мембрани на життєздатність клітин, використовуючи ендотеліальні клітини та нейрони мишей як модельні об'єкти [17]. Мембрана PLGA не повинна викликати цитотоксичності для ендотеліальних клітин та нейронів. Життєздатність клітин повинна залишатися в межах ≥85% від контрольної групи, а морфологія клітин – залишатись типовою. Результати тесту оформлюють у вигляді звіту, зазначаючи значення результатів тестів та перевіряють на відповідність стандарту ISO 10993-5.

Тест на біосумісність з ендотеліальними клітинами, відповідно до стандарту ISO 10993-4, ISO 10993-18 спрямований на оцінку реакції ендотеліальних клітин на PLGA-мембрану та виявлення будь-яких чинників, які можуть впливати на адгезію або життєздатність клітин [20; 68].

Після стерилізації PLGA-мембрани зразки промивають PBS для видалення залишків розчинників та мертвих клітин. Відбирають культуральний супернатант, до якого додають 20 мкл MTT-розчину (тіазол синій тетразоліум бромід), інкубують протягом 4 год, після чого зразки розчиняють у диметилсульфоксиді (DMSO) та вимірюють адсорбцію при 570 нм. Розраховують рівень життєздатності клітин порівняно із контрольними зразками.

Також вимірюють рівень цитокінів із використанням комплексу ELISA. У ході тестування вимірюють рівень запальних цитокінів (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-10). Проби культурального середовища збирають після 24, 48 та 72 годин інкубації з PLGA-мембраною. За допомогою стандартного ELISA-набору

вимірюють концентрації. Критерії оцінки результатів наведені у наступній таблиці.

Таблиця 5.11. Критерії оцінки результатів

Параметр	**Критерій прийнятності**
Життєздатність клітин	Рівень життєздатності ендотеліальних клітин складає не менше 70% від контрольної групи
Адгезія клітин	Прикріплення більше, ніж 80% клітин за 24 год
Продукція цитокінів	Рівень цитокінів (IL-1β, TNF-α, IL-6) не перевищує 30% від рівня, що спостерігається в контрольній групі.
Морфологічні зміни	Значні морфологічні зміни (округлення клітин, пошкодження мембран тощо) відсутні.

Відсутність значної активації цитокінів у порівнянні з контрольними групами свідчить про відсутність запальної реакції. Відсутність значних змін у морфології ендотеліальних клітин демонструє життєздатність та функціональність.

Результати вносять до звіту, який містить дані про життєздатність клітин, результати ELISA-тестування для цитокінів та флуоресцентні зображення для оцінки адгезії та морфології.

Тест на біосумісність з нейронами відповідно до стандартів ISO 10993-6, ISO 10993-18) проводять з метою оцінки біосумісності PLGA-мембрани з нейронами мишей в умовах *in vitro* [20; 69]. Перевіряють, чи мембрана є токсичною для нейронів, оцінюють життєдіяльність та активність нейронів, а також їх здатність до проліферації.

Зразки PLGA-мембрани стерилізують 70% етанолом, промивають стерильним PBS для видалення домішок. Проводять підготовку нейронних культур та інкубують на PLGA-мембрані протягом 24, 48 та 72 год. При температурі 37 °C та концентрації вуглекислого газу на рівні 5%. Після

інкубації проводять МТТ-тест та ELISA-тест, аналогічно до тестувань для ендотеліальних клітин. Критерії оцінки результатів наведені нижче.

Таблиця 5.12. Критерії оцінки результатів

Параметр	**Критерій прийнятності**
Життєздатність нейронів	Рівень життєздатності нейронів складає не менше 70% від контрольної групи
Адгезія нейронів	Прикріплення більше, ніж 80% клітин за 24 год
Морфологічні зміни	Прикріплення більше, ніж 80% клітин за 24 год
Продукція цитокінів	Рівень цитокінів (IL-1β, TNF-α, IL-6) не перевищує 30% від рівня, що спостерігається в контрольній групі.
Пошкодження мембран	Значні пошкодження нейрональних мембран відсутні.

Результати документують аналогічно до результатів тестування для ендотеліальних клітин.

Завдяки тесту на адгезію та проліферацію клітин (ISO 10993-5) можна перевірити здатність клітин до прикріплення та подальшого розвитку на PLGA-мембрані.

Після підготовки PLGA-мембрани із ендотеліальними клітинами та нейронами мишей проводять тест із флуоресцентними барвниками Calcein-AM для живих клітин (зелений флуоресцентний сигнал) та Propidium Iodide для мертвих клітин (червоний флуоресцентний сигнал). Спостереження за клітинами проводять під флуоресцентним мікроскопом.

Для оцінки проліферації проводять МТТ-тестування. МТТ-розчин додають до культурального середовища та, після інкубації протягом 4 годин, вимірюють інтенсивність поглинання при 570 нм. Критерії оцінки результатів наведено у таблиці 5.13.

Таблиця 5.13. Критерії оцінки результатів

Параметр	Критерій прийнятності
Життєздатність клітин	Рівень життєздатності нейронів складає не менше 70% від контрольної групи (оцінка через MTT-тест)
Адгезія клітин	Прикріплення більше, ніж 80% клітин за 24 год (оцінка через флуоресцентні барвники Calcein-AM/Propidium Iodide)
Проліферація клітин	На рівні або вище за 80% від контрольної групи після 72 год інкубації (оцінка через MTT-тест)
Морфологічні зміни	Значні пошкодження нейрональних мембран відсутні.
Продукція цитокінів	Рівень цитокінів (IL-1β, TNF-α, IL-6) не перевищує 30% від рівня, що спостерігається в контрольній групі.

Результати вносять до протоколу, який містить інформацію про оцінку життєздатності клітин через MTT-тест, результати тестів на адгезію (Calcein-AM/Propidium Iodide) та підсумки щодо проліферації клітин та рівня цитокінів. Звіт з результатами тесту додають до загальної документації контролю якості для підтвердження біосумісності матеріалу.

Тест на стерильність відповідно до стандарту ISO 11737-2 проводять, щоб гарантувати відсутність патогенних мікроорганізмів, що можуть становити загрозу як для життєдіяльності клітин у структурі, так і для оператора, який працює із виробом [70].

Зразки інкубують при температурі 30–37 °C протягом 14 діб для виявлення будь-яких мікроорганізмів. Для аеробних та анаеробних бактерій використовують відповідні середовища для росту, такі як бульйон для аеробних мікроорганізмів та агар для анаеробних бактерій. Кожен зразок

перевіряють на наявність мікробіологічного росту, при виявленні проводять ідентифікацію патогенів. Для виявлення більш дрібних мікроорганізмів може бути використана флотація для додаткового концентрування мікроорганізмів з поверхні зразка.

Згідно з Ph. Eur. та ДФУ, дозволяється наявність лише непатогенних мікроорганізмів у допустимих кількостях. До таких відносять непатогенні штами *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Staphylococcus epidermidis* [71; 72].

Жоден з перерахованих мікроорганізмів не повинен бути присутнім у кількості, що перевищує 1 мікроорганізм на мільйон виробів.

Результати документують, вказуючи дату та метод стерилізації, спостереження за ростом мікроорганізмів на різних етапах, відсутність або наявність мікроорганізмів у зразках. Звіт з результатами тесту додається до загальної документації для підтвердження стерильності виробу перед його використанням.

З метою перевірки ймовірності гідролітичної деградації мембрани при контакті з рідинами проводять тест на гідролітичну стабільність (ISO 10993-13).

Для тесту використовують стерильний PBS або інші відповідні буферні розчини із рівнем pH 7.4 для симуляції фізіологічних умов. Зразки PLGA-мембрани інкубуються в буферних розчинах при 37°C протягом 7, 14, 28, 60 діб в герметичних контейнерах для запобігання випаровуванню рідини.

Зразки періодично вилучають для перевірки маси та для візуальної оцінки. Вагу виробу вимірюють до та після інкубації, що дозволяє оцінити рівень деградації. Продукти деградації, такі як молочна і гліколева кислоти, повинні бути в межах безпечних рівнів, не викликаючи токсичності. Результати фіксують у протоколі.

5.1.3.2. Методи біологічного тестування для поживного середовища

Тестування проводять за температури інкубації 37±1°С, вологості 95%, концентрації CO_2 на рівні 5%. Тривалість тестування для дослідження цитотоксичності та сумісності із клітинами складає 72 год, для стерильності – 14 діб, для стабільності ПС – 7 діб.

Використовують стандартизовані методи для виявлення окремих бактерій, таких як *Escherichia coli, Salmonella spp., Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* та інших патогенних мікроорганізмів. Зразок поживного середовища інкубують в спеціальних культуральних середовищах, що підтримують ріст специфічних бактерій, при температурі 37°С протягом кількох днів. Критерієм прийнятності є відсутність росту патогенних мікроорганізмів, таких як *E. coli, Salmonella spp., Pseudomonas aeruginosa ma Staphylococcus aureus*. Якщо наявний ріст патогенних бактерій, середовище вважається забрудненим і не підлягає використанню.

Також проводять тестування на загальну кількість мікроорганізмів за Ph. Eur. 2.6.12, тестування на гриби за Ph. Eur. 2.6.13. Результати документують.

5.1.4. Фізико-механічні тестування

Фізико-механічні тестування дозволяють оцінити основні властивості PLGA-мембрани, які впливають на її функціональність, стабільність та відповідність вимогам.

Тест на міцність та розтяг проводять за допомогою розривної машини. Зразок мембрани затискають у пристрої та розтягують зі швидкістю 1 мм/с до моменту розриву. Вимірюють максимальне зусилля (Н) та максимальне подовження (%) до моменту розриву.

Критерії прийнятності:

- Міцність на розтяг становить не менше 1 МПа;
- Подовження мембрани – не менше 10%.

Тест на опір розриву (проколу) дозволяє перевірити стійкість мембрани до локального навантаження, яке може виникнути під час експлуатації. Мембрану закріплюють в тестовому обладнання та голкою з діаметром 1 мм натискають на поверхню виробу зі швидкістю 1 мм/с до моменту прориву. Вимірюють зусилля, необхідне для проколу мембрани. Опір розриву має бути не менше 0,5 Н/мм^2.

Також вимірюють товщину мембрани за допомогою мікрометра з точністю до 0.01 мм в 5 точках зразка – кути та центр. Товщина повинна відповідати заявленим параметрам (5 ± 0.2 мм). Відхилення між виміряними точками не повинно перевищувати 10%.

Під час тесту на гнучкість (еластичність) досліджують здатність виробу згинатися без утворення тріщин чи розривів. Зразок мембрани (20×15 мм) згинають навпіл по довжині та ширині 10 разів поспіль. Після згинань мембрану оглядають на наявність тріщин чи пошкоджень. Результат вважається прийнятним, якщо мембрана не зазнала пошкоджень.

Випробування на пористість дозволяє оцінити структуру пор мембрани, що впливає на її напівпроникність та здатність до стимуляції росту тканин. Аналіз проводять за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEM). Визначають середній діаметр пор і розподіл пористості по площі мембрани. Пористість повинна становити 40–60% загальної площі мембрани. Середній розмір пор — 1–10 мкм.

При тестуванні на стійкість до деформації перевіряють здатність мембрани зберігати форму під впливом фізичних навантажень. Зразок мембрани поміщають під вантаж вагою 500 г протягом 24 годин при кімнатній температурі. Після навантаження вимірюють залишкову деформацію (зміна

товщини або форми). Залишкова деформація не повинна перевищувати 5% початкових розмірів мембрани.

Усі результати тестування записують у протокол фізико-механічних тестів із зазначенням:

- Методики тестування.
- Параметрів тесту (швидкість розтягування, зусилля на розрив, пористість тощо).
- Результатів вимірювань для кожного зразка.

Звіт включає графіки, фотографії або SEM-зображення (для аналізу пористості), а також висновки щодо відповідності мембрани заданим критеріям.

5.2. Оцінка ефективності

Оцінка ефективності PLGA-мембрани полягає у визначенні її здатності виконувати основні функції, що включає оцінку бар'єрних властивостей, напівпроникності, стабільності під час експлуатації, взаємодії з лікарськими засобами (ЛЗ) та біосумісності з клітинами.

5.2.1. Бар'єрні властивості мембрани

Оцінка ефективності PLGA-мембрани *in vitro* включає тестування її напівпроникності для різних типів маркерних молекул, що імітують функції гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ). Тестування охоплює чотири основні класи маркерів: малі молекули, іони, великі молекули та лікарські засоби (ЛЗ). Ці маркери використовуються для моделювання фізіологічних процесів і перевірки, чи мембрана виконує бар'єрні функції відповідно до природного ГЕБ.

Для тестування проникності для малих молекул використовують розчини із такими маркерам як глюкоза ($C_6H_{12}O_6$) та лактат ($C_3H_6O_3$), оскільки глюкоза є основним енергетичним субстратом, а лактат – метаболітом, який

транспортується через ГЕБ для підтримки нейрональної активності. Малі молекули додаються до донорної камери дифузійного апарата з PLGA-мембраною. Через певні проміжки часу (наприклад, 1, 2, 4, 8 год) вимірюється концентрація молекул у рецепторній камері за допомогою спектрофотометрії або HPLC. Розраховують коефіцієнт проникності P:

$$P = \frac{dt}{dQ} \times \frac{1}{(A \times \Delta C)} \quad , \tag{5.1.}$$

де $\frac{dt}{dQ}$ – швидкість транспорту молекули (моль/с або г/с),

A — площа мембрани (см²)

ΔC — градієнт концентрації (моль/см³).

Напівпроникність для глюкози та лактату повинна становити 10^{-6} – 10^{-5} см/с, що відповідає природним умовам транспорту через ГЕБ [73].

Для дослідження регулювання транспорту іонів тестують іони натрію (Na^+), калію (K^+) та кальцію (Ca^+), оскільки у фізіологічних умовах натрій підтримує електричний потенціал мембрани, калій є необхідним для передачі нервових імпульсів, а кальцій бере участь у сигнальних шляхах клітин [74; 75].

Мембрану інкубують з розчинами іонів у донорній камері, після чого вимірюють концентрації іонів в рецепторній камері за допомогою іон-селективних електродів або атомно-абсорбційної спектрофотометрії. Прийнятною проникністю вважають 10^{-7} – 10^{-6} см/с.

Тестування проникності для великих молекул має на меті перевірку здатності мембрани обмежувати транспорт маркерних молекул – пептидів та альбуміну. Пептиди регулюють міжклітинну сигналізацію, альбумін – основний білок плазми, який в нормі не проникає через ГЕБ [76].

Зразки інкубують з розчинами великих молекул та оцінюють транспорт через вимірювання концентрації молекул у рецепторній камері за допомогою ELISA (для пептидів) або спектрофотометрії (для альбуміну). Проникність для

великих молекул (альбумін, пептиди) повинна бути 10^{-8} – 10^{-7} см/с, що свідчить про ефективний бар'єрний ефект.

Завдяки тестуванню із використанням маркерних молекул активних фармацевтичних інгредієнтів лікарських засобів можна оцінити проникність для них при терапії неврологічних та психічних розладів.

У дослідженні використовують ламотриджин як засіб для лікування епілепсії та фармакологічній корекції афективних розладів, L-DOPA як основний препарат для терапії хвороби Паркінсона та іони літію, які застосовують для терапії біполярного афективного розладу та великого депресивного розладу [77].

АФІ додають до донорної камери мембранного апарата, далі концентрація вимірюють через HPLC або спектрофотометрію.

Напівпроникність має становити:

- Для ламотриджину – 1.5–2.5 × 10^{-6} см/с;
- Для L-DOPA – 2.0–3.0 × 10^{-6} см/с;
- Для іонів літію – 3.0–5.0 × 10^{-6} см/с.

Усі вимірювання оформлюють у вигляді таблиць із зазначенням коефіцієнтів проникності для кожної молекули. Представляють графіки залежності проникності від часу для кожного класу маркерів. Звіт містить висновки про відповідність ефективності мембрани заданим параметрам.

5.2.2. Експлуатаційні випробування

Експлуатаційні випробування проводяться для підтвердження відповідності PLGA-мембрани її функціональним характеристикам в умовах, що імітують реальне використання. Ці випробування забезпечують перевірку

стабільності, функціональності, фізико-хімічних та біологічних властивостей мембрани під впливом контрольованих умов.

Для перевірки стабільності мембрани в умовах експлуатації застосовують наступний метод.

Виріб інкубують у буферному розчині (PBS, pH 7.4) при 37°C протягом 7, 14 та 28 діб. Вимірюють зміну маси (гравіметричний аналіз), зміну товщини та площі мембрани за допомогою мікрометра, механічну цілісність після інкубації (тест на розрив). В результаті втрата маси не повинна перевищувати 5% відносно початкової, а міцність на розрив зменшується не більше, ніж на 10%.

Для перевірки на хімічну стійкість у присутності АФІ мембрану інкубують розчинах маркерних молекул (глюкоза, лактат, L-DOPA, ламотриджин, іони Li^+) при 37°C протягом 7 діб. Проводять аналіз хімічного складу за допомогою ІЧ-спектроскопії для перевірки функціональних груп та HPLC для визначення залишкових молекул АФІ на поверхні мембрани.

Прийнятним результатом вважають відсутність змін у характерних піках ІЧ-спектру для PLGA та рівень перевищення залишкових молекул АФІ на мембрані більше ніж 5%.

5.3. Дослідження старіння

Дослідження старіння виробу проводять як у режимі реального часу, так і за умов прискореного старіння. Це дозволяє передбачити зміни фізико-хімічних, механічних та функціональних характеристик мембрани. Оцінюють вплив умов зберігання (температурний режим, вологість) та визначають термін придатності PLGA-мембрани ГЕБ.

Для дослідження старіння в реальному часі виріб зберігають при +2°C до +8°C і відносній вологості 50–70%. Через певні інтервали часу (1, 3, 5, 7 діб) проводять тести на фізико-хімічні властивості, механічну міцність, хімічну стабільність за допомогою ІЧ-спектроскопії та HPLC та на бар'єрні функції.

Для моделювання прискореного старіння мембрани піддають впливу підвищених температур (40°C, 75% вологості) протягом визначеного періоду. Період випробувань розраховують за формулою:

$$t_1 = \frac{t_0}{Q_{10}}, \quad (5.2.)$$

де t_1 – час прискореного старіння,

t_0 – час реального старіння,

Q_{10} – коефіцієнт, який описує швидкість хімічних реакцій при підвищенні температури на 10°C.

Наприклад, для 7 діб реального часу при $Q_{10} = 2$:

$$t_1 = \frac{7}{2} = 3{,}5 \text{ діб.}$$

Тести для прискореного старіння проводять аналогічно до тестів для старіння в реальному часі.

Після процесу старіння проводять тести на фізико-хімічні властивості (відхилення маси, товщини від початкових), тести на механічну міцність (розтяг, гнучкість), хімічну стійкість (ІЧ-спектроскопія та HPLC), на бар'єрні властивості (коефіцієнт проникності) та на стерильність.

Усі дані тестування (масові зміни, хімічна стабільність, механічні властивості тощо) записують у вигляді таблиць. Складають графіки залежності основних параметрів та порівнюють результати реального та прискореного старіння з метою підтвердження терміну зберігання виробу.

6. МАРКУВАННЯ ТА ІНСТРУКЦІЯ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯ

6.1. Маркування

6.1.1. Маркування на первинній упаковці (блістері)

На блістері зазначають наступну інформацію:

Назва виробу: Напівпроникна PLGA-мембрана гематоенцефалічного бар'єру (PLGA-BBB)

Розмір виробу: 15×20×5 мм

Стан стерильності: символ STERILE (номер символу 4.7 в ДСТУ EN 980:2007)

Клас виробу: символ IVD – медичний виріб для діагностики *in vitro* (номер символу 5.6 в ДСТУ EN 980:2007)

Дата стерилізації: ДД.ММ.РРРР.

Термін придатності: 7 діб

Номер партії: символ LOT (номер символу 4.4 в ДСТУ EN 980:2007) № BBB-0000 [79].

Особливі умови зберігання: Температура від +2°C до +8°C.

Застереження: «Тільки для *in vitro* досліджень», «Не використовувати після закінчення терміну придатності.»

3.1.2. Маркування вторинної упаковки (картонна коробка)

На картонній коробці зазначають наступну інформацію.

- Лицьова сторона упаковки

Назва виробу: Напівпроникна PLGA-мембрана гематоенцефалічного бар'єру (PLGA-BBB)

Виробник: назва компанії, логотип, адреса, контактні дані

Розміри виробу: 15×20×5 мм

Таблиця 6.1. Символи, що зазначаються на лицьовій стороні вторинного пакування

Символ	Значення
	Засторога! Ознайомитись із супровідними документами.
	Стерильність
	Медичний виріб для діагностики *in vitro*
	Код партії
	Знак відповідності технічним регламентам
	Містить достатньо для 3 випробувань
	Біологічні ризики
	Не використовувати повторно

- **Бічні сторони упаковки**

Умови зберігання: Температура: +2°C до +8°C.

Вологість: 50-70%

Термін придатності: ДД.ММ.РРРР (кінцева дата використання)

Застереження: «Використовується виключно в стерильних умовах», «Не піддавайте дії ультрафіолетового випромінювання або високих температур».

- **Зворотна сторона**

Ідентифікаційні дані: LOT № ВВВ-0000, артикул, штрих-код

Склад виробу: PLGA-мембрана з біочорнилами, що містять ендотеліальні клітини, та нейронами мишей

Призначення: «Для моделювання бар'єрних функцій гематоенцефалічного бар'єру у лабораторних умовах».

Інструкція з використання: QR-код для завантаження детальної інструкції.

6.2. Інструкція із застосування

Призначення

Напівпроникна мембрана гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) розроблена для проведення лабораторних *in vitro* досліджень. Мембрана використовується для оцінки бар'єрних функцій, проникності лікарських засобів (ЛЗ), іонів, малих та великих молекул через гематоенцефалічний бар'єр.

Клінічне значення

Напівпроникна мембрана ГЕБ, виготовлена методом 3D-біодруку, є інноваційним інструментом для лабораторних досліджень. Її використання дозволяє моделювати природні бар'єрні властивості гематоенцефалічного бар'єру, що відкриває нові можливості для дослідження проникності лікарських засобів (ЛЗ), тестування нових терапевтичних підходів і розуміння механізмів регуляції міжклітинної взаємодії у ЦНС.

Виріб дозволяє визначати проникність АФІ, що є важливим для:

- доклінічних досліджень ЛЗ для таких неврологічних розладів як епілепсія, хвороба Паркінсона, хвороба Альцгеймера;
- аналізу бар'єрної доступності для досягнення терапевтичних концентрацій у ЦНС;
- оцінки токсичності речовин, які не повинні потрапляти до мозкових тканин.

Мембрана допомагає оцінити, як нові транспортні системи доставляють активні речовини через ГЕБ, а також чи спряють певні хімічні модифікації проникненню АФІ через бар'єр.

Порушення ГЕБ є причиною або наслідком інсультів (пошкодження бар'єра призводить до проникнення токсинів і запальних молекул у мозкову тканину), розсіяного склерозу (зниження бар'єрної функції дозволяє імунним клітинам проникати в мозок), епілепсії (надмірна проникність призводить до порушення нейрональної активності) тощо.

Модель мембрани дозволяє відтворити ці патології *in vitro* для вивчення механізмів захворювань і пошуку терапевтичних мішеней. Також виріб може використовуватись для аналізу ефективності препаратів, що зміцнюють або відновлюють цілісність ГЕБ, а також антиоксидантів та протизапальних засобів, які можуть мінімізувати пошкодження бар'єру.

Виріб є цінним інструментом для вивчення фізіології ГЕБ, аналізу впливу метаболітів, токсинів та іонів на клітини бар'єру та для розробки інноваційних підходів до лікування (наприклад, використання стовбурових клітин для відновлення бар'єру).

Принцип аналізу

Мембрана виготовлена методом 3D-біодруку із PLGA (полімер молочно-гліколевої кислоти) з використанням біочорнил, що містять ендотеліальні клітини та нейрони.

Мембрана забезпечує:

- Напівпроникність для тестування речовин у контрольованих умовах.
- Відтворення функцій ГЕБ за допомогою живих клітинних шарів.

Матеріали та обладнання

Склад комплекту:

- Напівпроникна мембрана ГЕБ у стерильному блістері з додаванням поживного середовища
- Інструкція для застосування

Додаткові матеріали та обладнання:

- Буферний розчин (PBS)
- Стерильні пінцети та інструменти
- Лабораторні пластини для закріплення мембрани

Застереження та техніка безпеки

Застереження

- Використовуйте виріб лише для *in vitro* досліджень.
- Дотримуйтесь стерильних умов під час роботи з мембраною.
- Не використовуйте виріб після закінчення терміну придатності.
- Уникайте механічних пошкоджень мембрани при роботі.

Техніка безпеки:

- Компоненти набору призначені лише для тестувань *in vitro*;
- Проведення тестувань вимагає використання спецодягу та стерильних умов
- Рідкі відходи інактивують перед утилізацією
- Слід уникати розливу поживного середовища з блістера та контакту зі слизовими оболонками
- Не використовувати після закінчення терміну придатності
- Кожного разу потрібно використовувати нові наконечники піпетки під час внесення розчинів із маркерними молекулами
- Дотримуватись температурного режиму при тестуванні, зберіганні та транспортуванні
- Утилізувати виріб за протоколом знешкодження речовин біологічного походження

Зберігання та стабільність

Компоненти виробу стабільні протягом дії терміну придатності, вказаного на вторинній упаковці. Зберігання та транспортування виробу проводити в температурному діапазоні 2-8°С. Допускається одноразове транспортування за температури не вище 20 °С протягом 2 діб.

Підготовка зразків

Підготовка мембрани

Відкрийте вторинну упаковку (картонна коробка). Переконайтеся у цілісності блістера. У стерильних умовах дістаньте мембрану з блістера за допомогою стерильних пінцетів.

Підготовка зразків

Визначне цільову концентрацію АФІ залежно фізіологічно значущої концентрації в плазмі крові. Наприклад, 10-50 мкМ для ламотриджину, 50-200 мкМ для L-DOPA, 1-5 мМ для іонів літію Li^+.

Перевірте розчинність у воді, буферному розчині або органічних розчинниках. Водорозчинні АФІ (іони Li^+) розчиняють у PBS (pH 7,4); частково розчинні АФІ – у DMSO (не більше 0.1% кінцевого розчину для клітинних експериментів). Нерозчинні АФІ розчиняйте в невеликій кількості органічного розчинника, після чого доведіть до об’єму стерильною водою або буфером.

Зважте необхідну кількість АФІ на аналітичних вагах. Точність вимірювань повинна забезпечувати концентрацію з похибкою не більше 1%. Додайте невеликий об’єм обраного розчинника. Для важкорозчинних речовин використовуйте ультразвукову ванну або мішалку. Після повного розчинення АФІ доведіть розчин до заданого об’єму (наприклад, 10 мл) відповідним розчинником. Фільтруйте розчин через стерильний фільтр з пористістю 0.22 мкм для видалення нерозчинених часток і стерилізації.

Виміряйте кислотність розчину, яка повинна бути в межах 6.8–7.4 для клітинних експериментів. При необхідності коригуйте pH за допомогою NaOH або HCl. Перевірте стабільність розчину за умов зберігання (наприклад, при

+4°C або 37°C) протягом визначеного часу. Використовуйте спектрофотометрію або HPLC для перевірки відсутності домішок у розчині.

Зберігайте водні розчини при +4°C не більше 24 годин. Зберігайте органічні розчинники при -20°C до 7 днів, якщо стабільність підтверджена. Уникайте багаторазового заморожування/розморожування.

Таблиця 6.2. Приклад підготовки

АФІ	**Цільова концентрація**	**Розчинник**	**Метод розчинення**
Ламотриджин	10 мкМ	PBS (pH 7.4)	Розчинення у PBS при кімнатній температурі
L-DOPA	100 мкМ	Вода + 0.1% HCl	Розчинення в HCl, доведення водою
Іони літію (Li^+)	1 мМ	PBS (pH 7.4)	Пряме розчинення у PBS

Збір та обробка даних

Документування результатів

Занесіть результати вимірювань до спеціально розроблених форм, що містять назву зразка, концентрацію в донорній та рецепторній камерах, час відбору зразків, об’єми зразків та умови експерименту (температура, pH розчинів, вологість). Усі дані додатково внесіть в електронну базу для подальшої обробки та аналізу.

Розрахунки параметрів

Для кожного зразка обчисліть наступні параметри:

Коефіцієнт проникності (*P*):

$$P = \frac{dt}{dQ} \times \frac{1}{(A \times \Delta C)} \quad , \tag{6.1}$$

де $\frac{dt}{dQ}$ – швидкість – транспорту молекули (моль/с або г/с),

A — площа мембрани (см²)

ΔC — градієнт концентрації між донорною та рецепторною камерами (моль/см³).

Швидкість дифузії (*J*):

$$J = \frac{Q}{A \times t} \quad , \tag{6.2}$$

де *Q* – кількість молекули, що проникла через мембрану (моль);

t – час транспорту (с).

Побудуйте графіки залежності концентрації молекул у рецепторній камері від часу (лінійні або логарифмічні).

Побудуйте графіки коефіцієнта проникності для різних ЛЗ або маркерних молекул.

Інтерпретація результатів

Оцінка бар'єрної функції

Високий коефіцієнт проникності *P* свідчить про ефективну напівпроникність мембрани для іонів та малих молекул.

Низький коефіцієнт проникності *P* підтверджує бар'єрні властивості мембрани для великих молекул.

Таблиця 6.3. Інтерпретація результатів

Тип молекули	**Коефіцієнт проникності (см/с)**	**Інтерпретація**
Малі молекули	$10^{-6} – 10^{-5}$	Ефективний транспорт
Іони	$10^{-7} – 10^{-6}$	Фізіологічна напівпроникність
Великі молекули	$10^{-8} – 10^{-7}$	Бар’єр ефективно обмежує транспорт

Дані порівнюються з результатами контрольних експериментів (наприклад, транспорту через мембрани без клітинного шару).

Аналіз відхилень

Позитивні відхилення (високий транспорт) можуть свідчити про порушення бар’єрної функції (наприклад, пошкодження мембрани, деградація клітинного шару).

Негативні відхилення (низький транспорт) можуть бути спричинені нерозчинністю молекул, зміною pH, адсорбцією на мембрані тощо.

Аналіз проникності АФІ

Результати проникності ЛЗ аналізуються для оцінки їхньої ефективності в подоланні бар’єра.

- Високий транспорт (наприклад, 10^{-5} см/с) підтверджує потенційну здатність ЛЗ досягати тканин мозку.

- Низький транспорт вказує на необхідність модифікації ЛЗ або використання транспортних систем (наночастинок, ліпосом).

Взаємодія ЛЗ з мембраною

Проаналізуйте можливість адсорбції ЛЗ на мембрані, що може впливати на результати.

Визначте відсоток утримання ЛЗ на мембрані за допомогою високоефективної хроматографії або ІЧ-спектрофотометрії.

Документування результатів

Структура звіту:

- Опис експериментальних умов (тип мембрани, маркерних молекул, розчини, температура тощо);
- Результати (таблиці концентрацій, коефіцієнтів проникності, графіки залежностей тощо)
- Обговорення (порівняння результатів із теоретичними очікуваннями та контрольними даними).

Таблиця 6.4. Приклад таблиці концентрацій та коефіцієнтів проникності

Молекула	**Час (год)**	**Концентрація в рецепторній камері (мкМ)**	**Коефіцієнт проникності (см/с)**
Ламотриджин	1	10	$1{,}5 \times 10^{-6}$
L-DOPA	1	20	$2{,}3 \times 10^{-6}$
Альбумін	1	0,01	$8{,}5 \times 10^{-8}$

Діагностичні характеристики тесту

Специфічність та чутливість

Специфічність тесту відображає його здатність виключати хибнопозитивні результати, тобто проникність речовин, які в нормі не повинні долати бар'єр.

Аналіз проводять для великих молекул та інших речовин, які мають низьку проникність у фізіологічних умовах. Специфічність вважається високою, якщо проникність альбуміну складає 10^{-8} – 10^{-7} см/с.

Чутливість визначає здатність тесту виявляти мінімальні рівні проникності речовин, що проникають через мембрану.

Чутливість визначають для малих молекул (наприклад, глюкози, ламотриджину) при концентраціях у межах фізіологічного діапазону. Чутливість вважається високою, якщо проникність малих молекул реєструється на рівні 10^{-6} – 10^{-5} см/с із відхиленням не більше 5%.

Точність

Відтворюваність результатів у межах однієї постановки аналізу

Відтворюваність у межах однієї постановки аналізу демонструє стабільність результатів, отриманих при повторних вимірюваннях у рамках одного експерименту.

Для кожної речовини тест проводять три рази у паралельних зразках в однакових умовах.

Розраховують коефіцієнт варіації (*CV*):

$$CV = \frac{\sigma}{x_c} \times 100\% , \qquad (6.3)$$

Де σ – стандартне відхилення;

x_c – середнє значення.

CV повинен бути меншим ніж 10% для малих молекул і іонів та меншим ніж 15% для великих молекул.

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу

Відтворюваність між постановками оцінює стабільність результатів, отриманих у різних експериментах (різні дні, різні партії мембран або реагентів).

Для кожної речовини тест проводять три рази у незалежних експериментах із використанням різних партій мембран. Вимірюють середнє значення проникності *CV*. *CV* повинен бути меншим ніж 15% для малих молекул і іонів та меншим ніж 20% для великих молекул.

Таблиця 6.5. Таблиця критеріїв прийнятності

Параметр	**Критерії прийнятності**
Специфічність	Проникність великих молекул: 10^{-8} – 10^{-7} см/с
Чутливість	Проникність малих молекул: 10^{-8} – 10^{-7} см/с
Точність	Відхилення результатів не більше 5%.
Відтворюваність результатів у межах однієї постановки аналіз	CV ≤ 10% (малі молекули), ≤ 15% (великі молекули)
Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу	CV ≤ 15% (малі молекули), ≤ 20% (великі молекули)

7. ВИРОБНИЦТВО

7.1. Опис та обґрунтування технології виробництва напівпроникної мембрани гематоенцефалічного бар'єру методом 3D-біодруку

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

Етап санітарної підготовки виробництва включає медичні огляди та навчання персоналу, підготовку робочих розчинів, підготовку виробничих приміщень, обладнання та інструментів.

ДР 1.1 Підготовка персоналу

Для допущення персоналу до технологічних процесів, вимагається використання захисного одягу, дотримання правил роботи з біологічними та хімічними агентами, проходження регулярних медоглядів. Також для дотримання правил безпеки забезпечують навчання та моніторинг знань та навичок персоналу.

ДР 1.1.1 Дотримання належного санітарного стану персоналу

Працівники дотримуються правил особистої гігієни, включаючи регулярне миття рук, використання антисептиків, чистоту одягу, використовують спецодяг та проходять регулярні медичні огляди [79].

ДР 1.1.2 Навчання та періодична перевірка знань та навичок персоналу

Задля дотримання чистоти та правил безпеки персонал періодично опитують щодо обізнаності про потенційні ризики та способи їх уникнення. Для дотримання санітарних норм ведуть документацію про контроль здоров'я та перевірки санітарного стану персоналу та умов праці [80; 81].

ДР 1.2 Підготовка робочих розчинів

Підготовка робочих розчинів включає приготування дезінфікуючих та миючих розчинів для обробки обладнання, поверхонь, лабораторного посуду та рук під час технологічного процесу.

ДР 1.2.1 Підготовка дезінфікуючих розчинів

Стадія підготовки дезінфікуючих розчинів включає в себе приготування розчину на основі хлору для обробки поверхонь, спиртового розчину для обробки рук та розчину перекису водню для дезінфекції медичних інструментів.

Для приготування розчину на основі хлору використовують розчин з концентрацією 0,1-0,5% активного хлору. До 980 мл води додають 20 мл хлорного відбілювача та ретельно перемішують.

Для приготування спиртового розчину в чисту ємність додають 70 мл етилового спирту, 29,5 мл води та 0,5 мл гліцерину, ретельно перемішують компоненти.

Для приготування розчину перекису водню до 917 мл води додають 83 мл 3%-го перекису водню, перемішують до однорідності.

ДР 1.2.2 Підготовка миючих розчинів

Приготування миючих розчинів передбачає додавання 100 мл лужного миючого засобу до 900 мл води [82].

ДР 1.3 Підготовка виробничого приміщення

У якості підготовки виробничих приміщень проводять щоденні та генеральні прибирання із використанням відповідних дезінфікуючих та миючих розчинів.

ДР 1.3.1 Щоденне прибирання

Приміщення провітрюють та проводять сухе прибирання. Використовуючи дезінфікуючі та миючі розчини від ДР 1.1.1 та 1.1.2, проводять вологе прибирання поверхонь приміщення. Після закінчення прибирання відходи знешкоджують та утилізують.

ДР 1.3.2 Генеральне прибирання

Складають детальний план дій, враховуючи всі поверхні, обладнання та зони зберігання. Проводять сухе прибирання. Перевіряють терміни придатності усіх хімічних розчинів, утилізують прострочені матеріали. Використовуючи дезінфікуючі та миючі розчини від ДР 1.1.1 та 1.1.2, проводять вологе прибирання поверхонь приміщення. Після закінчення прибирання відходи знешкоджують та утилізують. Лабораторію оглядають на предмет залишкових забруднень. У журналі прибирання фіксують дати, обсяги роботи, відповідальних осіб та детальну інформацію про миючі та дезінфікуючі засоби, що використовувались у процесі генерального прибирання [82].

ДР 1.4 Підготовка обладнання

ДР 1.4.1 Стерилізація обладнання

В автоклаві розміщують підготовлене обладнання та контролюють можливість вільної циркуляції пари навколо предметів. Автоклав налаштовують на необхідні параметри. Процес стерилізації відбувається за температури 140 °С, тиску 0,15 МПа протягом 90 хв. Після завершення стерилізації автоклав охолоджують та вилучають стерилізоване обладнання.

Для CO_2-інкубатора використовують програму деконтамінації, що триває 4-8 год за температури 180 ºС. Ламінарний бокс стерилізують УФ-лампами з довжиною хвилі близько 254 нм протягом 15-30 хв.

ДР 1.5 Підготовка посуду та інструментів

Під час підготовки лабораторного посуду та інструментів проводять мийку та стерилізацію гострою парою.

1.5.1 Мийка посуду та інструментів

Стадія мийки лабораторного посуду та інструментів передбачає підготовку обладнання, такого як дистильована вода, миючі та дезінфікуючі розчини, губки, щітки, відра тощо. Переконуються, що інструменти та посуд не містить залишків бруду промиванням дистильованою водою.

Під час роботи із миючими та дезінфікуючими розчинами використовують рукавички та маску. Посуд занурюють у миючий розчин або наносять за допомогою губки, ретельно протирають внутрішню та зовнішню поверхні, ополіскують дистильованою водою. Наносять дезінфікуючий розчин на 5-10 хв, ополіскують дистильованою водою. Посуд та інструменти просушують на чистій сухій серветці або в сушарці для посуду.

1.5.2 Стерилізація посуду та інструментів гострою парою

Перед стерилізацією посуд і інструменти ретельно очищують від залишків сторонніх речовин. Очищений лабораторний посуд та інструменти розміщують в стерилізаторі, залишаючи простір для вільної циркуляції пари. Процес стерилізації відбувається при температурі 140 °С, тиску 0,2 МПа протягом 30 хвилин. Після завершення стерилізації стерилізатор охолоджують та, поступово знижують тиск, дотримуючись інструкцій виробника. Стерилізоване обладнання витягують, використовуючи захисні рукавички, та розміщують на стерильній поверхні для охолодження. У журналі стерилізації фіксують дати, параметри та відповідальних осіб.

ДР 2 Підготовка очищеного повітря

Для підготовки очищеного повітря проводять забір атмосферного повітря, фільтрують для видалення механічних часток, повторно очищають повітря та стабілізують його термодинамічні показники.

ДР 2.1 Підготовка стерильного повітря

Для забезпечення належних умов виготовлення PLGA-мембрани та 3D-біодруку, культивації мікроорганізмів та обробки результатів проводять підготовку стерильного повітря за допомогою багатоступеневої фільтрації та стабілізації термодинамічних показників.

ДР 2.1.1 Забір атмосферного повітря

Забір повітря здійснюють з атмосфери за допомогою трубчастих конструкцій висотою 8-10 м, розташованих у зонах з низькою запиленістю та загазованістю. Процес проходить при температурі від 20 до 40 ^{o}C та вологості 30-90%. Таким чином отримують якісне повітря, яке відповідає вимогам для подальшого використання в системах вентиляції та кондиціювання. Відпрацьовані матеріали відправляють на знешкодження.

ДР 2.1.2 Фільтрування повітря від механічних часток

Для запобігання абразивного пошкодження апаратури повітря очищують від механічних часток, встановлюючи фільтри попередньої очистки перед вентиляторами. Таким чином запобігають потраплянню часток розмірами більше 5 мкм. Відпрацьовані фільтрувальні матеріали відправляють на знешкодження та утилізацію.

ДР 2.1.3 Стабілізація термодинамічних показників повітря

За допомогою компресора нагнітають повітря у систему повітропостачання, внаслідок чого воно нагрівається до високих температур. При виході повітря охолоджують до температури 20-25 ^{o}C за допомогою

теплообмінника. Крапельна волога виводиться у вигляді конденсату у каналізацію.

ДР 2.1.4 Повторне очищення повітря

На головному повітряному фільтрі класу HEPA повітря очищують від часток розміром більше за 1,5 мкм, що передбачує ефективність процесу очищення до 98%. Відпрацьовані фільтрувальні матеріали відправляють на знешкодження та утилізацію.

ДР 2.1.5 Очистка повітря на індивідуальному фільтрі

Тонка фільтрація виконується за допомогою, які утримують частки розміром до 1 мкм. Надтонка фільтрація, яка спрямована на вилучення навіть частинок розміром 0,3 мкм, досягається за допомогою спеціальних фільтрів, що забезпечують якіснішу очистку повітря на рівні понад 99% [83].

ДР 3 Підготовка води

ДР 3.1 Забір води

Забір води із міського водоканалу для подальшого піддавання очистці.

ДР 3.2 Попередня фільтрація води

Здійснюється на фільтрі механічного очищення із пісочною набивкою для видалення піску, іржі та інших механічних домішок.

Контроль технологічний.

ДР 3.3 Фільтрація на вугільних фільтрах

Використовуються вугільні патронні фільтри із активованого вугілля для видалення залишкового хлору. Фільтрувальний матеріал періодично перевіряється на вміст хлору та, за необхідності, замінюється.

Контроль технологічний.

ДР 3.4 Мембранна очистка води

Вода пропускається через мембранний фільтр, який є непроникним для більшості домішок. Очищена вода зберігається у збірнику.

Контроль технологічний.

ДР 3.5 Очищення на зворотньоосмотичній установці

Зворотньоосмотична мембрана виконує роль бар'єру для розчинених солей, неорганічних та органічних молекул з молекулярною масою понад 100, мікроорганізмів і пірогенних речовин.

Контроль технологічний, хімічний.

ДР 3.6 Стерильна фільтрація води

Вода проходить через фільтр «Міліпор», і ця стерильна вода для ін'єкцій збирається в збірнику.

Контроль технологічний.

ДР 4. Підготовка поживного середовища для культивування клітин

ДР 4.1. Приготування поживного середовища

Поживне середовище змішують у ламінарному боксі для захисту від сторонньої контамінації.

Для здійснення підготовки поживного середовища для культивування ендотеліальних клітин використовують:

- 500 мл EBM-2 (Endothelial Basal Medium-2),
- 10%-FBS (Fetal Bovine Serum),
- 10 мг/мл VEGF (Vascular endothelial growth factor), що сприяє ангіогенезу та виживанню ендотеліальних клітин,
- 10 мг/мл bFGF (basic fibroblast growth factor) для належної проліферації та диференціації клітин,

- 25-50 мг аскорбінової кислоти, що слугує антиоксидантом та сприяє синтезу колагену
- 100 од/мл пеніциліну для запобігання бактеріальній контамінації та збереження життєздатності клітин.

Для здійснення підготовки поживного середовища для культивування нейронів мишей використовують:

- 500 мл нейробазального середовища (Neurobasal Medium),
- 10 мл L-глутаміну,
- 5 мл пеніциліну,
- 10 нг/мл NGF (Nerve growth factor),
- 25-50 мг аскорбінової кислоти.

ДР 4.2 Стерилізація поживного середовища

Приготоване поживне середовище містить термолабільні компоненти, тому стерилізується шляхом фільтрування через мембранні фільтри з розміром пор 0,45 мкм та 0,22 мкм в попередньо підготований стерильний посуд.

ДР 5 Підготовка 3Д принтера

Під час даного етапу виготовляють PLGA-мембрану методом 3D-друку. Стадія включає такі процеси як підготовка та калібрування 3D-принтера, безпосередній друк PLGA-мембрани та оцінка якості виготовленого напівпродукту.

ДР 5.1 Огляд 3D-принтера

У ході даної стадії перевіряють стан механічних компонентів, таких як осі, екструдер, відсутність механічних пошкоджень та коректність роботи 3D-принтера

ДР 5.1.1 Калібрування 3D-принтера

Для калібрування 3D-принтера встановлюють температуру екструдера на рівні 180-210 °C та на рівні 40-60 °C для платформи, що забезпечує належне плавлення матеріалів. Регулюють швидкість друку на рівні 30-50 мм/с для досягнення подачі матеріалу без розривів. Встановлюють товщину шару 0,1-0,3 мм та ширину екструзії 0,4-0,8 мм для забезпечення належної пористості.

Проводять тестові друки простих форм для перевірки точності та якості виготовлення, оцінюють отримані форми на відповідність заданим характеристикам.

ДР 6 Розробка 3D моделі

Для розробки моделі за допомогою програми AutoCAD створюють 2D-модель плоскої основи із зовнішніми розмірами 15×20 мм та внутрішніми 10×15 мм. За допомогою інструментів креслення створюють отвори (пори) у діапазоні 5-20 мкм. Пори розташовують однорідно для уникнення «мертвих зон» щільністю 30-50% від загального об’єму основи.

2D-основу екструдують у 3D-об’єкт, надаючи зовнішню товщину 5 мм та внутрішню – 2,5 мм для отримання повноцінної об’ємної моделі із зовнішнім розміром 15×20×5 мм та 10×15х2,5 мм.

ТП 7 Напрацювання клітинного матеріалу

ТП 7.1 Отримання ендотеліальних клітин

ТП 7.1.1. Культивування ендотеліальних клітин

Ендотеліальні клітини отримані з банку клітинних ліній поміщають в поживне середовище з ДР4.2. Посіяні клітини розміщують всередині інкубатора, проводячи моніторинг клітин. Оцінюють наявність контамінації ,

морфологію та адгезію клітин. Встановлюють оптимальні для росту та розвитку ендотеліальних клітин параметри для інкубатора: температура (t): 37 °С, вологість – 90%, концентрація CO_2 – 5%.

ТП 7.1.2 Відокремлення клітин від культурального посуду

Для відокремлення ендотеліальних клітин використовують розчин, що складається з 0,25% трипсину та 0,02% EDTA. Обережно видаляють середовище з посудини, в якому ростуть клітини піпетуванням. Далі клітини промивають 1-2 рази стерильним фосфатно-буферним розчином (PBS) для видалення залишків середовища. До культурального посуду додають 1-3 мл трипсину та інкубують посудину при 37 °С протягом 5-10 хв. Коли клітини починають відділятися, додають 2-3 мл FBS для зупинки дії трипсину. У стерильну пробірку або контейнер відбирають відокремлені клітини.

ТП 7.1.3 Центрифугування

Під час даного етапу пробірки наповнюють до 2/3 їх об’єму культуральною рідиною та розміщують у ротаційному відсіку, зважаючи на баланс мас пробірок.

Відібрані клітини центрифугують при температурі 20-25 °С та швидкості обертів 800-1200 об/хв, що дорівнює 200-300 g (гравітаційних сил) протягом 5-10 хв, контролюючи стан клітин під мікроскопом після центрифугування.

ТП 7.1.4 Ресуспендування

Для ресуспендування обережно відділяють супернатант, не порушуючи осад клітин та залишаючи 1-2 мл рідини. Додають 5 мл поживного середовища та обережно перемішують за допомогою піпетки. Оцінюють рівномірність

розподілу клітин та їх життєздатність за допомогою мікроскопа, за потреби вимірюючи кількість ресуспендованих клітин.

ТП 7.2 Підготовка нейронів

ТП 7.2.1 Відбір нейронів мишей

Дотримуючись етичних норм, проводять відбір нейронів із попередньою анестезією мишей віку 14-17 днів. Використовуючи лабораторні інструменти, видалену тканину механічно подрібнюють та обробляють трипсином для отримання клітинної суспензії.

ТП 7.2.2 Культивування

На даному етапі встановлюють оптимальні для росту та розвитку нейронів параметри для інкубатора: температура (t): 37 °C, вологість – 90%, концентрація CO_2 – 5%. За 48-72 год вводять додаткову частину поживного середовища.

Регулярно проводять моніторинг клітин під мікроскопом на наявність ознак життєздатності. Оцінюють наявність контамінації , морфологію та адгезію клітин. За необхідності додають фактори росту, використовувані у складі поживного середовища

ТП 7.2.3 Відокремлення від поживного середовища

Для відокремлення нейронів обережно видаляють середовище з посудини піпетуванням.

Клітини промивають 1-2 рази стерильним фосфатно-буферним розчином (PBS) для видалення залишків середовища. До культурального посуду додають 1-2 мл трипсину та інкубують посудину при 37 °C протягом 5-10 хв. Коли

клітини починають відділятися, додають 2-3 мл FBS для зупинки дії трипсину. У стерильну пробірку або контейнер відбирають відокремлені клітини.

ТП 7.2.4 Центрифугування

Під час даного етапу пробірки наповнюють до 2/3 їх об'єму відокремленими нейрональними клітинами та розміщують у ротаційному відсіку, зважаючи на баланс мас пробірок.

Відібрані клітини центрифугують при температурі 20-25 °C та швидкості обертів 800-1200 об/хв протягом 5-10 хв, контролюючи стан клітин під мікроскопом після центрифугування.

ТП 7.2.5 Ресуспендування

Для ресуспендування обережно відділяють супернатант, не порушуючи осад клітин та залишаючи 1-2 мл рідини. Додають 5 мл поживного середовища та обережно перемішують за допомогою піпетки. Оцінюють рівномірність розподілу клітин та їх життєздатність за допомогою мікроскопа, за потреби вимірюючи кількість ресуспендованих клітин.

ТП 8. Підготовка біочорнил

ТП 8.1. Приготування розчину желатину метакрилату

При використанні желатину метакрилату (GelMA) у порошковій формі, його розчиняють у PBS у кількості 5-10% за масою. Суміш нагрівають до 37-40 °C для розчинення желатину, не допускаючи перегріву для запобігання деградації желатину [85].

Для зберігання приготовану суміш охолоджують до кімнатної температури задля стабілізації її структури. За потреби, короткочасно

зберігають при 4 °С або заморожують для довготривалого зберігання. Відходи направляють на знешкодження та переробку.

ТП 8.2 Змішування клітин до однорідної маси

До розчиненого GelMA у стерильну пробірку додають 1-10 млн ендотеліальних клітин за температури 37 °С. Обережно перемішують розчин для уникнення пошкодження клітин, використовуючи м’які рухи піпеткою або мішалкою.

Після змішування суміш перевіряють під мікроскопом, щоб упевнитися, що клітини рівномірно розподілені в GelMA.

За позитивного результату суміш можна вважати біочорнилами.

За позитивного тестування на життєздатність суміш вважають біочорнилами, придатними для 3D-біодруку. Відходи направляють на знешкодження та переробку.

ТП 9. Підготовка мембрани

ТП 9.1. 3D-друк мембрани

Гранули PLGA (полілактидно-гліколева кислота) завантажують у 3D-принтер потужністю у 400 Вт, перевіряють налаштування та запускають процес друку, під час якого екструдер наносить матеріал шарами відповідно до заданої моделі. Під час даної стадії контролюють температуру, швидкість подачі матеріалу та проводять контроль якості, оцінюючи наявність деформацій [86; 87].

Після завершення друку мембрану охолоджують до кімнатної температури та знімають з платформи. Проводять візуальну оцінку товщини, пористості та однорідності матеріалу.

Також проводять огляд 3D-принтера для виявлення таких проблем як забивання екструдера тощо.

Відходи відправляють на знешкодження та перероблку.

ТП 9.2. Стерилізація мембрани

Мембрану занурюють у 70%-й етиловий спирт на 10-30 хвилин, після чого промивають стерильним фосфатно-буферним розчином (PBS) для видалення залишків спирту. Мембрану висушують в стерильних умовах.

ТП 9.3 Стерилізація біочорнил за допомогою фільтрації

Переконавшись у стерильності матеріалів, в шприц об’ємом 10-20 мл набирають необхідну кількість біочорнила, залишаючи простір для уникнення переповнення. Шприцевий фільтр прикріплюють до отвору шприці, переконуючись у герметичності з’єднання. Обережно натискають на поршень шприца, роблячи це повільно для уникнення надмірного тиску. Стерилізоване біочорнило збирають у підготовлену стерильну пробірку або контейнер та перевіряють на наявність забивання. За потреби, біочорнило зберігають в стерильних умовах. Відходи направляють на знешкодження та переробку.

ТП 9.4. 3D-біодрук на PLGA-мембрані

Переконавшись у стерильності та механічних характеристиках PLGA-мембрани, її розміщують на платформі.

3D-принтер налаштовують на такі параметри: швидкість друку – 5-20 мм/с, висота шарів – 100-300 мкм. Під час друку контролюють процес для уникнення деформацій та технічних неполадок. Перевіряють рівномірність

екструзії матеріалу. Після завершення друку конструкцію охолоджують до кімнатної температури [88–92].

ТП 10 Інкубація ендотеліальних клітин на PLGA-мембрані

До PLGA-мембрани з культурою ендотеліальних клітин додають

PLGA-мембрану з клітинами розміщують в інкубаторі, де підтримується температура 37 °C, вміст CO_2 на рівні 5% та вологість – 95%. Для досягнення високої вологості можуть використовувати спеціальний посуд з водою. Протягом 3-5 діб періодично перевіряють клітинну морфологію та адгезію за допомогою мікроскопії, оцінюючи розвиток клітин. За потреби, через 24-48 год після нанесення клітин їх промивають розчином PBS для видалення неприєднаних клітин.

ТП 11 Розміщення нейронів на PLGA-мембрані

На даній стадії технологічного процесу ресуспендовану культуру нейронів обережно додають на поверхню PLGA-мембрани з культурою ендотеліальних клітин, рівномірно розподіляють для уникнення агрегації клітин.

До посудини додають NBM (нейробазальне середовище), 2% добавки B-27 supplement, 2% L-глутаміну та 1% пеніциліну.

ТП 12 Інкубація

PLGA-мембрану з ендотеліальними клітинами та нейронами розміщують в інкубаторі, де підтримується температура 37 °C, вміст CO_2 на рівні 5% та вологість 95% протягом 7 діб. Для досягнення високої вологості можуть

використовувати спеціальний посуд з водою, додаючи достатній об’єм за необхідності.

За потреби, через 24-48 год після нанесення клітин їх промивають розчином PBS для видалення неприєднаних клітин.

ПМВ 13. Пакування, маркування

Готові напівпроникні мембрани гематоенцефалічного бар’єру упаковуються в стерильні блістери розмірів 40×60 мм для запобігання контамінації та герметизують за допомогою фольги у якості первинної упаковки. На блістер наносять маркування із короткими відомостями про виріб.

Під час пакування забезпечується наявність підтримуючого середовища для збереження клітинних культур.

Блістери упаковують у вторинну упаковку – картонні коробки розмірами 50×70×15 мм. В коробку вкладають інструкцію із застосування та наносять маркування із детальною інформацією про виріб на вторинну упаковку.

Маркування включає назву продукту, дату виготовлення, термін придатності, умови зберігання та ідентифікаційний номер серії.

Умови зберігання: температура 4-8 °С, в сухому та затемненому місці, до 48 годин.

Проводять перевірку цілісності упаковки, відповідності маркування стандартам та характеристикам готового виробу.

ЗВ 14 Знешкодження відходів та викидів

Всі використані розхідні матеріали (культури клітин, витратні елементи для мікроскопії тощо) збирають в окремі контейнери для біологічних відходів, що відповідають вимогам біобезпеки.

Лабораторний посуд очищають та збирають у спеціальні контейнери для подальшої стерилізації.

Одноразові інструменти (голки, скальпелі тощо) утилізують в контейнерах для гострих предметів, інструменти багаторазового використання – дезінфікують та стерилізують.

Використані матеріали, що містять біологічні елементи, підлягають дезактивації (наприклад, автоклавування) для знищення патогенів і зменшення ризику забруднення. Упаковку дезактивованих відходів виконують відповідно до вимог для безпечного транспортування і зберігання.

ПВ 15 Переробка відходів та викидів

Біологічні відходи, пластикові матеріали та скло передають для відповідної переробки установам, що спеціалізуються на переробці. Рідкі відходи обробляють перед скиданням у каналізацію.

Ведуть журнал обліку відходів, їх видів, обсягів та поводження з ними [84].

Технологічна схема виробництва наведена у Додатку Г.

7.2. Опис організації виробництва напівпроникної мембрани гематоенцефалічного бар’єру методом 3D-біодруку

Задля обґрунтування організації робіт на підприємстві було використано Додаток 2 до стандарту СТ-Н МОЗУ 424.0:2016 «Лікарські засоби. Належна

виробнича практика», що регулює Виробництво біологічних діючих речовин та біологічних лікарських препаратів [80].

Згідно з вимогами даного документа, при роботі з живими клітинами, стійкими у виробничому середовищі, слід облаштовувати спеціально призначені виробничі зони.

Для цього в лабораторії організовують такі зони:

• Зона санітарної підготовки персоналу – для забезпечення належного рівня чистоти та підготовки персоналу перед входом до інших виробничих зон.

• Зона підготовки обладнання – для підготовки стерильних інструментів, матеріалів та робочих розчинів.

• Зона 3D-друку та біодруку – для безпосереднього процесу біодруку із застосуванням 3D-технологій.

• Зона роботи з клітинами – для маніпуляцій із живими клітинами, включаючи культивування, центрифугування, ресуспендування, забір та розміщення нейронів мишей на PLGA-мембрані.

• Зона зберігання готової продукції – для тимчасового зберігання готових мембран у належних умовах.

• Зона пакування та маркування – для пакування готової продукції та її відповідного маркування.

• Зона знешкодження та переробки відходів – для безпечного видалення та переробки відходів, що утворюються під час виробництва.

Класи чистоти приміщень

Виходячи з вимог щодо рівня чистоти та необхідності контролю забруднень, до приміщень класу D було віднесено:

• Зону санітарної підготовки персоналу;

• Зону знешкодження та переробки відходів.

Зона санітарної підготовки персоналу є місцем, де персонал проходить етапи санітарної обробки перед входом у чистіші зони виробництва. Клас D забезпечує базовий рівень чистоти, необхідний для мінімізації забруднень, що можуть потрапити в зону вищих рівнів чистоти. Застосовуються базові заходи контролю повітря та частинок, що допомагають підтримувати чистоту на рівні, необхідному для підготовки персоналу до роботи з живими клітинами та біологічними матеріалами.

У зоні знешкодження та переробки відходів здійснюється обробка, сортування та переробка відходів, які можуть включати біологічні матеріали, відпрацьовані розчини, інструменти або компоненти, що мали контакт із клітинами. Клас D дозволяє підтримувати контроль над забрудненнями, які можуть поширюватися з відходів у зовнішнє середовище. Оскільки зона знешкодження є завершальним етапом виробничого процесу, клас D забезпечує належний рівень стерильності для зони роботи з відходами [22].

До приміщень класу C належать:

• Зона підготовки обладнання

• Зона пакування та маркування

У зоні підготовки обладнання здійснюється підготовка та стерилізація інструментів, обладнання та робочих розчинів, які будуть використовуватися у виробничих процесах, зокрема в зоні 3D-друку та біодруку. Клас C забезпечує рівень чистоти, що мінімізує ризик забруднення під час підготовки стерильних матеріалів [22].

Підтримання класу C в цій зоні є необхідним, адже обладнання та розчини, які не відповідають вимогам стерильності, можуть призвести до контамінації кінцевої продукції під час її створення.

Після завершення процесу біодруку готовий продукт переміщують у зону пакування та маркування, де він готується для зберігання та транспортування. Оскільки продукція вже готова до використання або подальшого зберігання, важливо забезпечити клас чистоти С, щоб уникнути контамінації на поверхні первинних пакувальних матеріалів в момент безпосереднього пакування.

Приміщення класу В:

- Зона 3D-біодруку
- Зона роботи з клітинами
- Зона зберігання продукції

У зоні 3D-біодруку будь-яке забруднення може вплинути на функціональні властивості мембрани, зокрема на її напівпроникність, механічну цілісність і стабільність.

Клас В забезпечує необхідну чистоту для зони, де здійснюється контакт біологічних матеріалів з поверхнею виробу [22]. Контрольований рівень часток і мікроорганізмів у приміщеннях класу В мінімізує ризик контамінації, особливо важливий для технологічних процесів із високими вимогами до стерильності.

Зона 3D-біодруку є однією з ключових у виробничому циклі, тому клас В забезпечує належний рівень чистоти, щоб уникнути впливу забруднень на функціональні властивості продукції.

У зоні роботи з ендотеліальними клітинами та нейронами мишей відбуваються такі маніпуляції з живими клітинами як культивування, центрифугування, ресуспендування, забір та розміщення нейронів мишей на PLGA-мембрані. Контакт клітин з будь-якими забрудненнями може призвести до неконтрольованих змін у культурі, що негативно позначиться на кінцевій продукції. Приміщення класу В забезпечує високу стерильність, що дозволяє

знизити ризик контамінації живих клітин, підтримуючи їхню життєздатність і контрольований ріст.

Після завершення виробництва готову продукцію зберігають у зоні, де вона повинна залишатися стерильною до моменту використання або пакування. Продукція потребує середовища з контролем чистоти, щоб уникнути будь-якої можливості забруднення під час зберігання.

Потоки персоналу:

Переміщення персоналу здійснюється в межах усіх виробничих приміщень після етапу санітарної підготовки, зокрема отримання чистого спецодягу та засобів індивідуального захисту.

Потоки сировини:

Лабораторне обладнання та нестерильну сировину вносять із загального коридору до приміщення класу С, а саме до зони підготовки обладнання, після чого їх можуть використовувати лише у лабораторному приміщенні. Після дезінфекційної обробки сировину забороняється її направляти до приміщень класу D із подальшим поверненням до зон класу С, що обумовлює односторонній потік сировини між коридором та зоною підготовки обладнання.

Сировина, оброблена відповідно до вимог класу В, направляється до зони 3D-біодруку, зони роботи з клітинами та зони зберігання готової продукції.

Готова продукція направляється до Зони пакування та маркування, у якій проводять нанесення маркувальних етикеток. Запакована та маркована готова продукція може бути повернена до зони зберігання готової продукції, а саме до холодильника (Х-14).

До зони маркування та пакування допускається двосторонній рух між коридором та приміщенням для забезпечення наявності пакувальних матеріалів зі складу.

Відходи, що утворюються під час процесів у приміщеннях класу B та C, направляються у приміщення класу D, а саме у зону знешкодження та переробки відходів, лише в односторонньому напрямку.

Схему компонування приміщень та обладнання наведена у Додатку Д.

8. КВАЛІФІКАЦІЯ УПАКОВКИ ТА СТРОК ПРИДАТНОСТІ

8.1. Фізичні властивості первинної упаковки

Первинна упаковка – блістер, що виготовляється із полівінілхлориду (PVC) або поліпропілену (PP) з алюмінієвим покриттям. Загальний розмір блістера – 40×60×6 мм із заглибленням по центру – 15×20×5 мм (точні параметри для розміщення мембрани та поживного середовища).

Мембрана розміщується у блістері в стерильних умовах, надалі первинна упаковка є герметичною для запобігання контамінації або виливу поживного середовища та стійкою для механічних пошкоджень під час транспортування або зберігання. Рівні краї блістера забезпечують точну посадку мембрани, мінімізуючи ризик механічних пошкоджень.

Товщина матеріалів PVC та PP 0,2–0,5 мм забезпечують оптимальне співвідношення гнучкості до міцності, а також запобігає деформаціям під час маніпуляцій. Місця з'єднання матеріалів обробляються методом термозварювання, що створює щільний і безпечний шов.

Прозорий матеріал (PVC/PP) дозволяє візуально контролювати стан мембрани та середовища без порушення герметичності упаковки. Також матеріали є стійкими до газової та гама- стерилізації.

Первинна упаковка має низьку паропроникність (<0,1 г/м² на добу), зберігаючи властивості поживного середовища шляхом запобігання втрати рідини [93].

Блістер володіє стійкістю до діапазону температур від -10°C до +50°C, таким чином зберігаючи властивості при зберіганні та транспортуванні виробу у межах рекомендованого температурного режиму, а саме від +2°C до +8°C. Також матеріал первинного пакування не деформується при короткотривалому впливі вищих температур (верхня межа – 70°C).

Матеріал є екологічним, оскільки є біологічно інертним та не виділяє токсичних речовин у навколишнє середовище.

Первинна упаковка відповідає стандарту ISO 15378 «Primary packaging materials for medicinal products», ISO 7153 «Packaging materials and systems for medical products», ISO 11607-1 «Packaging for terminally sterilized medical devices – Requirements for materials, sterile barrier systems and packaging systems» [94 – 96].

8.2. Хімічні властивості первинної упаковки

Матеріали є хімічно інертним, а отже, стійким до дії компонентів поживного середовища та не впливає на їх властивості. Первинна упаковка запобігає проникненню вологи ззовні та зберігає стабільність мембрани та середовища.

Матеріал не розчиняється та не виділяє токсичних речовин при контакті з такими рідинами як буферні розчини та поживне середовище описаного складу.

Первинна упаковка має низьку проникність для кисню, вуглекислого газу та вологи, зберігаючи ізольоване середовище для PLGA-мембрани.

У матеріалі відсутні пластифікатори та інші добавки, які здатні виділятись у поживне середовище.

PVC/PP стійкий до УФ-випромінювання, що запобігає його деградації, а також є стійким до окислення [93].

Умови зберігання (+2°C до +8°C, вологість 50-70%) гарантують хімічну стабільність матеріалу та запобігають його деградації чи розкладанню протягом 7 діб.

Первинна упаковка відповідає умовам Сертифікації на біосумісність відповідно до Стандарту ISO 10993.

8.3. Фізичні властивості вторинної упаковки

Картонна коробка з ламінуванням (розміри: 50×70×15 мм із допустимим відхиленням ±0,5 мм) повинна забезпечувати захист первинної упаковки від механічних пошкоджень під час транспортування, зберігання та маніпуляцій. Щільність картону складає 250–350 г/м², що забезпечує оптимальне співвідношення міцності та легкості.

Ламінований шар збільшує жорсткість і запобігає деформації під час навантажень або транспортування. Властивості матеріалу дозволяють захистити первинну упаковку навіть у разі падіння коробки. Ламінований шар на поверхні картону захищає упаковку від впливу вологи, конденсату чи короткочасного намокання та підходить для умов зберігання за відносної вологості 50–70%. Ламінований картон створює додатковий бар'єр від пилу, забруднень та УФ-випромінювання, яке може пошкоджувати вміст.

Вторинна упаковка описаного формату зберігає фізичні властивості в умовах рекомендованого діапазону температур (+2°C до +8°C) та не піддається деформації при короткочасному впливі більш високих або низьких температур.

Картон із ламінованим шаром виготовлений із матеріалів, що дозволяють вторинну переробку. Ламінуючий матеріал нетоксичний і відповідає вимогам безпеки для пакування медичних виробів [97].

Ламінований шар вторинної упаковки забезпечує зручну поверхню для чіткого нанесення маркування, при чому якість друку залишається високою завдяки менш шорсткій поверхні, ніж у неламінованого картону. Ламінований шар також забезпечує стійкість до стирання та механічних пошкоджень нанесених зображень.

Використання картону з ламінуванням незначно збільшує вагу упаковки (приблизно до 15–20 г), але забезпечує більший захист і презентабельність.

Конструкція коробки передбачає зручне відкриття без додаткових інструментів.

8.4. Хімічні властивості вторинної упаковки

Вторинна упаковка виготовлена з високоякісного целюлозного картону, що забезпечує екологічність та хімічну інертність основи. Ламінований шар створений із полімерів на основі поліетилену (PE) або поліпропілену (PP), які не вступають у хімічну взаємодію з продуктами або навколишнім середовищем.

Ламінуючий полімерний шар запобігає проникненню водяної пари та короткочасному впливу рідин, захищаючи картон від розмокання та втрати форми [97].

Матеріал не руйнується під впливом слабких кислот, лугів або розчинів солей. Також ламіноване покриття створює бар’єр для проникнення кисню та інших газів, забезпечуючи додатковий захист первинної упаковки.

Усі матеріали, що використовуються для ламінування та друку відповідають стандартам безпеки, оскільки не містять токсичних сполук, фталатів, важких металів чи інших шкідливих домішок.

Використовувані фарби для маркування та друку на ламінованій поверхні мають високу адгезію і хімічну стійкість [98]. Клеї, що використовуються для з’єднання елементів коробки, не взаємодіють із ламінованим шаром і забезпечують міцне склеювання [99].

Картонна основа є біорозкладною та відповідає вимогам екологічної безпеки. Ламінований шар, хоча й не є біорозкладним, може бути утилізований шляхом вторинної переробки. Також матеріал вторинної упаковки хімічно

інертний до первинної упаковки та її вмісту, що виключає ризик контамінації або зміни властивостей мембрани чи поживного середовища.

Картон із ламінуванням має обмежену вогнестійкість і повільно займається, що є стандартною властивістю для пакувальних матеріалів.

8.5. Робота приладу після старіння у реальному часі/прискорення старіння, умови зберігання

Випробування старіння (реального та прискореного) проводяться для підтвердження збереження функціональних властивостей напівпроникної мембрани гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) після тривалого зберігання у встановлених умовах. Це дозволяє визначити термін придатності приладу та переконатися в його безпечності й ефективності протягом заявленого періоду.

Температурний режим передбачає діапазон від +2°C до +8°C, за вологості повітря 50-70%, що є стандартними значеннями, які забезпечують стабільність мембрани та поживного середовища, виключаючи ризик деградації компонентів.

Прискорене старіння дозволяє оцінити довговічність приладу в коротші терміни, створюючи еквівалент реального часу. Відповідно до правила Q10, для кожного збільшення температури на 10°C процес старіння пришвидшується у 2 рази.

Після завершення циклів реального та прискореного старіння оцінюються наступні характеристики:

- фізичний стан мембрани;
- проникність мембрани;
- бар’єрні функції;
- стерильність;
- склад поживного середовища.

Після випробувань продукт вважається придатним, якщо:

• Збережені всі критичні функціональні та фізико-хімічні властивості мембрани.

• Продукт відповідає заявленим вимогам навіть після старіння, що еквівалентне терміну придатності.

• Первинна та вторинна упаковки зберегли свої захисні властивості.

Контрольними вимогами є дотримання стандартів ISO 11607-1 та ISO 11607-2 щодо упаковки медичних виробів, а також використання лабораторного обладнання, каліброваного згідно з ISO 17025.

8.6. Тестування на цілісність

Метою тестування на цілісність є підтвердження герметичності та механічної стійкості упаковки напівпроникної мембрани гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) як під час транспортування, так і під час зберігання у встановлених умовах. Це також включає перевірку на відсутність мікропошкоджень, які можуть вплинути на стерильність та функціональні властивості продукту.

Об’єктами тестування є первинна та вторинна упаковки.

Тест на герметичність первинної упаковки

У ході тестування методом виявлення витоків (bubble test), блістер занурюють у воду, після чого в нього вводять повітря під тиском. Виявлення бульбашок протягом встановленого часу свідчить про наявність витоків.

Метод підвищеного тиску – створення підвищеного тиску всередині упаковки та контроль його стабільності. Критерієм прийнятності є відсутність втрати тиску.

Тестування міцності швів блістера

Проводять механічне випробування на розрив міцності шва блістера, при чому мінімальна міцність шва повинна відповідати стандарту ISO 11607-1 [34].

Тест на проникнення барвника

Упаковку заповнюють барвником, після чого спостерігають наявність його витоку через шви та поверхню. Відсутність проникнень барвника свідчить про відсутність мікропошкоджень.

Тест на механічну стійкість вторинної упаковки

Тест на падіння проводять, піддаючи вторинну упаковку з первинною упаковкою всередині визначеній кількості падінь з різної висоти, відповідно до стандартів ISO 2248. Критерій прийнятності – відсутність видимих пошкоджень, що можуть вплинути на цілісність первинної упаковки [100].

Тест на стискання – упаковку розміщують між двома поверхнями, які створюють контрольоване зусилля стиснення, при чому коробка має зберегти свою форму та захисні властивості.

Результати тестування

Упаковки вважають цілісними за наступних умов:

- Відсутні витоки та мікропошкодження в первинній упаковці;
- Вторинна упаковка захищає вміст від механічних пошкоджень під час імітації транспортування;
- Герметичність зберігається у встановлених умовах зберігання та транспортування.

Тестування проводять відповідно до стандартів:

- ISO 11607-1: Вимоги до пакування для стерильних медичних виробів.
- ASTM F2096: Виявлення мікропошкоджень у гнучкій упаковці.
- ASTM D4169: Випробування транспортування для оцінки стійкості до механічного впливу

8.7. Мікробіологічні характеристики

Первинна упаковка

Стерильність первинної упаковки

- Упаковка відповідає стандарту ISO 11737-2, що визначає рівень мікробіологічного забруднення.
- Інфекційна безпека забезпечується стерилізацією перед запаковуванням мембрани.

Мікробіологічний контроль

Підтвердження стерильності шляхом проведення тестів на стерильність за методами, визначеними в ДФУ, Ph Eur., USP.

Індекс стерильності SAL (Sterility Assurance Level): не більше ніж 1 живий мікроорганізм на 1 мільйон одиниць (10^{-6}).

Бар'єрні властивості первинної упаковки

Матеріали первинної упаковки є хімічно інертними, тож забезпечують стійкість до проникнення мікроорганізмів та зберігають поживне середовище стерильним. Шви та матеріал упаковки перевіряються на герметичність.

Вторинна упаковка

Захисна функція вторинної упаковки

Мікробіологічний бар’єр є цілісним завдяки ламінованому покриттю картону, що запобігає накопичення пилу та мікроорганізмів на поверхні упаковки. Матеріал упаковки піддається очищенню та відповідає стандарту ISO 15378, що стосується матеріалів первинної та вторинної упаковки для фармацевтичних виробів.

Мінімізація ризику контамінації

Вторинна упаковка захищає блістер від контакту з навколишнім середовищем, частинками пилу, мікроорганізмами на поверхнях та у повітрі.

Упаковка забезпечує додаткову герметизацію завдяки правильно підібраним клеям та системам закривання/закупорювання.

Контроль санітарно-гігієнічного стану

Вторинна упаковка виготовляється в чистих приміщеннях, контроль над якими регулюється засадами належної виробничої практики.

8.8. Хімічна сумісність з частинами виробу

Первинна упаковка

Первинна упаковка для напівпроникної PLGA-мембрани виготовляється з полімерних матеріалів, які зазвичай використовуються для таблеткових блістерів. Упаковка забезпечує ізоляцію мембрани та поживного середовища від зовнішнього середовища, зберігаючи їх фізико-хімічні властивості.

Матеріал упаковки хімічно інертний до PLGA-мембрани, з якої виготовлено виріб. Це унеможливлює деградацію або хімічні реакції, які могли б вплинути на функціональні характеристики мембрани.

Полівінілхлорид (PVC) використовується для основи блістера, забезпечує стійкість до вологи та бар’єрну функцію, є хімічно інертним до PLGA та компонентів поживного середовища. Також даний матеріал відповідає вимогам стандартів ISO 10993 для біологічної безпеки медичних матеріалів.

Алюмінієва фольга використовується для герметизації блістера, забезпечує захист від газів, світла та вологи. Покриття має інертну поверхню, що також унеможливлює виникнення реакцій із компонентами виробу.

Для перевірки хімічної сумісності первинної упаковки з виробом та ПС проводять наступні тести:

- Екстракційний тест (оцінка можливості міграції таких компонентів упаковки як мономери, пластифікатори тощо), у ході якого результат має відображати відсутність виділення упаковкою летких органічних сполук та/або токсичних речовин;
- Тест на взаємодію (перевірка можливості виникнення хімічних реакцій між складовими), результатом якого є встановлення факту збереження властивостей упаковки, складу та стабільності PLGA-мембрани та ПС;
- Тест на зміну рівня pH (контроль зміни рівня pH після тривалого контакту виробу з первинним пакуванням), при якому максимально допустимим відхиленням від початкового рівня є значення ±0,1, що демонструє відсутність суттєвої хімічної взаємодії

Також контролюють хімічну стабільність у реальних умовах зберігання за температурного режиму від +2°C до +8°C протягом гарантованого терміну зберігання 7 діб. Поживне середовище має залишатись залишається стерильним і хімічно незмінним, що відображає його ефективність у підтриманні життєздатності мембрани.

Вторинна упаковка

Вторинна упаковка виконана з ламінованого картону, що забезпечує механічний захист первинної упаковки та можливість нанесення інформаційного маркування. Ламіноване покриття додає упаковці додаткових хімічно стійких властивостей, які захищають її від зовнішніх впливів.

Картон високої щільності (250–300 г/м²) є основним структурним матеріалом коробки, має низький рівень газо- та водопроникності, не виділяє летких органічних сполук.

Поліпропіленова (PP) або поліефірна (PET) ламінована плівка наноситься на поверхню картону, забезпечуючи захист від впливу вологи, забруднень та

хімічних реагентів, а також стійкість до зношування та подряпин, що важливо для підтримання чіткості маркування.

Друкарські фарби, що використовують для нанесення маркування не містять важких металів та токсичних сполук, що підтверджується відповідністю стандарту ISO 10993-18.

Проведення тестів підтверджують, що картон та ламіноване покриття не виділяють речовин, які могли б проникати через первинну упаковку та змінювати склад поживного середовища або впливати на виріб. Ламінована поверхня не реагує з кислотними чи лужними середовищами, які можуть випадково потрапити на упаковку під час транспортування чи зберігання.

Фарби, нанесені на упаковку, є хімічно стійкими та не впливають на інертність матеріалів.

Для оцінки хімічної сумісності вторинної упаковки проводять наступні тести:

- Стійкість до хімічних речовин (очищувальні засоби, органічні розчинники), результатом чого є збереження структури упаковки та її хімічної інертності;
- Тест на зміну рівня pH (оцінка стабільності складу вмісту при контракті із вторинним пакуванням)

9. СТЕРИЛІЗАЦІЯ

9.1. Стерилізація PLGA-мембрани ГЕБ та поживного середовища

Готова PLGA-мембрана ГЕБ містить живі клітини (ендотеліальні клітини та нейрони мишей), тому зовнішні методи стерилізації (газова стерилізація, автоклавування, гамма-опромінення) є неприйнятними, оскільки вони негативно впливають на життєздатність та функціональність клітин.

З огляду на дані параметри, виготовлення мембрани PLGA та нанесення біочорнил із ендотеліальними клітинами здійснюється у ламінарному боксі з класом чистоти А, що розміщують в зоні класу чистоти Б відповідно до стандартів GMP. Контроль чистоти повітря здійснюється регулярним тестуванням на частинки та мікроорганізми.

Шар з нейронів мишей додають у стерильних умовах у ламінарному боксі класу II відповідно до стандартів ISO 14644. Усі операції виконуються персоналом у стерильному одязі, який відповідає класу чистоти [22].

Поживне середовище стерилізують методом фільтрації, оскільки до його складу входять термолабільні компоненти, які можуть зазнати деградації при стерилізації іншими методами. Поживне середовище пропускають через мембранні фільтри з розміром пор 0,22 мкм, які затримують мікроорганізми. Фільтрацію виконують під ламінарним потоком у стерильному боксі. Відфільтроване середовище розливають у герметичні контейнери.

Перевірку поживного середовища на стерильність проводять методом інкубації в умовах, що відповідають фізіологічним – 37°C протягом 14 діб.

Для перевірки середовища для ендотеліальних клітин на стерильність використовують трипсин-соєвий бульйон (TSB), оскільки він забезпечує оптимальні умови для росту широкого спектра бактерій, грибів і дріжджів. Також білковий склад бульйону сумісний із компонентами поживного середовища.

Для контролю стерильності ПС для нейронів мишей використовують декстрозний бульйон Сабуро-2%. Субстрат спеціально розроблений для культивування грибів та дріжджів, які частіше контамінують середовища з нейронними компонентами. Бульйон Сабуро містить глюкозу й пептони, що підтримують ріст мікроорганізмів, навіть якщо поживне середовище має низький рівень білків [101].

Якщо є підозра на специфічні контамінації (наприклад, анаеробні бактерії), варто використовувати середовища для анаеробного росту, наприклад, тіогліколевий бульйон.

Усі додаткові матеріали (інструменти, пінцети, ємності) стерилізують в автоклаві або методом сухого жару перед використанням.

9.2. Контроль стерильності готового виробу

Для тестування напівпроникної PLGA-мембрани ГЕБ відбирають готові вироби (5% партії або мінімум 10 одиниць) у ламінарному боксі. Зразки інкубують протягом 14 діб при 37°C. Критерієм прийнятності є відсутність росту мікроорганізмів.

Регулярно проводять тестування на кількість часток та мікроорганізмів у зоні класу Б.

Регулярно проводять валідацію всіх етапів процесу виробництва на відповідність стандартам ISO 13485 (системи управління якістю медичних виробів).

Інформація про стерильність зазначається на первинному та вторинному пакуванні готового приладу символом 

.

9.3. Документування процесу стерилізації

Дані про всі етапи роботи в зоні класу Б та ламінарному боксі вносять до протоколів стерильного виробництва. Також вносять результати перевірки готового виробу та компонентів (поживного середовища) на стерильність в протокол тестування стерильності. Проводять регулярну перевірку зон чистоти та процедур стерильного виробництва.

9.4. Алгоритм дій при виявленні контамінації

9.4.1. Контамінація в напівпроникній PLGA-мембрані ГЕБ

При виявленні контамінації в готовому виробі, слід дотримуватись наступних рекомендацій:

Етап 1. Ізоляція контамінованих виробів

1. Негайно припинити використання партії, у якій виявлено контамінацію.
2. Відокремити всі контаміновані одиниці.
3. Перевірити записи про виробництво для визначення ймовірності контамінації всієї партії.

Етап 2. Повторне тестування партії

1. Відібрати додаткові зразки з партії для повторного тесту на стерильність.
2. Використовувати методи інкубації протягом 14 діб та/або мікроскопічного аналізу для виявлення мікроорганізмів.

Етап 3. Вилучення партії

1. Якщо підтверджено контамінацію, вилучити з обігу всю партію.
2. Оформити акт вилучення із зазначенням кількості вилучених виробів.

Етап 4. Аналіз причин контамінації

1. Провести перевірку пунктів:

- Стерильність зони класу Б та ламінарного боксу
- Герметичність первинної та вторинної упаковки
- Відповідність стерильності інструментів і витратних матеріалів
- Перевірити стерильність поживних середовищ

2. Встановити джерело контамінації

Етап 5. Коригувальні дії

1. Очистити та продезінфікувати зони
2. Повторно простерилізувати інструменти та матеріали
3. Провести додаткове навчання персоналу щодо роботи в стерильних умовах

Етап 6. Документування інциденту

1. Оформити звіт про контамінацію, включаючи інформацію про виявлені проблеми, результати повторних тестувань та заходи, вжиті для усунення причин.
2. Долучити звіт до системи управління якістю відповідно до стандарту ISO 13485.

9.4.2. Контамінація в поживному середовищі

Етап 1. Ізоляція середовища

1. Вилучити усі ємності з поживним середовищем, яке могло бути контаміноване.
2. Забезпечити належне маркування («Підозра на контамінацію»).

Етап 2. Аналіз середовища

1. Провести аналіз середовища на стерильність

- Інкубація у TSB або SDB при 37°C (бактерії) та 25°C (гриби).

- Тестування на специфічні мікроорганізми (наприклад, *Pseudomonas, Bacillus, Candida*).

2. Виконати хімічний аналіз (HPLC або ІЧ-спектрофотометрія) для перевірки деградації компонентів середовища.

Етап 3. Вилучення партії

1. У разі підтвердження контамінації вилучити з обігу всю партію середовища.

2. Провести ідентифікацію мікроорганізмів для визначення джерела мікробіологічного забруднення.

Етап 4. Аналіз причин контамінації

Перевірити:

- Стан фільтрів 0.22 мкм, які використовуються для стерилізації середовища.
- Стерильність контейнерів, у які розливають середовище.
- Умови роботи персоналу та відповідність стерильним процедурам.

Етап 5. Коригувальні дії

1. Замінити фільтри 0.22 мкм на нові та провести валідацію їх роботи.

2. Провести додаткове навчання персоналу щодо процедур фільтрації.

3. Перевірити та скорегувати умови зберігання середовища.

Етап 6. Документування інциденту

1. Оформити звіт, який включає:

- Номер партії середовища.
- Результати тестування.
- Причини контамінації та заходи для їх усунення.

2. Додати звіт до документації щодо управління ризиками (ISO 14971).

Задля уникнення повторної контамінації забезпечують регулярне тестування чистоти повітря, поверхонь та інструментів, використання валідованих фільтрів для стерилізації середовищ. Також проводять повторні регулярні навчання персоналу та забезпечують чітке документування всіх процедур виробництва та контролю.

ВИСНОВКИ

У магістерській дисертації "Розробка технічного файлу на напівпроникну мембрану гематоенцефалічного бар’єру методом 3D-біодруку для *in vitro* досліджень" виконано комплексний аналіз, спрямований на досягнення поставлених цілей і вирішення визначених завдань. Основні результати роботи наведені нижче:

1. Розроблено технологічний процес виготовлення напівпроникної мембрани гематоенцефалічного бар’єру. Технологія включає етапи підготовки матеріалів, друку PLGA-основи, нанесення шарів біочорнил з ендотеліальними клітинами, інкубації та подальшого нанесення нейронів мишей. Оптимізовано параметри 3D-друку, що дозволяють створити мембрану з необхідними фізико-хімічними та функціональними характеристиками.
2. Визначено основні параметри мембрани: її товщина становить 5 ± 0,2 мм, розмір пор — 10–50 мкм із загальною пористістю 40–60%, що забезпечує напівпроникність, аналогічну природному ГЕБ. Досліджено механічні властивості мембрани, які демонструють достатню стійкість до маніпуляцій під час тестування та транспортування.
3. Розроблено структуру технічного файлу, яка включає всі необхідні розділи згідно з вимогами ISO 13485. Документація охоплює опис виробу, специфікації матеріалів, аналіз ризиків, методики тестування, результати біологічних та фізико-хімічних випробувань, а також інструкцію з використання виробу.
4. Складено алгоритм проведення доклінічного тестування мембрани на біосумісність із ендотеліальними клітинами та нейронами мишей згідно з ISO 10993-5. Тести показують відсутність цитотоксичних ефектів, високу адгезію клітин до поверхні мембрани та стабільну проліферацію клітин у складі структури. Мембрана забезпечує життєздатність клітин і зберігає їх функціональність протягом експериментального періоду.

5. Розроблено інструкцію, яка детально описує підготовку мембрани до використання, умови культивування клітин, рекомендації щодо тестування проникності лікарських засобів та необхідні заходи безпеки. Інструкція включає умови зберігання мембрани та поживного середовища, а також методи уникнення контамінації під час роботи.

6. Було підготовлено проєкт Декларації про відповідність, який включає всі необхідні дані відповідно до вимог Регламенту (EU) 2017/746. У документі зазначено відповідність виробу стандартам ISO 13485, ISO 10993, ISO 14971, а також вимогам до *in vitro* діагностичних медичних виробів.

Отримані результати підтверджують ефективність запропонованих рішень для створення функціональної напівпроникної мембрани гематоенцефалічного бар’єру. Виріб може бути використаний як інноваційний інструмент для тестування лікарських засобів та вивчення механізмів транспорту речовин через гематоенцефалічний бар’єр.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015 Jan 5;7(1):a020412. doi: 10.1101/cshperspect.a020412. PMID: 25561720; PMCID: PMC4292164.
2. Banks WA. From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. Nat Rev Drug Discov. 2016 Apr;15(4):275-92. doi: 10.1038/nrd.2015.21. Epub 2016 Jan 22. PMID: 26794270.
3. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. Nat Rev Neurol. 2018 Mar;14(3):133-150. doi: 10.1038/nrneurol.2017.188. Epub 2018 Jan 29. PMID: 29377008; PMCID: PMC5829048.
4. Pollak TA, Drndarski S, Stone JM, David AS, McGuire P, Abbott NJ. The blood-brain barrier in psychosis. Lancet Psychiatry. 2018 Jan;5(1):79-92. doi: 10.1016/S2215-0366(17)30293-6. Epub 2017 Aug 3. PMID: 28781208.
5. Abbott NJ, Khan EU, Rollinson CM, Reichel A, Janigro D, Dombrowski SM, Dobbie MS, Begley DJ. 2002. Drug resistance in epilepsy: The role of the blood–brain barrier. Novartis Found Symp 243: 38–47; discussion 47–53, 180–185.
6. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes: Strasbourg, 18 March 1986. London : H.M.S.O., 1986. – 44 p
7. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. 2006. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. Nat Rev Neurosci 7: 41–53.
8. Wei Wei et al, 3D *In vitro* Blood-Brain-Barrier Model for Investigating Barrier Insults, Advanced Science (2023). DOI: 10.1002/advs.202205752
9. ISO 13485:2016. Medical devices – Quality management systems – Requirements for regulatory purposes. – Geneva: International Organization for Standardization, 2016. – 46 p.

10. Регламент (EU) 2017/746 Європейського парламенту та Ради від 5 квітня 2017 року щодо *in vitro* діагностичних медичних виробів (IVDR). – Офіційний вісник ЄС, L 117, 05.05.2017. – С. 176–332.
11. Постанова від Кабінету Міністрів України від 02.10.2013 №753. Про затвердження Технічного регламенту щодо медичних виробів. – Київ: Кабінет Міністрів України, 2013. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/753-2013-п (дата звернення: 02.12.2024 р.).
12. Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. Biomaterials. 2000 Dec;21(23):2475-90. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00115-0. PMID: 11055295.
13. Lü JM, Wang X, Marin-Muller C, Wang H, Lin PH, Yao Q, Chen C. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. Expert Rev Mol Diagn. 2009 May;9(4):325-41. doi: 10.1586/erm.09.15. PMID: 19435455; PMCID: PMC2701163.
14. Takata F, Nakagawa S, Matsumoto J, Dohgu S. Blood-Brain Barrier Dysfunction Amplifies the Development of Neuroinflammation: Understanding of Cellular Events in Brain Microvascular Endothelial Cells for Prevention and Treatment of BBB Dysfunction. Front Cell Neurosci. 2021 Sep 13;15:661838. doi: 10.3389/fncel.2021.661838. PMID: 34588955; PMCID: PMC8475767.
15. Najjar S, Pahlajani S, De Sanctis V, Stern JNH, Najjar A, Chong D. Neurovascular Unit Dysfunction and Blood-Brain Barrier Hyperpermeability Contribute to Schizophrenia Neurobiology: A Theoretical Integration of Clinical and Experimental Evidence. Front Psychiatry. 2017 May 23;8:83. doi: 10.3389/fpsyt.2017.00083. PMID: 28588507; PMCID: PMC5440518.
16. ISO 14971:2019. Medical devices – Application of risk management to medical devices**.** – Geneva: International Organization for Standardization, 2019. – 44 p.

17. ISO 10993:2018. Biological evaluation of medical devices**.** – Geneva: International Organization for Standardization, 2018. – 24 p.
18. ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. – Geneva: International Organization for Standardization, 2009. – 24 p.
19. ISO 10993-13:2010. Biological evaluation of medical devices. Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymers. – Geneva: International Organization for Standardization, 2010. – 16 p.
20. ISO 10993-18:2020. Biological evaluation of medical devices. Part 18: Chemical characterization of materials. – Geneva: International Organization for Standardization, 2020. – 40 p.
21. ISO 11737-2:2009. Sterilization of medical devices — Microbiological methods — Part 2: Tests of sterility performed in the definition, validation and maintenance of a sterilization process. – Geneva: International Organization for Standardization, 2009. – 24 p.
22. ISO 14644-1:2015. Cleanrooms and associated controlled environments. Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration. – Geneva: International Organization for Standardization, 2015. – 28 p.
23. ISO 15189:2015. Medical laboratories – Requirements for quality and competence. – Geneva: International Organization for Standardization, 2015. – 34 p.
24. ДСТУ EN ISO 178:2019. Пластмаси. Визначення властивостей у разі згинання (EN ISO 178:2019, IDT). – Київ: ДП «УкрНДНЦ», 2019. – 24 с.
25. ДСТУ EN ISO 11357-6:2022. Пластмаси. Диференціальна термічна аналіз (DTA) та диференціальна скануюча калориметрія (DSC). Частина 6. Визначення параметрів переходу. – Київ: ДП «УкрНДНЦ», 2022. – 16 с.
26. ДСТУ EN ISO 10993-18:2022. Хімічна характеристика матеріалів медичних виробів у процесі управління ризиками (EN ISO 10993-18:2022, IDT). – Київ: ДП «УкрНДНЦ», 2022. – 32 с.

27. ЄФ 2.2.3 «Determination of pH» Європейський фармакопейний стандарт. –Strasbourg: Council of Europe, 2017. – 10 p.
28. ЄФ 2.2.44 «Total Organic Carbon» Європейський фармакопейний стандарт. – Strasbourg: Council of Europe, 2017. – 12 p.
29. ЄФ 2.6.1 «Sterility» Європейський фармакопейний стандарт. – Strasbourg: Council of Europe, 2017. – 18 p.
30. ЄФ 2.2.29 «Liquid Chromatography» Європейський фармакопейний стандарт. – Strasbourg: Council of Europe, 2017. – 22 p.
31. ЄФ 2.2.25 «Absorption Spectrophotometry, UV-Visible» Європейський фармакопейний стандарт. – Strasbourg: Council of Europe, 2017. – 16 p.
32. ЄФ 3.1.5 «Materials Based on Poly (lactic acid) (PLA) and Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA)» Європейський фармакопейний стандарт. – Strasbourg: Council of Europe, 2017. – 14 p.
33. ДСТУ EN ISO 15223-1:2018. Вироби медичні. Символи, застосовані під час маркування на медичних виробах, етикетках та в супровідній документації. Загальні вимоги (EN ISO 15223-1:2016, IDT). – Київ: ДП «УкрНДНЦ», 2018. – 20 с.
34. ДСТУ EN ISO 11607-1:2019 «Вироби медичні простерилізовані. Пакування. Основні вимоги до матеріалів, стерильних бар`єрних і пакувальних систем»
35. ДСТУ EN ISO 11607-2:2015 «Вироби медичні простерилізовані. Пакування. Валідаційні вимоги»
36. Технічний регламент щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затверджений постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013 № 754 Регламент (EU) 2017/746 (IVDR): Процедура оцінки відповідності
37. ISO 14644-1:2015. Cleanrooms and associated controlled environments. Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration. – Geneva: International Organization for Standardization, 2015. – 28 p.

38. Наказ МОЗ України № 434 від 15.05.2012 «Про затвердження Правил належної виробничої практики для медичних виробів». – Київ: Міністерство охорони здоров'я України, 2012. – 40 с.
39. ДСТУ EN ISO 14971:2015. Вироби медичні. Управління ризиками для медичних виробів. – Київ: ДП «УкрНДНЦ», 2015. – 32 с.
40. ISO 128-1:2020. Technical product documentation (TPD) — General principles of representation. Part 1: Introduction and fundamental requirements**.** – Geneva: International Organization for Standardization, 2020. – 48 p.
41. ISO 216:2007. Writing paper and certain classes of printed matter — Trimmed sizes — A and B series, and indications of machine direction. – Geneva: International Organization for Standardization, 2007. – 12 p.
42. ISO 128-50:2007. Technical drawings — General principles of presentation — Part 50: Hatching**.** – Geneva: International Organization for Standardization, 2007. – 24 p.
43. Yan B, Hua Y, Wang J, Shao T, Wang S, Gao X, Gao J. Surface Modification Progress for PLGA-Based Cell Scaffolds. Polymers (Basel). 2024 Jan 4;16(1):165. doi: 10.3390/polym16010165. PMID: 38201830; PMCID: PMC10780542.
44. Firouzi Amandi A, Shahrtash SA, Kalavi S, Moliani A, Mousazadeh H, Rezai Seghin Sara M, Dadashpour M. Fabrication and characterization of metformin-loaded PLGA/Collagen nanofibers for modulation of macrophage polarization for tissue engineering and regenerative medicine. BMC Biotechnol. 2023 Dec 19;23(1):55. doi: 10.1186/s12896-023-00825-2. PMID: 38115008; PMCID: PMC10731790.
45. Lu Y, Cheng D, Niu B, Wang X, Wu X, Wang A. Properties of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) and Progress of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)-Based Biodegradable Materials in Biomedical Research. Pharmaceuticals (Basel). 2023 Mar 17;16(3):454. doi: 10.3390/ph16030454. PMID: 36986553; PMCID: PMC10058621.

46. Miller K, Joldes GR, Bourantas G, Warfield SK, Hyde DE, Kikinis R, Wittek A. Biomechanical modeling and computer simulation of the brain during neurosurgery. Int J Numer Method Biomed Eng. 2019 Oct;35(10):e3250. doi: 10.1002/cnm.3250. Epub 2019 Sep 5. PMID: 31400252; PMCID: PMC6785376.

47. Wu A, Lee D, Xiong WC. Lactate Metabolism, Signaling, and Function in Brain Development, Synaptic Plasticity, Angiogenesis, and Neurodegenerative Diseases. Int J Mol Sci. 2023 Aug 29;24(17):13398. doi: 10.3390/ijms241713398. PMID: 37686202; PMCID: PMC10487923.

48. Kawamoto EM, Vivar C, Camandola S. Physiology and pathology of calcium signaling in the brain. Front Pharmacol. 2012 Apr 13;3:61. doi: 10.3389/fphar.2012.00061. PMID: 22518105; PMCID: PMC3325487.

49. Hillmer L, Erhardt EB, Caprihan A, Adair JC, Knoefel JE, Prestopnik J, Thompson J, Hobson S, Rosenberg GA. Blood-brain barrier disruption measured by albumin index correlates with inflammatory fluid biomarkers. J Cereb Blood Flow Metab. 2023 May;43(5):712-721. doi: 10.1177/0271678X221146127. Epub 2022 Dec 15. PMID: 36522849; PMCID: PMC10108191.

50. Tuominen M, Leppäluoto J. Peptides and neurotransmission in the central nervous system. Med Biol. 1987;65(2-3):137-42. PMID: 2821329.

51. Panebianco M, Bresnahan R, Marson AG. Lamotrigine add-on therapy for drug-resistant focal epilepsy. Cochrane Database Syst Rev. 2023 Dec 11;12(12):CD001909. doi: 10.1002/14651858.CD001909.pub4. PMID: 38078494; PMCID: PMC10712213.

52. Hashimoto Y, Kotake K, Watanabe N, Fujiwara T, Sakamoto S. Lamotrigine in the maintenance treatment of bipolar disorder. Cochrane Database Syst Rev. 2021 Sep 15;9(9):CD013575. doi: 10.1002/14651858.CD013575.pub2. PMID: 34523118; PMCID: PMC8440301.

53. Pahwa M, Nuñez NA, Joseph B, Seshadri A, Gerberi DJ, Frye MA, Singh B. Efficacy and Tolerability of Lamotrigine in Borderline Personality Disorder:

A Systematic Review and Meta-Analysis. Psychopharmacol Bull. 2020 Sep 14;50(4):118-136. PMID: 33012875; PMCID: PMC7511148.

54. LeWitt PA. Levodopa therapy for Parkinson's disease: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. Mov Disord. 2015 Jan;30(1):64-72. doi: 10.1002/mds.26082. Epub 2014 Dec 1. PMID: 25449210.
55. Won E, Kim YK. An Oldie but Goodie: Lithium in the Treatment of Bipolar Disorder through Neuroprotective and Neurotrophic Mechanisms. Int J Mol Sci. 2017 Dec 11;18(12):2679. doi: 10.3390/ijms18122679. PMID: 29232923; PMCID: PMC5751281.
56. Rakofsky JJ, Lucido MJ, Dunlop BW. Lithium in the treatment of acute bipolar depression: A systematic review and meta-analysis. J Affect Disord. 2022 Jul 1;308:268-280. doi: 10.1016/j.jad.2022.04.058. Epub 2022 Apr 13. PMID: 35429528.
57. Terao I, Tsuge T, Endo K, Kodama W. Comparative efficacy, tolerability and acceptability of intravenous racemic ketamine with intranasal esketamine, aripiprazole and lithium as augmentative treatments for treatment-resistant unipolar depression: A systematic review and network meta-analysis. J Affect Disord. 2024 Feb 1;346:49-56. doi: 10.1016/j.jad.2023.11.023. Epub 2023 Nov 8. PMID: 37949235.
58. Nau R, Sörgel F, Eiffert H. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. Clin Microbiol Rev. 2010 Oct;23(4):858-83. doi: 10.1128/CMR.00007-10. PMID: 20930076; PMCID: PMC2952976.
59. ISO 11737-2:2009. Sterilization of medical devices — Microbiological methods — Part 2: Tests of sterility performed in the definition, validation and maintenance of a sterilization process. – Geneva: International Organization for Standardization, 2009. – 24 p.
60. Singh S, Singha P. Effect of Modifications in Poly (Lactide-co-Glycolide) (PLGA) on Drug Release and Degradation Characteristics: A Mini Review.

Curr Drug Deliv. 2021;18(10):1378-1390. doi: 10.2174/1567201818666210510165938. PMID: 33970845.

61. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 702, Ethanol. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol. Accessed Dec. 2, 2024.
62. Rocha CV, Gonçalves V, da Silva MC, Bañobre-López M, Gallo J. PLGA-Based Composites for Various Biomedical Applications. Int J Mol Sci. 2022 Feb 12;23(4):2034. doi: 10.3390/ijms23042034. PMID: 35216149; PMCID: PMC8876940.
63. J Axel Zeitler, Philip F Taday, David A Newnham, Michael Pepper, Keith C Gordon, Thomas Rades, Terahertz pulsed spectroscopy and imaging in the pharmaceutical setting - a review, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Volume 59, Issue 2, February 2007, Pages 209–223,
64. Simão VA, Evangelista-Ribeiro CP, Brand H, Lagass-Pereira L, Marques LF, Benites-Aoki PH, Nunes da Silveira-Antunes R, Tonso A, Ribeiro-Paes JT. Metabolic and proliferation evaluation of human adipose-derived mesenchymal stromal cells (ASC) in different culture medium volumes: standardization of static culture. Biologicals. 2019 Nov;62:93-101. doi: 10.1016/j.biologicals.2019.08.006. Epub 2019 Sep 6. PMID: 31495708.
65. Moldoveanu SC. Comparison of several HPLC methods for the analysis of vitamin C. Biomed Chromatogr. 2024 Jan;38(1):e5753. doi: 10.1002/bmc.5753. Epub 2023 Sep 26. PMID: 37750455.
66. Fontannaz, P., Kilinc, T. and Heudi, O. (2006) HPLC-UV Determination of Total Vitamin C in a Wide Range of Fortified Food Products. Food Chemistry, 94, 626-631. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.012
67. Hortelano I, Moreno Y, Vesga FJ, Ferrús MA. Evaluation of different culture media for detection and quantification of H. pylori in environmental and clinical samples. Int Microbiol. 2020 Nov;23(4):481-487. doi: 10.1007/s10123-020-00135-z. Epub 2020 Jun 30. PMID: 32607781.

68. ISO 10993-4:2017. Biological evaluation of medical devices. Part 4: Selection of tests for interactions with blood. – Geneva: International Organization for Standardization, 2017. – 34 p.
69. ISO 10993-6:2016. Biological evaluation of medical devices. Part 6: Tests for local effects after implantation. – Geneva: International Organization for Standardization, 2016. – 36 p.
70. ISO 11737-2:2009. Sterilization of medical devices — Microbiological methods — Part 2: Tests of sterility performed in the definition, validation and maintenance of a sterilization process. – Geneva: International Organization for Standardization, 2009. – 24 p.
71. Ph. Eur. 10.0. European Pharmacopoeia. 10th Edition. – Strasbourg: Council of Europe, 2019. – 4194 p.
72. ДФУ. Державний фармакопейний уніфікований стандарт. – Київ: Державний фармакопейний центр України, 2020. – 320 с.
73. Gejl M, Brock B, Egefjord L, Vang K, Rungby J, Gjedde A. Blood-Brain Glucose Transfer in Alzheimer's disease: Effect of GLP-1 Analog Treatment. Sci Rep. 2017 Dec 13;7(1):17490. doi: 10.1038/s41598-017-17718-y. PMID: 29235507; PMCID: PMC5727512.
74. Betz AL, Keep RF, Beer ME, Ren XD. Blood-brain barrier permeability and brain concentration of sodium, potassium, and chloride during focal ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 1994 Jan;14(1):29-37. doi: 10.1038/jcbfm.1994.5. PMID: 8263055.
75. Hatashita S, Hoff JT, Salamat SM. Ischemic brain edema and the osmotic gradient between blood and brain. J Cereb Blood Flow Metab. 1988 Aug;8(4):552-9. doi: 10.1038/jcbfm.1988.96. PMID: 3392116.
76. Ahishali B, Kaya M. Evaluation of Blood-Brain Barrier Integrity Using Vascular Permeability Markers: Evans Blue, Sodium Fluorescein, Albumin-Alexa Fluor Conjugates, and Horseradish Peroxidase. Methods Mol Biol. 2021;2367:87-103. doi: 10.1007/7651_2020_316. PMID: 32785841.

77. Toll SJ, Qiu F, Huang Y, Habgood MD, Dziegielewska KM, Nie S, Saunders NR. Entry of antiepileptic drugs (valproate and lamotrigine) into the developing rat brain. F1000Res. 2021 May 13;10:384. doi: 10.12688/f1000research.52607.2. PMID: 34249340; PMCID: PMC8207807.
78. ДСТУ EN 980:2007. Символи для маркування медичних виробів (EN 980:2003, IDT). – Київ: Держспоживстандарт України, 2008. – 26 с.
79. Про затвердження Порядку проведення медичних оглядів працівників певних категорій [Електронний ресурс] : Наказ МОЗ України від 21.05.2007 р. № 246 : станом на 23 берез. 2012 р. – Режим доступу: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0846-07#
80. Про затвердження Документів з питань забезпечення якості лікарських засобів. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика» : Наказ МОЗ України від 24.12.2020 р. № 3019 : станом на 24 груд. 2020 р.
81. Макогін О. О. Технологія виробництва біомаси грибів Trametes pubescens. Дільниця біосинтезу [Електронний ресурс] : Дипломний проєкт / Макогін Ольга Олександрівна. – Київ, 2020. – 79 с. – Режим доступу: https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/41488/1/Makohin_bakalavr.pdf
82. Про затвердження Методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів. Наказ МОЗ України від 14.12.2001 р. № 507 : станом на 24 квіт. 2015 р. – Режим доступу: https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0502282-01#Text
83. Таблиця класифікації повітряних фільтрів. [Електронний ресурс] // ENVIRCO. – Режим доступу: https://envirco.in.ua/filterklass.html
84. Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами. Наказ МОЗ України від 08.06.2015 № 325 – Режим доступу: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0959-15#Text

85. Sun, M.; Sun, X.; Wang, Z.; Guo, S.; Yu, G.; Yang, H. Synthesis and Properties of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels and Their Recent Applications in Load-Bearing Tissue. *Polymers* 2018, *10*, 1290. https://doi.org/10.3390/polym10111290
86. Wu XS, Wang N. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: biodegradation. J Biomater Sci Polym Ed. 2001;12(1):21-34. doi: 10.1163/156856201744425. PMID: 11334187.
87. Wang N, Wu XS. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid oligomers: Part II. Biodegradation and drug delivery application. J Biomater Sci Polym Ed. 1997;9(1):75-87. doi: 10.1163/156856297x00272. PMID: 9505204.
88. Grafting of 3D Bioprinting to *In vitro* Drug Screening: A Review / J. Nie et al. Advanced Healthcare Materials. 2020. Vol. 9, no. 7. P. 1901773. URL: https://doi.org/10.1002/adhm.201901773
89. An Introduction to 3D Bioprinting: Possibilities, Challenges and Future Aspects / Ž. Kačarević et al. Materials. 2018. Vol. 11, no. 11. P. 2199. URL: https://doi.org/10.3390/ma11112199
90. Pagan Erik; Stefanek Evan; Seyfoori Amir та ін. (2 травня 2023). A handheld bioprinter for multi-material printing of complex constructs. Biofabrication 15 (3). doi:10.1088/1758-5090/acc42c
91. Kong Bin; Zhao Yuanjin (2023-01). 3D Bioprinting for Biomedical Applications. BME Frontiers doi:10.34133/bmef.0010
92. Current standards and ethical landscape of engineered tissues–3D bioprinting perspective / M. P. Sekar et al. Journal of Tissue Engineering. 2021. Vol. 12. P. 204173142110276. URL: https://doi.org/10.1177/20417314211027677
93. Жогло Ф., Возняк В., Попович В. та ін. Допоміжні речовини та їх застосування в технології лікарських форм. — Львів, 1996; Черних В.П., Зіменковський Б.С., Гриценко І.С. Органічна хімія / За заг. ред. В.П. Черних. — Х., 2008; Химическая энциклопедия. — Т. 4. — М., 1999.

94. ISO 15378:2017. Primary packaging materials for medicinal products – Particular requirements for the application of ISO 9001:2015. – Geneva: International Organization for Standardization, 2017. – 56 p.
95. ISO 7153:2017. Packaging materials and systems for medical products – General requirements for the application of packaging for medical products. – Geneva: International Organization for Standardization, 2017. – 48 p.
96. ISO 11607-1:2019. Packaging for terminally sterilized medical devices – Part 1: Requirements for materials, sterile barrier systems, and packaging systems. – Geneva: International Organization for Standardization, 2019. – 36 p.
97. ДСТУ 8401:2015. Картон. Пакування, маркування, транспортування і зберігання**.** – Київ: ДП «УкрНДНЦ», 2015. – 15 с.
98. ДСТУ ISO 1524:2015. Фарби, лаки та поліграфічні фарби. Визначення ступеня перетиру (ISO 1524:2013, IDT). – Київ: ДП «УкрНДНЦ», 2015. – 10 с.
99. ДСТУ EN 15274:2019. Клеї загальної призначеності для конструкційних вузлів. Вимоги та методи випробувань (EN 15274:2015, IDT). – Київ: ДП «УкрНДНЦ», 2019. – 18 с.
100. ISO 2248:2000. Packaging — Complete, filled transport packages — Vertical impact test by dropping. – Geneva: International Organization for Standardization, 2000. – 8 p.
101. Odds FC. Sabouraud('s) agar. J Med Vet Mycol. 1991;29(6):355-9. doi: 10.1080/02681219180000581. PMID: 1815027.

ДОДАТОК А. Перелік контрольних точок виробництва

Стадія та підстадія технологічного процесу	Контрольна точка	Параметр для контролювання	Нормативне значення параметру	Методи контролю і/або прилад	Періодичність контролю
1	2	3	4	5	6
ДР 1.2. Підготовка робочих розчинів ДР 1.2.1 Підготовка дезінфікуючих розчинів	Кт 1.1.1	Об'єм води	980 мл	Мірний посуд	Кожна серія
	Кт 1.1.2	Об'єм хлорного відбілювача	20 мл		Кожна серія
	Кт 1.1.3	Об'єм етанолу	70 мл		Кожна серія
	Кт 1.1.4	Об'єм води	29,5 мл		Кожна серія
	Кт 1.1.5	Об'єм гліцерину	0,5 мл		Кожна серія
ДР 1.2. Підготовка робочих розчинів ДР 1.2.2 Підготовка миючих розчинів	Кт 1.2.1	Об'єм води	917 мл		Кожна серія
	Кт 1.2.2	Об'єм перекису водню	83 мл		Кожна серія
ДР 1.4. Підготовка обладнання ДР 1.4.1 Стерилізація обладнання	2.1.1	Температура	140 °С	Термометр	Кожна серія
	2.1.2	Тиск	0,15 МПа	Барометр	Кожна серія
	2.1.3	Час	90 хв	Таймер	Кожна серія
ДР 1.5 Підготовка посуду та інструментів ДР 1.5.1 Мийка посуду та інструментів	3.1.1	Час	5-10 хв	Таймер	Кожна серія
ДР 1.5. Підготовка посуду та інструментів ДР 1.5.2 Стерилізація посуду та інструментів гострою парою	3.2.1	Температура	140 °С	Термометр	Кожна серія
	3.2.2	Тиск	0,2 МПа	Барометр	Кожна серія
	3.2.3	Час	30 хв	Таймер	Кожна серія

1	2	3	4	5	6
ДР 2.1 Підготовка стерильного повітря ДР 2.1.1 Забір атмосферного повітря	4.1.1	Температура	20-40 ºС	Термометр	Періодично
	4.1.2	Висота	8-10 м	Нівелір	Щомісяця
	4.1.3	Вологість	30-90%	Гігрометр	Щодня
ДР 2.1 Підготовка стерильного повітря ДР 2.1.2 Фільтрування повітря від механічних часток	4.2.1	Діаметр частинок	<5 мкм	Мікроскопія	Кожна серія, щомісячне калібрування
ДР 2.1 Підготовка стерильного повітря ДР 2.1.3 Стабілізація термодинамічних показників повітря	4.3.1	Температура	20-25 ºС	Термометр	Кожна серія
ДР 2.1 Підготовка стерильного повітря ДР 2.1.4 Повторне очищення повітря	4.4.1	Діаметр частинок	<1,5 мкм	Мікроскопія	Кожна серія, щомісячне калібрування
	4.4.2	Ефективність	98%	Витратомір	Кожна серія
ДР 2.1 Підготовка стерильного повітря ДР 2.1.5 Очистка повітря на індивідуальному фільтрі	4.5.1	Діаметр частинок	<1 мкм	Мікроскопія	Кожна серія, щомісячне калібрування серія
	4.5.2	Ефективність	99%	Витратомір	Кожна серія

1	2	3	4	5	6
ТП 4 Підготовка поживного середовища ТП 4.1 Приготування поживного середовища	5.1.1	Об’єм EBM-2	500 мл	Мірний посуд	Кожна серія
	5.1.2	Об’єм FBS	10%	Піпетка	Кожна серія
	5.1.3	Об’єм VEGF	10 мг/мл	Піпетка, мікроскопія	Кожна серія, щомісячне калібрування серія
	5.1.4	Об’єм bFGF	10 мг/мл	Піпетка, мікроскопія	Кожна серія, щомісячне калібрування серія
	5.1.5	Об’єм пеніциліну	100 од/мл	Піпетка, мікроскопія	Кожна серія, щомісячне калібрування
	5.1.6	Об’єм NBM	500 мл	Мірний посуд	Кожна серія
	5.1.7	Об’єм L-глутаміну	10 мл	Піпетка, мікроскопія	Кожна серія, щомісячне калібрування
	5.1.8	Об’єм пеніциліну	5 мл	Піпетка	Кожна серія

1	2	3	4	5	6
ТП 4 Підготовка поживного середовища ТП 4.1 Приготування поживного середовища	5.1.9	Об’єм NGF	10 нг/мл	Піпетка, мікроскопія	Кожна серія, щомісячне калібрування
	5.1.10	Маса аскорбінової к-ти	25-50 мг	Лабораторні ваги	Кожна серія
	5.1.11	Маса аскорбінової к-ти	25-50 мг	Лабораторні ваги	Кожна серія
ТП 4 Підготовка поживного середовища ТП 4.2 Стерилізація поживного середовища	5.2.1	Діаметр пор	0,45 мкм	Мікроскопія	Кожна серія, щомісячне калібрування
	5.2.2	Діаметр пор	0,22 мкм	Мікроскопія	Кожна серія, щомісячне калібрування
ТП 5.1 Підготовка 3D-принтера ТП 5.1.1 Калібрування 3D-принтера	6.1.1	Температура екструдера	180-210 ºС	Термометр	Кожна серія
	6.1.2	Температура пластини	40-60 ºС	Термометр	Кожна серія
	6.1.3	Швидкість друку	30-50 мм/с	Внутрішній датчик	Кожна серія

1	2	3	4	5	6
ТП 5.1 Підготовка 3D-принтера ТП 5.1.1 Калібрування 3D-принтера	6.1.4	Товщина шару	0,1-0,3 мм	Внутрішній датчик	Кожна серія
	6.1.5	Ширина екструзії	0,4-0,8 мм	Внутрішній датчик	Кожна серія
ТП 6 Розробка 3D-моделі	7.1.1	Розміри	15×20×5 мм 10×15×2,4 мм	Вбудована функція «Лінійка»	Кожна серія
ТП 7.1 Отримання ендотеліальних клітин ТП 7.1.1 Культивування ендотеліальних клітин	8.1.1	Температура	37 °C	Термометр	Кожна серія
	8.1.2	Вологість	90%	Гігрометр	Кожна серія
	8.1.3	Концентрація CO_2	5%	Газовий аналізатор	Щотижневе калібрування
ТП 7.1 Отримання ендотеліальних клітин ТП 7.1.2 Відокремлення клітин від культурального посуду	8.2.1	Температура	37 °C	Термометр	Кожна серія
	8.2.2	Об’єм трипсину	1-3 мл	Піпетка	Кожна серія
	8.2.3	Час	5-10 хв	Таймер	Кожна серія
	8.2.4	Об’єм FBS	2-3 мл	Піпетка	Кожна серія
ТП 7.1 Отримання ендотеліальних клітин ТП 7.1.3 Центрифугування	8.3.1	Швидкість центрифугування	800-1200 об/хв	Внутрішній датчик	Кожна серія
	8.3.2	Температура	20-25 °C	Термометр	Кожна серія
	8.3.3	Час	5-10 хв	Таймер	Кожна серія
ТП 7 Отримання ендотеліальних клітин ТП 7.1.4 Ресуспендування	8.4.1	Об’єм клітин	1-2 мл	Піпетка	Кожна серія
	8.4.2	Об’єм ПС	5 мл	Піпетка	Кожна серія

1	2	3	4	5	6
ТП 7.2 Підготовка нейронів ТП 7.2.1 Відбір нейронів мишей	9.1.1	Об’єм ефіру	3 мл	Піпетка	Кожна серія
	9.1.2	Об’єм трипсину	3 мл	Піпетка	Кожна серія
ТП 7.2 Підготовка нейронів ТП 7.2.2 Культивування	9.2.1	Температура	37 °C	Термометр	Кожна серія
	9.2.2	Вологість	90%	Гігрометр	Кожна серія
	9.2.3	Концентрація CO_2	5%	Газовий аналізатор	Щотижневе калібрування
	9.2.4	Час	48-72 год	Таймер	Кожна серія
ТП 7.2 Підготовка нейронів ТП 7.2.3 Відокремлення від поживного середовища	9.3.1	Температура	37 °C	Термометр	Кожна серія
	9.3.2	Об’єм трипсину	1-3 мл	Піпетка	Кожна серія
	9.3.3	Час	5-10 хв	Таймер	Кожна серія
	9.3.4	Об’єм FBS	2-3 мл	Піпетка	Кожна серія
ТП 7.2 Підготовка нейронів ТП 7.2.4 Центрифугування	9.4.1	Швидкість центрифугування	800-1200 об/хв	Внутрішній датчик	Кожна серія
	9.4.2	Температура	20-25 °C	Термометр	Кожна серія
	9.4.3	Час	5-10 хв	Таймер	Кожна серія
ТП 7.2 Підготовка нейронів ТП 7.2.5 Ресуспендування	9.5.1	Об’єм клітин	1-2 мл	Піпетка	Кожна серія
	9.5.2	Об’єм ПС	5 мл	Піпетка	Кожна серія
ТП 8 Підготовка біочорнил ТП 8.1 Приготування розчину желатину метакрилату	10.1.1	Температура	37 °C	Термометр	Кожна серія
	10.1.2	Час	25-30 хв	Таймер	Кожна серія
	10.1.3	Об’єм GelMa	5-10% від об’єму PBS	Піпетка	Кожна серія

1	2	3	4	5	6
ТП 8 Підготовка біочорнил ТП 8.2 Змішування клітин до однорідної маси	10.2.1	Температура	37 °C	Термометр	Кожна серія
	10.2.2	Об’єм клітин	1-10 млн	Мікроскопія	Кожна серія
ТП 9 Підготовка мембрани ТП 9.1 3D-друк мембрани	11.1.1	Потужність	400 Вт	Ватметр	Кожна серія
ТП 9 Підготовка мембрани ТП 9.2 Стерилізація мембрани	11.2.1	Концентрація етанолу	70%	Спиртометр	Кожна серія
	11.2.2	Час	10-30 хв	Таймер	Кожна серія
ТП 9 Підготовка мембрани ТП 9.3 Стерилізація біочорнил за допомогою фільтрації	11.3.1	Об’єм біочорнила	10-20 мл	Піпетка	Кожна серія
ТП 9 Підготовка мембрани ТП 9.4 3D-біодрук ендотеліальних клітин	11.4.1	Швидкість друку	5-20 мм/с	Внутрішній датчик	Кожна серія
	11.4.2	Висота шарів	100-300 мкм	Внутрішній датчик	Кожна серія
ТП 10 Інкубація ендотеліальних клітин на PLGA-мембрані	12.1.1	Температура	37 °C	Термометр	Кожна серія
	12.1.2	Концентрація CO_2	5%	Газовий аналізатор	Щотижневе калібрування
	12.1.3	Вологість	95%	Гігрометр	Кожна серія
	12.1.4	Час	3-5 діб	Таймер	Кожна серія
ТП 12 Інкубація	13.1.1	Температура	37 °C	Термометр	Кожна серія
	13.1.2	Концентрація CO_2	5%	Газовий аналізатор	Щотижневе калібрування

1	2	3	4	5	6
ТП 12 Інкубація	13.1.3	Вологість	95%	Гігрометр	Кожна серія
	13.1.4	Час	7 діб	Таймер	Кожна серія
ПМВ 13 Пакування, маркування	14.1.1	Розмір первинної упаковки	40×60 мм	Мікрометр	Кожна серія
	14.1.2	Розмір вторинної упаковки	50×70×15 мм	Мікрометр	Кожна серія

ДОДАТОК Б. Параметри контролю для оцінки якості основної сировини, допоміжних продуктів та матеріалів

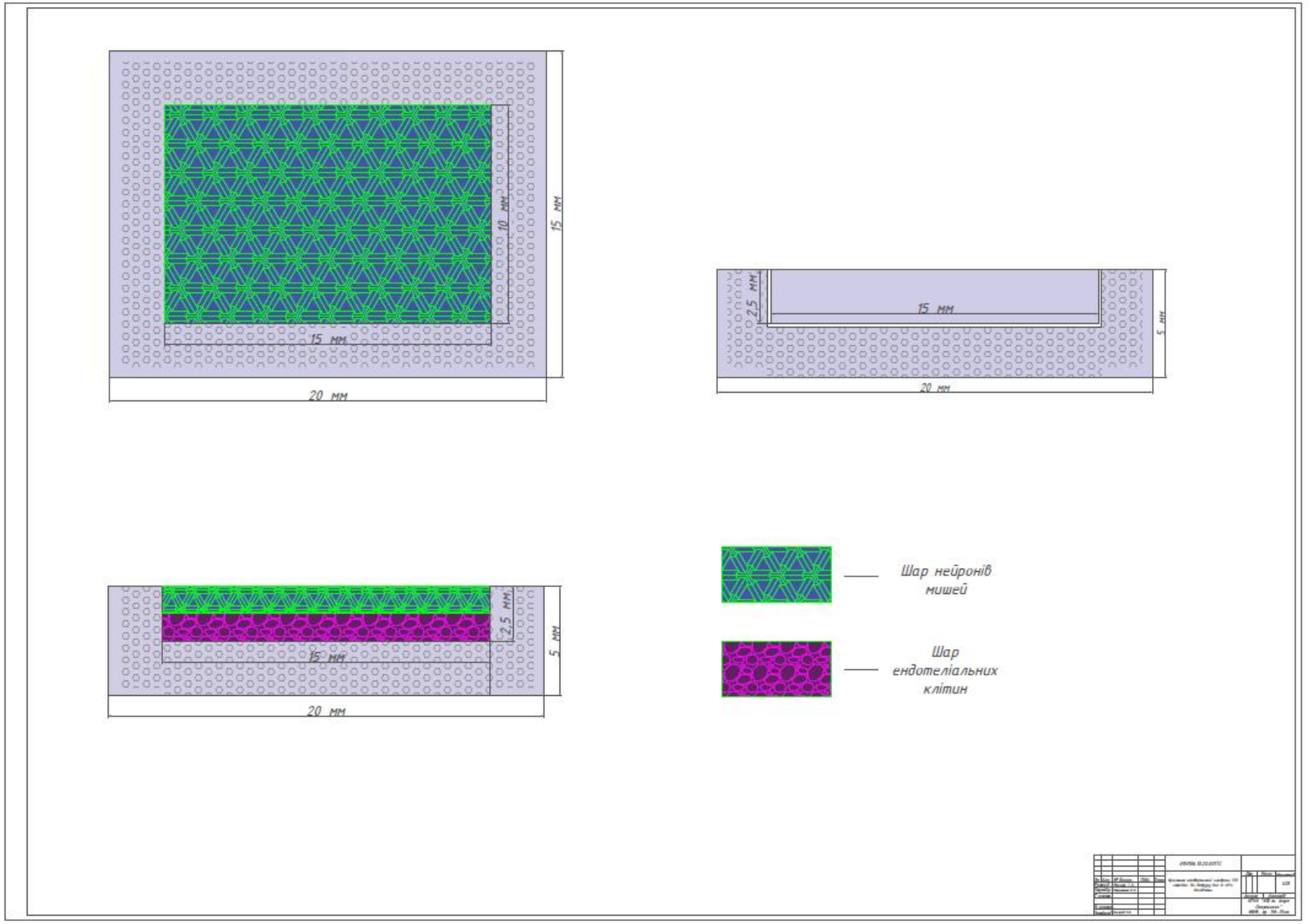
Найменування	НТД, що регламентує показник якості	Показник для перевірки	Нормативне значення
1	2	3	4
1. Основна сировина			
PLGA	USP, Ph. Eur., ISO 10993	Однорідність порошку, колір, чистота	Однорідний порошок білого або світло-жовтого кольору, чистота ≥ 99.5%, відповідність фармакопейним стандартам якості; сертифікований виробником з детальною сертифікацією аналізу (CoA)
Желатин метакрилат	Виробничий стандарт / ISO 13485	Ступінь модифікації, вміст залишкових реагентів	≥ 80% метакрилації, залишки ≤ 1%
Ендотеліальні клітини	Протокол постачальника, ISO 20387	Життєздатність, відсутність контамінації	Життєздатність ≥ 90%, відсутність мікоплазм та грибків
Нейрони мишей	Протокол постачальника, ISO 20387	Життєздатність, відсутність контамінації	Життєздатність ≥ 85%, відсутність патогенів
EBM (endothelial basal medium)	Сертифікат виробника	Прозорість, pH	Прозорий, pH 7.2–7.4
FBS (fetal bovine serum)	USP, Ph. Eur.	Стерильність, рівень ендотоксинів	< 10 EU/мл, стерильний
VEGF(vascular endothelial growth factor)	ISO 10993-1	Біологічна активність, концентрація	> 95% активності, ≥ 50 нг/мл
bFGF(basic fibrinoblast growth factor)	ISO 10993-1	Біологічна активність, стабільність	> 95% активності, стабільність до 6 міс

1	2	3	4
NBM (neurobasal medium)	Протокол виробника	Прозорість, pH	Прозорий, pH 7.2–7.4
NGF (nerve growth factor)	ISO 10993	Біологічна активність, чистота	> 95% активності, ≥ 98% чистоти
L-глутамін	ДФУ, USP, Ph. Eur.	Чистота, pH розчину, розчинність	≥ 99%, pH 4.5–6.0 (1% розчин), швидка розчинність у вод
EGM-2	Протокол виробника	Прозорість, pH	Прозорий, pH 7.4 ± 0.2
Гепарин	ДФУ, USP, Ph. Eur.	Активність, чистота, pH	≥ 180 USP/мг, чистота ≥ 98%, pH 5.5–7.5
Аскорбінова кислота	ДФУ, USP, Ph. Eur.	Чистота, стабільність, pH	Чистота ≥ 99%, pH 2.4–2.8 (5% розчин), стабільність ≥ 6 міс.
Пеніцилін	ДФУ, USP, Ph. Eur.	Стерильність, активність	Стерильний, активність ≥ 95%, відсутність мікробного росту
Добавка B-27	Протокол виробника	Композиційний склад, стерильність	Відповідність протоколу, стерильний
2. Допоміжна сировина			
Етиловий спирт	ДФУ, ДСТУ 4221-2003	Концентрація етанолу, чистота, pH	≥ 96% етанолу, чистота ≥ 99.8%, pH 7.0 ± 0.5
EDTA	1233009 USP Edetate disodium	pH Втрата маси при висушуванн	4,0-6,0 ≤ 11,4%
Трипсин	ДФУ, USP, Ph. Eur., ISO 18369-2	Чистота, ефективність забарвлення	Чистота ≥ 99%, рівномірне забарвлення клітин

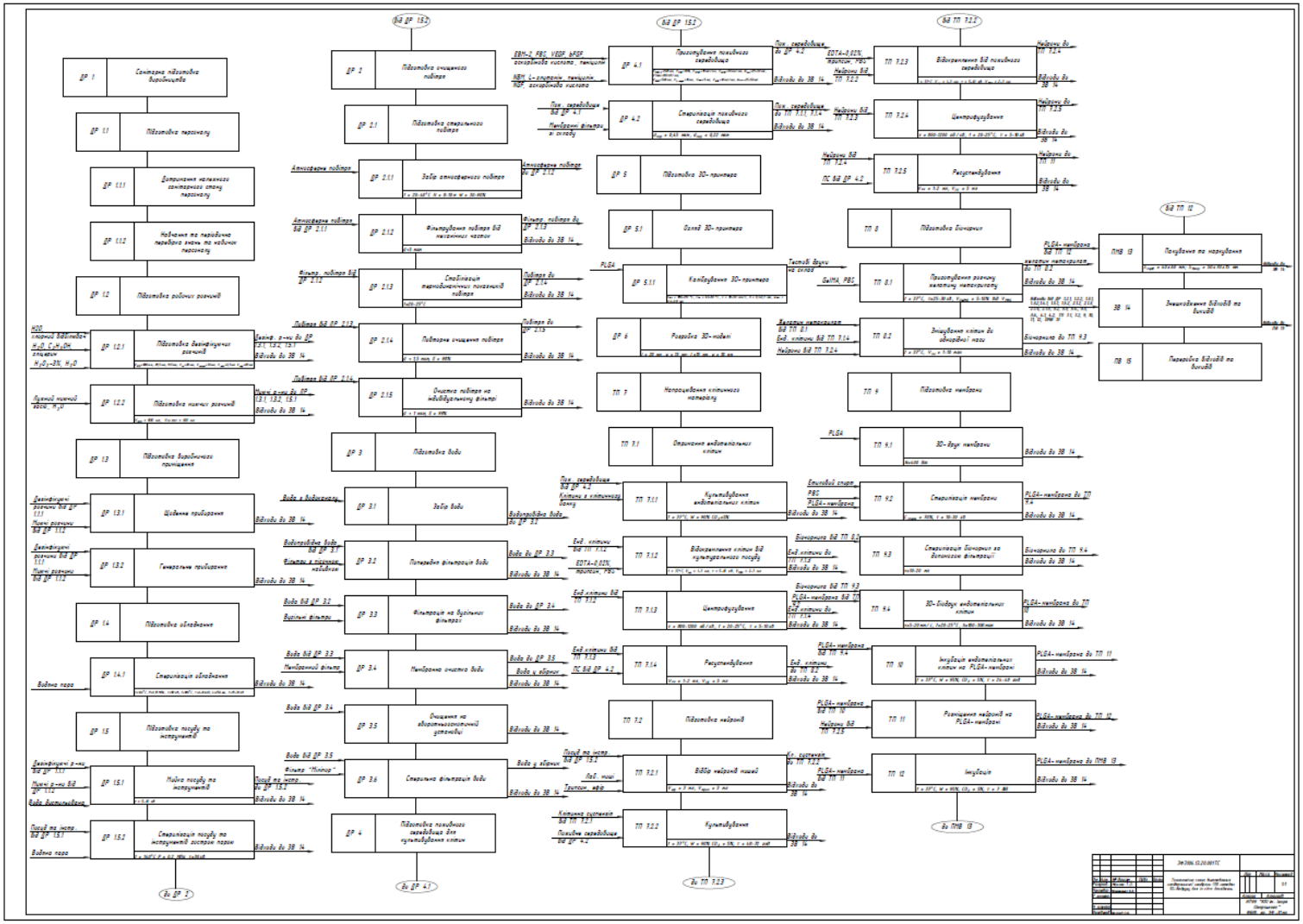
1	2	3	4
Трипановий синій	ДФУ, USP, Ph. Eur.	Активність, стерильність, pH	Активність ≥ 2500 U/мг, pH 7.0–8.5, стерильний
Перекис водню 30%	Протокол виробника, Ph Eur, USP	Хлориди Важкі метали As Cu Pb Pd Pt Zn Органічні стабілізатори	≤ 0.005 % ≤ 0.0005 % ≤ 0.0003 % ≤ 0.002 % ≤ 0.001 % ≤ 0.0001 % ≤ 0.0001 % ≤ 0.002 % ≤ 0.045 %
Фосфатний буферний розчин	Протокол виробника, Ph. Eur.	pH, прозорість	pH 7.2 ± 0.2, прозорий, без осаду
3. Матеріали			
Спецодяг	ДСТУ EN 340, ISO 13688	Стійкість до хімічних речовин, комфорт	Відповідність розмірам, захист від біо- та хімічних агентів
Шприцевий фільтр	Протокол виробника	Розмір пор Пористість	Діаметр пор 0,22 мкм, пористість 78%
Рукавички нітрилові	EN 455, ДСТУ EN 374	Цілісність, відсутність порошку	Без пошкоджень, без пудри, тест на герметичність
Мило рідке	ДСТУ 4315:2004	Консистенція, антибактеріальні властивості	Гомогенна текстура, ефективність ≥ 99.9% щодо бактерій
Губки	Протокол виробника, ISO 2876	Міцність, абсорбція	Висока абсорбція, стійкість до розчинників
Пакети для сміття	ДСТУ 4462:2005	Міцність, стійкість до розривів	Витримують навантаження ≥ 5 кг

1	2	3	4
Лабораторні стакани	ISO 3819	Місткість, цілісність	Відповідність заявленим об'ємам, без дефектів
Одноразові наконечники	Протокол виробника, ISO 8655	Стерильність, точність	Стерильні, точність об’єму ±1%
Чашка Петрі	ISO 24998	Прозорість, цілісність	Прозора, без тріщин та дефектів
Предметні скельця	ISO 8037	Прозорість, чистота	Без подряпин, забруднень та пошкоджень
Пробірки скляні	ISO 4142	Місткість, міцність	Відповідність об’єму, без тріщин
Касетні фільтри HEPA	EN 1822-1	Ефективність фільтрації	≥ 99.97% для частинок ≥ 0.3 мкм
Етикетки	ДСТУ 4519:2008	Адгезія, чіткість друку	Висока адгезія, чіткий друк
Маркери перманентні	Протокол виробника, ISO 14145	Стійкість до стирання	Написи зберігаються ≥ 6 міс., стійкі до води

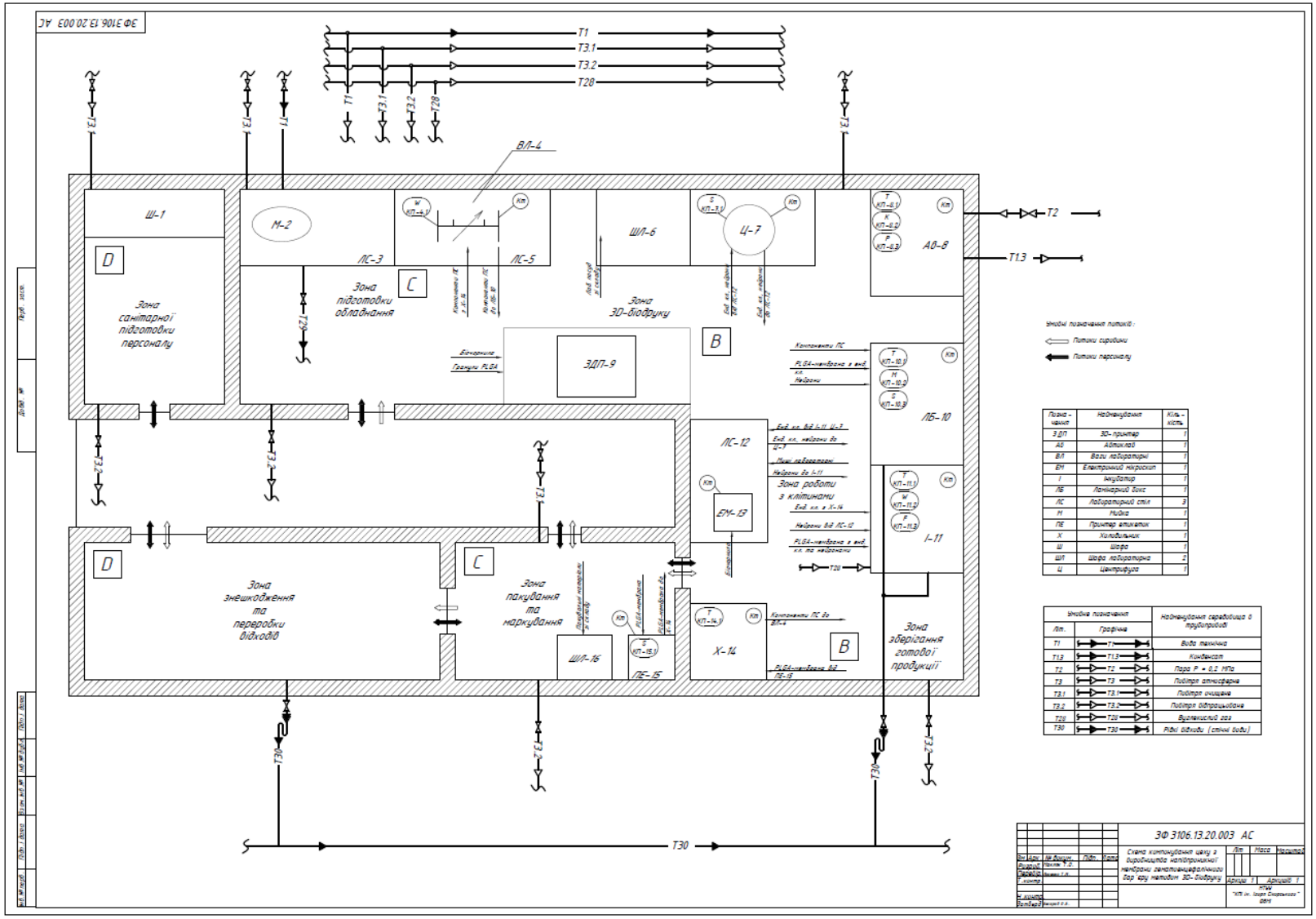
ДОДАТОК В. Креслення напівпроникної PLGA-мембрани ГЕБ методом 3D-біодруку



ДОДАТОК Г. Технологічна схема



ДОДАТОК Д. Схема компонування приміщення та потоків



Додаток Е. Приклад структури декларації про відповідність напівпроникної PLGA-мембрани ГЕБ

ДЕКЛАРАЦІЯ ПРО ВІДПОВІДНІСТЬ МЕДИЧНИХ ВИРОБІВ № 27

***Виробник**:* ТОВ «ІнВітро Моделі», вул. Дослідницька, 27, м. Київ, Україна, 02000
(назва та місцезнаходження виробника)

***підтверджує, що вироби медичні*:** Напівпроникна PLGA-мембрана ГЕБ
(назва продукції)

***клас виробу**:* *in vitro* діагностичні медичні вироби / вироби для досліджень, згідно із Регламентом (EU) 2017/746.

***які виготовляються**:* ТОВ «ІнВітро Моделі», вул. Дослідницька, 27, м. Київ, Україна, 02000

адреси виробничих майданчиків: вул. Наукова, 21, м. Київ, Україна, 03680

відповідають вимогам Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 02.10.2013 р. №754.

Технічна документація на медичний виріб розроблена та впроваджена.

Декларацію складено на підставі:

1. Сертифікат на систему управління якістю відповідно до вимог ДСТУ ISO 13485:2005 (ISO 13485:2003, IDT) № 001234 від 01.01.2024, чинний до 31.12.2026;
2. Сертифікат відповідності № 5678 від 01.03.2024, чинний до 31.02.2026 щодо забезпечення функціонування комплексної системи управління якістю вимогам Технічного регламенту щодо медичних виробів, Додаток 3, виключаючи пункти 8-11;

Сертифікати видано ОС/ООВ Державне українське об'єднання «Техмедвиріб», номер призначеного органу № 2127А, атестат акредитації № 17171.

Уповноважений представник виробника в Україні: ТОВ «Біомедтех-Україна»,
адреса: вул. Наукова, 73, м. Київ, Україна, 02000 ,
(за дорученням від 01.12.2023 № 123456)

Відповідальність за достовірність наданої інформації несе виробник.

Уповноважений представник виробника в Україні (за дорученням) _____ (підпис) Петренко Петро Петрович (ПІБ)

М.П. 01.01.2024 (дата) діє до 31.02.2026 (дата)