

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична біотехнологія»
(назва)

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” ЖОВТНЯ 2025 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ПОСТОЮК Ольги Олегівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біотехнологічні аспекти одержання імунобіотиків»

керівник роботи доц. СТАРОВОЙТОВА Світлана Олександрівна,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 05.11.2025 року № 911-к

2. Строк подання здобувачем роботи 01.12.2025

3. Вихідні дані до роботи: обраний штам: *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505, цільовий продукт: лізат

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):
Характеристика імунобіотиків як засобів модулювання імунної системи; аналіз
механізмів дії імунобіотиків та їх впливу на імунні відповіді організму;
біотехнологічні аспекти розробки імунобіотичних препаратів; обґрунтування вибору
біологічного агента та характеристика штаму *Lactobacillus rhamnosus*; техніко-
економічне обґрунтування виробництва імунологічного препарату на основі лізату
клітин *Lactobacillus rhamnosus*; обґрунтування вибору стадій технологічного процесу;
опис технологічної схеми отримання лізату; технологічні особливості одержання
готового продукту на основі бактеріального лізату; контроль якості та контроль
критичних параметрів виробничого процесу; аналіз екологічних аспектів та
перспектив екологізації виробництва; формування нормативно-технічної
документації, необхідної для проектування та впровадження
виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу:

Апатратурна схема формату A1

Технологічна схема формату A1

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01 жовтня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Імунобіотики, як засоби модулювання імунної системи та механізми їх дії	01.10.2025-06.10.2025	
2	РОЗДІЛ 2. Біотехнологічні аспекти розробки імунобіотиків	08.10.2025-16.10.2025	
3	РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору біологічного агента	16.10.2025-20.10.2025	
4	РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування виробництва імунологічного препарату на основі лізату клітин <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	21.10.2025-29.10.2025	
5	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу	30.10.2025-10.11.2025	
6	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми отримання лізату	03.11.2025-11.11.2025	
7	РОЗДІЛ 7. Технологічні особливості отримання готового продукту з лізату	13.11.2025-18.11.2025	
8	РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	20.11.2025-25.11.2025	
9	Оформлення списку літературних джерел	03.11.2025-07.11.2025	
10	Оформлення вступу та реферату	05.11.2025-21.11.2025	
11	Оформлення презентації	22.11.2025-29.11.2025	
12	Оформлення пояснювальної записки	22.11.2025-29.11.2025	

Здобувач

(підпис)

ПОСТОЮК Ольга

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

СТАРОВОЙТОВА Світлана

(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

The thesis is devoted to the study of scientific and biotechnological foundations for the creation of an immunological preparation based on *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 cell lysate. The work considers modern approaches to the use of immunobiotics as means of modulating innate and adaptive immunity, characterizes their mechanisms of action, in particular the influence of structural components of probiotic cells on immune system cells and cytokine response. Particular attention is paid to postbiotic forms – non-viable biomass and cell lysates, which are promising in terms of stability, safety, and pronounced immunoregulatory properties.

The paper provides justification for the choice of *L. rhamnosus* CRL1505 as a biological agent due to its proven ability to activate TLR2-dependent pathways, induce the production of type I interferons, regulate the inflammatory response, and increase the body's resistance to respiratory viral infections. A description of the technological process of obtaining lysate, post-fermentation stages, methods of cell lysis, drying, and grinding of the lyophilized mass is presented. A separate section is devoted to the quality control of semi-finished and finished products, in particular microbiological, physicochemical, and immunological indicators, as well as the assessment of the specific immunomodulatory activity of the obtained lysate.

The work consists of 84 pages, 9 tables, 1 sheet of equipment diagram in A1 format, 1 sheet of technological diagram in A1 format.

Keywords: lysate, *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505, immunobiotic, immunity, lyophilization.

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена дослідженню наукових та біотехнологічних основ створення імунологічного препарату на основі лізату клітин *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505. У роботі розглянуто сучасні підходи до застосування імунобіотиків як засобів модулювання вродженого та адаптивного імунітету, охарактеризовано механізми їх дії, зокрема вплив структурних компонентів пробіотичних клітин на клітини імунної системи та цитокінову відповідь. Особливу увагу приділено постбіотичним формам – нежиттєздатній біомасі та клітинним лізатам, які є перспективними з огляду на стабільність, безпечність та виражені імунорегуляторні властивості.

У роботі наведено обґрунтування вибору *L. rhamnosus* CRL1505 як біологічного агента завдяки його доведеній здатності активувати TLR2-залежні шляхи, індукувати продукцію інтерферонів типу I, регулювати запальну відповідь та підвищувати резистентність організму до респіраторних вірусних інфекцій. Представлено опис технологічного процесу отримання лізату, післяферментаційні етапи, методи лізису клітин, сушіння та подрібнення ліофілізованої маси. Окремий розділ присвячено контролю якості напівфабрикату та готової продукції, зокрема мікробіологічним, фізико-хімічним та імунологічним показникам, а також оцінці специфічної імуномодуючої активності отриманого лізату.

Робота складається з 84 сторінок, 9 таблиць, 1 аркуш апаратурної схеми форматом A1, 1 аркуш технологічної схеми форматом A1.

Ключові слова: лізат, *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505, імунобіотик, імунітет, ліофілізація.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. Імунобіотики, як засоби модулювання імунної системи та механізми їх дії.....	10
1.1. Механізми імуностимуляції імунобіотиками	11
1.2. Механізми імуносупресії імунобіотиками	14
РОЗДІЛ 2. Біотехнологічні аспекти розробки імунобіотиків.....	17
2.1. Життєздатна біомаса пробіотичних культур як основа імунобіотиків	17
2.2. Нежиттєздатна біомаса та структурні компоненти клітини в ролі імунобіотиків	22
РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору біологічного агента	32
РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування виробництва імунологічного препарату на основі лізату клітин <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	37
4.1. Характеристика лізату	37
4.2. Огляд ринку цільової продукції на основі компонентів	38
4.3. Розрахунок річної потужності виробництва	40
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу	41
5.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання лізату. 41	
5.1.1 Відділення біомаси із культуральної рідини	42
5.1.2. Суспендування біомаси розчином натрію хлориду	43
5.1.3. Обрання способу лізису клітин	43
5.1.4. Суспензування у відфільтрованому супернатанті з метаболітами.....	45
5.1.5. Сушіння лізату клітин	45
5.2. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	46
5.3. Специфікація обладнання	50
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми отримання лізату	51
РОЗДІЛ 7. Технологічні особливості отримання готового продукту з лізату.....	54
7.1. Обґрунтування форми випуску імунобіотику на основі ліофілізованого лізату <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505	54
7.1.1. Умови виробництва	55
7.2. Обґрунтування технологічних особливостей одрежання кінцевої форми .	58
7.3. Специфікація обладнання.....	60
7.4. Опис технологічної схеми отримання капсул з лізатом	60

РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.....	62
8.1. Контроль виробництва напівфабрикату	62
8.1.1 Опис.....	62
8.1.2 Втрата в масі при висушуванні	62
8.1.3 Специфічна нешкідливість	62
8.1.4 Мікробіологічна чистота.....	63
8.1.5. Імунологічний контроль.....	64
8.2. Контроль готової продукції	65
8.2.1.Опис.....	66
8.2.2. Однорідність маси.....	66
8.2.3. Вміст капсул	66
8.2.4. Розпадання	67
8.2.5. Мікробіологічна чистота.....	67
8.2.6. Специфічна активність.....	68
ВИСНОВКИ.....	70
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	72

ВСТУП

Сучасний стан медицини та біотехнології вимагає активного пошуку безпечних та ефективних засобів профілактики захворювань, що обумовлено зростанням антибіотикорезистентності та появою нових патогенних штамів. Традиційні методи імунізації, попри високу ефективність, мають низку обмежень, що пов'язані з віковими особливостями пацієнтів, імунодефіцитними станами, а також необхідністю зберігання та транспортування вакцин. У зв'язку з цим особливої актуальності набувають альтернативні підходи до регуляції імунної відповіді, серед яких важливе місце посідають імунобіотики – мікроорганізми або їхні структурні компоненти, здатні модулювати активність вродженого та адаптивного імунітету[77]. Імунобіотики впливають на імунну систему через взаємодію із рецепторами розпізнавання патернів, регуляцію продукції цитокінів, посилення бар'єрної функції слизових оболонок і стимуляцію секреції IgA, що робить їх перспективними засобами для профілактики вірусних і бактеріальних інфекцій[69,83].

У центрі уваги сучасних досліджень перебуває здатність пробіотичних бактерій не лише конкурувати з патогенами у кишковому середовищі, але й впливати на системний імунітет через вісь «кишечник–легені». Ця інтегрована система забезпечує транспорт імунних медіаторів між ШКТ та респіраторним трактом, дозволяючи компонентам кишкової мікробіоти знижувати тяжкість респіраторних інфекцій, у тому числі грипу та коронавірусної хвороби[69,73]. Такий двонаправлений зв'язок підкреслює необхідність розробки нових імунорегуляторних препаратів, які здатні стимулювати місцевий та системний захист без ризику перевантаження імунної системи.

На цьому тлі зростає інтерес до імунобіотиків на основі нежиттєздатної біомаси та окремих структурних компонентів клітин пробіотичних штамів, зокрема лактобацил. Встановлено, що такі компоненти, як пептидоглікан, тейхоеві кислоти, поверхневі білки та екзополісахариди, здатні зберігати імуномодулюючі властивості живих клітин і навіть перевищувати їх у безпечності та стабільності[14,41]. Особливе місце серед цих агентів займають бактеріальні лізати — комплекси фрагментів клітинної стінки, цитозольних білків, ліпотейхоевих кислот та інших молекул,

отримані шляхом контрольованого руйнування пробіотичних клітин. Лізати не несуть ризику колонізації, легко стандартизуються та забезпечують швидку активацію вроджених імунних механізмів через стимуляцію Toll-подібних рецепторів і продукцію цитокінів[22,64].

Одним з найперспективніших імунобіотичних агентів є лізат *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 – пробіотичного штаму, ефективність якого у стимуляції протівірусної та протибактеріальної відповіді була багаторазово підтверджена в експериментальних моделях. Його компоненти активують інтерферони I типу (IFN- α/β), регулюють синтез прозапальних і протизапальних цитокінів (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10), посилюють функціональну активність макрофагів і дендритних клітин, а також стимулюють розвиток Th1-відповіді, що є ключовим у боротьбі з вірусними інфекціями[63,79]. Окрім того, пептидоглікан та клітинна стінка CRL1505 демонструють виражений захисний ефект проти *Streptococcus pneumoniae*, сприяючи рекрутуванню нейтрофілів, посиленню експресії генів, індукованих інтерфероном, та збереженню цілісності слизових бар'єрів [14, 41]. Важливим є те, що ефективність нежиттєздатної біомаси CRL1505 майже не поступається живим клітинам, а інколи навіть перевершує їх у безпечності та толерантності для організму з ослабленим імунітетом[62].

Таким чином, розвиток імунобіотиків на основі лізатів пробіотичних бактерій, зокрема *L. rhamnosus* CRL1505, відкриває нові можливості для створення мукозальних імуномодуляторів, здатних забезпечувати ефективний захист від респіраторних інфекцій, коригувати порушення імунної відповіді та підсилювати бар'єрні функції епітелію. Це визначає актуальність і наукову значущість даної роботи, яка спрямована на дослідження біотехнологічних аспектів отримання імунобіотиків та аналіз механізмів дії компонентів лізату *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 як перспективної основи для імунорегулюючих препаратів.

РОЗДІЛ 1. Імунобіотики, як засоби модулювання імунної системи та механізми їх дії

Під терміном «імунобіотики» загалом розуміють мікроорганізми або їхні структурні компоненти (наприклад, пептидоглікан, тейхоєві кислоти, екзополісахариди і т.п.), які здатні модулювати імунну відповідь організму, сприяючи захисту від вірусних та інфекційних захворювань. Вони можуть діяти як живі бактеріальні штами, так і у вигляді безклітинних імуномодулюючих речовин, що робить їх перспективним і безпечним засобом імунної регуляції[77].

Механізм дії імунобіотиків базується на декількох ключових аспектах. По-перше, вони підтримують баланс кишкової мікрофлори, витісняючи патогенні бактерії та запобігаючи їх розмноженню. Це забезпечується за рахунок конкурентного пригнічення росту шкідливих мікроорганізмів та виробленням антимікробних сполук, таких як бактеріоцини. По-друге, імунобіотики сприяють зміцненню епітеліального бар'єру кишечника, стимулюючи синтез слизу та зміцнюючи міжклітинні з'єднання, що перешкоджає проникненню патогенів до системного кровотоку. Ще одним важливим механізмом дії імунобіотиків є їхня здатність модулювати роботу вродженого та адаптивного імунітету.

Вроджений та адаптивний імунітет являють собою два різні механізми захисту організму від збудників. Зокрема, адаптивний імунітет включає два основні типи відповіді: гуморальний, що опосередковується антитілами, та клітинний, який забезпечується специфічними імунними клітинами[49].

Вроджений імунітет є неспецифічним, оскільки він забезпечує першу лінію захисту від зовнішніх загроз, діючи швидко та універсально. Основні складові цієї системи включають фізичні та хімічні бар'єри, такі як шкіра та слизові оболонки, а також імунні клітини, серед яких дендритні клітини (DC), моноцити, макрофаги, нейтрофіли та природні кілери (NK). Крім того, у процесі захисту беруть участь молекули-індикатори, зокрема цитокіни, що регулюють запальну відповідь.

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Постоюк О.О.			Розділ 1. Імунобіотики, як засоби модулювання імунної системи та механізми їх дії	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Старовойтова С.О.					10	84
Н. Контр.						КАФЕДРА БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						
						10		

Адаптивний імунітет є другою лінією захисту організму, яка характеризується високою специфічністю до патогенів. Він забезпечується двома основними типами лімфоцитів – В- та Т-клітинами, які реалізують імунну відповідь через різні механізми. В-лімфоцити беруть участь у гуморальному імунітеті, виробляючи антитіла (імуноглобуліни, Ig), тоді як Т-лімфоцити забезпечують клітинно-опосередковані реакції імунної системи[49].

Слід зазначити, що численні наукові дослідження останніх років виявили надзвичайно тісний і багатогранний взаємозв'язок між двома, здавалося б, далекими органами нашого тіла – шлунково-кишковим трактом (ШКТ) та легеньми. Цей зв'язок підтримується за рахунок кровообігу та лімфатичного потоку, що відповідно і транспортують посередників імунних клітин(цитокіни, мікробні фрагменти, продукти життєдіяльності та гормони), утворюючи так звану вісь «мікробіота-кишечник-легені». Взаємодія між ШКТ та легеньми є двонаправленою: зміни в одному органі можуть призводити до змін в іншому. Тобто респіраторна вірусна інфекція може спричинити порушення мікробіоти кишечника і відповідно викликати дисбіоз, що в подальшому сприяє загостренню захворюванню легень, через порушення синтезу дифундуючих метаболітів з імуномодулюючими властивостями. І відповідно, можна зробити висновок, що дія імунорегулюючого препарату може впливати не тільки на захворювання пов'язані з ШКТ[69,77,73].

1.1. Механізми імуностимуляції імунобіотиками

Модуляція лімфоїдної тканини, асоційованої з кишечником

Лімфоїдна тканина, асоційована з кишечником, є найбільшим органом імунної системи організму. Імунобіотичні мікроорганізми, такі як *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantaru* DU1, *Weissella cibaria* DU1, *Lactobacillus sakei* DU2, *Ligilactobacillus salivarius* FFIG, *Lactobacillus casei* взаємодіють із клітинами епітелію та імунними клітинами в лімфоїдній тканині, викликаючи активацію імунної відповіді[29]. Основні механізми включають:

- **Взаємодія з Toll-подібними рецепторами.** Пробиотики взаємодіють із спеціальними молекулами, які називаються Toll-подібними рецепторами (TLR). Ці рецептори знаходяться на епітеліальних і дендритних клітинах і виконують роль

«наглядачів» імунної системи, допомагаючи їй виявляти шкідливі мікроорганізми. Коли пробіотики активують TLR, це запускає сигнальні шляхи, які активують імунну відповідь[53]. Подібним чином діють штами *Lactobacillus plantaru* DU1, *Weissella cibaria* DU1 та *Lactobacillus sakei* DU2, що модулюють імунні відповіді через активацію TLR3¹ поліцитидиловою кислотою[36]. *Ligilactobacillus salivarius* FFIG, здатний регулювати вроджену імунну відповідь через TLR3 або TLR4² проти ротавірусу в епітеліальних клітинах свиней[88].

- **Вироблення цитокінів.** Імунобіотики стимулюють виробництво речовин, які називаються цитокінами, зокрема інтерлейкіну-6 (IL-6), інтерлейкіну-12(IL-12) та TNF- α . Ці речовини допомагають активувати макрофаги, дендритні клітини та Т-клітини, що в підсумку підсилює як вроджений, так і адаптивний імунітет. Подібний механізм дії на імунну систему спостерігається у *Lactobacillus acidophilus*, який відомий своєю здатністю стимулювати секрецію IgA та модулювати продукцію цитокінів, цей штам відіграє роль як у вродженому, так і в адаптованому імунітеті [60,83,3]

Регуляція вродженого імунітету

Підсилення дії вродженого імунітету за допомогою імунобіотиків може здійснюватись:

- **Стимуляція клітин-кіллерів (NK).** Даний механізм дії характеризується збільшенням цитотоксичної активності NK-клітин, які відіграють важливу роль у знищенні інфікованих та трансформованих клітин. Пробіотичні культури такі як *Bacillus polyfermenticus*(використовуються при лікуванні тривалих кишкових розладів живою біомасою $3,1 \times 10^8$ КУО/день), *Lactobacillus casei* Shirota збільшують цитотоксичну активність NK-клітин. Але крім життєздатної біомаси, також посилювали дію та активність NK-клітин вбиті теплом клітини *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 і *Bifidobacterium breve* ATCC 15700NK[4].

¹TLR3 – білок, що відповідає за розпізнавання вірусного РНК та активації вродженого імунітету.

²TLR4 - білок, що відповідає за розпізнавання ліпополісахаридів, основних компонентів зовнішньої мембрани грам-позитивних та -негативних бактерій, та подальшої активації вродженого імунітету.

- **Активация макрофагов і нейтрофілів.** Завдяки взаємодії із рецепторами імунної системи, такими як Toll-подібні рецептори (TLRs) та інші специфічні рецептори, імунобіотичні штами та їх підсилюють фагоцитарну активність макрофагов і нейтрофілів. Ці взаємодії активують сигнальні шляхи, що призводять до підвищення продукції цитокінів і хемоаттрактантів, що дозволяє ефективніше очищати організм від патогенів і підвищує загальну ефективність імунної відповіді[44,60,96]. Наприклад, подібна дія на імунітет спостерігається у *Lactobacillus helveticus* IMAU70129, *L. casei* IMAU60214, *Lactobacillus rhamnosus* GG та *Lactobacillus rhamnosus* KLDS, які стимулюють макрофаги, що призводить до збільшення виробництва активних форм кисню (АФК) і прозапальних цитокінів (IL-8, TNF- α та IL-6). Ця активація посилює фагоцитарну та бактерицидну активність макрофагов проти патогенів, таких як *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli* [57].

Регуляція адаптивного імунітету

Імунобіотики впливають на адаптивну імунну систему через активацію та регуляцію Т- та В-клітин:

- **Баланс Th1 та Th2.** Клітини Th1 головним чином беруть участь у клітинно-опосередкованому імунітеті. Вони виробляють прозапальні цитокіни, такі як інтерферон-гамма (IFN- γ), інтерлейкін-2 (IL-2) і бета-фактор некрозу пухлини (TNF- β). Ці цитокіни активують макрофаги та необхідні для боротьби з внутрішньоклітинними патогенами, такими як віруси та деякі бактерії. Клітини Th2 виробляють цитокіни, які сприяють виробленню антитіл і беруть участь в імунній відповіді проти позаклітинних паразитів). Ключові цитокіни, що виробляються клітинами Th2, включають інтерлейкін-4 (IL-4), IL-5, IL-10 та IL-13. Ці цитокіни сприяють виробленню сильних антитіл і активації еозинофілів, що є важливим при алергічних реакціях і відповідях на паразитів[58,7] Імунобіотичні штами можуть допомогти відновити баланс між Th1 і Th2 відповідями, що є критично важливим для ефективного

імунного захисту та запобігання гіперчутливості[83]. Такі живі пробіотичні культури як *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. Casei* та *Lactobacillus GG* перед індукцією кліщем домашнього пилу, знижували відповідь Th2, яка характеризується зниженням продукції IL-4 та IL-5. *Lactobacillus rhamnosus GG* і *Bifidobacterium lactis* зменшують алергічні симптоми мишачих моделей астми шляхом індукції секреції трансформуючого фактору росту бета(TGF-β)[21].

- **Секреція IgA.** Імунобіотики стимулюють В-клітини до продукції секреторного IgA, який є важливим антитілом для підтримки слизової імунності. Секреторний IgA діє шляхом нейтралізації патогенів, запобігаючи їхньому прикріпленню до клітин слизової оболонки, а також активує інші імунні механізми, що дозволяє захищати організм від інфекцій і зберігати цілісність слизових бар'єрів[83,69]. Пробіотичний мікроорганізм *Lactobacillus fermentum* є одним із прикладів, що демонструє підвищує рівень кишкового IgA, посилює активність макрофагів і сприяє диференціації В-клітин у плазматичні клітини, що секретують IgA[50].

1.2. Механізми імуносупресії імунобіотиками

Зниження вироблення прозапальних цитокінів

Імуномодулюючі мікроорганізми здатні регулювати продукцію цитокінів, зокрема IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-17, TNF-α, IFN-γ що суттєво знижує запальні процеси у тканинах. Вони впливають на імунну відповідь, модулюючи активацію та диференціацію імунних клітин, таких як Т-лімфоцити і макрофаги, завдяки чому формується врівноважена реакція імунної системи. Дослідження показали, що прийом певних штамів пробіотичних бактерій може зменшувати експресію генів, відповідальних за синтез прозапальних медіаторів, що, в свою чергу, сприяє регуляції запальних процесів. Взаємодія імунобіотиків з травною мікрофлорою також може стимулювати продукцію антибактеріальних пептидів, які допомагають зміцнити бар'єри організму проти патогенів. Це дозволяє уникнути надмірної активації імунних клітин і зменшити ризик розвитку хронічних запальних станів[60]. Як приклад,

пробіотик *L. plantarum* C88 запобігає індукованій секреції прозапальних цитокінів шляхом модуляції шляхів TLR2 та TLR4[30]. *Lactobacillus salivarius* показав свою ефективність модуляції вироблення цитокінів. Тобто за рахунок збільшення виробництва IL-12 та IFN- γ , одночасно знижується рівні IL-4 та IL-5[19].

Активація регуляторних Т-клітин

Одним із ключових механізмів є здатність імунобіотиків стимулювати утворення регуляторних Т-клітин, які пригнічують надмірну імунну відповідь. Дані клітини виділяють протизапальні цитокіни, такі як IL-10 та трансформувальний фактор росту бета (TGF- β), що сприяє підтриманню імунного гомеостазу та толерантності до антигенів, таких як білки їжі, а також антигени, пов'язані з нормальними мікрофлорними мікроорганізмами, що живуть в кишечнику[49,78,96]. Один із представників імунобіотичних штамів, а саме *Lactobacillus plantarum* у різних дослідженнях показав, що посилює реакції Т-регуляторних клітин(Treg). Він може стимулювати вироблення IL-10 і сприяти диференціації Tregs, тим самим сприяючи імунній регуляції та толерантності[49].

Вплив на поляризацію макрофагів

Імунобіотики можуть модулювати функцію макрофагів, сприяючи їхній поляризації до протизапального фенотипу. Макрофаги характеризуються активним виділенням протизапальних медіаторів і факторів, що сприяють загоєнню тканин. Вони відіграють ключову роль у процесі регенерації, оскільки сприяють формуванню нових судин (ангіогенезу), виділяють фактори росту, такі як TGF- β а також стимулюють синтез колагену, що забезпечує структурну цілісність рани. Ці механізми мають особливе значення для терапії хронічних запальних захворювань, оскільки активні макрофаги не лише зменшують запалення, але й ініціюють процеси загоєння, відновлюючи нормальну функцію тканин[78]. Такий пробіотичний мікроорганізм як *Lactobacillus acidophilus* LA1, що зменшує тяжкість коліту за рахунок зниження регуляції популяції класично активованих макрофагів(M1)³ та збільшення популяції альтернативно активованих макрофагів(M2)⁴ в черевній

³ M1(прозапальні макрофаги) - ефекторні клітини, які вбивають внутрішньоклітинні патогени.

⁴ M2(протизапальні, регенепативні макрофагти) – клітини, що сприяють загоєнню ран.

порожнині, що призводить до зменшення запалення. Комбінація *Bifidobacterium longum* CH57 і *Lactobacillus brevis* CH23 зменшує запалення, запобігаючи поляризації M1 макрофагів і збільшуючи експресію білка щільного з'єднання (TJ). А жива біомаса *Lactobacillus plantarum* CLP-0611 полегшує коліт шляхом поляризації M1 до M2-подібних макрофагів[81].

Зміцнення бар'єрної функції кишечника

Імунобіотики сприяють зменшенню проникності кишкового епітелію, що запобігає проникненню антигенів і патогенів у кровотік. Це важливо, оскільки надмірне навантаження на імунну систему патогенами може викликати її гіперактивацію. Завдяки зміцненню бар'єра, імунобіотики допомагають знизити навантаження на імунну систему[79]. Наприклад, було показано, що такі штами, як *Lactobacillus reuteri* та *Lactobacillus rhamnosus*, збільшують експресію білків TJ, тим самим зменшуючи проникність кишечника та покращуючи бар'єрну функцію[26].

Інгібування дендритних клітин

Деякі штами пробіотичних бактерій здатні знижувати активацію дендритних клітин, що сприяє зменшенню активації Т-лімфоцитів і, як наслідок, послабленню імунної відповіді. Це відіграє важливу роль у випадках алергічних реакцій та аутоімунних захворювань[49,34]. Пробіотичні мікроорганізми такі як *Lactobacillus rhamnosus* взаємодіє з дендритними клітинами таким чином, що пригнічують надмірну імунну відповідь. Він може індукувати виробництво регуляторних Т-клітин через вплив на DC, тим самим пригнічуючи надмірні імунні відповіді[25]. Подібно до *L.rhamnosus* , *L.casei* пригнічує прозапальні сигнали в дендритних клітинах, сприяючи більш збалансованій імунній відповіді та потенційно зменшуючи запалення при таких станах, як запальне захворювання кишечника[6].

РОЗДІЛ 2. Біотехнологічні аспекти розробки імунобіотиків

2.1. Життєздатна біомаса пробіотичних культур як основа імунобіотиків

Протеолітичні культури, зокрема штами *Lactobacillus delbrueckii* CRL581, мають великий потенціал для створення функціональних харчових продуктів, які не тільки сприяють кращому харчуванню, але й здатні модулювати імунну систему, щоб покращити перебіг вірусної діареї або інших кишкових інфекційних захворювань. Експерименти вченими проводились над окремими групами мишей, яким протягом 3 днів вводили перорально досліджувану культуру (10^8 КУО/миша/добу) та її гідролізати (300 мкг/миша/добу). В отриманих результатах зазначалось, що після проведення даних маніпуляцій у організмі мишей спостерігалось значне підвищення фагоцитарної (близько на 20%), мікробіцидної активності перитонеальних макрофагів та підвищений рівень секреторного імуноглобуліну класу А(IgA) – 0,003 мкг/л, інтерферону гамма(IFN- γ) – близько 0,23 мкг/л, інтерлейкіну(IL-10) – близько 0,58 мкг/л. У випадку з гідролізатами *L. delbrueckii* CRL581 значних змін за даними показниками не спостерігалось[20].

Проведені вченими дослідження стосовно *Lactobacillus casei* було спрямоване на оцінку захисного ефекту, який забезпечується життєздатними та нежиттєздатними клітинами *L.casei* в моделі системного токсоплазмозу у миші. Це дослідження зумовлене відомими властивостями пробіотичних культур стимулювати та модулювати імунну відповідь незалежно від їхньої життєздатності[60].

Вплив *L.casei* реалізується через активацію місцевого та системного імунітету, а також через стимуляцію макрофагів. Активовані макрофаги, в свою чергу, обмежують реплікацію внутрішньоклітинних найпростіших, таких як *Toxoplasma gondii*, шляхом виробництва оксиду азоту[60]. Але основною складністю боротьби з *T.gondii* є здатність паразита уникати цитотоксичного ефекту оксиду азоту шляхом його пригнічення вироблення в активованих макрофагах[103].

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Біотехнологічні аспекти розробки імунобіотиків			Літ.	Арк.	Акрушів	
Розроб.		Постоюк О.О.									
Перевір.		Старовойтова С.О.								17	84
								КАФЕДРА БТМ 17			
Н. Контр.											
Затверд.		Стабніков В.П.									

Протягом 14 днів різним групам мишам щоденно вводили внутрішньошлунково живі бактерії *Lactobacillus casei* у кількості 1×10^9 КУО/100 мкл. На 7-й день тварини були інфіковані паразитом *Toxoplasma gondii*. Введення як живих бактерій призвело до посилення імунної відповіді організму, що проявлялося у підвищенні активності макрофагів та виробництві прозапальних цитокінів: інтерферон-гамма (IFN- γ), фактор некрозу пухлини (TNF), інтерлейкін-6 (IL-6). Високі концентрації IFN- γ і TNF активували перитонеальні макрофаги та стимулювали вироблення внутрішньоклітинного оксиду азоту. Живі бактерії змогли знизити паразитарне навантаження на 53%[60].

Вченими вивчався взаємозв'язок між *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 і імунобіотичною культурою, епітеліальними клітинами кишечника свиней та антигенпрезентуючими клітинами з псерових бляшок *in vitro*, щоб краще зрозуміти механізми, через які цей штам може запобігати виникненню вірусної діареї[79].

Результати показали, що *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 індукує інтерферон-альфа (IFN- α) та бета (IFN- β) в епітеліальних клітинах кишечника свиней, а також покращує виробництво IFN типу I. Спостерігалось також збільшення експресії мРНК IL-6 і TNF- α через толл-подібний рецептор 2 (TLR2) в епітеліальних клітинах кишечника свиней. Окрім зазначених вище даних також згадувалось збільшення експресії інтерлейкіну 1 бета (IL-1 β), IL-6 та IFN- γ , IL-10 в антигенрезистуючих клітинах[79].

Вірус грипу, що належить до родини *Orthomyxoviridae*, має РНК-геном та високу здатність до поширення, викликаючи респіраторні захворювання різної тяжкості. У важких випадках грип може призвести до запалення легень та порушення системи згортання крові, спричиняючи утворення тромбів в судинах, зокрема легень. Це ускладнює кровообіг, зменшує доставку кисню до тканин та може призвести до гострої дихальної недостатності.[86]. Тому, для вирішення даного питання було проведено дослідження та оцінка впливу носового введення живих і термічно інактивованих *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 на імунно-коагулятивну відповідь під час інфекції. Для цього використовували мишей, яким двічі на день через ніс

вводили живі або термоінактивовані *L.rhamnosus* протягом двох днів. Після цього, мишей інфікували вірусом грипу і аналізували результати через 14 днів експерименту[86].

Як живий так і інактивований штам бактерій ефективно знижував вірусне навантаження в легенях та пом'якшував запальну реакцію. Ці ефекти були досягнуті завдяки комплексу механізмів:

- Збалансування протизапальних цитокінів IL-10 задля зменшення запальних процесів.
- Активація інтерферонів I типу, що сприяло більш ефективному пригніченню реплікації вірусу.
- Підвищення активності Т-хелперів. Збільшення кількості CD4⁺⁵ IFN-γ лімфоцитів вказує на посилення клітинного імунітету, що є важливим для елімінації внутрішньоклітинних патогенів, таких як віруси.
- Оптимізація роботи антигенпрезентуючих клітин. Дендритні клітини відіграють центральну роль в ініціації адаптивного імунітету. Збільшення кількості та активація цих клітин сприяла ефективнішій презентації вірусних антигенів Т-лімфоцитам[86].

Дослідження щодо модуляції імунної відповіді *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 стосувались також пневмококової інфекції викликаной *Streptococcus pneumoniae*. Під час експерименту штам вводили мишам перорально 2 дні підряд у дозуванні 10⁸ КУО/миша. Після цього провели відповідні аналізи стосовно зміни певних показників в крові. Спостерігалось збільшення CD3, CD4, IFN-γ, Т-клітин у кишечнику, індукції їх мобілізації у слизові оболонки дихальних шляхів та покращення стимуляції продукування IFN-γ та активності антигенпрезентуючих клітин легенів[87].

Lactobacillus plantarum NCIMB 8826 є перспективним імунобіотиком, здатним запобігати летальним наслідкам респіраторної вірусної інфекції. Дослідження на мишах показали, що введення *L.plantarum* NCIMB 8826 до зараження вірусом або після

⁵ CD4(cluster of differentiation 4) є глікопротеїном, який служить корецептором для Т -клітинного рецептора, що знаходиться на поверхні імунних клітин.

нього сприяє формуванню специфічного протизапального профілю, що значно знижує смертність. Контакт дихальних шляхів з цим штамом зменшує експресію ключових прозапальних медіаторів, таких як IL-6, CCL2, CXCL10 та інших, що знижує тяжкість вірусного ураження[53].

Поведені вченими дослідження показали, що *L.plantarum* обмежує вірусну реплікацію в легеневій тканині, зменшує кількість нейтрофілів у легенях і пом'якшує запальні процеси. Крім того, захисний ефект штаму не залежить від цитокіну IL-10, що вказує на інші механізми імуномодуляції. *L.plantarum* взаємодіє з рецепторами розпізнавання патернів, такими як TLR2 та NOD2, активуючи сигнальні шляхи, характерні для грампозитивних бактерій. Отримані результати підтвердили, що введення *L.plantarum* забезпечує повний захист від летальних наслідків інфекції навіть у мишей із видаленими рецепторами TLR2, NOD2 або рецепторами до інтерферонів типу I, що демонструє універсальність імуномодулюючих властивостей цього штаму[53].

Пандемія COVID-19 стала викликом для сучасної медицини, висвітливши обмеження традиційних терапевтичних підходів. У пошуках ефективних профілактичних і лікувальних засобів особливу увагу заслуговують бактеріотерапевтичні препарати, зокрема пробіотики, що сприяють підтриманню імунного балансу через вплив на кишкову мікробіоту. Ці препарати впливають на стан кишкової мікробіоти, яка відіграє важливу роль у регуляції імунної системи. Дослідження підтверджують, що порушення балансу мікробіоти кишечника корелює із тяжкістю перебігу COVID-19, особливо у людей похилого віку, які часто страждають на дисбіоз. Зменшення кількості корисних бактерій, таких як *Bifidobacterium adolescentis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, та інших, може призводити до підвищення рівня прозапальних цитокінів, що провокують сильні запальні реакції. Високий рівень *Eubacterium rectale* у кишечнику пов'язаний зі зниженням запального процесу при хворобі Альцгеймера, тоді як *Bifidobacterium adolescentis* можуть пригнічувати активацію ядерного фактора κB, що стимулює вироблення прозапальних цитокінів. Доведено, що мікробіота кишечника модулює імунну відповідь через двонаправлений зв'язок між кишечником і легеньми. Ця так звана вісь

"кишечник-легені" функціонує за рахунок метаболітів, які транспортують кровоток і впливають на роботу імунної системи в різних органах, включаючи легені. Пробіотики демонструють значний терапевтичний потенціал, оскільки можуть пригнічувати «цитокіновий шторм», характерний для важких форм COVID-19. Вони впливають на імунну відповідь через стимуляцію макрофагів, дендритних клітин і регуляторних Т-лімфоцитів, а також підсилюють секрецію імуноглобуліну А (IgA), що важливо для боротьби з вірусами. Крім того, пробіотики здатні коригувати дисбіоз, що погіршується внаслідок антибіотикотерапії, та зменшувати шлунково-кишкові симптоми COVID-19. Використання бактеріотерапевтичних препаратів є не лише перспективним терапевтичним підходом, але й дієвим профілактичним засобом. Вони можуть допомогти у зміцненні імунітету та зниженні ризику інфікування під час нової хвилі COVID-19. Функціональні продукти харчування, збагачені пробіотичними мікроорганізмами, є доступним, безпечним і ефективним доповненням до сучасної терапії, особливо серед групи ризику[69].

Дослідження вченими на порослячих епітеліальних клітинах кишечника показали, що живі клітини *L.rhamnosus* CRL1505 сприяють виробленню IFN- α та IFN- β , незалежно від сигналізації TLR2 або TLR9. У епітеліальних клітинах кишечника після стимуляції TLR4 *L.rhamnosus* CRL1505 також спостерігається регуляція експресії CD40, CD80 і CD86, вироблення як прозапальних(TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6), так і протизапальних(IL-10) цитокінів. Це свідчить про здатність CRL1505 забезпечувати імунозахисний ефект, незалежно від активованого сигнального шляху TLR[63].

У тваринній промисловості також постає важлива задача пошуку ефективних і безпечних альтернатив антибіотикам для підтримки здоров'я та продуктивності бройлерних курчат. У цьому дослідженні було проведено порівняння ефектів пробіотика *Lactobacillus plantarum* P-8 і антибіотиків на імунобіотичні властивості та показники росту бройлерів протягом 42-денного експерименту. Результати засвідчили, що P-8 забезпечує подібні переваги у прирості ваги, споживанні корму та ефективності його використання, як і антибіотики. Водночас P-8 активував захисні імунні реакції у бройлерів, чого не спостерігалось у групі з антибіотиками[83].

Протягом дослідження імунобіотичний штам значно підвищував рівень секреторного IgA у фекаліях на 42-й день та кількість IgA лімфоцитів у єюнімі та пейєрових бляшках, перевищуючи показники як контрольної групи, так і групи з антибіотиками. У той час як антибіотики знижували кількість IgA лімфоцитів у цих ділянках. Р-8 також сприяв збільшенню кількості CD3 і CD4 Т-клітин на 42% та 81% у тканинах кишечника, значно перевершуючи антибіотики та контрольну групи. Цікаво, що Р-8 стимулював як Т-хелпери (Th1), так і Th2-цитокінову відповідь на ранніх етапах дослідження, що підтверджує його пробіотичну користь[83].

2.2. Нежиттєздатна біомаса та структурні компоненти клітини в ролі імунобіотиків

Респіраторно-вірусна атака спричиняє легку або більшу інфекцію, але може ускладнюватися вторинним зараженням *Streptococcus pneumoniae*. Вірус пошкоджує епітелій та руйнує мукоциліарний кліренс, що сприяє прилипанню пневмококів до дихальних шляхів. Це стає особливою небезпекою для немовлят, людей похилого віку та осіб з ослабленим імунітетом. Тому, для вирішення питання з вторинною інфекцією вченими було запропоновано використати імунобіотики, аби сприятливо вплинути на вроджену імунну відповідь та імунну відповідь слизової оболонки. Як досліджуваний зразок було обрано нежиттєздатний *L.rhamnosus* CRL1505 та його пептидоглікан[14].

Дослідження вченими проводилось на моделі декількох груп новонароджених мишей, яким протягом 2 днів вводили назально нежиттєздатні клітини та пептидоглікан імунобіотика в кількості 10^8 КУО/миша/день та 8 мкг/мл відповідно. Контрольна група отримувала тільки збалансоване харчування. Введення вірусу проводилось на 3 день після імунобіотиків, а зараження пневмококами – 1,3,5 дні після введення вірусу в організм мишей. І тільки вже через два дні, після інфікування *S.pneumoniae* проводили контроль стану легенів мишей[14]. В результатах дослідження було вказано, що пептидоглікан пробіотичного штаму зберігає особливості до імунної регуляції як і життєздатний штам *L.rhamnosus* CRL1505. Імунобіотик з петидоглікану посилював експресію генів, індукованих інтерфероном, які протидіють реплікації вірусу. Петидоглікан CRL1505 покращив виробництво деяких цитокінів (TNF- α , IL-10), водночас знизив рівні інших прозапальних факторів

(IL-6, MIP-1), що вказує на те, що запальна відповідь диференційовано модулюється. Окрім даних показників імунної відповіді також підвищились рівні кластеру диференціації (CD3+), Т-хелперні клітини (CD4+), інтерферону II типу (IFN- γ) та дендритні клітини. А присутність IFN- γ серед вище наведених показників вказує на генерацію відповіді Т-хелперів (Th1), що активують клітинну імунну відповідь через активацію макрофагів[14].

Дефензини виступають важливими компонентами вродженої імунної системи, що допомагають в інтеграції вроджених і адаптивних імунних реакцій. Тому його індукція є немало важливим процесом. І саме в цьому процесі може допомогти пептидоглікан, що був отриманий з пробіотичного штаму *Lactobacillus rhamnosus* MLGA вбитого теплом. Відбувається даний процес шляхом індукції пептидогліканом експресію гена AvBD9 в різних типах клітин (епітеліальних клітини тонкої кишки, спленоцитах, тимоцитах, гепатоцитах). Максимальний ефект в залежності від дози та типу клітин спостерігався:

- у первинних епітеліальних клітинах при дозуванні пептидоглікану 50 мкг/мл, через 4 години;
- спленоцити та гепатоцити при дозуванні пептидоглікану 50 мкг/мл, через 6 годин[29].

Але у тимоцитах індукція AvBD9 не залежала від часу, що вказує на клітинно-специфічну регуляцію цього процесу пептидогліканом *L.rhamnosus* MLGA[29].

Недоїдання характеризується як стан, під час якого в організм хазяїна не надходить достатня кількість енергії, макро- та мікроелементів. І даний стан тісно пов'язаний з вторинним імунітетом і його функціонуванням проти інфекційних агентів. Імунобіотики можуть забезпечити підтримання нормального покоління імунних клітин, що має вирішальне значення для встановлення захисних вроджених і адаптивних імунних реакцій. У даному дослідженні вчені пропонували розглянути пептидоглікан *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505, як фактор впливу на імунітет слизової оболонки. Експеримент проводився на моделі мишей, яким назально вводили як живий штам так CRL1505 та його пептидоглікан. Миші, які страждають від недостатнього харчування і позбавлені білка, мають труднощі з ліквідацією

легеневого патогена. Оскільки, з одного боку, їхні альвеолярні макрофаги виробляють низькі рівні медіаторів, необхідних для рекрутування, таких як TNF- α , IL-1 β та IL-6 на місцевому та системному рівні. З іншого – популяція нейтрофілів, моноцитів, макрофагів і дендритних клітин порушується через недостатнє харчування[62].

Назальне введення *L.rhamnosus* CRL1505 та його пептидоглікану за нормальної дієти викликає підвищену стійкість до *S.pneumoniae*. На це вказувало швидка елімінація інфекційного мікроорганізму, зменшення уражених ділянок легенів.

У випадку коли миші страждали від недоїдання, під час назального введення пептидоглікану і пробіотичного штаму спотерігалось:

- збільшення кількості лейкоцитів, що викликали рекрутуванням нейтрофілів на альвеолярному рівні;
- нормалізування рівні TNF- α , IL-1 β та IL-6 під час вродженої імунної відповіді на проти *S.pneumoniae*;
- збільшення кількості зрілих Т-клітин(CD4, регуляторні Т-клітини)[62].

Пептидоглікан та нежиттєздатна біомаса штаму *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 мають значний вплив на посилення імунної відповіді, особливо у випадках імунодефіциту, викликаного недостатнім харчуванням. Дослідження показали, що використання нежиттєздатного штаму бактерій або його компонентів (клітинна стінка або пептидоглікан) значно покращує імунну функцію та захищає організм від бактеріальних інфекцій[41].

Зокрема, застосування нежиттєздатної біомаси *L.rhamnosus* CRL1505 виявилось високоефективним у підвищенні стійкості до *Streptococcus pneumoniae*. У виснажених мишей, які отримували її разом із дієтою, патоген взагалі не виявлявся у легенях і крові. Цей ефект був аналогічним впливу пептидоглікану та клітинної стінки бактерій, що свідчить про здатність нежиттєздатної біомаси стимулювати імунну систему на рівні, порівнянному з окремими компонентами клітинної стінки. Нежиттєздатна біомаса також знижувала рівень пошкодження легеневої тканини спричиненого інфекцією. У групах, які отримували нежиттєздатні клітини

імунобіотика, спостерігалися мінімальні запальні процеси, відсутність крововиливів і збереження альвеолярної структури. Рівні лактатдегідрогенази (LDH) та альбуміну в бронхоальвеолярній рідині також були значно нижчими, що вказує на зниження загальної цитотоксичності й покращення бар'єрної функції легень[41].

Крім того, нежиттєздатна біомаса посилювала вроджену імунну відповідь через збільшення кількості лейкоцитів, макрофагів і нейтрофілів як у крові, так і в бронхоальвеолярній рідині. Також він сприяв підвищенню рівнів прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-1 β , IL-6) та протизапального IL-10, що забезпечувало збалансовану імунну реакцію. У багатьох випадках нежиттєздатна біомаса стимулювала ці показники до рівня, порівнянного або навіть вищого, ніж у мишей з хорошим харчуванням. Дослідження активності макрофагів також підтвердило, що нежиттєздатний штаб значно покращує функціональну здатність імунних клітин. Після стимуляції макрофагів термічно інактивованими пневмококами спостерігалось підвищення експресії прозапальних цитокінів і рецепторів розпізнавання патернів (TLR2, TLR9)[41].

Деактивовані UV-опроміненням клітини *L.rhamnosus* CRL1505 зберігають мембранну цілісність та залишкову ферментативну активність, демонструючи функціональну імуномодуляцію та підвищену стійкість до пневмококових інфекцій. Вони сприяли виробленню і регуляції прозапальних (TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6), так і протизапальних (IL-10) цитокінів, а також експресії CD40, CD80 і CD86. Крім того, здатність деактивованих клітин стимулювати виробництво цитокінів TNF- α , IL-1 β і IL-6 підкреслює їх потенціал як мукозальних ад'ювантів для розробки нових вакцин[63].

Клітинна стінка та пептидоглікан *L.rhamnosus* CRL1505 також модулюють імунну відповідь після активації TLR4, але з різною ефективністю. Клітинна стінка краще стимулює TNF- α , IL-6 і IL-8, тоді як пептидоглікан ефективніше підвищує IL-10, що дозволяє використовувати клітинну стінку як імуноад'ювант, а пептидоглікан – для захисту від інфекцій без запальних ушкоджень[63].

Два пробіотичні штаби *Lactobacillus casei* CRL431 та *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1518 були обрані вченими для розгляду через їх імуномодулюючі

властивості. В умовах дефіциту безпечних і ефективних пероральних ад'ювантів для імунізації дослідження було зосереджено на вивчених ад'ювантних властивостях пробіотиків та їх клітинних стінок у процесі вакцинації теплово інактивованою *Salmonella typhimurium*. Отримані вченими дані свідчать, що молекули клітинної стінки даних штамів сприяють зміцненню кишкового бар'єру та стимулюють секрецію IgA. Окрім того було вказано, що пробіотики можуть посилити гуморальну імунну відповідь, підвищуючи титри антитіла. Відповідно до даних, ввівши молекули їх бактеріальних стінок разом із теплово-інактивованою *S.typhimurium* вони лише помірно посилювало опосередковану антитілами фагоцитарну активність макрофагів, що впливає на можливу стимуляцію IgA. Переважання клітинно-опосередкованої відповіді типу Th1 підтверджує підвищений рівень IFN- γ і зниження IL-4, що пригнічує гуморальну відповідь типу Th2. Також, молекули клітинної стінки стимулюють секрецію прозапальних цитокінів TNF- α , IL-12(бере участь у диференціюванні наївних Т-клітин) та IL-6[43].

Автори одного із досліджень оцінювали захисний ефект нежиттєздатних клітин *Lactobacillus casei* у моделі системного токсоплазмозу у миші. Було встановлено, що навіть мертві бактерії здатні стимулювати та модулювати імунну відповідь. Протягом 14 днів мишам внутрішньошлунково вводили мертві *L.casei* у кількості 1×10^9 КУО/100 мкл[60].

Введення мертвих бактерій спричинило посилення імунної відповіді речовин, що проявляється у підвищеній активності макрофагів та виробленні прозапальних цитокінів: інтерферон-гамма (IFN- γ), фактор некрозу факторів (TNF) та інтерлейкін-6 (IL-6). Ці фактори активували перитонеальні макрофаги та стимулювали вироблення внутрішньоклітинного оксиду азоту. У результаті паразитарне навантаження втратилося на 17,3%[60].

Але окрім раніше розглянутих форм імунобіотиків(жива біомаса, пептидоглікан, клітинна стінка і т.п.) для регуляції імунних процесів організмі також може використовуватись бактеріальний лізат. Як от проведені вченими дослідження стосовно здатності нормального та підданого тепловому шоку лізату клітин

Lactobacillus plantarum PTCC 1058 впливати на експресію цитокінів у моноклеарних клітинах периферичної крові (PBMC) людини[64].

Для отримання лізатів використовували клітини *L. plantarum* у середині експоненціальної фази росту (10^8 КУО/мл). Ізольовані PBMC інкубували протягом 72 годин зі 100 мкг/мл нормального або підданого тепловому шоку лізату клітин. В результатах отримали, обидва типи лізатів сприяли збільшенню продукції прозапальних цитокінів та зниженню рівня протизапальних цитокінів. Однак вплив лізату, підданого тепловому шоку, був значно вираженішим. Було виявлено підвищення рівня мРНК IL-6, IFN- γ ⁶ і TNF- α , особливо у зразках з термічною обробкою. Серед прозапальних цитокінів найінтенсивніше продукувався IFN- γ , а за ним слідували IL-6 і TNF- α . При обробці лізатами *L. plantarum* також спостерігалось зниження експресії IL-10 і TGF- β , особливо виражене в групі з термічною обробкою. Це свідчить про поляризацію імунної відповіді за типом Th1, що може сприяти профілактиці інфекцій, алергій та онкологічних захворювань[64].

Проте, як імуномодулюючий чинник можуть використовувати не тільки пробіотичні штами, але і інші бактеріальні штами, такі як: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*[22].

Проведені вченими дослідження стосовно полівалентних бактеріальних лізатів на основі *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*. Для експериментів використовували лізати з різними методами руйнування клітин – механічними(центрифугування) та хімічними(лужна обробка). Проте, незалежно від методу отримання, лізати сприяють стійкості до інфекцій за рахунок активації TLR-сигналіну. Одним із ключових механізмів дії бактеріальних лізатів є рекрутинг нейтрофілів у легені, навіть за відсутності антитіл. Вони стимулюють продукцію хемокінів CXCL-1⁷ і IL-8, що сприяє швидкому залученню нейтрофілів для боротьби з патогенами. Також PBLs індують експресію антимікробних білків [22].

Лізат *Lactobacillus rhamnosus* чинить складний вплив на імунну систему, особливо у відповідь на запалення епітелію ясен викликане *Porphyromonas gingivalis*.

⁶ IFN- γ відіграє ключову роль в активації макрофагів, диференціації Т-хелперів та противірусній відповіді.

⁷ CXCL-1 – білок, що задіюється при запальних відповідях.

Він регулює рівень запальних цитокінів: підвищує експресію IL-1 β , TNF- α , IL-6 в інфікованих клітинах епітелію ясен. Важливо зазначити, що лізат *L.rhamnosus*, на відміну від його живих клітин, сприяє підвищенню рівня запальних цитокінів у присутності патогену[74].

Окрім цього, він впливає на Toll-подібні рецептори, що беруть участь у розпізнаванні бактеріальних патогенів. Лізат підвищує експресію TLR2, тоді як у неінфікованих клітинах *L.rhamnosus* знижує експресію TLR4. Однак у клітинах, інфікованих *P.gingivalis*, ці ж компоненти, навпаки, сприяють підвищенню TLR4. Лізат *L.rhamnosus* мають антагоністичний ефект щодо *P.gingivalis*, значно пригнічуючи його ріст після 24–30 годин інкубації. Таким чином, лізат *L.rhamnosus* модулює імунну відповідь, активуючи запальні механізми при наявності інфекції, але водночас пригнічуючи надмірне запалення у неінфікованих умовах, що робить його перспективним засобом для корекції імунітету та контролю запальних процесів[74].

Крім того, також вченими досліджувався вплив лізатів клітин *Lactobacillus plantarum* на регуляцію імунної системи та лікування запальних захворювань, зокрема atopічного дерматиту[37].

Для оцінки впливу експеримент проводився на моделі мишей з atopічним дерматитом, яких утримували в контрольованих умовах. Тварини отримували пероральне введення лізатів *L.plantarum* (250 мг/кг/день). В результаті було виявлено, що така терапія значно знижує потовщення епідермісу, зменшує утворення рогового шару і сприяє відновленню бар'єрної функції шкіри[37].

Додатково досліджувався вплив лізатів на імунну відповідь. Аналіз продукції цитокінів у перитонеальних макрофагах мишей показав, що введення *L.plantarum* лізатів стимулює продукцію IL-12 і IFN- γ , одночасно пригнічуючи IL-4. Також спостерігалось зниження рівня специфічного IgE, що свідчить про посилення Th1-відповіді і пригнічення Th2-реакцій[37].

Узагальнена характеристика штамів з імуномодуючою дією

Біологічний агент	Основа імунобіотика	Дозування	Механізм дії	Джерело
1	2	3	4	5
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> CRL581	Біомаса	1×10^8 КУО/мл	Активация вродженого імунітету	Elean, M., Albarracín, L., Cataldo, P. G., Londero, A., Kitazawa, H., Saavedra, L., ... Hebert, E. M. (2020). New immunobiotics from highly proteolytic <i>Lactobacillus delbrueckii</i> strains: their impact on intestinal antiviral innate immune response. <i>Beneficial Microbes</i> , 1–16. doi:10.3920/bm2019.0198
<i>Lactobacillus casei</i>	Біомаса	1×10^9 КУО/100 мкл	Підвищення мікробіцидної активності перитонеальних макрофагів та цитокінів	Salas-Lais, A. G., Robles-Contreras, A., Balderas-López, J. A., & Bautista-de Lucio, V. M. (2020). Immunobiotic and Paraprobiotic Potential Effect of <i>Lactobacillus casei</i> in a Systemic Toxoplasmosis Murine Model. <i>Microorganisms</i> , 8(1), 113. https://doi.org/10.3390/microorganisms8010113
	Термічно інактивована біомаса	1×10^9 КУО/100 мкл		
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505	Біомаса	1×10^8 КУО/мл	Регуляція рівню інтерферонів I типу, легеневиx лімфоцитів та дендритних клітин. Модулювання імунної відповіді, викликану легенеvim TLR3	Zelaya, H., Villena, J., Lopez, A. G., Alvarez, S., & Agüero, G. (2014). Modulation of the inflammation-coagulation interaction during pneumococcal pneumonia by immunobiotic <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505: Role of Toll-like receptor 2. <i>Microbiology and Immunology</i> , 58(7), 416–426. doi:10.1111/1348-0421.12163
	Термічно інактивована біомаса	10^8 клітин/миша		

<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505	Біомаса	1×10^8 КУО/мл	Взаємодія з Toll-подібними (TLR) рецепторами	Zelaya, H., Villena, J., Lopez, A. G., Alvarez, S., & Agüero, G. (2014). Modulation of the inflammation-coagulation interaction during pneumococcal pneumonia by immunobiotic <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505: Role of Toll-like receptor 2. <i>Microbiology and Immunology</i> , 58(7), 416–426. doi:10.1111/1348-0421.12163
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505	Термічно інактивована біомаса	10^8 клітин/миша	Індукція імунітету Th1-шляхом, підвищує експресію тромбомодуліну(ТМ) та фактор згортання крові(TF)	Clua, P., Kanmani, P., Zelaya, H., Tada, A., Kober, A. K. M. H., Salva, S., Villena, J. (2017). Peptidoglycan from Immunobiotic <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Improves Resistance of Infant Mice to Respiratory Syncytial Viral Infection and Secondary Pneumococcal Pneumonia. <i>Frontiers in Immunology</i> , 8. doi:10.3389/fimmu.2017.00948
	Пептидоглікан	8 мкг/мл		
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> MLGA	Пептидоглікан	50 мкг/мл	Експресія β -дефензину без активації експресії асоційованих прозапальних цитокінів	Huang, J., Li, J., Li, Q., Li, L., Zhu, N., Xiong, X., & Li, G. (2020). Peptidoglycan derived from <i>Lactobacillus rhamnosus</i> MLGA up-regulates the expression of chicken β -defensin 9 without triggering an inflammatory response. <i>Innate immunity</i> , 26(8), 733–745. https://doi.org/10.1177/1753425920949917
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB 8826	Біомаса	2×10^{10} КУО/мл	Індукція IL-10 <i>in vitro</i> з клітин THP-1 моноцитів. Також взаємодіє з PRR NOD2 і TLR2	Percopo, C. M., Rice, T. A., Brenner, T. A., Dyer, K. D., Luo, J. L., Kanakabandi, K., Sturdevant, D. E., Porcella, S. F., Domachowske, J. B., Keicher, J. D., & Rosenberg, H. F. (2015). Immunobiotic <i>Lactobacillus</i> administered post-exposure averts the lethal sequelae of respiratory virus infection. <i>Antiviral research</i> , 121, 109–119. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.07.001

<i>Lactobacillus casei</i> CRL431	Біомаса	1×10^8 КУО/мл	Індукція імунітету Th1-шляхом	Lemme-Dumit, J. M., Cazorla, S. I., Perdigon, G. D. V., & Maldonado-Galdeano, C. (2021). Probiotic Bacteria and Their Cell Walls Induce Th1-Type Immunity Against Salmonella Typhimurium Challenge. <i>Frontiers in immunology</i> , 12, 660854. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.660854
	Клітинна стінка	8 мкг/мкл		
<i>Lactobacillus paracasei</i> CNCM I-1518	Біомаса	1×10^8 КУО/мл	Індукція імунітету Th1-шляхом	Sanaei M, Mahdavi M, Setayesh N, Shahverdi AR, Sepehrizadeh Z, Yazdi MH. Comparison of Cytokine Expression in Human PBMCs Stimulated with Normal and Heat-Shocked <i>Lactobacillus plantarum</i> Cell Lysate. <i>Probiotics Antimicrob Proteins</i> . 2021 Dec;13(6):1539-1545. doi: 10.1007/s12602-021-09785-5. Epub 2021 Apr 11. PMID: 33843030.
	Клітинна стінка	8 мкг/мкл		
<i>Lactobacillus plantarum</i> PTCC 1058	Лізат отриманий механічним або хімічним шляхом	100 мкг/мл	Індукція імунітету Th1-шляхом	Vale, G. C., & Mayer, M. P. A. (2021). Effect of probiotic <i>Lactobacillus rhamnosus</i> by-products on gingival epithelial cells challenged with Porphyromonas gingivalis. <i>Archives of Oral Biology</i> , 128, 105174. doi:10.1016/j.archoralbio.2021.105174
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Лізат отриманий механічним шляхом	250 мкл	Індукція імунітету Th4-шляхом	Kim, H., Kim, H. R., Kim, N.-R., Jeong, B. J., Lee, J. S., Jang, S., & Chung, D. K. (2014). Oral administration of <i>Lactobacillus plantarum</i> lysates attenuates the development of atopic dermatitis lesions in mouse models. <i>Journal of Microbiology</i> , 53(1), 47–52. doi:10.1007/s12275-015-4483-z
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Лізат отриманий методом ультразвукової деструкції	250 мг/кг/день	Індукція імунітету Th1-шляхом	

РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору біологічного агента

В сучасних умовах охорони здоров'я актуальність використання біологічно активних засобів зростає з кожним роком. Особливе місце в цьому спектрі займають імунобіотики, які є інноваційними препаратами, що базуються на використанні корисних мікроорганізмів. Такі засоби спрямовані не лише на загальне зміцнення імунітету, але й на збалансування мікробіома організму, що є ключовим фактором у підтриманні здоров'я.

Вибір біологічного агента для використання в якості імунобіотика ґрунтується на розумінні складних взаємодій між мікробіотою кишечника та імунною системою. Але крім цих факторів, не менш важливими є оцінка продуктивності продуцента, складу поживного середовища, його вартості, а також багатьох інших аспектів.

Серед імунобіотичних штамів було обрано *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus casei*.

Опираючись на дані з *таблиці 1.1.* ми можемо побачити, що КУО серед трьох обраних штамів різняться. Найбільша КУО/мл за час культивування(24 год.) відслідковується у штамів *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 і *Lactobacillus casei*(1×10^9). Проте, слід враховувати, що нам необхідно отримати саме кількість біомаси в г/л. Оскільки ми не можемо розрахувати вихід біомаси за концентрацією клітин та складом поживного середовища, приймаємо умовний цільовий вихід біомаси 6 г/л для подальших розрахунків.

За *таблицею 1.2.* можемо порівняти ціни за 1 літр поживного середовища, що використовується при культивуванні. Для *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus casei* використовуються бульйон MRS, що є досить поширеним середовищем для лактобактерій. Проте його використання в промислових масштабах є доволі дорогим. Тому перевага надається *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505, чие середовище є дешевшим в порівнянні з іншими штамми(26,97 грн/л).

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору біологічного агента	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Постояк О.О.						
Перевір.		Старовойтова С.О.					32	84
						КАФЕДРА БТМ 32		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Успішне та економічне промислове вирощування лактобактерій значною мірою залежить від поживного середовища. Ці бактерії є ауксотрофними, тобто для росту їм потрібні специфічні поживні речовини, що робить їх дуже чутливими до складу середовища. Хоча середовище MRS є «золотим» стандартом, його вартість є надто високою для великомасштабного виробництва. Отже, розробка дешевших альтернативних поживних середовищ є надзвичайно важливою для розвитку виробництва пробіотиків. Тому для вирішення вибору біологічного агента, будемо опиратись саме на вартість поживного середовища і умовну вартість продукту. І серед представлених варіантів економічно вигідним є *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505.

Особливості одержання біомаси на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування	Концентрація клітин, КУО/мл	Особливості біоситезу	Використана література
	компонент	Концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505	Пептон Дріжджовий екстракт Лактоза MnSO ₄ MgSO ₄ KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄	5 10 20 0,04 0,05 5,6 3,6	24 год	1×10 ⁹	Періодичне культивування t=24 год T=37 °C pH 6.0	Correa Deza, M. A., Salva, S., Grillo-Puertas, M., Font, G. M., & Gerez, C. L. (2023). Effect of culture parameters on the heat tolerance and inorganic polyphosphate accumulation by <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505, a multifunctional bacterium. <i>World journal of microbiology & biotechnology</i> , 39(7), 182. https://doi.org/10.1007/s11274-023-03625-0
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB 8826	Глюкоза Пептон м'ясний екстракт дріжджовий екстракт K ₂ HPO ₄ Tween ® 80 C ₆ H ₁₇ N ₃ O ₇ CH ₃ COONa MnSO ₄ MgSO ₄	20,0 10,0 8,0 4,0 2,0 1,0 2,0 5,0 0,2 0,04	24 год	1×10 ⁷	Періодичне культивування t=24 год T=37 °C pH 7.0	Percopo, C. M., Rice, T. A., Brenner, T. A., Dyer, K. D., Luo, J. L., Kanakabandi, K., Sturdevant, D. E., Porcella, S. F., Domachowske, J. B., Keicher, J. D., & Rosenberg, H. F. (2015). Immunobiotic <i>Lactobacillus</i> administered post-exposure averts the lethal sequelae of respiratory virus infection. <i>Antiviral research</i> , 121, 109–119. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.07.001
<i>Lactobacillus casei</i>	Глюкоза Пептон м'ясний екстракт дріжджовий екстракт K ₂ HPO ₄ Tween ® 80 C ₆ H ₁₇ N ₃ O ₇ CH ₃ COONa MnSO ₄ MgSO ₄	20,0 10,0 8,0 4,0 2,0 1,0 2,0 5,0 0,2 0,04	24 год	1×10 ⁹	Періодичне культивування t=24 год T=37 °C pH 7.0	Salas-Lais, A. G., Robles-Contreras, A., Balderas-López, J. A., & Bautista-de Lucio, V. M. (2020). Immunobiotic and Paraprobiotic Potential Effect of <i>Lactobacillus casei</i> in a Systemic Toxoplasmosis Murine Model. <i>Microorganisms</i> , 8(1), 113. https://doi.org/10.3390/microorganisms8010113

Таблиця 3.3.

Вартість поживних середовищ для культивування

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації *
1	2	3	4	5	6
Lactobacillus rhamnosus CRL1505	Пептон	5	1300	6,5	1
	Дріжджовий екстракт	10	1800	18	
	Лактоза	20	58	1,16	
	MnSO ₄	0,04	95	0,01	
	MgSO ₄	0,05	50	0,01	
	KH ₂ PO ₄	5,6	150	0,84	
	Na ₂ HPO ₄	3,6	125	0,45	
	Вартість 1 л середовища – 26,97 грн				
Lactobacillus plantarum NCIMB 8826	Глюкоза	20,0	68	1,36	1
	Пептон	10,0	1300	13	
	м'ясний екстракт	8,0	7296	58,37	2
	Дріжджовий екстракт	4,0	1800	7,2	1
	K ₂ HPO ₄	2,0	348	0,696	
	Tween ® 80	1,0	330	0,33	3
	C ₆ H ₁₇ N ₃ O ₇	2,0	580	1,16	1
	CH ₃ COONa	5,0	151	0,755	
	MnSO ₄	0,2	95	0,02	
	MgSO ₄	0,04	50	0,01	
	Вартість 1 л середовища - 82,90 грн				
	Lactobacillus casei	Глюкоза	20,0	68	1,36
Пептон		10,0	1300	13	
м'ясний екстракт		8,0	7296	58,37	2
дріжджовий екстракт		4,0	1800	7,2	1
K ₂ HPO ₄		2,0	348	0,696	
Tween ® 80		1,0	330	0,33	3
C ₆ H ₁₇ N ₃ O ₇		2,0	580	1,16	1
CH ₃ COONa		5,0	151	0,755	
MnSO ₄		0,2	95	0,02	
MgSO ₄		0,04	50	0,01	
Вартість 1 л середовища - 82,90грн					

Примітка. * - ціни наведено станом на січень 2025 р. 1 – prom.ua, 2 – lab-mir.com, 3 - shop.hlr.ua

Таблиця 3.2.

Умовна вартість 1 г цільового продукту, синтезованих на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного цільового продукту за годину, г/л,	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505	6	24	0,25	26,97	107,88
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB 8826	6	24	0,25	82,90	331,6
<i>Lactobacillus casei</i>	6	24	0,25	82,90	331,6

Узагальнюючи проведені вище підрахунки і складені відповідні таблиці(таблиця 3.1.-3.2.), можемо дійти висновку, що серед запропонованих біологічних агентів, найвигіднішим є штам *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505.

РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування виробництва імунологічного препарату на основі лізату клітин *Lactobacillus rhamnosus*

4.1. Характеристика лізату

Лізат належить до класу *постбіотиків*, які визначаються як інактивовані мікроорганізми та/або їхні компоненти, що надають користь здоров'ю господаря[5]. Лізат отримують шляхом руйнування клітинної стінки(лізису), що призводить до вивільнення внутрішньоклітинних та структурних компонентів. Лізат у своєму складі містить компоненти клітинної стінки (ліпотейхоєві кислоти, пептидоглікани, екзополісахариди) та внутрішньоклітинні молекули (ДНК, функціональні білки). Взаємодія цих компонентів з рецепторами розпізнавання патернів (PRRs) клітин господаря визначає кінцевий імуномодулюючий профіль(Rocha-Ramírez, L. M. et al, 2020). Серед найважливіших компонентів – пептидоглікани клітинної стінки і ліпотейхоєві кислоти (LTA), які є лігандами рецепторів TLR2/NOD2 і викликають вироблення прозапальних цитокінів (IFN- β , TNF- α тощо)[14].

Лізати *L. rhamnosus* (постбіотики), що містять клітинні компоненти бактерії, є безпечними імуномодуляторами і в дослідженнях було показано дію цих компонентів на різних мишачих моделях. В одній з експериментальних моделей показано, що фракції бактеріальної клітинної стінки та пептидоглікану *L. rhamnosus* істотно впливають на імунітет кишкових клітин і дендритних клітин. В іншому дослідженні було продемонстровано що *L. rhamnosus* CRL1505 (цілий неактивований штам) після стимуляції рецептора Toll-like 4 (LPS) знижує експресію ко-стимулювальних маркерів (CD40, CD80, CD86) на дендритних клітинах та одночасно посилює їх продукцію прозапальних і регуляторних цитокінів – TNF- α , IL-1 β , IL-6 і IL-10[63]. Що показало, що навіть вбиті клітини УФ-випромінюванням CRL1505 здатні модулювати відповіді обох типів клітин (епітеліальних та дендритних).

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування виробництва імунологічного препарату	Літ.	Арк.	Акрушів	
Розроб.		Постоюк О.О.							
Перевір.		Старовойтова С.О					37	84	
						КАФЕДРА БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В.П.						37	

При хіміотерапії постбіотик здатний стимулювати відновлення мієлопоезу у кістковому мозку, знижувати рівень лейкопенії та прискорювати нормалізацію кількості мієлоїдних клітин після хіміотерапії. Інші дослідження, що фокусувалися на оцінці здатності нежиттєздатних форм *L. rhamnosus* CRL1505 та виділеного пептидоглікану забезпечувати захист від вторинної бактеріальної інфекції *Streptococcus pneumoniae*, яка часто розвивається після первинного вірусного запалення [55]. Висока стабільність інактивованих форм та виділених компонентів, доповнена їхньою доведеною ефективністю проти складних мукозальних інфекцій (пневмококова інфекція) та у імунокомпрометованих господарів, позиціонує лізат *L. rhamnosus* CRL1505(що якраз і містить в своєму складі всі вище згадані компоненти) як надзвичайно перспективний біопродукт [55].

4.2. Огляд ринку цільової продукції на основі компонентів

Серед великої кількості імуномодулюючих лікарських засобів і добавок, що присутні на ринку України, щоб тверезо оцінити потребу імуномодулюючого препарату на основі лізатів мікроорганізмів, варто виділити саме препарати, що містять у своєму складі в якості активної речовини компоненти клітин мікроорганізмів:

Таблиця 4.1.

Ринок продукції імуномодуючих препаратів/добавок на основі компонентів клітин

Препарат	Діюча основа	Концентрація	Фірма виробник, країна походження	Джерело
1	2	3	4	5
Дел-імун v	Лізат <i>L. rhamnosus</i> V	25 мг	ТОВ "МІРІММУНОФАРМ", Україна	Інструкція до препарату Дел-імун v екстра/[Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.add.ua/manual/del-immuno-v-jekstra.html
Імунсил D3	бета-глюкан	250 мг	ТОВ «Нутріомед», Україна	Імунсил D3 капсули /[Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://surli.cc/ulyjlw
Трилумін	комплекс низкомолекулярних органічних біологічноактивних сполук, отриманих із <i>Bacillus subtilis</i>	10 мг	ТОВ «Елемент здоров'я», Україна	Трилумін капсули №10/[Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://surl.lt/bulpua

Оскільки імунобіотики використовуються для імунопрофілактики, щоб підтримати імунітет під час сезонів зниження імунітету (восени і навесні – 2 рази на рік). Згідно із інструкцією на Дел-імун v, курс вживання препарату становить: від 14 до 30 днів, по 1-3 капсули, в залежності від вікової групи пацієнтів (<https://www.add.ua/ua/manual/del-immuno-v.html>). Так як імунопрофілактиці необхідно піддавати все населення без виключення, то для задоволення потреби у лізаті розрахунок будемо робити на все на населення України, що становить станом на травень 2025 року близько 32,9 млн осіб [99]

Таблиця 4.2.

Розрахунок річної потреби населення України у лізаті *L. rhamnosus*

Доза препарату, мг	Курс терапії, днів	Кількість капсул, шт	Кількість пацієнтів, осіб	Річна потреба у лізаті, кг
1	2	3	4	5
25 мг	60 днів	3	32 900 000	1 480 500 кг

4.3. Розрахунок річної потужності виробництва

Для задоволення потреби населення України необхідно 1 480 500 кг лізату. Оскільки на ринку існує конкуренція, і в аналогічному секторі засобів для регуляції імунних процесів присутньо як мінімум 3 засоби враховуючи «Дел Імун V». Але також слід враховувати, що більша частина споживачів будуть надавати перевагу народним методам лікування і в результаті пропонується взяти 1% дорослого населення для задоволення потреби на ринку. Тоді потужність виробництва має скласти як мінімум 14 805 кг.

Згідно із статтею [15] кількість життєздатних клітин становить 1×10^9 КУО/мл за 24 години культивування продуцента *L. rhamnosus* CRL1505. Зважаючи на те, що в більшості статей не вказується рівень біомаси то прийmemo, що 1×10^9 КУО/мл дорівнює 6 г/л. Таким чином, об'єм культуральної рідини становитиме:

$$\frac{14\,805 \times 1000}{6} = 2\,467\,500 \text{ л}$$

Далі розраховуємо загальні втрати під час етапів отримання лізату із культуральної рідини, які складають 20 % (центрифугування 15 %, фільтрація 5 %)

$$2\,467\,500 \text{ л} / (1 - 0,2) = 3\,041\,375 \text{ л}$$

Далі розрахуймо, який об'єм культуральної рідини можна отримати за цикл біосинтезу. Згідно із цими даними розрахуємо кількість необхідних етапів підготовки посівного матеріалу. Приймемо, що кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) = 350, тоді кількість культуральної рідини на добу (V_d) становитиме:

$$V_d = C/T_{рд} = 3\,041\,375 / 350 = 8812,5 \text{ л}$$

Об'єм культуральної рідини за цикл ($V_{пц}$) буде становити:

$$V_{пц} = \frac{K_1 * V_d * T_{цф}}{24} = \frac{1,1 * 8812,5 * 32}{24} = 12\,925 \text{ л/цикл}$$

де $T_{цф}$ – загальний цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (24 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій $K_1 = 1,1 - 1,5$.

Тоді розрахуємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{г} = V_{пц}/K_{зап} = 12\,925/0,7 = 18\,464 \text{ л}$$

Обираємо ферментер об'ємом на 25 м³ і уточнимо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап} = 18\,464 / 25\,000 = 0,7$$

Розраховане число не перевищує 0,7, отже об'єм ферментера підібраний правильно.

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу

5.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання лізату

Для отримання ферментативного лізату клітин штаму *L. rhamnosus* необхідно виконати такі стадії [45]:

- відділення біомаси із культуральної рідини за допомогою центрифугування з метою розділення на 2 фракції – біомасу та супернатант;
- фільтрування супернатанту крізь мембранний фільтр (із розміром 0,22 мкм) з метою отримання супернатанту з метаболітами;
- суспендування біомаси очищеною водою;
- лізис за допомогою лізоциму із активністю 2000-20 000 МО/мг (0.01-0.1 мг на 1 г біомаси) та протеази 50 000- 100 000 МО/мг (0.01-0.1 мг на 1 г біомаси) та слаймази (1-10 мг на 1 г біомаси) протягом 1 год при 38 °С;
- центрифугування розчину з метою відділення супернатанту і отримання осаду;
- суспензування осаду в 4 % розчину хлориду натрію (200 мл на 1 г біомаси) і витримування протягом 1 год;
- центрифугування суспензії для отримання осаду;
- осад суспендували у відфільтрованому супернатанті збагаченого метаболітами з метою отримання лізату (із вмістом 0,2-1,0 % білку, 0,2-1,0 % амінокислот та 0,3-0,8% полісахаридів).
- ліофільне сушіння осаду лізату.

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Постоюк О.О.						
Перевір.		Старовойтова С.О.					41	84
						КАФЕДРА БТМ 41		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

5.1.1 Відділення біомаси із культуральної рідини

Оскільки вихідний продукт, який нас цікавить, отримують із біомаси клітин *L. rhamnosus* то на першому етапі отримання необхідно виділити біомасу із культуральної рідини. Для цього існує декілька основних способів, такі як: фільтрування, центрифугування і флотація. Останній спосіб використовують в основному під час виділення біомаси дріжджів і грибів, тому у нашому випадку вирощування бактеріальної біомаси, розглядатися не буде.

Під час *фільтрування* здійснюється розділення рідкої та твердої фаз суспензії шляхом пропускання потоку рідини через пористу перегородку (мембрану). Після закінчення фільтрування, що є гідродинамічним процесом, швидкість якого в середньому становить 50 л/м², залежить від різниці тисків, яка виникає по обидва боки від фільтрувальної перегородки та обернено пропорційна опору рідини при проходженні через пори перегородки та шар осаду, отримують тверду (драглисті пластівчасті або дрібнозернисті осади) і рідку фракції [95].

Ще одним недоліком, що виникає під час фільтрування – це забивання пор фільтрів біомасою. Для усунення цієї проблеми передбачається системи автоматичного очищення за допомогою потоку стисненого повітря або ножів

Різноманітні фільтруючі системи (барабанні, стрічкові, тарілчасті, мембранні фільтри, карусельні вакуум-фільтри, фільтри-преси) засновані на однаковому принципі – затримці біомаси на пористій фільтруючій перегородці. Для очищення мембранних фільтрів, поверхню фільтрувального матеріалу покривають гідрофільним шаром або обробляють їх гідролітичними ферментами [95].

Центрифугування передбачає розділення неоднорідних систем в наслідок дії відцентрових сил за допомогою центрифуг (сепараторів) різних конструкцій і продуктивності, що дозволяють сконцентрувати осад до вологості 60–90 %. Сепаратори дають змогу отримувати біомасу з культуральної рідини, а також відділяти продукти мікробного синтезу (антибіотики, ферменти, вітаміни), що були заздалегідь переведені у тверду фазу.

Проте центрифугування має ряд переваг перед попередніми способами розділення:

- мінімальні втрати біомаси порівняно з традиційними методами (фільтрація чи флотація);
- висока ступінь автоматизації процесу;
- значний фактор розділення;
- велика ефективна поверхня осадження;
- здатність розділяти вискодисперсні системи.

В нашому випадку пропонується як основний метод використати центрифугування, для досягнення максимальної ефективності у виділенні біомаси і як допоміжний для отримання вторинного бульйону – фільтрування через мембану із діаметром пор 0,22 мкм.

5.1.2. Суспендування біомаси розчином натрію хлориду

Розчин NaCl звичайно використовують для суспендування клітин завдяки його фізіологічній сумісності та здатності підтримувати ізотонічне середовище. Наприклад, бактерії часто змивають і диспергують у фізіологічному розчині (0,9% NaCl) для збереження їх життєздатності[27]. При суспендуванні лізату клітин у розчині натрію основна його мета – встановити контрольовану іонну силу та осмотичний стан середовища, що безпосередньо впливає на розчинність, стабільність і взаємодії білків та інших біомолекул після лізису[103]. Як розчин для суспендування взято 4% NaCl. Таким чином, розчин NaCl інертний, легко стерилізується і контролює осмотичний тиск таким чином, що зберігає при цьому корисні нутрієнти клітини[46].

5.1.3. Обрання способу лізису клітин

Після виділення маси клітин із культуральної рідини, їх треба зруйнувати аби отримати доступ до компонентів клітин, що виявляють терапевтичний ефект. Для цього можна використати хімічні, ферментативні та фізичні методи. [95].

Ферментативний метод отримання клітинного лізату має низку значних переваг порівняно з механічними (гомогенізація, ультразвук) та хімічними методами, особливо при роботі з чутливими біомолекулами та у великомасштабних біопроцесах. Ключова перевага полягає у високій селективності, оскільки ферменти, такі як лізоцим, спрямовані на руйнування специфічних полімерів клітинної стінки, не торкаючись інших структур. Це мінімізує коекстракцію небажаних

внутрішньоклітинних забруднювачів (наприклад, нуклеїнових кислот), що забезпечує вищу чистоту початкового лізату і значно спрощує подальші етапи очищення. Крім того, ферментативний лізис є м'яким процесом, що проводиться в контрольованих ізотермічних умовах, запобігаючи термічній та механічній денатурації чутливих цільових білків, яка часто відбувається під впливом високих зсувних сил механічних гомогенізаторів[67].

З економічної точки зору, ферментативні процеси характеризуються нижчим енергоспоживанням і меншими капітальними витратами на обладнання порівняно з механічними системами. Таким чином, ферментативний метод максимізує функціональний вихід продукту при оптимізації подальших технологічних операцій.

Спираючись надані з патенту по отриманню ферментативного лізату, автори запропонували використання трьох ферментів[45]:

Лізоцим є лужним ферментом, що здатен гідролізувати мукополісахариди в бактеріях, руйнуючи клітинні стінки. Специфічна ферментативна активність для лізису клітин повинна становити 2000-20000 МО/мг. Кількість даного ферменту повинна становити 0,01-0,1мг/1 грам бактеріальних клітин[45].

Нейтральна протеаза належить до ендонуклеаз і може використовуватись для гідролізу різних бактеріальних білків. Нейтральна протеаза може діяти на розчинні поліпептиди в клітинних стінках, а в поєднанні з лізоцином сприяє повному їх розчепленню. Специфічна ферментативна активність для лізису клітин повинна становити 50000-100000 МО/мг. Кількість даного ферменту повинна становити 0,01-0,1мг/1 грам бактеріальних клітин[45].

Снайлаза комплексний фермент із травного тракту равлик, який містить понад 20 ферментів(целюлаза, амілаза, протеаза). Специфічна ферментативна активність для лізису клітин повинна становити 2000-20000 МО/мг. Фермент здатен швидко руйнувати клітинні стінки при рН 5,8-7,2 на 95%. Кількість даного ферменту повинна становити 1-10мг/1 грам бактеріальних клітин[45].

Для проведення ферментативного лізису буде встановлена температура в межах 35-40°C з тривалістю ферментативного гідролізу в 1-2 години [45].

5.1.4. Суспензування у відфільтрованому супернатанті з метаболітами

Суспендування бактеріального осаду у цьому супернатанті дозволяє включити до кінцевого лізату екстраклітинні метаболіти (ферментовані пептиди, органічні кислоти, білки тощо), що виділилися в процесі бродіння. Іншими словами, остаточний продукт містить і внутрішньоклітинні фрагменти, і секретовані бактерійними клітинами біоактивні речовини. Саме наявність цих речовин дозволяє зберегти активні компоненти, що містилися в супернатанті поза клітинами[45]. Практично це означає, що хоча додаткових поживних речовин там вже немає (перше бродіння завершено), залишкові органічні кислоти і іони створюють м'які умови зберігання. Наприклад, клітинно-вільні культуральні супернатанти *Lactobacillus* відомі наявністю антимікробних та імуномодуючих компонентів [1]. Такий «постбіотичний» супернатант сам по собі має біологічну активність, а його поєднання з бактеріальними фрагментами підсилює функціональні властивості кінцевого лізату.

5.1.5. Сушіння лізату клітин

Заключним етапом отримання лізату є видалення залишкової вологи за допомогою сушіння. Сушіння може бути тепловим при атмосферному тиску, під вакуумом або під глибоким вакуумом при температурах у діапазоні (від -30 до +60°C). Існує ще тип сушіння в електромагнітному полі, проте воно надто високовартісне, тому майже не використовується. Найпоширенішими є сушарки, робота яких базується на конвективному методі підведення тепла (аерофонтанні, з киплячим шаром, пневматичні, розпилювальні), коли тепло поширюється за рахунок гарячого повітря, інертних, топкових газів і сушіння відбувається в наслідок виникнення різниці температур між сушильним агентом і поверхнею матеріалу. При контактній сушці (шафові і вальцові сушарки) матеріал сушиться в наслідок контакту з гарячими поверхнями (плитами, вальцями). Цей метод є малоприсадабним для сушки термолабільних препаратів. Під час радіаційної сушки тепло передається за допомогою інфрачервоного випромінювання. Конвективна сушка передбачає підведення тепла за допомогою газоподібного сушильного агента-теплоносія. Така

технологія лежить в основі роботи аерофонтанних сушарок, розпилюючих, пневматичних і сушарок з киплячим шаром (Карлаш Ю.В., Красінько В.О., 2022).

Ліофільне висушування – один з найефективніших способів зневоднення живої біомаси дріжджів, міцелію, бактерійних препаратів і термолабільних біологічних речовин. При 0°C волога, замерзає і відбувається випаровування твердого тіла без його розплавлення (вода з твердого агрегатного стану трансформується одразу у пароподібний, без переходу у рідку фазу). При цьому молекулярна структура матеріалу зберігається майже без змін і висушений матеріал характеризується доброю дисперсністю і пористістю (Карлаш Ю.В., Красінько В.О., 2022). Тому подальший вибір способу сушіння лізату зупиняємо на ліофільному висушуванні, спираючись на його переваги наведені вище.

5.2. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.

Вихідні дані:

- об'єм культуральної рідини з однієї ферментації – $V_{\text{кр}} = 12\,925\text{ л}$;
- концентрація біомаси в КР = 6 г/л біомаси.

Розподіл втрат цільових продуктів по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено в таблиці 5.1:

Таблиця 5.1.

Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати під час виділення лізату (разом 20 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
1	ДР 1. Приготування 4 % розчину NaCl	Порошок NaCl	4 кг	—	—	-
		Вода дистильована	100 л	—	—	Реактор-збірник об'ємом 150 л
		4 % розчин NaCl	—	—	100 л	Реактор-збірник об'ємом 150 л
ТП 2. Зберігання культуральної рідини після закінчення культивування						
2	ТП 2.1 Зберігання культуральної рідини <i>L. rhamnosus</i>	Культуральна рідина (КР)	12 925 л	—	12 925 л	Реактор-збірник об'ємом 15,0 м ³
ТП 3. Виділення біомаси						
3	ТП 3.1 Центрифугування культуральної рідини <i>L. rhamnosus</i>	Культуральна рідина (КР)	12 925 л	—	—	Реактор-збірник об'ємом 15,0 м ³
		Осад біомаси клітин	77,55 кг (12 925 л х 6,0 г/л) з врахуванням 90 % вологості 775,5 кг	5 % (38,77 кг)	736,73 кг	Центрифуга DL-8MS Реактор-збірник об'ємом 1000 л
		Супернатант з метаболітами	—	—	12 188,3 л (12 925 л– 736,73 кг)	Перекачується відцентровим насосом продуктивністю 100 л/хв до збірнику об'ємом 15,0 м ³ Супернатант – на фільтрацію

Продовження таблиці 5.1.

ТП 4. Фільтрація супернатанту						
4	ТП 4.1 Отримання очищеного супернатанту з метаболітами	Супернатант з метаболітами	12 188,3 л	–	–	Збірник об'ємом 15,0 м ³ Фільтр 0,22 мкм
		Очищений супернатант з метаболітами	–	5 % (609,42 л)	11 578,89 л	Збірник об'ємом 15,0 м ³
ТП 5. Суспензування біомаси						
5	ТП.5.1 Промивка біомаси	Осад біомаси клітин	736,73 кг	–	–	Реактор-збірник об'ємом 1000 л
		Вода очищена	100 л	–	–	
		Суспензія осаду біомаси клітин	836,73 кг	-	836,73 кг	Реактор-збірник об'ємом 1000 л
ТП 6. Лізис клітин						
6	ТП 6.1 Ферментативний лізис	Суспензія осаду біомаси клітин	836,73 кг	–	–	Реактор-збірник об'ємом 1000 л
		Лізоцим (0,055 мг/г)	0,046 кг	–	–	Колба на 100 мл
		Протеаза (0,055 мг/г)	0,046 кг	–	–	Колба на 100 мл
		Снайлаза (5,5 мг/г)	4,6 кг	–	–	Колба на 5 л
		Суспензія лізату клітин	–	–	841,42 кг	Реактор-збірник об'ємом 1000 л
ТП 7. Виділення лізату клітин						
7	ТП 7.1 Центрифугування лізату клітин	Суспензія лізату клітин	841,42 кг	–	–	Реактор-збірник об'ємом 1000 л
		Очищений лізат клітин	–	5 % (42,08 кг)	794,65 кг	Реактор-збірник об'ємом 1000 л

ТП 8. Розчинення очищеного лізату						
8	ТП 8.1 Суспензування очищеного лізату	Очищений лізат осаду клітин	794,65 кг	—	—	Реактор-збірник об'ємом 1000 л
		4 % Розчин хлориду натрію	100 л	—	—	Реактор-збірник об'ємом 150 л
		Суспензія очищеного лізату клітин	—	—	894,65 л	Реактор-збірник об'ємом 1000 л
ТП 9. Виділення очищеного лізату клітин						
9	ТП 9.1 Центрифугування очищеного лізату клітин	Суспензія очищеного лізату клітин	894,65 л	—	—	Реактор-збірник об'ємом 1000 л Центрифуга DL-8MS
		Осад клітинних залишків	—	5 % (44,73 кг)	849,92 л	Реактор-збірник об'ємом 15,0 м³
ТП 10. Суспензування лізату						
10	ТП 10.1 Суспензування у очищеному супенатанті з метаболітами	Осад клітинних залишків	849,92 л	—	—	Реактор-збірник об'ємом 15,0 м³
		Очищений супернатант з метаболітами	11 578,89 л	—	—	Реактор-збірник об'ємом 15,0 м³
		Лізат	—	—	12 428,81 л	Реактор-збірник об'ємом 15,0 м³
ТП 11. Сушіння лізату						
11	ТП 11.1 Ліофільна сушка	Лізат	12 428,81 л	-	-	Реактор-збірник об'ємом 15,0 м³
		Лізат після ліофільної сушки	50 % (6214,4 кг втрата вологи)	-	6214,4 кг	Реактор-збірник об'ємом 10,0 м³

5.3. Специфікація обладнання

Загальний перелік обладнання, що буде використовуватися для виробництва лізатів наведено у таблиці. 5.2.

Таблиця 5.2.

Специфікація обладнання. Виробництво лізату

Позиція	Найменування позиції	Кількість	Характеристика обладнання
1	2	3	4
РЗ-1, РЗ-19	Реактор-збірник	2	Реактор-збірник об'єм: 15 м ³ . температура у середині: 20-95 °С, температура у сорочці: +5 ...+140°С, Матеріал: AISI 312/316.
<i>Джерело:</i> https://stprom.com.ua/ua/p1016510329-emkost-15000-litrov.html?srsltid=AfmBOoolSkpj-aCIYB4Tk9QV8ZJSskNB7qaqaw_yp8pIg_s3oXiWyjij			
РЗ-3	Реактор-збірник	1	Реактор-збірник, об'єм: 150 л мішалка від 0 до 60 об/хв. Матеріал: скло, об'єм сорочки: 35 л. Швидкість обертання мішалки 0~680 об/хв
<i>Джерело:</i> https://hms-ua.com/ua/p1445473620-steklyannyj-himicheskij-reaktor.html?source=merchant_center&srsltid=AfmBOoqbOHM5eu0lm6iI3_VC48-55siASg8Bdb1_Wpp8AYx5UvemK_eU			
РЗ-9	Реактор-збірник	1	Реактор-збірник, об'єм: 750 л мішалка від 0 до 60 об/хв. Матеріал: AISI 312, Габаритні розміри: 1050x800x860 мм
<i>Джерело:</i> https://comquima.com/en/tanks/used-stainless-steel-tank-750-liters46			
РЗ-11, РЗ-15	2	3	Реактор-збірник, об'єм: 1000 л мішалка від 0 до 60 об/хв. Матеріал: AISI 312, Габаритні розміри: 940x940x700 мм
<i>Джерело:</i> https://comquima.com/en/tanks/stainless-steel-square-tank-1000-litres			
Ц-5, Ц-13, Ц-17	Центрифуга	3	Центрифуга DL-8MS, швидкість: 8 000 об/хв, продуктивність: 6 x 2400 мл, габарити: 900×1000×1300 мм, вага: 320 кг
https://ua.sumerscience.com/laboratory-equipment/centrifuge/dl-8ms-large-capacity-centrifuge-8000rpm.html			
НВ-2, НВ-4, НВ-6, НВ-10, НВ-16, НВ-20	Насос відцентровий	6	Насос відцентровий Продуктивність 100 л/хв, потужність 900 Вт, маса 15 кг
<i>Джерело:</i> https://sigma.ua/buy/nasos-tsentrobeznyy-mnogostupenchatyy-0-9kvt-hmax-55m-qmax-100l-min-nerzh-leo-3-0-775416/?srsltid=afmboornryii60zx78gyw0y8d7nsoidnpc_xp1q1-etjgedx7odugywu			
НГ-7, НГ-12, НГ-12, НГ-14, НГ-18	Гвинтовий насос	5	Гвинтовий насос SOLTEC ОНВ-10- 01 Продуктивність: 10 м ³ /год Частота обертів: 450 об/хв Потужність: 4 кВт
<i>Джерело:</i> https://sealing.com.ua/ua/pumps/screw-pumps/gvintoviy-nasos-onv-10-01/			
СЛ-27	Ліофільна сушарка KZG-2	1	Ліофільна сушарка KZG-2, об'єм завантаження до 3000 кг, Розміри: 3600x1750x2850 мм, температура -55 ... +80 °С
<i>Джерело:</i> https://www.gea.com/ru/products/dryers-particle-processing/lyophilizers/lyovac-freeze-dryer/			

РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми отримання лізату

ДР 1. Приготування 4 % розчину NaCl

ДР 1.1 Приготування і стерилізація 4 % розчину NaCl

В реактор-збірник (РЗ-3) на 150 л подають 4 кг попередньо зваженого хлориду натрію і за допомогою насоса подають 100 л води очищеної. Для кращого розчинення у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури на рівні 40 °С. Стерилізують (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ТП 2. Зберігання культуральної рідини після закінчення культивування

ТП 2.1. Зберігання культуральної рідини *L. rhamnosus*

Після закінчення поцесу культивування культуральну рідину, що містить клітини *Lactobacillus rhamnosus* за допомогою насоса відцентрового (НВ-2) перекачують у реактор-збірник (РЗ-1) об'ємом 15 000 л. Зберігання культуральної здійснюється при 10 °С не більше 1-2 діб.

ТП 3. Виділення біомаси

ТП 3.1 Центрифугування культуральної рідини *L. rhamnosus*

Після завершення культивування біомасу відокремлюють від культуральної рідини центрифугуванням у центрифугі (Ц-5) при 8 000 об/хв протягом 5–10 хвилин. Волога біомаса перекачується за допомогою гвинтового насоса (НГ-7) у реактор-збірник (РЗ-11) об'ємом 1000 л. Супернатант надалі подається на процеси зазначені

ТП 4. Фільтрація супернатанту

ТП 4.1 Отримання очищеного супернатанту з метаболітами

Супернатант отриманий з ТП 3.1 фільтрують через мембранний фільтр (Ф-7) із діаметром пор 0,22 мкм. Отриманий супернатант з метаболітами зберігають у реакторі-збірнику (РЗ-9) на 15,0 м³.

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми отримання лізату			Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Постояк О.О.								
Перевір.		Старовойтова С.О.							51	84
								КАФЕДРА БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В.П.						51		

ТП 5. Суспензування біомаси

ТП.5.1 Суспензування біомаси

Вологу біомасу, отриману на *ТП 3.1* перекачують за допомогою гвинтового насосу (НГ-7) у реактор-збірник (РЗ-11) на 1000 л, куди подають 100 л води дистильованої і вмикають перемішуючий пристрій.

ТП 6. Лізис клітин

ТП 6.1 Ферментативний лізис

У реактор-збірник (РЗ-11) на 1000 л із суспензією біомаси подають попередньо зваженого 0,046 кг лізоциму, 0,046 кг протеази, 4,6 кг смайлази, вмикають перемішуючий пристрій і витримують на протязі 1 год при 38 °С.

ТП 7. Виділення лізату клітин

ТП 7.1 Центрифугування лізату клітин

Отриману суспензію із реактора-збірника (РЗ-11) подають на центрифугу (Ц-12), де розділяють при 8 000 об/хв протягом 5–10 хвилин. Вологий очищений лізат осаду клітин перекачується за допомогою гвинтового насосу (НГ-12) у реактор-збірник (РЗ-15) об'ємом 1000 л.

ТП 8. Розчинення очищеного лізату

ТП 8.1 Суспензування очищеного лізату

В реактор-збірник (РЗ-15) із вологим очищеним лізатом клітин, подають 100 л 4 % розчину хлориду натрію від *ДР.1* і витримують протягом 1 год.

ТП 9. Виділення очищеного лізату клітин

ТП 9.1 Центрифугування очищеного лізату клітин

Суспензію очищеного лізату клітин із *ТП 8.1* подають на центрифугу (Ц-17), де розділяють при 8 000 об/хв протягом 5–10 хвилин. Отриманий осад клітинних залишків перекачують у реактор-збірник (РЗ-19) об'ємом 15 000 л .

ТП 10. Суспензування лізату

ТП 10.1 Суспензування у очищеному супернатанті з метаболітами

В осад клітинних залишків у реакторі-збірнику (РЗ-19) на 15 000 л подають супернатант з метаболітами від *ТП3.1* і вмикають перемішуючий пристрій.

Отриманий лізат містить у своєму складі 0,2-1,0 % білку, 0,2-1,0 % амінокислот та 0,3-0,8% полісахаридів.

ТП 11. Сушіння лізату

ТП 11.1 Ліофільна сушка

Суспензію лізату клітин із *ТП 10.1* переносять із реактора-збірника (РЗ-19) у лотки і завантажують у камеру сушки (СЛ-27). Сушку ведуть протягом 24-48 год при -50°C...-80°C.

РОЗДІЛ 7. Технологічні особливості отримання готового продукту з лізату

7.1. Обґрунтування форми випуску імунобіотику на основі ліофілізованого лізату *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505

Вибір кінцевої лікарської форми для препарату базується на фізико-хімічних та біологічних властивостях діючої речовини, а саме ліофілізованого лізату *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505. Ця продукція характеризується високою чутливістю до вологи, кисню, температури та світла, що зумовлює необхідність використання лікарської форми, здатної забезпечити її стабільність і збереження біологічної активності.

Оптимальною формою для таких речовин є тверді желатинові капсули, які дозволяють точно дозувати діючу речовину, захищають її від зовнішніх впливів та забезпечують високу біодоступність при пероральному застосуванні. Обрано тверду двочастинну капсулу (корпус+ковпачок), що є типовою лікарською формою для фармацевтичних та харчових добавок. Згідно з Фармакопеею, капсула – це тверді препарати з твердою або м'якою оболонкою різної форми та місткості, що зазвичай містять одну дозу активної(их) речовини(речовин) і вони призначені для перорального застосування. Оболонка капсули може бути виготовлена з желатину або альтернативних матеріалів (наприклад, гідроксипропілметилцелюлози(НПМС)). У монографії підкреслено, що тверді капсули складаються з двох наперед виготовлених частин, в одну з яких засипають активний компонент у вигляді порошку, а потім закривають другою[10].

Капсула забезпечує стабільне середовище для сухого порошка лізату всередині. Оболонка капсули захищає вміст від прямого впливу агресивних шлункових умов (кислота, жовчні солі) і відкладає вивільнення активних компонентів у середньому на 4-5 хв після потрапляння в шлунково-кишковий тракт[97,82]. Дана форма є зручною для ковтання, без гіркого смаку і забезпечує точне дозування. Також важливою перевагою капсульної форми є захист активних компонентів від руйнівного впливу зовнішніх чинників.

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Технологічні особливості отримання готового продукту з лізату	Літ.	Арк.	Акрушів	
Розроб.		Постойок О.О.							
Перевір.		Старовойтова С.О					54	84	
						КАФЕДРА БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В.П							
					54				

Желатинова оболонка створює фізичний бар'єр, що запобігає контакту лізату з повітрям і вологою до того моменту, як препарат потрапить в організм[97].

Виготовлення капсульної форми дозволяють уникнути сильних механічних навантажень на активні компоненти. І на відміну від таблеток, при капсулюванні порошок просто насипається в оболонку, тоді як таблетування потребує пресування, що може руйнувати біологічно активні молекули. Хоча таблетки загалом мають фізичну стійкість, процес гранулювання і високого тиску часто знижує ефективність пробіотичних (біологічних) компонентів. Для ферментативного лізату це особливо критично, адже будь-які додаткові зусилля при формуванні таблетки можуть частково деградувати білки/пептиди в складі лізату[82].

Форма випуску у вигляді саше теж не є зовсім вдалим варіантом. технічна реалізація потребує високоякісних пакетувальних машин і шарових багатокомпонентних плівок, що ускладнює переробку (екологічний недолік)[51]. Після розкриття пакета порошок необхідно розвести чи проковтнути, що менш зручно для деяких користувачів.

Вибір матеріалу оболонки для капсул. Стандартними є желатинові капсули, проте для підвищеної стійкості до вологості можна застосовувати капсули з целюлозного гелевого матеріалу НРМС. Дослідження показали, що НРМС-капсули за високої вологості швидко поглинають вологу, але завдяки низькій рівноважній вологоємності та пластичній аморфній структурі зберігають міцність і не руйнуються. Натомість желатинові капсули поглинають вологу повільніше, але досягають більш високого ступеня гідратації, що призводить до їх розм'якшення і зниження механічної міцності[48]. Тому НРМС-капсула є більш стійкою до вологості і підходить для вологочутливих препаратів.

7.1.1. Умови виробництва

Промислове виробництво лікарських препаратів, зокрема твердої лікарської форми у вигляді двочастинних капсул, має здійснюватися відповідно до принципів Належної виробничої практики (GMP). Це особливо важливо для імунобіотика на основі лізату, де навіть незначна мікробна або фізична контамінація може знизити ефективність або безпеку препарату. Мікробна контамінація ліків зазвичай є

наслідком порушень санітарно-гігієнічних умов у процесі виготовлення. Джерелами мікроорганізмів можуть бути повітря виробничих приміщень, обладнання, інвентар, одяг і руки персоналу, а також сировина, вода і первинна упаковка[101]. Організація виробництва відповідно до вимог GMP, яка включає чіткі стандарти для виробничих приміщень, обладнання та персоналу, є гарантією виключення таких джерел контамінації[94].

Згідно зі стандартами GMP, усі виробничі приміщення класифікуються за класами чистоти: A, B, C, D.

Клас А – це локальна зона для виконання операцій з найвищим ризиком забруднення (наприклад, дозування, закупорювання, асептичне змішування), де повітря на робочому місці постачається ламінарним потоком зі швидкістю приблизно 0,45 м/с. *Клас В* – це оточуюче середовище для зони класу А у разі асептичних операцій. Класи С і D призначені для менш критичних етапів виробництва стерильних препаратів[94].

Враховуючи, що капсули не піддаються подальшій стерилізації, виробництво такої нестерильної лікарської форми рекомендовано здійснювати в приміщеннях класів чистоти С і D. В операціях з відкритим контактом продукції з довкіллям (зважування порошку, змішування, наповнення капсул) зазвичай використовують зони з вищим класом чистоти (клас С), де контролюється кількість часток та мікроорганізмів у повітрі. Менш критичні операції (наприклад, пакування готових капсул у контейнери, підготовка допоміжних речовин) можуть виконуватись у зонах класу D або навіть у виробничих приміщеннях без жорсткого контролю, якщо відсутній відкритий контакт препарату з оточуючим середовищем. Наприклад, зважування та попереднє змішування варто проводити у класі С із забезпеченням максимальної фільтрації повітря і регулярного моніторингу, тоді як фасування і пакування сформованих капсул можна відвести до приміщень класу D[105,100].

Для підтримки необхідної чистоти повітря у виробничих зонах передбачають низку організаційно-технічних заходів. Перш за все, вентиляційні системи обладнують НЕРА-фільтрами, які забезпечують подачу очищеного повітря. У критичних локальних зонах (класи А/В) організовують ламінарний (однопотік) рух

повітря зі сталою швидкістю $\sim 0,45$ м/с, що перешкоджає проникненню сторонніх часток у робочу зону. Приміщення підтримують при позитивному (надлишковому) тиску відносно суміжних менше чистих зон, щоб запобігти проникненню забрудненого повітря. Повітря повинно бути підігріте й за потреби зволожено до регламентованих параметрів (зазвичай температура $\sim 18\text{--}25$ °С, відносна вологість 45–65 %), щоб уникнути накопичення статичної електрики та руйнування вологочутливих компонентів[105,100].

Регулярний контроль чистоти повітря та поверхонь є обов'язковим. Так, у зонах класів С та D проводять моніторинг кількості часток та мікроорганізмів. Межі максимально допустимих часток в 1 м³ повітря становлять до 350 000 часток $\geq 0,5$ мкм у класі С та до 3 500 000 у класі D. Нормативні показники мікробіологічної чистоти у функціональному стані теж стандартизовано: наприклад, у класі С - ≤ 100 колонієутворюючих одиниць (КУО) в 1 м³ повітря, у класі D - ≤ 200 КУО/м³. Важливим є також мікробіологічний контроль робочої зони (методами відбору проб повітря, седиментації, контактного посіву), результати якого є критерієм дотримання чистоти при кожній зміні виробництва[105,100, 101].

Для запобігання як мікробній, так і перехресній контамінації в рамках GMP передбачаються організаційні заходи. Виробничі процеси бажано розмежувати: проводити зважування, змішування, наповнення капсул у відокремлених приміщеннях або чергувати випуски різних продуктів (капсул) у роздільний час з ретельним очищенням обладнання між партіями. Рекомендовано використовувати максимально «закриті» системи (витратоміри, циліндри, герметичні рукавиці на установках) і шлюзові камери для передачі матеріалів між зонами без порушення тиску та чистоти повітря[105,100].

Наповнювач для капсул. Як наповнювач для капсул пропонується для використання очищена целюлоза. Очищена целюлоза (найчастіше згадується як мікрокристалічна целюлози) в капсулах використовується як ділюент/наповнювач і допоміжна речовина для заповнення об'єму, поліпшення текучості порошкової суміші при дозуванні в автоматичних заповнювачах, забезпечення однорідності розподілу діючої речовини та нейтрального смаку і запаху готового продукту[84].

До переваг даного наповнювача можна віднести:-

- хімічна інертність і мінімальна здатність вступати в реакції з багатьма лікарськими речовинами;
- сумісний з широким спектром діючих речовин;
- добре поводить ся як наповнювач у сумішах, забезпечуючи рівномірний розподіл та, при необхідності, покращуючи купування/зв'язування частинок[28].

Як додатково можемо розглянути і інші наповнювачі, такі як лактоза та крохмаль.

Лактоза має дуже хорошу текучість і дешевша, але є потенційні мінуси, що унеможлиблює її використання в даному випадку. Даний наповнювач є відновним цукром і може вступати в реакції Майяра з амінными групами діючих речовин, що викликає проблеми стабільності та забарвлення. Крім того, даний компонент молочного походження, що може викликати проблеми у верстви людей, що страждають на непереносимість лактози[84,28].

Крохмаль також часто використовують як наповнювачі/дезінтегранти, але вони можуть бути більш гігроскопічними або менш однорідними в потоках у порівнянні з тою самою очищеною целюлозою[52].

7.2. Обґрунтування технологічних особливостей одрежання кінцевої форми

Подрібнення

Ліофілізовані лізати пробіотичних культур, є високочутливими до зовнішніх фізико-хімічних факторів і потребують делікатної механічної обробки на етапі подальшого технологічних процесів. Після сушіння матеріал набуває пористої та крихкої структури, що значно полегшує його подрібнення. Тому вибір методу помолу набуває принципового значення, адже саме він визначає ступінь збереження структурних клітинних фрагментів та інших функціональних компонентів лізату.

На практиці використовують різні типи механічного подрібнення: роторні, молоткові, струменеві млини, а також методи з використанням інтенсивного зсуву або удару. Однак більшість з них створюють значне локальне нагрівання, призводять

до нерівномірного розподілу часток та можуть спричинювати часткову денатурацію термолабільних компонентів клітин.

Кульковий млин є оптимальним вибором для подрібнення ліофілізованого лізату з огляду на контроль розміру часток. По-друге, кулькові млини дають можливість працювати в кріогенному режимі: насичення камери рідким азотом або системне охолодження зменшує локальне нагрівання й клейкість матеріалу, підвищує крихкість органічних ліофілізатів і таким чином мінімізує термічну денатурацію біомолекул під час ударів і тертя[42].

Протилежно, традиційні молоткові, роторні або ножові млини працюють за принципом удару і розрізання, що робить їх ефективними для волокнистих, гумових або еластичних матеріалів, проте вони часто генерують вищі локальні температури й широкі розподіли часток, що може призводити до часткової денатурації білків, окислення ліпідів та нерівномірного збереження активних фракцій лізату[35].

7.3. Специфікація обладнання

Таблиця 7.1.

Специфікація обладнання для отримання капсул з лізатом

Позиція	Найменування позиції	Кількість	Характеристика обладнання
1	2	3	4
МЛ-21	Млин кульковий	1	Загальний об'єм робочої камери – від 50 до 5000 літрів; Оберти постійні – 38 або 56 об/хв; Потужність приводу – від 1,2 до 55 кВт
<i>Джерело:</i> https://www.zto.com.ua/product/kulovij-mlin-2/			
К-22, К-24	Контейнер	2	Матеріал: нержавіюча сталь Розмір: 1745мм(діаметр), 3000 мм(висота циліндра), 4208 мм(висота загальна).
<i>Джерело:</i> https://www.rozavetrov.ua/index.php?cPath=193&language=uk			
ВС-23	Вібраційне сито	1	Модель: RP-1500-1S Діаметр: 1500 мм; Частота обертання, об/хв: 1420 Продуктивність, кг/г: 2600
<i>Джерело:</i> https://technik.ua/produksiia/prosiiuvachi-boroshna-tsukru-sukhoho-moloka/vibratsiini-prosiiuvachi-vibroprosiiuvachi			
ЗМ-25	Змішувач	1	Діапазон за об'ємом: до 10 000 л Час змішування мін 98% хв.: 5-10
<i>Джерело:</i> https://bioeco.in.ua/p/1539295260-smesitel-gorizontálny-lopastnyy-10-kub-m/			
КМ-26	Капсульна машина	1	Модель: АДАПТА 100 Потужність: до 100 000 капсул/год
<i>Джерело:</i> https://ima.it/pharma/machine/adapta/			
ФМ-27	Фасувальна машина	1	Модель: TLT 1400 – СУК 3040 Потужність: до 400 бл./хв
<i>Джерело:</i> https://www.exapro.com/bosch-tilt-1400-cuk-3040-p210226112/			

7.4. Опис технологічної схеми отримання капсул з лізатом

ДР 12. Подрібнення та просіювання сировини для капсул

ДР 12.1. Подрібнення сировини для капсул

Після завершення ліофільного сушіння висушений лізат подають у млин (МЛ-21) типу кульового для подрібнення до порошкоподібного стану з розміром частинок не більше 0,1 мм. Процес проводиться при температурі не вище 25°C, щоб запобігти руйнуванню білкових структур лізату. Отриманий порошок збирають у герметичні контейнери (К-22) з нержавіючої сталі.

ДР 12.2. Просіювання сировини

Просіювання проводять у промисловому вібраційному ситі (ВС-23), оснащений сітками з розміром пор 0,05 мм. Отриманий порошок збирають у герметичні контейнери (К-24) з нержавіючої сталі.

ТП 13. Змішування лізату з допоміжними речовинами

ТП 13.1. Приготування суміші для капсулювання

Порошок лізату з контейнера (К-24) завантажують у змішувач (ЗМ-25) разом із допоміжними речовинами – очищена целюлоза. Змішування здійснюють протягом 15–20 хв при швидкості обертання мішалки 20 об/хв до отримання однорідної сипучої маси. Вологість суміші не повинна перевищувати 5 %.

ТП 14. Капсулювання лізату

ТП 14.1. Заповнення капсул (основи)

Однорідну порошкоподібну суміш із ТП 13.1 подають у завантажувальний бункер капсульної машини (КМ-26). У машині автоматично відділяються нижні частини капсул (основи), які заповнюються дозованою кількістю порошку (0,3–0,5 г).

ТП 14.2. З'єднання капсул

Після заповнення нижніх частин капсул, верхні частини (кришечки) автоматично подаються у позицію з'єднання. Капсульна машина (КМ-26) з'єднує обидві частини капсули під тиском 0,3–0,5 МПа, забезпечуючи герметичність. Готові капсули відокремлюються на стрічку транспортера та подаються на контрольну ділянку.

ТП 15. Фасування та пакування капсул

ТП 15.1. Фасування в блістери

Готові капсули з транспортера подаються в автомат фасування (ФМ-27), де відбувається розміщення капсул у чарунки блістерів із полівінілхлоридної плівки. Блістери запаюються алюмінієвою фольгою та маркуються.

ТП 15.2. Упакування у вторинну тару

Блістери автоматично укладають у картонні коробки (УП-28), наносять етикетки, дату виробництва та номер серії.

РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва

8.1. Контроль виробництва напівфабрикату

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Показники якості	Допустимі межі	Методи контролю
Опис	ліофілізований порошок білого кольору	За п.1 МК – візуально.
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 3.5%	За п. 2 МК, ДФУ, вид. 1, р. 2.2.32, с. 49
Специфічна нешкідливість	Препарат має бути нешкідливим	За п. 3. МК
Мікробіологічна чистота	Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, плісняви та дріжджоподібних грибів	За п.4 АНД, ДФУ, доп. 1, р. 2.6.12, с.37, р. 2.6.13, N, с. 42

8.1.1 Опис

Ліофілізований порошок білого кольору. Визначення проводять візуально.

8.1.2 Втрата в масі при висушуванні

Не більше 3.5 %. Визначають згідно з ДФУ, вид.1, р.2.2.32, с. 49.

8.1.3 Специфічна нешкідливість

Порошок має бути нешкідливих для білих мишей для введенні його перорального в кількості однієї дози. Випробування проводять на 5-ти безпородних мишах різної статі масою 14–16 г (зважування проводять безпосередньо перед дослідом). Вміст флакону розводять водою Р з розрахунку 0,5 мл на 1 дозу препарату. Кожній з 5-ти мишей вводять 0,5 мл отриманої зависі перорально в шлунок за допомогою насадки на шприц місткістю 1 мл. Термін спостереження – 5 діб. Всі тварини повинні залишитися живими та не втратити у вазі. У випадку загибелі за цей період хоча б однієї тварини або втраті у вазі контроль повторюють на подвійній кількості тварин.

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Постоюк О.О.			РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва			Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.		Старовойтова С.О.								62	84
Н. Контр.								КАФЕДРА БТМ			
Затверд.		Стабніков В.П.									
					62						

Порошок вважають нешкідливим, якщо при повторному випробуванні не загинула жодна з мишей. У протилежному випадку дану серію препарату бракують.

8.1.4 Мікробіологічна чистота

Порошок не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, пліснявих та дріжджеподібних грибів. Визначають згідно з ДФУ, доп. 1, р. 2.6.12, с.37, р. 2.6.13, N, с. 42. Зразок порошку у кількості 10 г поміщають у мірний флакон місткістю 250 мл, доводять до 100 мл (розведення 1:10) буферним розчином з натрієм хлоридом і пептоном, рН 7,0 та перемішують до отримання гомогенної зависі. Для визначення загальної кількості бактерій по 1 мл зависі висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з густим поживним середовищем №1 методом двошарового висівання.

Для визначення загальної кількості грибів по 1 мл зависі висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з густим поживним середовищем 2 методом двошарового висівання.

Посіви на середовищі №1 інкубують при 30–35°C для виявлення бактерій, а посіви з середовищем №2 – при 20–25 °C для виявлення грибів протягом 5 діб, якщо вірогідні результати не будуть отримані раніше. Для визначення окремих видів мікроорганізмів по 10 мл зависі висівають на рідких поживних середовищах: №3 (для виявлення бактерій родини *Enterobacteriaceae*) та №8 (для виявлення *Pseudomonas aureginosa* та *Staphylococcus aureus*). Посіви інкубують при 30–35 °C протягом 18–24 год, після чого роблять пересіви з середовища №3 на густі середовища №4 та №5, а з середовища №8 – на середовища №9 та №10. Посіви інкубують при 35–37 °C протягом 24–48 год. При наявності росту мікроорганізмів проводять їх ідентифікацію згідно вимог ДФУ, доп. 1, р. 2.6.13, N, с.42.

Порошок не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, плісняви та дріжджеподібних грибів. У випадку виявлення в посівах сторонніх мікроорганізмів, контроль проводять на подвоєній кількості зразків препарату. При відсутності росту мікроорганізмів при повторному висіви досліджуваний препарат вважають таким, що відповідає вимогам. У випадку росту сторонніх мікроорганізмів при повторному висіві зразків серію порошку бракують.

8.1.5. Імунологічний контроль

Вироблення імунорегуляторних цитокінів вивчали у непоказних мишей з масою тіла 14–16 г. Сто сорок тварин було відібрано і розділено на 7 груп по 20 особин. Тварин годували збалансованим кормом для гризунів та водою *ad libitum*. I, II та III групи мишей отримували 0,5 мл водного розчину лізату перорально в дозах 5, 50, 100 та 500 мг/миша відповідно протягом 5 днів з інтервалом у 24 години. IV групі мишей вводили 0,5 мл суспензії Біфідиму (контрольний пробіотичний препарат) перорально в дозі 50 мг/миша за тим самим графіком. Біфідим являв собою суху масу антагоністичних біфідобактерій, іммобілізованих на ентеросорбенті, у поєднанні з аскорбіновою кислотою («Інтерветмед Лтд.», Київ, Україна). V групі мишей вводили 0,15 М NaCl. Мишей VI та VII груп використовували для вивчення інтерфероногенної активності одноразового введення 50 мг/мишу лізату (група VI) або Bifidim (група VII). Продукцію цитокінів за допомогою інтерферону гамма та фактор некрозу пухлини досліджували у інтактних та оброблених мишей через 8 годин після початкового введення, а потім кожні 24 години протягом наступних 5 днів. Для цього кількох мишей з кожної групи умиротворяли шляхом дислокації шийних хребців; сироватку крові, макрофаги перитонеального ексудату та селезінку, з яких у кожній групі мишей збирали спленоцити для тестування[54].

Оптимальну дозу лізату також було протестовано шляхом індукції імунорегуляторних цитокінів *in vitro* у спленоцитах та макрофагах перитонеального ексудату (1×10^7 клітин/мл) оброблених та інтактних мишей шляхом культивування клітин з препаратом у кінцевих концентраціях 5, 50, 100 та 500 мг/мл. Інтерфероногенну активність оцінювали у порівнянні з Bifidim 50 мг/мл та стандартними індукторами (IFN- α ; вірус хвороби Ньюкасла, NDV–10 TCD 50/клітина; IFN-g; фітогемаглютинін, PHA–20 мг/мл; Difco; фактор некрозу пухлини, ліпосахариди *E. coli* 0111–4 мг/мл–Sigma USA). Рівні продукції цитокінів визначали через 6, 24 та 48 годин після інкубації клітин з препаратами. Біологічну активність оцінювали за цитотоксичністю в пасажованій культурі мишачих фібробластів L-929.

Результат реєстрували на мультисканері (Dynatech, Швейцарія) з довжиною хвилі 540 нм. Індекс цитотоксичності розраховували за формулою:

$$CI = K-O/K \times 100\%,$$

де К та О – значення оптичної густини клітини в культуральному середовищі (RPMI 1640 з 10% FCS). Для стандартизації індексу цитотоксичності використовували калібрувальну криву на основі стандартної рекомбінантної формуляції фактору некрозу пухлин Sigma. Рівні IFN у клітинних культурах та сироватці крові вимірювали за допомогою стандартного мікротитрування в пасажованій клітинній культурі L-929 проти 100 TCD 50 індикаторного вірусу (вірус везикулярного стоматиту, Indiana VSV) при постійному рівні CO₂. Значимість результатів аналізували за t-критерієм Ст'юдента-Фішера[54]

8.2. Контроль готової продукції

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Показники якості	Допустимі межі	Методи контролю
Опис	повинні мати гладку поверхню без ушкоджень і видимих повітряних і механічних включень.	За п.1 МК – візуально.
Однорідність маси	не повинно перевищувати 10% при середній масі <300 мг	ДФУ розділ 2.9.5
Вміст капсул	±7,5 %	ДФУ розділ 2.9.6
Розпадання	не більше ніж за 30 хвилин	ДФУ розділ 2.9.1
Мікробіологічна чистота	-	ДФУ розділ 2.6.12
Специфічна активність	<i>Визначення цитокін-індукційної спроможності:</i> життєздатність клітин ≥95 % <i>Продукція цитокінів:</i> Титр інтерферону визначають за найвищим розведенням, яке забезпечує захист 50 % клітин.	За п.6 МК

8.2.1.Опис

Опис є первинним етапом контролю якості капсул і проводиться з метою підтвердження відповідності зовнішнього вигляду лікарського засобу вимогам нормативної документації. Для твердих желатинових капсул оцінюють їх форму, колір, розміри, цілісність оболонки, однорідність поверхні, відсутність тріщин, вм'ятин, плям або злипання.

Опис порівнюють з еталонним зразком або затвердженою специфікацією виробника. Якщо капсули мають маркування або нанесення логотипу, також перевіряють чіткість, колір і розташування відбитку.

Капсули повинні мати гладку поверхню без ушкоджень і видимих повітряних і механічних включень.

8.2.2. Однорідність маси

Для твердих желатинових капсул випробування виконують так: відбирають 20 капсул, кожен зважують разом із оболонкою, після чого видаляють вміст (відокремлюють оболонку) і зважують порожню капсулу. Маса вмісту визначається як різниця між масою капсули з вмістом і масою оболонки. Середнє значення маси вмісту обчислюють, після чого порівнюють відхилення маси кожної капсули від середньої.

Допустимі відхилення встановлені ДФУ: відхилення не повинно перевищувати 10% при середній масі <300 мг.

8.2.3. Вміст капсул

З відповідної кількості капсул витягують діючу речовину з кожної капсули (розчинення, екстракція, фільтрація) та визначають її концентрацію за допомогою відповідного аналітичного методу (наприклад, спектрофотометрія, титриметрія, хроматографія тощо) відповідно до вимог монографії. Препарат вважається придатним, якщо не більше ніж одна одиниця виходить за межі 85-115 % середнього значення, і жодна одиниця не виходить за межі 75–125 % середнього.

Також у ДФУ наведено загальні межі допуску для вмісту у випадку, якщо в монографії не має інших вказівок:

- при дозуванні < 1 мг – $\pm 15\%$

- від 1 до 10 мг – $\pm 10\%$
- від 10 до 100 мг – $\pm 7,5\%$
- ≥ 100 мг – $\pm 5\%$

8.2.4. Розпадання

Випробування на розпадання капсул визначає час, за який оболонка і вміст капсули повністю дезінтегрують у стандартних лабораторних умовах.

Для твердих капсул випробування проводять у приладі для визначення розпадання, використовуючи воду або буферний розчин при температурі $37 \pm 0,5$ °C, що імітує умови шлунково-кишкового тракту. Капсули поміщають у кошики приладу, які рухаються у вертикальному напрямку у середовищі розчинника. Кожна капсула має повністю розпадатися без залишків великих часток, що не проходять через сітку протягом певного часу.

Згідно з вимогами ДФУ, усі капсули повинні розпадатися не більше ніж за 30 хвилин, якщо інше не передбачено специфікацією.

8.2.5. Мікробіологічна чистота

Контроль мікробіологічної чистоти є обов'язковим етапом контролю якості для всіх лікарських засобів, у тому числі капсул. Випробування проводиться з метою перевірки відповідності лікарського засобу вимогам до вмісту життєздатних мікроорганізмів, дріжджів, пліснявих грибів, а також відсутності певних патогенних мікроорганізмів. Згідно з вимогами розділу ДФУ 2.6.12, методика випробування полягає у виявленні та кількісному підрахунку мікроорганізмів, що можуть бути присутні у готовому продукті або потрапити до нього під час виробництва.

Для капсул, призначених для перорального застосування, передбачено визначення таких показників:

- загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів;
- загальна кількість дріжджів і пліснявих грибів;
- відсутність патогенних мікроорганізмів, зокрема *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.* та *Candida albicans*.

Перед проведенням аналізу вміст капсул обережно висипають у стерильну колбу і розчиняють або суспендують у стерильному фізіологічному розчині натрію хлориду 0,9 % або у фосфатному буфері pH 7,0, після чого отриману суспензію використовують для посіву. Для визначення загальної кількості життєздатних аеробних мікроорганізмів використовують метод посіву на поживні середовища з інкубацією при температурі 30–35 °C протягом 3–5 діб (3 дні – бактерії, 5 днів – гриби)

8.2.6. Специфічна активність

Для визначення цитокін-індукційної спроможності лізату мишам масою 16–18 г перорально вводять суспензію препарату в дозах 0,5 та 1,0 см³ протягом п'яти діб з інтервалом 24 години у дозах, що відповідають еквівалентним концентраціям вихідного препарату. Контрольна група отримує фізіологічний розчин. Через добу після завершення введення тварин забивають методом цервікальної дислокації та відбирають сироватку крові, селезінку, спленоцити й макрофаги перитонеального ексудату. Життєздатність отриманих клітин контролюють у тесті з трипановим синім, що має бути не нижчою ніж 95 %[104].

Продукція цитокінів (ІФН та ФНП-а)

Контроль імуномодуючої активності лізату проводять за здатністю індукувати продукцію інтерферонів та за їх функціональною активністю. Для цього використовують спленоцити або мононуклеари периферичної крові, які культивують у середовищі 199, доповненому ембріональною телячою сироваткою, HEPES-буфером, глютаміном, 2-меркаптоетанолом та антибіотиками. Для індукції ІФН-α у лунки планшета вносять клітини, середовище та 10 мкл лізату; контрольні лунки містять лише середовище. Інкубацію здійснюють 24 години при 37 °C у 5 % CO₂, після чого супернатант відбирають. Індукцію ІФН-γ проводять аналогічно, замінюючи індуктор на фітогемаглютинін та подовжуючи інкубацію до 48 годин[104].

Функціональну активність інтерферонів визначають у культурі фібробластів лінії L-929, які висівають у 96-лунковий планшет до формування суцільного моношару. У стерильному планшеті готують дворазові розведення відібраних супернатантів (1:2-1:256), замінюють ними живильне середовище та інкубують 18

годин. Після цього вносять стандартну дозу вірусу везикулярного стоматиту й інкубують 24 години до появи цитопатичної дії в контролі. Титр інтерферону визначають за найвищим розведенням, яке забезпечує захист 50 % клітин. Для перерахунку ОД/см³ у МО/см³ використовують референтний зразок інтерферону та стандартну формулу співвідношення титрів[104].

ВИСНОВКИ

1. У ході виконання кваліфікаційної роботи було узагальнено сучасні наукові дані щодо імунобіотиків та проаналізовано їхні механізми взаємодії з імунною системою, що дозволило сформулювати комплексне уявлення про їхню роль у регуляції вроджених та адаптивних імунних реакцій. Показано, що біотехнологічні препарати на основі пробіотичних культур або їхніх структурних компонентів характеризуються високим потенціалом у профілактиці та корекції респіраторних і кишкових інфекцій, а їх імуномодуюча дія реалізується через активацію Toll-подібних рецепторів, регуляцію цитокінових каскадів, посилення бар'єрної функції слизових оболонок та підвищення синтезу секреторного IgA.

2. Було обґрунтовано вибір штаму *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 як перспективного біологічного агента для створення імунобіотиків, оскільки саме цей штам продемонстрував здатність до індукції інтерферонів I типу, активації макрофагів і дендритних клітин, модуляції співвідношення Th1/Th2-відповідей та формування ефективного мукозального захисту. Важливо, що як життєздатні клітини *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505, так і нежиттєздатна біомаса, пептидоглікан та фрагменти клітинної стінки зберігають виражені імунобіотичні властивості, що дає змогу використовувати їх у складі постбіотичних препаратів з покращеними показниками стабільності та безпеки.

3. В результаті проаналізованих даних було сформовано технологію одержання лізату, яка включає: культивування, відділення біомаси, суспендування у фізіологічному середовищі, лізис клітин (ферментативним методом), повторне суспендування в супернатанті, висушування та подрібнення ліофілізованої маси. Включення у кінцевий лізат позаклітинних метаболітів, отриманих після фільтрації культуральної рідини, підсилює імуномодуючі властивості препарату завдяки присутності біологічно активних пептидів і низькомолекулярних метаболітів, що синергічно взаємодіють зі структурними поверхневими компонентами клітин.

					НУХТ БТЕК 02.01.06 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Постоюк О.О.			РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Старовойтова С.О.					70	84
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						КАФЕДРА БТМ 70		

4. Також було розроблено апартурну та технологічні схеми виробництва ліофілізованого лізату *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 в желатинових капсулах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Aggarwal, Sunita & Sabharwal, Vandana & Kaushik, Pragya & Joshi, Anushka & Sharma, Aayushi & Suri, Manjula. (2022). Postbiotics: From emerging concept to application. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 6. 887642. 10.3389/fsufs.2022.887642.
2. Amobonye, A., Pillay, B., Hlope, F., Asong, S. T., & Pillai, S. (2025). Postbiotics: an insightful review of the latest category in functional biotics. *World journal of microbiology & biotechnology*, 41(8), 293. <https://doi.org/10.1007/s11274-025-04483-8>
3. Azad, M. A. K., Sarker, M., & Wan, D. (2018). Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles. *BioMed research international*, 2018, 8063647. <https://doi.org/10.1155/2018/8063647>
4. Aziz, N., & Bonavida, B. (2016). Activation of Natural Killer Cells by Probiotics. *Forum on immunopathological diseases and therapeutics*, 7(1-2), 41–55. <https://doi.org/10.1615/ForumImmunDisTher.2016017095>
5. Bae, W. Y., Jung, W. H., Shin, S. L., Kwon, S., Sohn, M., & Kim, T. R. (2022). Investigation of Immunostimulatory Effects of Heat-Treated *Lactiplantibacillus plantarum* LM1004 and Its Underlying Molecular Mechanism. *Food science of animal resources*, 42(6), 1031–1045. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e50>
6. Baradaran Ghavami, S., Asadzadeh Aghdaei, H., Sorrentino, D., Shahrokh, S., Farmani, M., Ashrafian, F., Dore, M. P., Keshavarz Azizi Raftar, S., Mobin Khoramjoo, S., & Zali, M. R. (2021). Probiotic-Induced Tolerogenic Dendritic Cells: A Novel Therapy for Inflammatory Bowel Disease? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8274. <https://doi.org/10.3390/ijms22158274>
7. Berger A. (2000). Th1 and Th2 responses: what are they?. *BMJ (Clinical research ed.)*, 321(7258), 424. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7258.424>
8. Bumgardner SA, Zhang L, LaVoy AS, Andre B, Frank CB, et al. (2018) Nod2 is required for antigen-specific humoral responses against antigens orally delivered using a recombinant *Lactobacillus* vaccine platform. *PLOS ONE* 13(5): e0196950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196950>
9. Bustos, A.Y., Taranto, M.P., Gerez, C.L. *et al.* Recent Advances in the Understanding of Stress Resistance Mechanisms in Probiotics: Relevance for the Design of

Functional Food Systems. *Probiotics & Antimicro. Prot.* **17**, 138–158 (2025).
<https://doi.org/10.1007/s12602-024-10273-9>

10. CAPSULES/[Электронный ресурс]. – Режим доступа:
<https://www.drugfuture.com/Pharmacopoeia/BP2010/data/6267.html#:~:text=DEFINITION>

11. Champagne-Jorgensen, K., Mian, M.F., McVey Neufeld, K.A. et al. Membrane vesicles of *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 contain immunomodulatory lipoteichoic acid and are endocytosed by intestinal epithelial cells. *Sci Rep* **11**, 13756 (2021).
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-93311-8>

12. Claes IJ, Segers ME, Verhoeven TL, Dusselier M, Sels BF, De Keersmaecker SC, Vanderleyden J, Lebeer S. Lipoteichoic acid is an important microbe-associated molecular pattern of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Microb Cell Fact.* 2012 Dec 15;11:161. doi: 10.1186/1475-2859-11-161. PMID: 23241240; PMCID: PMC3537616.

13. Clua P, Kanmani P, Zelaya H, Tada A, Kober AKMH, Salva S, Alvarez S, Kitazawa H, Villena J. Peptidoglycan from Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* Improves Resistance of Infant Mice to Respiratory Syncytial Viral Infection and Secondary Pneumococcal Pneumonia. *Front Immunol.* 2017 Aug 10;8:948. doi: 10.3389/fimmu.2017.00948. PMID: 28848552; PMCID: PMC5554128.

14. Clua, P., Kanmani, P., Zelaya, H., Tada, A., Kober, A. K. M. H., Salva, S., ... Villena, J. (2017). Peptidoglycan from Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* Improves Resistance of Infant Mice to Respiratory Syncytial Viral Infection and Secondary Pneumococcal Pneumonia. *Frontiers in Immunology*, 8. doi:10.3389/fimmu.2017.00948

15. Correa Deza M. A., Salva S., Grillo-Puertas M., Font G. M., Gerez, C. L. (2023). Effect of culture parameters on the heat tolerance and inorganic polyphosphate accumulation by *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505, a multifunctional bacterium. *World journal of microbiology & biotechnology*, 39(7), 182.
<https://doi.org/10.1007/s11274-023-03625-0>

16. Correa Deza M.A., Rodríguez de Olmos A., Suárez N.E., Font de Valdez G.F., Salva S., Gerez C.L. (2021a) Inorganic polyphosphate from the immunobiotic *Lactobacillus*

rhamnosus CRL1505 prevents inflammatory response in the respiratory tract. Saudi J Biol Sci 28:5684–5692. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.06.010

17. Daniali M., Nikfar S., Abdollahi M. (2020) Antibiotic resistance propagation through probiotics. Expert Opin 16:1207–1215. DOI: 10.1080/17425255.2020.1825682

18. Delgado S., Sánchez B., Margolles A., Ruas-Madiedo P., Ruiz L. (2020) Molecules produced by probiotics and intestinal microorganisms with immunomodulatory activity. Nutrients 12:391. DOI: 10.3390/nu12020391

19. Drago, L., Nicola, L., Iemoli, E. *et al.* Strain-dependent release of cytokines modulated by *Lactobacillus salivarius* human isolates in an *in vitro* model. BMC Res Notes 3, 44 (2010). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-44>

20. Elean, M., Albarracín, L., Cataldo, P. G., Londero, A., Kitazawa, H., Saavedra, L., Hebert, E. M. (2020). New immunobiotics from highly proteolytic *Lactobacillus delbrueckii* strains: their impact on intestinal antiviral innate immune response. Beneficial Microbes, 1–16. doi:10.3920/bm2019.0198

21. Eslami M, Bahar A, Keikha M, Karbalaee M, Kobyliak NM, Yousefi B. Probiotics function and modulation of the immune system in allergic diseases. Allergol Immunopathol (Madr). 2020 Nov-Dec;48(6):771-788. doi: 10.1016/j.aller.2020.04.005. Epub 2020 Aug 4. PMID: 32763025.

22. Ferrara, F., Rial, A., Suárez, N., & Chabalgoity, J. A. (2021). Polyvalent Bacterial Lysate Protects Against Pneumonia Independently of Neutrophils, IL-17A or Caspase-1 Activation. *Frontiers in immunology*, 12, 562244. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.562244>

23. Ferrucci V., Kong D.Y., Asadzadeh F., Marrone L., Boccia A., Siciliano R. *et al* (2021) Long-chain polyphosphates impair SARS-CoV-2 infection and replication. Sci Signal 14:eabe5040. DOI: 10.1126/scisignal.abe5040

24. Florencia, G., Brenda, V., Maximiliano, I., Susana, A., & Susana, S. (2025). A novel postbiotic from *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 able to enhance the steady-state myelopoiesis. Journal of Traditional and Complementary Medicine. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2025.02.007>

25. Foligne, B., Zoumpopoulou, G., Dewulf, J., Ben Younes, A., Chareyre, F., Sirard, J. C., Pot, B., & Grangette, C. (2007). A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PloS one*, 2(3), e313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000313>
26. Gou, H. Z., Zhang, Y. L., Ren, L. F., Li, Z. J., & Zhang, L. (2022). How do intestinal probiotics restore the intestinal barrier?. *Frontiers in microbiology*, 13, 929346. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.929346>
27. Grey, B. E., & Steck, T. R. (2001). The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied and environmental microbiology*, 67(9), 3866–3872. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.3866-3872.2001>
28. Hebbink, Gerald & Dickhoff, Bastiaan. (2019). Application of lactose in the pharmaceutical industry. 10.1016/B978-0-12-811720-0.00005-2.
29. Huang, J., Li, J., Li, Q., Li, L., Zhu, N., Xiong, X., & Li, G. (2020). Peptidoglycan derived from *Lactobacillus rhamnosus* MLGA up-regulates the expression of chicken β -defensin 9 without triggering an inflammatory response. *Innate immunity*, 26(8), 733–745. <https://doi.org/10.1177/1753425920949917>
30. Huang, L., Zhao, Z., Duan, C., Wang, C., Zhao, Y., Yang, G., Gao, L., Niu, C., Xu, J., & Li, S. (2019). *Lactobacillus plantarum* C88 protects against aflatoxin B₁-induced liver injury in mice via inhibition of NF- κ B-mediated inflammatory responses and excessive apoptosis. *BMC microbiology*, 19(1), 170. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1525-4>
31. Hynönen, U., & Palva, A. (2013). *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(12), 5225–5243. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4962-2>
32. Ikram, A., Safdar, S. Z., Arshad, M. T., Rasheed, A., & Gnedeka, K. T. (2024). An overview of postbiotics: unveiling their distinct role in gut health. *Food and Agricultural Immunology*, 35(1). <https://doi.org/10.1080/09540105.2024.2434463>
33. Jannah, S. R., Rahayu, E. S., Yanti, R., Suroto, D. A., & Wikandari, R. (2022). Study of Viability, Storage Stability, and Shelf Life of Probiotic Instant Coffee *Lactiplantibacillus plantarum* Subsp. *plantarum* Dad-13 in Vacuum and Nonvacuum

Packaging at Different Storage Temperatures. International journal of food science, 2022, 1663772. <https://doi.org/10.1155/2022/1663772>

34. Javanshir, N., Hosseini, G.N.G., Sadeghi, M. *et al.* Evaluation of the Function of Probiotics, Emphasizing the Role of their Binding to the Intestinal Epithelium in the Stability and their Effects on the Immune System. *Biol Proced Online* **23**, 23 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12575-021-00160-w>

35. Jet mill vs Ball mill: Which is Better for Your Material Processing Needs? /[Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://es.epic-powder.com/jet-mill-vs-ball-mill-which-is-better-for-your-material-processing-needs/>

36. Kanmani, P., & Kim, H. (2019). Immunobiotic Strains Modulate Toll-Like Receptor 3 Agonist Induced Innate Antiviral Immune Response in Human Intestinal Epithelial Cells by Modulating IFN Regulatory Factor 3 and NF- κ B Signaling. *Frontiers in immunology*, 10, 1536. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01536>

37. Kim, H., Kim, H. R., Kim, N.-R., Jeong, B. J., Lee, J. S., Jang, S., & Chung, D. K. (2014). Oral administration of *Lactobacillus plantarum* lysates attenuates the development of atopic dermatitis lesions in mouse models. *Journal of Microbiology*, 53(1), 47–52. doi:10.1007/s12275-015-4483-z

38. Kolling Y, Salva S, Villena J, Marranzino G, Alvarez S. Non-viable immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 and its peptidoglycan improve systemic and respiratory innate immune response during recovery of immunocompromised-malnourished mice. *Int Immunopharmacol.* 2015 Apr;25(2):474-84. doi: 10.1016/j.intimp.2015.02.006. Epub 2015 Mar 2. PMID: 25744605.

39. Kolling Y., Salva S., Villena J., Alvarez S. (2018). Are the immunomodulatory properties of *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 peptidoglycan common for all *Lactobacilli* during respiratory infection in malnourished mice? *PLoS One.*;13(3):e0194034. doi: 10.1371/journal.pone.0194034.

40. Kolling Y., Salva S., Villena J., Marranzino G., Alvarez S. (2025). A novel postbiotic from *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 able to enhance the steady-state myelopoiesis. *Journal of Traditional and Complementary Medicine.* <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2025.02.007>

41. Kolling, Y., Salva, S., Villena, J., Marranzino, G., & Alvarez, S. (2015). Non-viable immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 and its peptidoglycan improve systemic and respiratory innate immune response during recovery of immunocompromised-malnourished mice. *International Immunopharmacology*, 25(2), 474–484. doi:10.1016/j.intimp.2015.02.006
42. Lee, P. W., Maia, J., & Pokorski, J. K. (2017). Milling solid proteins to enhance activity after melt-encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 533(1), 254–265. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.044>
43. Lemme-Dumit, J. M., Cazorla, S. I., Perdigón, G. D. V., & Maldonado-Galdeano, C. (2021). Probiotic Bacteria and Their Cell Walls Induce Th1-Type Immunity Against *Salmonella Typhimurium* Challenge. *Frontiers in immunology*, 12, 660854. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.660854>
44. Liu, Y., Wang, J., & Wu, C. (2022). Modulation of Gut Microbiota and Immune System by Probiotics, Pre-biotics, and Post-biotics. *Frontiers in nutrition*, 8, 634897. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.634897>
45. Lu Z., Wei Y., Sun Y., Du R., Zhao Y., Guo X. (2024). *Lactobacillus rhamnosus*, ferment lysate for regulating skin microecology, preparation method, and application. US Patent Application No. US 20 24 0165015 A1. Filed 24 Mar 2022; published 23 May 2024. Assignee: Bloomage Biotech Co. Ltd.
46. Lu, Z., Wei, Y., Sun, Y., Du, R., Zhao, Y., & Guo, X. (2024, May 23). *Lactobacillus rhamnosus*, ferment lysate for regulating skin microecology, preparation method, and application (U.S. Patent No. US20240165015A1). U.S. Patent and Trademark Office. <https://patents.google.com/patent/US20240165015A1/en>
47. Macho Fernandez E, Valenti V, Rockel C, Hermann C, Pot B, Boneca IG, Grangette C. Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut*. 2011 Aug;60(8):1050-9. doi: 10.1136/gut.2010.232918. Epub 2011 Apr 6. Erratum in: *Gut*. 2011 Oct;60(10):1444. Fernandez, Elise Macho [corrected to Macho Fernandez, Elise]. PMID: 21471573.

48. Magramane, S., Kállai-Szabó, N., Farkas, D., Süvegh, K., Zelkó, R., & Antal, I. (2025). Comparative Evaluation of Gelatin and HPMC Inhalation Capsule Shells Exposed to Simulated Humidity Conditions. *Pharmaceutics*, 17(7), 877. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17070877>
49. Mazziotta, C., Tognon, M., Martini, F., Torreggiani, E., & Rotondo, J. C. (2023). Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. *Cells*, 12(1), 184. <https://doi.org/10.3390/cells12010184>
50. Mei, L., Chen, Y., Wang, J., Lu, J., Zhao, J., Zhang, H., Wang, G., & Chen, W. (2022). *Lactobacillus fermentum* Stimulates Intestinal Secretion of Immunoglobulin A in an Individual-Specific Manner. *Foods*, 11(9), 1229. <https://doi.org/10.3390/foods11091229>
51. Monodose Packaging For Probiotic and Nutraceutical Market Driven by 9.55% CAGR/[Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.towardspackaging.com/insights/monodose-packaging-for-probiotic-and-nutraceutical-market-sizing#:~:text=Monodose%20packaging%20raises%20the%20main,recyclable%20plastics>
52. Ohrem, H. L., Schornick, E., Kalivoda, A., & Ognibene, R. (2014). Why is mannitol becoming more and more popular as a pharmaceutical excipient in solid dosage forms?. *Pharmaceutical development and technology*, 19(3), 257–262. <https://doi.org/10.3109/10837450.2013.775154>
53. Percopo, C. M., Rice, T. A., Brenner, T. A., Dyer, K. D., Luo, J. L., Kanakabandi, K., ... Rosenberg, H. F. (2015). Immunobiotic *Lactobacillus administered* post-exposure averts the lethal sequelae of respiratory virus infection. *Antiviral Research*, 121, 109–119. doi:10.1016/j.antiviral.2015.07.001
54. Pidgorskyi, S., Shynkarenko-Sichel, L. N., Timoshok, N. A., Cheipesh, A. V., & Spivak, N. Y. (2011). Effects of dry enzymatic lysate Del-Immune V® on cytokine production in the experimental models. *Мікробіологія і біотехнологія*, (3).
55. Raya Tonetti, F., Clua, P., Fukuyama, K., Marcial, G., Sacur, J., Marranzino, G., Tomokiyo, M., Vizoso-Pinto, G., Garcia-Cancino, A., Kurata, S., Kitazawa, H., & Villena, J. (2022). The Ability of Postimmunobiotics from *L. rhamnosus* CRL1505 to Protect against Respiratory Syncytial Virus and Pneumococcal Super-Infection Is a Strain-

Dependent Characteristic. Microorganisms, 10(11), 2185.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10112185>

56. Rocha-Ramírez, L. M., Hernández-Ochoa, B., Gómez-Manzo, S., Marcial-Quino, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Centeno-Leija, S., & García-Garibay, M. (2020). Evaluation of Immunomodulatory Activities of the Heat-Killed Probiotic Strain *Lactobacillus casei* IMAU60214 on Macrophages In Vitro. *Microorganisms*, 8(1), 79. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010079>

57. Rocha-Ramírez, L. M., Pérez-Solano, R. A., Castañón-Alonso, S. L., Moreno Guerrero, S. S., Ramírez Pacheco, A., García Garibay, M., & Eslava, C. (2017). Probiotic *Lactobacillus* Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. *Journal of immunology research*, 2017, 4607491. <https://doi.org/10.1155/2017/4607491>

58. Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis*. 1999 Nov;5(4):285-94. doi: 10.1097/00054725-199911000-00009. PMID: 10579123.

59. Rottiers P, De Smedt T, Steidler L. Modulation of gut-associated lymphoid tissue functions with genetically modified *Lactococcus lactis*. *Int Rev Immunol*. 2009;28(6):465-86. doi: 10.3109/08830180903197498. PMID: 19954359.

60. Salas-Lais, A.G.; Robles-Contreras, A.; Balderas-López, J.A.; Bautista-de Lucio, V.M. Immunobiotic and Paraprobiotic Potential Effect of *Lactobacillus casei* in a Systemic Toxoplasmosis Murine Model. *Microorganisms* 2020, 8, 113. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010113>

61. Salva S, Tiscornia I, Gutiérrez F, Alvarez S, Bollati-Fogolín M. *Lactobacillus rhamnosus* postbiotic-induced immunomodulation as safer alternative to the use of live bacteria. *Cytokine*. 2021 Oct;146:155631. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155631. Epub 2021 Jul 10. PMID: 34252871.

62. Salva, S., Kolling, Y., Ivir, M., Gutiérrez, F., & Alvarez, S. (2021). The Role of Immunobiotics and Postbiotics in the Recovery of Immune Cell Populations From Respiratory Mucosa of Malnourished Hosts: Effect on the Resistance Against Respiratory Infections. *Frontiers in nutrition*, 8, 704868. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.704868>

63. Salva, S., Tiscornia, I., Gutiérrez, F., Alvarez, S., & Bollati-Fogolín, M. (2021). *Lactobacillus rhamnosus* postbiotic-induced immunomodulation as safer alternative to the use of live bacteria. *Cytokine*, 146, 155631. doi:10.1016/j.cyto.2021.155631
64. Sanaei M, Mahdavi M, Setayesh N, Shahverdi AR, Sepehrizadeh Z, Yazdi MH. Comparison of Cytokine Expression in Human PBMCs Stimulated with Normal and Heat-Shocked *Lactobacillus plantarum* Cell Lysate. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2021 Dec;13(6):1539-1545. doi: 10.1007/s12602-021-09785-5. Epub 2021 Apr 11. PMID: 33843030.
65. Sarita, B., Samadhan, D., Hassan, M. Z., & Kovaleva, E. G. (2025). A comprehensive review of probiotics and human health-current prospective and applications. *Frontiers in microbiology*, 15, 1487641. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1487641>
66. Schepler H., Wang X., Neufurth M., Wang S., Schröder H.C., Müller W.E. (2021) The therapeutic potential of inorganic polyphosphate: a versatile physiological polymer to control coronavirus disease (COVID-19). *Theranostics* 11:6193. DOI: 10.7150/thno.59535
67. Shehadul Islam, M., Aryasomayajula, A., & Selvaganapathy, P. R. (2017). A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines*, 8(3), 83. <https://doi.org/10.3390/mi8030083>
68. Sodium Chloride Solutions in Cell Biology, Microbiology, and Molecular Biology/[Электронный ресурс]. — Режим доступа: https://www.amerigoscientific.com/resource-sodium-chloride-solutions-in-cell-biology-microbiology-and-molecular-biology.html?srsltid=AfmBOocwgiL5cZqPMzaLTmhJniflE2EIYO_FVJGg6Zvrj6qBquhtwjw&utm
69. Starovoitova S., Demchenko O., Bila V., Spivak M. The Role of Intestinal Microbiota and its Recovery in COVID-19. *Microbiological journal*. 2022 (1). P. 63—71. <https://doi.org/10.15407/microbiolj84.01.057>.
70. Szydłowska, A., & Sionek, B. (2023). Probiotics and Postbiotics as the Functional Food Components Affecting the Immune Response. *Microorganisms*, 11(1), 104. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010104>

71. Teame T, Wang A, Xie M, Zhang Z, Yang Y, Ding Q, Gao C, Olsen RE, Ran C, Zhou Z. Paraprobiotics and Postbiotics of Probiotic Lactobacilli, Their Positive Effects on the Host and Action Mechanisms: A Review. *Front Nutr*. 2020 Oct 22;7:570344. doi: 10.3389/fnut.2020.570344. PMID: 33195367; PMCID: PMC7642493.
72. Tonetti F.R., Islam M.A., Vizoso-Pinto M.G., Takahashi H., Kitazawa H., Villena J. (2020) Nasal priming with immunobiotic lactobacilli improves the adaptive immune response against influenza virus. *Int Immunopharmacol* 78:106–115. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.106115
73. Tsukida, K., Takahashi, T., Iida, H. et al. Immunoregulatory effects triggered by immunobiotic *Lactobacillus jensenii* TL2937 strain involve efficient phagocytosis in porcine antigen presenting cells. *BMC Immunol* 17, 21 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12865-016-0160-1>
74. Vale, G. C., & Mayer, M. P. A. (2021). Effect of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* by-products on gingival epithelial cells challenged with *Porphyromonas gingivalis*. *Archives of Oral Biology*, 128, 105174. doi:10.1016/j.archoralbio.2021.105174
75. Velly H., Fonseca F., Passot S., Delacroix-Buchet A., Bouix M. (2014) Cell growth and resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 following freezing, drying and freeze-dried storage are differentially affected by fermentation conditions. *J Appl Microbiol* 117:729–740. DOI: 10.1111/jam.12577
76. Villena J., Vizoso-Pinto M.G., Kitazawa H. (2016) Intestinal innate antiviral immunity and immunobiotics: beneficial effects against rotavirus infection. *Front Immunol* 7:563. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00563
77. Villena, J., & Kitazawa, H. (2017). Editorial: Immunobiotics-Interactions of Beneficial Microbes with the Immune System. *Frontiers in immunology*, 8, 1580. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01580>
78. Villena, J., & Kitazawa, H. (2017). Editorial: Immunobiotics-Interactions of Beneficial Microbes with the Immune System. *Frontiers in immunology*, 8, 1580. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01580>
79. Villena, J., Chiba, E., Vizoso-Pinto, M.G. et al. Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* strains differentially modulate antiviral immune response in porcine intestinal

epithelial and antigen presenting cells. *BMC Microbiol* **14**, 126 (2014).
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-126>

80. Vinderola, G., Sanders, M. E., & Salminen, S. (2022). The Concept of Postbiotics. *Foods*, 11(8), 1077. <https://doi.org/10.3390/foods11081077>

81. Wang Y, Liu H, Zhao J. Macrophage Polarization Induced by Probiotic Bacteria: a Concise Review. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2020 Sep;12(3):798-808. doi: 10.1007/s12602-019-09612-y. PMID: 31741313.

82. Wang, G., Chen, Y., Xia, Y., Song, X., & Ai, L. (2022). Characteristics of Probiotic Preparations and Their Applications. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(16), 2472. <https://doi.org/10.3390/foods11162472>

83. Wang, L., Liu, C., Chen, M., Ya, T., Huang, W., Gao, P., & Zhang, H. (2015). A novel *Lactobacillus plantarum* strain P-8 activates beneficial immune response of broiler chickens. *International Immunopharmacology*, 29(2), 901–907. doi:10.1016/j.intimp.2015.07.024

84. Wu, Y., Levons, J., Narang, A. S., Raghavan, K., & Rao, V. M. (2011). Reactive impurities in excipients: profiling, identification and mitigation of drug-excipient incompatibility. *AAPS PharmSciTech*, 12(4), 1248–1263. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9677-z>

85. Zelaya H., Alvarez S., Kitazawa H., Villena J. (2016) Respiratory antiviral immunity and immunobiotics: beneficial effects on inflammation-coagulation interaction during influenza virus infection. *Front Immunol* 7:633. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00633

86. Zelaya, H., Tada, A., Vizoso-Pinto, M. G., Salva, S., Kanmani, P., Agüero, G., ... Villena, J. (2015). Nasal priming with immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* modulates inflammation-coagulation interactions and reduces influenza virus-associated pulmonary damage. *Inflammation Research*, 64(8), 589–602. doi:10.1007/s00011-015-0837-6

87. Zelaya, H., Villena, J., Lopez, A. G., Alvarez, S., & Agüero, G. (2014). Modulation of the inflammation-coagulation interaction during pneumococcal pneumonia by immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505: Role of Toll-like receptor 2. *Microbiology and Immunology*, 58(7), 416–426. doi:10.1111/1348-0421.12163

88. Zhou, B., Albarracin, L., Indo, Y., Arce, L., Masumizu, Y., Tomokiyo, M., Islam, M. A., Garcia-Castillo, V., Ikeda-Ohtsubo, W., Nochi, T., Morita, H., Takahashi, H., Kurata, S., Villena, J., & Kitazawa, H. (2020). Selection of Immunobiotic *Ligilactobacillus salivarius* Strains from the Intestinal Tract of Wakame-Fed Pigs: Functional and Genomic Studies. *Microorganisms*, 8(11), 1659. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111659>
89. Zhu, Y., Xiao, M., Kang, T., He, Y., Zhang, J., Zhao, Y., & Xiao, X. (2025). The Role of Inactivation Methods in Shaping Postbiotic Composition and Modulating Bioactivity: A Review. *Foods*, 14(13), 2358. <https://doi.org/10.3390/foods14132358>
90. Zielińska, D., & Kolożyn-Krajewska, D. (2018). Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic Properties: Review. *BioMed research international*, 2018, 5063185. <https://doi.org/10.1155/2018/5063185>
91. Żółkiewicz J., Marzec A., Ruszczyński M., Feleszko W. (2020) Postbiotics—a step beyond pre-and probiotics. *Nutrients* 12:2189. DOI: 10.3390/nu12082189
92. Інструкція із використання Дел-імун v [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.add.ua/ua/manual/del-immuno-v.html>.
93. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: Навч. посібник. – К.:НУХТ, 2022. –373 с. ISBN 978-966-612-278-3.
94. КЛАСИФІКАЦІЯ ВИРОБНИЧИХ ПРИМІЩЕНЬ /[Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3558/klasifikaciya-virobnichix-primishhen#:~:text=%D0%9A%D0%BB%D0%B0%D1%81%20%D0%90%20%E2%80%94%D0%BB%D0%BE%D0%BA%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%B0%20%D0%B7%D0%BE%D0%BD%D0%B0,1>
95. Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І. (2019) Загальна біотехнологія : навчальний посібник К. : ВПЦ "Київський університет", 2019. – 269 с
96. Лич І.В. Основи імунології [Електронний ресурс]: конспект лекцій для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / І.В. Лич. – К.: НУХТ, 2015. – 180 с.

97. Лич І.В. Промислова технологія лікарських засобів: конспект лекцій для студентів освітнього ступеня бакалавр спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / І.В. Лич. – К.: НУХТ, 2017. – 323 с.

98. МІКРОБНА КОНТАМІНАЦІЯ ЛІКІВ/[Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1465/mikrobna-kontaminaciya-likiv#:~:text=%D0%BA%D0%BE%D0%BD%D1%82%D0%B0%D0%BC%D1%96%D0%BD%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%8F%20%D0%BD%D0%B0%D1%81%D0%B0%D0%BC%D0%BF%D0%B5%D1%80%D0%B5%D0%B4%20%D1%81%D0%B0%D0%BF%D1%80%D0%BE%D1%84%D1%96%D1%82%D0%BD%D0%BE%D1%8E%20%D0%BC%D1%96%D0%BA%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%25>

99. Населення України на 2025 рік [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://prostir.media/ukrayina/skilky-lyudej-prozhyvaye-v-ukrayini-u-2025-rotsi/>

100. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0/1:2023 ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ НАЛЕЖНА ВИРОБНИЧА ПРАКТИКА ДОДАТОК 1. ВИРОБНИЦТВО СТЕРИЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

101. Основи загальної та фармацевтичної гігієни: Навч. посіб. для студ. вищ. фармац. навч. закл. і фармац. факультетів вищ. мед. навч. закладів. – Х.: Видавництво НФаУ: Золоті сторінки 2003. – 180 с.

102. Польова З.М., Тарасенко В.О., Мирончук Т.М., Польовий А.С. (2024). Дослідження асортименту фармацевтичного ринку лікарських засобів з пробіотичною активністю, що містять бактерії роду *Bacillus*, *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*. *Український військово-медичний журнал*, 5 (2), 120-128. [https://doi.org/10.46847/ujmm.2024.2\(5\)-120](https://doi.org/10.46847/ujmm.2024.2(5)-120)

103. Про захворювання Токсоплазмоз [Електронний ресурс]//Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/handbooks-uk/nozologia-dovidnyk/toksoplazmoz-3/>

104. Технологія пробіотиків : підручник / С. О. Старовойтова, О. І. Скроцька, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог. – К.: НУХТ, 2012. - 318 с.

105. Фармацевтична технологія : навчальний посібник до самостійної роботи провізорів-інтернів зі спеціальності «Загальна фармація». Ч. 2 / Г. П. Смойловська, Т.В. Хортецька, О.О. Малюгіна, Л.А. Фуклева. – Запоріжжя : ЗДМУ, 2017. – 100 с.