

Токсикологічні дослідження структурно-метаболітних комплексів пробіотичних штамів *Lactobacillus rhamnosus* GG та *Saccharomyces boulardii* в тестах *in vivo*

О.Ю. Ісаєнко

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України»;
e-mail: el_isaenko@ukr.net

Доведена відсутність токсичних речовин та шкідливих домішок у досліджених структурно-метаболітних комплексах L. rhamnosus та S. boulardii, отриманих авторським способом без використання живильних середовищ. Структурні компоненти одержували завдяки низькочастотній ультразвуковій обробки клітин Lactobacillus rhamnosus GG або Saccharomyces boulardii, а метаболіти – культивуванням лактобактерій та сахароміцетів у дезинтегратах пробіотичних мікроорганізмів. У тесті на специфічну нешкідливість достовірно збільшувався абсолютний приріст групової маси мишею (8,07–12,03%) порівняно з початковими значеннями. При введенні різних доз структурно-метаболітних комплексів L. rhamnosus та S. boulardii (0,5, 1,0, 2,0 мл) за масою мишею дозозалежність не встановлена. Завдяки шкірній та кон'юнктивальній пробам на морських свинках доведена відсутність алергенних властивостей досліджених речовин. Одержання оригінальних метаболітних сполук культивуванням L. rhamnosus та S. boulardii в структурних компонентах бактерій чи грибів дає змогу виключити можливий негативний вплив живильного середовища на кінцевий продукт та відкриває перспективи створення нового класу структурно-метаболітних речовин та їхніх комбінацій. Це в свою чергу розширить коло пошуку альтернативних, додаткових або дасть можливість удосконалити існуючі лікувально-профілактичні пробіотичні препарати. Ключові слова: метаболіти; структурні компоненти; специфічна нешкідливість; гостра та хронічна токсичність; Lactobacillus rhamnosus GG; Saccharomyces boulardii.

ВСТУП

При створенні потенційного фармакологічного засобу та його проміжних продуктів визначають фізико-хімічні характеристики, біологічну активність та доведення безпечності, досліджують склад розробленої лікарської форми [1–3]. Існуючі нормативні документи різних країн світу, директиви, закони, внутрішні інструкції фармацевтичних компаній та науково-дослідних центрів не лише не обходяться без тестування на тваринах, а навпаки є обов'язковими [4, 5].

Безпечність метаболітного пробіотика була доведена Кулаковою [6] за допомогою гострої та хронічної токсичності на мишах.

© О.Ю. Ісаєнко

Інші автори вивчали гостру токсичність препарату «Мікростім» на мишах, а хронічну – на щурах, завдяки чому довели відсутність токсичних властивостей у метаболітах пробіотичних лактобактерій [7]. Безпечність препарату «Біостім-Т» щодо гострої токсичності встановлена на білих безпородних мишах, а хронічна – на кролях породи шиншила. Також автори вивчали його алергенні властивості в тестах кон'юнктивальної проби [8]. В інших експериментах відсутність алергенності суспензій доводили за допомогою внутрішньошкірної проби на морських свинках [9].

Розроблені раніше нами експериментальні препарати були похідними клітин пробіотичних мікроорганізмів, безпечність яких, по-перше, не викликає сумнівів, а, по-друге, доведена в попередніх дослідях *in vitro* на тест-клітинах (фібробластах ембріонів миші і їхніх спленоцитах) [10]. А представлена публікація присвячена випробуванням *in vivo* на можливу наявність токсичних властивостей структурних компонентів і метаболітних сполук виробничих штамів лактобактерій і сахароміцетів. Токсикологічні дослідження речовин проводили згідно з державними нормативними документами й міжнародними стандартами, що використовують для контролювання фармацевтичних препаратів та з урахуванням наукових даних інших авторів [4–9].

Метою нашої роботи було токсикологічне дослідження структурних компонентів та метаболітних сполук лактобактерій і сахароміцетів у тестах на специфічну нешкідливість, гостру та хронічну токсичність, алергенні властивості й доведення їхньої безпечності для можливості подальшого конструювання метабіотиків нового покоління.

МЕТОДИКА

Досліджували структурно-метаболітні комплекси *Lactobacillus rhamnosus GG* та *Saccharomyces boulardii* нового покоління, отримані авторським способом без використання традиційних живильних середовищ. Зразки структурних компонентів лактобактерій і сахароміцетів одержували опроміненням низькочастотними ультразвуковими хвилями суспензій грибів *Saccharomyces boulardii* з пробіотичного препарату BULARDI® («Schonen», Швейцарія) та бактерій пробіотичного штаму *Lactobacillus rhamnosus GG* з симбіотика PREEMA® («Schonen», Швейцарія) [11]. Дезінтеграта (структурні компоненти) надалі застосовували для вирощування культур лактобактерій і грибів та дослідження щодо безпечності. Мета-

боліти (продукти життєдіяльності) одержували культивуванням пробіотичних мікроорганізмів у дезінтегратах *L. rhamnosus GG* та *S. boulardii* [12].

Зразки *L. rhamnosus GG* і *S. boulardii* та продукти їхнього метаболізму центрифугували при 1000g упродовж 30 хв, супернатант фільтрували за допомогою мембранних фільтрів «Владіпор» МФАС-Б № 4 (діаметр пор 0,2 мкм) [11, 12].

Матеріалом для досліджень було шість зразків: фільтрати структурних компонентів лактобактерій (L) і сахароміцетів (S); фільтрати культур лактобактерій (ML), сахароміцетів (MS), вирощених у власних дезінтегратах; фільтрати спільних культур лактобактерій із сахароміцетами, вирощених у дезінтегратах лактобактерій (MLS); фільтрати культур сахароміцетів, вирощених у дезінтегратах лактобактерій (LS).

Згідно з нормативними документаціями національних промислових підприємств єдиним методом визначення безпечності пробіотиків для медичного застосування є специфічна нешкідливість. Проведення тесту на останню здійснювали на рандомізованих лабораторних мишах обох статей масою 14–16 г. Кожна група включала п'ять здорових тварин. Фільтрати структурно-метаболітних комплексів вводили перорально в шлунок кожній миші в об'ємі 0,5 мл. Через 5 діб визначали групову масу тіла дослідних мишей та порівнювали її з початковими значеннями [5].

Визначення гострої (аномальної) токсичності здійснювали на рандомізованих лабораторних мишах. Кожну групу тварин, що містила по 10 особин масою 12–14 г, зважували безпосередньо перед експериментом (початкові значення групової маси). Дослідні речовини вводили одноразово внутрішньоочеревинно кожній лабораторній миші в об'ємі 0,5, 1,0 та 2,0 мл. Спостереження здійснювали протягом 5 діб з наступним зважуванням тварин вдруге [4–8].

Тест на визначення можливої хронічної

токсичності в фільтратах структурно-метаболітних комплексів проводили на рандомізованих лабораторних мишах обох статей, які формували в групи по 20 тварин. Дослідні миші кожного дня внутрішньоочеревинно отримували по 0,5 мл метаболітних речовин впродовж 14 днів [6]. Групову масу тіла лабораторних тварин визначали до початку експерименту та щодня.

Алергенні властивості суспензій вивчали на морських свинках – альбіносах (масою 300 г), яким робили внутрішньошкірну пробу, попередньо виголивши ділянку шкіри [13]. Суспензії фільтратів вводили в нативних (без розведення) та розведених 1:10 і 1:100 пробах в об'ємі 0,2 мл. Результат дослідження оцінювали через 30 хв, 4 год, 24 год і 96 год за наявністю або відсутністю гіперемії, набряку, пошкодження або некрозу шкіри в місцях ін'єкції. Відсутність алергенних властивостей фільтратів структурно-метаболітних комплексів підтверджували також у тесті кон'юнктивальної проби на морських свинках (масою 300 г) [8]. Тварини одержували нативні (без розведення) дослідні речовини щоденно впродовж тижня. Результат дослідження оцінювали кожного дня за наявністю або відсутністю гіперемії, набряку тощо.

Всі експериментальні дослідження проводили в межах національного та міжнарод-

ного законодавства згідно з положеннями Гельсінкської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації і Директиви Європейського співтовариства 2010/63/ЄС [1–5]. Для знеболювання (до засинання) застосовували тіопенталовий наркоз: спосіб введення та дози використовували відповідно до внутрішніх інструкцій ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України», які відповідають національним та міжнародним стандартам.

Статистичну обробку результатів експерименту здійснювали з використанням програмних пакетів Microsoft Excel 2010. Для характеристики їх достовірності застосовували параметричні критерії з визначенням середнього значення (M) та його похибки ($\pm m$). Для оцінки значимості відмінностей між показниками контрольної та дослідної груп використовували критерій t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі роботи визначали специфічну нешкідливість (табл. 1). Результати тесту показали безпечність усіх серій безклітинних структурних компонентів і метаболітних сполук *L. rhamnosus* та *S. boulardii* та їхніх комбінацій, отриманих за оригінальною технологією з застосуванням як

Таблиця 1. Вплив структурно-метаболітних комплексів *L. rhamnosus* і *S. boulardii* на масу мишей (показники нешкідливості) при пероральному введенні в шлунок ($M \pm m$)

Тестовані речовини	Маса, г	
	початкова	через 5 діб
Структурні компоненти лактобактерій	77,3 ± 1,2	84,7 ± 1,3*
Метаболіти лактобактерій, отримані культивуванням продуцентів у власних дезінтегратах	75,6 ± 0,8	81,7 ± 0,8*
Метаболіти лактобактерій і сахароміцетів, отримані культивуванням мікроорганізмів у дезінтегратах лактобактерій	72,7 ± 1,2	80 ± 1,1*
Структурні компоненти сахароміцетів	77,3 ± 1,2	86,6 ± 0,8*
Метаболіти сахароміцетів, отримані культивуванням грибів у власних дезінтегратах	75,6 ± 0,8	84 ± 0,5*
Метаболіти сахароміцетів, отримані культивуванням грибів у дезінтегратах лактобактерій	72,6 ± 1,2	81,3 ± 1,3*

фізичний чинник ультразвуковий фактор. Протягом експерименту всі дослідні тварини не лише залишилися живі та активні, а й їхня групова маса збільшувалася на 8,07–12,03% ($P \leq 0,05$) залежно від тестованої речовини *L. rhamnosus* та *S. boulardii*.

Доведення нешкідливості дослідних зразків *L. rhamnosus* та *S. boulardii* має практичне значення, оскільки національні підприємства-виробники контролюють цілюноклітинні пробіотичні препарати власного виробництва, які надходять нині у продаж, за допомогою цього тесту. Він дає змогу виявити не лише можливий негативний вплив самого дослідного засобу, а й токсичні домішки, що важливо при розробці нових лікарських речовин, технологічні етапи яких відрізняються від виробничих додаткових операцій або при

заміні існуючих етапів на новостворені [5].

За результатами тесту на гостру токсичність (табл. 2), встановлено, що від початку і до кінця терміну спостереження за лабораторними мишами жодна з тварин не загинула, ні в однієї з особини не проявилися ознаки інтоксикації, а їхня групова маса не знизилася порівняно з початковими значеннями. Введення всіх структурно-метаболітних комплексів *L. rhamnosus* і *S. boulardii* в дозах 0,5, 1,0 та 2,0 мл супроводжувалося абсолютним приростом маси тіла мишей, що свідчить про відсутність прояву токсичних властивостей. Кореляційної залежності обраної кількості введених структурних компонентів, метаболітних сполук пробіотичних штамів лактобактерій та сахароміцетів і абсолютного приросту

Таблиця 2. Вплив структурно-метаболітних комплексів *L. rhamnosus* і *S. boulardii* на масу мишей при внутрішньоочеревиному введенні ($M \pm m$)

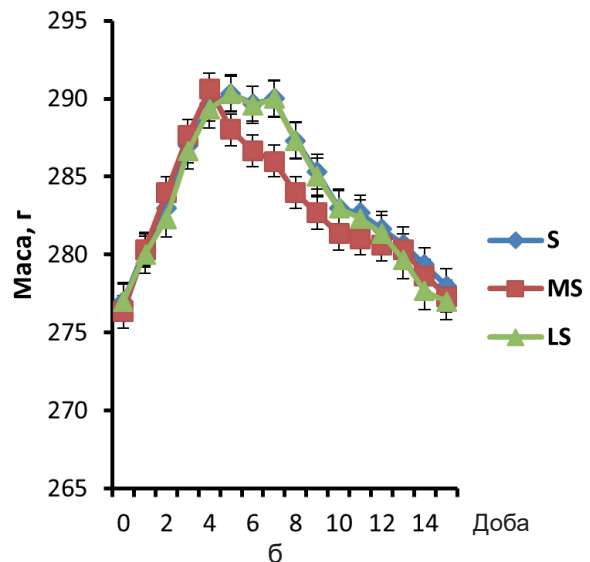
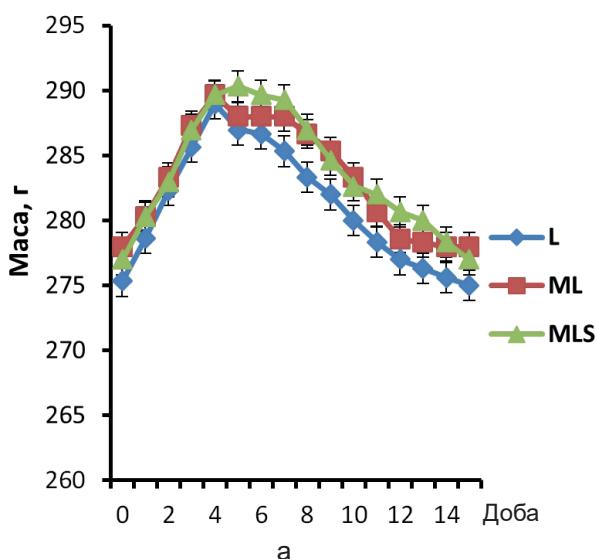
Тестовані речовини	Доза експериментального препарату, мл					
	0,5		1,0		2,0	
	маса тварин, г					
	початкова	через 5 діб	початкова	через 5 діб	початкова	через 5 діб
Структурні компоненти лактобактерій	133 ± 1,1	139,6 ± 1,6	131,3 ± 3,6	138 ± 3,6	134,3 ± 1,7	135 ± 1,5
Метаболіти лактобактерій, отримані культивуванням продуцентів у власних дезінтегратах	134,3 ± 1,8	140 ± 1,5	131,7 ± 2,8	138 ± 3,6	134,3 ± 1,8	134 ± 1,5
Метаболіти лактобактерій і сахароміцетів, отримані культивуванням мікроорганізмів у дезінтегратах лактобактерій	131 ± 0,5	136,6 ± 0,3	131 ± 1,7	136,3 ± 2,0	130,6 ± 1,8	130,3 ± 2,2
Структурні компоненти сахароміцетів	128,6 ± 1,7	135,3 ± 1,8	130 ± 2,3	136,3 ± 2,0	133 ± 1,5	133,3 ± 1,4
Метаболіти сахароміцетів, отримані культивуванням грибів у власних дезінтегратах	131,6 ± 3,9	138,3 ± 3,8	133 ± 2,1	137 ± 1,2	132,3 ± 3,3	132,6 ± 3,3
Метаболіти сахароміцетів, отримані культивуванням грибів у дезінтегратах лактобактерій	131,3 ± 2,3	137,6 ± 2,4	131,6 ± 2,0	137,3 ± 2,0	133,3 ± 3,2	133,3 ± 3,5

маси тіла тварин не встановлено.

Отримані результати щодо відсутності токсичних властивостей структурно-метаболітичних комплексів *L. rhamnosus* та *S. boulardii*, одержаних за авторським способом, добре узгоджуються з даними інших авторів [6–9]. Так, гостру токсичність супернатантів і ультрафільтратів пробіотиків, а також метаболітного пробіотика, отриманого Кулаковою [6] на основі консорціуму трьох штамів лактобацил, вивчали одноразовим внутрішньоочеревинним і внутрішньошлунковим введенням безпородним білим мишам. Тестування метаболітичних речовин у дозі 0,5 мл не впливало на поведінку тварин та не знижувало приріст маси. Старцева [8] проводила експерименти на білих безпородних мишах масою 18–20 г одноразовим внутрішлунковим введенням зразків в дозах 2000; 5000 і 10000 мг/кг. Вони також застосовували різні дози експериментального препарату і виявили відсутність токсичності речовин, яка не залежить від кількості досліджуваних продуктів пробіотичного походження. Інші автори

[7] вивчали на мишах масою 18–20 г гостру токсичність препарату «Мікростім» одноразовим його введенням внутрішньошлунково, підшкірно і внутрішньоочеревинно в дозах 50, 25 і 5 мл / кг відповідно. Наші результати відрізняються від даних Сафонової зі співавт. більш високими дозами (в 10–20 разів).

Завдяки визначенню хронічної токсичності структурних компонентів і метаболітів *L. rhamnosus* та *S. boulardii* встановлено, що щоденне застосування всіх розроблених речовин не викликало загибелі ні однієї піддослідної миші (рисунок). Під час експерименту у всіх тварин не зареєстровано прояву побічних реакцій та ознак інтоксикації. Введення структурних компонентів і метаболітичних сполук пробіотичних штамів лактобактерій протягом 4-5 діб супроводжувалося достовірним збільшенням групової маси тіла лабораторних мишей. На 5–7-му добу тварини мали стабільну масу тіла, яка з 8-ї доби почала повільно знижуватися. Залежно від структурно-метаболітного комплексу лактобак-



Вплив структурно-метаболітичних комплексів *L. rhamnosus* і *S. boulardii* на масу мишей при внутрішньоочеревинному введенні структурних компонентів лактобактерій (L), метаболітів лактобактерій, отриманих культивуванням продуцентів у власних дезінтегратах (ML), метаболітів лактобактерій і сахароміцетів, отриманих культивуванням мікроорганізмів у дезінтегратах лактобактерій (MLS) (а), структурних компонентів сахароміцетів (S), метаболітів сахароміцетів, отриманих культивуванням грибів у власних дезінтегратах (MS) та метаболітів сахароміцетів, отриманих культивуванням грибів у дезінтегратах лактобактерій (LS) (б)

терій маса тварин на 13–15-ту добу відповідала початковим значенням. Вірогідного зниження групової маси тіла дослідних мишей порівняно з початковою не відмічено.

Вивчення хронічної токсичності структурних компонентів і метаболітних сполук пробіотичних штамів сахароміцетів показали подібні результати (див. рисунок). Групова маса тварин до 4-5-ї доби порівняно з початковою достовірно збільшувалася. На 5–8-му добу експерименту вона не змінилася, а починаючи з 9-ї доби повільно зменшувалася і на 15-ту добу сягала початкових значень для всіх серій дослідних зразків. Отже дослідження хронічної токсичності безклітинних структурно-метаболітних засобів *S. boulardii* при їхньому щоденному введенні впродовж двотижневого експерименту показало збільшення абсолютної маси тіла тварин або вона залишалася на рівні з початковими значеннями.

Наші результати вивчення хронічної токсичності структурно-метаболітних комплексів лактобактерій та сахароміцетів подібні до даних, отриманими іншими авторами. Сафонова зі співавт. [7] досліджували хронічну токсичність на 20 щурах обох статей масою 150–200 г. Препарат «Мікростім» вводили *per os* щодня раз на добу протягом 3 міс в дозі 1,4 мл/кг. В інших експериментах хронічну токсичність цього препарату визначали на кролях породи шиншила щоденним пероральним введенням в дозі 150 мг/кг протягом 6 міс [8]. В аналогічному тесті полікомпонентний метаболітний пробіотик, супернатант і ультрафільтрат на основі консорціуму трьох штамів лактобацил вводили внутрішньощлунково мишам по 0,5 мл протягом 14 днів [6]. При оцінці хронічної (підгострої) токсичності негативного впливу на органи і тканини (під час гістологічного дослідження) та зниження приросту маси тіла тварин авторами не встановлено, що свідчить про відсутність токсичних властивостей та збігається з нашими результатами.

Підсумовуючи результати проведених тестів з вивчення безпечності оригінальних

безклітинних засобів слід зазначити: за допомогою низькочастотної ультразвукової дезінтеграції отримано структурні компоненти пробіотичних штамів лактобактерій і сахароміцетів з відсутніми проявами токсичних властивостей та метаболітні сполуки *L. rhamnosus* і *S. boulardii* без токсичного ефекту.

Наступний етап роботи передбачав вивчення алергенних властивостей структурних компонентів і метаболітних сполук пробіотичних штамів лактобактерій і сахароміцетів. У результаті проведення шкірної проби, при застосуванні всіх дослідних зразків, гіперемії, набряку шкіри тварин не спостерігалось. Це свідчить про відсутність алергенності структурних компонентів і метаболітних сполук *L. rhamnosus* та *S. boulardii*. Зіставляючи власні результати з даними аналогічних досліджень вивчення шкірної токсичності препарату «Сорболіну» можна зробити єдиний висновок: всі лабораторні тварини живі, активні, проявів порушення здоров'я та пошкодження шкіри не спостерігалось [9].

Результати кон'юнктивальної проби збігаються з даними інших авторів та доводять: розроблені речовини не викликали реакції у морських свинок, чим підтверджують відсутність алергенних властивостей структурно-метаболітних комплексів *L. rhamnosus* та *S. boulardii* [8].

Таким чином, похідні та метаболіти пробіотичних штамів мікроорганізмів, незалежно від способу одержання та штаму продуцента, є безпечними речовинами. Значимість представлених результатів полягає у доведенні відсутності токсичних речовин та шкідливих домішок у досліджених структурно-метаболітних комплексах *L. rhamnosus* та *S. boulardii*, отриманих авторським способом без використання традиційних живильних середовищ, завдяки вивченню специфічної нешкідливості, гострої та хронічної токсичності, алергенних властивостей розроблених засобів у тестах на лабораторних тваринах. Спостерігалось достовірно збільшення аб-

солютного приросту групової маси дослідних тварин порівняно з початковими їхніми значеннями. При введенні різних доз експериментальних препаратів дозозалежність між обраними концентраціями структурно-метаболітних речовин пробіотичних штамів *L. rhamnosus* та *S. boulardii* та масою мишей не встановлена. Таким чином, доведена безпечність безклітинних метаболітних сполук, отриманих культивуванням пробіотичних мікроорганізмів лактобактерій і сахароміцетів у власних дезінтегратах бактерій чи грибів або в дезінтегратах інших пробіотичних мікроорганізмів, свідчить про перспективність розробленої авторської технології й застосування обраного фізичного чинника для отримання структурних компонентів пробіотичних мікроорганізмів. Надалі планується додаткове всебічне вивчення структурно-метаболітних комплексів щодо обмеження терміну вживання, біохімічного складу тощо.

Автор висловлює подяку Т. М. Рижковій, М. Л. Лисиченко, В. І. Жилі, В. С. Васильєву, Т. М. Пługатор за наукові консультації та допомогу щодо лазерної обробки мікроорганізмів.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Е. Ю. Исаенко

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* GG И *SACCHAROMYCES BOULARDII* В ТЕСТАХ *IN VIVO*

Доказано отсутствие токсических веществ и вредных примесей в исследованных структурно-метаболических комплексах *L. rhamnosus* и *S. boulardii*, полученных авторским способом без использования питательных сред. Структурные компоненты получали благодаря низкочастотной ультразвуковой обработки клеток

Lactobacillus rhamnosus GG или *Saccharomyces boulardii*, а метаболиты – культивированием лактобактерий и сахароміцетов в дезінтегратах пробіотических микроорганизмов. В тесте на специфическую безвредность достоверно увеличивался абсолютный прирост групповой массы мышей (8,07–12,03%) по сравнению с исходными значениями. При введении различных доз структурно-метаболических комплексов *L. rhamnosus* и *S. boulardii* (0,5, 1,0, 2,0 мл) по массе мышей дозозависимость не установлена. Благодаря кожной и конъюнктивной пробам на морских свинках доказано отсутствие аллергенных свойств исследованных веществ. Получение оригинальных метаболических соединений культивированием *L. rhamnosus* и *S. boulardii* в структурных компонентах бактерий или грибов позволяет исключить возможное негативное влияние питательной среды на конечный продукт и открывает перспективы создания нового класса структурно-метаболических веществ и их комбинаций. Это в свою очередь расширит круг поиска альтернативных, дополнительных или даст возможность усовершенствовать существующие лечебно-профилактические пробиотические препараты с последующим их применением при заболеваниях различного генеза.

Ключевые слова: метаболиты; структурные компоненты; специфическая безопасность; острая и хроническая токсичность; *Lactobacillus rhamnosus* GG; *Saccharomyces boulardii*.

O. Y. Isayenko

TOXICOLOGICAL STUDIES STRUCTURAL-METABOLITIC COMPLEXES OF PROBIOTIC STRAINS OF *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* GG AND *SACCHAROMYCES BOULARDII* IN TESTS *IN VIVO*

The absence of toxic substances and harmful impurities in structural-metabolitic complexes of *L. rhamnosus* and *S. boulardii*, obtained by the author's method without using nutrient media, was proved. Structural components were obtained by low-frequency ultrasound treatment of *Lactobacillus rhamnosus* GG or *Saccharomyces boulardii* cells and metabolites by cultivating lactobacteria and saccharomycetes in disintegrators of probiotic microorganisms. When administered in different doses (0.5, 1.0, 2.0 ml), structural-metabolitic complexes of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* did not reveal a dose dependence. Due to skin and conjunctival tests in guinea pigs, the absence of allergenic properties of the substances was proved. Obtaining original metabolitic compounds by cultivating *L. rhamnosus* and *S. boulardii* with the structural components of bacteria or fungi eliminates the possible negative influence of the nutrient medium on the final product and opens the prospects for creating a new class of structural and metabolitic substances and their combinations. This, in turn, will expand the range of search for alternative, additional or improve existing treatment prophylactic probiotic preparations with

their subsequent application in diseases of different genesis.
 Key words: metabolites; structural components; specific harmlessness; acute and chronic toxicity; *Lactobacillus rhamnosus GG*; *Saccharomyces boulardii*.

SE "I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of NAMS of Ukraine"

REFERENCES

1. On the protection of animals used for scientific purposes. European Parliament and of the Council. Directive 2010/63/EU. 22 Sept 2010.
2. Kojima H. JaCVAM: an organization supporting the validation and peer review of new alternatives to animal testing. Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences. Tokyo, Japan. 2007;AA-TEX 14:483-5.
3. Suppression of the test for abnormal toxicity from the European Pharmac. European Pharmacopoeia animal testing. Strasbourg, France. 08 Dec 2017.
4. State Pharmacopoeia of Ukraine. State enterprise "Ukrainian scientific pharmacopoeial center for quality of medicines", Kh. State Enterprise "Ukrainian scientific pharmacopoeial center for quality of medicines". 2015; 2(1):527. [Ukrainian].
5. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Publishing House Scientific center for expertise of medical devices. 2015;XIII:1469. [Russian].
6. Kulakova YuV. Development of a multicomponent metabolite probiotic [dissertation]. Moscow research institute of epidemiology and microbiology G.N. Gabrichevsky. 2013. [Russian].
7. Safonova GM, Neschislavayev VA, Chistokhina LP. Safety assessment of a new probiotic containing lactobacilli metabolites. Sib M J. 2004;19(2):38-40. [Russian].
8. Startseva NV. Immunobiological characteristics of the drug "Biostim-T" based on natural nucleic acids [thesis]. Perm: Institute of Ecology and Genetics of microorganisms of the Ural Branch RAS; 2004. [Russian].
9. Vasilevich SF. Probiotic-enterosorbent Sorbolin production technology and application efficiency in cattle breeding. [abstract of dissertation]. Moscow: Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology – MVA named after K.I. Scriabin; 2018. [Russian].
10. Isayenko OYu, Knysh OV, Falko OV, Prokopyuk VYu, Prokopyuk OS. Cytotoxicity structural-metabolic complexes of *Lactobacillus rhamnosus GG* and *Saccharomyces boulardii*. Fiziol Zh. 2019;65(5):40-8. [Ukrainian].
11. Isayenko OYu, Knysh OV, Babych YeM, Kivva FV, Horbach TV, Balak OK. inventor; DU«IMI NAMN», assignee. Method of producing metabolites of probiotic bacterial strains. Ukrainian patent UA 123122. 2018 Feb. 12. [Ukrainian].
12. Isayenko OYu, Knysh OV, Babych YeM, Vashchenko V, Zachepylo SV, Polyanska VP, Kovalenko OI, Balak OK. inventor; DU«IMI NAMN», assignee. A method of obtaining a combination of metabolites of probiotic strains of fungi and bacteria. Ukrainian patent. UA 126603. 2018 Jun. 25. [Ukrainian].
13. Eliseeva TI, Balabolkin II. Allergic reactions to medicines: current concepts (overview). Mod Technolog Med. 2016;8(1):159-73. [Russian].

Матеріал надійшов
до редакції 20.06.2019