

**КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ,
ІММОБІЛІЗОВАНИХ В ГЕЛЕВИХ ГРАНУЛАХ З ДОДАТКОВИМ ПОКРИТТЯМ**

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків)

embriotech@icloud.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Дослідження є частиною відомчої (НАН України) НДР «Вивчення механізмів пошкоджень мікроорганізмів, іммобілізованих в гелевих носіях з різними фізико-хімічними властивостями, під час низькотемпературного зберігання та ліофілізації», № державної реєстрації 0118U001187.

Вступ. В комплексній терапії та для профілактики дисбіозів кишечника широко застосовують пробіотичні препарати і лікувально-профілактичні продукти харчування на основі пробіотичних штамів мікроорганізмів [1]. В сільському господарстві також широко використовують кормові добавки, які містять пробіотики [2]. В останні роки значного поширення набувають пробіотичні препарати, продукти і кормові добавки із використанням мікроорганізмів, іммобілізованих в полісахаридних гідрогелях, зокрема в гелях солей альгінової кислоти [3, 4]. Альгінатні гелі біосумісні, здатні до деполімеризації в макроорганізмі, не є антигенами, стійкі до кислих середовищ, які відповідають значенням рН шлунку та тонкого кишечника людини [4, 4]. Методи довгострокового зберігання комерційних препаратів, продуктів і добавок з іммобілізованими в гелях мікроорганізмами знаходяться в стадії розробки. Найбільшого поширення здобули дослідження по їх зберіганню за низьких температур [6, 7]. Було показано, що на життєздатність іммобілізованих в альгінатному гелі мікробних клітин під час заморожування впливає швидкість охолодження. Після швидкого охолодження частина іммобілізованих в гелевих носіях клітин гине [8]. Для реалізації повільних режимів охолодження потрібні програмні заморожувачі біологічних об'єктів та технічний персонал для їх обслуговування. У зв'язку з цим проводиться пошук способів підвищення життєздатності іммобілізованих мікроорганізмів за допомогою менш затратного і простого у виконанні швидкого охолодження. Нашу увагу привернули дослідження, в яких на гранули альгінатного гелю з іммобілізованими частками бактеріофагу T4 або штамми бактерій *Bifidobacterium longum* наносили додаткові покриття із шарів хітозанового гелю або поліетиленаміну [9, 10]. Ці покриття сприяли захисту фагових часток і бактеріальних клітин від пошкоджуючої дії середовища, що моделюють шлунковий сік та сік 12-палої кишки людини. А додатковий шар хітозанового гелю збільшував термін зберігання при 4°C іммобілізованих клітин *Bifidobacterium longum* ИМА 402. Було поставлено питання, як буде впливати додаткове покриття гелевих гранул на життєздатність іммобілізованих мікроорганізмів під час кріоконсервування?

Мета роботи – встановити вплив покриття гелевих гранул додатковим шаром альгінатного гелю на життєздатність іммобілізованих пробіотичних шта-

мів мікроорганізмів після швидкого охолодження до -196° С і довгострокового зберігання за цієї температури.

Об'єкти і методи дослідження.

Об'єктами дослідження були бактерії *Bifidobacterium bifidum*, штам 1 (далі *B. bifidum* 1), *Escherichia coli*, штам М-17 (далі *E. coli* М-17), дріжджі *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (далі *S. boulardii*). *B. bifidum* 1 отримані із ФБУН «Московський НДІ епідеміології і мікробіології ім. Г.Н. Габричевського» Роспотребнадзора (РФ), *E. coli* М-17 – із Всеросійської колекції промислових мікроорганізмів НДЦ «Курчатівський інститут» – «Держ. НДІ генетика» (РФ), *S. boulardii* виділені із комерційного препарату «Енте-рол»* («Biotocodex», Франція).

B. bifidum 1 вирощували у напіврідкому середовищі Блаурока [11] при температурі 37°C протягом 48 годин, *E. coli* М-17 – на скошеному агаризованому середовищі «Nutrient Agar» («Biolife», Італія) при температурі 37°C протягом 24 годин, *S. boulardii* – на скошеному сусло-агарі із вмістом цукру за Балінгом 8% [12] при температурі 30° С протягом 48 годин.

Перед іммобілізацією клітини *B. bifidum* 1 відмивали від ростового середовища і суспендували у фізіологічному розчині. Клітини *E. coli* М-17 і *S. boulardii* змивали фізіологічним розчином з поверхні агаризованих середовищ. Для одержання гелевих гранул і додаткового покриття використовували альгінат натрію Е 401 («FarmaSino», Китай). 2% розчин альгінату натрію стерилізували методом тіндалізації [13]. Клітинні суспензії змішували у співвідношенні 1:1 із 2% розчином альгінату натрію і формували гелеві гранули методом іонотропного гелеутворення [14]. Кінцева концентрація альгінату в гелевих гранулах становила 1%. Стабілізували гранули у 0,2 М розчині CaCl₂ протягом 20 хв. при 37° С. Потім підсушували на фільтрувальному папері. Діаметр гелевих гранул був 2,2±0,2 мм. Кінцева концентрація клітин в гелі становила 10⁹ клітин/мл. Для нанесення додаткового покриття частину гранул брали по одній пінцетом і занурювали у 2% розчин альгінату натрію, нагрітий до кімнатної температури. Потім гранули з додатковим шаром альгінату натрію переносили в 0,2 М розчин CaCl₂, витримували протягом 20 хвилин при 37° С, промивали і підсушували, як вказано вище. Для отримання конгломератів брали пінцетом відразу по 10 гранул і занурювали їх разом в 2% розчин альгінату натрію, потім стабілізували в 0,2 М розчин CaCl₂, промивали і підсушували. Утворювалися конгломерати із 10-ти гелевих гранул, покритих загальним шаром 2% альгінатного шару.

Для кріоконсервування вносили по 100 гранул або по 10 конгломератів в кріопробірки з робочим об'ємом 1,8 мл («Nunc», США). Зразки заморожували зануренням кріопробірок у рідкий азот. До заморожування, після заморожування та після зберігання

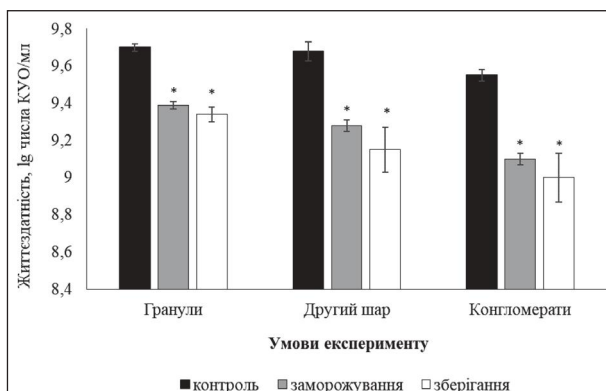


Рисунок 1 – Життєздатність іммобілізованих клітин *E.coli* M-17 після заморожування та зберігання впродовж 3 міс. при -196°C. за температури -196° С протягом 3 місяців (термін спостереження) визначали кількість життєздатних клітин. Заморожені зразки відігрівали на водяній бані при 37° С. Гелеві гранули і конгломерати розчиняли у 4% розчині ЕДТА («BASE», Німеччина). Відмивання клітин від ЕДТА відбувалося на етапі серійних розведень під час визначення життєздатності. Життєздатність клітин визначали «чашковим» методом Коха [15] за здатністю клітин до колонієутворення на агаризованих середовищах (*E. coli* M-17, *S. boulardii*) або у напіврідкому середовищі (*B. bifidum* 1).

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою пакету програм MS Exel та «Statistica 6.0».

Критичне значення t-критерію Ст'юдента було на рівні значущості $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

В перших експериментах вивчали життєздатність мікробних клітин після іммобілізації, нанесення додаткового покриття і формування конгломератів. Встановлено, що вказані процедури не впливають на життєздатність клітин *B. bifidum* 1, *E. coli* M-17, *S. boulardii*.

В експериментах по кріоконсервуванню іммобілізованих клітин мікроорганізмів були отримані наступні результати. До заморожування вихідна концентрація клітин *E. coli* M-17, іммобілізованих в гелевих гранулах без додаткового покриття та з додатковим покриттям, становила 9,7 lg числа КУО/мл гелю, в гранулах, об'єднаних в конгломерати, – 9,5 lg числа КУО/мл гелю (рис. 1).

Після заморожування до -196°C кількість життєздатних клітин в гранулах без додаткового покриття

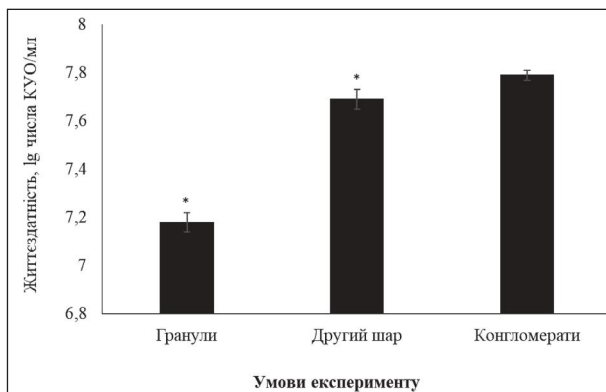


Рисунок 3 – Життєздатність іммобілізованих клітин *S.boulardii* після заморожування при -196°C.

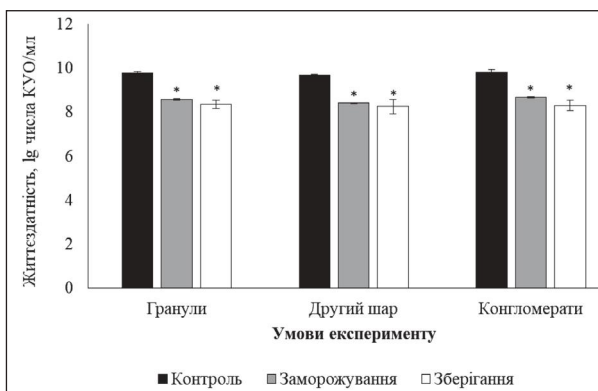


Рисунок 2 – Життєздатність іммобілізованих клітин *B.bifidum* 1 після заморожування та зберігання впродовж 3 міс. при -196°C. зменшилася до 9,39 lg числа КУО/мл гелю і залишилася без достовірних змін при подальшому зберіганні протягом 3 міс. В гранулах з додатковим покриттям кількість життєздатних клітин зменшилася після заморожування до 9, 28, а в гранулах із конгломератів – до 9,1 lg числа КУО/мл гелю. В процесі зберігання при -196°C життєздатність клітин в цих зразках також достовірно не змінювалася.

Аналогічні результати були отримані і в експериментах з бактеріями *B. bifidum* 1. В гранулах без додаткового покриття кількість життєздатних клітин зменшилася після заморожування з 9,82 до 8,52 lg числа КУО/мл гелю (рис. 2).

В гранулах з додатковим покриттям – з 9,7 до 8,41 lg числа КУО/мл гелю. В гранулах із конгломератів – з 9,80 до 8,60 lg числа КУО/мл гелю. Під час наступного зберігання протягом 3 міс. життєздатність клітин в усіх зразках достовірно не змінювалася.

На відміну від результатів, отриманих із клітинами бактерій, в експериментах із клітинами дріжджів було встановлено захисний ефект додаткового покриття гранул шаром 2% альгінатного гелю та об'єднання гранул у 2% альгінатному гелі в конгломерати. Вихідна концентрація життєздатних клітин *S. boulardii* у всіх зразках становила 8,4 lg числа КУО/мл гелю (рис. 3, 4).

Після заморожування до -196°C кількість життєздатних клітин в гранулах без додаткового покриття зменшилася до 7,18 lg числа КУО/мл гелю. В гранулах з додатковим покриттям – до 7,7, в гранулах із конгломератів – до 7,8 lg числа КУО/мл гелю. Під час наступного зберігання протягом 3 міс. життєздатність клітин *S. boulardii* додатково не змінювалася.

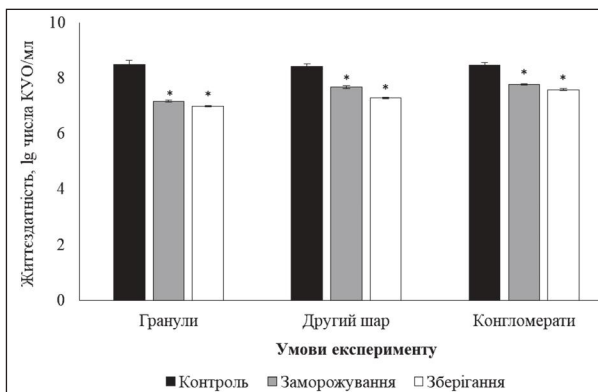


Рисунок 4 – Життєздатність іммобілізованих клітин *S.boulardii* після заморожування та зберігання впродовж 3 міс. при -196°C.

Отримані результати свідчать про те, що нанесення на гранули альгінатного гелю додаткового покриття із шару 2% альгінатного гелю або об'єднання декількох гранул в конгломерат в товщі 2% альгінатного гелю може виказати додаткову кріозахисну дію під час заморожування іммобілізованих мікроорганізмів з певною будовою клітин. Додаткова кріозахисна дія була відсутня в експериментах з іммобілізованими грамнегативними (*E. coli* M-17) та грампозитивними (*B. bifidum* 1) бактеріями і проявлялася в експериментах з клітинами дріжджів *S. boulardii*. Як відомо, дріжджі *Saccharomyces* належать до еукаріотів (протоаскомітетів) і мають, на відміну від бактерій, складну будову клітинних структур, в тому числі клітинної стінки і цитоплазматичної мембрани (ЦПМ) [16]. У зв'язку з цим клітини дріжджів мають набагато більше «мішеней» для пошкоджуючої дії фізико-хімічних чинників, які супроводжують процеси заморожування-відтаювання клітин. На збереженість клітин під час заморожування-відтаювання найбільший вплив викazuje швидкість охолодження. Під час швидкого охолодження, яке було використано в експериментах, пошкодження клітин відбувається переважно за рахунок формування і росту внутрішньоклітинних кристалів льоду і процесів рекристалізації [17, 18]. Імовірно, що після нанесення на гелеві гранули з іммобілізованими мікробними клітинами додаткового шару із 2% альгінатного гелю або після фіксації гранул у товщі 2% альгінатного гелю під час формування конгломератів швидкість охолодження клітин на етапі заморожування сповільнюється. Відповідно стають менше вираженими процеси внутрішньоклітинної кристалізації та відбувається помірна дегідратація клітин. На етапі відтавання також зменшуються температурні градієнти і рекристалізаційні процеси. Відповідно, в клітинах іммобілізованих дріжджів виникає менша кількість кріпошкоджень, які приводять до загибелі клітин. На користь такого пояснення отриманих результатів переконливо свідчить порівняння показників зниження життєздатності іммобілізованих бактерій *B. bifidum* 1 і дріжджів *S. boulardii*. В гранулах без покриття, в гранулах з додатковим покриттям та в гранулах із конгломератів кількість загинувших клітин біфідобактерій достовірно не відрізнялася – 1,3; 1,29; 1,2 lg числа КУО/мл гелю, від-

повідно. В гранулах без додаткового покриття після заморожування загинула така ж кількість дріжджових клітин, як і біфідобактерій – 1,22 lg числа КУО/мл гелю. А в гранулах з додатковим покриттям і в гранулах із конгломератів кількість загинувших дріжджових клітин була достовірно меншою – 0,7 та 0,6 lg числа КУО/мл гелю відповідно.

Слід також відмітити ще один позитивний момент проведеного дослідження. Важливим елементом для формування кишкового мікробіоценозу є агрегація в полісахаридно-муциновому матриці кишечнику клітин мікроорганізмів-пробіотиків в конгломерати (мікроколонії) [19]. Для утворення таких конгломератів під час утворення мікробіоценозу в кишечник потрібно транспортувати репродуктивні дози клітин пробіотиків [20]. Як один із варіантів транспортування в товстий кишечник репродуктивних доз пробіотиків ми пропонуємо об'єднання кількох гелевих гранул з іммобілізованими клітинами пробіотиків в один конгломерат, який розміщений в товщі альгінатного гелю. Для довгострокового зберігання таких конгломератів можна використовувати низькі температури.

Висновки. Нанесення на гелеві гранули із іммобілізованими клітинами мікроорганізмів-пробіотиків додаткового покриття із шару альгінатного гелю та об'єднання гелевих гранул з іммобілізованими клітинами в конгломерати, які розміщені в товщі альгінатного гелю не впливають на життєздатність іммобілізованих клітин. Життєздатність клітин *E. coli* M-17, *B. bifidum* 1, іммобілізованих в гранулах без додаткового покриття, в гранулах з додатковим покриттям та в гранулах, об'єднаних в конгломерати після швидкого охолодження до -196°C та зберігання за цієї температури не відрізняється. У зразках із клітинами дріжджів *S. boulardii*, іммобілізованих в гранулах з додатковим покриттям або об'єднаних в конгломерати, життєздатність після швидкого охолодження до -196°C підвищується.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати можуть бути використані під час розробки нових комерційних форм пробіотичних препаратів та лікувально-профілактичних продуктів харчування і технологій їх довгострокового зберігання.

Література

1. Bondarenko AV. Korektsiia dysbiotychnykh staniv I stabilizatsiia mikrobioty. Problemy bezpererвної medychnoi osvity ta nauky. 2014;2:77-80. [in Ukrainian].
2. Ovsyannikov YuS, Tikhonov GI, Golunov OV. Probiotiki v veterinarii. Veterinarnaya meditsina. 2009;1.2:66-68. [in Russian].
3. Gbassi GK, Vandamme T. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the Gut. *Pharmaceutics*. 2012 Feb 6;4(1):149-163. doi: 10.3390/pharmaceutics4010149.
4. Mitropoulou G, Nedovic V, Goyal A, Kourkoutas Y. Immobilization technologies in probiotic food production. *Int J Nutr Metab*. 2013 Oct 28;2013:716861. doi: 10.1155/2013/716861.
5. Yeung TW, Üçok EF, Tiani KA, McClements DJ, Sela DA. Microencapsulation in Alginate and Chitosan Microgels to Enhance Viability of *Bifidobacterium longum* for Oral Delivery. *Front Microbiol*. 2016 Apr 19;7:494. doi: 10.3389/fmicb.2016.00494.
6. Kalinichenko SV, Babych YeM, Ryzhkova TA, Maslii IH, Korotkykh OO, Danilina SS, ta in. Suchasnyi stan rozrobky ta zastosuvannia ptobiotychnykh, prebiotychnykh ta symbiotychnykh preparativ. *Annaly Mechnykovskoho instytutu*. 2013;3:5-12. Dostupno: http://nbuv.gov.ua/UJRN/ami_2013_3_3. [in Ukrainian].
7. Tanimomo J, Delcenserie V, Taminiau B, Daube G, Saint-Hubert C, Durieux A. Growth and Freeze-Drying Optimization of *Bifidobacterium crudilactis*. *Food and Nutr Sci*. 2016 Jun 29;7(7):616-26. doi: <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2016.77063>.
8. Ponomareva VL, Vysekantsev IP, Gurina TM, Onasenko ES, Pishko OV. The study of cryopreservation conditions effects on cell *Saccharomyces cerevisiae* viability, immobilized in alginate gel. *Visnyk Problem Biologii i Medytsyny*. 2012;1(92):14-17. [in Ukrainian].
9. Moghtader F, Egri S, Piskin E. Phages in modified alginate beads. *Artificial cells, nanomedicine and biotechnology*. 2017;45(2):357-363.
10. Yeung TW, Uçok E, Tiani K, McClements DJ, Sela DA. Microencapsulation in alginate and chitosan microgels to enhance viability of *Bifidobacterium longum* for oral delivery. *Front Microbiol*. 2016;7:494.
11. Polyak MS, Sukharevich VI, Sukharevich ME, Pitatel'nye srede dlya medicinskoj mikrobiologii. Sankt-Peterburg; 2002. 80 s. [in Russian].
12. Afanas'eva OV. Mikrobiologicheskij kontrol hlebopekarnogo proizvodstva. Moskva: Pischevaya promyshlennost; 1976. 144 s. [in Russian].
13. Labinskaja AC. Mikrobiologija s tehnikoj mikrobiologicheskikh issledovanij. 4-e izd. Moskva: Medicina; 1978; 23 s. [in Russian].

14. Tsen JH, Huang HY, Lin YP, King AE. Freezing resistance improvement of *Lactobacillus reuteri* by using cell immobilization. *J Microbiol Methods*. 2007 Sep;70(3):561-4. doi: 10.1016/j.mimet.2007.06.004.
15. Lusta KA, Fihte BA. Metody opredeleniya zhiznesposobnosti mikroorganizmov. Pushhino: ONTI NCBI AN SSSR; 1990. 186 s. [in Russian].
16. Shlegel' T. Obshchaya mikrobiologiya. Moskva: Mir. 1987. 567 s. [in Russian].
17. Gordienko EA, Pushkar NS. Fizicheskie osnovy nizkotemperaturnogo konservirovaniya kletochnykh suspenziy. Kiev: Nauk. dumka; 1994. 143 s. [in Russian].
18. Belous AM, Grischenko VI. Kriobiologiya. Kiev: Naukova dumka; 1994. 430 s. [in Russian].
19. Grigor'ev AV. Obshchie principy formirovaniya kishhechnogo mikrobiotsenoza cheloveka. *Medichnij Vsesvit*. 2002;1.2:168-173. [in Russian].
20. Tkachenko EI, Suvorova AN. Disbioz kishhechnika. Rukovodstvo po diagnostike i lecheniyu. Sankt-Peterburg: InformMed; 2009. 276 s. [in Russian].

КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ, ІММОБІЛІЗОВАНИХ В ГЕЛЕВИХ ГРАНУЛАХ З ДОДАТКОВИМ ПОКРИТТЯМ

Петров І. В., Ананьїна Г. Є., Онасенко О. С., Степанюк Л. В., Нардїд Е. О.

Резюме. Метою роботи було встановлення впливу додаткового покриття гелевих гранул шаром альгінатного гелю на життєздатність іммобілізованих в гранулах пробіотичних штамів мікроорганізмів після швидкого охолодження до температури -196°C та зберігання за цієї температури.

Об'єктами дослідження були бактерії *B. bifidum*, штам 1, *E. coli* M-17 та дріжджі *S. boulardii* CNCM I-745. *B. bifidum* вирощували у напіврідкому середовищі Блаурока, *E. coli* M-17 – на скошеному агаризованому середовищі «Nutrient Agar» («Biolife», Італія), *S. boulardii* – на скошеному сусло-агарі. Після вирощування бактерії *E. coli* та дріжджі *S. boulardii* змивали з поверхні агаризованих середовищ фізіологічним розчином. Бактерії *B. bifidum* відмивали від середовища Блаурока і теж суспендували у фізіологічному розчині. Для гелевих гранул і додаткового шару гелю використовували альгінат натрію E 401 («FarmaSino», Китай).

Мікробні клітини іммобілізували в гелевих гранулах методом іотропного гелеутворення. Стабілізували гранули у 0,2 М розчині CaCl_2 . Були отримані гранули шаровидної форми з діаметром $2,2 \pm 0,2$ мм. Кінцева концентрація альгінату натрію в гранулах становила 1%. Концентрація клітин в гелі становила 10^9 клітин/мл. Для нанесення додаткового покриття на окремі гранули та для отримання конгломератів окремі гранули або по 10-ть гранул брали пінцетом і занурювали у 2% розчин альгінату натрію. Гранули з додатковим покриттям та конгломерати також стабілізували у 0,2% розчині CaCl_2 . Заморожували зразки гранул та конгломератів зануренням у рідкий азот (-196°C). Життєздатність клітин визначали «чашковим» методом Коха за здатністю клітин до колонієутворення.

Встановлено, що під час заморожування до -196°C кількість життєздатних клітин *B. bifidum* та *E. coli*, іммобілізованих в гелевих гранулах без додаткового покриття, в гранулах з додатковим покриттям та в конгломератах зменшувалася. При цьому відносна кількість клітин, які загинули, не відрізнялася від показників загинувших клітин в гранулах без додаткового покриття.

В експериментах із клітинами дріжджів *S. boulardii* було показано, що кількість життєздатних клітин в гранулах з додатковим покриттям та в конгломератах після заморожування до -196°C достовірно вища, ніж в гранулах без додаткового покриття.

Під час наступного зберігання протягом 3-х місяців (термін спостереження) кількість життєздатних клітин бактерій та дріжджів не змінюється.

Ключові слова: пробіотики, іммобілізація, гелеві носії, кріоконсервування.

CRYOPRESERVATION OF PROBIOTIC STRAINS OF MICROORGANISMS IMMOBILIZED IN GEL GRANULES WITH ADDITIONAL COATING

Petrov I. V., Ananina G. E., Onasenko O. S., Stepanyuk L. V., Nardid E. O.

Abstract. This paper presents the results of the research devoted to the development of technologies for long-term storage of gel-immobilized probiotic microorganisms at low temperatures.

The aim of this work was to study the effect of coating gel granules with an additional layer of alginate gel on the viability of immobilized probiotic microorganisms' strains after rapid cooling to -196°C and their long-term storage at this temperature.

Objects and research methods. Probiotic strains of bacteria *Bifidobacterium bifidum* 1 (*B. bifidum*), *Escherichia coli* M-17 (*E. coli* M-17) and yeast *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (*S. boulardii*) were immobilized in granules of 1% alginate by ionotropic gelation. A part of the granules was coated with additional layer of 2% alginate gel. The granules from another part were combined into conglomerates of 10 pieces. These conglomerates were coated with 2% alginate gel. The granules and conglomerates were placed in cryovials and frozen by immersion in liquid nitrogen. The samples were thawed in a water bath at 37°C . Granules and conglomerates were dissolved in 4% EDTA solution. The viability of microorganisms was assessed by colony formation on agar plates or in semi-liquid media.

Research results and their discussion. Coating of the granules with a layer of 2% alginate gel, as well as the formation of conglomerates of granules coated with a layer of 2% alginate, did not cause changes in the viability of immobilized bacteria after their rapid cooling to -196°C . In *E. coli* M-17 samples, the number of viable bacteria per 1 ml of gel decreased by 0.31-0.42 lg. In *B. bifidum* samples, it decreased by 1.2-1.3 lg. In the samples of immobilized *S. boulardii* yeast, both coating the granules with 2% alginate gel and the formation of conglomerates of granules and their subsequent coating with 2% alginate gel had a protective effect. The number of viable cells per ml of gel in granules without additional coating decreased by 1.22 lg, while in coated granules it reduced by 0.7 lg and in the conglomerates the viability decreased by 0.6 lg.

It can be presumed that coating with 2% alginate gel reduces the cooling rate in the gel granules. Accordingly, this reduces the severity of intracellular crystallization and recrystallization processes during cooling-heating.

The storage process at the temperature of -196°C does not cause additional death of immobilized microbial cells.

Key words: probiotics, immobilization, gel carriers, cryopreservation.

*Рецензент – проф. Небесна З. М.
Стаття надійшла 25.12.2020 року*