

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **232685**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **415155**

(22) Data zgłoszenia: **07.12.2015**

(51) Int.Cl.

A61K 36/254 (2006.01)

A23K 50/90 (2016.01)

A61P 33/00 (2006.01)

(54) **Preparaty roślinne do zastosowania w leczeniu noseemozy u pszczół
i poprawy ich odporności**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

19.06.2017 BUP 13/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.07.2019 WUP 07/19

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet

Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin, PL

UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie,

Lublin, PL

UNIwersytet Jagielloński, Kraków, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ANETA PTASZYŃSKA, Świdnik, PL

MAŁGORZATA CYTRYŃSKA, Lublin, PL

WIESŁAW MUŁENKO, Lublin, PL

AGNIESZKA ZDYBICKA-BARABAS,

Niedzwica Duża, PL

GRZEGORZ BORSUK, Prawiedniki, PL

DANIEL ZAŁUSKI, Nowosiółki, PL

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Maria Brodzicka

PL 232685 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są dodawane do pokarmów pszczele preparaty, w postaci ekstraktów chloroformowych, etanolowych czy wodnych, sporządzanych z korzeni, łodyg, liści lub owoców roślin należących do rodzaju *Eleutherococcus*, znajdujących zastosowanie zarówno w leczeniu nosemozy u pszczół miodnych, wywołanej zakażeniem grzybami takimi jak, *Nosema apis* czy *Nosema ceranae*, jak i poprawie ich odporności.

Dotychczas, w leczeniu nosemozy u pszczół, stosuje się powszechnie leki na bazie fumagiliny, substancji wyizolowanej z grzyba *Aspergillus fumigatus*, której działanie polega jedynie na hamowaniu aktywności enzymu aminopeptydazy metioninowej MetAP-2, bez niszczenia zarodników *Nosema spp.*, co w konsekwencji prowadzi do rozwijania się oporności grzyba na ten antybiotyk.

Ponadto, fumagilina trudno rozpuszcza się w wodzie, będącej podstawą syropów cukrowych, przez co konieczne jest stosowanie różnych dodatków chemicznych zwiększających rozpuszczalność antybiotyku w roztworach wodnych, co z kolei grozi możliwością przenikania samej fumagiliny lub produktów jej metabolizmu do miodu.

W leczeniu nosemozy stosowane są też mieszanki ziołowe, jak np. wyciąg z kory dębu, jednakże działanie takich preparatów nie jest dostatecznie skuteczne w stosunku do organizmów wywołujących mikrosporydiozy u pszczół.

Inny, znany z opisu patentowego MX 2011011839, sposób zapobiegania i zwalczania nosemozy u pszczół, polega na wyciszeniu wybranych genów *Nosema spp.*, z zastosowaniem konstruktów genetycznych lub cząsteczek kwasów nukleinowych – dsRNAs, np. siRNAs, miRNAs and shRNAs – funkcjonalnie związanych z białkami penetrującymi komórkę.

Jak wykazuje praktyka, metoda ta również nie gwarantuje dostatecznej skuteczności zwalczania nosemozy u pszczół, dodatkowo wiąże się z koniecznością użycia drogich technik otrzymywania i oczyszczania genów, a sama idea aplikowania pszczołom preparatów na bazie modyfikowanych genetycznie związków jest dyskusyjna i nie jest powszechnie akceptowana.

Ze zgłoszenia patentowego P.408774, znany jest również preparat do leczenia mikrosporydioz, a zwłaszcza nosemozy u pszczół, zawierający jedną z rozproszonych homogenicznie, amidowych pochodnych protoporfiryny.

Z uwagi na fakt, iż miód i inne produkty pszczele wykorzystywane są przez człowieka jako produkty żywnościowe, lecznicze czy suplementy diety, leczenie pszczół powinno opierać się o dobrze poznane, bezpieczne preparaty, łatwo degradowalne i nie powodujące zmian genetycznych w organizmach pszczół.

Rośliny należące do rodzaju *Eleutherococcus*, takie jak np. *Eleutherococcus cissifolius*, *Eleutherococcus divaricatus*, *Eleutherococcus giraldii*, *Eleutherococcus henryi*, *Eleutherococcus lasiogyne*, *Eleutherococcus leucorrhizus*, *Eleutherococcus nodiflorus*, *Eleutherococcus rehderianus*, *Eleutherococcus senticosus*, *Eleutherococcus sessiliflorus*, *Eleutherococcus setulosus*, *Eleutherococcus sieboldianus*, *Eleutherococcus spinosus* czy też *Eleutherococcus trifolius*, to źródło ogromnej ilości związków biologicznie czynnych jak np. eleuterozydy, eleuterany, fenolokwasy, depsydy, polisacharydy, ciwujianozydy, akantopanaksozydy czy olejki eteryczne, wykazujących działanie bakterio- i grzybobójcze oraz immunostymulacyjne i adaptogenne u zwierząt kręgowych, w tym i człowieka.

Przeprowadzone badania kliniczne wskazują, że podawanie pacjentom substancji otrzymanych jako ekstrakty z roślin należących do rodzaju *Eleutherococcus*, zwiększa odporność niespecyficzną organizmu na szereg chorób poprzez wpływanie na ekspresję genów odpowiedzialnych za skuteczną walkę z czynnikami stresogennymi oraz silne działanie antyoksydacyjne (Committee on herbal medicinal products (HMPC). Reflection paper on the adaptogenic concept. Doc. Ref. EMEA/-/HMPC/102655/2007).

W znanym stanie techniki nie są znane żadne preparaty otrzymywane z roślin należących do rodzaju *Eleutherococcus*, mających zastosowanie w leczeniu pszczół.

Celem wynalazku było opracowanie skutecznego i nie powodującego skutków ubocznych, preparatu roślinnego do zwalczania grzybów z rodzaju *Nosema* i hamowania rozwoju ich zarodników, znajdującego zastosowanie w leczeniu mikrosporydioz u pszczół miodnych.

Nieoczekiwanie okazało się, że grupa specjalnie wyselekcjonowanych ekstraktów z różnych części roślin z rodzaju *Eleutherococcus*, znajduje zastosowanie w preparatach do leczenia nosemozy u pszczół i podnosi ich odporność.

Preparaty z roślin należących do rodzaju *Eleutherococcus*, według wynalazku charakteryzują się tym, że zostały wyekstrahowane z różnych części roślin z rodzaju *Eleutherococcus* do zastosowania w leczeniu nosemozy u pszczoł i podnoszenia ich odporności.

Korzystnym jest jeśli rośliny należące do rodzaju *Eleutherococcus*, to np. *Eleutherococcus cissifolius*, *Eleutherococcus divaricatus*, *Eleutherococcus giraldii*, *Eleutherococcus henryi*, *Eleutherococcus lasiogyne*, *Eleutherococcus leucorrhizus*, *Eleutherococcus nodiflorus*, *Eleutherococcus rehderianus*, *Eleutherococcus senticosus*, *Eleutherococcus sessiliflorus*, *Eleutherococcus setulosus*, *Eleutherococcus sieboldianus*, *Eleutherococcus spinosus* czy też *Eleutherococcus trifoliatus*.

Korzystnym jest jeśli ekstrakty sporządzone są z korzeni, łodyg, liści lub owoców roślin należących do rodzaju *Eleutherococcus*, z użyciem chloroformu, etanolu czy też gorącej wody.

Korzystnym jest również jeśli ekstrakty roślinne stosowane są w ilości od 1×10^{-3} do 1 na 1000 j.w. pokarmu.

Jak wykazano w przykładach, preparaty według wynalazku, to substancje nietoksyczne, wykazujące wysoki poziom terapeutyczny zakażeń pszczoł miodnych grzybami *Nosema* spp., skutecznie wpływają na wzmocnienie układu odpornościowego pszczoł, wyrażonego wzrostem aktywności oksydazy fenolowej.

Wynalazek przedstawiono w poniższych przykładach wykonania.

Przykład 1

W kilku kolbach miarowych umieszczono po 50 g wysuszonych i rozdrobnionych korzeni *Eleutherococcus senticosus*, które zalewano 500 ml chloroformu. Po 24 godz. maceracji, próbki poddano działaniu ultradźwięków przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po dekantacji, roztwory przesączało przez bibułę filtracyjną. Czynność tę powtórzono jeszcze dwukrotnie, przy czym w ostatniej operacji zmniejszono ilość chloroformu do 200 ml. Otrzymane ekstrakty zagęszczono, wysuszone zliofilizowano.

100 mg liofilizatu rozpuszczono w 100 ml wody i 4 ml takiego roztworu dodano do pokarmu dla pszczoł otrzymanego przez rozpuszczenie 500 g cukru spożywczego w 500 g wody.

Otrzymano pokarm płynny z ekstraktem z korzeni *Eleutherococcus senticosus* w ilości 4×10^{-3} j.w. na 1000 j.w. pokarmu.

Przykład 2

Próbki korzeni *Eleutherococcus senticosus* przygotowane jak w przykładzie 1, ekstrahowano zgodnie z procedurą z przykładu 1, używając odpowiednio 2 x po 500 ml i w ostatniej fazie 300 ml 75% roztworu etanolu. 135 mg otrzymanego liofilizatu równomiernie wymieszano z 1,0 kg cukru pudru i 0,25 kg miodu ogrzanego do temp. 50°C . Otrzymano ciasto zawierające $1,2 \times 10^{-1}$ j.w. ekstraktu na 1000 j.w. pokarmu.

Przykład 3

W kilku kolbach miarowych umieszczono po 50 g wysuszonych i rozdrobnionych łodyg *Eleutherococcus henryi*, które zalewano 500 ml wrzącej wody. Po 10 minutach preparaty przesączało, zamrożono i poddano liofilizacji.

1 g liofilizatu rozpuszczono w 1 litrze ddH₂O, po czym 10 ml tego roztworu dodano do 500 g cukru spożywczego rozpuszczonego w 500 g wody. Otrzymano pokarm płynny zawierający 10×10^{-3} j.w. ekstraktu w 1000 j.w. pokarmu.

Przykład 4

W kilku kolbach miarowych umieszczono po 50 g wysuszonych i rozdrobnionych łodyg *Eleutherococcus henryi*, które zalano 500 ml wrzącej wody. Po 10 minutach preparaty przesączało, zamrożono i poddano liofilizacji.

1 g liofilizatu rozpuszczono w 1 litrze ddH₂O i 1 ml tego roztworu dodano do 500 g cukru spożywczego rozpuszczonego w 500 g wody. Otrzymano pokarm płynny zawierający 1×10^{-3} j.w. ekstraktu w 1000 j.w. pokarmu.

Przykład 5

W kilku kolbach miarowych umieszczono 50 g mieszaniny wysuszonych i rozdrobnionych korzeni *Eleutherococcus giraldii* i *Eleutherococcus spinosus*, a także owoców *Eleutherococcus lasiogyne* i *Eleutherococcus trifoliatus*, które zalano 500 ml chloroformu. Po 24 godz. maceracji próbki umieszczono poddano działaniu ultradźwięków przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po dekantacji, roztwory przesączało przez bibułę filtracyjną. Czynność tę powtórzono jeszcze dwukrotnie, przy czym w ostatniej operacji zmniejszono ilość chloroformu do 200 ml. Otrzymane ekstrakty zagęszczono, wysuszone zliofilizowano.

120 mg liofilizatu równomiernie wymieszano z 1,0 kg cukru pudru i 0,25 kg miodu ogrzanego do temp. 50°C. Otrzymano ciasto zawierające $9,5 \times 10^{-2}$ j.w. ekstraktu na 1000 j.w. pokarmu.

Przykład 6

W kilku kolbach miarowych umieszczono 50 g mieszaniny wysuszonych i rozdrobnionych łodyg *Eleutherococcus nodiflorus* i *Eleutherococcus rehderianus*, a także owoców *Eleutherococcus sessiliflorus*, które zalewano 500 ml 75% roztworu etanolu. Po 24 godz. maceracji próbki umieszczono w łaźni ultradźwiękowej i poddano działaniu ultradźwięków przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po dekantacji, roztwory przesączało przez bibułę filtracyjną. Czynność tę powtórzono jeszcze dwukrotnie, przy czym w ostatniej operacji zmniejszono ilość 75% roztworu etanolu do 200 ml.

Otrzymane ekstrakty zagęszczono i poddano liofilizacji.

500 mg liofilizatu zmieszano z 250 g hydrolizatu skrobiowego rozpuszczonego w 250 mg przegotowanej wody. Otrzymano pokarm zawierający 1,0 j.w. ekstraktu na 1000 j.w. pokarmu.

Przykład 7

W kilku kolbach miarowych umieszczono 50 g mieszaniny wysuszonych i rozdrobnionych owoców *Eleutherococcus setulosus*, łodyg *Eleutherococcus leucorrhizus* oraz korzeni *Eleutherococcus sieboldianus*, które zalano 500 ml wrzącej wody. Po 10 minutach preparaty przesączało, zamrożono i poddano liofilizacji.

9,5 g liofilizatu rozpuszczono w 1 litrze ddH₂O i 1 ml tego roztworu dodano do 500 g cukru spożywczego rozpuszczonego w 500 g wody. Otrzymano pokarm płynny zawierający $9,5 \times 10^{-2}$ j.w. ekstraktu w 1000 j.w. pokarmu. Sporządzając pokarm stały, wymieszano równomiernie 120 mg liofilizatu z 1,0 kg cukru pudru i 0,25 kg miodu ogrzanego do temp. 50°C. Otrzymano ciasto zawierające $9,5 \times 10^{-2}$ j.w. ekstraktu na 1000 j.w. pokarmu.

Przykład 8. Działanie preparatów według wynalazku na leczenie nosemozy

Otrzymane w przykładach 1–7, płynne i stałe pokarmy zawierające wyekstrahowane wyciągi z różnych części roślin z rodzaju *Eleutherococcus*, używano w temperaturze pokojowej do karmienia pszczoł sztucznie zakażonych *Nosema* spp. oraz pszczoł zdrowych dla wykazania ewentualnego stopnia toksyczności.

W każdym z eksperymentów, dla każdej grupy pokarmowej, w 10 standardowych klatkach utrzymywano 40 pszczoł sztucznie zakażonych *Nosema* spp. Pszczoły karmiono pokarmami kolejno otrzymanymi wg poszczególnych przykładów.

W końcowej fazie, z pszczoł leczonych wyciągami wykonywano standardowe rozciery z 10 pszczoł w dwóch powtórzeniach, do sporządzenia preparatów mikroskopowych. Zarodniki liczone w komorze Bürkera obserwowanej w mikroskopie optycznym Olympus BX61 i porównywano z preparatem sporządzonym z rozciery z 10 pszczoł zakażonych ale nie leczonych wyciągami roślin z rodzaju *Eleutherococcus*, czyli karmionych czystym pokarmem.

W zależności od użytego w pokarmie wyciągu, w obrazach mikroskopowych nie zaobserwowano zarodników *Nosema* spp. co wskazuje na wyeliminowanie choroby – pokarmy z wyciągami z przykładów 1 i 2 – bądź zaobserwowano zmniejszoną ich ilość w stosunku do kontroli. Podczas gdy w grupie pszczoł kontrolnych, nie leczonych, zakażenie rozwinęło się do poziomu 28 mln zarodników *Nosema* spp./pszczołę, to w grupie pszczoł którym podawano pokarm opisany w przykładach 3–7, liczba zarodników zmalała do granic do 1,0–5,0 mln zarodników/pszczołę. Spadek liczby zarodników *Nosema* spp. po dokarmianiu pszczoł poszczególnymi preparatami otrzymanymi w przykładach od 1 do 7, w stosunku do kontroli – ilości zarodników u pszczoł karmionych czystym pokarmem – przedstawiono graficznie na rysunku jako fig. 1.

Wyniki jednoznacznie wskazują na dużą skuteczność preparatu według wynalazku.

Przykład 9. Badanie toksyczności preparatów według wynalazku na organizmy pszczoł

Dla każdej grupy pokarmowej, w 10 klatkach umieszczono po 40 zdrowych pszczoł i karmiono je pokarmami zawierającymi wyciągi otrzymane w przykładach od 1 do 7. Dla porównania analogiczną liczbę pszczoł, jako kontrole, karmiono czystym pokarmem. Po 21 dniach porównano liczbę żywych pszczoł w poszczególnych klatkach z kontrolą. Liczba pszczoł w grupach badawczych wynosiła od 19 do 26 sztuk, natomiast średnia żywych pszczoł w kontrolach wynosiła 23 sztuki.

Przeżywalność pszczoł w poszczególnych klatkach w porównaniu do kontroli, przedstawiono graficznie – fig. 2.

Mając na względzie naturalną umiarkowaną umieralność pszczoł, należy stwierdzić, iż preparaty według wynalazku to substancje nietoksyczne i w pełni bezpieczne jako dodatki do pszczelich pokarmów.

Przykład 10. Wpływ preparatów według wynalazku na wzrost odporności pszczół miodnych
Wzrost odporności pszczół po dokarmianiu pszczół pokarmami zawierającymi wyciągi otrzymane w przykładzie 1–7, wykazano poprzez wzrost w aktywności oksydazy fenolowej.

Dla każdej grupy pokarmowej, w 10 klatkach umieszczono po 40 zdrowych pszczół, które karmiono syropem i ciastem zawierającymi wyciągi według wynalazku i analogicznie grupę kontrolną dokarmianą czystym pokarmem. Po 3 dniach, od 10 pszczół z każdej grupy, pobrano hemolimfę w celu określenia poziomu oksydazy fenolowej.

W grupie pszczół karmionych syropem cukrowym i ciastem z dodatkiem preparatów według wynalazku, zaobserwowano wzrost aktywności oksydazy fenolowej w hemolimfie pszczół w granicach od 7,5 do prawie 14 razy w stosunku do grupy kontrolnej.

Wzrost w aktywności oksydazy fenolowej po dokarmianiu pszczół preparatami otrzymanymi w przykładach od 1 do 7, w stosunku do oksydazy grupy kontrolnej pszczół karmionych czystym pokarmem, przedstawiono na rysunku – fig. 3.

Zastrzeżenia patentowe

1. Preparaty z roślin należących do rodzaju *Eleutherococcus*, do zastosowania w leczeniu nose-moży u pszczół i podnoszenia ich odporności.
2. Preparaty według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że rośliny należące do rodzaju *Eleutherococcus*, to *Eleutherococcus cissifolius*, *Eleutherococcus divaricatus*, *Eleutherococcus giraldii*, *Eleutherococcus henryi*, *Eleutherococcus lasiogyne*, *Eleutherococcus leucorrhizus*, *Eleutherococcus nodiflorus*, *Eleutherococcus rehderianus*, *Eleutherococcus senticosus*, *Eleutherococcus sessiliflorus*, *Eleutherococcus setulosus*, *Eleutherococcus sieboldianus*, *Eleutherococcus spinosus* czy też *Eleutherococcus trifoliatius*.
3. Preparaty według zastrzeż. 1 i 2 sporządzone są z korzeni, łodyg, liści lub owoców roślin należących do rodzaju *Eleutherococcus*.
4. Preparaty według zastrzeż. 1, 2 i 3 ekstrahowane są użyciem chloroformu, etanolu czy też gorącej wody.

Rysunki

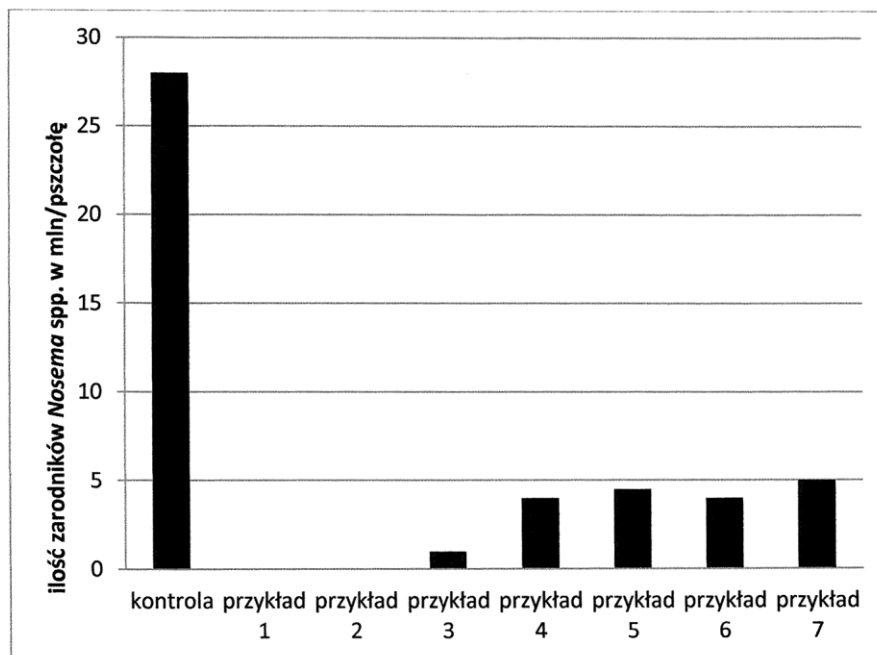


Fig.1

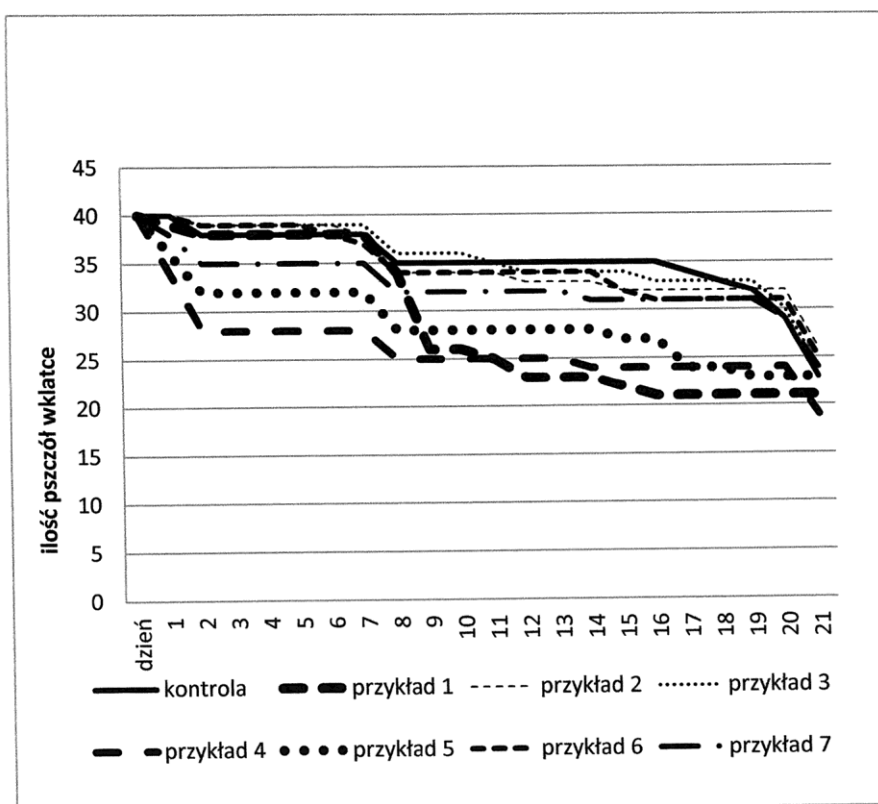


Fig.2

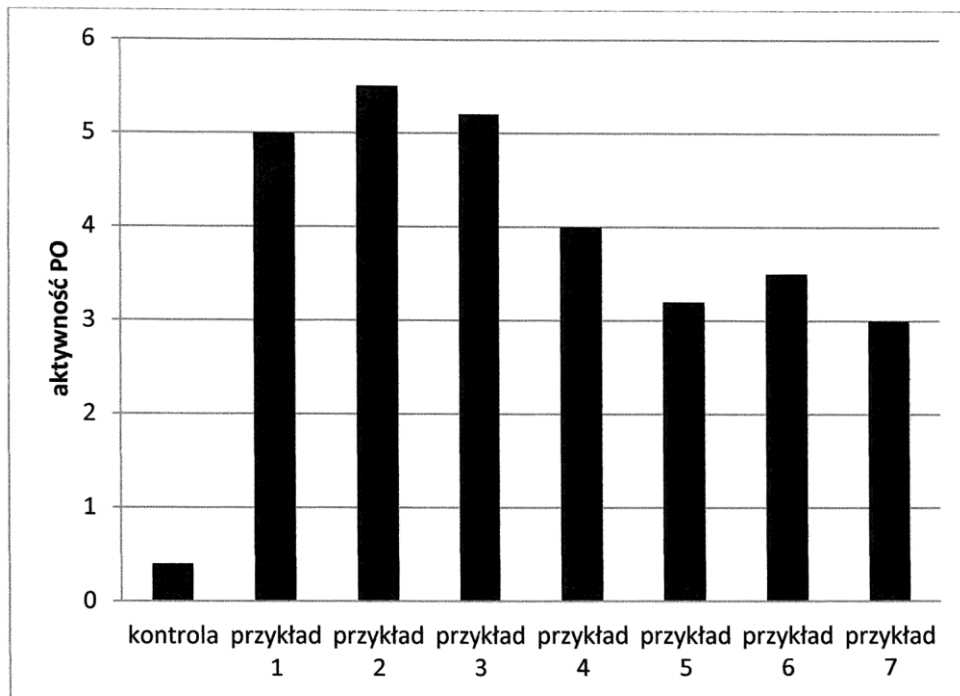


Fig.3

