

Kompozycja farmaceutyczna do stosowania w leczeniu lub profilaktyce ryb

Wynalazek dotyczy preparatu immunostymulującego przeznaczonego dla ryb, zwłaszcza do podawania drogą immersji. Podstawową zaletą wynalazku jest to, iż preparat podawany jest drogą immersyjną równocześnie nie wpływając na chemizm wody. Jego skład jest całkowicie nietoksyczny (w zakresie proponowanych dawek) i może być stosowany zarówno u ryb ozdobnych jak i przeznaczonych do konsumpcji bez okresu karencji.

Wstępne badania prowadzone w minionym dziesięcioleciu potwierdziły możliwość wykorzystania ziołowych ekstraktów roślinnych w profilaktyce zdrowotnej i terapii chorób szeregu gatunków zwierząt wodnych. W obecnym czasie zioła i produkty ziołowe odgrywają coraz ważniejszą rolę w akwakulturze. W akwarystyce nagminnie „profilaktycznie” stosowane są antybiotyki, czego efektem jest narastająca antybiotykooporność (Musa N et al. 2008). Preparaty immunostymulujące w określonych sytuacjach mogą zastępować antybiotyki np. u sumowatych (Bich Hang BT et al. 2014). Nie ma w chwili obecnej alternatywy dla stopniowo wycofywanych z rynku zoologicznego preparatów leczniczych opartych na kancerogennej zieleni malachitowej, błękitie metylenowym czy formalinie. Produkty zawierające wyżej wymienione substancje, pomimo, iż są niebezpieczne dla środowiska, są bardzo często stosowane bez przeprowadzenia rozeznania, co do przyczyny problemów obserwowanych u zwierząt wodnych. W tym kontekście szczególnie ważna jest możliwość ograniczania stosowania chemioterapeutyków poprzez wprowadzanie preparatów immunostymulujących.

Wpływ różnego rodzaju mieszanek ziołowych na procesy fizjologiczne ryb oraz ich działanie przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe u organizmów wodnych są obiektem badań zespołów naukowych na całym świecie (Dügenci SK et al. 2003; Muniruzzaman M & Chowdhury MBR, 2008). Jak wskazują doniesienia naukowe, wyciągi wielu gatunków roślin mogą wykazywać właściwości immunostymulujące (Govind et al. 2012). Substancje aktywne zawarte w ekstraktach mogą być stosowane u ryb w różnych stadiach rozwojowych, w tym u wylęgu (Bricknell I & Dalmo RA, 2005). Muszą jednak być w odpowiednim stopniu wykształcone organy odpowiedzialne za procesy immunologiczne. W przypadku wyciągów podawanych z karmą skuteczność działania ekstraktów roślinnych na układ odpornościowy ryb w znacznej mierze zależy od efektywności żerowania ryb. W tym wypadku na zwierzęta niepobierające paszy dodatki immunostymulujące nie działają. Szereg wyciągów roślinnych, w tym ekstrakt z jeżówki, pozyskiwanych do produkcji preparatów immunostymulujących dla ludzi i zwierząt gospodarskich posiada swoisty gorzki lub cierpki smak. Smak ten pochodzący m.in. od saponin, flawonoidów i związków fenolowych może ograniczać

akceptowalność karmy (Popek et al. 2010). Przewagą preparatu podawanego do wody jest możliwość stymulowania mechanizmów odpornościowych niezależnie od ilości i częstotliwości pobieranego przez ryby pokarmu.

W ostatnich latach nastąpił znaczny postęp w zakresie uprawy ziół, pozyskiwania i produkcji ekstraktów roślinnych. Obecnie szczególny nacisk kładzie się na standaryzację surowca przeznaczonego do produkcji leków, immunokosmetyków, suplementów diety czy dodatków paszowych (Kołodziej et al. 2010). Szczególne znaczenie odgrywa jakość, trwałość i dostępność otrzymywanego z roślin ekstraktu. Dostępne na rynku wysokiej jakości ekstrakty roślinne umożliwiają przygotowanie preparatu dla ryb o ściśle określonym stężeniu substancji aktywnych. Zastrzegane rozwiązanie, w odróżnieniu od cytowanych powyżej doniesień naukowych, bazuje na standaryzowanej produkcji o oznaczonej trwałości.

Aktualnie jest kilka preparatów komercyjnych dostępnych na rynku zoologicznym o podobnym działaniu, jednak sposób ich stosowania oraz skład jest różny od proponowanego wynalazku.

Firma Mosura produkuje roślinny preparat w postaci Toniku PRO poprawiający odporność krewetek i ryb. Jest to suplement diety (karma) przeznaczony głównie dla krewetek (ale zgodnie z instrukcją producenta również może być stosowany w przypadku hodowli ryb). Preparat wzmacnia system odpornościowy przez składniki odżywcze i immunostymulanty. Produkt ten zawiera bliżej nieokreślone stężenie substancji aktywnych. Producent nie przedstawił danych wskazujących na skuteczność działania produktu i uzyskiwany efekt.

Firma Ecological Laboratories INC znana pod marką MICROBE-LIFT produkuje ziołowy preparat poprawiający odporność ryb. Jest to produkt leczniczy, skuteczny w leczeniu stanów zapalnych o podłożu bakteryjnym i grzybiczym, wrzodów i wybroczyn, zmętnienia skóry, wrzodów otworu gębowego, martwicy płetw. Wzmacnia system immunologiczny bez ryzyka nabycia odporności przez szczep bakteryjny, jak ma to miejsce w przypadku stosowania antybiotyków. Ułatwia usuwanie mikroorganizmów chorobotwórczych z zakażonego miejsca, przez co – pozbawione żywiciela - szybko giną. Produkt ten jest jednak wyłącznie do użytku akwarystycznego, nie można go stosować do leczenia ryb przeznaczonych do spożycia. Produkt ten zawiera bliżej nieokreślone stężenie substancji aktywnych. Producent nie przedstawił danych wskazujących na skuteczność działania produktu i uzyskiwany efekt.

W zgłoszeniu patentowym KR101107034 (B1) opisano z kolei dodatek do paszy dla ryb składający się z materiałów roślinnych. Ekstrakt ten zgodnie z opublikowanym opisem zgłoszenia wykazuje działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze oraz przeciw-

pasożytnicze. Jednak jego skład i sposób podawania jest zupełnie różny od proponowanego wynalazku.

W zgłoszeniu patentowym CN102091242 (A) opisano mieszankę w odpowiednich proporcjach tradycyjnych ziół chińskich stosowaną do leczenia różnych chorób u ryb. Jednak jego skład jest zupełnie różny od proponowanego wynalazku. Mieszanka opiera się na naturalnych niestandardyzowanych wyciągach roślinnych, stąd skuteczność działania produktu może się zmieniać w zależności od partii wykorzystanych do produkcji składników.

W zgłoszeniu patentowym CN101507744 (A) opisano kompozycje ziół oraz sposób jej przygotowania. Preparat jest przeznaczony do użytku akwarystycznego. Jego skład i sposób podawania są zupełnie różne od proponowanego wynalazku. Preparat opiera się na naturalnych niestandardyzowanych wyciągach roślinnych.

W zgłoszeniu patentowym RU2011128157 (A) opisano metodę produkcji biologicznie czynnego dodatku do pasz dla zwierząt hodowlanych, ptaków i ryb. Składa się on z probiotyków oraz ziół leczniczych (m.in. z jeżówki purpurowej). Jednak całkowity skład, z uwagi na rodzaj użytych substancji oraz ich stężenia, jest różny od proponowanego wynalazku. Różnice występują również w sposobie podawania jak i w opisanym sposobie działania opisanego w zgłoszeniu patentowym preparatu. Nie podano stężenia substancji aktywnych wnoszonych do produktu w ekstraktach ziołowych.

Naturalne środki immunostymulujące stanowią liczną grupę preparatów pozyskiwanych z bakterii, grzybów oraz niektórych roślin. Różnorodność ich działania powodują, że nie ma jednej właściwej nazwy, w której można by ująć wszystkie właściwości. W literaturze określane są, jako naturalne immunostymulatory, immunomodulatory, immunoaugmentory bądź modyfikatory odpowiedzi biologicznej (ang. BRM, biological response modifiers). Immunostymulujący efekt działania jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*) jest powszechnie znany u ludzi i zwierząt, również u ryb. Jej działanie na system immunologiczny, przy podawaniu drogą pokarmową, został opisany u tilapii nilowej (Aly SM & Mohammed MF, 2009; Aly SM et al. 2008), karpia (RenYongLin, 2008) oraz gupika (Guz L et al. 2011). W powyższych cytowanych pracach naukowych wykazano, iż substancje aktywne tej rośliny, takie jak flawonoidy, posiadają właściwości immunostymulujące oraz wspomagają wzrost odporności na infekcje bakteryjne.

Do wzbogacania wody lub pokarmu w witaminy służą w akwarystyce specjalne suplementy multiwitaminowe. Preparaty te mają postać płynów, które wlewa się bezpośrednio do akwarium i/lub skrapiania nimi pokarm tuż przed podaniem go rybam. Na rynku znajdziemy obecnie kilka suplementów witaminowych dla ryb oferowanych przez największych

producentów preparatów akwarystycznych. Mają one charakter uniwersalny, czyli mogą być stosowane w przypadku ogromnej większości ryb ozdobnych. W ich skład wchodzi zazwyczaj wszystkie potrzebne witaminy w proporcjach dobranych przez danego producenta (pod tym względem nieznacznie różnią się od siebie) np. DENNERLE V-Maxx preparat witaminowy dla ryb w kroplach. Nie są one jednak opracowane i podawane w celu wzmocnienia odporności.

Celem wynalazku jest dostarczenie opartego o naturalne ekstrakty i witaminy produktu wykazującego wysoką skuteczność działania immunostymulującego, przeznaczonego dla wszystkich gatunków ryb, nadającego się do stosowania w wielogatunkowych obsadach w gospodarce rybackiej i akwarystyce. Szczególnie pożądane jest dostarczenie preparatu podawanego do wody i nadającego się do stosowania drogą immersji oraz posiadającego standaryzowany skład.

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna do stosowania w leczeniu lub profilaktyce ryb, zwłaszcza jako preparat immunostymulujący, składająca się z trzech części A, B i C, korzystnie w proporcjach wagowych A:B:C jak 1000:2:2, przy czym część A stanowi standaryzowany ekstrakt z jeżówki purpurowej w rozpuszczalniku wybranym z grupy obejmującej: wodę lub roztwór wodny glikolu propylenowego lub gliceryny, zwłaszcza o stężeniu 70%, przy czym stosunek surowca do ekstraktu (DER) wynosi 1:10, część B stanowi tiamina, zwłaszcza w postaci chlorowodoru tiaminy lub monoazotanu tiaminy, natomiast część C stanowi kwas askorbinowy lub jego sól, zwłaszcza w postaci kwasu askorbinowego o czystości 90-99% lub fosforan kwasu askorbinowego.

Korzystnie, kompozycja według wynalazku jest przeznaczona do podawania drogą immersji.

Korzystnie, kompozycja według wynalazku jest przeznaczona do podawania w układzie semistatycznym, z cotygodniową podmianą 50% wody na świeżą przed aplikacją preparatu.

Korzystnie, kompozycja według wynalazku jest przeznaczona do podawania drogą immersji w 2-6 powtórzeniach, co siedem dni.

Korzystnie, kompozycja według wynalazku jest przeznaczona do podawania drogą immersji w rozcieńczeniu 1:1000.

Preparat według wynalazku, przy opracowanym stężeniu wykazuje działanie immunostymulujące, które jest obserwowane przy podawaniu drogą immersji, co jest całkowicie nowym sposobem podawania tego typu preparatu.

Kompozycja według wynalazku składa się z wyciągu z jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*), tiaminy (witaminy B₁) oraz kwasu askorbinowego (witaminy C). Produkt jest nietoksyczny w stężeniu powyżej 10g/dm³ dla zwierząt wodnych i w krótkim czasie w pełni biodegradowalny. Ze względu na skład preparat może być stosowany u ryb przeznaczonych do konsumpcji bez okresu karencji oraz ryb ozdobnych. Co istotne, w przeciwieństwie do szeregu chemioterapeutyków, produkt spełnia wymogi bezpieczeństwa dla człowieka i zwierząt. W badanych ilościach kompozycja nie wykazuje właściwości kancerogennych czy mutagennych i może być stosowany w wielogatunkowych obsadach ryb.

Opracowany preparat jest łatwy technologicznie do wykonania i prosty w użyciu. Substancje, które wchodzi w jego skład, są łatwo dostępne w handlu i zachowują minimalną wymaganą dla preparatów 12-18 miesięczną trwałość. Kompozycja jest nietrwała w wodzie i ulega szybkiej biodegradacji, co jest jego znaczną zaletą. Produkt nie powoduje bezpośrednich zmian w chemizmie wody. Po jego zastosowaniu nie zaobserwowano długotrwałych (poniżej 7 dni) zmian w stężeniu związków fenolowych, które są jednym z głównych substancji aktywnych ekstraktu z jeżówki, oraz aktywności antyoksydacyjnej.

Kompozycja według wynalazku może znaleźć szerokie zastosowanie zarówno w rybnictwie jak i w akwarystyce. Jej podawanie powoduje poprawę jakości chowu i hodowli poprzez działanie na poprawę parametrów odpornościowych ryb. Preparat w większości przypadków może pomóc w ograniczeniu strat w trakcie transportu i kwarantanny zwierząt, dzięki czemu może przyczynić się do zwiększenia rentowności chowu ryb, a w szczególności narybku. Preparat może być stosowany u ryb przeznaczonych do konsumpcji bez okresu karencji oraz ryb ozdobnych. W rybnictwie zastosowanie medykamentów może skutkować, okresowym wyłączeniem ze sprzedaży leczonej partii ryb. Zastosowanie wynalazku daje możliwość szybszego powrotu do zdrowia ryb, przez co może wpłynąć na skrócenie ich okresu rekonwalescencji.

Opracowany preparat jest przeznaczony także do kwarantanny zwierząt. Co istotne, w przeciwieństwie do szeregu chemioterapeutyków, produkt spełnia stawiana tego typu preparatom wymogi bezpieczeństwa dla człowieka i zwierząt. Preparat w rekomendowanych do zastosowania ilościach nie jest toksyczny i może być stosowany w wielogatunkowych obsadach ryb. Przy stosowaniu preparatu nie są konieczne szczególne środki ostrożności. Preparat nie niszczy sprzętu rybackiego i nie pozostawia trudno zmywalnych lub trwałych

przebarwień na zbiornikach hodowlanych, co jest częstym zjawiskiem w przypadku chemioterapeutyków opartych na barwnikach takich jak: zieleń malachitowa i błękit metylenowy. Niepozostawienie niezmywalnych osadów na akwariach ma duże znaczenie w przypadku akwarystyki, w której zwraca się szczególną uwagę na estetykę.

Opracowany preparat jest łatwy technologicznie w wykonaniu i prosty w użyciu. zachowuje minimalną wymaganą dla preparatów 12-18 miesięczną trwałość. W przypadku wprowadzenia produktu na rynek zoologiczny i akwakultury konieczne jest zachowanie długiej trwałości, gdyż zanim trafi on do hodowcy minie kilka lub kilkanaście miesięcy, w czasie których preparat przejdzie przez hurtownie i sklepy. Produkt nie wymaga szczególnego sposobu przechowywania, co jest konieczne w przypadku niektórych środków leczniczych i probiotyków. Jak wyżej wspomniano, preparat jest nietrwały w wodzie i ulega biodegradacji, co jest jego znaczną zaletą dla produktu z przeznaczeniem do akwakultury. Nie powoduje zmian parametrów chemicznych wody.

Powstały produkt może znaleźć szerokie zastosowanie zarówno w rybactwie jak i w akwarystyce. Na rynku zoologicznym pogłębia się nisza związana z dostępnością preparatów służących pielęgnacji i rekonwalescencji ryb o wykazanej skuteczności działania. Jak szacuje się około 90% ryb ozdobnych dostępnych w sklepach zoologicznych pochodzi z importu z Azji. Zwierzęta te po przebytej długotrwałej podróży są najczęściej bardzo zestresowane i w złej kondycji fizycznej. Skutkiem tego są straty pojawiające się w okresie aklimatyzacji i kwarantanny. W czasie kwarantanny pojawiają się także problemy zdrowotne związane z infekcjami o podłożu bakteryjnym i grzybicznym. Aby temu skutecznie zapobiegać niezbędne jest uprzednie wzmocnienie odporności ryb. Kompozycja według wynalazku ułatwia rydom odbudowywanie utraconej w wyniku stresu czy zmiany warunków odporności i łagodzić skutki infekcji bakteryjno-grzybiczych.

Po przeprowadzonym zabiegu sortowania i transportu, na skutek których następuje u ryb spadek odporności, zaleca się stosowanie immunostymulatorów. Problemem, z którym często stykają się hodowcy ryb, jest czasowe zaprzestanie pobierania pokarmu przez zwierzęta poddane ekspozycji na mocny stres. Dlatego po transporcie lub sortowaniu często nie sprawdza się podawanie z paszą lewamizolu, beta-glukanów lub wyciągów roślinnych. Obniżenie odporności u ryb stwierdza się także po okresie zimowym, gdy ryby nie żerują, a działają na nie niesprzyjające czynniki środowiskowe (np. niska temperatura wody). Skuteczną w tym wypadku metodą ochrony ryb jest zastosowanie jesienią podczas transportu preparatu podawanego drogą immersji, którego substancje aktywne będą wchłaniane przez skrzela i skórę.

Podawanie ekstraktu z witaminami drogą immersji (do wody) jest nowym rozwiązaniem na skalę akwakultury. Ten sposób zastosowania preparatu immunostymulującego znajdzie zastosowanie w chowie ryb basenowym w obiegach zamkniętych, wylęgarnictwie i całej akwarystyce.

Przykład 1. Przygotowanie kompozycji według wynalazku

W przykładowej realizacji kompozycja immunostymulująca ma postać jednego trwałego płynu, stanowiącego roztwór użytkowy. Kompozycja składa się z trzech części A, B i C, gdzie część A to standaryzowany ekstrakt z jeżówki purpurowej zamiennie na bazie wodnej (rozpuszczalnik: woda do ekstrakcji) lub glikolowej (rozpuszczalnik: glikol propylenowy i woda do ekstrakcji w proporcjach 70% do 30%), lub glicerynowej (rozpuszczalnik: gliceryna i woda do ekstrakcji w proporcjach 70% do 30%), część B witamina B₁ (tiamina w postaci chlorowodoru tiaminy lub monoazotanu tiaminy o wysokich czystościach), część C witamina C (kwas askorbinowy 90-99% lub fosforan kwasu askorbinowego z przeznaczeniem paszowym lub spożywczym). W części A stosunek surowca do ekstraktu (DER) wynosi 1:10.

Kompozycja jest przygotowywana w proporcjach A:B:C jak 1000:2:2. Części B i C rozpuszcza się w części A w temperaturze pokojowej. Jeśli stosowany jest wodny ekstrakt z jeżówki, kompozycja wymaga zakonserwowania sorbinianem potasu według ogólnie przyjętych zasad konserwacji produktów spożywczych lub paszowych.

Przykład 2. Stosowanie kompozycji według wynalazku

Ryby umieszcza się w zbiorniku hodowlanym lub kwarantannowym o ustabilizowanych właściwościach fizycznych i parametrach chemicznych wody oraz działającym, stabilnym systemie filtracji i/lub napowietrzania. Ekspozycja ryb na preparat powinna odbywać się w układzie semistatycznym tj. z cotygodniową podmianą 50% wody na świeżą przed aplikacją preparatu. W celu uzyskania efektu immunostymulacyjnego zabieg wykonuje się w 2-6 powtórzeniach, co siedem dni. Z przygotowanego preparatu odmierza się 1 ml na każdy litr wody w zbiorniku. Po odmierzeniu preparat rozpuszcza się wstępnie (dokonuje rozcieńczenia) w proporcji 1:5-10 z wodą ze zbiornika. Następnie przygotowany roztwór wlewa się do wody z rybami, na dobę od podania preparatu wyłącza się (jeśli jest zamontowany) system filtracji i pozostawia napowietrzanie.

Przykład 3. Efekty stosowania wynalazku na ryby i środowisko wodne

Celem badań było wykazanie występowania pomiędzy grupami doświadczalnymi istotnych, rozłożonych w czasie różnic w stężeniu w wodzie związków fenolowych oraz aktywności antyoksydacyjnej.

Czterdziestopięciodniowe badania przeprowadzono w okresie od czerwca do połowy lipca 2014. W tym czasie, co 7 dni do wody podawano ekstrakt z jeżówki i witaminy. Każdorazowo przed aplikacją wyciągu i witamin podmieniano w zbiornikach 50% wody. Najczęściej przed podaniem ekstraktu i po jego podaniu analizowano skład chemiczny wody pod kątem obecności związków fenolowych i właściwości antyoksydacyjnych. W celu sprawdzenia działania ekstraktów i witamin na ryby wykonywano testy szoku osmotycznego. Testy te wykonano trzykrotnie w dwutygodniowych odstępach czasowych.

Badania przeprowadzono na 8 grupach danio pręgowanego. Każda z grup była trzech powtórzeniach doświadczalnych i liczyła po 20 osobników. Pierwsza grupa (kontrolnej) nie otrzymywała ekstraktu i witamin, drugiej grupie (B+C) podawano tylko witaminy B₁ 2 mg/dm³ i C 2 mg/dm³. Kolejne cztery grupy doświadczalne otrzymywały ekstrakt z jeżówki w ilości 10 mg/l, 100 mg/l, 1000 mg/l, 10000 mg/dm³. W pozostałych dwóch grupach podawano ekstrakt z jeżówki w ilości 1000 mg/dm³ i 10000 mg/dm³ w oraz witaminy B₁ 2 mg/dm³ i C 2 mg/dm³. Doświadczenie wykonano w 3 powtórzeniach.

Granica oznaczalności związków fenolowych dla użytej metody wynosiła 0,005 [mg·dm⁻³], granica wykrywalności badanych związków kształtowała się na poziomie 0,002 [mg·dm⁻³]. Badaną aktywność antyoksydacyjną wyrażano w skali procentowej (%).

W ramach przeprowadzonego doświadczenia próbki wody do analizy pobierano w 1, 5, 14, 20, 35 i 42 dniu doświadczenia. W dniach 14, 35 i 42 próbki wody do analiz pobierano przed i po podaniu ekstraktu, a w pozostałych terminach tylko raz przed podaniem ekstraktu. Zawartość związków fenolowych w wodzie [mg·dm⁻³] przedstawiono na fig. 1 natomiast na fig. 2 przedstawiono wartość aktywności antyoksydacyjnej wody.

Związki fenolowe oraz aktywność antyoksydacyjna są wskaźnikami, którymi można się posługiwać w badaniach immunologicznych i immunogenetycznych. Związki antyoksydacyjne i związki fenolowe (polifenole) likwidują tlenowe wolne rodniki i są odpowiedzialne za różne procesy zachodzące w organizmie. Monitoring powyższych parametrów pozwala na śledzenie zmian chemizmu wody oraz tempa rozkładu polifenoli. Szybkie tempo rozkładu tych związków w wodzie, przy zachowaniu skuteczności działania na ryby może mieć istotne znaczenie z punktu widzenia ekologii i ochrony środowiska. Preparaty na bazie wyciągów roślinnych są w chwili obecnej jednymi na najbardziej pożądanym produktach na rynku. Wyniki badań własnych wskazują, iż dodanie do wody wyciągu z jeżówki w ilości do 1000 mg wyciągu ·dm⁻³ wody, oraz jeżówki w ilości do 1000 mg wyciągu ·dm⁻³ wody z witaminami B₁ i C lub samych witamin B₁ i C w nie powoduje dające istotnych statystycznie zmian stężenia związków fenolowych i aktywności

antyoksydacyjnej w wodzie. Zmiany stężenia badanych związków stwierdzono w obiektach z dodatkiem 10000 mg/dm^3 oraz 10000 mg/dm^3 z dodatkiem witamin B₁ i C., niemniej jednak po kilku dniach ich ilości zmniejszały się. Dodatek jeżówki w grupach 10000 mg/dm^3 oraz 10000 mg/dm^3 z dodatkiem witamin B₁ i C powodował istotny wzrost stężenia związków fenolowych i aktywności antyoksydacyjnej. Zmiany te obserwowano między próbkami pobranymi tego samego dnia przed podaniem preparatu oraz po podaniu preparatu, a także między próbkami po podaniu preparatu oraz w siódmym dniu po podaniu preparatu. W ostatnim widoczne zaznaczał się spadek stężenia związków fenolowych oraz aktywności antyoksydacyjnej. Uzyskane wyniki wskazują, iż kompozycja według wynalazku jest nietrwała w wodzie i ulega szybkiej biodegradacji, co jest jego znaczną zaletą. Drugą istotną obserwacją jest brak zauważalnych, istotnych zmian stężenia związków fenolowych oraz aktywności antyoksydacyjnej w grupach 1000 mg/dm^3 oraz 1000 mg/dm^3 z dodatkiem witamin B₁ i C. Pomimo, że zauważono efekt w postaci wzrostu odporności ryb podawanych działaniu jeżówki i witamin to nie obserwowano zmian w chemizmie wody. Powyższe wyniki mogą rekomendować stosowanie wyciągów z jeżówki i witam w ekologicznych preparatach immunostymulujących dla ryb nawet w bardzo wysokich stężeniach do 10000 mg/dm^3 . Niemniej jednak dalsze prace badawcze w uwagi na uwarunkowania ekonomiczne i wykazywaną skuteczność działania już przy 1000 mg/dm^3 powinny być prowadzone ze szczególnym uwzględnieniem stężeń z przedziału $1000\text{-}10000 \text{ mg/dm}^3$.

Przykład 4. Działanie immunostymulujące kompozycji według wynalazku.

Ryby w środowisku naturalnym są w sposób stały narażone na działanie niekorzystnych czynników środowiskowych, do których zalicza się między innymi wykraczające poza zakres optymalny dla danego gatunku warunki termiczne wody, natlenienie, zasolenie i odczyn. W przyrodzie zmiany parametrów wody poddane są naturalnym dobowym i sezonowym zmianom. Wahania te mają zazwyczaj charakter stopniowy. Z inną sytuacją mamy do czynienia, gdy na skutek działania hodowcy następują nagle, powodujące szok zmiany składu chemicznego wody oraz jej temperatury. Zdarzenia te występują najczęściej w czasie transportu, kwarantanny, lub są wynikiem prowadzonej terapii. W ostatnim czasie, wobec ograniczonej liczby dostępnych na rynku środków leczniczych akwaryści i rybacy coraz częściej sięgają po sól kuchenną, jako substancje wykazującą szerokie działanie biobójcze w tym antypasożytnicze. Wrażliwość ryb na działanie rozpuszczonego w wodzie chlorku sodu jest cechą swoistą dla każdego gatunku. Powszechnie omawianym przypadkiem jest danio przęgowany – popularna ryba laboratoryjna i akwariowa wykazująca wysoką wrażliwość na substancje chemiczne a szczególnie sól kuchenną stanowiącą jednocześnie bardzo skuteczny

środek leczniczy. Mając powyższe na uwadze do określenia efektywności działania preparatu immunostymulującego, podnoszącego odporność na niekorzystne czynniki środowiskowe wykonywano testy na wysalanie z wykorzystaniem chlorku sodu. W ramach przeprowadzonych badań wykonano trzy testy szoku osmotycznego z zastosowaniem NaCl, jako czynnika stresogennego, dającego rozciągnięty w czasie efekt letalny. Do doświadczeń użyto narybku w wieku około 90 dni o średniej masie 0,2 g.

Pierwszym celem badań było wykazanie występowania pomiędzy grupami doświadczalnymi istotnych, rozłożonych w czasie różnic w przeżywalności ryb poddanych działaniu czynnika letalnego. Drugim celem było określenie tempa wzrostu odporności ryb w czasie.

Czterdziestopięciodniowe badania przeprowadzono w okresie od czerwca do połowy lipca 2014. W tym czasie, co siedem dni do wody podawano ekstrakt z jeżówki i witaminy B₁ i C. Każdorazowo przed aplikacją wyciągu i witamin podmieniano w zbiornikach 50% wody. Przed podaniem ekstraktu i po jego podaniu analizowano skład chemiczny wody pod kątem właściwości antyoksydacyjnych i obecności związków fenolowych. W celu sprawdzenia działania ekstraktów i witamin na ryby wykonywano testy szoku osmotycznego. Testy te przeprowadzono trzykrotnie w odstępach dwutygodniowych.

Każda z grup doświadczalnych liczyła po 10 osobników. Badania przeprowadzono na ośmiu grupach danio pręgowanego. Pierwsza grupa (kontrolna) nie otrzymywała ekstraktu i witamin, drugiej grupie (B+C) podawano tylko witaminy B₁ w stężeniu 2 mg/l i C w stężeniu 2 mg/l. Kolejne cztery grupy doświadczalne otrzymywały ekstrakt z jeżówki w ilości 10, 100, 1000 i 10000 mg/l. W pozostałych dwóch grupach podawano ekstrakt z jeżówki w ilości 1000 i 10000 mg/l w oraz witaminy B₁ w stężeniu 2 mg/l i C w stężeniu 2 mg/l, Wyniki testów dla poszczególnych grup przedstawiono w wartościach procentowych.

Na figurach 3 - 15 przedstawiono wyniki trzech testów szoku osmotycznego na danio pręgowanym. W każdym z testów wybrano trzy punkty czasowe, które najlepiej obrazują wpływ jeżówki i witamin na odporność ryb na czynnik środowiskowy. Statystycznie istotne różniące w procentowej przeżywalności ryb w pomiędzy grupami zaznaczono w tabelach kolorem żółtym i czerwonym.

W pierwszym teście (fig. 3) wykonanym na czteromiesięcznym narybku istotne różnice wystąpiły w 24, 27 i 30 minutach. Po 24 minucie przeżywalność całej grupy obserwowano tylko dla 1000 mg/l, 10000 mg/l, 1000 mg/l B+C i 10000 mg/l B+C, podczas gdy w grupach kontrolnej i 10 mg/l śmiertelność wynosiła 30%, a w grupie, gdzie podano tylko witaminy stwierdzono śnięcie całej obsady (fig. 4). W 27 minucie (fig. 5) i 30 minucie (fig. 6) istotne

różnice wystąpiły pomiędzy grupami: kontrolną, 10 mg/l i B+C, a grupami 1000 mg/l, 1000 mg/l B+C i 10000 mg/l B+C.

W drugim teście (fig. 7) statystycznie istotne różnice obserwowano w 54 minucie (fig. 8) pomiędzy grupami 10 mg/l, 100 mg/l i B+C, a grupami 1000 mg/l B+C i 10000 mg/l B+C, 57 minucie (fig. 9) pomiędzy grupami kontrolną, 10 mg/l, 100 mg/l i B+C, a grupami 1000 mg/l B+C oraz 60 minucie (fig. 10) pomiędzy grupami kontrolną, 10 mg/l, 100 mg/l i B+C a grupami 10000 mg/l B+C.

W trzecim teście (Fig. 11) statystycznie istotne różnice obserwowano w 48 minucie (fig. 12) pomiędzy grupami kontrolną, 10000 mg/l B+C, a grupami 1000 mg/l, 1000 mg/l B+C i 10000 mg/l B+C, natomiast w 51 minucie (fig. 13) oraz 54 minucie (fig. 14) pomiędzy grupami kontrolną, 10 mg/l, 100 mg/l, 10000 mg/l B+C i B+C, a grupami 1000 mg/l, 1000 mg/l B+C i 10000 mg/l B+C.

Wykonane badania prowadzą do następujących wniosków:

- I. W grupach, gdzie zastosowano dodatek ekstraktu na poziomie 10000 mg/l uzyskano o około 30% wyższą śmiertelność ryb w trakcie trwania całego 45 dniowego badania.
- II. W każdym z trzech testów były trzy punkty czasowe (9 minut), w których obserwowano wysoce istotne różnice w przeżywalności ryb pomiędzy wieloma grupami.
- III. W testach na wysalanie stwierdzono wyższą przeżywalność ryb w grupach, gdzie stosowano dodatek ekstraktu z jeżówki na poziomie 1000 i 10000 mg/l.
- IV. Tylko w grupach 1000 mg/l i 10000 mg/l, gdzie podawano witaminy jednocześnie z ekstraktami dodatek witamin wykazywał dodatni wpływ na przeżywalność ryb - sam dodatek witamin nie dawał takiego efektu.
- V. Przy zastosowaniu dodatku jeżówki w stężeniu 10000 mg/l (grupa 10000 mg/l B+C) ryby uzyskiwały wyższą odporność już po dwóch aplikacjach ekstraktu – test nr 1.
- VI. Po czterokrotnym i sześciokrotnym podaniu ekstraktu lepsze wyki uzyskano w stężeniu 1000 mg/l (grupa 1000mg/l B+C).
- VII. Do dalszych prac nad preparatem powinny być wybrane stężenia jeżówki z przedziału 1000 – 10000 mg/l.