



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **30040** (13) **U**
(51) **МПК (2006)**
A61K 35/66
A01K 61/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОФІЛАКТИКИ ЗАХВОРЮВАНЬ У ПРОМИСЛОВИХ ПРІСНОВОДНИХ РИБ

1

(21) u200710730

(22) 28.09.2007

(24) 11.02.2008

(72) ЗАЙКА ЛЕОНІД АНДРІЙОВИЧ, UA,
ПОТОПАЛЬСЬКИЙ АНАТОЛІЙ ІВАНОВИЧ, UA,
СИЧ ГАННА ОЛЕКСАНДРІВНА, UA, МАТВІЄНКО
НАТАЛІЯ МИКОЛАЇВНА, UA, БУЧАЦЬКИЙ ЛЕОНІД
ПЕТРОВИЧ, UA

(73) ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І
ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ, UA, ІНСТИТУТ РИБНОГО
ГОСПОДАРСТВА УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ
АГРАРНИХ НАУК, UA

2

(56)

(57) Спосіб профілактики захворювань у промислових прісноводних риб, що включає операції згодовування ридам корму, що містить імуномодуючий препарат, який **відрізняється** тим, що як імуномодуючий препарат застосовують препарат "Ізатізон" і згодовують його ридам разом із кормом за схемою 0,3-0,5 мілілітра розчину препарату на 1 кілограм маси риби протягом 25-31 дня з інтервалом в 20-24 години при температурі не нижче 14 °С.

Корисна модель відноситься до галузі рибного господарства і може бути використана для лікування та профілактики захворювань риб.

Серед факторів, що стримують розвиток рибного господарства, не останнє місце посідають хвороби риб, які призводять до зниження рибопродуктивності, значних економічних збитків, погіршення якості рибної продукції. Підвищені щільності посадки, відсутність достатньої кількості доброякісних кормів, а в деяких випадках ускладнення екологічної ситуації погіршує фізіологічний стан вирощуваних риб, негативно впливає на їх імунну систему, сприяє виникненню захворювань інфекційної, інвазійної, аліментарної і поліетіологічної природи. Одним з перспективних напрямків охорони здоров'я промислових риб є застосування ефективних імуномодуючих препаратів з профілактичною метою, а у разі виникнення захворювання - для лікування [9]. Імуномодуючі препарати мають широкий спектр дії проти патогенів різного походження, який здійснюють шляхом активації різних ланок системи неспецифічної резистентності. Імуномодуючі препарати - це сполуки природного або синтетичного походження: пептиди, полісахариди і моносахара, деякі вітаміни, різні екстракти морських організмів та ін. Найбільш зручним засобом їх застосування є згодовування.

Найбільш близьким до пропонованого за кількістю суттєвих ознак є спосіб профілактики захворювань у промислових прісноводних риб, який включає операції згодовування ридам корму, який містить імуномодуючий препарат [8]. У відповідності до згаданого способу у якості імуномодуючих препаратів застосовують глюкани, селериум, хитазан і вітамін С, який згодовують ридам у великих дозах.

Недолік описаного способу полягає у його недостатній ефективності, оскільки застосування згаданого способу, практично не сприяло, зокрема, підвищенню вмісту гемоглобіну та загального білку в крові риб, яким згодовували глюкани, селериум, хитазан і вітамін С.

У основу пропонованого способу поставлена задача створення такого способу профілактики захворювань у промислових прісноводних риб, який би дозволив підвищити його ефективність, зокрема дозволив би підвищити вміст гемоглобіну та загального білку в крові риб.

Пропонований спосіб профілактики захворювань у промислових прісноводних риб включає операції згодовування ридам корму, що містить імуномодуючий препарат, згідно корисної моделі, у якості імуномодуючого препарату застосовують препарат „Ізатізон" і згодовують ридам корм із згаданим препаратом за схемою 0,3-0,5 мілілітра розчину препарату на 1 кілограм маси риби протягом 25-31 дня з

(13) **U**(11) **30040**(19) **UA**

інтервалом в 20-24 години при температурі не нижче 14°C.

Авторами експериментально було виявлено оптимальний за ціною та ефективністю імуномодуючий препарат, а також схему його застосування. Таким препаратом виявився „Ізатизон“. „Ізатизон“ - це комплексний, протівірусний, антибактеріальний, антигрибковий і імуномодуючий препарат, який має широкий спектр дії, забезпечуючи високий лікувально-профілактичний, протизапальний і антигістамінний ефекти, підвищує резистентність організму тварин. При застосуванні препарат легко проникає через біологічні бар'єри, блокує репродукцію вірусів, пригнічує розмноження патогенних мікроорганізмів. Застосовується для лікування вірусних, бактеріальних і грибкових захворювань сільськогосподарських тварин, хуртових звірів і бджіл. Препарат „Ізатизон“ виготовляють у вигляді водних розчинів [16].

Результат від згодовування риbam „Ізатизону“ у дозах менших ніж 0,3 мілілітра розчину препарату на 1 кілограм маси риби менше ніж 25 днів, практично, не дав позитивного результату. Збільшення ж доз до 0,6 і вище мілілітрів розчину препарату на 1 кілограм маси риби і його вживання більше 32 днів економічно не обгрунтоване. Суть корисної моделі пояснюється графічними матеріалами:

На Фіг.1 графічно показано вплив препарату „Ізатизон“ на масу риби.

На Фіг.2. графічно показано вплив препарату „Ізатизон“ на гемоглобін та загальний білок крові риби.

Назви таблиць:

1. Лейкоцитарна формула контрольних та дослідних риб під впливом препарату „Ізатизону“, %, $M \pm m$

2. Вплив препарату „Ізатизон“ на бактеріостатичну активність сироватки крові і фагоцитарну активність нейтрофілів.

3. Проліферативна активність лімфоцитів риб під дією препарату „Ізатизон“ (за індексом стимуляції та відсотковою різницею РБТЛ).

Приклад. Дослідження проводили на однілітках і дволітках корокових риб. Використовували кілька окремих груп риб. Для кожної групи задавали свою схему згодовування „Ізатизону“, а саме, для 1-ї групи з розрахунку 0,2мл/кг маси риби, для 2-ї - 0,3мл/кг маси риби, для 3-ї - 0,4мл/кг маси риби, для 4-ї - 0,5мл/кг маси риби, для 6-ї - 0,6мл/кг маси риби, для 7-ї - 0,7мл/кг маси риби. Одна - 8-а група риб була контрольною - не отримувала препарат „Ізатизон“.

Препарат „Ізатизон“ риби отримували разом з комбікормом протягом 30 днів з інтервалом в 1 добу при температурі води 16-20°C.

Проведені дослідження риб дозволили отримати дані про характер і направлення змін у організмі однірічок корокових риб під впливом імуномодуючого препарату „Ізатизон“, і встановити межі коливань та характер сезонної мінливості досліджуваних показників. З матеріалів дослідів випливає, що дослідні риби, які приймали вищезгаданий препарат за схемою 0,3-0,5мл/кг маси риби протягом місяця з інтервалом в 1 добу

відрізнялись від контрольних більшою вагою, підвищеним вмістом гемоглобіну, загального білку, лейкоцитарною формулою, БАСК, фагоцитарною активністю нейтрофілів, проліферативною активністю лімфоцитів від контрольних риб (див рис. 1, 2, табл. № 1,2, 3).

Аналіз даних продемонстрував, що по завершенні експерименту маса дослідних риб була на 13% більша за контрольні, а вміст гемоглобіну і загального білку у крові дослідних риб були вищими, приблизно, на 26% ніж у контрольних (Фіг.1).

Характерною рисою білої крові риб є те, що вона представлена переважно лімфоцитами. Лімфоцити риб, як і у представників інших класів відіграють головну роль в роботі імунної системи. Важливе значення в реалізації імунологічних функцій виконують і інші типи чи популяції лейкоцитів: гранулоцити та моноцити. Вони приймають участь у фагоцитозі мікроорганізмів, синтезі цитокінів, медіаторів імунної відповіді, неспецифічних факторів імунітету: лізоциму, інтерферону, гемолізину, хитинази та ін. [2]. Низькій відсоток лейкоцитів в обох групах на початку червня, був, вочевидь, наслідком перехідних процесів. Аналіз лейкоцитарної формули засвідчив, що кількісні співвідношення клітин у всіх групах знаходились в межах норми [6]. Під час та по закінченні експерименту вміст лімфоцитів у дослідній групі в середньому був більшим на 10% ніж у контрольній, що пояснюється стимулюючим впливом „Ізатизону“ на вроджену резистентність корокових риб (табл. 1).

Результати досліджень БАСК показали, що ця ознака, яка відображає реакцію риб на мінливі умови середовища, зараженість їх паразитами, життєстійкість риб, ступінь стійкості їх до інфекційних хвороб [10], в середньому на 31% була вищою у риб, які приймали „Ізатизон“ (табл. 2).

Використання тетразолію нітросинього (НСТ) для аналізу фагоцитарних властивостей нейтрофілів риб запропонував А.Сивіцький зі співавторами у 1986 році. Принцип тесту відновлення НСТ (НСТ-тест) полягає в тому, що при активації фагоцитуючих клітин радикали ксину, що містяться у нейтрофілах, відновлюють розчинний тетразолій нітросиній до диформазану, якій розподіляється в цитоплазмі. Цей тест відображає ступінь активації кисневозалежних механізмів бактерицидної активності фагоцитуючих клітин. Тест можливо виконати двома методами: цитохімічним та спектрофотометричним [7]. Перевага цитохімічного методу, застосованого нами, полягає в тому, що він нескладний та дозволяє у польових умовах дослідити велику кількість риб [22].

Стимулюючу дію „Ізатизону“ на фагоцитарну активність нейтрофілів: вона була на 60% вищою у дослідних риб порівняно з контролем. Дані НСТ-тесту свідчать про стабільний позитивний ефект навіть після закінчення застосування „Ізатизону“ (табл. 2).

Реакція бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) характеризує здатність Т-лімфоцитів і

допоміжних клітин до кооперації та активації, до продукції цитокінів допоміжними клітинами з подальшою експресією рецепторів на Т-лімфоцитах, і синтезом ними цитокінів, до трансформації Т-лімфоцитів у бласти. Ця реакція являє собою послідовність подій, протягом яких малі лімфоїдні клітини Т-ряду, що перебувають у стані спокою, у відповідь на регуляторний сигнал зазнають морфологічних та метаболічних змін, наслідком яких є клітинна проліферація та диференціювання, синтез ДНК та ділення. Згадані імунологічні події лежать в основі початкової фази будь-якої імунологічної відповіді, тому реакція РБТЛ розглядається як інтегральний тест на імунологічну реактивність [22].

Для оцінки результатів РБТЛ використовували здатність живих клітин відновлювати розчинну жовту тетразолієву сіль (МТТ) до нерозчинного темно-синього формазану, інтенсивність цього процесу є показником загального рівня метаболізму клітин. Аналіз результатів РБТЛ (табл. 3) доводить, що „Ізатизон” здатен індукувати диференціювання зрілих Т-лімфоцитів риби на різних етапах дозрівання, оскільки він індукує відповідь Т-лімфоцитів на неспецифічні мітогени, а саме ФГА та КОН-А. Стимуляція клітин у культурі залежала від концентрації мітогенів, які було підібрано експериментально. Ліпополісахарид (ЛПС) стимулював проліферацію В-лімфоцитів, фітогеммаглютинин (ФГА) та конканавалін-А (Кон-А) індукували *in vitro* різні групи Т-лімфоцитів: Кон-А впливав на Т-лімфоцити різних ступенів дозрівання, а ФГА стимулював проліферацію диференційовано - визначених Т - клітин. Крім того, „Ізатизон” збільшує функціональну активність зрілих лімфоцитів риби.

Застосування препарату „Ізатизон” при додаванні у комбікорм впродовж місяця з інтервалом в 1 добу у кількості 0,3-0,5мл/кг ваги підвищує вміст гемоглобіну та загального білку в крові одnorічок корошових риби, сприяє більш швидкому росту та накопиченню маси риби.

Під впливом імуномодуючого препарату „Ізатизон” стабілізується картина білої крові риби, внаслідок чого збільшується кількість зрілих форм лейкоцитів.

Препарат „Ізатизон” стимулює функціональну активність Т- та В-лімфоцитів, підвищує фагоцитарну активність нейтрофілів та бактеріостатичну активність сироватки крові одnorічок корошових риби.

Імуномодуючий препарат „Ізатизон” може бути рекомендований для підвищення імунного статусу одnorічок корошових риби.

Імуномодуючий препарат „Ізатизон” може бути рекомендований для підвищення продуктивності корошових риби.

Література

1. Алекин О.А., Семенов А.Д., Скопинцев Б.А. Руководство по химическому анализу вод суши. - Л.: Гидрометиздат, 1973. - 267 с.
2. Балахнин И.А., Козиненко И.И. Интенсивность ответа на митоген неполовозрелых карпов в зависимости от возраста, длины, массы тела и наличия патогена // Докл. НАН Украины. - 1996. - №12. - 0.163-165.

3. Божик В.Й., Пірус Р.І., Шемчук В.Р., Струбіцький І.В. Про деякі властивості біологічного препарату ДОН-ІР // Науковий вісник. Том 2, частина 4. Львів: Львівська державна академія ветеринарної медицини ім. Гжицького С.З., 2000.

4. Головіна Н.А., Стрелков Ю.А., Воронин В.Н., Головин П.П., Евдокимова Е.Б., Юхименко Л.Н. Под ред. Головиной Н.А., Бауера О.Н. Ихиопатология. - Москва: Мир, 2007. - 448с.

5. Дегтярьов П.А., Шерман І.М., Пилипенко Ю.В., Яржомбек О.О., Вовченко С.Г. Фізіологія риби. Практикум // Київ: Вища школа, 2001. - С 24-44. 4.

6. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб.// Москва. Лёгкая и пищевая промышленность// Москва: Лёгкая и пищевая промышленность, 1982. - 184 с.

7. Івченко В.А., Сидорчук П.І., Павленко М.С., Горбатюк О.І. Дика О.В. Імунологічні методи досліджень у лабораторіях ветеринарної медицини // Біла Церква: Білоцерків.держ. аграр.ун-т, 1997. - 79с.

8. Казарникова А.В., Шестаковская Е.В. Методы поддержания здоровья осетровых рыб при заводском получении и товарном выращивании в современных условиях // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Москва: Институт биологии внутренних вод РАН, 2004г., - С.486 - 494.

9. Канаєв О. Ветеринарна санітарія в рибистві. 2 вид., перепр. І доп. - М.: Агропромиздат, 1985.-280 ст.

10. Компанець Е.В., Мікрометод визначення БАСК у риби та його використання в імунологічних дослідях // Рибе господарство: Київ. - 1991. - №45. - С.71 - 73.

11. Микряков В.Р, Попов А.В., Половкова С.Н. Структурно - функциональные изменения в иммунной системе рыб озера Неро в связи с загрязнением воды пестицидами// Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Москва: Институт биологии внутренних вод РАН, 2004г., - С. 1326 - 142.

12. Мусселиус В.О., Ванятинський В.Ф., Лихмар А.А. та інші. Лабораторний практикум по хворобах риби// Москва "Легка та харчова промисловість", 1983. - 296с.

13. Пастер Е.У., Овод В.К., Позур В.К., Вихоть Н.Е. Иммунология (практикум). - Київ: Вища школа, 1989. - 304с.

14. Плохинский Н.А. Биометрия // Новосибирск: Изд-во СОАН СССР, 1961г. - 364с.

15. Потопальский А.И., Лозюк Л.В. Противовирусный и противоопухолевый препарат изатизон. Киев.- Наук. думка - 1995.-104.

16. Потопальський А.І., Лозюк Л.В., Миролубова А.Н., Бесарабов Б.Ф. „Противовирусный, противопухольевый и антилейкозный препарат изатизон”. Киев.: Наук.Думка. - 1991. -192 с.

17. Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. -М.: Пищ. Пром-ть, 1966. - 376 с.

18. Супрун С.М., Донченко Г.В., Пархоменко Ю.М., Кучмеровская Т.М., Исаева Н.М. Новый витаминно-коферментный микопрепарат: результаты испытаний и перспективы применения

в рыбоводстве. // Рыбное хозяйство: Київ. - 2004. - №63. - С.217 - 220.

19. Трифонова Е.С., Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н., Болотов В.Д. Эффективность применения пробиотических препаратов «Зоонорм» и «Бифидум-СХЖ» на Можайском ПЭРЗ // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Москва: Институт биологии внутренних вод РАН, 2004г., -Л С.528 - 533.

20. Филиппова О.П., Бычкова Л.И., Трифонова Е.С., МякихФ.Ф. Опыт использования пробиотического препарата - бифилактрина на ранней стадии выращивания бестера // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Москва: Институт биологии внутренних вод РАН, 2004г., - С.534 - 538.

21. Ярилин А.А. Межклеточная кооперация при иммунном ответе. Выбор клеткой формы ответа. // Иммунол. - 1999. - №1. - С.17-25.

22. Loury O.H., Rosebrounghjb H.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. // J. Biol. Chem. -1951. - 191, N 1. - P.265-275.

23. Siwicki A.K., Anderson D.P., Antychowicz - Nonspecific defence mechanisms assay in fish I Phagocytic ability of neutrophils NBT test and myeloperoxidase activity test// International workshop and training course in Poland. August 23 - September 3, 1993.

Лейкоцитарна формула контрольних та дослідних риб п

Форма лейкоцитів	Початок червня		Кінець червня		Лип
	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
Нейтрофілі	4,6±	4,2±	2,2±	3,2±	1,4±
міелоцити	0,50	0,48	0,37	0,37	0,24
Нейтрофілі метаміелоцити	4,8±	5,0±	2,2±	2,8±	1,6±
	0,58	0,31	0,37	0,37	0,26
Паличко-ядерні нейтроф.	5,8±	7,0±	1,8±	2,0±	1,2±
	0,86	0,54	0,37	0,31	0,20
Сегменто-ядерні нейтроф.	6,8±	7,2±	2,2±	4,0±	1,8±
	0,86	0,37	0,37	0,31	0,37
Еозинофіли та псевдоеоз	5,6±	5,6±	2,0±	3,8±	0,6±
	1,07	0,92	0,70	0,37	0,4
Моноцити	3,8±	3,4±	1,2±	2,6±	0,4±
	0,58	0,50	0,37	0,50	0,24
Базофіли та псевдобазофіли	3,6±	3,2±	1,0±	2,8±	0,6±
	1,16	1,15	0,44	0,58	0,4
Лімфоцити	65,0±	64,4±	87,4±	78,8±	92,4±
	2,7	2,83	1,5	1,06	0,87

Примітка: М ± m - середня арифметична ± середня арифме

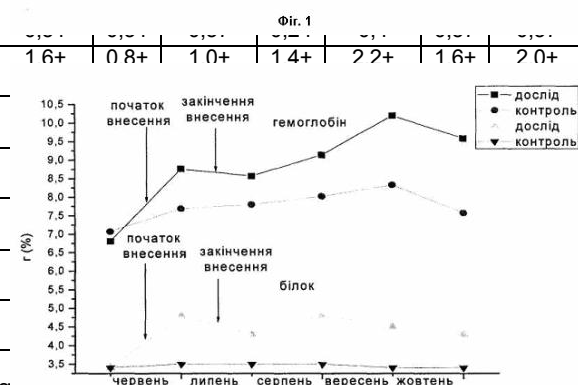
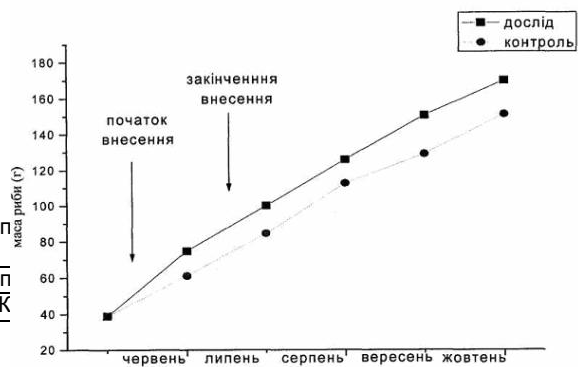
Вересень	57%	44%	
Жовтень	43%	35%	

*Примітка - p<0,05

Проліферативна активність лімфоцитів риб під дією препарату „Ізатизон” (n=10) (відсотковою різницею РБТЛ) (n=

Місяці	КОН-А 10мкг/мл			ЛПС 10мкг/мл		
	К	Д	%	К	Д	
Червень	1,42	2,03	142,9	1,68	2,94	
Липень	1,42	2,5	176	1,66	2,95	
Серпень	1,41	1,59	112,7	1,66	2,09	
Вересень	1,39	1,69	121,5	1,68	2,74	
Жовтень	1,37	1,67	121,8	1,67	2,45	

Примітка: p<0,05; К - контроль; Д - дослід;



Фіг. 2

Таблица 2

Вплив препарату „Ізатизон” на бактеріостатичну активність сироватки крові і фагоцитарну активність нейтрофілів (n=10)

Місяці	БАСК %		НСТ-тест %, М±m.	
	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль
Початок червня	27%	26%	9,2±1,31*	9,2±0,86*
Кінець червня	42%	36%	99±0,44*	29,8±1,49*
Липень	55%	37%	99,6±0,24*	22,2±1,49*
Серпень	60%	42%	97,4±1,07*	26,6±1,20*