

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

32 409

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 8/92 (2006.01)
A61K 8/06 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35524**
(22) Přihlášeno: **25.10.2018**
(47) Zapsáno: **04.12.2018**

(73) Majitel:
Bentley Czech s.r.o., Praha 10, Malešice, CZ
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Brno, Medlánky, CZ
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha 6,
Vokovice, CZ
Agritec Plant Research s.r.o., Šumperk, CZ

(72) Původce:
Mgr. Jan Říha, Ph.D., Maletín, CZ
Mgr. Hana Nejeschlebová, Újezd, CZ
doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D., Brno,
Veveří, CZ
MVDr. Ivana Koláčková, Ph.D., Moravské
Knínice, CZ
doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D., Šumperk,
CZ
prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D., Vikýřovice, CZ
Ing. Marie Bjelková, Ph.D., Šumperk, CZ

(74) Zástupce:
NEOLEGAL - advokátní a patentová kancelář, Ing.
Jaroslav Novotný, Římská 2135/45, 120 00 Praha 2,
Vinohrady

(54) Název užitého vzoru:
**Emulze pro podporu léčby kožních
problémů hospodářských zvířat**

CZ 32409 U1

Emulze pro podporu léčby kožních problémů hospodářských zvířat

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká přípravku s využitím konopného oleje a lihového propolisového extraktu, který slouží k podpoře léčby kožních problémů hospodářských zvířat, jako jsou povrchové rány na kůži, keratóza pokožky struku či poškození kůže způsobené mechanickým namáháním při dojení.

10

Dosavadní stav techniky

Povrchové rány na kůži hospodářských zvířat bývají způsobeny pohybem zvířat v technologickém prostředí jejich chovu, resp. kontaktem kůže s hranami, ostrými předměty, případně třením kůže o různé povrchy. Povrchové rány na kůži se dle jejich závažnosti ošetřují dezinfekcí, v případě hlubší rány pak dezinfekcí (např. na bázi jodové tinktury) a následným chirurgickým zákrokem (sešití rány). Povrchová zranění kůže mohou být vstupem pro závažnou infekci a ovlivňovat negativně zdraví i produkční schopnosti zvířete. Mají také výrazný vliv na welfare zvířat. Méně závažná poranění pak v běžné praxi nebývají ošetřena vůbec, totéž platí pro proces hojení závažnějších poranění.

15

Ke keratóze pokožky struku dochází zpravidla kvůli mechanickému namáhání tkáně struku při dojení. Dlouhodobé namáhání pokožky vede k jejím fyziologickým změnám, kdy dochází ke ztvrdnutí povrchové vrstvy kůže kvůli zvýšenému růstu a zároveň odumírání buněk této vrstvy epitelu. Kůže se pak stává při dalším mechanickém namáhání méně pružnou a náchylnou především ke vzniku drobných prasklin, do kterých je umožněn přístup vodě a případným patogenům, což výrazně zvyšuje bolestivost tkáně a prodlužuje její hojení při pokračujícím namáhání. Výskyt keratóz může souviset se špatným nastavením technologie dojení, způsobem ošetření struku, je však také dán geneticky. Keratóza má také zpravidla za následek zvýšení počtu somatických buněk v mléce jako ukazatele jeho hygienické kvality. Překážkou úspěšné léčby keratózy pokožky struku bývá jeho intenzivní namáhání při dojení, možnost přístupu patogenů k otevřeným ranám v prostředí a také způsob ošetření struku po dojení – např. lihovou či jodovou dezinfekcí, jejichž použití může poraněnou tkáň ještě více poškodit formou chemických spálenin či vzniku mokvajících ran.

25

Při poškození kůže způsobené jejím mechanickým a tlakovým namáháním při dojení dochází ke vzniku různých zhmožděnin ve spodních vrstvách epitelu, které jednak negativně ovlivňují pohodu zvířete díky zvýšené bolestivosti, jednak způsobují při dlouhodobém působení fyziologické změny tkáně (vazivová ložiska, podlitiny, deformace tkáně atd.), které mohou vyústit v negativní dopad na produkci, případně přímo ohrožovat zdraví zvířete. Jakkoliv je na zdraví mléčné žlázy kladen při produkci mléka stále vyšší důraz, v současné době nejsou široce využívány přípravky podporující regeneraci tkáně mezi jednotlivými dojeními (zpravidla 2 až 3 denně). Je kladen důraz spíše na důkladnou dezinfekci tkáně struku po dojení, případně ošetření strukového kanálku před možným vstupem patogenů. Struk je mechanicky a tlakově nejnamáhanější částí kůže těla hospodářských zvířat určených k produkci mléka. Důkladná regenerace tkáně struku je v intenzivní produkci mléka zapotřebí především kvůli zabránění fyziologickým změnám tkáně struku, resp. zajištění dlouhého produkčního věku zvířete.

35

40

45

50

Podstata technického řešení

Uvedené nedostatky odstraňuje přípravek ve formě emulze k ošetření kožních problémů hospodářských zvířat, podle tohoto technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje

alespoň 15 % hmotn. konopného oleje a alespoň 15 % hmotn. 80% ethanolového extraktu z propolisu připraveného jako nasycený roztok při teplotě nižší než 50 °C.

5 Propolis je pryskyřičná látka produkovaná včelou medonosnou jako ochranný a stavební materiál úlu. Včely vyrábí propolis z pryskyřičných látek, které získávají z rozličných rostlinných zdrojů (listy, květy, pupeny) a mísí se svými exkrety a včelím voskem. Složení propolisu je velmi proměnlivé, neboť závisí na včelí pastvě, obecně je však propolis tvořen pryskyřičnými látkami, včelím voskem, esenciálními a aromatickými oleji, pylem a dalšími látkami (Ghisalberti a kol., 1979; Toreti a kol., 2013). Řada látek obsažených v propolisu se vyznačuje antibakteriálními, antivirovými, protizánětlivými, hojivými a některými dalšími pozitivními účinky (Ghisalberti, 10 1979). Za nejvýznamnější skupinu látek, která propůjčuje propolisu biologickou aktivitu, jsou považovány flavonoidy (Marcucci, 1995; Tlak Gajger a kol., 2017). Pro včelstvo představuje propolis látku, která udržuje v úlu prostředí prosté choroboplodných zárodků a chrání tak včely před infekcí, včetně původce moru včelího plodu (Borba a kol, 2013).

15 *In vitro* aktivita propolisu byla prokázána proti řadě bakteriálních kmenů (Keskin a kol. 2017; Ugur a kol., 2004), včetně MRSA (Raghukumar a kol., 2010). *In vivo* byl na zvířecím modelu zaznamenán pozitivní efekt kombinované aplikace propolisového extraktu a antibiotik při léčbě infekce MRSA (Onlen a kol., 2007).

20 Lihový extrakt z včelího propolisu připravený rozpuštěním propolisu v 80% ethanolu do úplného nasycení roztoku při teplotě nižší než 50 °C vykazuje antibakterální vlastnosti na řadu patogenů přítomných v prostředí zemědělské prvovýroby. Rozpuštění extraktu je možné urychlit použitím ultrazvukové lázně, která však naruší buněčné struktury inhibovaných bakterií přítomných v extraktu a může mít podle některých zdrojů za následek mírné snížení účinnosti získaného 25 extraktu prostřednictvím snížené reakce imunitního systému příjemce, resp. inhibovat mechanismus antibakteriálního účinku propolisu. Extrakt je možné filtrovat za pomoci aktivního uhlí a peristaltické pumpy, a to zejména k odstranění reziduí voskových částic přítomných v extraktu, případně sloučenin způsobujících jeho charakteristickou tmavou barvu.

30 V rámci projektu NAZV KUS QJ1510047 proběhlo stanovení antimikrobiálních účinků propolisových extraktů na vybrané zástupce bakteriálních mastitidních patogenů (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) metodou impedanční mikrobiologie a průtokovou cytometrií.

35 Metodika

Instrumentace a materiál

- Analyzátor RABIT2 (Don Whitley Scientific Inc.)
- 40 • Denzitometr DEN-1 (Biosan)
- impedanční zkumavky RABIT (Don Whitley Scientific Inc.)
- 45 • Kultivační média a chemikálie: mozkosrdcová infuse (Carl Roth GmbH & Co. Kg), živný bujón, krevní agar (LABMediaServis), ethanol (Penta)
- kmen *S. aureus*, *E. coli* (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i. Brno)
- 50 • ethanolový a vodný extrakt propolisu

55

Hodnocení antimikrobiálních účinků propolisových extraktů a přípravku s obsahem propolisu a medu metodou impedanční mikrobiologie

- 5 Růst bakterií v médiu je provázen změnami vodivosti, které jsou v pravidelných intervalech zaznamenávány měřícím systémem a slouží mj. k určení tzv. času detekce TTD (Time To Detection). Jedná se o bod, kdy byl poprvé zaznamenán exponenciální trend růstové křivky. Platí, že čím vyšší je počáteční hustota bakterií v inokulu, tím je čas detekce kratší, čehož lze využít k mikrobiologické analýze tekutých vzorků. Impedanční mikrobiologii lze také využít jako nástroj pro hodnocení antimikrobiálního účinku látek. Inhibiční efekt látky na čistou bakteriální kulturu se projeví prodloužením času detekce a odlišným průběhem růstové křivky.

Pracovní postup

- 15 Pro testování byla zvolena 10% a 15% koncentrace lihového extraktu propolisu a stejné koncentrace vodného extraktu propolisu. Byla použita koncentrace inokula bakteriálních kmenů 104 KTJ/ml. Jednotlivé komponenty byly napipetovány do impedančních zkumavek dle tabulky 1, 2 a 3 a vloženy do modulu přístroje RABIT.
- 20 Parametry měření byly zvoleny následující: doba trvání testu 24 hodin, inkubační teplota 37 °C, interval zaznamenávání změn vodivosti 5 minut.

Získané růstové křivky zobrazují vodivost média v miliSiemens (mS) a její změny v časovém intervalu 5 minut.

25

Tabulka 1. 10% koncentrace lihového a vodného extraktu propolisu

S. aureus

Kontrola růstu <i>S. aureus</i> :	4,5 ml bujon + 0,5 ml inokulum
Kontrola růstu <i>S. aureus</i> (extrakt nahrazen demineralizovanou vodou):	4,5 ml bujon + 0,5 ml inokulum + 0,5 ml V
Kontrola růstu <i>S. aureus</i> (extrakt nahrazen 50 % ethanolem):	4 ml bujon + 0,5 ml inokulum 0,5 ml L
Test vodného extraktu:	4 ml bujon + 0,5 ml inokulum 0,5 ml VV
Test lihového extraktu:	4ml bujon + 0,5 ml inokulum 0,5 ml LV

Escherichia coli

Kontrola růstu <i>E.coli</i>	4 ml bujon + 0,5 ml inokulum
Kontrola růstu <i>E.coli</i> (extrakt nahrazen demineralizovanou vodou):	4 ml bujon + 0,5 ml inokulum + 0,5 ml V
Kontrola růstu <i>E. coli</i> (extrakt nahrazen 50 % ethanolem):	4 ml bujon + 0,5 ml inokulum 0,5 ml L
Test vodného extraktu:	4 ml bujon + 0,5 ml inokulum 0,5 ml VV
Test lihového extraktu:	4 ml bujon + 0,5 ml inokulum 0,5 ml LV

Tabulka 2. 15% koncentrace lihového a vodného extraktu propolisu

30

S. aureus

Kontrola růstu <i>S. aureus</i> :	4,5 ml bujon + 0,5 ml inokulum
Kontrola růstu <i>S. aureus</i> (extrakt nahrazen demineralizovanou vodou):	3,75 ml bujon + 0,5 ml inokulum + 0,75 ml V
Kontrola růstu <i>S. aureus</i> (extrakt nahrazen 50 % ethanolem):	3,75 ml bujon + 0,5 ml inokulum 0,75 ml L
Test vodného extraktu:	3,75 ml bujon + 0,5 ml inokulum 0,75 ml VV
Test lihového extraktu:	3,75 ml bujon + 0,5 ml inokulum 0,75 ml LV

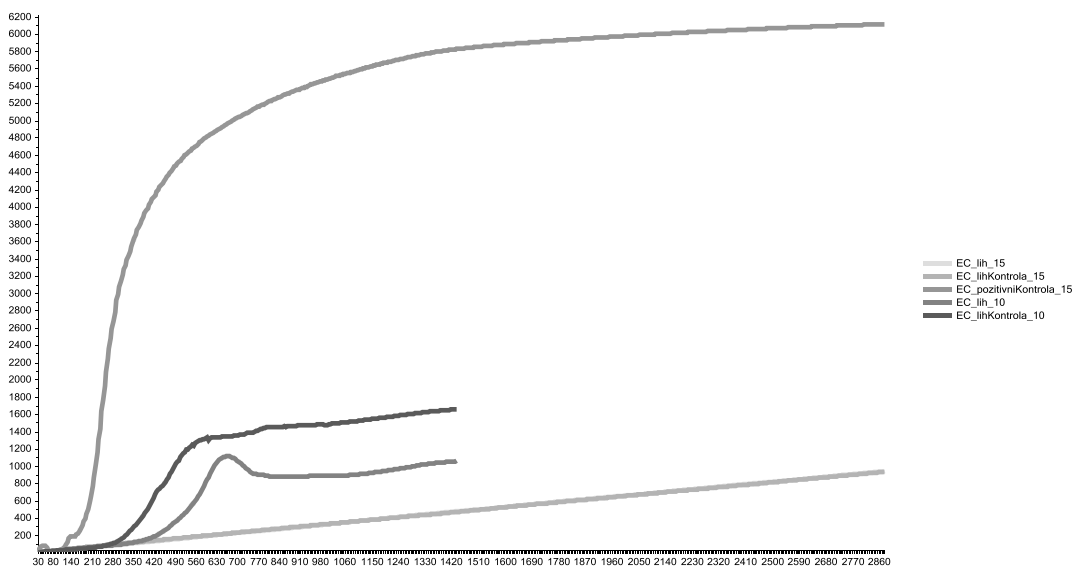
Escherichia coli

Kontrola růstu E.coli	4,5 ml bujon + 0,5 ml inokulum
Kontrola růstu E.coli (extrakt nahrazen demineralizovanou vodou):	3,75 ml bujon + 0,5 ml inokulum + 0,75 ml V
Kontrola růstu E. coli (extrakt nahrazen 50 % ethanolem):	3,75 ml bujon + 0,5 ml inokulum 0,75 ml L
Test vodného extraktu:	3,75 ml bujon + 0,5 ml inokulum 0,75 ml VV
Test líhového extraktu:	3,75 ml bujon + 0,5 ml inokulum 0,75 ml LV

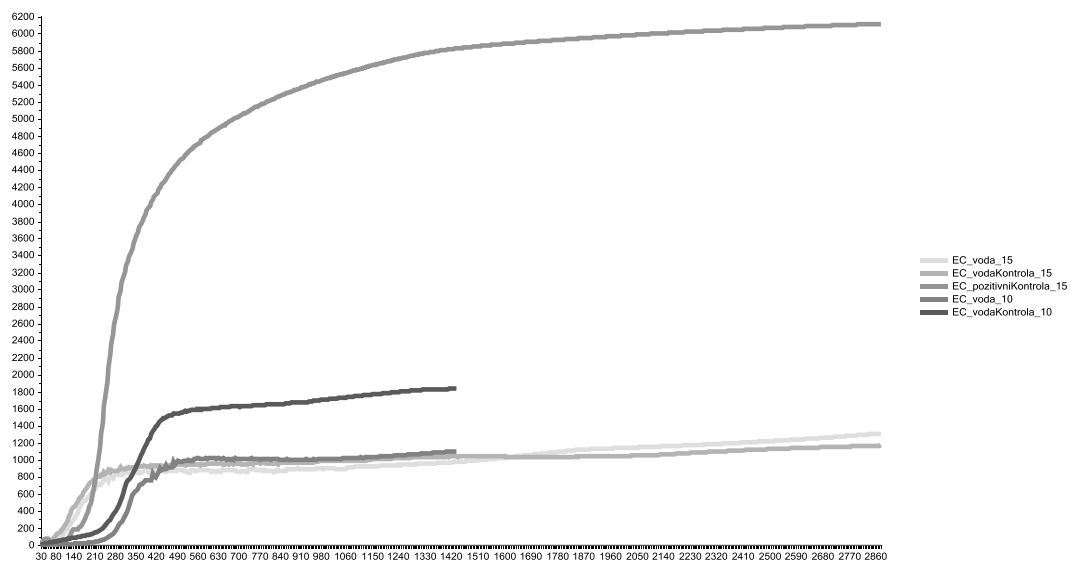
Vysvětlivky:

- L - 50% líh
 5 V - demineralizovaná voda
 LV – líhový extrakt propolisu
 VV- vodný extrakt propolisu
 bujon = mozkosrdcová infuze

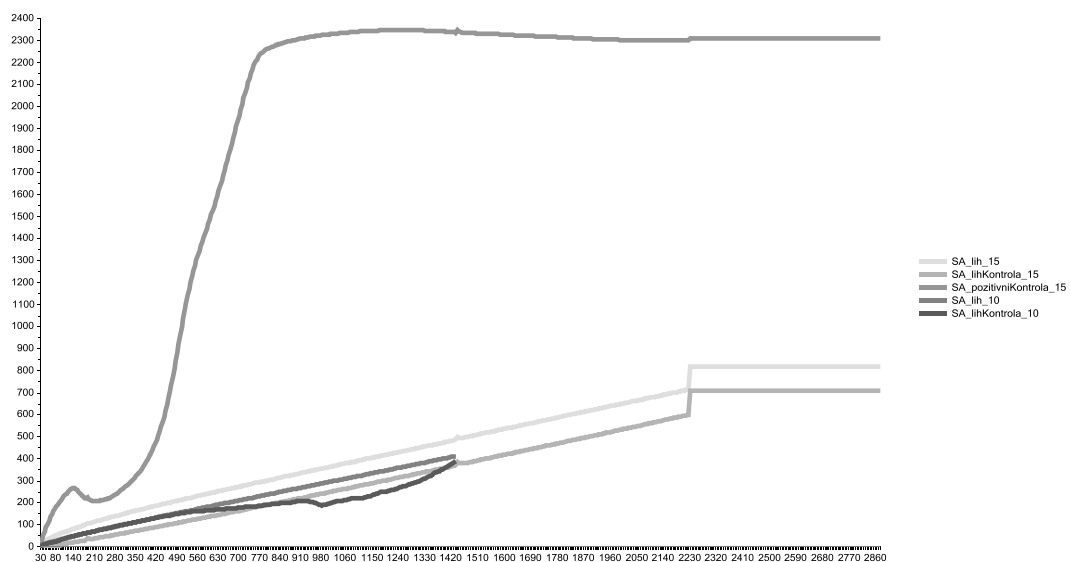
10 Výsledky



Graf1. Účinek líhových propolisových extraktů na *E. coli*.

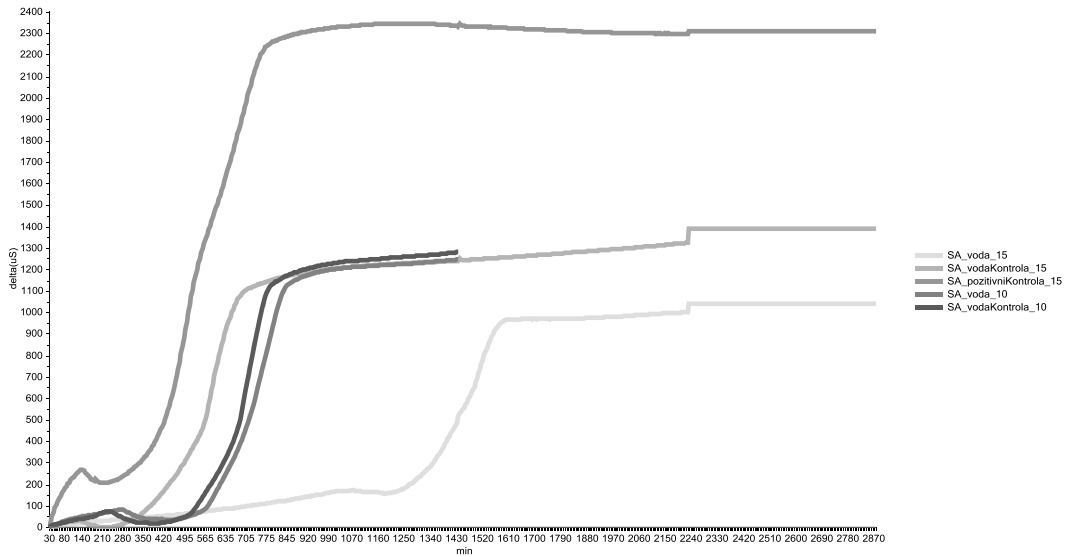


Graf 2. Účinek vodných propolisových extraktů na *E. coli*.



5

Graf 3. Účinek lihových propolisových extraktů na *S. aureus*.



Graf 4. Účinek vodných propolisových extraktů na *S. aureus*.

5 Testování účinnosti vodného extraktu propolisu na kmen *S. aureus* a *E. coli*

Z porovnání růstových křivek pozitivní kontroly *S. aureus* a růstových křivek *S. aureus* v prostředí 15% vodného extraktu propolisu (Graf 4.) vyplývá schopnost extraktu inhibovat v této koncentraci kontrolní kmen *S. aureus*. Čas detekce byl ve srovnání s pozitivní kontrolou prodloužen o 15 hodin a 5 minut. V případě 10% přídavku vodného extraktu propolisu byl čas detekce oproti pozitivní kontrole prodloužen pouze o 2 hodiny 20 minut. Účinek vodných propolisových extraktů na *E. coli* (Graf 2.) nelze považovat za průkazný – k růstové fázi dochází úměrně s naředěním zkoumané suspenze.

15 Testování účinnosti lihového extraktu propolisu na kmen *S. aureus* a *E. coli*

Lihový extrakt propolisu vykazoval v obou sledovaných koncentracích (10 a 15%) inhibiční účinky vůči testovaným kmenům *S. aureus* a *E. coli*, dosažená doba TTD je však srovnatelná s kontrolními vzorky, které obsahovaly místo propolisového extraktu poměrné koncentrace 50% ethanolu. Při tomto posouzení je tak inhibiční účinek propolisu překryt inhibičními účinky samotného ethanolu. Při posouzení růstových křivek obou typů vzorků (obsahujících ethanolové extrakty propolisu, v případě kontrolních vzorků pouze ethanol ve sledovaných koncentracích), je však inhibiční účinek propolisu dobře patrný, zejména z dynamiky růstu bakteriální populace ve vzorcích. To je patrné např. na Grafu 1. u 10 % koncentrace lihového extraktu propolisu při sledování inhibičního účinku na *E. coli* – u kontrolního vzorku dojde k růstové fázi bakteriální populace, u vzorku s obsahem propolisového extraktu je doba TTD posunuta o cca 2,5 hod a po pomalejší exponenciální růstové fázi dochází k inhibici bakteriální populace. U vzorků s 15 % obsahem extraktu či čistého ethanolu dochází k úplné inhibici, ovšem za stejného průběhu a efekt propolisového extraktu je tak již díky vysokému obsahu ethanolu neprůkazný.

Při hodnocení účinku lihových extraktů propolisu na kmen *S. aureus* (Graf 3.) je u 10 % koncentrace patrný podobný inhibiční efekt jako u 15 % koncentrace; u kontrolního vzorku je však patrný nástup růstové fáze ke konci testu. 15 % koncentrace lihového propolisového extraktu pak vykazuje o něco lepší inhibiční vlastnosti než kontrolní vzorek o stejné koncentraci ethanolu.

Přímé použití emulze s antibakteriálními účinky propolisového extraktu tak ránu desinfikuje. Díky konzistenci přípravku působí i jako prevence sekundární bakteriální infekce z prostředí.

Přídavek konopného oleje dává emulzi voděodolné vlastnosti, které zajišťují stabilní prostředí v okolí rány a na jejím povrchu a zabraňují možnému mokvání rány a vzniku infekce.

- 5 Zevní použití konopného oleje vykazuje dokumentované regenerační, antibakteriální a protizánětlivé účinky. Konopný olej se dobře vstřebává do horních vrstev pokožky, kde má výrazné regenerační a zklidňující účinky a podporuje tak proces hojení a regeneraci poškozené tkáně. Zajišťuje také prostup ostatních složek emulze povrchovou vrstvou kůže a jejich transport na místo poranění.

10

V prezentovaném technickém řešení je konopný olej použit v emulgované formě, která je stabilizována použitím vhodného emulgátoru a konzervována pomocí metyl- a propylparabenu.

- 15 Emulgátor DOW Corning RM 2051 je tvořen emulzí polyakrylátu v silikonovém oleji a umožňuje efektivní emulgaci při nízkém dávkování (1 až 5 %), a to až do formy gelu. Umožňuje emulgaci za studena, což je výhodné zejména kvůli zachování účinku propolisové tinktury.

- 20 Emulze se aplikuje na ránu či na zhmožděnou tkáň pokožky pomocí vhodného nástroje (např. nádobky na oplach struku) nebo rukou ve sterilní rukavici a nechá se působit do dalšího ošetření či do další nutné manipulace s dotčenou částí pokožky. Tomuto způsobu aplikace odpovídá také její konzistence.

- 25 Příklad uskutečnění technického řešení

Příkladem uskutečnění technického řešení je následující formulace přípravku:

Surovina	Obsah (%)	Funkce	Fáze	INCI
Voda	58.4	rozpouštědlo	1	Aqua
Metylparaben	0.2	konzervant	5	Metylparaben
Propylparaben	0.1	konzervant	6	Propylparaben
Konopný olej	20	aktivní látka	3	Cannabis Sativa (Hemp) seed oil
DOW Corning RM 2051	1.3	emulgátor	4	SodiumPolyacrylate(and)Dimethicone(and)Cyclopentasiloxane(and)Trideceth-6(and)PEG/PPG-18/18
Propolis extrakt	20	aktivní látka	2	Propolis Ethanol Extract (80 %)

- 30 kde fáze znamená pořadí přidání jednotlivých složek přípravku do směsi míchané při 1200 ot./min při teplotě 45 °C po dobu min 35 min od přidání poslední složky.

Průmyslová využitelnost

35

Přípravek ve formě emulze je možné přímo průmyslově využít k produkci veterinárního kosmetického přípravku k podpoře léčby kožních problémů hospodářských zvířat.

NÁROKY NA OCHRANU

5

1. Přípravek ve formě emulze k ošetření kožních problémů hospodářských zvířat, **vyznačující se tím**, že obsahuje alespoň 15 % hmotn. konopného oleje.

10

2. Přípravek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje alespoň 15 % hmotn. 80% ethanolového extraktu z propolisu ve formě nasyceného roztoku při teplotě nižší než 50 °C.