

Czy wirusobójcze ekstrakty roślinne są w stanie zapobiec infekcji karpia pospolitego (Cyprinus carpio L) wirusem CyHV-3 (Cyprinid herpesvirus 3)?

Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) to wirus infekujący karpia pospolitego oraz jego ozdobną odmianę – karpia koi. Wirus CyHV-3 zwany również wirusem KHV wywołuje chorobę KHVD prowadzącą do masowych śnięć karpia sięgających nawet do 100% populacji. Wirus ten pojawił się pod koniec lat 90-tych XX wieku i nadal stanowi przyczynę ogromnych strat w akwakulturze. Naukowcy od wielu lat starają się znaleźć rozwiązanie tego problemu. Prowadzone są liczne badania mające na celu wzmocnienie odporności karpia hodowlanych poprzez podanie im immunostymulantów, szczepienia a także dobór do rozrodu osobników cechujących się największą odpornością. Wszystkie zaproponowane jak dotąd rozwiązania nadal pozostają w fazie badań i żadne z nich nie stało się jeszcze powszechnie dostępne. Rozwiązania te powinny być bezpieczne, ekonomiczne i łatwe do zastosowania w akwakulturze.

Wyniki wstępnych badań pilotażowych wykazały, że ekstrakty etanolowe z dziurawca i z babki lancetowatej inaktywowały wirusa CyHV-3 w środowisku pozakomórkowym, czyli działały wirusobójczo. Dziurawiec oraz babka lancetowata, to rośliny od wieków powszechnie stosowane w medycynie ludowej ze względu na działanie prozdrowotne. Podawanie w paszy ekstraktów z tych roślin miało pozytywny wpływ na zdrowie łososia atlantyckiego i pstrąga tęczowego, zatem można się spodziewać, że ekstrakty te będą również bezpieczne dla karpia. W eksperymencie pilotażowym, w warunkach *in vitro*, etanolowe ekstrakty z dziurawca i z babki lancetowatej wykazywały bardzo silne działanie wirusobójcze, toteż w niniejszym projekcie zostanie zbadana ich aktywność w warunkach *in vivo*.

Skład **ekstraktów roślinnych (ER)** jest silnie uzależniony od metody i warunków ekstrakcji. Różnice w składzie ekstraktów, mogą skutkować tym, że będą charakteryzowały się odmiennymi właściwościami biologicznymi. Materiał roślinny zostanie poddany ekstrakcji w różnych warunkach metodą klasyczną przy użyciu etanolu a także metodą z dwutlenkiem węgla w warunkach nadkrytycznych (scCO₂). Metoda ekstrakcji scCO₂ jest wysoce wydajna i przyjazna dla środowiska, jednak nie wiadomo, czy ER otrzymane tą metodą również wykażą aktywność, którą zaobserwowano w badaniu pilotażowym, ponieważ w badaniu pilotażowym zastosowano ekstrakty etanolowe. Aktywność wirusobójcza wszystkich ER zostanie porównana w warunkach *in vitro*. Na podstawie otrzymanych wyników, zostanie wyłoniona metoda warunkująca uzyskanie ER charakteryzujących się najsilniejszymi właściwościami wirusobójczymi. Zbadany zostanie również skład wszystkich ER w celu wytypowania składników mogących odgrywać kluczową rolę w wirusobójczym działaniu ER. Aktywność tych składników zostanie potwierdzona w badaniach *in vitro*, zarówno pojedynczo jak i w kombinacjach, ze względu na możliwe synergistyczne działanie związków zawartych w ER. W rezultacie zostaną uzyskane informacje umożliwiające standaryzację wirusobójczych ER. Najskuteczniejsze ER zostaną zastosowane w eksperymentach *in vivo*.

Głównymi wrotami dla infekcji wirusem CyHV-3 jest skóra karpia, która jest pokryta warstwą śluzu. Śluz ten opóźnia moment kontaktu wirusa z komórkami naskórka ryby – zatem opóźnia moment infekcji. Wydaje się prawdopodobne, że wirus rozsiewany przez zainfekowane osobniki do środowiska może zostać inaktywowany przez ER, zanim wirus zdąży zainfekować rybę. Założenie to zostanie przetestowane w eksperymentach *in vivo*. Ekstrakty zostaną dodane od wody w której będą przetrzymywane niezakażone karpie. Następnie w tym samym zbiorniku zostaną umieszczone karpie zakażone wirusem CyHV-3. Planowane badania wyjaśnią czy ER zaaplikowane do wody w stężeniu bezpiecznym dla karpia, zapobiegą transmisji wirusa CyHV-3 z ryby zakażonej do niezakażonej. Aktywność ER w różnych stężeniach zostanie przetestowana celem określenia najniższego stężenia ER hamującego transmisję wirusa w populacji karpia. Pozwoli to określić maksymalną możliwą skalę zastosowania ER w profilaktyce przenoszenia wirusa z ryb zakażonych na niezakażone (duże stawy, czy mniejsze zbiorniki służące przetrzymywaniu karpia koi).

Badania przeprowadzone z udziałem łososia atlantyckiego i pstrąga tęczowego dowiodły, że ER z dziurawca oraz babki lancetowatej podawane wraz z paszą działały immunomodulująco na te ryby. Skóra i skrzela należą do powierzchni śluzowych ryb, podobnie jak jelita, toteż można się spodziewać, że ER dodane do wody, w której bytują karpie, mogą modulować ich odpowiedź immunologiczną. Ponadto kontakt powierzchni śluzowych (skóry, skrzeli, jelit) z antygenem danego patogenu może również modulować odpowiedź immunologiczną ryby skierowaną przeciwko temu patogenowi. W babce lancetowatej stwierdzono obecność saponin, substancji, które działały jak adiuwanty nasilając specyficzną odpowiedź immunologiczną u karpia. Biorąc pod uwagę te odkrycia, można podejrzewać, że wirus CyHV-3, który będzie uwalniany przez zakażone ryby, a następnie inaktywowany przez wirusobójcze ER, może działać jak szczepionka stosowana na błony śluzowe. W trakcie realizacji niniejszego projektu zostanie zbadana odpowiedź immunologiczna u karpia poddanych zakażeniu wirusem CyHV-3 w obecności ER w środowisku wodnym. Badania planowane w niniejszym projekcie dostarczą podstawowej wiedzy, która może okazać się użyteczna do opracowania metody zapobiegania rozsiewaniu się wirusa w populacji karpia, jak również nowej metody szczepienia karpia. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że obie te metody będą bezpieczne, wygodne w użyciu, przyjazne dla środowiska i jednocześnie ekonomiczne.