



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
Μελέτη της συγκέντρωσης πραζικουαντέλης στα βράγχια
της τσιπούρας μετά από διατροφική χορήγηση

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: Χρυσάνθη Νικολουδάκη

Βόλος, 2023

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Α. Γεώργιος Ρήγος, Διευθυντής Ερευνών, «Φαρμακοκινητική Ιχθύων - Διατροφική Παθολογία - Παθολογία Ιχθύων», Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛΚΕΘΕ (επιβλέπων).

Β. Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος Π.Θ. (μέλος).

Γ. Ελένη Γκολομάζου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Προστασία-Ευζωία Ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος Π.Θ. (μέλος).

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα, Δρ. Γεώργιο Ρήγο, Διευθυντή Ερευνών, του εργαστηρίου «Φαρμακοκινητικής Ιχθύων - Διατροφική Παθολογία - Παθολογία Ιχθύων», του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛΚΕΘΕ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την επιστημονική και συμβουλευτική καθοδήγηση ώστε να πραγματοποιηθεί και να ολοκληρωθεί η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές του πανεπιστήμιου Θεσσαλίας, του τμήματος Γεωπονίας ιχθυολογίας και υδάτινου Περιβάλλοντος, του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Μεσογειακή Υδατοκαλλιέργεια» για τις πολύτιμες γνώσεις που μας προσέφεραν. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την κυρία Ελένη Γκολομάζου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Προστασία-Ευζωία Ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος Π.Θ, για την πολύτιμη καθοδήγηση και υποστήριξη της.

Οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τους συναδέλφους μου για την πολύτιμη βοήθεια τους και συγκεκριμένα την Δρ. Δήμητρα Κογιάννου, χωρίς την συμβολή και βοήθεια της οποίας, δε θα ήταν δυνατή η διεξαγωγή της έρευνας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον σύζυγό και το παιδί μου για την ανεκτίμητη στήριξη και υπομονή τους.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
1. Εισαγωγή	5
2. Υλικά και μέθοδοι	14
2.1 Πειραματικοί Ιχθύες	14
2.2 Παρασκευή φαρμακούχων τροφών.....	15
2.3 Χορήγηση φαρμακούχας τροφής.....	15
2.4 Συλλογή δειγμάτων βράγχιων	16
2.5 Μέθοδος εκχύλισης για την παραλαβή της πραζικουαντέλης από τα βράγχια.....	16
3. Αποτελέσματα.....	17
4. Συζήτηση.....	19
5. Συμπεράσματα.....	22
Βιβλιογραφία.....	23

Περίληψη

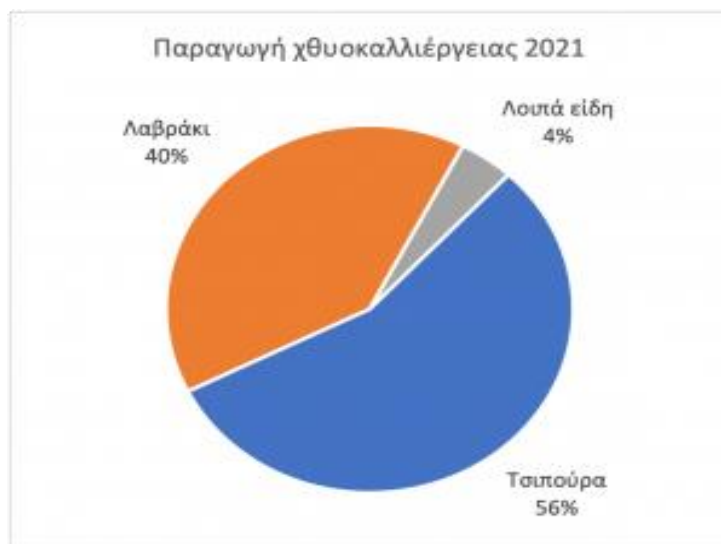
Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η φαρμακοκινητική μελέτη, της παραζικουαντέλης σε δείγματα βραγχίων έπειτα από διατροφική χορήγησή της, στην τσιπούρα εκτροφής (*Sparus aurata*.), μέσω επιλεγμένων χρωματογραφικών μεθόδων. Για τον σκοπό αυτό διακόσιοι πειραματικοί ιχθύες μέσου βάρους $52 \pm 3.7\text{g}$ μεταφέρθηκαν και χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, χαμηλής ($n=100$) και υψηλής δόσης ($n=100$). Παρασκευάστηκαν δύο σιτηρέσια διαφορετικής συγκέντρωσης παραζικουαντέλης, ένα χαμηλής (75mg/kg ιχθύος) και ένα υψηλής (150mg/kg ιχθύος) συγκέντρωσης, τα οποία χορηγήθηκαν εφάπαξ με ποσότητα τροφής ίση με 2% του σωματικού τους βάρους των πειραματικών ιχθύων. Δείγματα βραγχίων και από τις δυο δοκιμές ελήφθησαν ύστερα από 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 και 96 ώρες από τη χορήγηση της φαρμακούχας τροφής και αποθηκευτήκαν (σε -20°C) έως ότου αναλυθούν. Τα δείγματα βραγχίων αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία (HPLC-UV).

Η μέγιστη συγκέντρωση ($C_{\max}$) της παραζικουαντέλης, στα βράγχια για τα ψάρια που έλαβαν δόση ίση με 75 mg/kg και 150 mg/kg αντίστοιχα παρατηρήθηκε στις 4 ώρες από την χορήγηση (20.7 για τη χαμηλή και $39.1\text{ }\mu\text{g/g}$ για την υψηλή δόση). Σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της παραζικουαντέλης, στα βράγχια παρατηρήθηκε 72 ώρες μετά τη χορήγηση της χαμηλής δόση ($0.35\text{ }\mu\text{g/g}$) ενώ έπειτα από 96 ώρες, η συγκέντρωση του φαρμάκου ήταν ίση με $0.52\text{ }\mu\text{g/g}$, για την υψηλή δόση.

Συνεπώς, στην παρούσα εργασία βρέθηκε ότι η απορρόφηση της ουσίας στα βράγχια ήταν παραπάνω από επαρκής και στις δύο δοσολογίες που μελετήθηκαν με επικρατέστερη, όπως αναμενόταν, αυτή της υψηλής δόσης. Βασική προϋπόθεση για την αξιολόγηση του αποτελέσματος αποτελεί η επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας του θεραπευτικού σχήματος στο πεδίο.

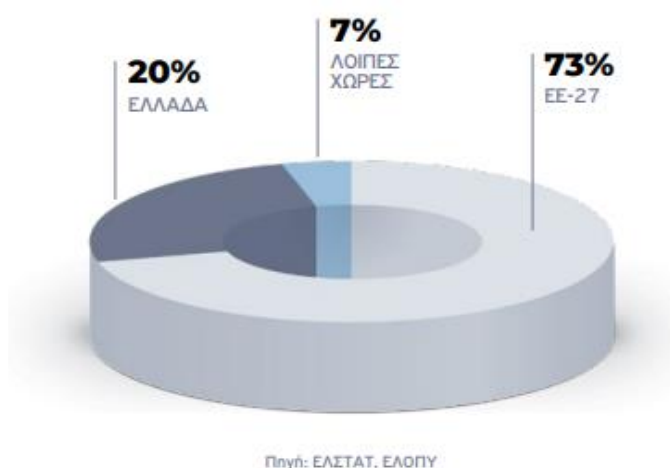
1. Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες, η βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών αποτελεί σημαντική πηγή εσόδων για την Ελληνική οικονομία, με συνεχή αυξανόμενη τάση της παγκόσμιας παραγωγής στο 63% (FAO, 2019). Ο ρυθμός πωλήσεων για το 2021 στην εγχώρια αγορά παρουσίασε μεγάλη αύξηση με 131.250 τόνους αξίας 636 εκατομμυρίων ευρώ. Τα κυρίαρχα είδη, η τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) αποτελούν το 96% της παραγωγής των ιχθυοκαλλιεργειών στην Μεσόγειο, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 1 (ΕΛΟΠΥ, 2022). Η εκτίμηση της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής τσιπούρας το 2019 ανήλθε σε 258.754 τόνους (FAO, 2021). Αυξητική τάση των πωλήσεων παρατηρήθηκε το 2021 στα δύο κύρια εκτρεφόμενα είδη. Το 80% της παραγωγής διατέθηκε στην παγκόσμια αγορά ενώ το 20% στην εγχώρια αγορά, όπως φαίνεται στην εικόνα 2 & 3. Το 58% της συνολικής παραγωγής ήταν τσιπούρα (61.454 τόνοι) και το 42% λαβράκι (43.876 τόνοι), (ΕΛΟΠΥ, 2022). Η τσιπούρα με επιστημονική ονομασία: *Sparus aurata* ανήκει στην οικογένεια των Σπαριδών (Sparidae) και απαντάται στη Μεσόγειο και στις ακτές του βορειοανατολικού Ατλαντικού. Θεωρείται από τα πιο πολύτιμα ψάρια της Μεσογείου λόγω της υψηλής διατροφικής της αξίας, καθώς είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά όπως ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία, αποτελεί πηγή πρωτεϊνών και διαθέτει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα (ΕΛΟΠΥ 2022).

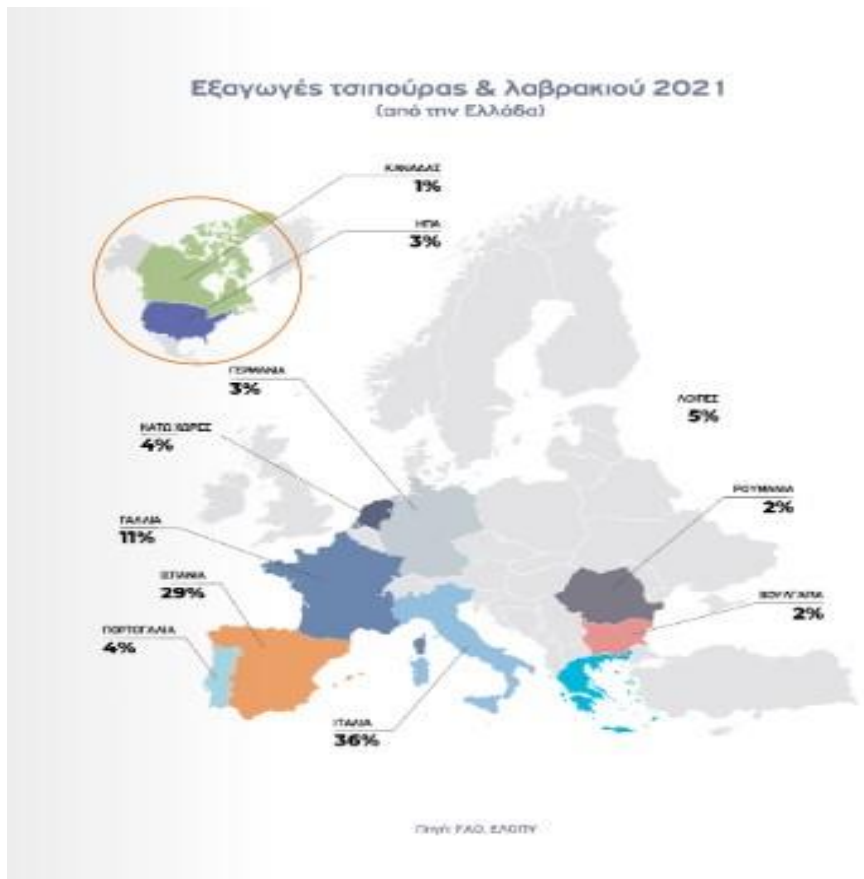


Εικόνα 1 Απεικόνιση του μεγέθους παραγωγής των εκτρεφόμενων ειδών το 2021 (ΕΛΟΠΥ, 2022).

Πωλήσεις τσιπούρας & λαβρακιού 2021



Εικόνα 2 Ποσοστό πωλήσεων των κύριων εκτρεφόμενων ειδών κατά το έτος 2021(ΕΛΟΠΥ, 2022).



Εικόνα 3 Κατανομή εξαγωγών των κύριων εκτρεφόμενων ειδών το 2021 (ΕΛΟΠΥ, 2022).

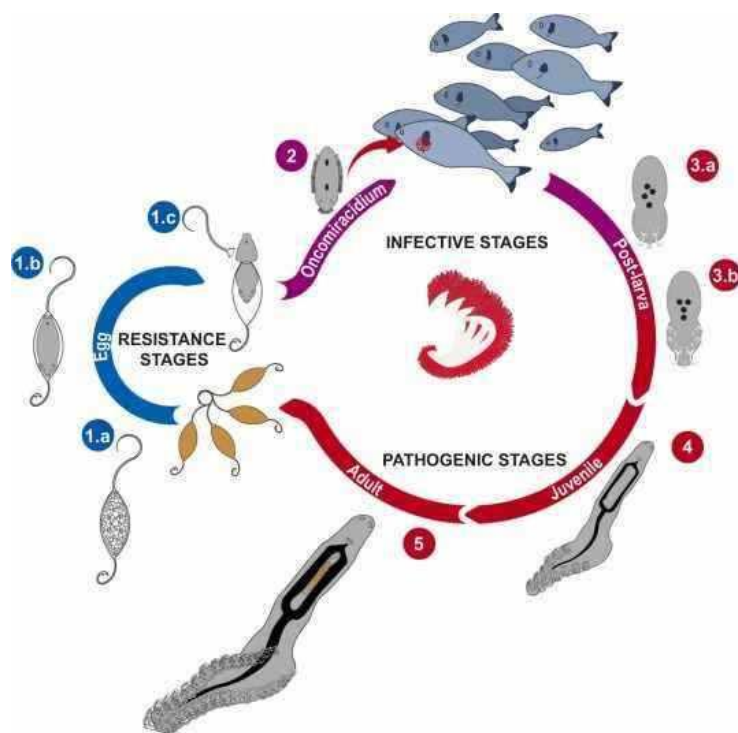
Στις ιχθυοκαλλιέργειες της Μεσογείου γίνεται εντατική χρήση θαλάσσιων ιχθυοκλωβών για την εκτροφή ιχθύων μεγαλύτερης βιομάζας (συνολική βιομάζα 6-10 kg ψάρι/m³), δεδομένου ότι συνδέεται με την αύξηση της παραγωγής (παραγωγικός κύκλος 12-15 μήνες). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και τη μη τήρηση των συνθηκών υγιεινής στους ιχθυοκλωβούς έχει σαν αποτέλεσμα την αυξανόμενη διασπορά σοβαρών παρασιτικών ασθενειών που σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να υπερβαίνει και το 60-70%, επιφέροντας ολέθριες συνέπειες στα εκτρεφόμενα ψάρια και στην τελική παραγωγή (Sitjà-Bobadilla, 2004).

Συγκεκριμένα η τσιπούρα μπορεί να προσβληθεί από το *Sparicotyle chrysoprii* (Van Beneden et Hesse, 1863), το οποίο αποτελεί ένα από τα πιο παθογόνα παράσιτα των εκτρεφόμενων ιχθύων. Το *S. chrysoprii* εντοπίζεται κυρίως στη Μεσόγειο, την Ερυθρά θάλασσα, στα παράλια των ακτών της βορειοδυτικής Αφρικής και στον Ατλαντικό Ωκεανό (Anonymous, 2021) προκαλώντας μεγάλη θνησιμότητα, αρνητική

επίδραση στην ανάπτυξη των ψαριών και σε παραγωγικούς δείκτες όπως ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (αύξηση FCR από 0.2-0.4).

Το *S. chrysoprii* είναι ένα μονογενές παράσιτο που προσβάλλει τα βράγχια, κυρίως σε συνθήκες υψηλής ιχθυοφόρτισης, αυξημένης θερμοκρασίας του θαλασσινού νερού (>20°C) και μειωμένης κυκλοφορίας του εξαιτίας της βιοεπίστρωσης που εντοπίζεται στα δίκτυα των κλωβών (Constela et al. 2022). Η εκδήλωση των συμπτωμάτων, έπειτα από προσβολή από το παράσιτο *S. chrysoprii*, παρατηρείται μετά από απότομη αύξηση της θερμοκρασίας του θαλασσινού νερού, παρά το γεγονός ότι εντοπίζεται παρασιτικό φορτίο καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (Antonelli et al., 2010). Έχει διαπιστωθεί πως η διακύμανση των αβιοτικών παραμέτρων όπως η θερμοκρασία του νερού, το pH (Modu et al., 2012), η φωτοπερίοδος και η αλατότητα επηρεάζουν τη συστηματική αύξηση των μονογενών παρασίτων κυρίως στα προνυμφιακά τους στάδια. Η κλινική εικόνα μετά από προσβολή των ιχθυοπληθυσμών περιλαμβάνει: μειωμένη όρεξη, υποτονικότητα στις κινήσεις των ιχθύων, διεσταλμένους οφθαλμούς, δερματικούς αποχρωματισμούς και αναιμία οδηγώντας σε εξάντληση και τελικά στη θνησιμότητα των ζώων (Sitjà-Bobadilla et al., 2006; Sitjà Bobadilla and Alvarez-Pellitero, 2009; Mladineo et al., 2023).

Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του παρασίτου *S. chrysoprii* παρουσιάζεται στην εικόνα 4 (Enrique Riera-Ferrer et al, 2023).



Εικόνα 4 Αναπαράσταση κύκλου ζωής του *S. chrysophrii* (Enrique Riera Ferrer et al, 2023).

Η αρχική περιγραφή του παράσιτου έγινε από τους Van beneden & Hesse το 1863, ως *Microcotyle chrysophrii*, ωστόσο ο Mamaev το 1984 το αναφέρει ως *S. chrysophrii*.

Η πλήρης συστηματική κατάταξη είναι η έξης:

Φύλο: *Platyhelminthes*

Κλάση: *Monogenea*,

Τάξη: *Mazocraeidea*,

Οικογένεια: *Microcotylidae*,

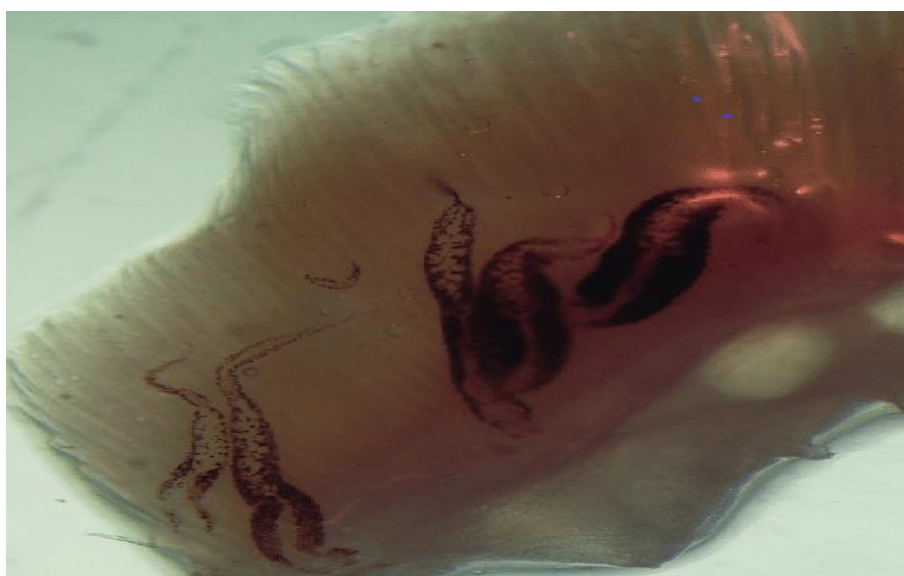
Γένος: *Sparicotyle*,

Είδος: *Sparicotyle chrysophrii*.

Επιπλέον, υπάγεται στην υποκατηγορία των μονογενών παρασίτων *polyopisthocotyleans*, καθώς το οπίσθιο μέρος του παρασίτου ονομάζεται οπισθοάπτορ. Διακρίνεται από ένα γενετικό στόμιο ενισχυμένο με δύο κύκλους ακάνθων από τέσσερα αγκάθια κατακόρυφα με διπλά αγκιστρώματα στο άκρο τους, από ένα σπερματικό υμένα που συνενώνεται με το οπίσθιο τμήμα του κόλπου και από έναν ενιαίο κόλπο (Mamaev, 1984). Το γένος είναι ενδεικτικό της υποοικογένειας

Atriasterinae (Maillard and Noisy, 1979) η οποία εντάσσεται στην οικογένεια *Microcotylidae* (Taschenberg, 1879) με πάνω από 160 είδη που κατανέμονται παγκοσμίως σε 50 γένη 7 υποοικογενειών (Lablack et al., 2022).

Η παθογένεια εκδηλώνεται στο σημείο προσκόλλησης όταν τα προσκολλημένα παράσιτα ‘απομυζούν’ τα βραγχιακά ελάσματα και τρέφονται με το αίμα των ιχθύων προκαλώντας βλάβες στο επιθήλιο του ιστού (εικόνα 5). Βακτήρια μπορεί να εισέρχονται στην πληγή και στο κατεστραμμένο ιστό, προκαλώντας φλεγμονώδη αντίδραση, που εκδηλώνεται με επιθηλιακή υπερπλασία, συμφόρηση τριχοειδών, φλεγμονώδες διήθημα, ανάπτυξη ελασματοειδούς συγγένειας και προοδευτικής μείωσης των μεσοκυττάρων διαστημάτων (Colorni and Padrós, 2011).



Εικόνα 5 Προσβολή παρασίτου *S. chrysophrii* σε βραγχιακά ελάσματα τσιπούρας

Ωστόσο, λιγότερη προσοχή στην παθογένεια έχει δοθεί στις εκκρίσεις του παρασίτου, τα εκκριτικά προϊόντα (ESP) και τα εξωκυτταρικά κυστίδια (EV) που παράγονται και αποβάλλονται στους ιστούς του ξενιστή κατά τη διάρκεια του παρασιτισμού. Σε άλλους παρασιτικούς έλμινθες, πρόκειται κυρίως για πρωτεάσες και αναστολείς πρωτεασών, καθώς και άλλους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ιστική αποσύνδεση, διάχυση και μετανάστευση, πέψη, και ιδίως την απόρριψη του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή και την αλληλεπίδραση με το μικροβίωμα του ξενιστή (Roonet et al., 2022; Mladineo et al., 2023). Οι ESP/ EV που παράγονται από το *S. chrysophrii* δεν έχουν ακόμη εξεταστεί διεξοδικά αλλά πιθανότατα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ιογένεση και την παθογένεια. Τα κύρια κλινικά

συμπτώματα προκαλούνται επομένως από την προσκόλληση των παρασιτικών σφικτήρων στο επιθήλιο των βράγχιων και την επακόλουθη αιμορραγία, η οποία επιδεινώνεται από τον αποικισμό των δευτερογενών βακτηριακών λοιμώξεων (Vagianou et al., 2009; Colorni and Padrós, 2011; Susini et al., 2011).

Τα ιστοπαθολογικά ευρήματα έχουν περιγραφεί ως εστιακές φλεγμονώδεις αλλοιώσεις γύρω από τους μονογενείς σφικτήρες σε ήπιες λοιμώξεις ή γενικευμένη υπερπλασία, συμφόρηση πρωτογενών και δευτερογενών ελασμάτων, αυξημένο αριθμό βλεννογόνων κυττάρων και πάχυνση των νηματοειδών άκρων σε εξαιρετικά μολυσμένα ψάρια (Vagianou et al., 2009). Έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία ενός κυτταρικού διηθήματος που περιβάλλει τα εκφυτικά αγγεία των βραγχιακών τόξων και αποτελούνταν από λίγα λευκοκύτταρα και πολλά μαστοειδή κύτταρα, εκ των οποίων ορισμένα απογυμνώθηκαν. Η ανοσοϊστοχημική χρώση του μονογονιδίου που ήταν προσκολλημένο στα βράγχια επέτρεψε την ταυτοποίηση στοχευμένων στοιχείων του έμφυτου και προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή απόκρισης. Τα φαγοκυτταρικά, καθώς και τα κύτταρα που παράγουν αντισώματα και εντοπίστηκαν κοντά στις βλάβες, επιβεβαίωσαν την ενεργοποίηση των στοιχείων του λεμφικού ιστού που συνδέεται με το βράγχιο (GIALT) στη λοίμωξη από *S. chrysophrii* και την ενεργοποίηση της προσαρμοστικής έμφυτης απόκρισης.

Ο έλεγχος της παρουσίας και του πολλαπλασιασμού των μονογενών παρασίτων σε μια ιχθυοκαλλιέργεια είναι υψίστης σημασίας. Πραγματοποιείται μέσω ενός ολοκληρωμένου συστήματος ελέγχου που περιλαμβάνει διαφορετικές στρατηγικές πρόληψης όπως την επιτήρηση της παρουσίας του παρασίτου με τη χρήση διαγνωστικών τεχνικών και του συστήματος βαθμονόμησης, τον τακτικό καθαρισμό των σημαντικότερων υποστρωμάτων (π.χ. δίκτυα ή σχοινιά όπου μπορούν να προσκολληθούν τα αυγά του παρασίτου), απολύμανση και αλλαγή του εξοπλισμού κατά την εργασία με νεαρά ιχθύδια και μεγαλύτερους ιχθύες, έλεγχος της βιομάζας στους κλωβούς, καθημερινή απομάκρυνση των νεκρών και κατανομή των κλωβών στο χώρο εκτροφής μετά την ομαδοποίηση σε μεγέθη. Οι στρατηγικές αυτές ενσωματώθηκαν πρόσφατα στον οδηγό των ιχθυοκαλλιεργειών για την καταπολέμηση των παρασιτικών λοιμώξεων στη μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια (Fioravanti et al., 2020) και υλοποιούνται στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού προγράμματος PerformFish με σκοπό την πρόληψη από τον κίνδυνο μόλυνσης των μεσογειακών εκτρεφόμενων ψαριών από *S. chrysophrii* (Padrós et al., 2020; Constela et al., 2022).

Εκτός από τις στρατηγικές πρόληψης, η θεραπεία κατά των μονογενών παρασίτων που προσβάλλουν τα βράγχια των εκτρεφόμενων Μεσογειακών ψαριών αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την καταπολέμησή τους. Θεραπείες μπορούν να πραγματοποιηθούν μέσα σε κλωβούς κυρίως με τη μέθοδο των θεραπευτικών μπάνιων με χρήση σάκου και εναλλακτικά με την χορήγηση του φαρμάκου μέσω της τροφής (Sitjà-Bobadilla et al., 2010).

Η πιο αποδοτική και γνωστή θεραπεία για την αντιμετώπιση παρασιτικών περιστατικών είναι η εμβάπτιση σε μπάνιο φορμόλης (Boyd and McNevin, 2015). Ωστόσο, η χρήση της φορμόλης ως μέσο θεραπείας προκαλεί πολλές αρνητικές αντιδράσεις, δυσφημίζοντας τον κλάδο, καθώς υπάρχει υπόνοια όχι μόνο για ανεπιθύμητη ύπαρξη καταλοίπων στο τελικό προϊόν αλλά κυρίως για το περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Επιπλέον, υπάρχουν και πρακτικά ζητήματα κατά την εφαρμογή των θεραπευτικών εμβάπτισεων στους κλωβούς, εφόσον θεωρείται απαραίτητη η χρήση μηχανικού εξοπλισμού σακών κάλυψης διχτύων, καθιστώντας ιδιαίτερα δύσκολη τη χρήση της εφαρμογής των λουτρών σε άσχημες καιρικές συνθήκες. Συνεπώς, υπάρχει ενδεχόμενο να απαγορευτεί η χρήση της φορμόλης δημιουργώντας ταυτόχρονα έλλειψη νόμιμων αντιπαρασιτικών για την θεραπεία των ψαριών.

Η χορήγηση μιας φαρμακούχας τροφής ως θεραπεία αντιπαρασιτικού σχήματος θα απέδιδε πολλαπλά οφέλη για την βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών και κυρίως θα ήταν δυνατή η αντικατάσταση της φορμόλης. Η πραζικουαντέλη είναι ένα ευρέος φάσματος ανθελμινθικό φάρμακο και αποτελεί την ιδανική αντιπαρασιτική ουσία για την αντιμετώπιση μονογενών παράσιτων σε ψάρια εκτροφής (Buchmann, 1987; Hirazawa et al., 2000; 2004; 2013). Σημαντικό είναι ότι δεν παρουσιάζει πρακτικές δυσκολίες κατά την εφαρμογή της χορήγησης της, είναι οικονομικά πιο συμφέρουσα και φιλική προς το περιβάλλον. Η πραζικουαντέλη παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα δεδομένου ότι δεν έχει εντοπιστεί κανένας γονιδιατοξικός κίνδυνος σε μελέτες σε ζύμες, βακτήρια, *drosophila* και Θηλαστικά (Bartsch et al.; 1978; Frohberg et al.; 1984; Kramers et al., 1991). Ως εκ τούτου, θεωρείται ασφαλής ουσία για θεραπείες σε ζώα, χωρίς όμως να έχει μελετηθεί ενδελεχώς ο περιβαλλοντικός αντίκτυπος που μπορεί να έχει. Ο κύριος προβληματισμός που εγείρεται αφορά στην δεκτικότητα της τροφής από τα ψάρια καθώς η πραζικουαντέλη έχει πικρή γεύση (Williams et al. 2007; Hirazawa et al., 2013; Partridge et al., 2016) και ως εκ τούτου σε

στάδιο προχωρημένης παρασίτωσης και μειωμένης όρεξης, η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου είναι μικρή. Εφαρμοστήκαν διάφορες τεχνικές για τη βελτίωση της γευστικότητας της τροφής και την αποφυγή απόρριψης στην υδάτινη στήλη, μειώνοντας ωστόσο και την αποτελεσματικότητα της δραστικής ουσίας. Εφαρμόστηκε η κάλυψη των τροφών με ελκυστικά προϊόντα, (όπως ιχθυέλαιο, εκχυλίσματα κρίλ, ζάχαρη ή φρέσκο σκόρδο), ή η χρήση ουσιών επικάλυψης ή δέσμευσης (άλας νατρίου καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης, άγαρ, ζελατίνη) (Williams et al., 2007; Yamamoto et al., 2011; Blumenthal et al., 2014; Forwood et al., 2016; Pilmer et al., 2016; Partridge et al., 2019). Επιπλέον, η πραζικουαντέλη, αποτελεί ένα συνθετικό φάρμακο που ανακαλύφθηκε για την καταπολέμηση των ανθρώπινων παρασίτων και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως κτηνιατρικό σκεύασμα τόσο σε παραγωγικά όσο σε οικόσιτα ζώα. Όσον αφορά στα ψάρια, με βάση την πρόσφατη γνωμοδότηση της Επιτροπής Κτηνιατρικών Φαρμάκων (CVMP), η πραζικουαντέλη συμπεριλήφθηκε στην ομάδα των "επιτρεπόμενων ουσιών" με μέγιστο όριο καταλοίπων (Maximum Residue Limit, MRL) 20 µg/kg στο μυ και το δέρμα των ιχθύων (Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) 2023/981 της Επιτροπής για την τροποποίηση του παραρτήματος του κανονισμού αριθ. 37/2010 της Επιτροπής) (EMA, 2022). Μέχρι στιγμής, η χρήση της πραζικουαντέλης στην Ευρώπη ήταν εφικτή ως φάρμακο ιχθύων σε πλαίσιο "off-label" (οδηγία 90/676/ΕΟΚ του Συμβουλίου, οδηγία 2001/82/ΕΚ και κανονισμός 37/2010 της Επιτροπής) (Eom et al., 1988). Στην Ιαπωνία, η πραζικουαντέλη είναι η δραστική ουσία εγκεκριμένων εμπορικών φαρμάκων, όπως το Hadaclean (Bayer Ltd.), το Benesaru (ASKA Animal Health Co., Ltd.) και το Praziguardflavour για ψάρια (Riken Vets Pharma Inc.) σε ορισμένες εμπορικές μορφές, με σαφείς οδηγίες σχετικά με τον τρόπο χρήσης του. Ομοίως, στη Νορβηγία χρησιμοποιείται ως θεραπεία από το στόμα για τους ταινιοσκώληκες στα *Salmonidae*, όπως το *Eubothrium* sp. (Lunestad et al., 2015). Σε πειραματικές δοκιμές, έχουν ελεγχθεί παρασκευάσματα πραζικουαντέλης που χορηγούνται μέσω του στόματος σε δόσεις από 10 έως 500 mg/kg ΣΒ ημερησίως για έως και 20 ημέρες σε διάφορα εκτρεφόμενα είδη ψαριών (Bjorklund and Bylund et al., 1987; Kim et al., 2001; 2003; Tubbs and Tingle et al., 2006a; 2006b; Williams et al., 2007; Tubbs et al., 2008; Shirakashi et al., 2012; Hirazawa et al., 2013; Ishimaru et al., 2013; Partridge et al., 2014; Xu et al., 2016; Partridge et al., 2019).

Η χορήγηση πραζικουαντέλης για τις παρασιτικές λοιμώξεις μπορεί να έχει εξαιρετικά και γρήγορα αποτελέσματα. Η αντιπαρασιτική της αποτελεσματικότητα

φαίνεται να απορρέει από πολυάριθμους μηχανισμούς δράσης, ανάλογα με το τύπο του παρασίτου, τη θέση του στον ξενιστή καθώς και το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Harnett et al., 1988).

Οι Staudt et al. (1992) αναφέρουν πως η πραζικουαντέλη δρα προκαλώντας σοβαρούς σπασμούς και παράλυση των μυών των σκουληκιών. Η παράλυση πιθανώς προκαλείται από την ταχεία εισροή ιόντων Ca^{2+} εντός του σχιστοσώματος. Ενώ έχει δειχθεί πως ο κύριος μοριακός στόχος είναι ο τασεοελεγχόμενος δίαυλος ασβεστίου (ασβεστίο-εξαρτώμενος δίαυλος από διαφορά δυναμικού), το ακριβές σημείο πρόσδεσης παραμένει άγνωστο. Επιπλέον, πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι οι δίαυλοι του υποδοχέα (TRP, transient receptor potential) αποτελούν πιθανούς στόχους της πραζικουαντέλης (Bais and Greenberg et al., 2018)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η χρήση της πραζικουαντέλης ως αντιπαρασιτικού έχει ήδη δοκιμαστεί με επιτυχία έναντι άλλων μονογενών παρασίτων σε εκτρεφόμενα ψάρια (όπως αναφέρουν οι Bader et al., 2018 και Norbury et al. 2022) και σύμφωνα με τα διαθέσιμα δεδομένα, θα μπορούσε ενδεχομένως να αποτελέσει μια εναλλακτική λύση για τη θεραπεία και τον έλεγχο των λοιμώξεων από το *S. chrysophrii* στη τσιπούρα. Αυτή ήταν η αρχική ιδέα του συγκεκριμένου έργου, το οποίο βασίζεται στην αξιολόγηση των παραμέτρων φαρμακοκινητικής της πραζικουαντέλης λαμβάνοντας υπόψη ότι μεταξύ των διαφόρων παραμέτρων που πρέπει να εξεταστούν για την αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της χρήσης της εν λόγω ουσίας για τη θεραπεία κατά των μονογενών παρασίτων στην τσιπούρα, έχει μεγάλη σημασία η βαθύτερη γνώση του μεταβολισμού της πραζικουαντέλης στα ψάρια και ειδικότερα σε αυτό το είδος.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Πειραματικοί Ιχθύες

Τσιπούρες μέσου βάρους $52 \pm 3.7\text{g}$ μεταφέρθηκαν από μονάδα παραγωγής και τοποθετήθηκαν σε πειραματικές δεξαμενές στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Διακόσιοι πειραματικοί ιχθύες χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες: ομάδα χαμηλής δόσης ($n=100$) και ομάδα υψηλής

δόσης (n=100). Καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, η θερμοκρασία του νερού διατηρήθηκε $21 \pm 1^{\circ} \text{C}$, ενώ η ποιότητα του νερού και οι περιβαλλοντικές συνθήκες στις δεξαμενές ήταν σταθερές (pH: 8.0 ± 0.3 , αλατότητα: $33 \pm 0.5 \text{ g/L}$, διαλυμένο οξυγόνο: $> 6.5 \text{ mg/L}$, ολικό άζωτο αμμωνίας: $< 0.1 \text{ mg/L}$, φωτοπερίοδος: 12 ώρες φως- 12 ώρες σκοτάδι). Ο εγκλιματισμός των ιχθύων διήρκησε 14 ημέρες πριν την έναρξη της δοκιμής, περίοδος κατά την οποία, τους δόθηκε εμπορικό σιτηρέσιο σε ποσότητα ίση με 2% του σωματικού τους βάρους. Με σκοπό να εξασφαλιστεί η ίδια διατροφική κατάσταση, 24 ώρες πριν από τη χορήγηση της φαρμακούχου τροφής στους ιχθύες δεν δόθηκε τροφή.

2.2 Παρασκευή φαρμακούχων τροφών:

Η παρασκευή των φαρμακούχων πειραματικών σιτηρεσίων πραγματοποιήθηκε με συσκευή Hobart. Αναλυτικά, παρασκευάστηκαν δύο σιτηρέσια διαφορετικής συγκέντρωσης πραζικουαντέλης (100% PZQ), για τη χαμηλή δόση: 75mg και την υψηλή δόση: 150mg/kg ιχθύος. Η εκατοστιαία περιεκτικότητα των πρώτων υλών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των τροφών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1 Εκατοστιαία περιεκτικότητα των πρώτων υλών των φαρμακούχων σιτηρεσίων.

	Σύσταση %
<i>Ιχθυάλευρο 68</i>	60.00
<i>Κριλ άλευρο</i>	12.00
<i>Αλεύρι</i>	18.25
<i>Γλουτένη σίτου</i>	3.00
<i>Ιχθυέλαιο</i>	5.00
<i>Βιταμίνες</i>	0.27
<i>Ελκυστικά</i>	1.50
<i>Υψηλή πραζικουαντέλη</i>	0.75
<i>Χαμηλή πραζικουαντέλη</i>	1.50

2.3 Χορήγηση φαρμακούχας τροφής

Η χορήγηση της φαρμακούχου τροφής πραγματοποιήθηκε εφάπαξ σε ποσότητα ίση με 2% του σωματικού τους βάρους των πειραματικών ιχθύων. Η δεκτικότητα και συγκεκριμένα η κατανάλωση της τροφής παρατηρήθηκαν συστηματικά διασφαλίζοντας τη λήψη όλης της χορηγούμενης ποσότητας της φαρμακούχου ιχθυοτροφής. Η τελική υπολογισμένη δοσολογία της φαρμακούχας

ουσίας ήταν στη χαμηλή δόση: 75mg/kg ιχθύος και στην υψηλή δόση: 150mg/kg ιχθύος.

2.4 Συλλογή δειγμάτων βράγχων

Μετά την αιμοληψία τα αναισθητοποιημένα ψάρια θανατώθηκαν με περίσσεια αναισθητικού και τα βραγχιακά τόξα αφαιρέθηκαν με νυστέρι αμφίπλευρα και αποθηκεύτηκαν (-20°C) έως ότου αναλυθούν. Τα δείγματα βραγχίων που συνολικά συλλέχθηκαν ισούταν με 200 (100/δοκιμή).

Οι αναλύσεις της πραζικουαντέλης στους ιστούς της τσιπούρας πραγματοποιήθηκαν στα εργαστήρια του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Έρευνών (ΕΛΚΕΘΕ) στην Ανάβυσσο Αττικής.

2.5 Μέθοδος εκχύλισης για την παραλαβή της πραζικουαντέλης από βράγχια

Οι ιστοί (1g) τεμαχίστηκαν με τη βοήθεια ψαλιδιού και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρου των 50mL. Ακολούθησε προσθήκη 6mL οξικού αιθυλεστέρα και το δείγμα ομοιογενοποιήθηκε. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε μαγνητική πλάκα όπου πραγματοποιήθηκε ανάδευση του δείγματος για 10min. Στη συνέχεια, έπειτα από φυγοκέντρωση (συνθήκες φυγοκέντρωσης: 10.000g, 10min, 10°C) πραγματοποιήθηκε παραλαβή του υπερκείμενου και μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα πολυπρεπυλενίου των 15mL. Ακολούθως η υγρή εκχύλιση επαναλήφθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (4mL). Το ομογενοποίημα αναδεύτηκε, φυγοκετρήθηκε εκ νέου, όπως περιγράφεται ανωτέρω και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ομοίως στον προαναφερθέν δοκιμαστικό σωλήνα. Τα 10mL εξατμίστηκαν έως ξηρού υπό ρεύμα N₂ σε υδατόλουτρο υπό σταθερή θερμοκρασία (45°C). Το ξηρανθέν υπόλειμμα επαναιωρήθηκε σε εξάνιο (2.5mL), αναδεύτηκε και φορτώθηκε σε ενεργοποιημένη στήλη ενεργοποιημένου πυριτίου (Isolute 500mg SI, IST). Η στήλη στη συνέχεια ξεπλύθηκε με 15% v/v διαιθυλαιθέρα-εξάνιο (5mL). Η ουσία εκλούστηκε από τη στήλη με 70% ακετόνη σε εξάνιο (5mL) και εξατμίστηκε όπως παραπάνω. Ακολούθησε ανασύσταση με την προσθήκη αρχικά 350μL ακετονιτριλίου και στη συνέχεια 750μL υπερκάθολου νερού. Το δείγμα φιλτραρίστηκε (0.22μm) και μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο των 2mL ώστε να αναλυθεί σε HPLC-UV.

Μέθοδος έκλουσης HPLC-UV:

Στήλη: Luna C18 150×4.6mm, 5μ

Προστήλη: C18 4x3.00mm

Κινητή φάση (πίνακας 2): H₂O (A)/Ακετονιτρίλιο (B)

Πίνακας 1 Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης.

Χρόνος (min)	Ροή (ml/min)	A%	B%	Καμπύλη (curve)
	1.00	65	35	
20.00	1.00	65	35	11
21.00	1.00		100	6
35.00	1.00		100	11
36.00	1.00	65	35	6

Ανιχνευτής UV: 210nm

Θερμοκρασία στήλης: 30°C

Θερμοκρασία αυτόματου δειγματολήπτη: 20°C

3. Αποτελέσματα

Η δεκτικότητα και η κατανάλωση των πειραματικών σιτηρεσίων παρατηρήθηκε να είναι ικανοποιητικές διασφαλίζοντας τη λήψη όλης της χορηγούμενης ποσότητας φαρμακούχου ιχθυοτροφής. Ένα φαρμακοκινητικό μοντέλο ενός διαμερίσματος βρέθηκε καταλληλότερο για την περιγραφή της κινητικής της ουσίας έπειτα από διατροφική χορήγηση πραζικουαντέλης, στα βράγχια της τσιπούρας. Οι συγκεντρώσεις της πραζικουαντέλης στα βράγχια μετά από διατροφική χορήγηση παρουσιάζονται στην Εικόνα 1. Η αύξηση στη χορηγούμενη δόση κατά δυο φορές προκάλεσε σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων συγκεντρώσεων πραζικουαντέλης στα βράγχια έως και 8 ώρες μετά τη θεραπεία. Οι μέγιστες τιμές πραζικουαντέλης στους ιχθύες που έλαβαν 75 και 150 mg/kg καταγράφηκαν 4 ώρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου αντίστοιχα (20.7 για τη χαμηλή και 39.1 μg/g, για την υψηλή δόση). Διπλασιασμός της δοσολογίας του φαρμάκου οδήγησε σε σημαντική δοσοεξαρτώμενη σχέση στη σχετική έκθεση της πραζικουαντέλης στον ιστό-στόχο της τσιπούρας, καθώς η περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου (AUC_{0-∞}) υπολογίστηκε

186.3 και 378.9 $\mu\text{g h/mL}$ για τα ψάρια που σιτίστηκαν με τη χαμηλή και την υψηλή δοσολογία αντίστοιχα (Πίνακας 3). Όσον αφορά στην απομάκρυνση του φαρμάκου από τα βράγχια, παρατηρήθηκε διαφορετικό προφίλ μεταξύ των δύο δοσολογικών σχημάτων. Ο $t_{1/2\beta}$ (χρόνος ημίσειας ζωής της απομάκρυνσης) της πραζικουαντέλης στα βράγχια των ιχθύων που έλαβαν τη χαμηλή δόση ήταν μικρότερος σε σύγκριση με εκείνο που υπολογίστηκε για την ομάδα υψηλής δόσης και κυμάνθηκε μεταξύ 8.9-11.7 ωρών (Πίνακας 3). Επιπλέον, η απομάκρυνση της πραζικουαντέλης από τα βράγχια ήταν ταχεία, καθώς η συγκέντρωσή του μειώθηκε σε 0.35 $\mu\text{g/g}$ στις 72 ώρες μετά τη θεραπεία για την ομάδα χαμηλής δόσης και σε 0.52 $\mu\text{g/g}$ στις 96 ώρες μετά τη θεραπεία για την ομάδα υψηλής δόσης.

Πίνακας 2 Φαρμακοκινητικές παράμετροι μετά από διατροφική χορήγηση δύο δόσεων πραζικουαντέλης (χαμηλή = 75 mg/kg, υψηλή = 150 mg/kg) στα βράγχια της τσιπούρας σε θερμοκρασία 21°C.

Παράμετροι	χαμηλή	υψηλή
Ιστός	βράγχια	
β	0.078	0.059
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/mL}$)	20.7	39.1
$T_{\max}$ (h)	4	4
$t_{1/2\beta}$ (h)	8.9	11.7
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g h/mL}$)	186.3	378.9

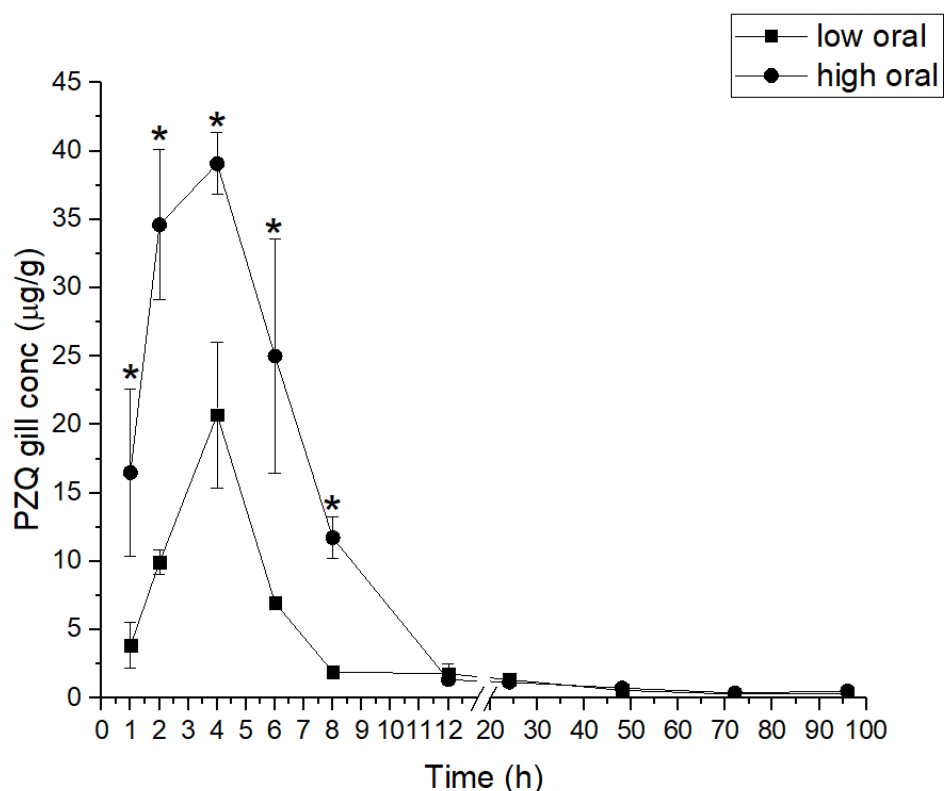
β : κλίση

$C_{\max}$: βράγχια μέγιστη συγκέντρωση

$T_{\max}$: χρόνος για μέγιστη συγκέντρωση πλάσμα/βράγχια

$t_{1/2\beta}$: χρόνος ημίσειας ζωής της απομάκρυνσης

$AUC_{0-\infty}$: περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου



Εικόνα 1 Μέση συγκέντρωση της πραζικουαντέλης (μg/g) στα βράγχια τσιπούρας (N=5) τις ώρες που ακολούθησαν τη χορήγηση των φαρμακούχων σιτηρεσίων συγκέντρωσης 75mg/kg (Χαμηλή) και 150mg/kg (Υψηλή). * υποδεικνύει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των δοκιμών

4. Συζήτηση

Προβλήματα δεκτικότητας των φαρμακούχων σιτηρεσίων δεν παρουσιάστηκαν στον συγκεκριμένο πειραματισμό, γεγονός που δεικνύει ότι η προσθήκη ελκυστικών στην τροφή βοήθησε σημαντικά στην αποδοχή της πειραματικής τροφής. Σε προηγούμενες δοκιμές φαρμακούχων τροφών με πραζικουαντέλη, η προσθήκη κρίλ αλεύρων σε συνδυασμό με νωπά διαιτητικά σιτηρέσια όντως αύξησε την δεκτικότητα της (Yamamoto et al., 2011; Forwood et al., 2016) επιβεβαιώνοντας το προαναφερθέν. Παρόμοια αποτελέσματα φάνηκαν και στο εκτρεφόμενο μαγιάτικο (*Seriola dumerili*) (Kogiannou, et al. 2021) ενώ σε άλλα εκτρεφόμενα είδη η χορήγηση φαρμακούχων τροφών με πραζικουαντέλη ήταν προβληματική (Partridge, et al. 2017) καθιστώντας αναγκαία την επικάλυψη της φαρμακούχας τροφής με ελκυστικές ουσίες (Pilmer, 2016) για να αυξηθεί η δεκτικότητά της.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη προσπάθεια προσδιορισμού της συγκέντρωσης διατροφικά χορηγούμενης πραζικουαντέλης στα βράγχια της τσιπούρας καθώς για τον συγκεκριμένο ιστό δεν υπάρχουν σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές. Οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες εστιάζουν κυρίως στο κυκλοφορικό σύστημα και ειδικά στο πλάσμα των ψαριών. Σε μια πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη παρουσιάστηκε η φαρμακοκινητική της πραζικουαντέλης στο πλάσμα τσιπούρας μετά από διατροφική χορήγηση στις δόσεις που μελετήθηκαν και στην παρούσα μελέτη (Kogiannou et al., 2023). Αναφορικά με την απορρόφηση της ουσίας στο πλάσμα, η μέγιστη συγκέντρωση πραζικουαντέλης έπειτα από χορήγηση της χαμηλής δόσης (75 mg/kg) μετρήθηκε 4 ώρες μετά τη χορήγηση (6.7 μg/mL), ενώ η αντίστοιχη τιμή στην ομάδα υψηλής δόσης μετρήθηκε στις 6 ώρες μετά τη χορήγηση (8.2 μg/mL). Συγκριτικά στα βράγχια, οι μέγιστες συγκεντρώσεις (C_{max}) πραζικουαντέλης έπειτα από δόσεις 75 και 150 mg/kg σημειώθηκαν 4 ώρες μετά τη φαρμακευτική χορήγηση και βρέθηκαν ίσες με 20.7 για τη χαμηλή και 39.1 μg/g, για την υψηλή δόση, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι τιμές στα βράγχια ήταν τρεις και πέντε φορές υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές πλάσματος, 4 ώρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου αντίστοιχα. Επιπλέον, η περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου ($AUC_{0-\infty}$), στο πλάσμα παρουσίασε τιμές 225.7 και 262.3 μg h/mL για τα ψάρια που έλαβαν τη χαμηλή και την υψηλή συγκέντρωση φαρμάκου, αντίστοιχα υποδεικνύοντας έλλειψη δοσο-εξαρτώμενης σχέσης (Kogiannou, et al. 2023). Αντίθετα, έντονη δοσο-εξαρτώμενη σχέση παρατηρήθηκε στα βράγχια με την $AUC_{0-\infty}$ να σημειώνει τιμές 186.3 και 378.9 μg h/mL για τη χαμηλή και την υψηλή δοσολογία αντίστοιχα.

Όσον αφορά στην απομάκρυνση του φαρμάκου από τα βράγχια, παρατηρήθηκε διαφορετικό προφίλ μεταξύ των δύο δοσολογικών σχημάτων. Ο $t_{1/2\beta}$ της πραζικουαντέλης στα βράγχια των ιχθύων που έλαβαν τη χαμηλή δόση ήταν μικρότερος σε σύγκριση με εκείνον που υπολογίστηκε για την ομάδα υψηλής δόσης και κυμάνθηκε μεταξύ 8.9-11.7 ωρών. Επιπλέον, η απομάκρυνση της πραζικουαντέλης από τα βράγχια ήταν ταχεία, καθώς η συγκέντρωσή της μειώθηκε σε 0.35 μg/g στις 72 ώρες μετά τη θεραπεία για την ομάδα χαμηλής δόσης και σε 0.52 μg/g στις 96 ώρες μετά τη θεραπεία για την ομάδα υψηλής δόσης (Kogiannou, et al. 2023). Στο πλάσμα, ο χρόνος ημίσειας ζωής της απομάκρυνσης $t_{1/2\beta}$ του φαρμάκου υπολογίστηκε σε 25.7 h και 14.1 h για τη χαμηλή και την υψηλή δόση αντίστοιχα, καταδεικνύοντας ταχύτερη

απομάκρυνση της πραζικουαντέλης στην υψηλή δοσολογία. Τέλος, η συγκέντρωση της πραζικουαντέλης μειώθηκε σχετικά απότομα μετά τις 12 ώρες από τη χορήγηση (περίπου 50%), ωστόσο, η ελάχιστη συγκέντρωση στο πλάσμα παρέμεινε περίπου στο 1 $\mu\text{g/mL}$, 96 ώρες μετά τη θεραπεία και για τα δύο δοσολογικά σχήματα που εξετάστηκαν (Kogiannou et al., 2023). Συνεπώς γίνεται αντιληπτό ότι σημαντικές αποκλίσεις στην κινητική της πραζικουαντέλης στο πλάσμα των ψαριών σε σχέση με τα βράγχια. Τα βράγχια έχουν σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών στα ψάρια (Sun et al., 2010) και η έλλειψη ομοιότητας στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους των αντιμικροβιακών ουσιών μεταξύ πλάσματος και βράγχιων όπως διαπιστώθηκε εδώ καθώς και σε άλλες μελέτες (Mallik et al., 2023) να οφείλεται σε αυτό τους τον ρόλο, κάτι που ωστόσο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Η κινητική του φαρμάκου έχει μελετηθεί και σε πλήθος άλλων εκτρεφόμενων ειδών με ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, στο Ιαπωνικό μαγιάτικο (*Yellowtail kingfish*) η $C_{\max}$ στο πλάσμα παρουσίασε τιμές 5.510.6 $\mu\text{g/ml}$ (Partridge et al., 2019; Tubbs and Tingle et al., 2006b), έπειτα από διατροφική χορήγηση πραζικουαντέλης 50 mg/kg. Σε ένα άλλο είδος της οικογένειας *Seriola* η μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου μετρήθηκε 3.0 και 4.2 $\mu\text{g/mL}$ έπειτα από διατροφική χορήγηση πραζικουαντέλης 30 και 60mg/kg, αντίστοιχα. Συνεχίζοντας, η μέγιστη συγκέντρωση στον ορό του τόνου (*Thunnus orientalis*), βρέθηκε 2.0 $\mu\text{g/ml}$, όταν χορηγήθηκαν 15 mg PZQ/kg (Ishimaru et al., 2013), ενώ η αντίστοιχη τιμή στο πλάσμα του Ασιατικού βαλτόχελου (*Monopterus albus*) ίση με 0.4 $\mu\text{g/ml}$, μετά τη χορήγηση 10 mg PZQ /kg ψαριού (Xu et al., 2016). Τέλος, η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα του Κορεατικού βράχου (*Sebastes schlegeli*) μετρήθηκε 8.59 $\mu\text{g/ml}$ μετά από τη δόση 400mg/kg (Kim, et al., 2001). Αναφορικά με την απομάκρυνση ($t_{1/2\beta}$) της πραζικουαντέλης έπειτα από την εκ στόματος χορήγηση αυτή έχει βρεθεί να κυμαίνεται από 5.4 έως 120 h στο πλάσμα ή τον ορό των άλλων μελετημένων εκτρεφόμενων ειδών (Kim et al., 2001; Tubbs and Tingle, 2006b; Ishimaru et al., 2013; Xu et al., 2016; Partridge et al., 2019; Kogiannou and Rigos, 2021). Γενικά οι διαφορές που παρατηρούνται στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους μεταξύ των μελετών θα μπορούσαν να αποδοθούν σε ποικίλους παράγοντες, όπως το είδος των ψαριών, το μέγεθος και οι πειραματικές συνθήκες (Rigos et al., 2002).

5. Συμπεράσματα

Προβλήματα δεκτικότητας των φαρμακούχων σιτηρεσίων δεν παρουσιάστηκαν στον συγκεκριμένο πειραματισμό, γεγονός που δεικνύει ότι η χρησιμοποίηση ελκυστικών στην τροφή βοήθησε σημαντικά στην αποδοχή της πειραματικής τροφής.

Συγκριτικά, το θεραπευτικό σχήμα με τη μεγαλύτερη δοσολογία, δεδομένου ότι είναι αποδεκτό από το ψάρι, πλεονεκτεί σε σχέση με αυτό της μικρής δόσης καθώς οι σχετικές συγκεντρώσεις της πραζικουαντέλης στα βράγχια μετρήθηκαν να είναι μεγαλύτερες σε όλα τα εξεταζόμενα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της ημέρας.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και τη σχετική βιβλιογραφία που αφορά στο υπό εξέταση είδος, το θεραπευτικό σχήμα της μεγάλης δοσολογίας (150 mg/kg PZQ), που η χορήγησή του συνδυάζεται, σε σύγκριση με το σχήμα της χαμηλής δόσης, με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα βράγχια της τσιπούρας είναι και το προτεινόμενο για την αντιμετώπιση των μονογενών παρασίτων που προσβάλλουν το ψάρι. Αποτελεί μια ιδανική λύση για την αντικατάσταση των θεραπευτικών εμβαπτίσεων με φορμόλη για τις μεσογειακές ιχθυοκαλλιέργειες, όπως αποδεικνύεται από την υψηλή αποτελεσματικότητα του φαρμάκου έναντι ενός ευρέος φάσματος παρασίτων που προσβάλλουν πολλά εκτρεφόμενα είδη ψαριών (Bader et al. 2019; Norbury et al. 2022). Επίσης, η γρήγορη απομάκρυνση της ουσίας συνιστά δύο ημερήσια θεραπευτικά γεύματα της ίδιας συνολικής δοσολογίας ώστε να διατηρηθεί η συγκέντρωση της πραζικουαντέλης σε υψηλά επίπεδα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα την περίοδο της ημέρας. Μια δοκιμή στο πεδίο ενάντια στο *S. chrysophrii* είναι απαραίτητη για να επιβεβαιώσει ότι το θεραπευτικό σχήμα της μεγάλης δοσολογίας (150 mg/kg PZQ), το οποίο και προτείνεται από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, είναι το πλέον κατάλληλο θεραπευτικό σχήμα για την καταπολέμηση του.

Βιβλιογραφία

- Anonymous (2021) PARAPEZ 3: Evaluación de la transmisión de formas parasitarias entre peces salvajes y cultivados. SAIGAS, Facultad de Veterinaria de la Universidad CEU Cardenal Herrera, Valencia, Spain. Project report, pp.63.
- Antonelli L, Quilichini Y, Marchand B (2010) *Sparicotyle chrysophrii* (Van Beneden and 1005 Hesse 1863) (Monogenea: Polyopisthocotylea) parasite of cultured gilthead sea bream 1006 *Sparus aurata* (Linnaeus 1758) (Pisces: Teleostei) from Corsica: Ecological and 1007 morphological study. *Parasitology Research* 107, 389-398.
- Aslam ML, Carraro R, Sonesson AK, Meuwissen T, Tsigenopoulos CS, Rigos G, Bargelloni L, Tzokas K (2020) Genetic variation, GWAS and accuracy of prediction for host resistance to *Sparicotyle chrysophrii* in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Frontiers in Genetics* 11, 594770. doi: 10.3389/fgene.2020.59477.
- Athanassopoulou F, Ragias V, Vagianou S, Di Cave D, Rigos G, Papathanasiou G, Georgoulakis J (2005) Report of *Sparicotyle* (Microcotyle) *chrysophrii* Van Beneden and Hesse 1863 *Atrispinum seminalis* Euzet and Maillard 1973 and *Polylabris tubicirrus* Paperna and Kohn 1964 (Monogenea) on captive sea bream (*Sparus aurata*) and sharp snout sea bream (*Diplodus puntazzo*) in coastal Greece and Italy. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 25, 256-261.
- Bannister J, Sievers M, Bush F, Bloecher N (2019) Biofouling in marine aquaculture: a review of recent research and developments. *Biofouling* 35, 631-648.
- Bader C, Starling DE, Jones DE, Brewer MT (2019) Use of praziquantel to control platyhelminth parasites of fish. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 42, 139-153.
- Boyd, C., & McNevin, A. (2015). *Aquaculture, Resource Use, and the Environment*: John Wiley & Sons, New Jersey.
- Buchmann, K. (1987). Effects of praziquantel on the monogenean gill parasite *Pseudodactylogyrus* bini. *Acta Vet. Scand.*, 28, 447-450.

- Cabello-Gómez JF, Aguinaga-Casañas MA, Falcón-Piñeiro A, González-Gragera E, Márquez Martín R, Agraso MdM, Bermúdez L, Baños A, Martínez-Bueno M (2022) Antibacterial and antiparasitic activity of propyl-propane-thiosulfinate (PTS) and propyl-propane thiosulfonate (PTSO) from *Allium cepa* against gilthead sea bream pathogens in in vitro and in vivo studies. *Molecules* 27, 6900. doi: 10.3390/molecules27206900.
- Constenla M, Fioravanti ML, Ciulli S, Gustinelli A, Zarza C, Rigos G, Padrós F (2022) Diseases risk assessment associated with the most relevant infectious and parasitic diseases in seabream and seabass farming systems in Europe. In: EAS2022 Abstracts, pp 273-274. European Aquaculture Society Conference. Rimini, Italy.
- Cascarano MC, Stavrakidis-Zachou O, Mladineo I, Thompson KD, Papandroulakis N, Katharios P (2021) Mediterranean aquaculture in a changing climate: Temperature effects on pathogens and diseases of three farmed fish species. *Pathogens* 10, 1205. doi: 10.3390/pathogens10091205.
- Colorni A, Padros F (2011) Chapter 10 Diseases and health management. In: Sparidae: biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species, Pavlidis MA, Mylonas CC (eds), Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp: 321-357.
- Enrique Riera-Ferrer, Raquel Del Pozo, M. Carla Piazzon, Ariadna Sitjà-Bobadilla, Itziar Estensoro, Oswaldo Palenzuela (2023) Sparicotyle chrysophrii experimental infection of gilthead seabream (*Sparus aurata*): Establishment of an in vivo model reproducing the pathological outcomes of sparicotylosis. *Aquaculture* 573, 739588.
- FAO. (2018). Food and Agriculture Organization of the United Nations, The State of World Fisheries and Aquaculture 2018-Meeting the sustainable development goals. Rome.
- FAO, The State of World Fisheries and Aquaculture (2020) doi: 10.4060/ca9229en.
- Fioravanti ML, Mladineo I, Palenzuela O, Beraldo P, Massimo M, Gustinelli A, Sitjà-Bobadilla A (2020) Fish farmer's guide to combating parasitic infections in European sea bass and gilthead sea bream aquaculture. A series of ParaFishControl guides to combating fish parasite infections in aquaculture. Guide 4. Edited by Sitjà-Bobadilla A and Bello-Gómez E. e-NIPO: 833-20-104-5, 29 pp.
- Firmino JP, Vallejos-Vidal E, Sarasquete C, Ortiz-Delgado JB, Balasch JC, Tort L, Estevez A, Reyes-Lopez FE, Gisbert E (2020) Unveiling the effect of dietary

essential oils supplementation in *Sparus aurata* gills and its efficiency against the infestation by *Sparicotyle chrysophrii*. Scientific Report 10, 1776.

- Forwood, J., Bubner, E., Landos, M., Deveney, M. and D'Antignana, T., 2016. Praziquantel delivery via moist pellets to treat monogenean parasites of yellowtail kingfish *Seriolalandi*: efficacy and feed acceptance. *Diseases of Aquatic Organisms*, 121(3), pp.201-209.
- Hirazawa, N., Akiyama, K., & Umeda, N. (2013). Differences in sensitivity to the anthelmintic praziquantel by the skin-parasitic monogeneans *Benedeniaseirolae* and *Neobenedeniagirellae*. *Aquaculture*, 404, 59-64.
- Hirazawa, N., Mitsuboshi, T., Hirata, T., & Shirasu, K. (2004). Susceptibility of spotted halibut *Veraspervariegatus* (Pleuronectidae) to infection by the monogenean *Neobenedeniagirellae* (Capsalidae) and oral therapy trials using praziquantel. *Aquaculture*, 238(1-4), 83-95.
- Hirazawa, N., Ohtaka, T., & Hata, K. (2000). Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothriumokamotoi* in the tiger puffer *Takifugurubripes*. *Aquaculture*, 188(1-2), 1-13.
- Ishimaru, K., Mine, R., Shirakashi, S., Kaneko, E., Kubono, K., Okada, T., Sawada, Y. and Ogawa, K., 2013. Praziquantel treatment against *Cardicola* blood flukes: Determination of the minimal effective dose and pharmacokinetics in juvenile Pacific bluefin tuna. *Aquaculture*, 402-403, pp.24-27.
- Kim, K. H., Kim, C. S., & Kim, J. W. (2001). Depletion of praziquantel in plasma and muscle tissue of cultured rockfish *Sebastesschlegeli* after oral and bath treatment. *Diseases of aquatic organisms*, 45(3), 203-207.
- Kogiannou Dimitra, Nikoloudaki Chrysanthi, Rigos George 2021. Absorption and depletion of dietary administered praziquantel in greater amberjack, *Seriola dumerili*. *Aquaculture* 535, 736354.
- Katharios P, Papandroulakis N, Divanach P (2006) Treatment of *Microcotyle* sp. (Monogenea) on the gills of cage-cultured red porgy, *Pagrus pagrus* following baths with formalin and mebendazole. *Aquaculture* 251, 167-171.
- Kogiannou D, Nikoloudaki C, Valsamidi V, Golomazou E, Rigos G (2022) Pharmacokinetic properties of in-feed administered praziquantel in gilthead seabream, *Sparus aurata* Innovative Solutions in a Changing World, European Aquaculture Symposium 2022, 26-30 September, Rimini, Italy.

- Dimitra Kogiannou, Chrysanthi Nikoloudaki, Vasilisa Valsamidi, Mado Kotsiri, Eleni Golomazou, George Rigos (2023) Pharmacokinetics of praziquantel in gilthead seabream (*Sparus aurata*) plasma and gills. *Aquaculture* 577, 739975.
- Lablack L, Rima M, Georgieva S, Marzoug D, Kostadinova A (2022) Novel molecular data for monogenean parasites of sparid fishes in the Mediterranean and a molecular phylogeny of the Microcotylidae Taschenberg, 1879. *Current Research in Parasitology & Vector Borne Diseases* 2, 100069. doi: 10.1016/j.crpvbd.2021.100069
- Mallik S. K., Shahi N., Pathak R., Kala K., Patil P. K., Singh B., Ravindran R., Krishna N., Pandey P. K. (2023). Pharmacokinetics and biosafety evaluation of a veterinary drug florfenicol in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792) as a model cultivable fish species in temperate water. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1033170.
- Mamaev YL (1984) The composition of the genera *Atristaster* and *Atrispinum* (Microcotylidae, Monogenea) and some peculiarities of their morphology. *Parazitologiya* 18, 204-208. [in Russian].
- Ivona Mladineo, Donatella Volpatti, Paola Beraldo, George Rigos, Pantelis Katharios, Francesc Padros (2023) Monogenean *Sparicotyle chrysophrii*: The major pathogen of the Mediterranean gilthead seabream aquaculture. Review in *Aquaculture*, doi: 10.1111/raq.12839.
- Modu BM, Saiful M, Kartini M, Kasim Z, Hassan M, Shaharom-Harrison FM (2012) Effects of water quality and monogenean parasite in the gills of freshwater aat fish, *Hemibagrus nemurus* Valenciennes 1840. *Current Research Journal of Biological Sciences* 4, 242-246.
- Nikolaou M, Neofitou N, Skordas K, Castritsi-Catharios J, Tziantziou L (2014) Fish farming and antifouling paints: a potential source of Cu and Zn in farmed fish. *Aquaculture Environment Interactions* 5, 163-171. 10.3354/aei00101.
- Norbury LJ, Shirakashi S, Power C, Nowak BF, Bott NJ (2022) Praziquantel use in aquaculture - Current status and emerging issues. *International Journal for Parasitology. Drugs and drug resistance*, 18, 87-102.
- Partridge, G. J., Burge, T., & Lymbery, A. J. (2017). A comparison of the palatability of racemic praziquantel and its two enantioseparated isomers in yellowtail kingfish *Seriolalandi* (Valenciennes, 1833). *Aquaculture research*, 48(4), 1735-1743.

- Partridge, G., Rao, S., Woolley, L., Pilmer, L., Lymbery, A. and Prestidge, C., 2019. Bioavailability and palatability of praziquantel incorporated into solid-lipid nanoparticles fed to yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 218, pp.14-20.
- Pilmer, L., 2016. Novel methods of improving the palatability of feeds containing praziquantel for commercially cultured yellowtail kingfish, Honours thesis. Murdoch University.
- Qiu H, Gapeeva A, Kaps S, Adelung R, Baum M (2021) Core-shell structured nets for biofouling control in aquaculture. *Aquaculture Reports* 21, 100781.
- Rigos G, Fountoulaki E, Cotou E, Dotsika E, Doural N, Karacostas I (2013) Tissue distribution and field evaluation of caprylic acid against natural infections of *Sparicotyle chrysophrii* in cage-reared gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Aquaculture* 408–409, 15–19.
- Rigos G, Henry M and Tsigenopoulos C (2015) *Sparicotyle chrysophrii* and gilthead sea bream – potential experimental infection model. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 35, 49-53.
- George Rigos, Dimitra Kogiannou, Antigoni Vasilaki and Mado Kotsiri 2021. Evaluation of praziquantel efficacy against *Zeuxapta seriolae* infections in greater amberjack, *Seriola dumerili*. *Applied Sciences* 11, 4656.
- Repullés-Albelda A, Raga JA, Montero FE (2011) Post-larval development of the microcotylid monogenean *Sparicotyle chrysophrii* (Van Beneden and Hesse, 1863): Comparison with species of Microcotylidae and Heteraxinidae. *Parasitology International* 60, 512–520. doi: 10.1016/j.parint.2011.09.008.
- Rooney J, Northcote HM, Williams TL, Cortés A, Cantacessi C, Morpew RM (2022) Parasitic helminths and the host microbiome – a missing ‘extracellular vesicle-sized’ link? *Trends in Parasitology* 38, 737-747.
- Sitjà-Bobadilla, A. (2004). Parasites in Mediterranean aquacultured fish: current impact and future research directions. In S. Mas-Coma (Ed.), *Multidisciplinary for Parasites, Vectors and Parasitic Diseases*. Bologna, Italy., Medimond.
- Sitjà-Bobadilla A, de Felipe MC, Alvarez-Pellitero P (2006) In vivo and in vitro treatments against *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 261, 856–864.

- Sitjà-Bobadilla A and Alvarez-Pellitero P (2009) Experimental transmission of *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Polyopisthocotylea) to gilthead sea bream (*Sparus aurata* L): an haematological and histopathological approach. *Folia Parasitologica* 56, 143-151.
- Sitjà-Bobadilla A, Redondo J, Alvarez-Pellitero P (2010) Occurrence of *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Polyopisthocotylea) in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) from different mariculture systems in Spain. *Aquaculture Research* 41, 939-944. doi: 10.1111/j.1365- 2109.2009.02369.x
- Sun Y, Bu S-J (2012) Pharmacokinetics and relative bioavailability of praziquantel in healthy water buffalo after oral and intramuscular administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 35, 618-622.
- Susini F, Fischì G, Macori G, Cocumelli C, Cardeti G, Alimonti C, Forletta R, Gustinelli A, Fioravanti ML (2011) Episodio di mortalità da *Sparicotyle chrysophrii* in orate (*Sparus aurata*) in gabbia. In: the Abstract book of the XVII Convegno Nazionale della Società Italiana di Patologia Ittica, Ostuni, Italy, p. 57.
- Thomas, C. and Timson, D., 2020. The Mechanism of Action of Praziquantel: Can New Drugs Exploit Similar Mechanisms?. *Current Medicinal Chemistry*, 27(5), pp.676-696.
- Tubbs, L. A., & Tingle, M. D. (2006). Bioavailability and pharmacokinetics of a praziquantel bolus in kingfish *Seriolalandi*. *Diseases of aquatic organisms*, 69(2-3), 233-238.
- Tubbs, L. and Tingle, M., 2006. Effect of dose escalation on multiple dose pharmacokinetics of orally administered praziquantel in kingfish *Seriolalandi*. *Aquaculture*, 261(4), pp.1168-1174.
- Vagianou S, Athanassopoulou F, Ragias V, Di Cave D, Leontides L, Golomazou E (2006) Prevalence and pathology of ectoparasites of Mediterranean sea bream and sea bass reared under different environmental and aquaculture conditions. *Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh* 58, 78-88.
- Villar-Torres M, Montero FE, Raga JA, Repullés-Albelda A (2018) Come rain or come shine: environmental effects on the infective stages of *Sparicotyle chrysophrii*, a key pathogen in Mediterranean aquaculture. *Parasites & Vectors* 11, 558.

- Williams, R. E., Ernst, I., Chambers, C. B., & Whittington, I. D. (2007). Efficacy of orally administered praziquantel against *Zeuxaptaseriolae* and *Benedeniaseriola* (Monogenea) in yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 77(3), 199-205.
- Xu, N., Dong, J., Yang, Y., Ai, X., 2016. Pharmacokinetics and residue depletion of praziquantel in rice field eels *Monopterus albus*. *Dis. Aquat. Org.* 119, 67–74.
- Yamamoto, S., Shirakashi, S., Morimoto, S., Ishimaru, K. and Murata, O., 2011. Efficacy of oral praziquantel treatment against the skin fluke infection of cultured chub mackerel, *Scomber japonicus*. *Aquaculture*, 319(1-2), pp.53-57.
- Ετήσια Έκθεση Υδατοκαλλιέργειας –ΕΛΟΠΥ 2022.