Wpływ flumechiny na leukocyty krwi obwodowej karpi, aktywność esterazy alfa-naftylooctowej i proliferację limfocytów stymulowaną mitogenami

ANTONINA Sopińska, ANNA Grochoła,
MONIKA Roczeń-Karczmarz*, KRZYSZTOF Tomczuk*

Zakład Chorób Ryb i Biologii, *Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Otrzymano 30.05.2018

Zaakceptowano 09.07.2018

Sopińska A., Grochoła A., Roczeń-Karczmarz M., Tomczuk K.

Effect of flumequine on peripheral blood leukocytes, alpha naphthyl acetate esterase activity and mitogenic lymphocyte response

Summary

The aim of this study was to evaluate the effect of flumequine on the percentage of peripheral blood leukocytes of carp, alpha naphthyl acetate esterase (ANAE) activity and proliferative activity of lymphocytes stimulated with concanavalin A (Con A) and lipopolysaccharide (LPS). Flumequine was administered to 40 carp, weighing 150 ± 10 g, at a dose of 12 mg/kg, once (group I) and four times, every 2 days (group II). Among white blood cells in flumequine, treated fish (group II) observed a decrease in percentage of lymphocytes and an increase of neutrophils. Identification of the ANAE esterase activity in fish lymphocytes of the control group showed the advantage of positive cells over the negative ones and amounted to $62.65 \pm 3.22\%$. After administration of flumequine in group II fish, this value decreased to $44.75 \pm 3.70\%$. The present study clearly demonstrated that both Con A and LPS induced lymphoid cell proliferation in vitro in group I. There was an increase in activity after stimulation of LPS and its reduction after Con A in group II. This indicates a stimulating effect of flumequine on B lymphocytes. The results of this study are not conclusive as to the positive effect of the drug on the immune system of fish and indicate the need for caution in its use.

Keywords: carp, flumequine, lymphocytes, ANAE activity, proliferative activity, mitogens

Intensywnej hodowli ryb towarzyszy stała opieka służby weterynaryjnej, pomagająca utrzymać zwierzęta w stanie zdrowia i ograniczyć straty ekonomiczne hodowcom. Pomimo tego choroby zakaźne tła bakteryjnego ciągle powodują straty w gospodarstwach rybackich, które wynoszą 20-80% pogłowia ryb (23). Uważa się powszechnie, że do zagrożenia chorobowego dochodzi wtedy, kiedy następuje zaburzenie równowagi między organizmem ryby, środowiskiem i czynnikami chorobotwórczymi (36). Duże zagęszczenie ryb, możliwe deficyty tlenu oraz wahania odczynu wody, to najczęstsze czynniki stresogenne towarzyszące hodowli, obniżające odporność ryb i powodujące, że bakterie obecne w wodzie, nawet o małej patogenności, bądź saprofityczne, stają się potencjalnym zagrożeniem chorobowym (17). Bakterie z rodzaju *Aeromonas*, *Pseudomonas* i *Flavobacterium*, są najczęstszą przyczyną chorób o charakterze uogólnionym (posocznicy) lub miejscowym, związanym z uszkodzeniem

powłok ciała i skrzel (17, 18, 23). W przypadku wystąpienia danej jednostki chorobowej terapia celowana oparta na stosowaniu chemioterapeutyków jest konieczna i uzasadniona (17). Praktyczne zastosowanie w leczeniu chorób bakteryjnych u ryb znajdują: oksytetracyklina, kwas oksolinowy, flumechina, sarafloksacyna, enrofloksacyna, florfenikol, a także sulfonamidy i potencjonowane sulfonamidy (22, 25). Oprócz korzystnego działania antybakteryjnego należy przewidywać u ryb negatywne konsekwencje ich stosowania, tj.: degradację środowiska wodnego, zagrożenie dla stanu zdrowotnego zwierząt oraz jakości produktu spożywczego (1, 25, 26). Liczne doniesienia wskazują na immunosupresyjne działanie chemioterapeutyków na mechanizmy obronne ryb, szczególnie wiele badań poświęcono oksytetracyklinie (4, 8, 9, 28, 29, 37), znacznie mniej pozostałym lekom, w tym flumechinie (10). Wiadomo, że prawidłowo funkcjonujący układ odpornościowy jest niezbędny do eliminacji patogenu,

natomiast upośledzony system obrony zwiększa podatność na powtórne infekcje. W inicjacji odpowiedzi komórkowej i humoralnej podstawową rolę pełnią limfocyty T i B, nie tylko u ssaków (30), ale także u ryb (16). Limfocyty są klasyfikowane zgodnie z ich właściwościami immunologicznymi (30) i znajdują się w określonych proporcjach w krwi obwodowej ludzi i zwierząt (2, 14, 41). Jedną z metod rozróżniającą limfocyty T od limfocytów B jest barwienie cytochemiczne, wskazujące na obecność w tych komórkach esterazy alfa-naftylooctowej (ANAE) (11, 14, 24). Liczni badacze preferują tę metodę w diagnostyce chorób z zaburzeniami proliferacyjnymi (39), a także w ocenie dojrzałości układu immunologicznego (3). W medycynie ludzkiej, a także weterynaryjnej badania te mają zastosowanie przy rozpoznaniu białaczek, nowotworów, w przebiegu chorób wirusowych, bakteryjnych czy podczas działania ksenobiotyków (19, 33, 38). Badania te, powszechnie stosowane u ludzi, zwierząt doświadczalnych (myszy, szczurów), bydła, świń, ptaków (2, 3, 7, 13, 15, 20, 21, 41), w niewielkim zakresie wykonywane są u ryb (6, 34, 35).

Wyniki ilościowe dotyczące populacji limfocytów nie świadczą w pełni o sprawności obronnej układu immunologicznego, dopiero ich aktywacja pod wpływem antygeny rozpoczyna właściwą odpowiedź immunologiczną i decyduje o jej nasileniu. Aktywacja i proliferacja komórek T i B wywołana antygenem zachodzi *in vivo* w tkankach limfoidalnych, natomiast *in vitro* może być uwidoczniła przez kontakt limfocytów z aktywującymi czynnikami, do których między innymi należą mitogeny, tj.: fitohemaglutynina (PHA) i konkanawalina A (Con A), mitogeny stymulujące komórki T, lipopolisacharyd (LPS), stymulujący komórki B (5, 16, 30). Stopień proliferacji limfocytów po antygenowej lub mitogennej stymulacji jest stosowany jako parametr oceny immunokompetencji komórek (30, 40).

Celem badań była ocena wpływu flumechiny podanej karpom w karmie na skład procentowy leukocytów krwi obwodowej, aktywność esterazy alfa-naftylooctowej (ANAE) i aktywność proliferacyjną limfocytów stymulowaną konkanawaliną A (Con A) i lipopolisacharydem (LPS).

Materiał i metody

Do badań użyto 60 sztuk karpia jednorocznych, odłowionych z gospodarstwa rybackiego w województwie lubelskim, o średniej masie ciała 150 ± 10 g, które nie wykazywały objawów chorobowych i dotychczas nie otrzymywały antybiotyków. Ryby podzielono na 3 grupy i adaptowano je przez okres 2 tygodni do warunków akwariowych. Każda grupa obejmowała po 20 sztuk karpia i była przetrzymywana w 100 l akwariach, z napowietrzaniem i termoregulacją. Średnia temperatura wody w okresie doświadczenia wynosiła $20 \pm 1^\circ\text{C}$. W okresie tym ryby były karmione paszą firmy Hendrix przeznaczoną dla karpia. Podczas doświadczenia zawiesiny paszowe wraz z lekiem i bez leku były świeżo przygotowywane przed podaniem karpom na bazie

stosowanej paszy. Testowanym lekiem była flumechina, którą podano rybom grupy I w dawce 12 mg/kg m.c., jednorazowo, rybom grupy II w tej samej dawce, czterokrotnie, co drugi dzień. Rybom grupy kontrolnej podano jedynie samą zawiesinę paszową bez leku. Każda ryba w grupach doświadczalnych otrzymała 5 ml zawiesiny zawierającej odpowiednie stężenie leku w przeliczeniu na kg m.c., a w grupie kontrolnej bez leku. Zawiesinę podano rybom sondą do przewodu pokarmowego, po uprzednim zastosowaniu anestetyku MS-222 (Sigma) w stężeniu $0,1 \text{ g l}^{-1}$.

Po zakończeniu doświadczenia, po 24 i 96 godz. od podania ostatniej dawki leku, od 10 ryb doświadczalnych i kontrolnych pobrano każdorazowo do dalszych badań po 1 ml krwi z żyły ogonowej, do heparynizowanych probówek. Z każdej próby krwi wykonano 10 rozmazów, a pozostałą część materiału przeznaczono do izolacji limfocytów. Połowę rozmazów wybarwiono metodą rutynową May Grünwalda-Giemsy i przeznaczono do badań obrazu białokrwinkowego, zaś drugą połowę wykorzystano do badań cytochemicznych metodą Muellera (20), w celu identyfikacji limfocytów T. Metoda ta ujawnia w cytoplazmie limfocytów T obecność enzymu esterazy alfa-naftylooctowej (ANAE), w postaci pojedynczych lub kilku wyraźnych ziarnistości o zabarwieniu czerwono-brązowym. Rozmazy krwi po wysuszeniu i utrwaleniu w płynie Backera o pH 6,7 inkubowano w mieszaninie barwnika pararozaniliny (Sigma) i alfa-naftylooctanu (Sigma) o pH 5,8. W każdym rozmazie krwi obliczano procent komórek barwiących się pozytywnie na 200 limfocytów.

Aktywność proliferacyjną limfocytów krwi obwodowej oceniano w badaniu *in vitro*, metodą nieswoistej transformacji blastycznej, opartej na pomiarze inkorporacji radioaktywnie znakowanego prekursora kwasów nukleinowych H^3 – tymidyny. Limfocyty izolowano na Gradisolu o gęstości $1,06 \text{ g/ml}$. Mikrohodowle o objętości $0,2 \text{ ml}$ i stężeniu limfocytów $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ prowadzono w plastikowych mikropłytkach o okrągłym dnie (Sterilin, England) w płynie hodowlanym RPMI – 1640 z dodatkiem 10% surowicy cielęcej i antybiotyków, w obecności mitogenu konkanawaliny (Con A, $20 \mu\text{g/ml}$; Sigma) i lipopolisacharydu (LPS, $20 \mu\text{g/ml}$; Sigma). Próbę kontrolną stanowiły hodowle limfocytów ryb, którym nie podano antybiotyku. Po 48-godzinnej inkubacji dodano $20 \mu\text{l}$ ^3H -tymidyny (UVVVR Czechy) o aktywności $0,5 \mu\text{Ci}$. Po 24 godzinach komórki były izolowane, a następnie dokonano pomiaru stopnia wbudowania znakowanej tymidyny w DNA transformujących limfocytów przy użyciu licznika scyntylacyjnego Beckmana (LS 5000 TD, Beckman). Badania wykonano trzykrotnie dla każdej próby. Wyniki przedstawiono w postaci liczby impulsów/minutę (cpm/min.).

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej testem t-Studenta w programie Statistica 6.0 w zakresie średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego oraz dokonano porównań na poziomie $p \leq 0,05$ między grupami doświadczalnymi a grupą kontrolną.

Wyniki i omówienie

W grupie ryb kontrolnych, w obrazie białokrwinkowym najwyższy odsetek stanowiły limfocyty, których wartość wyniosła średnio $96,71 \pm 1,22\%$ i $98,10$

$\pm 0,56\%$, znacznie niższe wartości dotyczyły pozostałych krwinek; procent neutrofilii kształtował się na poziomie $2,80 \pm 0,26\%$ i $1,82 \pm 0,03\%$, a monocytów – $1,20 \pm 0,60\%$ i $1,35 \pm 0,20\%$ (tab. 1). U ryb grupy I, po jednorazowym podaniu flumechiny (12 mg/kg m.c.) nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w procencie limfocytów, natomiast wystąpił wzrost odsetka neutrofilii w stosunku do grupy kontrolnej (tab. 1). U ryb grupy II po czterokrotnym podaniu leku obserwowano spadek odsetka limfocytów ($86,75 \pm 2,50$) oraz wzrost neutrofilii ($11,36 \pm 0,15$), w drugim terminie pobrania. Różnice te były statystycznie istotne na poziomie $p \leq 0,05$ (tab. 1). W obu grupach doświadczalnych, we wszystkich terminach badań odsetek monocytów był zbliżony do grupy kontrolnej (tab. 1).

Wyniki badań nad procentowym udziałem limfocytów ANAE+ w krwi obwodowej karpi przedstawiono w tab. 1. W grupie ryb kontrolnych, w obu terminach badań odsetek komórek ANAE+ był na podobnym poziomie i wyniósł od $62,65 \pm 3,22\%$ do $63,25 \pm 1,15\%$. U ryb grupy kontrolnej, którym nie podano leku, wystąpiła przewaga komórek ANAE+ (limfocytów T) nad pozostałymi limfocytami (ANAE–). U ryb grupy I wystąpił niewielki spadek odsetka komórek ANAE+ (limfocytów T) w drugim terminie badania, bez statystycznie istotnych różnic, zaś u ryb grupy II w obu terminach badania stwierdzono statystycznie istotnie niższe wartości ($p \leq 0,05$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Najniższą wartość ($44,75 \pm 3,70\%$) stwierdzono u ryb grupy II po 96 godzinach od podania ostatniej dawki leku (tab. 1).

W badaniach nad aktywnością proliferacyjną limfocytów krwi obwodowej karpi stymulowanych mitogenami zaobserwowano u ryb grupy I statystycznie istotnie wyższą aktywność limfocytów niż w grupie kontrolnej, wyższą po zastosowaniu LPS niż po Con A w obu terminach badań (tab. 2). U ryb grupy II nastąpiło obniżenie wartości badanego parametru po stymulacji LPS, jednak wartości te nadal były statystycznie istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej (tab. 2). U ryb grupy II uzyskano znacznie niższą ($p \leq 0,05$) aktywność proliferacyjną limfocytów wobec mitogenu Con A w porównaniu z kontrolą (tab. 2). Wyniki badań nad aktywnością proliferacyjną limfocytów karpi stymulowanych LPS wskazują na pobudzenie aktywności proliferacyjnej limfocytów B, w obu grupach doświadczalnych i w obu terminach badań (tab. 2).

Jednym z najistotniejszych problemów hodowli karpi w gospodarstwach rybackich są często występujące choroby i śnięcia ryb, przynoszące hodowcom straty

Tab. 1. Odsetek krwinek białych: limfocytów, neutrofilii, monocytów i komórek ANAE+ w krwi obwodowej karpi doświadczalnych (grupa I i II) i kontrolnych (n = 10, $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Grupy ryb	Czas badania (h)	Limfocyty (%)	Neutrofile (%)	Monocyty (%)	Limfocyty ANAE+ (%)
Kontrola	24	$96,71 \pm 1,22$	$2,80 \pm 0,26$	$1,20 \pm 0,60$	$62,65 \pm 3,22$
	96	$98,10 \pm 0,56$	$1,82 \pm 0,03$	$1,35 \pm 0,20$	$63,25 \pm 1,15$
Grupa I	24	$92,56 \pm 2,40$	$6,50 \pm 1,22^*$	$1,82 \pm 0,50$	$65,40 \pm 2,32$
	96	$94,30 \pm 1,56$	$5,82 \pm 2,40^*$	$1,44 \pm 0,25$	$61,22 \pm 3,25$
Grupa II	24	$88,42 \pm 1,71$	$9,56 \pm 0,18^*$	$1,60 \pm 0,09$	$52,40 \pm 2,30^*$
	96	$86,75 \pm 2,50^*$	$11,36 \pm 0,15^*$	$0,98 \pm 0,08$	$44,75 \pm 3,70^*$

Objaśnienia: * różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$)

Tab. 2. Aktywność proliferacyjna limfocytów krwi obwodowej karpi kontrolnych i doświadczalnych wyrażona liczbą impulsów (cpm/minutę) (n = 10, $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Grupy ryb	Czas badania (h)	Mitogeny	
		Con A cpm/min. $\times 10^3$	LPS cpm/min. $\times 10^3$
Kontrola	24	$1,24 \pm 0,02$	$0,80 \pm 0,07$
	96	$1,62 \pm 0,15$	$0,95 \pm 0,04$
Grupa I	24	$2,50 \pm 0,96$	$4,65 \pm 0,18^*$
	96	$3,24 \pm 0,52^*$	$3,52 \pm 0,12^*$
Grupa II	24	$0,68 \pm 0,09^*$	$1,54 \pm 0,02^*$
	96	$0,84 \pm 0,11^*$	$1,75 \pm 0,04^*$

Objaśnienia: * różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$)

ekonomiczne. Stosowane w leczeniu chemioterapeutyki, z jednej strony, są pomocne w likwidacji czynnika infekcyjnego, z drugiej, mogą wpływać niekorzystnie na układ immunologiczny (27). Wyniki badań własnych dotyczące obrazu białokrwinkowego nie są jednoznaczne. Na obniżenie odsetka limfocytów i wzrost neutrofilii, szczególnie u ryb grupy II, mógł mieć wpływ zarówno lek, jak również stres, którym ryby były poddane podczas czterokrotnego podawania leku. Wzrost odsetka neutrofilii stwierdzony u ryb grupy II mógł być również następstwem generowanego stanu zapalnego przez ksenobiotyk (38).

Zastosowana w badaniach metoda cytochemiczna do identyfikacji limfocytów ANAE+ w krwi ryb okazała się metodą przydatną, dającą powtarzalne wyniki. Metoda ta, w porównaniu do nowoczesnych technik, w tym immunochemicznych czy cytometrii przepływowej, jest metodą tańszą, prostszą i szybszą, nie wymaga izolacji limfocytów, pozwala na wydłużenie czasu badania, ponieważ esterazy na wysuszonych rozmazach krwi są stabilne nawet do 6 tygodni, bez utraty aktywności enzymatycznej (7). W mieszaninie inkubacyjnej przy pH 5,8 zwiększa się aktywność enzymu, następuje skurcz lizosomów, dochodzi do degranulacji enzymu, co uwiadcza się jako barwny produkt reakcji w postaci jednej lub kilku ziarnistości koloru czerwono-brązowego, leżących pod błoną cytoplazmatyczną lub wewnątrz komórek (42). Wielu

autorów prac podkreśla, że aktywność esterazy alfa-naftylooctowej (ANAE) stanowi wiarygodny marker cytochemiczny dla limfocytów T, obecnych w krwi i tkankach limfatycznych organizmu (7, 24). Obecność esteraz w lizosomach limfocytów T, które hydrolizują proste estry, tj. octan naftyli, nadaje komórkom właściwości cytotoksyczne (3), jednak barwieniem cytochemicznym nie można wykazać równoznaczności limfocytów ANAE+ z komórkami cytotoksycznymi. Badania przeprowadzone u ludzi, a także u wielu gatunków ssaków i ptaków dowodzą, że komórki ANAE pozytywnie dominują nad negatywnymi, jednak ich procent nie jest wielkością stałą, zależy od gatunku zwierzęcia, a także stanu funkcjonalnego i dojrzałości układu immunologicznego (3, 7, 13, 15, 21, 41). Podobnie jak u ssaków, również u ryb stwierdzono tę zależność; u karpia kilkumiesięcznych odsetek ANAE+ wynosił $37,5 \pm 2,8\%$ (34), a u karpia jednorocznych, w badaniach własnych, średnia wartość wyniosła $63,25 \pm 1,15\%$. Ponadto, wyniki uzyskane u ryb grupy II, dotyczące aktywności enzymatycznej limfocytów wskazują na immunosupresyjne działanie flumechiny podanej kilkakrotnie rybm, w przeciwieństwie do braku tej reakcji po jednokrotnym podaniu leku. Podobną toksyczność, indukowaną ksenobiotykami stwierdzono u myszy po działaniu alfatoksyny (38).

Na zależność aktywności proliferacyjnej limfocytów od częstotliwości podawanego leku i zastosowanego mitogenu wskazują wyniki badań własnych. Jednorazowe podanie flumechiny miało wpływ stymulujący zarówno na limfocyty T jak i B, natomiast czterokrotne podanie leku obniżyło aktywność proliferacyjną limfocytów wobec Con A i w mniejszym stopniu wobec LPS. Wyniki te wskazują na stymulujący wpływ flumechiny na aktywność proliferacyjną limfocytów B i supresyjny na limfocyty T. Ocena wpływu flumechiny na aktywność układu immunologicznego na podstawie testu proliferacji limfocytów nie jest jednak pełna. Test ten nie zapewnia wglądu w funkcję całego systemu obronnego organizmu. Wpływ leku może być w większym lub mniejszym stopniu osłabiony poprzez interakcje z innymi funkcjami immunologicznymi, a także wobec patogenów w warunkach naturalnych. Dotychczasowe badania nad wpływem chinolonów na aktywność komórek układu immunologicznego nie są jednoznaczne. Hussy i wsp. (12) stwierdzili zmniejszenie, a nawet zahamowanie proliferacji ludzkich limfocytów przez niektóre leki należące do tej grupy. W badaniach przeprowadzonych u węgorzy po podaniu flumechiny wraz z karmą, w dawce 10 mg/kg m.c., w badaniach *in vivo* stwierdzono stymulujące działanie leku i wzrost aktywności proliferacyjnej limfocytów (10). Badania te, jak i wyniki badań własnych, wskazują na bezpieczne stosowanie chinolonów u ryb jedynie przy podaniu jednorazowym, nie wielokrotnym, które jest na ogół postępowaniem terapeutycznym (22, 31, 32).

Pomimo że flumechina podana w niskich stężeniach nasila proliferację limfocytów głównie B, w warunkach *in vitro*, to w warunkach naturalnych, biorąc pod uwagę wiele dodatkowych zdarzeń towarzyszących podawaniem chemioterapeutyk, a także możliwości powstawania szczepów opornych, zanieczyszczenie środowiska i pozostałości leku w mięsie ryb przeznaczonym do konsumpcji, zaleca się ostrożność w jej stosowaniu.

Piśmiennictwo

1. Alcaide E., Blasco M. D., Esteve C.: Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. *Res. Microbiol.* 2010, 161, 40-45.
2. Asti R. N., Alabay B., Kurtde N., Altunay H., Ergun L.: Determination of alpha-naphthyl acetate esterase activity in peripheral blood leukocytes in the different animal species. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 1996, 43, 129-133.
3. Bayraktaroglu A. G., Simsek O., Kurum A., Arian S., Ergun E.: Determination of alpha-naphthyl acetate esterase (ANAE) activity in peripheral blood leukocytes of pregnant, adult, and kitten Angora cats. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2015, 39, 57-61.
4. Bogert C., van den Kroon A. M.: Effects of oxytetracycline on *in vivo* proliferation and differentiation of erythroid and lymphoid cells in the rat. *Clin. Exp. Immunol.* 1982, 50, 327-335.
5. Caspi P. R., Shahrabani R., Kehati-Dan T., Avtalion R. R.: Heterogeneity of mitogen responsive lymphocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunol.* 1984, 8, 61-70.
6. Donmez H. H., Sur E., Boydak M.: Determination of alpha naphthyl acetate esterase activity in peripheral blood leucocytes of Kangal fish (*Garra rufa*). *Vet. Bil. Derg.* 2007, 21, 81-84.
7. Ergün E., Ergün L., Ozen A., Asti R. N.: Determination of alpha naphthyl acetate esterase activity in the peripheral blood leukocytes of ostrich (*Struthio camelus massaicus*). *Revue Med. Vet.* 2004, 155, 147-150.
8. Grondel J. L., Boesten H. J. A. M.: The influence of antibiotics on the immune system. I. Inhibition of the mitogenic leukocyte response *in vitro* by oxytetracycline. *Dev. Comp. Immunol. Suppl.* 1982, 2, 211-216.
9. Grondel J. L., Gloudemans A. G., van Muiswinkel W. B.: The influence of antibiotics on the immune system. II. Modulation of fish leukocyte responses in culture. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1985, 9, 251-260.
10. Heijden M. H. van der, Booms G. H., Tanck M. W., Rombout J. H., Boon J. H.: Influence of flumequine on *in vivo* mitogen responses of European eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) lymphoid cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1995, 47, 143-152.
11. Higgy K. E., Burns G. F., Hayhoe F. G.: Discrimination of B, T and null lymphocytes by esterase cytochemistry. *Scand. J. Haematol.* 1977, 18, 437-448.
12. Hussy P., Maass G., Tümmeler B., Grosse F., Schomburg U.: Effect of 4-quinolones and novobiocin on calf thymus DNA polymerase alpha primase complex, topoisomerases II and II, and growth of mammalian lymphoblasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986, 29, 1073-1078.
13. Kajikawa D. V. M., Koyama H., Yushikawa T., Tsubaki S.: Use of alpha-naphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1983, 44, 1549-1552.
14. Knowles D. M., Hoffman T., Ferrarini M., Kunkel H. G.: The demonstration of acid alpha-naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes usefulness as a T cell marker. *Cell. Immunol.* 1978, 35, 112-123.
15. Karaca T., Cemek M., Kanter M.: Lipid peroxidation and antioxidant levels, and alpha naphthyl acetate esterase activity of peripheral blood lymphocytes in Mallard, Muscovy and Pekin ducks. *Acta Vet. Brno* 2006, 75, 33-38.
16. Koumans-van Diepen J. C. E., Harmsen E. G. M., Rombout J. H. W. M.: Immunocytochemical analysis of mitogen responses of carp (*Cyprinus carpio* L.) peripheral blood leucocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994, 42, 209-219.
17. Kosińska A.: Bakteryjne choroby ryb diagnozowane w Polsce i możliwości ich zwalczania, [w:] Żelazny J., Reichert M. (red.): Zagrożenie zdrowia ryb i możliwości ochrony. Wyd. PIWet-PIB, Puławy 2014, s. 157-175.
18. Kosińska A., Pękala A.: Zaburzenia w hodowli ryb słodkowodnych powodowane przez bakterie, [w:] Żelazny J. (red.): Perspektywy i możliwości zwalczania chorób ryb. Wyd. PIWet-PIB, Puławy 2010, s. 95-111.
19. Kulenkampff J., Janossy G., Greaves M. F.: Acid esterase in human lymphoid cells and leukaemic blasts: a marker for T lymphocytes. *Br. J. Haematol.* 1977, 36, 231-240.

20. Mueller J., Brun del Re G., Buerki H., Keller H. U., Hess M. W., Cottier H.: Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur. J. Immunol.* 1975, 5, 270-274.
21. Mueller J., Keller H. U., Hagmann J. D., Cornioley R. J., Ruchti C., Cottier H.: Nonspecific esterase in human lymphocytes. *Int. Arch. Allergy Appl.* 1981, 64, 410-421.
22. Pękala A.: Zastosowanie chemioterapeutyków w leczeniu bakteryjnych chorób ryb, [w:] Żelazny J. (red.): Perspektywy i możliwości zwalczania chorób ryb. Wyd. PIWet-PIB, Puławy 2010, s. 129-143.
23. Pękala A.: Zagrożenia wynikające z niewłaściwego stosowania chemioterapeutyków u ryb, [w:] Żelazny J., Reichert M. (red.): Zagrożenie zdrowia ryb i możliwość ochrony. Wyd. PIWet-PIB, Puławy 2014, s. 201-219.
24. Pinkus G. S., Hargreaves H. K., McLeod J. A., Nadler L. M., Rosenthal D. S., Said J. W.: α -Naphthyl acetate esterase activity-A cytochemical marker for T lymphocytes. *Am. J. Vet. Pathol.* 1979, 97, 17-42.
25. Posyniak A., Mitrowska K.: Efektywność i bezpieczeństwo antybiotykoterapii u ryb słodkowodnych, [w:] Żelazny J., Reichert M. (red.): Zagrożenie zdrowia ryb i możliwość ochrony. Wyd. PIWet-PIB, Puławy 2014, s. 177-201.
26. Posyniak A., Żelazny J., Żmudzki J., Niedzielska J., Semeniuk S.: Residue depletion of flumequine from liver and muscle tissue of juvenile carp, *Cyprinus carpio* L., following different routes of administration. *Pol. J. Vet. Sci.* 1999, 2, 99-112.
27. Radomska M.: Antybiotyki a układ odpornościowy. *Reumatologia* 1994, 32, 63-95.
28. Rijkers G. T., Teunissen A. G., van Oosterom R., van Muiswinkel W. B.: The immune system of cyprinid fish. The immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp. *Aquaculture* 1980, 19, 177-189.
29. Rijkers G. T., van Oosterom R., van Muiswinkel W. B.: The immune system of cyprinid fish. Oxytetracycline and the regulation of humoral immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1981, 2, 281-290.
30. Roitt I. M., Brostoff J., Male D. K.: Immunologia. J. Żeromski (red.), Wyd. Med. Warszawa 1996.
31. Samuelsen O. B.: Pharmacokinetics of quinolones in fish: A review. *Aquaculture* 2006, 255, 55-75.
32. Samuelsen O. B., Bergh O.: Efficacy of orally administered florfenicol and oxolinic acid for the treatment of vibriosis in cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 2004, 235, 27-35.
33. Sen I., Turgut K., Celik I., Kiran M. M.: The importance of lymphocyte enzyme profile, inclusion bodies in circulating leukocytes conjunctival smear samples in the diagnosis on canine distemper virus infection. *Indian Vet. J.* 2002, 79, 213-217.
34. Sopińska A., Grochola A.: Kształtowanie się wybranych parametrów odporności wrodzonej i adaptacyjnej u karpi w drugim sezonie hodowlanym. *Med. Weter.* 2018, 74, dx.doi.org/10.21521/mw.5979.
35. Sopińska A., Grochola A.: Wpływ preparatu TFX na aktywność proliferacyjną limfocytów karpi w badaniach in vivo i in vitro. *Med. Weter.* 2016, 72, 307-311.
36. Svobodová Z., Lloyd R., Máchová J., Vykusová B.: Water quality and fish health. EIFAC Technical Paper. No 54, FAO, Rome 1993, 59.
37. Terech-Majewska E., Siwicki A. K.: Wpływ oksytetracykliny na aktywność metaboliczną i fagocytarną makrofagów oraz odpowiedź proliferacyjną limfocytów karpia i suma europejskiego. *Med. Weter.* 2006, 62, 1431-1434.
38. Tuzcu M., Sur E., Celik I., Öznurlu Y., Ciftci M. K.: Effects of aflatoxin on the proportions of peripheral blood leukocytes and alpha-naphthyl acetate esterase (ANAE) positive lymphocytes in the mouse. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2010, 16, 337-341.
39. Wada N., Prieur A. M., Griscelli C.: Nonspecific alpha-naphthyl acetate esterase activity of T-lymphocytes: study in healthy newborns and children, in immune deficiencies and juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatr. Res.* 1981, 15, 1266-1270.
40. Warr G. W., Simon R. C.: The mitogen response potential of lymphocytes from the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) re-examined. *Dev. Comp. Immunol.* 1983, 7, 379-384.
41. Yang T. J., Jantzen P. A., Williams L. F.: Acid α -naphthyl acetate esterase: presence of activity in bovine and human T and B lymphocytes. *Immunology* 1979, 38, 85-93.
42. Zicca A., Leprini A., Cadoni A., Franzi A. T., Ferrarini M., Grossi C. E.: Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acid esterase in human TM lymphocytes. *Am. J. Pathol.* 1981, 105, 40-46.

Adres autora: prof. dr hab. Antonina Sopińska, Akademicka 12, 20-033 Lublin, Poland; e-mail: antonina.sopinska@up.lublin.pl