

Wpływ oksytetracykliny na aktywność metaboliczną i fagocytarną makrofagów oraz odpowiedź proliferacyjną limfocytów karpia i suma europejskiego

ELŻBIETA TERECH-MAJEWSKA*, ANDRZEJ K. SIWICKI

*Zespół Epizootiologii, Zespół Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej Katedry Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn

Terech-Majewska E., Siwicki A. K.

Influence of oxytetracycline on the metabolic and phagocyte activity of macrophages and the proliferative response of lymphocytes in Carp and European Catfish

Summary

Oxytetracycline (OTC) is an antibiotic used in fish farming in many countries. It is an effective drug against many bacterial diseases occurring in breeding conditions. It is believed that OTC induces immunosuppression in humans and many animal species. The aim of the study was to examine the influence of OTC on the basic functions of Carp (*Cyprinus carpio*) and European Catfish (*Silurus glanis*) immune systems. The study used 200 Carp fry (50-100 g body weight) and 200 Catfish fry (80-100 g body weight). The fish were kept in plastic tanks (500-1000 litre capacity) in a water temperature of 20-22°C. OTC was applied by intraperitoneal injection at a dose of 10 mg/kg body weight. The results of the study indicate that OTC induces the suppression of metabolic (Respiratory Burst Activity) and phagocyte function (Phagocyte Killing Activity) in Carp and European Catfish macrophages, as well as increasing the proliferative response of lymphocytes. The alteration dynamics clearly indicate that suppression is temporary. In practice OTC is used in 75-100 mg/kg body weight doses over a couple of days (Carp, Catfish, and Trout). Longer suppression may make the fish susceptible to secondary infections.

Keywords: fish immunology, immunosuppression

Chemioterapia w akwakulturze stała się narzędziem stosowanym w celu ograniczenia strat hodowlanych i często jest jednym z najskuteczniejszych środków przeciwdziałania oraz kontroli chorób bakteryjnych ryb (24). Antybiotykoterapia jest najczęściej stosowanym zabiegiem chemioterapeutycznym w rybactwie. Współczesne podejście do zagadnienia stosowania antybiotyków budzi wiele kontrowersji, leki są stosowane w paszy (bez osłon) bezpośrednio do środowiska, w którym mogą powodować niekorzystne zjawiska. Pozostałości leków w jadalnych tkankach ryb to problem związany z odpowiedzialnością za zdrowie konsumenta. Niekorzystny wpływ na organizm leczonych zwierząt, to główny dylemat przy wyborze leku. Do tego typu efektów należą uszkodzenia narządów, w których leki gromadzą się w dużych stężeniach (nerki, wątroba), zaburzenia ze strony układu pokarmowego, nadkażenia innymi drobnoustrojami, a także oddziaływanie na funkcje komórek układu odpornościowego (28). Sprawność układu immunologicznego jest podstawą efektu terapeutycznego stosowanych leków, gdyż dzięki funkcjom fagocytarnym i bójczym możliwa jest eliminacja drobnoustrojów z organizmu ryb.

Tetracykliny są jednymi z pierwszych antybiotyków wprowadzonych do terapii ryb hodowlanych. Stosowane są ze względu na szerokie spektrum działania i dużą skuteczność, przy jednoczesnym stosunkowo niskim koszcie leczenia. Lekiem z tej grupy o największym znaczeniu w ichtioterapii jest oksytetracyklina (OTC), efektywna w stosunku do większości drobnoustrojów patogennych dla ryb – *Flexibacter sp.*, *Vibrio sp.*, *Aeromonas sp.*, *Yersinia sp.*, *Edwardsiella sp.* Tetracykliny uważa się za środki o działaniu immunosupresyjnym (2, 25). Liczne badania wykazały, że oksytetracyklina działa supresyjnie na mechanizmy obronne ryb (14, 19). Oksytetracyklina upośledza fagocytozę i wewnątrzkomórkowe mechanizmy bójcze oraz cytotoksyczność limfocytów T u ludzi i u wielu gatunków zwierząt (2, 25).

Badania podjęto w celu oceny wpływu OTC na nieswoiste mechanizmy obronne u ryb (*in vivo*). Do badań wybrano gatunki, które mają podobne wymagania temperaturowe, ale zupełnie inne potrzeby biologiczne i metabolizm. W warunkach intensywnej hodowli (np. w wodzie pochłodniczej z elektrowni) ryby tych gatunków dobrze tolerują podobne środowisko. Reakcje nieswoiste pełnią rolę pierwszej linii obrony

i ich skuteczność nierzadko decyduje o dalszym rozwoju procesu chorobowego.

Celem badań było określenie wpływu oksytetracykliny na aktywność metaboliczną i fagocytarną komórek PMN-polimorfonuklearnych i MN-mononuklearnych oraz odpowiedź proliferacyjną limfocytów T i B u karpia i suma europejskiego.

Materiały i metody

Badania prowadzono na narybku karpia (*Cyprinus carpio L.*) o masie 50-100 g i suma europejskiego (*Silurus glanis L.*) o masie 80-100 g. Łącznie użyto 400 ryb. Ryby przetrzymywano w basenach plastikowych o pojemności 500-1000 l, w wodzie o temperaturze 20-22°C. Karpie pochodziły z Rybackiego Zakładu Doświadczalnego Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Żabieńcu, sumy z Ośrodka Doświadczalnego Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Zatorze. Każdorazowo ryby adaptowano do warunków laboratoryjnych przez okres 14 dni. Karmiono je paszą standardową o zawartości białka 35%. Przed pobraniem krwi i narządów do badań immunologicznych ryby wprowadzano w stan znieczulenia ogólnego preparatem Propiscin (IRŚ Żabieniec). Krew do badań pobierano z żyły ogonowej lub bezpośrednio z serca przy użyciu zestawu Vacuette (Greiner Labortechnik). We wszystkich układach doświadczeń krew oraz nerkę głowową pobierano od 10 sztuk ryb każdej grupy doświadczalnej przed podaniem oksytetracykliny oraz w określonych terminach po jej podaniu: w 2., 4., 8., 12., 14. i 21. dniu. Do badań użyto oksytetracykliny (Polfa, Kutno), którą stosowano w iniekcji dootrzewnowej jednorazowo, w dawce 10 mg/kg masy ciała.

Aktywność metaboliczną neutrofilii i makrofagów określano metodą wewnątrzkomórkowego wybuchu tlenowego (RBA – Respiratory Burst Activity) po stymulacji komórek PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Sigma) wg metody opisaną przez Siwickiego i wsp. (30).

Aktywność fagocytarną komórek PMN i MN określano metodą spektrofotometryczną przy użyciu testu PKA (Potential Killing Activity) opisanego przez Rook i wsp. (26), w modyfikacji Siwickiego i Andersona (29).

Poziom odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów stymulowanych mitogenami: konkanawaliną A (ConA-Sigma) i lipopolisacharydami (LPS-Sigma) określano metodą spektrofotometryczną, przy zastosowaniu testu MTT opisanego przez Mosmanna (23) w modyfikacji Siwickiego i wsp. (32).

Do izolacji komórek pobierano krew oraz nerkę głowową. Tkankę narządu rozcierano, dodając medium RPMI 1640 z dodatkiem 10 j.m./cm³ heparyny. Komórki wirowano dwukrotnie w celu maksymalnego oczyszczenia. Następnie komórki rozcieńczano do stężenia 1 × 10⁶ komórek/cm³ w RPMI-1640 (Sigma) z dodatkiem hepesu, L-glutaminy oraz 10% surowicy płodowej (FCS-Gibco). Żywotność komórek określano metodą rutynową po wybarwieniu w roztworze błękitu trypanu.

Odczyt ekstynkcji prowadzono we wszystkich testach przy długości fali 620 nm. Wyniki badań poddano analizie statystycznej, określając średnią, odchylenie standardowe i istotność różnic $p \leq 0,05$ przy użyciu testu t-Studenta.

Wyniki i omówienie

Badania wykazały, że oksytetracyklina po jednorazowym podaniu dootrzewnowo w dawce 10 mg/kg m.c., wyraźnie obniża poziom aktywności metabolicznej (RBA) oraz fagocytarnej (PKA) leukocytów. Poziom ekstynkcji tej reakcji był najniższy pomiędzy 12. a 14. dniem po podaniu ksenobiotyku zarówno u karpia, jak i u suma. Kinetykę zmian w aktywności metabolicznej leukocytów określanej poziomem wybuchu tlenowego (RBA) stymulowanego PMA oraz w aktywności fagocytarnej leukocytów określanej zdolnością do wewnątrzkomórkowego zabijania (PKA) bakterii *Aeromonas hydrophila* u karpia (tab. 1). Statystycznie istotny spadek poziomu badanych parametrów między 4. a 12. dniem po podaniu oksytetracykliny wskazuje na obniżenie aktywności metabolicznej i bójczej leukocytów w porównaniu z kontrolą. Supresja utrzymywała się do 14. dnia, w dniu 21. stwierdzano powrót parametrów do stanu wyjściowego.

W tab. 2 przedstawiono kinetykę zmian w poziomach odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów stymulowanych mitogenami ConA i LPS u karpia. Stwierdzono statystycznie istotny spadek odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów na mitogeny pomiędzy 4. a 12. dniem po podaniu oksytetracykliny (najniższy poziom w 8. dniu po podaniu oksytetracykliny).

Kinetyka zmian RBA i PKA u suma europejskiego (tab. 3) kształtowała się podobnie jak u karpia, z wyraźnym obniżeniem pomiędzy 2. a 12. dniem. Obniżone poziomy oznaczanych parametrów utrzymywały się do 12. dnia po podaniu oksytetracykliny.

Odpowiedź proliferacyjna limfocytów stymulowanych Con A i LPS u suma europejskiego (tab. 4) była najniższa pomiędzy 2. a 12. dniem. Największy spadek odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów zanotowano w 4. dniu.

Wpływ tetracyklin na funkcje komórek fagocytyujących może dotyczyć zarówno etapu pochłaniania cząstek, jak również zabijania wewnątrzkomórkowego. W obu przypadkach efekty działania uzależnione są od stężenia leku, czasu ekspozycji komórek oraz ilości jonów wapniowych w środowisku. Warunkiem koniecznym fagocytozy jest wejście komórki żernej w bezpośredni kontakt z drobnoustrojem, tetracykliny powodują zmniejszoną adhezję fagocytów na skutek zmian morfologicznych komórek (5). Oddziaływanie takie dotyczy szczególnie wyższych stężeń tetracyklin, które mogą powodować zmniejszenie elastyczności błony komórkowej, utratę pseudopodiów, a w efekcie osłabiać aktywność fagocytarną (6, 7). OTC upośledza tworzenie aktyny F, białka cytoszkieletu, decydującego o aktywności ruchowej komórki. Chelatowanie jonów wapniowych w efekcie zakłóca zależne od nich mechanizmy odpowiedzialne za formowanie dimerów i trimerów aktyny (8). Neutrofile są szczególnie wrażliwe na obniżony poziom Ca²⁺. Związanie wewnątrzkomórkowych jonów wapnia hamuje dojrzewanie fagosomów, uniemożliwiając ich fuzję z lizosomami (22). Wysoka aktywność OTC w chelatowaniu Ca²⁺ może być przyczyną osłabiania mechanizmu wewnątrzkomórkowego zabijania tlenowego sfagocytowanego materiału, ponieważ wzrost stężenia jonów wap-

Tab. 1. Wpływ oksytetracykliny podanej w iniekcji dootrzewnowo na aktywność metaboliczną i fagocytarną leukocytów, określoną wybuchem tlenowym stymulowanym PMA (RBA) oraz zdolnością do wewnątrzkomórkowego zabijania (PKA) bakterii *A. hydrophila* u karpia (n = 10; $\bar{x} \pm SD$)

Rodzaj testu	Dni po podaniu oksytetracykliny						
	0	2	4	8	12	14	21
RBA	0,34 ± 0,03	0,31 ± 0,04	0,18 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,25* ± 0,05	0,31 ± 0,03	0,32 ± 0,02
PKA	0,31 ± 0,04	0,29 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,04	0,29* ± 0,05	0,33 ± 0,04	0,34 ± 0,03

Objaśnienie: * p ≤ 0,05.

Tab. 2. Wpływ oksytetracykliny podanej w iniekcji dootrzewnowo na odpowiedź proliferacyjną limfocytów stymulowanych ConA i LPS u karpia (n = 10; $\bar{x} \pm SD$)

Rodzaj testu	Dni po podaniu oksytetracykliny						
	0	2	4	8	12	14	21
ConA	0,41* ± 0,05	0,38* ± 0,05	0,19 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,21* ± 0,05	0,39* ± 0,05	0,40* ± 0,05
LPS	0,35* ± 0,05	0,30 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,15 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,36 ± 0,04	0,35 ± 0,04

Objaśnienie: jak w tab. 1.

Tab. 3. Wpływ oksytetracykliny podanej w iniekcji dootrzewnowo na aktywność metaboliczną i fagocytarną leukocytów, określoną wybuchem tlenowym stymulowanym PMA (RBA) oraz zdolnością do wewnątrzkomórkowego zabijania (PKA) bakterii *A. hydrophila* u sumy europejskiego (n = 10; $\bar{x} \pm SD$)

Rodzaj testu	Dni po podaniu oksytetracykliny						
	0	2	4	8	12	14	21
RBA	0,25* ± 0,05	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,27 ± 0,03
PKA	0,23 ± 0,04	0,18 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,16 ± 0,04	0,19 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,24 ± 0,02

Objaśnienie: jak w tab. 1.

Tab. 4. Wpływ oksytetracykliny podanej w iniekcji dootrzewnowo na odpowiedź proliferacyjną limfocytów stymulowanych ConA i LPS u sumy europejskiego (n = 10; $\bar{x} \pm SD$)

Rodzaj testu	Dni po podaniu oksytetracykliny						
	0	2	4	8	12	14	21
ConA	0,36 ± 0,04	0,30 ± 0,04	0,23 ± 0,03	0,27 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,34 ± 0,04	0,35 ± 0,03
LPS	0,27* ± 0,05	0,22 ± 0,03	0,20 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,25 ± 0,03	0,28 ± 0,04	0,26 ± 0,03

Objaśnienie: jak w tab. 1.

niowych jest istotnym elementem wyzwalającym ten proces.

U ryb, podobnie jak u ssaków, stymulacja błony komórkowej komórek żernych powoduje aktywację kompleksu oksydaza NADPH i wytworzenie reaktywnych form tlenowych o właściwościach bakteriobójczych, co określane jest terminem wewnątrzkomórkowego wybuchu tlenowego. Supresyjne oddziaływanie OTC na produkcję wolnych rodników tlenowych stwierdzane było w badaniach *in vitro* u różnych gatunków ryb, przy bardzo różnych poziomach stężenia leku (20). Podczas terapii ryb tetracykliny osiągają wysokie stężenia, znacznie przewyższające stężenia w osoczu, w narządach bogatych w komórki żerne, jak np. nerka głowowa (10, 21).

Tetracykliny mogą również zakłócać procesy odpornościowe, w które zaangażowane są limfocyty. Stężenia OTC rzędu 6 µg/cm³ upośledzają przyłączenie ³H-tymidyny do DNA limfocytów karpia, stymulowanych PHA,

co świadczy o hamującym wpływie leku na zdolność limfocytów T do odpowiedzi proliferacyjnej na antygen (9). Lunden i wsp. (19) w badaniach *in vitro* i *in vivo* na narybku pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) obserwowała efekt supresyjnego oddziaływania OTC. Autorzy wykazali, że podawanie rybom antybiotyku w dawce 75 mg/kg m.c. *per os* przez 10 dni powoduje osłabienie aktywności proliferacyjnej komórek izolowanych z nerki głowowej o 40% w przypadku limfocytów B i o ponad 60% dla limfocytów T.

Wydaje się, że OTC może wpływać na tempo proliferacji limfocytów w dwojaki sposób. Po pierwsze, jako chelator jonów wapnia, zmniejsza ich ilość w otoczeniu komórek, uniemożliwiając tym samym napływ Ca²⁺ do limfocytów po pobudzeniu komórek mitogenami, co upośledza syntezę DNA i RNA (9, 22). Druga interakcja polega na hamowaniu syntezy białek mitochondrialnych, co zaburza biogenezę mitochondrialną, może zachodzić już przy niższych stężeniach OTC (18). Tetracykliny oddziałują na komórki bakteryjne poprzez wiązanie się z podjednostką 30 S rybosomów i hamowanie syntezy białka drobnoustrojów. Istnie-

ją doniesienia wykazujące, iż OTC w koncentracjach > 20 µg/cm³ może blokować także syntezę białek mitochondrialnych w komórkach eukariotycznych, a w stężeniach > 50 µg/cm³, syntezę białek cytoplazmatycznych (19). Zaburzenie syntezy białek w mitochondriach powoduje obniżenie poziomu enzymów uczestniczących w podziałach komórkowych i prowadzi do osłabienia lub całkowitego zniesienia zdolności komórek do proliferacji, jak również osłabienia potencjału metabolicznego tkanek. Efektem może być osłabienie wytwarzania przeciwciał po podawaniu OTC (9, 11).

Prowadzone w wielu ośrodkach badania nad wpływem chemioterapeutyków wykazały ich negatywny wpływ na komórkowe i humoralne mechanizmy obronne u ryb (3, 8, 14, 31). Ten efekt uboczny stosowania antybiotyków potwierdziło wielu badaczy (2, 6, 25). Antybiotyki są to preparaty, które nie eliminują mikroorganizmów z organizmu, mogą je zabijać (aktywność bójcza) bądź hamo-

wać ich wzrost (aktywność bakteriostatyczna). Wspomagają pośrednio naturalne mechanizmy obronne (fagocytozę) oczyszczające organizm z uszkodzonych mikroorganizmów i ich toksyn. Przy braku odpowiednich elementów reakcji odpornościowej, prawidłowa likwidacja infekcji jest niemożliwa. Badania własne przeprowadzone na karpniu i sumie europejskim również wykazały supresyjne działanie oksytetracykliny na nieswoiste komórkowe mechanizmy obronne po jednorazowej dawce 10 mg/kg, utrzymujący się przez kilka dni efekt supresji funkcji metabolicznej, fagocytarnej i proliferacyjnej może sprzyjać wtórnym infekcjom oraz obniżyć potencjał adaptacyjny.

Trzeba także mieć na uwadze fakt, że OTC jest antybiotykiem dosyć trudnym ulegającym biodegradacji w środowisku wodnym, szczególnie w akwenach o dużej ilości osadów (15, 16, 27). W osadach dennych tetracykliny tworzą kompleksy z jonami Ca i Mg, co utrudnia nie tylko biodegradację leku, ale sprzyja długotrwałemu pozostawianiu w środowisku i zwiększaniu lekooporności (1, 12, 13, 33). Tetracykliny stwierdza się w osadach w trakcie podawania tego leku rybom (nawet do 100%), jak również na poziomie 10-50% do 18 miesięcy po podaniu leku (21, 27). Równocześnie stwierdzono, że tetracykliny mogą wpływać na skład gatunkowy i ilościowy naturalnej flory jelitowej u ryb (32). W warunkach eksperymentalnych stwierdzono hamujący wpływ tetracykliny na przemiany fizykochemiczne w wodzie, co może także sprzyjać zatruciom ryb zwłaszcza związkami azotowymi (17). Pozostałości antybiotyku stwierdzano także w tkankach ryb dziko żyjących i zooplanktonie w pobliżu farm, gdzie leczono ryby (4).

Ryba jest jednym z najistotniejszych elementów ekosystemu wodnego, nawet jeśli są to warunki hodowli. Jest bezpośrednio narażona na wszystkie elementy skażenia środowiska. Szczególnie istotne jest to, że antybiotyki mogą przez długi okres krążyć w łańcuchu pokarmowym w stężeniach znacznie niższych od farmakologicznych i powodować niepożądane zjawiska w organizmach zwierząt oraz ludzi. Układ immunologiczny ryb funkcjonuje na podobnych zasadach jak u ssaków, pomimo odrębności anatomiczno-fizjologicznych. Aspekt ten wydaje się mieć ogromne znaczenie w badaniach porównawczych nad mechanizmami obronnymi i pozwala uznać ryby za zwierzęta modelowe dla analizy wpływu różnych ksenobiotyków na układ odpornościowy ludzi i innych zwierząt.

Biorąc pod uwagę złożoność problemów w terapii ryb, wiele ośrodków poszukuje metod alternatywnych. Bardzo efektywną metodą jest immunomodulacja, przy użyciu immunomodulatorów naturalnych. Jest to skuteczna alternatywa dla hodowli o dużym ryzyku zanieczyszczeń środowiskowych, w celu osłony immunohomeostazy, ale nadal niedoceniana przez lekarzy i hodowców.

Piśmiennictwo

1. Austin B.: Antibiotic pollution from fish farms: effect on aquatic microflora. *Microbiol. Sci.* 1985, 2, 113-117.
2. Banck G., Forsgren A.: Antibiotics and suppression of lymphocyte function in vitro. *Antimicrob. Agent Chemother.* 1979, 11, 544-560.
3. Dunier M., Siwicki A. K.: Effects of environmental contaminants and chemotherapeutics on fish defense mechanisms. *Arch. Ryb. Pol.* 1994, 1, 2, 21-54.

4. Ervik A., Thorsen B., Eriksen V., Lunestad B. T., Samuelsen O. B.: Impact of administering antibacterial agents on wild fish and blue mussels *Mytilus edulis* in the vicinity of fish farms. *Dis. Aquatic Organ.* 1994, 18, 45-51.
5. Forsgren A., Gnarpe H.: The effect of antibacterial agents on the association between bacteria and leukocytes. *Scand. J. Infect. Dis.* 1982, 33 (suppl.), 115-120.
6. Forsgren A., Schmelling D., Quie P. G.: Effect of tetracycline on the phagocytic function of human leukocytes. *J. Infect. Dis.* 1974, 130, 415-417.
7. Gnarpe H., Belsheim J.: Direct and indirect effects of antibiotics on granulocyte activity. *J. Antimicrob. Chemother.* 1981, 8 (Suppl. C), 71-78.
8. Gleichmann E., Kimber I., Purchase I. F.: Immunotoxicology: suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on the immune system. *Arch. Toxic.* 1989, 63, 257-273.
9. Grondel J. L., Gloudemans A. G. M., van Muiswinkel W. B.: The influence of antibiotics on the immune system. II. Modulation of fish leukocyte response in culture. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1985, 9, 251-260.
10. Grondel J. L., Nouws J. F. M., Jong de Schutte A. R., Driessens F.: Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in carp, *Cyprinus carpio* L., following different routes of administration. *J. Fish Dis.* 1987, 10, 153-163.
11. Grondel J. L., Nouws J. F. M., Van Muiswinkel W. B.: The influence of antibiotics on the immune system. Immunopharmacokinetic investigations on the primary anti-SRBC response in carp *Cyprinus carpio* L. after oxytetracycline injection. *J. Fish Dis.* 1987, 10, 35-44.
12. Hektoen H., Berge J. A., Nygaard K., Schanning M., Hormazabal V., Yndestad M.: The environmental effects of antibacterial agents used in fish farming. *Norsk-Veterinaertidsskrift* 1993, 105, 27-32.
13. Hektoen H., Berge J. A., Hormazabal V., Yndestad M.: Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 1995, 133, 175-184.
14. Ingram G. A.: Substances involved in the natural resistance of fish to infection. *J. Fish Biol.* 1980, 16, 23-60.
15. Jacobsen H., Berlind L.: Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture* 1988, 70, 365-370.
16. Kerry J., Hiney M., Coyne R., Nic Gabhain S., Gilroy D., Cazabon, Smith P.: Fish feed as source of oxytetracycline resistant bacteria in the sediments under fish farms. *Aquaculture* 1995, 131, 101-113.
17. Klaver Al., Matthews R. A.: Effects of oxytetracycline on nitrification in a model aquatic system. *Aquaculture* 1994, 123, 237-247.
18. Kwiatkowska K., Sobota A.: Przekazywanie sygnału fagocytarnej: od agregacji receptorów do przebudowy cytoskieletu. *Post. Biol. Kom.* 1999, 26, 59-81.
19. Lunden T., Bylund G.: The influence of in vitro an in vivo exposure to antibiotics on mitogen induced proliferation of lymphoid cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 2000, 10, 395-404.
20. Lunden T., Liljus E. M., Bylund G.: Respiratory burst activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocytes is modulated by antimicrobial drugs. *Aquaculture* 2002, 207, 203-212.
21. Łapińska K., Dąbrowski W., Daczowska-Kazon E., Sawicki W.: Przyswajalność i okres karencji oksytetracykliny u pstrąga tęczowego. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 466-470.
22. Myers M. J., Farrell D. E., Henderson M.: Oxytetracycline-mediated alteration of murine immunocompetence. *Pathobiol.* 1995, 65, 270-271.
23. Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983, 65, 55-63.
24. Noga E. J.: *Fish Disease Diagnosis and Treatment.* Mosby-Year Book Inc., USA 1996, 276-277.
25. Radomska M.: Antybiotyki a układ odpornościowy. *Reumatologia* 1994, 32, 63-69.
26. Rook G. A., Steele J., Umar S., Dockrell H. M.: A simple method for the solubilisation of reduced NBT and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by γ -IFN. *J. Immunol. Methods* 1985, 82, 161-167.
27. Samuelsen B. O., Torsvik V., Ervik A.: Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance towards oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *Sci. Total Environ.* 1992, 114, 25-36.
28. Sierosławska A., Terech-Majewska E., Siwicki A. K.: Wpływ chemioterapeutyków na układ odpornościowy ryb, [w:] *Ochrona zdrowia ryb – aktualne problemy.* Wyd. IRŚ, Olsztyn 2004, 227-235.
29. Siwicki A. K., Anderson D. P.: Nonspecific defence mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and monocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum, [w:] Siwicki A. K., Anderson D. P., Waluga J. (red.): *Fish Diseases Diagnosis and Prevention Methods.* Wyd. IRŚ, Olsztyn 1993, 105-112.
30. Siwicki A. K., Anderson D. P., Dunier M.: In vitro immunotoxicology alternative models for environmental toxicology. *Biologiczne Monitorowanie Skażenia Środowiska.* Wyd. IRŚ Olsztyn, 1996, 159-170.
31. Siwicki A. K., Rymuszka A., Głabski E., Terech-Majewska E.: Białka ostrej fazy u ryb – możliwości zastosowania w monitorowaniu skażenia środowiska, [w:] *Biologiczne Monitorowanie Skażenia Środowiska.* Wyd. IRŚ Olsztyn 1996, s. 173-177.
32. Studnicka M., Siwicki A. K., Morand M., Rymuszka A., Bownik A., Terech-Majewska E.: Modulation of nonspecific defence mechanisms and specific immune responses after suppression induced by xenobiotics. *J. Appl. Ichthyol.* 2000, 16, 1-7.
33. 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.

Adres autora: dr Elżbieta Terech-Majewska, ul. Oczapowskiego 13, 10-957 Olsztyn; e-mail: etam@uwm.edu.pl