



UNIwersytet Jagielloński  
w Krakowie

Wydział Biologii  
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych

**Badania mechanizmów regulujących związaną ze stresem  
redystrybucję neutrofilii ryb**

Katarzyna Kłak-Pomykała

Rozprawa doktorska  
wykonana pod opieką  
prof. dr hab. Magdaleny Chadzińskiej  
w Zakładzie Immunologii Ewolucyjnej  
Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych

Kraków 2025

## **Podziękowania**

*Pragnę podziękować wszystkim,  
którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy, w szczególności,  
**Pani Prof. dr hab. Magdalenie Chadzińskiej**  
za możliwość realizacji badań, poświęcony mi czas,  
nieocenione wsparcie (zarówno w sferze naukowej jak i prywatnej),  
cenne rady i konstruktywną krytykę, a także wiarę we mnie,  
która nie pozwalała ugasić mojego naukowego zapachu i motywacji.*

*Dr Magdalenie Maciuszek za wspaniałą współpracę w realizowanym projekcie,  
ale przede wszystkim za naszą laboratoryjną przyjaźń.*

*Dr Niedharsan Pooranachandran for excellent collaboration, introducing me to the world  
of CRISPR-Cas9, and invaluable support throughout this work.*

*Wszystkim byłym i obecnym pracownikom i doktorantom z Zakładu Immunologii  
Ewolucyjnej, za ciągłą gotowość pomocy i ciekawe dyskusje naukowe, ale przede wszystkim  
za niesamowitą atmosferę pracy, szczególnie dziękuję również za wzajemne wsparcie  
i codzienną dawkę dobrego humoru w pokoju 3.154.*

*Moim najbliższym, rodzinie i przyjaciółkom,  
za wiarę we mnie i za to, że zawsze mogę na nich liczyć.*

*Mojemu mężowi Karolowi, który zawsze mnie wspierał  
i nie pozwalał mi się poddać w momentach zwątpienia.  
Moim wspaniałym rodzicom za możliwość kształcenia się  
i stawianie mojego szczęścia na pierwszym miejscu.  
Bez ich pomocy nie osiągnęłabym tego wszystkiego, dlatego  
**Mężowi i Rodzicom pragnę zadedykować niniejszą pracę.***

### **Forma rozprawy**

**Rozprawę doktorską stanowi jedna praca przeglądowa oraz 3 oryginalne prace naukowo-badawcze, które zostały opublikowane i 1 praca w formie manuskryptu przygotowanego do druku:**

### **Praca przeglądowa:**

1. Kłak K., Chadzińska M. Czy ryby ulegają stresowi? Kosmos. Problemy nauk biologicznych. 2021, 70: 57-71. doi: 10.36921/kos.2021\_2673. MEiN=20

### **Opublikowane prace oryginalne:**

1. Kłak K., Maciuszek M., Marcinkowska M., Verburg-van Kemenade B. M. L., Chadzinska M. The importance of CXC-receptors CXCR1-2 and CXCR4 for adaptive regulation of the stress axis in teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 2022, 127: 647-658. doi: 10.1016/j.fsi.2022.06.070. MEiN=140, IF<sub>2021</sub>=4,622, IF<sub>2022</sub>=4,7
2. Kłak K., Maciuszek M., Pijanowski L., Marcinkowska M., Homa J., Verburg-van Kemenade B. M. L., Rakus K., Chadzinska M. Evolutionarily conserved mechanisms regulating stress-induced neutrophil redistribution in fish. *Front. Immunol.* 2024, 15:1330995. doi: 10.3389/fimmu.2024.13309952024. MEiN=140, IF<sub>2023-2024</sub>=5,7
3. Kłak K., Maciuszek M., Michalik A., Mazur M., Zawisza M., Pecio A., Nowak B., Chadzinska M. Fire in the belly: stress and antibiotics induce dysbiosis and inflammation in the gut of common carp. *Fish & Shellfish Immunology*. 2025, 161:11030. doi: 10.1016/j.fsi.2025.110301. MEiN=140, IF<sub>2023-2024</sub>=4,1

### **Praca przygotowana do druku:**

4. Kłak K., Maciuszek M., Kralka J., Pecio M., Nowak B., Konstantinidis I., Galindo-Villegas J., Chadzinska M., Microbiome dysbiosis affects stress response in common carp. (w przygotowaniu).

**Wyżej wymienione prace nie zostały użyte w innych postępowaniach o uzyskanie stopnia naukowego.**

## Spis treści

<b>Streszczenie</b> .....	<b>6</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>8</b>
<b>I. Wstęp</b> .....	<b>10</b>
1. Klak K., Chadzińska M. Czy ryby ulegają stresowi? Kosmos. Problemy nauk biologicznych. 2021, 70: 57-71. doi.org/10.36921/kos.2021_2673. ....	10
2. Neutrofile ssaków .....	26
2.1. Powstawanie i różnicowanie neutrofilii .....	26
2.2. Funkcje neutrofilii .....	30
2.3. Heterogenność i plastyczność neutrofilii .....	31
2.4. Starzenie się neutrofilii .....	33
3. Neutrofile ryb doskonałokostnych .....	35
3.1. Powstawanie neutrofilii/granulocytopenia u ryb kostnoszkieletowych .....	36
3.2. Funkcje efektorowe neutrofilii ryb .....	37
3.3. Heterogenność neutrofilii ryb kostnoszkieletowych .....	38
4. Chemokiny .....	39
4.1. Ogólny podział chemokin .....	39
4.1.1. CXCL8 i CXCR1/CXCR2 .....	41
4.1.2. CXCL9-11 i CXCR3 .....	41
4.1.3. CXCL12 i CXCR4 .....	41
4.2. Charakterystyka chemokin CXC ryb karpowatych .....	42
4.2.1. Cxcl8_11, Cxcl8_12-Cxcr1 i Cxcr2 .....	42
4.2.2. Cxcb1, Cxcb2 i Cxcr3 .....	43
4.2.3. Cxcl12a, Cxcl12b i Cxcr4 .....	44
<b>II. Cele i hipotezy badawcze</b> .....	<b>45</b>
<b>III. Wyniki</b> .....	<b>47</b>
1. Klak K., Maciuszek M., Marcinkowska M., Verburg-Van Kemenade B. M. L., Chadzińska M. The importance of CXC-receptors CXCR1-2 and CXCR4 for adaptive regulation of the stress axis in teleost fish. Fish & Shellfish Immunology. 2022, 127: 647-658. ....	47
2. Klak K., Maciuszek M., Pijanowski L., Marcinkowska M., Homa J., Verburg-Van Kemenade B. M. L., Rakus K., Chadzińska M. Evolutionarily conserved mechanisms regulating stress-induced neutrophil redistribution in fish. Frontiers in immunology. 2024, 15:1330995. ....	62
3. Klak K., Maciuszek M., Michalik A., Mazur M., Zawisza M., Pecio A., Nowak B., Chadzińska M. Fire in the belly: stress and antibiotics induce dysbiosis and inflammation in the gut of common carp. Fish & Shellfish Immunology. 2025, 161:11030.....	87
4. Klak K., Maciuszek M., Kralka J., Pecio A., Nowak B., Konstantinidis I., Galindo-Villegas J., Chadzińska M., Microbiome dysbiosis affects stress response in common carp. Manuskrypt w przygotowaniu. ....	111

5. Sygnalizacja TLR/Myd88 wpływa na dojrzewanie i redystrybucję neutrofilek podczas zapalenia u larw danio przegowanego.....	155
5.1. Materiały i metody.....	155
5.1.1. Hodowla danio przegowanego i warunki eksperymentalne.....	155
5.1.2. Obrazowanie i analiza danych.....	156
5.2. Wyniki eksperymentu.....	157
5.3. Wnioski.....	158
<b>IV. Dyskusja.....</b>	<b>160</b>
1. Oś: Stres-chemokiny-neutrofile.....	160
2. Oś: Jelita-mózg-neutrofile.....	166
<b>V. Ograniczenia badań.....</b>	<b>174</b>
<b>VI. Podsumowanie.....</b>	<b>175</b>
<b>VII. Wnioski końcowe.....</b>	<b>178</b>
<b>VIII. Bibliografia.....</b>	<b>179</b>
<b>IX. Oświadczenia współautorów.....</b>	<b>202</b>

## Streszczenie

Zarówno u ssaków, jak i ryb, neutrofile są pierwszymi leukocytami rekrutowanymi do miejsca zapalenia, co ma kluczowe znaczenie dla efektywnej odpowiedzi immunologicznej. Proces ten regulują między innymi chemokiny CXC oraz receptory chemokinowe (CXCR). Nowe dowody wskazują, że chemokiny CXC mogą również brać udział w regulacji odpowiedzi na stres. Odpowiedź na stres jest mechanizmem konserwatywnym ewolucyjnie, a ryby stanowią szczególnie intrygujący model badań dotyczących wpływu stresu na odporność, ponieważ nerka głowowa, w której zachodzi produkcja hormonów stresu, jest również ich głównym narządem hematopoetycznym, a zatem hormony stresu mogą wpływać na dojrzewanie i aktywność leukocytów na zasadzie oddziaływań parakrynych. Ponadto u wszystkich kręgowców stres wywołuje szybką mobilizację neutrofilii do krwi. Z drugiej strony zaburzenia związane z neutrofilią wskazują, że wywołana stresem redystrybucja neutrofilii stanowi poważne wyzwanie w kontekście powszechnego zastosowania przeciwzapalnych glikokortykoidów.

Celem obecnej pracy było zbadanie udziału hormonów stresu w redystrybucji neutrofilii z narządów/tkanek hematopoetycznych oraz roli chemokin CXC i ich receptorów (CXCR) w tym procesie. Ponadto badano, czy stres wywołuje zmiany w składzie i różnorodności mikrobioty jelitowej, oraz jak wywołana antybiotykami dysbioza mikrobioty jelitowej wpływa na aktywację osi stresu i wywołaną stresem redystrybucję neutrofilii, ich dojrzewanie i aktywność. W tym kontekście sprawdzano też udział sygnalizacji TLR/Myd88 w regulacji redystrybucji dojrzałych i niedojrzałych neutrofilii pod wpływem kortyzolu i podczas zapalenia. Badania prowadzono na karpniu (*Cyprinus carpio* L.) i larwach danio pręgowanego (*Danio rerio*).

W przypadku karpia wykazano, że podczas ostrego stresu redystrybucja neutrofilii z narządów hematopoetycznych (głównie z nerki głowowej) do krwi jest regulowana przez interakcję kortyzolu z wewnątrzkomórkowymi receptorami glikokortykoidowymi (Gr). Dodatkowo stwierdzono, że chemokiny Cxcl12 i Cxcl8 oraz ich receptory, odpowiednio Cxcr4 i Cxcr1/Cxcr2 wpływają na aktywację osi stresu. Wykazano również, że chemokiny CXC wpływają na retencję (Cxcl12 *via* Cxcr4) oraz redystrybucję (Cxcl8 *via* Cxcr1 i Cxcr2) neutrofilii. Stwierdzono, że w regulację tych procesów są także zaangażowane czynniki stymulujący kolonie granulocytów (poprzez receptor Gcsf(r) i metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (Mmp9). Dodatkowo zaobserwowano, że antybiotyki i stres wywołują zmiany w mikrobiocie jelitowej karpia, które prowadzą do dysbiozy. Z kolei dysbioza i stres wpływają na granulocytopenię, proces dojrzewania neutrofilii nerki głowowej, ich aktywność,

redystrybucję oraz wywołują zależne od limfocytów Th17 zapalenie w jelitach karpia, które manifestuje się m.in. zwiększonym naciekiem neutrofilek.

Ustalono również, że u larw danio przegowanego do miejsca zapalenia są rekrutowane zarówno niedojrzałe jak i dojrzałe neutrofile, a stymulacja larw kortyzolem *in vivo* istotnie zwiększa liczbę dojrzałych neutrofilek w miejscu zapalenia. Ponadto, zahamowanie sygnalizacji zależnej od MyD88 zmniejsza liczbę komórek niedojrzałych w ognisku zapalenia i istotnie obniża liczbę dojrzałych neutrofilek zrekrutowanych do ogniska zapalenia podczas stymulacji kortyzolem.

Wyniki obecnej pracy potwierdzają ważną adaptacyjną rolę wzajemnych interakcji pomiędzy układem hormonalnym a układem odpornościowym. Biorąc pod uwagę kluczowe znaczenie neutrofilek jako komórek pierwszej linii obrony, zwiększenie ich liczby w krążeniu wydaje się korzystne w sytuacjach ostrego stresu, kiedy podczas reakcji walki i ucieczki zwiększa się ryzyko urazów i zakażenia. Należy jednak pamiętać, że interakcja ta ma charakter bardzo złożony i jednym z jej ważnych elementów jest także mikrobiota.

Wyjaśnienie mechanizmów związanych z wpływem stresu na odporność jest jednym z ważniejszych wyzwań w obszarze badań interakcji układów neuroendokrynnego i immunologicznego. Wyniki obecnej pracy wskazują na potrzebę odejścia od prewencyjnego stosowania antybiotyków w akwakulturze oraz ograniczenia w niej działania czynników stresogennych. Badania te mogą w przyszłości zostać wykorzystane w celu opracowania i ulepszenia strategii kontroli zdrowia ryb.

**Słowa kluczowe:** stres, neutrofile, chemokiny CXC, kortyzol, mikrobiota, karp

## Abstract

Both in mammals and fish, neutrophils are the first leukocytes recruited to the site of inflammation, what is crucial for an effective immune response. This process, among others, is regulated by CXC chemokines and chemokine receptors (CXCR). Emerging evidence suggests that CXC chemokines may also be involved in the regulation of the stress response. The stress response is an evolutionarily conserved mechanism, and fish are a particularly intriguing model for studying the effects of stress on immunity, because the head kidney, where stress hormones are produced, is also their main hematopoietic organ. Therefore, stress hormones can affect leukocyte maturation and activity through paracrine interactions. Furthermore, in all vertebrates, stress induces rapid mobilization of neutrophils into the blood circulation. On the other hand, neutrophilia-related disorders suggest that stress-induced neutrophil redistribution poses a significant challenge in the context of the widespread use of anti-inflammatory glucocorticoids.

The current study aimed to investigate the role of stress hormones in the redistribution of neutrophils from hematopoietic organs/tissues, and the involvement of CXC chemokines and their receptors (CXCR) in this process. Furthermore, we investigated whether stress induces changes in the composition and diversity of the gut microbiota, and how antibiotic-induced dysbiosis of the gut microbiota affects the activation of the stress axis and stress-induced redistribution of neutrophils, their maturation and activity. In this context, we also investigated the role of TLR/Myd88 signaling in the regulation of mature and immature neutrophil redistribution, under cortisol treatment and inflammation. The studies were performed on common carp (*Cyprinus carpio* L.) and zebrafish larvae (*Danio rerio*).

It has been shown that during acute stress, the redistribution of neutrophils from hematopoietic organs (mainly from the head kidney) to the blood is regulated by cortisol interaction with intracellular glucocorticoid (Gr) receptors. Additionally, the chemokines Cxcl12 and Cxcl8, along with their receptors, Cxcr4 and Cxcr1/Cxcr2, respectively, have been found to influence the activation of the stress axis. Moreover, it has been shown that CXC chemokines affect the retention (Cxcl12 *via* Cxcr4) and redistribution (Cxcl8 *via* Cxcr1 and Cxcr2) of neutrophils. Granulocyte colony-stimulating factor (through the Gcsf(r) receptor) and matrix metalloproteinase 9 (Mmp9) were also involved in the regulation of these processes. Additionally, it has been shown that antibiotics and stress induce changes in the intestinal microbiota of carp, leading to dysbiosis. In turn, dysbiosis and stress affected granulocytogenesis, maturation, activity, redistribution of neutrophils and induced

Th17-dependent inflammation in the carp intestines, which was manifested, among others, by increased neutrophil infiltration.

It was also established that in zebrafish larvae, both immature and mature neutrophils are recruited to the site of inflammation, and that *in vivo* stimulation of larvae with cortisol significantly increases the number of mature neutrophils at the site of inflammation. Furthermore, inhibition of the MyD88-dependent signaling pathway reduces the number of immature cells in the focus of inflammation, while under cortisol treatment, it significantly reduces the number of mature neutrophils recruited to the inflammatory focus.

The results of the current study confirm the important adaptive role of bidirectional interactions between the endocrine and immune systems. Considering the pivotal role of neutrophils as the first-line defense responders, an increase in their number in the circulation may be beneficial in situations of acute stress, when the risk of injury and infection increases during the fight-or-flight response. However, it should be emphasized that this interaction is very complex, and microbiota is one of its important components.

Elucidating the mechanisms by which stress modulates immunity remains a critical challenge in research on neuroendocrine-immune interaction. Findings from the present study indicate the need to transition away from the preventive use of antibiotics in aquaculture and to mitigate stress-inducing factors. The current results can be used in the future to develop and improve fish health control strategies.

**Key words:** stress, neutrophils, CXC chemokines, cortisol, microbiota, carp

## **I. Wstęp**

Obecna praca skupia się na wpływie stresu na redystrybucję neutrofilii. W pierwszej części wstępu, który stanowi praca przeglądowa Kłak i Chadzińska (2021) opisane zostały konserwatywne ewolucyjnie mechanizmy reakcji stresowej ryb. Poznane dotąd mechanizmy odpowiedzi na stres u ryb skonfrontowano w niej z aktualnym stanem wiedzy na ten temat u kręgowców wyższych, w tym u ssaków. Neuroendokryny charakter tej reakcji rozważono również w wielowymiarowym kontekście wpływu na fizjologię oraz przede wszystkim na układ odpornościowy. Praca ta również argumentuje, dlaczego wśród kręgowców, ryby są unikatowym modelem w badaniach wpływu stresu na układ odpornościowy.

- 1. Kłak K., Chadzińska M. Czy ryby ulegają stresowi? Kosmos. Problemy nauk biologicznych. 2021, 70: 57-71. doi.org/10.36921/kos.2021\_2673.**

KATARZYNA KŁAK, MAGDALENA CHADZIŃSKA

*Zakład Immunologii Ewolucyjnej  
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Jagielloński  
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków  
E-mail: katarzyna.klak@doctoral.uj.edu.pl  
magdalena.chadzinska@uj.edu.pl*

## CZY RYBY ULEGAJĄ STRESOWI?

### WSTĘP

Reakcja stresowa stanowi kluczowy mechanizm regulacyjny, umożliwiający utrzymanie homeostazy, aktywowany po zaburzeniu „milieu intérieur” organizmu. Słowo „stres” jest zaskakująco trudne do zdefiniowania. Wiele z dotychczas proponowanych definicji osiąga jednak konsensus, w którym stres stanowi fizjologiczną reakcję na stresor (GONZALO i współaut. 2003, SCHRECK i TORT 2016). Efekty działania stresorów są dwojakie: wywołują stan zagrożenia lub zaburzenia równowagi homeostatycznej i generują skoordynowany zbiór reakcji behawioralnych i fizjologicznych, które umożliwiają kompensację i/lub adaptację oraz pokonanie zagrożenia. W przypadku doświadczania intensywnego, przewlekłego stresu, fizjologiczna reakcja na stres może stracić swoją wartość adaptacyjną, co może skutkować zahamowaniem wzrostu, rozrodu czy zmniejszoną odpornością na patogeny (WENDELAAR BONGA 1997).

Procesy biorące udział w zachowaniu równowagi fizjologicznej integrują komponenty neuroendokrynne, autonomiczne, metaboliczne i behawioralne (SCHRECK i TORT 2016). U ssaków zidentyfikowano dwie główne osie sygnalizacyjne, stanowiące zintegrowaną reakcję fizjologiczną na zaistniałe niebezpieczeństwo/stresor: (i) aktywacja osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. hypothalamus-pituitary-adrenal axis, HPA) i (ii) aktywacja osi układ współczulny-rdzeń nad-

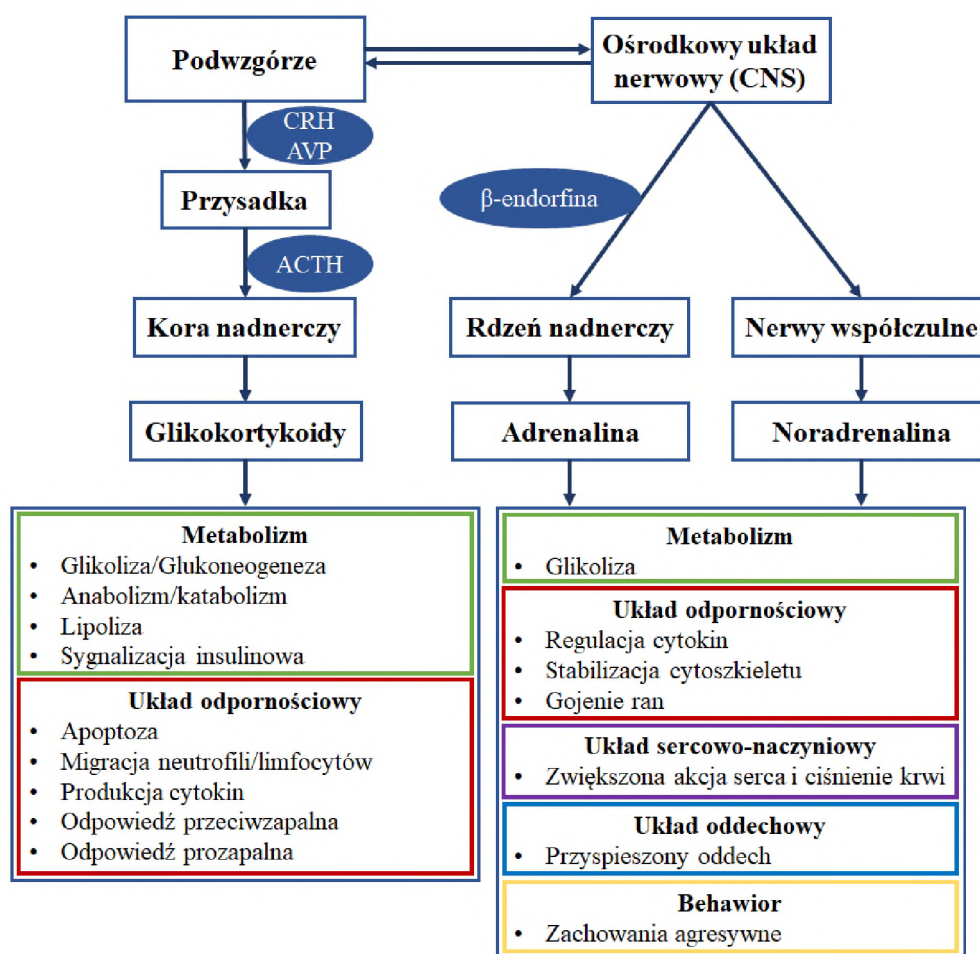
nerczy (ang. symphatetic-adrenal medullary axis, SAM) (Ryc. 1). W pierwszym przypadku reakcja na stresor jest inicjowana na poziomie podwzgórza, które uwalnia kortykoliberynę (ang. corticotropin-releasing hormone, CRH) i wazopresynę (ang. arginine vasopressin, AVP). Hormony te przekazują sygnał do przysadki mózgowej, inicjując tym samym uwalnianie hormonu adrenokortykotropowego/kortykotropiny (ang. adrenocorticotrophic hormone, ACTH), który stymuluje korę nadnerczy do uwolnienia glikokortykoidów (GK) (Ryc. 1). Głównymi krążącymi hormonami glikokortykoidowymi są kortyzol (u ludzi, większości innych ssaków i ryb) lub kortykosteron (u gryzoni, ptaków i większości gadów). Aktywacja SAM jest o wiele szybsza, a w jej wyniku dochodzi do uwalniania z rdzenia nadnerczy adrenaliny/epinefryny i noradrenaliny/norepinefryny z obwodowych nerwów współczulnych (Ryc. 1). Oś SAM inicjuje tzw. reakcję „walki lub ucieczki” (ang. fight or flight), która obejmuje zintegrowaną reakcję behawioralną w przypadku poczucia zagrożenia lub ostrego stresu, a także zmiany metaboliczne i reakcję układu odpornościowego (Ryc. 1) (WENDELAAR BONGA 1997, CHEN i współaut. 2015).

### „CZUĆ SIĘ JAK RYBA W WODZIE” – STRESORY W ŚRODOWISKU WODNYM

Chociaż opis przebiegu reakcji stresowej opiera się przede wszystkim na badaniach przeprowadzonych na ssakach, w pełni do-

**Słowa kluczowe:** ryby, reakcja na stres, oś stresu, allostaza, dobrostan zwierząt, interakcje neuro-endokrynno-immunologiczne

\*Praca finansowana ze źródeł Narodowego Centrum Nauki (grant nr UMO-2019/33/B/NZ6/00402) oraz subwencji N18/DBS/000009.



Ryc. 1. Funkcje biologiczne regulowane przez dwie osie stresu.

Oś podwzgórze-przesadka-nadnercza (HPA) jest aktywowana stresem fizycznym lub psychicznym. Uwalnianie kortykoliberyny (CRH) i wazopresyny (AVP) z podwzgórza powoduje wydzielanie hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) przez przysadkę mózgową. ACTH następnie stymuluje uwalnianie glikokortykoidów z kory nadnerczy. Oś układ współczulny-rdzeń nadnerczy (SAM) jest skoordynowaną odpowiedzią na różnorodne stresory, w której pośredniczy uwalnianie katecholamin. Krażące glikokortykoidy i katecholaminy oddziałują na wiele różnych komórek: powodują zmiany behawioralne, metaboliczne i immunologiczne oraz w obrębie układu sercowo-naczyniowego i oddechowego (wg CHEN i współaut. 2015, zmodyfikowana).

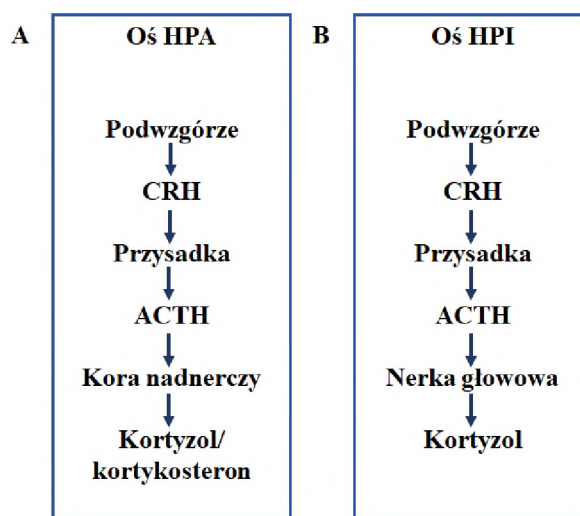
tyczy on również niższych kręgowców. W porównaniu do kręgowców lądowych, szczególnie ciekawym modelem badawczym są ryby, m.in. ze względu na odmienność środowiska, w którym żyją. Identyfikacja stresu u ryb w warunkach naturalnych, laboratoryjnych lub w akwakulturze jest skomplikowana i w zasadzie jest decyzją arbitralną, z powodu różnorodności parametrów behawioralnych, fizjologicznych oraz wielu czynników łagodzących lub nasilających wpływ stresorów. Istotny wpływ na przebieg reakcji stresowej u ryb mają temperatura i jakość wody, pora roku, wiek, płeć, genetyczne lub nabyte cechy indywidualne, czynniki społeczne oraz różnice w obrębie szczepów lub gatunków. Do powszechnych bodźców stresowych wywołujących zintegrowaną reakcję stresową u ryb należą nagłe lub ekstremalne zmiany w środowisku (zmiana tempera-

tury i zasolenia wody oraz jej zmętnienie), interakcje z innymi zwierzętami (drapieżnictwo, pasożyty, konkurencja) oraz ingerencja człowieka, w tym praktyki związane z akwakulturą (połowy, manipulacje, transport) oraz zanieczyszczenie wody (metale ciężkie i substancje chemiczne) (WENDELAAR BONGA 1997, SPAGNOLI i współaut. 2016, BALDISSE-RA i współaut. 2020, URBINATI i współaut. 2020). Reakcja ryb na czynniki stresowe ma wiele cech charakterystycznych dla tej grupy organizmów. Są one związane z bliskim kontaktem tych zwierząt z otaczającym środowiskiem wodnym, przez skrzelą i jelito (w wodzie morskiej). Stresory działające na skrzelą wpływają na równowagę wodno-mineralną. Stanowi to jeden z głównych powodów wysokiej podatności ryb na zanieczyszczenia wody. Innym powodem jest duża różnorodność i wyjątkowa wrażliwość sensorycz-

na powłok ciała ryb. Percepcja sensoryczna stresora warunkuje wywołanie reakcji stresowej zarówno u ryb, jak i innych kręgowców. Ryby reagują na szkodliwe zanieczyszczenia chemiczne i wiele innych stresorów na poziomach intensywności często znacznie niższych od tych, które są odczuwalne dla zwierząt lądowych (WENDELAAR BONGA 1997).

Zgodnie z koncepcją allostazy (ogólny stan równowagi utrzymywany poprzez liczne zmiany wieloukładowe, które odpowiadają przewidywanym wymaganiom środowiskowym), aby zwierzę mogło pokonać zagrożenie, reakcja stresowa musi być kompensacyjna i adaptacyjna. Taki adaptacyjny typ reakcji stresowej to eustres. Koszt, jaki organizm musi ponieść reagując na stres, to ładunek allostacyjny. Niski ładunek allostacyjny lub eustres może mieć pozytywny wpływ na kondycję ryb (stres mobilizujący). Jeżeli odpowiedź nie powiedzie się lub będzie niewystarczająca, następuje przeciążenie allostacyjne. Zazwyczaj obserwuje się to w warunkach przewlekłego (chronicznego) stresu, gdy ryby nie są w stanie skutecznie radzić sobie z ciągłym wyzwaniem stresowym, a reakcja stresowa traci wymiar adaptacyjny, staje się dysfunkcyjna i ostatecznie ma niekorzystne skutki. Ten stan braku przystosowania określono jako dystres (SAMARAS i współaut. 2018).

Pomimo odmiennych środowisk, mechanizm reakcji stresowej u ryb wykazuje wiele podobieństw do kręgowców lądowych (znaczną konserwatywność ewolucyjną). Istnieją trzy główne etapy reakcji na czynniki stresowe: alarmowa, przystosowania (oporności) oraz kompensacji lub wyczerpania (śmierć). Charakter reakcji na stres zależy od natężenia i czasu trwania stresora. Zasadniczo we wszystkich przypadkach faza alarmowa polega na uruchamianiu systemów zaangażowanych w „walkę i ucieczkę” i, co ważne, radzenia sobie ze stresem. Podczas etapu przystosowania zachodzi przywrócenie norm homeostatycznych – ryba pokonuje stresor, co umożliwi stopniową kompensację lub następuje faza wyczerpania (przewlekły stres), prowadząca do śmierci (SCHRECK i TORT 2016). W obrębie mechanizmów zintegrowanej odpowiedzi na stres u ryb podstawowa reakcja na stresor obejmuje aktywację dwóch osi neuroendokrynnych. Oś układ współczulny-komórki chromafinowe prowadzi do wydzielania katecholamin (adrenaliny i noradrenaliny) z komórek chromafinowych, homologu rdzenia nadnerczy u ssaków, które u ryb są rozproszone lub występują w małych skupiskach w nerce głowowej (WENDELAAR BONGA 1997, GALHARDO i OLIVEIRA 2009, URBINATI i współaut. 2020). Druga to oś podwzgórze-przysadka-komórki



Ryc. 2. Porównanie osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA, A) u ssaków i osi podwzgórze-przysadka-komórki śródnerkowe nerki głowowej (HPI, B) u ryb.

CRH, kortykoliberyna; ACTH, hormon adrenokortykotropowy (wg NARDOCCI i współaut. 2014, zmodyfikowana).

śródnerkowe nerki głowowej (ang. hypothalamus-pituitary-interrenal axis, HPI), która jest funkcjonalnym analogiem osi przysadkowo-nadnerczowej u ssaków (HPA) (BRAITHWAITE i EBBESSON 2014, NARDOCCI i współaut. 2014). Schematyczne porównanie osi HPA u ssaków i HPI u ryb przedstawia Ryc. 2. Warto w tym miejscu wspomnieć, że u ryb nerka głowowa jest narządem parzystym, znajdującym się w przedniej części jamy brzusznej, za skrzelami. Jest ona funkcjonalnym homologiem szpiku kostnego i nadnerczy u ssaków (WENDELAAR BONGA 1997, GORISSEN i FLIK 2016).

Zarówno u ssaków, jak i u ryb, wtórne reakcje na zaistniały stresor obejmują natychmiastowe działanie, na poziomie krwi i tkanek, uwolnionych katecholamin i kortykosteroidów. Odpowiedzi wtórne stanowią mierzalne zmiany poziomu glukozy, kwasu mlekowego i głównych jonów (np. chlorków sodu i potasu) we krwi oraz tkankowego poziomu glikogenu i białek szoku cieplnego (ang. heat shock proteins, HSP) (BARTON 2002). Aktywacja osi współczulno-adrenergicznej powoduje zmiany w układzie sercowo-naczyniowym i oddechowym oraz pomaga w mobilizacji zapasów energetycznych w związku ze zwiększeniem zapotrzebowania metabolicznego. Oś HPI reguluje nie tylko metabolizm energetyczny, ale także równowagę wodno-mineralną. Ma to związek z faktem, że aldosteron (główny hormon mineralokortykoidowy, odpowiedzialny za resorpcję i utrzymywanie fizjologicznego stężenia sodu

u ssaków) u ryb nie występuje lub występuje w bardzo niskich stężeniach (WENDELAAR BONGA 1997, SPENCERA i DEAK 2017).

Przedłużona ekspozycja na stresor może także prowadzić do uogólnionej reakcji całego organizmu. Przykładowo, stres ma hamujący wpływ m.in. na reprodukcję ryb i hamuje ich wzrost. Ogólna odporność na choroby może w stresie również podlegać daleko idącym zmianom i prowadzić do immunosupresji, dramatycznie zwiększając zapadalność na choroby i w konsekwencji śmiertelność ryb (WENDELAAR BONGA 1997, GALHARDO i OLIVEIRA 2009).

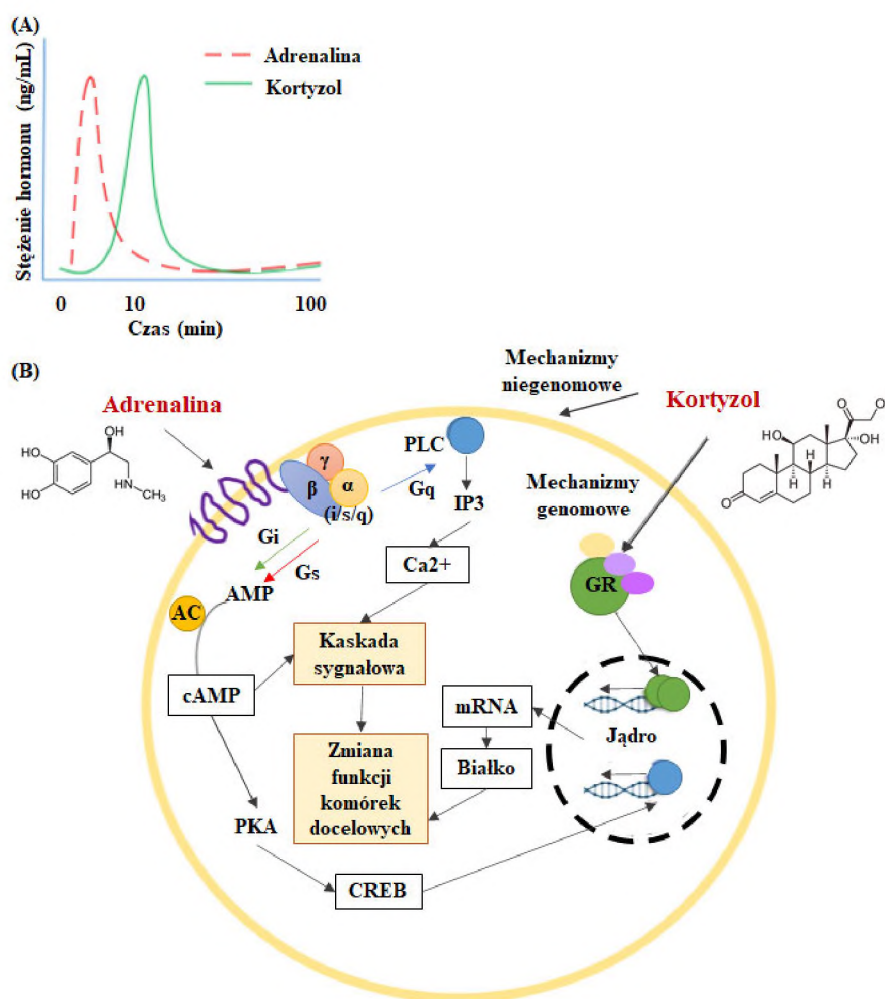
### JAK RYBY SIĘ STRESUJĄ? MECHANIZMY REGULACJI ODPOWIEDZI STRESOWEJ

Kiedy ryby są narażone na stresor, fizjologiczna reakcja stresowa jest inicjowana przez centralny układ nerwowy, po rozpoznaniu rzeczywistego lub postrzeganego zagrożenia. Współczulne włókna nerwowe, które unerwiają komórki chromafinowe, stymulują uwalnianie katecholamin. Tkanka chromafinowa znajduje się głównie w przednim obszarze nerki głównej (BARTON 2002, SCAPIGLIATI i współaut. 2007). Ponieważ katecholaminy, a głównie adrenalina, u ryb doskonałokostnych są zmagazynowane w komórkach chromafinowych, ich uwalnianie jest szybkie, a poziom krążących hormonów stresu natychmiast wzrasta i następnie są one szybko usuwane z krążenia (Ryc. 3A). Działanie adrenaliny polega na szybkiej mobilizacji glukozy, co zaspokaja zapotrzebowanie na energię, wywołane przez stresor (BARTON 2002, FAUGHT i współaut. 2016). Adrenalina działa poprzez receptory  $\alpha$ - lub  $\beta$ -adrenergiczne (ADR), które należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR) i moduluje odpowiedź komórkową poprzez fosforylację/defosforylację docelowych białek (Ryc. 3B). Chociaż adrenalina wpływa na zmiany transkrypcyjne, w tym geny zaangażowane w metabolizm i odpowiedź immunologiczną, dominująca rola tego hormonu u ryb jest niezależna od regulacji transkrypcji (BARTON 2002, CHADZIŃSKA i współaut. 2012, FAUGHT i współaut. 2016). U ssaków adrenalina aktywuje białko wiążące element odpowiedzi na cAMP (ang. cAMP response element-binding protein, CREB), kluczowy czynnik transkrypcyjny zaangażowany w regulację metaboliczną podczas stresu. Jednak rola CREB w szlaku sygnalizacji reakcji stresowej, w której pośredniczy adrenalina, nie jest jak dotąd wyjaśniona u ryb (FAUGHT i współaut. 2016).

Uwalnianie kortyzolu u ryb jest opóźnione w stosunku do katecholamin (wzrost po-

ziomu kortyzolu następuje w ciągu od kilku minut do kilku godzin) (Ryc. 3A) (FAUGHT i współaut. 2016, BALDISSERA i współaut. 2020). Wolniejsza odpowiedź tkanek na stymulację kortyzolem zwykle obejmuje syntezę białek efektorowych, które ułatwiają mobilizację i relokację substratów energetycznych, w tym uzupełnianie wyczerpanych zapasów glikogenu. U ryb aktywacja osi HPI rozpoczyna się od podwzgórza, które odbiera sygnały przesyłane z ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Wykrywanie stresującego sygnału stymuluje nerwy podwzgórzowe do wydzielania kortykoliberyny. CRH stymuluje komórki kortykotropowe przedniego płata przysadki do wydzielania hormonu adrenokortykotropowego. ACTH wiąże się ze specyficznym receptorem MC2 (ang. melanocortin receptor 2, MC2R) na powierzchni komórek śródnerkowych i aktywuje szlak sygnałowy prowadzący do wydzielania kortyzolu jako produktu końcowego aktywacji osi HPI. W przeciwieństwie do komórek chromafinowych, synteza i uwalnianie kortyzolu z komórek śródnerkowych nerki głównej są opóźnione i łatwo mierzalne. W rezultacie poziom krążącego kortyzolu jest powszechnie stosowany jako wskaźnik stresu doświadczanego przez ryby (BARTON 2002, UREN WEBSTER i współaut. 2020). Kontrola uwalniania kortyzolu odbywa się poprzez ujemne sprzężenie zwrotne, na wszystkich poziomach osi HPI (BARTON 2002). Kortykosteroidy wywierają wpływ na tkanki docelowe poprzez dwa odrębne mechanizmy znane jako genomowe i niegenomowe szlaki sygnałowe (DAS i współaut. 2018, URBINATI i współaut. 2020). W działaniu hormonów kortykosteroidowych pośredniczą wewnątrzkomórkowe receptory, działające jako ligandozależne czynniki transkrypcyjne (PRUNET i współaut. 2006). Ryby doskonałokostne wykazują ekspresję większej liczby receptorów kortykosteroidowych, w porównaniu z innymi kręgowcami. Podobnie jak u ssaków, u ryb opisano dwa rodzaje receptorów kortyzolu: mineralokortykoidowe (MR) i glikokortykoidowe (GR) (STOLTE i współaut. 2008).

W genomowym szlaku sygnalizacyjnym hydrofobowy kortyzol dostaje się do komórki i aktywuje cytoplazmatyczne czynniki transkrypcyjne, takie jak receptor GR (Ryc. 3B). Aktywny kompleks hormon-receptor przemieszcza się do jądra, gdzie zachodzi jego dimeryzacja. Jako homodimer wiąże się ze specyficznymi elementami odpowiedzi na glikokortykoidy (ang. glucocorticoid responsive elements, GRE), w promotorze genów docelowych regulujących metabolizm glukozy, poziom jonów, behavior i odporność (transaktywacja/transrepresja) (ALSOP i VIJAYAN 2009). Ponieważ proces ten prowa-



Ryc. 3. Molekularny mechanizm działania hormonów stresu.

Zmiany stężenia adrenaliny i kortyzolu w osoczu w odpowiedzi na stres (A). Transdukcja sygnału wewnątrz komórki (B). Adrenalina za pośrednictwem receptorów adrenergicznych sprzężonych z białkiem G ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) inicjuje wewnątrzkomórkowe kaskady sygnalizacyjne: za pośrednictwem białka Gs stymuluje cyklazę adenylową (AC) i powoduje wzrost poziomu cAMP, natomiast za pośrednictwem białka Gi prowadzi do zahamowania AC i spadku poziomu cAMP. Fosforylacja kinazy białkowej A (PKA), powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego CREB. Kompleks adrenalina-receptor-białko Gq stymuluje fosfolipazę C (PLC), która katalizuje powstawanie trisfosforanu inozytolu (IP3). IP3 inicjuje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia  $\text{Ca}^{2+}$ . Kortyzol działa na ścieżce genomowej wiążąc się z wewnątrzkomórkowymi receptorami GR. Dochodzi do dimeryzacji kompleksów ligand-receptor i ich translokacji do jądra, gdzie indukują transkrypcję genu poprzez przyłączenie do GRE (wg FAUGHT i współaut. 2016, VERBURG-VAN KEMENADE i współaut. 2017).

dzi do syntezy białek *de novo*, sygnalizacja genomowa jest wolniejsza, natomiast okres jej trwania jest dłuższy (synteza swoistych białek regulatorowych zachodzi minimum po 30 minutach od ekspozycji na kortyzol, następnie stopniowo rozwija się ich działanie). Z kolei sygnalizacja niegenomowa jest szybka (od sekund do minut), ponieważ komórki efektorowe są modulowane przez aktywację kaskady sygnalizacyjnej, w tym cyklicznych nukleotydów cAMP (cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan), cGMP (cykliczny guanozylo-3',5'-monofosforan), jonów wapnia  $\text{Ca}^{2+}$ , trisfosforanu inozytolu IP3 (ang. inositol 1,4,5-trisphosphate) i kinaz białko-

wych (GRZANKA i JARZĄB 2009, DAS i współaut. 2018). W rozróżnianiu tych dwóch mechanizmów nie należy opierać się wyłącznie na czasie pojawienia się efektów biologicznych, ponieważ mogą również istnieć mechanizmy niegenomowe ujawniające się po dłuższym czasie (GRZANKA i JARZĄB 2009). Główną różnicą między tymi dwoma szlakami jest to, że podczas gdy szlak genomowy obejmuje aktywację transkrypcji i translacji genu za pośrednictwem steroidów, efekty niegenomowych szlaków przekazywania sygnałów są niezależne od regulacji genów (DAS i współaut. 2018).

U ryb występują dwa zduplikowane geny *GR* (*GR1* i *GR2*), których transkrypcja prowadzi do powstania funkcjonalnych białek (wyjątek: danio pręgowany, u którego występuje tylko jeden *GR*) (ALSOP i VIJAYAN 2009, DAS i współaut. 2018). Ponadto, gen *GR1* posiada dwa warianty: *GR1a* i *GR1b*. Co ciekawe, zduplikowane receptory wymagają różnych stężeń kortyzolu (odpowiednio niskich i wysokich, które odpowiadają podstawowemu poziomowi kortyzolu i jego stężeniu w warunkach stresu), aby zainicjować aktywację tych receptorów w komórkach efektorowych (zdolność do transaktywacji) (BURY i STURM 2007, STOLTE i współaut. 2008, URBINATI i współaut. 2020). Chociaż w badaniach zaproponowano istnienie receptora błonowego pośredniczącego w szybkiej aktywacji szlaków sygnałowych w odpowiedzi na stymulację glikokortykoidami, do tej pory nie został on zsekwenconowany w żadnym modelu zwierzęcym. Mechanizm działania tych receptorów w szybkiej sygnalizacji niegenomowej jest jak dotąd u ryb nieznan. Zaproponowano cztery modele niegenomowego działania, dzięki którym kortyzol wywołuje szybką sygnalizację stresową u ryb doskonałokostnych: (i) zmiany fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej w wyniku interkalacji kortyzolu (bez udziału receptora), (ii) aktywacja błonowego GR, (iii) aktywacja receptorów błonowych niezależnych od GR, (iv) niezależne od receptorów błonowych otwarcie kanałów  $Ca^{2+}$  i wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia (DAS i współaut. 2018). Uważa się, że niegenomowe szlaki sygnalizacyjne skutkują wzmocnieniem następujących po nich efektów genomowych. Z kolei genomowe mechanizmy działania tego hormonu dostarczają niezbędnych białek do nietranskrypcyjnego przekazu sygnału (GRZANKA i JARZĄB 2009). Wszystkie te mechanizmy tworzą szeroki zakres możliwości zróżnicowanych regulacji za pomocą kortyzolu (BURY i STURM 2007, STOLTE i współaut. 2008).

## WPLYW STRESU NA FIZJOLOGIĘ RYB

Podstawowym mechanizmem adaptacji podczas stresu jest realokacja docelowego wykorzystania zasobów energetycznych (inwestowanych np. podczas wzrostu i reprodukcji), w kierunku działań wymagających intensyfikacji, takich jak oddychanie, poruszanie się, osmoregulacja i regeneracja tkanek, w celu przywrócenia homeostazy i zachowania integralności funkcjonalnej. Powoduje to obniżenie kondycji ryb podczas stresu przewlekłego i w czasie regeneracji po stresie. W odpowiedzi wtórnej, po percepcji bodźca stresowego następuje mobilizacja substratów bogatych w energię, wyczerpanie

zapasów glikogenu w wątrobie, podniesienie poziomu glukozy w osoczu i ogólne zahamowanie syntezy białek (WENDELAAR BONGA 1997).

U ryb mięśnie stanowią ponad połowę masy ciała, dlatego zmiany ich wielkości mają szczególne znaczenie dla wzrostu. Wzrost mięśni jest konsekwencją wielu procesów umożliwiających absorpcję składników odżywczych ze środowiska oraz ich wykorzystanie do wzrostu liczby i wielkości miocytów. Ze względu na duży koszt energetyczny reakcji stresowej, w efekcie obserwuje się zmniejszenie lub brak wzrostu, a parametry takie jak zmiana masy ciała lub wydajność metaboliczna, są stosowane jako wskaźniki stresu ryb (WENDELAAR BONGA 1997, SADOUL i VIJAYAN 2016). Ostry i przewlekły stres zwykle wiąże się ze zwiększonym tempem metabolizmu, ocenianym u ryb na podstawie obserwowanej hiperglikemii (poziom glukozy w osoczu jest dodatnio skorelowany z tempem metabolizmu). Stres wpływa również na wzrost poprzez bezpośrednie hamowanie molekularnych mechanizmów miogenezy i hormonalnej regulacji wzrostu. Ostry stres moduluje poziomy hormonu wzrostu (ang. growth hormone, GH) w krążeniu, co sugeruje interakcję między osią stresu i osią GH u ryb. Stres unieruchomienia, nagła zmiana temperatury lub zakażenie bakteryjne zmniejszają poziom GH u ryb (SADOUL i VIJAYAN 2016). Stres wpływa również na równowagę osmotyczną płynów ustrojowych, zwiększając utratę wody u ryb morskich oraz jej napływ w przypadku ryb słodkowodnych (WENDELAAR BONGA 1997).

Obciążenie allostatyczne spowodowane stresem zmniejsza także sprawność reprodukcyjną u ryb obu płci. Chociaż większość badań donosi o hamującym wpływie stresu na rozród, istnieją warunki, w których kortykosteroidy mogą mieć działanie stymulujące. Większość z tych efektów obserwuje się u samic w okresie okołooowulacyjnym (MILLA i współaut. 2009). Wiele badań wykazało wzmacniającą lub bezpośrednio stymulującą rolę kortykosteroidów w dojrzewaniu oocytów *in vitro* (GOETZ 1983, PATINO i THOMAS 1990). Z kolei hamujący wpływ stresu na rozród może się przejawiać w sposób bezpośredni poprzez zmniejszenie szans przeżycia osobników dorosłych lub w wyniku niewydolności rozrodczej. Stres ogranicza rozród także poprzez wpływ na dojrzewanie (hamowanie rozwoju jajników i jąder), hamowanie tarła i owulacji oraz jakość gamet i potomstwa (wytwarzanie mniejszych jaj i larw). Długoterminowe skutki stresu dla potomstwa pozostają jednak w dużej mierze nieopisane. Efekty hormonalne działania stresu obejmują supresję wytwarzania hormonów podwzgórza

(np. gonadoliberyna, GnRH), przysadki (np. hormon folikulotropowy, FSH; hormon luteinizujący, LH) i gonad (np. testosteron, T i estradiol, E2), przy czym najsilniejszy jest wpływ stresu na wytwarzanie androgenów i estrogenów. Zrozumienie mechanizmów zakłócania reprodukcji przez stres komplikuje fakt, że hormony modulowane stresem mogą mieć działanie ogólnoustrojowe, a także wywierać bezpośredni wpływ na hormony regulujące układ rozrodczy, a badania eksperymentalne często nie pozwalają na ich rozróżnienie (PANKHURST 2016).

Istnieje także wiele efektów trzeciorzędowych wynikających z pierwotnych i wtórnych reakcji na stres, np. zmiany behawioru. Podczas stresu u ryb obserwuje się przykładowo: pobudzenie, lęk, zmniejszony apetyt (redukowane żerowanie). W warunkach laboratoryjnych zwiększony poziom kortyzolu jest skorelowany ze zmniejszoną eksploracją zbiornika, skototaksją (szukanie schronienia w ciemnym miejscu), tigmotaksją (pływanie przy ścianach zbiornika), nieregularnym pływaniem, nurkowaniem i nagłymi, krótkotrwałymi unieruchomieniami (SPAGNOLI i współaut. 2016). W warunkach naturalnych podczas narażenia na chroniczny stres, poza znaczącymi zmianami we wzorcu pływania, utrzymujący się wyższy poziom stresu może wpłynąć na zachowania względem drapieżników, np. może spowodować zwiększenie intensywności poszukiwania schronienia, zmienić zachowania terytorialne i zakłócić procesy pamięciowe (GALHARDO i OLIVEIRA 2009). Istnieją również stresory, które mogą wywoływać specyficzny efekt, np. substancje toksyczne, których działanie ukierunkowane jest na konkretne układy fizjologiczne (YADA i TORT 2016).

## WPLYW STRESU NA ODPORNOŚĆ RYB

### ODPORNOŚĆ RYB A ODPORNOŚĆ SSAKÓW

Ryby są pierwszymi kręgowcami, które w pełni wykształciły odporność wrodzoną i nabytą. Należy także pamiętać, że u ryb pierwszą linię obrony stanowi nabłonek jelit, skrzeli i skóry, a tkanki łączne są bogate w komórki odpornościowe. Najważniejszymi komórkami odporności wrodzonej ryb, tak jak u ssaków, są fagocyty neutrofile i makrofagi (których prekursorami są monocyty). Zainfekowane komórki mogą być również zabijane przez komórki NCC (ang. non-specific cytotoxic cells), będące odpowiednikiem ssaczycych komórek NK (ang. natural killer). Komórki te wytwarzają białka bakteriobójcze i/lub lityczne (VERBURG-VAN KEMENADE i współaut. 2009).

Podobnie jak u ssaków, również u ryb w obrębie odpowiedzi nabytej można wyróżnić odpowiedź typu komórkowego z udziałem limfocytów T i odpowiedź humoralną, w której główną rolę odgrywają limfocyty B, jedne z kluczowych komórek odpornościowych u ryb. Co ciekawe, komórki te u ryb wykazują cechy charakterystyczne dla odpowiedzi wrodzonej i nabytej. Odpowiadają za wydzielanie przeciwciał, produkcję cytokin, ale wykazują też zdolności fagocytarne (YADA i TORT 2016). Nabyta odpowiedź immunologiczna zapewnia układowi odpornościowemu kręgowców zdolność do rozpoznawania i zapamiętywania określonych patogenów oraz do uzyskania silniejszej i szybszej odpowiedzi podczas kolejnego zetknięcia się z tym samym patogenem. Zainicjowanie odpowiedzi immunologicznej wymaga specyficznego rozpoznania antygeny. Główne białka kompleksu zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex, MHC) prezentują fragmenty antygeny na powierzchni komórek prezentujących antygen (ang. antigen-presenting cell, APC). Limfocyty T, za pomocą specyficznego receptora TCR (ang. T-cell receptor), rozpoznają antygeny związane z cząsteczkami MHC. U ssaków występuje podział funkcji limfocytów T w obrębie ich różnych typów. Występują limfocyty pomocnicze T (Th), które wspierają funkcję limfocytów B, i cytotoksyczne limfocyty T (Tc), które atakują i zabijają komórki zainfekowane wirusem. Komórki Th za pomocą ko-receptora CD4 wiążą MHC klasy II, podczas gdy komórki Tc charakteryzują się obecnością ko-receptora CD8, który wiąże MHC klasy I. Taki podział funkcji nie jest w pełni ustalony u ryb, chociaż leukocyty ryb wykazują aktywność cytotoksyczną. Ponadto, u doskonałokostnych limfocyty T wykazują obecność CD4, CD8 i MHC klasy I (VERBURG-VAN KEMENADE i współaut. 2009, URBINATI i współaut. 2020). Ryby doskonałokostne okazują się być wyjątkowe pod względem organizacji genów MHC, ponieważ w przeciwieństwie do innych grup kręgowców, ich geny MHC klasy I i klasy II nie tworzą kompleksu. W związku z tym dla genów MHC u ryb doskonałokostnych zaproponowano nazwę genów zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility, MH) (RAKUS 2008). Rozpoznanie określonego antygeny prezentowanego przez MHC na powierzchni APC prowadzi do ekspansji klonalnej specyficznych limfocytów B i T (VERBURG-VAN KEMENADE i współaut. 2009). Limfocyty B wykazują na swojej powierzchni ekspresję receptorów (ang. B-cell receptor, BCR) i wydzielają je w postaci przeciwciał (CASTRO i TAFALLA 2015). Swoiste przeciwciała wydzielane przez limfocyty B przyłączają się do patogenu, co powoduje opsonizację i zwiększoną fagocytozę

patogenów. Pierwsze związanie antygeny indukuje komórki pamięci, które po kolejnym zetknięciu z antygenem powodują szybszą i bardziej efektywną odpowiedź nabytą. Limfocyty T swoiste dla antygeny zabijają zainfekowane komórki gospodarza lub wspomagają wytwarzanie przez limfocyty B przeciwciał specyficznych dla antygeny (VERBURG-VAN KEMENADE i współaut. 2009, URBINATI i współaut. 2020). Makrofagi są głównymi APC u ryb, ale u niektórych gatunków opisano również komórki dendrytyczne, które są ważnymi APC u ssaków. U ryb obecne są zatem wszystkie podstawowe funkcje odporności nabytej, jednak w porównaniu z ssakami repertuar ich przeciwciał jest bardziej ograniczony (VERBURG-VAN KEMENADE i współaut. 2009, MAGNADOTTIR 2010, SECOMBES i WANG 2012). Ryby doskonałokostne posiadają trzy różne klasy przeciwciał: IgM, IgT (zwane również IgZ u niektórych gatunków, np. danio pręgowanego) oraz IgD. IgM i IgD są obecne u wszystkich ryb doskonałokostnych i wydają się być niezbędnymi przeciwciałami, natomiast IgT/Z występują tylko u niektórych z nich. IgM jest najbardziej powszechną immunoglobuliną w surowicy oraz śluzie skóry i pełni kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej, natomiast IgT jest główną immunoglobuliną w błonie śluzowej jelita (YADA i TORT 2016). Ogólnie uważa się, że ograniczenie repertuaru przeciwciał ryb w porównaniu do ssaków, wynika m.in. z faktu, iż u ryb nie zachodzi (lub jest znacznie ograniczone) zjawisko przełączania klas przeciwciał (z IgM do różnych izotypów Ig) (SECOMBES i WANG 2012, CASTRO i TAFALLA 2015). Przełączanie klas polega na rekombinacji miejscowo specyficznej, w której dochodzi do zastąpienia regionu stałego łańcucha ciężkiego przeciwciała (BARRETO i współaut. 2005). Całokształt tych zmian jest definiowany jako przełączanie klas, ponieważ klasa przeciwciała jest określana przez region stały łańcucha ciężkiego, który jest ważny dla określenia jego funkcji efektorowej. Zmiana klasy nie wpływa na swoistość przeciwciał względem antygeny (nie dochodzi do modyfikacji części zmiennej) (STAVNEZER i AMEMIYA 2004, BARRETO i współaut. 2005). Chociaż limfocyty B ssaków i ryb mają wiele wspólnych cech, ich znaczenie w obronie organizmu może w niektórych przypadkach nie być porównywalne. Na przykład u ssaków fagocytyrujące limfocyty B są ograniczone do jamy otrzewnej i stanowią 10-15% wszystkich limfocytów B, podczas gdy u ryb doskonałokostnych są rozpowszechnione ogólnoustrojowo (w tym we krwi, śledzionie i nerce głowowej) i stanowią 60% populacji limfocytów B. Zatem wrodzona rola limfocytów B u ryb wydaje się

być o wiele ważniejsza niż u ssaków (YADA i TORT 2016). Podczas infekcji szybka, ale zazwyczaj krótkotrwała wrodzona odpowiedź immunologiczna poprzedza bardziej trwałą i specyficzną adaptacyjną odpowiedź immunologiczną. U ryb ten okres opóźnienia może wynosić nawet 10-12 tygodni, o czym należy pamiętać, rozważając profilaktykę szczepień ryb (MAGNADOTTIR 2010).

Do tkanki limfoidalnej ryb należą nerka głowowa, grasica, śledziona i tzw. zbiory limfoidalne (ang. gut-associated lymphoid tissue, GALT), występujące w ścianie jelit (GWIZDON 2019). W przeciwieństwie do wyższych kręgowców, ryby nie mają węzłów chłonnych i migdałków. Posiadają natomiast centra melanomakrofagowe (ang. melanomacrophage centers, MMC), które są uważane za homolog ośrodków rozmnażania (ang. germinal centres, GC) znajdujących się we wtórnych narządach limfatycznych ssaków (SECOMBES i WANG 2012). MMC występują w całym ciele, a koncentrują się głównie w śledzionie, wątrobie i nerkach. Ponadto, ryby nie posiadają szpiku kostnego i kępek Peyera (WENDELAAR BONGA 1997). Sugeruje się jednak podobieństwo głównych skupisk GALT w środkowym odcinku jelit z kępkami Peyera ssaków (GWIZDON 2019). Największymi narządami limfoidalnymi i immunokompetentnymi u ryb są nerka głowowa i śledziona. Jak już wspomniano, nerka głowowa pełni rolę szpiku kostnego. Zawiera komórki krwiotwórcze, w obrębie których zachodzi proces tworzenia komórek mieloidalnych i limfoidalnych (WENDELAAR BONGA 1997). U ryb dojrzałych immunologicznie śledziona jest wtórnym narządem limfoidalnym. Pełniona przez nią funkcja dotyczy odpowiedzi wrodzonej i nabytej (obecność makrofagów i limfocytów T i B) oraz produkcji czerwonych krwinek (erytropoeza) (WENDELAAR BONGA 1997, MYSZKOWSKA 2019, BALDISSERA i współaut. 2020). Grasica, która wraz z dojrzewaniem podlega inwolucji, podobnie jak u ssaków, u wielu, ale nie wszystkich gatunków ryb doskonałokostnych, działa jako centrum dojrzewania limfocytów T (WENDELAAR BONGA 1997, MYSZKOWSKA 2019).

Dojrzewanie, proliferacja, różnicowanie i aktywność leukocytów ryb są oczywiście regulowane przez cytokiny i ich receptory. W zależności od stadium zakażenia i funkcji poszczególnych rodzajów komórek, komórki odpornościowe wytwarzają różne typy cytokin. Wśród tych cytokin wyróżniamy: interleukiny (IL), interferony (IFN), chemokiny (chemotaktyczne cytokiny), które regulują migrację komórek (chemotaksja) i inne cytokiny, do których np. należą czynniki martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factors, TNFs) oraz czynniki stymulujące wzrost ko-

lonii (ang. colony-stimulating factors, CSFs) (CASTRO i TAFALLA 2015). Cytokiny mogą wywierać różnorodny wpływ na wzrost i różnicowanie komórek. Dla wielu cytokin wytwarzanych u ssaków, u ryb wykazano występowanie ortologów. Pomimo niskiego stopnia homologii sekwencji, zachowane są ich istotne motywy i struktury trójwymiarowe. W układzie odpornościowym kręgowców prozapalne cytokiny, w tym czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) i interleukina 6 (IL-6), indukują odpowiedź ostrej fazy i uwalnianie chemokin. Następnie uwalniana jest interleukina 12 (IL-12), co z kolei stymuluje uwalnianie interferonu typu II: interferonu-gamma (IFN- $\gamma$ ). W porównaniu do ssaków, odpowiedź prozapalna u ryb charakteryzuje się pierwszą falą ekspresji TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , a następnie ekspresją chemokin i maksymalnym wzrostem ekspresji IL-12 (CHADZIŃSKA i współaut. 2008). TNF- $\alpha$  wykazuje ekspresję konstytutywną w nerwie głowowej i skrzelach oraz może być indukowany przez stymulację makrofagów nerki głowowej lipopolisacharydem (LPS), pochodzącym z bakterii Gram-ujemnych. TNF- $\alpha$  kontroluje także wewnątrzkomórkową replikację patogenów i indukuje proliferację komórek. Bierze również udział w stymulacji wytwarzania tlenku azotu (NO). IL-1 $\beta$  wydzielana przez makrofagi stymuluje proliferację tymocytów (dojrzewających limfocytów T), inicjuje reakcję ostrej fazy oraz aktywuje makrofagi i limfocyty T. Ekspresja IL-12 może być indukowana w makrofagach nerki po infekcjach bakteryjnych i wirusowych. Z kolei IFN- $\gamma$ , wytwarzany głównie przez NCC i limfocyty T, aktywuje makrofagi w celu zwiększenia ich aktywności bakteriofagowej w tym wytwarzania NO i chemokin. Chemokiny występują we wszystkich klasycznych narządach odpornościowych i biorą udział w kierowaniu leukocytów do miejsca zapalenia. Sygnalizacja komórek odpornościowych ma decydujące znaczenie dla szybkiego i skutecznego zwalczania patogenów. Niewielkie ilości cytokin mogą generować silne odpowiedzi zapalne i wymagana jest ścisła kontrola nad ich wytwarzaniem, aby zapobiec uszkodzeniu komórek gospodarza. Jak już wspomniano, cytokiny ryb wykazują podobne działanie do ich odpowiedników u ssaków, jednak stopień ich podobieństwa jest różny. Stopień homologii sekwencji między ortologami cytokin ludzi i ryb wynosi zazwyczaj około 20 do 30%. Sugeruje to istotne różnice w wiązaniu lub powinowactwie do przeciwciał, receptorów lub białek wiążących (VERBURG-VAN KEMENADE i współaut. 2009). Warto także wspomnieć, że w związku ze zjawiskiem duplikacji genomu (ang. whole genome duplication, WGD), które mia-

ło miejsce w ewolucji ryb, wiele genów, w tym genów kodujących cytokiny, występuje u nich w formie zduplikowanej. Ewolucja genów kodujących cytokiny i ich receptory także obejmowała wiele duplikacji mniejszej puli genów oraz różnicowanie sekwencji i funkcji ich produktów. Należy wspomnieć, że po WGD większość zduplikowanych genów powraca do systemu pojedynczych genów poprzez mutacje utraty funkcji. Jednak w niektórych przypadkach zduplikowane geny są zachowywane i przechodzą subfunkcjonalizację, w której dwa geny dzielą funkcję oryginalnego genu, lub neofunkcjonalizację, w której mutacje nadają jednemu z genów nową funkcję. Zduplikowane geny mogą być również zachowywane w celu zachowania zdolności do fenotypowego buforowania mutacji (ang. genetic robustness) (ALSOP i VIJAYAN 2009). Danio pręgowany ma około 2900 par zduplikowanych genów, w obrębie około 20 000 genów kodujących białka (BLOMME i współaut. 2006, ALSOP i VIJAYAN 2009). Stwierdzono, że cytokiny są jednymi z najszybciej ewoluujących białek, co prawdopodobnie wynika z wysokiej presji ze strony patogenów. Jednak pomimo tych zastrzeżeń kręgowce wydają się być grupą dość jednorodną pod względem aktywności biologicznej wywieranej przez cytokiny na komórki docelowe (SCAPIGLIATI i współaut. 2007, VERBURG-VAN KEMENADE i współaut. 2009).

#### STRES ZWIĘKSZA PODATNOŚĆ NA ZAKAŻENIA

Badania w zakresie neuroendokrynologii i immunologii ujawniły imponującą liczbę wspólnych ligandów, receptorów i szlaków sygnałowych, poprzez które układ nerwowy, hormonalny i odpornościowy współdziałają w celu koordynowania allostazy. Wiele receptorów sklasyfikowanych jako typowe receptory hormonalne ulega ekspresji na/w leukocytach, a na poziom ich ekspresji może wpływać stymulacja immunologiczna. Wśród nich są także receptory adrenergiczne i receptory GR. Z kolei na typowych komórkach neuroendokrynych występują receptory dla cytokin (VERBURG-VAN KEMENADE i współaut. 2017). Układ nerwowy, odpornościowy i hormonalny u kręgowców współpracują ze sobą, w przetwarzaniu informacji i reagowaniu na bodźce zewnętrzne lub wewnętrzne, szczególnie w sytuacji stresowej, gdy konieczna jest szybka reakcja (TORT 2011, YADA i TORT 2016). Układ nerwowy moduluje natychmiastową ogólną odpowiedź wrodzoną oraz aktywność hormonalną. Uwalniane hormony stresu przygotowują układ odpornościowy na potencjalne wyzwania (np. infekcje, regenerację ran). Tym samym rozpoznanie stresu przez układ nerwowy jest wczesnym sy-

gnałem ostrzegawczym dla układu odpornościowego. Ta interakcja występuje u wszystkich kręgowców i angażuje cząsteczki takie jak: CRH, ACTH, GK, aminy biogenne i cytokiny. Z tego względu, odpowiedź na stres charakteryzuje się zaangażowaniem komórek odpornościowych i neuroendokrynnych na poziomie ogólnosystemowym (YADA i TORT 2016).

Stres może modulować zarówno przebieg wrodzonej jak i nabytej reakcji odpornościowej. Przykładowo u ssaków stwierdzono, że w stymulowanych LPS monocytach i makrofagach, adrenalina hamuje tworzenie wolnych rodników tlenowych poprzez receptor adrenergiczny  $\beta$ 2-AR. Ponadto, adrenalina, noradrenalina i agonści receptorów  $\beta$ -adrenergicznych hamują syntezę i uwalnianie prozapalnych cytokin, takich jak TNF- $\alpha$  i IL-12, jednocześnie promując wydzielanie przeciwzapalnej interleukiny-10 (IL-10). Zastosowanie agonistów  $\beta$ 2-AR hamuje syntezę IFN- $\gamma$  przez komórki Th1, ale nie wpływa na syntezę IL-4 przez komórki Th2 (prawdopodobnie z powodu braku  $\beta$ 2-AR na komórkach Th2). Katecholaminy mogą pośrednio wpływać na migrację i proliferację limfocytów, wytwarzanie przeciwciał i lizę komórek poprzez regulację poziomu cAMP (YANG i GLASER 2002, CHADZIŃSKA i współaut. 2012).

Glikokortykoidy wydają się mieć immunosupresyjne właściwości o złożonym działaniu. Wykazano bowiem, że mogą pobudzać apoptozę niektórych populacji leukocytów, hamować uwalnianie cytokin, osłabiać migrację i proliferację leukocytów oraz aktywność komórek NK. U ssaków GK zwiększają w monocytach ekspresję genów związanych z fagocytozą komórek apoptotycznych oraz wpływają na wzrost migracji monocytów do miejsca infekcji (ENGELSMA i współaut. 2002, TORT 2011). GK hamują również szlak jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), co prowadzi do zmniejszenia produkcji cytokin prozapalnych, takich jak IL-1, IL-6 i TNF (TORT 2011). GK są powszechnie stosowane jako środki immunosupresyjne w chorobach zapalnych i autoimmunologicznych (ENGELSMA i współaut. 2002, DHABHAR 2009). Jednak klasyczny pogląd, że GK działają wyłącznie immunosupresyjnie jest obecnie kwestionowany, ponieważ wydaje się, że w warunkach fizjologicznych GK mogą wywierać zróżnicowany wpływ regulując układ odpornościowy. Przykładowo, w warunkach stresowych, obserwuje się limfopenię, zmniejszoną proliferację limfocytów i zwiększoną ich apoptozę, a z drugiej strony podczas stresu następuje bardzo szybki wzrost względnej liczby krążących

granulocytów obojętnochłonnych (ENGELSMA i współaut. 2002, PIJANOWSKI i współaut. 2015). GK wpływają na migrację leukocytów, powodując redystrybucję krążących leukocytów do różnych przedziałów ciała. Apoptoza odgrywa kluczową rolę w prawidłowym rozwoju i regulacji układu odpornościowego i jest indukowana przez GK podczas selekcji i różnicowania tymocytów i komórek B. Kortyzol zmniejsza natomiast i opóźnia apoptozę neutrofilii (ENGELSMA i współaut. 2002, RONCHETTI i współaut. 2018). Odnotowuje się również zróżnicowany wpływ GK na ekspresję cytokin. Z jednej strony uwalnianie cytokin prozapalnych, w tym typowych cytokin limfocytów T pomocniczych (Th1): interleukiny-2 (IL-2) i interferonu- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), jest silnie tłumione przez GK. Z drugiej strony stymulowana jest ekspresja wielu cytokin limfocytów T pomocniczych (Th2) w tym interleukiny-4 (IL-4) i IL-10 (ENGELSMA i współaut. 2002). Sądzi się zatem, że GK indukują przesunięcie równowagi limfocytów pomocniczych T (Th) z komórek Th1 i komórkowej odpowiedzi immunologicznej, w kierunku komórek Th2, które biorą udział w wytwarzaniu przeciwciał, głównie poprzez hamowanie syntezy IL-12 (cytokiny stymulującej komórki Th1) przez komórki dendrytyczne i makrofagi (CHADZIŃSKA i współaut. 2012). Badania przeprowadzone na myszach wykazały, że podczas infekcji *Listeria monocytogenes*, stres unieruchomienia może hamować migrację leukocytów i produkcję cytokin Th1, indukując jednocześnie ekspresję cytokin Th2. Na przykład, wśród studentów medycyny zaobserwowano zwiększoną częstość zakażeń górnych dróg oddechowych w czasie sesji egzaminacyjnej. Ponadto wykazano, że przedłużone okresy stresu akademickiego są związane ze znacznym spadkiem poziomu IgA w ślinie. Sugeruje to, że osoby doświadczające stresu akademickiego wykazują osłabienie pierwszej linii obrony przed patogenami atakującymi błonę śluzową układu żołądkowo-jelitowego, a zatem są bardziej podatne na choroby zakaźne (YANG i GLASER 2002).

Wpływ stresu na układ odpornościowy jest również szeroko badany u ryb. Badania dotyczące wpływu katecholamin na funkcje immunologiczne ryb wykazały, iż aktywność fagocytarna makrofagów pstrąga tęczowego zmniejsza się po zastosowaniu agonistów receptorów  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergicznych *in vitro*. Ponadto ligandy receptorów adrenergicznych modulują produkcję reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS). Działanie katecholamin u ryb przejawia się również w komponentach odpowiedzi nabytej. Wykazano, iż agonista receptora  $\beta$ -ADR tłumii, natomiast działanie *in vitro* agoni-

stów receptora  $\alpha$ 2-ADR wzmacnia odpowiedź humoralną leukocytów śledziona. Sympatektomia (odnerwienie współczulne) *in vivo*, przeprowadzona przed (ale nie po) immunizacji, powoduje zwiększenie odpowiedzi humoralnej, co wskazuje na hamowane przez katecholaminy wydzielania przeciwciał we wczesnych stadiach odpowiedzi adaptacyjnej (CHADZIŃSKA i współaut. 2012). W badaniach dotyczących wpływu stresu na odporność, które zostały przeprowadzone na czterech, różnych pod względem podatności na infekcje, liniach karpia (R3, R3xR8, K i R2) zaobserwowano, że ryby o wyższej podatności na infekcje, wykazują silniejszą reakcję stresową (PLJANOWSKI i współaut. 2015). Ryby są szczególnie ciekawym modelem badań nad wpływem stresu na odporność, ze względu na unikatowe wśród kręgowców funkcje nerki główowej. Jak już wspomniano, narząd ten zespala komponenty wszystkich trzech układów regulujących i w związku z tym daje możliwość bezpośrednich interakcji neuroimmunoendokrynnych (TORT 2011, NARDOCCI i współaut. 2014). Nerka główowa tworzy tym samym specyficzne środowisko dojrzewania np. dla monocytów/makrofagów, w którym podlegają bezpośredniemu, parakrynnemu działaniu hormonów stresu. Makrofagi to niezwykle plastyczne komórki, wykazujące zjawisko polaryzacji, w wyniku której dochodzi do powstawania komórek klasycznie aktywowanych M1 (makrofagi prozapalne) i alternatywnie aktywowanych M2 (makrofagi przeciwzapalne). Wyniki badań przeprowadzonych na karpkach, w których wpływ stresu/kortyzolu na polaryzację makrofagów badano *in vitro* (kortyzol) i *in vivo* (stres unieruchomienia) sugerują, że kortyzol *in vitro* i stres *in vivo* kierują monocyty/makrofagi nerki główowej na ścieżkę polaryzacji alternatywnej. Badania te potwierdzają, że podobnie jak u ssaków, także u ryb glikokortykoidy są istotnymi stymulatorami alternatywnej polaryzacji makrofagów (MACIUSZEK i współaut. 2019). Funkcje nerki główowej, do których należy wytwarzanie, dojrzewanie i różnicowanie komórek odpornościowych (leukocytów) oraz uwalnianie kortyzolu i katecholamin są kluczowe, kiedy zachodzi potrzeba uruchomienia systemowej reakcji na stres (VERBURG-VAN KEMENADE i współaut. 2009, 2017; YADA i TORT 2016). Podobnie jak u ssaków, hormony stresu u ryb wykazują działanie immunomodulacyjne. Kortyzol jako dominujący steroid w reakcji stresowej ma szeroki i zróżnicowany wpływ na układ odpornościowy. Stwierdzono na przykład, że u karpia stres zmniejsza liczbę krążących limfocytów B i odpowiedź przeciwciał po immunizacji *in vivo*, a także hamuje ekspresję cytokin prozapalnych *in vitro*. Stres często

działa immunosupresyjnie, przeciwdziałając potencjalnie szkodliwym skutkom zbyt silnej odpowiedzi prozapalnej, jednak ostry stres i związane z nim uwalnianie kortyzolu może wywierać działanie stymulujące (STOLTE i współaut. 2008, TORT 2011). Stres wywołuje zmiany w liczbie i szybkości rekrutacji komórek odpornościowych, które są kierowane do tkanek lub narządów w celu zwiększenia skutecznej ochrony immunologicznej. Wiąże się to z istotnymi różnicami w rozmieszczeniu leukocytów w różnych obszarach ciała. Pod wpływem stresu zachodzą zmiany w liczbie leukocytów, zależnie od ich typów. Liczba limfocytów jest znacznie zmniejszona, natomiast liczba fagocytów (neutrofilii i monocytów/makrofagów) wzrasta, np. kortyzol indukuje apoptozę limfocytów, natomiast hamuje apoptozę neutrofilii, co wskazuje na selektywną regulację wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej (DHABHAR 2009, TORT 2011, CHADZIŃSKA i współaut. 2012, PLJANOWSKI i współaut. 2015). Poziom leukocytów we krwi jest zależny od intensywności i czasu trwania stresu. Ostry, krótkotrwały stres stymuluje wytwarzanie leukocytów w nerce główowej, co skutkuje wzrostem w krążeniu liczby leukocytów, a konkretnie neutrofilii. W wyniku ciągłego stresu różne subpopulacje leukocytów, głównie limfocyty, koncentrują się w narządach docelowych, w których działa bodziec stresowy, dlatego zarówno centralne narządy limfatyczne, jak i krew wykazują spadek liczby tych komórek. Uważa się, że wywołana stresem neutrofilia, czyli zwiększenie liczby neutrofilii w układzie krążenia, jest odpowiedzią adaptacyjną, ponieważ przedłuża żywotność komórek, które tworzą pierwszą linię obrony przeciwko patogenom. Biorąc pod uwagę kluczowe znaczenie neutrofilii w pierwszej linii obrony, przedłużenie ich życia, a tym samym utrzymanie większej liczby krążących neutrofilii jest korzystne w sytuacjach ostrego stresu, kiedy reakcja walki i ucieczki zwiększa szansę na zranienie, a tym samym zakażenie. Warto jednak wspomnieć, że u ryb kortyzol nie tylko zwiększa liczbę granulocytów obojętnochłonnych we krwi, ale również hamuje migrację tych komórek do uszkodzonych miejsc lub zmian zapalnych i spowalnia gojenie się ran (WENDELAAR BONGA 1997). Ponadto wysokie poziomy kortyzolu u ryb i skorelowana z tym immunosupresja, wiąże się ze zmniejszoną odpornością na patogeny oportunistyczne (bakterie, grzyby, pierwotniaki lub wirusy) lub na eksperymentalne zakażenie patogenami, co prowadzi do chorób i zwiększonej śmiertelności (WENDELAAR BONGA 1997, BALDISSERA i współaut. 2020).

W kontekście wpływu stresu na odporność należy także wspomnieć o ważnym

aspekcie wpływu kortyzolu na mikrobiom. Badania przeprowadzone na łososiu atlantyckim wykazały bowiem, że wzrost stężenia kortyzolu po ekspozycji na łagodny stresor wiąże się ze zmianami w różnorodności i składzie mikrobiomu jelitowego. W szczególności dotyczy to zmniejszonej liczebności bakterii kwasu mlekowego z rodzaju *Carnobacterium*, oraz zwiększonej liczebności kilku rodzajów, wywołujących zapalenie i oportunistycznych, bakterii patogennych. Biorąc pod uwagę fundamentalny wpływ mikrobioty i jej metabolitów na wiele aspektów zdrowia gospodarza, sugeruje to, że zaburzenie mikrobiomu jelitowego prawdopodobnie przyczynia się do niekorzystnego wpływu stresu na funkcje układu immunologicznego i odporność na choroby (DAWOOD 2020, UREN WEBSTER i współaut. 2020).

### PODSUMOWANIE

Reakcja stresowa jest mechanizmem konserwatywnym ewolucyjnie. Tym samym istnieje wiele podobieństw między reakcjami na stres kregowców wodnych i lądowych. Wskazuje to, że historia ewolucji tych mechanizmów, mających fundamentalne znaczenie adaptacyjne, trwa co najmniej 400 milionów lat. Potwierdza to wysokie, sięgające 93%, podobieństwo sekwencji głównych przekaźników neuroendokrynnych i ich receptorów zaangażowanych w kontrolę reakcji na stres (WENDELAAR BONGA 1997, ENGELSMA i współaut. 2002). Stanowi to wyraźny kontrast względem różnorodności mediatorów immunologicznych. Również funkcje głównych hormonów stresu są podobne. Wzrost poziomu katecholamin w osoczu (pierwszych neurotransmiterów), stanowi niespecyficzny sygnał alarmowy lub reakcję aktywacji, która prowadzi do szybkiej mobilizacji substratów energetycznych oraz zwiększonego poboru i transferu tlenu. Wzrost krążącego kortyzolu następuje wolniej i trwa dłużej, ułatwiając (glukoneogeneza) lub łagodząc (przywrócenie zaburzonej równowagi wodnomineralnej) działanie katecholamin. Podobieństwa dotyczą również hamującego wpływu stresu na wzrost, rozmnażanie i funkcje immunologiczne (WENDELAAR BONGA 1997).

Z ewolucyjnego punktu widzenia tego rodzaju efekty to kompromisy ewolucyjne (w ramach zjawiska trade off) lub koszty dostosowania, które występują wówczas, gdy korzystna zmiana jednej cechy jest powiązana ze szkodliwą zmianą innej. Jest to również podstawowa zasada teorii ewolucji historii życiowych organizmów (optymalna alokacja zasobów). W przypadku funkcji immunologicznych warto pamiętać, że o ile krótkoter-

minowe immunosupresyjne działanie hormonów stresu może mieć funkcję adaptacyjną (ponieważ zapobiega nadmiernej aktywacji układu odpornościowego i wiąże się z oszczędnościami energetycznymi), w perspektywie długoterminowej może stracić wymiar adaptacyjny i promować rozwój chorób. Homeostaza organizmu obejmuje złożoną sieć sygnalizacji hormonalnej i cytokinowej, w której przekaźniki układu neuroendokrynnego i układu odpornościowego blisko współpracują. Zarówno stres, jak i odpowiedź immunologiczna muszą być pod ścisłą kontrolą, aby zapobiec potencjalnym szkodliwym działaniom w obrębie sygnalizacji komórkowych w organizmie.

Warto w tym miejscu raz jeszcze podkreślić, że ryby stanowią interesujący model do badań ewolucji odporności, a w szczególności interakcji neuro-endokrynno-immunologicznych. W przeciwieństwie do ssaków, u ryb produkcja kortyzolu (komórki śródnerkowe), katecholamin (komórki chromafinowe) oraz hematopoeza i produkcja przeciwciał są zespolone w obrębie jednego narządu – nerki główowej. Zatem jest to krytyczne miejsce bezpośrednich interakcji parakrynnych między układem odpornościowym a neuroendokrynnym. Konieczne są jednak dalsze badania nad rybami doskonałokostnymi w celu poznania i lepszego zrozumienia ewolucyjnego znaczenia dwukierunkowej interakcji immuno-neuroendokrynnnej u różnych gatunków. Zrozumienie komórkowych mechanizmów neuroendokrynnnej regulacji odpowiedzi immunologicznej u ryb pozwoli na opracowanie nowych strategii farmaceutycznych i terapeutycznych w celu zapobiegania chorobom wywoływanym lub pogłębianym przez stres. Intensywna akwakultura charakteryzuje się szeregiem procedur, które należy badać pod kątem ogólnego dobrostanu ryb (m.in. gęstość obsady w zbiornikach, metody połowów, transportu i uśmiercania). Nie ulega wątpliwości, że ryby ulegają stresowi, który wpływa na funkcjonowanie wielu narządów i tkanek. Należy o tym pamiętać w kontekście powracających każdego roku w okolicach świąt Bożego Narodzenia, dyskusji na temat humanitarnych połowów tych zwierząt, ich transportu i sprzedaży. Przedstawione w tym artykule wyniki badań dotyczących stresu u ryb podkreślają konieczność ulepszania i opracowywania nowych narzędzi i metod, które można wykorzystać do oceny wpływu stosowanych w akwakulturze procedur na dobrostan i zapewnić obiektywne informacje, które pomogą określić i zdefiniować granice dopuszczalnych warunków w niewoli, a także niwelować towarzyszące im czynniki stresogenne.

## Streszczenie

Mechanizm reakcji na stres jest konserwatywny ewolucyjnie, w związku z tym mimo odmiennego środowiska życia, odpowiedź stresową ryb doskonałokostnych charakteryzuje wiele podobieństw do kręgowców lądowych. Obejmują one główne przekaźniki osi układ współczulny-komórki chromafinowe (odpowiednik osi układ współczulny-rdzeń nadnerczy) oraz osi podwzgórze-przysadka-komórki śródnierkowe nerki główowej (funkcjonalny analog osi podwzgórze-przysadka-nadnercza), a także ich główne funkcje. Współdziałanie układu neuroendokrynnego i układu odpornościowego stanowi integralną część fizjologii, nieodzowną dla utrzymania homeostazy. Zakłócenie złożonych interakcji neuro-endokrynno-immunologicznych ma negatywny wpływ na stan zdrowia i ogólny dobrostan zwierząt i ludzi. Ryby doskonałokostne stanowią szczególnie intrygujący model w zakresie badań wpływu stresu na odporność, ponieważ funkcje immunologiczne i hormonalne są u nich zintegrowane w obrębie jednego narządu - nerki główowej. W konsekwencji procesy immunologiczne podlegają bezpośredniej modulacji parakrynnnej. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie przeglądu aktualnej wiedzy na temat przebiegu reakcji stresowej u ryb i jej roli w regulacji odporności ryb.

## LITERATURA

- ALSOP D., VIJAYAN M., 2009. *The zebrafish stress axis: Molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event*. Gen. Comp. Endocrinol. 161, 62-66.
- BARRETO V. M., PAN-HAMMARSTROM Q., ZHAO Y., HAMMARSTROM L., MISULOVIN Z., NUSSENZWEIG M. C., 2005. *AID from bony fish catalyzes class switch recombination*. J. Exp. Med. 202, 733-738.
- BALDISSERA M. D., DE FREITAS SOUZA C., VAL A. L., BALDISSEROTTO B., 2020. *Involvement of purinergic signaling in the Amazon fish *Pterygoplichthys pardalis* subjected to handling stress: Relationship with immune response*. Aquaculture 514, doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734481.
- BARTON B., 2002. *Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids*. Integr. Comp. Biol. 42, 517-525.
- BLOMME T., VANDEPOELE K., DE BODT S., SIMILION C., MAERE S., VAN DE PEER Y., 2006. *The gain and loss of genes during 600 million years of vertebrate evolution*. Gen. Biol. 7, doi: 10.1186/gb-2006-7-5-r43.
- BRAITHWAITE V. A., EBBESSON L. O. E., 2014. *Pain and stress responses in farmed fish*. OIE Revue Scientifique et Technique 33, 245-253.
- BURY N. R., STURM A., 2007. *Evolution of the corticosteroid receptor signalling pathway in fish*. Gen. Comp. Endocrinol. 153, 47-56.
- CASTRO R., TAFALLA C., 2015. *Overview of fish immunity*. [W:] *Mucosal health in aquaculture*. BECK B. H., PEATMAN E. (red.). Academic Press, Elsevier Inc., United States, 3-54.
- CHADZIŃSKA M., LEON-KLOOSTERZIEL K. M., PLYTYCZ B., VERBURG-VAN KEMENADE B. M. L., 2008. *In vivo kinetics of cytokine expression during peritonitis in carp: Evidence for innate and alternative macrophage polarization*. Dev. Comp. Immunol. 32, 509-518.
- CHADZIŃSKA M., TERTIL E., KEPKA M., HERMSEN T., SCHEER M., VERBURG-VAN KEMENADE B. M. L., 2012. *Adrenergic regulation of the innate immune response in common carp (*Cyprinus carpio* L.)*. Dev. Comp. Immunol. 36, 306-316.
- CHEN Y., ARSENAULT R., NAPPER S., GRIEBEL P., 2015. *Models and methods to investigate acute stress responses in cattle*. Animals 5, 1268-1295.
- DAS C., THRAYA M., VIJAYAN M. M., 2018. *Nongenomic cortisol signaling in fish*. Gen. Comp. Endocrinol. 265, 121-127.
- DAWOOD M. A. O., 2020. *Nutritional immunity of fish intestines: important insights for sustainable aquaculture*. Rev. Aquacult., doi.org/10.1111/raq.12492.
- DHABHAR F. S., 2009. *Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: Implications for immunoprotection and immunopathology*. NeuroImmunoModulation 16, 300-317.
- ENGELSMA M. Y., HUISING M. O., VAN MUISWINKEL W. B., FLIK G., KWANG J., SVELKOUH H. F. J., VERBURG-VAN KEMENADE B. M. L., 2002. *Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1*. Vet. Immunol. Immunopathol. 87, 467-479.
- FAUGHT E., ALURU N., VIJAYAN M. M., 2016. *The molecular stress response*. [W:] *Biology of stress in fish: fish physiology*. SCHRECK C. B., TORT L., FARRELL A. P., BRAUNER C. J. (red.). Academic Press, Elsevier Inc., United States, 113-166.
- GALHARDO L., OLIVEIRA R. F., 2009. *Psychological stress and welfare in fish*. Ann. Rev. Biomed. Sci. 11, 1-20.
- GOETZ F. W., 1983. *Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes*. [W:] *Reproduction behavior and fertility control: fish physiology*. HOAR W. S., RANDALL D. J., DONALDSON E. M. (red.). Academic Press, Elsevier Inc., United States, 117-170.
- GONZALO A., CARRASCO G. A., VAN DE KAR L. D., 2003. *Neuroendocrine pharmacology of stress*. Eur. J. Pharmacol. 463, 235-272.
- GORISSEN M., FLIK G., 2016. *The endocrinology of the stress response in fish: an adaptation-physiological view*. [W:] *Biology of stress in fish: fish physiology*. SCHRECK C. B., TORT L., FARRELL A. P., BRAUNER C. J. (red.). Academic Press, Elsevier Inc., United States, 75-111.
- GRZANKA A., JARZAB J., 2009. *Niegenomowy mechanizm działania glikokortykosteroidów*. Pneumonologia i Alergologia Polska 77, 387-393.
- GWIZDON M., 2019. *Wpływ żywienia karpia na kształtowanie się parametrów immunologicznych jelita*. [W:] *Uwarunkowania utrzymania dobrostanu zwierząt w Polsce*. TRUSZKOWSKI W. (red.). Katedra Agrotechnologii, Zarządzania Produkcją Rolniczą i Agrobiznesu, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Olsztyn, 44-53.
- MACIUSZEK M., RYDZ L., ŚWITAKOWSKA I., VERBURG-VAN KEMENADE B. M. L., CHADZIŃSKA M., 2019. *Effects of stress and cortisol on the polarization of carp macrophages*. Fish Shellfish Immunol. 94, 27-37.
- MAGNADOTTIR B., 2010. *Immunological Control of Fish Diseases*. Marine Biotechnol. 12, 361-379.
- MILLA S., WANG N., MANDIKI S. N. M., KESTEMONT P., 2009. *Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction?* Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol. 153, 242-251.
- MYSZKOWSKA A., 2019. *Ocena parametrów stresu oksydacyjnego w śledzienie w powiązaniu z żywieniem karpia*. [W:] *Uwarunkowania utrzy-*

- mania dobrostanu zwierząt w Polsce. TRUSZKOWSKI W. (red.). Katedra Agrotechnologii, Zarządzania Produkcją Rolniczą i Agrobiznesu, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Olsztyn, 54-61.
- NARDOCCI G., NAVARRO C., CORTÉS P. P., IMARAI M., MONTÓYA M., VALENZUELA B., JARA P., ACUÑA-CASTILLO C., FERNÁNDEZ R., 2014. *Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish*. *Fish Shellfish Immunol.* 40, 531-538.
- PANKHURST N. W., 2016. *Reproduction and development*. [W:] *Biology of stress in fish: fish physiology*. SCHRECK C. B., TORT L., FARRELL A. P., BRAUNER C. J. (red.). Academic Press, Elsevier Inc., United States, 295-331.
- PATINO R., THOMAS P., 1990. *Induction of maturation of atlantic croaker oocytes by 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in vitro: Consideration of some biological and experimental variables*. *J. Exp. Zool.* 255, 97-109.
- PIJANOWSKI L., JURECKA P., IRNAZAROW I., KEPKA M., SZWEJSER E., VERBURG-VAN KEMENADE B. M. L., CHADZIŃSKA M., 2015. *Activity of the hypothalamus-pituitary-interrenal axis (HPI axis) and immune response in carp lines with different susceptibility to disease*. *Fish Physiol. Biochem.* 41, 1261-1278.
- PRUNET P., STURM A., MILLA S., 2006. *Multiple corticosteroid receptors in fish: From old ideas to new concepts*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 17-23.
- RAKUS K. L., 2008. *Major histocompatibility (MH) polymorphism of common carp: link with disease resistance*. Doctor of Philosophy, Wageningen University.
- RONCHETTI S., RICCI E., MIGLIORATI G., GENTILI M., RICCARDI C., 2018. *How glucocorticoids affect the neutrophil life*. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1-12.
- SADOUL B., VIJAYAN M. M., 2016. *Stress and growth*. [W:] *Biology of stress in fish: fish physiology*. SCHRECK C. B., TORT L., FARRELL A. P., BRAUNER C. J. (red.). Academic Press, Elsevier Inc., United States, 167-205.
- SCHRECK C. B., TORT L., 2016. *The concept of stress in fish*. [W:] *Biology of stress in fish: fish physiology*. SCHRECK C. B., TORT L., FARRELL A. P., BRAUNER C. J. (red.). Academic Press, Elsevier Inc., United States, 35, 1-34.
- SAMARAS A., ESPÍRITO SANTO C., PAPANDROULAKIS N., MITRIZAKIS N., PAVLIDIS M., HÖGLUND E., PELGRIM T. N. M., ZETHOF J., SPANINGS F. A. T., VINDAS M. A., EBBESSON L. O. E., FLIK G., GORISSEN M., 2018. *Allostatic load and stress physiology in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)*. *Front. Endocrinol.* 9, 1-13.
- SCAPIGLIATI G., BUONOCORE F., MAZZINI M., 2007. *Biological activity of cytokines: an evolutionary perspective*. *Curr. Pharmaceut. Design* 12, 3071-3081.
- SECOMBES C. J., WANG T., 2012. *The innate and adaptive immune system of fish*. [W:] *Infectious disease in aquaculture: prevention and control*. AUSTIN B. (red.). Elsevier Inc., 3-68.
- SPAGNOLI S., LAWRENCE C., KENT M. L., 2016. *Stress in fish as model organisms*. [W:] *Biology of stress in fish: fish physiology*. SCHRECK C. B., TORT L., FARRELL A. P., BRAUNER C. J. (red.). Academic Press, Elsevier Inc., United States, 35, 541-564.
- SPENCERA R. L., DEAK T., 2017. *A users guide to HPA axis research*. *Physiol. Behav.* 178, 43-65.
- STAVNEZER J., AMEMIYA C. T., 2004. *Evolution of isotype switching*. *Semin. Immunol.* 16, 257-275.
- STOLTE E. H., NABUURSC S. B., BURYD N. R., STURMD A., FLIKB G., SAVALKOULA H. F. J., VERBURG-VAN KEMENADE B. M. L., 2008. *Stress and innate immunity in carp: Corticosteroid receptors and pro-inflammatory cytokines*. *Mol. Immunol.* 46, 70-79.
- TORT L., 2011. *Stress and immune modulation in fish*. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1366-1375.
- URBINATI E. C., ZANUZZO F. S., BILLER J. D., 2020. *Stress and immune system in fish*. [W:] *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. BALDISSEROTTO B., URBINATI E. C., CYRINO J. E. P. (red.). Academic Press, Elsevier Inc., United States, 93-114.
- UREN WEBSTER T. M., RODRIGUEZ-BARRETO D., CONSUEGRA S. GARCIA DE LEANIZ C., 2020. *Cortisol-Related Signatures of Stress in the Fish Microbiome*. *Front. Microbiol.* 11, 1-9.
- VERBURG-VAN KEMENADE B. M. L., STOLTE E. H., METZ J. R., CHADZIŃSKA M., 2009. *Neuroendocrine-immune interactions in teleost fish*. [W:] *Fish neuroendocrinology, Fish physiology*. BERNIER N. J., VAN DER KRAAK G., FARRELL A. P., BRAUNER C. J. (red.). Academic Press, Elsevier Inc., United States, 313-364.
- VERBURG-VAN KEMENADE B. M. L., COHEN N., CHADZIŃSKA M., 2017. *Neuroendocrine-immune interaction: Evolutionarily conserved mechanisms that maintain allostasis in an ever-changing environment*. *Dev. Comp. Immunol.* 66, 2-23.
- WENDELAAR BONGA S. E., 1997. *The stress response in fish*. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.
- YADA T., TORT L., 2016. *Stress and disease resistance: immune system and immunoendocrine interactions*. [W:] *Biology of stress in fish: Fish physiology*. SCHRECK C. B., TORT L., FARRELL A. P., BRAUNER C. J. (red.). Academic Press, Elsevier Inc., United States, 365-403.
- YANG E., GLASER R., 2002. *Stress-induced immunomodulation and the implications for health*. *Int. Immunopharmacol.* 2, 315-324.

**KOSMOS Vol. 70, 1, 57–71, 2021**

KATARZYNA KLAK, MAGDALENA CHADZIŃSKA

*Department of Evolutionary Immunology, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, 9 Gronostajowa Str.,  
30-387 Kraków, E-mail: katarzyna.klak@doctoral.uj.edu.pl, magdalena.chadzinska@uj.edu.pl*

#### CAN FISH GET STRESSED?

##### Summary

Mechanism of the stress response is evolutionary well-conserved, therefore, despite the different living environment, teleost fish share many similarities with terrestrial vertebrates. These involve the main transmitters of the hypothalamic-sympathetic-chromaffin cells axis (the sympathetic-adrenal medullary axis equivalent) and the hypothalamic-pituitary-interrenal axis (functional analog of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis), as well as their principal functions. The cooperation between neuroendocrine and immune systems form an integrated part of physiology in maintaining homeostasis. The disturbance of these complex neuroendocrine-immune interactions has a negative impact on the health status and welfare of animals as well as human beings. Teleost fish form an especially intriguing model in the field of study stress-immune interactions, as they integrate immune and endocrine functions in one organ – the head kidney. Consequently, immune processes may straightforward undergo paracrine modulation. The aim of this work is to provide an overview of the current knowledge about the stress response in fish and its role in the regulation of fish immunity.

Key words: fish, stress response, stress axis, allostasis, animal welfare, neuroendocrine-immune interaction

Z uwagi na fakt, że obecna rozprawa w głównej mierze dotyczy wpływu stresu na neutrofile, kolejny rozdział wstępu dotyczył będzie opisu tej populacji leukocytów.

## **2. Neutrofile ssaków**

Neutrofile to wysoce wyspecjalizowane leukocyty pochodzące z linii mieloidalnej i uczestniczące we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. U ludzi są najliczniejszymi krążącymi we krwi leukocytami (50-70%), jednakże ich liczba w krążeniu jest gatunkowo specyficzna i np. u myszy wynosi 10-25% [1]. Neutrofile są wyposażone w jedną z najefektywniejszych zdolności migracyjnych wśród komórek somatycznych i stanowią pierwszą linię obrony w patologiach septycznych, wynikających z przerwania fizycznych barier organizmu (skóry lub nabłonka błon śluzowych), jak i sterylnych, w sytuacji, gdy nie doszło do przerwania ciągłości barier fizycznych [2]. Potwierdzeniem kluczowej roli neutrofilii w odporności wrodzonej są pacjenci z niedoborami odporności związanymi z ich funkcjonowaniem, jak np. neutropenia, przewlekła choroba ziarniniakowa lub niedobór adhezji leukocytów, z których wynika wysoka i zagrażająca życiu podatność na infekcje [3, 4].

Jednak ze względu na szeroki arsenał mechanizmów bójczych wykorzystywanych przez neutrofile oraz gwałtowny charakter ich działania, neutrofile porównuje się do miecza obusiecznego, ponieważ poza neutralizacją patogenów, stanowią zagrożenie dla zdrowych tkanek. Zdarza się to w przypadku wielu chorób zapalnych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów czy choroby zapalne jelit [3]. W kolejnych podrozdziałach wstępu opisano najnowsze odkrycia dotyczące neutrofilii, ich powstawania, funkcji, podziału, a także czynników wpływających na aktywację oraz długość życia tych komórek.

### **2.1. Powstawanie i różnicowanie neutrofilii**

W przypadku ssaków, neutrofile są głównie produkowane w szpiku kostnym w procesie granulocytopoezy. W warunkach homeostatycznych powstaje  $1-2 \times 10^{11}$  neutrofilii/dzień u ludzi i  $1 \times 10^7$  neutrofilii/dzień u myszy. Jednakże w przypadku ostrego zapalenia ich liczba może wzrosnąć dziesięciokrotnie [5]. Proces dojrzewania neutrofilii jest kontrolowany przez czynniki transkrypcyjne (głównie PU.1 i C/EBP $\alpha$ - $\zeta$ ) [6-9]. Ścieżka powstawania neutrofilii rozpoczyna się od hematopoetycznych komórek macierzystych (ang. *hematopoietic stem cells*, HSCs), które ulegają różnicowaniu, przekształcając się najpierw w multipotencjalne komórki progenitorowe (ang. *common myeloid progenitors*, CMP) [10]. Komórki CMP różnicują się w komórki progenitorowe linii granulocytarno-mieloidalnej (ang. *granulocyte-monocyte progenitor*, GMP), z której powstają również monocyty/makrofagi, eozynofile, bazofile i

komórki dendrytyczne (ang. *dendritic cells*, DC) [10]. Pod wpływem czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (ang. *granulocyte-colony stimulating factor*, GCSF) GMP przekształcają się w mieloblasty. Komórki te przechodzą następnie szereg etapów różnicowania/dojrzenia, obejmujących kolejno stadia: promielocytu, mielocytu, metamielocytu, komórki pałeczkowatej i ostatecznie osiągają formę dojrzałego, polimorfonuklearnego neutrofila (ang. *polymorphonuclear leukocyte*, PMN) [11] (Ryc. 1). Stosunkowo niedawno zidentyfikowano populację zdolnych do proliferacji, różnicujących się z GMP, bezpośrednich prekursorów niedojrzałych neutrofilów, którą nazwano preneutrofilami (ang. *pre-neutrophils*, preNeus) [12]. W trakcie różnicowania dojrzewający neutrofil zmienia kształt jądra, które początkowo ma formę okrągłą, następnie pałeczkowatą a w końcu wielopłatową. Jednocześnie, zachodzą zmiany w ekspresji receptorów związanych z retencją/uwolnieniem neutrofilów. Wraz z dojrzewaniem dochodzi na przykład do spadku poziomu ekspresji integryny  $\alpha 4\beta 1$  (ang. *very late antigen-4*, VLA4) oraz receptora chemokinowego CXC typu 4 (CXCR4), podczas gdy ekspresja receptora chemokinowego CXCR2 oraz receptora Toll-podobnego 4 (ang. *Toll-like receptor 4*, TLR4) ulega podwyższeniu [3, 12–15].

Warto w tym miejscu przypomnieć, że komórki zrębowe szpiku kostnego charakteryzują się ekspresją cząsteczki adhezyjnej VCAM1 (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*), będącej ligandem dla VLA4, oraz chemokiny SDF-1 (ang. *stromal-derived factor-1*) znanej również pod nazwą CXCL12, działającej jako ligand dla CXCR4 [12, 13]. Dzięki tym interakcjom niedojrzałe neutrofile są utrzymywane w szpiku kostnym do osiągnięcia dojrzałości.

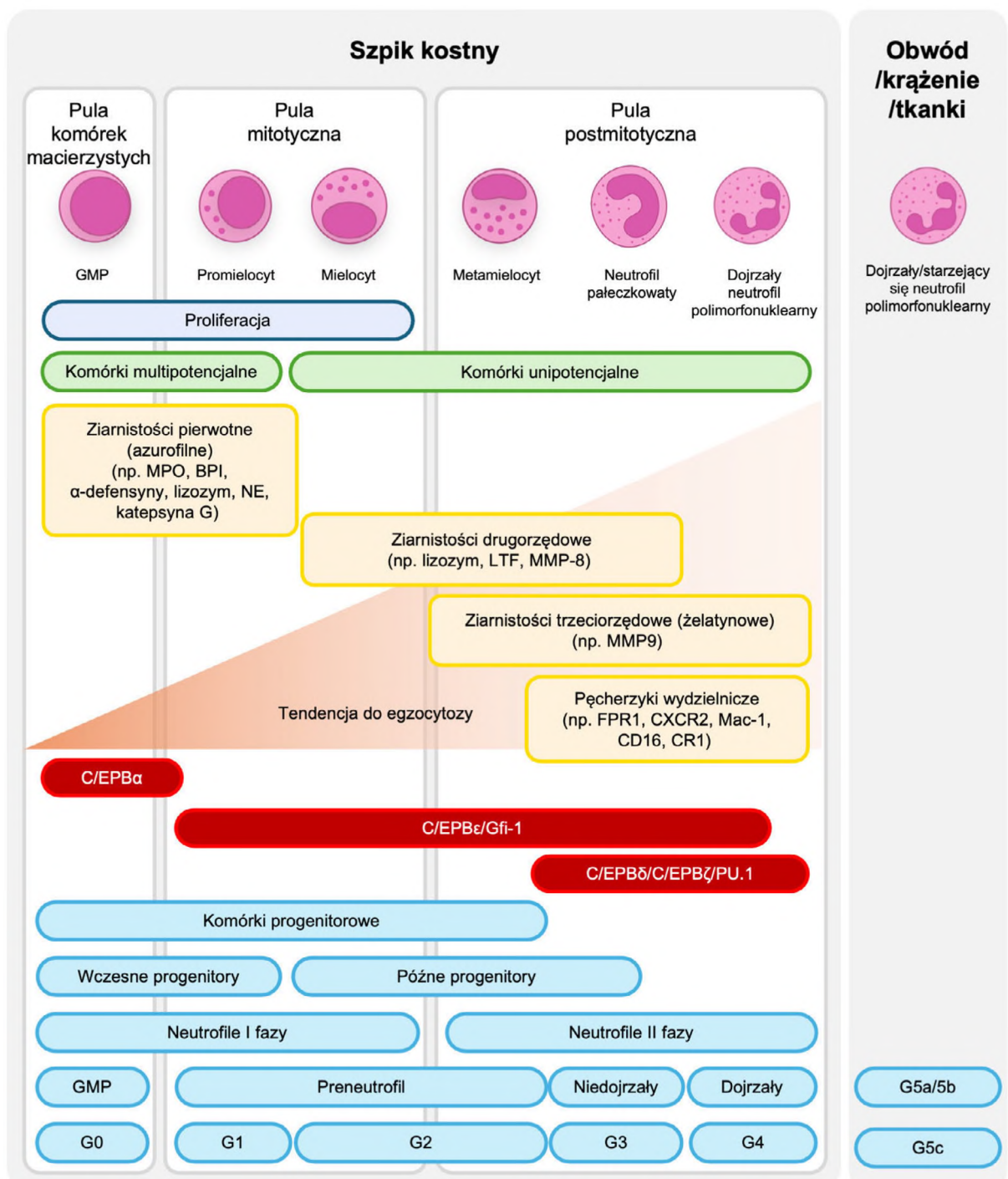
Neutrofile to granulocyty obojętnochłonne, w związku z czym charakteryzuje je obecność ziarnistości oraz pęcherzyków wydzielniczych, magazynujących specyficzne białka, kluczowe dla ich funkcji. Ziarnistości te powstają sekwencyjnie na konkretnych etapach różnicowania: pierwotne (azurofilne) na etapach od mieloblastu do promielocytu, wtórne (specyficzne) w stadiach mielocytu i metamielocytu, natomiast trzeciorzędowe (żelatynowe) w komórkach pałeczkowatych [12, 16]. Główne białka ziarnistości pierwotnych obejmują mieloperoksydazę (MPO),  $\alpha$ -defensyny, białko bakteriobójcze/zwiększające przepuszczalność (ang. *bactericidal/permeability-increasing protein*, BPI), lizozym i różnego typu proteiny serynowe takie jak elastaza neutrofilowa (NE) i katepsyna G. Głównymi białkami ziarnistości drugorzędowych są laktoferyna (LTF) i kolagenaza neutrofilowa (MMP8). Ziarnistości trzeciorzędowe, czyli żelatynowe, są bogate w żelatynazy, w tym żelatynazę B, zwaną też metaloproteiną macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (MMP9). Pęcherzyki wydzielnicze

zawierają białka związane z aktywacją, które ułatwiają adhezję i migrację neutrofilów, takie jak receptory chemoatraktantów (np. receptor formilo-peptydu 1, FPR1) i CXCR2, Mac-1, CD16 i receptor dla dopełniacza 1 (CR1) [16, 17].

Homeostaza neutrofilów utrzymywana jest dzięki delikatnej równowadze pomiędzy granulocytopenią, dojrzewaniem, rezerwą neutrofilową i uwalnianiem ze szpiku kostnego, marginalizacją wewnątrznaczyniową, a następnie apoptozą i oczyszczaniem szczątków komórkowych.

Dojrzałe neutrofile występują w naczyniach krwionośnych w dwóch pulach: puli swobodnie płynącej we krwi oraz puli przygotowanej do diapedezy, przylegającej do postkapilarnych naczyń żylnych, zatrzymanej w zatokach naczyniowych i rozgałęzieniach naczyń włosowatych w narządach. Ta ostatnia pula jest określana jako „pula marginalna” i stanowi rezerwę dyspozycyjną. Dotychczasowe badania pokazują, że poza narządami uprzywilejowanymi immunologicznie (np. mózg i jądra), homeostatyczna migracja neutrofilów obejmuje praktycznie każdą tkankę, jednak najwięcej neutrofilów marginalnych znajduje się w płucach, śledzionie a także w szpiku kostnym [18]. Neutrofile marginalne odgrywają kluczową rolę w patrolowaniu narządów, a ich lokalizacja np. w płucach, jest idealnie dostosowana do funkcji tego narządu, biorąc pod uwagę, drogę przedostawania się patogenów do krwioobiegu (łożyska naczyń włosowatych) [18]. Z kolei niewydolność lokalnych mechanizmów obronnych, w miejscach, takich jak np. błony śluzowe czy skóra, gdzie narażenie na kolonizujące mikroorganizmy i ryzyko inwazji są stałe, umożliwia drobnoustrojom dostęp do krążenia i zwiększa ryzyko sepsy [19].

Dodatkowo neutrofile pełnią funkcje wspomagające w zdrowych tkankach. W śledzionie wspomagają dojrzewanie limfocytów B i produkcję przeciwciał [20]. W szpiku kostnym napływające starzejące się neutrofile promują uwalnianie komórek progenitorowych do krwioobiegu i tym samym promują redukcję zasobów niszy hematopoetycznej [21]. Ponadto eliminacja apoptotycznych neutrofilów na drodze fagocytozy przez komórki dendrytyczne i makrofagi w tkankach, hamuje sekrecję interleukiny 23 (IL-23), kontrolującej produkcję IL-17, która z kolei zmniejszając poziom G-CSF reguluje granulocytopenię [22].



**Rycina 1.** Rozwój neutrofilii w szpiku kostnym. Morfologicznie neutrofile dzielą się na komórki progenitorowe granulocytów i monocytów (GMP), promielocyty, mielocyty, metamielocyty, neutrofile pałeczkowate i dojrzałe neutrofile polimorfonuklearne. Na podstawie ich zdolności proliferacyjnej i różnicowania komórki dzielą się na pulę komórek macierzystych, pulę mitotyczną i pulę postmitotyczną. Dojrzewanie neutrofilii wiąże się ze zmianami poziomu/aktywności czynników transkrypcyjnych oraz z pojawianiem się kolejnych typów ziarnistości. W neutrofilach tworzą się co najmniej cztery rodzaje ziarnistości, z których każda uzyskuje unikalny zestaw cząsteczek efektorowych. Ziarnistości są uwalniane hierarchicznie, w kolejności odwrotnej do ich powstawania. Sekwencjonowanie transkryptomu pojedynczych komórek (ang. *single-cell RNA sequencing*, scRNA-seq) uszczegółowiło podział neutrofilii, ustanawiając ich nową nomenklaturę (wg. Malengier-Devlies i in. [5], zmodyfikowana).

## 2.2. Funkcje neutrofilii

Dojrzałe neutrofile opuszczając szpik kostny są wyposażone w arsenał białek efektorowych, dzięki czemu wymagają niewielkiego wsparcia transkrypcyjnego lub translacyjnego podczas aktywacji mechanizmów przeciwdrobnoustrojowych [23, 24]. W literaturze, neutrofile porównywane są do żołnierzy na polu walki, ponieważ podobnie jak żołnierze na froncie, neutrofile wchodzi w każdą sytuację uzbrojone i gotowe do walki, nawet przy pozornej nieobecności wroga. Neutrofile są wyposażone w szeroki wachlarz receptorów rozpoznających patogeny (ang. *pathogen recognition receptors*, PRR), począwszy od rodziny receptorów TLR po wyspecjalizowane receptory zmiatacze (np. dektyna-1) i receptory dla opsonin [25].

Do eliminacji patogenów neutrofile wykorzystują co najmniej trzy główne mechanizmy efektorowe: fagocytozę, degranulację i tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (ang. *neutrophil extracellular traps*, NET). Fagocytoza, czyli wychwytywanie i pochłanianie poprzez wpuklenie błony komórkowej, rozpoznanego przez neutrofile patogenu, została wykazana zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* [26]. Dzięki temu mechanizmowi patogen zostaje zamknięty w fagosomie [27], który następnie ulega fuzji z lizosomami tworząc fagolizosom. Zamknięte w fagolizosomach patogeny są następnie zabijane lub neutralizowane na drodze zależnej lub niezależnej od tlenu [28, 29]. Biorą w tym udział kolejno mechanizmy zależne od oksydazy NADPH i związane z powstawaniem, toksycznych dla patogenów, ROS lub białka przeciwbakteryjne (np. katepsyny, defensyny, LTF, białko BPI, i lizozym). Zdolność neutrofilii do zabijania fagocytowanych drobnoustrojów jest co najmniej o 1-2 rzędy wielkości wyższa niż innych fagocytów [28, 30, 31].

W przypadku kolejnego ze wspomnianych mechanizmów efektorowych wykorzystywanych przez neutrofile do eliminacji patogenów, czyli degranulacji, badania *in vitro* wyraźnie wykazały następujące po fuzji ziarnistości z błoną plazmatyczną, uwalnianie ich zawartości i produkcję ROS [25]. Neutrofile wykazują również zdolność do wytwarzania sieci NET, mechanizmu polegającego na dekondensacji chromatyny, która udekorowana jądrowymi, cytoplazmatycznymi lub pochodzącymi z ziarnistości białkami efektorowymi, jest wyrzucana na zewnątrz komórki [32]. Początkowo wyrzut sieci NET opisywano wyłącznie jako strategię przeciwdrobnoustrojową, dzięki której bakterie są wychwytywane i zabijane, jednak coraz więcej dowodów wskazuje na szerszy zakres funkcji sieci NET, np. w autoimmunizacji i nowotworach [33].

Wymienione toksyczne mechanizmy efektorowe do niedawna były uważane za jedyne funkcje neutrofilii. Neutrofile z kolei, uważano za stosunkowo prymitywne narzędzie wśród

komórek układu odpornościowego, których głównym celem była rekrutacja *en masse* do miejsca urazu lub infekcji, gdzie wkrótce potem miały ulec apoptozie. Jednakże znaczny postęp i zaawansowane narzędzia w badaniach nad funkcjami tych komórek wykazały, że neutrofile wykazują różnorodny repertuar mechanizmów działania, który znacząco wykracza poza proste zabijanie patogenów a ich rekrutacja jest ściśle regulowana [34]. Stwierdzono przykładowo, że neutrofile mogą wytwarzać zarówno cytokiny prozapalne jak i przeciwzapalne, a także chemokiny i czynniki immunomodulacyjne, które wpływają na rekrutację i fenotyp neutrofilii, makrofagów, komórek dendrytycznych (DC), limfocytów T i B [25]. Chociaż neutrofile są znacznie mniej wydajne niż makrofagi lub DC w produkcji cytokin i chemokin, ich duża liczba w miejscach zapalenia, kilkakrotnie większa niż makrofagów i DC, sugeruje, że przyczyniają się one znacząco do kształtowania mikrośrodowiska zapalnego. Wspomniane funkcje, jak i ciągła produkcja neutrofilii, ich obfitość w miejscach zapalenia i dane pokazujące obecnie, że żywotność neutrofilii może być znacznie wydłużona przez niektóre cytokiny w miejscach zapalenia lub mikrośrodowisku guza (ang. *tumor microenvironment*, TME), sugerują, że neutrofile, obok makrofagów i DC, są kluczowymi koordynatorami reakcji odpornościowej [35]. Neutrofile uczestniczą również w regeneracji tkanek po urazie, regulują wyciszenie reakcji zapalnej i powrót tkanki do stanu homeostazy [36]. Stąd istnieje duże zainteresowanie scharakteryzowaniem mechanizmów regulujących redystrybucję i długość życia neutrofilii, nie tylko w stanach chorobowych, ale także w warunkach homeostazy.

### **2.3. Heterogenność i plastyczność neutrofilii**

Neutrofile, stosunkowo do niedawna, uważano za jednorodną populację komórek, z typowo przeciwdrobnoustrojowymi funkcjami efektorowymi. Pogląd ten został poparty domniemanym krótkim okresem życia neutrofilii i brakiem zdolności do proliferacji. Doniesienie Pillay i współautorów podważyło tę koncepcję, sugerując, że w normalnych warunkach średni czas życia neutrofilii w krwiobiegu jest znacznie dłuższy niż wcześniej uważano i wynosi do 12,5 godzin u myszy i 5,4 dnia w przypadku neutrofilii człowieka [37]. Jednak, poza krążącymi neutrofilami człowieka, analizie prawdopodobnie podległy również neutrofile szpiku kostnego, co spowodowało znaczne przeszacowanie otrzymanej wartości. Czas życia neutrofilii jest nadal kwestią dyskusyjną ze względu na brak odpowiedniej metody śledzenia losów tych komórek *in vivo* [38]. Wynika to z faktu, że długość życia neutrofilii ulega znacznemu wydłużeniu w przypadku neutrofilii znajdujących się w puli marginalnej, czy po ekstrawazacji, w tkankach. Ponadto zjawisko wstecznej migracji (nazywanej też retromigracją), w której neutrofile migrują z tkanek ponownie do krążenia stanowi dodatkowe

utrudnienie w prawidłowym zobrazowaniu tego okresu oraz ich losów [39, 40]. Wydłużony czas życia neutrofilów może stanowić podstawę do przechodzenia przez nie zmian fenotypowych i funkcjonalnych, tym samym wpływając na ich heterogenność. Ponadto, w momencie zapalenia, długość życia neutrofilów jest znacznie zwiększona poprzez hamowanie apoptozy komórek, efekt wywołany przez cytokiny, wzorce molekularne związane z patogenami (ang. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), cząsteczki wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniami/zagrożeniem (ang. *danger/damage-associated molecular patterns*, DAMP) lub inne czynniki środowiskowe [41, 42]. W efekcie, w przewlekłym zapaleniu długość życia neutrofilów jest нефизjologicznie wydłużona, co pogarsza rokowanie choroby. Kontrowersje wokół długości życia neutrofilów można więc rozstrzygnąć, uznając ją za adaptacyjną cechę, której wartość zależy od (pato)fizjologicznego kontekstu (np. obecności patogenów, sygnalizacji cytokinowej itp.). Tym samym obecnie neutrofile uważane są za heterogenną populację o różnych, unikalnych fenotypach i odpowiadających im funkcjach efektorowych, charakterystycznych zarówno dla stanów patologicznych jak i homeostazy [43]. Istnienie zróżnicowanych fenotypowo podgrup neutrofilów to temat wciąż mało poznany. Być może najlepiej znanym przykładem jest tutaj mikrośrodowisko guza, w którym neutrofile charakteryzuje polaryzacja podobna do tej opisanej dla makrofagów M1/M2 infiltrujących mikrośrodowisko nowotworu (ang. *tumor-associated macrophages*, TAM). Także, wśród neutrofilów związanych z guzem (ang. *tumor-associated neutrophils*, TAN) wyróżniono dwie subpopulacje o analogicznych nazwach N1 (przeciwnowotworowe i prozapalne) i N2 (pronowotworowe i immunosupresyjne). Polaryzacja TAN w kierunku N1 jest indukowana zablokowaniem szklaku sygnalizacyjnego transformującego czynnika wzrostu- $\beta$  (ang. *transforming growth factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ) lub stymulacją interferonem typu I (IFN I) i charakteryzuje je wysoka ekspresja cytokin prozapalnych np. TNF- $\alpha$ , i chemokin np. CCL3, CXCL10 [44–46]. Z kolei polaryzacja TAN2 jest indukowana wysokim poziomem TGF- $\beta$  lub G-CSF i takie komórki charakteryzuje np. wysoka ekspresja czynnika wzrostu śródbłonnki naczyń (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), IL-8/CXCL8, CXCR2 i MMP9 [2, 44, 47–49]. Występowanie subpopulacji neutrofilów nie ogranicza się do nowotworów. Populacje pro- i przeciwzapalnych neutrofilów obserwuje się np. w sepsie [50], zawałe mięśnia sercowego [51] lub toczniu rumieniowatym układowym (ang. *systemic lupus erythematosus*, SLE) [52, 53]. W trakcie izolacji neutrofilów z krwi pacjentów w gradiencie gęstości obserwowane są wyraźnie rozdzielone frakcje komórek. Na tej podstawie wyróżniono neutrofile o normalnej lub wysokiej gęstości (ang. *normal- or high-density neutrophils*, NDN lub HDN) oraz subpopulację neutrofilów o niskiej gęstości (ang.

*low-density neutrophils*, LDN) [54, 55]. LDN są najczęściej opisywane w kontekście chorób autoimmunologicznych [56], nowotworów [44], sepsy [57] i zakażeń ludzkim wirusem nabytego niedoboru odporności (ang. *human immunodeficiency virus*, HIV) [58, 59]. Podobnie jak w przypadku TAN2, LDN wykazują funkcje pronowotworowe i immunosupresyjne [60]. Istnieje kilka teorii na temat pochodzenia LDN. Pierwsza z nich wyjaśnia, że LDN są mieszkanką dojrzałych i niedojrzałych neutrofilów, które mogą mieć działanie immunomodulujące [61]. Druga natomiast postuluje, że LDN wykazują niższą gęstość ze względu na przebytą degranulację [34]. Co ciekawe, LDN można pozyskać poprzez stymulację dojrzałych neutrofilów TGF- $\beta$  [44]. TAN i LDN wykazują niemal identyczne profile ekspresji markerów powierzchniowych oraz właściwości pronowotworowe, jednak dotychczasowe doniesienia nie dają jednoznacznych dowodów potwierdzających, że TAN i LDN są odrębnymi populacjami komórek [40].

W obecnej pracy skupiono się w głównej mierze na cechach neutrofilów, w tym na ich dojrzałości/wieku, specyficznych markerach ich aktywności i redystrybucji. Podejście to wydaje się słuszne, ponieważ oprócz różnorodności fenotypowej neutrofilów, komórki te wykazują plastyczność w zależności od środowiska bytowania (obecności mediatorów pro- lub przeciwzapalnych, a także mikrośrodowiska tkanki lub narządu), które wydaje się mieć wpływ na różnicowanie i specjalizację funkcjonalną tych komórek. Pokazano, na przykład, że w określonych warunkach zapalnych neutrofile mogą różnicować się w inne typy komórek mieloidalnych, w tym komórki dendrytyczne (DC). Zaobserwowano ponadto, że neutrofile wyizolowane ze szpiku kostnego, po stymulacji GM-CSF, TNF- $\alpha$  i IL-4, mogą różnicować się w populację komórek hybrydowych charakteryzujących się obecnością zarówno markerów charakterystycznych dla DC jak i markerów neutrofilów, co zostało zweryfikowane zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* [62].

#### **2.4. Starzenie się neutrofilów**

Jak już wspomniano, liczba neutrofilów jest ściśle kontrolowana i podlega dynamicznej regulacji na wszystkich kluczowych etapach, od opisanego wcześniej różnicowania i retencji w szpiku kostnym do uwalniania, marginalizacji naczyniowej i ostatecznej eliminacji poprzez fagocytozę w wyspecjalizowanych narządach [63, 64]. Z ewolucyjnego punktu widzenia ta regulacja ma krytyczne znaczenie, ponieważ wraz z zapewnieniem optymalnej liczby neutrofilów do skutecznej eliminacji patogenów, jednocześnie zapobiega ich destrukcyjnemu działaniu w obrębie naczyń krwionośnych lub tkanek [65]. Wraz z uwolnieniem neutrofilów z tkanki hematopoetycznej, w przypadku braku infekcji/toczącego się zapalenia, neutrofile

podlegają procesowi starzenia, który obejmuje szereg stopniowych, zależnych od czasu zmian fenotypowych, które kumulują się z czasem. Między innymi, dochodzi do zwiększania ekspresji CXCR4, powierzchniowego receptora dla CXCL12. W badaniach *ex vivo* wykazano, że wzrost ekspresji CXCR4 rozpoczyna się w ciągu 4 godzin od rozpoczęcia hodowli. Proces ten umożliwia w organizmie kierowanie starzejących się neutrofilów z powrotem do szpiku kostnego w celu ich eliminacji [13, 66, 67]. Ponadto badania *ex vivo* pokazały, że w starzejących się neutrofilach dochodzi do obniżenia ekspresji CXCR2, będącego receptorem chemokin CXCL1 i CXCL8, co sugeruje, że starzejące się neutrofile mogą wykazywać zmniejszoną odpowiedź na sygnały zapalne [68]. Tym bardziej intrygujące są doniesienia, które wskazują, że w warunkach *in vivo*, starzejące się neutrofile są pierwszymi komórkami rekrutowanymi do miejsca zapalenia i mogą być równie lub nawet bardziej skuteczne podczas odpowiedzi zapalnej [14]. Co ważne, zmiany fenotypowe związane ze starzeniem się neutrofilów poprzedzają ich apoptozę. Chociaż znaczna część neutrofilów podlega apoptozie po około jednym dniu w hodowli, zachowują one integralność komórkową dłużej niż inne typy komórek [64, 69]. To opóźnienie śmierci komórek prawdopodobnie zapewnia starzejącym się neutrofilom wystarczająco dużo czasu na migrację do regionów, w których mogą zostać bezpiecznie usunięte, minimalizując w ten sposób ryzyko uwolnienia ich cytotoksycznej zawartości do krwiobiegu [69]. Z kolei w badaniach *in vivo* wykazano, że starzejące się neutrofile, które utrzymywały się dłużej we krwi, poza wzrostem poziomu CXCR4, wykazały również zmniejszenie ekspresji L-selektyny (CD62L). Co ciekawe zmiany te wykazywały oscylacje dobowe [21]. Jednocześnie, starzejące się neutrofile miały podwyższony poziom białek adhezyjnych, takich jak CD11b i CD49d (podjednostek integrzyn, kolejno MAC1 i VLA4), podczas gdy sygnalizacja CD47 (białka powierzchniowego, które działa jako sygnał "nie jedz mnie" dla makrofagów) była nieznacznie zmniejszona, co potencjalnie ułatwiało rozpoznanie i fagocytozę neutrofilów przez makrofagi [70]. Morfologicznie, starzejące się neutrofile stają się mniejsze, mniej ziarniste a ich jądro jest coraz bardziej segmentowane (tak zwana hipersegmentacja) [15, 21].

Analizy transkryptomu starzejących się neutrofilów ujawniły zmiany w szlakach zaangażowanych w aktywację komórek (w tym sygnalizację NF- $\kappa$ B oraz kinaz MAPK, ang. *mitogen-activated protein kinases*, w tym p38), wykrywanie wzorców molekularnych związanych z patogenami/zagrożeniami (poprzez TLR i receptory NOD podobne, ang. *NOD-like receptors*, NLR), adhezję, migrację (integriny i RAC1, ang. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), a nawet degradację białek i śmierć komórek w starzejących się neutrofilach [15].

Przełom w zrozumieniu procesu starzenia się neutrofilii nastąpił dzięki postępom w badaniach nad mikrobiomem. Wykazano bowiem, że metabolity mikrobioty jelitowej przedostają się do krwiobiegu i mogą modulować odpowiedź immunologiczną gospodarza. Eksperymenty na myszach pozbawionych mikrobioty (ang. *germ-free*, GF) lub traktowanych antybiotykami wykazały wyraźną redukcję liczby starzejących się (CD62L<sup>low</sup>) neutrofilii jak i komórek progenitorowych. Efekt ten był częściowo odwracalny za pomocą stymulacji lipopolisachrydem (LPS) lub w wyniku transplantacji mikrobioty kałowej [15]. Ta odbudowa wymagała nienaruszonego sygnalizowania przez receptory rozpoznające wzorce, takie jak TLR4 i TLR2, oraz białko adaptorowe MYD88 (ang. *myeloid differentiation primary response 88*) [15].

Konsekwencje starzenia się neutrofilii są wieloaspektowe. Nowsze badania wykorzystujące metodę obrazowania *in vivo* wykazały, że starzejące się neutrofile przylegające do ściany naczyniowej wykazują zwiększoną aktywację beta2-integriny (CD18), wyższą produkcję ROS i większą skłonność do NETozy (programowanej śmierci komórki zależnej od tworzenia NET), co w sytuacjach patologicznych może przyczyniać się do niedrożności naczyń [15, 71]. Podkreśla to słuszność porównania działania neutrofilii do miecza obusiecznego, w którym te same procesy, które przygotowują neutrofile do ich bezpiecznego usuwania, mogą również przyczyniać się do reakcji zapalnych i perfuzji tkanek [15, 17, 21, 71]. Dobbowe oscylacje neutrofilii i wynikające z nich zanikanie starzejących się neutrofilii podkreślają złożoność tej regulacji i wydają się dodatkowym mechanizmem regulującym czas krążenia neutrofilii we krwi [21].

### **3. Neutrofile ryb doskonałokostnych**

Neutrofile ryb doskonałokostnych podobnie jak ssaków, odgrywają centralną rolę we wczesnej odpowiedzi immunologicznej na urazy i zakażenia, a także są kluczowe dla utrzymania homeostazy [72]. W tej części wstępu przedstawiono aktualną wiedzę na temat neutrofilii ryb doskonałokostnych i usytuowano ją w kontekście ewolucyjnym w zakresie mechanizmów obrony gospodarza i skutecznego regulowania powrotu do homeostazy. Warto w tym miejscu podkreślić, że przedstawiciel ryb doskonałokostnych z rodziny karpowatych, danio pręgowane, jest znanym organizmem modelowym, który dzięki szerokiemu wachlarzowi narzędzi molekularnych i możliwościom obrazowania przyżyciowego, zrewolucjonizował badania neutrofilii. Na przekór konwencji, „dopuszczenie do głosu” ryb w tej dziedzinie badań udzieliło odpowiedzi na wiele nurtujących pytań. Podkreśla to przede wszystkim

znaczenie badań nad mechanizmami konserwatywnymi ewolucyjnie, co jest również jednym z głównych celów obecnej pracy.

### **3.1. Powstawanie neutrofilii/granulocytopenia u ryb doskonałokostnych**

Rozwój neutrofilii u ryb doskonałokostnych przebiega zgodnie z dwufazowym procesem hematopoetyki. W pierwszej fazie, około 24 godziny po zapłodnieniu (ang. *hours post fertilization*, hpf), podczas hematopoetyki pierwotnej, powstają komórki mieloidalne (neutrofile, komórki tuczne i makrofagi) i erytrocyty. W drugiej fazie, 48-72 hpf, podczas hematopoetyki definitywnej, powstają wszystkie podtypy komórek krwi, w tym komórki limfoidalne [73, 74]. Niektóre doniesienia wskazują, że hematopoetyka pierwotna, głównie mielopoetyka, rozpoczyna się już 10 godzin po zapłodnieniu, w przedniej bocznej mezodermie (ang. *anterior lateral mesoderm*, ALM) zarodka danio przegowanego [73–76]. Brak barwienia ziarnistości czernią sudanową wskazuje, że powstałe w tym okresie neutrofile są jeszcze niedojrzałe [77]. Następnie dochodzi do częściowego zaniku hematopoetyki pierwotnej. Ma to miejsce w tylnych wyspach krwi (ang. *posterior blood island*, PBI). Hematopoetyka ostateczna/definitywna zachodzi początkowo w brzusznej ścianie aorty grzbietowej (ang. *aorta-gonad-mesonephros*, AGM). Z AGM z kolei wyodrębniają się trzy narządy krwiotwórcze/limfatyczne: ogonowa tkanka hemopoetyczna (ang. *caudal hematopoietic tissue*, CHT), grasica oraz nerka głowowa, która od szóstego dnia po zapłodnieniu (ang. *days post fertilization*, dpf) działa jako samodzielny narząd hemopoetyczny, który stanowi odpowiednik szpiku kostnego ssaków [74, 78]. Komórki HSC migrują do CHT, a podwójnie pozytywne barwienia markerów i ziarnistości neutrofilii, mieloperoksydazy i barwienie czernią sudanową, wskazują, że te komórki dają początek dojrzałym neutrofilom [77, 79]. Proces granulocytopenii u ryb, podobnie jak u ssaków, obejmuje sekwencyjne różnicowanie mieloblastów do promielocytów, a następnie do dojrzałych neutrofilii. Wczesne promielocyty danio przegowanego, mimo że wykazują zaokrąglone jądro, nie posiadają jeszcze pierwotnych ziarnistości azurofilnych charakterystycznych dla ich ssaczych odpowiedników [80]. W miarę postępu dojrzewania neutrofila chromatyna ulega kondensacji, a jądro segmentacji. Jednakże, większość neutrofilii ryb charakteryzuje jądro w kształcie nerki lub dwupłatowe, a nie typowa wielopłatowość, jak w przypadku neutrofilii człowieka [77, 81–83]. U dorosłych ryb neutrofile są zmagazynowane w nerce, która pełni funkcję głównego rezerwuaru hemopoetycznego w krążeniu np. ryb karpowatych [80]. Niedawno wydana praca [84], zdefiniowała, na podstawie scRNA-seq, wzór dojrzewania neutrofilii w nerce danio przegowanego. Autorzy wyodrębnili cztery fazy dojrzewania neutrofilii (P1-P4), przy czym ostatnia faza (P4)

charakteryzowała się zwiększoną ekspresją *mmp9*, która była skorelowana z obecnością bardziej rozwiniętych, wydłużonych ziarnistości oraz większą segmentacją jądra [84].

### 3.2. Funkcje efektorowe neutrofilii ryb

Neutrofile ryb doskonałokostnych, po osiągnięciu dojrzałości, uruchamiają szereg mechanizmów efektorowych niezbędnych do obrony gospodarza. W odpowiedzi na uszkodzenie tkanki lub zetknięcie z patogenem komórki te są szybko mobilizowane z nerki główowej do miejsca zapalenia [85, 86]. Obrazowanie *in vivo* larw danio pręgowanego wykazało, że neutrofile szybko migrują w kierunku zwiększonego stężenia czynników chemotaktycznych, zwłaszcza w odpowiedzi na zwiększenie poziomu nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ) w miejscach zranienia [87, 88]. Migracja neutrofilii do miejsc zapalenia obejmuje zachowanie znane jako rojenie się neutrofilii (ang. *neutrophil swarming*), które po raz pierwszy zaobserwowano w mysich modelach zapalenia [89–91]. Rojenie jest definiowane jako wywołane urazem lub zakażeniem skoordynowane i stopniowe gromadzenie się i tworzenie skupisk komórek [89, 90]. W modelu amputacji/uszkodzenia płetwy ogonowej larw danio wykazano, że neutrofile tworzą rój wokół „pionierskiego” neutrofila, który jako pierwszy dociera do rany. Pionierskie neutrofile przechodzą rodzaj śmierci komórkowej, która przypomina formowanie się sieci NET. Wyciszenie stanu zapalnego oraz redukcja liczby neutrofilii w miejscu uszkodzenia tkanki następuje na skutek kilku różnych procesów: apoptozy neutrofilii lub odwrotnej migracji, w wyniku której, tak jak u ssaków, neutrofile ryb opuszczają tkanki objęte zapaleniem i ponownie wchodzą do krążenia [87, 92, 93]. Warto wspomnieć, że proces ten po raz pierwszy został opisany na modelu danio pręgowanego [93, 94], w którym śledzono oddalanie się neutrofilii z miejsca zranienia, i od tego czasu zidentyfikowano go jako mechanizm, który zachodzi także w przypadku neutrofilii mysich i ludzkich [95–97]. Praca Elks i in. [94] wykazała, że proces ten jest regulowany przez mikrośrodowiskowe bodźce prozapalne, takie jak hipoksja. Wykorzystanie larw danio z podwójnie transgenicznej linii z ekspresją w neutrofilach (pod kontrolą promotorów *lyz* lub *mpx*), ulegających fotokonwersji białek, Kaede lub Dendra2, umożliwiło śledzenie i ilościowe określenie liczby migrujących wstecznie neutrofilii [87, 98]. Jest to również rewolucyjne narzędzie do analizy długości życia neutrofilii i ich losów po wypełnieniu funkcji efektorowych w miejscu zapalenia [98].

Podobnie jak u ssaków, również u ryb, podstawową funkcją efektorową neutrofilii ryb jest fagocytoza. Proces został zobrazowany *in vivo* za pomocą fluorescencyjnych linii reporterowych danio [86]. Kirchberger i in. [84] wykazali, że dojrzała subpopulacja neutrofilii  $MMP9^+$  wykazuje znacznie większą aktywność fagocytarną niż komórki mniej dojrzałe.

Chociaż analizy składu ziarnistości ryb nie były tak obszerne jak u ssaków, badania określające aktywność mieloperoksydazy potwierdziły, że oprócz fagocytozy, kolejny kluczowy mechanizm przeciwdrobnoustrojowy, stanowi degranulacja, czyli zewnątrzkomórkowe uwalnianie wstępnie uformowanych zawartości ziarnistości [99, 100]. W neutrofilach ryb wykazano także aktywność oksydazy NADPH i konsekwentnie produkcję ROS [101, 102], a także tlenku azotu [103, 104]. Ponadto wykazano, że sieci NET wytwarzane przez neutrofile ryb mają podobne cechy strukturalne i funkcje do tych obserwowanych u ssaków [105–107]. Co więcej, neutrofile ryb regulują również nabytą odpowiedź immunologiczną. Biorąc pod uwagę obecność cząsteczek MHC klasy II oraz zwiększoną ekspresję cząsteczek biorących udział w prezentacji antygeny i aktywacji limfocytów T, neutrofile mają potencjał do pełnienia funkcji profesjonalnych komórek APC [108].

### 3.3. Heterogenność neutrofilii ryb doskonałokostnych

Jak wspomniano wcześniej, w badaniach na ssakach, heterogenność neutrofilii jest coraz szerzej definiowana, a subpopulacje są charakteryzowane na podstawie różnic w gęstości czy obecności specyficznych markerów powierzchniowych [85]. U ryb doskonałokostnych charakterystyka fenotypów neutrofilii wciąż jest słabo zbadana. Dostępność zaawansowanych narzędzi molekularnych w badaniach na modelu danio przegowanego, a także ostatnie postępy w analizach scRNA-seq znacznie rozwinęły wiedzę na temat heterogenności neutrofilii ryb doskonałokostnych i wykazały ich podobieństwo do ssaków [84, 109]. W pracy Bobrovskikh i in. [110], w której próbowano na podstawie analiz scRNA-seq zbadać polaryzację neutrofilii, wykazano tylko niewielką liczbę komórek o wyraźnych cechach pro- lub przeciwzapalnych. Autorzy sugerowali, że wynika to z istnienia szerokiego spektrum fenotypów neutrofilii ryb. Istnienie takich samych mechanizmów funkcjonalnych neutrofilii ryb i ssaków, jak np. zjawisko odwrotnej migracji, sugeruje jednak, że podobnie jak u ssaków, neutrofile ryb nie stanowią jednolitej populacji komórek, ale wykazują znaczne zróżnicowanie. Wspomniana już praca badawcza na modelu danio przegowanego, charakteryzująca etapy różnicowania neutrofilii w nerce głównej to obecnie jeden z głównych dowodów na istnienie tego zróżnicowania u niższych kręgowców [84]. García-López i in. [111] podjęli próbę porównania migracji i profili transkrypcyjnych neutrofilii pochodzących z różnych źródeł (rostralna tkanka hematopoetyczna, RBI *versus* CHT) larw danio przegowanego. Badania te wykazały, że neutrofile RBI charakteryzuje wyższa ekspresja genu *csf3b*, kodującego czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów (ang. *granulocyte-colony stimulating factor b*, Csf3b). Ponadto wykazano, że po uszkodzeniu tkanki, neutrofile pochodzące z RBI i CHT charakteryzują się zasadniczo

odmiennymi wzorcami migracyjnymi podczas stanu zapalnego. Neutrofile pochodzące z CHT migrowały ze znacznie większą prędkością, pokonywały dłuższe odległości, wykazały również niższą kierunkowość i większe rozproszenie/dyspersję. Wykazano również, że stanowią one bardziej heterogenną populację komórek, z dwoma odrębnymi podzbiorami różniącymi się szybkością migracji. Natomiast neutrofile pochodzące z RBI charakteryzuje bardziej jednolita odpowiedź migracyjna [111]. Ponadto obie populacje neutrofilii wykazują wspólne podstawowe profile transkrypcyjne, ale także specyficzne dla podzbioru sygnatury transkrypcyjne. Stwierdzono także, że, tylko neutrofile pochodzące z CHT były rekrutowane do miejsca zranienia w sposób zależny od obecności nadtlenu wodoru. Wyniki te sugerują, że współistniejące populacje neutrofilii o odrębnym pochodzeniu wykazują różnice funkcjonalne [111]. Z kolei Hammond i in. [112], przy użyciu linii transgenicznej *TgBAC(arg2:eGFP)sh571* danio przegowanego, wykazującej ekspresję białka zielonej fluorescencji (eGFP) pod kontrolą promotora dla genu *arg2*, kodującego przeciwzapalną arginazę 2, wykazali, że wkrótce po rekrutacji neutrofilii do miejsca zranienia i infekcji, część z nich zwiększa ekspresję *arg2*. Autorzy postulowali, że ekspresja w neutrofilach *arg2:GFP* na etapach gojenia się rany, wskazuje ich przeciwzapalną alternatywnie spolaryzowaną subpopulację [112]. Obecnie jednak nie jest jasne, czy istnieją odrębne subpopulacje neutrofilii, czy obserwowane zmiany wynikają z lokalnej sygnalizacji tkankowej [113].

Chociaż wiadomo, że mikrobiota wpływa na dojrzewanie układu odpornościowego i aktywację neutrofilii u ssaków, nie mamy bezpośrednich dowodów na jej wpływ na neutrofile ryb doskonałokostnych.

#### **4. Chemokiny**

Z uwagi na fakt, że kluczową rolę w retencji i redystrybucji neutrofilii odgrywają chemokiny CXC i ich receptory, to właśnie ich opisowi zostanie poświęcony kolejny rozdział.

##### **4.1. Ogólny podział chemokin**

Chemokiny, nazywane również chemotaktycznymi cytokinami (CHEMOtaktyczne cytoKINY), to wielofunkcyjne białka kierujące migracją/redystrybucją komórek. Sądzi się, że powstały z pojedynczego genu-przodka, około 650 milionów lat temu [114]. Chemokiny wywierają efekt chemotaktyczny na komórki, które posiadają specyficzne receptory chemokin, należące do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G (ang. *G protein-coupled receptors*, GPCR). Receptory te, w zależności, którą grupę chemokin wiążą, dzieli się na: CXCR, CCR, CXC3R i CR [115]. Aktywacja receptorów chemokin uruchamia wewnątrzkomórkowe ścieżki

sygnałowe, które prowadzą do mobilizacji wapnia w komórce, a ostatecznie do przegrupowania cytoszkieletu i chemotaksji [116].

Funkcjonalnie chemokiny dzielą się na trzy główne kategorie: (I) homeostatyczne, wytwarzane i wydzielane konstytutywnie w obszarach nieobjętych zapaleniem, (II) zapalne, wytwarzane przez komórki w momencie infekcji lub zapalenia, oraz (III) chemokiny o mieszanej funkcji, wykazujące cechy dwóch pierwszych grup [117]. Chemokiny z pierwszej z wymienionych kategorii są na ogół zaangażowane w homeostatyczną redystrybucję leukocytów i między innymi kontrolują ich powrót do tkanki hematopoetycznej [118]. Z kolei chemokiny biorące udział w zapaleniu regulują migrację leukocytów do miejsca urazu i/lub zakażenia. Ponadto mogą również aktywować komórki w celu wywołania efektywnej odpowiedzi immunologicznej i odpowiadać za rozpoczęcie procesu gojenia się ran [119, 120]. Do tej pory u ludzi zidentyfikowano około 50 chemokin, które zostały pogrupowane na cztery rodziny: CXC ( $\alpha$ -chemokiny), CC ( $\beta$ -chemokiny), XC ( $\gamma$ -chemokiny) i CX<sub>3</sub>C ( $\delta$ -chemokiny) [114, 121]. W przypadku chemokin CXC i CX<sub>3</sub>C, odpowiednio jedna lub trzy reszty aminokwasowe są wstawiane pomiędzy pierwsze dwie z czterech reszt cysteiny. Pierwsza i trzecia reszta cysteiny są nieobecne w rodzinie chemokin XC, która posiada tylko jedno wiązanie disiarczkowe. Natomiast w rodzinie chemokin CC pierwsze dwie cysteiny są usytuowane obok siebie [114, 122, 123].

Chemokiny CXC są drugą, co do wielkości wśród wymienionych rodzin. Po zidentyfikowaniu motywu ELR (Glu-Leu-Arg) bezpośrednio poprzedzającego motyw CXC, zostały one dodatkowo podzielone na dwie główne grupy w zależności od obecności motywu (ELR+) lub jego braku (ELR-). Do grupy zawierającej motyw ELR (ELR+ CXC) należy osiem chemokin (CXCL1–3, 5–8, 15), które wykazują silne właściwości chemotaktyczne względem neutrofilii, działając poprzez receptory powierzchniowe CXCR1-2 [123]. Ponadto chemokiny ELR+ promują angiogenezę [124]. Do grupy pozbawionej motywu ELR (ELR- CXC) należy osiem chemokin (CXCL4, CXCL9-14 i CXCL16), oddziałujących z receptorami CXCR3-6 [125–127]. Chemokiny z rodziny CXC pozbawione motywu ELR (ELR-) kierują migracją limfocytów i monocytów i wykazując słabsze właściwości chemotaktyczne wobec neutrofilii, a także hamują angiogenezę [119, 124, 128]. Chemokiny ELR+ CXC są syntetyzowane przez różne komórki w odpowiedzi na liczne bodźce, szczególnie w odpowiedzi na cytokiny prozapalne, takie jak IL-1 i TNF [128]. Ich główną funkcją jest wspomaganie adhezji neutrofilii do komórek śródbłonna oraz migracji tych komórek zgodnie z gradientem chemotaktycznym, np. w kierunku miejsca zapalenia.

#### **4.1.1. CXCL8 i CXCR1/CXCR2**

Chemokina CXCL8 (znana też jako IL-8) wykazuje najsilniejsze właściwości chemotaktyczne względem neutrofilii, działając przez receptory CXCR1 i CXCR2 [17]. Wykazano również, że MMP9 poprzez przycięcie cząsteczki CXCL8 kilkukrotnie zwiększa aktywności tej chemokiny, a tym samym migrację oraz aktywację neutrofilii. Tworzy to rodzaj dodatniego sprzężenia zwrotnego, ponieważ aktywowane neutrofile wydzielają większą ilość MMP9 [129]. Poza silnymi właściwościami chemotaktycznymi wobec neutrofilii, CXCL8 wykazuje również właściwości chemotaktyczne wobec bazofilii, stymulowanych cytokinami eozynofilii oraz limfocytów T krwi obwodowej [130–132]. Obecności CXCL8 nie odnotowano u szczurów i myszy, co sugeruje, że gen kodujący CXCL8 został usunięty z genomów tych gryzoni a funkcje CXCL8 są prawdopodobnie kompensowane przez inną chemokinę z rodziny CXC, prawdopodobnie CXCL1. Co ciekawe, szczury posiadają dwa receptory (CXCR1 i CXCR2), natomiast myszy jeden receptor (CXCR2), które umożliwiają chemotaksję neutrofilii przez interakcję z chemokinami CXCL1-3 [133].

#### **4.1.2. CXCL9-11 i CXCR3**

Indukowane przez interferon typu II ( $\text{IFN-}\gamma$ ) chemokiny CXCL9-11 uczestniczą w zapoczątkowaniu nabytej odpowiedzi immunologicznej. Sygnalizacja chemokin CXCL9-11 zachodzi przez receptor CXCR3, wywołując chemotaksję limfocytów T pomocniczych typu 1 (Th1), limfocytów cytotoksycznych (Tc), monocytów, DC i komórek NK. Aktywacja makrofagów i DC prowadzi do produkcji IL-12, która stymuluje komórki NK do produkcji  $\text{IFN-}\gamma$  [134]. Razem z IL-1 $\beta$  i/lub TNF- $\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  indukuje produkcję CXCL9-11 w różnych typach komórek, w tym granulocytach, makrofagach i fibroblastach [135]. Następnie dochodzi do rekrutacji aktywnych limfocytów T [136]. Podczas gdy aktywowane limfocyty T produkują  $\text{IFN-}\gamma$ , infiltrujące limfocyty T działają w dodatniej pętli aktywacyjnej, napędzając rekrutację limfocytów T [137]. Za regulację tego procesu odpowiadają przeciwzapalne cytokiny, takie jak IL-10, które hamują syntezę  $\text{IFN-}\gamma$ , a tym samym zmniejszają rekrutację limfocytów T [138, 139]. Ponadto, zarówno CXCL9, jak i CXCL10 mają silne działanie angiostatyczne [140, 141].

#### **4.1.3. CXCL12 i CXCR4**

Tak jak już wspomniano podczas omawiania granulocytopenii, interakcja homeostatycznej chemokiny CXCL12, konstytutywnie wydzielanej przez komórki zrębowe tkanki hematopoetycznej, i jej powierzchniowego receptora CXCR4, odpowiada za utrzymanie niedojrzałych neutrofilii w szpiku kostnym [142]. Jednym z mechanizmów regulujących to oddziaływanie jest internalizacja receptora CXCR4 [143]. Sygnalizacja CXCL12-CXCR4

odpowiada również za powrót starzejących się neutrofilów do szpiku, gdzie następnie są usuwane na drodze apoptozy [13, 142, 144].

#### **4.2. Charakterystyka chemokin CXC ryb karpowatych**

U ryb doskonałokostnych do tej pory opisano 4 podrodziny chemokin (CXC, CC, XC i C), z których podobnie jak u ssaków, kluczowe chemokiny odpowiedzialne za aktywację i pobudzanie migracji neutrofilów, należą do podrodziny CXC [122, 145]. Wykazano ponadto, że zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, rekombinowane chemokiny CXC indukują migrację fagocytów [146]. Dane te w dużej mierze odpowiadają badaniom na ssakach, co sugeruje, że wiele funkcji immunologicznych chemokin CXC u ryb doskonałokostnych jest dobrze zachowanych. Ze względu na wybrane organizmy modelowe, na których przeprowadzono część eksperymentalną obecnej rozprawy, w tej części wstępu skupiono się głównie na scharakteryzowaniu chemokin z rodziny CXC u karpia i danio przegowanego (Tabela 1).

##### **4.2.1. Cxcl8\_11, Cxcl8\_12-Cxcr1 i Cxcr2**

U karpia i danio przegowanego występują dwa geny kodujące dwa homologi CXCL8, które zostały oznaczone jako Cxcl8\_11 (opisanej również jako Cxcl8a, CXCL8\_L1 lub CXCa) i Cxcl8\_12 (opisanej również jako Cxcl8b lub CXCL8\_L2) [147–150]. Transkrypcja obu paralogów genów kodujących Cxcl8 karpowatych jest indukowana w odpowiedzi na stan zapalny związany ze zranieniem [150] i zakażeniem bakteryjnym [148, 151]. Wykazano również, że receptory chemokinowe Cxcr1 i Cxcr2 to funkcjonalne homologi ich odpowiedników u ssaków. Neutrofile wykazują wysoką ekspresję genów kodujących te receptory, a zdolność pobudzania chemotaksji neutrofilów przez obie chemokiny Cxcl8 została wykazana zarówno u danio przegowanego [150, 152], jak i u karpia [147]. Zarówno Cxcr1, jak i Cxcr2 są wymagane do efektywnego rekrutowania neutrofilów do uszkodzonych obszarów na początkowym etapie reakcji zapalnej [2], a transkrypcja Cxcr2 i Cxcl8\_11 oraz Cxcl8\_12 zwiększa się po amputacji ogona larw danio przegowanego [149]. Co ciekawe, w niektórych sytuacjach te geny kodujące paralogi Cxcl8 są różnie regulowane, co sugeruje odmienne role (subfunkcjonalizację) w rekrutacji neutrofilów podczas reakcji zapalnych. Sugeruje się, że Cxcl8\_11 głównie koordynuje rekrutację neutrofilów do miejsc urazu, podczas gdy Cxcl8\_12 głównie kieruje migracją neutrofilów do krwiobiegu [149]. W badaniach na larwach danio przegowanego wykazano, że, sygnalizacja Cxcl8 zależy od rodzaju zapalenia, ponieważ w przypadku rekrutacji neutrofilów do sterylnego zranienia, w sygnalizację zaangażowany jest

receptor *Cxcr1* [150], natomiast jeżeli zapalenie związane jest z toczącą się infekcją w sygnalizację zaangażowany jest receptor *Cxcr2* [153]. Badania na danio pręgowanym wykazały również, że dwukierunkowa redystrybucja neutrofilii między miejscem zapalenia a naczyniami krwionośnymi podczas ostrego stanu zapalnego jest koordynowany przez *Cxcr1* i *Cxcr2* w sposób zróżnicowany [150, 154]. Badania wykazały, że interakcja *Cxcr1-Cxcl8\_11* odpowiada za rekrutację neutrofilii do ogniska zapalnego, podczas gdy interakcja *Cxcr2-Cxcl8\_11* koordynuje migrację wsteczną, związaną z wyciszeniem stanu zapalnego [155]. Wykazano również, że po silnej początkowej odpowiedzi *Cxcr1* na *Cxcl8\_11*, ulega on stopniowej desensytyzacji, po której następuje internalizacja receptora, podczas gdy *Cxcr2* pozostaje na błonie komórkowej z utrzymującą się wrażliwością na *Cxcl8\_12* i koordynuje redystrybucję neutrofilii podczas fazy wyciszenia reakcji zapalnej [156]. Zróżnicowana ekspresja paralogów *CXCL8* została również opisana u karpia [147]. Inne badania przeprowadzone na karpniu ujawniły ponadto bezpośredni wpływ *Cxcl8* na zwiększenie produkcji ROS, przez komórki zrekrutowane do ogniska zapalnego [146].

#### **4.2.2. *Cxcb1*, *Cxcb2* i *Cxcr3***

W genomie karpia opisano także dwie chemokiny CXC wykazujące funkcjonalną homologię z chemokinami *CXCL9–11* ssaków: *Cxcb1* i *Cxcb2* [157]. W genomie danio pręgowanego zidentyfikowano siedem genów homologicznych do ssaczych genów kodujących chemokiny *CXCL9–11*; jednak jak dotąd nie przeprowadzono badań transkrypcyjnych dla tych chemokin, określanych jako chemokiny *Cxcb* [157]. Badania ekspresji przeprowadzono jednak u karpia, gdzie wykazano, że obydwa geny kodujące *Cxcb*, podobnie jak u ssaków zwiększają ekspresję w odpowiedzi na rekombinowany  $\text{IFN-}\gamma$  [146, 157]. Ponadto zaobserwowano różnice w ich wrażliwości na LPS i kinetyce ekspresji genów kodujących *Cxcb1* i *Cxcb2* podczas zapalenia otrzewnej wywołanego zymosanem, co ponownie sugeruje funkcjonalną dywersyfikację lub subfunkcjonalizację chemokin *Cxcb* ryb karpiojących [157]. W badaniach na karpniu wykazano również silną aktywność chemotaktyczną *Cxcb1* względem monocytów, granulocytów i limfocytów [146]. Z kolei u danio pręgowanego wykazano, że obydwa homologi chemokin *CXCL9–11* indukują sygnalizację poprzez homolog receptora *Cxcr3* [158]. Podobnie fakt, że transkrypcja *cxcr3* i *cxcb* pokrywa się w czasie podczas stanu zapalnego u karpia, oraz, że zarówno ekspresja genów kodujących chemokiny *Cxcb*, jak i receptor *Cxcr3* były zwiększone po stymulacji  $\text{IFN-}\gamma$  sugeruje, że chemokiny *Cxcb* są ligandami dla *Cxcr3* karpia [159].

### 4.2.3. Cxcl12a, Cxcl12b i Cxcr4

Zarówno u karpia jak i u danio przęgowanego opisano dwa ortologi ssaczej chemokiny CXCL12 (Cxcl12a i Cxcl12b) [160, 161]. Badania funkcjonalne na modelu danio przęgowanego wykazały, że ortologi Cxcl12 sygnalizują poprzez Cxcr4 [161, 162]. Ta wysoka konserwatywność ewolucyjna istnieje, mimo, że zarówno geny kodujące chemokinę jak i jej receptor u danio przęgowanego są zduplikowane i opisane odpowiednio jako Cxcr4a/b i Cxcl12a/b [163]. Obydwa warianty Cxcr4 mogą wiązać obydwie warianty Cxcl12, jednakże Cxcr4a wiąże preferencyjnie Cxcl12b, a Cxcr4b wiąże z większym powinowactwem Cxcl12a [164]. Pokazano ponadto, że Cxcr4a jest przede wszystkim związany z regulacją proliferacji komórek i wpływa na rozszerzanie naczyń, podczas gdy Cxcr4b jest powiązany z retencją neutrofilów w tkankach hematopoetycznych, modulacją stanu zapalnego, reguluje także migrację neutrofilów i makrofagów oraz ich interakcję z innymi typami komórek. Bierze również udział w nowotworzeniu oraz regeneracji tkanek [164–167].

**Tabela 1.** Chemokiny CXC ( $\alpha$ -chemokiny) i ich receptory scharakteryzowane u karpia i danio przęgowanego.

Karp ( <i>Cyprinus carpio</i> L.)	Danio przęgowane ( <i>Danio rerio</i> )	Podobieństwo do chemokin ssaków	Przypuszczalny receptor – karp	Przypuszczalny receptor – danio przęgowane	Rola
CXCL8-podobne: Cxca/Cxcl8_1, Cxcl8_12	Cxcl8a (Cxcl8_11), Cxcl8b.1,0.2.3 (Cxcl8_12.1–0.3), Cxcl18b	Funkcjonalny homolog CXCL8 (IL-8)	Cxcr1, Cxcr2	Cxcr1 (Il8ra), Cxcr2 (Il8rb)	Cxcl8_11 i Cxcl8_12: rekrutacja neutrofilów, funkcje prozapalne [149,150]. Cxcl8_11 and Cxcr2 - Migracja wsteczna neutrofilów, rola w wyciszeniu zapalenia [155].
Cxcb: Cxcb1, Cxcb2	Cxcl11-podobne aa, ac, ad, ae, af, ag	Funkcjonalny homolog CXCL9- 11	Cxcr3	Cxcr3.1,2,3	Rekrutacja makrofagów i neutrofilów do miejsca zranienia/infekcji [169].
Cxcl12: Cxcl12a, Cxcl12b	Cxcl12b, Cxcl12a	Ortolog CXCL12 (SDF-1)	Cxcr4	Cxcr4a, Cxcr4b	Retencja niedojrzałych neutrofilów w tkance hematopoetycznej [165,168]. Powrót starzejących się neutrofilów do tkanki hematopoetycznej [144]. Rekrutacji i retencja neutrofilów w miejscu zranienia [170].

## II. Cele i hipotezy badawcze

Celem obecnej pracy było **poznanie mechanizmów zaangażowanych w regulację indukowanej stresem redystrybucji neutrofilii u ryb.**

W niniejszej rozprawie doktorskiej weryfikowano 3 główne hipotezy badawcze:

- 1) Podczas ostrego stresu, dochodzi do zależnej od hormonów stresu (katecholamin, ACTH i kortyzolu) redystrybucji granulocytów obojętnochłonnych z narządów hematopoetycznych (głównie z nerki głównej) do krwi obwodowej
- 2) Chemokiny z rodziny CXC oraz ich receptory są zaangażowane w indukowaną stresem redystrybucję granulocytów obojętnochłonnych.
- 3) Indukowana stresem redystrybucja neutrofilii zależna jest od składu mikrobioty jelit i receptorów Toll-podobnych (TLR).
- 4) Zwiększona w wyniku działania stresu liczba neutrofilii krwi obwodowej wpływa na migrację tych komórek do ogniska zapalnego.

Na tej podstawie sformułowano szczegółowe zadania badawcze:

- Zbadanie wpływu czasu trwania stresu na: (i) poziom kortyzolu i glukozy w surowicy oraz (ii) redystrybucję neutrofilii, w tym na ekspresję genów zaangażowanych w retencję (*cxcl12-cxcr4*) i uwolnienie/migrację (*cxcl8-cxcr1/2*, *gcsfr*, *mmp9*) tych komórek z tkanki hematopoetycznej do krwioobiegu.
- Zbadanie wpływu zablokowania receptorów adrenergicznych ( $\beta 1$ Adr i  $\beta 2$ Adr), receptora melanokortyny 2 (Mc2r), receptorów glikokortykoidowych i mineralokortykoidowych (Gr i Mr) na: (i) poziom kortyzolu i glukozy w surowicy, oraz na (ii) redystrybucję neutrofilii, w tym na ekspresję genów zaangażowanych w retencję i uwolnienie/migrację tych komórek z tkanki hematopoetycznej do krwioobiegu.
- Zbadanie wpływu zablokowania receptorów chemokinowych Cxcr1, 2 i 4 na: (i) aktywność osi stresu (podwzgórze-przysadka-nerka główna, HPI), w tym na: poziom kortyzolu i glukozy w surowicy, ekspresję genów związanych z sygnalizacją osi stresu oraz genów kodujących chemokiny z rodziny CXC i ich receptory, oraz (ii) redystrybucję neutrofilii, w tym na ekspresję genów zaangażowanych w retencję i uwolnienie/migrację tych komórek z tkanki hematopoetycznej do krwioobiegu.

- Zbadanie wpływu stresu i antybiotykoterapii na: (i) skład i różnorodność mikrobioty jelitowej oraz (ii) rozwój reakcji zapalnej jelit, w tym na morfologię jelit i na ekspresję genów związanych z zapaleniem i redystrybucją neutrofilów w jelitach.
- Zbadanie wpływu wywołanej antybiotykoterapią dysbiozy mikrobioty jelitowej na: (i) aktywność osi HPI, w tym: poziom kortyzolu i glukozy w surowicy oraz ekspresję genów związanych z sygnalizacją osi stresu, (ii) indukowaną stresem redystrybucję neutrofilów oraz ekspresję genów zaangażowanych w retencję i uwolnienie/migrację neutrofilów z tkanki hematopoetycznej do krwioobiegu oraz (iii) aktywność neutrofilów pozyskanych z nerki główowej, w tym na ich profil transkryptomyczny, aktywność fagocytarną i produkcję reaktywnych form tlenu.
- Zbadanie, wpływu kortyzolu *in vivo* na rekrutację neutrofilów do ogniska zapalenia oraz roli sygnalizacji TLR/Myd88 w tym procesie.

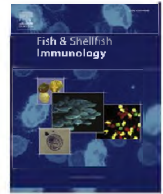
### III. Wyniki

1. **Klak K., Maciuszek M., Marcinkowska M., Verburg-van Kemenade B. M. L., Chadzinska M. The importance of CXC-receptors CXCR1-2 and CXCR4 for adaptive regulation of the stress axis in teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 2022, 127: 647-658.**

Badania na ssakach sugerują, że chemokiny zaangażowane są w regulację odpowiedzi na stres. Celem pracy było sprawdzenie potencjalnej roli chemokin CXC: prozapalnych Cxcl8 (Cxcl8<sub>11</sub> i 12) i homeostatycznych Cxcl12 (Cxcl12a i b) w regulacji osi stresu (podwzgórze-przysadka-nerka głowowa) u karpia. W tym celu karpie potraktowano inhibitorami receptorów tych chemokin, odpowiednio: reparyksyną (inhibitor receptorów Cxcr1 i Cxcr2), SB225002 (inhibitor receptora Cxcr2) oraz AMD3100 (inhibitor receptora Cxcr4) a następnie poddano procedurze 11-godzinnego stresu unieruchomienia. Po zakończeniu procedur *in vivo* sprawdzono poziom kortyzolu i glukozy w surowicy, a w narządach osi stresu HPI zbadano ekspresję genów kodujących jej kluczowe mediatory, w tym genów kodujących białka uczestniczące w syntezie i konwersji kortyzolu.

Zaobserwowano, że 11-godzinny stres unieruchomienia zwiększa poziom kortyzolu i glukozy w surowicy, a także podnosi ekspresję genów kluczowych mediatorów osi HPI aktywujących steroidogenezę i konwersję kortyzolu. Ponadto, we wszystkich narządach osi HPI, stres zwiększa ekspresję genów kodujących chemokiny Cxcl8 i Cxcl12 i ich receptory Cxcr1, Cxcr2 i Cxcr4, a także Il-1 $\beta$  w podwzgórzu i nerce głowowej. Zablokowanie sygnalizacji chemokinowej powoduje zmiany w ekspresji genów kodujących badane chemokiny, ich receptory, a także genów zaangażowanych w regulację osi stresu, w tym syntezę i konwersję kortyzolu.

Odkrycia te ujawniają, że u ryb, poza znaną hormonalną regulacją osi stresu na drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego, również chemokiny CXC działające poprzez receptory Cxcr1, Cxcr2 i Cxcr4, są ważnymi regulatorami odpowiedzi na stres, a w szczególności zachodzącej w nerce głowowej steroidogenezy i konwersji kortyzolu.



Full length article

## The importance of CXC-receptors CXCR1-2 and CXCR4 for adaptive regulation of the stress axis in teleost fish

Katarzyna Klak<sup>a</sup>, Magdalena Maciuszek<sup>a</sup>, Magdalena Marcinkowska<sup>a</sup>,  
B.M. Lidy Verburg-van Kemenade<sup>b</sup>, Magdalena Chadzinska<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Evolutionary Immunology, Institute of Zoology and Biomedical Research, Faculty of Biology, Jagiellonian University, Gronostajowa 9, PL30-387, Krakow, Poland

<sup>b</sup> Cell Biology and Immunology Group, Wageningen University, P.O. Box 338, 6700 AH, Wageningen, the Netherlands

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

CXC chemokines and receptors  
Stress response  
Cortisol synthesis and conversion

### ABSTRACT

In an ever-changing environment, an adaptive stress response is the pivotal regulatory mechanism to maintain allostasis. Physiologic responses to stressors enable to overcome potential threat. Glucocorticoid effects can be considered compensatory and adaptive, however prolonged or excessive glucocorticoid secretion can be also maladaptive and detrimental. Therefore, it must be tightly regulated. Apart from the essential hormonal feedback regulation, evidence accrues that cytokines, e.g., proinflammatory interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), also play an important regulatory role in the stress axis.

Here we focused on the potential role of CXC chemokines (CXCL8 and CXCL12) and their receptors (CXCR1, 2 and 4) in the regulation of the stress response in common carp. We studied changes in gene expression of CXC chemokines and CXCRs in the stress axis organs (hypothalamus-pituitary gland-head kidney) upon 11 h of restraint stress and we established how CXCR blocking affects the activation of the stress axis and the synthesis/conversion of cortisol.

During restraint stress, gene expression of the majority of the proinflammatory CXCL8 and homeostatic CXCL12 chemokines and their receptors was upregulated in the stress axis organs. Inhibition of CXCR1-2 and CXCR4 differentially affected the expression of genes encoding stress-related molecules: hormones, binding proteins, receptors as well as expression of genes encoding IL-1 $\beta$  and its receptor. Moreover, we observed that CXC chemokines, via interaction with their respective CXCRs, regulate gene expression of molecules involved in cortisol synthesis and conversion and consistently affect the level of cortisol released into the circulation during the stress response.

We revealed that in fish, CXC chemokines and their receptors are important regulators of the stress response at multiple levels of the stress axis, with particularly pronounced effects on steroidogenesis and cortisol conversion in the head kidney.

### 1. Introduction

In an ever-changing environment, an adaptive stress response is the pivotal regulatory mechanism to maintain allostasis [1]. Upon stress, the Hypothalamus-Pituitary gland-Interrenal (HPI) axis is activated [2,3]. This HPI axis cascade of actions begins in the nucleus preopticus (NPO) of the hypothalamus, which releases corticotropin-releasing hormone (CRH). In fish, the CRH-cell axons project directly from the NPO to the pituitary gland where CRH, through CRH-receptor (CRHR) activation, stimulates the release of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) [4,5].

CRH activity is additionally regulated by the presence of CRH binding protein (CRH-BP) that has a high capacity to antagonize/block CRH-induced ACTH release [6,7]. ACTH is post-translationally cleaved from the precursor protein - proopiomelanocortin (POMC). ACTH binds to melanocortin receptor 2 (MC2R), uniquely located on the surface of interrenal cells of the head kidney. Activation of the MC2R by ACTH additionally requires binding of the MC2R accessory protein (MRAP). This arrangement initiates the signalling pathway for biosynthesis and secretion of corticosteroids [3]. Like most mammals (except rodents), in fish cortisol is the principal glucocorticoid [8]. Cortisol release is

\* Corresponding author.

E-mail address: [magdalena.chadzinska@uj.edu.pl](mailto:magdalena.chadzinska@uj.edu.pl) (M. Chadzinska).

<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.06.070>

Received 20 May 2022; Received in revised form 29 June 2022; Accepted 30 June 2022

Available online 5 July 2022

1050-4648/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

controlled by negative feedback at all levels of the HPI axis [9–11].

Cortisol biosynthesis requires the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) which is responsible for the compulsory outer and inner mitochondrial membrane transport of cholesterol. Moreover, the cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme (P450<sub>sc</sub> encoded by the *cyp11a* gene) catalyzes the conversion of cholesterol to pregnenolone, a precursor for all steroid hormones [12,13]. Pregnenolone is subsequently converted to 17-hydroxyprogesterone (17-OHP), and this reaction is catalyzed by 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD). In turn, 21-hydroxylase catalyzes the conversion of 17-OHP to 11-deoxycortisol [14], while 11 $\beta$ -hydroxylase (CYP11B1) catalyzes the synthesis of cortisol [15]. The activity of steroid hormones is regulated extracellularly by corticosteroid-binding globulin (CBG) and intracellularly by 11 $\beta$ -HSD dehydrogenases. In mammals, type 1 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD1), also known as cortisone reductase, converts the inactive form of cortisone into active cortisol, while 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 $\beta$ -HSD2) converts cortisol into inactive cortisone [16,17]. In fish 11 $\beta$ -HSD2 was found, which exerts complex biological functions, but 11 $\beta$ -HSD1 was not detected. Phylogenetic analyses assigned the 11 $\beta$ -HSD1 function to 11 $\beta$ -HSD3, which is considered the ancestor of 11 $\beta$ -HSD1 [18].

Fish possess two types of cortisol receptors: mineralocorticoid- (MR) and glucocorticoid receptors (GR) [2]. Nuclear GRs bind cortisol and this complex translocates into the cell nucleus and binds to the responsive glucocorticoid element (GRE) thereby regulating gene expression (trans-activation or trans-repression) [19,20]. Fish have duplicated GR genes (*gr1* and *gr2*), encoding functional proteins (except zebrafish, which have only one GR) [21]. Moreover, the GR1 gene has two constitutively expressed alternative splice variants: *gr1a* and *gr1b*. GR1a has an extra nine-amino-acid insert in its DNA binding region [22, 23]. Interestingly, in rainbow trout and in common carp GR2 is sensitive to low cortisol concentrations (which correspond to the basal cortisol level), whereas high cortisol levels, typical during a stress response, are required for GR1 activation [24–26]. Analyses of cortisol transactivation properties in common carp by Stolte et al. [26] revealed that during homeostasis cortisol binds with high affinity to both MR and GR2, whereas GR1s are preferentially activated under stress. Interestingly, genes encoding glucocorticoid receptors are constitutively expressed in all immune tissues and in tissues rich in immune cells [26].

Physiologic responses to stressors form an evolutionary tradeoff between the protective glucocorticoid effects, considered as compensatory and/or adaptive (which enable to overcome potential threat), versus the maladaptive and detrimental consequences connected with prolonged, excessive glucocorticoid secretion [27,28]. Therefore, the stress reaction must be tightly regulated. Next to the above-mentioned endocrine mechanisms involved, in recent years it became evident that also immune mediators e.g., cytokines, are important regulators of the stress reaction. A prominent example, both in mammals and in fish, forms the proinflammatory interleukin 1 (IL-1 $\beta$ ) and its receptor – IL-1RI. In common carp, Metz et al. [29] found a stress-induced upregulation of gene expression of IL-1 $\beta$  and its receptor IL-1RI in the HPI axis organs.

It is important to mention that fish are a particularly interesting model to study bilateral neuroendocrine-immune interaction, as the head kidney combines hematopoietic, immune and endocrine functions (production of blood cells and antibodies as well as cortisol and catecholamines). This combination may facilitate paracrine endocrine-immune interaction [30]. Moreover, fish are the first vertebrates with a fully effective immune system that consists of innate and adaptive responses and a broad cytokine panel. This panel also includes a group of small chemotactic cytokines called chemokines, which are involved in leukocyte activation and direct their migration. As in mammals, fish chemokines can be divided, based on their function and localization (homeostatic and proinflammatory chemokines) or structure. The latter helped to distinguish 4 chemokine families in fish: CXC, CC, XC and C [31]. These types of chemokines signal through seven transmembrane domain G-protein coupled receptors (GPCRs), divided respectively into

CXCR, CCR, CXC3R and CR families [32]. To date, a large chemokine repertoire was characterized among teleosts where zebrafish genome analysis revealed the presence of 111 chemokines [33,34]. One of the best-known classes of fish chemokines constitute CXC chemokines, in which two cysteine (C) residues are separated by one amino acid (X). In common carp several genes for CXC ligands and receptors have been described: proinflammatory (CXCL8\_L1, CXCL8\_L2 and CXCb1 and CXCb2) as well as homeostatic (CXCL12a, CXCL12b and CXCL14) chemokines and 4 CXC receptors (CXCR1-4) [32,33]. While CXCL12 and CXCL14 show clear orthology to their mammalian counterparts, CXCL8 and CXCb chemokines are rather functional homologs than orthologs to mammalian CXCL8 and CXCL9-11 respectively [35–39].

Currently, a number of studies emphasize the non-immune functions of CXC chemokines, important for the maintenance of physiological equilibrium. For example, in mammals, Rostène et al. [32] showed the expression of CXC chemokines and their receptors in the CNS (predominantly the HPI axis) and their involvement in thermoregulation as well as regulation of drinking and feeding behavior. In turn, a study in zebrafish revealed CXCL12–CXCR4 involvement in the migration of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons that control pituitary gonadotropin secretion and gametogenesis [33]. Furthermore, we recently found that a stress response modifies gene expression of CXC chemokines in stress axis organs of common carp [40].

The current research focused on the role of CXC chemokines and their receptors in the regulation of the stress response in common carp. We studied changes in gene expression of CXC chemokines and CXCRs in the stress axis organs and established how CXCR blocking affects the activation of the stress axis and the synthesis/conversion of cortisol.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Young individuals of common carp (*Cyprinus carpio* L.; body weight (b.w.) 70–120 g, 8–10 months; line R3xR8) were obtained from the Institute of Ichthyobiology and Aquaculture, Polish Academy of Science, Golysz, Poland. Prior to the experiments, fish were adapted for 4 weeks at 21 °C and 12L:12D light/dark cycle in recirculating tap water at the Institute of Zoology and Biomedical Research in Krakow, Poland. Fish were kept in tanks (volume 375 l, flow rate 4 l/min, density 45 fish/tank and 9 kg/m<sup>3</sup>) daily fed with pelleted dry commercial food (Aller Master, Aller Aqua, Czarna Dąbrówka, Poland) and with the bloodworm (the midge larvae from a *Chironomidae* family) at a total ratio of 1% of their estimated body weight. To avoid additional stress and/or differences in handling, all samplings were performed by the same person and at the same time of day. All animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the relevant national and local animal welfare bodies, and procedures were approved by the local ethical committee (2nd Local Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) in Krakow, Poland, license number LKE 246/2021.

### 2.2. Restraint stress

Restraint was given by netting fish as described previously [41,42]. Briefly, fish were stressed by the confinement of one fish in a net in their own aquarium while maintaining full contact with water. During the stress challenge fish were not fed. Experiments were performed 2 times independently with 4 fish per group/time point every time.

### 2.3. CXCR inhibitor injection and restraint stress

The non-competitive allosteric inhibitor of chemokine CXCR1 and CXCR2 receptors: reparixin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA, 30 mg/kg b.w.) and the nonpeptide CXCR2 receptor inhibitor: SB225002 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA, 2 mg/kg b.w.) were resuspended in sterile dimethyl sulfoxide (DMSO, Thermo Fisher

Scientific, Massachusetts, USA). The CXCR4 inhibitor: AMD3100 (plerixafor, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA, 1 mg/kg b.w.) was resuspended in sterile PBS (270 mOsm). For all inhibitors, effectiveness was previously proven *in vivo* for zebrafish [43,44] and *in vitro* for carp leukocytes in migratory assay with recombinant CXC chemokines (data not shown). Experimental fish were assigned randomly to the vehicle (DMSO/PBS, N = 8) and inhibitor treatment groups (N = 8). Prior to injection, all fish were individually weighed to adjust the dose of a particular drug. To minimize stress and pain, the weighing and the injection procedure was preceded by short-term anaesthesia with a buffered solution of tricaine methanesulfonate (TMS, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA, 0.2 g/l with the addition of 0.8 g/l NaHCO<sub>3</sub>, (POCh, Gliwice, Poland). Inhibitor or vehicle (DMSO/PBS) intraperitoneal (i.p.) injection was administered 1-h prior to the stress procedure, at 8 a.m. The final volume for i.p. injections was 100 µl per individual fish. After injection, fish from each group were transferred into tanks. One hour post injection half of the fish from each group was kept undisturbed while half was stressed for 11 h as described above.

Every experiment was performed independently 2 times per applied inhibitor, each at the same time (8 a.m. injections, 9 a.m. confinement (11 h), 8 p.m. sampling) resulting in 16 control (DMSO/PBS, N = 8 or inhibitor, N = 8 injected group) and 16 stressed individuals (DMSO/PBS, N = 8 or inhibitor, N = 8 injected group).

#### 2.4. Blood collection

After restraint stress fish were terminally anaesthetized by rapid netting and transfer (<30 s, all at once to avoid handling stress) into tanks containing a lethal dose of TMS (0.2 g/l TMS buffered with 0.8 g/l NaHCO<sub>3</sub>, rapid euthanasia: < 1 min). Unstressed fish groups were rapidly euthanized just before the stressed fish groups to avoid disturbing stress stimuli.

Fish were bled by the puncture of a caudal vein and the blood was spun at 800 rcf for 10 min at 4 °C. The collected serum was aliquoted and stored at –20 °C for further tests.

#### 2.5. Cortisol assay and glucose determination

The free cortisol levels were determined using a commercially available Neogen, Lexington Cortisol ELISA Kit (KY, USA) with an assay range of 0.04–10 ng/ml and cross reactivity with cortisone - 15.7%, according to the manufacturer's protocol. All standards and samples were set up in duplicate and analyzed in the same batch. The level of glucose in blood serum was measured with an iXell® glucometer (Ganexo, Warsaw, Poland) in twofold measurements.

#### 2.6. Studies of gene expression

##### 2.6.1. RNA isolation

The nucleus preopticus (NPO) of the hypothalamus, dissected precisely as described by Metz et al. [27], pituitary gland (PIT) and head kidney (HK) were excised and immersed in Fix RNA buffer (EURx, Gdańsk, Poland). All tissues were stored at 4 °C until the further determination of gene expression. Due to the small amounts of starting tissue material RNA from NPO and pituitary was purified using the ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega, Madison, USA), whereas RNA from the head kidney was isolated with GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx, Gdańsk, Poland) according to the manufacturer's protocols. Final elution was carried out respectively in 18 µl (Promega, Madison, USA) or 30 µl (EURx, Gdańsk, Poland) of nuclease-free water, to maximize the concentration of RNA. RNA quantification and purity were measured by spectrophotometry using Spark® Multimode Microplate and NanoQuant Plate™ Reader (Tecan, Grödig, Austria). RNA samples were stored at –80 °C.

##### 2.6.2. First strand cDNA synthesis

The cDNA synthesis reaction, including non-RT (-RT, non-reverse transcriptase) control, was performed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) following the manufacturer's protocol. Briefly, 10 µl of a 1 µg total RNA sample was added to a 10 µl RT master mix consisting of 2 µl 10x RT Buffer, 0.8 µl 25x dNTP Mix (100 mM), 2 µl 10x RT Random Primers, 1 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase and 4.2 µl of nuclease-free water. Samples were then placed into the thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, California, USA) in the following reaction conditions: 25 °C for 10 min; 37 °C for 120 min; 85 °C for 5 min and rapid cooling to 4 °C infinity mode. Samples were set at 100 µl with nuclease-free water constituting 5x diluted stocks. Additionally, the 50x and 100x cDNA dilutions were prepared and stored at –20 °C until further RT-qPCR analysis.

##### 2.6.3. Real-time quantitative PCR

All forward and reverse primers sequences and accession numbers are listed in Table S1.

The 40S ribosomal protein s11 gene served as an internal standard. For RT-qPCR analysis 4 µl of cDNA (concentrations listed in Table S1.) was used as a template in a 15 µl amplification mixture, containing 2 µl each primer and 7 µl of SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA). RT-qPCR, initialized with 2 min at 50 °C, followed by 2 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C, has been performed in Rotor-Gene Q, 5-Plex HRM (Qiagen, Hilden, Germany). After each run, an analysis of melt curves was performed by fluorescence detection from 60 to 90 °C at 1 °C intervals, in order to check specificity. The results were checked and analyzed using Rotor-GeneQ Series Software 2.3.1 and Microsoft® Excel®. Constitutive expression was rendered as a ratio of target gene vs. reference gene (40S ribosomal protein s11 gene) and was calculated according to the following equation:

$$Ratio = \frac{(E_{reference})^{Ct_{reference}}}{(E_{target})^{Ct_{target}}}$$

Changes in gene expression upon inhibitor treatment and/or stress challenge were determined as a ratio of target gene vs. reference gene (40S ribosomal protein s11 gene) relative to the expression in control samples based on the ensuing equation:

$$Ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta Ct_{Target}}}{(E_{reference})^{\Delta Ct_{Reference}}}$$

where  $E$  is amplification efficiency, and  $Ct$  is the number of PCR cycles required for the signal to exceed a predetermined threshold value [45].

In NTC samples (non-template control samples), where nuclease-free water was used instead of cDNA and -RT control samples, no amplification was observed.

##### 2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad 9 Software (San Diego, CA, USA). Results were shown as mean ± standard deviation (SD). Significant differences in the serum level of cortisol and glucose in control and stressed animals, at different time points, were determined using a one-way analysis of variance (ANOVA) and Kruskal-Wallis post hoc test. Significant differences in all results from experiments verifying inhibitor effects on cortisol, glucose and changes in mRNA levels were determined using two-way ANOVA with post hoc Tukey's test. Significant differences in the constitutive gene expression were determined using one-way ANOVA with post hoc Tukey's test. For all tests statistically significant differences were considered at the level of  $p \leq 0.05$ .

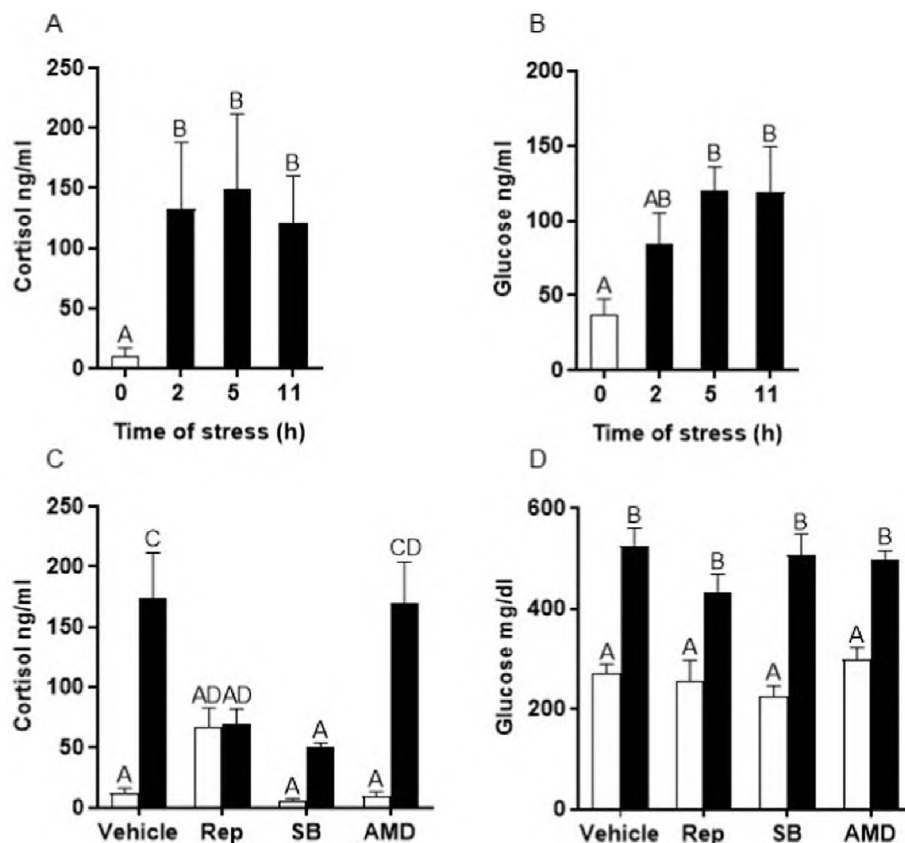
### 3. Results

#### 3.1. Constitutive expression of genes encoding for CXC chemokines, IL-1 $\beta$ and their receptors in stress axis organs

In all HPI organs constitutive expression of genes encoding IL-1 $\beta$ , IL-1RI, CXCL8 and CXCL12 chemokines, as well as their receptors CXCR1, CXCR2 and CXCR4 was observed (Fig. S1). The highest expression of *il-1 $\beta$*  was measured in the head kidney while its expression in the NPO and the pituitary was lower. The highest expression of *il-1r1* was observed in the pituitary and the lowest in the NPO (Fig. S1A). The highest expression of *cxcl8\_11*, *cxcl8\_12*, *cxcr1* and *cxcr2* was found in the head kidney, while their expression in the NPO and the pituitary was much lower (Fig. S1B). In the NPO and the head kidney expression of *cxcl12a* was at an equal level, while its expression in the pituitary was significantly lower. Expression of *cxcl12b* and *cxcr4* was highest in the head kidney, lower in the NPO and lowest in the pituitary (Fig. S1C).

#### 3.2. Effects of CXCR1, CXCR2 and CXCR4 blocking on the level of cortisol after stress

Restraint stress lasting 2, 5, or 11 h induced significant upregulation of cortisol (Fig. 1A) and glucose (Fig. 1B) levels in the blood serum. Also, in vehicle-treated and CXCR4 inhibitor-treated animals similar stress-induced increase in cortisol levels was observed, while stress-induced changes in cortisol levels were not found in fish treated with inhibitors of CXCR1-2 (reparixin) or CXCR2 (SB) (Fig. 2C). Glucose levels in the blood serum did not change in response to CXCR inhibitors (Fig. 2D).



**Fig. 1.** Changes in cortisol and glucose levels in blood serum of common carp. Levels of cortisol (A) and glucose (B) were measured in control unstressed (0 h, white bars) and stressed (black bars) fish and in fish treated with CXCR1-2, CXCR2 or CXCR4 inhibitors (C and D). 1 h before stress (11 h of restraint) fish were pretreated with reparixin (Rep, 30 mg/kg b.w., i.p.), SB225002 (SB, 2 mg/kg b.w., i.p.), AMD3100 (AMD, 1 mg/kg b.w., i.p.) or with vehicle. Fish were sampled at 11 h of stress (black bars). Inhibitor- or vehicle-treated but unstressed control fish (white bars) were sampled 12 h post injection. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) (n = 6–8). Different letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups (p  $\leq$  0.05).

#### 3.3. Effect of CXCR1, CXCR2 and CXCR4 inhibition on the expression of stress-related genes in stress axis organs

In the NPO, stress slightly but significantly upregulated *crh* and *crh-bp* expression (Fig. 2A and B) while stress-induced upregulation of *crh* was not found in the NPO of reparixin-, SB- or AMD-treated fish (Fig. 2A). These treatments did not affect the expression of *crh-bp*. Neither stress nor CXCR inhibition affected gene expression of the CRHR (Fig. 2C) and GRs (Fig. 2E and F). The expression of *mr* in NPO of stressed reparixin-treated fish was higher than this expression in NPO of stressed AMD-treated ones (Fig. 2D).

In the pituitary gland, stress downregulated expression of *crh* (Fig. 3C) and *gr1* (Fig. 3E) while it slightly upregulated expression of *gr2* (Fig. 3F). Stress-induced downregulation of *crhr* was not changed upon CXCR inhibition (Fig. 3C), while stress-induced *gr1* downregulation was not observed in reparixin-treated stressed fish (Fig. 3E). Moreover, both in unstressed and stressed fish treated with reparixin, upregulation of *pomc* was observed (Fig. 3A). In the pituitary, reparixin upregulated also the expression of *crh-bp* in unstressed fish (Fig. 3B) and expression of *mr* (Fig. 3D) and *gr2* (Fig. 3F) in stressed fish. The expression of *crh-bp* in the pituitary of stressed AMD-treated fish was higher than its expression in the pituitary of stressed fish treated with vehicle or CXCR1-2 inhibitors (Fig. 3B).

In the head kidney, stress upregulated the expression of *mc2r* (3-fold), *gr1* (2-fold), *star* (3-fold) and *cyp11b* (3-fold) (Fig. 4). Stress-induced upregulation of expression of these genes was not observed in AMD-treated stressed fish. Moreover, the expression of *gr1* (Fig. 4C) in the head kidney of stressed SB-treated fish was also lower than that in vehicle-treated stressed ones. In the head kidney of both unstressed and stressed fish treated with SB, *gr2* expression was lower than in the head kidney of vehicle-, reparixin- or AMD-treated animals (Fig. 4D). In contrast, in stressed fish, SB-injection upregulated the expression of *mc2r* (Fig. 4A) and *11 $\beta$ -hsd2* (Fig. 4H). Expression of *11 $\beta$ -hsd3* (Fig. 4G)

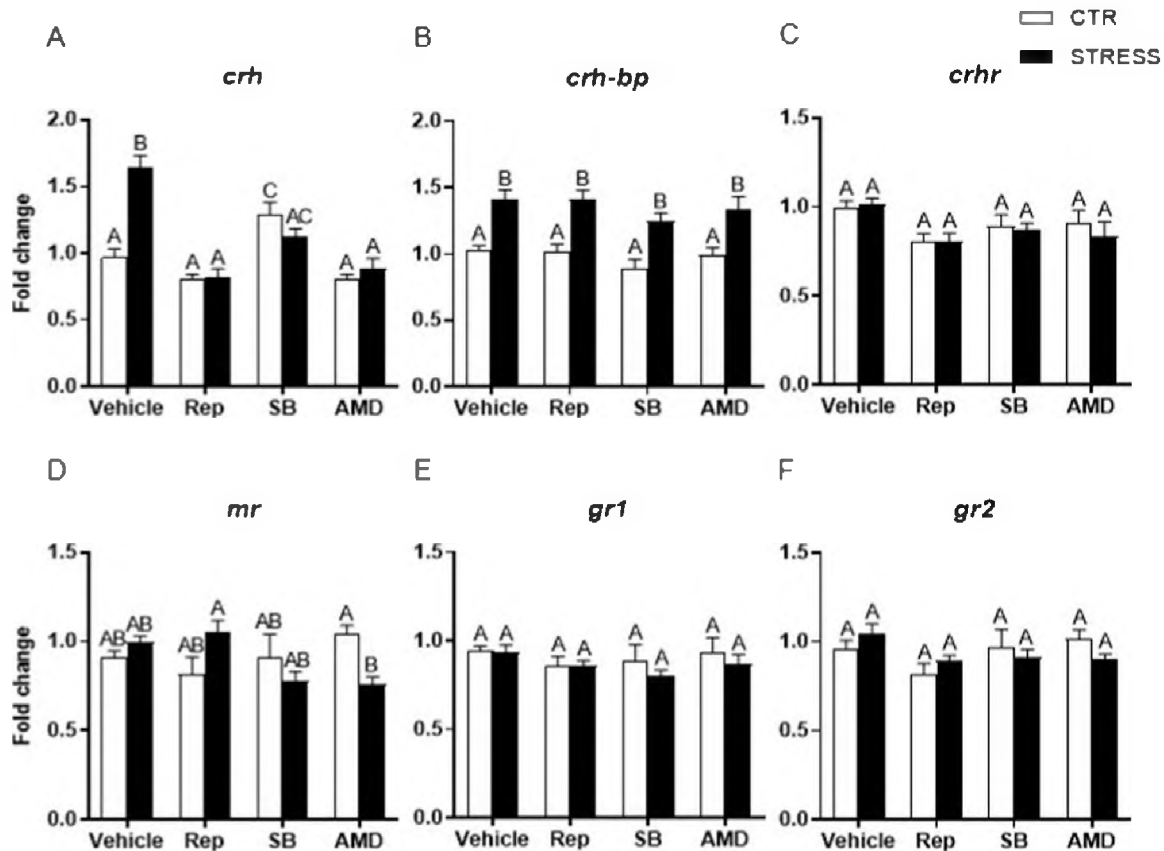


Fig. 2. Changes in expression of stress-related genes in the nucleus preopticus (NPO) of the hypothalamus in common carp. 1 h before stress (11 h of restraint) fish were pretreated with reparixin (Rep, 30 mg/kg b.w., i.p.), SB225002 (SB, 2 mg/kg b.w., i.p.), AMD3100 (AMD, 1 mg/kg b.w., i.p.) or vehicle. Fish were sampled at 11 h of stress (black bars). Inhibitor- or vehicle-treated but unstressed control fish (white bars) were sampled 12 h post injection. Gene expression was measured by RT-qPCR and presented as an x-fold change compared to control fish (vehicle-injected and unstressed: CTR) and normalized to the housekeeping gene 40S ribosomal protein s11 mRNA levels. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) ( $n = 6-8$ ). Different letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ).

was higher in the head kidney of AMD-treated stressed fish than in vehicle- or SB-treated ones.

### 3.4. Effect of CXCR1, CXCR2 and CXCR4 inhibition on the expression of CXCL8 chemokines and their putative receptors in stress axis organs

In the NPO, stress upregulated the expression of *cxcl8\_l2* (2-fold) as well as *cxcr1* (2-fold) (Fig. 5B and C). Expression of *cxcl8\_l1* was higher in the NPO of stressed fish that were treated with CXCR inhibitors, than in stressed fish treated with vehicle (Fig. 5A). Expression of *cxcl8\_l2* was significantly higher in NPO of stressed fish treated with SB than in stressed fish treated with vehicle, reparixin or AMD (Fig. 5B). In AMD-treated fish stress-induced upregulation of *cxcl8\_l2* (Fig. 5B) and *cxcr1* (Fig. 5C), was not observed. In turn, in stressed fish treated with reparixin *cxcr1* expression was even higher than in NPO of stressed fish treated with vehicle or AMD (Fig. 5C). A similar phenomenon of reparixin-induced upregulation of gene expression was also found for *cxcr2* in the NPO of stressed animals (Fig. 5D).

In the pituitary, stress upregulated the expression of *cxcl8\_l2* (3-fold) (Fig. 5F) and *cxcr1* (2-fold) (Fig. 5G), while it downregulated the expression of *cxcl8\_l1* (Fig. 5E). The expression of *cxcl8\_l1* was higher in the pituitary of both unstressed and stressed fish that were treated with reparixin than in the pituitary of vehicle-, SB- or AMD-treated animals. A similar phenomenon of reparixin-induced upregulation of gene expression was found in the pituitary of stressed fish for *cxcr1* (Fig. 5G) and *cxcr2* (Fig. 5H). The expression of *cxcl8\_l2* was higher in the pituitary of SB-treated stressed fish than in the pituitary of stressed fish treated with

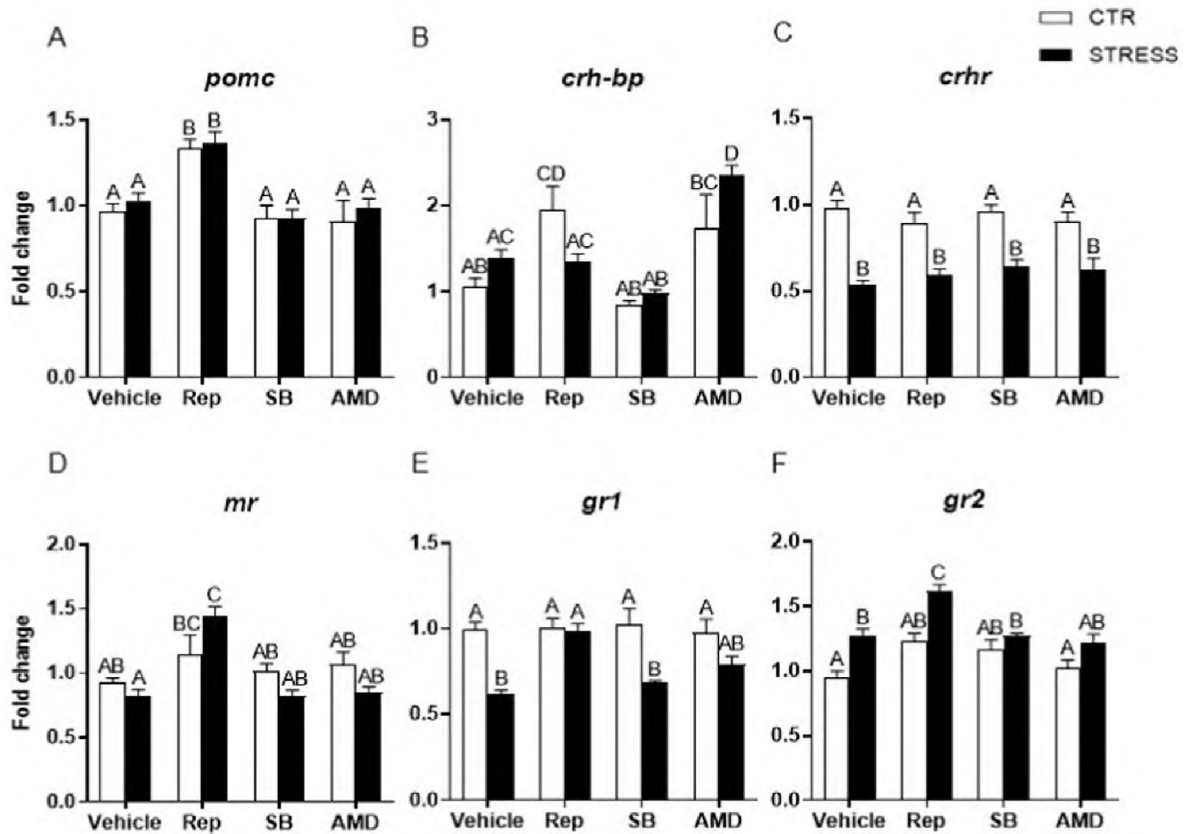
vehicle, reparixin or AMD (Fig. 5F).

In the head kidney, stress upregulated the expression of *cxcl8\_l1* (2-fold) (Fig. 5I) and *cxcl8\_l2* (3-fold) (Fig. 5J) while it did not change the gene expression of their receptors (Fig. 5K and L). Stress-induced upregulation of CXCL8 genes was not found in the head kidney of stressed animals treated with SB or AMD (Fig. 5I and J). In the head kidney of SB-treated and stressed fish, expression of *cxcr1* (Fig. 5K) and *cxcr2* (Fig. 5L) was lower than in stressed fish treated with vehicle. Additionally in SB-treated stressed fish, *cxcr1* expression was lower than in stressed fish treated with reparixin (Fig. 5K).

### 3.5. Effect of CXCR1, CXCR2 and CXCR4 inhibition on the expression of CXCL12 chemokines and their receptor in stress axis organs

In the NPO, stress slightly but significantly upregulated the expression of *cxcl12a* (Fig. 6A) and *cxcr4* (Fig. 6C). Stress-induced *cxcl12a* (Fig. 6A) upregulation was not observed in stressed fish treated with AMD. The stress-induced upregulation of *cxcr4* (Fig. 6C) was not modified by CXCR inhibitors. Expression of *cxcl12b* (Fig. 6B) did not change upon stress, but it was upregulated in stressed fish treated with reparixin and SB.

In the pituitary, stress induced upregulation of *cxcr4* (2.5-fold) (Fig. 6F) and this upregulation was not modified by CXCR inhibitors. Stress did not change the expression of *cxcl12* genes in the pituitary of the vehicle- and SB-treated fish (Fig. 6D and E), while their expression was upregulated in the pituitary of stressed fish treated with reparixin or AMD (Fig. 6D and E).



**Fig. 3.** Changes in expression of stress-related genes in the pituitary gland of common carp. 1 h before stress (11 h of restraint) fish were pretreated with reparation (Rep, 30 mg/kg b.w., i.p.), SB225002 (SB, 2 mg/kg b.w., i.p.), AMD3100 (AMD, 1 mg/kg b.w., i.p.) or with vehicle. Fish were sampled at 11 h of stress (black bars). Inhibitor- or vehicle-treated but unstressed control fish (white bars) were sampled 12 h post injection. Gene expression was measured by RT-qPCR and presented as an x-fold change compared to control fish (vehicle-injected and unstressed: CTR) and normalized to the housekeeping gene 40S ribosomal protein s11 mRNA levels. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) ( $n = 6-8$ ). Different letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ).

In the head kidney, stress induced upregulation of both *cxcl12* genes (Fig. 6G and H) and expression of *cxcr4* (Fig. 6I). Stress-induced upregulation of *cxcl12b* (Fig. 6H) and *cxcr4* (Fig. 6I) was not observed in the head kidney of fish treated with CXCR inhibitors. The stress-induced upregulation of *cxcl12a* (Fig. 6G) was not found in the head kidney of stressed fish treated with SB or AMD. Moreover, reparation upregulated *cxcl12a* gene expression in the head kidney of unstressed animals (Fig. 6G).

### 3.6. Effect of CXCR1, CXCR2 and CXCR4 inhibition on *IL-1 $\beta$* and its receptor *IL-1RI* gene expression in stress axis organs

In the NPO, stress slightly but significantly upregulated the expression of *il-1 $\beta$*  and *il-1r1* (Fig. 7A and B). Stress-induced *il-1 $\beta$*  (Fig. 7A) and *il-1r1* (Fig. 7B) upregulation was not observed in stressed fish treated with SB or AMD, while in reparation-treated stressed fish *il-1 $\beta$*  expression was significantly higher than that observed in NPO of vehicle-treated stressed animals (Fig. 7A).

In the pituitary, stress did not induce changes in the expression of *il-1 $\beta$*  and *il-1r1*, while in fish treated with reparation *il-1 $\beta$*  and *il-1r1* were higher than in stressed fish treated with vehicle, SB, or AMD (Fig. 7C and D). In reparation-treated unstressed fish *il-1r1* expression (Fig. 7D) was higher than expression observed in unstressed fish treated with SB.

In the head kidney stress induced upregulation of both *il-1 $\beta$*  and *il-1r1* (Fig. 7E and F). Stress-induced upregulation of *il-1 $\beta$*  (Fig. 7E) and *il-1r1* (Fig. 7F) expression was not observed in the head kidney of fish treated with SB or AMD (Fig. 7E and F).

## 4. Discussion

This study presents novel data supporting the concept of phylogenetically conserved bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems during the stress response. We found that during restraint stress, gene expression of the majority of proinflammatory CXCL8 and homeostatic CXCL12 chemokines and their receptors is upregulated in the stress axis organs while blocking of CXCR1-2 and CXCR4 differentially affects the expression of genes encoding stress-related molecules: hormones, binding proteins, and receptors as well as the expression of genes encoding *IL-1 $\beta$*  and its receptor. Moreover, CXC chemokines and CXCRs regulate gene expression of molecules involved in cortisol synthesis and conversion and consistently affect the level of cortisol released into the circulation during the stress response.

The involvement of CXC chemokines and receptors in the regulation of the stress response in fish has been already suggested in our previous studies in which we found a relatively high level of the constitutive expression of genes encoding CXC chemokines and their receptors in stress axis organs: the hypothalamus, the pituitary gland, and the head kidney of common carp [40]. A similar pattern of expression of genes encoding CXCLs and CXCRs in the stress axis organs was also observed in mammals. For example, in the rat brain, gene expression of CXCL12 and CXCR4 has been found in several regions, including the hypothalamus and pituitary gland [46,47]. Moreover, the expression of CXCL12, CXCR4 and CXCR7 (additional CXCL12 receptor) mRNA and/or protein was reported in the human pituitary gland (reviewed by Rostène et al. [32]). It is worth mentioning that CXCL12–CXCR4 interaction has been identified to have a critical role in neurogenesis [47]. Furthermore, Licinio et al. [48] found that the gene encoding CXCL8 is expressed in

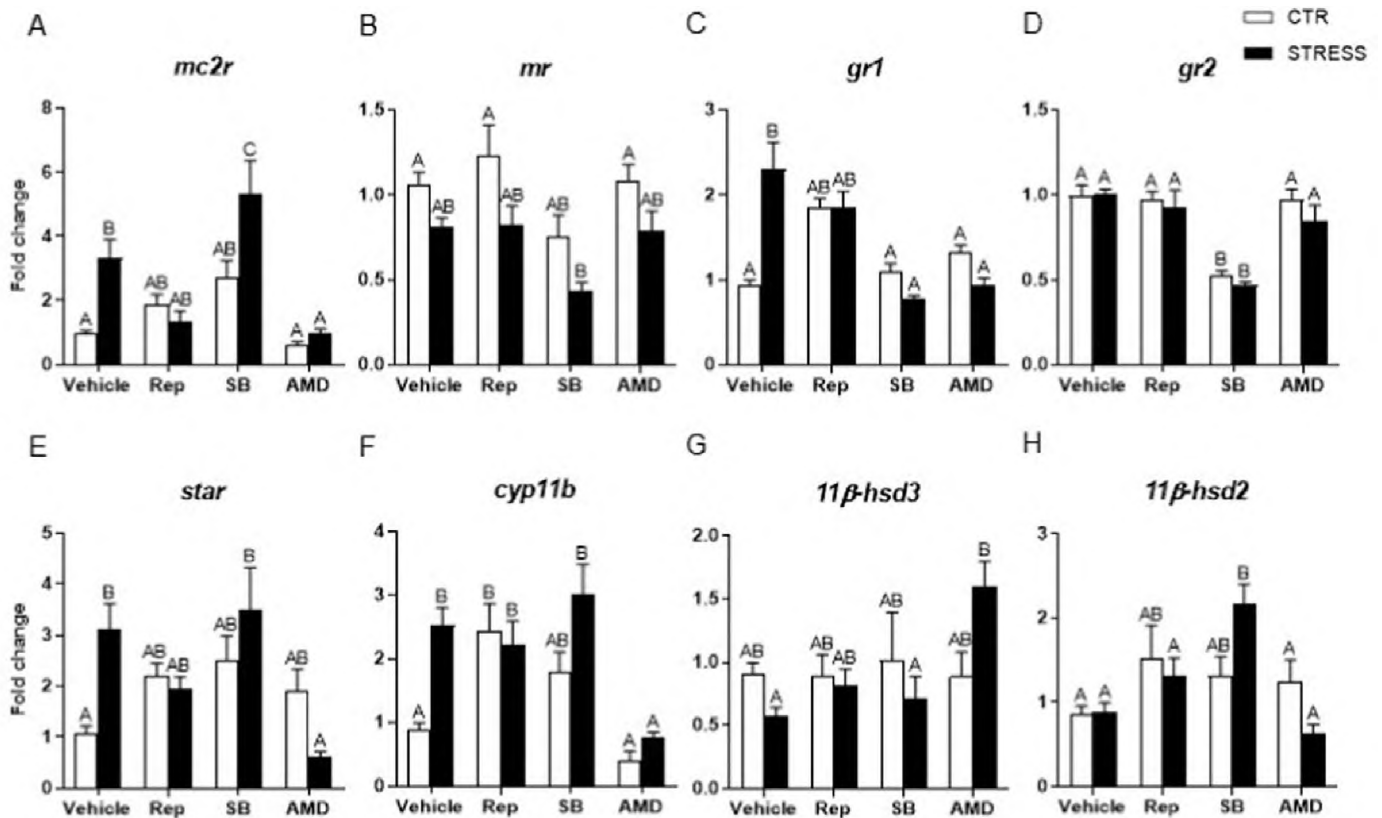
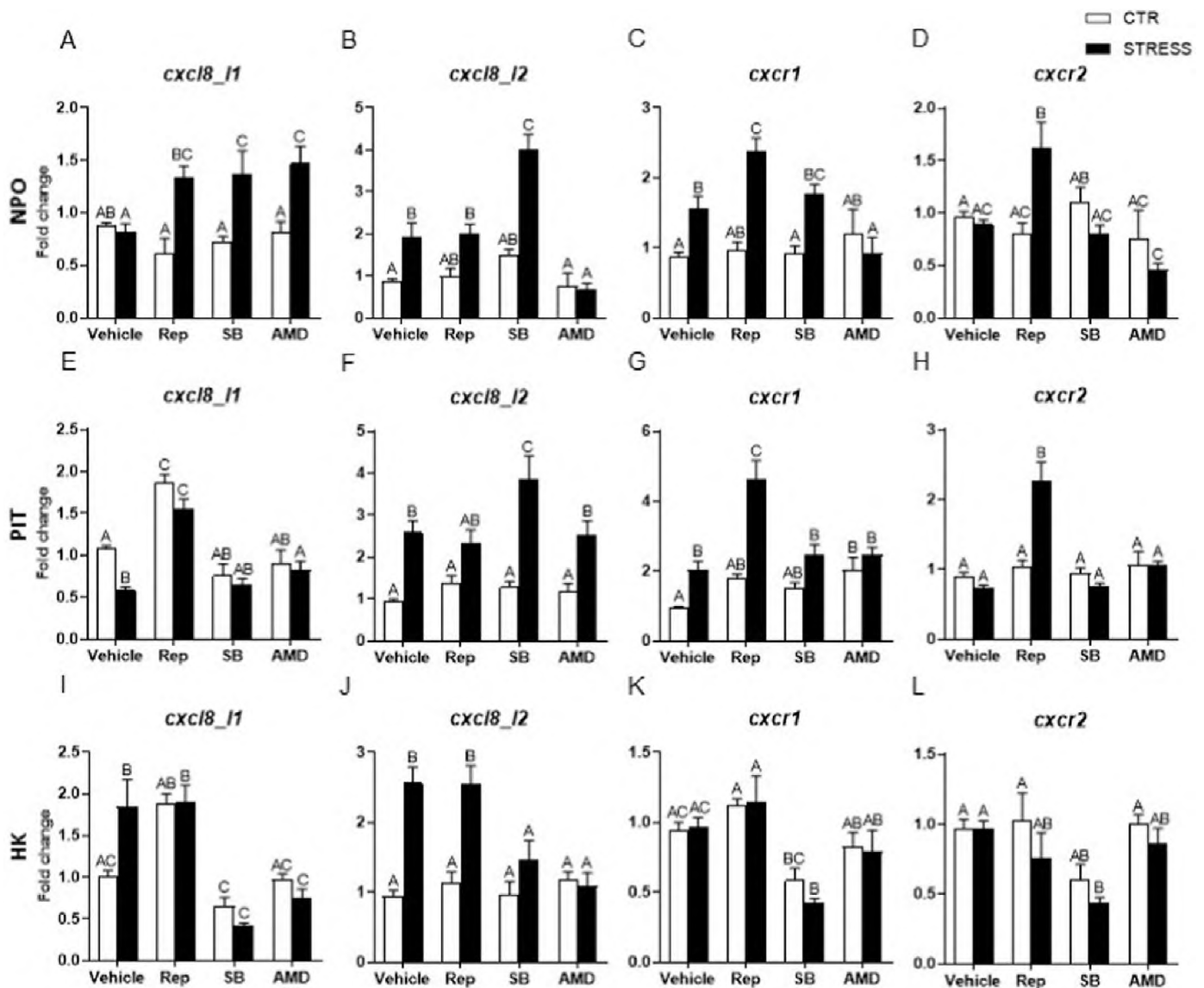


Fig. 4. Changes in expression of stress-related genes in the head kidney of common carp. 1 h before stress (11 h of restraint) fish were pretreated with reparixin (Rep, 30 mg/kg b.w., i.p.), SB225002 (SB, 2 mg/kg b.w., i.p.), AMD3100 (AMD, 1 mg/kg b.w., i.p.) or vehicle. Fish were sampled at 11 h of stress (black bars). Inhibitor- or vehicle-treated but unstressed control fish (white bars) were sampled 12 h post injection. Gene expression was measured by RT-qPCR and presented as an x-fold change compared to control fish (vehicle-injected and unstressed: CTR) and normalized to the housekeeping gene 40S ribosomal protein s11 mRNA levels. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) ( $n = 6-8$ ). Different letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups ( $p < 0.05$ ).

the rat paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus, where GRH is produced, and in the hippocampus, where the mechanism of regulatory negative feedback on the HPA axis is exerted. Besides the PVN, also the rat posterior pituitary produces CXC chemokines, such as cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC), a chemokine similar to human GROs and mouse MIP-2 [49,50].

As previously observed by Pijanowski et al. [40] at 24 h of stress, we now find stress-induced changes in the expression of CXC chemokines and their receptors in the carp HPI axis at 11 h of stress, which supports the hypothesis that CXCLs and CXCRs are involved in the regulation of the stress response. We found that gene expression of the majority of CXC chemokines and CXC receptors was upregulated in the HPI axis. This was not affected by CXCR1-2 inhibition in the NPO and pituitary gland. In the NPO however, stress-induced upregulation of *cxcl8*, *cxcr1* and *cxcl2a* was downregulated in fish treated with the CXCR4 inhibitor. In contrast, in the head kidney, blocking of the CXCR2 or CXCR4 receptors also blocked the stress-induced upregulation of CXCL8 and CXCL12 chemokine and CXCR4 chemokine receptor genes while blocking of CXCR2 receptor caused downregulation of CXCR1 and CXCR2 genes. Collectively these data indicate that during the stress reaction, the expression of genes that encode CXC chemokines and their receptors is stimulated in the NPO by the interactions between the CXCL12 chemokine and its cognate CXCR4 receptor, while in the head kidney this regulation depends both on the interaction between CXCL12 and CXCR4 and between CXCL8 and CXCR2. However, the high constitutive expression of chemokines and their receptors and the stress-induced changes in their expression that we observed in the head kidney, may be not only connected with the chemokine-regulated stress axis activation but can also highlight the important hematopoietic

function of this organ. At this point, it must be mentioned that both in mammals and in fish, CXCL12-CXCR4 interaction is a key retention signal for leukocytes in the hematopoietic tissues and that its disruption induces leukocyte migration into the blood circulation [51–53]. In turn, the high constitutive expression of genes encoding CXCR1 and CXCR2 that is found in neutrophils enables their immediate migration to the circulation and/or inflammatory focus in response to CXCL8 and CXCL8-related chemokines [37,52,54,55]. Most probably, a similar mechanism also regulates the neutrophil redistribution that is observed during a stress reaction. Because the head kidney comprises functions of endocrine, hematopoietic and lymphoid organs, the interpretation of the stress-induced changes that we observed is very complex. Extensive proliferation of the head kidney progenitor cells as well as active leukocyte redistribution from and towards the head kidney complicate this even more. Moreover, it cannot be overlooked that endocrine-immune interactions are bilateral and also cortisol modulates leukocyte proliferation, differentiation, apoptosis and activity, including expression of cytokines. These immunomodulating effects of the stress hormones have been described for several fish species e.g. [56, 57]. For example, in common carp we found that upon an immune response (LPS stimulation *in vitro* and peritonitis *in vivo*) leukocytes increase expression of GRs and consequently the sensitivity for cortisol increases, which correlates with the inhibition of the expression of pro-inflammatory cytokines [58]. Furthermore, cortisol administered at stress levels to phagocytes *in vitro* significantly inhibits LPS-induced expression of the pro-inflammatory cytokines: TNF- $\alpha$ , IL-12p35 and of iNOS expression [26]. Recently, Maciuszek and coworkers [59] found that *in vitro* cortisol also downregulates the expression of CXCL8 genes in LPS-stimulated macrophages, while an *in vivo* restraint stress



**Fig. 5.** Changes in expression of genes encoding CXCL8 chemokines and their putative receptors: CXCR1 and CXCR2 in the stress HPI axis organs: nucleus preopticus (NPO, from the hypothalamus), pituitary gland (PIT) and head kidney (HK) of common carp. 1 h before stress (11 h of restraint) fish were pretreated with reparixin (Rep, 30 mg/kg b.w., i.p.), SB225002 (SB, 2 mg/kg b.w., i.p.), AMD3100 (AMD, 1 mg/kg b.w., i.p.) or vehicle. Fish were sampled at 11 h of stress (black bars). Inhibitor- or vehicle-treated but unstressed control fish (white bars) were sampled 12 h post injection. Gene expression was measured by RT-qPCR and presented as an x-fold change compared to control fish (vehicle-injected and unstressed: CTR) and normalized to the housekeeping gene 40S ribosomal protein s11 mRNA levels. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) ( $n = 6-8$ ). Different letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ).

up-regulates the gene expression of anti-inflammatory IL-10, arginase 1 and MMP-9 in head kidney macrophages.

Previous studies of the stress response in mammals show that immobilization stress can be responsible for changes in chemokine expression. For example, upregulation of CINC gene expression was observed in the parvocellular and magnocellular subdivisions of the PVN of rats that were stressed by immobilization. Moreover, in the same stress model, increased CINC immunostaining intensity was found in the posterior pituitary, along with the increase of chemokine levels in the blood serum. The authors, therefore, concluded that CINC (after its synthesis in the PVN) could undergo axonal transport through the median eminence to be released into the peripheral blood from the hypothalamic–neurohypophysial system [50]. In turn, enhanced protein levels of the CXCL12 and CCL2 chemokines were observed in the hippocampus and frontal cortex of prenatally stressed rats [60]. Furthermore, upregulation of proinflammatory chemokines such as CXCL1 (the rodent homologue of human IL-8) was reported in the CNS and in the

periphery in response to intermittent cold stress, and during the already mentioned immobilization stress [61]. Also, painful stress increased the immunoreactivity of CXCL1 in the posterior pituitary, in the external layers of the median eminence, and it induced its secretion into the blood circulation [62]. An enhanced level of CXCL1 after chronic intermittent cold stress was suggested to be an adaptive response in the brain which fulfils a protective role when confronted with cumulative damage due to repeated or prolonged stress exposure [61]. The stimulatory role of CXCL1 in the release of ACTH from cultured pituitary neurons, as described by Sawada et al. [49] prompts speculation, that the proinflammatory chemokines may participate in the glucocorticoid receptor-mediated negative feedback.

Clear evidence for the role of CXC chemokines in the regulation of the stress response is now provided by the results of our experiments with CXCR inhibitors. We found that in the NPO of animals with blocked CXCR1-2 or CXCR4 receptors, the stress-induced *crh* upregulation was absent. These data suggest that CXC chemokines activate the stress axis

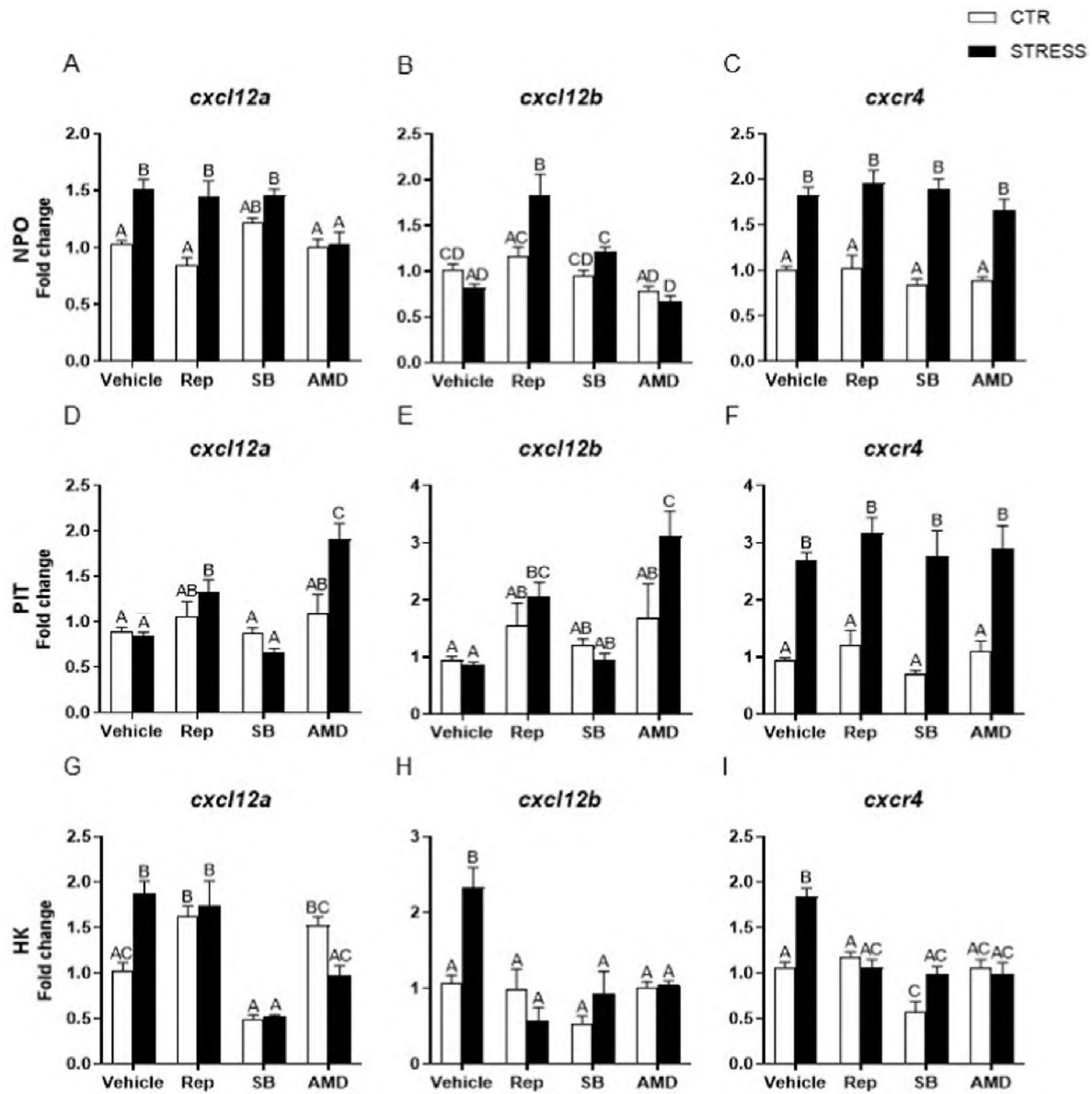


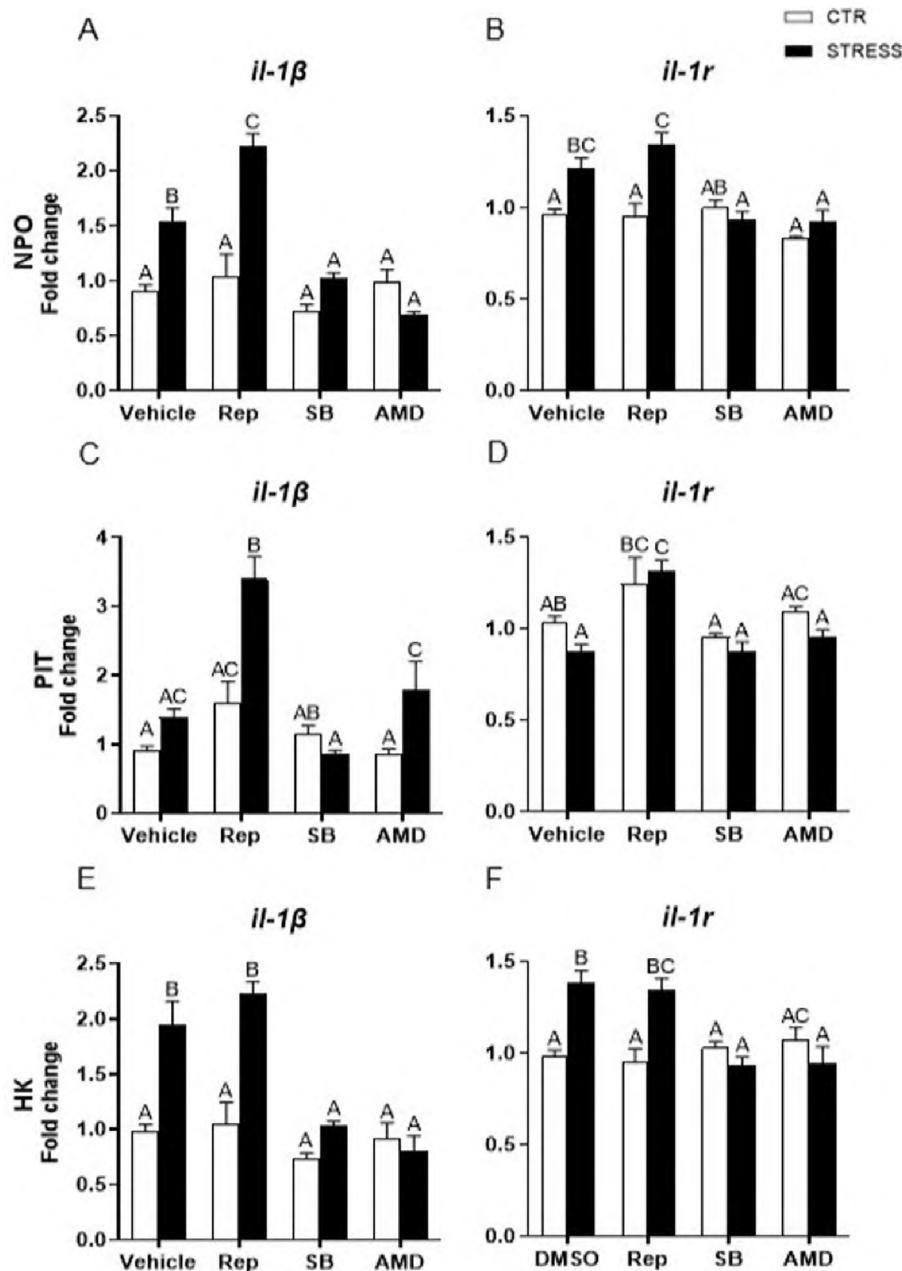
Fig. 6. Changes in expression of genes encoding CXCL12 chemokines and their receptor CXCR4 in the stress HPI axis organs: nucleus preopticus (NPO, from the hypothalamus), pituitary gland (PIT) and head kidney (HK) of common carp. 1 h before stress (11 h of restraint) fish were pretreated with reparixin (Rep, 30 mg/kg b.w., i.p.), SB225002 (SB, 2 mg/kg b.w., i.p.), AMD3100 (AMD, 1 mg/kg b.w., i.p.) or vehicle. Fish were sampled at 11 h of stress (black bars). Inhibitor- or vehicle-treated but unstressed control fish (white bars) were sampled 12 h post injection. Gene expression was measured by RT-qPCR and presented as an x-fold change compared to control fish (vehicle-injected and unstressed: CTR) and normalized to the housekeeping gene 40S ribosomal protein s11 mRNA levels. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) (n = 6–8). Different letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups (p  $\leq$  0.05).

via stimulation of the production of hypothalamic CRH. Similar results were found earlier in mammals for IL-1 $\beta$  which stimulated CRH synthesis via the IL-1RI expressed in the paraventricular nucleus of the hypothalamus [63]. Moreover, in mammals, also other cytokines regulate the activity of the neuroendocrine system and particularly the stress response. For example, the peripheral administration of IL-1, IL-6, and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), through the stimulation of hypothalamic secretion of CRH, raises the plasma concentrations of ACTH and glucocorticoids [64–67]. Moreover, both IL-1 and IL-2 stimulated ACTH release from the pituitary gland [68,69].

Also in fish, Metz and co-workers [29] found that during a 24 h restraint stress, *il-1 $\beta$*  and *il-1r1* expression was upregulated in the stress axis organs of common carp. A similar phenomenon was observed in our present experiments, where 11 h of exposure to stress upregulated the *il-1 $\beta$*  and *il-1r1* expression in the NPO and HK. Interestingly this

phenomenon was not observed in fish with blocked CXCR2 or CXCR4, which suggests that, upon stress, CXCL8 and CXCL12 may regulate the expression of genes encoding IL-1 $\beta$  and its receptor. In addition to the stress-induced CXCR-dependent change in *crh* expression in the NPO, we also observed several changes in the head kidney. Blocking of CXCR4 counteracted the stress-induced increase of *mc2r* expression. We also obtained a similar effect for *gr1* expression in fish treated with a CXCR2 or CXCR4 inhibitor. Most probably, such changes were caused by negative feedback regulating HPI activity.

Based on changes in cortisol levels observed in fish with blocked chemokine receptors, we hypothesized that chemokines may also be directly involved in the regulation of steroidogenesis in the kidney. We found that blocking of CXCR4 prevents the stress-induced upregulation of the expression of genes encoding STAR and CYP11b. These data suggest that CXCL12s via CXCR4 are involved in the stimulation of



**Fig. 7.** Changes in expression of genes encoding IL-1 $\beta$  and its receptor IL-1R1 in the stress axis organs: nucleus preopticus (NPO, from the hypothalamus), pituitary gland (PIT) and the head kidney (HK) of common carp. 1 h before stress (11 h of restraint) fish were pretreated with reparixin (Rep, 30 mg/kg b.w., i.p.), SB225002 (SB, 2 mg/kg b.w., i.p.), AMD3100 (AMD, 1 mg/kg b.w., i.p.) or vehicle. Fish were sampled at 11 h of stress (black bars). Inhibitor- or vehicle-treated but unstressed control fish (white bars) were sampled 12 h post injection. Gene expression was measured by RT-qPCR and presented as an x-fold change compared to control fish (vehicle-injected and unstressed: CTR) and normalized to the housekeeping gene 40S ribosomal protein s11 mRNA levels. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) (n = 6–8). Different letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups (p  $\leq$  0.05).

steroidogenesis in the head kidney. After inhibition of CXCRs, a very interesting effect was found on the expression of genes that encode for the enzymes involved in cortisol conversion. In stressed animals, CXCR2 inhibition upregulated gene expression of 11 $\beta$ -HSD2, involved in the conversion of cortisol into its inactive form, cortisone. Inhibition of CXCR4 upregulated expression of the gene encoding 11 $\beta$ -HSD3, most probably responsible for the conversion of inactive cortisone into active cortisol. Upregulation of the 11 $\beta$ -HSD2 explains the decrease of the serum cortisol level in fish that were treated with CXCR2. This is the first evidence of a link between 11 $\beta$ -HSD activation and CXCR2 or CXCR4 inhibition and to our knowledge, the first proof of CXCL12/CXCR4 and CXCL8/CXCR2 involvement in the regulation of cortisol conversion. To date, it was established that cytokines within the HPA axis, are capable of direct and/or indirect modulation of the production and secretion of cortisol and ACTH and that adrenal steroidogenesis is affected by cytokines produced locally in adrenal tissue [70].

In conclusion, we demonstrated that in fish, CXC chemokines and

their receptors can be essential regulators of the stress response at multiple levels within the HPI axis, with particularly pronounced effects on steroidogenesis and cortisol conversion in the head kidney.

#### Funding

This work was supported by the Polish National Science Center (grant no. 2019/33/B/NZ6/00402).

#### CRediT authorship contribution statement

**Katarzyna Klak:** Formal analysis, Writing – review & editing, All authors contributed to the article and approved the submitted version. **Magdalena Maciuszek:** Formal analysis, All authors contributed to the article and approved the submitted version. **Magdalena Marcinkowska:** Formal analysis, All authors contributed to the article and approved the submitted version. **B.M. Lidy Verburg-van Kemenade:** conceived

the study, Writing – review & editing, All authors contributed to the article and approved the submitted version. **Magdalena Chadzinska:** conceived the study, Funding acquisition, Writing – review & editing, All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.06.070>.

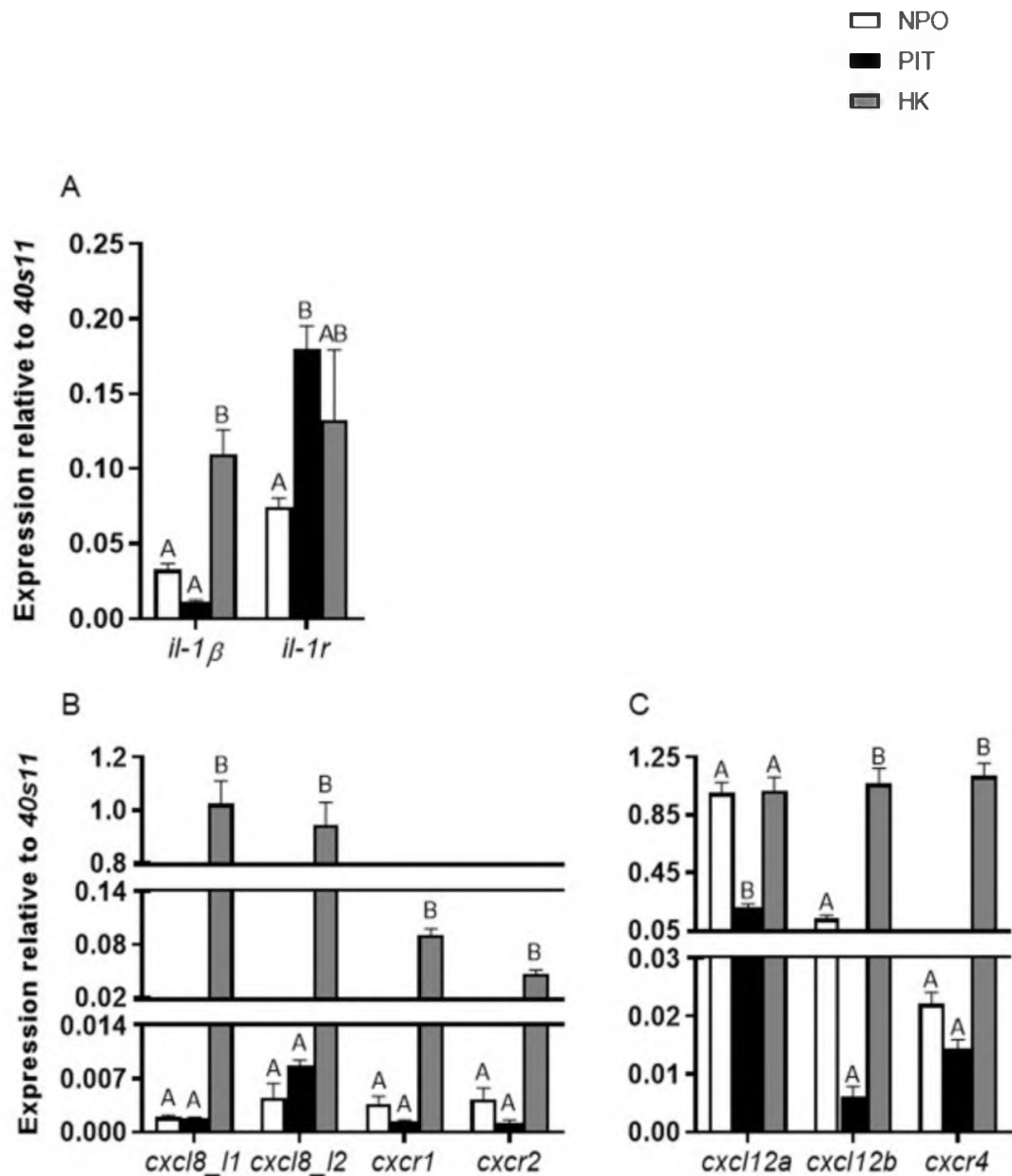
## References

- [1] B.M.L. Verburg-van Kemenade, N. Cohen, M. Chadzinska, Neuroendocrine-immune interaction: evolutionarily conserved mechanisms that maintain allostasis in an ever-changing environment, *Dev. Comp. Immunol.* 66 (2017) 2–23, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.05.015>.
- [2] S.E. Wendelaar Bonga, The stress response in fish, *Physiol. Rev.* 77 (1997) 591–625, <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>.
- [3] I.A. Bouyoucos, A.N. Schoen, R.C. Wahl, W.G. Anderson, Ancient fishes and the functional evolution of the corticosteroid stress response in vertebrates, *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 260 (2021), 111024, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111024>.
- [4] J.R. Metz, M. Huising, J. Meek, A.J. Taverne-Thiele, S.E. Wendelaar Bonga, G. Flik, Localization, expression and control of adrenocorticotropic hormone in the nucleus preopticus and pituitary gland of common carp (*Cyprinus carpio* L.), *J. Endocrinol.* 182 (2004) 23–31, <https://doi.org/10.1677/joe.0.1820023>.
- [5] G. Flik, P.H.M. Klaren, E.H. van den Burg, J.R. Metz, M.O. Huising, CRF and stress in fish, *Gen. Comp. Endocrinol.* 146 (2006) 36–44, <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.11.005>.
- [6] N.J. Westphal, A.F. Seasholtz, B.P. Crh, The regulation and function of a phylogenetically conserved binding protein, *Front. Biosci.* 11 (2006) 1878–1891, <https://doi.org/10.2741/1931>.
- [7] M.O. Huising, J.R. Metz, A.F. de Mazon, B.M.L. Verburg-van Kemenade, G. Flik, Regulation of the stress response in early vertebrates, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1040 (2005) 345–347, <https://doi.org/10.1196/annals.1327.057>.
- [8] T.P. Mommsen, M.M. Vijayan, T.W. Moon, Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation, *Rev. Fish Biol. Fish.* 9 (1999) 211–268, <https://doi.org/10.1023/A:1008924418720>.
- [9] B.A. Barton, Stress in Fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids, *Integr. Comp. Biol.* 42 (2002) 517–525, <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>.
- [10] J.C. Balasch, L. Tort, Netting the stress responses in fish, *Front. Endocrinol.* 10 (2019) 62, <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00062>.
- [11] M. Gorissen, G. Flik, The endocrinology of the stress response in fish: an adaptation – physiological view, *Fish Physiol.* 35 (2016) 75–111, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00003-5>.
- [12] E. Faught, N. Aluru, M.M. Vijayan, The molecular stress response, in: B.C. Schreck, L. Tort, A.P. Farrell, C.J. Brauner (Eds.), *Fish Physiology*, Elsevier Inc., Amsterdam, 2016, pp. 113–166, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00004-7>.
- [13] S.L. Alderman, A. McGuire, N.J. Bernier, M.M. Vijayan, Central and peripheral glucocorticoid receptors are involved in the plasma cortisol response to an acute stressor in rainbow trout, *Gen. Comp. Endocrinol.* 176 (2012) 79–85, <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.12.031>.
- [14] I. Bacila, V.T. Cunliffe, N.P. Krone, Interrenal development and function in zebrafish, *Mol. Cell. Endocrinol.* 535 (2021), 111372, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111372>, 2021.
- [15] J. Tokarz, G. Möller, M. Hrabě de Angelis, J. Adamski, Steroids in teleost fishes: A functional point of view, *Steroids* 103, 123–144, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.06.011>.
- [16] A.H. Payne, D.B. Hales, Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones, *Endocr. Rev.* 25 (2004) 947–970, <https://doi.org/10.1210/er.2003-0030>.
- [17] K. Chapman, M. Holmes, J. Seckl, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action, *Physiol. Rev.* 93 (2013) 1139–1206, <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2012>.
- [18] M.E. Baker, Evolutionary analysis of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-type 1, -type 2, -type 3 and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-type 2 in fish, *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 574 (2004) 167–170, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.023>.
- [19] M. Shimon-Hophy, R.R. Avtalion, Influence of chronic stress on the mechanism of the cytotoxic system in common carp (*Cyprinus carpio*), *Immunology* 164 (2021) 211–222, <https://doi.org/10.1111/imm.13345>.
- [20] B.M.L. Verburg-van Kemenade, E.H. Stolte, J.R. Metz, M. Chadzinska, Neuroendocrine-immune interactions in teleost fish, in: N.J. Bernier, G. Van Der Kraak, A.P. Farrell, C.J. Brauner (Eds.), *Fish Physiology*, Elsevier Inc., Amsterdam, 2009, pp. 313–364, [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(09\)28007-1](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(09)28007-1).
- [21] D. Alsop, M. Vijayan, The zebrafish stress axis: molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event, *Gen. Comp. Endocrinol.* 161 (2009) 62–66, <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.09.011>.
- [22] C. Rivers, A. Levy, J. Hancock, S. Lightman, M. Norman, Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (1999) 4283–4286, <https://doi.org/10.1210/jcem.84.11.6235>.
- [23] E.H. Stolte, B.M.L. Verburg-van Kemenade, H.F.J. Savelkoul, G. Flik, Evolution of glucocorticoid receptors with different glucocorticoid sensitivity, *J. Endocrinol.* 190 (2006) 17–28, <https://doi.org/10.1677/joe.1.06703>.
- [24] E.H. Stolte, A.F. de Mazon, K.M. Leon-Koosterziel, M. Jesiak, N.R. Bury, A. Sturm, H.F.J. Savelkoul, B.M.L. Verburg-van Kemenade, G. Flik, Corticosteroid receptors involved in stress regulation in common carp, *Cyprinus carpio*, *J. Endocrinol.* 198 (2008) 403–417, <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0100>.
- [25] E.C. Urbinati, F.S. Zanuzzo, J.D. Biller, Stress and immune system in fish, in: B. Baldisserotto, E.C. Urbinati, J.E.P. Cyrino (Eds.), *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*, Elsevier Inc., Amsterdam, 2020, pp. 93–114, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815872-2.00005-1>.
- [26] E.H. Stolte, S.B. Nabuurs, N.R. Bury, A. Sturm, G. Flik, H.F.J. Savelkoul, B.M.L. Verburg-van Kemenade, Stress and innate immunity in carp: corticosteroid receptors and pro-inflammatory cytokines, *Mol. Immunol.* 46 (2008) 70–79, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.07.022>.
- [27] R.M. Sapolsky, Glucocorticoids, the evolution of the stress response, and the primate predicament, *Neurobiol. Stress.* 14 (2021), 100320, <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100320>.
- [28] B. Taborsky, S. English, T.W. Fawcett, B. Kuijper, O. Leimar, J.M. McNamara, S. Ruuskanen, C. Sandi, Towards an evolutionary theory of stress responses, *Trends Ecol. Evol.* 36 (2021) 39–48, <https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.09.003>.
- [29] J.R. Metz, M.O. Huising, K. Leon, B.M.L. Verburg-van Kemenade, G. Flik, Central and peripheral interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 receptor 1 expression and their role in the acute stress response of common carp, *Cyprinus carpio* L., *J. Endocrinol.* 191 (2006) 25–35, <https://doi.org/10.1677/joe.1.06640>.
- [30] E. Kondera, Haematopoiesis and haematopoietic organs in fish, *Sci. Ann. Polish Soc. Anim. Prod.* 15 (2019) 9–16.
- [31] K. Laing, Chemokines, *Dev. Comparative Immun.* 28 (2004) 443–460, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.09.006>.
- [32] W. Rostène, A. Guyon, L. Kular, D. Godefroy, F. Barbieri, A. Bajetto, G. Banisadr, C. Callewaere, G. Conductier, C. Rovère, S. Melik-Parsadaniantz, T. Florio, Chemokines and chemokine receptors: new actors in neuroendocrine regulations, *Front. Neuroendocrinol.* 32 (2011) 10–24, <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.07.001>.
- [33] H. Nomiya, K. Hieshima, N. Osada, Y. Kato-Unoki, K. Otsuka-Ono, S. Takegawa, T. Izawa, A. Yoshizawa, Y. Kikuchi, S. Tanase, R. Miura, J. Kusuda, M. Nakao, O. Yoshie, Extensive expansion and diversification of the chemokine gene family in zebrafish: identification of a novel chemokine subfamily CX, *BMC Genom.* 9 (2008) 222, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-222>.
- [34] O. Palevitch, E. Abraham, N. Borodovsky, G. Levkowitz, Y. Zohar, Y. Gothilf, Cxcl12a-Cxcr4b signaling is important for proper development of the forebrain GnRH system in zebrafish, *Gen. Comp. Endocrinol.* 165 (2010) 262–268, <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.07.001>.
- [35] B.M.L. Verburg-van Kemenade, L.M. van der Aa, M. Chadzinska, Neuroendocrine-immune interaction: regulation of inflammation via G-protein coupled receptors, *Gen. Comp. Endocrinol.* 188 (2013) 94–101, <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.11.010>.
- [36] M. Chadzinska, L. Golbach, L. Pijanowski, M. Scheer, B.M.L. Verburg-van Kemenade, Characterization and expression analysis of an interferon- $\gamma$  2 induced chemokine receptor CXCR3 in common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Dev. Comp. Immunol.* 47 (2014) 68–76, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.07.008>.
- [37] L.M. van der Aa, M. Chadzinska, E. Tijhaar, P. Boudinot, B.M.L. Verburg-van Kemenade, CXCL8 chemokines in teleost fish: two lineages with distinct expression profiles during early phases of inflammation, *PLoS One* 5 (2010), e12384, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012384>.
- [38] L.M. van der Aa, M. Chadzinska, L.A. Golbach, C.M.S. Ribeiro, B.M.L. Verburg-van Kemenade, Pro-inflammatory functions of carp CXCL8-like and CXCL8 chemokines, *Dev. Comp. Immunol.* 36 (2012) 741–750, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.11.011>.
- [39] L.M. van der Aa, M. Chadzinska, W. Derks, M. Scheer, J.-P. Levrault, P. Boudinot, B.M. Lidv Verburg-van Kemenade, Diversification of IFN $\gamma$ -inducible CXCL8 chemokines in cyprinid fish, *Dev. Comp. Immunol.* 38 (2012) 243–253, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.05.005>.
- [40] L. Pijanowski, B.M.L. Verburg-van Kemenade, M. Chadzinska, A role for CXC chemokines and their receptors in stress axis regulation of common carp, *Gen. Comp. Endocrinol.* 280 (2019) 194–199, <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.05.004>.
- [41] M. Huising, C. van Schooten, A. Taverne-Thiele, T. Hermsen, B.M.L. Verburg-van Kemenade, G. Flik, Structural characterisation of a cyprinid (*Cyprinus carpio* L.) CRH, CRH-BP and CRH-RL, and the role of these proteins in the acute stress response, *J. Mol. Endocrinol.* 32 (2004) 627–648, <https://doi.org/10.1677/jme.0.0320627>.
- [42] L. Pijanowski, B.M.L. Verburg-van Kemenade, I. Imazarov, M. Chadzinska, Stress-induced adaptation of neutrophilic granulocyte activity in K and R3 carp lines, *Fish Shellfish Immunol.* 47 (2015) 886–892, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.10.030>.
- [43] H.M. Isles, K.D. Herman, A.L. Robertson, C.A. Loynes, L.R. Prince, P.M. Elks, S. A. Renshaw, The CXCL12/CXCR4 signaling Axis retains neutrophils at inflammatory sites in zebrafish, *Front. Immunol.* 10 (2019), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01784>, 1784.
- [44] S. Xu, F. Xie, L. Tian, S.H.C. Manno, F.A.M. Manno, S.H. Cheng, Prolonged neutrophil retention in the wound impairs zebrafish heart regeneration after cryoinjury, *Fish Shellfish Immunol.* 94 (2019) 447–454, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.030>.

- [45] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) e45, <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- [46] G. Banisadr, P. Fontanges, F. Haour, P. Kitabgi, W. Rostène, S. Mèlik Parsadaniantz, Neuroanatomical distribution of CXCR4 in adult rat brain and its localization in cholinergic and dopaminergic neurons, *Eur. J. Neurosci.* 16 (2002) 1661–1671, <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02237.x>.
- [47] G. Banisadr, D. Skrzydelski, P. Kitabgi, W. Rostène, S.M. Parsadaniantz, Highly regionalized distribution of stromal cell-derived factor-1/CXCL12 in adult rat brain: constitutive expression in cholinergic, dopaminergic and vasopressinergic neurons, *Eur. J. Neurosci.* 18 (2003) 1593–1606, <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02893.x>.
- [48] J. Licinio, M.-L. Wong, P.W. Gold, Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 mRNA is localized in rat hypothalamus and hippocampus, *Neuroreport* 3 (1992) 753–756, <https://doi.org/10.1097/00001756-199209000-00008>.
- [49] T. Sawada, K. Koike, Y. Kanda, Y. Sakamoto, A. Nohara, M. Ohmichi, K. Hirota, A. Miyake, Vitro effects of CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, on hormone secretion by rat anterior pituitary cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202 (1994) 155–160, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1906>.
- [50] Y. Sakamoto, K. Koike, H. Kiyama, K. Konishi, K. Watanabe, S. Tsurufuji, R. J. Bicknell, K. Hirota, A. Miyake, A stress-sensitive chemokineric neuronal pathway in the hypothalamo-pituitary system, *Neuroscience* 75 (1996) 133–142, [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00252.7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00252.7).
- [51] O. Bonavita, V. Mollica Poeta, M. Massara, A. Mantovani, R. Bonecchi, Regulation of hematopoiesis by the chemokine system, *Cytokine* 109 (2018) 76–80, <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2018.01.021>.
- [52] R.C. Furze, S.M. Rankin, Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow, *Immunology* 125 (2008) 281–288, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02950.x>.
- [53] K.B. Walters, J.M. Green, J.C. Surfus, S.K. Yoo, A. Huttenlocher, Live imaging of neutrophil motility in a zebrafish model of WHIM syndrome, *Blood* 116 (2010) 2803–2811, <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-03-276972>.
- [54] A. Capucetti, F. Albano, R. Bonecchi, Multiple roles for chemokines in neutrophil biology, *Front. Immunol.* 11 (2020) 1259, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01259>.
- [55] M.O. Huising, E. Stolte, G. Flik, H.F.J. Savelkoul, B.M.L. Verburg-van Kemenade, CXC chemokines and leukocyte chemotaxis in common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Dev. Comp. Immunol.* 27 (2003) 875–888, [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(03\)00082-X](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(03)00082-X).
- [56] F.A. Weyts, G. Flik, B.M. Verburg-van Kemenade, Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes, *Dev. Comp. Immunol.* 22 (1998) 563–572, [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(98\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(98)00027-5).
- [57] J.P.J. Saeij, L.B.M. Verburg-van Kemenade, W.B. van Muiswinkel, G.F. Wiegertjes, Daily handling stress reduces resistance of carp to *Trypanoplasma borreli*: in vitro modulatory effects of cortisol on leukocyte function and apoptosis, *Dev. Comp. Immunol.* 27 (2003) 233–245, [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00093-9](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00093-9).
- [58] E.H. Stolte, M. Chadzinska, D. Przybylska, G. Flik, H.F.J. Savelkoul, B.M. L. Verburg-van Kemenade, The immune response differentially regulates Hsp70 and glucocorticoid receptor expression in vitro and in vivo in common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Fish Shellfish Immunol.* 27 (2009) 9–16, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.11.003>.
- [59] M. Maciuszek M, L. Rydz L, I. Switakowska, B.M.L. Verburg-van Kemenade, M. Chadzinska M, Effects of stress and cortisol on the polarization of carp macrophages, *Fish Shellfish Immunol.* 94 (2019) 27–37, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.064>.
- [60] J. Ślusarczyk, E. Trojan, K. Głombik, B. Budziszewska, M. Kubera, W. Lasoń, K. Popiołek-Barczyk, J. Mika, K. Wędzony, A. Basta-Kaim, Prenatal stress is a vulnerability factor for altered morphology and biological activity of microglia cells, *Front. Cell. Neurosci.* 9 (2015) 82, <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2015.00082>.
- [61] M. Girotti, J.J. Donegan, D.A. Morilak, Chronic intermittent cold stress sensitizes neuro-immune reactivity in the rat brain, *Psychoneuroendocrinology* 36 (2011) 1164–1174, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.02.008>.
- [62] K. Matsumoto, K. Koike, A. Miyake, K. Watanabe, K. Konishi, H. Kiyama, Noxious stimulation enhances release of cytokine-induced neutrophil chemoattractant from hypothalamic neurosecretory cells, *Neurosci. Res.* 27 (1997) 181–184, [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(96\)01144-3](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(96)01144-3).
- [63] K. Yabuuchi, M. Minami, S. Katsumata, M. Satoh, Localization of type I interleukin-1 receptor mRNA in the rat brain, *Mol. Brain Res.* 27 (1994) 27–36, [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(94\)90180-5](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(94)90180-5).
- [64] B.M.R.N.J. Woloski, E.M. Smith, W.J. Meyer, G.M. Fuller, J.E. Blalock, Corticotropin-releasing activity of monokines, *Science* 230 (1985) 1035–1037, <https://doi.org/10.1126/science.2997929>.
- [65] F. Berkenbosch, J. van Oers, A. del Rey, F. Tilders, H. Besedovsky, Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1, *Science* 238 (1987) 524–526, <https://doi.org/10.1126/science.2443979>.
- [66] R. Sapolsky, C. Rivier, G. Yamamoto, P. Plotsky, W. Vale, Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor, *Science* 238 (1987) 522–524, <https://doi.org/10.1126/science.2821621>.
- [67] Y. Naitoh, J. Fukata, T. Tominaga, Y. Nakai, S. Tamai, K. Mori, H. Imura, Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotropic hormone in conscious, freely-moving rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155 (1988) 1459–1463, [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)81305-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)81305-6).
- [68] L.C. Payne, D.A. Weigent, J.E. Blalock, Induction of pituitary sensitivity to interleukin-1: a new function for corticotropin-releasing hormone, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198 (1994) 480–484, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1070>.
- [69] S. Karanth, S.M. McCann, Anterior pituitary hormone control by interleukin 2, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 88 (1991) 2961–2965, <https://doi.org/10.1073/PNAS.88.7.2961>.
- [70] A.V. Turnbull, C.L. Rivier, Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action, *Physiol. Rev.* 79 (1999) 1–71, <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.1999.79.1.1>.

Table S1.

<b>Gene</b>	<b>Sense (5'-3')</b>	<b>Antisense (5'-3')</b>	<b>μM</b>	<b>Acc. No.</b>
<i>40s11</i>	CCGTGGGTGACATCGTTACA	TCAGGACATTGAACCTCACTGTCT	1	AB012087
<i>pomc</i>	TTGGCTCTGGCTGTTCTGTGT	TCATCTGTCAGATCAGACCTGCATA	2,5	Y14618.1
<i>crh</i>	CATCCGGCTCGGTAACAGAA	CCAACAGACGCTGCGTTAACT	1	AJ576243
<i>crh-bp</i>	ACAATGATCTCAAGCGGTCCAT	CCACCCAGAAGCTCGACAAA	1	AJ490881
<i>crhr</i>	CCCTGCTGATCGCCTTCAT	GCAGGATAAATGCTGTAATCAGGT	1	AJ576244
<i>gr1</i>	GACTTACCTGACTCCCTATCTGAC	GCTTCCACCATCTGCTGC	1	AJ879149
<i>gr2</i>	GGAGAACAACGGTGGGACTAAAT	GGCTGGTCCCGATTAGGAA	1	AM183668
<i>mr</i>	TTCCCTGCAGAACTCAAAGGA	ACGGACGGTGACAGAAACG	2	AJ783704
<i>mc2r</i>	AGCATATTCCACGCGCTAGG	ACTGTAGCGGCCTCGAAGAA	2	AJ605725.1
<i>star</i>	GTGGAACCCCAATGTCAAAC	ACAGGTGGGTCCATTCTCAG	1	FJ490418
<i>cyp11b1</i>	CCCTGGAAAGGTCAGTGTGT	GGTGGGGTTTGGAGATAAGG	2	XM_019123804.1
<i>11β-hsd3</i>	GCACTCAATGGTTTCTTTGGA	GCTCCAGCTTCGATAATGTG	2	XM_019107831
<i>11β-hsd2</i>	TACGCAAAAAACAGCCAATGA	GTAGTATCGCACCTGGGGTTG	2	XM_019069125
<i>cxcl8 11 (PIT/NPO)</i>	TCACTTCACTGGTGTGCTC	GGAATTGCTGGCTCTGAATG	1	AB470924.1
<i>cxcl8 11 (HK)</i>	CTGGGATTCCTGACCATTGGT	GTTGGCTCTCTGTTTCAATGCA	1	AJ421443
<i>il-1b</i>	AAGGAGGCCAGTGGCTCTGT	CCTGAAGAAGAGGAGGCTGTCA	1	KC008576.1
<i>il-1r1</i>	ACGCCACCAAGAGCCTTTTA	GCAGCCCATATTTGGTCAGA	1	AJ843873.2
<i>cxcl8 12</i>	TCACTTCACTGGTGTGCTC	GGAATTGCTGGCTCTGAATG	1	AB470924
<i>cxcb1</i>	GGGCAGGTGTTTTTGTGTTGA	AAGAGCGACTTGCGGGTATG	1	AB08298
<i>cxcb2</i>	AGGCAGGTGCTTCTGTGCTGACA	TTCATGCATTTCCGCTCTGCGCT	1	JN104598
<i>cxcl12a</i>	CACCGTACAGATATGTACCATATAGTC	GGTGGTCTTTTGCAGAGTCATTT	1	AJ627274
<i>cxcl12b</i>	GAGGAGGACCACCATGCATCT	TTGTGCAAGCAGTCCAGAAGA	1	AJ536027.3
<i>cxcr1</i>	GCAAATTGGTTAGCCTGGTGA	AGGCGACTCCACTGCACAA	1	AB010468
<i>cxcr2</i>	TATGTGCAAACTGATTTCAAGGCTTAC	GCACACACTATACCAACCAGATGG	1	AB010713
<i>cxcr4</i>	CGGTGCTGCGTTCATCTATT	TTCTTTTGGAAAGCCCATCAC	1	AB012310.1



**Figure S1.** Constitutive expression of the genes encoding for IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ R, CXC chemokines and their receptors in the stress axis organs: nucleus preopticus (NPO, from the hypothalamus), pituitary gland (PIT) and the head kidney (HK) of common carp. Gene expression was measured by RT-qPCR and presented relative to the housekeeping gene 40S ribosomal protein s11 mRNA levels. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) (n = 6–8). Asterisks indicate statistically significant differences between organs (\*p  $\leq$  0.05, \*\* p  $\leq$  0.01, \*\*\* p  $\leq$  0.001).

2. **Klak K., Maciuszek M., Pijanowski L., Marcinkowska M., Homa J., Verburg-van Kemenade B. M. L., Rakus K., Chadzinska M. Evolutionarily conserved mechanisms regulating stress-induced neutrophil redistribution in fish. *Frontiers in Immunology*. 2024, 15:1330995.**

U wszystkich kręgowców ostry stres powoduje szybką mobilizację granulocytów do krwi. W celu weryfikacji mechanizmów regulujących tę reakcję zbadano jak zablokowanie receptorów glikokortykoidowych (Gr), mineralokortykoidowych (Mr), receptora hormonu adrenokortykotropowego (Mc2r), receptorów beta-adrenergicznych ( $\beta$ -Adr) oraz receptorów chemokinowych Cxcr4, Cxcr1 i Cxcr2, wpływa na redystrybucję neutrofilii z nerki głowowej do krwi oraz ekspresję genów zaangażowanych w retencję tych komórek w nerce głowowej (*cxcl12*, *cxcr4*) i ich redystrybucję do krwi (*cxcl8*, *cxcr1/2*, *gcsfr*, *mmp9*).

Karpie potraktowano antagonistami receptorów: (i) Gr (RU-486), (ii) Gr i Mr (RU-486 i spironolakton), (iii) Mc2r (GPS1573), (iv)  $\beta$ 1-Adr (atenolol), lub (v)  $\beta$ 2-Adr (ICI-118,551). Ponadto, aby zweryfikować udział receptorów CXC w wywołanej stresem redystrybucji neutrofilii zastosowano selektywne inhibitory receptorów chemokinowych: reparyksynę (inhibitor Cxcr1 i 2), SB225002 (inhibitor Cxcr2) oraz AMD3100 (inhibitor Cxcr4). Po podaniu inhibitorów/antagonistów karpie poddano 11-godzinnemu stresowi unieruchomienia.

Wykazano, że u karpia stres unieruchomienia wywołuje, zależną od czasu trwania stresu, neutrofilie a zjawisko to wiąże się ze spadkiem liczby neutrofilii w nerce głowowej, czemu towarzyszy podwyższony poziom kortyzolu i glukozy w surowicy. Ponadto zaobserwowano, że zarówno w nerce głowowej jak i w leukocytach krwi obwodowej, stres zwiększa ekspresję genów kodujących chemokiny CXC i ich receptory (*cxcl12*, *cxcl8*, *cxcr4*, *cxcr1*), a także *gcsfr* i *mmp9*. Wykazano również, że zablokowanie zarówno Gr, jak i Gr i Mr hamuje indukowaną stresem redystrybucję neutrofilii z nerki głowowej do krwi. Podobne zjawisko obserwowano także po zablokowaniu receptorów Cxcr.

Wyniki wskazują, że indukowana ostrym przedłużonym stresem redystrybucja neutrofilii z nerki głowowej do krążenia jest zależna od interakcji kortyzolu z receptorami Gr/Mr, oraz że chemokiny z rodziny CXC i ich receptory są zaangażowane w regulację tego procesu.



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Linlin Zhang,  
Chinese Academy of Sciences (CAS), China

REVIEWED BY  
Jason W. Holland,  
University of Aberdeen, United Kingdom  
Igo Guimaraes,  
Universidade Federal de Jataí, Brazil

\*CORRESPONDENCE  
Magdalena Chadzinska  
✉ magdalena.chadzinska@uj.edu.pl

RECEIVED 31 October 2023  
ACCEPTED 21 February 2024  
PUBLISHED 07 March 2024

CITATION  
Klak K, Maciuszek M, Pijanowski L,  
Marcinkowska M, Homa J,  
Verburg-van Kemenade BML, Rakus K and  
Chadzinska M (2024) Evolutionarily conserved  
mechanisms regulating stress-induced  
neutrophil redistribution in fish.  
*Front. Immunol.* 15:1330995.  
doi: 10.3389/fimmu.2024.1330995

COPYRIGHT  
© 2024 Klak, Maciuszek, Pijanowski,  
Marcinkowska, Homa, Verburg-van Kemenade,  
Rakus and Chadzinska. This is an open-access  
article distributed under the terms of the  
[Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).  
The use, distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s) are  
credited and that the original publication in  
this journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is permitted  
which does not comply with these terms.

# Evolutionarily conserved mechanisms regulating stress-induced neutrophil redistribution in fish

Katarzyna Klak<sup>1,2</sup>, Magdalena Maciuszek<sup>1</sup>, Lukasz Pijanowski<sup>1</sup>,  
Magdalena Marcinkowska<sup>1,2</sup>, Joanna Homa<sup>1</sup>,  
B. M. Lidya Verburg-van Kemenade<sup>3</sup>, Krzysztof Rakus<sup>1</sup>  
and Magdalena Chadzinska<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Evolutionary Immunology, Institute of Zoology and Biomedical Research, Faculty of Biology, Jagiellonian University, Krakow, Poland, <sup>2</sup>Doctoral School of Exact and Natural Sciences, Jagiellonian University, Krakow, Poland, <sup>3</sup>Cell Biology and Immunology Group, Department of Animal Sciences, Wageningen University, Wageningen, Netherlands

**Introduction:** Stress may pose a serious challenge to immune homeostasis. Stress however also may prepare the immune system for challenges such as wounding or infection, which are likely to happen during a fight or flight stress response.

**Methods:** In common carp (*Cyprinus carpio* L.) we studied the stress-induced redistribution of neutrophils into circulation, and the expression of genes encoding CXC chemokines known to be involved in the regulation of neutrophil retention (CXCL12) and redistribution (CXCL8), and their receptors (CXCR4 and CXCR1-2, respectively) in blood leukocytes and in the fish hematopoietic organ – the head kidney. The potential involvement of CXC receptors and stress hormone receptors in stress-induced neutrophil redistribution was determined by an *in vivo* study with selective CXCR inhibitors and antagonists of the receptors involved in stress regulation: glucocorticoid/mineralocorticoid receptors (GRs/MRs), adrenergic receptors (ADRs) and the melanocortin 2 receptor (MC2R).

**Results:** The stress-induced increase of blood neutrophils was accompanied by a neutrophil decrease in the hematopoietic organs. This increase was cortisol-induced and GR-dependent. Moreover, stress upregulated the expression of genes encoding CXCL12 and CXCL8 chemokines, their receptors, and the receptor for granulocytes colony-stimulation factor (GCSFR) and matrix metalloproteinase 9 (MMP9). Blocking of the CXCR4 and CXCR1 and 2 receptors with selective inhibitors inhibited the stress-induced neutrophil redistribution and affected the expression of genes encoding CXC chemokines and CXCRs as well as GCSFR and MMP9.

**Discussion:** Our data demonstrate that acute stress leads to the mobilization of the immune system, characterized by neutrophilia. CXC chemokines and CXC receptors are involved in this stress-induced redistribution of neutrophils from the hematopoietic tissue into the peripheral blood. This phenomenon is directly

regulated by interactions between cortisol and the GR/MR. Considering the pivotal importance of neutrophilic granulocytes in the first line of defense, this knowledge is important for aquaculture, but will also contribute to the mechanisms involved in the stress-induced perturbation in neutrophil redistribution as often observed in clinical practice.

#### KEYWORDS

stress, neutrophil redistribution, cortisol, CXC chemokines, CXC receptors, GCSFR, MMP9

## 1 Introduction

The mechanism of the stress response is evolutionarily well-conserved. In fish, stress activates the brain-sympathetic-chromaffin cell axis (the equivalent of the mammalian brain-sympathetic-adrenal medulla axis, SAM) and the brain-pituitary-interrenal cells of the head kidney axis (HPI, the equivalent of the mammalian hypothalamus-pituitary-adrenal axis, HPA) (1). The key mediators are adrenocorticotrophic hormone (ACTH), glucocorticoids (GC), and catecholamines. Upon binding of corticotropin-releasing hormone (CRH) to the pituitary gland CRH receptors, ACTH is released. ACTH binds to the melanocortin type 2 receptor (MC2R) in the head kidney to stimulate cortisol synthesis by the interrenal cells (2). While the significance of ACTH in the fish immune system has received little attention, it has been demonstrated in mammals that ACTH is one of the first hormones to bind to receptors on immune cells. It regulates the immune response and triggers an increase in the cytotoxicity of T-lymphocytes (3). Also, adrenaline regulates the immune response by delivering “danger” signals. Adrenaline is released after sympathetic innervation of the head kidney chromaffin cells has activated the SAM axis (4). The effect of adrenaline on immune cells is mainly mediated by  $\beta$ -adrenoreceptors ( $\beta$ -ADR) and is immune suppressive both *in vitro* and *in vivo* (5, 6).

Under natural conditions fish relatively often experience short periods of acute stress, leading to a temporary disturbance of homeostasis. These acute stress events may last for a few minutes to several hours. In contrast, under conditions of intensive aquaculture, disturbances last for many hours a day for weeks to several months and therefore are classified as chronic stress. The most common stress factors that fish experience in aquaculture are crowding, transport and transshipment, and procedures of grading or vaccination. Chronic stress causes loss of homeostasis, to which adaptation is not possible, or needs long time to adapt. In a situation of chronic stress, the response shifts from adaptive to maladaptive, eventually resulting in impaired reproduction, reduced growth, and decreased disease resistance due to immunosuppression (1, 7, 8).

In contrast to the well-known immunosuppressive and anti-inflammatory effects of glucocorticoids (e.g., 9), in all vertebrate groups, a stress-induced glucocorticoid elevation enhances the

release of neutrophils (PMNs, polymorphonuclear leukocytes) into circulation (e.g., 10–14). Moreover, cortisol treatment inhibits neutrophil apoptosis (e.g., 15). As neutrophils are important in the first line of the innate immune defense, a prolonged lifespan will maintain higher numbers in circulation to serve as an adaptive mechanism to fight the extra chance of injury or infection during stress.

In all vertebrates, neutrophil function is strictly dependent on their recruitment. In humans, neutrophils represent 50–70% of the total pool of peripheral blood leukocytes (PBL), whereas in mice they comprise only 10–25% of the PBLs (16). The percentage of PMNs in teleost fish greatly varies during periods of homeostasis: from 4% of circulating leukocytes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) (17), 5% in the goldfish (*Carassius auratus* L.) and cichlid (*Cichlasoma dimerus*) (18), up to about 15–20% in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (19), and even as much as 80% in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) (20).

Neutrophils are typically the frontline cells recruited to the focus of the infection or the damage site and they predominate in the rapid initial influx of leukocytes (21). At the inflammatory site, activated neutrophils become powerful killers acting via phagocytosis, degranulation, or formation of neutrophil extracellular traps (NETs) (e.g., 22). Moreover, neutrophils produce potent factors that are toxic for pathogens, like reactive oxygen species (ROS), enzymes e.g., lysozyme and antimicrobial peptides like bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), cathelicidins, and defensins (23). The balance between neutrophil production/release and their clearance safeguards homeostasis (24). In mammals, under normal conditions, continuous neutrophil production during granulopoiesis develops solely in the bone marrow (25). These self-renewing, slowly dividing progenitor cells, express chemokine receptors CXCR2 and CXCR4 and are kept in these niches by interacting with stromal cells like osteoblasts that express CXCL12 (also known as stromal cell-derived factor 1, SDF1). The process of granulopoiesis and neutrophil emigration from the hematopoietic tissues is controlled by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), that under both homeostatic and inflammatory conditions signals through the G-CSF receptor (G-CSFR) (26). During infection, the level of the G-CSF in the bone marrow increases, and activates the synthesis of proteases, including matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). Proteases break down the

adhesion molecules that connect hematopoietic stem cells (HSCs) to the stromal cell microenvironment. Moreover, G-CSF causes CXCL12 downregulation on bone marrow stromal cells. This action, along with the disruption of the CXCL12-CXCR4 interaction, results in neutrophil release (27). Live imaging in zebrafish (*Danio rerio*) confirmed that constitutive CXCL12-CXCR4 signaling impairs persistent, directed neutrophil motility, thereby retaining neutrophils in regions of high CXCL12 expression and inducing neutrophil aggregates. Depletion of CXCL12 with morpholino oligonucleotides restores neutrophil mobilization (28).

Neutrophils emerge in the bloodstream as terminally differentiated cells. Their chemotaxis to inflammatory areas is stimulated in response to pathogen- and host-derived chemotactic stimuli including CXC chemokines (29). Both in mammals and in fish, interaction of CXCL8 (also known as interleukin 8, IL-8) with CXCR1 and CXCR2, is critical for the recruitment of neutrophils to the site of inflammation. We and others confirmed that teleost CXCL8 chemokines exhibit a functional homology to mammalian CXCL8, and that all teleost fish possess at least one form of CXCL8 (CXCL8\_L1), while two distinct forms of this chemokine can be found in carp and zebrafish (CXCL8\_L1 and CXCL8\_L2) (30–32). In carp, recombinant CXCL8 molecules from both forms (CXCL8\_L1 and L2) induced chemotaxis of neutrophils (30). Moreover, recently we also revealed that in fish, CXC chemokines and their receptors are important regulators of the stress response at multiple levels of the stress axis, with particularly pronounced effects on steroidogenesis and cortisol conversion in the head kidney (33).

Mechanisms regulating stress-induced neutrophil redistribution are less understood. Teleost fish are an especially intriguing model for stress-immune interaction studies because their major hematopoietic organ, the head kidney, combines immune and endocrine functions (e.g., cortisol and catecholamine production), and thus these immune processes may be under direct, paracrine control. More than half of all extant vertebrate species belong to this group (35,000 species). Teleost fish are found in essentially every aquatic habitat and have been successful in adapting to different environments and we postulate that the ability to control and co-ordinate endocrine and immune responses during environmental challenges must have contributed to this success.

We now aimed to reveal evolutionarily conserved mechanisms involved in the regulation of neutrophil redistribution during stress in common carp. We studied the stress-induced redistribution of neutrophils from the head kidney, into the circulation and the gene expression of CXC chemokines (CXCL12 and CXCL8) and their receptors (CXCR4 and CXCR1-2). We also investigated the involvement of CXC receptors and GR/MR, ADR and MC2R, in stress-induced PMN redistribution by an *in vivo* study of the effects of selective inhibitors of CXCR1, 2 and 4 chemokine receptors and GR/MR, ADR and MC2R antagonists during stress in common carp.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Animals

Juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L. body weight (b.w.)) 70–120 g, 8–10 months; line R3xR8) were obtained from the

Institute of Ichthyobiology and Aquaculture, Polish Academy of Science, Golysz, Poland. Prior to the experiments, fish were adapted for 4 weeks at 21°C and 12L:12D light/dark cycle in recirculating tap water at the Institute of Zoology and Biomedical Research in Krakow, Poland. Fish were kept in tanks (volume 375 l, 45 fish/tank) and daily fed with pelleted dry commercial feed (Aller Master, Aller Aqua, Czarna Dabrowka, Poland) at a total ratio of 1% of their estimated b.w. and with the bloodworm (the midge larvae from a Chironomidae family). To avoid additional stress and/or differences in handling, all samplings were performed by the same person and at the same time of day.

In the blood serum of each animal the free cortisol levels were determined using a commercially available Neogen, Lexington Cortisol ELISA Kit (KY, USA) and levels of glucose were measured with an iXell<sup>®</sup> glucometer (Ganexo, Warsaw, Poland) as described previously by Klak et al. (33).

All animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the relevant national and local animal welfare bodies, and procedures were approved by the local ethical committee (2nd Local Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) in Krakow, Poland, license number 292/2017 and 246/2021).

### 2.2 Stress model

Restraint stress was given by netting the fish and suspending the nets with the fish in the water of separate tanks as described previously (14, 34). Fish were stressed for 2, 5, 11 (acute stress) and 24 hours (prolonged acute stress) and sampled at 11.00, 13.00, 20.00 and 9.00, respectively. Immediately after the stress, the fish were deeply anesthetized in 0.4 g/L tricaine methane sulfonate (TMS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) buffered with 0.8 g/L NaHCO<sub>3</sub> (POCH, Gliwice, Poland). The control group was sacrificed on the same experimental day at 9.00 a.m. We also verified if control/unstressed fish, sampled at different time points of the day (9.00, 11.00, 13.00 and 20.00), differ in the percentage of PMNs present in the head kidney and peripheral blood and found no statistically significant differences (Supplementary Figure 1). The fish were not fed during the stress procedure. The experiments were repeated twice independently with 4 fish per group for each time point.

### 2.3 Pretreatment with antagonists and inhibitors

The following antagonists/inhibitors were used: for the glucocorticoid receptors (GR): mifepristone (RU-486) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA, 2 mg/kg b.w.), for mineralocorticoid receptors (MR): spironolactone (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA, 2 mg/kg b.w.), a selective antagonist for  $\beta$ 1-ADR: atenolol (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA, 0.213 mg/kg b.w.), a  $\beta$ 2-ADR antagonist: ICI-118,551 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA, 0.25 mg/kg b.w.), the MC2R antagonist: GPS1573 (Cambridge Research Biochemicals, Billingham, UK, 1 mg/kg b.w.), the non-

competitive allosteric inhibitor of chemokine CXCR1 and CXCR2 receptors: reparixin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA, 30 mg/kg b.w.) and the nonpeptide CXCR2 receptor inhibitor: SB225002 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA, 2 mg/kg b.w.). They were resuspended in sterile dimethyl sulfoxide (DMSO, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). The CXCR4 inhibitor: AMD3100 (plerixafor) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA, 1 mg/kg b.w.) was resuspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS) (270 mOsm). For all antagonists/inhibitors, effectiveness was previously proven (35–40). Experimental fish were assigned randomly to the vehicle (DMSO/PBS, N = 8) and antagonist or inhibitor treatment groups (N = 8) as described previously (33). Prior to injection, all fish were individually weighed to adjust the dose of a particular drug. To minimize stress and pain, the weighing and the injection procedure was preceded by a short-term anesthesia with a buffered solution of tricaine methanesulfonate (TMS, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA, 0.2 g/L with the addition of 0.8 g/L NaHCO<sub>3</sub>, (POCH, Gliwice, Poland)). Antagonist/inhibitor or vehicle (DMSO/PBS) intraperitoneal (i.p.) injection was administered 1 h prior to the stress procedure, at 8 a.m. The final volume for i.p. injections was 100  $\mu$ L per individual fish. After injection, fish from each group were transferred into tanks. One hour post injection half of the fish from each group was kept undisturbed while half was stressed for 11 h as described above. Every experiment was performed independently 2 times per applied antagonist/inhibitor, each at the same time (8 a.m. injections, 9 a.m. confinement (11 h), 8 p.m. sampling) resulting in 16 control (DMSO/PBS, N = 8 or antagonist/inhibitor, N = 8 injected group) and 16 stressed individuals (DMSO/PBS, N = 8 or antagonist/inhibitor, N = 8 injected group).

## 2.4 Head kidney and peripheral blood leukocytes isolation

For PBLs isolation, blood was removed from the caudal vein into a syringe containing 2 mL of RPMI 1640 (Lonza, Basel, Switzerland), adjusted to carp osmolarity of 270 mOsm/kg with distilled water (cRPMI) containing 0.066 mg/mL of heparin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and centrifuged for 10 min at 800 rcf at 4°C to obtain the buffy coat. The buffy coat suspended in cRPMI (containing heparin 0.033 mg/mL) was layered on 3 mL Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and centrifuged at 2000 rcf for 25 min in 4°C without the brake. PBLs were collected, washed two times in cRPMI (10 min at 800 rcf, 4°C) and resuspended in 1 mL of cRPMI. 100  $\mu$ L of cell suspension was added to 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for subsequent cytometric analysis while the cell pellet was resuspended in 350  $\mu$ L RL buffer (EURx, Gdansk, Poland) with 1% (v/v) 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and kept at -80°C for further RNA analyses.

The head kidney is a paired organ. One part of the head kidney was excised and immersed in Fix RNA buffer (EURx, Gdańsk, Poland). All tissues were stored at 4°C until subsequent determination of gene expression. In turn, the second part of the head kidney was used to obtain a suspension of cells from this organ by passing the tissue through a 100  $\mu$ m nylon mesh with cRPMI and

washed once and resuspended in 1 mL of cRPMI. 100  $\mu$ L of cell suspension was added to 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for subsequent cytometric analysis.

PBLs and cells from HK were measured using a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter Inc.). The forward (FSC) and side light scatter (SSC) profiles were adjusted to ensure that all leukocyte populations were clearly displayed. The neutrophil population identified by its typical location was selected by gating (see Figure 1C). Counting was terminated when 30,000 leukocytes were counted. Data was analyzed in Microsoft Excel, the sum of P1-P3 gates was taken as 100% leukocytes.

## 2.5 Immunocytochemistry

Cytospins containing  $1 \times 10^6$  peripheral blood leukocytes from control and stressed fish after centrifugation on Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were prepared on glass slides by centrifugation (5 min, 447 x g, at RT; Hettich Universal Tuttlingen, Germany), and then fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and stored at -20°C. Staining was performed as previously described (41). After thawing, cytospin preparations were rehydrated, washed in 0.1 M PBS (pH 7.3), next incubated for 15 min with PBS containing 3% hydrogen peroxide to quench endogenous peroxidase activity, followed by blocking 2% carp inactive serum in a solution containing 1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in PBS at RT for 45 min. Cells were incubated overnight at 4 °C with the primary mouse antibodies TCL-BE8 (1:50) reacting with carp granulocytes (42, 43). For negative control, 1% BSA in PBS was added instead of primary antibodies. After overnight incubation, the slides were rinsed several times in PBS, and then secondary goat anti-mouse IgG antibodies (Bethyl Laboratories, Inc., 1:400) were added for 1 h at RT. Then cells were incubated for 1 h with an ExtrAvidin-peroxidase complex (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and visualized with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The preparations were analyzed under a light microscope (400 $\times$  magnification, Meiji Techno, USA). Pictures were taken with a Moticam10 10.0 MP camera (China). Images were prepared and analyzed in Gimp 2.10. The percentage of TCL-BE8 positive cells in PBLs, obtained from control fish and fish after 24 h of immobilization stress, was calculated. Up to 100 cells were counted on each slide (N = 4).

## 2.6 Gene expression studies

### 2.6.1 RNA isolation

RNA was isolated with GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx, Gdańsk, Poland) according to the manufacturer's protocols. Final elution was carried out in 30  $\mu$ L of nuclease-free water, to maximize the concentration of RNA. RNA quantification and purity were measured by spectrophotometry using a Spark<sup>®</sup> Multimode Microplate and NanoQuant Plate<sup>™</sup> Reader (Tecan, Grödig, Austria). RNA samples were stored at -80°C for further analysis.

## 2.6.2 cDNA synthesis

The cDNA synthesis reaction was performed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) following the manufacturer's protocol. A non-RT (-RT, non-reverse transcriptase) control was included. Samples were diluted 5x and stored at -20°C until further use.

## 2.6.3 Real-time quantitative PCR

All forward and reverse primer sequences and accession numbers are included in [Supplementary Table 1](#) (30, 33, 44–47). For RT-qPCR, 4 µL of 50 × diluted cDNA and forward and reverse primers (2 µL each) were added to 7 µL SYBR<sup>®</sup>Select Master Mix (Applied Biosystems, USA). RT-qPCR was initialized for 2 min at 50°C, followed by 2 min at 95°C, and 40 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C, it was performed in a Rotor-Gene Q, 5-Plex HRM (Qiagen, Hilden, Germany). A melting curve analyses were performed at the end of each run. The 40S ribosomal protein s11 (40s11) was used as reference gene. In NTC (non-template control) and -RT control samples, no amplification was observed.

Changes in gene expression upon treatment were determined as a ratio of target gene vs. reference gene (*40s11*) relative to the expression in control samples according to the following equation:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_t} \text{Target}^{(\text{control-sample})}}{(E_{\text{reference}})^{\Delta C_t} \text{Reference}^{(\text{control-sample})}}$$

Where E is amplification efficiency and Ct is the number of PCR cycles needed for the signal to exceed a predetermined threshold value (48).

## 2.7 Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad 9 Software (San Diego, CA, USA). Data were expressed as mean and standard error (SE). Significant differences in all results from experiments verifying stress-induced changes in redistribution of neutrophilic granulocytes as well as changes in the gene expression in control and stressed animals, at different time points, were determined using a one-way analysis of variance (ANOVA) and *post hoc* tests: Tukey's or Dunn (in case of kinetics of neutrophil redistribution upon stress). The differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

# 3 Results

## 3.1 Stress-induced redistribution of neutrophils

Acute restraint stress induced redistribution of neutrophils from the head kidney to the blood. At 2 and 5 h of stress, the percentage of blood neutrophils slightly and gradually increased, but was not significantly different from the percentages observed in unstressed fish. Starting from 11 h of stress, the percentage of neutrophils in PBLs was significantly higher than in control

unstressed animals. At 11 h and 24 h of stress, the percentage of neutrophils in PBLs was at a similar level ([Figures 1A, C](#)). At 11 h and 24 h of stress, the percentage of neutrophils in the head kidney was lower than in the control unstressed fish ([Figures 1B, C](#)). Immunocytochemical staining ([Figure 1D](#)) showed that 24 h of restraint stress increased the number of positive TCL-BE8 cells in PBLs (CTR:  $2.82 \pm 2.36$  vs. STRESS  $33.82 \pm 14.24$ ;  $p = 0.0286$ ).

Moreover, stress induced increase in the level of cortisol ([Figure 1E](#)) and glucose ([Figure 1F](#)) in serum.

Furthermore, to verify how fast fish will recover post 24 h restraint stress, an additional experiment was performed where upon stress, fish were released from the net for 6 and 12 h ([Supplementary Figure 2](#)). Already after 6 h of release, the percentage of PMNs in circulation returned to control level. This confirmed that 24 h restraint is a prolonged acute stress and fish are able to recover very fast.

## 3.2 Stress-induced changes in the expression of genes encoding CXC chemokines and receptors, GCSFR and MMP9

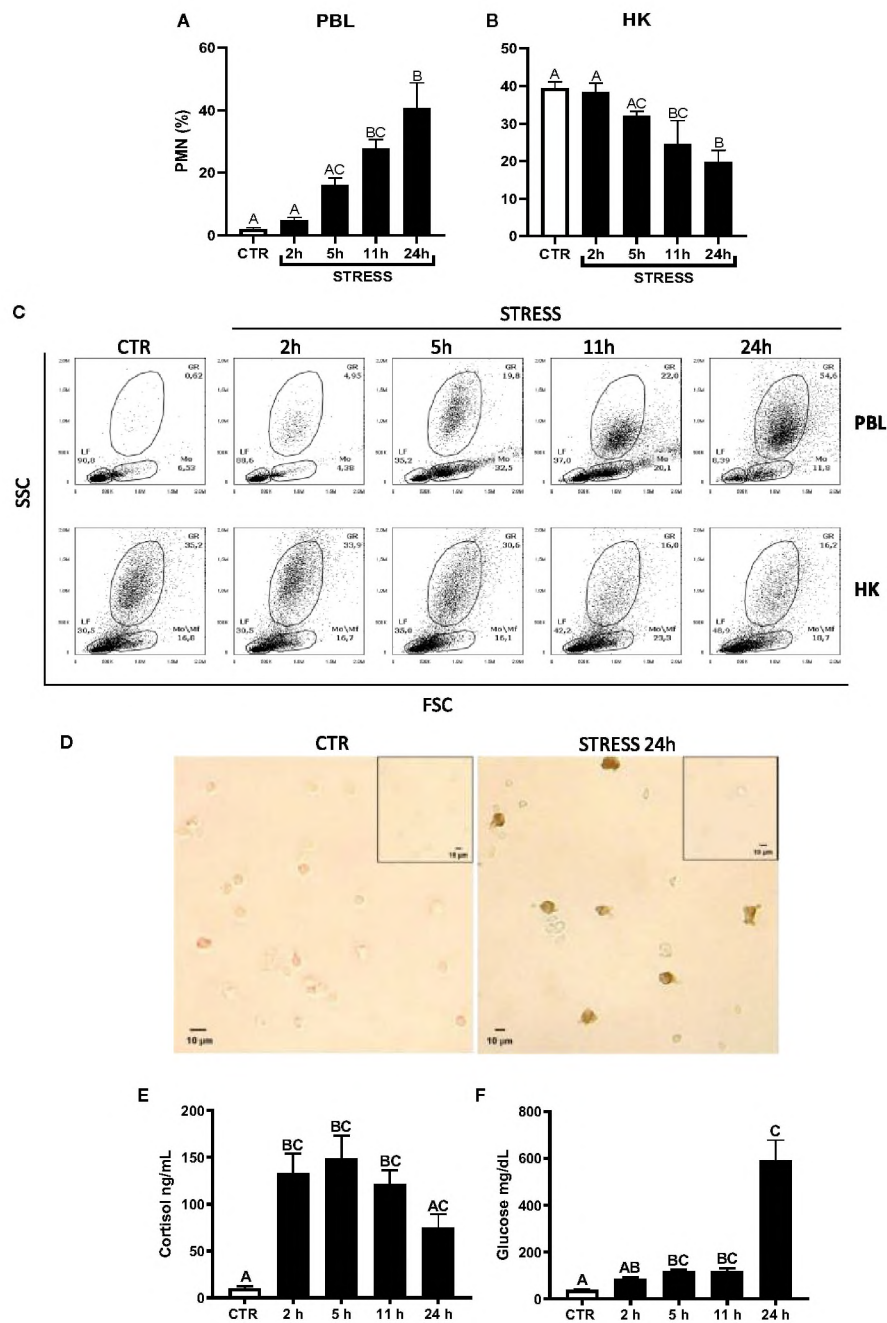
In PBLs, upregulation of the expression of *cxcl12a* ([Figure 2A](#)) and *cxcl12b* ([Figure 2B](#)) was observed at 11 h and 24 h of stress, respectively, as compared to unstressed animals. Moreover, in PBLs, restraint stress upregulated expression of *cxcl8\_11* (at 5, 11 and 24 h of stress) ([Figure 2C](#)) and *cxcl8\_12* (at 11 and 24 h of stress) ([Figure 2D](#)). Stress upregulated also the expression of *cxcr4* (at 2, 5 and 11 h) ([Figure 2I](#)) and *cxcr1* (at 5, 11 and 24 h) ([Figure 2J](#)). Furthermore, in PBLs, restraint stress upregulated the expression of *gcsfr* ([Figure 2O](#)) and *mmp9* ([Figure 2P](#)) at 5, 11 and 24 h. The highest expression of *gcsfr* was found at 5 h of stress ([Figure 2O](#)).

In the head kidney, upregulations of *cxcl12a* and *cxcl12b* ([Figures 2E, F](#)) were demonstrated at 11 h of stress. In this organ, restraint stress also upregulated the expression of *cxcl8\_11* (at 11 h of stress) ([Figure 2G](#)), *cxcl8\_12* (at 5 and 11 h) ([Figure 2H](#)), *cxcr4* (at 5 and 11 h) ([Figure 2L](#)) and *cxcr1* (at 5 h) ([Figure 2M](#)). In addition, in the head kidney, stress-induced upregulation of *gcsfr* (at 11 h) and *mmp9* (at 5 and 11 h) was also observed ([Figures 2Q, R](#)).

Both in PBLs and in the head kidney, stress did not affect the expression of *cxcr2* ([Figures 2K, N](#)).

## 3.3 Effects of hormone receptor blocking on the stress-induced redistribution of neutrophils

To evaluate the involvement of ADR, MC2R, GR and MR receptors in the stress-induced PMN redistribution, antagonists of these receptors were used. 11 h of stress increased the percentage of PMNs in the circulation of vehicle-injected fish, while this reaction was not observed in fish treated with antagonists of GR (RU-486) or GR+MR (RU-486+SP) ([Figures 3A, B](#)). In contrast, stress-induced increase of the PMN percentage in the blood was not altered in fish treated with the  $\beta_1$ -ADR antagonist – atenolol ([Figures 3A, B](#)). In

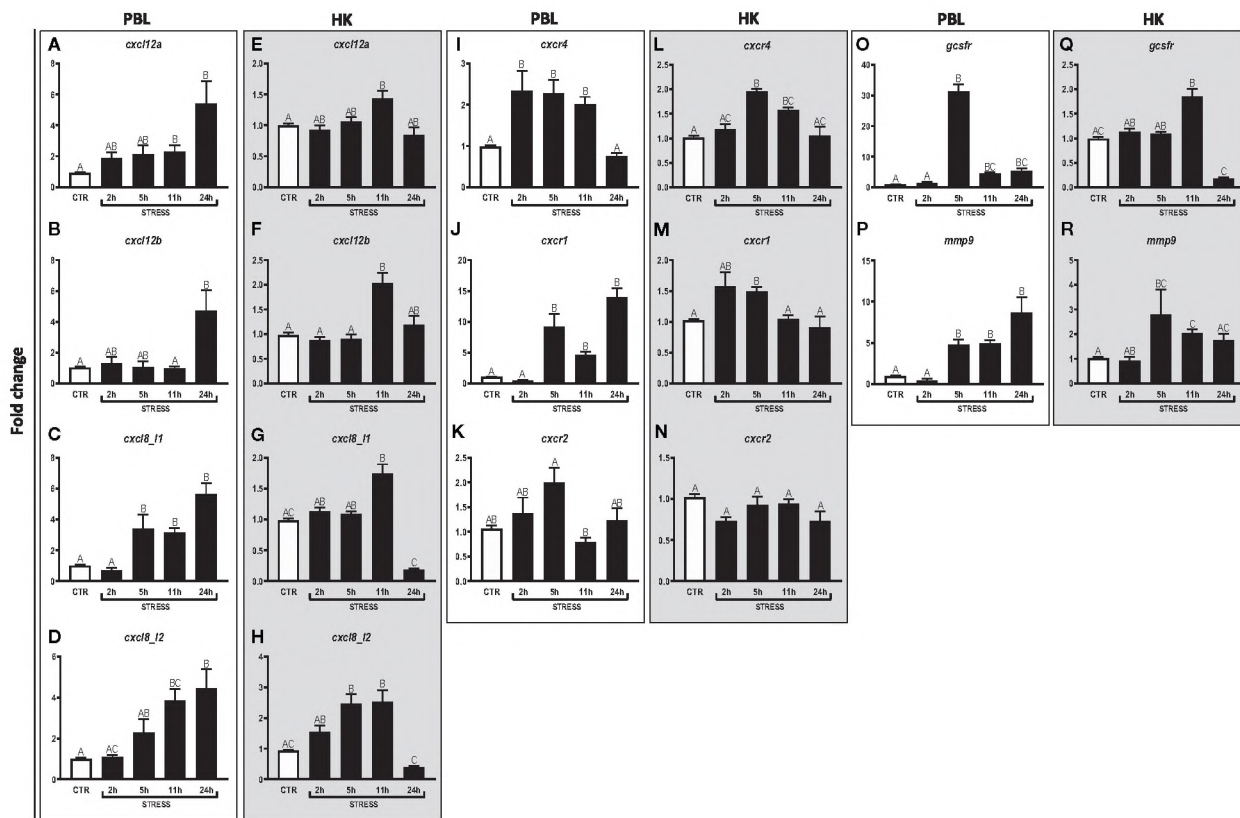


**FIGURE 1** Restraint stress-induced changes in the redistribution of neutrophils (PMN), cortisol and glucose level in common carp. Unstressed control fish and stressed fish were sampled at 2, 5, 11 or 24 h of the experiments. Stress-induced changes in the percentage of PMNs in peripheral blood (PBL, **A**) or in the head kidney (HK, **B**) leukocytes. The percentage of PMNs was measured by flow cytometry in control unstressed fish (CTR, white bars) and in stressed fish (STRESS, black bars) based on cell size (FSC) and granularity (SSC). (**C**) Representative dot plots of PBL and HK from control and stressed fish. (**D**) Representative images of immunocytochemical staining of TCL-BE8 positive cells (granulocytes) in the peripheral blood leukocytes. Negative controls of primary antibody omission are included as figure inserts. (**E**) Cortisol level in serum. (**F**) Glucose level in serum. Data are presented as mean ± standard error (SE) (n ≥ 5). Mean values not sharing letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups (p ≤ 0.05).

turn, in stressed fish treated either with β2-ADR (ICI) or MC2R (GPS) antagonist, the PMN percentage in blood was significantly higher than that observed in vehicle-treated stressed animals (Figures 3A, B). In the head kidney, the percentage of PMNs decreased after stress challenge and this reaction was not altered upon any of the assessed antagonists, however, the PMN percentage

in RU-486-injected unstressed fish was significantly lower than in vehicle-treated unstressed fish (Supplementary Figure 3).

In stressed animals that were treated with the GR antagonist, increased levels of serum cortisol were observed compared to stressed fish that were vehicle-treated. Similar high levels of cortisol were also observed in unstressed and stressed fish treated



**FIGURE 2** Restraint stress-induced changes in the expression of genes encoding CXC chemokines and receptors, GCSFR and MMP9 in peripheral blood leukocytes (PBL, A–D, I–K, O, P) and in the head kidney (HK, E–H, L–N, Q, R) of common carp. Unstressed control fish (CTR, white bar) and stressed fish (STRESS, black bars) were sampled at 2, 5, 11 or 24 h of the experiments. Gene expression was determined by RT-qPCR and presented as an x-fold increase compared to unstressed fish and standardized for the housekeeping gene 40S ribosomal protein s11. Data are presented as mean ± standard error (SE) (n ≥ 5). Mean values not sharing letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups (p ≤ 0.05).

with a combination of GR and MR antagonists (Figure 3C). Stressed fish treated with ICI or GPS had higher levels of serum glucose than stressed animals treated with vehicle (Figure 3D).

### 3.4 Effects of GR and MR blocking on the expression of genes encoding CXC chemokines and receptors, GCSFR and MMP9

In PBLs stress induced upregulation of *cxcl8\_l1*, *cxcl8\_l2* and *cxcr4*, and these effects were not observed in fish treated with RU-486 and spironolactone (RU-486+SP) (Figures 4C, D, I). Such upregulation of *cxcr1* was not observed in RU-486- and RU-486+SP-treated groups of stressed fish (Figure 4J). In turn, expression of *cxcl12b* was higher in RU-486-treated stressed fish than in RU-486 and spironolactone-treated stressed fish (Figure 4B). Neither stress nor antagonist treatment affected the expression of *cxcl12a* and *cxcr2* (Figures 4A, K).

In the head kidney, stress induced upregulation of *cxcl12a*, *cxcl12b*, *cxcl8\_l1* and *cxcr4* in vehicle-injected fish and this upregulation was not observed in stressed fish treated with RU-486+SP (Figures 4E–G, L). Stress-induced upregulation of *cxcl8\_l2*

expression was not observed in stressed fish treated with RU-486 or RU-486+SP (Figure 4H). In the head kidney of stressed fish treated with RU-486, expression of *cxcr2* was higher than in stressed animals treated with vehicle or RU-486+SP (Figure 4N). Neither stress nor GR and MR antagonist treatment affected expression of *cxcr1* (Figure 4M).

In both PBLs and head kidney, stress-induced upregulations of *gcsfr* (Figures 4O, Q) and *mmp9* (Figures 4P, R) were not observed in stressed fish treated with RU-486 or RU-486+SP.

### 3.5 Effects of CXCR4 blocking on the stress-induced redistribution of neutrophils

The stress-induced increase of PMN percentage in the peripheral blood was not observed in stressed fish treated with CXCR4 inhibitor - AMD3100 (Figures 5A, C). However, AMD3100 injection did not prevent the stress-induced decrease of the percentage of PMNs in the head kidney (Figures 5B, C).

Stressed fish treated with AMD3100 had higher levels of serum cortisol than stressed animals treated with vehicle only (Figure 5D), while serum glucose levels were similar in stressed fish that were treated with vehicle or CXCR4 inhibitor (Figure 5E).

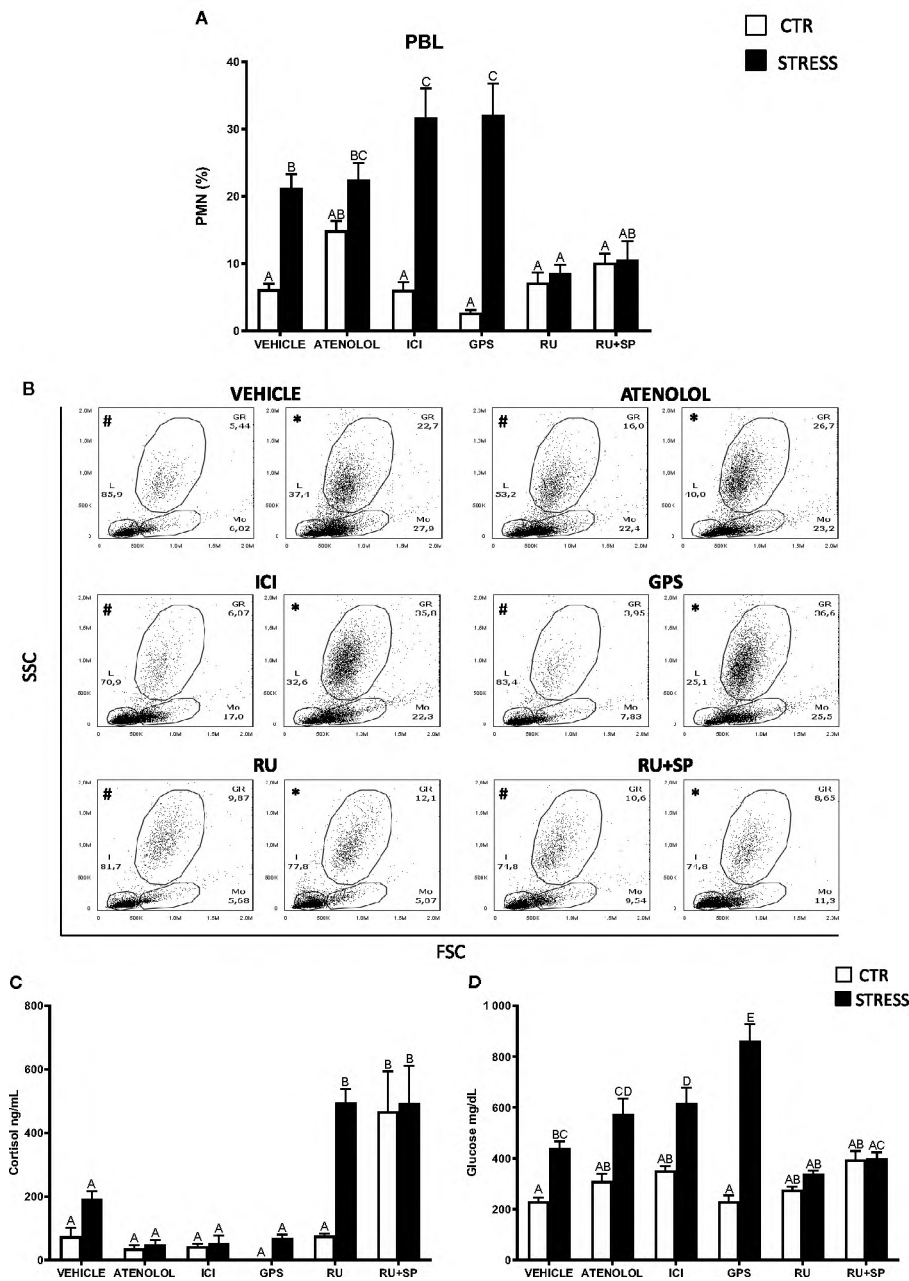
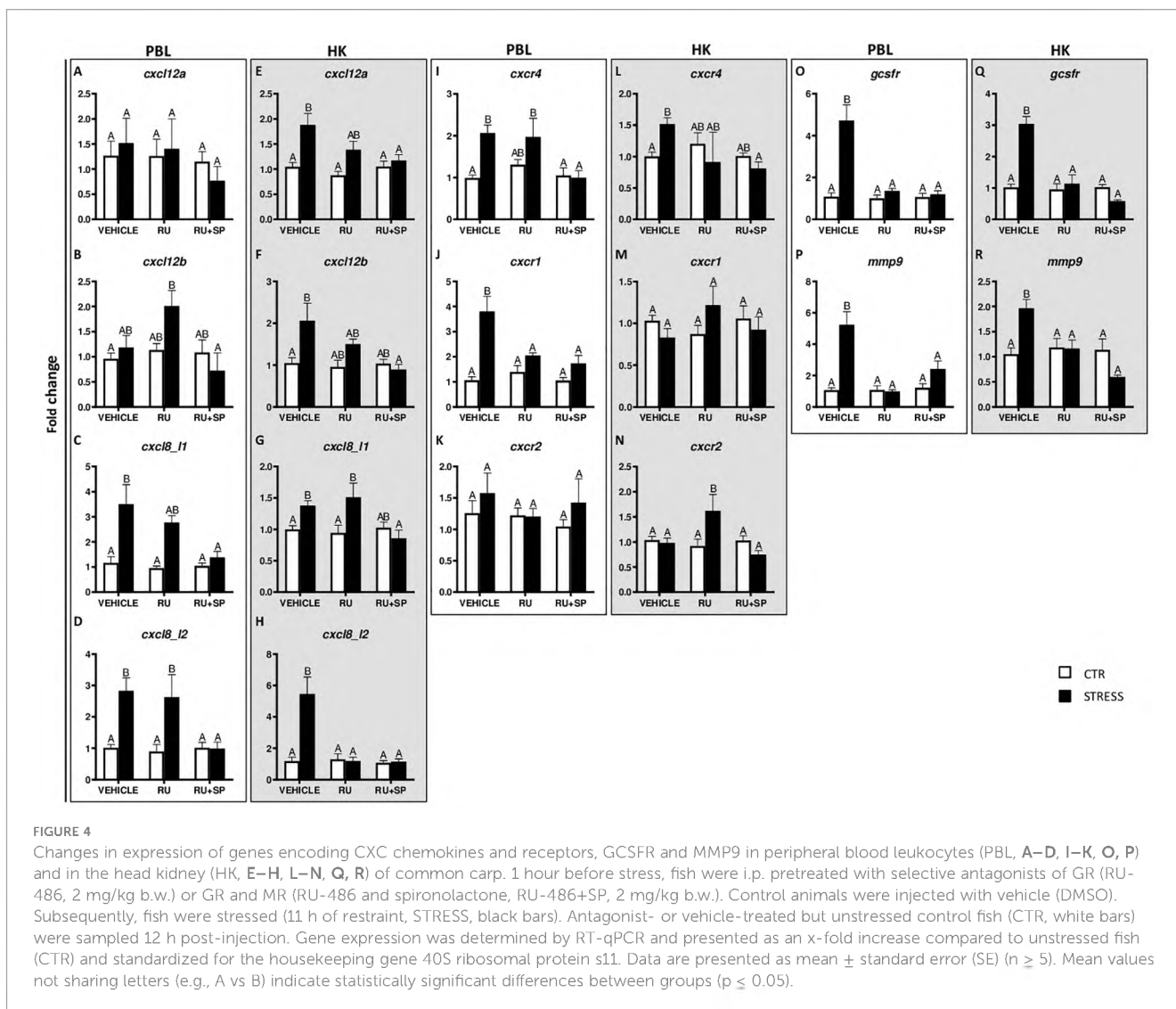


FIGURE 3

The *in vivo* effects of ADR, MC2R, GR and MR antagonists on changes in neutrophil (PMN) percentage in peripheral blood leukocytes (PBL) and on serum cortisol and glucose level in common carp. 1 hour before stress, fish were i.p. pretreated with:  $\beta$ 1-ADR antagonist (atenolol, 0.213 mg/kg b.w.),  $\beta$ 2-ADR antagonist (ICI-118,551, ICI, 0.25 mg/kg b.w.), MC2R antagonist (GPS1573, GPS, 1 mg/kg b.w.) or with antagonist of GRs (RU-486, 2 mg/kg b.w.) or with antagonists of GRs and MRs (RU-486 and Spironolactone, RU-486+SP, each 2 mg/kg b.w.). Control animals were treated with vehicle (DMSO). Subsequently, fish were stressed (11 h of restraint, STRESS). Antagonist- or vehicle-treated but unstressed control fish (CTR) were sampled 12 h post-injection. (A) The percentage of PMNs was measured by flow cytometry based on cell size (FSC) and granularity (SSC). (B) Representative dot plots of PBL from unstressed or stressed (11 h) fish treated with vehicle (VEHICLE) or antagonist (ATENOLOL, ICI, GPS, RU-486, RU-486+SP). # - dot plots from control unstressed fish, \* - dot plots from fish stressed 11 h. (C) Cortisol level in serum. (D) Glucose level in serum. Data are presented as mean  $\pm$  standard error (SE) ( $n \geq 5$ ). Mean values not sharing letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ).



### 3.6 Effects of CXCR4 blocking on the expression of genes encoding CXC chemokines and receptors, GCSFR and MMP9

In PBLs of stressed fish, AMD3100 treatment decreased the expression of *cxcl12a* (Figure 6A). Stress-induced changes in the expression of *cxcl8\_11*, *cxcr1* and *gcsfr* were not prevented by AMD3100 injection (Figures 6C, J, O). Moreover, stress-induced upregulation of *cxcl8\_12*, *cxcr4* and *mmp9* in PBLs was enhanced by AMD3100-treatment (Figures 6D, I, P). Neither stress nor AMD3100 treatment affected the expression of *cxcl12b* and *cxcr2* in PBLs (Figures 6B, K).

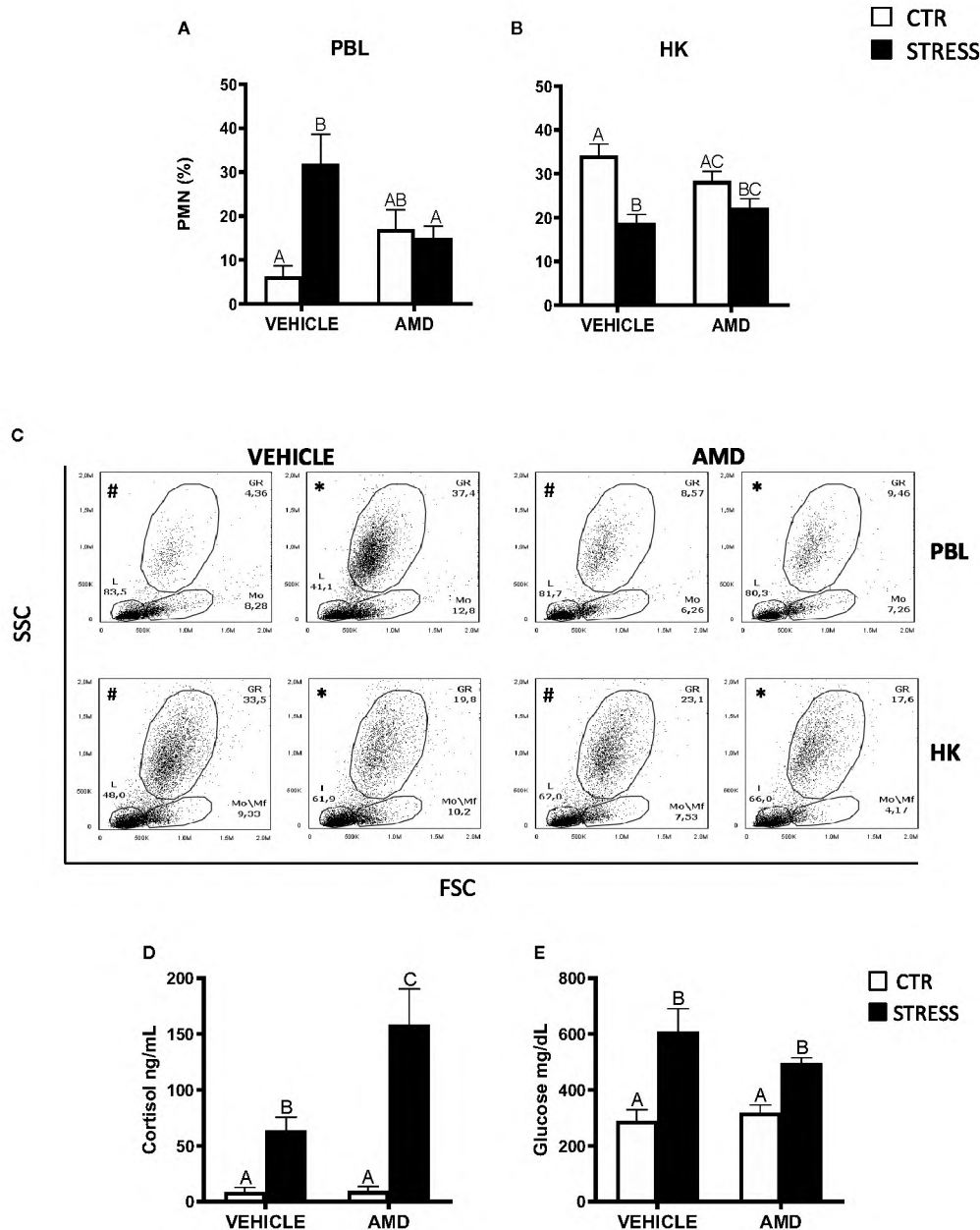
In the head kidney, stress-induced upregulations of *cxcl12a*, *cxcl12b*, *cxcl8\_11*, *cxcl8\_12*, *cxcr4*, *gcsfr* and *mmp9* were not observed in AMD3100-treated animals (Figures 6E–H, L, Q, R). In the case of *cxcl12a*, in AMD3100-treated unstressed fish, the expression level was higher than in vehicle-treated unstressed fish or in AMD3100-treated stressed fish (Figure 6E). In turn, the *cxcr1* expression level in the head kidney of AMD3100-injected stressed fish was lower

than in that in vehicle-injected stressed fish (Figure 6M). Neither stress nor AMD3100 treatment affected the expression of *cxcr2* in the head kidney (Figure 6N).

### 3.7 Effects of CXCR1 and CXCR2 blocking on the stress-induced redistribution of neutrophils

The stress-induced increase of the PMN percentage in the peripheral blood was not observed in stressed fish treated with the CXCR1 and CXCR2 inhibitor – reparixin as well as in fish pretreated with the CXCR2 inhibitor - SB225002 (Figures 7A, C). However, pretreatment of stressed fish with reparixin or SB225002 had no effect on stress-induced decrease of the PMN percentage in the head kidney (Figures 7B, C).

Stress-induced increases of cortisol levels were not observed in animals treated with reparixin or SB225002 (Figure 7D), while CXCR1-2 inhibitors did not change the level of serum glucose (Figure 7E).

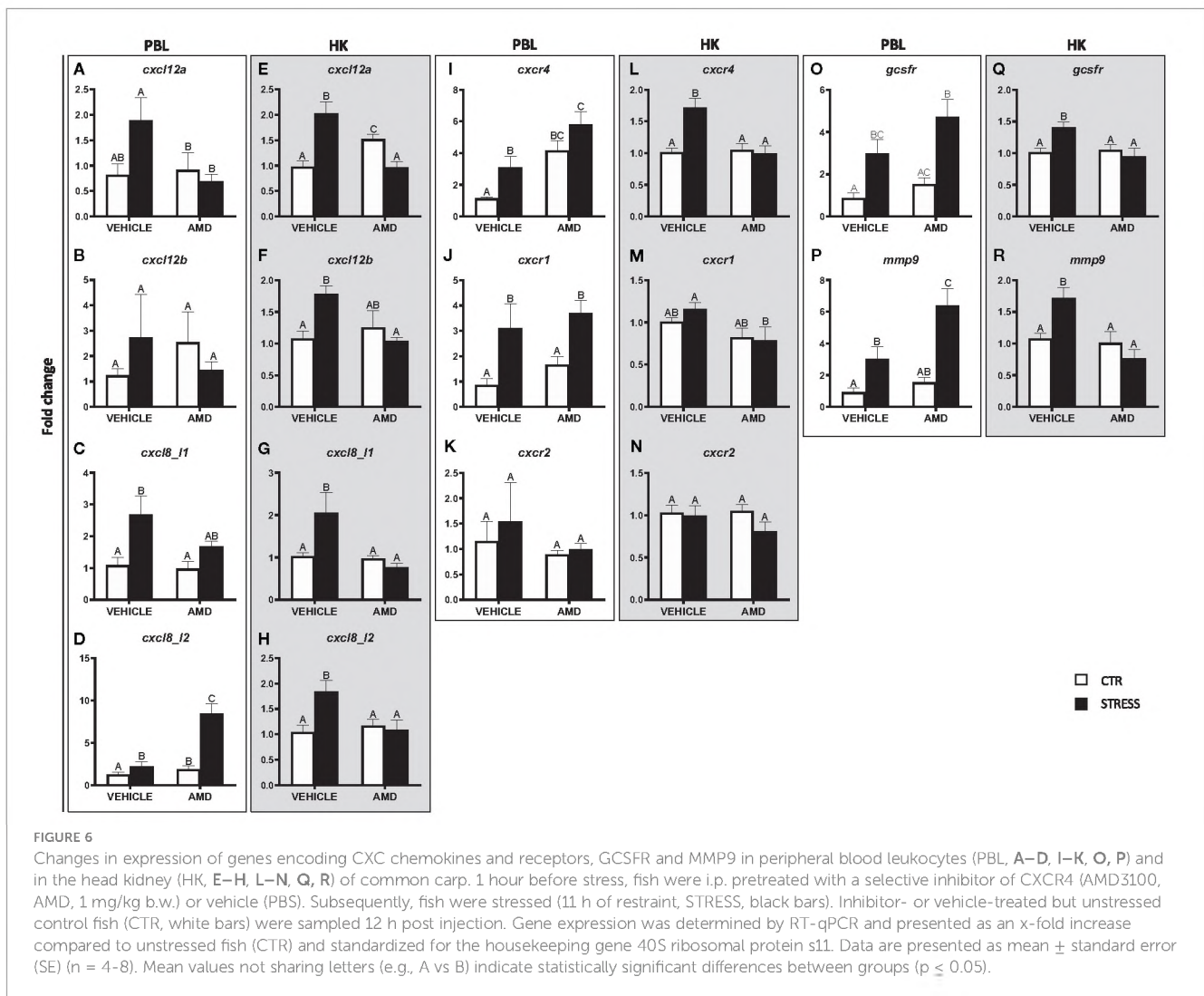


**FIGURE 5**  
 The *in vivo* effect of CXCR4 blocking on the percentage of neutrophils (PMN) in peripheral blood leukocytes (PBL, A), in the head kidney (HK, B) and on serum cortisol and glucose level in common carp. 1 hour before stress, fish were i.p. pretreated with a selective inhibitor of CXCR4 (AMD3100, AMD, 1 mg/kg b.w.) or with vehicle (PBS). Subsequently, fish were stressed (11 h of restraint, STRESS, black bars). Inhibitor- or vehicle-treated but unstressed control fish (CTR, white bars) were sampled 12 h post-injection. The percentage of PMNs was measured by flow cytometry based on cell size (FSC) and granularity (SSC). (C) Representative dot plots of PBL and HK from unstressed and stressed fish treated with vehicle (VEHICLE) or inhibitor (AMD). # - dot plots from control unstressed fish, \* - dot plots from fish stressed 11 h. (D) Cortisol level in serum. (E) Glucose level in serum. Data are presented as mean  $\pm$  standard error (SE) ( $n \geq 4$ ). Mean values not sharing letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.8 Effects of CXCR1 and CXCR2 blocking on the expression of genes encoding CXC chemokines and receptors, GCSFR and MMP9

In both PBLs and in the head kidney, expression of *cxcl12a* and *cxcr4* was lower in reparixin-treated stressed fish than in stressed fish treated with vehicle (Figures 8A, E, I, L). Similar results were

also observed for *cxcl12b*, *gcsfr* and *mmp9* expression in the head kidney (Figures 8F, Q, R). Both in PBLs and the head kidney, the expression of genes encoding CXCL12 chemokines and CXCR4 were similar in fish treated with vehicle or with the CXCR2 inhibitor - SB225002 (Figures 8A, B, E, F, I, L). Neither stress nor CXCR1/2 inhibitor treatment affected the expression of *cxcl12b* and *cxcr2* in PBLs (Figures 8B, K) as well as the expression of *cxcl8\_11*, *cxcr1* and *cxcr2* in the head kidney (Figures 8G, M, N).



Moreover, in both PBLs and in the head kidney, stress-induced changes in the expression of *cxcl8\_l2* were prevented by reparixin and SB225002 injection (Figures 8D, H). In PBLs, stress-induced increases of *cxcl8\_l1*, *cxcr1*, *gcsfr* and *mmp9* were modified neither by reparixin nor by SB225002 treatment (Figures 8C, J, O, P).

## 4 Discussion

Stress may pose a serious challenge to immune homeostasis, but under certain circumstances, stress may prepare the immune system for challenges such as wounding or infection, which are likely to happen during a fight or flight response (49). Our study focused on the role of stress and GR/MR receptors in the process of neutrophil redistribution in common carp. We hypothesize that the regulation of this phenomenon depends on: (i) neutrophil retention/redistribution signals and/or (ii) cell survival.

Stress induced a time-dependent increase in the level of cortisol and glucose in blood serum (33) and massive elevation of the number of neutrophils circulating in the blood of carp. Our findings are consistent with results in other mammalian and fish models,

e.g., in rodents stress hormones induced significant changes in the absolute numbers and relative proportions of white blood cells (12, 50). This precise neuroendocrine tailoring of leukocyte proportions was characterized by the initial mobilization of all leukocytes into the blood (within minutes after the beginning of a stress challenge), followed by a decrease in the number of most white blood cells, while neutrophil numbers, that are key for the innate response, continued to increase (12, 51). Also, Poller et al. (52) showed a rapid neutrophilia triggered by acute stress in mice. The regulation of stress-induced redistribution of neutrophils therefore is an evolutionary conserved phenomenon (10, 53, 54).

Although stress-induced neutrophilia in rats has been linked to noradrenergic signaling (12), Poller et al. (52) have shown that, despite the role of the sympathetic nervous system (SNS) in accelerating hematopoiesis during chronic variable stress, the SNS and specifically adrenergic signaling, does not mediate neutrophilia during acute restraint stress. Also, in our hands blocking of  $\beta 1$ -ADR with atenolol or  $\beta 2$ -ADR with ICI-118,551 did not reduce the stress-evoked elevation of the number of blood neutrophils. On the contrary, in mice, atenolol, but not ICI-118,551, suppressed neutrophilia induced by acute cold restraint stress (4°C for 1 h)

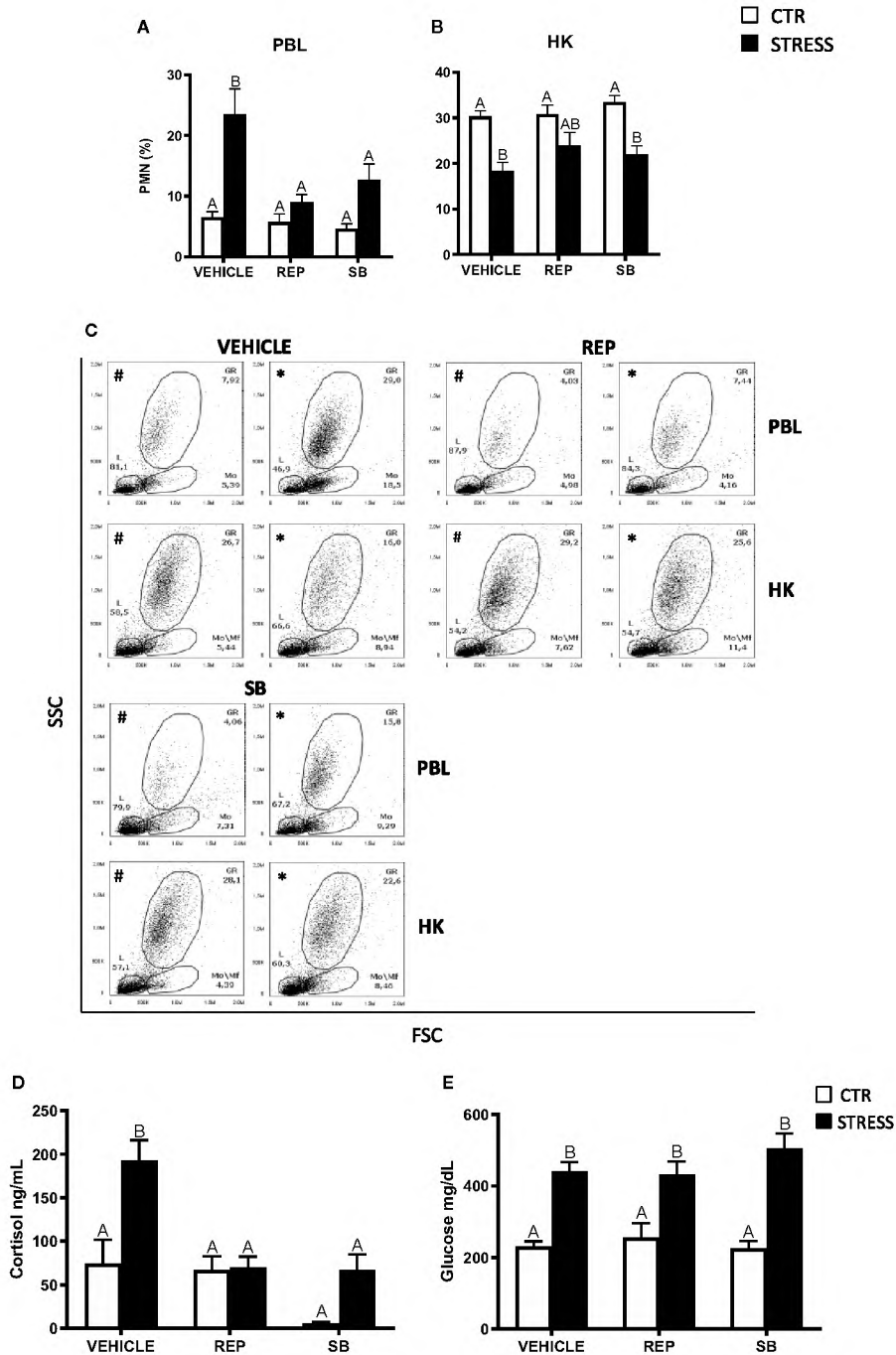
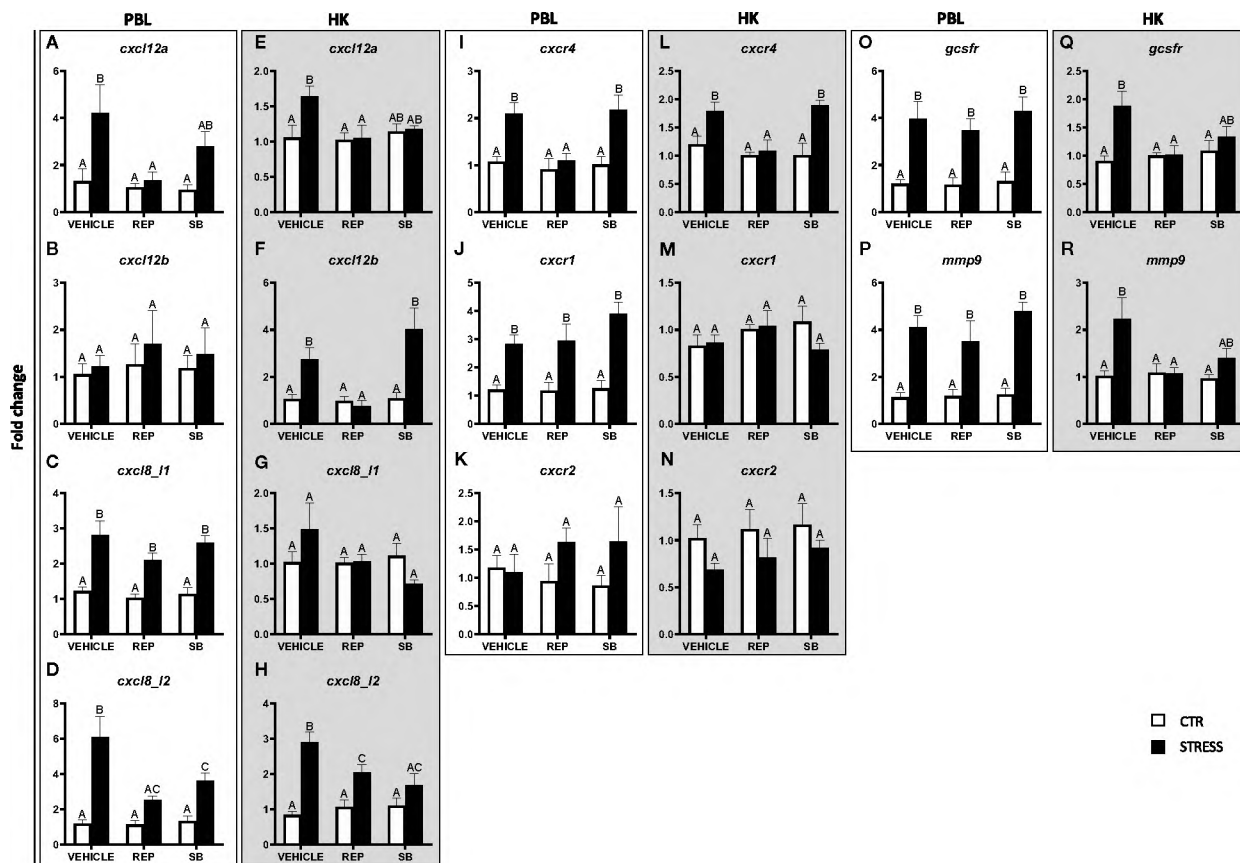


FIGURE 7

The *in vivo* effects of CXCR1/2 blocking on the percentage of neutrophils (PMN) in peripheral blood leukocytes (PBL, A), in the head kidney (HK, B) and on serum cortisol and glucose level in common carp. 1 hour before stress, fish were i.p. pretreated with a selective inhibitor of CXCR1 and CXCR2 receptors (Reparixin, REP, 30 mg/kg b.w.), selective CXCR2 receptor inhibitor (SB225002, SB, 2 mg/kg b.w.) or with vehicle (DMSO). Subsequently, fish were stressed (11 h of restraint, STRESS, black bars). Inhibitor- or vehicle-treated but unstressed control fish (CTR, white bars) were sampled 12 h post-injection. The percentage of PMNs was measured by flow cytometry based on cell size (FSC) and granularity (SSC). (C) Representative dot plots of PBL and HK from unstressed and stressed fish treated with vehicle (VEHICLE) or inhibitors (REP, SB). # - dot plots from control unstressed fish, \* - dot plots from fish stressed 11 h. (D) Cortisol level in serum. (E) Glucose level in serum. Data are presented as mean  $\pm$  standard error (SE) (n  $\geq$  6). Mean values not sharing letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups (p  $\leq$  0.05).

(55). Conflicting reports on the effect of catecholamines on leukocyte redistribution may be caused by the use of different stressors (12). Immobilization, cold stress, or inflammatory pain induced different relative increases in concentrations of catecholamines and glucocorticoids in circulation and this may

cause different changes in leukocyte distribution (56, 57). Our study for the first time considers changes in neutrophil redistribution under a prolonged, 11 h restraint stress in fish. Interestingly, we show that, in fish pretreated with the  $\beta$ 2-ADR antagonist the number of neutrophilic granulocytes in circulation was even



**FIGURE 8**  
 Changes in expression of genes encoding CXC chemokines and receptors, GCSFR and MMP9 in peripheral blood leukocytes (PBL, A–D, I–K, O, P) and in the head kidney (HK, E–H, L–N, Q, R) of common carp. 1 hour before stress, fish were i.p. pretreated with inhibitor of CXCR1 and CXCR2 receptors (Reparixin, REP, 30 mg/kg b.w.), selective CXCR2 receptor inhibitor (SB225002, SB, 2 mg/kg b.w.) or with vehicle (DMSO). Subsequently, fish were stressed (11 h of restraint, STRESS, black bars). Inhibitor- or vehicle-treated but unstressed control fish (CTR, white bars) were sampled 12 h post injection. Gene expression was determined by RT-qPCR and presented as an x-fold increase compared to unstressed fish (CTR) and standardized for the housekeeping gene 40S ribosomal protein s11. Data are presented as mean ± standard error (SE) (n = 5–8). Mean values not sharing letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups (p ≤ 0.05).

higher than in vehicle-treated stressed fish. This suggests that activation of this receptor inhibits neutrophils release/migration. Previously, an anti-inflammatory action of  $\beta$ 2-ADR agonists was observed in rodents and birds. For example, in hens, salmeterol ( $\beta$ 2-ADR agonist) reduced the percentage of circulating heterophils (neutrophils of the avian species) compared to control and propranolol ( $\beta$ 2-ADR antagonist)-treated birds (58) while in mice isoproterenol (selective  $\beta$ -adrenergic agonist), decreased neutrophil migration during peritonitis (59).

Similarly to  $\beta$ 2-ADR-blocking, also the MC2R antagonist increased the number of neutrophilic granulocytes in the circulation of stressed fish above the level observed in vehicle-treated stressed animals. In this case, it cannot be overlooked that GPS1573 retains some antagonist effect on the MSH receptors: MC3R, MC4R and MC5R, but not on MC1R (60). This may, at least partially, explain the GPS-induced upregulation of PMN numbers, as it was previously observed that  $\alpha$ -MSH, upon binding to MC4R and MC5R, inhibited the IL-8-induced neutrophil migration *in vitro*, and reduced the neutrophil migration to the site of inflammation *in vivo* (61–63). Moreover, the GPS-induced

reduction in cortisol synthesis in stressed fish could be associated with high levels of catecholamines as it is known that the phenylethanolamine-N-methyl transferase (PNMT), which catalyzes the transformation of noradrenaline to adrenaline, is formed only in the presence of high local concentrations of cortisol (64). Therefore, during stress, a low cortisol level potentially elevates the level of noradrenaline. Although, in our hands blocking of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-ADRs did not down-regulate the stress-induced neutrophil release into circulation. Dhabhar et al. (12) observed that in adrenalectomized mice, noradrenaline increased the percentage of neutrophils in circulation (2 hpi). Therefore, we can speculate that in stressed fish, in the absence of cortisol, the level of noradrenaline is so high that it stimulates the release of neutrophils.

Usually in mammals, a stress- or infection-induced increase in the number of blood neutrophils reflects a mobilization of cells from different compartments e.g., bone marrow, marginated pool, spleen, lung, or lymph nodes (12). In our studies, a stress-induced increase in blood neutrophils was accompanied by a neutrophil decrease in the hematopoietic organ of fish, the head kidney.

Previously, this correlation was also observed in carp after an acute temperature shock (10). This indicates that the head kidney is a source of neutrophils, which emigrate into the circulation during a stress response. However, we cannot exclude that other immunocompetent organ, such as e.g., the trunk kidney or spleen, also serve as a neutrophil reservoir. The latter possibility can be partially supported by our data indicating that, although GR/MR blockade significantly reduced the stress-induced increase of circulating neutrophils, it did not change neutrophil numbers in the head kidney of stressed fish. As cell proliferation and regulated redistribution both take place in the head kidney this is difficult to establish. Our preliminary results indeed show that also in the trunk kidney, stress (11 h and 24 h of restraint) resulted in decreased numbers of neutrophils (Supplementary Figure 4). Furthermore, stress-induced changes in the numbers of neutrophils in the blood and in the hematopoietic organs are also influenced by the cortisol-induced and GR-dependent increase in the survival of neutrophils. *In vitro* studies in carp revealed that cortisol rescues neutrophils from apoptosis while RU-486 completely inhibits its anti-apoptotic effect (15). Also *in vivo*, such interaction in the head kidney is feasible as leukocytes, including neutrophils, arise and mature in this organ and they express cortisol receptors (65). At the same time, cortisol is produced in the interrenal cells of the head kidney (9).

Although the mechanisms that regulate neutrophil retention and redistribution during infection/inflammation are well described, little is known about the mechanisms that induce neutrophil motility under stress. Recent elegant work of Tang et al. (50) showed that in mice, acute restraint stress (6 h) induces up-regulation of the inflammatory response in blood leukocytes, suggesting that acute stress leads to an inflammatory state of the body. Therefore, we hypothesize that infection/inflammation- and stress-related mechanisms behind neutrophil mobilization are linked. CXC chemokines and their receptors play a crucial role in neutrophil redistribution upon infection (32, 66–69). During 11 h of stress, both in PBLs and head kidney, we observed upregulation of expression of genes encoding CXCL12s and their receptor CXCR4, as well as the inflammatory CXCL8 chemokines and its putative receptor CXCR1 but not CXCR2. Interestingly, when cortisol receptors were blocked, no such upregulation could be observed, indicating a direct regulation by cortisol-GR/MR interactions.

Both in mammals and zebrafish CXCL12 and CXCR4 interaction plays an important role in neutrophil retention in the hematopoietic tissues (68, 70). However, Walters et al. (28) found that depletion of endogenous CXCL12 mRNA did not affect the neutrophil redistribution in zebrafish larvae, suggesting redundancy with other factors that also mediate neutrophil retention in hematopoietic tissues *in vivo*.

Several studies described the role of CXCL12-CXCR4 interaction during neutrophil migration towards the skin during inflammation and wounding (69–72). For example, in zebrafish larvae, *cxc4b* and *cxl12a* were expressed at the wound site, and *cxc4b* and *cxl12a* CRISPR knockdown showed that CXCL12/CXCR4 signaling may play an important role in neutrophil retention at inflammatory sites. Both in knockdown larvae and in fish treated with AMD3100, inhibition of the CXCL12/CXCR4 signaling accelerated the resolution of the neutrophils

from the site of inflammation due to their increased reverse migration (69). Also, Paredes-Zúñiga et al. (70) found in zebrafish larvae that CXCL12a/CXCR4b signaling antagonizes inflammatory signals in response to tissue injury. Compared to wild-type siblings, *cxc4b* null mutant larvae exhibited increased neutrophil recruitment to wounds. Interestingly, no difference between *cxc4b* null mutant larvae and their wild type siblings was found in the recruitment of neutrophils to the focus of *S. Typhimurium* infection-induced inflammation.

Upon infection, increased levels of GCSF decrease the level of CXCL12 protein and therefore disrupt CXCL12-CXCR4 interaction and stimulate the release of neutrophils from the bone marrow into the blood (73). In addition, Lévesque et al. (74) found that upon GCSF-induced mobilization of bone marrow progenitor cells, CXCR4 is cleaved and truncated, resulting in the loss of chemotaxis in response to CXCL12. They also found a decrease in the CXCL12 concentration, due to the accumulation of serine proteases (neutrophil elastase and cathepsin G, but not proteinase-3) which directly cleaved and inactivated this chemokine. In our study, GR/MR-dependent up-regulation of expression of genes encoding GCSFR and MMP9 suggests that a similar phenomenon may be initiated during stress in fish. In fish, upregulation of *cxl12* and *cxc4* expression was found at 11 h of stress in PBLs and in the head kidney. Petit et al. (75) showed similar results of GCSF-induced transient upregulation of the expression of the CXCL12 gene in bone marrow *in vivo* and *in vitro*, in human and murine osteoblast cell lines. They proved that the gradual decrease of the bone marrow CXCL12 protein is mostly connected with its degradation by neutrophil elastase. As anti-CXCL12 antibodies are unavailable for carp, we cannot check whether, despite the increase in expression at the gene level, a similar or opposite phenomenon also occurs at the protein level. To definitively confirm the importance of the CXCL12-CXCR4 interaction for neutrophil mobilization during stress, we used a selective inhibitor of CXCR4 - AMD3100. In clinical trials, AMD3100 selectively and reversibly antagonized CXCL12 binding to CXCR4, with subsequent egress of hematopoietic stem cells to the peripheral blood (76). In mice, AMD3100 caused a 3-fold increase in the number of circulating neutrophils and this increase corresponded with a decrease of neutrophil numbers in the bone marrow (24). Similar studies in healthy human volunteers revealed that AMD3100 infusion generated a dose-related increase in the number of circulating neutrophils (77). Also, in non-mammalian studies in the little skate (*Leucoraja erinacea*), a significant mobilization of leukocytes upon intraperitoneal administration of AMD3100 was found (78). Surprisingly, at 11 h of stress in AMD3100-treated carp, an increase in the PMN percentage in the circulation was not observed. In unstressed fish treated with AMD3100 the number of neutrophils slightly but not significantly increased in the blood and decreased in the head kidney. During stress, AMD3100 evoked a statistically significant reduction of the neutrophil numbers in the circulation compared to stressed vehicle-treated fish. Moreover, in the head kidney, CXCR4 blockage down-regulated the expression of genes encoding CXCL12s, CXCL8s, MMP-9 as well as CXCR4, CXCR1 and GCSFR, while in PBLs it upregulated expression of *cxc4*, *cxl8\_12* and *mmp9*. In this context, it is important to acknowledge that the acute stress response is a critical physiological mechanism, which ensures that leukocytes are present in the right

place, at the right time, and in the right state of activation to be prepared for immune challenges that are likely following upon stress under natural conditions (12). Examples of such stress-induced leukocyte trafficking from circulation include skin and other tissues that can be wounded by a predator or stressor (79). Restraint stress by netting, which we used in our study, almost perfectly mimics confinement in nature and involves direct contact of skin with the net. From an evolutionary point of view, such a situation in nature might promote immuno-enhancement of skin tissue, which is now easily exposed to wounding during desperate escape movements. Therefore, we could not exclude that CXCR4 blockage stimulates PMN release at earlier time points of stress, accelerating their migration to injury-exposed organs like the skin. Liu et al. (39) showed that in mice AMD3100 induced the redistribution of lymphocytes, monocytes, and neutrophils from primary immune organs to the secondary immune organs, peripheral tissues and blood, without compromising neutrophil trafficking to inflamed sites. Therefore, we performed an additional experiment and stressed AMD3100-treated fish for 2 h and 5 h. However, in both time points, we did not observe increased neutrophil numbers in the blood circulation (Supplementary Figure 5).

Evrard et al. (80) suggested that CXCL12-CXCR4 interaction is crucial mainly for the retention in the hematopoietic tissue of proliferative neutrophil precursors (preNeu), while in non-proliferating neutrophils the expression of CXCR4 is very low. We can therefore hypothesize that these cells are not sensitive to AMD3100. However, in a microbiota-driven process, ageing neutrophils that are present in circulation, upregulate the expression of CXCR4 on their cell surface, which allows them to home back to the bone marrow in response to CXCL12. This ultimately results in the clearance of these leukocytes by resident macrophages (81). Uhl et al. (82) noticed that in mice with endotoxemia, inhibition of the chemokine receptor CXCR4 by AMD3100 or antibody-mediated blockade of CXCL12 did not change the number of aged neutrophils in the circulation and bone marrow. In turn, Devi et al. (83) demonstrated that CXCR4 inhibition via AMD3100 does not result in neutrophil mobilization from the bone marrow. Instead, CXCR4 blockage augmented the frequency of circulating neutrophils through their release from alternative reservoirs/marginated pools present in the lung, while simultaneously preventing neutrophil return to the bone marrow. We therefore postulate that, like during inflammation, also upon stress, “age-wise” cells are the first and dominant subtype of neutrophil to be recruited from hematopoietic tissue. This is in line with the observation that cells, recruited to the circulation during stress, have higher *cxc4* expression, which is characteristic for aged neutrophils (81). Importantly, although the number of blood neutrophils in AMD3100-treated stressed fish was lower than in stressed animals treated with vehicle, *cxc4* expression in PBLs from fish with CXCR4 blockage was significantly higher than in fish with “intact” CXCR4.

In mammals, GCSF induces not only loosening of CXCL12-CXCR4 interactions but also increases the CXCL8 concentration in blood circulation. CXCL8, acting via CXCR1 and CXCR2, is one of the most potent neutrophil chemoattractant (84, 85). Through different mechanisms of activation, CXCL8 binding activates

these receptors and induces specific intracellular signaling cascades that result in rapid neutrophil recruitment (86–88). Furthermore, Martin et al. (89) found in mice, that maximal mobilization of neutrophils, stimulated by CXCR2-acting chemokines, is dependent on the blockade of the CXCR4-dependent pathway. They also suggested a specific crosstalk between CXCR2 and CXCR4 in which activation of one chemokine receptor evokes desensitization of a second chemokine receptor. Interestingly, during infection/inflammation GCSF also induces granule proteins including MMP-9 (90–92) which further potentiated CXCL8 activity by its N-terminal truncation (90–93).

In carp, stress upregulated the expression of genes encoding CXCL8 chemokines and CXCR1 in both PBLs and head kidney, while expression of the gene encoding CXCR2 remains at the same level in unstressed and stressed fish. In addition, upon stress, a time-dependent upregulation of *mmp9* and *gcsfr* was observed in both PBLs and head kidney. This indicates that CXCL8 chemokines are involved in the regulation of stress-induced neutrophil redistribution from hematopoietic tissues/organs into circulation and likely MMP-9 is involved in their truncation/activation. However, we cannot ignore that MMP-9 is also known for its role in the regulation of neutrophil migration across the basement membrane and the degradation of the extracellular matrix (94).

The role of the interaction between CXCL8 chemokines and their putative receptors CXCR1 and CXCR2 in stress-induced redistribution of neutrophils towards the bloodstream was confirmed in experiments with CXCR1/CXCR2 inhibitors. Both reparixin (inhibitor of CXCR1 and CXCR2) and SB225002 (inhibitor of CXCR2) lowered the number of neutrophilic granulocytes observed in circulation upon stress. Interestingly, only reparixin significantly reduced the stress-induced upregulation of the expression of *cxcl12*, *cxc4*, *mmp9* and *gcsfr*, while both reparixin and SB225002 prevented such upregulation of *cxcl8\_12*. This suggests that expression of *cxcl12* and its receptor is mainly mediated by CXCR1 while expression of *cxcl8\_11* is regulated by CXCR2 or both CXCR1 and CXCR2.

Interestingly, inhibitors of CXCR4 and CXCR1-2 differentially affected the cortisol levels in stressed fish. We previously published a detailed explanation of the interaction between CXC chemokines and the activation of the stress axis and cortisol synthesis and conversion (33).

Altogether, our data strongly suggest that acute stress led to the mobilization of the immune system, characterized by neutrophilia, and this phenomenon is evolutionary well-conserved. We also revealed that in fish, CXC chemokines and their receptors are involved in the stress-induced redistribution of PMNs from the hematopoietic tissue into the peripheral blood and that this phenomenon is directly regulated by interactions between cortisol and the GR/MR.

Considering the pivotal importance of neutrophilic granulocytes to the first line of defense, our results will not only be important for aquaculture, but they will also contribute to revealing the mechanisms involved in the stress-induced perturbation in neutrophil redistribution as often observed in clinical practice. Prominent examples are Cushing disease, characterized by increased secretion of ACTH, or glucocorticoid resistance/insensitivity of several common inflammatory diseases.

## Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://doi.org/10.57903/UJ/GM6MQF>, 10.57903/UJ/GM6MQF.

## Ethics statement

The animal study was approved by 2nd Local Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) in Krakow, Poland, license number 292/2017 and 246/2021. The study was conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements.

## Author contributions

KK: Writing – review & editing, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft. MMac: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. LP: Investigation, Methodology, Writing – review & editing. MMar: Investigation, Writing – review & editing. JH: Investigation, Methodology, Writing – review & editing. BMLVvK: Conceptualization, Writing – review & editing, Data curation. KR: Conceptualization, Writing – review & editing. MC: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

## Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This work

## References

- Wendelaar Bonga SE. The stress response in fish. *Physiol Rev.* (1997) 77:591–625. doi: 10.1152/physrev.1997.77.3.591
- Flik G, Klaren PHM, Van den Burg EH, Metz JR, Huising MO. CRF and stress in fish. *Gen Comp Endocrinol.* (2006) 146:36–44. doi: 10.1016/j.ygcen.2005.11.005
- Johnson EW, Hughes TK, Smith EM. ACTH enhancement of T-lymphocyte cytotoxic responses. *Cell Mol Neurobiol.* (2005) 25:743–57. doi: 10.1007/s10571-005-3972-8
- Schreck CB, Tort L. “The concept of stress in fish”. *Biol Stress fish: Fish Physiol.* (2016) . p:1–34. doi: 10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1
- Zinyama RB, Bancroft GJ, Sigola LB. Adrenaline suppression of the macrophage nitric oxide response to lipopolysaccharide is associated with differential regulation of tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10. *Immunology.* (2001) 104:439–46. doi: 10.1046/j.1365-2567.2001.01332.x
- Kepka M, Verburg-van Kemenade BML, Chadzinska M. Neuroendocrine modulation of the inflammatory response in common carp: Adrenaline regulates leukocyte profile and activity. *Gen Comp Endocrinol.* (2013) 188:102–9. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.11.014
- Van Weerd JH, Komen J. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comp Biochem Physiol Part A: Mol Integr Physiol.* (1998) 120:107–12. doi: 10.1016/S1095-6433(98)10017-X
- Pankhurst NW, Schreck CB, Tort L, Farrell AP, Brauner CJ, editors, vol. . p . London, United Kingdom: Academic Press (2016). p. 295–331. doi: 10.1016/B978-0-12-802728-8.00008-4
- Verburg-van Kemenade BML, Cohen N, Chadzinska M. Neuroendocrine-immune interaction: Evolutionarily conserved mechanisms that maintain allostasis in an ever-changing environment. *Dev Comp Immunol.* (2017) 66:2–23. doi: 10.1016/j.dci.2016.05.015
- Engelsma MY, Hougee S, Nap D, Hofenk M, Rombout JHWM, van Muiswinkel WB, et al. Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish Shellfish Immunol.* (2003) 15:397–410. doi: 10.1016/S1050-4648(03)00006-8
- Saffar AS, Ashdown H, Gounni AS. The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival. *Curr Drug Targets.* (2011) 12:556–62. doi: 10.2174/138945011794751555
- Dhabhar FS, Malarkey WB, Neri E, McEwen BS. Stress-induced redistribution of immune cells - From barracks to battlefields: A tale of three hormones—Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology.* (2012) 37:1345–68. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.05.008
- Falso PG, Noble CA, Diaz JM, Hayes TB. The effect of long-term corticosterone treatment on blood cell differentials and function in laboratory and wild-caught amphibian models. *Gen Comp Endocrinol.* (2015) 212:73–83. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.01.003
- Pijanowski L, Jurecka P, Irnazarow I, Kepka M, Szejewer E, Verburg-van Kemenade BML, et al. Activity of the hypothalamus–pituitary–interrenal axis (HPI axis) and immune response in carp lines with different susceptibility to disease. *Fish Physiol Biochem.* (2015) 41:1261–78. doi: 10.1007/s10695-015-0084-3

was supported by the Polish National Science Center [grant number 2019/33/B/NZ6/00402]. The open-access publication of this article was funded by the program “Excellence Initiative - Research University” at the Faculty of Biology of the Jagiellonian University in Kraków, Poland.”

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The author(s) declared that they were an editorial board member of Frontiers, at the time of submission. This had no impact on the peer review process and the final decision.

## Publisher’s note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2024.1330995/full#supplementary-material>

15. Weyts FAA, Flik G, Verburg-van Kemenade BML. Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes. *Dev Comp Immunol.* (1998) 22:563–72. doi: 10.1016/S0145-305X(98)00027-5
16. Hidalgo A, Chilvers ER, Summers C, Koenderman L. The neutrophil life cycle. *Trends Immunol.* (2019) 40:584–97. doi: 10.1016/j.it.2019.04.013
17. Witeska M, Kondera E, Szymañska M, Ostrysz M. Hematological changes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after short-term lead (Pb) exposure. *Polish J Environ Stud.* (2010) 19:825–31.
18. Rey Vázquez G, Guerrero GA. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue Cell.* (2007) 39:151–60. doi: 10.1016/j.tice.2007.02.004
19. Haugland GT, Rønneseth A, Gundersen L, Lunde HS, Nordland K, Wergeland HI. Neutrophils in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) are MHC class II+ and secret IL-12p40 upon bacterial exposure. *Aquac Fisheries.* (2024) 9:144–53. doi: 10.1016/j.aaf.2022.07.002
20. Rønneseth A, Wergeland HI, Pettersen EF. Neutrophils and B-cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish Shellfish Immunol.* (2007) 23:493–503. doi: 10.1016/j.fsi.2006.08.017
21. Henderson RB, Hobbs JAR, Mathies M, Hogg N. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood.* (2003) 102:328–35. doi: 10.1182/blood-2002-10-3228
22. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* (2013) 13:159–75. doi: 10.1038/nri3399
23. Bardeol BW, Kenny EF, Sollberger G, Zychlinsky A. The balancing act of neutrophils. *Cell Host Microbe.* (2014) 15:526–36. doi: 10.1016/j.chom.2014.04.011
24. Strydom N, Rankin SM. Regulation of circulating neutrophil numbers under homeostasis and in disease. *J Innate Immun.* (2013) 5:304–14. doi: 10.1159/000350282
25. Metzemaekers M, Gouwy M, Proost P. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cell Mol Immunol.* (2020) 17:433–50. doi: 10.1038/s41423-020-0412-0
26. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* (2010) 31:318–24. doi: 10.1016/j.it.2010.05.006
27. Hosoba S, Waller EK. New molecule for mobilizing marrow stem cells. *Blood.* (2014) 123:310–1. doi: 10.1182/blood-2013-12-538249
28. Walters KB, Green JM, Surfus JC, Yoo SK, Huttenlocher A. Live imaging of neutrophil motility in a zebrafish model of WHIM syndrome. *Blood.* (2010) 116:2803–11. doi: 10.1182/blood-2010-03-276972
29. Nomiya H, Hieshima K, Osada N, Kato-Unoki Y, Otsuka-Ono K, Takegawa S, et al. Extensive expansion and diversification of the chemokine gene family in zebrafish: Identification of a novel chemokine subfamily CX. *BMC Genomics.* (2008) 9:222. doi: 10.1186/1471-2164-9-222
30. van der Aa LM, Chadzinska M, Tijhaar E, Boudinot P, Verburg-van Kemenade BML. CXCL8 chemokines in teleost fish: two lineages with distinct expression profiles during early phases of inflammation. *PLoS One.* (2010) 5:e12384. doi: 10.1371/journal.pone.00112384
31. Chen J, Xu Q, Wang T, Collet B, Corripio-Miyar Y, Bird S, et al. Phylogenetic analysis of vertebrate CXC chemokines reveals novel lineage specific groups in teleost fish. *Dev Comp Immunol.* (2013) 41:137–52. doi: 10.1016/j.dci.2013.05.006
32. de Oliveira S, Reyes-Aldasoro CC, Candel S, Renshaw SA, Mulero V, Calado A. Cxcl8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. *J Immunol.* (2013) 190:4349–59. doi: 10.4049/jimmunol.1203266
33. Klak K, Maciuszek M, Marcinkowska M, Verburg-van Kemenade BML, Chadzinska M. The importance of CXC-receptors CXCR1-2 and CXCR4 for adaptive regulation of the stress axis in teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* (2022) 127:647–58. doi: 10.1016/j.fsi.2022.06.070
34. Pijanowski L, Verburg-van Kemenade BML, Irnazarow I, Chadzinska M. Stress-induced adaptation of neutrophilic granulocyte activity in K and R3 carp lines. *Fish Shellfish Immunol.* (2015) 47:886–92. doi: 10.1016/j.fsi.2015.10.030
35. Van Den Thillart G, Vianen G, Ponce MC, Lelieveld H, Nieveen M, Van Raaij M, et al. Differential role of adrenoceptors in control of plasma glucose and fatty acids in carp, *Cyprinus carpio* (L.). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* (2001) 281:R615–24. doi: 10.1152/ajpregu.2001.281.2.R615
36. Scott GR, Keir KR, Schulte PM. Effects of spironolactone and RU486 on gene expression and cell proliferation after freshwater transfer in the euryhaline killifish. *J Comp Physiol B.* (2005). doi: 10.1007/s00360-005-0014-2
37. Coelho FM, Pinho V, Amaral FA, Sachs D, Costa VV, Rodrigues DH, et al. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis Rheumatol.* (2008) 58:2329–37. doi: 10.1002/art.23622
38. Braber S, Overbeek SA, Koelink PJ, Henricks PAJ, Zaman GJR, Garssen J, et al. CXCR2 antagonists block the N-Ac-PGP-induced neutrophil influx in the airways of mice, but not the production of the chemokine CXCL1. *Eur J Pharmacol.* (2011) 668:443–9. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.03.025
39. Liu Q, Li Z, Gao J-L, Wan W, Ganesan S, McDermott DH, et al. The CXCR4 antagonist AMD3100 redistributes leukocytes from primary immune organs to secondary immune organs, lung, and blood in mice. *Eur J Immunol.* (2015) 45:1855–67. doi: 10.1002/eji.201445245
40. Goldenberg AJ, Gehrand AL, Waples E, Jablonski M, Hoeync B, Raff H. Effect of a melanocortin type 2 receptor (MC2R) antagonist on the corticosterone response to hypoxia and ACTH stimulation in the neonatal rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* (2018) 315:R128–33. doi: 10.1152/ajpregu.00009.2018
41. Szwajser E, Pijanowski L, Maciuszek M, Ptak A, Wartalski K, Duda M, et al. Stress differentially affects the systemic and leukocyte estrogen network in common carp. *Fish Shellfish Immunol.* (2017) 68:190–201. doi: 10.1016/j.fsi.2017.07.011
42. Nakayasu C, Omori M, Hasegawa S, Kurata O, Okamoto N. Production of a monoclonal antibody for carp (*Cyprinus carpio* L.) phagocytic cells and separation of the cells. *Fish Shellfish Immunol.* (1998) 8:91–100. doi: 10.1006/fsim.1997.0125
43. Forlenza M, Scharsack JP, Kachamakova NM, Taverne-Thiele AJ, Rombout JHWM, Wiegertjes GF. Differential contribution of neutrophilic granulocytes and macrophages to nitrosative stress in a host–parasite animal model. *Mol Immunol.* (2008) 45:3178–89. doi: 10.1016/j.molimm.2008.02.025
44. van der Aa LM, Chadzinska M, Golbach LA, Ribeiro CMS, Verburg-van Kemenade BML. Pro-inflammatory functions of carp CXCL8-like and CXCL8 chemokines. *Dev Comp Immunol.* (2012) 36:741–50. doi: 10.1016/j.dci.2011.11.011
45. Chadzinska M, Baginski P, Kolaczowska E, Savelkoul HFJ, Verburg-Van Kemenade BML. Expression profiles of matrix metalloproteinase 9 in teleost fish provide evidence for its active role in initiation and resolution of inflammation. *Immunology.* (2008) 125:601–10. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02874.x
46. Huising MO, van der Meulen T, Flik G, Verburg-Van Kemenade BML. Three novel carp CXC chemokines are expressed early in ontogeny and at nonimmune sites. *Eur J Biochem.* (2004) 271:4094–106. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04347.x
47. Huising MO, Stolte E, Flik G, Savelkoul HFJ, Verburg-Van Kemenade BML. CXC chemokines and leukocyte chemotaxis in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev Comp Immunol.* (2003) 27:875–88. doi: 10.1016/S0145-305X(03)00082-X
48. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* (2001) 29:e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
49. Dhabhar FS, Miller AH, McEwen BS, Spencer RL. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. *Role adrenal Steroid hormones.* *J Immunol.* (1996) 157:1638–44. doi: 10.4049/jimmunol.157.4.1638
50. Tang L, Cai N, Zhou Y, Liu Y, Hu J, Li Y, et al. Acute stress induces an inflammation dominated by innate immunity represented by neutrophils in mice. *Front Immunol.* (2022) 13:1014296. doi: 10.3389/fimmu.2022.1014296
51. Dhabhar FS. The short-term stress response – Mother nature’s mechanism for enhancing protection and performance under conditions of threat, challenge, and opportunity. *Front Neuroendocrinol.* (2018) 49:175–92. doi: 10.1016/j.jfyne.2018.03.004
52. Poller WC, Downey J, Mooslechner AA, Khan N, Li L, Chan CT, et al. Brain motor and fear circuits regulate leukocytes during acute stress. *Nature.* (2022) 607:578–84. doi: 10.1038/s41586-022-04890-z
53. Ellsaesser CF, Clem LW. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *J Fish Biol.* (1986) 28:511–21. doi: 10.1111/j.1095-8649.1986.tb05187.x
54. Grzelak AK, Davis DJ, Caraker SM, Crim MJ, Spitsbergen JM, Wiedmeyer CE. Stress leukogram induced by acute and chronic stress in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Med.* (2017) 67:263–9.
55. Zieziulewicz TJ, Mondal TK, Gao D, Lawrence DA. Stress-induced effects, which inhibit host defenses, alter leukocyte trafficking. *Cell Stress Chaperones.* (2013) 18:279–91. doi: 10.1007/s12192-012-0380-0
56. Kvetniánský R, Pacák K, Sabban EL, Kopin IJ, Goldstein DS. Stressor specificity of peripheral catecholaminergic activation. *Adv Pharmacol.* (1997) 42:556–60. doi: 10.1016/S1054-3589(08)60811-X
57. Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye’s doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* (1998) 275:R1247–55. doi: 10.1152/ajpregu.1998.275.4.R1247
58. Hatefi A, Zare Shahneh A, Ansari Pirsaraie Z, Alizadeh AM, Atashnak MP, Masoudi R, et al. The stimulation and inhibition of beta-2 adrenergic receptor on the inflammatory responses of ovary and immune system in the aged laying hens. *BMC Vet Res.* (2021) 17:195. doi: 10.1186/s12917-021-02892-z
59. Silva RL, Castanheira FV, Figueiredo JG, Bassi GS, Ferreira SH, Cunha FQ, et al. Pharmacological beta-adrenergic receptor activation attenuates neutrophil recruitment by a mechanism dependent on nicotinic receptor and the spleen. *Inflammation.* (2016) 39:1405–13. doi: 10.1007/S10753-016-0372-9
60. Bouw E, Huisman M, Neggers SJCMM, Themmen APN, van der Lely AJ, Delhanty PJD. Development of potent selective competitive-antagonists of the melanocortin type 2 receptor. *Mol Cell Endocrinol.* (2014) 394:99–104. doi: 10.1016/j.mce.2014.07.003
61. Catania A, Rajora N, Capsoni F, Minonzio F, Star RA, Lipton JM. The neuropeptide  $\alpha$ -MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis in vitro. *Peptides.* (1996) 17:675–9. doi: 10.1016/0196-9781(96)00037-X
62. Zhang C, Chery S, Lazerson A, Altman NH, Jackson R, Holt G, et al. Anti-inflammatory effects of  $\alpha$ -MSH through p-CREB expression in sarcoidosis like granuloma model. *Sci Rep.* (2020) 10:7277. doi: 10.1038/s41598-020-64305-9

63. Alemi H, Wang S, Blanco T, Kahale F, Singh RB, Ortiz G, et al. The neuropeptide  $\alpha$ -Melanocyte-Stimulating Hormone prevents persistent corneal edema following injury. *Am J Pathol.* (2024) 194:150–64. doi: 10.1016/j.ajpath.2023.09.007
64. Carter JR, Goldstein DS. Sympathoneural and adrenomedullary responses to mental stress. *Compr Physiol.* (2015) 5:119–46. doi: 10.1002/cphy.c140030
65. Stolte EH, de Mazon AF, Leon-Koosterziel KM, Jesiak M, Bury NR, Sturm A, et al. Corticosteroid receptors involved in stress regulation in common carp, *Cyprinus carpio*. *J Endocrinol.* (2008) 198:403–17. doi: 10.1677/JOE-08-0100
66. Link D. Mechanisms of neutrophil release from the bone marrow. *Blood.* (2013) 122:SCI-43. doi: 10.1182/blood.V122.21.SCI-43.SCI-43
67. Xu R, Bao C, Huang H, Lin F, Yuan Y, Wang S, et al. Low expression of CXCR1/2 on neutrophils predicts poor survival in patients with hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure. *Sci Rep.* (2016) 6:38714. doi: 10.1038/srep38714
68. De Filippo K, Rankin SM. CXCR4, the master regulator of neutrophil trafficking in homeostasis and disease. *Eur J Clin Invest.* (2018) 48:e12949. doi: 10.1111/eci.12949
69. Isles HM, Herman KD, Robertson AL, Loynes CA, Prince LR, Elks PM, et al. The CXCL12/CXCR4 signaling axis retains neutrophils at inflammatory sites in zebrafish. *Front Immunol.* (2019) 10:1784. doi: 10.3389/fimmu.2019.01784
70. Paredes-Zúñiga S, Morales RA, Muñoz-Sánchez S, Muñoz-Montecinos C, Parada M, Tapia K, et al. CXCL12a/CXCR4b acts to retain neutrophils in caudal hematopoietic tissue and to antagonize recruitment to an injury site in the zebrafish larva. *Immunogenetics.* (2017) 69:341–9. doi: 10.1007/s00251-017-0975-9
71. Avniel S, Arik Z, Maly A, Sagie A, Basst HB, Yahana MD, et al. Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the recovery of skin following burns. *J Invest Dermatol.* (2006) 126:468–76. doi: 10.1038/sj.jid.5700069
72. Liu H, Liu H, Deng X, Chen M, Han X, Yan W, et al. CXCR4 antagonist delivery on decellularized skin scaffold facilitates impaired wound healing in diabetic mice by increasing expression of SDF-1 and enhancing migration of CXCR4-positive cells. *Wound Repair Regen.* (2017) 25:652–64. doi: 10.1111/wrr.12552
73. Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity.* (2002) 17:413–23. doi: 10.1016/S1074-7613(02)00424-7
74. Lévesque J-P, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest.* (2003) 111:187–96. doi: 10.1172/JCI15994
75. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol.* (2002) 3:687–94. doi: 10.1038/ni813
76. Pusic I, DiPersio JF. Update on clinical experience with AMD3100, an SDF-1/CXCL12–CXCR4 inhibitor, in mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Opin Hematol.* (2010) 17:319–26. doi: 10.1097/MOH.0b013e328338b7d5
77. Hendrix CW, Collier AC, Lederman MM, Schols D, Pollard RB, Brown S, et al. Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* (2004) 37:1253–62. doi: 10.1097/01.qai.0000137371.80695.ef
78. Hersh TA, Dimond AL, Ruth BA, Lupica NV, Bruce JC, Kelley JM, et al. A role for the CXCR4–CXCL12 axis in the little skate, *Leucoraja erinacea*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* (2018) 315:R218–29. doi: 10.1152/ajpregu.00322.2017
79. Dhabhar FS. Stress, leukocyte trafficking, and the augmentation of skin immune function. *Ann New York Acad Sci.* (2003) 992:205–17. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb03151.x
80. Evrard M, Kwok IWH, Chong SZ, Teng KWW, Becht E, Chen J, et al. Developmental analysis of bone marrow neutrophils reveals populations specialized in expansion, trafficking, and effector functions. *Immunity.* (2018) 48:364–79. doi: 10.1016/j.immuni.2018.02.002
81. Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature.* (2015) 525:528–32. doi: 10.1038/nature15367
82. Uhl B, Vadlauer Y, Zuchtriegel G, Nekolla K, Sharaf K, Gaertner F, et al. Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood.* (2016) 128:2327–37. doi: 10.1182/blood-2016-05-718999
83. Devi S, Wang Y, Chew WK, Lima R, A-González N, Mattar CNZ, et al. Neutrophil mobilization via plerixaformidated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. *J Exp Med.* (2013) 210:2321–36. doi: 10.1084/jem.20130056
84. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukocyte Biol.* (2002) 72:847–55. doi: 10.1189/jlb.72.5.847
85. Sarmiento J, Shumate C, Suetomi K, Ravindran A, Villegas L, Rajarathnam K, et al. Diverging mechanisms of activation of chemokine receptors revealed by novel chemokine agonists. *PLoS One.* (2011) 6:e27967. doi: 10.1371/journal.pone.0027967
86. Richardson RM, Marjoram RJ, Barak LS, Snyderman R. Role of the cytoplasmic tails of CXCR1 and CXCR2 in mediating leukocyte migration, activation, and regulation. *J Immunol.* (2003) 170:2904–11. doi: 10.4049/jimmunol.170.6.2904
87. Viola A, Luster AD. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* (2008) 48:171–97. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.121806.154841
88. Nasser MW, Raghuvanshi SK, Grant DJ, Jala VR, Rajarathnam K, Richardson RM. Differential activation and regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL8 monomer and dimer. *J Immunol.* (2009) 183:3425–32. doi: 10.4049/jimmunol.0900305
89. Martin C, Burdon PCE, Bridger G, Gutierrez-Ramos J-C, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity.* (2003) 19:583–93. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00263-2
90. Pruijt JFM, Fibbe WE, Laterveer L, Pieters RA, Lindley IJD, Paemen L, et al. Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the Metalloproteinase gelatinase B (MMP-9). *Proc Natl Acad Sci.* (1999) 96:10863–8. doi: 10.1073/pnas.96.19.10863
91. D'Haese A, Wuyts A, Dillen C, Dubois B, Billiau A, Heremans H, et al. *In vivo* neutrophil recruitment by granulocyte chemotactic protein-2 is assisted by gelatinase B/MMP-9 in the mouse. *J Interferon Cytokine Res.* (2000) 20:667–74. doi: 10.1089/107999000414853
92. Starckx S, Van den Steen PE, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B and chemokines in leukocytosis and stem cell mobilization. *Leuk Lymphoma.* (2002) 43:233–41. doi: 10.1080/10428190290005982
93. Van den Steen PE, Wuyts A, Husson SJ, Proost P, Van Damme J, Opdenakker G. Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *Eur J Biochem.* (2003) 270:3739–49. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03760.x
94. Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* (2013) 48:222–72. doi: 10.3109/10409238.2013.770819

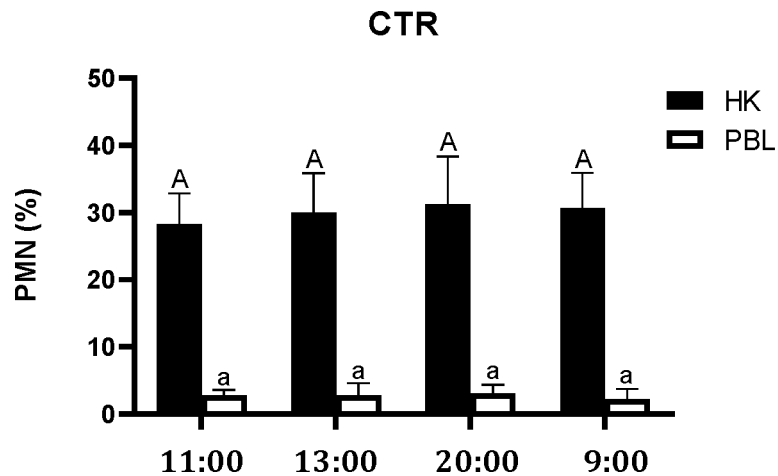
## *Supplementary Material*

### 1 Supplementary Tables

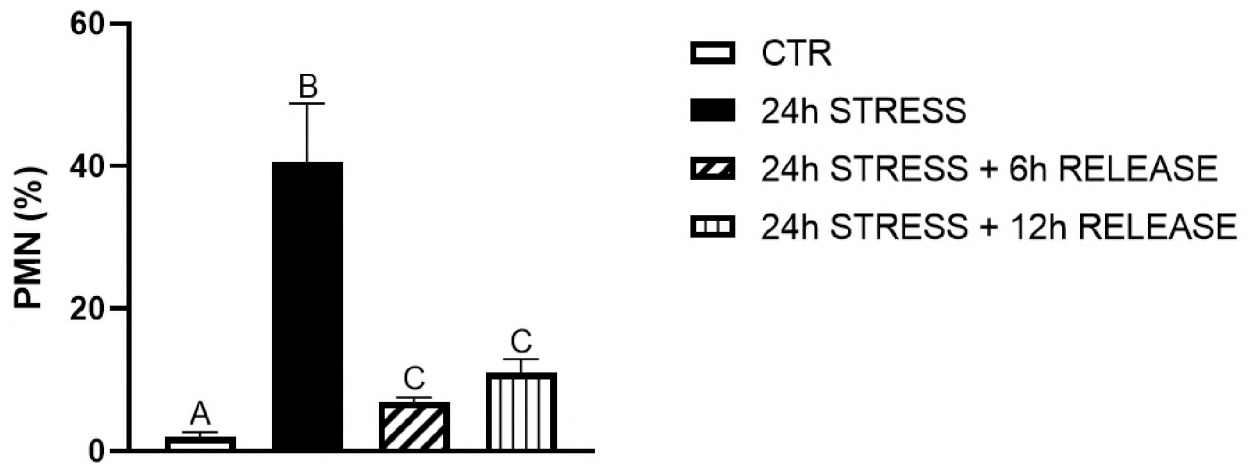
**Supplementary Table 1.** Primers sequences, corresponding accession numbers, concentrations and references.

<b>Gene (Acc.no)</b>	<b>Primer nucleotide sequences (5'-3')</b>	<b>μM</b>	<b>References</b>
<i>40s11</i> (AB012087)	F: CCGTGGGTGACATCGTTACA R: TCAGGACATTGAACCTCACTGTCT	1	Huising et al., 2003, 2004; Chadzinska et al., 2008; van der Aa et al., 2010, 2012; Klak et al., 2022
<i>excl12a</i> (AJ627274)	F: CACCGTCACAGATATGTACCATATAGTC R: GGTGGTCTTTTGCAGAGTCATTT	1	Huising et al., 2004; Klak et al., 2022
<i>excl12b</i> (AJ536027.3)	F: GAGGAGGACCACCATGCATCT R: TTGTGCAAGCAGTCCAGAAGA	1	Huising et al., 2004; Klak et al., 2022
<i>excr4</i> (AB012310.1)	F: CGGTGTCTGCGTTCATCTATT R: TTCTTTTGGGAAGCCCATCAC	1	Klak et al., 2022
<i>excl8_11</i> (AJ421443)	F: CTGGGATTCCTGACCATTGGT R: GTTGGCTCTCTGTTTCAATGCA	1	Chadzinska et al., 2008, van der Aa et al., 2010, 2012, Klak et al., 2022
<i>excl8_12</i> (AB470924)	F: TCACTTCACTGGTGTGCTC R: GGAATTGCTGGCTCTGAATG	1	van der Aa et al., 2010, 2012; Klak et al., 2022
<i>excr1</i> (AB010468)	F: GCAAATGGTTAGCCTGGTGA R: AGGCGACTCCACTGCACAA	1	Huising et al., 2003; Chadzinska et al., 2008, van der Aa et al., 2010, 2012, Klak et al., 2022
<i>excr2</i> (AB010713)	F: TATGTGCAAACCTGATTTTCAGGCTTAC R: GCACACACTATACCAACCAGATGG	1	Huising et al., 2003, van der Aa et al., 2010, 2012; Klak et al., 2022
<i>mmp9</i> (AB057407)	F: ATGGGAAAAGATGGACTGCTG R: TCAAACAGGAAGGGGAAGTG	2,25	Chadzinska et al., 2008
<i>gcsfr-1</i> (MH262557)	F: GGGCAGCAACTACACAGGA R: AGCACCATAGAGGCAGGAG	1	

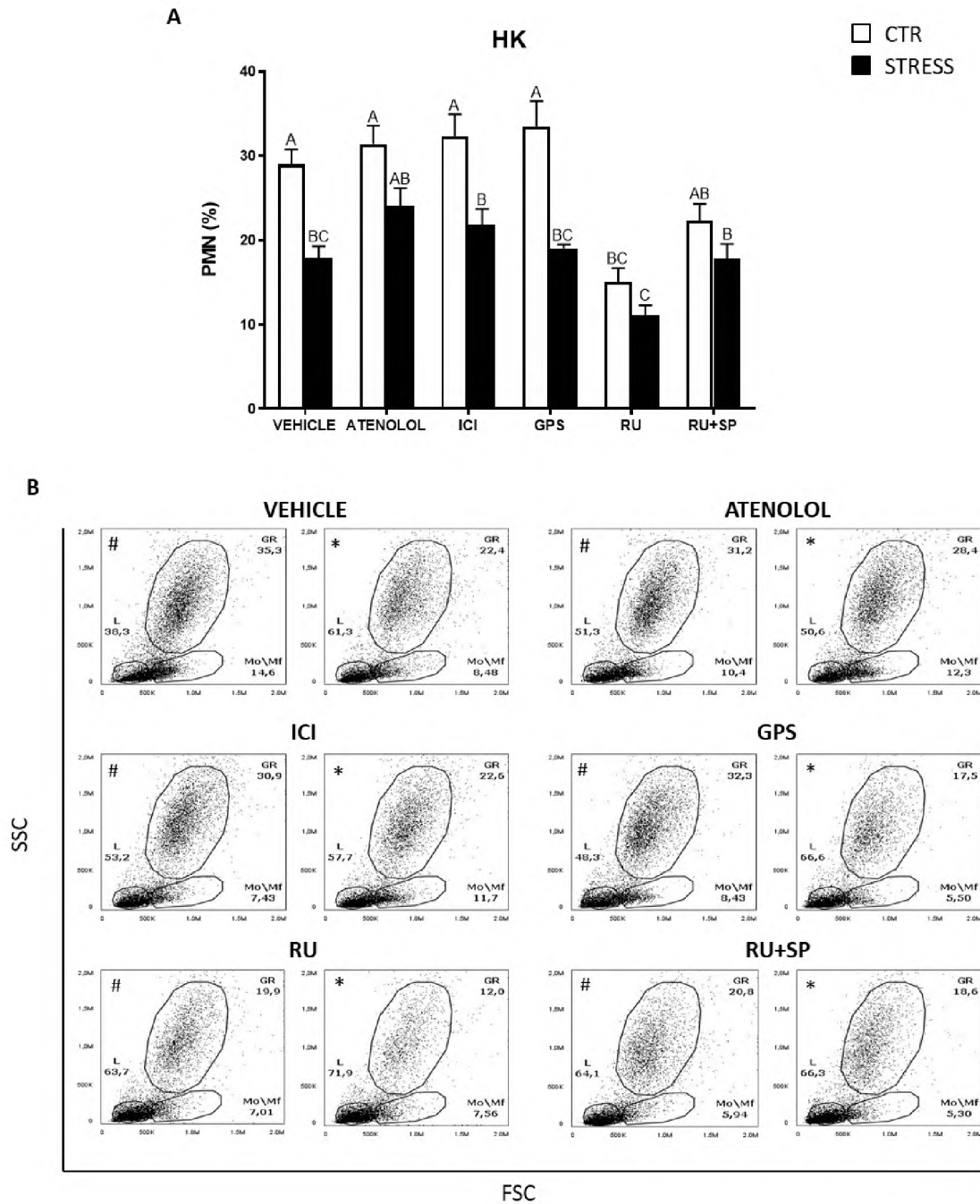
2 Supplementary Figures



**Supplementary Figure 1.** Percentage of neutrophils (PMNs) in the head kidney (HK) and in peripheral blood (PBL) leukocytes of unstressed fish (CTR) sampled at different time points of the day. Fish were kept at 12L:12D light regime. Data are presented as mean  $\pm$  standard error (SE) (n = 3-4). Mean values sharing letters indicate no statistically significant differences between groups.

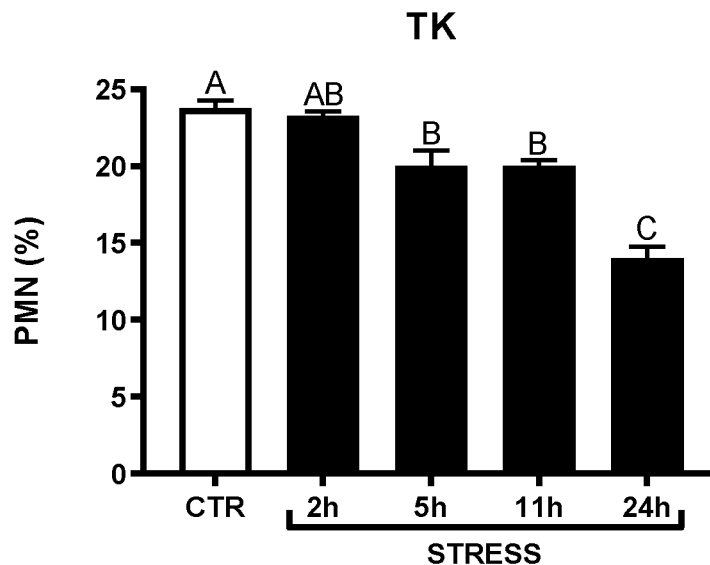


**Supplementary Figure 2.** The effect of restraint stress and subsequent recovery the percentage of neutrophils (PMN) in peripheral blood leukocytes (PBL) of common carp. Fish were left undisturbed (CTR) or stressed by restraint for 24 h (24 h STRESS). To study the stress recovery process, after 24 h of restraint, one group of fish was released back into the water for 6 h (24 h STRESS + 6h RELEASE) while another group was released for 12 h (24 h STRESS + 12h RELEASE). The percentage of PMNs was measured by flow cytometry based on cell size (FSC) and granularity (SSC). Data are presented as mean  $\pm$  standard error (SE) (n = 4-12). Mean values not sharing letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ).

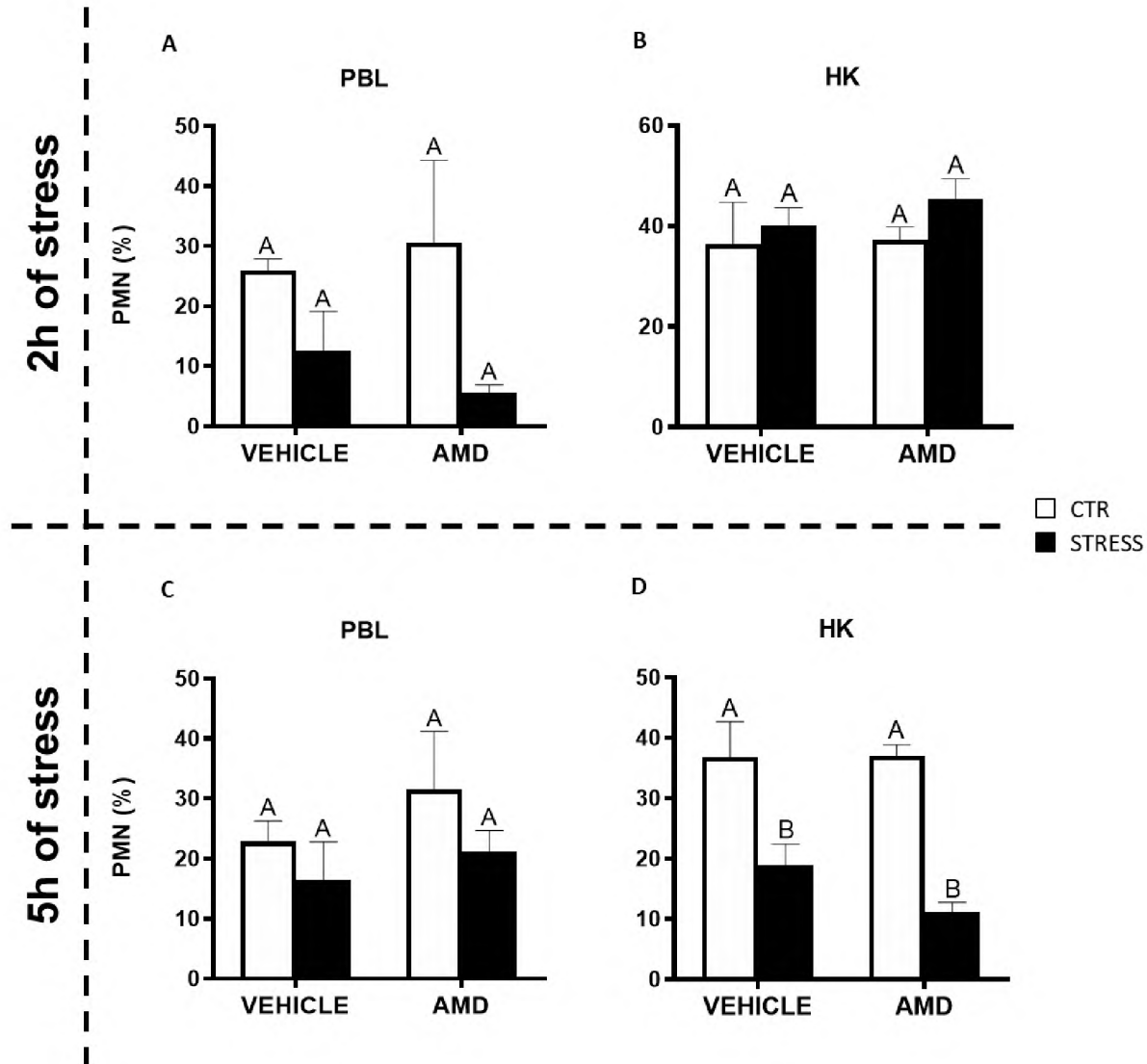


**Supplementary Figure 3.** The *in vivo* effects of ADR, MC2R, GR and MR antagonists on changes in neutrophilic granulocytes (PMN) percentage in the head kidney (HK) of common carp. 1 hour before stress, fish were i.p. pretreated with:  $\beta$ 1-ADR antagonist (atenolol, 0.213 mg/kg b.w.),  $\beta$ 2-ADR antagonist (ICI-118,551, ICI, 0.25 mg/kg b.w.), MC2R antagonist (GPS1573, GPS, 1 mg/kg b.w.) or with antagonist of GRs (RU-486, 2 mg/kg b.w.) or with antagonists of GRs and MRs (RU-486 and Spironolactone, RU-486+SP, each 2 mg/kg b.w.). Control animals were treated with vehicle (DMSO). Subsequently, fish were stressed (11 h of restraint, STRESS). Antagonist- or vehicle-treated but unstressed control fish (CTR) were sampled 12 h post-injection. The percentage of PMNs was measured by flow cytometry based on cell size (FSC) and granularity (SSC). Data are presented as

mean  $\pm$  standard error (SE) (n = 6-8). Mean values not sharing letters (e.g. A vs B) indicate statistically significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ). (B) Representative dot plots of HK from unstressed or stressed (11 h) fish treated with vehicle (VEHICLE) or antagonist (ATENOLOL, ICI, GPS, RU-486, RU-486+SP). # - dot plots from control unstressed fish, \* - dot plots from fish stressed 11 h.



**Supplementary Figure 4.** Restraint stress-induced changes in the redistribution of neutrophils (PMN) in the trunk kidney (TK) of common carp. Unstressed control fish and stressed fish were sampled at 2, 5, 11 or 24 h of the experiments. The percentage of PMNs was measured by flow cytometry in control unstressed fish (CTR, white bar) and stressed fish (STRESS, black bars) based on cell size (FSC) and granularity (SSC). Data are presented as mean  $\pm$  standard error (SE) (n  $\geq$  5). Mean values not sharing letters (e.g. A vs B) indicate statistically significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ).



**Supplementary Figure 5.** The *in vivo* effect of CXCR4 blocking on the percentage of neutrophils (PMN) in peripheral blood leukocytes (PBL) and the head kidney (HK) of common carp. 1 hour before stress, fish were i.p. pretreated with a selective inhibitor of CXCR4 (AMD3100, AMD, 1 mg/kg b.w.) or with vehicle (PBS). Subsequently, fish were stressed for 2 h (A, B) or 5 h (C, D) by restraint procedure (STRESS, black bars). Inhibitor- or vehicle-treated but unstressed control fish (CTR, white bars) were sampled at the same time points post-injection (3 h or 6 h). The percentage of PMNs was measured by flow cytometry based on cell size (FSC) and granularity (SSC). Data are presented as mean  $\pm$  standard error (SE) (n = 3-4). Mean values not sharing letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ).

3. **Klak K., Maciuszek M., Michalik A., Mazur M., Zawisza M., Pecio A., Nowak B., Chadzinska M. Fire in the belly: stress and antibiotics induce dysbiosis and inflammation in the gut of common carp. *Fish & Shellfish Immunology*. 2025, 161:11030.**

Badania na ssakach wykazały, że stres zmienia skład mikrobioty jelitowej, zwiększając liczbę bakterii wywołujących stan zapalny jelit.

Celem pracy było sprawdzenie wpływu antybiotyków i stresu na skład i różnorodność mikrobioty jelitowej, aktywację osi stresu mierzoną jako wzrost poziomu kortyzolu w surowicy oraz rozwój reakcji zapalnej w jelitach. W celu wywołania dysbiozy karpie traktowano przez 48 godzin mieszanką antybiotyków o szerokim spektrum (neomycyna, metronidazol, wankomycyna, ampicylina). W 24 godzinie procedury część ryb została poddana 24-godzinnemu stresowi unieruchomienia.

Wykazano, że zarówno antybiotyki jak i stres zwiększają poziom kortyzolu w surowicy oraz w różnym stopniu zmieniają skład i różnorodność mikrobioty jelitowej. Antybiotyki wywołały dysbiozę charakteryzującą się obniżeniem liczebności bakterii z rodzaju *Aeromonas*, *Bacteroides*, *Barnesiellaceae*, *Cetobacterium* i *Shewanella* przy jednoczesnym zwiększeniu liczebności bakterii z rodzaju *Flavobacterium*. Stres w mniejszym stopniu wpłynął na zmiany w mikrobiomie, powodując obniżenie liczebności bakterii *Cetobacterium* i zwiększenie liczby bakterii z rodzaju *Vibrio*. Z kolei połączenie antybiotykoterapii i stresu wywołało dysbiozę charakteryzującą się przewagą niekorzystnych rodzajów bakterii (*Brevinema*, *Flavobacterium* i *Desulfovibrionaceae*). Jednocześnie w jelitach zaobserwowano zwiększoną ekspresję genów kodujących mediatory prozapalne i cytokiny zaangażowane w odpowiedź zależną od limfocytów Th17. W jelitach ryb potraktowanych antybiotykami i stresowanymi zaobserwowano także zmiany morfologiczne wskazujące na rozwój reakcji zapalnej, w tym wzrost liczebności komórek kubkowych i pręcikowych oraz zwiększony naciek neutrofilii.

Wyniki te wskazują, że antybiotyki i stres wywołują zmiany w mikrobiocie jelitowej karpia, które prowadzą do dysbiozy. Z kolei dysbioza i stres wywołują zależne od limfocytów Th17 zapalenie jelit, które manifestuje się zwiększoną migracją/napływem neutrofilii.



Full length article

## Fire in the belly: Stress and antibiotics induce dysbiosis and inflammation in the gut of common carp

Katarzyna Klak<sup>a,b,1</sup> , Magdalena Maciuszek<sup>a,1</sup> , Anna Michalik<sup>c</sup>, Mikolaj Mazur<sup>a,b</sup> ,  
 Maria Zawisza<sup>a,b</sup> , Anna Pecio<sup>d</sup>, Barbara Nowak<sup>e</sup> , Magdalena Chadzinska<sup>a,\*</sup> 

<sup>a</sup> Department of Evolutionary Immunology, Institute of Zoology and Biomedical Research, Faculty of Biology, Jagiellonian University, Krakow, Poland

<sup>b</sup> Doctoral School of Exact and Natural Sciences, Jagiellonian University, Krakow, Poland

<sup>c</sup> Department of Invertebrate Development and Morphology, Institute of Zoology and Biomedical Research, Faculty of Biology, Jagiellonian University, Krakow, Poland

<sup>d</sup> Department of Comparative Anatomy, Institute of Zoology and Biomedical Research, Faculty of Biology, Jagiellonian University, Krakow, Poland

<sup>e</sup> Institute for Marine and Antarctic Studies - Launceston, University of Tasmania, Launceston, Tasmania, Australia



## ARTICLE INFO

## Keywords:

Common carp

Restraint stress

Antibiotic-induced dysbiosis

Gut inflammation

Th17

Gut microbiota

Interleukin 17

## ABSTRACT

Fish are exposed to numerous stressors which negatively affect their immune response and increase infection susceptibility. The risk of bacterial infections results in the excessive and preventive use of antibiotics. Therefore, we aimed to study how antibiotic treatment and restraint stress will affect the stress response, microbiota composition, gut morphology, and inflammatory reaction in common carp.

Both restraint stress and antibiotic treatment increased cortisol level. Moreover, antibiotics induced dysbiosis in fish gut, manifested by a decrease in the total abundance of bacteria, and a shift in bacteria diversity, including a reduced number of *Aeromonas*, *Bacteroides*, *Barnesiellaceae*, *Cetobacterium* and *Shewanella* and an increased abundance of *Flavobacterium*. To a lesser extent, stress modified gut microbiota, as it decreased bacteria number and slightly changed the microbiota composition by decreasing *Cetobacterium* abundance and increasing *Vibrio* abundance. Microbiota of the antibiotic-treated and stressed fish shifted from the beneficial bacterial genera – *Cetobacterium* and *Bacteroides*, to the increased presence of unfavorable bacteria such as *Brevinema*, *Flavobacterium* and *Desulfobivibrionaceae*.

Stress and antibiotic-induced changes in the gut microbiota were related to the changes in the gut morphology when the higher abundance of goblet and rodlet cells and increased secretion activity of goblet cells were observed. Moreover, up-regulation of the expression of genes encoding pro-inflammatory mediators and cytokines involved in the Th17 immune response was present in the gut of the antibiotic-treated and stressed fish.

We conclude that in carp antibiotics and stress alter the abundance and composition of the microbiota and induce Th17-dependent inflammatory reaction in the gut. Moreover, our results strongly suggest the interplay of the stress axis and the brain-gut-microbiota axis.

## 1. Introduction

The recognition of the gut microbiota as a fundamental player in host physiology and pathology has revolutionized research in many fields, especially in immunology. Microbiota consists of a range of microorganisms, and in healthy individuals, there is a dynamic balance between symbiotic and pathogenic microorganism communities, which reside on the mucosal surfaces, including the gut in all vertebrate groups [1–3]. In

exchange for a niche in a nutrition-sufficient environment, the microbiota covers a wide range of functions, including indigestible nutrient metabolism (e.g., carbohydrates into short-chain fatty acids, SCFAs) [4, 5], regulation of development [6,7], and immune response [7–9]. It must be emphasized that microbiota modulates immune response not only locally, in the mucosa, but also at the systemic level, by its influence on innate immune cell production and activity [3,7,10]. The impact of the microbiota on systemic immunity has been extensively studied but

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [katarzyna.klak@doctoral.uj.edu.pl](mailto:katarzyna.klak@doctoral.uj.edu.pl) (K. Klak), [magdalena.maciuszek@uj.edu.pl](mailto:magdalena.maciuszek@uj.edu.pl) (M. Maciuszek), [a.michalik@uj.edu.pl](mailto:a.michalik@uj.edu.pl) (A. Michalik), [mikolaj.mazur@doctoral.uj.edu.pl](mailto:mikolaj.mazur@doctoral.uj.edu.pl) (M. Mazur), [maria.zawisza@doctoral.uj.edu.pl](mailto:maria.zawisza@doctoral.uj.edu.pl) (M. Zawisza), [anna.pecio@uj.edu.pl](mailto:anna.pecio@uj.edu.pl) (A. Pecio), [b.nowak@utas.edu.au](mailto:b.nowak@utas.edu.au) (B. Nowak), [magdalena.chadzinska@uj.edu.pl](mailto:magdalena.chadzinska@uj.edu.pl) (M. Chadzinska).

<sup>1</sup> Contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2025.110301>

Received 27 September 2024; Received in revised form 12 March 2025; Accepted 26 March 2025

Available online 27 March 2025

1050-4648/© 2025 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

has not yet been fully understood. However, it is well-known that the maintenance of an immune system interdependent on the microbiota is very complex. In humans, the breakdown of the normal microbial community increases the risk of pathogen overgrowth and inflammatory diseases [3]. The failure to control immunity misdirects response against self, microbiota-derived or environmental antigens [3]. For example, it is now commonly understood that the gut resident microbiota controls the growth of lymphocyte subsets, including T helper cells. A particular lineage of CD4<sup>+</sup> Th cells known as T helper 17 (Th17) cells is essential for host defense and plays a role in the onset of autoimmune illness by generating the proinflammatory cytokines such as interleukin-17A (IL-17A), IL-17F, and IL-22, which are involved in neutrophilia, production of antimicrobial proteins, as well as tissue remodeling and repair [11]. In contrast to Th1 and Th2 cells, Th17 cells preferentially aggregate in the colon, suggesting that gut-intrinsic processes may regulate their formation/maturation. In line with this theory, germ-free mice or those treated with antibiotics have significantly fewer intestinal Th17 cells [12–15]. In addition to their protective function, Th17 cells are also known to exert pathological effects during intestinal inflammation e.g., in Crohn's disease [16].

Many studies demonstrated that exposure to stressors also significantly affects the gut microbiota [17–19]. In mammals, elevated plasma cortisol has been associated with changes in the diversity of the intestinal microbiota [20]. In this case, commonly observed trends include decreased alpha-diversity and shifts in the relative abundance of the dominant phyla *Bacteroidetes* and *Firmicutes*, with increases in potentially pathogenic and facultative anaerobic *Proteobacteria* [17,19,21–23]. Stress exposure has also been shown to cause significant reductions in the highly abundant intestinal bacteria, including the beneficial *Lactobacillus* genus [24]. Moreover, interactions between stress and microbiota were found to be bidirectional as shown in the study on mice, where stressed germ-free animals exerted substantially increased hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) responsiveness compared to mice raised with a normal functional microbiota [25,26].

Moreover, glucocorticoids have been shown to exhibit both beneficial and deleterious effects on intestinal barrier function [27]. For example, in patients with active Crohn's disease, glucocorticoids induced inflammation remission, which has been associated with beneficial effects on intestinal barrier permeability [28]. In contrast, in acute stress studies, increased intestinal permeability was connected with high endogenous cortisol levels [29,30]. Therefore, the outcomes of the treatment with glucocorticoids are not entirely understood in the studies on intestinal barrier function. Some authors showed barrier function reinforcement after glucocorticoid treatment [31,32], while others reported glucocorticoid-induced augmentation of intestinal permeability and bacteria translocation into the inner milieu [33–38]. The potential of the microbiota-gut-brain axis as a therapeutic target gained therefore much interest in the context of ameliorating stress-related disorders [39]. Considering the long coevolutionary history of symbiotic microbes and vertebrates [40,41], the existence of a bidirectional relationship between intestinal microbial communities and the highly conserved vertebrate neuroendocrine stress axis should not be surprising. However, this complex interplay is still not well understood while modern and highly contextual coevolutionary pressures (e.g., stressful environment, microbial resistance or shifts due to extensive use of antibiotics and/or glucocorticoids) do not simplify this research field [20,27].

In aquatic environments, fish are exposed to numerous external factors that challenge their allostasis. These factors include various stressors, poor diet, antibiotic therapy or pollution, unsuitable environmental conditions, as well as exposure to pathogens [42]. Among responses to a perceived stressor, in fish, the hypothalamus-pituitary-head kidney axis is activated, resulting in the release of cortisol from the head kidney interrenal cells [43,44]. The microbiota of fish, especially their intestinal tract, has been intensively studied, however, data concerning stress-microbiota interactions in fish are still very limited.

Recently, Uren Webster and colleagues [18] found that in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry, a stress-induced increase in cortisol concentration was associated with changes in the diversity and composition of the gut microbiota. Notably, these changes included a reduced abundance of probiotic lactic acid bacteria and an increased number of several bacteria genera with pro-inflammatory and opportunistic properties [18]. Moreover, Zha et al. [45] have found that predation stress increased the number of *Fusobacteria* in perch (*Perca fluviatilis*) gut microbiota; this change has been suggested to be associated with inflammatory disease etiology/progression.

Previous research has shown that, unlike mammals, fish have the lowest co-phylogeny pattern with microbial species, which most likely is an outcome of a greater number of transitory environmental bacteria [40]. In Cyprinids, with particular emphasis on common carp (*Cyprinus carpio* L.), the dominant bacterial phyla of the intestinal microbiota are *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, and *Fusobacteria* [46–49]. Interestingly, studies describing the composition of common carp healthy gut microbiota showed a relatively high abundance of *Aeromonas* species, including *A. hydrophila* [50,51]. Their presence and function during homeostasis may be explained by the high cellulolytic activity of the intestinal microbiota in the common carp, while the genus *Aeromonas* was described as the most important bacteria producing cellulase [42].

In this study, we determined the effects of acute prolonged restraint stress on common carp intestinal microbiota, as well as the consequences of stress- and antibiotic-induced dysbiosis for host welfare and health. We investigated the intestinal microbiota composition and analyzed histological changes in the gut, gene expression profiles and immune status of fish.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Sexually immature individuals of common carp (*Cyprinus carpio* L.; body weight (b.w.) 70–120 g, 8–10 months old, mixed sex; line R3xR8) were obtained from the Institute of Ichthyobiology and Aquaculture, Polish Academy of Science, Golysz, Poland. Fish were acclimated for 4 weeks in tanks with recirculating tap water (dissolved oxygen level of approximately 5 mg/l) at the Institute of Zoology and Biomedical Research in Krakow, Poland. Continuous aeration at 21 °C and 12L:12D light/dark cycle were used. The tap water was previously dechlorinated and disinfected using UV by the water supplier. Fish were kept in tanks (volume 375 l, flow rate 4 l/min, density 45 fish/tank and 9 kg/m<sup>3</sup>) and fed pelleted dry commercial feed (Aller Master, Aller Aqua, Czarna Dabrowka, Poland) daily at 1% of their estimated body weight. None of the fish had been treated with any antibiotics before inclusion in this study. All fish in the animal facility were subjected to regular veterinary and microbiological inspections to confirm their health. To avoid additional stress and/or differences in handling, all sampling was performed by the same person and at the same time of day. All fish were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the relevant national and local animal welfare bodies. All procedures were approved by the local ethical committee (2nd Local Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) in Krakow, Poland, license number 227/2023).

### 2.2. Antibiotic treatment and restraint stress challenge

After acclimation, 24 experimental healthy common carp individuals were assigned haphazardly into 4 groups and placed in the new individual tanks with aerated tap water that was taken for the experiment from the pool in which the fish were previously kept and tanks were maintained under identical environmental conditions (e.g., 21 °C, photoperiod, and water quality) to prevent environmental factors from acting as confounding variables. Each group comprised 3 fish in

duplicated tanks. After 24-h acclimation in experimental tanks, a broad-spectrum antibiotic cocktail, containing vancomycin (0.01 g/L, Sigma Aldrich/Merck, MO, USA), neomycin (0.5 g/L, Sigma Aldrich/Merck, MO, USA), ampicillin (0.5 g/L, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and metronidazole (0.5 g/L, Sigma Aldrich/Merck, MO, USA) (VNAM), was dissolved in water of two groups to disrupt the intestinal microbiota as previously described [52–56]. Vancomycin and metronidazole are typically used for microbiota depletion, mainly anaerobic bacteria, whereas ampicillin has a widespread antibacterial spectrum, and neomycin is used against both gram-negative and some gram-positive bacteria.

Fish from the other two groups were not exposed to any antibiotics. After 24 h, restraint stress was applied to all individuals from one of the groups in the tanks containing water and one of the groups in the tanks with a VNAM antibiotic cocktail. Fish were stressed by netting as described previously [57,58]. Briefly, each fish was placed in an individual net for 24 h, while remaining fully submerged in the water in their original tank. Fish in the remaining tanks were left undisturbed. The experiment included procedures lasting 3 days as presented on the timeline (Fig. 1) and was repeated 3 times independently, while microbiome analysis was performed on samples collected in 2 independent experiments.

Fish were not fed during *in vivo* procedures. Upon completion of *in vivo* treatment fish were sacrificed with a lethal dose of tricaine methanesulfonate (TMS, Sigma-Aldrich, MO, USA, 0.2 g/l with the addition of 0.8 g/l NaHCO<sub>3</sub>, POCh, Gliwice, Poland). Unstressed fish were rapidly euthanized using the same method (<30 s, all at once).

Blood was collected by the puncture of a caudal vein and centrifuged (800 rcf, 10 min, 4 °C) to collect serum, which was aliquoted and stored at –20 °C for further determination of cortisol and glucose levels. The free cortisol level in blood serum was determined using a commercial immunoassay kit (Lexington Cortisol ELISA Kit, Neogen, KY, USA). The glucose level was measured with an iXell® glucometer (Ganexo, Warsaw, Poland) as described previously by Klak et al. [57] (Table 1).

### 2.3. Organ isolation

The entire intestinal tract was removed aseptically. The luminal contents were flushed out of the intestinal lumen using ice-cooled sterile phosphate-buffered saline (PBS, 270 mOsm). Subsequently, the gut devoid of contents was divided into 3 parts: foregut, midgut, and hindgut.

**Table 1**

Changes in cortisol and glucose levels in common carp serum upon antibiotic and stress challenge. Unstressed control fish and stressed fish were sampled at 24 h of restraint. Data are presented as mean ± standard error (SE) (n ≥ 11). Capital letters indicate statistically significant differences means in cortisol levels, while different lowercase letters indicate statistically significant differences in glucose levels between groups (p ≤ 0.05).

	Cortisol [ng/ml] Mean (±SE)	Glucose [mg/dl] Mean (±SE)	n
CTR	3,65 (±1,40) <sup>A</sup>	300,03 (±23,59) <sup>a</sup>	16–18
ANT	271,37 (±48,60) <sup>BC</sup>	467,92 (±23,38) <sup>b</sup>	16–18
STR	110,00 (±16,35) <sup>B</sup>	448,19 (±43,92) <sup>b</sup>	16–18
ANT + STR	358,43 (±75,42) <sup>C</sup>	577,82 (±50,25) <sup>b</sup>	16–18

For microbiota studies, approximately 2.0 cm of the middle part of the foregut, midgut, and hindgut was collected using sterile instruments and dissected alongside. The mucosa microbial content destined for molecular analyses was isolated by scratching using a sterile scalpel blade and immediately preserved in ice-cooled 100 % ethanol (HPLC) for storage at –20 °C until use.

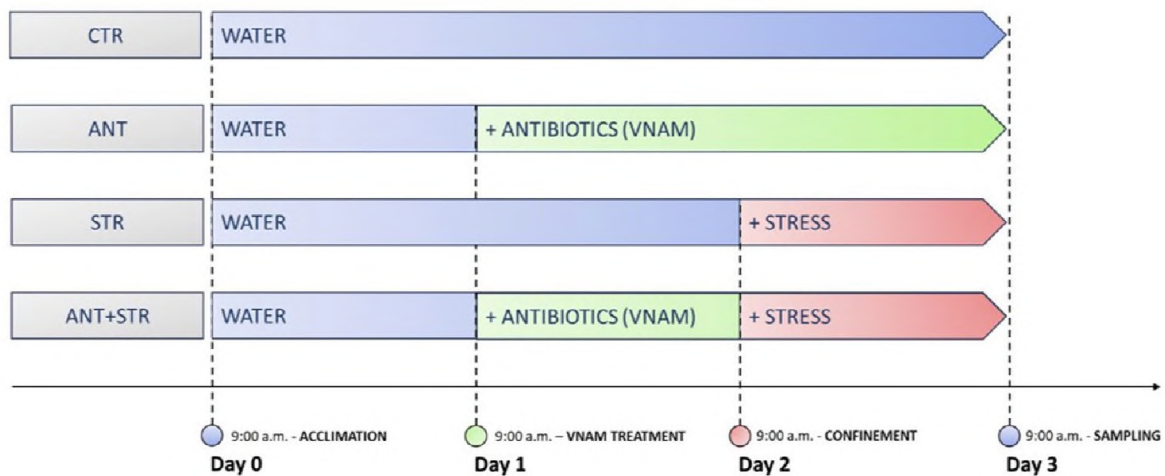
For histological analysis, approximately 1.0 cm long intestinal samples were collected from the middle part of the foregut, midgut, and hindgut regions. All samples were then fixed by immersion in Bouin's fluid (Sigma-Aldrich; MO, USA) for 48 h until further processing.

For analysis of gene expression, intestinal tissues (≤ 30 mg) from the middle part of the foregut, midgut, and hindgut were carefully dissected and immediately transferred to Fix RNA buffer (EURx, Gdansk, Poland) and kept at 4 °C.

### 2.4. Amplicon-based microbiome screen

#### 2.4.1. Library preparation and sequencing

The composition of the carp gut microbiome was determined based on the amplicons of V4 hypervariable region of the bacterial 16S rRNA gene. DNA was isolated using Bio-Trace DNA Purification Kit (EURx, Poland, Gdansk) following the manufacturer's protocol. DNA was extracted from three distinct parts of the gut (foregut, midgut, and hindgut) from control and experimental fish. Additionally, DNA extraction was performed from control samples, including water from an aquarium where experiments were conducted and pelleted dry commercial feed. Samples (experimental and control) and negative controls (DNA extraction control and molecular-grade water as a PCR control)



**Fig. 1.** Timeline illustrating the experimental setup. The dotted lines designate time points of: (i) the beginning of fish acclimation in experimental tanks (ACCLIMATION), (ii) antibiotic treatment period (VNAM TREATMENT), (iii) the beginning of the restraint stress period (CONFINEMENT) and (iv) sampling (SAMPLING). CTR – control group immersed in water; ANT – group immersed in VNAM cocktail; STR – group immersed in water and stressed by confinement; ANT + STR – group immersed in VNAM cocktail and stressed by confinement.

were used for amplicon library preparation following the two-step preparation protocol.

In the first round of PCR (27 cycles), V4 region of 16S rDNA was amplified using specific primers 515F/806R [59,60] with Illumina adapter stubs. The bead-purified PCR products were used as the template for the second indexing PCR reaction (7 cycles). Pooled libraries were sequenced on an Illumina MiSeq v3 lane (2x300bp reads) (1st batch) and NextSeq 2000 (2x300bp reads) (2nd batch).

#### 2.4.2. Analyses of amplicon sequencing data

Amplicon data were analyzed using a custom pipeline based on USEARCH/VSEARCH (available and described at <https://github.com/Symbiosis-JU/Bioinformatic-pipelines>). Reads assembled into contigs were quality-filtered, then dereplicated and denoised, aligned against the SILVA 138 [61] databases, screened for chimeras using UCHIME [62], classified taxonomically, and clustered at 97 % identity level using the nearest-neighbor algorithm and divided into OTUs. Data on the relative abundance of microorganisms were calculated in Microsoft® Excel® and visualized using RStudio (Software 2022.02.0 + 443) and Flourish (<https://flourish.studio/>). Sequence data have been deposited in GenBank under BioProject number PRJNA1136671.

#### 2.4.3. Histological analysis

The foregut, midgut, and hindgut intestine samples (approximately 1.0 cm) from 3 fish in each group were collected individually and immersed in Bouin's fixative (Sigma-Aldrich; MO, USA) for histology. After 48 h the fixed samples were moved into 70 % ethanol. Next, the samples were dehydrated in graded ethanol solutions, followed by a hydrophobic clearing agent (Xylene, Sigma-Aldrich; MO, USA). Dehydrated and cleared samples were then embedded in Paraplast Plus (Leica; Wetzlar, Germany) using an embedding machine and later cut into 7 µm-thin sections with microtome (Hyrax M55, Zeiss; Oberkochen, Germany). The sections were stained with hematoxylin (Chempur; Piekary Slaskie, Poland) and eosin (H&E stain). All sections were visualized using Nikon Eclipse E600 microscope, digitized using the NIS-Elements F software and post-processed by Canva. The images were examined on a computer, using X10 – X40 magnifications. The severity of enteritis was analyzed in distal intestine sections using a semi-quantitative scoring system as previously described [63,64].

### 2.5. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) analysis

#### 2.5.1. Isolation of total RNA and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from all samples using GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx, Gdansk, Poland), including on-column DNase treatment with the RNase-free DNase, following the manufacturer's instructions. To maximize the concentration of RNA, final elution was carried out in 30 µl of nuclease-free water (EURx, Gdansk, Poland). RNA from individual samples were stored at –80 °C until further analysis.

Prior to cDNA synthesis, total RNA quantification and purity were measured by spectrophotometry using a Spark® Multimode Microplate and NanoQuant Plate™ Reader (Tecan, Grodig, Austria). For the cDNA synthesis reaction, The High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) was used, according to the manufacturer's protocol. Non-reverse transcriptase (-RT) control was included. Samples were diluted 5x and stored at –20 °C until further use.

#### 2.5.2. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

RT-qPCR was performed using the Rotor-Gene Q, 5-Plex HRM (Qiagen, Hilden, Germany). Master mix for each RT-qPCR run was prepared as follows: 2 µl of each primer, 7 µl of SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) and 4 µl of 50 × diluted cDNA. [Supplementary Table 1](#) contains all used sequences for forward and reverse primers, including their accession numbers. The 40S

ribosomal protein s11 (40s11) gene served as an internal reference. All RT-qPCR runs were carried out under the following conditions: 2 min at 50 °C, followed by 2 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C. To confirm amplification specificity, an analysis of melt curves was performed by fluorescence detection from 60 to 90 °C at 1 °C intervals, after the end of each run. No amplification was observed in -RT and non-template control (NTC) samples. The results were analyzed using Rotor-GeneQ Series Software 2.3.1 and Microsoft® Excel®.

Changes in gene expression upon antibiotic treatment or/and stress challenge were determined as a ratio of target gene vs. reference gene (40s11) relative to the expression in control samples according to the following equation:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{t_{\text{target}}(\text{control-sample})}}}{(E_{\text{reference}})^{\Delta C_{t_{\text{reference}}(\text{control-sample})}}}$$

Where  $E$  stands for amplification efficiency and  $C_t$  is the number of PCR cycles needed for the signal to exceed a predetermined threshold value. Both values were obtained upon comparative quantitation analysis in Rotor-GeneQ Series Software for each primer set and sample [65]. Based on the mean values of the obtained results, heatmaps were generated using the Heatmapper web server [66]. The provided gene expression values were normalized using a z-score transformation, calculated as  $z = (x - \mu) / \sigma$ , where  $x$  is the mean gene expression value for the given group,  $\mu$  is the mean of the dataset (the average of all the scores), and  $\sigma$  is the standard deviation. This transformation allows for a relative comparison of gene expression profiles within each gene. The colors within the heatmap are defined as follows: (I) blue represents z-scores below the gene's mean, indicating relatively lower expression relative to other groups, (II) white represents z-scores near zero, indicating values close to the gene's average expression, (III) red represents z-scores above the gene's mean, indicating relatively higher expression compared to other groups.

#### 2.5.3. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad 9 Software (San Diego, CA, USA). Results were shown as mean ± standard error (SE). Data were tested for parametric testing criteria with the Shapiro–Wilk (normality) and Spermman (homogeneity of variances) tests. Data that did not meet the criteria for normal distribution according to the Shapiro–Wilk test were normalized by logarithmic transformation. Antibiotic and stress effects on changes in cortisol, glucose and mRNA levels were determined using two-way ANOVA with post hoc Tukey's test. Effects of antibiotic and stress on severity of enteritis was assessed using Kruskal–Wallis followed by Dunn's post-hoc test. For all tests, statistically significant differences were considered at the level of  $p \leq 0.05$ .

Alpha and beta diversity were analyzed using the software MicrobiomeAnalyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>). Alpha and Beta diversity of the microbiomes in the foregut, midgut and hindgut were analyzed using Chao and Shannon indexes. The total number of bacterial reads, i.e., the number of bacteria in a fish gut as discrete variables, was compared between the groups. All bacterial genera were compared according to the number within the groups. Moreover, in lower taxonomic ranks comparison of the most prevalent bacteria (in case of the prevalence being  $\geq 1$  % of the total amount of bacteria) was performed. Results were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Stress response after antibiotic-induced dysbiosis

To evaluate the influence of antibiotic-induced dysbiosis on stress response in common carp, control fish, and fish with antibiotic-induced dysbiosis were subjected to prolonged restraint stress. Subsequently, the cortisol and glucose levels in blood plasma were determined. As expected, restraint stress induced a significant increase in the cortisol and

glucose levels in blood plasma (Table 1). Cortisol and glucose levels in blood plasma were also significantly higher in the fish treated with antibiotics than in the control fish and did not significantly differ from those in the stressed fish. Cortisol levels in the fish treated with antibiotics and subjected to restraint stress were significantly higher than in the stressed fish, while there was no significant difference in the glucose level between those groups (Table 1).

### 3.2. Gut microbiota

First, we characterized the microbiota of the foregut, midgut, and hindgut of healthy control fish. The gut microbiota was identified based on sequences of the V4 region of their 16S rDNA gene obtained through high-throughput amplicon sequencing. The total number of 16S rDNA reads after all analysis steps, including initial decontamination, was 11690615 (3604 reads per sample on average). Within this data, we identified 3244 OTUs. The obtained data were subsequently critically checked, and OTUs representing bacteria present in the control tap water were removed from the dataset (Supplementary Fig. 1). Among the final 3244 OTUs *Aeromonas*, *Bacteroidetes*, *Barnesiellaceae* *Brevinema*, *Cetobacterium*, *Flavobacterium*, *Shewanella*, *ZOR0006* and *Vibrio* genera were found to be the most dominant in all segments of the gut of control fish (Fig. 2). We did not observe statistically significant differences in the microbial richness (Chao Index, Fig. 3A), bacteria diversity (Shannon Index, Fig. 3B; Simpson Index, Fig. 3C) and Beta diversity (Fig. 3D) between these 3 parts of intestines.

In the next step, microbiota changes upon antibiotic- and stress-treatment in the whole intestine (pooled data from the foregut, midgut, and hindgut) were analyzed. Statistically significant differences between antibiotic-treated fish and both control and stressed fish were found in microbial diversity (Shannon Index, Fig. 4B). Also, the Simpson Index (Fig. 4C) was significantly different between the control group - CTR (unstressed, untreated fish) and antibiotic-treated - ANT ( $p =$

0.021053), stressed - STR ( $p = 0.015196$ ) and antibiotic-treated and stressed fish ANT + STR ( $p = 0.0036579$ ). We did not observe differences in the microbial richness between differentially treated fish groups (Chao Index, Fig. 4A). We found strong beta diversity (the Bray-Curtis Index) in bacterial communities between control and experimental groups ( $p = 0.001$ ) (Fig. 4D). Furthermore, such differences were observed between each treatment group albeit ANT and ANT + STR groups ( $p = 0.327$ ) (Fig. 4E).

Both antibiotic treatment and stress changed the diversity and abundance of gut microbiota in the carp gut (Fig. 5). A significant reduction of bacteria abundance was observed in ANT group compared to the CTR (42 % reduction,  $p = 0.003$ ) and in the fish from ANT + STR group (24 % reduction,  $p = 0.01$ ) (Fig. 5A). Moreover, a slight but significant reduction in the abundance of bacteria genera was observed after stress (6 % reduction compared to CTR,  $p = 0.04$ ) (Fig. 5A). In the gut of ANT fish reduced abundance of *Aeromonas*, *Bacteroides*, *Barnesiellaceae*, *Cetobacterium*, *Shewanella*, *Vibrio* and *ZOR0006* was observed, while the abundance of *Desulfovibrionaceae* and *Flavobacterium* was elevated in the gut of these fish compared to CTR group. At the same time, in the gut of ANT + STR fish, an increased abundance of *Mycoplasma* was observed compared to ANT fish. Additionally, in the gut of the STR group the abundance of *Cetobacterium* was reduced, when compared to CTR (Fig. 5B). Furthermore, in tanks where stressed or antibiotic-treated fish were kept, the diversity and relative abundance of bacteria genera in the water differed significantly compared to water from tanks with control unstressed fish (Supplementary Fig. 2).

As both antibiotics and stress induced changes in the bacterial genera diversity in the whole gut we decided to analyze the effects of stress and antibiotic treatment in the specific gut segments: foregut, midgut, and hindgut (Fig. 6). In the foregut of ANT and ANT + STR fish, a decrease in the number of *Aeromonas*, *Bacteroides*, *Barnesiellaceae*, *Cetobacterium* and *Shewanella* bacteria and increase of *Acinetobacter*, *Delftia*, and *Flavobacterium* abundance were observed, compared to CTR fish. Moreover,

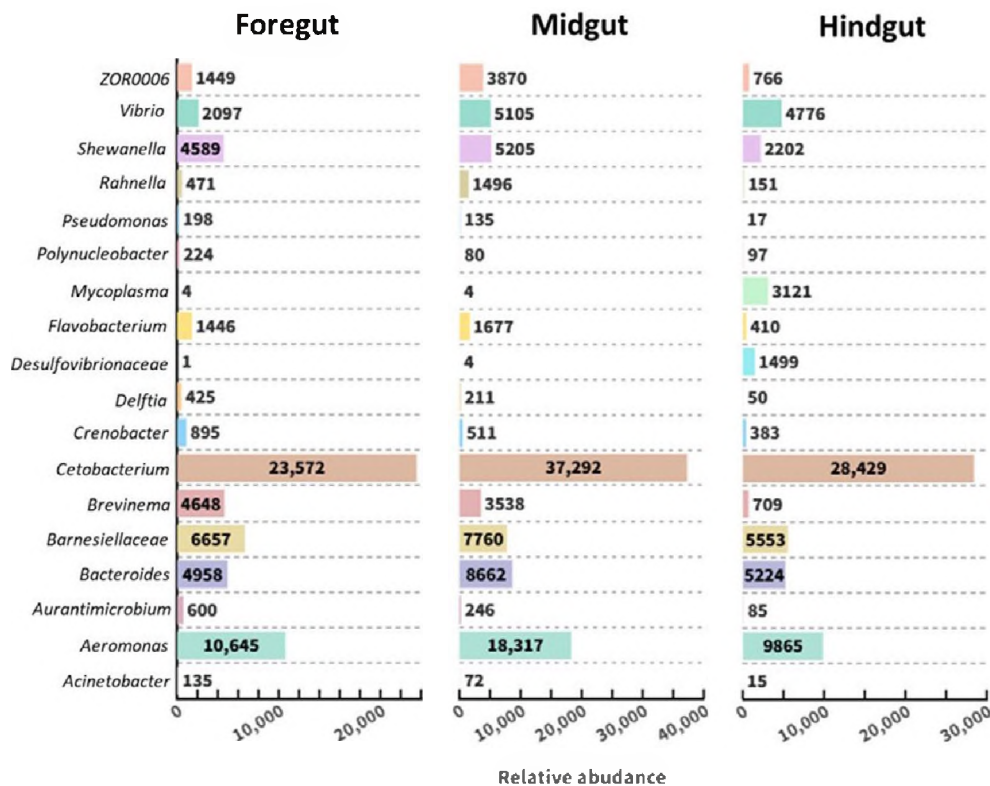
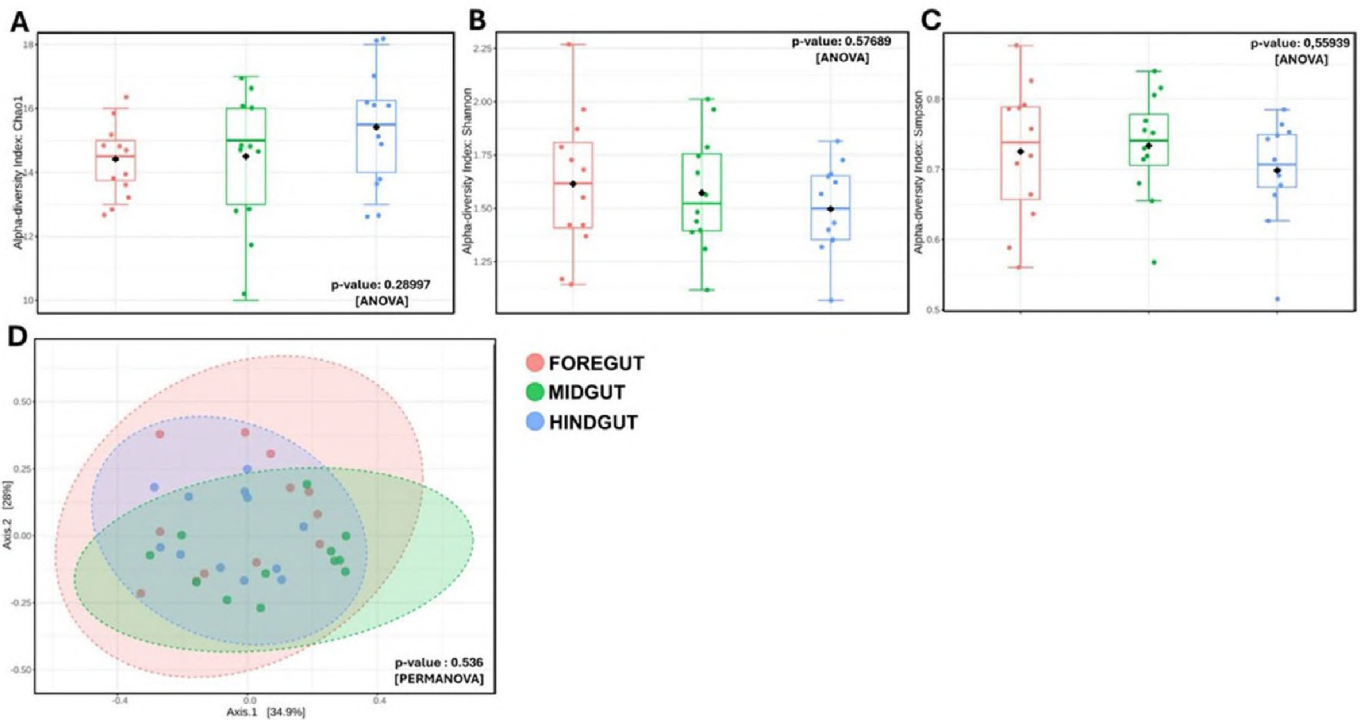


Fig. 2. Diversity and relative abundance of bacterial genera in the foregut, midgut and hindgut of control untreated and non-stressed carp. The table shows the average number of readings (relative abundance) in the control, untreated, and non-stressed fish ( $n = 12$ ).



**Fig. 3.** Alpha and beta diversity of microbial genus in foregut, midgut, and hindgut in the control untreated and non-stressed carp. Box-and-whisker plots for comparison of alpha diversity as diversity indices (Chao1 (A) and Shannon (B)). Statistical analysis was performed using ANOVA and post-hoc pairwise comparison (multiple-group only). (C) Two-dimensional principal coordinate analysis (PCoA) with Bray-Curtis Index of bacterial communities between different segments. Statistical analysis was performed using PERMANOVA and pairwise PERMANOVA analysis. The multi-testing adjustment is based on Benjamini-Hochberg procedure (FDR). Every point in the plot represents a sample from one fish ( $n = 12$ ).

the reduction of *Crenobacter*, *Rahnella* and *Vibrio* and the increase of *Aurantimicrobium*, *Polynucleobacter*, and *Pseudomonas* abundance were observed only in the foregut in ANT + STR group. An increased abundance of *Vibrio* and *ZOR0006* was found in the foregut of STR compared to CTR fish (Fig. 6). In the midgut of ANT and ANT + STR group, decreased abundance of *Aeromonas*, *Bacteroides*, *Barnesiellaceae*, *Cetobacterium*, *Crenobacter* (ANT + STR group), *Shewanella* and *ZOR0006* was observed, while antibiotics increased in this part of the gut abundance of *Acinetobacter*, *Delftia* (ANT and ANT + STR), *Brevinema* (ANT + STR), *Flavobacterium* (ANT) and *Mycoplasma* (ANT + STR) (Fig. 6). In the midgut of the fish from STR group, reduction of *Aeromonas*, *Bacteroides* and *Cetobacterium*, while an increase of *Brevinema* and *Vibrio* was observed. In the hindgut, a decrease of *Aeromonas*, *Bacteroides*, *Barnesiellaceae*, *Cetobacterium*, *Crenobacter*, *Shewanella*, *Vibrio* and *ZOR0006* abundance and increase number of *Desulfovibrionaceae* and *Flavobacterium* (ANT) was observed in ANT and ANT + STR groups. Moreover, in ANT + STR group, we observed a higher number of *Mycoplasma* and *Pseudomonas*. In the hindgut of STR group, we observed a decrease in the number of *Cetobacterium* and an increase in *Desulfovibrionaceae* and *Flavobacterium* (Fig. 6).

### 3.2.1. Expression of inflammation-related genes in the gut

To verify if stress- and/or antibiotic-induced dysbiosis of microbiota induced gut inflammation the expression of inflammation-related genes in the foregut, midgut and hindgut was measured (Fig. 7). The strongest effects of the treatments were observed in the foregut where significant upregulation of the expression of genes encoding proinflammatory cytokines and chemokines (*il-1 $\beta$* , *il-23p19*, *il-12p35*, *il-17a/f2*, *il-17c*, *il-17d2*, *cxcl8\_l2*, *cxcb2*), *tlr4* and anti-inflammatory *il-10* was observed in ANT + STR fish. Interestingly, *il-1 $\beta$*  expression was significantly upregulated in the foregut of ANT group. The *cxcl8\_l1* expression was downregulated in the foregut of all treatment groups (ANT, STR and ANT + STR). No significant differences were observed between groups

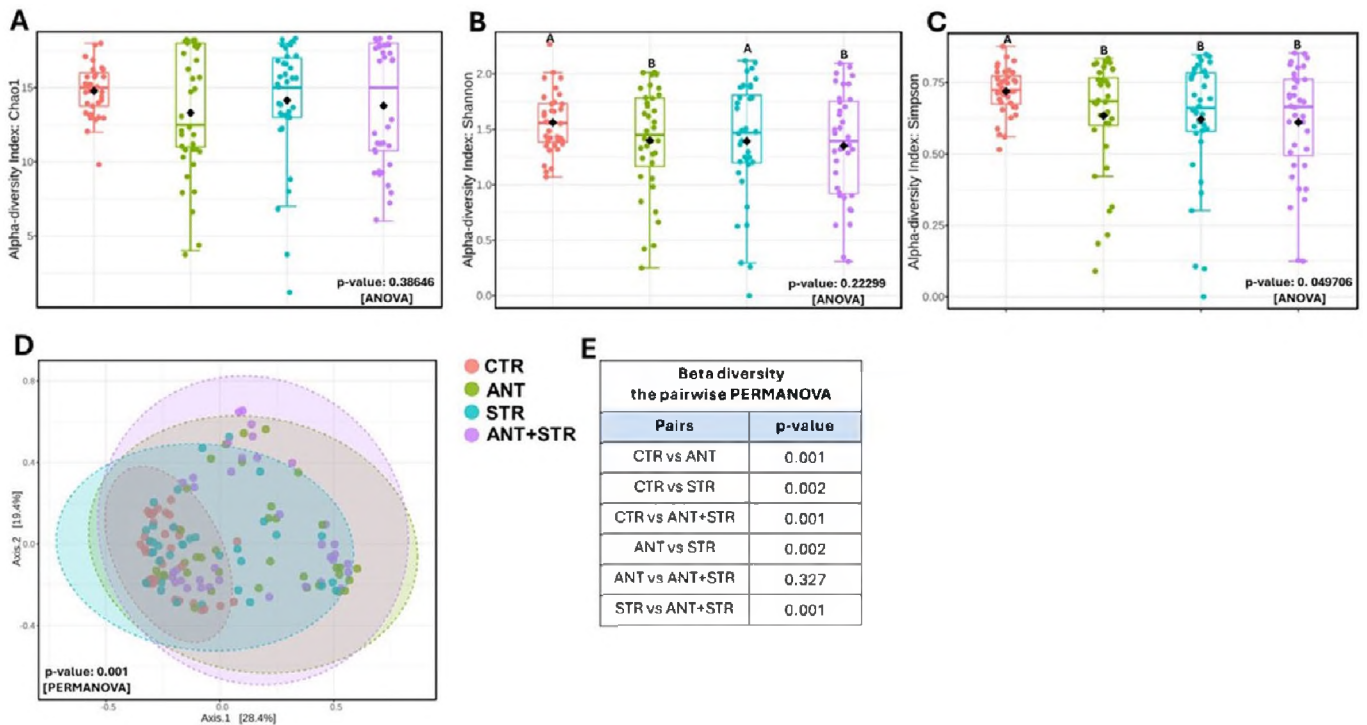
for *cxcb1*, *cxcl12a*, and *cxcl12b* expression levels.

In the midgut, a significant increase in the expression of *il-1 $\beta$* , *il-17a/f2*, and *il-17c* genes was observed in ANT group. The expression of *cxcl8\_l1* was significantly lower in ANT group than in the CTR or STR fish. The expression of *cxcb1* and *cxcb2* genes was significantly upregulated in ANT + STR group, when compared to the other groups. No significant differences were observed in *tlr-4*, *il-23p19*, *il-12p35*, *cxcl8\_l2*, *cxcl12a*, *cxcl12b* and *il-10* mRNA levels between the groups.

The gene expression analysis in hindgut revealed a significant upregulation of the expression of *cxcb1* in ANT + STR fish when compared with CTR or STR groups, while it was not significantly different from ANT group. Moreover, the *il-10* expression was significantly upregulated in the ANT group, compared to the control. No significant differences were observed in the expression of the remaining genes (*tlr-4*, *il-1 $\beta$* , *il-23p19*, *il-12p35*, *il-17a/f2*, *il-17c*, *il-17d2*, *cxcl8\_l1*, *cxcl8\_l2*, *cxcb2*, *cxcl12a* and *cxcl12b*) between control and treated fish groups (Fig. 7).

### 3.2.2. Histopathological changes in the gut

All samples of fore-, mid- and hindgut showed similar organization of intestinal histology showing mucosa, submucosa and muscularis surrounded by serosa. Mucosa was composed of a monolayer of columnar epithelium and lamina propria and was surrounded by submucosa. Except for columnar enterocytes and apically situated goblet cells, typical for gut epithelium (Fig. 8A–C'), rodlet cells, intraepithelial lymphocytes (Supplementary Fig. 3C) and eosinophilic granular cells (Supplementary Fig. 3C) as well as McKnight cells (Supplementary Fig. 3D) were observed. While the organization of intestinal histology and types of cells were the same in fish from all treatments, there were some overall differences between fish from different treatments. In particular, inflammatory infiltrate composed of lymphocytes, neutrophils and macrophages was present in mucosa and submucosa of all the fish treated with antibiotics and subjected to restrain stress (Fig. 8D–L')



**Fig. 4.** Effects of stress and antibiotic treatment on the alpha and beta diversity of bacteria genera in the whole intestine of common carp. CTR - control unstressed fish, ANT - unstressed fish treated with an antibiotic cocktail containing vancomycin (0.01 g/L), neomycin (0.5 g/L), ampicillin (0.5 g/L) and metronidazole (0.5 g/L) (VNAM), STR - stressed fish (24 h restraint stress), and ANT + STR - stressed fish treated with antibiotic VNAM cocktail. Box-and-whisker plots for comparison of alpha diversity as diversity indices (Chao1 (A) and Shannon (B)). Values not sharing capital letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups in all 3 intestine segments (A) ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis was performed using ANOVA and post-hoc pairwise comparison (multiple-group only). (B) Two-dimensional principal coordinate analysis (PCoA) with Bray-Curtis Index of bacterial communities between different segments. Statistical analysis was performed using PERMANOVA and pairwise PERMANOVA analysis (D). The multi-testing adjustment is based on Benjamini-Hochberg procedure. Every point in the plot represents a sample from one fish ( $n = 12$ ).

irrespective of the part of the gut sampled. As a result, the abundance of lymphocytes, eosinophilic granular cells and neutrophils differed between fish from different treatment groups (Fig. 8D–L'). Inflammatory infiltrate was less common in fish treated with antibiotics (2 out of 3) and in stressed fish (1 out of 3) and was mostly observed in the foregut in submucosa. Lymphocytes and rare eosinophilic granular cells, a few macrophages and neutrophils were present in lamina propria (Supplementary Figs. 3A–C). In the fore and mid part of the gut goblet and rodlet cells were rare (Fig. 8A', B'), whereas they became more common towards the posterior part (Fig. 8C'). In all treatment groups, intestinal epithelium contained more goblet and rodlet cells than the controls (Fig. 8F', I'). Their abundance was noticeably greater in ANT + STR group, where they became dominant in the epithelium, especially in the hindgut (Fig. 8L'). Moreover, the secretion activity of goblet cells increased in the mid and hindgut, which was documented not only by their increased abundance but also by the presence of mucus in the lumen as observed during sampling. Mucus was abundant in the group treated with antibiotics and stress and observed both grossly and in histology (Fig. 8I', H'). Other observed alterations in the histological observation in the treatment group included the pronounced widening of lamina propria and more visible capillaries (Fig. 8D', E', K'). Based on histological examination, cellular response to treatment was variable between individuals. However, there were clear differences for some variables as shown by the scores for enteritis (Supplementary Table 2). In particular, the score for the size of supranuclear vacuoles for ANT, STR and ANT + STR was significantly greater than control. Furthermore, scores for an increase in goblet cells, granular eosinophilic cells and size of lamina propria were significantly increased in ANT + STR in comparison to controls and the two other treatment groups. This suggests that enteritis was most severe in the distal intestine of carp from ANT +

STR group.

#### 4. Discussion

Intensive aquaculture is a generator of many stressors what negatively affect fish immune response and increase fish susceptibility to infections, including bacterial diseases. This results in the excessive and often preventive use of antibiotics [67]. Therefore, in the current research, we studied how antibiotic treatment and restraint stress would affect the activation of the stress axis, measured by the level of cortisol and glucose in the blood plasma, and the condition of the gut of the common carp.

As expected, antibiotics induced dysbiosis in fish gut, manifested by a decrease in the total abundance of bacteria, and a shift in bacteria diversity. The detailed analysis of the abundance and diversity of bacteria in all examined parts of gut showed that antibiotic treatment reduced the number of bacteria from the genera: *Aeromonas*, *Bacteroides*, *Barnesiellaceae*, *Cetobacterium* and *Shewanella*, while it increased the relative abundance of *Flavobacterium*. When characterizing the bacteria whose number decreased after antibiotic therapy, it is worth noting that *Cetobacterium*, which belongs to the *Fusobacteriota* phylum, are the most abundant bacteria in the Cyprinid gut [50,68]. It is an obligate anaerobe responsible for vitamin B12 production [69], which can activate the parasympathetic nervous system and increase insulin expression as well as sugar uptake [70]. *Bacteroides* (also known as *Bacteroidota*), an obligate anaerobe of the gastrointestinal tract both in mammals and fish, is involved in steroid metabolism and synthesis of proteins, glucose and lipid and food fermentation [50,71,72]. Moreover, included in *Bacteroidota* phylum, *Barnesiellaceae* regulates fat and energy metabolism [73] and in fish, its high abundance was associated with a good health status

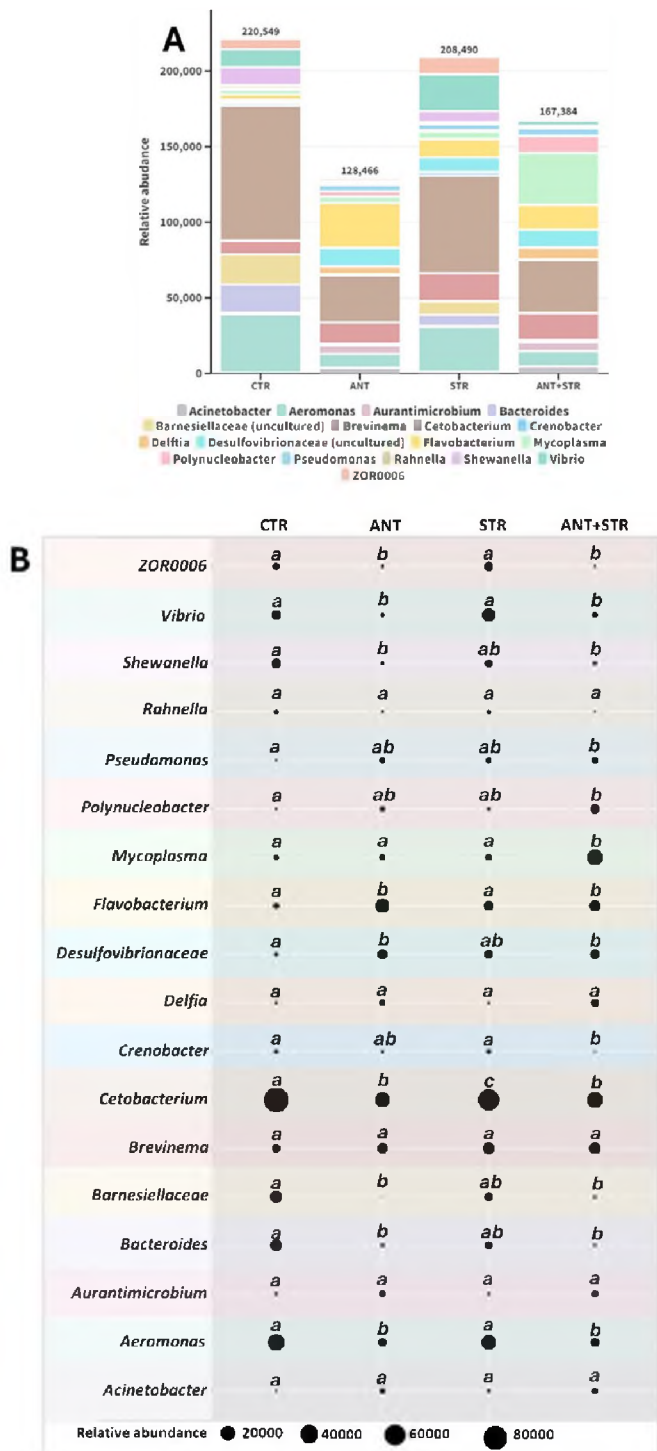


Fig. 5. Effects of stress and antibiotic treatment on the diversity and relative abundance of bacteria genera in the gut of common carp. CTR - control unstressed fish, ANT - unstressed fish treated with an antibiotic cocktail containing vancomycin (0.01 g/L), neomycin (0.5 g/L), ampicillin (0.5 g/L) and metronidazole (0.5 g/L) (VNAM), STR - stressed fish (24 h restraint stress), and ANT + STR - stressed fish treated with antibiotic VNAM cocktail. (A) - changes in the number and average relative abundance of bacteria genera (n = 12), (B) - statistically significant differences between bacteria genera in fish from different experimental groups (n = 12). The blob sizes correspond to the relative abundance of the bacterial genera. Values not sharing capital letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups in the gut (p ≤ 0.05). Statistical analysis was performed using two-way ANOVA with subsequent Tukey's pairwise multiple comparisons test.

of the fish [74]. *Shewanella* is a facultative anaerobe Gram-negative bacterium, mainly present on fish skin and in the gut [75] and is involved in fermentation, the breakdown of sugars and the production of hydrogen sulfide. *Aeromonas* species are known as facultative anaerobes involved in the fermentation of organic compounds and reduction of nitrates in the fish gut [67,76]. However, some *Aeromonas* species are pathogenic to fish [76,77]. Similarly to *Aeromonas* and *Pseudomonas*, *Shewanella* can induce infection [75]. As mentioned above, antibiotic treatment increased abundance of *Flavobacterium* in carp gut. It belongs to the phylum *Bacteroidota* and is a Gram-negative bacterium widely distributed in aquatic environments, including freshwater and marine ecosystems. It plays a crucial role in the degradation of organic matter, especially complex polysaccharides, however, it was found to be very pathogenic to both Cyprinids and Salmonids [78,79]. It can cause flavobacteriosis such as columnaris disease, cold water disease or bacterial gill disease [80].

Similar results indicating antibiotic-induced changes in fish gut microbiota were previously obtained for grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) gut, where after 28 days of antibiotic treatment a decreased abundance of *Cetobacterium* and *Bacteroides* was found [56] as well as in zebrafish (*Danio rerio*) where erythromycin declined numbers of *Fusobacteria*, *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* but increased the abundance of *Spirochaetes* (*Brevinema*) [81]. Antibiotic treatments decreased abundance of *Cetobacterium* in other studies on zebrafish [82], channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [83], and Devils Hole pupfish (*Cyprinodon diabolis*) [84]. In gilthead seabream (*Sparus aurata*), a decrease in the abundance of *Vibrio* and an increase in the gut abundance of *Brevinema* were also observed after 24 h of antibiotic therapy (VNAM) [85].

To a lesser extent, stress caused a decrease in the number of bacteria and slightly changed the microbiota composition. In this case, the most visible changes concerned a decrease in *Cetobacterium* abundance and an increase in *Vibrio* abundance. *Vibrio* is a facultative anaerobe and obligate endosymbiont, which takes part in fermentation [50] and some *Vibrio* species are used as probiotics [86], however, other *Vibrio* species e.g. *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, and *V. alginolyticus*, are well-known fish pathogens causing vibriosis [87].

Stress has been connected with microbial shifts in the population profile of intestinal microbiota of humans and rodents [88,89] as well as fish (e.g. Atlantic salmon fry, grass carp) [18,56]. In mammals, stress decreased the abundance of bacteria from the *Lactobacillus* genus (reviewed by Bailey [90]). Moreover, in stressed mice, Gao et al. [89] observed an increased abundance of inflammation-promoting species of *Helicobacter*, *Peptostreptococcaceae*, *Streptococcus*, and *Enterococcus faecalis* and a decreased number of *Rikenella*, *Roseburia*, and *Lachnospiraceae* genera. Many studies suggest that stress-induced alterations in the intestinal microbiota promote enteric infection and the overproduction of inflammatory mediators [90]. Elevated cortisol levels were associated with a marked decline in the lactic acid bacteria (*Carnobacterium* sp.) and an increase in the abundance of bacteria from classes *Clostridia* and *Gammaproteobacteria* [18].

High cortisol levels can affect the growth and proliferation of bacteria, directly or indirectly, via modification of the immune response [18]. For example, an *in vitro* study showed that cortisol caused a direct shift in the dental microbiome and increased the abundance of bacteria from *Fusobacteria* phylum, particularly *Leptotrichia goodfellowii* and *Fusobacterium nucleatum* [91]. On the other hand, the administration of cortisol reduced, in a dose-dependent manner, the growth of *Flavobacterium columnare*, a well-known pathogen of freshwater fish [92]. Interestingly, a positive correlation between the presence of high fecal cortisol and the abundant occurrence of *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Aeromonas* was shown in Atlantic salmon fry [18]. In salmonid fish, stress-induced cortisol elevation correlated with altered community richness and composition of the skin and fecal microbiome, what promoted the proliferation of opportunistic pathogens [93]. In Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), long-term treatment with slow-release implants of the corticosteroids, cortisol or dexamethasone

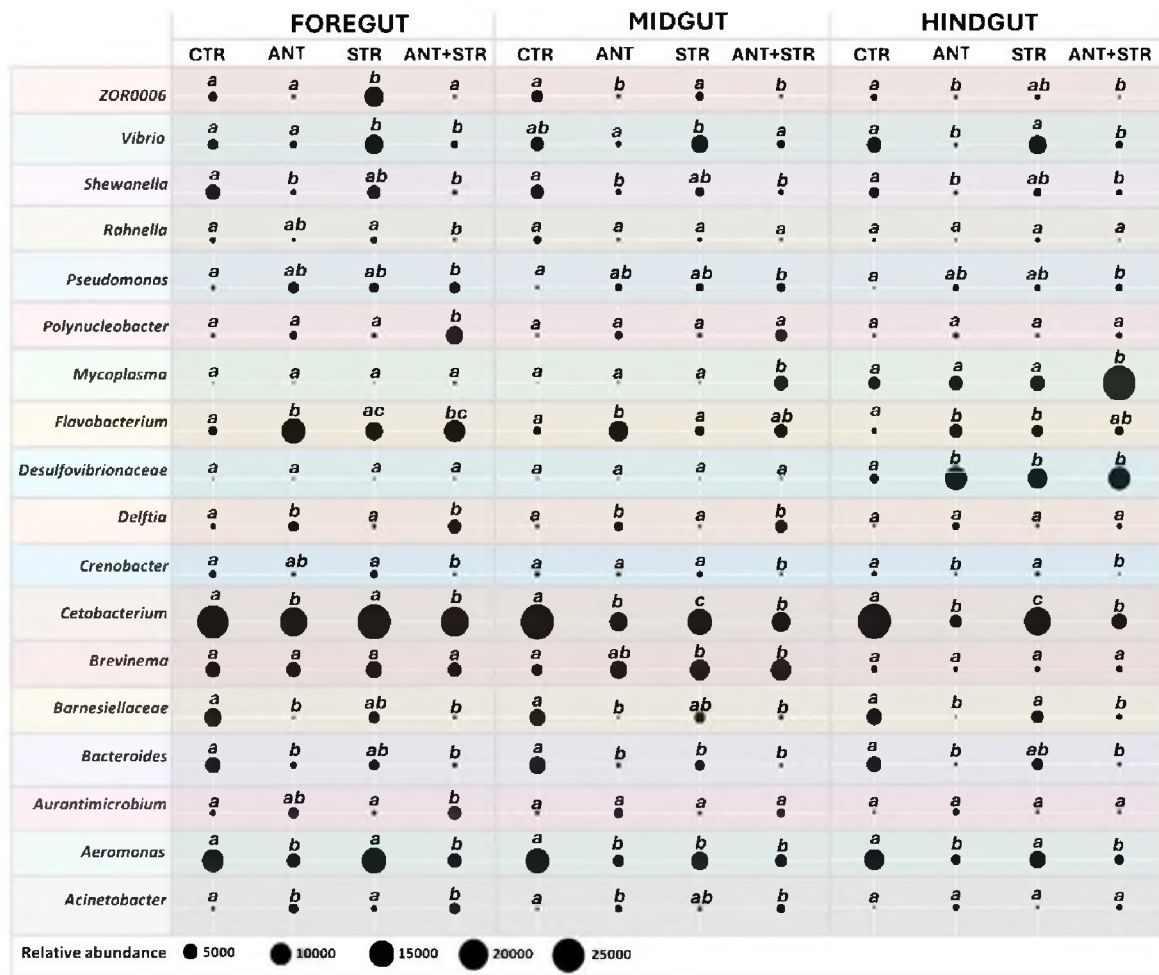


Fig. 6. Effects of stress and antibiotic treatment on the relative abundance of bacteria genera in the foregut, midgut, and hindgut of common carp. CTR - control unstressed fish, ANT - unstressed fish treated with an antibiotic cocktail containing vancomycin (0.01 g/L), neomycin (0.5 g/L), ampicillin (0.5 g/L) and metronidazole (0.5 g/L) (VNAM), STR - stressed fish (24 h restraint stress), and ANT + STR - stressed fish treated with antibiotic VNAM cocktail. The blob sizes correspond to the average relative abundance of the bacterial genera from each group (n = 12). Values not sharing capital letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups in particular intestinal segments (foregut, midgut, or hindgut) (p ≤ 0.05). Statistical analysis was performed using two-way ANOVA with subsequent Tukey's pairwise multiple comparisons test.

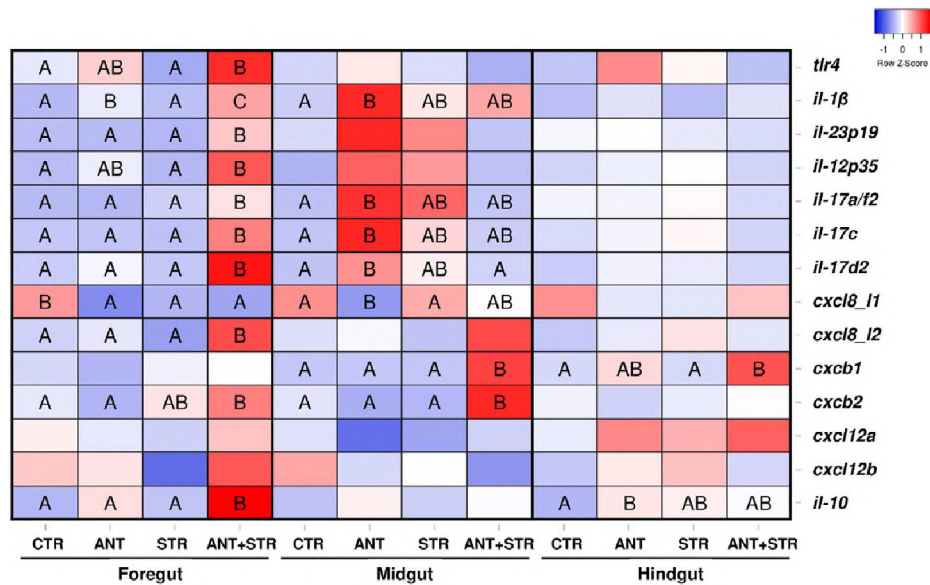
resulted in changes in the gut microbiota [94]. Furthermore, Maltz and colleagues [95] found that during bacterial infection social stress induces widespread changes in the mice gut microbiota and in its morphology. An increased concentration of pro-inflammatory cytokines in the colon (*inos*, *tnf-α*, *il-1β*) and a decreased level of protective SCFAs were observed during the same experiment [95]. Similarly to our results, under the influence of social stress, there was a decrease in the total abundance of beneficial bacteria from phyla: *Verrucomicrobiota*, *Bacillota*, and *Bacteroida* and an increase in *Campylobacterota* (*Helicobacter*) and *Bacteroidetes* abundance. Increased abundance of these bacteria was also correlated with the development of intestinal inflammation [96]. This study also showed that stress exposure increased susceptibility to the pathogen and colonic inflammation during infection with *Citrobacter rodentium* [95]. Increased levels of pro-inflammatory cytokines and changes in the gut microbiota were also observed in mice under temperature-induced stress [97] and after cortisol administration, where reduction of probiotic lactic acid-producing bacteria and increase of proinflammatory bacteria was found [98–100].

We found that antibiotic-treated and stressed fish showed increased abundance of *Mycoplasma*, *Polynucleobacter* and *Pseudomonas*. *Mycoplasma* belongs to *Firmicutes*, and this phylum is considered the second most important bacteria group found in the carp/fish gut microbiota [101]. In fish, *Mycoplasma* species can be part of the normal microbiota

e.g. rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [102,103] and longjaw mud-sucker (*Gillichthys mirabilis*) [104] however they are also often associated with various infections, particularly in stressed or immunocompromised fish [105]. *Polynucleobacter* is mainly present in the microbiota of fish skin and gills [106]. *Pseudomonas* is a facultative anaerobe, participating in the breakdown of hydrocarbons and denitrification. Some species of *Pseudomonas* can be opportunistic pathogens for fish, particularly under stressful conditions or when the fish immune system is compromised. For example, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* can cause diseases such as fin rot, tail rot, and pseudomoniasis [107].

Our study shows that both antibiotics and stress can induce the microbiota shift from the beneficial bacterial strains – *Cetabacterium* and *Bacteroides*, to the increased presence of unfavorable bacteria such as *Brevinema*, *Flavobacterium* and *Desulfovibrionaceae*. Litvak and colleagues [108] suggested that antibiotic treatment induced epithelial oxidation, which led to a shift in the microbiota from obligate anaerobes to facultative bacterial overgrowth. This was also observed in grass carp, where antibiotic-induced dysbiosis reduced the abundance of *Cetabacterium* and increased the amount of facultative photosynthetic bacteria *Rhodobacter* [56].

We found that the changes in the abundance and diversity of gut bacteria in carp induced by stress and antibiotic-treatment changes in



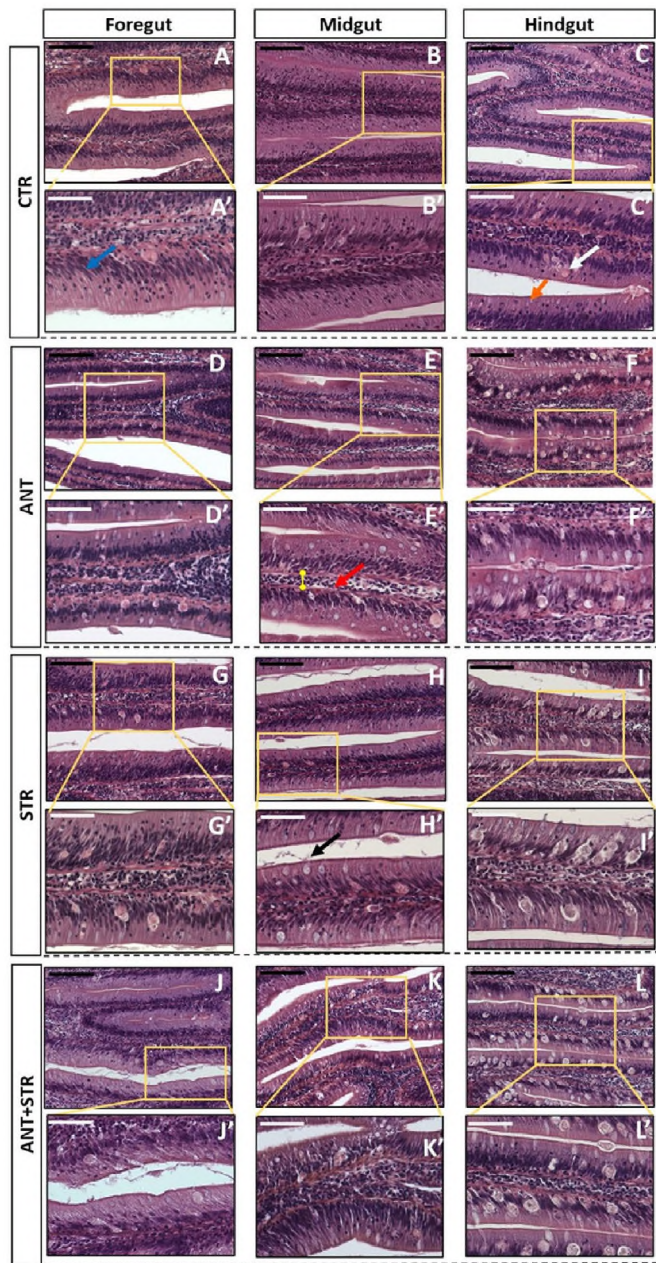
**Fig. 7.** Heatmaps showing stress-induced changes in the expression of immune-related genes in the foregut, midgut, and hindgut of common carp with VNAM-disrupted intestinal microbiota. CTR – control group immersed in water; ANT – group immersed in VNAM cocktail; STR – group immersed in water and stressed by confinement; ANT + STR – group immersed in VNAM cocktail and stressed by confinement. Mean gene expression values were normalized using a z-score transformation by the Heatmapper web server [66]. Created heatmaps show a relative comparison of gene expression profiles within each gene. The colors within the heatmap are defined as the blue-white-red scheme gradient as follows: (I) blue represents z-scores below the gene's mean, indicating relatively lower expression to other groups ( $z < 0$ ), (II) white represents z-scores near zero, indicating values close to the gene's average expression ( $z = 0$ ), (III) red represents z-scores above the gene's mean, indicating relatively higher expression compared to other groups ( $z > 0$ ). One rectangle presents mean data from  $n = 9$ –12 fish. Mean values not sharing capital letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups in particular intestinal segments (foregut, midgut, or hindgut) ( $p \leq 0.05$ ). Statistical analysis was performed using two-way ANOVA with subsequent Tukey's pairwise multiple comparisons test. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

the abundance and diversity of gut bacteria in carp were related to the changes in the morphology as well as in the expression of immune-related genes in the gut. In fish from the ANT + STR group abundance of goblet and rodlet cells were higher than in control fish. Moreover, the increased secretion activity of goblet cells was observed in the mid and hindgut of fish from ANT + STR group. This observation suggested that fish from this group developed intestinal inflammation. Previously, Yang and colleagues [81] found a higher occurrence of goblet cells in the gut of zebrafish exposed to antibiotic treatment. Such increase in goblet cell number was also regarded as the host immunomodulatory response to the dysbiosis of the intestinal microbiota, which was causing disruptions to intestinal homeostasis and the immune system [109]. Furthermore, the fish from ANT + STR group had the highest score of enteritis in their distal intestine.

The observation that antibiotic treatment and stress induced inflammation in carp gut was further tested by the gene expression analysis, where up-regulation of the expression of genes encoding pro-inflammatory mediators and cytokines involved in the inflammatory and Th17 response (*il-1β*, *il-23p19*, *il-12p35*, *il-17c*, *il-17a/f2*, *il-17d2*, *cxcl8\_l2*, *cxcb2* and *tlr4*) were measured in the foregut of fish treated with antibiotics and subjected to stress. Previously, upregulation of TLR4 was associated in mammals with inflammatory pathologies, particularly those of gastrointestinal origin [110,111]. Similarly, in fish, Su et al. [112] reported upregulation of *tlr4* expression after bacterial infection in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) gut and implied TLR4 signaling pathway activation, which is known to lead to changes in the transcription of various effector proteins and pro-inflammatory cytokines [113]. We found that fish with antibiotic-induced dysbiosis had up-regulated expression of proinflammatory *il-1β* in the foregut and midgut. That result corresponds with previous studies on grass carp [56] with antibiotic-induced dysbiosis, where up-regulation of this pro-inflammatory cytokine was also detected. Interestingly, in our study *il-1β* expression was significantly higher in the foregut of fish with

antibiotic-induced dysbiosis that subsequently was stressed. Shaw et al. [15] study revealed that the microbiota induced the production of IL-1β in lamina propria phagocytes and that stimulation of IL-1β –IL-1R signaling drove the generation of intestinal steady state Th17 cells (sTh17). Moreover, IL-1β induces the generation of pathogenic Th17 cells (induction of IL-17 production in naive precursors) [114]. Our study suggests that antibiotic treatment created an *il-1β*-rich microenvironment in the foregut, what could potentially promote the generation of pathogenic Th17 cells. It is very likely that subsequent stress aggravated these pathological conditions. Moreover, in fish from ANT + STR group, we observed a significant increase in the expression of *il-23p19*, encoding IL-23 subunit alpha. It should be mentioned here, that in mice, Th17 cells formed in the presence of rIL-23 had proinflammatory potential, while in IL-23 deficient mice inflammatory disease is prevented [115,116].

Previous studies of mice indicated that metabolites of fine-tuned microbiota can suppress *il-1β* secretion, which leads to reduced neutrophil recruitment and activation [117]. In our study, increased mRNA level of *il-1β* in the gut of antibiotic-treated and subsequently stressed fish suggested that antibiotic-induced dysbiosis discontinued the anti-inflammatory properties of healthy microbiota metabolites and may have augmented gut inflammatory reaction. As such, dysbiosis of the gut microbiota may shape the Treg/Th17 commitment to mucosal immunity. Constantly elevated inflammatory mediator levels can initiate pathological processes that may lead to several chronic disorders and influence susceptibility to autoimmune inflammatory diseases. Furthermore, defects in the Th17 cell differentiation may predispose the host to infections at mucosal surfaces [118]. Considering the dynamic balance in intestinal immunity and the important role in promoting inflammation and host innate immune responses against pathogens, we examined the gene expression of the IL-17 cytokine family. These studies revealed that *il-17a/f2*, *il17c* and *il-17d2* levels were elevated in the foregut of fish from ANT + STR group and in the midgut of fish treated



**Fig. 8.** Histology of cross-sections of foregut, midgut, and hindgut stained with hematoxylin and eosin (H&E) of common carp from four experimental groups: CTR - control carp immersed in water, ANT - carp immersed in VNAM cocktail, STR - carp immersed in water and stressed by confinement, and ANT + STR - carp immersed in VNAM cocktail and stressed by confinement. Photos marked with an apostrophe (') show an enlargement of the selected area (yellow frame). The scale bar is 100  $\mu\text{m}$  (black line) or 50  $\mu\text{m}$  (light line). An enterocyte is shown with a blue arrow, a rodlet cell is shown with a white arrow, a goblet cell is shown with an orange arrow, a lamina propria is shown with a yellow indicator and mucus in the lumen is shown with a black arrow. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

with antibiotics. Based on higher IL-17A expression levels observed in patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease, Nielsen et al. [119] linked the role of IL-17A to sustaining intestinal inflammation in IBD. Also, in grass carp, short-term exposure to antibiotics induced significant up-regulation of the expression of gene encoding fish-specific IL-17N cytokine [56]. The proinflammatory potential of the upregulated profile of genes encoding the IL-17 family is further supported by gene

upregulation of proinflammatory CXCL8\_L2, and CXCb1 chemotactic cytokines, that guide leukocyte migration.

Results indicating that microbiota disruption may provoke inflammations in the gut were previously described both for mammals and fish (e.g., Sun et al. [56,120]). Two scenarios are considered in the literature as the causative factors of this kind of diseases: (i) more frequent presence of pro-inflammatory bacteria [121–123] or (ii) reduced frequency of other bacteria species that attenuate inflammation [124]. Uncontrolled intestinal inflammation results in epithelial damage that promotes bacteria entry into the intestinal lamina propria (known as the leaky gut). Moreover, inflammation can potentially reduce the number of peace-keeping bacteria species and favor more resistant aggressive pathobionts, thus sustaining an inflammatory loop [125, 126].

Antibiotic treatment increased serum cortisol and glucose levels resembling values observed in fish after exposure to restraint stress. The fish treated with an antibiotic cocktail and subsequently stressed had serum cortisol level significantly higher than the stressed fish without antibiotic treatment. These results imply bidirectional brain-gut interaction where not only stress can change the abundance and composition of gut microbiota but also microbiota changes can affect stress response [127,128]. Similarly, in the study of Sudo and colleagues [25], an exaggerated HPA response was reported in germ-free mice compared to animals housed under specific pathogen-free conditions, which was reversed by reconstruction with *Bifidobacterium infantis*. Microbiota seems to regulate HPA response to prevent exaggerated immune response and/or autoimmunity. There are numerous pathways through which gut microbiota communicates with the brain. These include activation of the vagus nerve, production of microbial metabolites (i.e., SCFAs), and enteroendocrine cell signaling [129]. Therefore microbiota-gut-brain axis regulates central physiological processes, such as neurotransmission and neuroendocrine-immune signaling that are all adopted in stress-related responses [129,130].

## 5. Conclusions

Taken together, our findings show that in common carp combined antibiotic treatment and restraint stress altered the abundance and composition of the gut microbiota and polarized the immune system toward a Th17-dependent pro-inflammatory configuration. Further research is required to determine whether in this case, intestinal inflammation is a direct result of the microbiota dysbiosis and subsequent changes in the level of microbial metabolites e.g. SCFAs, or the mechanisms regulating this phenomenon are even more complex and involved for example modification of gut-brain axis. The latter is probable, as antibiotic treatment and subsequent stressing significantly increase the activation of stress axis.

It could be therefore concluded that microbiota influences health and welfare of lower vertebrates including fish. Moreover, we believe that our findings are relevant to broader research on stress-related diseases, which are linked to microbiota dysbiosis.

## Author contribution

MC, KK and MMac conceived and designed the study. KK, MMac, AM, AP, MZ, MM performed the experiments and analyzed the data. BN analyzed histological materials. AM, MMac, KK contributed to the generation of whole genome metagenome sequencing data and initial quality control of the sequencing data. KK, MMac, MC wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to the interpretation of the results and/or revision of the manuscript. All authors approved the final version.

## Ethics approval

All animal protocols were approved by the local ethical committee

(2nd Local Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) in Krakow, Poland, license number 227/2023.

### Availability of data and materials

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available in the RODBUK Cracow Open Research Data Repository, <https://doi.org/10.57903/UJ/RH0J5L>.

Metagenome data used for this analysis are available at the Sequence Read Archive (SRA) under project number PRJNA1136671 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>).

### Funding

This work was supported by the Polish National Science Center [grant number 2019/33/B/NZ6/00402]. The open-access publication of this article was funded by the programme “Excellence Initiative – Research University” at the Faculty of Biology of the Jagiellonian University in Kraków, Poland.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Acknowledgements

We thank Dariusz Gajdzinski and Mateusz Pocięcha from fish facilities for taking care of the animals used in this study. Amplicon libraries were sequenced on Illumina NextSeq 2000 in the Genomics Core Facility in Malopolska Center of Biotechnology Jagiellonian University, whose operation is supported by a grant from the Priority Research Area BioS under the Strategic Programme Excellence Initiative at Jagiellonian University.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2025.110301>.

### Data availability

Data will be made available on request.

### References

- [1] R.E. Ley, D.A. Peterson, J.I. Gordon, Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine, *Cell* 124 (2006) 837–848, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017>.
- [2] J.M. Brechley, D.C. Douek, Microbial translocation across the GI tract, *Annu. Rev. Immunol.* 30 (2012) 149–173, <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075001>.
- [3] N. Kamada, S.-U. Seo, G.Y. Chen, G. Núñez, Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 321–335, <https://doi.org/10.1038/nri3430>.
- [4] H.J. Flint, K.P. Scott, S.H. Duncan, P. Louis, E. Forano, Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut, *Gut Microbes* 3 (2012) 289–306, <https://doi.org/10.4161/gmic.19897>.
- [5] Z. Al Bander, M.D. Nierert, A. Mousa, N. Naderpoor, The gut microbiota and inflammation: an overview, *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 17 (2020) 7618, <https://doi.org/10.3390/ijerph17207618>.
- [6] R. Martin, A.J. Nauta, K. Ben Amor, L.M.J. Knippels, J. Knol, J. Garssen, Early life: gut microbiota and immune development in infancy, *Benef. Microbes* 1 (2010) 367–382, <https://doi.org/10.3920/BM2010.0027>.
- [7] Y. Belkaid, T.W. Hand, Role of the microbiota in immunity and inflammation, *Cell* 157 (2014) 121–141, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>.
- [8] S. Becattini, Y. Taur, E.G. Pamer, Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease, *Trends Mol. Med.* 22 (2016) 458–478, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.04.003>.
- [9] J.L. Round, S.K. Mazmanian, The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (2009) 313–323, <https://doi.org/10.1038/nri2515>.
- [10] Y. Belkaid, S. Naik, Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals, *Nat. Immunol.* 14 (2013) 646–653, <https://doi.org/10.1038/ni.2604>.
- [11] D.R. Littman, A.Y. Rudensky, Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation, *Cell* 140 (2010) 845–858, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.021>.
- [12] I.I. Ivanov, K. Atarashi, N. Manel, E.L. Brodie, T. Shima, U. Karaoz, D. Wei, K. C. Goldfarb, C.A. Santee, S.V. Lynch, T. Tanoue, A. Imaoka, K. Itoh, K. Takeda, Y. Umesaki, K. Honda, D.R. Littman, Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria, *Cell* 139 (2009) 485–498, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>.
- [13] I.I. Ivanov, R. de L. Frutos, N. Manel, K. Yoshinaga, D.B. Rifkin, R.B. Sartor, B. B. Finlay, D.R. Littman, Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine, *Cell Host Microbe* 4 (2008) 337–349, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.09.009>.
- [14] V. Gaboriau-Routhiau, S. Rakotobe, E. Lécuyer, I. Mulder, A. Lan, C. Bridonneau, V. Rochet, A. Pisi, M. De Paep, G. Brandi, G. Eberl, J. Snel, D. Kelly, N. Cerf-Bensussan, The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses, *Immunity* 31 (2009) 677–689, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.020>.
- [15] M.H. Shaw, N. Kamada, Y.-G. Kim, G. Núñez, Microbiota-induced IL-1 $\beta$ , but not IL-6, is critical for the development of steady-state Th17 cells in the intestine, *J. Exp. Med.* 209 (2012) 251–258, <https://doi.org/10.1084/jem.20111703>.
- [16] L.A. Lobo, C.F. Benjamim, A.C. Oliveira, The interplay between microbiota and inflammation: lessons from peritonitis and sepsis, *Clin. Transl. Immunol.* 5 (2016) 1–8, <https://doi.org/10.1038/cti.2016.32>.
- [17] M.T. Bailey, S.E. Dowd, J.D. Galley, A.R. Hufnagle, R.G. Allen, M. Lyte, Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation, *Brain Behav. Immun.* 25 (2011) 397–407, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.023>.
- [18] T.M. Uren Webster, D. Rodríguez-Barreto, S. Consuegra, C. Garcia de Leaniz, Cortisol-related signatures of stress in the fish microbiome, *Front. Microbiol.* 11 (2020) 1–9, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01621>.
- [19] A. Bharwani, M.F. Mian, J.A. Foster, M.G. Surette, J. Bienenstock, P. Forsythe, Structural and functional consequences of chronic psychosocial stress on the microbiome and host, *Psychoneuroendocrinology* 63 (2016) 217–227, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.10.001>.
- [20] V.A. Ortega, E.M. Mercer, G.F. Giesbrecht, M.-C. Arrieta, Evolutionary significance of the neuroendocrine stress axis on vertebrate immunity and the influence of the microbiome on early life stress regulation and health outcomes, *Front. Microbiol.* 12 (2021), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.634539>.
- [21] S. El Aidy, A.S. Ramsteijn, F. Dini-Andreote, R. van Eijk, D.J. Houwing, J.F. Salles, J.D.A. Olivier, Serotonin transporter genotype modulates the gut microbiota composition in young rats, an effect augmented by early life stress, *Front. Cell. Neurosci.* 11 (2017) 1–12, <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00222>.
- [22] T.L. Gur, L. Shay, A.V. Palkar, S. Fisher, V.A. Varaljay, S. Dowd, M.T. Bailey, Prenatal stress affects placental cytokines and neurotrophins, commensal microbes, and anxiety-like behavior in adult female offspring, *Brain Behav. Immun.* 64 (2017) 50–58, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.12.021>.
- [23] S. Geng, L. Yang, F. Cheng, Z. Zhang, J. Li, W. Liu, Y. Li, Y. Chen, Y. Bao, L. Chen, Z. Fei, X. Li, J. Hou, Y. Lin, Z. Liu, S. Zhang, H. Wang, Q. Zhang, H. Wang, X. Wang, J. Zhang, Gut microbiota are associated with psychological stress-induced defects in intestinal and blood–brain barriers, *Front. Microbiol.* 10 (2020) 1–12, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03067>.
- [24] J.D. Galley, M.C. Nelson, Z. Yu, S.E. Dowd, J. Walter, P.S. Kumar, M. Lyte, M. T. Bailey, Exposure to a social stressor disrupts the community structure of the colonic mucosa-associated microbiota, *BMC Microbiol.* 14 (2014) 189, <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-189>.
- [25] N. Sudo, Y. Chida, Y. Aiba, J. Sonoda, N. Oyama, X. Yu, C. Kubo, Y. Koga, Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice, *J. Physiol.* 558 (2004) 263–275, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>.
- [26] Y. Luo, B. Zeng, L. Zeng, X. Du, B. Li, R. Huo, L. Liu, H. Wang, M. Dong, J. Pan, P. Zheng, C. Zhou, H. Wei, P. Xie, Gut microbiota regulates mouse behaviors through glucocorticoid receptor pathway genes in the hippocampus, *Transl. Psychiatry* 8 (2018) 187, <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0240-5>.
- [27] M. Tena-Garitaonandia, M. Arredondo-Amador, C. Mascaraque, M. Asensio, J.J. G. Marin, O. Martínez-Augustín, F. Sánchez de Medina, Modulation of intestinal barrier function by glucocorticoids: lessons from preclinical models, *Pharmacol. Res.* 177 (2022) 106056, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106056>.
- [28] G.E. Wild, K.A. Waschke, A. Bitton, A.B.R. Thomson, The mechanisms of prednisone inhibition of inflammation in Crohn’s disease involve changes in intestinal permeability, mucosal TNF $\alpha$  production and nuclear factor kappa B expression, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18 (2003) 309–317, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2003.01611.x>.
- [29] T. Vanuytsel, S. van Wanrooy, H. Vanheel, C. Vanormelingen, S. Verschuere, E. Houben, S. Salim Rasool, J. Toth, L. Holvoet, R. Farre, L. Van Outendhove, G. Boeckxstaens, K. Verbeke, J. Tack, Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism, *Gut* 63 (2014) 1293–1299, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305690>.
- [30] J.B. Meddings, M.G. Swain, Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat, *Gastroenterology* 119 (2000) 1019–1028, <https://doi.org/10.1053/gast.2000.18152>.

- [31] J.D. Schepper, F. Collins, N.D. Rios-Arce, H.J. Kang, L. Schaefer, J.D. Gardinier, R. Raghuvanshi, R.A. Quinn, R. Britton, N. Parameswaran, L.R. McCabe, Involvement of the gut microbiota and barrier function in glucocorticoid-induced osteoporosis, *J. Bone Miner. Res.* 35 (2020) 801–820, <https://doi.org/10.1002/jbmr.3947>.
- [32] A.B. Ribeiro, H. Giusti, A.P.T. Souza, C.R. Franci, R.S. Saia, Dexamethasone prevents lipopolysaccharide-induced epithelial barrier dysfunction in rat ileum, *Shock* 49 (2018) 334–344, <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000930>.
- [33] B. Ocón, C.J. Aranda, R. Gámez-Belmonte, M.D. Suárez, A. Zarzuelo, O. Martínez-Augustín, F. Sánchez de Medina, The glucocorticoid budesonide has protective and deleterious effects in experimental colitis in mice, *Biochem. Pharmacol.* 116 (2016) 73–88, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.07.010>.
- [34] C.J. Aranda, M. Arredondo-Amador, B. Ocón, J.L. Lavín, A.M. Aransay, O. Martínez-Augustín, F.S. de Medina, Intestinal epithelial deletion of the glucocorticoid receptor NR3C1 alters expression of inflammatory mediators and barrier function, *FASEB J.* 33 (2019) 14067–14082, <https://doi.org/10.1096/fj.201900404ARR>.
- [35] Ş. Kızıltaş, N. İmeryüz, T. Gürcan, A. Siva, S. Saip, A. Dumankar, C. Kalaycı, N. B. Ulusoy, Corticosteroid therapy augments gastroduodenal permeability to sucrose, *Am. J. Gastroenterol.* 93 (1998) 2420–2425, <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1998.00697.x>.
- [36] M.G. Gareau, J. Jury, G. MacQueen, P.M. Sherman, M.H. Perdue, Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation, *Gut* 56 (2007) 1522–1528, <https://doi.org/10.1136/gut.2006.117176>.
- [37] M.G. Gareau, J. Jury, P.C. Yang, G. MacQueen, M.H. Perdue, Neonatal maternal separation causes colonic dysfunction in rat pups including impaired host resistance, *Pediatr. Res.* 59 (2006) 83–88, <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000190577.62426.45>.
- [38] N. Moussaoui, J.P. Jacobs, M. Larauche, M. Biraud, M. Million, E. Mayer, Y. Tache, Chronic early-life stress in rat pups alters basal corticosterone, intestinal permeability, and fecal microbiota at weaning: influence of sex, *J. Neurogastroenterol. Motil.* 23 (2017) 135–143, <https://doi.org/10.5056/jnm16105>.
- [39] M. van de Wouw, J.M. Lyte, M. Boehme, M. Sichetti, G. Moloney, M.S. Goodson, N. Kelley-Loughnane, T.G. Dinan, G. Clarke, J.F. Cryan, The role of the microbiota in acute stress-induced myeloid immune cell trafficking, *Brain Behav. Immun.* 84 (2020) 209–217, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.12.003>.
- [40] N.D. Youngblut, G.H. Reischer, W. Walters, N. Schuster, C. Walzer, G. Stalder, R. E. Ley, A.H. Farnleitner, Host diet and evolutionary history explain different aspects of gut microbiome diversity among vertebrate clades, *Nat. Commun.* 10 (2019) 2200, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10191-3>.
- [41] R.E. Ley, C.A. Lozupone, M. Hamady, R. Knight, J.I. Gordon, Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota, *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (2008) 776–788, <https://doi.org/10.1038/nrmicro1978>.
- [42] T. Uzar, W. Andrzejewski, J. Mazurkiewicz, Microbiome of the digestive tract and probiotic therapy in cyprinids, *Pol. J. Nat. Sci.* 34 (2019) 157–170.
- [43] S.E. Wendelaar Bonga, The stress response in fish, *Physiol. Rev.* 77 (1997) 591–625, <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>.
- [44] I.A. Bouyoucos, A.N. Schoen, R.C. Wahl, W.G. Anderson, Ancient fishes and the functional evolution of the corticosteroid stress response in vertebrates, *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 260 (2021) 111024, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111024>.
- [45] Y. Zha, A. Eiler, F. Johansson, R. Svanbäck, Effects of predation stress and food ration on perch gut microbiota, *Microbiome* 6 (2018) 28, <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0400-0>.
- [46] A.M. Tarnecki, F.A. Burgos, C.L. Ray, C.R. Arias, Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unravelled by metagenomics, *J. Appl. Microbiol.* 123 (2017) 2–17, <https://doi.org/10.1111/jam.13415>.
- [47] S. Wu, G. Wang, E.R. Angert, W. Wang, W. Li, H. Zou, Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine, *PLoS One* 7 (2012) e30440, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030440>.
- [48] S. Chang, J. Wang, C. Dong, Y. Jiang, Intestinal microbiota signatures of common carp (*Cyprinus carpio*) after the infection of *Aeromonas hydrophila*, *Aquac. Reports* 30 (2023) 101585, <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101585>.
- [49] M. Ghanbari, W. Kneifel, K.J. Domig, A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing, *Aquaculture* 448 (2015) 464–475, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>.
- [50] M.A.H.J. van Kessel, B.E. Dutilh, K. Neveling, M.P. Kwint, J.A. Veltman, G. Flik, M.S.M. Jetten, P.H.M. Klaren, H.J.M. Op den Camp, Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.), *AMB Express* 1 (2011) 41, <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-41>.
- [51] M. Ruzauskas, J. Armalytė, E. Lastauskienė, R. Šiugzdiniene, I. Klimienė, R. Mockeliūnas, E. Bartkienė, Microbial and antimicrobial resistance profiles of microbiota in common carps (*Cyprinus carpio*) from aquacultured and wild fish populations, *Animals* 11 (2021) 929, <https://doi.org/10.3390/ani11040929>.
- [52] D. Karmarkar, K.L. Rock, Microbiota signalling through MyD88 is necessary for a systemic neutrophilic inflammatory response, *Immunology* 140 (2013) 483–492, <https://doi.org/10.1111/imm.12159>.
- [53] D. Zhang, G. Chen, D. Manwani, A. Mortha, C. Xu, J.J. Faith, R.D. Burk, Y. Kunisaki, J.-E. Jang, C. Scheiermann, M. Merad, P.S. Frenette, Neutrophil ageing is regulated by the microbiome, *Nature* 525 (2015) 528–532, <https://doi.org/10.1038/nature15367>.
- [54] K. Watanabe, C.A. Gilchrist, M.J. Uddin, S.L. Burgess, M.M. Abhyankar, S. N. Moonah, Z. Noor, J.R. Donowitz, B.N. Schneider, T. Arju, E. Ahmed, M. Kabir, M. Alam, R. Haque, P. Pramoonjago, B. Mehrad, W.A. Petri, Microbiome-mediated neutrophil recruitment via CXCR2 and protection from amebic colitis, *PLoS Pathog.* 13 (2017) e1006513, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006513>.
- [55] S. Ascher, E. Wilms, G. Pontarollo, H. Formes, F. Bayer, M. Müller, F. Malinarich, A. Grill, M. Bosmann, M. Saffarzadeh, I. Brandão, K. Groß, K. Kiouptsi, J. M. Kittner, K.J. Lackner, K. Jurk, C. Reinhardt, Gut microbiota restricts NETosis in acute mesenteric ischemia-reperfusion injury, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 40 (2020) 2279–2292, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314491>.
- [56] B.-Y. Sun, H.-X. Yang, W. He, D.-Y. Tian, H.-Y. Kou, K. Wu, C.-G. Yang, Z.-Q. Cheng, X.-H. Song, A grass carp model with an antibiotic-disrupted intestinal microbiota, *Aquaculture* 541 (2021) 736790, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736790>.
- [57] K. Klak, M. Maciuszek, M. Marcinkowska, B.M.L. Verburg-van Kemenade, M. Chadzinska, The importance of CXC receptors CXCR1-2 and CXCR4 for adaptive regulation of the stress axis in teleost fish, *Fish Shellfish Immunol.* 127 (2022) 647–658, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.06.070>.
- [58] L. Pijanowski, P. Jurecka, I. Irnazarow, M. Kepka, E. Szwajser, B.M.L. Verburg-van Kemenade, M. Chadzinska, Activity of the hypothalamus–pituitary–interrenal axis (HPI axis) and immune response in carp lines with different susceptibility to disease, *Fish Physiol. Biochem.* 41 (2015) 1261–1278, <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0084-3>.
- [59] A. Apprill, S. McNally, R. Parsons, L. Weber, Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton, *Aquat. Microb. Ecol.* 75 (2015) 129–137, <https://doi.org/10.3354/ame01753>.
- [60] A.E. Parada, D.M. Needham, J.A. Fuhrman, Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples, *Environ. Microbiol.* 18 (2016) 1403–1414, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>.
- [61] C. Quast, E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, F. O. Glockner, The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013), <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1219>.
- [62] R.C. Edgar, B.J. Haas, J.C. Clemente, C. Quince, R. Knight, UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection, *Bioinformatics* 27 (2011) 2194–2200, <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTR381>.
- [63] P.A. Urán, A.A. Gonçalves, J.J. Taverne-Thiele, J.W. Schrama, J.A.J. Verreth, J.H. W.M. Rombout, Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Fish Shellfish Immunol.* 25 (2008) 751–760, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.02.013>.
- [64] P.A. Urán, J.W. Schrama, J.H.W.M. Rombout, J.J. Taverne-Thiele, A. Obach, W. Koppe, J.A.J. Verreth, Time-related changes of the intestinal morphology of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at two different soybean meal inclusion levels, *J. Fish. Dis.* 32 (2009) 733–744, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01049.x>.
- [65] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 45e–45, <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- [66] S. Babicki, D. Arndt, A. Marcu, Y. Liang, J.R. Grant, A. Maciejewski, D.S. Wishart, Heatmapper: web-enabled heat mapping for all, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) W147–W153, <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW419>.
- [67] N. Hayatgheib, E. Moreau, S. Calvez, D. Lepelletier, H. Pouliquen, A review of functional feeds and the control of *Aeromonas* infections in freshwater fish, *Aquac. Int.* 28 (2020) 1083–1123, <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00514-3>.
- [68] J.F. Rawls, B.S. Samuel, J.I. Gordon, Gutnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 4596–4601, <https://doi.org/10.1073/pnas.0400706101>.
- [69] C. Tsuchiya, T. Sakata, H. Sugita, Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish, *Lett. Appl. Microbiol.* 46 (2007), <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02258.x>, 071018031740002.???
- [70] W.-J. Xia, M.-L. Xu, X.-J. Yu, M.-M. Du, X.-H. Li, T. Yang, L. Li, Y. Li, K.B. Kang, Q. Su, J.-X. Xu, X.-L. Shi, X.-M. Wang, H.-B. Li, Y.-M. Kang, Antihypertensive effects of exercise involve reshaping of gut microbiota and improvement of gut-brain axis in spontaneously hypertensive rat, *Gut Microbes* 13 (2021) 1–24, <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1854642>.
- [71] R. Van der Meulen, L. Makras, K. Verbrugge, T. Adriani, L. De Vuyst, In vitro kinetic analysis of oligofructose consumption by *Bacteroides* and *Bifidobacterium* spp. indicates different degradation mechanisms, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 1006–1012, <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1006-1012.2006>.
- [72] Y. Liu, Y. Li, J. Li, Q. Zhou, X. Li, Gut microbiome analyses of wild migratory freshwater fish (*Megalobrama terminalis*) through geographic isolation, *Front. Microbiol.* 13 (2022) 1–12, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.858454>.
- [73] T. Zheng, Y. Tao, S. Lu, J. Qiang, P. Xu, Integrated transcriptome and 16S rDNA analyses reveal that transport stress induces oxidative stress and immune and metabolic disorders in the intestine of hybrid yellow catfish (*tachysurus fulvicraco* × *pseudobagrus vachelli*), *Antioxidants* 11 (2022) 1737, <https://doi.org/10.3390/antiox11091737>.
- [74] T. Ofek, M. Lalzar, I. Izhaki, M. Halpern, Intestine and spleen microbiota composition in healthy and diseased tilapia, *Anim. Microbiome*. 4 (2022) 50, <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00201-z>.
- [75] V. Jung-Schroers, A. Jung, M. Ryll, J. Bauer, F. Teitge, D. Steinhagen, Methods for identification and differentiation of different *Shewanella* spp. isolates for diagnostic use, *J. Fish. Dis.* 41 (2018) 689–714, <https://doi.org/10.1111/jfd.12772>.

- [76] C. Lee, J. Kim, K. Hwang, S. Hwang, Fermentation and growth kinetic study of *Aeromonas caviae* under anaerobic conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83 (2009) 767–773, <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1983-y>.
- [77] G. Bandeira Junior, B. Baldissarotto, Fish infections associated with the genus *Aeromonas*: a review of the effects on oxidative status, *J. Appl. Microbiol.* 131 (2021) 1083–1101, <https://doi.org/10.1111/jam.14986>.
- [78] A. Kozinska, A. Pekala, Various cases of flavobacteriosis in trout and carp cultured in Poland Summary, *Med. Weter.* 63 (2007) 858–863.
- [79] W. Guo, R. Han, W. Xu, Z. Lu, Y. Li, X. Dan, Z. Mo, The protective effect of inactivated *Flavobacterium columnare* vaccine in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), *Front. Immunol.* 14 (2023) 1–12, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1162975>.
- [80] M. Adamek, F. Teitge, V. Jung-Schroers, M. Heling, D. Gela, V. Piackova, M. Kocour, D. Steinhagen, *Flavobacteria* as secondary pathogens in carp suffering from koi sleepy disease, *J. Fish. Dis.* 41 (2018) 1631–1642, <https://doi.org/10.1111/jfd.12872>.
- [81] J.H. Yang, J.W. Park, H.S. Kim, S. Lee, A.M. Yerke, Y.S. Jaiswal, L.L. Williams, S. Hwang, K.H. Moon, Effects of antibiotic residues on fish gut microbiome dysbiosis and mucosal barrier-related pathogen susceptibility in zebrafish experimental model, *Antibiotics* 13 (2024) 82, <https://doi.org/10.3390/antibiotics13010082>.
- [82] S. He, Q. Wang, S. Li, C. Ran, X. Guo, Z. Zhang, Z. Zhou, Antibiotic growth promoter olaquinox increases pathogen susceptibility in fish by inducing gut microbiota dysbiosis, *Sci. China Life Sci.* 60 (2017) 1260–1270, <https://doi.org/10.1007/s11427-016-9072-6>.
- [83] E. Wang, Z. Yuan, K. Wang, D. Gao, Z. Liu, M.R. Liles, Consumption of florfenicol-mediated feed alters the composition of the channel catfish intestinal microbiota including enriching the relative abundance of opportunistic pathogens, *Aquaculture* 501 (2019) 111–118, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.019>.
- [84] S.S. Bhute, B. Escobedo, M. Haider, Y. Mekonen, D. Ferrer, S.D. Hillyard, A. D. Friel, F. van Breukelen, B.P. Hedlund, The gut microbiome and its potential role in paradoxical anaerobism in pupfishes of the Mojave Desert, *Anim. Microbiome*. 2 (2020) 20, <https://doi.org/10.1186/s42523-020-00037-5>.
- [85] A. Ruiz, E. Gisbert, K.B. Andree, Impact of the diet in the gut microbiota after an inter-species microbial transplantation in fish, *Sci. Rep.* 14 (2024) 4007, <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54519-6>.
- [86] N. van Hai, R. Fotedar, A review of probiotics in shrimp aquaculture, *J. Appl. Aquacult.* 22 (2010) 251–266, <https://doi.org/10.1080/10454438.2010.500597>.
- [87] G.M.M. Sanchez-Fernandes, I. Sá-Correia, R. Costa, Vibriosis outbreaks in aquaculture: addressing environmental and public health concerns and preventive therapies using gilthead seabream farming as a model system, *Front. Microbiol.* 13 (2022) 1–25, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.904815>.
- [88] J.D. Galley, M.T. Bailey, Impact of stressor exposure on the interplay between commensal microbiota and host inflammation, *Gut Microbes* 5 (2014) 390–396, <https://doi.org/10.4161/gmic.28683>.
- [89] X. Gao, Q. Cao, Y. Cheng, D. Zhao, Z. Wang, H. Yang, Q. Wu, L. You, Y. Wang, Y. Lin, X. Li, Y. Wang, J.-S. Bian, D. Sun, L. Kong, L. Birnbaumer, Y. Yang, Chronic stress promotes colitis by disturbing the gut microbiota and triggering immune system response, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115 (2018) E2960–E2969, <https://doi.org/10.1073/pnas.1720696115>.
- [90] M.T. Bailey, Influence of stressor-induced nervous system activation on the intestinal microbiota and the importance for immunomodulation, in: *Adv. Exp. Med. Biol.*, Springer New York LLC, 2014, pp. 255–276, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_12).
- [91] A.E. Duran-Pinedo, J. Solbriati, J. Frias-Lopez, The effect of the stress hormone cortisol on the metatranscriptome of the oral microbiome, *Npj Biofilms Microbiomes* 4 (2018) 25, <https://doi.org/10.1038/s41522-018-0068-z>.
- [92] A.M. Declercq, J. Aerts, B. Ampe, F. Haesebrouck, S. De Saeger, A. Decostere, Cortisol directly impacts *Flavobacterium columnare* in vitro growth characteristics, *Vet. Res.* 47 (2016) 84, <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0370-9>.
- [93] T.M. Uren Webster, S. Consuegra, C. Garcia de Leaniz, Early life stress causes persistent impacts on the microbiome of Atlantic salmon, *Comp. Biochem. Physiol., Part D: Genomics Proteomics* 40 (2021) 100888, <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2021.100888>.
- [94] C.E. Couch, W.T. Neal, C.L. Herron, M.L. Kent, C.B. Schreck, J.T. Peterson, Gut microbiome composition associates with corticosteroid treatment, morbidity, and senescence in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), *Sci. Rep.* 13 (2023) 1–11, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29663-0>.
- [95] R.M. Maltz, J. Keirse, S.C. Kim, A.R. Mackos, R.Z. Gharaibeh, C.C. Moore, J. Xu, A. Somogyi, M.T. Bailey, Social stress affects colonic inflammation, the gut microbiome, and short-chain fatty acid levels and receptors, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 68 (2019) 533–540, <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002226>.
- [96] A. Sarmento, C.D. Simões, Gut microbiota dysbiosis and chronic intestinal inflammation, in: *Compr. Gut Microbiota*, Elsevier, 2022, pp. 423–441, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819265-8.00057-7>.
- [97] W. Yi, J. Cheng, Q. Wei, R. Pan, S. Song, Y. He, C. Tang, X. Liu, Y. Zhou, H. Su, Effect of temperature stress on gut-brain axis in mice: regulation of intestinal microbiome and central NLRP3 inflammasomes, *Sci. Total Environ.* 772 (2021) 144568, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144568>.
- [98] E.Y. Huang, T. Inoue, V.A. Leone, S. Dalal, K. Touw, Y. Wang, M.W. Musch, B. Theriault, K. Higuchi, S. Donovan, J. Gilbert, E.B. Chang, Using corticosteroids to reshape the gut microbiome: implications for inflammatory bowel diseases, *Inflamm. Bowel Dis.* 21 (2015) 963–972, <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000332>.
- [99] E. Petrosou, E.B. Silva, D. Lay, S.D. Eicher, Effects of orally administered cortisol and norepinephrine on weanling piglet gut microbial populations and *Salmonella* passage1, *J. Anim. Sci.* 96 (2018) 4543–4551, <https://doi.org/10.1093/jas/sky312>.
- [100] T. Wu, L. Yang, J. Jiang, Y. Ni, J. Zhu, X. Zheng, Q. Wang, X. Lu, Z. Fu, Chronic glucocorticoid treatment induced circadian clock disorder leads to lipid metabolism and gut microbiota alterations in rats, *Life Sci.* 192 (2018) 173–182, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.049>.
- [101] D. Parada Venegas, M.K. De la Fuente, G. Landskron, M.J. González, R. Quera, G. Dijkstra, H.J.M. Harmsen, K.N. Faber, M.A. Hermoso, Short chain fatty acids (SCFAs)-Mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases, *Front. Immunol.* 10 (2019), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>.
- [102] D. Huyben, L. Sun, R. Moccia, A. Kiessling, J. Dicksved, T. Lundh, Dietary live yeast and increased water temperature influence the gut microbiota of rainbow trout, *J. Appl. Microbiol.* 124 (2018) 1377–1392, <https://doi.org/10.1111/jam.13738>.
- [103] I.S. Hines, C.S. Ferguson, T.J. Bushman, D.M. Gatlin, R.V. Jensen, S.A. Smith, D. D. Kuhn, A.M. Stevens, Impact of a yeast-based dietary supplement on the intestinal microbiome of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Aquac. Res.* 52 (2021) 1594–1604, <https://doi.org/10.1111/are.15011>.
- [104] N. Bano, A. DeRae Smith, W. Bennett, L. Vasquez, J.T. Hollibaugh, Dominance of *Mycoplasma* in the guts of the long-jawed mudsucker, *gillichthys mirabilis*, from five California salt marshes, *Environ. Microbiol.* 9 (2007) 2636–2641, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01381.x>.
- [105] S. Razin, *Mycoplasmas*, *Nature* 213 (1967) 116–117, <https://doi.org/10.1038/213116c0>.
- [106] D. Rosado, R. Xavier, R. Severino, F. Tavares, J. Cable, M. Pérez-Losada, Effects of disease, antibiotic treatment and recovery trajectory on the microbiome of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*), *Sci. Rep.* 9 (2019) 18946, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55314-4>.
- [107] J.R. López, L. Lorenzo, C. Marcelino Pozuelo, M.C. Mariu-Arjona, J.I. Navas, *Pseudomonas baetica*: pathogenicity for marine fish and development of protocols for rapid diagnosis, *FEMS Microbiol. Lett.* 364 (2016) fnw286, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw286>.
- [108] Y. Litvak, M.X. Byndloss, A.J. Bäuml, Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota, *Science* 362 (2018) 6418, <https://doi.org/10.1126/science.aat9076>.
- [109] N. Arias-Jayo, L. Abecia, L. Alonso Sáez, A. Ramirez-García, A. Rodríguez, M. A. Pardo, High-fat diet consumption induces microbiota dysbiosis and intestinal inflammation in zebrafish, *Microb. Ecol.* 76 (2018) 1089–1101, <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1198-9>.
- [110] L. Belmonte, S. Beutheu Youmba, N. Bertiaux-Vandaële, M. Antonietti, S. Leclaire, A. Zalar, G. Gourcerol, A.-M. Leroi, P. Déchelotte, M. Coëffier, P. Ducrot, Role of toll like receptors in irritable bowel syndrome: differential mucosal immune activation according to the disease subtype, *PLoS One* 7 (2012) e42777, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042777>.
- [111] B. Szebeni, G. Veres, A. Dezsöfi, K. Rusai, Á. Vannay, G. Bokodi, B. Vászárhelyi, I. Korponay-Szabó, T. Tulassay, A. Arató, Increased mucosal expression of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in coliac disease, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 45 (2007) 187–193, <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318064514a>.
- [112] J. Su, C. Yang, F. Xiong, Y. Wang, Z. Zhu, Toll-like receptor 4 signaling pathway can be triggered by grass carp reovirus and *Aeromonas hydrophila* infection in rare minnow *Gobiocypris rarus*, *Fish Shellfish Immunol.* 27 (2009) 33–39, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.02.016>.
- [113] T. Kawai, S. Akira, The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition, *Int. Immunol.* 21 (2009) 317–337, <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp017>.
- [114] K. Ghoreschi, A. Laurence, X.-P. Yang, C.M. Tato, M.J. McGeachy, J.E. Konkel, H. L. Ramos, L. Wei, T.S. Davidson, N. Bouladoux, J.R. Grainger, Q. Chen, Y. Kanno, W.T. Watford, H.-W. Sun, G. Eberl, E.M. Shevach, Y. Belkaid, D.J. Cua, W. Chen, J.J. O’Shea, Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- $\beta$  signalling, *Nature* 467 (2010) 967–971, <https://doi.org/10.1038/nature09447>.
- [115] M. Lochner, L. Peduto, M. Cherrier, S. Sawa, F. Langa, R. Varona, D. Riethmacher, M. Si-Tahar, J.P. Di Santo, G. Eberl, In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17 + and regulatory IL-10+ Foxp3+ ROR $\gamma$ T+ T cells, *J. Exp. Med.* 205 (2008) 1381–1393, <https://doi.org/10.1084/jem.20080034>.
- [116] D. Yen, J. Cheung, H. Scheerens, F. Poulet, T. McClanahan, B. Mckenzie, M. A. Kleinschek, A. Owyang, J. Mattson, W. Blumenschein, E. Murphy, M. Sathe, D. J. Cua, R.A. Kastelein, D. Rennick, IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6, *J. Clin. Investig.* 116 (2006) 1310–1316, <https://doi.org/10.1172/JCI21404>.
- [117] C. Guo, S. Xie, Z. Chi, J. Zhang, Y. Liu, L. Zhang, M. Zheng, X. Zhang, D. Xia, Y. Ke, L. Lu, D. Wang, Bile acids control inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome, *Immunity* 45 (2016) 802–816, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.008>.
- [118] W. Ouyang, J.K. Kolls, Y. Zheng, The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation, *Immunity* 28 (2008) 454–467, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.004>.
- [119] O.H. Nielsen, I. Kirman, N. Rüdiger, J. Hendel, B. Vainer, Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease, *Scand. J. Gastroenterol.* 38 (2003) 180–185, <https://doi.org/10.1080/00365520310000672>.
- [120] L. Sun, X. Zhang, Y. Zhang, K. Zheng, Q. Xiang, N. Chen, Z. Chen, N. Zhang, J. Zhu, Q. He, Antibiotic-induced disruption of gut microbiota alters local

- metabolomes and immune responses, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9 (2019) 1–13, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00099>.
- [121] R. Xie, Y. Gu, M. Li, L. Li, Y. Yang, Y. Sun, B. Zhou, T. Liu, S. Wang, W. Liu, R. Yang, X. Su, W. Zhong, B. Wang, H. Cao, *Desulfovibrio vulgaris* interacts with novel gut epithelial immune receptor LRRCL19 and exacerbates colitis, *Microbiome* 12 (2024) 4, <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01722-8>.
- [122] G. Bouma, W. Strober, The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 521–533, <https://doi.org/10.1038/nri1132>.
- [123] T. Pereira Guedes, J. Alves Silva, S. Neves, D. Falcão, P. Costa, P. Lago, I. Pedroto, M. Salgado, Positioning *Aeromonas* infection in inflammatory bowel disease: a retrospective analysis, *ge - port, J. Gastroenterol.* 30 (2023) 20–28, <https://doi.org/10.1159/000520272>.
- [124] H. Sokol, B. Pigneur, L. Watterlot, O. Lakhdari, L.G. Bermúdez-Humarán, J.-J. Gratadoux, S. Blugeon, C. Bridonneau, J.-P. Furet, G. Corthier, C. Grangette, N. Vasquez, P. Pochart, G. Trugnan, G. Thomas, H.M. Blottière, J. Doré, P. Marteau, P. Seksik, P. Langella, *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 16731–16736, <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>.
- [125] B. Stecher, R. Robbiani, A.W. Walker, A.M. Westendorf, M. Barthel, M. Kremer, S. Chaffron, A.J. Macpherson, J. Buer, J. Parkhill, G. Dougan, C. von Mering, W.-D. Hardt, *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota, *PLoS Biol.* 5 (2007) e244, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050244>.
- [126] C. Lupp, M.L. Robertson, M.E. Wickham, I. Sekirov, O.L. Champion, E.C. Gaynor, B.B. Finlay, Host-Mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of enterobacteriaceae, *Cell Host Microbe* 2 (2007) 119–129, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.010>.
- [127] M. Crumeyrolle-Arias, M. Jaglin, A. Bruneau, S. Vancassel, A. Cardona, V. Dauge, L. Naudon, S. Rabot, Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats, *Psychoneuroendocrinology* 42 (2014) 207–217, <https://doi.org/10.1016/j.psychneuen.2014.01.014>.
- [128] G. De Palma, P. Blennerhassett, J. Lu, Y. Deng, A.J. Park, W. Green, E. Denou, M. A. Silva, A. Santacruz, Y. Sanz, M.G. Surette, E.F. Verdu, S.M. Collins, P. Bercik, Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7735, <https://doi.org/10.1038/ncomms8735>.
- [129] J.A. Foster, L. Rinaman, J.F. Cryan, Stress & the gut-brain axis: regulation by the microbiome, *Neurobiol. Stress.* 7 (2017) 124–136, <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2017.03.001>.
- [130] A. Madison, J.K. Kiecolt-Glaser, Stress, depression, diet, and the gut microbiota: human–bacteria interactions at the core of psychoneuroimmunology and nutrition, *Curr. Opin. Behav. Sci.* 28 (2019) 105–110, <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2019.01.011>.

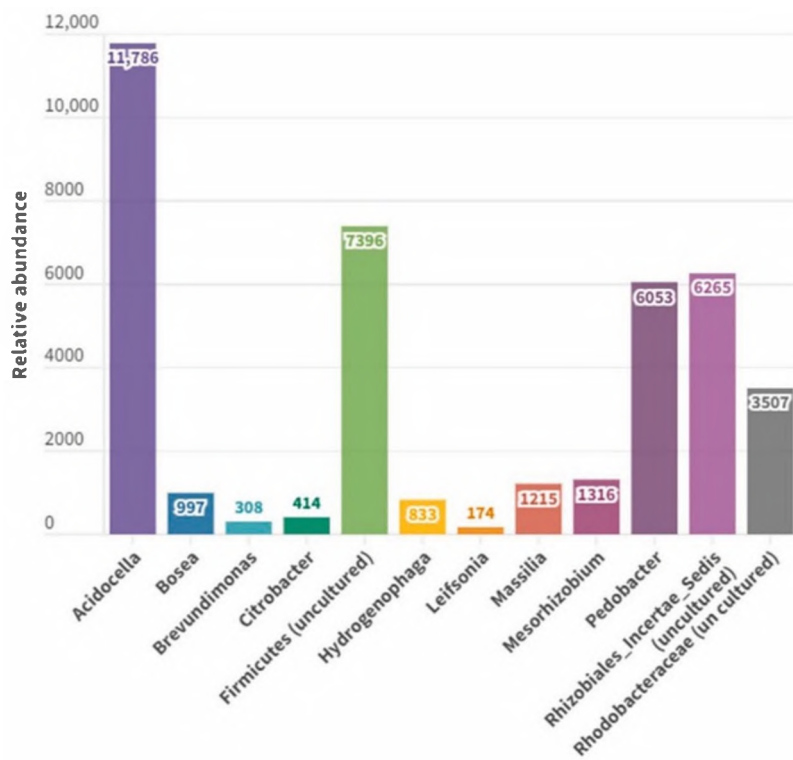
**Supplementary materials**

**Supplementary Table 1.** Primer sequences, concentrations, and corresponding accession numbers.

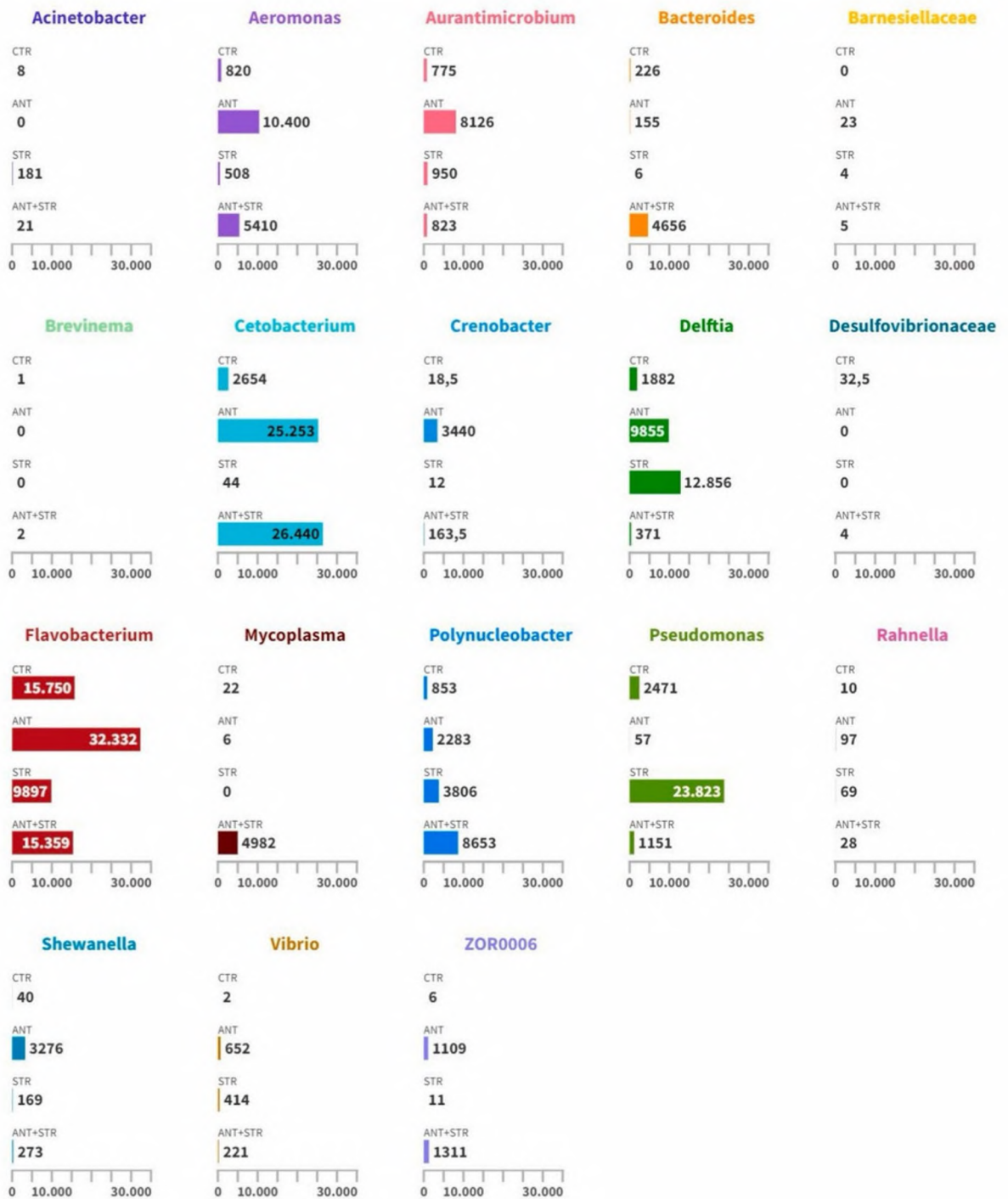
Gene (NCBI acc.no)	Primer nucleotide sequences (5'-3')	μM
<i>40s11</i> (AB012087)	F: CCGTGGGTGACATCGTTACA R: TCAGGACATTGAACCTCACTGTCT	1
<i>cycl12a</i> (AJ627274)	F: CACCGTCACAGATATGTACCATATAGTC R: GGTGGTCTTTTGCAGAGTCATTT	1
<i>cycl12b</i> (AJ536027)	F: GAGGAGGACCACCATGCATCT R: TTGTGCAAGCAGTCCAGAAGA	1
<i>il-16</i> (KC008576)	F: AAGGAGGCCAGTGGCTCTGT R: CCTGAAGAAGAGGAGGCTGTCA	1
<i>cycl8_l1</i> (AJ421443)	F: CTGGGATTCTGACCATTGGT R: GTTGGCTCTCTGTTTCAATGCA	1
<i>cycl8_l2</i> (AB470924)	F: TCACTTCACTGGTGTGCTC R: GGAATTGCTGGCTCTGAATG	1
<i>cyclb1</i> (AB082985)	F: GGGCAGGTGTTTTGTGTTGA R: AAGAGCGACTTGC GGATG	1
<i>cyclb2</i> (JN104598)	F: AGGCAGGTGCTTCTGTGCTGACA R: TTCATGCATTTCCGCTCTGCGCT	1
<i>tlr4</i> (XM_042736549)	F: TCAAAAACGGATCACACTGCA R: TGAAAGCTCCTGGTTCAATGT	1
<i>il-10</i> (AB110780)	F: CGCCAGCATAAAGAACTCGT R: TGCCAAATACTGCTCGATGT	1
<i>il-23p19</i> (HM231139)	F: CTCGCTCTGAAAACTACACCAGG R: GGCACGCTCTCTCCACTTACT	2
<i>il-12p35</i> (AJ580354)	F: TGCTTCTCTGTCTCTGTGATGGA R: CACAGCTGCAGTCGTTCTTGA	1
<i>il-17a/f2</i> (LC151601)	F: ATGTCCTGATAAATGGGCAGTGAG R: TGTCTGATAAATGGGCAGTGAGT	1
<i>il-17c</i> (XM_019125070)	F: GTGCCTGTGAAGCAAACCTCG R: TGCACAGGTACAGGCTACAG	1
<i>il-17d2</i> (LC151614)	F: GGAGCAGATGTTCCGGGAGAC R: CGAGACGCTGATTGACAGGT	1

**Supplementary table 2.** Distal intestine enteritis in common carp as a result of dysbiosis and stress. The degree of enteritis was assessed using a semi-quantitative scoring system for the different variables as described previously [63, 64]. MF - mucosal folds (1 – basal length; 2 – some shrinkage and bloating; 3 – diffused shrinkage and onset of tissue disruption; 4 – diffused tissue disruption; 5 – total tissue disruption); SNV – supranuclear vacuoles (1 – basal size; 2 – some size reduction; 3 – diffused size reduction; 4 – onset of extinction; 5 – no SNV); LP – lamina propria (1 – normal size, 2 – increased size; 3 – medium size; 4 – large size; 5 – largest size; SM - subepithelial mucosa (normal size; 2 – increased size; 3 – medium size; 4 – large size; 5 – largest size. GC – goblet cells (1 – scattered cells; 2 – increased number and sparsely distributed; 3 – diffused number widely spread; 4 – densely grouped cells; 5 – highly abundant and tightly-packed cells; EG – eosinophilic granulocytes (1 – few in SM; 2 – increased number in SM and some migration into LP; 3 – increased migration into LP; 4 – diffused number in LP and SM; 5 – dense EG in LP and SM; Data are presented as mean score  $\pm$  standard error (SE) (n = 3). Different letter (e.g. A vs B) indicates statistically significant differences in mean scores between groups ( $p \leq 0.05$ ).

	<b>CTR</b>	<b>ANT</b>	<b>STR</b>	<b>ANT+STR</b>
<b>MF</b>	1.00 ( $\pm$ 0.00) A	1.00 ( $\pm$ 0.00) A	1.00 ( $\pm$ 0.00) A	1.00 ( $\pm$ 0.00) A
<b>SNV</b>	1.00 ( $\pm$ 0.00) A	2.00 ( $\pm$ 0.00) B	2.00 ( $\pm$ 0.00) B	2.00 ( $\pm$ 0.00) B
<b>LP</b>	1.33 ( $\pm$ 0.00) A	2.00 ( $\pm$ 0.00) AB	2.00 ( $\pm$ 0.00) AB	3.33 ( $\pm$ 0.33) B
<b>SM</b>	1.00 ( $\pm$ 0.00) A	2.00 ( $\pm$ 0.00) A	1.67 ( $\pm$ 0.33) A	1.67 ( $\pm$ 0.33) A
<b>GC</b>	1.00 ( $\pm$ 0.00) A	2.00 ( $\pm$ 0.00) AB	1.67 ( $\pm$ 0.33) AB	3.33 ( $\pm$ 0.33) B
<b>EG</b>	1.00 ( $\pm$ 0.00) A	2.00 ( $\pm$ 0.00) AB	1.00 ( $\pm$ 0.00) A	4.00 ( $\pm$ 0.00) B

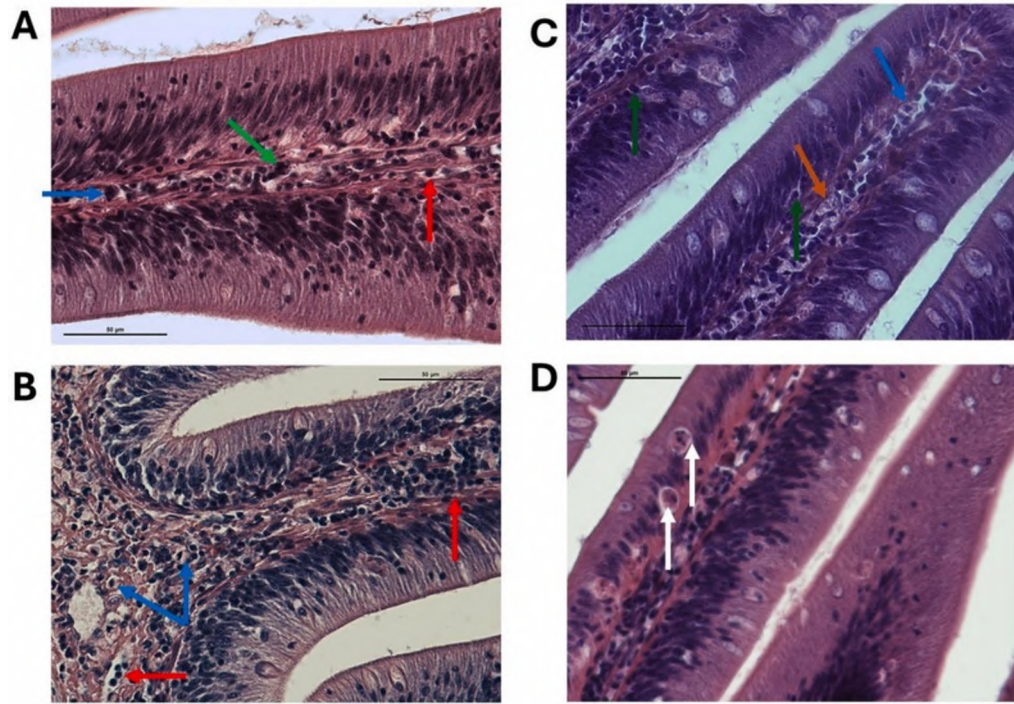


Supplementary Figure 1.

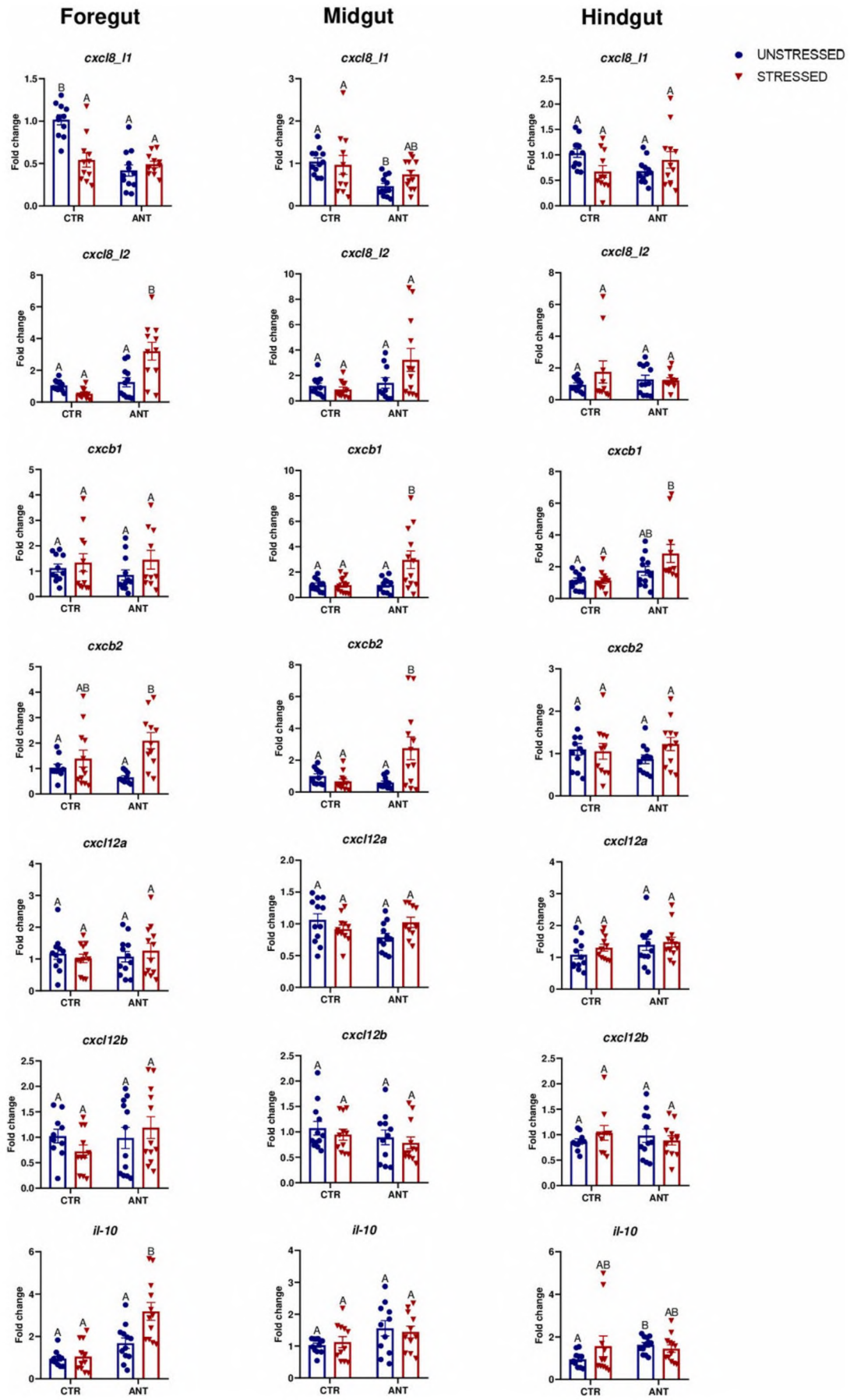


Relative abundance

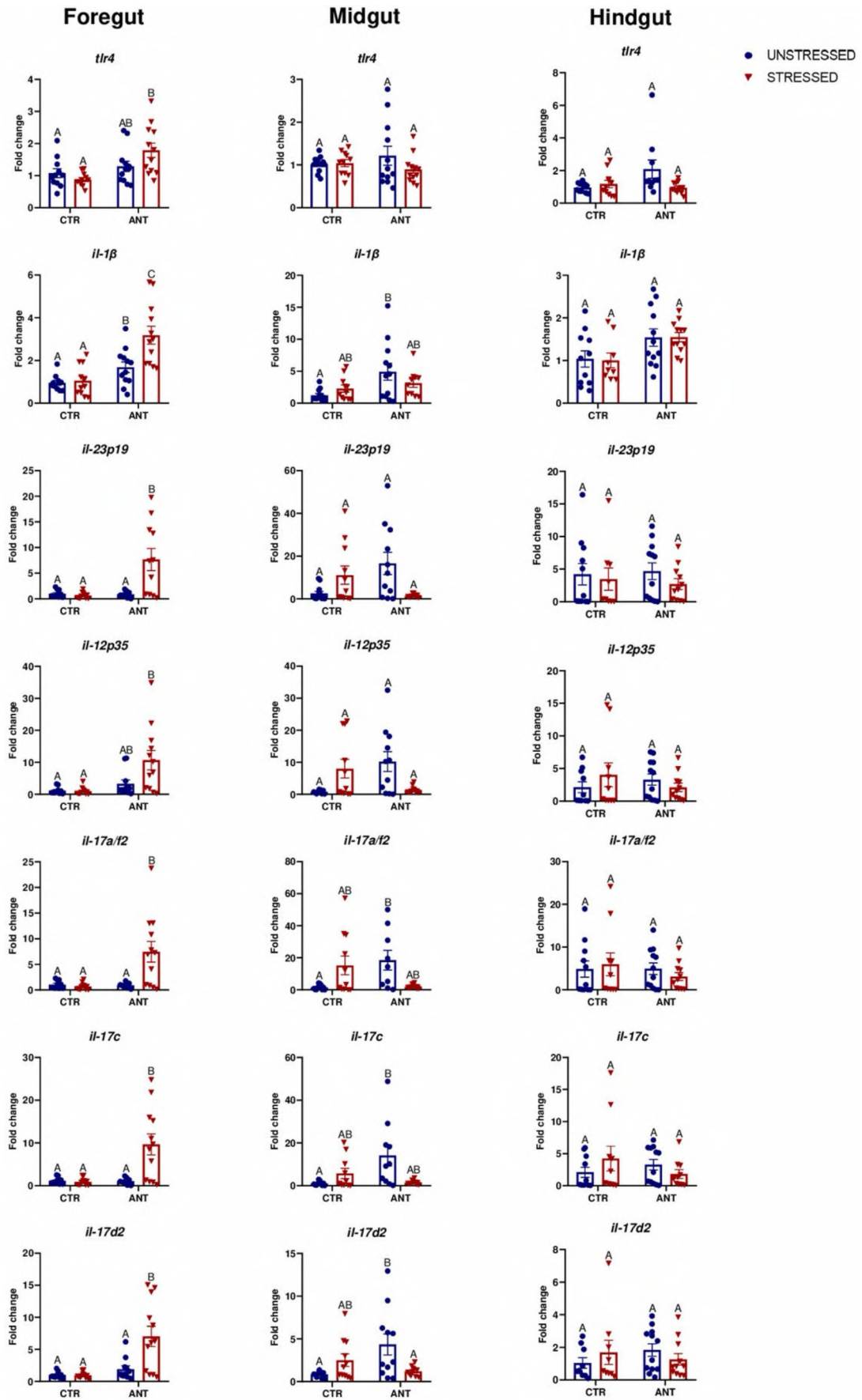
Supplementary Figure 2.



Supplementary Figure 3.



Supplementary Figure 4.



Supplementary Figure 5.

**Figure titles:**

**Supplementary Figure 1.** The diversity and relative abundance of bacteria genera in the water from tanks, where fish were kept.

**Supplementary Figure 2.** Effects of stress and antibiotic treatment on the diversity and relative abundance of bacteria genera in the water from tanks, where fish from different treatments were kept. CTR - tank from control unstressed fish, ANT – tank from unstressed fish treated with antibiotic cocktail (a broad-spectrum antibiotic cocktail, containing vancomycin (0.01 g/L), neomycin (0.5 g/L), ampicillin (0.5 g/L) and metronidazole (0.5 g/L) (VNAM)), STR - tank from stressed fish (24 h restraint stress), and ANT+STR – tank from stressed fish treated with antibiotic VNAM cocktail.

**Supplementary Figure 3.** Histology of cross-sections of foregut (A-B, D) and midgut (C) stained with hematoxylin and eosin (H&E) of common carp from three experimental groups: ANT - carp immersed in VNAM cocktail (A); STR – group immersed in water and stressed by confinement (D) and ANT+STR - carp immersed in VNAM cocktail and stressed by confinement (B-C). The scale bar is 50  $\mu\text{m}$ . An example of a macrophage is shown with a blue arrow (A-C), a neutrophil is shown with a green arrow (A), a lymphocyte is shown with a red arrow (A-B), an eosinophilic granular cell is shown with an orange arrow (C), the intraepithelial lymphocyte is shown with a grey arrow (C) and McKnight cells are shown with white arrows (D).

**Supplementary Figures 4-5.** Stress-induced changes in the expression of immune-related genes in the foregut, midgut, and hindgut of common carp with VNAM-disrupted intestinal microbiota. UNSTRESSED and STRESSED (24 h of confinement) fish were sampled at 48 h of the experiment. CTR represents the control group immersed in water, while ANT represents fish immersed in an antibiotic VNAM cocktail (0.01 g/L Vancomycin, 0.5 g/L Neomycin, 0.5 g/L Ampicillin and 0.5 g/L of Metronidazole). Within both, CTR and ANT groups, results are depicted with dots for the not-stressed fish and triangles for the stressed fish. Data are presented as mean data from n=9-12 fish  $\pm$  standard error (SE). Statistical analysis was performed using two-way ANOVA with subsequent Tukey's pairwise multiple comparisons test. Mean values not sharing letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences in particular intestinal segments (foregut, midgut, or hindgut) ( $p \leq 0.05$ ). Gene expression was determined by RT-qPCR and presented as an x-fold increase change compared to unstressed fish (CTR) and standardized for the housekeeping gene 40S ribosomal protein s11.

**4. Klak K., Maciuszek M., Kralka J., Pecio A., Nowak B., Konstantinidis I., Galindo-Villegas J., Chadzinska M., Microbiome dysbiosis affects stress response in common carp. Manuskrypt w przygotowaniu.**

W poprzedniej pracy (Klak i in., 2025) wykazano, że antybiotyki i stres wywołują u karpia dysbiozę mikrobioty jelitowej oraz reakcję zapalną w jelitach, manifestująca się m.in. naciekiem neutrofilii. Ponadto, u niestresowanych zwierząt z wywołaną antybiotykami dysbiozą zaobserwowano zwiększony poziom kortyzolu.

Celem pracy było zbadanie wpływu wywołanej antybiotykami dysbiozy na aktywność osi stresu (HPI) i na wywołaną stresem redystrybucję neutrofilii. Sprawdzone również wpływ dysbiozy i/lub stresu na profil transkryptomyczny oraz aktywność fagocytarną neutrofilii nerki głowowej.

Wykazano, że 24-godzinny stres powoduje wzrost poziomu kortyzolu w surowicy. Również wywołana antybiotykami dysbioza związana jest ze wzrostem poziomu kortyzolu, a ryby z dysbiozą, które poddano stresowi miały w surowicy istotnie wyższy poziom kortyzolu w porównaniu do ryb stresowanych z nienaruszoną mikrobiotą. Ponadto, w nerce głowowej ryb stresowanych zaobserwowano zwiększenie ekspresji genów kodujących białka regulujące steroidogenezę (*star*, *cyp11b1*) i konwersję kortyzolu (*11b-hsd2 i 3*). Jednak u stresowanych ryb z wywołaną antybiotykami dysbiozą nie dochodziło do wzrostu ekspresji *star* i *cyp11b*. U zwierząt tych zarówno w podwzgórzu jak i w nerce głowowej zwiększała się natomiast ekspresja genu kodującego prozapalną Il-1 $\beta$ . Dysbioza i stres zwiększały także w nerce głowowej i w leukocytach krwi obwodowej ekspresję genów zaangażowanych w pobudzenie granulocytopenozy (*gcsfr*) i migracji neutrofilii (*cxcl8\_l2* i *cxcrl*). Odnotowano również, że zarówno w wyniku stresu jak i dysbiozy dochodzi do redystrybucji neutrofilii do krwi obwodowej, jednak wzrost procentu neutrofilii we krwi był niższy u stresowanych ryb z dysbiozą niż u osobników stresowanych z nienaruszoną mikrobiotą. Aby sprawdzić, czy wynika to z redystrybucji neutrofilii z krwi do tkanek peryferycznych (skóra, skrzela), czy też jest to wynik zaburzonej granulocytopenozy/dojrzewania neutrofilii w nerce głowowej zbadano morfologię skóry i skrzeli, wykonano analizę transkryptomu neutrofilii nerki głowowej oraz zbadano aktywność tych komórek. Stwierdzono, że neutrofile pozyskane od zwierząt stresowanych wykazały wyższą ekspresję genów związanych z aktywnością antyapoptoczną (podwyższenie ekspresji *hif1a*, *cd8* i obniżenie *trim36*), oraz obniżoną ekspresję genów związanych z odpowiedzią przeciwwirusową (*dhx58*, *irf3*, *irf7*, *stat1*) i związaną z rozpoznawaniem sygnałów pochodzących z mikrobioty (*gpr43*), a także obniżoną ekspresję *cxcrl* związanego z retencją i dojrzewaniem neutrofilii w nerce głowowej. Wykazano ponadto,

że podobnie jak podczas stresu, ryby z dysbiozą wykazują zwiększoną ekspresję *hif1a*, a także obniżoną ekspresję *dhx58*, *irf3*, *irf7* i *stat1* i *cxc4*. U tych ryb zaobserwowano także zwiększoną ekspresję *lcp2a*, *cyb1* i zmniejszoną ekspresję *icam2*, *camp*, *trpv5*, *il10* i *tgfb*, co sugeruje wpływ dysbiozy na właściwości adhezyjne i migracyjne oraz proliferację i aktywność przeciwdrobnoustrojową/prozapalną. W neutrofilach pochodzących z nerki głowowej ryb stresowanych z wywołaną dysbiozą zaobserwowano podniesienie ekspresji *mmp9* i obniżenie ekspresji *mpx* i *cxc4*) a także wzrost ekspresji genów związanych z rozpoznaniem i prezentacją antygenów; *mhc1*, *trb*, *nlrp12*, *dhx58* oraz odpowiedzią prozapalną i przeciwwirusową (*irf3*, *irf7*, *stat1* i *il1β*). Stwierdzono również, że zarówno stres jak i wywołana antybiotykami dysbioza obniżają aktywność fagocytarną neutrofilii.

Uzyskane wyniki wskazują, że mikrobiota zaangażowana jest w regulację odpowiedzi na stres, w tym wpływa na wywołaną stresem granulocytopenię, proces dojrzewania neutrofilii, ich redystrybucję oraz aktywność.

1 **Microbiome dysbiosis affects stress response in common carp**

2  
3 Katarzyna Klak<sup>1,2</sup>, Magdalena Maciuszek<sup>1</sup>, Jakub Kralka<sup>1</sup>, Anna Pecio<sup>3</sup>, Barbara Nowak<sup>4</sup>, Ioannis  
4 Konstantinidis<sup>5</sup>, Jorge Galindo-Villegas<sup>5</sup>, Magdalena Chadzinska<sup>1</sup>

5  
6 1. Department of Evolutionary Immunology, Institute of Zoology and Biomedical Research, Faculty of  
7 Biology, Jagiellonian University, Krakow, Poland.

8 2. Doctoral School of Exact and Natural Sciences, Jagiellonian University, Krakow, Poland.

9 3. Department of Comparative Anatomy, Institute of Zoology and Biomedical Research, Faculty of  
10 Biology, Jagiellonian University, Krakow, Poland.

11 4. Institute for Marine and Antarctic Studies - Launceston, University of Tasmania, Launceston,  
12 Tasmania, Australia.

13 5. Department of Genomics, Faculty of Biosciences and Aquaculture, Nord University, Bodø, Norway  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

49 **Abstract**

50 In both fish and mammals, the immune and stress responses are interconnected, with glucocorticoids  
51 affecting the number (increasing neutrophil-to-lymphocyte ratio) and activity of leukocytes and  
52 cytokines/chemokines regulating the activation of the stress response. There is growing evidence for  
53 the involvement of the gastrointestinal microbiota in that crosstalk.

54 Here, we investigated the effects of antibiotic-induced microbiota depletion/dysbiosis on the  
55 activity of the stress axis, including stress-induced neutrophil redistribution in common carp. We  
56 studied changes in the expression of key genes involved in stress regulation, as well as genes involved  
57 in neutrophil retention, release and migration. To evaluate neutrophil maturation and activity in a  
58 hematopoietic niche, we performed gene expression analysis, bulk RNA sequencing and checked the  
59 phagocytic activity of the head kidney-derived neutrophils.

60 Fish experiencing stress during dysbiosis had higher cortisol level than stressed fish with an  
61 undisturbed microbiota. Non-stressed fish with dysbiosis also had significantly elevated cortisol level.  
62 Moreover, in organs forming stress axis of antibiotic-treated stressed fish we observed upregulation  
63 of *il-1 $\beta$*  expression. In this fish, we also noted increased expression of genes associated with  
64 granulocytopoiesis (*g-csfr*) and neutrophil migration (*cxc18\_l2* and *cxcr1*) in the head kidney and in  
65 blood leukocytes. Neutrophilia occurred in all treatment groups, however, in dysbiotic fish, both  
66 stressed and unstressed, neutrophilia was significantly less severe than in stressed fish with intact  
67 microbiota. In stressed fish with dysbiosis, transcriptome analysis of head kidney-derived neutrophils  
68 revealed decreased expression of *mpx* and *cxcr4*, and upregulation of *mmp9* expression, indicating an  
69 enhanced migratory behavior in line with altered maturation. Moreover, increased expression of  
70 *mhc1*, *trb*, *nlrp12*, *dhx58*, *irf3*, *irf7*, *stat1* and *il1 $\beta$*  expression suggests enhanced antigen presentation,  
71 inflammasome activation, and alterations in neutrophil function, potentially indicating neutrophil-  
72 cytotoxic T cell interplay. In turn, the transcriptomic profile of neutrophils derived from head kidney  
73 of stressed fish was directed towards antiapoptotic activity (upregulation of *hif1a*, *cd8* and  
74 downregulation of *trim36*), and showed decreased expression of gene encoding SCFA receptor  
75 (*gpr43*) and genes related to antiviral activity (*dhx58*, *irf3*, *irf7*, *stat1*). Similarly to stressed fish,  
76 unstressed dysbiotic fish exhibited upregulation of the expression of *hif1a*, alongside downregulation  
77 of the expression of *dhx58*, *irf3*, *irf7*, *stat1*. Moreover, they showed increased expression of *mmp9*,  
78 *lcp2a*, *cyb1* and decreased expression of *icam2*, *camp*, *trpv5*, *il10* and *tgfb*, what suggests altered  
79 adhesion and migratory properties, as well as changed proliferatory and antimicrobial/ inflammatory  
80 activity. Furthermore, significantly reduced phagocytic activity was observed in the head kidney  
81 neutrophils from unstressed antibiotic-treated fish, as well as in stressed animals (both with intact  
82 and disbiotic microbiota) compared to control fish.

83 The obtained results indicate that the microbiota is involved in the regulation of the stress  
84 response, including its influence on stress-induced granulocytopoiesis, neutrophil maturation, as well  
85 as their redistribution and activity.

86  
87 **Key words:** restraint stress, antibiotic-induced dysbiosis, neutrophil activity, CXC chemokines and  
88 receptors, HPI axis

89  
90  
91  
92  
93  
94

## 95 **1. Introduction**

96 As ectothermic vertebrates that inhabit aquatic environments, fish often experience environmental  
97 changes, and some of them, such as exposure to pollutants, crowding, and changes in water  
98 parameters (e.g., temperature, salinity, pH, oxygen level), induce a stress response. The well-  
99 described three-level stress response in fish mirrors that of other vertebrates. The primary response  
100 involves two neuroendocrine axes: the hypothalamus-sympathetic-chromaffin cell (adrenal medulla  
101 homologue) axis, which triggers the release of catecholamines (adrenaline, noradrenaline), and the  
102 hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis, which produces cortisol in the interrenal tissue of the  
103 head kidney (analogous to the adrenal cortex) (Wendelaar Bonga, 1997). The HPI axis is initiated by  
104 the release of corticotrophin-releasing hormone (CRH) from the hypothalamic nucleus preopticus  
105 (NPO). The next level involves the anterior pituitary, where adrenocorticotrophic hormone (ACTH) is  
106 cleaved from the larger proopiomelanocortin (POMC) protein (Metz et al., 2006b; Wendelaar Bonga,  
107 1997). ACTH secretion is stimulated upon CRH binding to the CRH receptor (CRHR). This process is  
108 regulated by CRH-binding protein (CRH-BP), which modulates CRH activity due to its affinity equal to  
109 or even greater than the CRHR (Westphal, Nicole, J., 2006). The interrenal tissue produces cortisol  
110 upon ACTH binding to melanocortin receptor 2 (MC2R) (Bouyoucos et al., 2021). Cortisol maintains  
111 organismal allostasis via mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid (GR) receptors. Teleosts show  
112 remarkable conservation in the core part of cortisol biosynthesis compared to humans. This pathway  
113 involves steroidogenic acute regulatory protein (StAR), which facilitates the mitochondrial transfer of  
114 cholesterol that is further enzymatically converted to pregnenolone. In the next steps, pregnenolone  
115 is enzymatically converted into 11-deoxycortisol, and 11 $\beta$ -hydroxylase (CYP11B1) completes this  
116 process by converting 11-deoxycortisol into cortisol. The activity of steroid hormones is also  
117 regulated by 11 $\beta$ -HSD dehydrogenases (Tokarz et al., 2015). In fish, 11 $\beta$ -hydroxysteroid  
118 dehydrogenase type 3 (11 $\beta$ -HSD3) functionally resembles mammalian cortisone reductase (11 $\beta$ -  
119 hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 11 $\beta$ -HSD1), which converts the inactive cortisone into active  
120 cortisol. Conversely, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 $\beta$ -HSD2) converts cortisol into its  
121 inactive form, cortisone (Baker, 2004; Chapman et al., 2013; Payne and Hales, 2004). As a result of the  
122 release of stress hormones, the secondary response stimulates physiological and behavioral  
123 adjustments, modulates some metabolic pathways that alter immune response, and affects  
124 hematological parameters. The tertiary response arises with prolonged stress and affects the whole  
125 organism physiology, including disease resistance (Barton, 2002). Prolonged stress can cause so-called  
126 allostatic overload, increasing disease susceptibility and mortality rates (Sneddon et al., 2016).  
127 Therefore, the stress axis must be tightly regulated to avoid allostatic overloads while providing  
128 emergency coordination of affected systems. In both fish and mammals, the immune response is  
129 interconnected with the stress response, with glucocorticoids affecting the number and activity of  
130 leukocytes (Chakraborty et al., 2021; Jones, 2012; Reiske et al., 2020; Verburg-van Kemenade et al.,  
131 2017) and cytokines/chemokines regulating the activation of the stress response. For example, our  
132 previous studies clearly indicated that CXC chemokines and their receptors are involved in the  
133 regulation of HPI activation and cortisol production/conversion in fish (Klak et al., 2022; Pijanowski et  
134 al., 2019).

135 Furthermore, in mammals, the activation of the stress axis depends on the composition of the  
136 gastrointestinal microbiota. For example, research involving germ-free mice revealed exaggerated  
137 responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis to acute stress (Luo et al., 2018;  
138 Sudo et al., 2004; Crumeyrolle-Arias et al., 2014), while social stressors changed the gut microbiota  
139 composition (Bailey et al., 2011). Many other studies revealed microbial engagement via the vagus  
140 nerve in the modulation of the responsiveness of the cortisol-HPA axis (Chen et al., 2021; Marca et  
141 al., 2011). Additionally, studies on rodents and humans showed that fecal microbiota transplantation

142 from depressed donors induced depressive-like phenotypes in the non-depressed microbe-depleted  
143 recipients (Kelly et al., 2016; Wang et al., 2020; Zheng et al., 2016).

144 In vertebrates, including teleost fish, the stress response is manifested by increased levels of cortisol  
145 and glucose, as well as a higher percentage of neutrophils in the blood circulation (Dhabhar et al.,  
146 2012; Klak et al., 2024). The immediate mobilization of neutrophils into the circulation induced by  
147 stress is believed to be highly adaptive, as it protects the host against potential injuries and infections  
148 that may occur during the fight or flight stress response. This hypothesis is in agreement with the  
149 results of Dhabhar and colleagues (Dhabhar et al., 1996), who claimed that in rodents, neural and  
150 endocrine factors released during stress signal specific leukocytes to exit the peripheral blood and  
151 enter other immune compartments (lymph nodes, Peyer's patches, bone marrow, lung, skin, mucosa,  
152 spleen, and other tissues) while sustaining blood neutrophilia. Recently, we found that restraint stress  
153 in common carp mobilizes neutrophil redistribution from the hematopoietic tissues, especially from  
154 the head kidney. We also showed that this phenomenon in common carp is regulated by the  
155 interaction of CXC chemokines and CXCR receptors and is cortisol-dependent (Klak et al., 2024). The  
156 mechanisms maintaining immature neutrophils in hematopoietic organs and stimulating their  
157 redistribution during inflammation and stress are highly conserved across different species (Dhabhar  
158 et al., 2012; Klak et al., 2024). In teleost fish, as in mammals, CXC ligands drive neutrophil activation  
159 and migration (Laing, 2004). In mammals, neutrophils are produced and mature in the bone marrow,  
160 which serves as the main neutrophil reservoir. However, inside the blood vessels of other organs such  
161 as the lungs, liver, and spleen, a pool of non-circulating cells forms a reservoir of mature neutrophils  
162 (Hidalgo et al., 2019). In teleost fish, the head kidney serves as the primary hematopoietic tissue  
163 where neutrophils are produced and mature. Their maturation follows several stages and is  
164 accompanied by the sequential formation of characteristic primary (azurophilic), secondary (specific),  
165 and tertiary (gelatinase) effector granules (Lawrence et al., 2018). The role of the master regulator of  
166 granulopoiesis relies on the granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), known to regulate steady-  
167 state hematopoiesis (proliferation and differentiation of neutrophil progenitors) (Gregory et al.,  
168 2007). Additionally, it modulates neutrophil functional maturation and mobilization into the  
169 bloodstream (Gregory et al., 2007). Administration of G-CSF results in a significant increase in  
170 circulating neutrophils, associated with decreased CXCL12 protein level in the bone marrow and  
171 decreased CXCR4 expression on the neutrophil surface (Hyun et al., 2006; Petit et al., 2002).  
172 Interestingly, the long-latency effects of G-CSF (hours to days) are distinct from those mediated by  
173 chemokine receptor signaling, such as the CXCR2 axis, which can induce a rapid neutrophil release  
174 within minutes to hours (Hidalgo and Casanova-Acebes, 2021). The maturation process of  
175 neutrophils, before being released into circulation or later in a marginal pool on blood vessel walls,  
176 involves distinct morphological changes along with stage-specific expression patterns of neutrophil  
177 surface receptors (Khojraty et al., 2021; Kirchberger et al., 2024). Studies have shown that in mice,  
178 the interaction of CXCL12 chemokine with the CXCR4 receptor on neutrophils retains these cells  
179 within the bone marrow (De Filippo and Rankin, 2018; Eash et al., 2009). Once in the bloodstream, in  
180 the absence of inflammation, neutrophils undergo a process of aging, also defined as senescence,  
181 where their function gradually declines until they are eventually cleared by tissues such as the liver,  
182 spleen, or bone marrow by stromal macrophages or in the periphery by tissue-resident macrophages  
183 (Malengier-Devlies et al., 2021). The clearance of aged, senescent neutrophils at bone marrow sites is  
184 CXCR4-dependent, and its surface expression increases as neutrophil age (Martin et al., 2003; Suratt  
185 et al., 2004).

186 In case of infection or stress, the number of peripheral blood neutrophils can increase rapidly  
187 (Dhabhar et al., 2012). Moreover, in mice, it has been shown that during inflammation, the first cells  
188 recruited into the blood circulation are aged neutrophils, characterized by higher expression of CXCR4  
189 and TLR and lower expression of L-selectin (CD62L) (Uhl et al., 2016; Zhang et al., 2015). It is

190 important to mention that aged and non-aged neutrophils exhibit differences in the expression of  
191 neutrophil elastase (NE), myeloperoxidase (MPO), and bactericidal/permeability-increasing protein  
192 (BPI), which are higher in aged cells. Moreover, aged neutrophils exhibit increased phagocytic  
193 capacity, higher ROS production, and expanded production of neutrophil extracellular traps (NETs),  
194 while non-aged cells can proliferate (Martinelli et al., 2004; Taneja et al., 2008). When leaving the  
195 blood capillaries, both neutrophil populations differ in the dynamics of the initial endothelial cell  
196 interactions. Uhl et al. (2016) have shown that upon LPS treatment, aged neutrophils rolled and  
197 firmly adhered in postcapillary venules, as well as transmigrated into the perivascular tissue faster  
198 than non-aged cells (Uhl et al., 2016). Rising evidence suggests a critical role for the gut microbiota in  
199 neutrophil aging, as well as in the tonic regulation of neutrophil production and phagocytic capacity  
200 in the bone marrow (Balmer et al., 2014; Clarke et al., 2010; Khosravi et al., 2014; Zhang et al., 2015).  
201 The microbiota drives neutrophil aging via Toll-like receptors (TLRs) and myeloid differentiation factor  
202 88 (Myd88)-dependent signaling pathways (Uhl et al., 2016; Zhang et al., 2015) and Zhang and co-  
203 workers (Zhang et al., 2015) found that microbiota depletion significantly reduced the number of  
204 aged circulating neutrophils.  
205 Previous studies on fish have highlighted the crucial role of CXC chemokines in the regulation of  
206 neutrophil redistribution during inflammation and stress (de Oliveira et al., 2013; Kepka et al., 2013;  
207 Klak et al., 2024; van der Aa et al., 2012, 2010). However, it remains unclear whether in fish, stress  
208 preferentially induces the redistribution of aged neutrophils and whether this process is dependent  
209 on microbiota. Therefore, we investigated how microbiota depletion affects the stress response, as  
210 well as the redistribution, maturation, and activity of neutrophils in common carp.

211

## 212 **2. Materials and methods**

### 213 **2.1. Animals**

214 Juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.; body weight (b.w.) 70–120 g, 8–10 months; line R3xR8)  
215 were obtained from the Institute of Ichthyobiology and Aquaculture, Polish Academy of Science,  
216 Gołysz, Poland. Before experiments, fish were acclimated for 4 weeks at 21°C in tanks (volume 375 l,  
217 flow rate 4 l/min, density 45 fish/tank and 9 kg/m<sup>3</sup>) with recirculating tap water and continuous  
218 aeration in 12L:12D light/dark cycle) at the Institute of Zoology and Biomedical Research in Krakow,  
219 Poland. Fish were fed daily with pelleted dry commercial feed (Aller Master, Aller Aqua, Czarna  
220 Dąbrówka, Poland) at 1% of their estimated body weight. None of the fish had been treated with  
221 antibiotics before this study. All animals were handled in strict accordance with good animal practice  
222 as defined by the relevant national and local animal welfare bodies.

223

### 224 **2.2. Antibiotic treatment and restraint stress challenge**

225 Antibiotic treatment and restraint stress challenge were performed as described by Klak, Maciuszek  
226 et al. (2024). Briefly, after acclimation, 24 individuals of healthy common carp were randomly  
227 assigned to experimental groups. Each group comprised 6 fish placed in separate tanks with aerated  
228 tap water (21°C). Fish from two tanks were pretreated with a broad-spectrum antibiotic cocktail,  
229 containing Vancomycin (0,01 g/L, Sigma Aldrich/Merck, MO, USA), Neomycin (0,5 g/L, Sigma  
230 Aldrich/Merck, MO, USA), Ampicillin (0,5 g/L, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and Metronidazole  
231 (0,5 g/L, Sigma Aldrich/Merck, MO, USA) (VNAM), to induce dysbiosis of the microbiota (ANT groups).  
232 Fish from the other two tanks were not exposed to antibiotics (INT groups). After 24 hours, half of  
233 the fish from the INT and VNAM groups were stressed by the confinement as described previously  
234 (Klak and Maciuszek, 2024). Fish in the remaining tanks were left undisturbed. The experiment was  
235 performed twice. To avoid additional stress and/or differences in handling, all samplings were  
236 performed by the same person and at the same time of day (9 a.m. VNAM treatment (24h),  
237 confinement (24 h), sampling), resulting in N=6 control (CTR - not exposed to any antibiotics and

238 unstressed), N=6 stressed (STR - not exposed to any antibiotics but stressed for 24 h), N=6 antibiotic-  
239 treated (ANT – 48 h in VNAM cocktail and unstressed), and N=6 antibiotic-treated and stressed (ANT  
240 – 48 h in VNAM cocktail and restrained for 24 h) fish. The fish were not fed during the *in vivo*  
241 procedures. Upon completion of the antibiotic trial, and restraint stress period, the fish were rapidly  
242 euthanized (<30 s, all at once) using a lethal dose of tricaine methanesulfonate (TMS, Sigma-Aldrich,  
243 MO, USA, 0.2 g/l with the addition of 0.8 g/l NaHCO<sub>3</sub>, POCh, Gliwice, Poland). Unstressed fish groups  
244 were euthanized before the stressed fish groups to avoid disrupting handling stress stimuli. All  
245 procedures were approved by the local ethical committee (2nd Local Institutional Animal Care and  
246 Use Committee (IACUC) in Krakow, Poland, license number 227/2023.

247

### 248 **2.3. Cortisol and glucose**

249 Blood was collected by caudal vein puncturing, allowed to clot at 4°C and centrifuged (3000 x g, 10  
250 min, 4 °C) to collect serum. Free cortisol level was determined using a commercially available  
251 Neogen, Lexington Cortisol ELISA Kit (KY, USA). Serum glucose levels were measured with an iXell®  
252 glucometer (Ganexo, Warsaw, Poland) as described previously by Klak et al. (Klak et al., 2022).

253

### 254 **2.4. Histology**

255 The first gills arches (about 0.3 cm in length) and skin samples (approximately 1.0 x 1.0 cm from the  
256 abdominal body part beneath the pectoral girdle) from 3 fish in each group were collected  
257 individually and immersed in Bouin's fixative (Sigma-Aldrich; HT10132) for 48 h. Fixed samples were  
258 moved into 70% ethanol. Next, the samples were dehydrated in graded ethanol solutions, followed  
259 by a hydrophobic clearing agent (Xylene, Sigma-Aldrich 534056). Dehydrated and cleared samples  
260 were then embedded in Paraplast Plus (Leica; Ref 39602004) using an embedding machine and later  
261 cut into 7 µm sections with a microtome (Hyrax M55, Zeiss). Hematoxylin and eosin (H&E stain,  
262 Chempur, 124687404) were used to stain the sections. All sections were visualized with a Nikon  
263 Eclipse E600 microscope, digitized by the NIS-Elements F software and post-processed by Canva. The  
264 X10 – X40 magnifications were used for the histological analysis.

265

### 266 **2.5. Tissue and cell isolation**

267 Fish blood was collected by the puncture of the caudal vein into a syringe containing 0.066 mg/ml of  
268 heparin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 2 ml of RPMI 1640 (Lonza, Basel, Switzerland) adjusted  
269 to carp osmolarity of 270 mOsm/kg with sterile water (cRPMI) and centrifuged (10 min, 800 rcf, 4 °C)  
270 to obtain the buffy coat. The buffy coat resuspension in cRPMI with heparin (0.033 mg/ml) was  
271 subsequently layered on 3 ml Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and centrifuged  
272 (2000 rcf, 25 min, 4 °C, with acceleration/deceleration shutoff). Collected PBL were washed twice in  
273 cRPMI (800 rcf, 10 min, 4 °C) and resuspended in 1 ml of cRPMI. 100 µl of cell suspension was  
274 collected for flow cytometry analyses. After centrifugation (800 rcf, 10 min, 4 °C) remaining cell pellet  
275 was resuspended in 400 µL RL buffer (EURx, Gdansk, Poland) with the addition of 1 % (v/v) β-  
276 mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and kept at -80 °C until further analysis of gene  
277 expression.

278 Nucleus preopticus (NPO) of the hypothalamus was dissected precisely according to the method  
279 described by Metz et al. (Metz et al., 2006a), pituitary gland (PIT), as well as the head kidney (HK, one  
280 partitioned tissue sample) were carefully dissected (≤ 30 mg), and immediately transferred to Fix RNA  
281 buffer (Eurex, Gdansk, Poland) and kept at 4°C for further analysis of gene expression. The remaining  
282 head kidney tissue was passed through a 100 µm nylon mesh, washed once and resuspended in 1 mL  
283 of cRPMI. 100 µl of the obtained head kidney leukocyte suspension was collected for flow cytometry  
284 analyses.

285 To obtain a neutrophil-enriched leukocyte suspension, the remaining leukocyte suspension was  
286 layered on a discontinuous Percoll gradient (1.020, 1.060, 1.070, and 1.083 g/cm<sup>3</sup>) and centrifuged for  
287 30 min at 800×g with the brake disengaged (Verburg-van Kemenade et al. 1994). The neutrophil-  
288 enriched cell fraction was collected, washed, and resuspended in cRPMI with heparin (0.033 mg/ml).  
289 This procedure was performed twice for each sample to improve neutrophil population purity. Finally,  
290 pelleted cells were resuspended in 1 ml of cRPMI. In a hemocytometer under a light microscope,  
291 purity and number of isolated neutrophils were verified by Türk's staining 0.01% (w/v) crystal violet  
292 (Sigma-Aldrich, MO, USA) in 3% (v/v) acetic acid (POCH, Gliwice, Poland) which allows distinction  
293 between leukocytes based on nucleus size and shape and cytoplasm granularity (Chadzinska et al.,  
294 2008). A neutrophil-enriched suspensions was divided to measure cell activity (as described below in  
295 section 2.7.), and gene expression (cells resuspended in 350 mL RL buffer (EURx, Gdansk, Poland)  
296 with 1% (v/v) β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and kept at -80°C for further  
297 RNA analyses).

298

## 299 **2.6. Cell morphology and activity**

### 300 **2.6.1. Flow cytometry analysis of cell size and granularity**

301 Flow cytometric analysis of PBL and HKL size (forward scatter, FSC) and complexity/granularity  
302 (sideward scatter, SSC) was performed, with 30,000 threshold events per sample, using CytoFLEX flow  
303 cytometer (Beckman Coulter Inc.). The neutrophil population was identified based on FSC/SSC  
304 characteristics and their typical location, selected by gating (Supplementary Fig. 1).

305

### 306 **2.6.2. Respiratory burst**

307 The neutrophil-enriched suspensions were resuspended in cRPMI at the concentration of 1<sup>^</sup>10<sup>6</sup>  
308 cells/well and seeded in 96-well cell culture plates (Nest Biotech Co, Wuxi, China) Cells were incubated  
309 at 27 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 30 min, to allow adhesion. After incubation, granulocytes were stimulated with  
310 phorbol ester - PMA (0,1 µg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 2 hours at 27 °C in 5% CO<sub>2</sub>. The  
311 intracellular oxidative burst was assayed by the oxidation of the nonfluorescent dihydrorhodamine  
312 123 (DHR-123, Sigma Aldrich/Merck, MO, USA) to the fluorescent rhodamine 123. For this purpose,  
313 DHR-123 was added to samples with a final concentration of 2,5 µg/ml and incubated (10 min at 27  
314 °C in 5% CO<sub>2</sub>) in the dark. After incubation, cells were acquired in a CytoFLEX flow cytometer  
315 (Beckman Coulter Inc.) equipped with a 488 nm blue laser. Neutrophils were distinguished by their  
316 FSC and SSC profiles, with 30,000 threshold events per sample. The oxidized product, rhodamine 123,  
317 was detected using the FITC channel with 525/40 nm bandpass filter. Data acquisition and analysis  
318 were performed using CytExpert software (Beckman Coulter Inc.). Fluorescence compensation was  
319 assessed using unstained controls. As a quantitative measure of intracellular ROS levels, the mean  
320 fluorescence intensity (MFI) of rhodamine 123 was used.

321

### 322 **2.6.3. Phagocytosis**

323 The neutrophil-enriched suspensions were resuspended in cRPMI at the concentration of 1<sup>^</sup>10<sup>6</sup>  
324 cells/well and seeded in an 18-well ibiTreat µ-slide (Ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany) suitable for  
325 inverted confocal microscopy observation at a concentration 1<sup>^</sup>10<sup>5</sup> cells/well. Cells were incubated at  
326 27 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 60 min, to allow adhesion.

327 After incubation in cRPMI medium cells were exposed to opsonized in fresh carp serum Zymosan A S.  
328 cerevisiae BioParticles™, Texas Red™ conjugate (2 × 10<sup>7</sup> particles/mL) with a ratio of 20:1. Cells were  
329 incubated with Zymosan for 120 min at 27 °C. Samples were then stained with DHR-123, incubated  
330 for 10 minutes at 27 °C and subsequently fixed with 4 % paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich, St.  
331 Louis, MO, USA) in PBS. Cells were imaged in a confocal microscope (Zeiss LSM 900), using a 20 × lens.

332 FITC and mCherry signals were measured using the 488-nm, and 561-nm, respectively, with suited  
333 dichroic and emission filter settings.

334

## 335 **2.7. Gene expression profiling by RT-qPCR and bulk RNA sequencing**

### 336 **2.7.1. Isolation of total RNA**

337 RNA from obtained tissues (NPO, PIT, HK, PBL) and head kidney-derived neutrophils was isolated  
338 using GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx, Gdansk, Poland), including on-column DNase  
339 treatment, following the manufacturer's instructions. Final elution was carried out in 30 µl of  
340 nuclease-free water (EURx, Gdansk, Poland) to densify the concentration of RNA. Total RNA from  
341 individual samples were stored at -80 °C until further analysis. Total RNA quantification and purity  
342 were measured by spectrophotometry using a Spark® Multimode Microplate and NanoQuant  
343 Plate™ Reader (Tecan, Grödig, Austria).

344

### 345 **2.7.2. Library construction and sequencing**

346 Total RNA from HK neutrophil samples, obtained as described in the previous section, was used as the  
347 template for RNA-seq library construction. RNA concentration, purity, and integrity were assessed  
348 using NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific) and Tape Station 4150 (Agilent Technologies). RNA-  
349 seq libraries were prepared using the NEBNext Ultra™ RNA Library Prep Kit (New England Biolabs)  
350 with the poly(A) mRNA magnetic isolation module (NEB #E7490). Briefly, 0.8 ng of total RNA was  
351 subjected to poly(A) enrichment, followed by fragmentation of mRNA to ~100–200 nucleotides. First-  
352 and second- strand complementary DNA (cDNA) synthesis was performed, and the resulting cDNA  
353 was purified, end-repaired, and ligated to sequencing adaptors. Barcoding was carried out using  
354 NEBNext Multiplex Oligos (New England Biolabs). PCR enrichment was performed with nine cycles,  
355 and the amplified libraries were purified using AMPure XP beads (Beckman Coulter, Inc.). A total of 15  
356 libraries were generated, representing four experimental groups: (CTR, n=5; ANT, n=4; STR, n=3; and  
357 ANT + STR, n=3). Library quality and quantification were assessed using Tape Station 4150 (Agilent  
358 Technologies). Libraries were pooled in equimolar ratios and sequenced on the HiSeq X platform  
359 (Illumina) at Novogene, generating over 2.5 billion 150bp paired end reads. The raw sequencing data  
360 generated in this study will be deposited in the Sequence Read Archive (SRA)  
361 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) at the submission stage.

362

### 363 **2.7.3. Bioinformatic analysis**

364 Quality control and preprocessing of raw sequencing reads were conducted using fastp v0.20.1 (Chen  
365 et al., 2018) with the parameters (--detect\_adapter\_for\_pe -g -q 20) to remove adapter sequences  
366 and low-quality reads. Trimmed reads were aligned to the common carp genome (NCBI assembly  
367 GCA\_018340385.1) using hisat2 v2.2.1 (Kim et al., 2019) with default paired-end mode parameters.  
368 To quantify gene expression levels, aligned reads were processed using featureCounts v2.0.3 (Liao et  
369 al., 2014) with the parameters (-p --countReadPairs -D 1000 -t mRNA -g gene), ensuring accurate  
370 transcript quantification. Differential expression analysis was conducted in R v4.4.2 using the limma  
371 package (Ritchie et al., 2015). A pre-filtering step was applied to retain rows with at least 10 counts  
372 across all samples. Scaling normalization was performed using the Trimmed Mean of M-values (TMM)  
373 method. Statistical modeling was implemented using lmer, followed by differential expression  
374 analysis with eBayes. P-values were adjusted using the Benjamin-Hochberg correction, and genes  
375 were considered differentially expressed at  $p_{\text{adjusted.value}} < 0.01$  and  $|\log(\text{FC})| > 1$ . Functional  
376 enrichment analysis, including Gene Ontology (GO) annotation and KEGG pathway enrichment, was  
377 performed using g:Profiler (Raudvere et al., 2019), with a significant threshold of 0.05 based on the  
378 g:SCS multiple test correction method. Enriched GO terms were categorized into biological processes  
379 (BP), molecular functions (MF), and cellular components (CC); however, only BP terms are presented  
380 in the figures. Ortholog assignment and pathway mapping were conducted using the ggplot2 and  
381 GOplot packages in R, utilizing the common carp genome as the reference.

382

#### 383 **2.7.4. cDNA synthesis and Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)**

384 For the cDNA synthesis reaction, The High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied  
385 Biosystems, Carlsbad, California, USA) was used. Non-reverse transcriptase (-RT) control was  
386 included. Samples were diluted 5x and stored at -20 °C until further use. RT-qPCR was performed  
387 using the Rotor-Gene Q, 5-Plex HRM (Qiagen, Hilden, Germany). For each RT-qPCR run master mix  
388 was prepared as follows: 7 µl of SYBR®Select Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, California,  
389 USA), 2 µl of each primer and 4 µl of cDNA (50× diluted). All used sequences for forward and reverse  
390 primers, including their accession numbers, are listed in Supplementary Table 1. For the internal  
391 reference 40S ribosomal protein s11 (40s11) gene was used. All RT-qPCR runs were performed under  
392 the following conditions: 2 min at 50 °C, 2 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C and 60 sec at 60 °C.  
393 An analysis of melt curves was performed by fluorescence detection from 60 to 90 °C at 1 °C  
394 intervals, after the end of each run, to confirm amplification specificity. No amplification was  
395 observed in -RT and non-template controls (NTC). Obtained results were analyzed using Rotor-GeneQ  
396 Series Software 2.3.1 and Microsoft® Excel®. Constitutive expression was determined as a ratio of  
397 target gene vs. reference gene (40s11 gene) according to the following equation:

$$398 \text{Ratio} = \frac{(E_{reference})^{Ct_{reference}}}{(E_{target})^{Ct_{target}}}$$

398

399 Changes in gene expression upon antibiotic treatment or/and stress challenge were determined as a  
400 ratio of target gene vs. reference gene (40s11) relative to the expression in control samples according  
401 to the following equation:

$$402 \text{Ratio} = \frac{(E_{target})^{\Delta Ct_{Target}(\text{control-sample})}}{(E_{reference})^{\Delta Ct_{Reference}(\text{control-sample})}}$$

402

403 Where E stands for amplification efficiency and Ct is the number of PCR cycles needed for the signal  
404 to exceed a predetermined threshold value (Pfaffl, 2001).

405

406

### 407 **2.8. Statistical analysis**

408 Statistical analysis was performed with GraphPad 9 Software (San Diego, CA, USA). Outliers were  
409 removed following Grubb's outlier test. Data were tested for parametric testing criteria with the  
410 Shapiro–Wilk (normality) and Spearman (homogeneity of variances) tests. Based on the Shapiro–Wilk  
411 test, data that did not meet the criteria for normal distribution were normalized by logarithmic  
412 transformation. Antibiotic and stress effects on changes in cortisol, glucose and mRNA levels were  
413 determined using two-way ANOVA with post hoc Tukey's test. Statistically significant differences were  
414 considered at the level of  $p \leq 0.05$ .

415

## 416 **3. Results**

### 417 **3.1. Effects of stress and antibiotic treatment on the stress response**

418 To evaluate the involvement of microbiota in the regulation of stress response, we determined the  
419 expression of stress-related genes in the HPI axis organs: nucleus preopticus of the hypothalamus  
420 (NPO), pituitary gland (PIT) and head kidney (HK) (Fig. 1) and the level of glucose and cortisol in blood  
421 plasma (Fig. 2)

422 In the NPO of antibiotic-treated but unstressed fish (ANT group), expression of *crh-bp* was  
423 significantly higher than in ANT+STR animals. In ANT fish, an upregulation of *il-1b* expression was  
424 observed compared to unstressed (CTR) and stressed (STR) fish, both with intact microbiota.  
425 Moreover, *il-1b* expression was significantly higher in NPO of ANT+STR fish than in CTR fish (Fig. 1A).

426 Additionally, in the PIT, stress and dysbiosis induced notable changes in the expression of stress-  
427 related genes. The expression of *chrh* was consistently downregulated across all treated groups (ANT,  
428 STR, ANT+STR) compared to control unstressed fish (CTR). In turn, expression of *gr1* was significantly  
429 downregulated in ANT fish compared to the control animals. Moreover, higher expression of *il-1b* was  
430 observed in ANT+STR fish than in CTR and STR groups (Fig. 1B).

431 In the head kidney, gene expression analysis revealed upregulation of *il-1b* in the ANT+STR group  
432 compared to CTR, STR and ANT groups. Analysis of the expression of genes involved in cortisol  
433 synthesis showed upregulation of *star* expression in stressed animals with intact microbiota (STR)  
434 compared to CTR and ANT+STR fish and *cyp11b1* expression compared to CTR and ANT fish.  
435 Furthermore, in the head kidney, we analyzed the expression of genes encoding enzymes involved in  
436 the cortisol conversion and we found that expression of *11b-hsd3* was higher in STR and ANT+STR fish  
437 compared to animals from CTR and ANT groups, while *11b-hsd2* expression was upregulated in the  
438 head kidney from STR and ANT+STR fish compared to animals from CTR group.

439 Not surprisingly, restraint stress induced an increase in serum cortisol and glucose levels.  
440 Furthermore, cortisol and glucose levels were significantly higher in unstressed fish with antibiotic-  
441 induced dysbiosis, than in unstressed fish with intact microbiota and did not differ from the levels  
442 observed in stressed fish. Moreover, in stressed fish, antibiotic-induced dysbiosis has a synergistic  
443 effect on cortisol level, which was higher than in stressed fish, but not on the glucose levels, as they  
444 were similar in all treated groups (Fig. 2).

445

### 446 **3.2. Effects of stress and antibiotic treatment on the number of neutrophils**

447 To investigate how microbiota-derived signals regulate stress-induced neutrophil redistribution, we  
448 assessed neutrophil percentage among head kidney (HKL) and peripheral blood leukocytes (PBL) of  
449 stressed fish with antibiotic-induced dysbiosis. We observed significant reductions in the percentages  
450 of neutrophils in the HKL of stressed fish (STR) compared to unstressed control fish. A similar pattern  
451 was observed between antibiotic-treated unstressed and stressed fish (Fig. 3A). The stressed fish had  
452 a higher percentage of circulating neutrophils. In ANT and ANT+STR fish, the percentage of blood  
453 neutrophils was higher than in control ones, while lower than in stressed fish with intact microbiota  
454 (Fig. 3B). Moreover, we verified the number of neutrophil granulocytes in two peripheral tissues –  
455 skin and gills. However, we did observe neutrophil infiltration neither in the skin nor in the gills of fish  
456 from all experimental groups (Data not shown).

457

### 458 **3.3. Effects of stress and antibiotic treatment on the expression of key genes involved in neutrophil 459 redistribution in the head kidney and peripheral blood leukocytes**

460 Based on previous observations, we evaluated the expression of key genes involved in neutrophil  
461 redistribution from the head kidney into the peripheral blood leukocyte pool.

462 In the head kidney, gene expression analysis revealed upregulation of *g-csfr* expression in the  
463 ANT+STR group compared to fish from CTR and ANT groups. Moreover, in the head kidney of  
464 ANT+STR animals, we found higher expression of *cxcl8\_l2* than that observed in fish from other  
465 groups and upregulation of *cxcr1* expression compared to values measured in stressed fish with intact  
466 microbiota. In turn expression of *cxcl12a* was downregulated in antibiotic-treated unstressed animals  
467 compared to control fish. Downregulation of gene expression was observed in the head kidney of STR  
468 fish compared to other groups in the case of *cxcb2* (Fig. 4A).

469 Gene expression analysis in PBLs revealed upregulation of *g-csfr* in STR and ANT+STR groups  
470 compared to CTR fish. Moreover, in unstressed fish with antibiotic-induced dysbiosis (ANT) an  
471 upregulation of *cxcl8\_l1*, *cxcl8\_l2* and *cxcl12a* genes compared to unstressed animals with intact  
472 microbiota (CTR). Moreover, in ANT fish expression of *cxcr3* was higher than in CTR and STR animals,  
473 while in this group expression of *mmp9* was downregulated compared to STR fish. In PBLs of all

474 treatment groups (ANT, STR and ANT+STR) upregulation of the expression of *mmp9*, *cxcl8\_11*, *cxcl8\_12*  
475 and *cxcr1* was observed compared to CTR fish. Additionally, the chemokine genes *cxcb1* and *cxcb2*  
476 were significantly upregulated in the ANT+STR group compared to the control fish (Fig. 4B).  
477 Furthermore, we found that in PBLs, expression of *gr1* was upregulated in both STR and ANT+STR  
478 groups compared to the control fish, while *il-1b* expression was upregulated across all treatment  
479 groups compared to the control animals (Supplementary Fig. 2).

480

481

### 482 **3.4. Effects of stress and antibiotic-treatment on neutrophil activity**

483 We also compared the phagocytic capacity of head kidney-derived neutrophils in control, stressed  
484 fish with intact microbiota, as well as in stressed and antibiotic-treated animals. Our results show that  
485 the percentage of phagocytosis and the phagocytic index were significantly reduced in HK neutrophils  
486 retrieved from STR, ANT and ANT+STR fish compared to control unstressed fish with undisturbed  
487 microbiota (Fig. 6). In these cells we measured ROS production. We found that *ex vivo* stimulation of  
488 HK neutrophils increased ROS production. However, we did not observe differences in ROS  
489 production between experimental groups (Supplementary Fig. 4).

490

### 491 **3.5. Effects of stress and antibiotic-treatment on the expression of genes involved in neutrophil** 492 **aging**

493 To further understand how stress and microbiota influence neutrophil function, we analyzed the  
494 expression of maturation/ageing marker genes in neutrophils isolated from the head kidney. Our  
495 results revealed that *mpx* expression was significantly lower in neutrophils from stressed fish with  
496 dysbiosis compared to other groups (CTR, STR, ANT+STR). Further analysis showed that *cxcr4*  
497 expression was significantly reduced in both groups of fish with dysbiosis (ANT and ANT+STR)  
498 compared to control fish, while stressed fish with undisturbed microbiota exhibited significantly  
499 higher *cxcr4* expression compared to both the CTR group and ANT+STR fish (Fig. 5).

500

### 501 **3.6. Transcriptome responses of common carp neutrophils to antibiotic treatment, stress, and their** 502 **combination**

#### 503 **3.6.1. Statistics of the raw read filtering, annotation and mapping steps.**

504 The sequencing results from 15 samples were analyzed to evaluate read quality and composition  
505 (Supplementary Tab. 2). Briefly, the mean raw read count across all samples was 171,142,555 reads,  
506 with values ranging from 131,105,626 (STR\_1) to 196,802,540 (CTR\_4). The average percentage of  
507 clean reads was 97.22%, demonstrating high sequencing quality and effective filtering of low-quality  
508 sequences. The GC content ranged from 47.2% to 54.16%, with an average of 48.91%, indicating  
509 stable nucleotide composition across samples. The mean Q20 and Q30 scores were 97.41% and  
510 95.08%, respectively, confirming high sequencing accuracy. Error rates remained consistently low,  
511 averaging 0.026% across all samples. Additionally, the percentage of pass filter reads (%PF) remained  
512 high (96.94% on average), ensuring high-quality sequencing output. Overall, these sequencing  
513 statistics indicate high-quality data, with minimal errors and a well-balanced GC composition,  
514 ensuring reliable downstream analysis of differential gene expression.

515

#### 516 **3.6.2. Multivariate Analysis of Gene Expression**

517 To evaluate the impact of antibiotic treatment (ANT), stress (STR), and their combination (ANT + STR)  
518 on the transcriptome of common carp neutrophils, we conducted a differential expression analysis  
519 across the three experimental conditions compared to the control (CTR). Principal component  
520 analysis (PCA) (Fig. 7A) revealed distinct clustering patterns among experimental groups, indicating  
521 significant gene expression changes in response to each treatment. Log2 fold change (logFC)

522 dimensions 1 and 2 accounted for 32% and 17% of the variance, respectively, highlighting unique  
523 transcriptomic profiles associated with each condition. CTR samples clustered closely together, while  
524 STR and ANT displayed intermediate clustering, suggesting some shared but distinct transcriptional  
525 changes. Notably, the (ANT + STR) group formed a separate, well-defined cluster, indicating a more  
526 pronounced transcriptomic shift when both treatments were applied simultaneously.  
527 The observed overlap between STR and ANT suggests the presence of shared regulatory pathways,  
528 while the distinct clustering of (ANT+STR) implies an additive or synergistic effect. These findings  
529 highlight a complex interaction between stress- and antibiotic-induced transcriptional responses,  
530 potentially influencing immune function and cellular homeostasis in common carp neutrophils.

531

### 532 **3.6.3. Differential Gene Expression Patterns**

533 The bar chart (Fig. 7B) summarizes the number of differentially expressed genes (DEGs) identified  
534 across treatments compared to the control group. ANT treatment resulted in the largest number of  
535 DEGs, with 3,056 downregulated and 2,569 upregulated genes. The combined ANT+STR treatment  
536 exhibited a more balanced pattern, with 1,884 downregulated and 2,043 upregulated genes. STR  
537 treatment induced the lowest number of DEGs, with 234 downregulated and 494 upregulated genes,  
538 suggesting a less pronounced effect compared to the other conditions. A detailed breakdown of the  
539 DEGs for each comparison is provided in Supplementary Tab. 2.

540

### 541 **3.6.4. Overlap of Differentially Expressed Genes**

542 The Venn diagram (Fig. 7C) illustrates the overlap of DEGs across the three treatments. Among the  
543 7,434 DEGs identified, a core set of 468 was commonly shared across all treatments, suggesting key  
544 genes consistently affected by stress, antibiotic supplementation, or their combination. Distinct  
545 transcriptional responses were observed in the ANT (3,330 unique DEGs) and ANT+STR (1,607 unique  
546 DEGs) groups, indicating that these treatments triggered more specific gene expression changes  
547 compared to STR alone. This suggests that antibiotic exposure, either alone or in combination with  
548 stress, has a stronger regulatory impact on gene expression than stress alone.

549

### 550 **3.6.5. Hierarchical Clustering of DEGs**

551 The heatmap (Fig. 7D) shows hierarchical clustering of DEGs across experimental groups. CTR samples  
552 formed a distinct cluster, whereas the STR, ANT, and ANT+STR groups exhibited varying degrees of  
553 overlap and distinction, reflecting both shared and unique transcriptional changes among treatments.  
554 Notably, the ANT+STR group displayed a mixed expression, supporting the PCA results and  
555 highlighting the complex interaction between antibiotic exposure and stress-induced transcriptional  
556 responses. These findings suggest that while stress alone induces moderate transcriptomic changes,  
557 its combination with antibiotic treatment enhances the regulatory effect on gene expression, leading  
558 to a distinct transcriptional signature.

559

### 560 **3.6.6. Differential Gene Expression Analysis**

561 Volcano plots were generated to visualize differentially expressed genes (DEGs) between treatment  
562 groups (STR, ANT, and ANT+STR) and the control (CTR) (Fig. 8A-C). Genes were classified as  
563 significantly upregulated or downregulated based on a log<sub>2</sub> fold change (log<sub>2</sub>FC) threshold on the x-  
564 axis, and -log<sub>10</sub> (p-value) on the y-axis. The dashed lines indicate significant thresholds, and only the  
565 top 100 unregulated and downregulated genes are labelled. In the STR group, a relatively small  
566 number of DEGs were identified compared to CTR, with notable upregulation observed in genes such  
567 as hypoxia inducible factor 1-alpha-like (hif1a), cluster-of-differentiation-8-a (cd8a), and 4 (cd4).  
568 Interestingly, downregulated genes included the short-chain fatty acid receptor (*gpr43*) and the  
569 apoptosis inducer *trim36*, suggesting that stress alone induces moderate but relevant changes in  
570 immune gene expression (Fig. 8A).

571 In contrast, the ANT group exhibited a substantial number of DEGs, with few upregulated genes,  
572 including lymphocyte cytosolic protein 2-a (*lcp2a*), cyclin-B1 (*cyb1*), and *hif1a*. Conversely, several  
573 key immune-related genes, including intercellular adhesion molecule 2 (*icam2*), cathelicidin  
574 antimicrobial peptides (*camp*), and transient receptor potential vanilloid 5 (*trpv5*) were markedly  
575 downregulated, highlighting a strong immunomodulatory effect of antibiotic treatment. (Fig. 8B). The  
576 ANT+STR group displayed a unique immune transcriptional profile, with significant DEGs such as  
577 major histocompatibility complex 1 (*mhc1*), T-cell receptor beta (*trb*), and a member of the NLR  
578 “inflammasome” family (*nlrp12*) showing a strong overexpressed regulatory pattern (Fig. 8C). These  
579 findings suggest complex interactions between antibiotic and stress treatments, resulting in altered  
580 gene expression profiles. All immune-related genes included in the analysis were retrieved from the  
581 NCBI online platform using the *C. carpio* genome, and their corresponding LOC identifiers were  
582 obtained via BLAST on the same NCBI site, ensuring accuracy and specificity of gene annotations. In  
583 most cases, gene symbols were assigned through homology with mammalian counterparts.

584

### 585 **3.6.7. Hierarchical Clustering of Immune-Related Genes**

586 A heatmap of immune-related DEGs across all treatments (Fig. 8D) reinforces the distinct clustering  
587 patterns previously observed in the volcano plots among the experimental groups. The control (CTR)  
588 samples exhibited minimal transcriptional changes, whereas STR, ANT, and ANT+STR groups displayed  
589 divergent gene expression patterns. Notably, the ANT+STR group exhibited a mixed expression  
590 pattern, incorporating features of both STR and ANT groups, suggesting a potential interaction effect  
591 between stress and antibiotic exposure. Antiviral genes, including RIG-1-like receptor 3 (*dhx58*),  
592 interferon regulatory factor 3 (*irf3*), 7 (*irf7*), and the signal transducers and activators of transcription  
593 1 (*stat1*) were prominently downregulated in both the ANT and STR groups, while the same genes  
594 were significantly overexpressed in the ANT+STR group. Moreover, an extended analysis of genes  
595 associated with neutrophil maturation and redistribution revealed downregulation of *tgfb* in the ANT  
596 group, and upregulation of *mmp9* and *il-1 $\beta$*  in fish from the ANT+STR group (Fig. 8E-G). This highlights  
597 the modulatory effects of stress and antibiotic treatments on immune-related transcriptional  
598 responses, potentially altering the host’s antiviral mechanisms, proliferation and maturation.

599

### 600 **3.6.8. Gene Ontology (GO) Enrichment Analysis of DEGs among the Three Conditions Evaluated.**

601 Comparative transcriptomic analysis across the three experimental conditions, ANT vs. CTR; STR vs.  
602 CTR; and ANT+STR vs. CTR identified key BPs significantly enriched among DEGs (Fig. 9). The enriched  
603 GO terms predominantly involved chromosomal segregation, nuclear division, mitotic cell regulation,  
604 and rRNA processing, suggesting that the treatments induce widespread effects on fundamental  
605 cellular functions. In both, ANT vs. CTR and ANT+STR vs. CTR, strong enrichment was observed in  
606 rRNA processing and chromosome organization, indicating a transcriptional response linked to  
607 ribosome biogenesis and genome stability. In contrast, STR vs. CTR exhibited significant enrichment  
608 in cell cycle regulation, mitotic nuclear division, and chromosomal segregation, indicating potential  
609 disruption in cell proliferation and division pathways. Across all conditions, sister chromatid  
610 segregation and chromosome biogenesis appeared prominently affected, suggesting a conserved  
611 regulatory response to external stressor. The dot size in the enrichment plot, representing the  
612 number of DEGs per pathway, underscores the extensive transcriptional shifts in response to  
613 treatments. Additionally, the color gradient, reflecting statistical significance (*adjusted p-value*),  
614 emphasizes the most significant enriched pathways, particularly those linked to genomic integrity  
615 and cellular homeostasis. These findings indicate that the applied treatments significantly exert a  
616 profound influence on cell cycle dynamics, chromosomal stability, and ribosomal function, potentially  
617 affecting immune regulation and stress adaptation mechanisms in common carp.

618

### 619 **3.6.9. KEGG Pathway Enrichment Analysis**

620 To gain insights into the biological significance of DEGs previously determined for the three  
621 treatments under study, a KEGG pathway enrichment analysis was conducted to identify key  
622 biological pathways significantly affected by these conditions (Fig. 10). The results indicate a profound  
623 transcriptional response in cell cycle regulation, immune activation, metabolic adaptation, and signal  
624 transduction, suggesting that these biological processes are central to the observed responses in carp  
625 neutrophils. The KEGG pathway heatmap (Fig. 10A) summarizes the distribution of enriched  
626 pathways across the three experimental groups. Pathways were categorized into cellular processes,  
627 immune system regulation, signal transduction, and metabolism, with ANT+STR showing the highest  
628 number of significantly altered pathways.

629 The immune-related pathways were predominantly enriched in the STR and ANT+STR groups, while  
630 cell cycle and metabolic pathways were particularly affected by antibiotic exposure alone. The color  
631 gradient represents the gene expression gap, with red indicating higher differential expression levels  
632 and green representing a lower expression gap across conditions. The bubble plot representation (Fig.  
633 10B) further highlights the functional pathways, most significantly affected by the treatments. The  
634 most enriched pathways included cell cycle progression, oocyte meiosis, and p53 signaling, with ANT  
635 and ANT+STR groups displaying the strongest activation, suggesting disruptions in cellular  
636 proliferation and apoptosis regulation. Additionally, protein processing in the endoplasmic reticulum,  
637 oxidative phosphorylation, and ribosome biogenesis were prominently enriched, indicating metabolic  
638 and translational adjustments in response to antibiotic exposure.

639 In the immune system category, pathways such as RIG-I-like receptor signaling, C-type lectin receptor  
640 signaling, and NOD-like receptor signaling were significantly overrepresented, particularly in the STR  
641 and ANT+STR groups, suggesting an innate immune activation in response to stress and antibiotic  
642 exposure. The cytosolic DNA-sensing pathway was significantly enriched, indicating a potential role in  
643 pathogen recognition and cellular stress response mechanisms. The size of the bubbles corresponds  
644 to the number of DEGs mapped to each pathway, while the color gradient reflects statistical  
645 significance (adjusted p-value), with darker shades indicating higher pathway enrichment  
646 significance. To further explore the molecular mechanisms underlying the transcriptional immune  
647 changes affecting only the ANT+STR group, KEGG pathway maps were generated for key processes.  
648 The C-type lectin receptor signaling pathway map (Fig. 10C) revealed widespread transcriptional  
649 alterations in immune components, including pattern recognition receptors (PRRs), cytokine signaling  
650 regulators, and stress-responsive elements. In this pathway, genes highlighted in green represent  
651 differentially expressed immune-related genes in common carp, emphasizing their role in modulating  
652 immune responses to external stressors. These findings suggest a key role for C-type lectin receptors  
653 in pathogen recognition, inflammation, and immune stress responses. The immune system pathway  
654 map (Fig. 10D) demonstrated extensive transcriptional remodeling in innate immune signaling,  
655 particularly involving pathogen recognition, cytokine signaling, and inflammatory responses. Genes  
656 within the RIG-I-like receptor signaling, p53-mediated apoptosis, and Nf-kb pathways were strongly  
657 upregulated, particularly in the ANT+STR group, indicating a potential synergistic effect of combined  
658 stress and antibiotic exposure on immune activation. Collectively, these findings suggest that stress  
659 and antibiotic exposure drive widespread transcriptional changes in common carp neutrophils, with  
660 distinct yet overlapping effects on immune function, metabolic adaptation, and cell cycle regulation.  
661 The pronounced enrichment of immune-related pathways in STR and ANT+STR groups suggests  
662 heightened immune activity under combined stress conditions, while the strong metabolic and cell  
663 cycle alterations in the ANT group indicate a potential antibiotic-induced metabolic shift. These  
664 insights contribute to a deeper understanding of the molecular mechanisms underlying stress and  
665 antibiotic-induced responses in fish, with potential implications for aquatic animal health and  
666 immune regulation.

667 **3.6.10. KEGG Pathway Analysis Reveals Treatment-Specific Immune Modulation, Stress Adaptation,**  
668 **and Senescence in Neutrophils**

669 The RIG-I-like receptor signaling pathway was significantly enriched in the ANT and ANT+STR groups,  
670 indicating activation of innate immune recognition mechanisms. Among them, genes included *rig-1*,  
671 *mda5*, and *lgp2*, which detect non-self RNA and activate downstream signaling cascades, were  
672 differentially expressed. The *rig-1-irf7/3* pathway, responsible for type I interferon (*ifna*, *ifnb1*)  
673 production, is expected as upregulated, suggesting a heightened antiviral immune response.  
674 Simultaneously, the *rig-1-nfkb* pathway is activated, further supporting immune modulation through  
675 inflammatory signaling. The strong immune activation in the ANT and ANT+STR groups suggests that  
676 antibiotic exposure influences immune regulation, potentially as a compensatory response to  
677 immunomodulation. Cellular senescence pathways were enriched in all three conditions (ANT, STR,  
678 and ANT+STR), highlighting transcriptional changes associated with cell cycle arrest and stress-  
679 induced immune adaptation. Genes involved in the senescence-associated secretory phenotype  
680 (*sasp*), inflammatory cytokines, and growth factors are differentially expressed, suggesting increased  
681 immune cell aging and altered inflammatory responses in response to both antibiotic treatment and  
682 environmental stressors. The p53 signaling pathway was significantly enriched across all treatment  
683 groups, indicating a central role in stress-induced cell cycle regulation and apoptosis. Key genes  
684 associated with cell cycle arrest (*cdk* inhibitors), DNA repair (*gadd45*), and apoptosis (*bax*, *puma*) are  
685 upregulated, suggesting that neutrophils under stress and antibiotic exposure exhibit transcriptional  
686 profiles favoring cellular homeostasis through controlled cell cycle progression and survival  
687 mechanisms. These findings indicate that immune activation via RIG-I-like receptor signaling is  
688 specific to antibiotic exposure, whereas cellular senescence and p53-mediated stress responses are  
689 universally affected across all treatments. The results suggest a complex interplay between immune  
690 function, stress adaptation, and neutrophil longevity, which may have implications for host immune  
691 regulation and resilience in aquaculture environments.

692

693 **4. Discussion**

694 Our previous study demonstrated that stress and antibiotic exposure disrupted gut microbiota in  
695 common carp (Klak et al., 2025), leading to intestinal inflammation and the upregulation of pro-  
696 inflammatory cytokines associated with Th17-driven immune responses. The current study builds on  
697 our previous findings, further investigating the consequences of stress- and antibiotic-induced  
698 dysbiosis, focusing on hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis functionality, that affected might  
699 change stress-induced neutrophil redistribution and neutrophil activity in common carp. Through this  
700 approach, we aim to unravel the complex interplay between the microbiome, brain, and immune  
701 system.

702 We found that both antibiotic-induced dysbiosis and stress increased the levels of cortisol and  
703 glucose. This aligns with previous research indicating that cortisol is the primary glucocorticoid  
704 released during stress responses in fish, leading to elevated glucose levels to meet increased energy  
705 demands (Klak et al., 2022; Maciuszek et al., 2019; Martínez-Porchas et al., 2009). Additionally,  
706 antibiotic treatment alone (ANT) resulted in elevated cortisol and glucose levels compared to the  
707 control group, suggesting that alterations in microbiota composition can activate HPI axis. Observed  
708 increased levels of cortisol in fish experiencing dysbiosis are supported by results of previous studies  
709 (Crumevolle-Arias et al., 2014; Sudo, 2016; Sudo et al., 2004; Uren Webster et al., 2020). For  
710 instance, Sudo et al., (2004) has shown that germ-free animals exhibit exaggerated HPA axis  
711 responses to stress, manifested by a big increase in corticosterone level. Similarly, in our study, the  
712 combined effects of stress and antibiotic treatment (ANT+STR) appeared synergistic, with cortisol  
713 levels exceeding those observed in stressed fish with undisturbed microbiota (STR).

714 Moreover, in antibiotic-treated fish, the alteration of stress-related gene expression in the HPI axis  
715 was observed, for example, upregulation of *il-1b* expression in the hypothalamus. In antibiotic-

716 treated and stressed fish, we found upregulation of *il-1b* expression in NPO, pituitary and head  
717 kidney. It has to be mentioned that IL-1 $\beta$  is one of the most potent activators of the HPA axis (Rivest,  
718 2010) as it stimulates release of hypothalamic CRH (Sapolsky et al., 1987) and ACTH from the  
719 pituitary (Bernton et al., 1987). Previous studies of common carp (Metz et al., 2006a) showed that 24  
720 h restraint stress upregulated *il-1b* expression in NPO.

721 Moreover, in the pituitary of antibiotic-treated fish, we found down-regulation of the expression of  
722 *crhr*. Similarly, in stressed animals, *crhr* expression was downregulated in the pituitary. Also in rats, it  
723 was shown that chronic treatment with an antibiotic cocktail led to a decrease in the brain *Crhr*  
724 mRNA levels (Hoban et al., 2016). Furthermore, we observed the downregulation of *gr1* expression in  
725 the pituitary gland of antibiotic-treated fish (ANT group), which further suggested that microbiota  
726 disruption may alter the negative feedback regulation of the HPI axis. A similar trend was observed in  
727 germ-free mice cortex (Sudo et al., 2004) and the hippocampus of germ-free rats (Crumeyrolle-Arias  
728 et al., 2014). Although the specific regulatory roles of the cortex and hippocampus, and pituitary  
729 differ, both are involved in stress axis regulation, suggesting a conserved influence of microbiota on  
730 neuroendocrine stress regulation.

731 To verify the mechanisms responsible for dysbiosis-induced elevation of cortisol and glucose levels,  
732 we measured the expression of genes involved in cholesterol transport (*star*), cortisol synthesis  
733 (*cyp11b1*) and conversion (*11b-hsd2* and *3*) in the head kidney. Previous studies indicated that their  
734 transcription levels were positively correlated with the cortisol level (Geslin and Auperin, 2004;  
735 Hagen et al., 2006; Kusakabe et al., 2002). Consistent with these findings, under stress conditions, we  
736 observed an upregulation of genes involved in cortisol synthesis and conversion in the head kidney,  
737 what suggested an adaptive response aimed at maintaining cortisol homeostasis. This reinforces the  
738 robustness of the 24-hour stress response in fish, highlighting the capacity to dynamically regulate  
739 glucocorticoid levels in response to environmental challenges. Our results indicated that changes of  
740 the gut microbiota affect steroidogenesis during stress. In fish with normal microbiota, stress induced  
741 upregulation of *star* and *cyp11b*, alongside *11b-hsd*, what suggested that the steroidogenic pathway  
742 was already optimized for cortisol production and regulation. The increase in *11b-hsd3* likely  
743 facilitated cortisol activation, while the simultaneous upregulation of *11b-hsd2* suggested a  
744 regulatory mechanism to prevent excessive cortisol signaling, protecting tissues from prolonged  
745 exposure to elevated glucocorticoids. However, in fish with microbiota dysbiosis, the mechanisms  
746 regulating steroidogenesis appeared to be changed. While upon antibiotic treatment stress still  
747 induced changes in *11b-hsd* expression, no significant changes of *star* or *cyp11b* expression was  
748 observed, suggesting that the initial steps of steroidogenesis in ANT+STR fish were not as dynamically  
749 regulated as in fish with an intact microbiome. This is probably a result of a higher cortisol  
750 concentration in ANT+STR animals, compared to STR fish, and implies that the cortisol negative  
751 feedback loop might have already affected their transcription. However, despite a hypercortisolemia  
752 state, we observed sustained high *11b-hsd3* expression, indicating amplification of active cortisol  
753 availability.

754 Although glucocorticoids are well known for their immunosuppressive properties, they also  
755 significantly raise neutrophil number in the circulation (Dhabhar et al., 2012, 1995; Klak et al., 2024;  
756 Wilckens, 1995; Wilckens and De Rijk, 1997). In mammals, three mechanisms are believed to be  
757 responsible for the rise in blood neutrophil counts brought on by adrenal steroids: a longer half-life of  
758 circulating neutrophils, a reduction in neutrophil egress from the blood, and an increase in neutrophil  
759 egress from the bone marrow (Ronchetti et al., 2018; Velthove et al., 2010). Given the observed HPI  
760 axis changes and their physiological outcomes, we further investigated dysbiosis- and stress-induced  
761 immune effects, focusing on neutrophil distribution. Stressed fish showed significant reductions in

762 head kidney neutrophil percentage compared to CTR ones, which is consistent with typical stress-  
763 induced neutrophil mobilization from hematopoietic tissue, observed both in mammals and fish  
764 (Dhabhar et al., 2012; Klak et al., 2024). A similar reduction was observed in the fish from ANT+STR  
765 group but not in fish from ANT group.

766 In the blood, neutrophil percentages were higher in stressed fish than in controls, reflecting their  
767 mobilization from reservoirs such as the head kidney. This is similar to the mechanism observed  
768 during inflammation when, due to increased demand for neutrophils, rapid adaptation of the  
769 hematopoietic system is observed (Malengier-Devlies et al., 2021). The steady-state leukocyte  
770 production is switched into emergency granulopoiesis, a status when the *de novo* production of  
771 neutrophils by the hematopoietic tissues is augmented, while additional mature neutrophils are  
772 rapidly released from the marginated pools. In our study, stress most probably due to the 'reactive  
773 granulopoiesis' phenomenon (defined in the literature as a setting when the trigger of emergency  
774 granulopoiesis is not infectious (Malengier-Devlies et al., 2021)) caused a decrease in hematopoietic  
775 tissue reservoirs (neutrophil mobilization from HK into circulation) and an increase in the circulation.  
776 Interestingly, both ANT and ANT+STR fish exhibited elevated blood neutrophil percentage compared  
777 to controls, however, the percentage of blood neutrophils in antibiotic-treated unstressed and  
778 stressed fish was significantly lower than those observed in STR fish with intact microbiota.  
779 Previously, the increased number of circulating granulocytes was observed in germ-free mice after  
780 stress (van de Wouw et al., 2020). The authors indicated that the absence of microbiota resulted in an  
781 oversensitivity of granulocytes in response to acute stress. We can speculate that dysbiosis creates  
782 pro-inflammatory conditions that stimulate the HPI axis to synthesize cortisol, as well as induce  
783 emergency granulopoiesis. It is consistent with our earlier studies demonstrating that stress and  
784 antibiotic exposure disrupt gut microbiota in common carp, what leads to intestinal inflammation and  
785 the upregulation of pro-inflammatory cytokines associated with Th17-driven immune responses (Klak  
786 et al., 2025).

787 Our findings clearly show changes in the HPI axis, whether due to restraint stress, antibiotic  
788 treatment, or their combination, which may contribute to the observed immune effects, including  
789 neutrophil mobilization into circulation. This is potentially a host neuroendocrine regulatory  
790 mechanism activated under stress or antibiotic-induced dysbiosis. To answer the question why in our  
791 study in the antibiotic-treated stressed fish the number of circulating neutrophils was lower than in  
792 the stressed fish with intact microbiota and based on the previous results of Dhabhar and Mcewen  
793 (Dhabhar and Mcewen, 1999) who showed that upon stress neutrophils migrate to peripheral tissues  
794 e.g. to skin to protect the body from potential deleterious effects of stress, we performed histological  
795 analysis of the neutrophil infiltration in the gills and skin of STR and ANT+STR fish. However, we did  
796 not observe such infiltration. These studies complemented our previous observations, in which we  
797 analyzed neutrophil infiltration in the intestine (Klak et al., 2025). In contrast to skin and gills, we  
798 found an inflammatory infiltrate of neutrophils in the gut of ANT+STR group, while in ANT or STR fish,  
799 the inflammatory infiltrate was less common (Klak et al., 2025). To further explore the mechanisms  
800 involved in the regulation of stress and/or dysbiosis-induced neutrophil redistribution, we measured  
801 expression profile of genes known to be involved in neutrophil retention in the hematopoietic tissue,  
802 such as *cxcl12* and *cxcr4*, as well as genes encoding proteins involved in the regulation of  
803 granulocytogenesis and neutrophil release/ migration into the circulation such as GCSFR, MMP9,  
804 CXCL8, CXCR1-3. The crucial role of these mediators in stress-induced neutrophil redistribution in  
805 common carp was described previously by our group (Klak et al., 2024). In the head kidney of  
806 ANT+STR fish, we observed the upregulation of *g-csfr*, *cxcl8\_l2* and *cxcr1* expression, what confirmed  
807 that in antibiotic-treated stressed fish, the gene expression pattern was redirected into  
808 granulopoiesis stimulation and neutrophil egress to increase the number of neutrophils in the blood.  
809 In turn, the results from PBLs show an increase of *g-csfr*, *mmp-9*, *cxcl8\_l1*, *cxcl8\_l2* and *cxcr1*

810 expression in all treatment groups, reflecting activation of proinflammatory pathways promoting  
811 neutrophil migration. Kirchberger et al. (2024) found in zebrafish, that the *mmp9* expression in  
812 neutrophils identified their mature stage. Similarly, upregulation of *cxcr1* is associated with the late  
813 phase of neutrophil maturation (banded/segmented mature cells). Moreover, this study showed that  
814 mature (*mmp9+*) neutrophils show high phagocytic activity and are rapidly recruited to the wound  
815 area (Kirchberger et al., 2024). Therefore, we hypothesize that observed lower expression of *mmp9*  
816 and *cxcr1* in PBLs of antibiotic-treated fish might indicate that circulating neutrophils in this fish are  
817 less mature than those in PBLs from animals which were not treated with antibiotics. However, it is  
818 not clear whether it is a result of preferential recruitment of mature or aged neutrophils into the  
819 inflammation focus (dysbiotic intestines) or a result of dysbiosis-induced perturbation in neutrophil  
820 maturation in the head kidney. Previously, Zhang et al. (2015) showed that both germ-free mice, as  
821 well as mice with antibiotic-induced depletion of the microbiota, exhibit significantly reduced  
822 numbers of aged neutrophils in the blood when compared to specific pathogen-free mice (SPF).  
823 Moreover, in their experiments, neutrophil number in germ-free mice was partially restored after  
824 faecal microbiota transplantation (Zhang et al., 2015). The same study has shown that antibiotic  
825 treatment of germ-free mice did not further reduce aged neutrophil numbers in circulation,  
826 confirming that observed results are not antibiotic-dependent but result from disrupted microbiota  
827 signaling (Zhang et al., 2015).

828 To reveal whether neutrophil maturation in the head kidney was affected by dysbiosis and/or stress,  
829 we measured expression of genes characteristic for different stages of neutrophil maturation (*mpx*,  
830 *tlr4*, *mmp9*, *cxcr1*, 2 and 4). RT-qPCR analysis revealed that head kidney neutrophils from STR, ANT  
831 and ANT+STR fish show lower expression of *cxcr4* than neutrophils from control fish. CXCR4 is usually  
832 expressed in immature neutrophils, ensuring their retention in hematopoietic tissue however its  
833 expression is also increased in senescent neutrophils, what stimulates their migration to clearance  
834 tissue (Day and Link, 2012; Eash et al., 2009). The reduced constitutive expression of *cxcr4* in head  
835 kidney-derived neutrophils in all treatment groups suggests that neutrophils in these conditions may  
836 have altered trafficking dynamics, potentially being prematurely released from the head kidney, as  
837 there is a decreased retention signal. Conversely, a less profound decrease in *cxcr4* expression in head  
838 kidney-derived neutrophils from stressed fish with undisturbed microbiota implies that stress in the  
839 presence of a healthy microbiota may enhance the release of both immature and mature neutrophils.  
840 According to earlier studies in mammals, the microbiome may control the phagocytic ability and  
841 production of bone-marrow-derived neutrophils (Balmer et al., 2014; Clarke et al., 2010; Deshmukh  
842 et al., 2014; Khosravi et al., 2014). A study on germ-free mice implicated that the ability of bone  
843 marrow granulocyte and/or monocyte progenitors (GMPs) to maintain cells with progenitor potential  
844 is defective in the absence of commensal microbes (Khosravi et al., 2014). Moreover, Balmer et al.,  
845 (2014) study has shown that systemic recognition of microbiota-derived compounds by TLRs is  
846 necessary to maintain a sufficient pool of bone marrow myeloid cells. This implies that the microbiota  
847 may normally act as a source of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), priming  
848 neutrophils (e.g., via neutrophil surface TLR4) for effective immune responses (Karmarkar and Rock,  
849 2013). Furthermore, we assessed the phagocytic activity of head kidney-derived neutrophils and  
850 observed its significant reduction in all treatment groups. The observation that fish with dysbiosis,  
851 whether stressed or not, exhibit lowered phagocytic capacity compared to controls underlines the  
852 essential role of a healthy microbiota in maintaining optimal neutrophil maturation. Without  
853 adequate microbial signals, neutrophils may remain unprimed, leading to reduced activation and a  
854 diminished immune response. If microbiota-derived signals typically prime neutrophils for action,  
855 their absence or reduction could lead to less frequent activation of neutrophils.

856 In addition, we found that HK-derived neutrophils from the ANT+STR group show decreased  
857 expression of *mpx*. This is consistent with previous findings of microbiota immune modulation

858 studies. For example, in Watanabe et al. (2017) study, dysbiotic mice had lower myeloperoxidase  
859 activity. According to a study on gnotobiotic zebrafish larvae, colonization with a commensal  
860 microbiota causes both a steady-state rise in neutrophil numbers and a large increase in neutrophil  
861 *mpx* expression (Kanter et al., 2014).

862 To prevent biased analysis of changes in gene expression, we performed bulk RNA sequencing of the  
863 head kidney neutrophils. In neutrophils from ANT and ANT+STR fish, GO analysis indicated the  
864 enrichment in rRNA processing and chromosome organization, what suggests a cellular response  
865 directed towards increased protein synthesis and maintenance of genomic integrity. In turn, in  
866 neutrophils from stressed fish, the enrichment in the expression of genes involved in the cell cycle-  
867 related processes indicates heightened cell proliferation. In contrast to the neutrophil precursor  
868 population (preNeus), immature neutrophils are non-proliferative, however, during inflammatory  
869 conditions, they can enter the bloodstream and migrate toward the site of injury as efficiently as  
870 mature neutrophils (Evrard et al., 2018). Sepsis model demonstrates an expansion in the number of  
871 preNeus in the bone marrow during inflammation due to increased myelopoiesis (Evrard et al., 2018).  
872 Stress-induced neutrophilia in our study strikingly parallels mechanisms characteristic of an  
873 inflammatory state. Proliferative characteristic of head kidney neutrophils indicates increased  
874 myelopoiesis due to redistribution of preNeus and mature neutrophils into circulation (stress-induced  
875 neutrophilia). Moreover, in neutrophils from stressed fish, we observed the upregulation of *hif1a*  
876 (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ), what might be connected with delayed neutrophil apoptosis.  
877 Moreover, our results are consistent with previous observations that cortisol treatment reduces  
878 apoptosis and increases the survival of carp neutrophils (Weyts et al., 1998). Also, in a zebrafish  
879 inflammation model, activation of Hif-1 $\alpha$  delays inflammation resolution by reducing neutrophil  
880 apoptosis and reverse migration (Elks et al., 2011). Marchi et al. (2020) described that both GR and  
881 MR play a key role in enhancing Hif-1 $\alpha$  activity.

882 Furthermore, KEGG pathways revealed significantly enriched immune pathways related to pathogen  
883 recognition and cellular stress response mechanisms in the ANT+STR group. It is tempting to conclude  
884 that this profile is a result of stress- and antibiotic-induced dysbiosis.

885 Other significant observations of immune-related DEGs revealed in the head kidney neutrophils of  
886 antibiotic-treated fish decreased expression of *tgfb*, what suggests antibiotic/dysbiosis-induced  
887 weakening of anti-inflammatory mechanisms. Interestingly, DEGs analysis of the ANT+STR group  
888 showed an increase in expression of *mmp9* and *il1b* genes, a pattern which in zebrafish was  
889 associated with the last neutrophil maturation phase (Kirchberger et al., 2024). This also suggests a  
890 pro-inflammatory state of neutrophils awaiting release from the head kidney.

891 Moreover, neutrophils from the ANT+STR group exhibited upregulation of interferon (IFN) and  
892 antiviral response genes compared to CTR. Also, human mature blood neutrophils exposed to severe  
893 myeloablative stress (post-transplant) strongly upregulated IFN-stimulated genes (ISG) and antiviral  
894 defense GOs (Montaldo et al., 2022). Likewise, Xie et al. (2020) identified a mature,  
895 polymorphonuclear neutrophil subset with high ISG expression under homeostatic conditions (Xie et  
896 al., 2020). Authors identified that this cell subset mainly originates from bone marrow mature  
897 neutrophils (Xie et al., 2020). This study underlines that neutrophils may be primed to combat  
898 invading pathogens even before infection occurs. Grieshaber-Bouyer et al. (2021) showed that in  
899 healthy neutrophils, the expression of interferon target genes is a dynamic process that evolves with  
900 maturation (neutrotime) (Grieshaber-Bouyer et al., 2021). Our data parallels these findings, indicating  
901 that stress and antibiotics (dysbiosis) reprogram neutrophils towards an antiviral-like state, with  
902 robust upregulation of IFN-stimulated gene expression. This suggests that the ANT+STR triggered a  
903 demand-adapted granulopoiesis, releasing neutrophils with a primed, IFN-driven phenotype like  
904 mammalian “emergency” neutrophils, to maximize host defense. Interestingly, decoupled treatment  
905 conditions induced the opposite effect, with decreased expression patterns of these genes. Similarly,

906 downregulated *irf3*, *irf7*, and other DEGs related to the antiviral innate immune response were  
907 observed (Dai et al., 2023).

908 Interestingly, *gpr43* encoding a main SCFA receptor (also known as FFAR2 or free fatty acid receptor  
909 2) was downregulated in neutrophils of stressed fish. This indicates that stress likely disturbs short-  
910 chain fatty acid (SCFA) signaling, which normally modulates neutrophil maturation and activity.  
911 Studies on *Gpr43*<sup>-/-</sup> mice show the immunomodulatory effects of SCFAs and their role in regulating  
912 inflammation. Kamp et al. demonstrated that GPR43 restrains neutrophil recruitment and activation  
913 (Kamp et al., 2016). GPR43-deficient or SCFA-depleted mice showed exaggerated neutrophil  
914 migration during inflammation (Kamp et al., 2016). Therefore, in our study, downregulation of *gpr43*  
915 may have influenced the retention of neutrophils within the head kidney, thereby modulating stress-  
916 induced mobilization. Moreover, a study on *ex vivo* LPS-stimulated head kidney leukocytes of  
917 common carp showed that the addition of SCFAs reduces the expression of several cytokines, either  
918 pro-inflammatory (*il-1b*, *il-6*, *tnfa*, *cxcl8*, *p40*) or anti-inflammatory (*il-10*) (Petit et al., 2022).

919 Neutrophil granulopoiesis, release, trafficking, extravasation, and clearance are among the specific  
920 regulatory systems that closely control neutrophil accumulation and activation under homeostatic  
921 settings. Cytokines can stimulate emergency granulopoiesis to fulfil the increased demand for new  
922 neutrophils during systemic inflammation. *De novo* production of neutrophils may be lifesaving  
923 during infectious inflammation due to their antibacterial qualities, ability to produce soluble  
924 mediators, and direct cell-cell contact. However, excessive neutrophil generation and activation may  
925 be harmful to the host e.g., in sepsis. Glucocorticoids appear to be a key regulator of the repertoire of  
926 immune responses, including their amplitude and direction. Both in aquaculture/veterinary and  
927 human medicine, new approaches to the treatment or prevention of diseases may become possible  
928 with better knowledge of the actual function of endogenous glucocorticoids in host defence, with a  
929 focus on the underappreciated parts of glucocorticoid effects on neutrophil redistribution. While  
930 stressors are often impossible to eliminate, great care of the microbiome might be a solution to a  
931 more balanced glucocorticoid orchestration of immune cell redistribution and activation.  
932 Intentionally modifying the gut microbiota is a potential therapeutic approach. It is tempting to think  
933 that medications that target the gut microbiota may be effective in treating illnesses linked to stress.  
934 Furthermore, this underlines the need for research in probiotic therapies as a possible chaperone to  
935 glucocorticoid treatment, as well as the switch to the preventive use of probiotics rather than  
936 antibiotics in aquaculture. Especially since the purpose of aquaculture is directly connected to human  
937 health, as a source of food.

938

939

940

941

942 **References:**

- 943 Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J.R., Maciejewski, A., Wishart, D.S., 2016.  
944 Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.* 44, W147–W153.  
945 <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW419>
- 946 Bailey, M.T., Dowd, S.E., Galley, J.D., Hufnagle, A.R., Allen, R.G., Lyte, M., 2011. Exposure to a social  
947 stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced  
948 immunomodulation. *Brain. Behav. Immun.* 25, 397–407.  
949 <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.023>
- 950 Baker, M.E., 2004. Evolutionary analysis of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-type 1, -type 2, -type  
951 3 and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-type 2 in fish. *FEBS Lett.* 574, 167–170.  
952 <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.023>
- 953 Balmer, M.L., Schürch, C.M., Saito, Y., Geuking, M.B., Li, H., Cuenca, M., Kovtonyuk, L. V., McCoy,  
954 K.D., Hapfelmeier, S., Ochsenbein, A.F., Manz, M.G., Slack, E., Macpherson, A.J., 2014.  
955 Microbiota-derived compounds drive steady-state granulopoiesis via MyD88/TICAM signaling. *J.*  
956 *Immunol.* 193, 5273–5283. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400762>
- 957 Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in  
958 circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* 42, 517–525.  
959 <https://doi.org/10.1093/ICB/42.3.517>
- 960 Bernton, E.W., Beach, J.E., Holaday, J.W., Smallridge, R.C., Fein, H.G., 1987. Release of multiple  
961 hormones by a direct action of Interleukin-1 on pituitary cells. *Science.* 238, 519–521.  
962 <https://doi.org/10.1126/science.2821620>
- 963 Bouyoucos, I.A., Schoen, A.N., Wahl, R.C., Anderson, W.G., 2021. Ancient fishes and the functional  
964 evolution of the corticosteroid stress response in vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*  
965 *Mol. Integr. Physiol.* 260, 111024. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111024>
- 966 Chadzinska, M., Leon-Kloosterziel, K.M., Plytycz, B., Lidy Verburg-van Kemenade, B.M., 2008. In vivo  
967 kinetics of cytokine expression during peritonitis in carp: Evidence for innate and alternative  
968 macrophage polarization. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 509–518.  
969 <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.08.008>
- 970 Chakraborty, S., Pramanik, J., Mahata, B., 2021. Revisiting steroidogenesis and its role in immune  
971 regulation with the advanced tools and technologies. *Genes Immun.* 2021 223 22, 125–140.  
972 <https://doi.org/10.1038/s41435-021-00139-3>
- 973 Chapman, K., Holmes, M., Seckl, J., 2013. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-  
974 keepers of tissue glucocorticoid action. *Physiol. Rev.* 93, 1139–1206.  
975 <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2012>
- 976 Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., Gu, J., 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor.  
977 *Bioinformatics* 34, i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- 978 Chen, X., Liang, H., Hu, K., Sun, Q., Sun, B., Bian, L., Sun, Y., 2021. Vagus nerve stimulation suppresses  
979 corticotropin-releasing factor-induced adrenocorticotrophic hormone release in rats.  
980 *Neuroreport* 32, 792–796. <https://doi.org/10.1097/wnr.0000000000001656>
- 981 Clarke, T.B., Davis, K.M., Lysenko, E.S., Zhou, A.Y., Yu, Y., Weiser, J.N., 2010. Recognition of  
982 peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat. Med.* 16,  
983 228–231. <https://doi.org/10.1038/NM.2087>
- 984 Crumeyrolle-Arias, M., Jaglin, M., Bruneau, A., Vancassel, S., Cardona, A., Daugé, V., Naudon, L.,  
985 Rabot, S., 2014. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and  
986 neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 42, 207–217.  
987 <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.01.014>
- 988 Dai, C., Zheng, J., Qi, L., Deng, P., Wu, M., Li, L., Yuan, J., 2023. Chronic stress boosts systemic  
989 inflammation and compromises antiviral innate immunity in *Carassius gibel*. *Front. Immunol.*  
990 14, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1105156>
- 991 Day, R.B., Link, D.C., 2012. Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. *Cell. Mol. Life*  
992 *Sci.* <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0870-8>
- 993 De Filippo, K., Rankin, S.M., 2018. CXCR4, the master regulator of neutrophil trafficking in

994 homeostasis and disease. *Eur. J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1111/eci.12949>

995 de Oliveira, S., Reyes-Aldasoro, C.C., Candel, S., Renshaw, S.A., Mulero, V., Calado, Â., 2013. Cxcl8 (IL-

996 8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. *J.*

997 *Immunol.* 190, 4349–4359. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203266>

998 Deshmukh, H.S., Liu, Y., Menkiti, O.R., Mei, J., Dai, N., O’Leary, C.E., Oliver, P.M., Kolls, J.K., Weiser,

999 J.N., Worthen, G.S., 2014. The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance

1000 to *Escherichia coli* K1 sepsis in neonatal mice. *Nat. Med.* 20, 524–530.

1001 <https://doi.org/10.1038/nm.3542>

1002 Dhabhar, F.S., Malarkey, W.B., Neri, E., McEwen, B.S., 2012. Stress-induced redistribution of immune

1003 cells—From barracks to boulevards to battlefields: A tale of three hormones – Curt Richter

1004 Award Winner. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1345–1368.

1005 <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.05.008>

1006 Dhabhar, F.S., McEwen, B.S., 1999. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin

1007 immune function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1059.

1008 <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.3.1059>

1009 Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1996. Stress-induced changes in blood

1010 leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *J. Immunol.* 157, 1638–1644.

1011 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.157.4.1638>

1012 Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1995. Effects of stress on immune cell

1013 distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J. Immunol.* 154, 5511–5527.

1014 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.154.10.5511>

1015 Eash, K.J., Means, J.M., White, D.W., Link, D.C., 2009. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release

1016 from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood* 113, 4711–

1017 4719. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-09-177287>

1018 Elks, P.M., Van Eeden, F.J., Dixon, G., Wang, X., Reyes-Aldasoro, C.C., Ingham, P.W., Whyte, M.K.B.,

1019 Walmsley, S.R., Renshaw, S.A., 2011. Activation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (Hif-1 $\alpha$ ) delays

1020 inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish

1021 inflammation model. *Blood* 118, 712–722. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-12-324186>

1022 Evrard, M., Kwok, I.W.H., Chong, S.Z., Teng, K.W.W., Becht, E., Chen, J., Sieow, J.L., Penny, H.L., Ching,

1023 G.C., Devi, S., et al., 2018. Developmental analysis of bone marrow neutrophils reveals

1024 populations specialized in expansion, trafficking, and effector functions. *Immunity* 48, 364-

1025 379.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.002>

1026 Geslin, M., Auperin, B., 2004. Relationship between changes in mRNAs of the genes encoding

1027 steroidogenic acute regulatory protein and P450 cholesterol side chain cleavage in head kidney

1028 and plasma levels of cortisol in response to different kinds of acute stress in the rainbow trout

1029 (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 70–80. [https://doi.org/10.1016/S0016-](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00283-1)

1030 [6480\(03\)00283-1](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00283-1)

1031 Gregory, A.D., Hogue, L.A., Ferkol, T.W., Link, D.C., 2007. Regulation of systemic and local neutrophil

1032 responses by G-CSF during pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Blood* 109, 3235–

1033 3243. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-01-015081>

1034 Grieshaber-Bouyer, R., Radtke, F.A., Cunin, P., Stifano, G., Levescot, A., Vijaykumar, B., Nelson-

1035 Maney, N., Blaustein, R.B., Monach, P.A., et al., 2021. The neutrotime transcriptional signature

1036 defines a single continuum of neutrophils across biological compartments. *Nat. Commun.* 12, 1–

1037 21. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22973-9>

1038 Hagen, I.J., Kusakabe, M., Young, G., 2006. Effects of ACTH and cAMP on steroidogenic acute

1039 regulatory protein and P450 11 $\beta$ -hydroxylase messenger RNAs in rainbow trout interrenal cells:

1040 Relationship with in vitro cortisol production. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145, 254–262.

1041 <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.09.014>

1042 Hidalgo, A., Casanova-Acebes, M., 2021. Dimensions of neutrophil life and fate. *Semin. Immunol.* 57.

1043 <https://doi.org/10.1016/j.smim.2021.101506>

1044 Hidalgo, A., Chilvers, E.R., Summers, C., Koenderman, L., 2019. The Neutrophil Life Cycle. *Trends*

1045 *Immunol.* 40, 584–597. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.013>

1046 Hoban, A.E., Moloney, R.D., Golubeva, A. V., McVey Neufeld, K.A., O'Sullivan, O., Patterson, E.,  
1047 Stanton, C., Dinan, T.G., Clarke, G., Cryan, J.F., 2016. Behavioural and neurochemical  
1048 consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat. *Neuroscience*  
1049 339, 463–477. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.003>

1050 Hyun, K.K., De La Luz Sierra, M., Williams, C.K., Gulino, A.V., Tosato, G., 2006. G-CSF down-regulation  
1051 of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. *Blood* 108,  
1052 812. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-10-4162>

1053 Jones, H.P., 2012. Immune cells listen to what stress is saying: Neuroendocrine receptors orchestrate  
1054 immune function. *Methods Mol. Biol.* 934, 77–87. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-071-7\\_4/COVER](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-071-7_4/COVER)

1056 Kamp, M.E., Shim, R., Nicholls, A.J., Oliveira, A.C., Mason, L.J., Binge, L., Mackay, C.R., Wong, C.H.Y.,  
1057 2016. G protein-coupled receptor 43 modulates neutrophil recruitment during acute  
1058 inflammation. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0163750>,

1059 Kanther, M., Tomkovich, S., Xiaolun, S., Grosser, M.R., Koo, J., Flynn, E.J., Jobin, C., Rawls, J.F., 2014.  
1060 Commensal microbiota stimulate systemic neutrophil migration through induction of Serum  
1061 amyloid A. *Cell. Microbiol.* 16, 1053–1067. <https://doi.org/10.1111/cmi.12257>

1062 Karmarkar, D., Rock, K.L., 2013. Microbiota signalling through MyD88 is necessary for a systemic  
1063 neutrophilic inflammatory response. *Immunology* 140, 483–492.  
1064 <https://doi.org/10.1111/imm.12159>

1065 Kelly, J.R., Borre, Y., O' Brien, C., Patterson, E., El Aidy, S., Deane, J., Kennedy, P.J., Beers, S., Scott, K.,  
1066 Moloney, G., Hoban, A.E., Scott, L., Fitzgerald, P., Ross, P., Stanton, C., Clarke, G., Cryan, J.F.,  
1067 Dinan, T.G., 2016. Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces  
1068 neurobehavioural changes in the rat. *J. Psychiatr. Res.* 82, 109–118.  
1069 <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.07.019>

1070 Kepka, M., Verburg-van Kemenade, B.M.L., Chadzinska, M., 2013. Neuroendocrine modulation of the  
1071 inflammatory response in common carp: Adrenaline regulates leukocyte profile and activity.  
1072 *Gen. Comp. Endocrinol.* 188, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2012.11.014>

1073 Khosravi, A., Yáñez, A., Price, J.G., Chow, A., Merad, M., Goodridge, H.S., Mazmanian, S.K., 2014. Gut  
1074 microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection. *Cell Host Microbe* 15, 374–  
1075 381. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.006>

1076 Khoyratty, T.E., Ai, Z., Ballesteros, I., Eames, H.L., Mathie, S., Martín-Salamanca, S., Wang, L.,  
1077 Hemmings, A., Willemsen, N., von Werz, V., Zehrer, A., Walzog, B., van Grinsven, E., Hidalgo, A.,  
1078 Udalova, I.A., 2021. Distinct transcription factor networks control neutrophil-driven  
1079 inflammation. *Nat. Immunol.* 22, 1093–1106. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00968-4>

1080 Kim, D., Paggi, J.M., Park, C., Bennett, C., Salzberg, S.L., 2019. Graph-based genome alignment and  
1081 genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat. Biotechnol.* 2019 378 37, 907–915.  
1082 <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>

1083 Kirchberger, S., Shoeb, M.R., Lazic, D., Wenninger-Weinzierl, A., Fischer, K., Shaw, L.E., Nogueira, F.,  
1084 Rifatbegovic, F., Bozsaky, E., Ladenstein, R., et al., 2024. Comparative transcriptomics coupled  
1085 to developmental grading via transgenic zebrafish reporter strains identifies conserved features  
1086 in neutrophil maturation. *Nat. Commun.* 15. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45802-1>

1087 Klak, K., Maciuszek, M., Marcinkowska, M., Verburg-van Kemenade, B.M.L., Chadzinska, M., 2022.  
1088 The importance of CXC-receptors CXCR1-2 and CXCR4 for adaptive regulation of the stress axis  
1089 in teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* 127, 647–658. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.06.070>

1090 Klak, K., Maciuszek, M., Michalik, A., Mazur, M., Zawisza, M., Pecio, A., Nowak, B., Chadzinska, M.,  
1091 2025. Fire in the belly: Stress and antibiotics induce dysbiosis and inflammation in the gut of  
1092 common carp. *Fish Shellfish Immunol.* 161, 110301. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2025.110301>

1093 Klak, K., Maciuszek, M., Pijanowski, L., Marcinkowska, M., Homa, J., Lidy Verburg-van Kemenade,  
1094 B.M., Rakus, K., Chadzinska, M., Zhang, L., Holland, J.W., Kemenade BML, V., 2024.  
1095 Evolutionarily conserved mechanisms regulating stress-induced neutrophil redistribution in fish.  
1096 *Front. Immunol.* 15, 1330995. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2024.1330995>

1097 Kusakabe, M., Todo, T., James Mcquillan, H., Goetz, F.W., Young, G., 2002. Characterization and

1098 expression of steroidogenic acute regulatory protein and MLN64 cDNAs in trout. *Endocrinology*

1099 143, 2062–2070. <https://doi.org/10.1210/endo.143.6.8672>

1100 Laing, K., 2004. Chemokines. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 443–460.

1101 <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.09.006>

1102 Lawrence, S.M., Corriden, R., Nizet, V., 2018. The ontogeny of a neutrophil: mechanisms of

1103 granulopoiesis and homeostasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 82. <https://doi.org/10.1128>

1104 Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W., 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning

1105 sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930.

1106 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>

1107 Maciuszek, M., Rydz, L., Świtakowska, I., Verburg-van Kemenade, B.M.L., Chadzińska, M., 2019.

1108 Effects of stress and cortisol on the polarization of carp macrophages. *Fish Shellfish Immunol.*

1109 94, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.064>

1110 Malengier-Devlies, B., Metzemaekers, M., Wouters, C., Proost, P., Matthys, P., 2021. Neutrophil

1111 homeostasis and emergency granulopoiesis: The example of systemic juvenile idiopathic

1112 arthritis. *Front. Immunol.* 12, 5329. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.766620>

1113 Marca, R. La, Waldvogel, P., Thörn, H., Tripod, M., Wirtz, P.H., Pruessner, J.C., Ehlert, U., 2011.

1114 Association between cold face test-induced vagal inhibition and cortisol response to acute

1115 stress. *Psychophysiology* 48, 420–429. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8986.2010.01078.X>

1116 Marchi, D., Santhakumar, K., Markham, E., Li, N., Storbeck, K.H., Krone, N., Cunliffe, V.T., Van Eeden,

1117 F.J.M., 2020. Bidirectional crosstalk between Hypoxia-Inducible Factor and glucocorticoid

1118 signalling in zebrafish larvae. *PLOS Genet.* 16, e1008757.

1119 <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1008757>

1120 Martin, C., Burdon, P.C.E., Bridger, G., Gutierrez-Ramos, J.C., Williams, T.J., Rankin, S.M., 2003.

1121 Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone

1122 marrow and their return following senescence. *Immunity* 19, 583–593.

1123 [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00263-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00263-2)

1124 Martinelli, S., Urosevic, M., Daryadel, A., Oberholzer, P.A., Baumann, C., Fey, M.F., Dummer, R.,

1125 Simon, H.-U., Yousefi, S., 2004. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular

1126 trap formation during neutrophil differentiation. *J. Biol. Chem.* 279, 44123–44132.

1127 <https://doi.org/10.1074/jbc.M405883200>

1128 Martínez-Porchas, M., Rafael Martínez-Córdova, L., Ramos-Enriquez, R., 2009. Cortisol and glucose:

1129 reliable indicators of fish stress? *Panam. J. Aquat. Sci.* 4, 158–178.

1130 Metz, J.R., Huisling, M.O., Leon, K., Verburg-van Kemenade, B.M.L., Flik, G., 2006a. Central and

1131 peripheral interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 receptor I expression and their role in the acute

1132 stress response of common carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Endocrinol.* 191, 25–35.

1133 <https://doi.org/10.1677/joe.1.06640>

1134 Metz, J.R., Peters, J.J.M., Flik, G., 2006b. Molecular biology and physiology of the melanocortin

1135 system in fish: a review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 148, 150–162.

1136 <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.03.001>

1137 Montaldo, E., Lusito, E., Bianchessi, V., Caronni, N., Scala, S., Basso-Ricci, L., Cantaffa, C., Masserdotti,

1138 A., Barilaro, M., Barresi, S., et al., 2022. Cellular and transcriptional dynamics of human

1139 neutrophils at steady state and upon stress. *Nat. Immunol.* 23, 1470–1483.

1140 <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01311-1>

1141 Payne, A.H., Hales, D.B., 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol

1142 to active steroid hormones. *Endocr. Rev.* 25, 947–970. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0030>

1143 Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Lahav, M., Peled, A., Habler, L., Ponomaryov, T., Taichman,

1144 R.S., Arenzana-Seisdedos, F., Fujii, N., Sandbank, J., Zipori, D., Lapidot, T., 2002. G-CSF induces

1145 stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat.*

1146 *Immunol.* 3, 687–694. <https://doi.org/10.1038/ni813>

1147 Petit, J., de Bruijn, I., Goldman, M.R.G., van den Brink, E., Pellikaan, W.F., Forlenza, M., Wiegertjes,

1148 G.F., 2022.  $\beta$ -Glucan-induced immuno-modulation: A role for the intestinal microbiota and

1149 Short-Chain Fatty Acids in Common Carp. *Front. Immunol.* 12, 1–17.

1150 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.761820>

1151 Pijanowski, L., Verburg-van Kemenade, B.M.L., Chadzinska, M., 2019. A role for CXC chemokines and  
1152 their receptors in stress axis regulation of common carp. *Gen. Comp. Endocrinol.* 280, 194–199.  
1153 <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.05.004>

1154 Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H., Vilo, J., 2019. g:Profiler: a web  
1155 server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic  
1156 Acids Res.* 47, W191–W198. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz369>

1157 Reiske, L., Schmucker, S., Pfaffinger, B., Weiler, U., Steuber, J., Stefanski, V., 2020. Intravenous  
1158 Infusion of cortisol, adrenaline, or noradrenaline alters porcine immune cell numbers and  
1159 promotes innate over adaptive immune functionality. *J. Immunol.* 204, 3205–3216.  
1160 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000269>

1161 Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., Smyth, G.K., 2015. limma powers  
1162 differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.*  
1163 43, e47–e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>

1164 Rivest, S., 2010. Interactions between the immune and neuroendocrine systems, in: *Progress in Brain  
1165 Research.* Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)81004-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)81004-7)

1166 Ronchetti, S., Ricci, E., Migliorati, G., Gentili, M., Riccardi, C., 2018. How glucocorticoids affect the  
1167 neutrophil life. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 4090. <https://doi.org/10.3390/ijms19124090>

1168 Sapolsky, R., Rivier, C., Yamamoto, G., Plotsky, P., Vale, W., 1987. Interleukin-1 stimulates the  
1169 secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science.* 238, 522–524.  
1170 <https://doi.org/10.1126/science.2821621>

1171 Sneddon, L.U., Wolfenden, D.C.C., Thomson, J.S., 2016. Stress management and welfare, fish  
1172 physiology. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00012-6>

1173 Sudo, N., 2016. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and gut microbiota: A target for dietary  
1174 intervention? In: *The gut-brain axis dietary, probiotic, and prebiotic interventions on the  
1175 microbiota.* Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802304-4.00013-X>

1176 Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X., Kubo, C., Koga, Y., 2004. Postnatal  
1177 microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response  
1178 in mice. *J. Physiol.* 558, 263–275. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>

1179 Suratt, B.T., Petty, J.M., Young, S.K., Malcolm, K.C., Lieber, J.G., Nick, J.A., Gonzalo, J.A., Henson, P.M.,  
1180 Worthen, G.S., 2004. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil  
1181 homeostasis. *Blood* 104, 565–571. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-10-3638>

1182 Taneja, R., Sharma, A.P., Hallett, M.B., Findlay, G.P., Morris, M.R., 2008. Immature circulating  
1183 neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling. *Shock* 30, 618–622.  
1184 <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318173ef9c>

1185 Tokarz, J., Möller, G., Hrabě de Angelis, M., Adamski, J., 2015. Steroids in teleost fishes: A functional  
1186 point of view. *Steroids* 103, 123–144. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.06.011>

1187 Uhl, B., Vadlau, Y., Zuchriegel, G., Nekolla, K., Sharaf, K., Gaertner, F., Massberg, S., Krombach, F.,  
1188 Reichel, C.A., 2016. Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute  
1189 inflammatory response. *Blood* 128, 2327–2337. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-718999>

1190 Uren Webster, T.M., Rodriguez-Barreto, D., Consuegra, S., Garcia de Leaniz, C., 2020. Cortisol-related  
1191 signatures of stress in the fish microbiome. *Front. Microbiol.* 11, 1–9.  
1192 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01621>

1193 van de Wouw, M., Lyte, J.M., Boehme, M., Sichetti, M., Moloney, G., Goodson, M.S., Kelley-  
1194 Loughnane, N., Dinan, T.G., Clarke, G., Cryan, J.F., 2020. The role of the microbiota in acute  
1195 stress-induced myeloid immune cell trafficking. *Brain. Behav. Immun.* 84, 209–217.  
1196 <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.12.003>

1197 van der Aa, L.M., Chadzinska, M., Golbach, L.A., Ribeiro, C.M.S., Lidy Verburg-van Kemenade, B.M.,  
1198 2012. Pro-inflammatory functions of carp CXCL8-like and CXCL1 chemokines. *Dev. Comp.  
1199 Immunol.* 36, 741–750. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.11.011>

1200 van der Aa, L.M., Chadzinska, M., Tijhaar, E., Boudinot, P., Verburg-van Kemenade, B.M.L., 2010.  
1201 CXCL8 chemokines in Teleost fish: Two lineages with distinct expression profiles during early

1202 phases of inflammation. *PLoS One* 5, e12384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012384>

1203 Velthove, K.J., Leufkens, H.G.M., Souverein, P.C., Schweizer, R.C., Bracke, M., van Solinge, W.W.,

1204 2010. Effects of glucocorticoids on the neutrophil count: A cohort study among hospitalized

1205 patients. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 23, 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2009.10.006>

1206 Verburg-van Kemenade, B.M.L., Cohen, N., Chadzinska, M., 2017. Neuroendocrine-immune

1207 interaction: Evolutionarily conserved mechanisms that maintain allostasis in an ever-changing

1208 environment. *Dev. Comp. Immunol.* 66, 2–23. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.05.015>

1209 Wang, S., Ishima, T., Zhang, J., Qu, Y., Chang, L., Pu, Y., Fujita, Y., Tan, Y., Wang, X., Hashimoto, K.,

1210 2020. Ingestion of *Lactobacillus intestinalis* and *Lactobacillus reuteri* causes depression- and

1211 anhedonia-like phenotypes in antibiotic-treated mice via the vagus nerve. *J. Neuroinflammation*

1212 17. <https://doi.org/10.1186/S12974-020-01916-Z>

1213 Watanabe, K., Gilchrist, C.A., Uddin, M.J., Burgess, S.L., Abhyankar, M.M., Moonah, S.N., Noor, Z.,

1214 Donowitz, J.R., Schneider, B.N., Arju, T., Ahmed, E., Kabir, M., Alam, M., Haque, R.,

1215 Pramoonjago, P., Mehrad, B., Petri, W.A., 2017. Microbiome-mediated neutrophil recruitment

1216 via CXCR2 and protection from amebic colitis. *PLOS Pathog.* 13, e1006513.

1217 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006513>

1218 Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591–625.

1219 <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>

1220 Westphal, Nicole, J., S.A.F., 2006. CRH-BP: the regulation and function of a phylogenetically

1221 conserved binding protein. *Front. Biosci.* 11, 1878–1891. <https://doi.org/10.2741/1931>

1222 Weyts, F.A., Flik, G., Kemenade, B.M.L.V., 1998. Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic

1223 granulocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 22, 563–572. [https://doi.org/10.1016/S0145-](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(98)00027-5)

1224 [305X\(98\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(98)00027-5)

1225 Wilckens, T., 1995. Glucocorticoids and immune function: physiological relevance and pathogenic

1226 potential of hormonal dysfunction. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 193–197.

1227 [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)89021-5](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)89021-5)

1228 Wilckens, T., De Rijk, R., 1997. Glucocorticoids and immune function: Unknown dimensions and new

1229 frontiers. *Immunol. Today* 18, 418–424. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)01111-0](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)01111-0)

1230 Xie, X., Shi, Q., Wu, P., Zhang, X., Kambara, H., Su, J., Yu, H., Park, S.Y., Guo, R., Ren, Q., Zhang, S., Xu,

1231 Y., Silberstein, L.E., Cheng, T., Ma, F., Li, C., Luo, H.R., 2020. Single-cell transcriptome profiling

1232 reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection. *Nat. Immunol.* 21, 1119–1133.

1233 <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0736-z>

1234 Zhang, D., Chen, G., Manwani, D., Mortha, A., Xu, C., Faith, J.J., Burk, R.D., Kunisaki, Y., Jang, J.-E.,

1235 Scheiermann, C., Merad, M., Frenette, P.S., 2015. Neutrophil ageing is regulated by the

1236 microbiome. *Nature* 525, 528–532. <https://doi.org/10.1038/nature15367>

1237 Zheng, P., Zeng, B., Zhou, C., Liu, M., Fang, Z., Xu, X., Zeng, L., Chen, J., Fan, S., Du, X., Zhang, X., Yang,

1238 D., Yang, Y., Meng, H., Li, W., Melgiri, N.D., Licinio, J., Wei, H., Xie, P., 2016. Gut microbiome

1239 remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's

1240 metabolism. *Mol. Psychiatry* 21, 786–796. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.44>

1241

1242

1243 **Figure titles:**

1244 **Figure 1.** Heatmaps showing the influence of restraint stress and antibiotic-induced dysbiosis of  
1245 microbiota on the expression stress-related genes in the stress axis organs: nucleus preopticus of  
1246 hypothalamus (NPO), pituitary gland (PIT) and head kidney (HK) of common carp. CTR - control  
1247 unstressed fish, ANT – unstressed fish treated with an antibiotic cocktail containing vancomycin (0.01  
1248 g/L), neomycin (0.5 g/L), ampicillin (0.5 g/L) and metronidazole (0.5 g/L) (VNAM), STR - stressed fish  
1249 (24 h restraint stress), and ANT + STR – stressed fish treated with antibiotic VNAM cocktail. Gene  
1250 expression was determined by RT-qPCR. The average gene expression levels were converted into z-  
1251 scores using the Heatmapper web server (Babicki et al., 2016). The heatmaps generated from these  
1252 normalized values show relative, within-gene comparison of expression levels across groups. In the  
1253 blue white red color scheme, blue indicate z-scores below the gene’s mean ( $z < 0$ ), reflecting relatively  
1254 lower expression; white cells denote z-scores around zero ( $z = 0$ ), indicating expression close to the  
1255 gene’s average; and red cells correspond to z-scores above the mean ( $z > 0$ ), signifying relatively  
1256 higher expression compared to other groups. One rectangle presents mean data from n=6 fish. Mean  
1257 values not sharing capital letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between  
1258 groups in particular HPI axis components (NPO, PIT, HK) ( $p \leq 0.05$ ). Statistical analysis was performed  
1259 using two-way ANOVA with subsequent Tukey’s pairwise multiple comparisons test.

1260 **Figure 2.** Effects of restraint stress and antibiotic treatment on cortisol (A) and glucose (B) levels in  
1261 blood plasma of common carp. UNSTRESSED fish and STRESSED (24 h of confinement) fish were  
1262 sampled at 48 h of the experiment. CTR - control unstressed fish, ANT – unstressed fish treated with  
1263 an antibiotic cocktail containing vancomycin (0.01 g/L), neomycin (0.5 g/L), ampicillin (0.5 g/L) and  
1264 metronidazole (0.5 g/L) (VNAM), STR - stressed fish (24 h restraint stress), and ANT + STR – stressed  
1265 fish treated with antibiotic VNAM cocktail. Within both CTR and ANT groups, results are depicted  
1266 with dots for the not-stressed groups and triangles for the stressed groups. Data are presented as  
1267 mean  $\pm$  standard error (SE) ( $n \geq 14$ ). Mean values not sharing letters (e.g., A vs B) indicate statistically  
1268 significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ).

1269 **Figure 3.** Effects of restraint stress and antibiotic treatment on the percentage of neutrophils (PMN)  
1270 in the leukocytes of the head kidney (HKL, A) and peripheral blood (PBL, B) of common carp. CTR -  
1271 control unstressed fish, ANT – unstressed fish treated with an antibiotic cocktail containing  
1272 vancomycin (0.01 g/L), neomycin (0.5 g/L), ampicillin (0.5 g/L) and metronidazole (0.5 g/L) (VNAM),  
1273 STR - stressed fish (24 h restraint stress), and ANT + STR – stressed fish treated with antibiotic VNAM  
1274 cocktail. Within both CTR and ANT groups, results are depicted with dots for the not-stressed groups  
1275 and triangles for the stressed groups. Data are presented as mean  $\pm$  standard error (SE) ( $n \geq 14$ ).  
1276 Mean values not sharing letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between  
1277 groups ( $p \leq 0.05$ ).

1278 **Figure 4.** Heatmaps showing the influence of restraint stress and antibiotic-induced dysbiosis of  
1279 microbiota on the expression of genes involved in neutrophil redistribution in the head kidney (HK)  
1280 and peripheral blood leukocytes (PBL) of common carp. CTR - control unstressed fish, ANT –  
1281 unstressed fish treated with an antibiotic cocktail containing vancomycin (0.01 g/L), neomycin  
1282 (0.5 g/L), ampicillin (0.5 g/L) and metronidazole (0.5 g/L) (VNAM), STR - stressed fish (24 h restraint  
1283 stress), and ANT + STR – stressed fish treated with antibiotic VNAM cocktail. Gene expression was  
1284 determined by RT-qPCR. The average gene expression levels were converted into z-scores using the  
1285 Heatmapper web server (Babicki et al., 2016). The heatmaps generated from these normalized values  
1286 show relative, within-gene comparison of expression levels across groups. In the blue-white-red  
1287 color scheme, blue indicate z-scores below the gene’s mean ( $z < 0$ ), reflecting relatively lower expression;  
1288 white cells denote z-scores around zero ( $z = 0$ ), indicating expression close to the gene’s average; and

1289 red cells correspond to z-scores above the mean ( $z > 0$ ), signifying relatively higher expression  
1290 compared to other groups.. One rectangle presents mean data from  $n=6$  fish. Mean values not  
1291 sharing capital letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups ( $p \leq$   
1292 0.05). Statistical analysis was performed using two-way ANOVA with subsequent Tukey's pairwise  
1293 multiple comparisons test.

1294 **Figure 5.** Phagocytosis of Zymosan A S. by neutrophils isolated from the head kidney. (A) Percentage  
1295 of neutrophils with phagocytosed zymosan particles. (B) Phagocytosis index, defined as the number  
1296 of phagocytosed particles per cell. (C) Representative confocal microscopy images of head kidney-  
1297 derived dihydrorhodamine (DHR, green fluorescence) labelled neutrophils phagocytosing Texas Red-  
1298 labelled zymosan particles (red fluorescence). Scale bar = [10  $\mu\text{m}$ ]. CTR - control unstressed fish, ANT  
1299 - unstressed fish treated with an antibiotic cocktail containing vancomycin (0.01 g/L), neomycin  
1300 (0.5 g/L), ampicillin (0.5 g/L) and metronidazole (0.5 g/L) (VNAM), STR - stressed fish (24 h restraint  
1301 stress), and ANT + STR - stressed fish treated with antibiotic VNAM cocktail. Within both, CTR and  
1302 ANT groups, results are depicted with dots for the not-stressed groups and triangles for the stressed  
1303 groups. Data are presented as mean  $\pm$  standard error (SE) ( $n \geq 14$ ). Mean values not sharing letters  
1304 (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ).

1305 **Figure 6.** Heatmaps showing the influence of restraint stress and antibiotic-induced dysbiosis of  
1306 microbiota on the expression of genes involved in neutrophil maturation in neutrophils retrieved  
1307 from the head kidney of common carp. CTR - control unstressed fish, ANT - unstressed fish treated  
1308 with an antibiotic cocktail containing vancomycin (0.01 g/L), neomycin (0.5 g/L), ampicillin (0.5 g/L)  
1309 and metronidazole (0.5 g/L) (VNAM), STR - stressed fish (24 h restraint stress), and ANT + STR -  
1310 stressed fish treated with antibiotic VNAM cocktail. Gene expression was determined by RT-qPCR The  
1311 average gene expression levels were converted into z-scores using the Heatmapper web server  
1312 (Babicki et al., 2016). The heatmaps generated from these normalized values show relative, within-  
1313 gene comparison of expression levels across groups. In the blue, white, red color scheme, blue  
1314 indicate z-scores below the gene's mean ( $z < 0$ ), reflecting relatively lower expression; white cells  
1315 denote z-scores around zero ( $z = 0$ ), indicating expression close to the gene's average; and red cells  
1316 correspond to z-scores above the mean ( $z > 0$ ), signifying relatively higher expression compared to  
1317 other groups. One rectangle presents mean data from  $n=6$  fish. Mean values not sharing capital  
1318 letters (e.g., A vs B) indicate statistically significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ). Statistical  
1319 analysis was performed using two-way ANOVA with subsequent Tukey's pairwise multiple  
1320 comparisons test.

1321 **Figure 7.** Overall transcriptome response of common carp neutrophils following antibiotic treatment,  
1322 stress, or their combination. (A) Principal component analysis (PCA) plot showing clustering of gene  
1323 expression profiles across the control (CTR), stress (STR), antibiotic (ANT), and combined ANT+STR  
1324 treatments. (B) Bar chart illustrating the number of differentially expressed genes (DEGs) for each  
1325 treatment group, with downregulated genes (red) and upregulated genes (blue). (C) Venn diagram  
1326 highlighting the overlap of DEGs across the ANT, STR, and ANT+STR treatments. Numbers within each  
1327 section represent unique and shared DEGs. (D) Heatmap of log<sub>2</sub> fold change hierarchical clustering  
1328 for DEGs across experimental groups, illustrating distinct and overlapping transcriptional profiles.

1329 **Figure 8. Volcano plots and hierarchical heatmap summarizing gene expression changes under**  
1330 **different treatments.** Volcano plots display differentially expressed genes (DEGs) between treatment  
1331 and control groups, with upregulated genes shown in red and downregulated genes in blue. (A) DEGs  
1332 between STR and CTR groups. (B) DEGs between ANT and CTR groups. (C) DEGs between ANT+STR  
1333 and CTR groups, illustrating the combined effect of treatments. Immune-related genes in the plots  
1334 were identified using the *C. carpio* genome from the NCBI platform, with corresponding LOC

1335 identifiers (e.g., *cd8a* retrieved from [NCBI Gene LOC109090968](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LOC109090968)). The x-axis represents log fold  
1336 change (logFC), while the y-axis shows FDR-adjusted p-values. **(D)** A heatmap of log<sub>2</sub> fold change  
1337 values for immune-related DEGs across treatments (CTR, STR, ANT, ANT+STR), with hierarchical  
1338 clustering highlighting distinct and overlapping transcriptional patterns. **(E-G)** A heatmaps of log<sub>2</sub> fold  
1339 change values for neutrophil maturation-related DEGs: **(E)** STR vs CTR, **(F)** ANT vs CTR and **(G)**  
1340 ANT+STR vs CTR, with hierarchical clustering highlighting distinct and overlapping transcriptional  
1341 patterns. Unstressed (CTR, ANT) and stressed (STR, ANT+STR) fish were sampled at 48 h of the  
1342 experiment. CTR represents fish not treated with antibiotics, while fish from ANT and ANT+STR  
1343 groups were treated with an antibiotic VNAM cocktail (0.01 g/L Vancomycin, 0.5 g/L Neomycin, 0.5  
1344 g/L Ampicillin and 0.5 g/L of Metronidazole).

1345

1346 **Figure 9.** Gene Ontology (GO) enrichment analysis of Biological Process (BP) for differentially  
1347 expressed genes (DEGs) under different treatments. The enrichment plot compares three conditions  
1348 (ANT, STR, and ANT+STR each vs. CTR) based on significantly enriched biological processes (Y-axis)  
1349 and their corresponding enrichment scores (X-axis). Dot size represents the number of DEGs  
1350 associated with each process, while color intensity indicates statistical significance (adjusted p-value).  
1351 Unstressed (CTR, ANT) and stressed (STR, ANT+STR) fish were sampled at 48 h of the experiment. CTR  
1352 represents fish not treated with antibiotics, while fish from ANT and ANT+STR groups were treated  
1353 with an antibiotic VNAM cocktail (0.01 g/L Vancomycin, 0.5 g/L Neomycin, 0.5 g/L Ampicillin and 0.5  
1354 g/L of Metronidazole).

1355

1356 **Figure 10.** Integrative analysis of differentially expressed genes (DEGs) and enriched pathways across  
1357 ANT (Antibiotic-treated), STR (Stressed), and ANT+STR (Combined treatment) clusters. **(A)** The  
1358 heatmap table compares shared and unique genes across pathways, with color gradients from green  
1359 to red indicating significance. **(B)** The dot plot displays multiple enriched biological pathways, with  
1360 key immune-related pathways highlighted in green, yellow, and red when affecting one, two, or all  
1361 three groups, respectively. **(C-D)** The C-type lectin receptor (left) and NOD-like receptor (right)  
1362 signaling KEGG pathway diagrams illustrate differentially expressed genes (green) in common carp  
1363 linked to immunity and stress.

1364

1365 **Figure 11:** KEGG Pathway Enrichment Analysis of Differentially Expressed Genes (DEGs) in HK  
1366 neutrophils of common carp. The KEGG pathway maps illustrate: **(A)** the enriched immune pathway  
1367 (RIG-I-like receptor signaling pathway), **(B)** the metabolic pathway (cellular senescence), and **(C)** the  
1368 signaling pathway (p53 signaling) associated with the identified DEGs across experimental conditions.  
1369 Highlighted genes (in green) represent significant transcriptional changes recorded in common carp  
1370 (*Cyprinus carpio*), emphasizing key regulatory processes affected by the treatments.

1371

1372 **Supplementary materials:**

1373 **Supplementary Table 1.** Primer sequences, corresponding accession numbers and used  
1374 concentrations.

1375 **Supplementary Table 2.** Summary of sequencing results from 15 samples.

1376 **Supplementary Figure 1.** Representative dot plots of HKL and PBL. CTR - control unstressed fish, ANT  
1377 - unstressed fish treated with an antibiotic cocktail containing vancomycin (0.01 g/L), neomycin  
1378 (0.5 g/L), ampicillin (0.5 g/L) and metronidazole (0.5 g/L) (VNAM), STR - stressed fish (24 h restraint  
1379 stress), and ANT + STR - stressed fish treated with antibiotic VNAM cocktail.

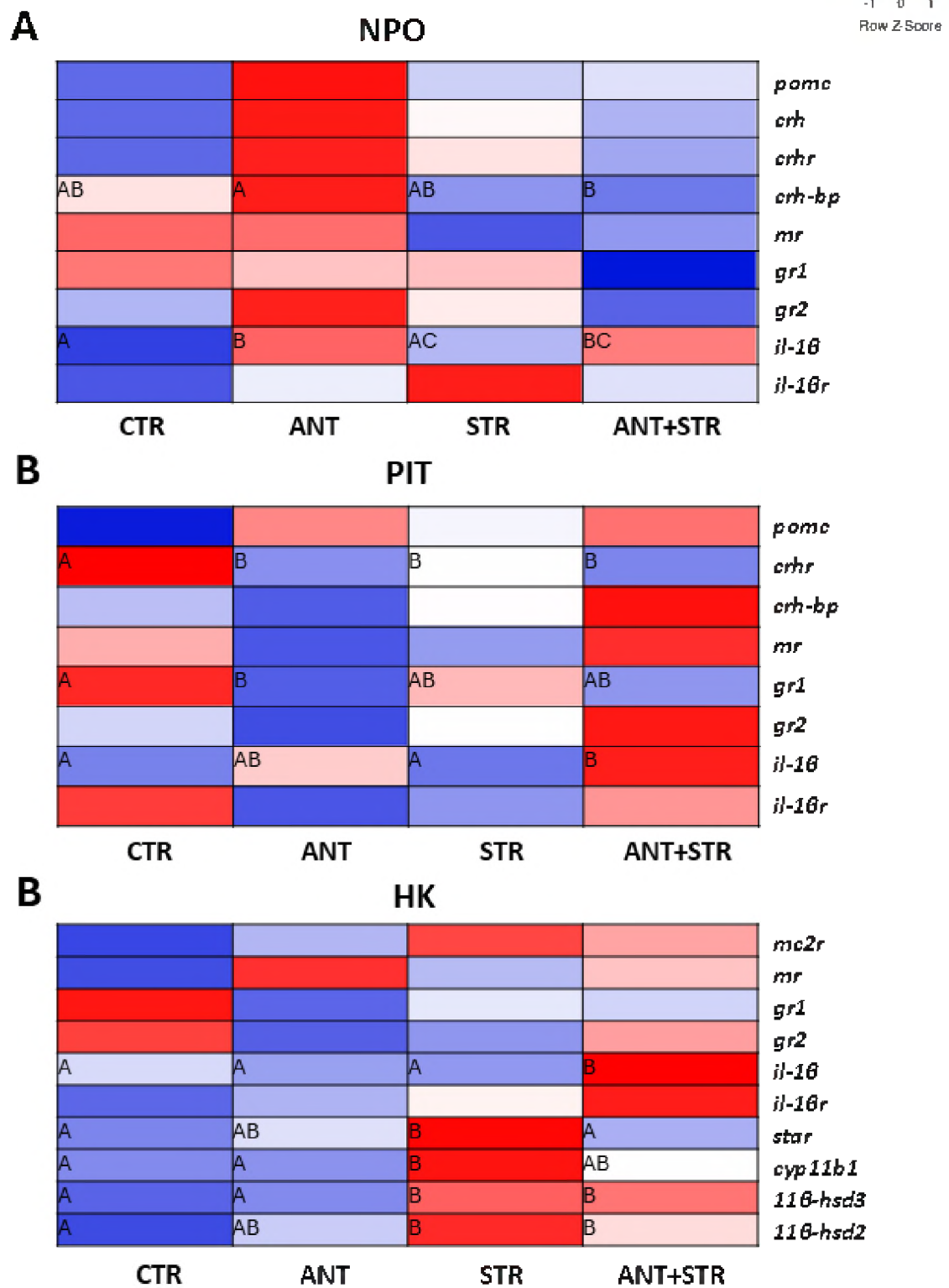
1380 **Supplementary Figure 2.** Heatmaps showing the influence of restraint stress and antibiotic-induced  
1381 dysbiosis of microbiota on the expression of genes involved in neutrophil redistribution in the head  
1382 kidney (HK) and peripheral blood leukocytes (PBL) of common carp. Unstressed (CTR, ANT) and  
1383 stressed (STR, ANT+STR) fish were sampled at 48 h of the experiment. CTR represents fish not treated  
1384 with antibiotics, while fish from ANT and ANT+STR groups were treated with an antibiotic VNAM  
1385 cocktail (0.01 g/L Vancomycin, 0.5 g/L Neomycin, 0.5 g/L Ampicillin and 0.5 g/L of Metronidazole).  
1386 Gene expression was determined by RT-qPCR and presented as an x-fold increase compared to  
1387 unstressed fish (CTR) and standardized for the 40S ribosomal protein s11 housekeeping gene. One  
1388 rectangle presents mean data from n=6 fish. Mean values not sharing capital letters (e.g., A vs B)  
1389 indicate statistically significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ). Statistical analysis was  
1390 performed using two-way ANOVA with subsequent Tukey's pairwise multiple comparisons test.

1391 **Supplementary Figure 3.** The influence of restraint stress and antibiotic-induced dysbiosis of  
1392 microbiota on the ROS production of head kidney-derived neutrophils. Unstressed (CTR, ANT) and  
1393 stressed (STR, ANT+STR) fish were sampled at 48 h of the experiment. CTR represents fish not treated  
1394 with antibiotics, while fish from ANT and ANT+STR groups were treated with an antibiotic VNAM  
1395 cocktail (0.01 g/L Vancomycin, 0.5 g/L Neomycin, 0.5 g/L Ampicillin and 0.5 g/L of Metronidazole).  
1396 Data are presented as mean  $\pm$  standard error (SE) ( $n \geq 6$ ). Mean values not sharing letters (e.g., A vs B)  
1397 indicate statistically significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ).

1398

1399

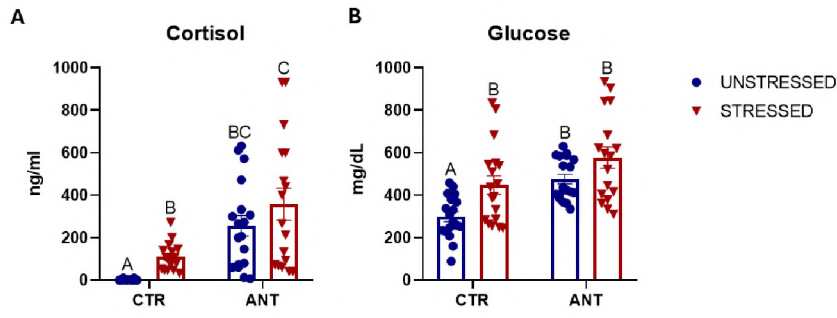
1400



1401  
 1402  
 1403

**Figure 1.**

1404

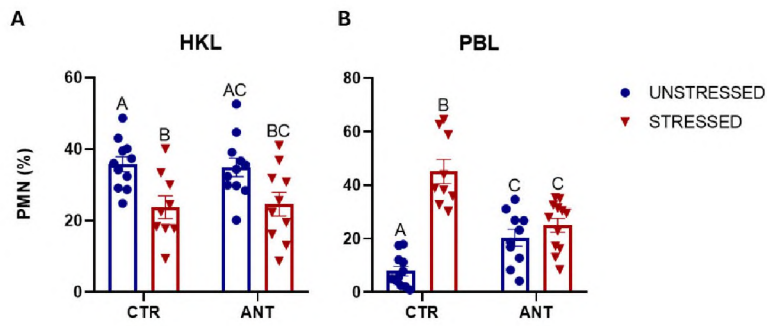


1405

1406 **Figure 2.**

1407

1408



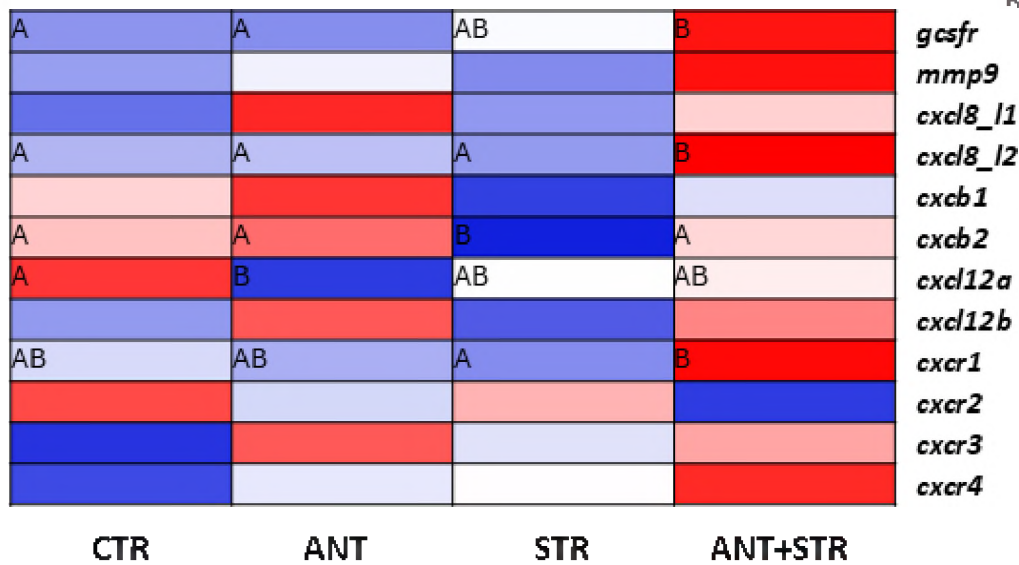
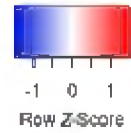
1409

1410 **Figure 3.**

1411

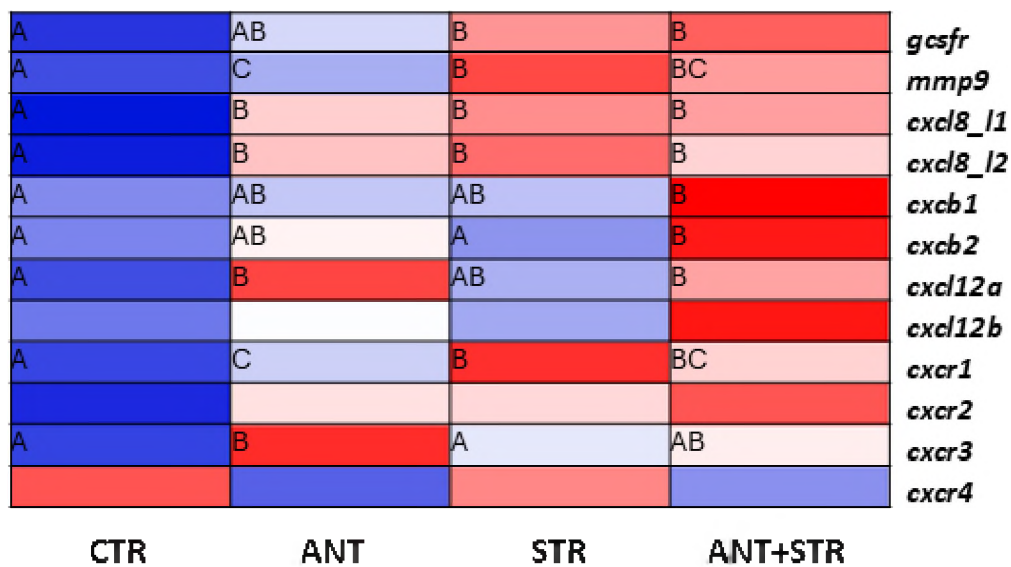
**A**

**HK**



**B**

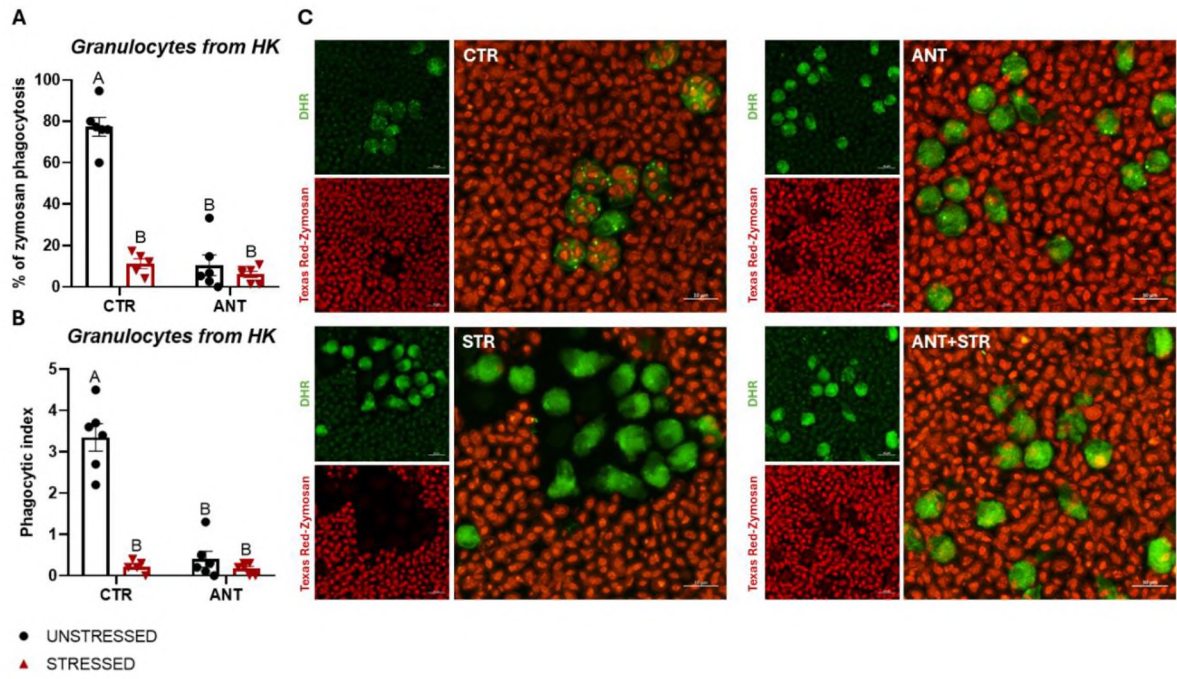
**PBL**



1412

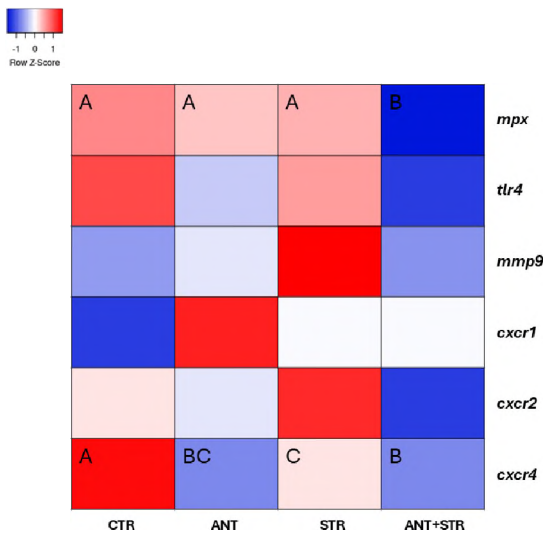
1413 **Figure 4.**

1414



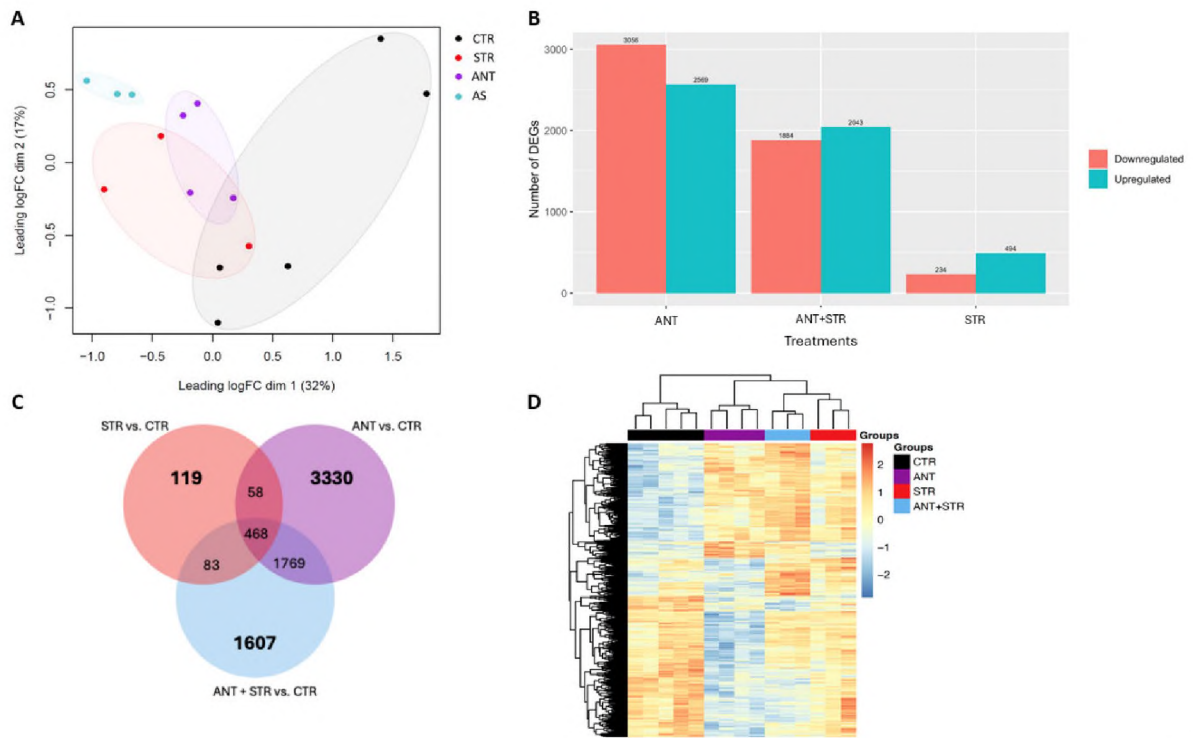
1415  
1416  
1417  
1418

**Figure 5.**



1419  
1420

**Figure 6.**



1421

1422

**Figure 7.**

1423

1424

1425

1426

1427

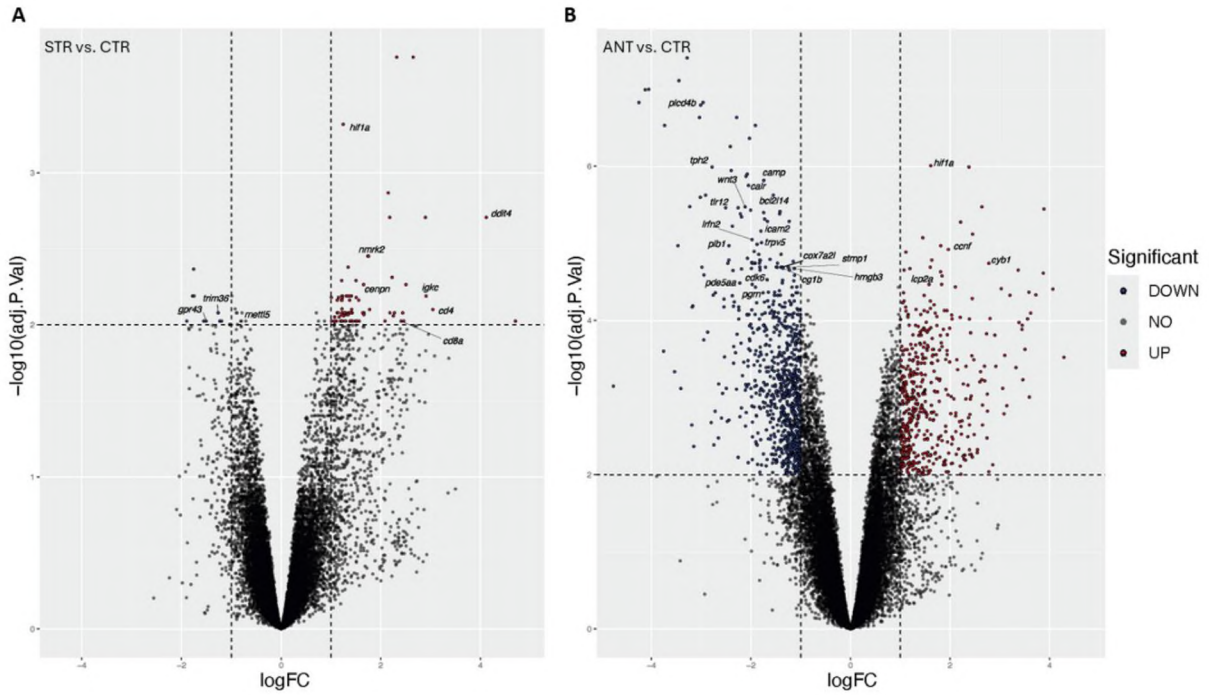
1428

1429

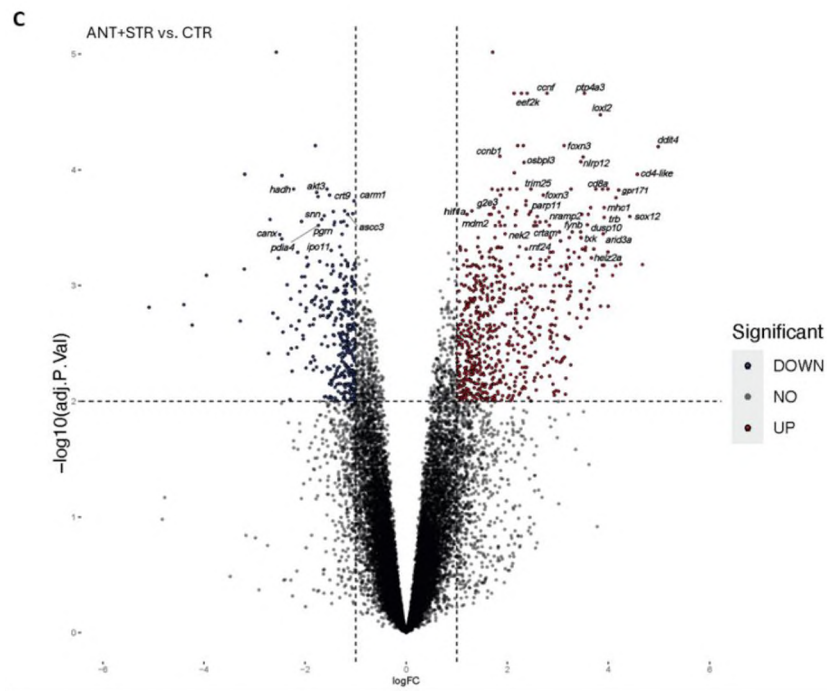
1430

1431

1432



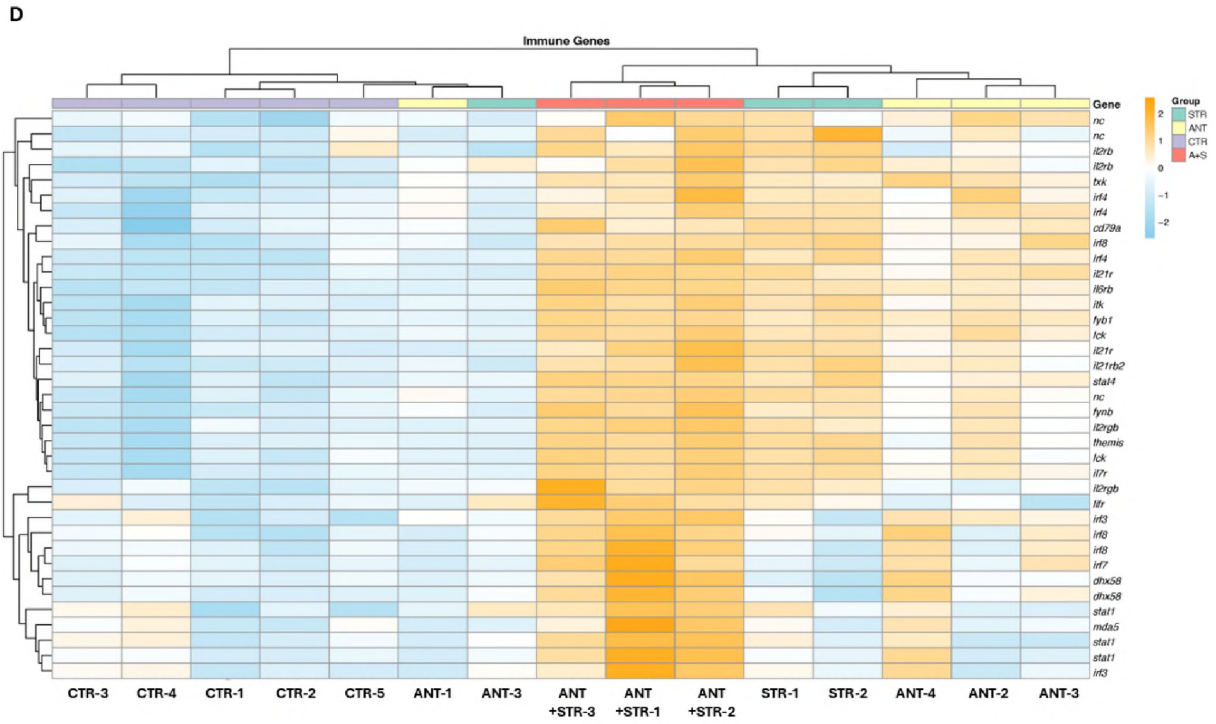
1433



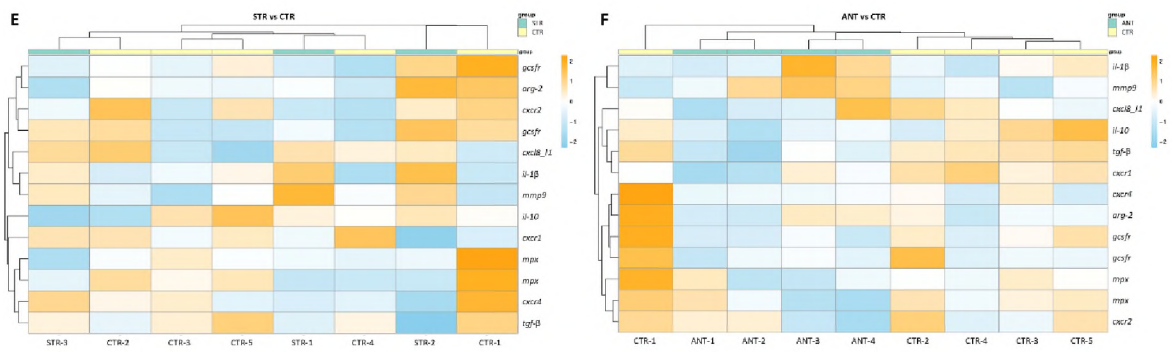
1434

1435

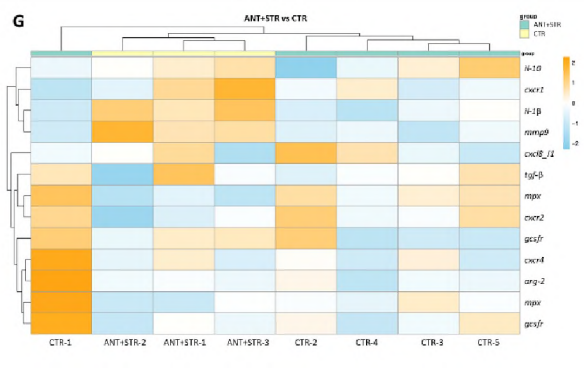
1436



1437



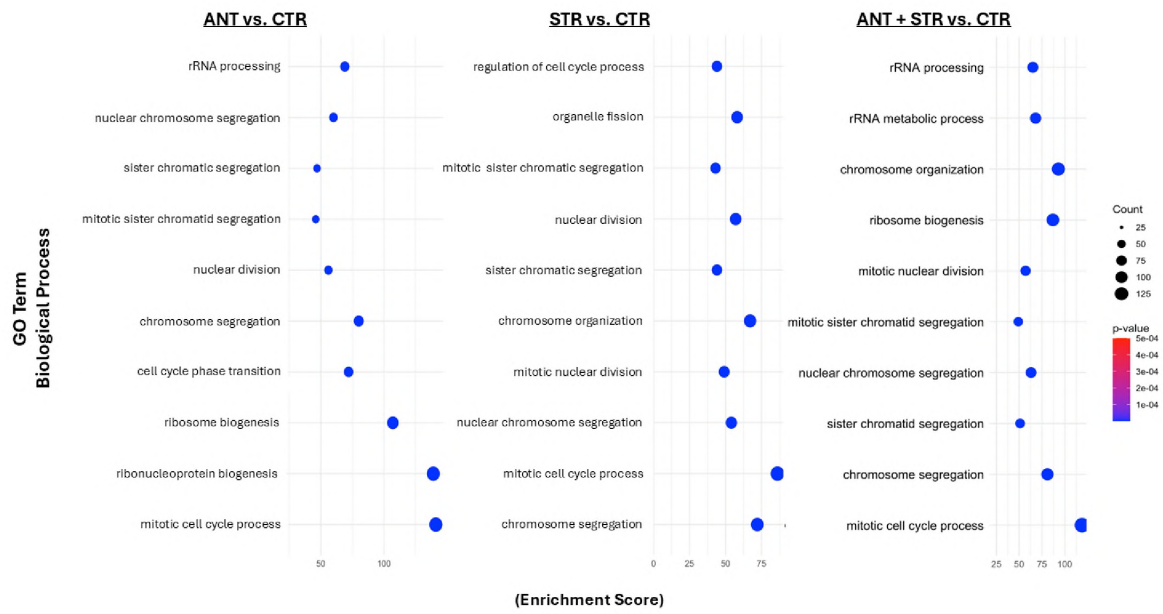
1438



1439

1440

1441 **Figure 8.**



1442

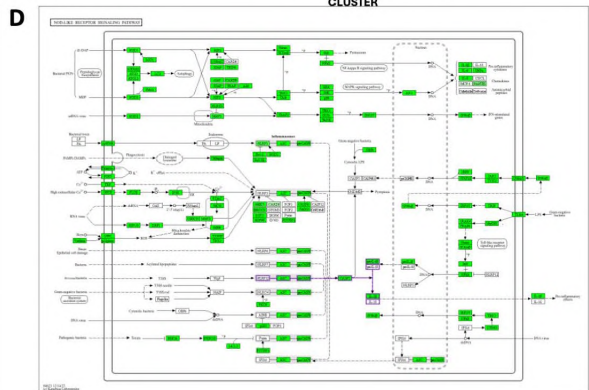
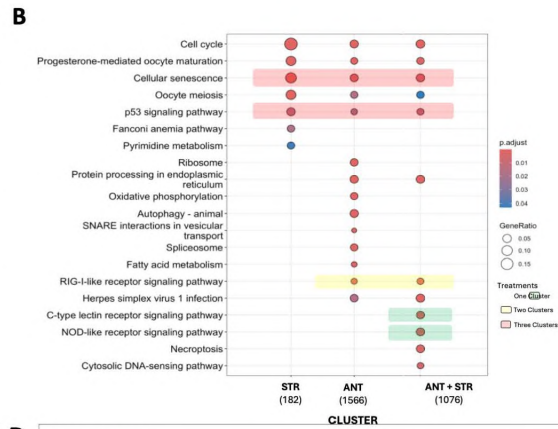
1443 **Figure 9.**

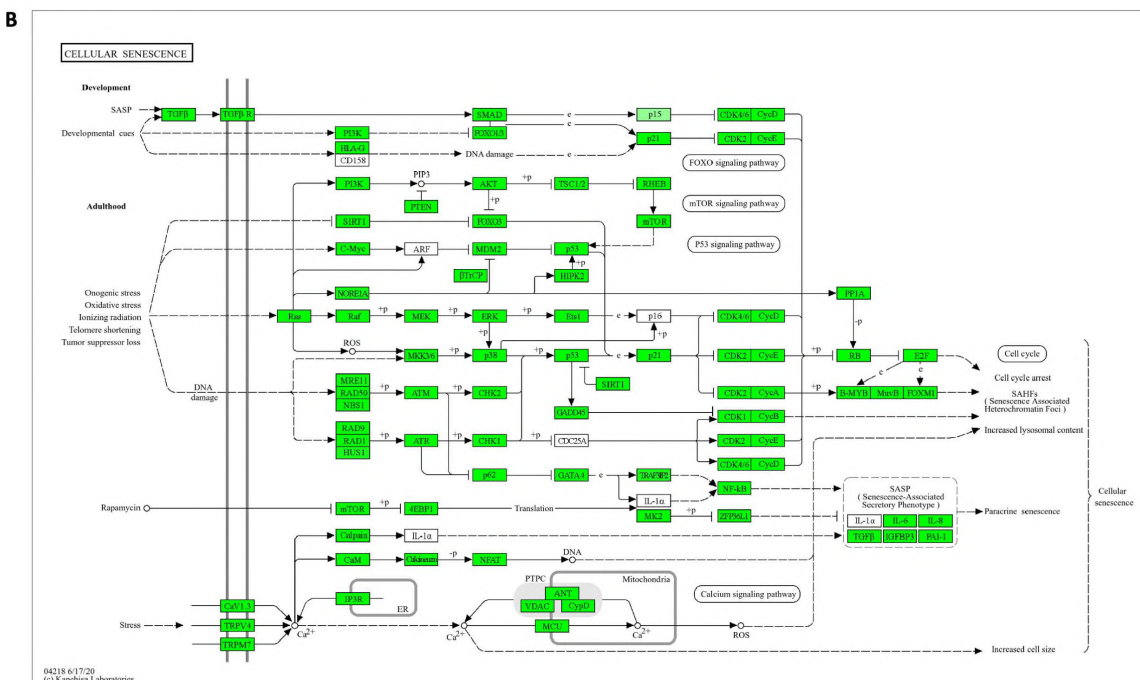
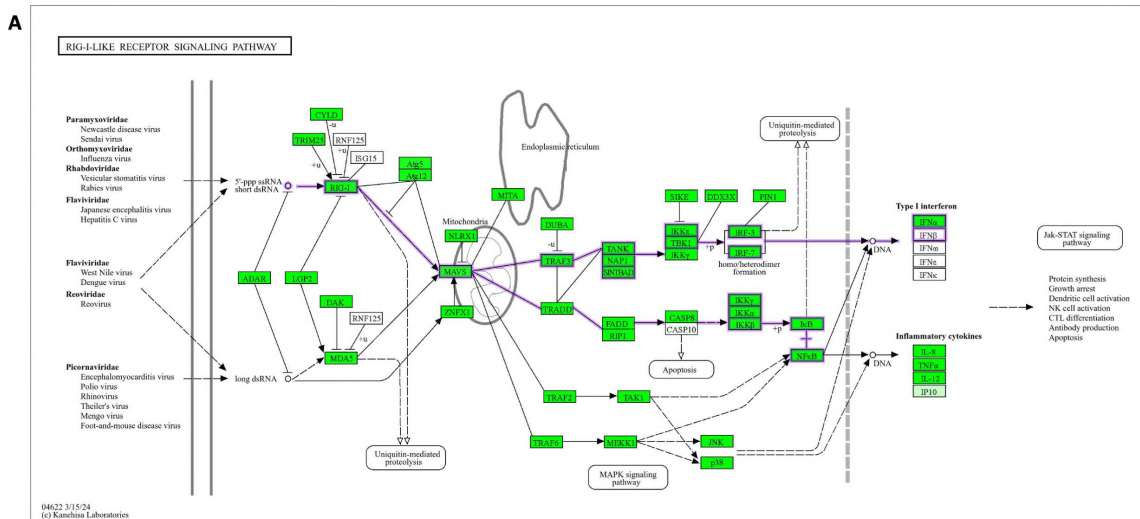
1444

1445 **A**

KEGG Category/ Pathway	Shared Genes	Unique to:			<i>p.adjust</i>
		ANT	STR	ANT+STR	
<b>Cellular Processes/ Cell Cycle</b>	30	50	10	70	1.00E-05
<b>Organismal Systems/ Immune System Pathway</b>	10	5	2	20	1.00E-02
<b>Environmental Information Processing/ Signal Transduction</b>	15	20	5	25	5.00E-02
<b>Metabolism/ Metabolic Pathways</b>	20	40	10	60	1.00E-03

Gene Expression Key: - (red) to + (green)





**Supplementary Table 1.**

Gene (NCBI acc.no)	Primer nucleotide sequences (5'-3')	$\mu$ M
<i>40s11</i> (AB012087)	F: CCGTGGGTGACATCGTTACA R: TCAGGACATTGAACCTCACTGTCT	1
<i>pomc</i> (Y14618.1)	F: TTGGCTCTGGCTGTTCTGTGT R: TCATCTGTCAGATCAGACCTGCATA	2,5
<i>crh</i> (AJ576243)	F: CATCCGGCTCGGTAACAGAA R: CCAACAGACGCTGCGTAACT	1
<i>crhr</i> (AJ576244)	F: CCCTGCTGATCGCCTTCAT R: GCAGGATAAATGCTGTAATCAGGTT	1
<i>crh-bp</i> (AJ490881)	F: ACAATGATCTCAAGCGGTCCAT R: CCACCCAGAAGCTCGACAAA	1
<i>mr</i> (AJ783704)	F: TTCCTGCAGAACTCAAAGGA R: ACGGACGGTGACAGAAACG	2
<i>gr1</i> (AJ879149)	F: GACTTACCTGACTCCCTATCTGAC R: GCTTCCACCATCTGCTGC	1
<i>gr2</i> (AM183668)	F: GGAGAACAACGGTGGGACTAAAT R: GGCTGGTCCCATTAGGAA	1
<i>il-1<math>\beta</math></i> (KC008576)	F: AAGGAGGCCAGTGGCTCTGT R: CCTGAAGAAGAGGAGGCTGTCA	1
<i>il-1<math>\beta</math>r</i> (AJ843873)	F: ACGCCACCAAGAGCCTTTTA R: GCAGCCCATATTTGGTCAGA	1
<i>mc2r</i> (AJ605725.1)	F: AGCATATTCCACGCGCTAGG R: ACTGTAGCGGCTCGAAGAA	2
<i>star</i> (FJ490418)	F: GTGGAACCCCAATGTCAAAC R: ACAGGTGGGTCCATTCTCAG	1
<i>Cyp11b1</i> (XM_019123804.1)	F: CCCTGGAAGGTCAAGTGTGT R: GGTGGGGTTTGGAGATAAGG	2
<i>11<math>\beta</math>-hsd3</i> (XM_019107831)	F: GCACTCAATGGTTTCTTTGGA R: GCTCCAGCTTCGATAATGTG	2
<i>gcsfr</i> (MH262557)	F: GGGCAGCAACTACACAGGA R: AGCACCATAGAGGCAGGAG	1
<i>mmp-9</i> (AB057407)	F: ATGGGAAAGATGGACTGCTG R: TCAAACAGGAAGGGGAAGTG	2,25
<i>cxcl8_11</i> (PIT/NPO) (AB470924.1)	F: TCACTTCACTGGTGTGCTC R: GGAATTGCTGGCTCTGAATG	1
<i>cxcl8_11</i> (HK) (AJ421443)	F: CTGGGATTCTGACCATTGGT R: GTTGGCTCTCTGTTCAATGCA	1
<i>cxcl8_12</i> (AB470924)	F: TCACTTCACTGGTGTGCTC R: GGAATTGCTGGCTCTGAATG	1
<i>cxcb1</i> (AB082985)	F: GGGCAGGTGTTTTGTGTTGA R: AAGAGCGACTTGCGGGTATG	1
<i>cxcb2</i> (JN104598)	F: AGGCAGGTGCTTCTGTGCTGACA R: TTCATGCATTTCCGCTCTGCGCT	1
<i>cxcl12a</i> (AJ627274)	F: CACCGTCACAGATATGTACCATATAGTC R: GGTGGTCTTTTGAGAGTCATTT	1
<i>cxcl12b</i> (AJ536027)	F: GAGGAGGACCACCATGCATCT R: TTGTGCAAGCAGTCCAGAAGA	1
<i>cxcr1</i> (AB010468)	F: GCAAATTGGTTAGCCTGGTGA R: AGGCGACTCCACTGCACAA	1

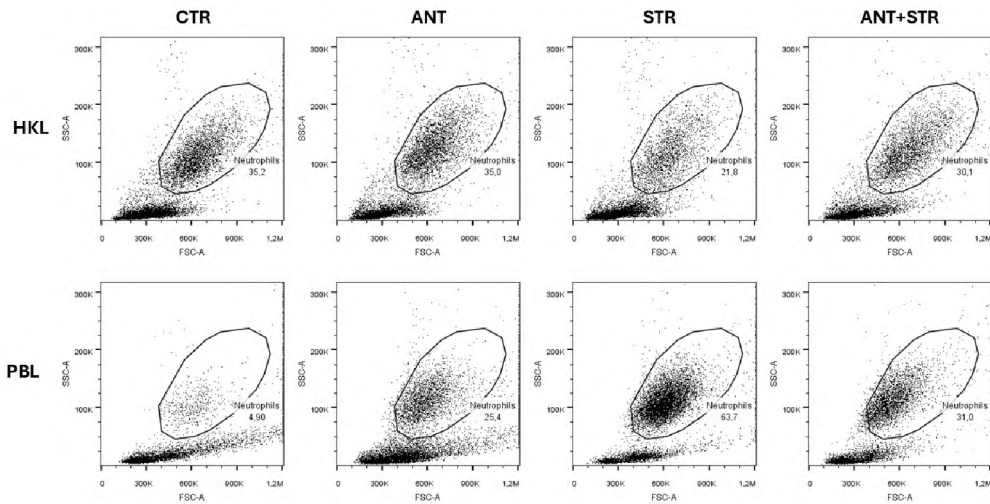
<b><i>cxcr2</i></b> <b>(AB010713)</b>	<b>F: TATGTGCAAAGTATTTCAGGCTTAC</b> <b>R: GCACACTATAACCAACCAGATGG</b>	<b>1</b>
<b><i>cxcr3</i></b> <b>(HE584636)</b>	<b>F: CACTCTGTACGCCACTCGTAGG</b> <b>R: TGTCATGACCCCAAGCATCTGC</b>	<b>1</b>
<b><i>cxcr4</i></b> <b>(AB012310.1)</b>	<b>F: CGGTGTCTGCGTTTCATCTATT</b> <b>R: TTCTTTTGAAGCCCATCAC</b>	<b>1</b>
<b><i>mpx</i></b> <b>(AB429306)</b>	<b>F: GTGGTCGTGTCGGTCTCTT</b> <b>R: GATGCCTTTTGTTTGGTGGTG</b>	<b>1</b>
<b><i>tlr4</i></b> <b>(XM_042736549)</b>	<b>F: TCAAAACGGATCACACTGCA</b> <b>R: TGAAAGCTCTGGTTCAATGT</b>	<b>1</b>

1468  
1469  
1470

1471 **Supplementary Table 2.**

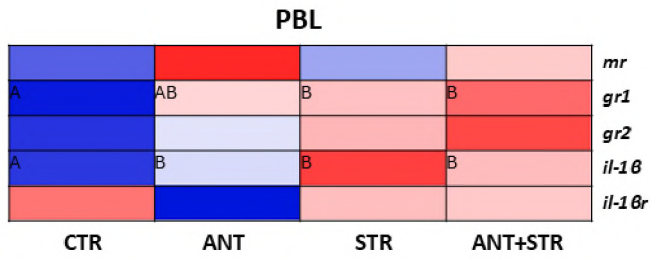
Sample Name	Raw Reads	Low Quality	Too Many N	Too Short	Too Long	Clean Reads	GC Content	% PF	Effective(%)	Error(%)	Q20(%)	Q30(%)
CTR_1	160352104	963828	27886	819364	0	<b>158541026</b>	47.70%	98.90%	99.99	0.02	97.59	95.69
CTR_2	181505382	1333866	29426	3601652	0	<b>176540438</b>	47.80%	97.30%	99.99	0.03	97.22	94.95
CTR_3	176917064	1088938	29820	773006	0	<b>175025300</b>	47.40%	98.90%	100	0.02	97.76	95.95
CTR_4	196802540	1537246	35068	1078840	0	<b>194151386</b>	47.40%	98.70%	99.99	0.02	97.59	95.66
CTR_5	156317682	1802068	27016	1215214	0	<b>153273384</b>	48.20%	98.10%	99.99	0.03	97.2	94.93
STR_1	131105626	935654	23208	563926	0	<b>129582838</b>	47.50%	98.80%	99.99	0.02	97.56	95.62
STR_2	179474100	1388124	31228	1701624	0	<b>176353124</b>	47.60%	98.30%	99.99	0.03	97.48	95.41
STR_3	169300346	1286504	28672	1272440	0	<b>166712730</b>	47.60%	98.50%	99.99	0.03	97.34	95.24
ANT_1	172455660	1649916	30570	4673576	0	<b>166101598</b>	50.00%	96.30%	99.99	0.03	97.54	95.37
ANT_2	158692308	1758124	28222	4801176	0	<b>152104786</b>	50.50%	95.80%	99.99	0.03	97.49	95.26
ANT_3	168112392	1903070	30420	7796592	0	<b>158382310</b>	51.20%	94.20%	99.99	0.03	97.35	94.91
ANT_4	193202028	3038268	30738	16427320	0	<b>173705702</b>	50.80%	99.90%	99.99	0.03	96.52	93.26
ANT+STR_1	165971054	1444334	29002	2587350	0	<b>161910368</b>	47.30%	97.60%	99.99	0.03	97.4	95.25
ANT+STR_2	175268332	1195208	30798	1907358	0	<b>172134968</b>	47.20%	98.20%	99.99	0.02	97.56	95.58
ANT+STR_3	173808406	1201478	29658	3110258	0	<b>169467012</b>	47.40%	97.50%	99.99	0.03	97.23	95.02

1472  
1473  
1474



1475  
1476  
1477

**Supplementary Figure 1.**

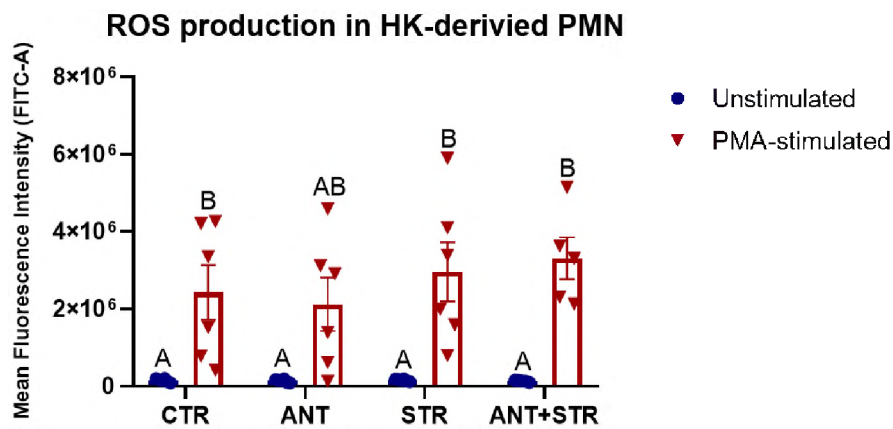


1478

1479 **Supplementary Figure 2.**

1480

1481



1482

1483 **Supplementary Figure 3.**

1484

1485

1486

## 5. Sygnalizacja TLR/Myd88 wpływa na dojrzewanie i redystrybucję neutrofilii podczas zapalenia u larw danio pręgowanego

U ssaków wykazano, że mikrobiota wpływa na dojrzewanie i aktywację neutrofilii i że w zjawisko to zaangażowane są receptory TLR i białko adaptorowe Myd88. W celu sprawdzenia udziału tej sygnalizacji w odpowiedzi na zapalenie podczas stresu postanowiliśmy uzupełnić badania nad wpływem mikrobioty jelitowej na redystrybucję neutrofilii o model danio pręgowanego, który umożliwia rozróżnienie dojrzałych i niedojrzałych neutrofilii.

### 5.1. Materiały i metody

#### 5.1.1. Hodowla danio pręgowanego i warunki eksperymentalne

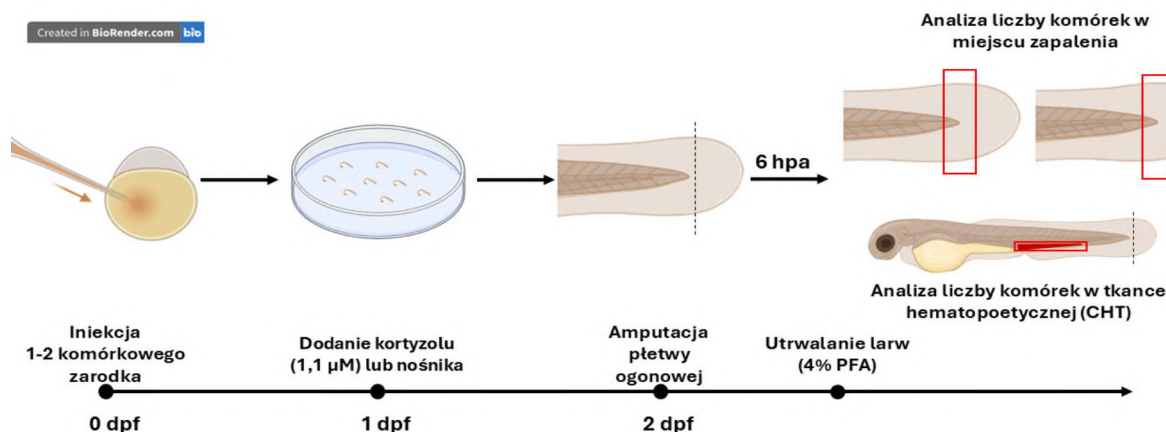
Larwy danio pręgowanego (*Danio rerio*) pozyskano ze zwierzętarni Zakładu Immunologii Ewolucyjnej UJ, zgodnie ze standardowymi procedurami. Do rozrodu użyto danio z podwójnie transgenicznej linii *Tg(lysC:CFP-NTR)<sup>vi002</sup>;Tg(BACmmp9:Citrine-CAAX)<sup>vi00</sup>* pozyskanej z St. Anna Children's Cancer Research Institute (CCRI) [84]. Zebrane zarodki hodowano w temperaturze 28,5 °C w pożywce E3 z błękitem metylenowym (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,3 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1% błękitu metylenowego, pH 7,0) w szalkach Petriego. Stadia rozwojowe oceniano zgodnie z klasyfikacją [171]. W celu stworzenia mutantów F0 (tzw. *crispanty*, ang. *crispants*), z nokautem genu *myd88*, w stadium 1-2-komórkowym zarodki iniekowano komponentami systemu CRISP/Cas9: 0,5 µl białka Cas9 (20 µM, New England Biolabs, NEB, M0386, Ipswich, MA, USA) oraz 1 µl (100 µM, 1:1) sekwencji targetujących gen *myd88*: sgRNA1 CTGTTACTGGAATCGCCTCA (TGG), sgRNA2-TGCAGTTTCCGAAAGAAACT (GGG). Grupę kontrolną stanowiły zarodki iniekowane: białkiem Cas9 (0,5 µl, 20 µM) wraz z niespecyficznym (nierozpoznającym specyficznie żadnego regionu genomu) sgRNA (1 µl scramble crRNA, 100 µM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Efektywność mutacji potwierdzono za pomocą genotypowania opartego na reakcji PCR, z użyciem części zainiekowanych 5-dniowych larw z obydwu grup.

Kortyzol (hydrokortyzon; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), rozpuszczono w 96% etanolu (1 mg/ml) i przechowywano w temperaturze -20 °C. Przed każdym eksperymentem świeżo przygotowywano 1,1 µM roztwory kortyzolu, w 96% etanolu (0,04% obj./obj.), w buforze E3 z błękitem metylenowym. Do roztworów kontrolnych dodano nośnik w tej samej objętości (96% etanol, 0,04% obj./obj.). Zastosowane stężenie etanolu nie wykazuje toksyczności względem larw [172, 173]. 1-dniowe larwy przez 24 h poddawane były działaniu kortyzolu (KORT, 1,1 µM) lub nośnika (CTR) poprzez imersję (28,5 °C). Następnie larwy uśpiono 0.01% roztworem trikainy (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) i u połowy larw z każdej grupy

wywoływano stan zapalny poprzez amputację części płetwy ogonowej (AMP) [174]. Po 6 godzinach od amputacji larwy utrwalano w 4% paraformaldehydzie (4% PFA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, 4 °C) (Ryc. 2).

### 5.1.2. Obrazowanie i analiza danych

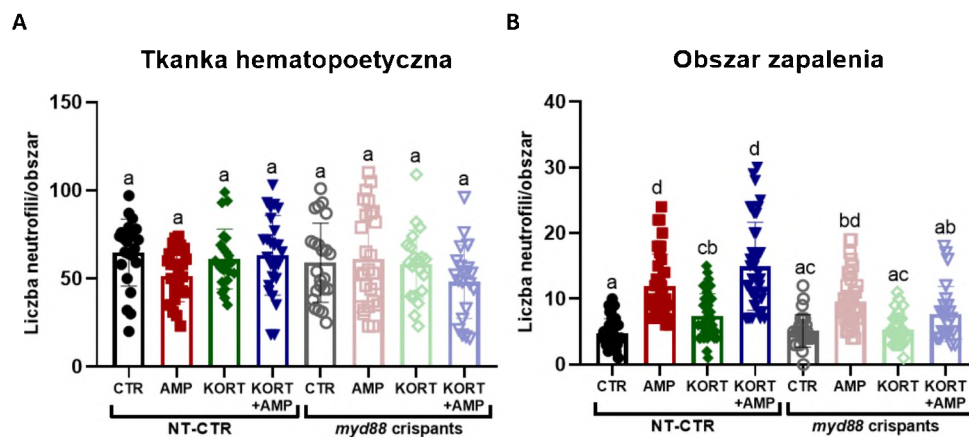
Utrwalone larwy pozycjonowano lateralnie w 1% agarozie o niskiej temperaturze topnienia (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) w E3. Obrazowanie przeprowadzono za pomocą mikroskopu konfokalnego LSM 900 (Zeiss) wyposażonego w detektor Airyscan 2 przy użyciu obiektywu apochromatycznego 20x/0.8 M27 i laserów o długości fal 488 nm i 405 nm. Skrawki optyczne (ang. *Z-stack*) były zbierane co 1,8  $\mu\text{m}$ . Obszar analiz zdefiniowano za pomocą pola o wymiarach 100  $\mu\text{m}$  na 350  $\mu\text{m}$  dla płetwy ogonowej oraz 600  $\mu\text{m}$  na 100  $\mu\text{m}$  dla tkanki hematopoetycznej. Analizę wykonano przy użyciu oprogramowania ZEN 3.8 Lite. W obrębie wyznaczonych obszarów zaznaczano manualnie komórki o powierzchni 50-80  $\mu\text{m}^2$  przy użyciu opcji „Draw Sline Contour”. Następnie w obrębie zaznaczeń odczytano średnie intensywności fluorescencji dla każdego z fluorochromów (TaYFP, ang. *yellow fluorescent protein* oraz CFP, ang. *cyan fluorescent protein*). Surowe dane pogrupowano w programie Excel, w celu otrzymania liczby komórek wykazujących wyłącznie fluorescencję CFP (stanowiących niedojrzałe neutrofile, które nie wykazują ekspresji *mmp9*) oraz komórek wykazujących fluorescencję CFP i TaYFP (stanowiących dojrzałą populację neutrofile, która wykazuje ekspresję *mmp9*). Dane poddano analizie statystycznej w programie GraphPad Prism i analizowano za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (2-way ANOVA) z testem post-hoc Sidaka w celu identyfikacji istotnych różnic między grupami ( $p < 0,05$ ).



**Rycina 2.** Schemat obrazujący procedury wykonane podczas eksperymentu. Oś czasu przedstawia dni eksperymentu: 0-2 dpf – dni od zapłodnienia (ang. *days post fertilization*), hpa – godziny po amputacji (ang. *hours post amputation*).

## 5.2. Wyniki eksperymentu

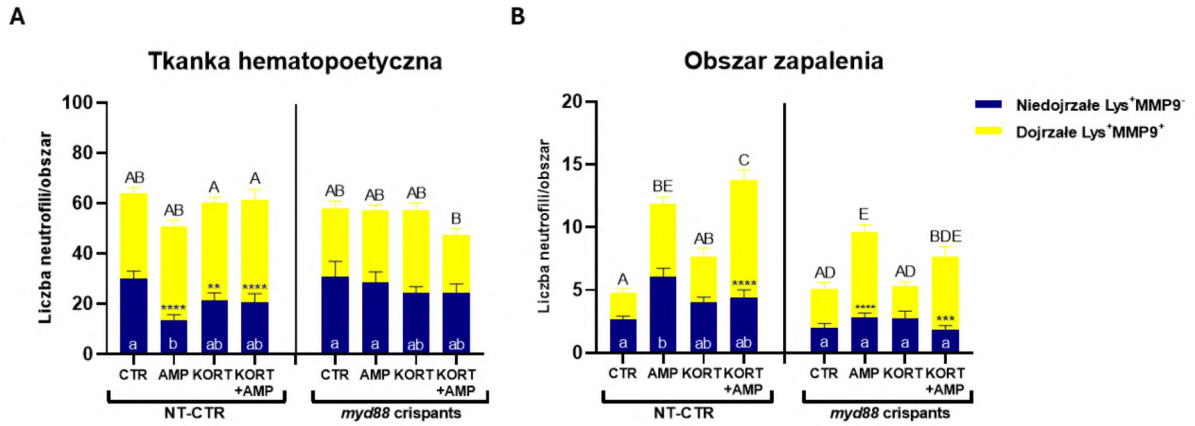
W eksperymencie nie zaobserwowano różnic w liczbie neutrofilów w tkance hematopoetycznej pomiędzy rybami z różnych grup eksperymentalnych (Ryc. 3A). W obszarze zapalenia doszło do zwiększenia liczby neutrofilów. Nie zaobserwowano jednak istotnych statystycznie różnic między liczbą neutrofilów w ognisku zapalenia u larw kontrolnych i potraktowanych kortyzolem oraz u larw z mutacją *myd88* (Ryc. 3B). Stwierdzono natomiast, że u larw z mutacją *myd88* traktowanych kortyzolem liczba neutrofilów w miejscu zapalenia jest niższa niż u traktowanych kortyzolem larw z funkcjonalną cząsteczką Myd88.



**Rycina 3.** Wpływ kortyzolu i sygnalizacji zależnej od MyD88 na liczbę neutrofilów w tkance hematopoetycznej i obszarze zapalenia u larw danio przegowanego linii *Tg(lysC:CFPNTR)<sup>vi002</sup>;Tg(BACmmp9:Citrine-CAAX)<sup>vi003</sup>*. *myd88* crispants – zarodki danio zainiekowane komponentami systemu CRISP/Cas9 (Cas9 mRNA oraz sgRNA skierowanego przeciwko *myd88*), NT-CTR – zarodki danio przegowanego zainiekowane Cas9 mRNA wraz z niespecyficznym (niemającym powiązania z żadnym regionem genomu) sgRNA. 1-dniowe larwy przez 24 h poddawane były działaniu kortyzolu (KORT, 1,1  $\mu$ M) lub nośnika (CTR), a następnie u części larw z każdej grupy wywoływano stan zapalny poprzez amputację części płetwy ogonowej (AMP). Po 6 godzinach liczono komórki w tkance hematopoetycznej i obszarze zapalenia. N=21-27, średnia + błąd standardowy, 2-way ANOVA, z testem post-hoc Sidaka ( $p < 0,05$ ). Różne litery oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami (np. a vs b).

Podczas zapalenia (grupa AMP), w tkance hematopoetycznej larw kontrolnych z funkcjonalną cząsteczką Myd88 (NT-CTR) zaobserwowano mniej niedojrzałych komórek ( $MMP9^-$ ) niż u larw z mutacją Myd88. U larw kontrolnych (bez mutacji) liczba komórek dojrzałych ( $MMP9^+$ ) istotnie przeważała nad liczbą komórek niedojrzałych ( $MMP9^-$ ). Tę zależność zaobserwowano również w pozostałych grupach eksperymentalnych (KORT i KORT+AMP). Ponadto, u larw NT-CTR stymulowanych kortyzolem w momencie zapalenia (KORT+AMP) stwierdzono większą liczbę komórek  $MMP9^+$  niż u larw z mutacją Myd88 (Ryc. 4A). Stwierdzono ponadto, że u larw NT-CTR w miejscu amputacji znajduje się istotnie statystycznie więcej komórek  $MMP9^-$  niż w analogicznej grupie pozbawionej funkcjonalnej

cząsteczki Myd88. Co ciekawe, larwy NT-CTR traktowane kortyzolem, podczas zapalenia (KORT+AMP) wykazały większą liczbę neutrofilii MMP9<sup>+</sup> w miejscu zapalenia niż larwy z amputacją, które nie były traktowane kortyzolem. Podobnego zjawiska nie obserwowano u larw z nokautem Myd88 (Ryc. 4B).



**Rycina 4.** Wpływ kortyzolu i sygnalizacji zależnej od MyD88 na liczbę niedojrzałych (MMP9<sup>-</sup>) i dojrzałych (MMP9<sup>+</sup>) neutrofilii w tkance hematopoetycznej i obszarze zapalenia u larw danio pręgowanego linii *Tg(lysC:CFPNTR)<sup>vi002</sup>;Tg(BACmmp9:Citrine-CAAX)<sup>vi003</sup>. myd88* crispants – zarodki danio pręgowanego zainiekowane komponentami systemu CRISP/Cas9 (Cas9 mRNA oraz sgRNA skierowanego przeciwko *myd88*), NT-CTR – zarodki danio pręgowanego zainiekowane Cas9 mRNA wraz z niespecyficznym (niemającym powiązania z żadnym regionem genomu) sgRNA. 1-dniowe larwy przez 24 h poddawane były działaniu kortyzolu (KORT, 1,1 μM) lub nośnika (CTR), a następnie u części larw z każdej grupy wywoływano stan zapalny poprzez amputację części pletwy ogonowej (AMP). Po 6 godzinach liczono komórki w tkance hematopoetycznej i obszarze zapalenia. N=21-27, średnia + błąd standardowy, 2-way ANOVA, z testem post-hoc Sidaka (p<0,05). Różne litery oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami (a vs b dla neutrofilii MMP9<sup>-</sup>; A vs B dla neutrofilii MMP9<sup>+</sup>). Gwiazdki wskazują na różnicę istotną statystycznie pomiędzy liczbą neutrofilii MMP9<sup>-</sup> i MMP9<sup>+</sup>.

### 5.3. Wnioski

Uzyskane wyniki sugerują, że kortyzol oraz sygnalizacja TLR/Myd88 nie wpływają na całkowitą liczbę neutrofilii w tkance hematopoetycznej u larw danio pręgowanego. Kortyzol nie zmienia także całkowitej liczby neutrofilii napływających do miejsca zapalenia. Sygnalizacja TLR/Myd88 ma natomiast istotny wpływ na liczbę neutrofilii rekrutowanych do ogniska zapalenia podczas stymulacji kortyzolem. Ponadto wykazano, że sygnalizacja TLR/Myd88 wpływa na dojrzewanie neutrofilii i ich redystrybucję w momencie zapalenia, jeżeli larwy podlegają stymulacji kortyzolem. Pozwala to wnioskować, że w momencie stresu dochodzi do wzmożonego napływu dojrzałych neutrofilii, które w przypadku zapalenia, są preferencyjnie rekrutowane do jego ogniska. Jeżeli sygnalizacja TLR/Myd88 jest zaburzona, dojrzewanie

neutrofili w tkance hematopoetycznej jest mniej efektywne i w sytuacji stresu powoduje obniżoną migrację dojrzałych neutrofili do ogniska zapalenia.

## **IV. Dyskusja**

### **1. Oś: Stres-chemokiny-neutrofile**

Podobnie jak ssaki, ryby kostnoszkieletowe rozwinęły wysoce efektywne mechanizmy obronne, w celu zapobiegania i zwalczania infekcji. Wrodzona odpowiedź immunologiczna, w tym zapalenie, opiera się na ściśle regulowanym rozpoznawaniu patogenów przez receptory PRR oraz migracji fagocytów do miejsca zakażenia. Kluczowy w tej odpowiedzi jest m.in. szybki napływ neutrofilii, regulowany przez chemokiny i ich receptory. W pierwszych dwóch artykułach obecnej pracy wykazaliśmy, że również ostry stres aktywuje mechanizmy podobne do odpowiedzi zapalnej, a kortyzol, przy braku infekcji, jest istotnym czynnikiem regulującym redystrybucję neutrofilii z narządów hematopoetycznych do krwi. Zjawisko to jest zależne od receptorów Gr (**Rozdział III.2.**). Ponadto wykazano, że jest to zależność dwukierunkowa, ponieważ chemokiny CXCL, które są zaangażowane w regulację retencji i migracji neutrofilii mają również istotną rolę w regulacji aktywacji osi stresu. (**Rozdział III.1.**). Obserwowana u ryb indukowana stresem neutrofilia, która jest zależna od czasu trwania stresu i zanika wkrótce po ustąpieniu stresora, potwierdza konserwatywność ewolucyjną tego procesu. Wcześniejsze badania sugerowały, że indukowana stresem neutrofilia jest zależna zarówno od katecholamin jak i od kortyzolu/kortykosteronu [175, 176]. Z kolei Poller i współautorzy [177] pokazali, że u myszy neutrofilia wywołana ostrym stresem nie jest zależna od układu współczulnego. Te pozorne sprzeczności mogą głównie wynikać z kinetyki tej reakcji i pojawiać się, gdy różne badania analizują różne etapy reakcji stresowej. Badania wpływu ostrego stresu na liczbę leukocytów we wczesnych punktach czasowych (stresor trwający minuty) pokazują, że jest to, zależna od adrenaliny i noradrenaliny, szybka mobilizacja (wzrost liczby) monocytów, neutrofilii i limfocytów we krwi, natomiast w późniejszych punktach czasowych (stresor trwający godziny) zjawisko to jest głównie regulowane przez glikokortykoidy, które wpływają nie tylko na redystrybucję leukocytów do krwi, ale także na ich późniejszą migrację z krwi do tkanek [175]. Istotnym źródłem komórek, wspomagającym szybką redystrybucję leukocytów jest pula marginalna [3, 5], a natychmiastowa sygnalizacja jest szczególnie istotna podczas infekcji lub stanu zapalnego [5]. Dłuższe działanie stresora powoduje, że ogólna liczba (szczególnie limfocytów i komórek NK) we krwi zmniejsza się w miarę tego jak komórki przemieszczają się do narządów/tkanek docelowych [175]. Wyjątek stanowią tutaj neutrofile wykazujące dwufazową ciągłą mobilizację do krwi [175]. Należy zwrócić uwagę, że przedstawione w obecnej pracy wyniki analiz cytometrycznych w formie wartości procentowych, przy zwiększonych wartościach dla neutrofilii, niebezpośrednio wskazują również na obniżone wartości procentowe pozostałych populacji leukocytów. Koordynacja

migracji określonych typów leukocytów najprawdopodobniej zapewnia optymalizację zasobów immunologicznych podczas adaptacyjnej odpowiedzi organizmu na stresor. W badaniach nad redystrybucją leukocytów kluczowy jest czas trwania stresu, dlatego należy podkreślić, że w obecnej pracy testujemy model ostrego przedłużonego stresu (11 lub 24 h), i skupiamy się na słabo poznanych mechanizmach regulujących wzrost (i brak znaczącego spadku) liczby neutrofilii we krwi.

W obecnej pracy ważne było również określenie roli, jaką odgrywają poszczególne hormony stresu w regulacji redystrybucji neutrofilii. Stwierdzono, że zastosowanie antagonisty receptorów  $\beta$ 1Adr nie wpłynęło na wywołaną stresem neutrofilię, a zablokowanie sygnalizacji  $\beta$ 2Adr oraz Mc2r zwiększyło liczbę neutrofilii we krwi. Może to sugerować zwiększoną redystrybucję pozostałych leukocytów do tkanek i zaangażowanie katecholamin i receptorów  $\beta$ 1Adr w tej regulacji. Obserwowany równolegle brak wzrostu poziomu kortyzolu po stresie w grupach z zablokowaną sygnalizacją  $\beta$ 1Adr,  $\beta$ 2Adr lub Mc2r sugeruje, że redystrybucja neutrofilii była w sposób pośredni zależna od katecholamin. Reiske i współautorzy [178] wykazali, że u świni dożylny wlew kortyzolu, adrenaliny lub noradrenaliny zmniejsza liczbę limfocytów i zwiększa liczbę neutrofilii. Jednakże efekt wywołany katecholaminami był słabszy i trwał krócej w porównaniu do efektu wywołanego przez kortyzol [178]. W innych badaniach, w których stymulowano różne obszary podwzgórza (podwzgórze przedwzrokowe/przednie, ang. *preoptic/anterior hypothalamus*, AH; podwzgórze brzuszno-przyśrodkowe, ang. *ventromedial hypothalamus*, VMH) kotów, wykazano, że stymulacja AH i VMH wywołuje wzrost poziomu kortyzolu i adrenaliny w osoczu, przy jednoczesnej granulocytozie i limfopenii [179–181]. W obecnej pracy, wykazaliśmy ponadto, że u karpia zablokowanie receptorów Gr i/lub Mr zatrzymało zależną od stresu neutrofilię. Również u ssaków podanie kortykosteronu (endogennego agonisty receptora GR i MR) lub RU28362 (specyficznego agonisty GR) szczurom poddanym adrenalectomii spowodowało zmiany w rozmieszczeniu leukocytów, które były podobne do tych obserwowanych u zwierząt z funkcjonalnymi nadnerczami podczas stresu [182]. Wyniki te sugerują, że kortykosteron, działający za pośrednictwem receptora GR, jest głównym mediatorem wywołanych stresem zmian w redystrybucji limfocytów i monocytów we krwi [182]. Warto w tym miejscu przypomnieć, że karp posiada 2 typy receptorów Gr (Gr1 i Gr2) a kortyzol wiąże się także z dużym powinowactwem do receptorów Mr. Z literatury wiadomo, że u ssaków, sygnalizacja przez receptor GR zachodzi przy wysokich, charakterystycznych dla stresu, stężeniach kortyzolu [183]. Sądzymy w związku z tym, że u karpia za aktywację mechanizmu uwolnienia neutrofilii z nerki główowej prawdopodobnie odpowiada receptor Gr1, który tak jak GR ssaków, wymaga wysokich stężeń

kortyzolu [184–186]. Dodatkowy argument potwierdzający tę zależność stanowi analiza ekspresji genów w nerce główowej, która wykazała podwyższony poziom *gr1* po 11-godzinym stresie unieruchomienia (**Rozdział III.1.**). Potwierdzeniem kluczowej roli glikokortykoidów w regulacji wywołanej stresem redystrybucji neutrofilii są obserwacje pokazujące wpływ egzogennych, syntetycznych glikokortykoidów na to zjawisko. Przykładowo Barden i in. [187] wykazali, że u zdrowych ochotników deksametazon powoduje wzrost liczby neutrofilii we krwi, który utrzymuje się przez 24 godziny od podania tego glikokortykoidu. Z kolei po 4 godzinach od podania deksametazonu następuje we krwi, zależna od dawki, redukcja liczby monocytów, limfocytów, bazofili i eozynofili [187]. Ponadto wcześniejsze badania, które wykazały, że glikokortykoidy mogą hamować apoptozę neutrofilii, wydłużać czas życia tych komórek oraz opóźniać ich usuwanie zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [188–190], dodatkowo potwierdzają udział tych hormonów stresu w utrzymaniu podwyższonego poziomu neutrofilii we krwi podczas stresu. Co ciekawe zaobserwowaliśmy również, że u karpia, zablokowanie sygnalizacji Gr obniżyło liczbę neutrofilii w nerce główowej zarówno u ryb poddanych stresowi jak i niestresowanych (**Rozdział III.2.**). U ssaków wykazano także, że glikokortykoidy mogą stymulować hematopoezę i zwiększać produkcję neutrofilii w szpiku kostnym [188]. Wyniki analizy ekspresji genów przeprowadzone w obecnej pracy, również sugerują, że kortyzol wspomaga mobilizację neutrofilii z tkanki hematopoetycznej do krwiobiegu. Podczas stresu obserwowano bowiem wzrost ekspresji genów związanych z retencją (*cxcl12*, *cxcr4*) i uwolnieniem neutrofilii z tkanki hematopoetycznej (*gcsfr*, *mmp9*, *cxcl8*). U ssaków MMP9 bierze udział w mobilizacji komórek macierzystych i progenitorowych hematopoezy (ang. *hematopoietic stem and progenitor cell*, HSPC) poprzez rozszczepianie i inaktywację cząsteczki adhezyjnej VCAM-1 i/lub chemokiny CXCL12 [191]. Zaburzenie interakcji CXCL12-CXCR4 i/lub VCAM-1/VLA-4 przyczynia się do mobilizacji HSPC. U ssaków wykazano, że podczas mobilizacji/uwolnienia komórek hematopoetycznych, ze szpiku kostnego dochodzi w nim do zmniejszenia poziomu białka CXCL12, co pobudza zwiększenie ekspresji genu *CXCL12*. Jednocześnie wykazano zwiększony poziom zarówno genu jak i białka MMP9 [192], a zastosowanie rekombinowanego białka MMP9 prowadziło w warunkach *in vitro* do degradacji CXCL12 [192]. W obecnej pracy zaobserwowaliśmy również zależny od stresu/kortyzolu wzrost ekspresji *gcsfr*. Wcześniejsze badania na ssakach wykazały, że GCSF indukuje mobilizację neutrofilii poprzez obniżenie poziomu CXCL12 oraz zwiększenie ekspresji CXCR4 w szpiku kostnym [193]. Obserwowany wzrost ekspresji *cxcr4* w obecnej pracy wpisuje się w ten wzór sygnalizacji. Z kolei seria eksperymentów *in vitro* i *in vivo* ujawniła, że zależna od MMP9 degradacja CXCL12 zwiększa

wywołaną GCSF mobilizację HSPC. Obserwowane u karpia, wywołane stresem zmiany ekspresji genów w leukocytach krwi obwodowej (wzrost ekspresji *cxcl8*, *cxcl12*, *cxcr4*, *cxcr1*, *gcsfr* i *mmp9*) świadczą o zaangażowaniu w proces redystrybucji neutrofilii konstytutywnych (Cxcl12) i prozapalnych (Cxcl8) chemokin z rodziny CXC. W badaniach na myszach pokazano, że podniesienie poziomu CXCL12 we krwi poprzez podanie wektora adenowirusowego zawierającego gen *CXCL12* powoduje znaczącą mobilizację komórek HSPC [194]. Sądzymy, że u ryb zależna od Gr1 aktywacja neutrofilii inicjuje kaskadę sygnalizacyjną, prowadzącą do zachwiania równowagi Cxcl12/Cxcr4 i redystrybucji dojrzałych i niedojrzałych neutrofilii do krwi. Aby to sprawdzić w obecnej pracy zastosowano inhibitor Cxcr4 - AMD3100, którego działanie stymulujące redystrybucję neutrofilii zostało potwierdzone u ssaków i u ryb [170, 195]. Jednak u ryb potraktowanych inhibitorem przed 11-godzinnym stresem unieruchomienia, zaobserwowano obniżenie liczby neutrofilii we krwi obwodowej, pomimo wyższego poziomu kortyzolu w surowicy w porównaniu do ryb stresowanych, nastrzykniętych nośnikiem. Być może redystrybucja neutrofilii nastąpiła wcześniej niż w badanych punktach czasowych (nastrzyknięcie inhibitorem godzinę przed stresem) co znacznie ogranicza precyzyjną interpretację tych wyników. Ponadto zarówno stres jak i zablokowanie sygnalizacji Cxcr4-Cxcl12 mogło doprowadzić do szybkiego wyczerpania puli marginalnej. Poza retencją w puli marginalnej, sygnalizacja Cxcr4-Cxcl12 odpowiada także za powrót starzejących się neutrofilii (charakteryzujących się wysoką ekspresją CXCR4) do tkanki hematopoetycznej [3]. Tam podlegają one apoptozie a następnie są fagocytowane przez makrofagi [3, 5]. Ten proces jest niezbędny do modulacji niszy hematopoetycznej i stymuluje produkcję GCSF oraz może powodować zmniejszenie ekspresji *CXCL12*, co z kolei prowadzi do zwiększonego uwalniania neutrofilii do krwi [21]. W obecnej pracy stres wywołał wzrost ekspresji *cxcr1* w leukocytach krwi obwodowej podczas gdy poziom ekspresji *cxcr2* nie uległ zmianie. Jak już wspomniano we wstępie, wcześniejsze badania na danio pręgowanym wykazały, że sygnalizacja Cxcl8 zależy od mikrośrodowiska reakcji. I tak w przypadku rekrutacji neutrofilii do miejsca sterylnego zranienia, w sygnalizację zaangażowany jest receptor Cxcr1 [150], natomiast jeżeli zapalenie związane jest z toczącą się infekcją w sygnalizację zaangażowany jest receptor Cxcr2 [153]. Wydaje się, że mechanizmy regulujące redystrybucję neutrofilii podczas stresu są bardzo podobne do tych obserwowanych podczas sterylnego zapalenia. Co więcej, Zuñiga-Traslaviña i in. [149] wykazali, że u larw danio pręgowanego, wyciszenie genu *cxcl8\_12* obniża liczbę neutrofilii w krwiobiegu. W związku z tym wysoka ekspresja *cxcl8\_12* w leukocytach krwi obwodowej ryb potraktowanych AMD3100 sugeruje aktywną regulację chemotaksji neutrofilii z nerki głowowej do krwi.

Wysoki poziom kortyzolu u ryb traktowanych przed stresem AMD3100 i brak charakterystycznej neutrofilii sugeruje przede wszystkim brak responsywności na stres. U danio przęgowanego obserwowana w wyniku ostrego stresu neutrofilia nie została odnotowana podczas stresu przewlekłego [196]. Wydaje się, że zwiększony pod wpływem AMD3100 poziom kortyzolu może powodować desensytyzację receptorów glikokortykoidowych, co z kolei mogło spowodować zatrzymanie zależnej od Gr1 aktywacji i redystrybucji neutrofilii z niszy hematopoetycznej do krążenia. Argumentem wspierającym tą hipotezę jest obniżona ekspresja *gr1* w nerce głowowej stresowanych ryb potraktowanych AMD3100 w porównaniu do ryb stresowanych potraktowanych nośnikiem. Jednocześnie, obserwowane u ryb stresowanych z zablokowanym receptorem Cxcr4 obniżenie ekspresji genów związanych z syntezą kortyzolu (*star* i *cyp11b*) dodatkowo sugeruje aktywne ujemne sprzężenie zwrotne związane z wysokim poziomem kortyzolu. Z kolei zwiększenie ekspresji *11 $\beta$ -hsd3* (**Rozdział III.1.**) sugeruje nasilone przekształcanie kortyzonu do jego aktywnej formy, czyli kortyzolu. W sytuacji, gdy receptory Gr wykazują zmniejszoną wrażliwość na kortyzol, zwiększona aktywność *11 $\beta$ -hsd3* przy wysokim poziomie kortyzolu zwiększa ryzyko uszkodzenia komórek. Należy podkreślić, że badania potwierdzają również różnice w odpowiedzi neutrofilii na glikokortykosteroidy, w tym, że ostre działanie glikokortykoidów może powodować immunostymulację, podczas gdy przewlekła ekspozycja komórek na glikokortykoidy ma działanie immunosupresyjne [197, 198].

Również zastosowanie inhibitorów receptorów Cxcr1 i/lub Cxcr2 zmniejszyło redystrybucję neutrofilii do krwioobiegu. Pozwala to wnioskować, że wywołana stresem redystrybucja neutrofilii do krwi wymaga zarówno przerwania sygnałów retencyjnych jak i pobudzenia sygnałów stymulujących ich migrację. Szczególnie ciekawą obserwacją było stwierdzenie, że zablokowanie receptorów Cxcr1 i 2 obniża poziomu kortyzolu w surowicy ryb. Nasuwa to wniosek, że chemokiny Cxcl8 regulują przebieg reakcji stresowej/aktywację osi HPI. Z kolei obniżona ekspresja *cxcr4*, *gcsfr* i *mmp9* w nerce głowowej zwierząt potraktowanych tymi inhibitorami sugeruje zablokowanie sygnalizacji odpowiedzialnej za uwolnienie neutrofilii. Obserwacje te jednoznacznie wskazują, że proces indukowanej stresem redystrybucji neutrofilii zależy nie tylko od sygnałów neuroendokrynnych, ale także od obecności chemokin CXC i ich receptorów. Wyniki przedstawione w **Rozdziale III.2.** uzupełniają oraz tworzą integralną część analiz **Rozdziału III.1.**, w którym wykazano, że chemokiny regulują aktywację osi stresu. Chociaż wywołana IL-1 $\beta$  regulacja CRH jest uważana za główny mechanizm, za pomocą którego cytokiny stymulują uwalnianie

glikokortykoidów, coraz więcej dowodów potwierdza bezpośrednie działanie cytokin również na pozostałych poziomach osi stresu [199]. U ssaków i ryb receptory cytokin wykryto we wszystkich narządach osi HPA/HPI [200, 201]. Ponadto badania na ssakach wskazują, że cytokiny są również syntetyzowane w mózgu, przednim płacie przysadki mózgowej i w nadnerczach [202]. Lokalnie produkowane cytokiny mogą działać parakrynnie i dzięki temu wpływać na aktywność osi HPA. W badaniach nad wpływem cytokin na funkcjonowanie osi HPA najczęściej uwagi poświęcono cytokinom prozapalnym: IL-1, IL-6 i TNF $\alpha$  [200]. Układ odpornościowy, za pośrednictwem tych cytokin, stymuluje uwalnianie glikokortykoidów [203]. To z kolei powoduje negatywne sprzężenie zwrotne, hamujące dalszą syntezę i uwalnianie cytokin prozapalnych. W ten sposób glikokortykoidy chronią organizm przed nadmierną aktywacją odpowiedzi zapalnej [200]. Prace Rostene i in. [204], Ślusarczyk i in. [205] oraz Verburg-van Kemenade i in. [206] opisują rolę chemokin CXCL8 i CXCL12 w regulacji osi HPA ssaków lub HPI ryb podczas stresu. W obecnej pracy (**Rozdział III.1.**) potwierdzono tę rolę, dzięki zastosowaniu inhibitorów receptorów Cxcr1, Cxcr2 i Cxcr4. Wykazano, że chemokiny CXC regulują u ryb ekspresję genu kodującego Crh. Co ciekawe, odpowiadają również za regulację ekspresji genu kodującego Il-1 $\beta$  (we wszystkich narządach osi stresu) oraz Il-1r w NPO i nerce głowowej. Według naszej wiedzy, jest to jak dotąd pierwszy dowód wskazujący, że chemokiny CXC podczas stresu regulują ekspresję *il-1 $\beta$*  w osi HPI ryb. Wcześniejsze badania na ssakach pokazały, że w szpiku kostnym, IL-1 $\beta$  poprzez związanie z IL-1R stymuluje mielopoezę [207]. IL-1 $\beta$  bezpośrednio lub za pośrednictwem m.in. GCSF może indukować proliferację i różnicowanie HSPC i GMP [207–209]. Co ciekawe, wykazano również, że IL-1 $\beta$  odpowiada za pobudzanie produkcji CXCL8 oraz bezpośrednią aktywację neutrofilów do produkcji ROS, tworzenia NET, a także może przedłużać żywotność tych komórek [210–215]. Ponadto obserwowane zmiany w ekspresji genów kodujących chemokiny Cxcl8 i Cxcl12 sugerują, że narządy osi stresu stanowią istotne źródło tych chemokin.

Obecne badania stanowią istotny krok w kierunku kompleksowego zrozumienia kinetyki oraz mechanizmów hormonalnych pośredniczących w indukowanych stresem zmianach w redystrybucji neutrofilów. Możliwość dwukierunkowej modulacji neuroendokrynno-immunologicznej tworzy potencjał dla zastosowań terapeutycznych jak i podkreśla znaczenie stresu w kontekście interpretacji wyników badań krwi. W badaniach nad mechanizmami odpowiedzi na stres, ryby mają tę przewagę nad gryzoniami, że podobnie jak ludzie, są to organizmy aktywne w ciągu dnia, a ich głównym hormonem glikokortykoidowym jest kortyzol [216]. Wyniki obu artykułów, dotyczące roli chemokin CXC i ich receptorów w regulacji osi HPI oraz mechanizmów redystrybucji neutrofilów podczas stresu, wprowadzają nową

perspektywę w rozumieniu dwukierunkowej komunikacji między układem odpornościowym, a neuroendokrynnym. Tak jak zapalenie może aktywować oś stresu [202], kortyzol/oś stresu może regulować aktywację chemokin/odpowiedź immunologiczną. Ta wielopoziomowa interakcja warunkuje możliwość wykorzystywania kaskady osi stresu do regulacji redystrybucji leukocytów do krwi a następnie do ogniska zapalnego lub regulacji jego wyciszenia.

## 2. Oś: Jelita-mózg-neutrofile

Jak zauważono w pierwszej części dyskusji, aktywacja osi stresu przez cytokiny/chemokiny może pełnić funkcję regulatorową. Zaburzenie regulacji osi stresu może jednak negatywnie wpływać na stan zdrowia i dobrostan ludzi i zwierząt. Dobrym tego przykładem są pacjenci z zaburzeniami endokrynologicznymi (np. zespołem Cushinga), u których podwyższony poziom kortyzolu powoduje niewrażliwość na przeciwwzapalne działanie glikokortykoidów [217, 218]. Przewlekły stres jest powszechnie uznawany za czynnik przyczyniający się do rozwoju lub zaostrzenia różnych chorób zapalnych, w tym chorób zapalnych jelit (ang. *inflammatory bowel disease*, IBD) [219]. Choroby te charakteryzują się dysregulacją odpowiedzi immunologicznej, która skutkuje przewlekłym zapaleniem przewodu pokarmowego, podczas którego może wystąpić oporność lub niewrażliwość na glikokortykoidy, co stwarza poważny problem terapeutyczny. Ciężka postać IBD, choroba Leśniowskiego-Crohna, czy wrzodziejące zapalenie jelita grubego (ang. *ulcerative colitis*, UC) charakteryzują się przewlekłym, nawracającym zapaleniem przewodu pokarmowego, któremu często towarzyszy zwiększona przepuszczalność jelit, zaburzona równowaga mikrobioty i dysfunkcja układu odpornościowego [220, 221]. Badania podkreślają złożoną interakcję między stresem, dysbiozą mikrobiomu i chorobami zapalnymi jelit [220]. Między innymi na modelu przewlekłego stresu psychologicznego wykazano, że nadprodukcja CRH i glikokortykoidów prowadzi do redukcji białek ścisłych połączeń nabłonka jelit, uszkadzając przez to integralność błony śluzowej, co ściśle wiąże się z progresją IBD [222–224]. Co ciekawe, coraz liczniejsze dowody sugerują, że stres znacząco modyfikuje także mikrobiotę jelitową, która odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu zdrowia jelit i homeostazy immunologicznej. Nawet krótkotrwały stres może wywołać dysbiozę [225]. Termin ten odnosi się do zmian w składzie mikrobioty (w tym zmian liczebności bakterii zasiedlających jelita), które prowadzą do zaburzeń homeostazy mikrobiologicznej, zmian metabolicznych i funkcjonalnych [226]. Jednym z mechanizmów, poprzez które stres wpływa na mikrobiotę jelit, jest aktywacja osi HPA [227]. W obecnej pracy (**Rozdział III.3.**) przeanalizowano wpływ 24-godzinne stresu unieruchomienia na skład i liczebność bakterii mikrobioty jelitowej karpia,

a także oceniono, czy indukowana stresem neutrofilia stanowi czynnik ryzyka w patofizjologii jelit, prowadzący do zapalenia jelit w warunkach dysbiozy.

Wykazano, że potraktowanie antybiotykami wywołuje u karpia dysbiozę mikrobioty jelitowej, charakteryzującą się obniżeniem liczebności bakterii z rodzaju *Aeromonas*, *Bacteroides*, *Barnesiellaceae*, *Cetobacterium* i *Shewanella* przy jednoczesnym zwiększeniu liczebności bakterii z rodzaju *Vibrio*, *Flavobacterium* i *Desulfovibrionaceae*. Z kolei 24-godzinny stres unieruchomienia w mniejszym stopniu wpłynął na zmiany mikrobioty, powodując obniżenie liczebności bakterii *Cetobacterium* i zwiększenie liczebności bakterii z rodzaju *Vibrio*. Największe zmiany w mikrobiocie jelitowej karpia wywołało połączenie antybiotykoterapii i stresu, co spowodowało dysbiozę charakteryzującą się zwiększeniem w jelicie liczebności niekorzystnych rodzajów bakterii (*Brevinema*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Mycoplasma*, *Flavobacterium*, *Desulfovibrionaceae*). Tak jak opisano w dyskusji artykułu (**Rozdział III.3.**) większość zmian w mikrobiocie zarówno tych pojawiających się pod wpływem stresu, antybiotyków lub ich kombinacji, charakteryzowała się zmniejszeniem liczebności korzystnych rodzajów bakterii przy jednoczesnym zwiększeniu liczebności bakterii patogennych. Obniżenie liczebności najliczniejszego korzystnego rodzaju bakterii, *Cetobacterium* po antybiotykoterapii i/lub stresie unieruchomienia może wskazywać, że jest to zmiana zależna od wspólnego dla tych trzech grup czynnika, którym wydaje się być wzrost poziomu kortyzolu (**Rozdział III.3. Tab.1.**). Liczebność *Cetobacterium* była istotnie obniżona u ryb stresowanych w porównaniu do kontrolnych, a w obydwóch grupach traktowanych antybiotykami liczebność tego rodzaju bakterii była istotnie niższa niż w grupie wyłącznie poddanej stresowi. Wiele z opisywanych w dyskusji (**Rozdział III.3.**) bakterii to rodzaje charakterystyczne dla mikrobiomu karpia/ryb karpiowatych, które w stanie homeostazy wykazują korzystne działanie związane z wspomaganie trawienia i regulacją metabolizmu, jednak w sytuacji dysbiozy lub stresu mogą wykazywać działanie patogenne (np. *Mycoplasma*, *Pseudomonas*). W stanie homeostazy komensalne szczepy bakteryjne wspierają metabolizm, modulują odpowiedź immunologiczną oraz utrzymują integralność bariery jelitowej [228, 229]. W przebiegu dysbiozy równowaga mikrobioty zostaje zaburzona, dochodzi do spadku różnorodności gatunkowej bakterii, pojawia się nadmierny wzrost szczepów patogennych i spada liczba szczepów korzystnych dla organizmu, co może prowadzić do upośledzenia funkcji bariery jelitowej oraz pojawienia się stanu zapalnego [230]. Jest to zjawisko obserwowane często u ssaków, w tym w badaniach klinicznych [230]. U ssaków, niektóre z gatunków komensali uznawane za korzystne w stanie równowagi mikrobiologicznej, jak szczepy *Escherichia coli*, mogą w warunkach dysbiozy nadmiernie się namnażać i wytwarzać toksyny

prowadząc do uszkodzenia nabłonka jelitowego [229, 231]. Innym przykładem jest *Clostridioides difficile*, który po antybiotykoterapii, gdy spada konkurencja ze strony innych bakterii, może rozwinąć się do postaci patogennej wywołującej ciężkie zapalenie okrężnicy [231, 232]. Infekcja *Clostridioides difficile* zachodzi głównie przez układ pokarmowy, dlatego jest ściśle związana z zaburzeniem mikrobioty jelitowej [231, 232]. Wykazano, że dysbioza wiąże się także z obniżoną produkcją krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. *short chain fatty acids*, SCFA), co ze względu na ich działanie przeciwzapalne i wspomagające, często powoduje naruszenie integralności bariery nabłonka jelitowego i zaburza tolerancję immunologiczną [233, 234]. Zarówno u ssaków jak i u ryb, SCFA są głównymi metabolitami wytwarzanymi w wyniku fermentacji przez bakterie [235–237]. Coraz więcej dowodów wskazuje również na istotną rolę SCFA w modyfikowaniu aktywności neutrofilii. W szczególności wykazano, że SCFA wspomagają migrację neutrofilii do miejsc zakażenia i zwiększają ich aktywność fagocytarną. Ograniczają również syntezę cytokin prozapalnych przez neutrofile [229]. Co ciekawe w badaniu *in vitro* przeprowadzonym na leukocytach nerki główowej karpia stymulowanych LPS wykazano, że dodanie SCFA powodowało zmniejszenie ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne (*il-1 $\beta$* , *il-6*, *tnfa*, *cxcl8*, *p40*) i przeciwzapalną IL-10 (*il-10*). W obecnej pracy w jelicie przednim i środkowym, u ryb z wywołaną antybiotykami dysbiozą odnotowano wzrost ekspresji *il-1 $\beta$* . Jednak największe zmiany ekspresji genów kodujących mediatory przeciw- i prozapalne (*il-10*, *il-1 $\beta$* , *cxcl8\_12*, *cxcb2*), receptor Tlr4 (*tlr4*) i cytokiny zaangażowane w odpowiedź zależną od limfocytów Th17 (*il-23p19*, *il-12p35*, *il-17a/f2*, *il-17c*, *il-17d2*), zaobserwowano u ryb traktowanych antybiotykami a następnie stresowanych, które wykazały najbardziej zaawansowaną dysbiozę. U ryb niestresowanych z wywołaną antybiotykami dysbiozą również zaobserwowano wzrost w jelitach ekspresji niektórych z tych genów (*il-1 $\beta$* , *il-17a/f2*, *il-17c*, *il-17d2*). Co ciekawe, w jelitach ryb z najbardziej zaawansowaną dysbiozą zaobserwowano również zmiany morfologiczne wskazujące na toczącą się reakcję zapalną, w tym wzrost liczebności komórek kubkowych i pręcikowych oraz zwiększony naciek neutrofilii. Wcześniejsze badania na ssakach wykazały, że podczas homeostazy rekrutacja neutrofilii do jelita jest osłabiana przez mikrobiotę [238], co zapobiega rozwojowi reakcji zapalnej. U ludzi i myszy, PAMPy takie jak LPS i peptydoglikan są wykrywane przez receptory PRR (TLR i NLR) [15, 239]. Indukuje to między innymi produkcję interleukiny-17 (IL-17) przez jelitowe limfocyty Th17, co z kolei pobudza produkcję GCSF, głównego regulatora różnicowania neutrofilii [240]. Sugeruje to więc zaangażowanie mikrobioty w regulację granulocytopeny. Ponadto, makrofagi i komórki dendrytyczne w błonie śluzowej jelit konstytutywnie produkują duże ilości pro-IL1 $\beta$ . Sygnały

pochodzące od bakterii patogennych indukują tworzenie zależnego od NLRC4 (ang. *NLR family caspase activation and recruitment domain-containing protein 4*) inflamasomu i konwersję pro-IL1 $\beta$  do jej aktywnej formy, co indukuje rekrutację neutrofilów. Zrekrutowane neutrofile mogą migrować do światła jelita, tworząc zorganizowaną strukturę, która zapobiega translokacji i ekspansji zarówno gatunków komensalnych bakterii, jak i tych patogennych [241]. Pokazano ponadto, że rekrutacja neutrofilów do nabłonka błony śluzowej jest zależna od CXCR2. U myszy pozbawionych genu *Cxcr2* (CXCR2<sup>-/-</sup>) wykazano, zmniejszoną rekrutację neutrofilów do tkanek obwodowych i obniżoną odporność na zakażenia jelit [242–244]. Bakterie SFB (ang. *segmented filamentous bacteria*) i inne komensale mogą także bezpośrednio stymulować komórki Th17, aktywując zależną od IL-17 i CXCR2 rekrutację neutrofilów do jelit i kontrolę nadmiernej ekspansji SFB [243]. Badania na ssakach sugerują także, że sygnały z mikrobioty jelitowej mogą odgrywać znaczącą rolę w regulacji homeostazy neutrofilów. Kontynuując temat wspomnianej już roli w regulacji granulocytopeny, wyniki badań na ssakach wskazują, że wywołana antybiotykami redukcja lub całkowity brak mikrobioty, a także hodowla zwierząt w warunkach sterylnych znacząco zmniejszają liczbę neutrofilów i ich prekursorów, co skutkuje zwiększoną podatnością na infekcje [15, 240, 245]. Jednak rola mikrobioty jelitowej w wywołanej stresem redystrybucji neutrofilów jest nadal słabo poznana. W kolejnym etapie badań obecnej pracy sprawdzono więc wpływ mikrobioty na aktywność osi stresu (HPI) i na wywołaną stresem redystrybucję neutrofilów oraz ich aktywność (**Rozdział III.4.**). Na podstawie analizy ekspresji genów wykazano, że 24-godzinny stres unieruchomienia wpływa głównie na ekspresję genów zaangażowanych w steroidogenezę oraz konwersję kortyzolu w nerce głowowej. Brak zmian w ekspresji genów na wyższych poziomach osi stresu sugeruje aktywny mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego podczas 24-godzinnego stresu. Z kolei ryby z wywołaną antybiotykami dysbiozą charakteryzowała zwiększona ekspresja *il-1 $\beta$*  na wszystkich poziomach osi stresu, co sugeruje zależną od IL-1 $\beta$  przedłużoną aktywację osi stresu. Ponadto, poziom kortyzolu u ryb z dysbiozą był na podobnym poziomie do tego obserwowanego u ryb poddanych 24-godzinnej stresowi unieruchomienia. Co ciekawe, u ryb poddanych stresowi, dysbioza istotnie zwiększyła poziom kortyzolu w porównaniu do stresowanych ryb z niezaburzoną mikrobiotą. Te obserwacje są spójne z wcześniejszymi badaniami na myszach GF, u których brak mikrobioty był związany z nadmierną aktywacją osi stresu i zwiększoną produkcją kortykosteronu [246]. Jedną z hipotez sugeruje również, że dysbioza jelit może przyczyniać się do zwiększonego uwalniania cytokin prozapalnych (np. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), co skutkuje większą aktywacją osi HPA i zwiększa ryzyko wystąpienia podczas IBD objawów lęku i depresji [247–249].

Analiza ekspresji genów związanych retencją i migracją neutrofilów w nerce głowowej i leukocytach krwi obwodowej wykazała, że dysbioza podczas stresu obniża wywołaną stresem neutrofiliją. Co ciekawe, zarówno w wyniku dysbiozy jak i stresu zaobserwowano zwiększoną liczbę neutrofilów we krwi obwodowej, jednak ten wzrost był niższy u ryb z dysbiozą. Biorąc pod uwagę badania Zhang i in. [15], w których wykazano, że brak mikrobioty znacząco zmniejsza liczbę starzejących się neutrofilów, w obecnej pracy podjęto się także sprawdzenia czy obniżona neutrofilia u ryb z dysbiozą wynika z redystrybucji neutrofilów z krwi do innych narządów/tkanek (np. jelit, skrzel, skóry), czy jednak z zaburzonej granulocytopoezy i/lub dojrzewania neutrofilów w nerce głowowej. Analizy ekspresji genów metodą RT-qPCR i transkryptomu wykazały w neutrofilach nerki głowowej pochodzących od stresowanych ryb z wywołaną antybiotykami dysbiozą, obniżoną ekspresją genu *mpx* kodującego mieloperoksydazę i *cxcr4*, przy jednoczesnym podwyższeniu ekspresji *mmp9*. Wcześniejsze badania przeprowadzone na szczurach GF wykazały, że neutrofile przy braku mikrobioty, charakteryzuje zmniejszona aktywność mieloperoksydazy i obniżona zdolność do chemotaksji w odpowiedzi na rekombinowany GCSF (rhGCSF) [250]. Z kolei niski poziom ekspresji *cxcr4* oraz wysoki poziom *mmp9* wskazuje na aktywację klasycznych mechanizmów prowadzących do uwolnienia neutrofilów z nerki głowowej [251]. Badania przeprowadzone na mutantach *smu681* danio przegowanego, u którego stwierdzono niedobór mieloperoksydazy wykazały zwiększoną liczbę neutrofilów gromadzących się w miejscu zakażenia *Candida albicans* przy jednocześnie wydłużonym czasie neutralizacji zakażenia w porównaniu do kontroli z funkcjonalną mieloperoksydazą [252]. Biorąc to pod uwagę, wyniki obecnej pracy, sugerują, że obniżona ekspresja *mpx* w neutrofilach, może sprzyjać zintensyfikowanemu napływowi neutrofilów do miejsca zapalenia (jelit) u ryb z dysbiozą podczas indukowanej stresem redystrybucji. Ponadto obniżony poziom *mpx* sugeruje obniżenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej tych komórek. Co ciekawe, pomimo tej samej liczby neutrofilów w nerce głowowej u zwierząt z dysbiozą i ryb z grupy kontrolnej, aktywności fagocytarna neutrofilów z tej grupy ryb była znacząco obniżona w porównaniu do wysoce aktywnych neutrofilów pozyskanych z nerki głowowej ryb kontrolnych. U danio przegowanego wykazano, że dojrzała populacja neutrofilów wykazuje większą aktywność fagocytarną w porównaniu do niedojrzałych komórek [84]. Może to sugerować, że w obecnych badaniach, podczas dysbiozy neutrofile w nerce głowowej karpia stanowią głównie populację niedojrzałych komórek. Potencjalnie dysbioza mogła więc mieć wpływ zarówno na aktywność jak i dojrzewanie neutrofilów w nerce głowowej. Wykazano, że dysbioza powoduje wzrost ekspresji *hif1a*, *lcp2a*, *cyb1* oraz obniżenie ekspresji *dhx58*, *irf3*, *irf7*, *stat1*, *icam2*,

*cxcr4*, *camp*, *trpv5* i *tgfb*. Z kolei profil transkryptomyczny neutrofilii ryb poddanych stresowi wskazał wzrost aktywności antyapoptotycznej (wzrost ekspresji *hif1a*, *cd8* i spadek ekspresji *trim36*) i zmniejszoną ekspresję genów kodujących receptor SCFA (*gpr43*), receptor homeostatycznej chemokiny Cxcl12 (*cxcr4*) i genów związanych z odpowiedzią przeciwwirusową (*dhx58*, *irf3*, *irf7*, *stat1*). W przypadku ryb z dysbiozą, poddanych stresowi analiza transkryptomu neutrofilii nerki głowowej ujawniła zmniejszoną ekspresję *mpx* i *cxcr4* oraz zwiększoną ekspresję *mmp9*, co wskazuje na zwiększoną aktywność migracyjną tych komórek. Ponadto zaobserwowano w tych komórkach zwiększoną ekspresję *mhc1*, *trb*, *nlrp12*, *dhx58*, *irf3*, *irf7*, *stat1* i *il1β*, co sugeruje interakcję neutrofilii i cytotoksycznych komórek T, aktywację inflamasomu oraz zwiększoną aktywność prozapalną. Poniżej po krótko przedstawiono w jaki sposób wymienione geny i kodowane przez nie białka regulują dojrzewanie i aktywność neutrofilii.

Badania Elks i in. [94] przeprowadzone na danio pręgowanym wykazały, że aktywacja Hif1a zmniejsza apoptozę neutrofilii. W badaniach na myszach wykazano, że stymulacja komórek szpiku kostnego TGF-β1 i GM-CSF promuje granulocytopenię, a także zwiększa liczbę dojrzałych granulocytów w szpiku kostnym i we krwi [253, 254]. Badania na neutrofilach człowieka, pozyskanych ze szpiku kostnego wykazały natomiast, że dojrzałe neutrofile wykazują wysoką ekspresję genów, które zwiększały ich reakcje na IFN typu I i II. Co ciekawe, czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) obniżał ekspresję tych genów. W dojrzałych neutrofilach również obserwowano zwiększoną ekspresję *STAT1*, kodującego czynnik transkrypcyjny STAT1 (ang. *signal transducer and activator of transcription 1*), podczas gdy niedojrzałe neutrofile nie wykazywały takiego wzorca ekspresji [255]. Poza główną rolę w odpowiedzi przeciwwirusowej, zwiększoną produkcję IFN typu I wykazano również podczas infekcji bakteryjnych [256]. Co więcej, obserwowane zmiany ekspresji *irf3* wskazują na aktywność osi sygnałowej IRF3, która jest aktywowana głównie w następstwie pobudzenia ścieżki sygnalizacyjnej TLR-TRIF. Zwiększoną aktywację tej ścieżki obserwowano w neutrofilach szpiku kostnego myszy GF [257]. U myszy wykazano także, że stymulacja LPS indukuje *de novo* ekspresję *ICAM-1* na powierzchni neutrofilii. Ta indukcja była z kolei związana ze zwiększoną aktywnością fagocytarną i produkcją ROS. W przypadku myszy z niedoborem cząsteczki adhezyjnej *ICAM-1* (ang. *intracellular adhesion molecule-1*) te funkcje efektorowe były zaburzone [258]. Poza zdolnością do neutralizacji patogenów, neutrofile są również zaangażowane w bezpośrednią prezentację antygenów, ponieważ wykazują ekspresję genów dla białek głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHCI i MHCII) [259, 260]. Poza badaniami *in vitro* [261], które

wykazały, że stymulacja neutrofilii GM-CSF, IFN- $\gamma$  i IL-3 zwiększa ekspresję *MHCII* w neutrofilach człowieka, dobrym przykładem są również neutrofile izolowane od pacjentów leczonych GM-CSF lub IFN- $\gamma$ , które również wykazują wysoką ekspresję tego genu [260, 262, 263]. Neutrofile mogą działać zatem jako APC dla limfocytów T [264]. Zaobserwowane u karpia zmiany w ekspresji *gpr43*, jak już wspomniano mogą skutkować problemami w wiązaniu SCFA i w redystrybucji neutrofilii. W badaniach przeprowadzonych na myszach wykazano bowiem, że prawidłowa mikrobiota, która produkuje SCFA, poprzez GPR43 reguluje rekrutację neutrofilii do ogniska zapalnego [265]. Zależny od GPR43 wpływ krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych na neutrofile jest złożony i zależy od kontekstu. Wykazano, że sygnalizacja ta, wywołuje chemotaksję w kierunku wysokich stężeń SCFA oraz stymuluje wytwarzanie ROS i fagocytozę [266, 267]. Jednak badania na neutrofilach myszy *Gpr43<sup>-/-</sup>* wykazały zwiększoną produkcję ROS i nasiloną chemotaksję w odpowiedzi na bodźce pochodzenia bakteryjnego (LPS i formylowane peptydy bakteryjne, ang. *N-formylmethionine-leucyl-phenylalanine*, fMLP) oraz w odpowiedzi na C5a i CXCL1. W przypadku takich myszy zaobserwowano także występowanie zaostrego lub nieustępującego stanu zapalnego podczas infekcji oraz w modelach zapalenia okrężnicy, zapalenia stawów i astmy [265, 266, 268]. Wyniki te sugerują immunosupresyjną rolę sygnalizacji GPR43 w regulacji aktywności neutrofilii. Dodatkowo zastosowanie SCFA zostało również powiązane z obniżeniem produkcji ROS [267]. Wciąż nie jest więc jasne, w jaki sposób SCFA wywołują przeciwstawne efekty w neutrofilach za pośrednictwem tego samego receptora. Jednym z możliwych wyjaśnień jest to, że w niskich stężeniach (odpowiadających poziomom w osoczu) SCFA hamują rekrutację i aktywację neutrofilii poprzez sygnalizację GPR43, co zapobiega reakcjom immunologicznym przeciwko bakteriom komensalnym, natomiast w wysokich stężeniach (poziomy w świetle jelita) sprzyjają eliminacji patogenów przez neutrofile [241].

Wyniki uzyskane w obecnej pracy wskazują, że dysbioza poprzez zwiększenie poziomu IL-1 $\beta$  przedłuża aktywację osi HPI, co powoduje zwiększenie poziomu kortyzolu i redystrybucję neutrofilii do krążenia. Ponadto, wyniki analizy transkryptomu sugerują istotny wpływ mikrobioty na dojrzewanie i aktywność neutrofilii w nerce głowowej podczas indukowanej stresem granulocytopenii.

Zarówno w tkance hematopoetycznej, jak w krążeniu neutrofile poprzez receptory TLR2 i TLR4 odbierają bezpośrednio sygnały pochodzące z mikrobioty [241, 269]. Zhang i in. [15] odkryli, że mikrobiota za pośrednictwem sygnalizacji TLR/Myd88 wpływa na dojrzewanie neutrofilii. Badania na myszach z delecją MyD88 wykazały, że aktywacja szlaku MyD88 w komórkach śródbłonna naczyń bariery krew-mózg jest również niezbędna do aktywacji

neuronów biorących udział w regulacji osi HPA prowadzącej do wzrostu stężenia glikokortykoidów w osoczu podczas wczesnych stanów zapalnych [270]. Ze względu na brak komercyjnego dostępu do przeciwciał u ryb, a tym bardziej przeciwciał dla markerów określających etapy dojrzewania neutrofilii, poza sprawdzeniem aktywności neutrofilii karpia, kluczową rolę w rozróżnieniu populacji niedojrzałych i dojrzałych komórek odegrały badania przeprowadzone na larwach transgenicznej linii reporterowej  $Mmp9$   $Tg(lysC:CFP-NTR)^{vi002};Tg(BACmmp9:Citrine-CAAX)^{vi003}$  [84]. Larwy danio pochodzące z tej linii charakteryzuje obecność 2 populacji neutrofilii:  $Mmp9^+$  (wykazujące ekspresję *mmp9*) i  $Mmp9^-$  (niewykazujące ekspresji *mmp9*). Wykazano, że komórki  $Mmp9^+$  charakteryzują się większą ziarnistością i segmentacją jądra komórkowego w porównaniu z komórkami  $Mmp9^-$ , co sugeruje ich dojrzały fenotyp [84]. Podobnie, jak w przypadku badań Kirchberger i współpracowników [84], w obecnej pracy (**Rozdział III.5.**) zaobserwowano napływ populacji dojrzałych ( $Mmp9^+$ ) i niedojrzałych ( $Mmp9^-$ ) neutrofilii do miejsca zranienia. U ssaków podczas stanu zapalnego, zarówno dojrzałe, jak i niedojrzałe neutrofile są rekrutowane ze szpiku kostnego [57]. Co ciekawe, wykazano również, że pierwsze neutrofile, które docierają do miejsca zapalenia, to neutrofile starzejące się, a następnie dojrzałe (niestarzejące się) [14]. Larwy danio przegowanego charakteryzują się niewielką liczbą neutrofilii krążących, ponieważ większość neutrofilii znajduje się w tkance hematopoetycznej (CHT) [271]. Jednak podczas stresu lub zapalenia są one szybko uwalniane do krwiobiegu [272]. W obecnej pracy wykazaliśmy, że potraktowanie larw danio kortyzolem zwiększa w miejscu zapalenia liczbę dojrzałych neutrofilii. Najprawdopodobniej wynika to z ich zwiększonej redystrybucji do krążenia w wyniku wcześniejszego uwolnienia pod wpływem kortyzolu, z drugiej strony może również sugerować ich zwiększoną retencję w miejscu zranienia/zmniejszoną migrację wsteczną oraz obniżoną apoptozę. Kortyzol nie zmienił jednak całkowitej liczby neutrofilii napływających do miejsca zapalenia. Z kolei zablokowanie sygnalizacji TLR/Myd88 istotnie zmniejszyło liczbę neutrofilii rekrutowanych do ogniska zapalenia podczas stymulacji kortyzolem. Podobne wyniki przedstawiono dla myszy GF i potraktowanych antybiotykami, które nastrzyknięto dootrzewnowo zymosanem. Neutrofile tych myszy wykazały zmniejszoną rekrutację do miejsca zapalenia, co wynikało z obniżonej zdolności do ekstrawazacji [273]. Podobnie wyniki obecnej pracy sugerują, że rekrutacja neutrofilii do ogniska zapalenia wymaga stymulacji poprzez ścieżkę zależną od MyD88. Pozwala to wnioskować, że w momencie stresu dochodzi do wzmożonego napływu dojrzałych neutrofilii, które w przypadku zapalenia, są preferencyjnie rekrutowane do jego ogniska. Jeżeli sygnalizacja TLR/Myd88 jest zaburzona, dojrzewanie neutrofilii w tkance hematopoetycznej

jest mniej efektywne, co w sytuacji stresu powoduje obniżoną migrację dojrzałych neutrofilów do ogniska zapalenia.

Badania na larwach danio przegowanego stanowią ważne uzupełnienie badań przeprowadzonych na karpie nie tylko ze względu na podobieństwo tych dwóch gatunków ryb karpiowatych. Silna homologia dojrzewania neutrofilów danio przegowanego z neutrofilami ssaków [84] wspiera nasz pogląd na temat ewolucyjnej konserwatywności mechanizmów regulujących retencję i redystrybucję neutrofilów i stwarza nadzieję, na wykorzystanie obecnych wyników w szeroko zakrojonych badaniach nad biologią neutrofilów oraz analizą roli niedojrzałych i dojrzałych neutrofilów podczas stresu i zapalenia. Uważamy, że wywołana stresem redystrybucja neutrofilów do krążenia stanowi ważny mechanizm adaptacyjny organizmu przygotowujący go na wypadek potencjalnej infekcji, do której może dojść podczas, charakterystycznych dla stresu reakcji walki i ucieczki. Przeciwnie do stresu chronicznego, ostry stres może być zatem korzystny dla organizmu. Doskonałym przykładem adaptacyjnego charakteru tego procesu są wyniki prospektywnego badania kohortowego pacjentów, u których odnotowano wywołane stresem (związane z poddaniem się operacji) zmiany w redystrybucji leukocytów (w tym zwiększenie liczby neutrofilów) we krwi. Zmiany te związane były z lepszą rekonwalescencją pooperacyjną, co wynikało z korzystnego wpływu związanej ze stresem redystrybucji leukocytów na gojenie się ran [197].

## **V. Ograniczenia badań**

Interpretując powyższe wyniki trzeba jednak mieć świadomość ograniczeń przeprowadzonych badań. Poniżej przedstawiono listę czynników, które mogą mieć wpływ na interpretację wyników uzyskanych w obecnej pracy:

1. Badania ekspresji genów nie zawsze przekładają się na proporcjonalne zmiany poziomu białka, jednak brak komercyjnie dostępnych przeciwciał skierowanych przeciwko konkretnym białkom karpia i danio uniemożliwia/ogranicza te analizy. Z tego względu w pracy poza sprawdzeniem ekspresji genów przeprowadzono również badania aktywności komórek, analizę mikroskopową oraz histologiczną, a także zastosowano neutrofilową linię reporterową danio przegowanego w celu uwierzytelnienia otrzymanych danych. Uważamy, że stanowi to dobry wstęp do dalszych badań, i w przyszłości warto będzie też bardziej szczegółowo sprawdzić te zależności np. wykorzystując inne transgeniczne/reporterowe linie danio przegowanego np. z nokautem receptorów chemokinowych.

2. Dokonane analizy przeprowadzono nie na czystej populacji neutrofilii, ale na populacji komórek wzbogaconych w neutrofile, co w pewnym stopniu może wpływać na uzyskane wyniki, szczególnie badań ekspresji genów/analizy transkryptomyczne.

3. Wyniki badań neutrofilii z nerki główowej np. ich liczby i stopnia dojrzałości, są obciążone pewnym błędem z uwagi na fakt, że w tym hematopoetycznym narządzie dochodzi do ciągłego powstawania i różnicowania się neutrofilii, ale jest to najprawdopodobniej również tkanka klirensowa, do której wracają i w której są usuwane starzejące się neutrofile.

4. Zarówno obecna praca jak i większość badań dotyczących mikrobiomu skupia się na udziale bakterii, nie można jednak zapominać, że mikrobiotę jelit tworzą również inne mikroorganizmy takie jak grzyby, wirusy, protisty czy archeony, które również mogą brać udział w regulacji badanych zależności poprzez wpływ na metabolizm, konkurencję o zasoby niszy czy interakcję w z układem odpornościowym.

5. Dane wskazujące na różnice w reakcji na różne typy stresorów (w zależności od stężenia hormonów stresu) wskazują m.in., że ostry przedłużony stres unieruchomienia nie jest uniwersalnym modelem, dlatego w przyszłości warto rozważyć także badania z użyciem innych typów stresorów, szczególnie stresu chronicznego. Jednakże zastosowany model ma wysoką wartość w kontekście praktyk stosowanych w akwakulturze.

Pomimo wymienionych ograniczeń uważamy, że uzyskane wyniki wzbogacają wiedzę na temat interakcji układów neuroendokrynnego i odpornościowego.

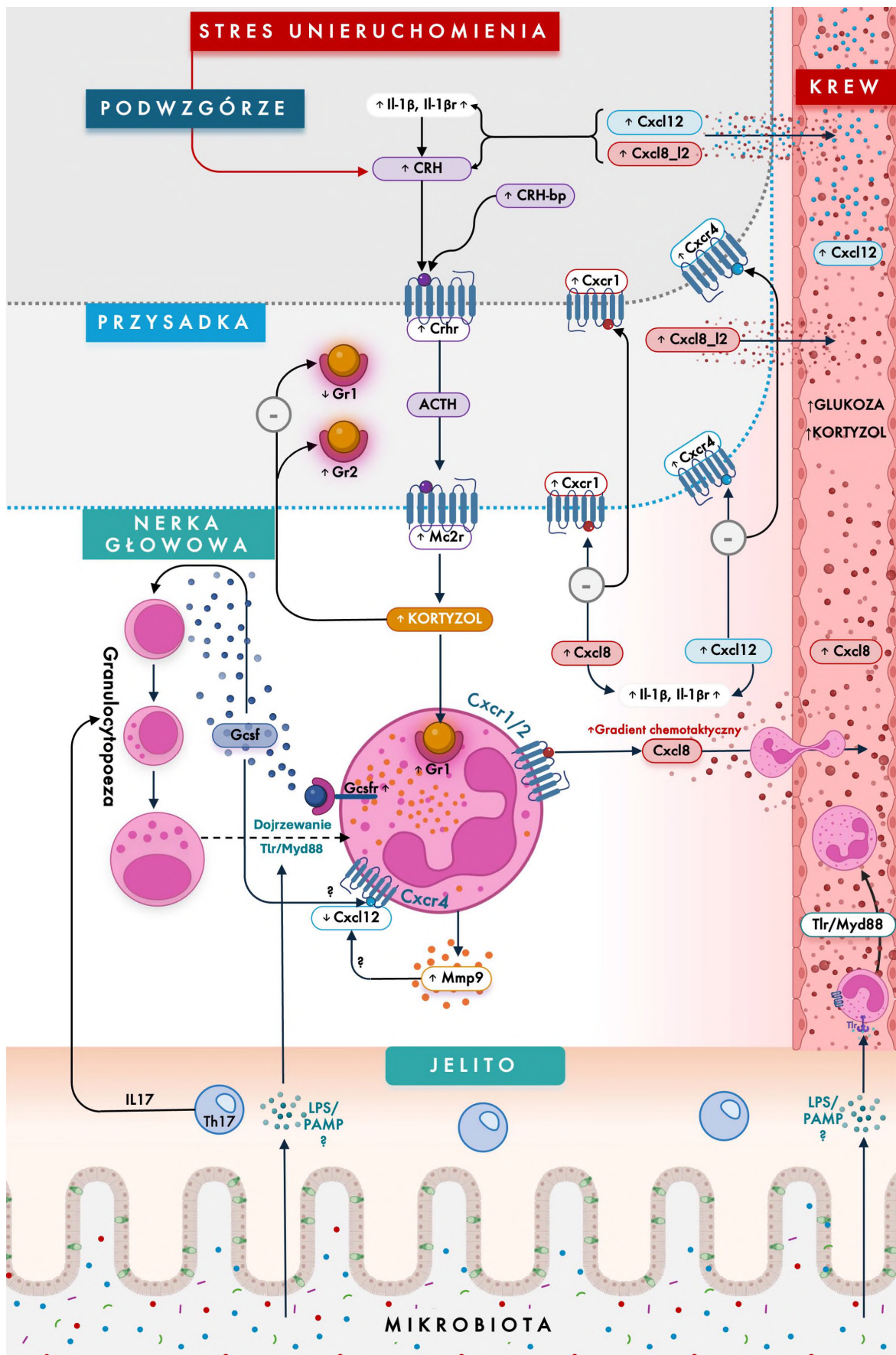
## **VI. Podsumowanie**

Podsumowując, badania przeprowadzone w obecnej pracy pozwoliły na zaproponowanie potencjalnego mechanizmu regulującego wywołaną stresem redystrybucję neutrofilii z tkanki hematopoetycznej (nerki główowej) do krążenia u ryb doskonałokostnych (Ryc. 5). W sposób szczególny skupiono się na roli w tym procesie hormonów stresu i chemokin z rodziny CXC (Ryc. 5).

Jak już wspomniano, z uwagi na swoją funkcję hematopoetyczną i endokrynną, nerka główowa ryb jest miejscem bezpośrednich interakcji neuro-immuno-endokrynnych, podczas których hematopoeza podlega bezpośredniej parakrynnnej regulacji ze strony hormonów stresu. Badania przeprowadzone w ramach obecnej pracy wykazały, że stres unieruchomienia aktywuje kanoniczny szlak sygnałowy prowadzący do syntezy i wydzielania kortyzolu. Stwierdzono, że powstający pod wpływem aktywacji osi stresu w komórkach śródnerkowych kortyzol, reguluje retencję/uwolnienie neutrofilii z nerki główowej do krążenia poprzez

interakcję z receptorami Gr1 w cytoplazmie neutrofile. Opierając się na obecnych wynikach i danych literaturowych [274–276] wydaje się, że wywołane stresem podniesienie poziomu Il-1 $\beta$  w nerce głowowej aktywuje granulocytopenę, a zjawisko to regulowane jest przez interakcję Gcsf z Gcsfr. Dodatkowo prawdopodobnie, tak jak to się dzieje podczas odczynu zapalnego, sygnalizacja Gcsf-Gcsfr stymuluje neutrofile do wydzielenia Mmp9. Badania na ssakach [192, 277, 278], sugerują, że aktywność proteolityczna Mmp9 prowadzi do cięcia lub degradacji Cxcl12 (co jak sądzimy związane jest ze zwiększoną ekspresją *cxcl12* w celu uzupełnienia poziomu degradowanego białka). Wzmocniona aktywność Mmp9, jak i Gcsf powoduje z kolei zaburzenie sygnalizacji Cxcl12-Cxcr4, odpowiedzialnej za retencję neutrofile w nerce głowowej, co z kolei prowadzi do uwolnienia zarówno dojrzałych (zjawisko zależne od Gr/Mr i Cxcr1) jak i niedojrzałych (zjawisko zależne od Gr/Mr i Cxcr4) neutrofile do krwi obwodowej. Równolegle, pod wpływem stresu dochodzi do wzrostu poziomu chemokin Cxcl8 we wszystkich narządach osi stresu oraz w leukocytach krwi obwodowej. W NPO, nerce głowowej oraz we krwi wzrasta także poziom Cxcl12. Potencjalnie, produkowane w NPO i przysadce chemokiny stanowią dodatkowe źródło tych chemokin we krwi. Zwiększenie poziomu Cxcl8 we krwi zwiększa migrację dojrzałych neutrofile z nerki głowowej do krążenia. Z kolei zmiana poziomu Cxcl12a reguluje retencję niedojrzałych komórek w nerce głowowej. Ponadto, chemokiny CXC regulują również proces aktywacji osi stresu. Ma to istotne znaczenie szczególnie w NPO gdzie wpływają na produkcję CRH oraz Il-1 $\beta$ .

Dodatkowo, w obecnej pracy zaobserwowano, że na redystrybucję neutrofile wpływa mikrobiota jelitowa. Zachodzi to (przynajmniej częściowo) przez sygnalizację zależną od TLR/Myd88 i wpływa na proces dojrzewania i aktywność neutrofile. Kolejnym czynnikiem, który prawdopodobnie wpływa, podczas stresu na granulocytopenę i migrację neutrofile jest, produkowana przez znajdujące się w jelicie limfocyty Th17, Il-17. Obserwowana w obecnej pracy wywołana stresem zmiana w składzie i różnorodności mikrobioty może być potencjalnym dodatkowym sygnałem aktywującym neutrofile i/lub przyspieszającym ich dojrzewanie. Z kolei dane literaturowe sugerują, że sygnały pochodzące z mikrobioty jelitowej regulują aktywność osi stresu najprawdopodobniej za pośrednictwem nerwu błędnego [279–281].



Rycina 5. Uproszczony schemat prawdopodobnego mechanizmu regulacji wywołanej stresem redystrybucji neutrofilów z tkanki hematopoetycznej do krwi. Opis w tekście.

## VII. Wnioski końcowe

Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Stres, w sposób zależny od czasu trwania, powoduje redystrybucję neutrofilów z nerki głównej do krążenia, a zjawisko to jest zależne od interakcji kortyzolu z receptorami Gr/Mr.

2. W leukocytach nerki głównej, krwi obwodowej oraz w narządach budujących oś stresu, stres zwiększa ekspresję genów kodujących chemokiny CXC, ich receptory oraz Gcsfr i Mmp9, a zablokowanie receptorów chemokinowych Cxcr1, Cxcr2 i Cxcr4 hamuje wywołaną stresem redystrybucję neutrofilów z nerki głównej do krążenia a także wpływa na poziom kortyzolu, poprzez regulację ekspresji genów zaangażowanych w syntezę i konwersję tego hormonu.

3. Stres i antybiotyki wpływają na liczbę i skład bakterii mikrobioty jelitowej karpia, a u poddanych stresowi ryb z dysbiozą jelitową rozwija się zależne od limfocytów Th17 zapalenie jelit, manifestujące się m.in. naciekiem neutrofilów.

4. Wywołana antybiotykami dysbioza mikrobiomu jelitowego wpływa na aktywację osi stresu i w konsekwencji na poziom kortyzolu oraz na wywołaną stresem redystrybucję neutrofilów do krążenia. Zmienia także ekspresję genów kodujących Gcsfr, Mmp9, chemokiny CXC i ich receptory w nerce głównej i w leukocytach krwi, a także wpływa na profil transkryptomyczny neutrofilów nerki głównej i ich aktywność fagocytarną.

5. Kortyzol zwiększa liczbę dojrzałych neutrofilów w ognisku zapalnym, a zjawisko to jest zależne od sygnalizacji Myd88.

## VIII. Bibliografia

1. Jaillon S., Ponzetta A., Di Mitri D., Santoni A., Bonecchi R., Mantovani A. Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(9):485-503. doi:10.1038/s41568-020-0281-y
2. de Oliveira S., Rosowski E.E., Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(6):378-391. doi:10.1038/nri.2016.49
3. Summers C., Rankin S.M., Condliffe A.M., Singh N., Peters A.M., Chilvers E.R. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010;31(8):318-324. doi:10.1016/j.it.2010.05.006
4. Lima S.S.S., França M.S., Godoi CCG, et al. Neutropenic patients and their infectious complications at a university hospital. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013;35(1):18-22. doi:10.5581/1516-8484.20130009
5. Malengier-Devlies B., Metzemaekers M., Wouters C., Proost P., Matthys P. Neutrophil homeostasis and emergency granulopoiesis: the example of systemic juvenile idiopathic arthritis. *Front Immunol*. 2021;12:5329. doi:10.3389/fimmu.2021.766620
6. Nerlov C., Graf T. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev*. 1998;12(15):2403-2412. doi:10.1101/GAD.12.15.2403
7. Dahl R., Walsh J.C., Lancki D., Laslo P., Iyer S.R., Singh H, Simon M.C. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBP $\alpha$  ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol*. 2003;4(10):1029-1036. doi:10.1038/ni973
8. Cowland J.B., Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev*. 2016;273(1):11-28. doi:10.1111/IMR.12440
9. Skokowa J., Cario G., Uenalan M., Schambach A., Germeshausen M., Battmer K., Zeidler C., Lehmann U., Eder M., Baum C., et al. LEF-1 is crucial for neutrophil granulocytogenesis and its expression is severely reduced in congenital neutropenia. *Nat Med*. 2006;12(10):1191-1197. doi:10.1038/nm1474
10. Akashi K., Traver D., Miyamoto T., Weissman I.L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nat*. 2000;404(6774):193-197. doi:10.1038/35004599
11. Hidalgo A., Chilvers E.R., Summers C., Koenderman L. The neutrophil life cycle. *Trends Immunol*. 2019;40(7):584-597. doi:10.1016/j.it.2019.04.013
12. Evrard M., Kwok I.W.H., Chong S.Z., Teng K.W.W., Becht E., Chen J., Sieow J.L., Penny H.L., Ching G.C., Devi S., et al. Developmental analysis of bone marrow neutrophils reveals populations specialized in expansion, trafficking, and effector functions. *Immunity*. 2018;48(2):364-379. doi:10.1016/j.immuni.2018.02.002
13. Martin C., Burdon P.C.E., Bridger G., Gutierrez-Ramos J.C., Williams T.J., Rankin S.M. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone

- marrow and their return following senescence. *Immunity*. 2003;19(4):583-593. doi:10.1016/S1074-7613(03)00263-2
14. Uhl B., Vadlau Y., Zuchtriegel G., Nekolla K., Sharaf K., Gaertner F., Massberg S., Krombach F., Reichel C.A. Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood*. 2016;128(19):2327-2337. doi:10.1182/blood-2016-05-718999
  15. Zhang D., Chen G., Manwani D., Mortha A., Xu C., Faith J.J., Burk R.D., Kunisaki Y., Jang J.E., Scheiermann C., et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nat*. 2015;525(7570):528-532. doi:10.1038/nature15367
  16. Borregaard N., Sørensen O.E., Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol*. 2007;28(8):340-345. doi:10.1016/j.it.2007.06.002
  17. Metzemaekers M., Gouwy M., Proost P. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(5):433-450. doi:10.1038/s41423-020-0412-0
  18. Casanova-Acebes M., Nicolás-Ávila J.A., Yao Li J.L., Balachander A., Rubio-Ponce A., Weiss L.A., Adrover J.M., Burrows K., A-González N., Ballesteros I. Neutrophils instruct homeostatic and pathological states in naive tissues. *J Exp Med*. 2018;215(11):2778-2795. doi:10.1084/jem.20181468
  19. Nauseef W.M., Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol*. 2014;15(7):602-611. doi:10.1038/ni.2921
  20. Puga I., Cols M., Barra C.M., He B., Cassis L., Gentile M., Comerma L., Chorny A., Shan M., Xu W. B cell–helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol*. 2011;13(2):170-180. doi:10.1038/ni.2194
  21. Casanova-Acebes M., Pitaval C., Weiss L.A., Nombela-Arrieta C., Chèvre R., A-González N., Kunisaki Y., Zhang D., van Rooijen N., Silberstein L.E., et al. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*. 2013;153(5):1025-1035. doi:10.1016/j.cell.2013.04.040
  22. Stark M.A., Huo Y., Burcin T.L., Morris M.A., Olson T.S., Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*. 2005;22(3):285-294. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.011
  23. Sheshachalam A., Srivastava N., Mitchell T., Lacy P., Eitzen G. Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Front Immunol*. 2014;5:448. doi:10.3389/fimmu.2014.00448
  24. Ericson J.A., Duffau P., Yasuda K., Ortiz-Lopez A., Rothamel K., Rifkin I.R., Monach P.A.; ImmGen Consortium. Gene expression during the generation and activation of mouse neutrophils: Implication of novel functional and regulatory pathways. *PLoS One*. 2014;9(10). doi:10.1371/journal.pone.0108553
  25. Burn G.L., Foti A., Marsman G., Patel D.F., Zychlinsky A. The Neutrophil. *Immunity*.

- 2021;54(7):1377-1391. doi:10.1016/j.immuni.2021.06.006
26. Rosowski E.E. Determining macrophage versus neutrophil contributions to innate immunity using larval zebrafish. *Dis Model Mech.* 2020;13(1):dmm041889. doi:10.1242/dmm.041889
  27. Nordenfelt P., Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2011;90(2):271-284. doi:10.1189/JLB.0810457
  28. Segal A.W. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:197-223. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653
  29. Winterbourn C.C., Kettle A.J., Hampton M.B. Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annu Rev Biochem.* 2016;85:765-792. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014442
  30. Kaufmann S.H.E. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:129-163. doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.001021
  31. Levy O. Antimicrobial proteins and peptides: Anti-infective molecules of mammalian leukocytes. *J Leukoc Biol.* 2004;76(5):909-925. doi:10.1189/jlb.0604320
  32. Burgener S.S., Schroder K. Neutrophil extracellular traps in host defense. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020;12(7):a037028. doi:10.1101/cshperspect.a037028
  33. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2017;18(2):134-147. doi:10.1038/nri.2017.105
  34. Rosales C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front Physiol.* 2018;9. doi:10.3389/fphys.2018.00113
  35. Shafqat A., Khan J.A., Alkachem A.Y., Sabur H., Alkattan K., Yaqinuddin A., Sing G.K. How neutrophils shape the immune response: Reassessing their multifaceted role in health and disease. *Int J Mol Sci.* 2023;24(24). doi:10.3390/ijms242417583
  36. Jones H.R., Robb C.T., Perretti M., Rossi A.G. The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin Immunol.* 2016;28(2):137-145. doi:10.1016/j.smim.2016.03.007
  37. Pillay J., Den Braber I., Vrisekoop N., Kwast L.M., de Boer R.J., Borghans J.A., Tesselaar K., Koenderman L. In vivo labeling with  $2\text{H}_2\text{O}$  reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2010;116(4):625-627. doi:10.1182/blood-2010-01-259028
  38. Koenderman L., Tesselaar K., Vrisekoop N. Human neutrophil kinetics: a call to revisit old evidence. *Trends Immunol.* 2022;43(11):868-876. doi:10.1016/j.it.2022.09.008
  39. Starnes T.W., Huttenlocher A. Neutrophil reverse migration becomes transparent with zebrafish. *Adv Hematol.* 2012;2012:398640. doi:10.1155/2012/398640
  40. McKenna E., Mhaonaigh A.U., Wubben R., Dwivedi A., Hurley T., Kelly L.A., Stevenson N.J., Little M.A., Molloy E.J. Neutrophils: need for standardized nomenclature. *Front Immunol.* 2021;12:602963. doi:10.3389/fimmu.2021.602963
  41. Bhagirath V.C., Dwivedi D.J., Liaw P.C. Comparison of the proinflammatory and procoagulant properties of nuclear, mitochondrial, and bacterial DNA. *Shock.* 2015;44(3):265-271. doi:10.1097/SHK.0000000000000397

42. Witko-Sarsat V., Pederzoli-Ribeil M., Hirsh E., Sozzani S., Cassatella M.A. Regulating neutrophil apoptosis: New players enter the game. *Trends Immunol.* 2011;32(3):117-124. doi:10.1016/j.it.2011.01.001
43. Silvestre-Roig C., Hidalgo A., Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: Implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood.* 2016;127(18):2173-2181. doi:10.1182/blood-2016-01-688887
44. Fridlender Z.G., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen G.S., Albelda S.M. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- $\beta$ : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell.* 2009;16(3):183-194. doi:10.1016/j.ccr.2009.06.017
45. Andzinski L., Kasnitz N., Stahnke S., Wu C.F., Gereke M., von Köckritz-Blickwede M., Schilling B., Brandau S., Weiss S., Jablonska J. Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human. *Int J Cancer.* 2016;138(8):1982-1993. doi:10.1002/ijc.29945
46. Ohms M., Möller S., Laskay T. An attempt to polarize human neutrophils toward N1 and N2 phenotypes in vitro. *Front Immunol.* 2020;11:517711. doi:10.3389/fimmu.2020.00532
47. Casbon A.J., Reynau D., Park C., Khuc E., Gan D.D., Schepers K., Passegué E., Werb Z. Invasive breast cancer reprograms early myeloid differentiation in the bone marrow to generate immunosuppressive neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(6):E566-E575. doi:10.1073/pnas.1424927112
48. Shaul M.E., Levy L., Sun J., Mishalian I., Singhal S., Kapoor V., Horng W., Fridlender G., Albelda S.M., Fridlender Z.G. Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGF $\beta$  modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs. *Oncoimmunology.* 2016;5(11):1-14. doi:10.1080/2162402X.2016.1232221
49. Wu C.F., Andzinski L., Kasnitz N., Kröger A., Klawonn F., Lienenklaus S., Weiss S., Jablonska J. The lack of type I interferon induces neutrophil-mediated pre-metastatic niche formation in the mouse lung. *Int J cancer.* 2015;137(4):837-847. doi:10.1002/IJC.29444
50. Murao A., Aziz M., Wang P. Neutrophil heterogeneity in sepsis: The role of DAMPs. *Shock.* 2022;59(2):239. doi:10.1097/SHK.0000000000002019
51. Ma Y., Yabluchanskiy A., Iyer R.P., Cannon P.L., Flynn E.R., Jung M., Henry J., Cates C.A., Deleon-Pennell K.Y., Lindsey M.L. Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2016;110(1):51-61. doi:10.1093/cvr/cvw024
52. Hacbarth E., Kajdacsy-Balla A. Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis Rheum.* 1986;29(11):1334-1342. doi:10.1002/art.1780291105
53. Ahmad A.H., Melbouci D., Decker P. Polymorphonuclear neutrophils in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: More complicated than anticipated. *Immuno.* 2022;2(1):85-103. doi:10.3390/immuno2010007

54. Galdiero M.R., Varricchi G., Loffredo S., Mantovani A., Marone G. Roles of neutrophils in cancer growth and progression. *J Leukoc Biol.* 2018;103(3):457-464. doi:10.1002/JLB.3MR0717-292R
55. Davis R.E., Sharma S., Conceição J., Carneiro P., Novais F., Scott P., Sundar S., Bacellar O., Carvalho E.M., Wilson M.E. Phenotypic and functional characteristics of HLA-DR+ neutrophils in Brazilians with cutaneous leishmaniasis. *J Leukoc Biol.* 2017;101(3):739-749. doi:10.1189/jlb.4A0915-442RR
56. Carmona-Rivera C., Kaplan M.J. Low density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol.* 2013;35(4):455. doi:10.1007/s00281-013-0375-7
57. Drifte G., Dunn-Siegrist I., Tissières P., Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med.* 2013;41(3):820-832. doi:10.1097/CCM.0b013e318274647d
58. Bowers N.L., Helton E.S., Huijbregts R.P.H., Goepfert P.A., Heath S.L., Hel Z. Immune suppression by neutrophils in HIV-1 infection: role of PD-L1/PD-1 pathway. *PLoS Pathog.* 2014;10(3). doi:10.1371/journal.ppat.1003993
59. Cloke T., Munder M., Bergin P., Herath S., Modolell M., Taylor G., Müller I., Kropf P. Phenotypic alteration of neutrophils in the blood of HIV seropositive patients. *PLoS One.* 2013;8(9):e72034. doi:10.1371/journal.pone.0072034
60. Grecian R., Whyte M.K.B, Walmsley S.R. The role of neutrophils in cancer. *Br Med Bull.* 2018;128(1):5-14. doi:10.1093/bmb/ldy029
61. Ui Mhaonaigh A., Coughlan A.M., Dwivedi A., Hartnett J., Cabral J., Moran B., Brennan K., Doyle S.L., Hughes K., Lucey R., et al. Low density granulocytes in ANCA vasculitis are heterogenous and hypo-responsive to anti-myeloperoxidase antibodies. *Front Immunol.* 2019;10:489283. doi:10.3389/fimmu.2019.02603
62. Matsushima H., Geng S., Lu R., Okamoto T., Yao Y., Mayuzumi N., Kotol P.F., Chojnacki B.J., Miyazaki T., Gallo R.L., Takashima A. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood.* 2013;121(10):1677. doi:10.1182/blood-2012-07-445189
63. von Vietinghoff S., Ley K. IL-17A Controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *J Immunol.* 2009;183(2):865-873. doi:10.4049/jimmunol.0804080
64. Bratton D.L., Henson P.M. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol.* 2011;32(8):350-357. doi:10.1016/j.it.2011.04.009
65. Phillipson M., Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med.* 2011;17(11):1381-1390. doi:10.1038/nm.2514
66. Furze R.C., Rankin S.M. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology.* 2008;125(3):281-288. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02950.x

67. Morrison S.J., Scadden D.T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nat.* 2014;505(7483):327-334. doi:10.1038/nature12984
68. Eash K.J., Greenbaum A.M., Gopalan P.K., Link D.C. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2423-2431. doi:10.1172/JCI41649
69. Whyte M.K.B., Meagher L.C., Macdermot J., Haslett C. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J Immunol.* 1993;150(11):5124-5134. doi:10.4049/jimmunol.150.11.5124
70. Adrover J.M., Nicolás-Ávila J.A., Hidalgo A. Aging: A temporal dimension for neutrophils. *Trends Immunol.* 2016;37(5):334-345. doi:10.1016/j.it.2016.03.005
71. Tanji-Matsuba K., Van Eeden S.F., Saito Y., Okazawa M., Klut M.E., Hayashi S., Hogg J.C. Functional changes in aging polymorphonuclear leukocytes. *Circulation.* 1998;97(1):91-98. doi:10.1161/01.cir.97.1.91
72. Havixbeck J.J., Rieger A.M., Wong M.E., Hodgkinson J.W., Barreda D.R. Neutrophil contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in teleost fish. *J Leukoc Biol.* 2016;99(2):241-252. doi:10.1189/jlb.3HI0215-064R
73. Carradice D., Lieschke G.J. Zebrafish in hematology: sushi or science? *Blood.* 2008;111(7):3331. doi:10.1182/blood-2007-10-052761
74. Chen A.T., Zon L.I. Zebrafish blood stem cells. *J Cell Biochem.* 2009;108(1):35-42. doi:10.1002/JCB.22251
75. Berman J.N., Kanki J.P., Look A.T. Zebrafish as a model for myelopoiesis during embryogenesis. *Exp Hematol.* 2005;33(9):997-1006. doi:10.1016/j.exphem.2005.06.010
76. Davidson A.J., Zon L.I. The 'definitive' (and 'primitive') guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene 2004 2343.* 2004;23(43):7233-7246. doi:10.1038/sj.onc.1207943
77. Le Guyader D., Redd M.J., Colucci-Guyon E., Murayama E., Kissa K., Briolat V., Mordelet E., Zapata A., Shinomiya H., Herbomel P. Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. *Blood.* 2008;111(1):132-141. doi:10.1182/blood-2007-06-095398
78. Verburg-van Kemenade B.M.L., Cohen N., Chadzinska M. Neuroendocrine-immune interaction: Evolutionarily conserved mechanisms that maintain allostasis in an ever-changing environment. *Dev Comp Immunol.* 2017;66:2-23. doi:10.1016/j.dci.2016.05.015
79. Jin H., Sood R., Xu J., Zhen F., English M.A., Liu P.P., Wen Z. Definitive hematopoietic stem/progenitor cells manifest distinct differentiation output in the zebrafish VDA and PBI. *Development.* 2009;136(4):647-654. doi:10.1242/dev.029637
80. Bennett C.M., Kanki J.P., Rhodes J., Liu T.X., Paw B.H., Kieran M.W., Langenau D.M., Delahaye-Brown A., Zon L.I., Fleming M.D., Look A.T. Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio.* *Blood.* 2001;98(3):643-651. doi:10.1182/blood.v98.3.643
81. Ronneseth A., Wergeland H.I., Pettersen E.F. Neutrophils and B-cells in Atlantic cod (*Gadus*

- morhua* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2007;23(3):493-503. doi:10.1016/j.fsi.2006.08.017
82. Lieschke G.J., Oates A.C., Crowhurst M.O., Ward A.C., Layton J.E. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood.* 2001;98(10):3087-3096. doi:10.1182/blood.v98.10.3087
  83. Wu M., Xu Y., Li J., Lian J., Chen Q., Meng P., Lu T., Xie H., Zhang W., Xu J., Zhang Y. Genetic and epigenetic orchestration of Gfi1aa-Lsd1-cebpa in zebrafish neutrophil development. *Dev.* 2024;148(17). doi:10.1242/dev.199516
  84. Kirchberger S., Shoeb M.R., Lazic D., Wenninger-Weinzierl A., Fischer K., Shaw L.E., Nogueira F., Rifatbegovic F., Bozsaky E., Ladenstein R. et al. Comparative transcriptomics coupled to developmental grading via transgenic zebrafish reporter strains identifies conserved features in neutrophil maturation. *Nat Commun.* 2024;15(1). doi:10.1038/s41467-024-45802-1
  85. Havixbeck J.J., Barreda D.R. Neutrophil development, migration, and function in Teleost fish. *Biology (Basel).* 2015;4(4):715. doi:10.3390/biology4040715
  86. Speirs Z.C., Loynes C.A., Mathiessen H., Elks P.M., Renshaw S.A., Jørgensen L.V.G. What can we learn about fish neutrophil and macrophage response to immune challenge from studies in zebrafish. *Fish Shellfish Immunol.* 2024;148. doi:10.1016/j.fsi.2024.109490
  87. Henry K.M., Loynes C.A., Whyte M.K.B., Renshaw S.A. Zebrafish as a model for the study of neutrophil biology. *J Leukoc Biol.* 2013;94(4):633-642. doi:10.1189/jlb.1112594
  88. Niethammer P., Grabher C., Look A.T., Mitchison T.J. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nat.* 2009;459(7249):996-999. doi:10.1038/nature08119
  89. Isles H.M., Loynes C.A., Alasmari S., Kon F.C., Henry K.M., Kadochnikova A., Hales J., Muir C.F., Keightley M.C., Kadirkamanathan V., et al. Pioneer neutrophils release chromatin within in vivo swarms. *Elife.* 2021;10:1-29. doi:10.7554/eLife.68755
  90. Poplimont H., Georgantzoglou A., Boulch M., Walker H.A., Coombs C., Papaleonidopoulou F., Sarris M. Neutrophil swarming in damaged tissue is orchestrated by connexins and cooperative calcium alarm signals. *Curr Biol.* 2020;30(14):2761-2776.e7. doi:10.1016/j.cub.2020.05.030
  91. Lämmermann T., Afonso P.V., Angermann B.R., Wang J.M., Kastenmüller W., Parent C.A., Germain R.N. Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *Nat.* 2013;498(7454):371-375. doi:10.1038/nature12175
  92. Sommer F., Torraca V., Meijer A.H. Chemokine receptors and phagocyte biology in zebrafish. *Front Immunol.* 2020;11:516639. doi:10.3389/fimmu.2020.00325
  93. Mathias J.R., Perrin B.J., Liu T.X., Kanki J., Look A.T., Huttenlocher A. Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *J Leukoc Biol.* 2006;80(6):1281-1288. doi:10.1189/jlb.0506346
  94. Elks P.M., Van Eeden F.J., Dixon G., Wang X., Reyes-Aldasoro C.C., Ingham P.W., Whyte

- M.K., Walmsley S.R., Renshaw S.A. Activation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (Hif-1 $\alpha$ ) delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model. *Blood*. 2011;118(3):712-722. doi:10.1182/blood-2010-12-324186
95. Woodfin A., Voisin M.B., Beyrau M., Colom B., Caille D., Diapouli F.M., Nash G.B., Chavakis T., Albelda S.M., Rainger G.E., et al. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat Immunol*. 2011;12(8):761-769. doi:10.1038/ni.2062
  96. Nourshargh S., Renshaw S.A., Imhof B.A. Reverse migration of neutrophils: Where, when, how, and why? *Trends Immunol*. 2016;37(5):273-286. doi:10.1016/J.IT.2016.03.006
  97. Buckley C.D., Ross E.A., McGettrick H.M., Osborne C.E., Haworth O., Schmutz C., Stone P.C., Salmon M., Matharu N.M., Vohra R.K., et al. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J Leukoc Biol*. 2006;79(2):303-311. doi:10.1189/jlb.0905496
  98. Dixon G., Elks P.M., Loynes C.A., Whyte M.K.B., Renshaw S.A. A method for the in vivo measurement of zebrafish tissue neutrophil lifespan. *ISRN Hematol*. 2012;2012:1-6. doi:10.5402/2012/915868
  99. Forlenza M., Scharsack J.P., Kachamakova N.M., Taverne-Thiele A.J., Rombout J.H.W.M., Wiegertjes G.F. Differential contribution of neutrophilic granulocytes and macrophages to nitrosative stress in a host-parasite animal model. *Mol Immunol*. 2008;45(11):3178-3189. doi:10.1016/j.molimm.2008.02.025
  100. Palić D., Andreasen C.B., Menzel B.W., Roth J.A. A rapid, direct assay to measure degranulation of primary granules in neutrophils from kidney of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Fish Shellfish Immunol*. 2005;19(3):217-227. doi:10.1016/J.FSI.2004.12.003
  101. Mayumi M., Takeda Y., Hoshiko M., Serada K., Murata M., Moritomo T., Takizawa F., Kobayashi I., Araki K., Nakanishi T., Sumimoto H. Characterization of teleost phagocyte NADPH oxidase: molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) phagocyte NADPH oxidase. *Mol Immunol*. 2008;45(6):1720-1731. doi:10.1016/j.molimm.2007.09.028
  102. Kawahara B.T., Quinn M.T., Lambeth J.D. Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evol Biol*. 2007;7(1):1-21. doi:10.1186/1471-2148-7-109
  103. Tafalla C., Figueras A., Novoa B. Role of nitric oxide on the replication of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999;72(3-4):249-256. doi:10.1016/s0165-2427(99)00109-9
  104. Campos-Perez J.J., Ellis A.E., Secombes C.J. Toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to bacterial pathogens of fish. *Dis Aquat Organ*. 2000;43(2):109-115. doi:10.3354/dao043109

105. Palić D., Ostojić J., Andreasen C.B., Roth J.A. Fish cast NETs: Neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Dev Comp Immunol.* 2007;31(8):805-816.  
doi:10.1016/j.dci.2006.11.010
106. Pijanowski L., Scheer M., Verburg-van Kemenade B.M.L., Chadzinska M. Production of inflammatory mediators and extracellular traps by carp macrophages and neutrophils in response to lipopolysaccharide and/or interferon- $\gamma$ 2. *Fish Shellfish Immunol.* 2015;42(2):473-482.  
doi:10.1016/J.FSI.2014.11.019
107. Pijanowski L., Golbach L., Kolaczkowska E., Scheer M., Verburg-van Kemenade B.M.L., Chadzinska M. Carp neutrophilic granulocytes form extracellular traps via ROS-dependent and independent pathways. *Fish Shellfish Immunol.* 2013;34(5):1244-1252.  
doi:10.1016/j.fsi.2013.02.010
108. Haugland G.T., Rønneseth A., Gundersen L., Lunde H.S., Nordland K., Wergeland H.I. Neutrophils in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) are MHC class II+ and secret IL-12p40 upon bacterial exposure. *Aquac Fish.* 2024;9(2):144-153. doi:10.1016/j.aaf.2022.07.002
109. Hou Y., Khatri P., Rindy J., Schultz Z., Gao A., Chen Z., Gibson A.L., Huttenlocher A., Dinh H.Q. Single-cell transcriptional landscape of temporal neutrophil response to burn wound in larval zebrafish. *J Immunol.* 2024;213(4):469-480. doi:10.4049/jimmunol.2400149
110. Bobrovskikh A.V., Zubairova U.S., Naumenko L.G., Doroshkov A.V. Catching the big fish in big data: A meta-analysis of zebrafish kidney scRNA-Seq datasets highlights conserved molecular profiles of macrophages and neutrophils in vertebrates. *Biology (Basel).* 2024;13(10):773. doi:10.3390/biology13100773
111. García-López J.P., Grimaldi A., Chen Z., Meneses C., Bravo-Tello K., Bresciani E., Banderas A., Burgess S.M., Hernández P.P., Feijoo C.G. Ontogenetically distinct neutrophils differ in function and transcriptional profile in zebrafish. *Nat Commun.* 2023;14(1):1-15.  
doi:10.1038/s41467-023-40662-7
112. Hammond F.R., Lewis A., Speirs Z.C., Anderson H.E., Sipka T., Williams L.G., Nguyen-Chi M., Meijer A.H., Wiegertjes G.F., Elks P.M. An arginase 2 promoter transgenic line illuminates immune cell polarisation in zebrafish. *DMM Dis Model Mech.* 2023;16(6).  
doi:10.1242/DMM.049966
113. Deniset J.F., Kubes P. Neutrophil heterogeneity: Bona fide subsets or polarization states? *J Leukoc Biol.* 2018;103(5):829-838. doi:10.1002/JLB.3RI0917-361R
114. Nomiya H., Osada N., Yoshie O. The evolution of mammalian chemokine genes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(4):253-262. doi:10.1016/j.cytogfr.2010.03.004
115. Rossi D., Zlotnik A.. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:217-243. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.217
116. Sánchez-Madrid F., Del Pozo M.A. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* 1999;18(3):501-511. doi:10.1093/emboj/18.3.501

117. Mantovani A., Bonecchi R., Locati M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(12):907-918. doi:10.1038/nri1964
118. Blanchet X., Langer M., Weber C., Koenen R., von Hundelshausen P. Touch of chemokines. *Front Immunol.* 2012;3(JUL):175. doi:10.3389/fimmu.2017.01970
119. Fernandez E.J., Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42:469-499. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.42.091901.115838
120. Ridiandries A., Tan J.T.M., Bursill C.A. The role of chemokines in wound healing. *Int JMol Sci* 2018, Vol 19, Page 3217. 2018;19(10):3217. doi:10.3390/ijms19103217
121. Bonora M., Wieckowski M.R., Chinopoulos C., Kepp O., Kroemer G., Galluzzi L., Pinton P. Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene* 2015 3412. 2015;34(12):1608-1608. doi:10.1038/ncr.2014.462
122. Nomiya H., Hieshima K., Osada N., Kato-Unoki Y., Otsuka-Ono K., Takegawa S., Izawa T., Yoshizawa A., Kikuchi Y., Tanase S. Extensive expansion and diversification of the chemokine gene family in zebrafish: Identification of a novel chemokine subfamily CX. *BMC Genomics.* 2008;9(1):222. doi:10.1186/1471-2164-9-222
123. Capucetti A., Albano F., Bonecchi R. Multiple roles for chemokines in neutrophil biology. *Front Immunol.* 2020;11:1259. doi:10.3389/fimmu.2020.01259
124. Strieter R.M., Polverini P.J., Kunkel S.L., Arenberg D.A., Burdick M.D., Kasper J., Dzuiba J., Van Damme J., Walz A., Marriott D., et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem.* 1995;270(45):27348-27357. doi:10.1074/jbc.270.45.27348
125. Zlotnik A. Chemokines and cancer. *Int J Cancer.* 2006;119(9):2026-2029. doi:10.1002/ijc.22024
126. Bird S., Tafalla C. Teleost chemokines and their receptors. *Biology (Basel).* 2015;4(4):756-784. doi:10.3390/biology4040756
127. Mackay C.R. Chemokines: what chemokine is that? *Curr Biol.* 1997;7(6). doi:10.1016/S0960-9822(06)00181-3
128. Laing K. Chemokines. *Dev Comp Immunol.* 2004;28(5):443-460. doi:10.1016/j.dci.2003.09.006
129. Van den Steen P.E., Proost P., Wuyts A., Van Damme J., Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- $\alpha$  and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood.* 2000;96(8):2673-2681. doi:10.1182/blood.v96.8.2673
130. White M.V., Yoshimura T., Hook W., Kaliner M.A., Leonard E.J. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1) causes human basophil histamine release. *Immunol Lett.* 1989;22(2):151-154. doi:10.1016/0165-2478(89)90182-X

131. Warringa R.A., Schweizer R.C., Maikoe T., Kuijper P.H., Bruijnzeel P.L., Koendermann L. Modulation of eosinophil chemotaxis by interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992;7(6):631-636. doi:10.1165/ajrcmb/7.6.631
132. Larsen C.G., Anderson A.O., Appella E., Oppenheim J.J., Matsushima K. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science.* 1989;243(4897):1464-1466. doi:10.1126/science.2648569
133. Lee J., Cacalano G., Camerato T., Toy K., Moore M.W., Wood W.I. Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor. *J Immunol.* 1995;155(4):2158-2164. doi:10.4049/jimmunol.155.4.2158
134. Wehner R., Dietze K., Bachmann M., Schmitz M. The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and natural killer cells. *J Innate Immun.* 2011;3(3):258-263. doi:10.1159/000323923
135. Gasperini S., Marchi M., Calzetti F., Laudanna C., Vicentini L., Olsen H., Murphy M., Liao F., Farber J., et al. Gene expression and production of the monokine induced by IFN- $\gamma$  (MIG), IFN-Inducible T Cell  $\alpha$  Chemoattractant (I-TAC), and IFN- $\gamma$ -Inducible Protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J Immunol.* 1999;162(8):4928-4937. doi:10.4049/jimmunol.162.8.4928
136. Loetscher M., Gerber B., Loetscher P., Jones S.A., Piali L., Clark-Lewis I., Baggiolini M., Moser B. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med.* 1996;184(3):963-969. doi:10.1084/jem.184.3.963
137. Groom J.R., Luster A.D. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res.* 2011;317(5):620-631. doi:10.1016/j.yexcr.2010.12.017
138. Fiorentino D.F., Zlotnik A., Vieira P., Mosmann T.R., Howard M., Moore K.W., O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol.* 1991;146(10):3444-3451. doi:10.4049/jimmunol.146.10.3444
139. Macatonia S., Doherty T.M., Knight S.C., O'Garra A. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol.* 1993;150(9):3755-3765. doi:10.4049/jimmunol.150.9.3755
140. Keane M.P., Arenberg D.A., Moore B.B., Addison C.L., Strieter R.M. CXC chemokines and angiogenesis/angiostasis. *Proc Assoc Am Physicians.* 1998;110(4):288-296.
141. Cole K.E., Strick C.A., Paradis T.J., Osborne K.T., Loetscher M., Gladue R.P., Lin W., Boyd J.G., Moser B., Wood D.E., et al. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med.* 1998;187(12):2009-2021. doi:10.1084/jem.187.12.2009
142. De Filippo K., Rankin S.M. CXCR4, the master regulator of neutrophil trafficking in homeostasis and disease. *Eur J Clin Invest.* 2018;48(S2):e12949. doi:10.1111/eci.12949

143. Strydom N., Rankin S.M. Regulation of circulating neutrophil numbers under homeostasis and in disease. *J Innate Immun.* 2013;5(4):304-314. doi:10.1159/000350282
144. Suratt B.T., Petty J.M., Young S.K., Malcolm K.C., Lieber J.G., Nick J.A., Gonzalo J.A., Henson P.M., Worthen G.S.. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood.* 2004;104(2):565-571. doi:10.1182/blood-2003-10-3638
145. DeVries M.E., Kelvin A.A., Xu L., Ran L., Robinson J., Kelvin D.J. Defining the origins and evolution of the chemokine/chemokine receptor system. *J Immunol.* 2006;176(1):401-415. doi:10.4049/jimmunol.176.1.401
146. van der Aa L.M., Chadzinska M., Golbach L.A., Ribeiro C.M.S., Verburg-van Kemenade B.M.L. Pro-inflammatory functions of carp CXCL8-like and CXCL8 chemokines. *Dev Comp Immunol.* 2012;36(4):741-750. doi:10.1016/j.dci.2011.11.011
147. van der Aa L.M., Chadzinska M., Tijhaar E., Boudinot P., Verburg-van Kemenade B.M.L. CXCL8 chemokines in teleost fish: Two lineages with distinct expression profiles during early phases of inflammation. Kelly KA, ed. *PLoS One.* 2010;5(8):e12384. doi:10.1371/journal.pone.0012384
148. Huising M.O., Stolte E., Flik G., Savelkoul H.F.J., Verburg-van Kemenade B.M.L. CXC chemokines and leukocyte chemotaxis in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev Comp Immunol.* 2003;27(10):875-888. doi:10.1016/S0145-305X(03)00082-X
149. Zuñiga-Traslaviña C., Bravo K., Reyes A.E., Feijóo C.G. Cxcl8b and Cxcr2 regulate neutrophil migration through bloodstream in zebrafish. *J Immunol Res.* 2017;2017. doi:10.1155/2017/6530531
150. de Oliveira S., Reyes-Aldasoro C.C., Candel S., Renshaw S.A., Mulero V., Calado Â. Cxcl8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. *J Immunol.* 2013;190(8):4349-4359. doi:10.4049/jimmunol.1203266
151. de Oliveira S., Lopez-Muñoz A., Martínez-Navarro F.J., Galindo-Villegas J., Mulero V., Calado Â. Cxcl8-11 and Cxcl8-12 are required in the zebrafish defense against *Salmonella Typhimurium*. *Dev Comp Immunol.* 2015;49(1):44-48. doi:10.1016/j.dci.2014.11.004
152. Sarris M., Masson J.B., Maurin D., Van der Aa L.M., Boudinot P., Lortat-Jacob H., Herbomel P. Inflammatory chemokines direct and restrict leukocyte migration within live tissues as glycan-bound gradients. *Curr Biol.* 2012;22(24):2375-2382. doi:10.1016/j.cub.2012.11.018
153. Deng Q., Sarris M., Bennin D.A., Green J.M., Herbomel P., Huttenlocher A. Localized bacterial infection induces systemic activation of neutrophils through Cxcr2 signaling in zebrafish. *J Leukoc Biol.* 2013;93(5):761-769. doi:10.1189/jlb.1012534
154. Powell D., Lou M., Barros Becker F., Huttenlocher A. Cxcr1 mediates recruitment of neutrophils and supports proliferation of tumor-initiating astrocytes in vivo. *Sci Reports* 2018 81. 2018;8(1):1-12. doi:10.1038/s41598-018-31675-0
155. Powell D., Tauzin S., Hind L.E., Deng Q., Beebe D.J., Huttenlocher A. Chemokine signaling

- and the regulation of bidirectional leukocyte migration in interstitial tissues. *Cell Rep.* 2017;19(8):1572-1585. doi:10.1016/j.celrep.2017.04.078
156. Coombs C., Georgantzoglou A., Walker H.A., Patt J., Merten N., Poplimont H., Busch-Nentwich E.M., Williams S., Kotsi C., Kostenis E., et al. Chemokine receptor trafficking coordinates neutrophil clustering and dispersal at wounds in zebrafish. *Nat Commun.* 2019;10(1):1-17. doi:10.1038/s41467-019-13107-3
  157. van der Aa L.M., Chadzinska M., Derks W., Scheer M., Levraud J.P., Boudinot P., Verburg-van Kemenade B.M.L. Diversification of IFN $\gamma$ -inducible CXCb chemokines in cyprinid fish. *Dev Comp Immunol.* 2012;38(2):243-253. doi:10.1016/j.dci.2012.05.005
  158. Torraca V., Cui C., Boland R., Bebelman J.P., van der Sar A.M., Smit M.J., Siderius M., Spaink H.P., Meijer A.H. . The CXCR3-CXCL11 signaling axis mediates macrophage recruitment and dissemination of mycobacterial infection. *DMM Dis Model Mech.* 2015;8(3):253-269. doi:10.1242/dmm.017756
  159. Chadzinska M., Golbach L., Pijanowski L., Scheer M., Verburg-van Kemenade B.M.L. Characterization and expression analysis of an interferon- $\gamma$ 2 induced chemokine receptor CXCR3 in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev Comp Immunol.* 2014;47(1):68-76. doi:10.1016/j.dci.2014.07.008
  160. Huising M.O., Van Der Meulen T., Flik G., Verburg-Van Kemenade B.M.L. Three novel carp CXC chemokines are expressed early in ontogeny and at nonimmune sites. *Eur J Biochem.* 2004;271(20):4094-4106. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04347.x
  161. Harrison M.R.M., Bussmann J., Huang Y., Zhao L., Osorio A., Burns C.G., Burns C.E., Sucov H.M., Siekmann A.F., Lien C.L. Chemokine-guided angiogenesis directs coronary vasculature formation in zebrafish. *Dev Cell.* 2015;33(4):442-454. doi:10.1016/j.devcel.2015.04.001
  162. Haas P., Gilmour D. Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. *Dev Cell.* 2006;10(5):673-680. doi:10.1016/j.devcel.2006.02.019
  163. Raz E., Mahabaleswar H. Chemokine signaling in embryonic cell migration: a fisheye view. *Development.* 2009;136(8):1223-1229. doi:10.1242/dev.022418
  164. Boldajipour B., Doitsidou M., Tarbashevich K., Laguri C., Yu S.R., Ries J., Dumstrei K., Thelen S., Dörries J., Messerschmidt E.M., et al. Cxcl12 evolution – subfunctionalization of a ligand through altered interaction with the chemokine receptor. *Development.* 2011;138(14):2909-2914. doi:10.1242/dev.068379
  165. Walters K.B., Green J.M., Surfus J.C., Yoo S.K., Huttenlocher A. Live imaging of neutrophil motility in a zebrafish model of WHIM syndrome. *Blood.* 2010;116(15):2803-2811. doi:10.1182/blood-2010-03-276972
  166. Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol.* 2004;14(3):171-179. doi:10.1016/j.semcancer.2003.10.003
  167. Dambly-Chaudière C., Cubedo N., Ghysen A. Control of cell migration in the development of

- the posterior lateral line: Antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. *BMC Dev Biol.* 2007;7(1):1-14. doi:10.1186/1471-213X-7-23
168. Harvie E.A., Huttenlocher A. Neutrophils in host defense: new insights from zebrafish. *J Leukoc Biol.* 2015;98(4):523-537. doi:10.1189/jlb.4mr1114-524r
  169. Sommer F., Torraca V., Kamel S.M., Lombardi A., Meijer A.H. Frontline science: Antagonism between regular and atypical Cxcr3 receptors regulates macrophage migration during infection and injury in zebrafish. *J Leukoc Biol.* 2019;107(2):185. doi:10.1002/JLB.2HI0119-006R
  170. Isles H.M., Herman K.D., Robertson A.L., Loynes C.A., Prince L.R., Elks P.M., Renshaw S.A. The CXCL12/CXCR4 signaling axis retains neutrophils at inflammatory sites in zebrafish. *Front Immunol.* 2019;10:1784. doi:10.3389/fimmu.2019.01784
  171. Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 1995;203(3):253-310. doi:10.1002/aja.1002030302
  172. Pinheiro-da-Silva J., Luchiari A.C. Embryonic ethanol exposure on zebrafish early development. *Brain Behav.* 2021;11(6):e02062. doi:10.1002/brb3.2062
  173. Guo N., Lin J., Peng X., Chen H., Zhang Y., Liu X., Li Q. Influences of acute ethanol exposure on locomotor activities of zebrafish larvae under different illumination. *Alcohol.* 2015;49(7):727-737. doi:10.1016/j.alcohol.2015.08.003
  174. Xie Y., Meijer A.H., Schaaf M.J.M. Modeling inflammation in zebrafish for the development of anti-inflammatory drugs. *Front Cell Dev Biol.* 2021;8. doi:10.3389/fcell.2020.620984
  175. Dhabhar F.S., Malarkey W.B., Neri E., McEwen B.S. Stress-induced redistribution of immune cells—From barracks to boulevards to battlefields: A tale of three hormones – Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology.* 2012;37(9):1345-1368. doi:10.1016/j.psyneuen.2012.05.008
  176. Wojtaszek J., Dziejulska-Szwajkowska D., Lozińska-Gabska M., Adamowicz A., Dugaj A. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): Cortisol effect on the carp blood. *Gen Comp Endocrinol.* 2002;125(2):176-183. doi:10.1006/gcen.2001.7725
  177. Poller W.C., Downey J., Mooslechner A.A., Khan N., Li L., Chan C.T., McAlpine C.S., Xu C., Kahles F., He S., et al. Brain motor and fear circuits regulate leukocytes during acute stress. *Nature.* 2022;607(7919):578-584. doi:10.1038/s41586-022-04890-z
  178. Reiske L., Schmucker S., Pfaffinger B., Weiler U., Steuber J., Stefanski V. Intravenous infusion of cortisol, adrenaline, or noradrenaline alters porcine immune cell numbers and promotes innate over adaptive immune functionality. *J Immunol.* 2020;204(12):3205-3216. doi:10.4049/jimmunol.2000269
  179. Wrona D. Neural-immune interactions: An integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol.* 2006;172(1-2):38-58. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.10.017
  180. Mori Y., Kaname H., Sumida Y., Tanaka S., Kubo C., Tashiro N., Nomoto K. Changes in the

- leukocyte distribution and surface expression of adhesion molecules accompanied with hypothalamically induced restlessness in the cat. *Neuroimmunomodulation*. 2000;7(3):135-146. doi:10.1159/000026431
181. Kaname H., Mori Y., Sumida Y., Kojima K., Kubo C., Tashiro N. Changes in the leukocyte distribution and surface expression of adhesion molecules induced by hypothalamic stimulation in the cat. *Brain Behav Immun*. 2002;16(4):351-367. doi:10.1006/brbi.2001.0635
  182. Dhabhar F.S., Miller A.H., McEwen B.S., Spencer R.L. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *J Immunol*. 1996;157(4):1638-1644. doi:10.4049/jimmunol.157.4.1638
  183. Medina A., Seasholtz A.F., Sharma V., Burke S., Bunney W.Jr., Myers R.M., Schatzberg A., Akil H., Watson S.J. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor expression in the human hippocampus in major depressive disorder. *J Psychiatr Res*. 2012;47(3):307. doi:10.1016/j.jpsychires.2012.11.002
  184. Bury N.R., Sturm A. Evolution of the corticosteroid receptor signalling pathway in fish. *Gen Comp Endocrinol*. 2007;153(1-3):47-56. doi:10.1016/j.ygcen.2007.03.009
  185. Stolte E.H., de Mazon A.F., Leon-Koosterziel K.M., Jesiak M., Bury N.R., Sturm A., Savelkoul H.F., Verburg-Van Kemenade B.M.L., Flik G. Corticosteroid receptors involved in stress regulation in common carp, *Cyprinus carpio*. *J Endocrinol*. 2008;198(2):403-417. doi:10.1677/JOE-08-0100
  186. Urbinati E.C., Zanuzzo F.S., Biller J.D. Stress and immune system in fish. In: *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Elsevier; 2020:93-114. doi:10.1016/B978-0-12-815872-2.00005-1
  187. Barden A., Phillips M., Hill L.M., Fletcher E.M., Mas E., Loh P.S., French M.A., Ho K.M., Mori T.A., Corcoran T.B. Antiemetic doses of dexamethasone and their effects on immune cell populations and plasma mediators of inflammation resolution in healthy volunteers. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2018;139:31-39. doi:10.1016/j.plefa.2018.11.004
  188. Ronchetti S., Ricci E., Migliorati G., Gentili M., Riccardi C. How glucocorticoids affect the neutrophil life. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):4090. doi:10.3390/ijms19124090
  189. Ai F., Zhao G., Lv W., Liu B., Lin J. Dexamethasone induces aberrant macrophage immune function and apoptosis. *Oncol Rep*. Published online December 13, 2019. doi:10.3892/or.2019.7434
  190. Weyts F.A., Flik G., Verburg-van Kemenade B.M.L. Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes. *Dev Comp Immunol*. 1998;22(5-6):563-572. doi:10.1016/S0145-305X(98)00027-5
  191. Jin F., Zhai Q., Qiu L., Meng H., Zou D., Wang Y., Li Q., Yu Z., Han J., Li Q., Zhou B. Degradation of BM SDF-1 by MMP-9: The role in G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(9):581-588.

doi:10.1038/bmt.2008.222

192. Georgiou K.R., Scherer M.A., King T.J., Foster B.K., Xian C.J. Deregulation of the CXCL12/CXCR4 axis in methotrexate chemotherapy-induced damage and recovery of the bone marrow microenvironment. *Int J Exp Pathol.* 2012;93(2):104-114. doi:10.1111/j.1365-2613.2011.00800.x
193. Petit I., Szyper-Kravitz M., Nagler A., Lahav M., Peled A., Habler L., Ponomaryov T., Taichman RS., Arenzana-Seisdedos F., et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol.* 2002;3(7):687-694. doi:10.1038/ni813
194. Hattori K., Heissig B., Tashiro K., Honjo T., Tateno M., Shieh J.H., Hackett N.R., Quitariano M.S., Crystal R.G., Rafii S., Moore M.A. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood.* 2001;97(11):3354-3360. doi:10.1182/blood.v97.11.3354,
195. Liu Q., Li Z., Gao J.L., Wan W., Ganesan S., McDermott D.H., Murphy P.M. CXCR4 antagonist AMD3100 redistributes leukocytes from primary immune organs to secondary immune organs, lung and blood in mice. *Eur J Immunol.* 2015;45(6):1855-1867. doi:10.1002/eji.201445245
196. Grzelak A.K., Davis D.J., Caraker S.M., Crim M.J., Spitsbergen J.M., Wiedmeyer C.E. Stress leukogram induced by acute and chronic stress in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Med.* 2017;67(3):263-269.
197. Rosenberger P.H., Ickovics J.R., Epel E., Nadler E., Jokl P., Fulkerson J.P., Tillie J.M., Dhabhar F.S. Surgical stress-induced immune cell redistribution profiles predict short-term and long-term postsurgical recovery: A prospective study. *J Bone Jt Surgery Am Vol.* 2009;91(12):2783. doi:10.2106/JBJS.H.00989
198. Dhabhar F.S. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: Implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation.* 2009;16(5):300-317. doi:10.1159/000216188
199. Pankhurst N.W. Reproduction and Development. In: *Fish Physiology.* Elsevier Inc. 2016; 35:295-331. doi:10.1016/B978-0-12-802728-8.00008-4
200. Silverman M.N., Pearce B.D., Miller A.H. Cytokines and HPA axis regulation. 2003:85-122. doi:10.1007/978-1-4615-0323-1\_5
201. Pijanowski L., Verburg-van Kemenade B.M.L., Chadzinska M. A role for CXC chemokines and their receptors in stress axis regulation of common carp. *Gen Comp Endocrinol.* 2019;280:194-199. doi:10.1016/j.ygcen.2019.05.004
202. Silverman M.N., Pearce B.D., Biron C.A., Miller A.H. Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunol.* 2005;18(1):41-78. doi:10.1089/vim.2005.18.41
203. Turnbull A.V., Rivier C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines:

- Actions and mechanisms of action. *Physiol Rev.* 1999;79(1):1-71.  
doi:10.1152/physrev.1999.79.1.1
204. Rostène W., Guyon A., Kular L., Godefroy D., Barbieri F., Bajetto A., Banisadr G., Callewaere C., Conductier G., Rovère C., et al. Chemokines and chemokine receptors: New actors in neuroendocrine regulations. *Front Neuroendocrinol.* 2011;32(1):10-24.  
doi:10.1016/j.yfrne.2010.07.001
  205. Ślusarczyk J., Trojan E., Chwastek J., Glombik K., Basta-Kaim A. A potential contribution of chemokine network dysfunction to the depressive disorders. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14(7):705. doi:10.2174/1570159x14666160219131357
  206. Verburg-van Kemenade B.M.L., Van der Aa L.M., Chadzinska M. Neuroendocrine-immune interaction: Regulation of inflammation via G-protein coupled receptors. *Gen Comp Endocrinol.* 2013;188(1):94-101. doi:10.1016/j.ygcn.2012.11.010
  207. Ueda Y., Cain D.W., Kuraoka M., Kondo M., Kelsoe G. IL-1R type I-dependent hemopoietic stem cell proliferation is necessary for inflammatory granulopoiesis and reactive neutrophilia. *J Immunol.* 2009;182(10):6477-6484. doi:10.4049/jimmunol.0803961
  208. Pietras E.M., Mirantes-Barbeito C., Fong S., Loeffler D., Kovtonyuk L.V., Zhang S., Lakshminarasimhan R., Chin C.P., Techner J.M., Will B., et al. Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. *Nat Cell Biol.* 2016;18(6):607-618. doi:10.1038/ncb3346
  209. Dinarello C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996;87(6):2095-2147.  
doi:10.1182/blood.V87.6.2095.bloodjournal8762095
  210. Opendakker G., Fibbe W.E., Van Damme J. The molecular basis of leukocytosis. *Immunol Today.* 1998;19(4):182-189. doi:10.1016/s0167-5699(97)01243-7
  211. Mitroulis I., Kambas K., Chrysanthopoulou A., Skendros P., Apostolidou E., Kourtzelis I., Drosos G.I., Boumpas D.T., Ritis K. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 $\beta$  and autophagy-related signaling in gout. *PLoS One.* 2011;6(12):e29318.  
doi:10.1371/journal.pone.0029318
  212. Prince L.R., Allen L., Jones E.C., Hellewell P.G., Dower S.K., Whyte M.K., Sabroe I. The role of interleukin-1 $\beta$  in direct and toll-like receptor 4-mediated neutrophil activation and survival. *Am J Pathol.* 2004;165(5):1819-1826. doi:10.1016/S0002-9440(10)63437-2
  213. Yagisawa M., Yuo A., Kitagawa S., Yazaki Y., Togawa A., Takaku F.. Stimulation and priming of human neutrophils by IL-1 alpha and IL-1 beta: complete inhibition by IL-1 receptor antagonist and no interaction with other cytokines. *Exp Hematol.* 1995;23(7):603-608.
  214. Colotta F., Re F., Polentarutti N., Sozzani S., Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.* 1992;80(8):2012-2020.  
doi:10.1182/blood.v80.8.2012.2012
  215. Ter Haar N.M., Tak T., Mokry M., Scholman R.C., Meerding J.M., de Jager W., Verwoerd A.,

- Foell D., Vogl T., Roth J., et al. Reversal of sepsis-like features of neutrophils by Interleukin-1 blockade in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2018;70(6):943-956. doi:10.1002/art.40442
216. Wendelaar Bonga S.E. The stress response in fish. *Physiol Rev.* 1997;77(3):591-625. doi:10.1152/physrev.1997.77.3.591
217. Rohleder N. Acute and chronic stress induced changes in sensitivity of peripheral inflammatory pathways to the signals of multiple stress systems - 2011 Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology.* 2012;37(3):307-316. doi:10.1016/j.psyneuen.2011.12.015
218. Powell N.D., Sloan E.K., Bailey M.T., Arevalo J.M., Miller G.E., Chen E., Kobor M.S., Reader B.F., Sheridan J.F., Cole S.W. Social stress up-regulates inflammatory gene expression in the leukocyte transcriptome via  $\beta$ -adrenergic induction of myelopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(41):16574-16579. doi:10.1073/pnas.1310655110
219. Zhang Y., Li X., Lu S., Guo H., Zhang Z., Zheng H., Zhang C., Zhang J., Wang K., Pei F., Duan L. Stress triggers gut dysbiosis via CRH-CRHR1-mitochondria pathway. *NPJ biofilms microbiomes.* 2024;10(1):93. doi:10.1038/S41522-024-00571-z
220. Atanasova K., Knödler L.L., Reindl W., Ebert M.P., Thomann A.K. Role of the gut microbiome in psychological symptoms associated with inflammatory bowel diseases. *Semin Immunopathol.* 2025;47(1):1-15. doi:10.1007/s00281-025-01036-x
221. Ge L., Liu S., Li S., Yang J., Hu G., Xu C., Song W.. Psychological stress in inflammatory bowel disease: Psychoneuroimmunological insights into bidirectional gut-brain communications. *Front Immunol.* 2022;13:1-20. doi:10.3389/fimmu.2022.1016578
222. Xu W., Lu J., Chen Y., Wang Z., Cao J., Dong Y. Impairment of CRH in the intestinal mucosal epithelial barrier of pregnant Bama miniature pig induced by restraint stress. *Endocr J.* 2021;68(4):485-502. doi:10.1507/endocrj.EJ20-0332
223. Zheng G., Victor Fon G., Meixner W., Meixner W., Creekmore A., Zong Y., Dame M.K., Colacino J., Dedhia P.H., Hong S., Wiley J.W. Chronic stress and intestinal barrier dysfunction: Glucocorticoid receptor and transcription repressor HES1 regulate tight junction protein Claudin-1 promoter. *Sci Reports 2017 71.* 2017;7(1):1-12. doi:10.1038/s41598-017-04755-w
224. Zong Y., Zhu S., Zhang S., Zheng G., Wiley J.W., Hong S. Chronic stress and intestinal permeability: Lubiprostone regulates glucocorticoid receptor-mediated changes in colon epithelial tight junction proteins, barrier function, and visceral pain in the rodent and human. *Neurogastroenterol Motil.* 2019;31(2):e13477. doi:10.1111/nmo.13477
225. Morys J., Malecki A., Nowacka-Chmielewska M. Stress and the gut-brain axis: an inflammatory perspective. *Front Mol Neurosci.* 2024;17:1415567. doi:10.3389/fnmol.2024.1415567
226. Levy M., Kolodziejczyk A.A., Thaiss C.A., Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(4):219-232. doi:10.1038/nri.2017.7

227. Sudo N., Chida Y., Aiba Y., Sonoda J., Oyama N., Yu X.N., Kubo C., Koga Y. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice. *J Physiol.* 2004;558(1):263-275. doi:10.1113/jphysiol.2004.063388
228. Lee J.Y., Tsois R.M., Bäumlér A.J. The microbiome and gut homeostasis. *Science.* 2022;377(6601):eabp9960. doi:10.1126/science.abp9960
229. Yan Q., Jia S., Li D., Yang J. The role and mechanism of action of microbiota-derived short-chain fatty acids in neutrophils: From the activation to becoming potential biomarkers. *Biomed Pharmacother.* 2023;169:115821. doi:10.1016/j.biopha.2023.115821
230. Shen Y., Fan N., Ma S.X., Cheng X., Yang X., Wang G. Gut microbiota dysbiosis: pathogenesis, diseases, prevention, and therapy. *MedComm.* 2025;6(5):e70168. doi:10.1002/mco2.70168
231. Rodríguez C., Romero E., Garrido-Sánchez L., Alcáin-Martínez G., Andrade R.J., Taminiau B., Daube G., García-Fuentes E. Microbiota insights in clostridium difficile infection and inflammatory bowel disease. *Gut Microbes.* 2020;12(1). doi:10.1080/19490976.2020.1725220
232. Acevedo-Román A., Pagán-Zayas N., Velázquez-Rivera L.I., Torres-Ventura A.C., Godoy-Vitorino F. Insights into gut dysbiosis: Inflammatory diseases, obesity, and restoration approaches. *Int J Mol Sci* 2024, Vol 25, Page 9715. 2024;25(17):9715. doi:10.3390/IJMS25179715
233. Kelly C.J., Zheng L., Campbell E.L., Saeedi B., Scholz C.C., Bayless A.J., Wilson K.E., Glover L.E., Kominsky D.J., Magnuson A., et al. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell Host Microbe.* 2015;17(5):662-671. doi:10.1016/j.chom.2015.03.005
234. Bilotta A.J., Ma C., Yang W., Yu Y., Yu Y., Zhao X., Zhou Z., Yao S., Dann S.M., Cong Y. Propionate enhances cell speed and persistence to promote intestinal epithelial turnover and repair. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2021;11(4):1023-1044. doi:10.1016/j.jcmgh.2020.11.011
235. Clements K.D., Gleeson V.P., Slaytor M. Short-chain fatty acid metabolism in temperate marine herbivorous fish. *J Comp Physiol B.* 1994;164(5):372-377. doi:10.1007/BF00302552
236. Hao Y.T., Wu S.G., Xiong F., Tran N.T., Jakovlić I., Zou H., Li W.X., Wang G.T. Succession and fermentation products of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) hindgut microbiota in response to an extreme dietary shift. *Front Microbiol.* 2017;8:277916. doi:10.3389/fmicb.2017.01585
237. Zhang L.S., Davies S.S. Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions. *Genome Med* 2016 81. 2016;8(1):1-18. doi:10.1186/s13073-016-0296-x
238. Belkaid Y., Harrison O.J. Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity.* 2017;46(4):562-576. doi:10.1016/j.immuni.2017.04.008

239. Clarke T.B., Davis K.M., Lysenko E.S., Zhou A.Y., Yu Y., Weiser J.N. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med.* 2010;16(2):228-231. doi:10.1038/nm.2087
240. Deshmukh H.S., Liu Y., Menkiti O.R., Mei J., Dai N., O'Leary C.E., Oliver P.M., Kolls J.K., Weiser J.N., Worthen G.S. The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to *Escherichia coli* K1 sepsis in neonatal mice. *Nat Med.* 2014;20(5):524-530. doi:10.1038/nm.3542
241. Zhang D., Frenette P.S. Cross talk between neutrophils and the microbiota. *Blood.* 2019;133(20):2168-2177. doi:10.1182/blood-2018-11-844555
242. Watanabe K., Gilchrist C.A., Uddin M.J., Burgess S.L., Abhyankar M.M., Moonah S.N., Noor Z., Donowitz J.R., Schneider B.N., Arju T., et al. Microbiome-mediated neutrophil recruitment via CXCR2 and protection from amebic colitis. Monack DM, ed. *PLOS Pathog.* 2017;13(8):e1006513. doi:10.1371/journal.ppat.1006513
243. Flannigan K.L., Ngo V.L., Geem D., Harusato A., Hirota S.A., Parkos CA., Lukacs N.W., Nusrat A., Gaboriau-Routhiau V., Cerf-Bensussan N., et al. IL-17A-mediated neutrophil recruitment limits expansion of segmented filamentous bacteria. *Mucosal Immunol.* 2017;10(3):673-684. doi:10.1038/MI.2016.80
244. Mei J., Liu Y., Dai N., Hoffmann C., Hudock K.M., Zhang P., Guttentag S.H., Kolls J.K., Oliver P.M., Bushman F.D., Worthen G.S. Cxcr2 and Cxcl5 regulate the IL-17/G-CSF axis and neutrophil homeostasis in mice. *J Clin Invest.* 2012;122(3):974-986. doi:10.1172/JCI60588
245. Khosravi A., Yáñez A., Price J.G., Chow A., Merad M., Goodridge H.S., Mazmanian S.K. Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection. *Cell Host Microbe.* 2014;15(3):374-381. doi:10.1016/j.chom.2014.02.006
246. Sudo N. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis and gut microbiota: A target for dietary intervention? In: *The gut-brain axis.* Elsevier Inc.; 2016:293-304. doi:10.1016/B978-0-12-802304-4.00013-X
247. Misiak B., Łoniewski I., Marlicz W., Frydecka D., Szulc A., Rudzki L., Samochowiec J. The HPA axis dysregulation in severe mental illness: Can we shift the blame to gut microbiota? *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2020;102. doi:10.1016/j.pnpbp.2020.109951
248. Kouba B.R., de Araujo Borba L., Borges de Souza P., Gil-Mohapel J., Rodrigues A.L.S. Role of inflammatory mechanisms in major depressive disorder: From etiology to potential pharmacological targets. *Cells 2024, Vol 13, Page 423.* 2024;13(5):423. doi:10.3390/cells13050423
249. Ma X., Shin J.W., Cho J.H., Han S.W., Kim D.H. IL-6 expression-suppressing *Lactobacillus reuteri* strains alleviate gut microbiota-induced anxiety and depression in mice. *Lett Appl Microbiol.* 2024;77(1). doi:10.1093/lambio/ovad144

250. Ohkubo T., Tsuda M., Tamura M., Yamamura M. Impaired superoxide production in peripheral blood neutrophils of germ-free rats. *Scand J Immunol.* 1990;32(6):727-729. doi:10.1111/j.1365-3083.1990.tb03216.x
251. Day R.B., Link D.C. Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(9):1415-1423. doi:10.1007/s00018-011-0870-8
252. Wang K., Fang X., Ma N., Lin Q., Huang Z., Liu W., Xu M., Chen X., Zhang W., Zhang Y. Myeloperoxidase-deficient zebrafish show an augmented inflammatory response to challenge with *Candida albicans*. *Fish Shellfish Immunol.* 2015;44(1):109-116. doi:10.1016/j.fsi.2015.01.038
253. Keller J.R., Jacobsen S.E.W., Sill K.T., Ellingsworth L.R., Ruscetti F.W. Stimulation of granulopoiesis by transforming growth factor  $\beta$ : Synergy with granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(16):7190-7194. doi:10.1073/pnas.88.16.7190
254. Hestdal K., Jacobson S.E.W., Ruscetti F.W., Longo D.L., Boone T.C., Keller J.R. Increased granulopoiesis after sequential administration of transforming growth factor-beta 1 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Exp Hematol.* 1993;21(6):799-805.
255. Martinelli S., Urosevic M., Daryadel A., Oberholzer P.A., Baumann C., Fey M.F., Dummer R., Simon H.U., Yousefi S. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *J Biol Chem.* 2004;279(42):44123-44132. doi:10.1074/jbc.M405883200
256. Kovarik P., Castiglia V., Ivin M., Ebner F. Type I interferons in bacterial infections: A balancing act. *Front Immunol.* 2016;7(DEC):240176. doi:10.3389/fimmu.2016.00652
257. Ascher S., Wilms E., Pontarollo G., Formes H., Bayer F., Müller M., Malinarich F., Grill A., Bosmann M., Saffarzadeh M. Gut microbiota restricts NETosis in acute mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(9):2279-2292. doi:10.1161/ATVBAHA.120.314491
258. Woodfin A., Beyrau M., Voisin M.B., Ma B., Whiteford J.R., Hordijk P.L., Hogg N., Nourshargh S. ICAM-1-expressing neutrophils exhibit enhanced effector functions in murine models of endotoxemia. *Blood.* 2016;127(7):898-907. doi:10.1182/blood-2015-08-664995
259. Beauvillain C., Delneste Y., Scotet M., Peres A., Gascan H., Guermonprez P., Barnaba V., Jeannin P. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood.* 2007;110(8):2965-2973. doi:10.1182/blood-2006-12-063826
260. Lin A., Loré K. Granulocytes: New members of the antigen-presenting cell family. *Front Immunol.* 2017;8:319852. doi:10.3389/FIMMU.2017.01781
261. Gosselin E.J., Wardwell K., Rigby W.F.C., Guyre P.M. Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3. *J Immunol.* 1993;151(3):1482-1490. doi:10.4049/jimmunol.151.3.1482

262. Seshadri R.. Expression of HLA-DR (Major Histocompatibility Complex Class II) on neutrophils from patients treated with Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor for mobilization of stem cells. *Blood*. 1995;86(6):2452-2453.  
doi:10.1182/blood.v86.6.2452b.bloodjournal8662452b
263. Spagnoli G.C., Juretic A., Rosso R., Van Bree J., Harder F., Heberer M. Expression of HLA-DR in granulocytes of polytraumatized patients treated with recombinant human granulocyte macrophage—colony-stimulating factor. *Hum Immunol*. 1995;43(1):45-50. doi:10.1016/0198-8859(94)00131-9
264. Ashtekar A.R., Saha B. Poly's plea: Membership to the club of APCs. *Trends Immunol*. 2003;24(9):485-490. doi:10.1016/S1471-4906(03)00235-7
265. Kamp M.E., Shim R., Nicholls A.J., Oliveira A.C., Mason L.J., Binge L., Mackay C.R., Wong C.H. G protein-coupled receptor 43 modulates neutrophil recruitment during acute inflammation. *PLoS One*. 2016;11(9). doi:10.1371/journal.pone.0163750,
266. Maslowski K.M., Vieira A.T., Ng A., Kranich J., Sierro F., Yu D., Schilter H.C., Rolph M.S., Mackay F., Artis D., et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282-1286.  
doi:10.1038/nature08530,
267. Vinolo M.A.R., Hatanaka E., Lambertucci R.H., Newsholme P., Curi R.. Effects of short chain fatty acids on effector mechanisms of neutrophils. *Cell Biochem Funct*. 2009;27(1):48-55.  
doi:10.1002/cbf.1533
268. Tester A.M., Cox J.H., Connor A.R., Starr A.E., Dean R.A., Puente X.S., López-Otín C., Overall C.M. LPS responsiveness and neutrophil chemotaxis *in vivo* require PMN MMP-8 activity. *PLoS One*. 2007;2(3). doi:10.1371/journal.pone.0000312
269. Sabroe I., Prince L.R., Jones E.C., Horsburgh M.J., Foster S.J., Vogel S.N., Dower S.K., Whyte M.K. Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol*. 2003;170(10):5268-5275.  
doi:10.4049/jimmunol.170.10.5268
270. Gosselin D., Rivest S. MyD88 signaling in brain endothelial cells is essential for the neuronal activity and glucocorticoid release during systemic inflammation. *Mol Psychiatry*. 2008;13(5):480-497. doi:10.1038/sj.mp.4002122
271. Deng Q., Yoo S.K., Cavnar P.J., Green J.M., Huttenlocher A. Dual Roles for Rac2 in neutrophil motility and active retention in zebrafish hematopoietic tissue. *Dev Cell*. 2011;21(4):735-745.  
doi:10.1016/j.devcel.2011.07.013
272. Paredes-Zúñiga S., Morales R.A., Muñoz-Sánchez S., Muñoz-Montecinos C., Parada M., Tapia K., Rubilar C., Allende M.L., Peña O.A. CXCL12a/CXCR4b acts to retain neutrophils in caudal hematopoietic tissue and to antagonize recruitment to an injury site in the zebrafish larva. *Immunogenetics*. 2017;69(5):341-349. doi:10.1007/s00251-017-0975-9

273. Karmarkar D., Rock K.L. Microbiota signalling through MyD88 is necessary for a systemic neutrophilic inflammatory response. *Immunology*. 2013;140(4):483-492. doi:10.1111/imm.12159
274. Sreejit G., Nooti S.K., Jaggars R.M., Athmanathan B., Ho Park K., Al-Sharea A., Johnson J., Dahdah A., Lee M.K.S, Ma J. Retention of the NLRP3 inflammasome-primed neutrophils in the bone marrow is essential for myocardial infarction-induced granulopoiesis. *Circulation*. 2022;145(1):31-44. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.121.056019
275. Eislmayr K., Bestehorn A., Morelli L., Borroni M., Vande Walle L., Lamkanfi M., Kovarik P. Nonredundancy of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  is defined by distinct regulation of tissues orchestrating resistance versus tolerance to infection. *Sci Adv*. 2022;8(9):7293. doi:10.1126/sciadv.abj7293
276. Pyrillou K., Burzynski L.C., Clarke M.C.H. Alternative pathways of IL-1 activation, and its role in health and disease. *Front Immunol*. 2020;11:613170. doi:10.3389/fimmu.2020.613170
277. Janssens R., Boff D., Ruytinx P., Mortier A., Vanheule V., Larsen O., Daugvilaite V., Rosenkilde M.M., Noppen S., Liekens S., et al. Peroxynitrite exposure of CXCL12 impairs monocyte, lymphocyte and endothelial cell chemotaxis, lymphocyte extravasation *in vivo* and anti-HIV-1 activity. *Front Immunol*. 2018;9:1933. doi:10.3389/fimmu.2018.01933
278. Winkler I.G., Lévesque J.P. Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: When innate immunity assails the cells that make blood and bone. *Exp Hematol*. 2006;34(8):996-1009. doi:10.1016/j.exphem.2006.04.005
279. Bravo J.A., Forsythe P., Chew M.V., Escaravage E., Savignac H.M., Dinan T.G., Bienenstock J., Cryan J.F. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(38):16050-16055. doi:10.1073/pnas.1102999108
280. Herman J.P., McKlveen J.M., Ghosal S., Kopp B., Wulsin A., Makinson R., Scheimann J., Myers B. Regulation of the hypothalamic-pituitary- adrenocortical stress response. *Compr Physiol*. 2016;6(2):603-621. doi:10.1002/cphy.c150015
281. Siopi E., Galeme M., Rivagorda M., Saha S., Moigneu C., Moriceau S., Bigot M., Oury F., Lledo P.M. Gut microbiota changes require vagus nerve integrity to promote depressive-like behaviors in mice. *Mol Psychiatry* 2023 287. 2023;28(7):3002-3012. doi:10.1038/s41380-023-02071-6

**IX. Oświadczenia współautorów**

**Kłak K., Chadzińska M. Czy ryby ulegają stresowi? Kosmos. Problemy nauk biologicznych. 2021, 70: 57-71. doi: 10.36921/kos.2021\_2673. MEiN=20**

## Oświadczenie

Ja niżej podpisana jako pierwszy autor publikacji  
pt. „Czy ryby ulegają stresowi?” oświadczam, że mój wkład w przygotowaniu publikacji polegał  
na udziale w częściach dotyczących:

- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a mój indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 70 %

  
Czytelny podpis Kandydata

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „Czy ryby ulegają stresowi?” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w  
przygotowaniu publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 70 %

  
Czytelny podpis Współautora

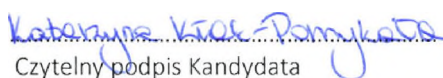
**Klak K., Maciuszek M., Marcinkowska M., Verburg-van Kemenade B. M. L., Chadzinska M. The importance of CXC-receptors CXCR1-2 and CXCR4 for adaptive regulation of the stress axis in teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 2022, 127: 647-658. doi: 10.1016/j.fsi.2022.06.070. MEiN=140, IF2021=4,622, IF2022=4,7**

## Oświadczenie

Ja niżej podpisana jako pierwszy autor publikacji pt. „The importance of CXC-receptors CXCR1-2 and CXCR4 for adaptive regulation of the stress axis in teleost fish” oświadczam, że mój wkład w przygotowaniu publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a mój indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 35 %

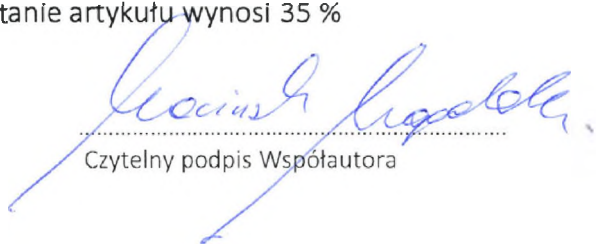
  
Czytelny podpis Kandydata

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „The importance of CXC-receptors CXCR1-2 and CXCR4 for adaptive regulation of the  
stress axis in teleost fish” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w  
przygotowaniu publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 35 %

  
Czytelny podpis Współautora

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „The importance of CXC-receptors CXCR1-2 and CXCR4 for adaptive regulation of the  
stress axis in teleost fish” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w  
przygotowaniu publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 35 %

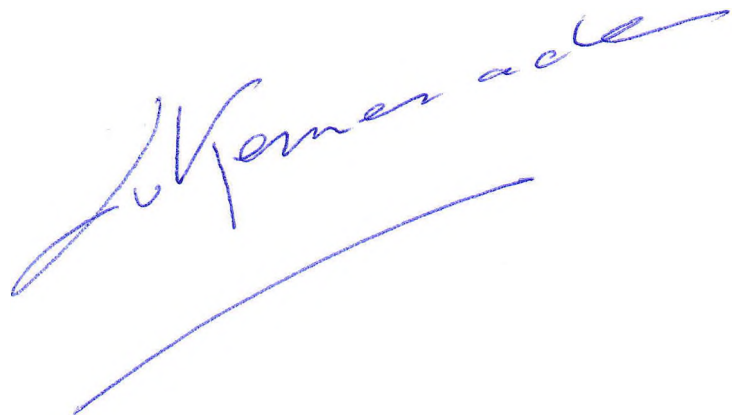
  
Czytelny podpis Współautora

### Statement

I, undersigned as a co-author of the publication entitled "The importance of CXC-receptors CXCR1-2 and CXCR4 for adaptive regulation of the stress axis in teleost fish", declare that the contribution of M.A. Katarzyna Kłak-Pomykała to the preparation of this publication consisted of participation in the following parts:

- Development of research methodology
- Experiment conduction
- Sample collection
- Measurements and data collection
- Analysis and interpretation of results
- Manuscript preparation
- Manuscript editing
- Manuscript revision

and her individual percentage contribution to the article is 35 %



## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „The importance of CXC-receptors CXCR1-2 and CXCR4 for adaptive regulation of the  
stress axis in teleost fish” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w  
przygotowaniu publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 35 %

  
Czytelny podpis Współautora

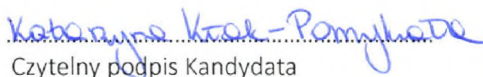
**Klak K., Maciuszek M., Pijanowski L., Marcinkowska M., Homa J., Verburg-van Kemenade B. M. L., Rakus K., Chadzinska M. Evolutionarily conserved mechanisms regulating stress-induced neutrophil redistribution in fish. *Front. Immunol.* 2024, 15:1330995. doi: 10.3389/fimmu.2024.13309952024. MEiN=140, IF2023-2024=5,7**

## Oświadczenie

Ja niżej podpisana jako pierwszy autor publikacji pt. „Evolutionarily conserved mechanisms regulating stress-induced neutrophil redistribution in fish” oświadczam, że mój wkład w przygotowaniu publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a mój indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 35 %

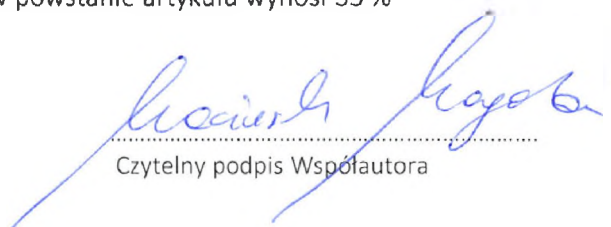
  
Czytelny podpis Kandydata

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „Evolutionarily conserved mechanisms regulating stress-induced neutrophil redistribution  
in fish” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu publikacji  
polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 35 %



.....  
Czytelny podpis Współautora

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „Evolutionarily conserved mechanisms regulating stress-induced neutrophil redistribution  
in fish” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu publikacji  
polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzeniu procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 35 %


Ł. Pijanowski  
Czytelny podpis Współautora

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „Evolutionarily conserved mechanisms regulating stress-induced neutrophil redistribution  
in fish” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu publikacji  
polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania metodyki badan
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 35 %

  
Czytelny podpis Współautora

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „Evolutionarily conserved mechanisms regulating stress-induced neutrophil redistribution  
in fish” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu publikacji  
polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania metodyki badan
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 35 %

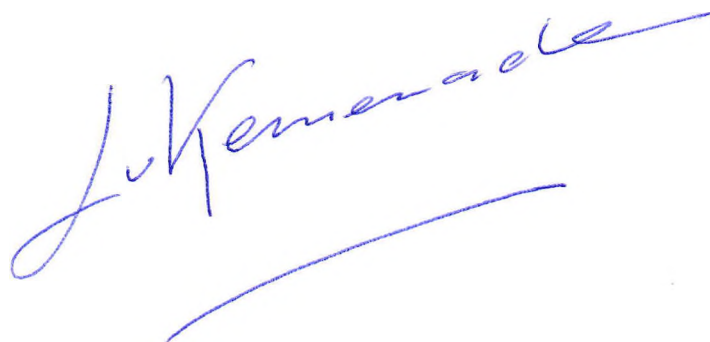
  
.....  
Czytelny podpis Współautora

### Statement

I, undersigned as a co-author of the publication entitled "Evolutionarily conserved mechanisms regulating stress-induced neutrophil redistribution in fish", declare that the contribution of M.A. Katarzyna Kłak-Pomykała to the preparation of this publication consisted of participation in the following parts:

- Development of research methodology
- Experiment conduction
- Sample collection
- Measurements and data collection
- Analysis and interpretation of results
- Manuscript preparation
- Manuscript editing
- Manuscript revision

and her individual percentage contribution to the article is 35 %

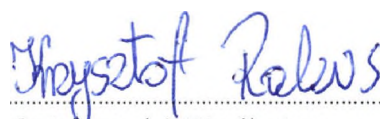


## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „Evolutionarily conserved mechanisms regulating stress-induced neutrophil redistribution  
in fish” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu publikacji  
polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania metodyki badan
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 35 %



Czytelny podpis Współautora

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „Evolutionarily conserved mechanisms regulating stress-induced neutrophil redistribution  
in fish” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu publikacji  
polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania metodyki badan
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 35 %

  
Czytelny podpis Współautora


**Klak K., Maciuszek M., Michalik A., Mazur M., Zawisza M., Pecio A., Nowak B., Chadzinska M. Fire in the belly: stress and antibiotics induce dysbiosis and inflammation in the gut of common carp. *Fish & Shellfish Immunology*. 2025, 161:11030. doi: 10.1016/j.fsi.2025.110301. MEiN=140, IF2023-2024=4,1**

## Oświadczenie

Ja niżej podpisana jako pierwszy autor publikacji pt. „Fire in the belly: Stress and antibiotics induce dysbiosis and inflammation in the gut of common carp” oświadczam, że mój wkład w przygotowaniu publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania koncepcji badań
- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a mój indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 30%

  
Czytelny podpis Kandydata

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „Fire in the belly: Stress and antibiotics induce dysbiosis and inflammation in the gut of  
common carp” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu  
publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania koncepcji badań
- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 30%

  
Czytelny podpis Współautora

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „Fire in the belly: Stress and antibiotics induce dysbiosis and inflammation in the gut of  
common carp” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu  
publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania koncepcji badań
- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 30%

Anna Michalik  
Czytelny podpis Współautora

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „Fire in the belly: Stress and antibiotics induce dysbiosis and inflammation in the gut of  
common carp” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu  
publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania koncepcji badań
- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 30%

  
.....  
Czytelny podpis Współautora

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „Fire in the belly: Stress and antibiotics induce dysbiosis and inflammation in the gut of  
common carp” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu  
publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania koncepcji badań
- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 30%

  
Czytelny podpis Współautora

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „Fire in the belly: Stress and antibiotics induce dysbiosis and inflammation in the gut of  
common carp” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu  
publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania koncepcji badań
- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 30%

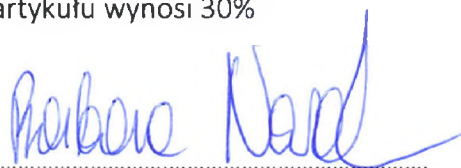
  
Czytelny podpis Współautora

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „Fire in the belly: Stress and antibiotics induce dysbiosis and inflammation in the gut of  
common carp” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu  
publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania koncepcji badań
- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 30%



Czytelny podpis Współautora

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor publikacji  
pt. „Fire in the belly: Stress and antibiotics induce dysbiosis and inflammation in the gut of  
common carp” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu  
publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania koncepcji badań
- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu
- Przeprowadzenia procesu recenzji

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 30%

  
.....  
Czytelny podpis Współautora

**Klak K., Maciuszek M., Kralka J., Pecio M., Nowak B., Konstantinidis I., Galindo-Villegas J., Chadzinska M., Microbiome dysbiosis affects stress response in common carp. (w przygotowaniu).**

## Oświadczenie

Ja niżej podpisana jako pierwszy autor manuskryptu pt. „Microbiome dysbiosis affects stress response and neutrophil activity in teleost fish” oświadczam, że mój wkład w przygotowaniu publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania koncepcji badań
- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu

a mój indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 30 %



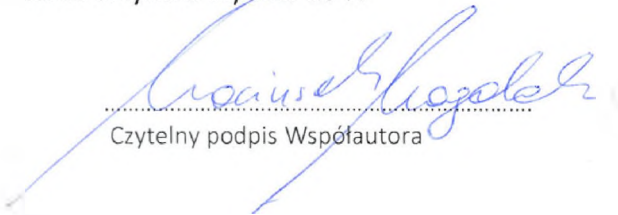
Czytelny podpis Kandydata

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor manuskryptu pt. „Microbiome dysbiosis affects stress response in common carp” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania koncepcji badań
- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 30 %

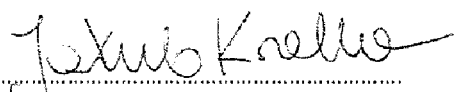
  
Czytelny podpis Współautora

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor manuskryptu pt. „Microbiome dysbiosis affects stress response in common carp” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania koncepcji badań
- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 30 %

  
.....  
Czytelny podpis Współautora

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor manuskryptu pt. „Microbiome dysbiosis affects stress response in common carp” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania koncepcji badań
- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 30 %

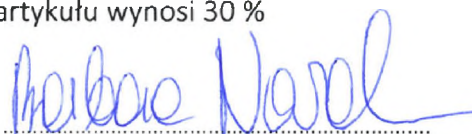
  
.....  
Czytelny podpis Współautora

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor manuskryptu pt. „Microbiome dysbiosis affects stress response in common carp” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania koncepcji badań
- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 30 %

  
Czytelny podpis Współautora

## Statement

I, undersigned as a co-author of the manuscript entitled "Microbiome dysbiosis affects stress response in common carp" I declare that the MA Katarzyna Kłak-Pomykała contribution to the preparation of the publication consisted of participation in the following parts:

- Development of research concepts
- Development of research methodology
- Experiment conduction
- Sample collection
- Measurements and data collection
- Analysis and interpretation of results
- Manuscript preparation
- Manuscript editing

and her individual percentage contribution to the article is 30 %



.....  
Legible Co-author signature

*Jorge Galindo-Villegas*

.....  
Name and Surname of Co-Author

Bodø, Norway, 28/05/2025

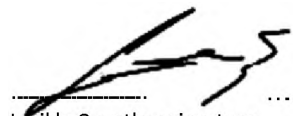
.....  
Place and date

## Statement

I, undersigned as a co-author of the manuscript entitled "Microbiome dysbiosis affects stress response in common carp" I declare that the MA Katarzyna Kłak-Pomykała contribution to the preparation of the publication consisted of participation in the following parts:

- Development of research concepts
- Development of research methodology
- Experiment conduction
- Sample collection
- Measurements and data collection
- Analysis and interpretation of results
- Manuscript preparation
- Manuscript editing

and her individual percentage contribution to the article is 30 %

  
.....  
Legible Co-author signature

## Oświadczenie

Ja niżej podpisany/a jako współautor manuskryptu pt. „Microbiome dysbiosis affects stress response in common carp” oświadczam, że wkład mgr Katarzyny Kłak-Pomykały w przygotowaniu publikacji polegał na udziale w częściach dotyczących:

- Opracowania koncepcji badań
- Opracowania metodyki badań
- Przeprowadzenia eksperymentów
- Zbieraniu materiałów
- Wykonaniu oznaczeń i zebraniu danych
- Analizie i interpretacji wyników
- Przygotowaniu manuskryptu
- Redagowaniu manuskryptu

a jej indywidualny procentowy wkład w powstanie artykułu wynosi 30 %

  
Czytelny podpis Współautora