

Kandidatnummer: 10006, 10011, 10021, 10038

Effekt av kronisk kobbereksponering på milten til atlantisk laks

Bacheloroppgave i Bachelor i Bioingeniørfag

Veileder: Ingvill Tolås

Medveileder: Anne Elin Varhaugvik

Mai 2024

Kandidatnummer: 10006, 10011, 10021, 10038

Effekt av kronisk kobbereksponering på milten til atlantisk laks

Bacheloroppgave i Bachelor i Bioingeniørfag
Veileder: Ingvill Tolås
Medveileder: Anne Elin Varhaugvik
Mai 2024

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for biologiske fag Ålesund



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Denne bacheloroppgaven ble gitt via Institutt for Biologiske fag ved Norges teknisk-naturvitenskapelig universitet (NTNU) i Ålesund i 2024. Oppgaven er skrevet som et avsluttende prosjekt ved bioingeniørutdanningen. Den er en del av NFR-prosjektet "Bruk av kobberimpregnerte nøter i fiskeoppdrettsnæringen– konsekvenser for fiskehelse, bærekraft og produktivitet" (prosjektnummer 325849). Praktisk arbeid tilknyttet prosjektet ble utført ved laboratoriet på NTNU i Ålesund.

Aller først vil vi gi en stor takk til hovedveileder Ingvill Tolås og praktisk veileder Anne Elin Varhaugvik. Vi er svært takknemlige for deres gode faglige og praktiske veiledning. Dere har stilt opp med engasjement og god oppfølging gjennom hele bacheloroppgaven.

Videre ønsker vi å uttrykke stor takknemlighet til Avdeling for patologi ved Ålesund sjukehus, som har vært behjelpelig med opplæring og bruk av deres instrument for digital patologi.

En stor takk rettes også til histopatolog Even Thoen fra Patogen, som har bistått med god faglig kunnskap og evaluering av farger resultatene. Vi ønsker også å takke Tora Bardal for forbehandling av vevsmaterialet vårt og vurdering av mikroskopiske funn. Takk til Rolf Erik Olsen som har vært behjelpelig med vurdering av mikroskopiske funn.

Til slutt ønsker vi å takke for NTNU i Ålesund sin rolle i vår akademiske utvikling.

Sammendrag

Bacheloroppgaven vår, en del av forskningsprosjektet "Bruk av kobberimpregnerte nøter i fiskeoppdrettsnæringen – konsekvenser for fiskehelse, bærekraft og produktivitet» (prosjektnummer 325849), fokuserer på effekten av kobber på atlantisk laks og dets påvirkning på milten.

Kobberimpregnerte nøter brukes i oppdrettsnæringen for å bekjempe biofilm og opprettholde optimale vekstforhold for fisken. Kobbereksponeering kan føre til toksiske effekter, oppgaven har derfor fokusert på kobberets virkning på milten som er et viktig immunologisk og hematologisk organ.

Det ble benyttet ulike histologiske fargemetoder for å undersøke mengde kobbernedslag i vevet og analysere histologiske endringer. Målet var å se etter sammenheng mellom observerte funn og kobbereksponeering. Ved mikroskopering ble det observert mørke aggregater ved alle fargemetodene. Fargemetoden HES avslørte tydelige vevsstrukturer, med hvit pulpa i mørk blå-lilla farge og rød pulpa i lysere lilla kanaler. Fargemetoden Rhodanin er spesifikk for kobbernedslag, og ble benyttet for identifisering av kobber. Alle snitt farget med Rhodanin, ble kvantifisert for aggregat, hvor det ble observert en økning av antall aggregat ved stigende kobbereksponeering. Fargemetoden Perl ble benyttet for å påvise jernavleiring fra eventuelle melanomakrofager grunnet usikkerhet til opphav av aggregatene. Et fåtall av aggregatene inneholdt svakt blå avleiring. Dette kan antas å være melanomakrofager eller uspesifikke nedslag. Fargemetoden Giemsa ble benyttet for å differensiere celler. Fargemetoden påviste ulike immunologiske celletyper i økt mengde, som kan skyldes kobberindusert inflammasjon. Observerte mørkegrønne aggregater i hvit pulpa, kan tenkes å være melanin, tilhørende melanomakrofager.

Resultatene indikerer at kronisk kobbereksponeering kan forårsake inflammasjon i milten, noe som kan påvirke helsen og velferden til atlantisk laks. Selv om forskning på andre arter og nye metoder pågår, vil oppdrettslaks fortsatt være dominerende i næringen. For å sikre fiskens helse og økonomisk stabilitet i oppdrettsnæringen, samt beskytte tilstøtende økosystemer, bør fremtidige studier inkludere flere histologiske og kvantitative analysemetoder.

Abstract

Our bachelor's thesis, part of the research project " Effects of antifouling copper coating in aquaculture – implication for fish health, performance and sustainability of production" (project number 325849), focuses on the effects of copper on Atlantic salmon and its impact on the spleen.

Copper-impregnated nets are used in aquaculture to combat biofilm and maintain optimal growth conditions for the fish. Copper exposure can lead to toxic effects, so our thesis focused on copper's impact on the spleen, an important immunological and hematological organ.

Various histological staining methods were employed to investigate the amount of copper deposits in the tissue and to analyze histological changes. The aim was to determine if there was a correlation between observed findings and copper exposure. Microscopy revealed dark aggregates with all staining methods. The HES staining method revealed distinct tissue structures, with white pulp in dark blue-purple and red pulp in lighter purple channels. Rhodanin staining, specific for copper deposits, was used to identify copper. All sections stained with Rhodanin were quantified for aggregates, showing an increase in the number of aggregates with higher copper exposure. Perl staining was used to detect iron deposits from potential melanomacrophages, due to uncertainty regarding the origin of the aggregates. A few aggregates showed weak blue deposits, possibly indicating melanomacrophages or nonspecific deposits. Giemsa staining was used to differentiate cells, revealing various immunological cell types in increased quantities, likely due to copper-induced inflammation. Observed dark green aggregates in the white pulp might be melanin, belonging to melanomacrophages.

The results suggest that chronic copper exposure can cause inflammation in the spleen, potentially affecting the health and welfare of Atlantic salmon. Despite ongoing research on other species and new methods, farmed salmon will continue to dominate the aquaculture industry. To ensure fish health and economic stability in aquaculture, as well as protect adjacent ecosystems, future studies should include additional histological and quantitative analysis methods.

Ordliste

Bioakkumulering: Opphoping av tungt nedbrytbare grunnstoff eller andre kjemiske sambindinger (1).

Biofilm: Strukturert samfunn av bakterier som er festet til en overflate og til hverandre (2).

Hematokrit: Prosentvis fraksjon av erytrocytter i forhold til totalt blodvolum (3).

Histologi: Læren om vevets struktur (4).

Hypoksi: En tilstand med utilstrekkelig opptak/mengde oksygen (5).

Morfologi: Beskrivelse av form og oppbygning (6).

Stamfisk: Kjønnsmoden fisk som brukes til foreldre til nye generasjoner av fisk (7).

Innholdsfortegnelse

Forord.....	1
Sammendrag.....	I
Abstract	II
Ordliste.....	III
1 Introduksjon	1
1.1 Bakgrunn	1
1.2 Teori	2
1.2.1 Oppdrettsnæring og atlantisk laks	2
1.2.2 – Begroing som problematikk	4
1.2.3 Kobber som antibegroingsmiddel, frigjøring fra oppdrettsanlegg og miljøgift.....	5
1.2.4 Kobberfunksjon og toksisitet.....	6
1.2.5 Miltens funksjon.....	8
1.2.6 Miltens anatomi og oppbygging.....	9
1.2.7 Forbehandling av histologisk materiale.....	12
1.2.8 Fargemetoder.....	13
2. Material og metode.....	15
2.1 Material	15
2.2 Forbehandling av prøvemateriale	16
2.3 Snitting	17
2.4 Fargemetoder.....	18
2.4.1 Avparafinisering og rehydrering	18
2.4.2 Dehydrering.....	18
2.4.3 HES	18
2.4.4 Rhodanin	19
2.4.5 Perl	20
2.4.6 Giemsa.....	21
2.5 Digital patologi.....	22
2.6 Metode for kobbertelling.....	23
2.7 Statistikk.....	24
3 Resultater.....	25
3.1 HES	25
3.2 Rhodanin	27
3.3 Telling av kobber ved fargemetoden Rhodanin	29

3.4 Perl	31
3.5 Giemsa.....	33
3.6 Morfologiske variasjoner av aggregater ved ulike fargemetoder	36
4 Diskusjon.....	38
4.1 Strukturelle observasjoner.....	38
4.2 Kobberaggregat	39
4.2.1 Økt antall aggregat ved kronisk kobbereksponering	40
4.3 Kobberindusert inflammasjon	42
4.4 Melanomakrofager	44
4.4.1 Bristing av melanomakrofager	44
4.5 Uoverensstemmelse mellom Giemsa og Perl	45
5 Konklusjon	47
6. Referanseliste	49
7 Vedlegg	55
Vedlegg 1: Rhodanin fargeteknikk.....	55
Vedlegg 2: Giemsa fargeteknikk.....	57
Vedlegg 3: HES fargeteknikk.....	59
Vedlegg 4: Perl fargeteknikk.....	62
Vedlegg 5: Statistikk	64
Vedlegg 6: Kontrolltelling.....	65

1 Introduksjon

1.1 Bakgrunn

Bacheloroppgaven ble valgt på bakgrunn av studentenes interesse for patologi. Selv om studentenes erfaring hovedsakelig har vært innen menneskelig patologi, ses oppgaven på som en spennende mulighet til å utforske patologien hos en ny organisme og utvide vår kunnskap. Arbeidsoppgavene knyttet til oppgaven er engasjerende og utfordrende. Gjennom laboratorieanalyser og datatolkning får gruppen praktisk erfaring med forskningsmetoder, noe som er lærerikt og utviklende for oss som studenter.

Formålet med denne oppgaven er å undersøke hvordan kobber fra oppdrettsnæringen påvirker milten hos atlantisk laks. Kobber slippes ut i miljøet fra fiskeoppdrettsanlegg gjennom fôrspill, fiskeavføring og kobberimpregnerte nøter (8). Vedlikehold av kobberimpregnerte nøter kan føre til utslipp av kobber, som igjen kan påvirke akvatiske organismer (9). Selv om det er kjent at kobber er toksisk for fisk, er det lite kjent hvordan det påvirker milten hos atlantisk laks. Ved å undersøke milten som et lymfatisk organ, håper bachelorgruppen å få en bedre forståelse av oppdrettsindustriens påvirkning på laksehelsen og økosystemet rundt oppdrettsanlegg.

Denne bacheloroppgaven skal fokusere spesifikt på problemstillingen; *hvilken effekt har kronisk kobbereksposering på milten til atlantisk laks?* Med effekt menes en histologisk endring som kobber kan ha på milten. Kronisk kobbereksposering i denne sammenheng vil si at fisken er utsatt for lavere nivåer av kobber over en avgrenset periode. Med denne problemstillingen tar oppgaven sikte på å bidra til økt kunnskap om hvordan denne praksisen påvirker dyrevelferden og helsen til oppdrettsfisken.

1.2 Teori

1.2.1 Oppdrettsnæring og atlantisk laks

1.2.1.1 Oppdrettsnæringen i Norge

I norsk fiskeoppdrett er den største andelen av volumet dominert av atlantisk laks (10). Den har dannet grunnlaget for oppdrettsnæringen siden 1970-tallet og er fremdeles en viktig oppdrettsfisk i Norge (11,12).

I 2022 eksporterte Norge ca. 1.23 millioner tonn oppdrettslaks (atlantisk laks) til en omtrent verdi på 122.5 milliarder kroner. Denne eksporten utgjorde omtrent 75% av den totale eksportverdien av sjømat, som var på ca. 171.7 milliarder kroner det året. Produksjonen av oppdrettsfisk har økt jevnt siden 2012, fra 1.3 millioner tonn årlig til over 1.65 millioner tonn i 2021 og 1.64 millioner tonn i 2022 (9). Fiskeridirektoratet viser at produksjon lå på rundt 1,61 millioner tonn i 2023. Atlantisk laks står for den største delen med 1.52 millioner tonn. Dette utgjør 95% av den totale produksjonen. Til tross for pågående arbeid på andre arter og nye produksjonsmetoder, vil sannsynligvis oppdrettslaks fortsatt være den dominerende arten i oppdrettsnæringen i mange å fremover (9).

1.2.1.2 Atlantisk laks

Atlantisk laks har det latinske navnet *Salmo salar* og er i familien kalt *Salmonidae*. *Salmo salar* er en anadrom fisk, som betyr at dens livssyklus innebærer migrasjon mellom ferskvann og havet (12).

Fra lakseungen klekkes, lever de i ferskvann som yngel med en plommesekk på magen (12). Yngel utvikles til en parr. Fysiologisk har parren parmerker eller fingermerker og lever minst ett år i elven før den svømmer ut i havet. Parren forvandles til smolt etter noen år og forandrer utseende til en mer blank kropp (13). En smolt er en settefisk som har gjennomgått fysiologiske tilpasninger som tillater den å overleve i havvannsmiljøet. Disse tilpasningene inkluderer evnen til å regulere saltbalansen ved å eliminere overskuddsalter gjennom gjellene (10). Smolten svømmer til havet fra elven om våren og tilbringer de neste ett til fire år der.

Den vandrer tilbake til elven den ble født i for å gyte når den er kjønnsmoden. Ved gyting finner hunnen et område med god strøm og grov grus hvor hun legger egg (12).

1.2.1.3 Oppdrettslaksens livssyklus

Atlantisk laks gjennomgår normalt tre hovedfaser i fiskeoppdrett; stamfisk, settefisk og matfisk (10).

I fiskeoppdrett er genetikken til hunn- og hannfisk nøye avlet frem gjennom en avansert avlsprosess. For å tilby befruktete egg (rogn) med varierte genetiske egenskaper til oppdrettsnæringen, ligger det flere generasjoner med seleksjon til forbedrede egenskaper bak. For å danne avlsmessig fremgang i Norge, blir seleksjon av individer basert på hvilke egenskaper det skal avles på. I de senere årene har det vært avl for egenskaper som økt motstand mot sykdom, evnen til å tåle miljøutfordringer og god vekst under varierte oppdrettsforhold. Dette vil totalt utvikle en sterk laksestamme (10).

Rogn fra atlantisk laks har klekketid på to til tre dager ved 480-520 døgngrader, hvor temperaturen i vannet vil påvirke klekkingen. Ved for eksempel 2-5°C vil klekkingen skje 50 døgngrader tidligere (10). Innen fiskeoppdrett kontrolleres tidspunktet for smoltifiseringen av fisken. Storsmolt refererer til en strategi i oppdrett. Den innebærer at før fisken overføres til åpne merder i sjø, lever den lengre av livet sitt i kar på land. Den reduserte tiden i åpne sjømerder skal minimere risikoen for blant annet lakselus i merdene, samtidig som laksen muligens oppnår raskere vekst mot slaktevekt. En smolt mellom 250 til 400 gram kalles storsmolt. I oppdrettsnæringen er postsmolt en fase hvor fisken går fra ferskvann til havvann og tilpasses det marine miljøet for videre vekst (10). Gjennom lys- og temperaturmanipulering produseres smolt av ønsket størrelse innen et halvt år, kjent som halvårssmolt (0+). Denne perioden kan forlenges til 1,5 år (1-årssmolt) eller lenger (2-årssmolt) ved å senke vanntemperaturen. Dette gjør smolt tilgjengelig i alle årstider (10).

Etter smoltifisering overføres vanligvis atlantisk laks til matfiskanlegg og plasseres i merder i sjø. I Norge lever smolten i åpne merder der vannet kan flyte fritt gjennom, hvor naturen rundt bestemmer kvaliteten på vannet for oppdrettsfisken (10). Det er viktig med tilstrekkelig vannutveksling for å sikre eliminering av avfallsstoffer og tilførsel av oksygen (14).

Når merdenes nett blir utsatt for vannstrømninger, oppstår det en dragkraft. Denne dragkraften har stor betydning for utformingen av merdene (15). Merdene er ofte av sylindrisk utforming, og er organisert i rutenett med varierende antall merder i samme område. Videre har de flytekant som støtter stolper og rekkverk (15). Nettene i merdene er tradisjonelt laget av nylon eller polyetylen grunnet deres evne til å tåle både mekaniske belastninger og miljøpåvirkninger (16). Imidlertid kan bruken av slike materialer også presentere utfordringer i oppdrettsnæringen.

1.2.2 – Begroing som problematikk

I akvakultur er biofilm en av utfordringene som fører til en mindre effektiv og bærekraftig produksjon i fiskeoppdrett (17). Når biofilmen vokser, kan dette redusere vanngjennomstrømning og oksygentilførsel. Sammen vil dette redusere vannkvaliteten i merdene og påvirke akvatiske organismer (18,19). Noe som blant annet kan resultere i redusert vekst i akvatiske organismer. Videre kan det føre til at oppdrettsnæringen benytter kjemikalier for å oppnå ønsket vekst (20). Antibegroingsmiddel er derfor utviklet for å hindre mikroorganismers evne til begroing ved å hindre adhesjon og dermed vekst (21,22). Eksempler på slike antibegroingsmidler er kobber, sink, irgarol og polydimetylsiloxan (23,24).

Kobber har flere fordeler i forhold til andre nøter, slik som nylonnøter. Kobbernøter tåler å stå lengre i sjø før de byttes og har derfor en økonomisk fordel. Dette gjør kobber mer robust i forhold til nylon, og det har i tillegg en bedre evne til å hindre biofilm (18,20). Til tross for kobberets effektivitet som antibegroingsmiddel, er det viktig å vurdere konsekvensene kobber kan ha på akvatiske organismer.

1.2.3 Kobber som antibegroingsmiddel, frigjøring fra oppdrettsanlegg og miljøgift

1.2.3.1 Kobber

Mineraler er nødvendig i livsprosessene til alle akvatiske organismer (25).

Et slikt mineral er kobber, et grunnstoff som finnes naturlig i miljøet, både i havvann, sediment og i jordskorpen (19). Stoffet spiller en viktig rolle i flere biologiske prosesser slik som vekst og reproduksjon (26). For virveldyr er kobber en kofaktor for flere enzym og utgjør en bestanddel i ulike glykoprotein. Kobber er også viktig for syntese av hemoglobin og et fungerende nervesystem (27). På grunn av kobberets viktige rolle i fisk, er det et av flere tungmetallforbindelser som inngår i fiskefôr (19). Selv om kobber er essensielt for akvatiske organismer, er det også viktig å være oppmerksom på de potensielle miljøkonsekvensene ved frigjøring av kobber fra oppdrettsanlegg.

1.2.3.2 Frigjøring av kobber fra oppdrettsanlegg

Oppdrettsfisk eksponeres for kobber via fôrspill og naturlig forekomst i havvann.

Derimot kommer den største eksponeringen av kobber fra antibegroingsmiddel på nøtene (19). Antibegroingsmiddelet vil over tid løses opp i vannet og spres med vannstrømmen. En del av dette kobberet kan også synke til havbunn i nærheten av oppdrettsanlegget. Dette kan føre til akkumulering av høye konsentrasjoner av kobber rundt fiskeoppdrettsanlegg.

Kobber som er oppløst i havvann finnes i ulike kjemiske og fysiske tilstander, inkludert partikler, ioner og som uorganiske og organiske komplekser. De kjemiske egenskapene til vannbåren kobber spiller en viktig rolle for akkumulering i marine organismer og dens potensielle giftighet for dem (19).

Den største kilden til kobber fra fiskeoppdrett er kobber(I)oksid, som brukes til antibegroingsmiddel på nøter. Slike kobberbelagte nøter er avhengig av vedlikehold for å opprettholde effektiviteten. Et eksempel på dette er spyling, som kan føre til ekstra slitasje og øke utslipp av kobberpartikler til miljøet (9). Når kobber(I)oksid (Cu_2O) løser seg opp i havvann, blir det frigjort Cu^{2+} -ioner.

Ifølge kunnskapsstøtterapport fra Havforskningsinstituttet om miljøeffekter av kobber, viser bioakkumuleringsstudier at opptak av kobber i akvatiske organismer hovedsakelig skjer i form av kobberioner (Cu^{2+}). Kobberioner anses som den mest giftige formen for akvatiske organismer, etterfulgt av kobber-hydroksidkomplekset (Cu-OH) (19). Disse aspektene ved kobberfrigjøring understreker behovet for nøye vurdering av miljømessige og regulatoriske rammer for å sikre bærekraftig bruk av kobber i akvakultur.

1.2.3.3 Miljømessige og regulatoriske aspekter for bruk av kobber i akvakultur

Kobber kan i store konsentrasjoner føre til skade på ulike organismer og kan over tid føre til negative virkninger i vannmiljøet (19). I Norge er det regulatoriske rammeverk og retningslinjer som er pålagt fiskeoppdrettsanlegg. Dette er et viktig tiltak som går ut på overvåking av bunnen under anleggene og i de omkringliggende områdene (19,28).

Overvåkingen består av undersøkelser med måling av kobberkonsentrasjoner i sedimentene, både i anleggssonen og i overgangssonen, hvor kobber brukes som antibegroingsmiddel (19). Avhengig av resultater på målinger fra anleggssonen, vil dette påvirke om det er behov for ytterligere undersøkelser for mer detaljert kartlegging av kobber. Dette er begrunnet ved at det ikke er ønskelig at organismer som lever i, eller nærhet av oppdrettsanlegg, skal eksponeres for høy konsentrasjon av kobber (19). Slike tiltak er avgjørende for å minimere risikoen for at organismer i, eller i nærheten av oppdrettsanlegg, utsettes for skadelige nivåer av kobber, noe som kan føre til toksiske effekter.

1.2.4 Kobberfunksjon og toksisitet

1.2.4.1 Kobbertoksisitet

Optimalt opptak av kobber forekommer når konsentrasjonen møter fiskens fysiologiske behov. Dersom dette nivået overskrides, vil dette føre til lavere retensjonsgrad i fisken. Ved en høy mengde kobber i fôr, tar fisken opp en mindre prosentandel kobber, men totalt sett akkumuleres fortsatt en høyere mengde i kroppen (19).

En kunnskapsrapport fra Havforskningsinstituttet, foreslår tilstandsrapporter av kobber i kystvann. Intervallet $<0,3-2,6\mu\text{g/l}$ gir ikke toksiske effekter, $2,6-5,2\mu\text{g/l}$ gir akutte toksiske effekter og $>5,2\mu\text{g/l}$ gir omfattende akutt-toksiske effekter. Dermed er grensen på $2,6\mu\text{g/l}$ en «*Predicted no effect concentration*» (PNEC) som er satt for marine organismer (19).

Kombinasjon av høy eksponering og økt opptak av kobber, kan blant annet medføre histologiske endringer i gjeller og vevsskader i fordøyelseskjertelen hos fisk (19,29). Gjellene er det første organet som eksponeres for vannbåren kobber (30). Deres kontinuerlige eksponering og direkte kontakt med omgivelsene gjør de svært sårbare for ulike substanser (31). Samtidige viser studier at gjellene har lavere kobberakkumulering i forhold til indre organer, slik som lever og tarm. Dette belyser viktigheten av å studere organer, som milten, i forhold til akkumulering og effekt av kobbereksponeering (32). Denne akkumuleringen kan også føre til oksidativt stress, som er en alvorlig konsekvens av kobbereksponeering som påvirker cellenes evne til å håndtere reaktive oksygenforbindelser.

1.2.4.2 Oksidativt stress

Ulike tungmetaller, slik som kobber, kan føre til cellostress i ulike organismer inkludert fisk. Høye nivåer av kobber kan føre til at cellenes oksidant-antioksidantsystem blir påvirket og svekket (33).

Oksidativt stress beskriver en ubalanse forårsaket av reaktive oksygenforbindelser (ROS) eller oksidanter, som overstiger cellenes evne til å respondere effektivt ved bruk av antioksidanter (34). Oksidativt stress er avgjørende for å utløse programmert celledød, apoptose. Denne prosessen bidrar til å regulere antall celler i vev, og fjerner celler som vevet ikke lenger har bruk for eller som potensielt kan være farlige (35).

Kobber kan forårsake oksidativt stress på celler både direkte og indirekte. For det første kan kobber indirekte danne reaktive oksygenforbindelser (36). Kobber er vist å kunne fremkalle redoksykluser gjennom fentonreaksjoner, hvor det henholdsvis blir dannet hydroksylion (OH) og hydroksylradikal (OH). Radikalene som blir dannet kan i sin tur påvirke antioksidanter i ulike vev. Dette vil forårsake skade på DNA og ulike makromolekyler, i tillegg til peroksidering av cellemembraner (37,38). I tillegg kan frie Cu^{2+} -ioner binde seg

direkte med ulike negative grupper på proteiner, som thiolgrupper. Ionene kan også føre til denaturering av ulike enzym (36).

1.2.5 Miltens funksjon

Selv om det er etablert at kobber kan ha en toksisk effekt for fisk, er det fremdeles lite kunnskap om hvordan kobbernivåene kan påvirke allmentilstanden til fisk (19,29). For å belyse dette kan man undersøke spesifikt hvordan kobber påvirker immunologiske reaksjoner i milten.

Milten er både et immunologisk og hematologisk viktig organ. Eksempelvis er milten ansvarlig for blodfiltrering, da fisk mangler lymfeknuter. Organet spiller videre en sentral rolle i hematopoiese, hvor nye røde blodceller dannes. Milten har også en viktig funksjon i katabolismen av gamle erythrocytter, der de brytes ned og resirkuleres. Denne multifunksjonelle rollen understreker miltens vitalitet i opprettholdelsen av både immunologisk forsvar og homeostase av blodceller hos fisk (38).

Hos fisk som er eldre, har sultet eller hos fisk som har gjennomgått en infeksjon, kan det observeres store ansamlinger av melanomakrofager i milten. Melanomakrofagene har en viktig rolle i å fjerne nedbrytningsprodukter fra skadet celler og annet avfallsmateriale fra milten. Fargen kan derfor variere fra lys og gyllen (ceroid og lipofuscin), til mørk brun (melanin og hemosiderin). I tilfelle av toksiske eller septiske tilstander, kan melanomakrofagene bryte, og dette kan føre til at melaninkornene sprer seg utover parenkymet, det funksjonelle vevet i milten (38).

1.2.6 Milten anatomi og oppbygging

1.2.6.1 Milten anatomi

Fisk mangler lymfeknuter og beinmarg, som er vanlige lymfoide organer hos pattedyr. Imidlertid har fisk alternative immunologiske organer, blant annet milten, som utfører lignende funksjoner. Fiskens immunceller er lokalisert i disse lymfoide organene (38). Hos fisk ligger milten bak magesekken og har en mørkerød farge (38). Den er omgitt av en kapsel dannet av kubisk epitel og tynt bindevev (39). Frisk milt skal være velavgrenset og ha skarpe kanter. Avrunding av kantene kan være uttrykk for at milten er svullen og kan være et tegn på inflammasjon (38).

Anatomisk kan milten deles inn i to hoveddeler; rød pulpa og hvit pulpa. Den røde pulpaen utgjør den største delen av milten, og er erytrocyttproduserende med blodfylte små kanaler, kalt sinusoider. Rød pulpa inneholder forskjellige typer immunceller, slik som makrofager og lymfocytter. Disse cellene er viktige i forsvar mot sykdommer (38).

Den hvite pulpaen består av leukocytter og inneholder to spesielle strukturer; melanomakrofagersentre og ellipsoider. Melanomakrofagersentrene består av ansamlinger av celler som inneholder ulike pigmenter, der melanin gir dem mørk farge. Ellipsoidene er enden av arterioler og har spesielle celler, vevsmakrofager, som kan fange opp fremmede substanser i blodet, for eksempel bakterier eller virus. Disse fagocytene spiller en viktig rolle i immunforsvaret ved å vandre til melanomakrofagersentrene, der de fungerer som antigenpresenterende celler overfor T-lymfocytene (38). Ellipsoidene, som representerer den terminale delen av arteriolene i milten hos fisk, er kledd med entodel. Disse strukturene er sårbare for skade forårsaket av toksiner (38).

Celletypene i milt hos atlantisk laks inkluderer blant annet granulocytter, makrofager, NK-celler, mastceller, erytrocytter og T- og B-celler (40,41).

1.2.6.2 Fiskens immunsystem

Fiskens immunforsvar kan kategoriseres i to hovedkomponenter; Det innate- og det adaptive immunsystemet. Det innate immunsystemet er første forsvarsmekanisme mot mikroorganismer, og inkluderer celler som granulocytter, makrofager og naturlige dreperceller (NK-celler). Det adaptive immunsystemet karakteriseres av en mer målrettet og forsinket respons mot patogener, og involverer hovedsakelig T- og B-lymfocytter (42,43).

1.2.6.2.1 Innate immunforsvaret

Ved en infeksjon eller vevsskade aktiveres immunsystemet, og granulocytter og makrofager strømmer til betennelsesstedet som respons på kjemotaksiner. Fagocytosehastigheten, prosessen med å fange og fordøye fremmede partikler, øker spesielt hvis mikroorganismer allerede er merket med antistoffer eller komplementfaktorer gjennom opsonisering. Når mikroben er fanget inne i et fagosom, smelter det sammen med andre vesikler som inneholder ulike toksiske eller bakteriedrepende stoffer. Disse stoffene inkluderer blant annet hydrogenperoksid, superoksid og andre reaktive oksygenarter (ROS), i tillegg proteaser, lipaser og karbohydratnedbrytende enzymer. Disse stoffene bryter ned mikroorganismer, og bidrar til å opprettholde fiskens immunforsvar (38).

Melanomakrofager er en type leukocyt og kan normalt forekomme i nyrene og milt hos frisk fisk, og i økende volum ved ulike betennelsestilstander hos syke eller eldre fisk (44).

Melanomakrofager kan opptre i sentre, hvor flere melanomakrofager samles.

Melanomakrofagsentre fungerer primært som metabolske avfallsdepot, hvor disse sentrene inneholder pigmentene melanin, hemosiderin og lipofuscin (44,45). Pigmentene har ulike funksjoner. Melanin i melanomakrofager har evne til å absorbere og nøytralisere avfallsstoffer (44). Det kan også binde og inaktivere jern og andre tungmetaller. På grunn av melaninets evne til å absorbere fremmedstoffer, kan det forekomme opphopninger av tungmetaller og toksiner i vev hos fisk med høy forekomst av melanomakrofager (46). Hemosiderin i melanomakrofager oppstår som et resultat av jernfrigjøring når erytrocytter brytes ned i rød pulpa (44,47). Lipofuscin produseres ved oksidativ polymerisering av flerumettede fettsyrer hos fisk, ofte som et resultat av mangelfull ernæring (48). Melanomakrofagsentre har blitt foreslått å bli brukt som biomarkør for vannkvalitet for spesifikke faktorer slik som

oksygenmengde og kjemisk forurensing. De er godt egnet som biomarkør da sentrene øker i mengde og størrelse i vevet ved stress, og kan dermed observeres histologisk (44).

Fisk har evne til å spontant drepe ulike typer bakterier og parasitter, i tillegg til virusinfiserte celler og kreftceller (49). NCC (*Nonspecific Cytotoxic Cells*) hos teleost og amerikansk elvemalle, foreslås å ha mye av de samme funksjonene som NK-celler hos pattedyr (50). NCC tilhører det innate immunforsvaret og har funksjoner inkludert gjenkjennelse samt binding av patogene molekyler. NCC ligner også NK-celler ved destruksjon gjennom ulike signalveier (49,51). NCC kan drepe mer enn en målcelle, som gjør de mer effektive i å lysere enn vanlige cytotoxiske celler (38).

1.2.6.2.2 Adaptive immunsystemet

Lymfocytene, inkludert T-lymfocytter og B-lymfocytter, har en viktig rolle i immunsystemet. Disse cellene er ansvarlige for å gjenkjenne spesifikke antigener fra fremmede stoffer eller organismer, og for å initiere immunresponser. T-lymfocytter er viktig for å utføre cellemedierte immunresponser, mens B-lymfocytter produserer antistoffer som kan binde seg til antigener. Samlet sett er lymfocytene viktig for å opprettholde forsvar mot infeksjoner og sykdommer hos fisk (38).

1.2.6.3 Erytrocytter

Det er forskjeller i morfologien til erytrocytter mellom fisk og pattedyr. Fiskens erytrocytter inneholder cellekjerne, som er fraværende i erytrocytter til pattedyr. I tillegg er størrelsen på fiskens erytrocytter større og har en mer oval form. Kjernene i erytrocytter regulerer cellens respons på ytre stimuli og dens evne til å tilpasse seg endringer i miljøet. Erytrocytter hos både fisk og pattedyr er hovedsakelig ansvarlig for transport av oksygen i kroppen ved hjelp av hemoglobin. Hos fisk, spesielt atlantisk laks, spiller erytrocytter en kritisk rolle i oksygentransporten og har evne til å regulere kroppens respons på endringer i oksygenkonsentrasjonen i miljøet (52–54). Histopatologi er en god metode for å påvise patologisk endring.

1.2.7 Forbehandling av histologisk materiale

Prosessen med å anvende histopatologi starter med innsamling og forbehandling av prøvemateriale fra vev. Forbehandlingen begynner med et fikseringssteg som bidrar til immobilisering og stabilisering av vevet. Dette vil hindre at indre og ytre faktorer påvirker vevet (55).

Etter vevet er fiksert, skal det makrobeskrives via diktering og makrobeskjæres. I en makrobeskrivelse, blir vevet beskrevet etter mengde, mål, vekt, form og utseende. Vevet makrobeskjæres til riktig størrelse, tilpasset kassetene for fremføring. Vevsbiten kan også merkes for å gi informasjon om retningen i forhold til opprinnelig plassering i kroppen. Orientering er viktig under innstøping (55).

Neste steg er fremføring av vevet som innebærer ytterligere fiksering, dehydrering, klaring og parafinimpregnering. Dehydrering innebærer å erstatte vann og fikseringsmiddel i vev med hydrofobe stoffer, slik som etanol. Vevsbiten senkes i gradvis økende konsentrasjon av etanol, fra 70% etanolløsning til absolutt etanol, for å fjerne vannløselige stoffer. Klaring er en prosess der man erstatter dehydreringsmiddelet med et klaringsmiddel. Ofte er xylen brukt som klaringsmiddel, fordi det fungerer som et bindeledd mellom dehydreringsmiddelet og parafin. Parafinimpregnering betyr å erstatte klaringsmiddelet med flytende parafin og gjør vevet klart til innstøping (55).

Under innstøping blir vevet orientert og plassert i en metallisk støpeform. Flytende parafin tilsettes og vevsbiten dekkes. Parafinen rundt vevet stivner ved plassering av formen på en kjøleplate. Etter innstøping er vev i parafinblokker klart til å snittes til tynne vevssnitt ved bruk av et mikrotom og overføres til objektglass. Tykkelsen på snittene avhenger av vevstype og hvilken fargemetode som skal benyttes (55)

Når snitt er på objektglass, er vevet klart til å farges. Hvilken fargemetode en velger å farge vevet med, er basert på hva man ønsker å detektere. Hver fargemetode har mål om å farge en spesifikk struktur eller komponent (56). For å beskytte vevet mot uttørking og mekanisk påvirkning, blir et dekkglass montert over snittet etter farging. Til slutt benyttes et lysmikroskop for å kontrollere og vurdere fargen i vevet (55).

1.2.8 Fargemetoder

1.2.8.1 HES fargemetode

Fargemetoden HES benyttes som en standard fargemetode for å gi et overordnet bilde av vevet. Metoden benyttes spesielt for å fremheve generelle strukturer i vevet. HES er en trikromfarge og består av fargene hematoxylin, erytrosin og safran (57).

Hematoxylin fungerer som kjernefarge, men er selv ikke et fargestoff. Derimot vil det ved oksidasjon fremstilles hematein, som er et fargestoff. Hematein trenger aluminium som bindeledd for å binde seg til negativt ladde nukleinsyrer i DNA. Denne bindingen vil gi rød farge til kjerner med nukleinsyrer. Videre blir snittet skylt i springvann, blåning, og på grunn av avspaltning av H^+ -ioner fra hemateinet, vil kjernene farges blå. Vevet farges i en bestemt tid, og kalles dermed en progressiv fargemetode (57).

Erytrosin er et anion fargestoff og en svak syre. Erytrosin danner ionebindinger med de positivt ladet NH_3^+ -gruppene i proteinene som finnes i cytoplasmaet. Denne interaksjonen oppstår fordi proteinene har en positiv ladning ved samme pH-verdi som fargestoffet anvendes. Bindingen av fargestoffet til disse gruppene resulterer i en rosa til rød farge, som gir god kontrast mot den blåfargen produsert av hematoxylin. Erytrosin farger spesifikt komponenter som cytoplasma, erytrocytter, og muskelfibre i røde nyanser (57).

Safran består av et stort fargestoff kalt crocin, og via Van der Waalske krefter binder det seg til kollagenfibre. Fargestoffet utkonkurrerer erytrosin som er et mindre fagemolekyl og farger løst bindevev gult (57).

1.2.8.2 Rhodanin fargemetode

Rhodanin fargemetode er en spesialfarge brukt for å påvise tilstedeværelse av kobbernedslag i vev. Rhodanin vil farge små kobberkorn rødbrune ved tilstedeværelse i cytoplasma, og galle farges grønt. Kobber finnes normalt i ulike vev og er ofte en komponent i enzymreaksjoner. Likevel gir kobber normalt ikke utslag i reaksjon med farge, fordi det forekommer i små mengder. Rhodanin vil dermed påvise økt kobbernedslag, slik som i lever og hjerne hos mennesker (Vedlegg 1).

1.2.8.3 Fargemetoden Perl

Fargemetoden Perl benyttes for å detektere jernavleiringer i vev. Jern er vanligvis bundet til proteiner som ferritin, hemosiderin og hemoglobin i vev. Disse kan identifiseres gjennom farging med Perl. Uten bruk av fargeteknikk har ikke jernpigment sterk nok egenfarge for diagnostiske formål, og man benytter derfor metoder slik som fargemetoden Perl. I ferritin og hemosiderin er jern løst bundet i form av Fe^{3+} , som kan detekteres hvis pH-verdien er tilstrekkelig lav. Ved lav pH vil bindingene mellom jern og protein spaltes, og jernionene vil reagere med ferrocyanid-ionene i løsningen. Dette fører til dannelsen av et tungoppløselig kompleks, kalt berlinerblå, og jernavleiringene blir synlige. Kjernefødt benyttes som kjernefarge i vevet, ofte i kombinasjon med aluminium for å farge kjerner rødt (57).

1.2.8.4 Fargemetoden Giemsa

Fargemetoden Giemsa er et blått fargestoff sammensatt av metylenazid og eosin. Metylenazid er metakromatisk, som vil si at det har egenskaper til å gi ulike nyanser av en farge. Eddiksyre brukes til å fjerne overskudd av blått for å fremheve de ulike elementene (58).

De forskjellige cellekjerner får ulike nyanser av blåfarge på grunn metylazid, mens cytoplasma farges i ulike nyanser av rødt på grunn av eosin. På denne måten kan fargemetoden danne ulike fargenyanser, som igjen gjør det mulig å differensiere ulike celletyper og cellulære komponenter (59). Fargemetoden Giemsa kan også påvise tilstedeværelse av mikroorganismer (Vedlegg 2).

2. Material og metode

2.1 Material

Materialet til studien ble hentet fra et forsøk utført av det pågående forskningsprosjektet «Bruk av kobberimpregnerte nøter i fiskeoppdrettsnæringen – konsekvenser for fiskehelse, bærekraft og produktivitet» av Universitetet i Bergen. Smolt av atlantisk laks (ca. 250 g) ble akklimatisert i en 2500 liter tank ved 12 °C i 30 dager. For å evaluere effekten av kobbereksposering, ble laks distribuert i 9 ulike tanker. Tank 1, 2 og 3 utgjorde en kontrollgruppe uten tilsatt kobber. Tank 6, 7 og 8 ble tilsatt $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ til en endelig konsentrasjon av ca. 1,37 µg/l kobber. Tank 9, 10 og 11 ble tilsatt $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ til en endelig konsentrasjon av ca. 10,29 µg/l kobber. Konsentrasjonene ble fastsatt ut ifra kjent litteratur om andre relevante målinger av konsentrasjoner i fjorder rundt oppdrettsanlegg som ble bekreftet gjennom kjemiske analyser av vannprøver.

Eksponeringen foregikk kontinuerlig uten forstyrrelser i 50 dager. På dette tidspunktet ble det gjennomført en prøvetaking. Fôret ble endret til et som inneholdt en markør for fordøyelighet (yttrium), med tanke på en fordøyelsesprøvetaking planlagt til uken etter. Ved prøvetaking på dag 50 ble det lagt merke til abnormaliteter på milt, og det ble derfor planlagt at milt skulle høstes ved neste prøvetaking. Etter 55 dager eksponering ble milt høstet fra tre individ i kontrollgruppen (alle fra tank 1), tre individ eksponert for ca. 1,37 µg/l kobber (en fra tank 6, en fra tank 7 og en fra tank 8) og tre individ eksponert for ca. 10,29 µg/l kobber (en fra tank 9 og to fra tank 11). Tallene gitt individene er brukt for å sikre overenstemmelse med resten av forskningsprosjektet.

Tabell 1: Tabell viser hvilket fiskeindivid som har oppholdt seg i hvilket kar og med gjennomsnittlige målt kobbernivå i karet.

Individ og kar	Gjennomsnitt målt kobbernivå (µg/L)	Eksponeringsnivå	Kommentar
55 (kar 1)	<0,5	Ingen (kontroll)	Lite vevsmateriale
56 (kar 1)	<0,5		
57 (kar 1)	<0,5		
59 (kar 6)	1,37	Lav	
71 (kar 7)	1,37		
84 (kar 8)	1,37		
66 (kar 9)	10,29	Høy	
88 (kar 11)	10,29		
89 (kar 11)	10,29		

2.2 Forbehandling av prøvemateriale

Prøvemateriale ble fiksert i *BiopSafe* når det ble tatt ut i Bergen. Biopsien ble plassert i en *BiopSafe*, som er en liten beholder med formalin innkapslet i lokket. Ved å trykke ned på toppen av *BiopSafe*, ble 4% formaldehydløsning (formalin) frigjort og vevsbiten dekket (60,61).

Videre ble vevet makrobeskjært, fremført og innstøpt av Tora Bardal ved NTNU i Trondheim, før bachelorgruppen mottok materialet i blokker. Vevet ble makrobeskjært til en størrelse som passet kassetten det lå i under fremføringen. Ved fremføring ble vevet overført til innstøpningskassetter, dehydrert og innfiltrert med paraffin i *Leica TP1020* (62). På *Leica TP1020* ble program 3 brukt og vevet startet i stasjon 3 med 80% etanol (tabell 2).

Tabell 2: Fremgangsmåte ved *Leica TP1020-Programming Worksheet; Program 3*.

Posisjon	Reagens
1	Ingen reagens
2	70% EtOH
3	80% EtOH nr I
4	80% II
5	96% I
6	96% II
7	100% I
8	100% II
9	TissueClear i
10	TissueClear II
11	Paraffin
12	Paraffin

2.3 Snitting

Ved bruk av et mikrotom med vannsklie med 40 °C på vannet, ble de 9 blokkene med prøvemateriale trimmet på 10-15 µm. Trimming var avgjørende for å avdekke vevet på blokken, slik at hele vevet skulle komme tydelig frem ved finsnitting. Før finsnittingen ble blokkene lagt på en kjøleplate for å lettere oppnå fine vevssnitt. God kvalitet på vevssnittene er avgjørende for et optimalt fargerresultat. Det er viktig at vevssnittene inneholder minst mulig folder og rifter. For å oppnå dette ble det ofte byttet til ny skarp kniv, noe som også gjorde det enklere å få tynne og fine vevssnitt. Det var viktig at vevssnittene ikke ble mer enn et cellelag tykt under finsnittingen, for enklere mikroskopering. Tykkelsen på vevssnittene ble justert avhengig av fargemetode.

Til fargemetoden HES ble det snittet på 2 µm og laget 3 vevssnitt fra hver blokk lagt på *Microscope Slides Cut Edges Frosted*-objektglass. Ved fargemetoden Rhodanin, ble det snittet på 3 µm og laget 3 vevssnitt fra hver blokk lagt på *Superfrost Microscope Slides*-objektglass. Fargemetoden Perl krever snitt på 5 µm og det ble snittet 1 vevssnitt fra hver blokk lagt på *Superfrost Microscope Slides*-objektglass. Ved fargemetoden Giemsa ble det snittet på 3 µm og laget 2 vevssnitt fra hver blokk lagt på *Microscope Slides Cut Edges Frosted*-objektglass (Tabell 3).

Blokk 56 ble ikke snittet til Perl og Giemsa da det var for lite materiale igjen i blokka. Det resterende materialet ble prioritert til HES og Rhodanin.

Tabell 3: Oversikt over fargemetode, blokk og snitt pr. fargemetode. Fargemetode med tilhørende snitt markert i rødt er brukt til digital patologi.

Kobbereksponering	Blokk	Snitt 1	Snitt 2	Snitt 3	kommentar
Ingen (kontrollgruppe)	55	55-1: HES, Rhodanin, Perl, Giemsa	55-2: HES, Rhodanin	55-3: HES, Rhodanin	
	56	56-1: HES, Rhodanin	56-2: HES, Rhodanin	56-3: HES, Rhodanin	Hull i blokken
	57	57-1: HES, Rhodanin, Perl, Giemsa	57-2: HES , Rhodanin	57-3: HES, Rhodanin	
Medium	59	59-1: HES, Rhodanin, Perl, Giemsa	59-2: HES, Rhodanin	59-3: HES, Rhodanin	
	71	71-1: HES, Rhodanin, Perl, Giemsa	71-2: HES, Rhodanin	71-3: HES, Rhodanin	
	84	84-1: HES, Rhodanin, Perl, Giemsa	84-2: HES, Rhodanin	84-3: HES, Rhodanin	
Høy	66	66-1: HES, Rhodanin, Perl, Giemsa	66-2: HES, Rhodanin	66-3: HES, Rhodanin	
	88	88-1: HES, Rhodanin, Perl, Giemsa	88-2: HES, Rhodanin	88-3: HES, Rhodanin	
	89	89-1: HES, Rhodanin, Perl, Giemsa	89-2: HES, Rhodanin	89-3: HES , Rhodanin	

2.4 Fargemetoder

2.4.1 Avparafinisering og rehydrering

Før farging av alle vevssnittene ble parafin fjernet med avparafinisering. Vevssnittene ble dyppet 2 minutter i to xylenbad og deretter startet rehydreringsprosessen. Vevssnittene ble ført gjennom en serie med alkoholbad med avtagende konsentrasjon, som starter med 1 minutt absolutt alkohol, deretter 1 minutt 96% alkohol og 1 minutt 70% alkohol. Til slutt skylles snittene 1 minutt i vann (57).

2.4.2 Dehydrering

Dehydreringsprosess fjerner vann fra snittet som kan forstyrre mikroskoperingen. Etter farging blir vevssnittene dyppet i 30 sekund, i økende grad av alkohol, 70%, 96% til absolutt alkohol. Det ble dyppet i absolutt alkohol i to ulike bad. Til slutt ble det dyppet i xylen. For å beskytte vevet mot uttørking og mekanisk påvirkning, blir et dekkglass montert over snittet etter farging.

2.4.3 HES

Fargemetoden HES er en standard fargemetode som ble brukt for å for å gi en overordnet fremstilling av vevet og muliggjør identifikasjon av ulike strukturer i vevet (63). Ved fargemetoden HES ble det snittet på 2 μm og lagt på *Microscope Slides Cut Edges Frosted*-objektglass (Vedlegg 3).

2.4.3.1 Material

- Mayer Hematoxylin (lotnr: 220310C001)
- Erytrosin
- Safran (lotnr: L72026)
- Xylen (batch nr: NO02414830)
- Absolutt alkohol
- 96% alkohol
- 70% alkohol
- Destillert vann

2.4.3.2 Metode

Vevssnittene ble dyppet i hematoxylin (Cyt) i 4 minutter for å farge cellekjerner. Deretter ble de blånet i springvann i 5 minutter. Etter dette ble vevssnittene dyppet i erytrosin i 1 minutt. Etter en kort skylleprosess i vann (x2 i 15 sekund), ble prøvene dyppet i alkohol 70% i 30 sekund, 96 % i 30 sekund og absolutt alkohol i 30 sekund, før de ble farget i safran i 1 minutt. Etterpå ble vevssnittene igjen behandlet med absolutt alkohol, 30 sekund i to kar. Til slutt ble vevssnittene dyppet i xylen før montering for mikroskopisk analyse (Vedlegg 3).

2.4.4 Rhodanin

Rhodanin fargemetode ble brukt for å detektere tilstedeværelse av eventuell kobber i vevet. Ved fargemetoden Rhodanin ble det snittet på 3 µm og lagt på *Superfrost Microscope Slides*-objektglass (Vedlegg 1).

2.4.4.1 Material

- Rhodanin stamløsning
- Etanol
- Xylen (batch nr: NO02414830)
- Mayer Hematoxylin
- 5-(4-dimethylaminobenzylidene) Rhodanin (R3)
- Destillert vann

2.4.4.2 Metode

Først ble Rhodanin bruksløsning laget av Rhodanin stamløsning og destillert vann. For å lage 250 ml Rhodanin bruksløsning, som tilsvarer et kar, ble 235 ml stamløsning blandet med 15ml destillert vann. Det ble laget to Rhodanin bruksløsninger for tilsvarende to kar for å få plass til totalt 27 vevssnitt. Rhodanin-bruksløsningen inkuberte i varmeskap i 30 minutter ved 60°C. Snittene sto i Rhodanin bruksløsning i varmeskap i 3 timer ved 60 °C. Videre ble vevssnittene vasket godt i destillert vann. Deretter ble vevssnittene farget med hematoxylin (Mayer) i 1 minutt og blånet i 5 minutt (Vedlegg 1).

Tabell 4: Snittene til Rhodanin fargemetode ble fordelt i to kar, inkludert kontrollsnitt.

Kar 1	Kar 2
kontrollsnitt 1	kontrollsnitt 2
88-1	89-2
66-1	89-3
84-1	57-2
55-1	57-3
55-3	59-3
71-1	71-2
73-3	88-3
59-2	55-2
56-1	66-3
56-2	84-2
57-1	84-3
89-1	66-2
	88-2
	56-3

2.4.5 Perl

Fargemetoden Perl ble brukt for å påvise og vurdere eventuelt jernavleiringer i vevet. Ved fargemetoden Perl fargemetode ble vev snittet på 5 μm og lagt på *Superfrost Microscope Slides*-objektglass (Vedlegg 4).

2.4.5.1 Material

- Kaliumhexacyanoferrat(III) (Bestillingsnr: 104973100)
- 2% HCl
- 0,5% Kjernerød
- Destillert vann

2.4.5.2 Metode

2% Kaliumferrocyanide ble laget av 2g kaliumhexacyanoferrat(III) og 100 ml destillert vann. Deretter ble Perl løsning laget av 1 del 2% kaliumferrocyanide og 1 del 2% HCl. Perl løsning ble filtrert på vevssnittene i 15 minutter og deretter skylt med destillert vann. Vevssnittene sto

i 0,5% kjerneverd i 5 minutter og skylt med destillert vann. Til slutt ble vevssnittene dehydrert og montert for mikroskopisk analyse (Vedlegg 4).

2.4.6 Giemsa

Fargemetoden Giemsa ble brukt for å differensiere celletyper for å se etter inflammasjon. Ved Giemsa ble vev snittet på 3 µm og lagt på *Microscope Slides Cut Edges Frosted*-objektglass (Vedlegg 2).

2.4.6.1 Material

- May Grunwald bruksløsning
- Giemsa bruksløsning
- Absolutt alkohol
- Iseddik (konsentrert eddiksyre)
- Xylen
- Destillert vann

2.4.6.2 Metode

May Grunwald bruksløsning ble laget av 25 ml May Grunwald-stamløsning og 25 ml rensa vann. Videre ble Giemsa bruksløsning laget av Giemsa-stamløsning og destillert vann. For å lage omtrent 50 ml av bruksløsningen, som tilsvarer et lite kar, ble 3ml Giemsa stamløsning blandet med 51ml destillert vann. Deretter ble det laget absolutt alkohol med iseddik av 200ml absolutt alkohol og 6 ml iseddik (konsentrert eddiksyre). Videre ble vevssnittene satt i May Grunwald bruksløsning i 6 minutter og dyppet 8 ganger i absolutt alkohol. Vevssnittene ble så dyppet 6 ganger i absolutt alkohol med eddiksyre, og 2 dypp i absolutt alkohol før vevssnittene ble ført i til xylen. Til slutt ble vevssnittene montert (Vedlegg 2).

2.5 Digital patologi

Digital patologi er et verktøy som innebærer skanning av objektglass og digitalisering av vevssnitt (64). Digital patologi ble benyttet for å oppnå best mulig oppløsning av mikroskopiske bilder, da det var vanskelig å se spesifikke fargenedslag med vanlig lysmikroskopi. Det ble vurdert mest hensiktsmessig å fremkalle digitale bilder av vevssnitt fra kontrollgruppen og høy eksponeringsgruppe, ut ifra en antakelse om at disse eksponeringsgruppene ville gi størst kontrast.

Vevssnitt fra kontrollgruppen og høy eksponeringsgruppe ble valgt ut og farget med HES-, Perl- og Giemsa-fargemetode. For Rhodanin fargemetode ble vevssnitt fra alle eksponeringsgruppene valgt, da dette var nødvendig for telling av antall aggregat og besvarelse av problemstillingen (tabell 5).

Tabell 5: Oversikt over fargemetode, blokk og snitt pr. fargemetode. Fargemetode med tilhørende snitt markert i rødt er brukt til digital patologi.

Kobbereksposering	Blokk	Snitt 1	Snitt 2	Snitt 3	kommentar
Ingen (kontrollgruppe)	55	55-1: HES, Rhodanin, Perl, Giemsa	55-2: HES, Rhodanin	55-3: HES, Rhodanin	
	56	56-1: HES, Rhodanin	56-2: HES, Rhodanin	56-3: HES, Rhodanin	Hull i blokken
	57	57-1: HES, Rhodanin, Perl, Giemsa	57-2: HES , Rhodanin	57-3: HES, Rhodanin	
Medium	59	59-1: HES, Rhodanin, Perl, Giemsa	59-2: HES, Rhodanin	59-3: HES, Rhodanin	
	71	71-1: HES, Rhodanin, Perl, Giemsa	71-2: HES, Rhodanin	71-3: HES, Rhodanin	
	84	84-1: HES, Rhodanin, Perl, Giemsa	84-2: HES, Rhodanin	84-3: HES, Rhodanin	
Høy	66	66-1: HES, Rhodanin, Perl, Giemsa	66-2: HES, Rhodanin	66-3: HES, Rhodanin	
	88	88-1: HES, Rhodanin, Perl, Giemsa	88-2: HES, Rhodanin	88-3: HES, Rhodanin	
	89	89-1: HES, Rhodanin, Perl, Giemsa	89-2: HES, Rhodanin	89-3: HES , Rhodanin	

2.6 Metode for kobbertelling

For å kvantifisere mengden aggregat i forskjellige vevsblokker, ble det implementert en metode for kobbertelling. Denne statistiske tilnærmingen ble bestemt for å støtte videre analyser relatert til prosjektet, og for å sammenligne vevsbitene med henholdsvis kontroll, mellom- og høy kobbereksponering.

I forberedelsen av metoden, ble det utarbeidet en detaljert plan for å maksimere standardiseringen av tellingen. Det ble avgjort at alle vevssnitt farget med Rhodanin skulle inkluderes i analysen for å sikre et omfattende datagrunnlag. For å minimere effekten av tilfeldige variasjoner i synsfeltet, ble det bestemt at to synsfelt per snitt skulle evalueres. Disse synsfeltene ble bestemt å være i nedre hjørnet til venstre, og øvre hjørnet til høyre.

Det ble bestemt å utføre mikroskopisk undersøkelse med 10x forstørrelse i stedet for 40x forstørrelse. Dette valget var basert på tidligere observasjoner som viste at aggregatene varierte betydelig i størrelse. Med 40x forstørrelse ble det klart at de større aggregatene bestod av flere mindre korn, noe som var vanskelig å skille ved lavere forstørrelser. Likevel ble 10x forstørrelse valgt som mer hensiktsmessig, da små korn utgjorde en relativt liten del av aggregatene som ble observert i snittet. Videre ga 10x forstørrelse et større synsfelt av snittet sammenlignet med 40x forstørrelse, og ga derfor et mer representativt bilde av snittet (Vedlegg 6).

Mikroskoperingen ble utført over en periode på to dager av samme person for å sikre konsistent evaluering av hvert synsfelt. Observasjonene fra mikroskoperingen ble telt som ett totalt antall aggregat i vevet, uten videre klassifisering. Størrelsen på ulike aggregater varierte betydelig. Aggregater som viste tydelige segmenteringer, ble telt som flere individuelle aggregat som var bundet sammen til større enheter. Noen aggregat viste tegn til oppløsning, karakterisert ved tilstedeværelse av mange separate og lysere korn rundt et sentralt mørkere aggregat. Enkeltstående korn ble kun inkludert i tellingen dersom de tydelig kunne skilles fra hverandre uten å være fysisk bundet (Vedlegg 6).

2.7 Statistikk

For å kvantifisere og sammenligne kobberakkumulasjonen mellom ulike eksponeringsgrupper, ble det gjennomført en kvantitativ metode.

Det ble først beregnet gjennomsnitt av målte verdier for hver blokk innenfor de tre gruppene kontrollgruppen, gruppen med medium- og høy kobbereksponering. Deretter ble et samlet gjennomsnitt beregnet for kontrollgruppen basert på gjennomsnittsverdiene fra hver blokk i denne gruppen. Den beregnede gjennomsnittsverdien ble anvendt som referansestandard, representativ for forventet kobbernivå hos friske fisker ikke eksponert for økt mengde kobber. For hver blokk i de eksponerte gruppene, ble gjennomsnittsverdien delt på referansestandard for å bestemme *fold change*. Denne beregningen ga en relativ verdi som uttrykker kobberakkumulasjon i hver blokk i forhold til kontrollgruppen (Vedlegg 5).

Resultatene av *fold change*-analysen ble deretter visualisert ved bruk av grafisk programvare. Dette muliggjorde en effektiv og klar presentasjon av hvordan kobberakkumulasjonen varierte mellom de forskjellige eksponeringsgruppene sammenlignet med kontrollgruppen.

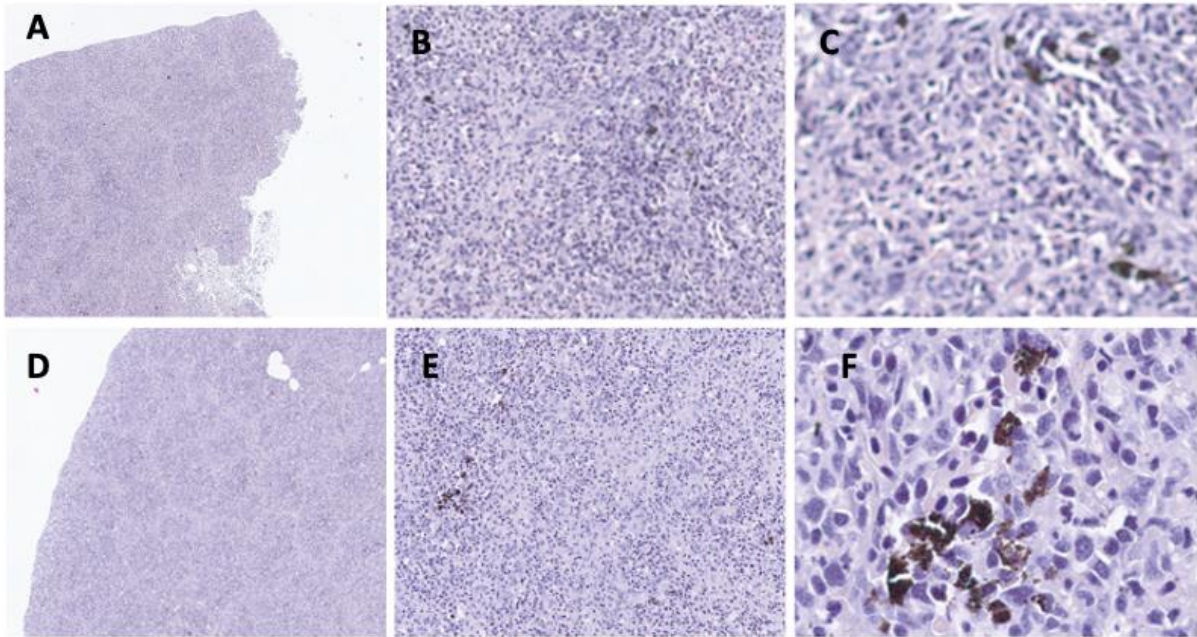
3 Resultater

3.1 HES

HES ble brukt for å vurdere om kobbereksponering påvirker strukturer i vevet. Figur 1 viser representative bilder av HES fargede vevssnitt fra kontrollgruppen og høy kobbereksponering. Hvit pulpa har en mørkere blå-lilla farge og sees som øyer jevnt over vevet (figur 1A og D). Rød pulpa har en lysere lilla farge og ligger som kanaler rundt hvit pulpa, mens cellekjernene er farget tydelig blå (figur 1A og D).

Figur 1A, B og C viser vevssnitt fra kontrollgruppen (57- 2) ved 2.5, 10 og 20x forstørrelse respektivt. Som man kan se ved 10 og 20x forstørrelse, er cellekjernene farget tydelig blå, samtidig ble det observert brun-svarte aggregater i hvit pulpa. Figur 1B og C er noe uklart på grunn av feil ved digital patologi.

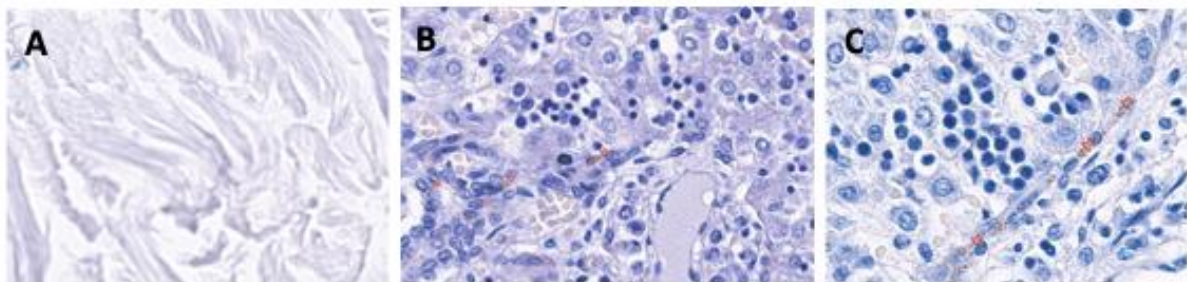
Figur 1D, E og F viser vevssnitt fra høy kobbereksponering (89-3) ved 2.5, 10 og 40x forstørrelse respektiv. Hos individer eksponert for høye nivåer av kobber observeres det at cellekjernene er farget blå (figur 1E og F). Videre ble det observert brun-svarte aggregater av ulik fargenyanse og struktur i hvit pulpa.



Figur 1: Snitt farget med HES. **A)** Snitt 57-2 HES kontrollgruppe, 2,5x forstørrelse. Strukturer med rød og hvit pulpa. Hvit pulpa sees som mørkere lilla/blå øyer, mens rød pulpa er som lysere ganger i vevet. **B)** Snitt 57-2 HES kontrollgruppe, 10x forstørrelse. Brun-svarte aggregater i hvit pulpa og cellekjernene er farget blå. **C)** Snitt 57-2 HES kontrollgruppe, 20x forstørrelse. Brun-svarte aggregater i hvit pulpa og cellekjerner er farget blå. **D)** Snitt 89-3 HES med høy kobbereksponering, 2,5x forstørrelse. Strukturer med rød og hvit pulpa. Hvit pulpa sees som mørkere lilla/blå øyer, mens rød pulpa er som lysere ganger i vevet. **E)** Snitt 89-3 HES med høy kobbereksponering, 10x forstørrelse. Brun-svarte aggregater i hvit pulpa og cellekjerner farget blå. **F)** Snitt 89-3 HES med høy kobbereksponering, 40x forstørrelse. Cellekjerner er farget blå. Observeres brun-svarte aggregater av ulike fargenyanser og strukturer i hvit pulpa.

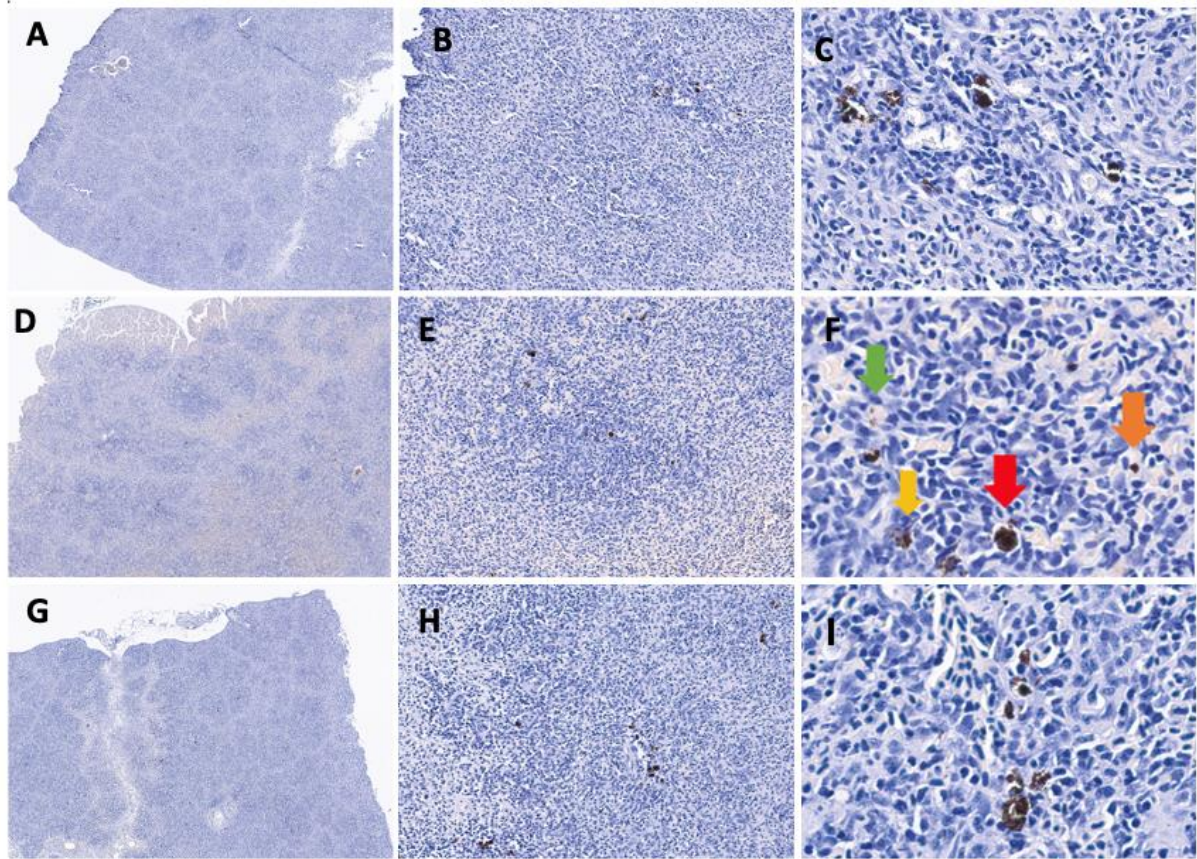
3.2 Rhodanin

For å vurdere om kobbereksponering hadde resultert i akkumulering av kobber i milt, ble det benyttet Rhodanin fargemetode, som skal farge kobbernedslag rød-brune. For å sikre at den spesialiserte fargemetoden fungerte som den skulle, ble vevssnitt fra hud, hvor det naturlig ikke finnes kobber, benyttet som negativ kontroll (figur 2A). To vevssnitt fra lever med forventet kobberinnhold, ble benyttet som positiv kontroll (figur 2B og C). Negativ kontroll viste ingen kobbernedslag i vevssnitt fra hud, slik som forventet. Ved begge positive kontroller ble det observert svake brune kobbernedslag, som indikerer at fargemetoden er pålitelig og man kan stole på fargeresultatene.



Figur 2: Rhodanin kontroller. **A)** Negativ kontroll Rhodanin av hud, 5x forstørrelse. Ikke funn av brune nedslag og kontrollen er godkjent. **B)** Positiv kontroll 1 Rhodanin av lever, 40x forstørrelse. Brune nedslag av kobber og kontrollen er godkjent. **C)** Positiv kontroll 2 Rhodanin av lever, 40x forstørrelse. Brune nedslag av kobber og kontrollen er godkjent.

Figur 3 viser vevssnitt fra alle grupper for kobbereksponering ved 2.5, 10 og 40x forstørrelse respektivt. Det ble observert aggregater ved alle gruppene for kobbereksponering ved mikroskopering. Disse aggregatene var i hovedsak observert i hvit pulpa (figur 3). Videre ble det i alle grupper for kobbereksponering observert mørke aggregater i varierende form og fargenyanser (figur 3C, F og I). Noen av aggregat er runde med homogen mørkebrun farge (figur 3F, rød pil), mens andre er kantete med homogen farge (figur 3F, oransje pil). I tillegg ble det gjort funn av brune aggregater uten en definerbar form, men som besto av noen korn og segmenter (figur 3F, gul pil). Andre aggregater var lysere brune korn (figur 3F, grønn pil).



Figur 3: Snitt farget med Rhodanin. **A)** Snitt 55-2 Rhodanin kontrollgruppe, 2,5x forstørrelse. Strukturene rød og hvit pulpa. Hvit pulpa sees som mørkere lilla/blå øyer, mens rød pulpa er som lysere ganger i vevet. **B)** Snitt 55-2 Rhodanin kontrollgruppe, 10x forstørrelse. Brune aggregater observert i hvit pulpa. **C)** Snitt 55-2 Rhodanin kontrollgruppe, 40x forstørrelse. Brune aggregater med ulike fargenyanser og struktur. **D)** Snitt 59-3 Rhodanin med medium kobbereksponering, 2,5 x forstørrelse. Strukturene rød og hvit pulpa. Hvit pulpa sees som mørkere lilla/blå øyer, mens rød pulpa er som lysere ganger i vevet. **E)** Snitt 59-3 Rhodanin med medium kobbereksponering, 10 x forstørrelse. Brune aggregater observert i hvit pulpa. **F)** Snitt 59-3 Rhodanin med medium kobbereksponering, 40 x forstørrelse. Rød pil peker på aggregat som er rund med en homogen mørkebrun farge. Oransje pil peker på aggregat som er kantete med en homogen mørkebrun farge. Gul pil peker på et brunt aggregat uten definer form, og består av noen korn og segmenter. Grønn pil peker på aggregat som er lysere brune korn. **G)** Snitt 66-3 Rhodanin med høy kobbereksponering, 2,5 x forstørrelse. Strukturene rød og hvit pulpa. Hvit pulpa sees som mørkere lilla/blå øyer, mens rød pulpa er som lysere ganger i vevet. **H)** Snitt 66-3 Rhodanin med høy kobbereksponering, 10x forstørrelse. Brune aggregater observert i hvit pulpa. **I)** Snitt 66-3 Rhodanin med høy kobbereksponering, 40 x forstørrelse. Brune aggregater med ulike fargenyanser og struktur.

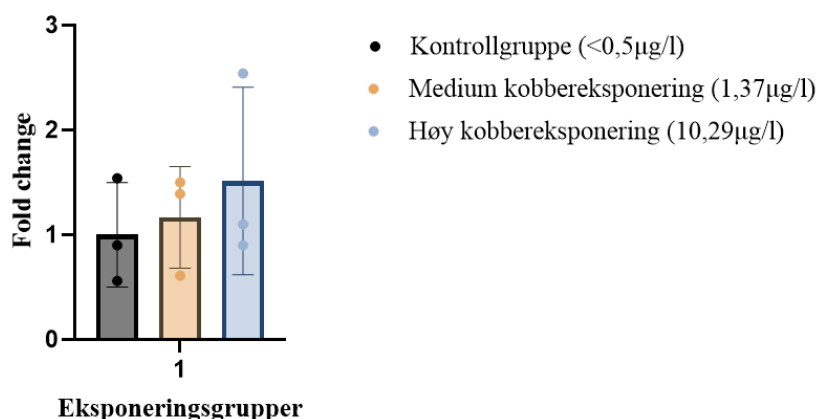
3.3 Telling av kobber ved fargemetoden Rhodanin

For å kvantifisere antall aggregat i alle vevssnitt ble det utført telling. Dette ble organisert i et regneark, hvor total mengde ble beregnet for hver eksponeringsgruppe. Tallene viser et økende antall aggregat fra kontrollgruppe, til medium kobbereksposering og høy kobbereksposering (Tabell 6). Det er også observert en høy intern variasjon innad i eksponeringsgruppene.

Tabell 6: Regnearket viser antall observerte aggregat fra telling, og danner grunnlaget for utregnet statistikk og tallverdier brukt i histogram.

Eksponeringsgrad		Snitt 1		Snitt 2		Snitt 3		Total mengde per gr.
	Synsfelt	1	2	1	2	1	2	
Kontrollgr.	Blokk 55	25	20	40	21	25	22	509
	Blokk 56	6	29	14	16	16	14	
	Blokk 57	44	37	56	15	46	63	
Medium gr.	Blokk 59	21	13	16	10	22	22	595
	Blokk 71	41	34	41	41	33	46	
	Blokk 84	28	39	18	31	22	117	
Høy gr.	Blokk 66	26	22	27	33	20	24	770
	Blokk 88	64	71	69	104	66	57	
	Blokk 89	55	26	30	23	38	15	

De ulike søylene i figur 4, representerer kontrollgruppen (< 0,5 µg/l), medium kobbereksposering (1,37 µg/l) og høy kobbereksposering (10,29 µg/l). Søylene visualiserer forskjellene mellom gruppene. *Fold change* for kontrollgruppen er satt til 1, og de andre eksponeringsgruppene blir sammenlignet med denne verdien. For gruppen med medium eksponering ble gjennomsnittlig *fold change* beregnet til 1,16. For gruppen med høy eksponering var gjennomsnittlig *fold change* 1,51 (Vedlegg 5).



Figur 4: Histogrammet viser antall aggregat i forhold til eksponeringsgrad. Dataene er basert på statistiske beregninger fra vedlegg 5

Tabell 7 viser sammendrag fra ANOVA. Sammendraget viser en F-verdi på 0,4808 og en P-verdi på 0,6402. F-verdien viser at forskjellene mellom gruppegjennomsnittene er liten sammenlignet med intern variasjon i gruppene. Gitt at P-verdi er satt til $<0,05$, viser beregnet P-verdi at det ikke er signifikant differanse mellom eksponeringsgruppene.

Tabell 7: ANOVA- sammendrag viser at det ikke er en signifikant forskjell mellom gruppene. F-verdi: 0,4808, P-verdi: 0,6402. P-verdi sammendrag: Ingen signifikant. Det er ingen signifikant differanse mellom gjennomsnittene for de forskjellige eksponeringsgruppene

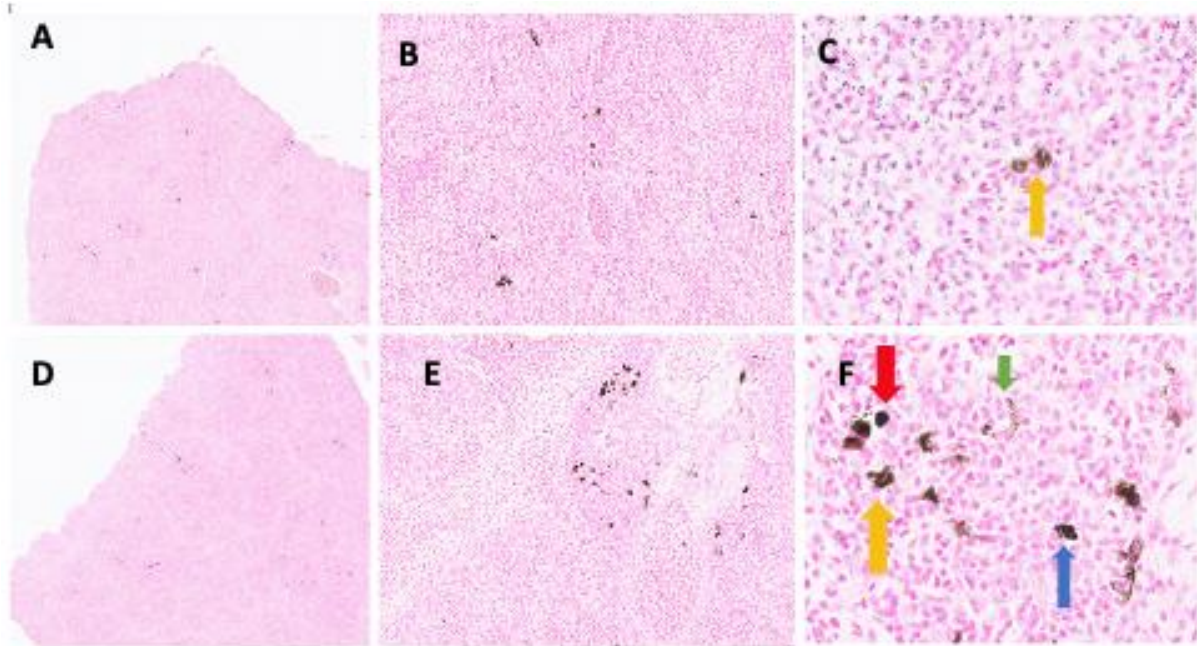
ANOVA-sammendrag	
F-verdi	0,4808
P-verdi	0,6402
P-verdi sammendrag	Ingen signifikant
Signifikant differanse mellom gruppegjennomsnittene	Nei

3.4 Perl

Perl fargemetode ble benyttet for å påvise eventuelle jernavleiringer i vevet som kan komme fra melanomakrofager.

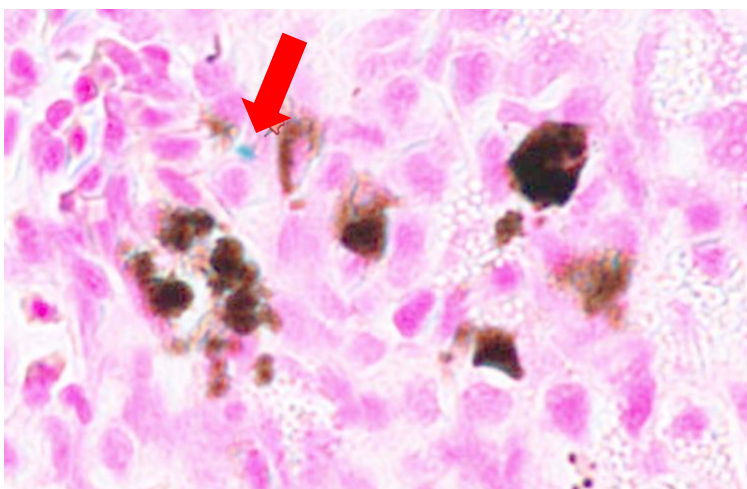
Figur 5A, B og C viser vevssnitt fra kontrollgruppen (55) ved 2.5, 10 og 40x forstørrelse respektivt. Figur 5B viser brune aggregater i varierende størrelse og form. Videre viser figur 5C at cellekjernene er farget rød og gul pil peker på brune aggregater med svakt blått pigment. Aggregatene har en rund og segmentert med granulater. I resten av cellebildet er det uspesifikke blå nedslag.

Figur 5D, E og F viser vevssnitt fra høy kobbereksponering (66) ved 2.5, 10 og 40x forstørrelse respektivt. Som man kan se ved 10 og 40x forstørrelse, er cellekjernene farget rød. Det er også observert flere brune aggregater (figur 5E og F). Rød pil (figur 5F) peker på mørkt aggregat med svakt blått pigment og en rund, kompakt struktur. Videre peker blå pil (figur 5F) på aggregat med svakt blått pigment og har en kantet struktur. Grønn pil (figur 5F) peker på aggregater i form av lysere brune korn, og gul pil (figur 5F) peker på aggregat med fragmentert form.



Figur 5: Snitt farget med Perl. **A)** Snitt 55 perl kontrollgruppe, 2,5 x forstørrelse. Strukturene rød og hvit pulpa, og en utførselsgang til høyre i bildet. **B)** Snitt 55 Perl kontrollgruppe, 10 x forstørrelse. Brune aggregater i varierende størrelse og form. **C)** Snitt 55 Perl kontrollgruppe, 40 x forstørrelse. Cellekjernene er farget rød. Gul pil peker på brune aggregater med svakt blått pigment. Aggregatene har en rund og segmentert med granulater. I resten av cellebildet er det uspesifikke blå nedslag. **D)** Snitt 66 Perl med høy kobbereksponering, 2,5 x forstørrelse. Strukturene rød og hvit pulpa. **E)** Snitt 66 Perl med høy kobbereksponering, 10 x forstørrelse. Brune aggregater i varierende størrelse og form. **F)** Snitt 66 Perl med høy kobbereksponering, 40 x forstørrelse. Cellekjernene er farget rød. Det er flere brune aggregater. Rød pil peker på mørkt aggregat med svakt blått pigment og en rund, kompakt struktur. Blå pil peker på aggregat med svakt blått pigment og har en kantet struktur. Grønn pil peker på aggregater i form av lysere brune korn. Gul pil peker på aggregat med fragmentert form.

Figur 6 viser vevssnitt 55 Perl fra kontrollgruppe med 80x forstørrelse. Hvor rød pil peker på tydelig blått nedslag. Det ble også observert blått nedslag mellom og inne i de brune aggregatene.



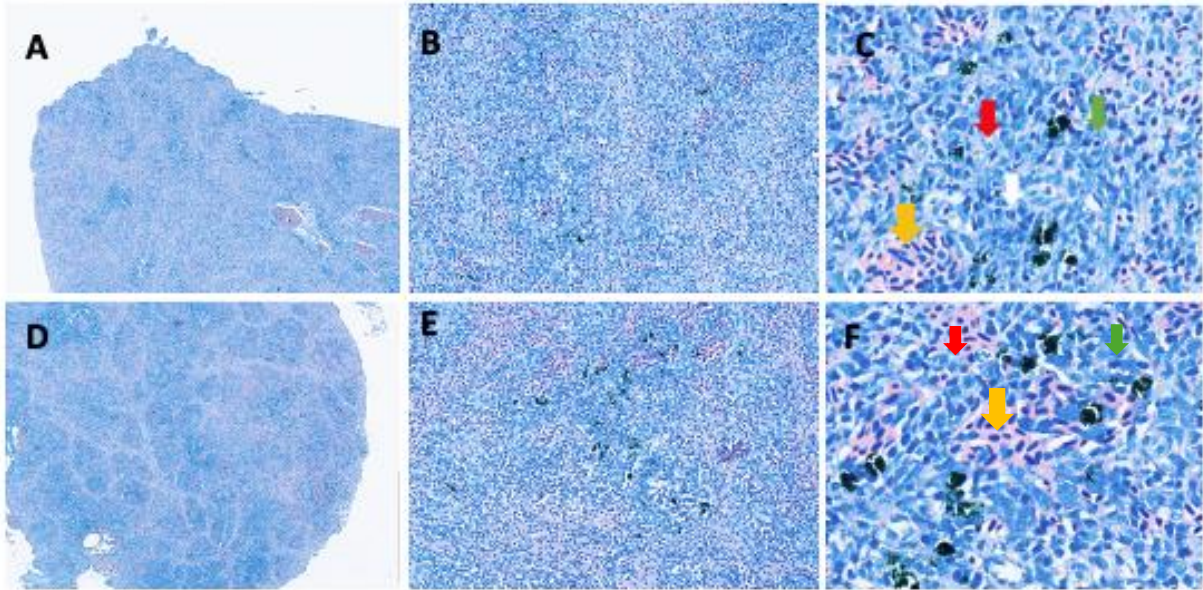
Figur 6: Snitt 55 perl kontrollgruppe, 80x forstørrelse. Rød pil peker på tydelig blått pigment. Det ble også observert blått pigment mellom og inne i de brune aggregatene.

3.5 Giemsa

For å undersøke eventuell inflammasjon ble det benyttet Giemsa fargemetode for å differensiere celler.

Fargemetoden har farget ulike cellekjerne i ulike nyanser av blåfarge, mens cytoplasma er blitt farget i ulike nyanser av rød. Ved kontrollgruppen og høy kobbereksponering (figur 7), ble det observert ulike uidentifiserte celletyper. En celletype ble observert med avlange blå cellekjerne og rosa cytoplasma. Videre ble det gjort funn av runde celler med kornete struktur, mens andre var mørkere og mer kompakte. Det ble observert tydelig mørkegrønne aggregater med ulike strukturer i hvit pulpa.

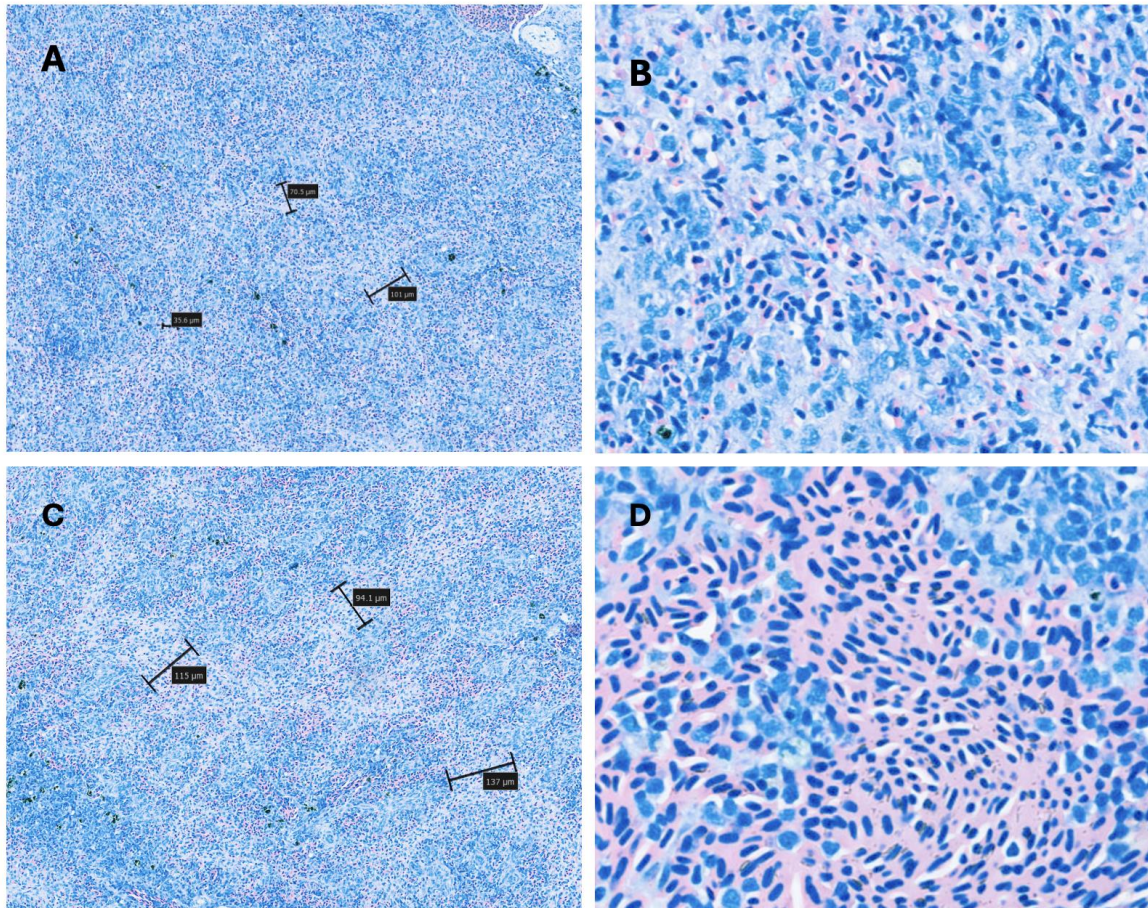
Figur 7 viser vevssnitt fra kontrollgruppen (55) og fra høy kobbereksponering (88) ved 2.5, 10 og 40x forstørrelse respektivt. Det er observert strukturer med rød og hvit pulpa. Hvit pulpa sees som mørkere blå-lilla øyer, mens rød pulpa sees som lysere kanaler gjennom vevet (figur 7A og D). Videre ses det ved 40x forstørrelse, mørke aggregater med grønn farge (figur 7C og F). Cellekjerne observeres med ulike nyanser av blå og cytoplasma er farget ulike nyanser av rød (figur 7C og F). Noen av cellene har blå, oval cellekjerne med rødt cytoplasma (figur 7C og F, gul pil), mens andre har rund og kompakt struktur med jevn blåfarge (figur 7C og F, grønn pil). Videre er det observert en lysere blå, rund og mer granulert struktur (figur 7C og F, rød pil). Det ble også observert to blå intracellulære mørke strukturer inne i en sirkulær form (figur 7C, hvit pil).



Figur 7: Snitt farget med Giemsa. **A)** Snitt 55 Giemsa kontrollgruppe, 2,5x forstørrelse. Strukturene rød og hvit pulpa er observert. Hvit pulpa er mørkere blå-lilla øyer, mens rød pulpa er lysere ganger gjennom vevet. Utførselsganger til høyre i bildet. **B)** Snitt 55 Giemsa kontrollgruppe, 10x forstørrelse. Flere mørke aggregater med grønn farge. **C)** Snitt 55 Giemsa kontrollgruppe, 40x forstørrelse. Cellekjerne er farget ulike nyanser av blå og cytoplasma er farget ulike nyanser av rød. Gul pil peker på blå, oval cellekjerne med rødt cytoplasma rundt. Grønn pil peker på en rund, kompakt struktur med jevn blå farge. Rød pil peker på en lysere blå, rund og mer granulert struktur. Hvit pil peker på en blå to intracellulære mørke strukturer inne i en sirkulær form. Det er flere mørke aggregater i ulike strukturer med svarte farge. **D)** Snitt 88 Giemsa kontrollgruppe, 2,5x forstørrelse. Strukturene rød og hvit pulpa er observert. Hvit pulpa er mørkere blå-lilla øyer, mens rød pulpa er lysere ganger gjennom vevet. **E)** Snitt 88 Giemsa kontrollgruppe, 10x forstørrelse. Flere mørke aggregater med grønn farge. **F)** Snitt 88 Giemsa kontrollgruppe, 40x forstørrelse. Cellekjerne er farget ulike nyanser av blå og cytoplasma er farget ulike nyanser av rød. Gul pil peker på blå, oval cellekjerne med rødt cytoplasma rundt. Grønn pil peker på en rund, kompakt struktur med jevn blå farge. Rød pil peker på en lysere blå, rund og mer granulert struktur. Det er flere mørke aggregater i ulike strukturer med svarte farge.

Figur 8 viser vevssnitt farget med Giemsa. Figur 8A (55) ved 8x forstørrelse, viser tre målestokker (svart strek) bredden på rød pulpa i ulike områder i vevet hos kontrollgruppen. Målestokkene viser følgende mål: 35.6 μm , 70.5 μm og 101 μm . Ved kontrollgruppen ble det også observert erytrocytter med blå, oval cellekjerne med rosa cytoplasma, og immunceller farget blå (figur 8B).

Figur 8C og D viser vevssnitt fra høy kobbereksponering (88) ved 8x og 20x forstørrelse respektivt. Ved 8x forstørrelse er det tre målestokker (svart strek) som viser bredden på rød pulpa ved ulike områder i vevet. Målestokkene viser følgende mål: 115 μm , 94.1 μm og 137 μm . Ved høy kobbereksponering ble det også observert større mengder erytrocytter enn ved kontrollgruppen. Erytrocyttene sees med en blå, oval cellekjerne, omringet av rosa cytoplasma. Over erytrocyttene ble det observert blå immunceller med ulike farge og struktur.

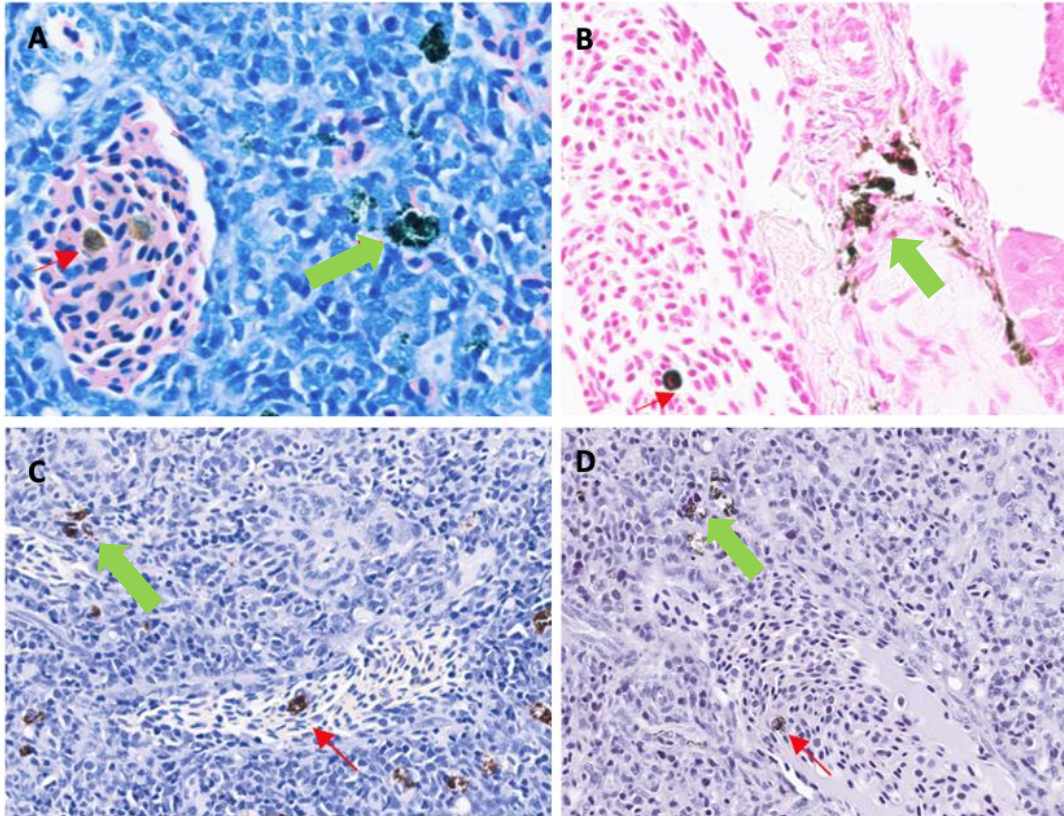


Figur 8: Snitt Giemsa fargemetode. **A)** Snitt 55 Giemsa kontrollgruppe, 8x forstørrelse. Målestokk som viser bredde på rød pulpa (avstand mellom hvit pulpa). Målestokkene viser følgende: 35,6, 70,5 μm og 101 μm . **B)** Snitt 55 Giemsa kontrollgruppe, 20x forstørrelse. Både erythrocytter med blå oval cellekjerne med rosa cytoplasma, og immunceller farget blå. **C)** Snitt 88 Giemsa med høy kobbereksponering, 8x forstørrelse. Målestokk som viser bredde på rød pulpa (avstand mellom hvit pulpa). Målestokkene viser følgende: 115 μm , 94,1 μm og 137 μm . **D)** Snitt 88 Giemsa med høy kobbereksponering, 20x forstørrelse. Stor mengde erythrocytter sees ved blå oval cellekjerne med rosa cytoplasma. Noen blå immunceller med ulike farge og struktur ble observert over erythrocyttene.

3.6 Morfologiske variasjoner av aggregater ved ulike fargemetoder

Ved de ulike fargemetodene ble det observert aggregater i, og utenfor, utførselsgangene. Disse funnene er tydeliggjort i figur 9 for høy kobbereksponering. Vevssnitt fra Giemsa (88) og Perl (66) er med 40x forstørrelse, mens vevssnitt fra HES (89-3) og Rhodanin (88-3) er med 20x forstørrelse.

Aggregatene ved fargemetoden Giemsa hadde en rund struktur med brun farge i utførselsgangen, mens aggregatene utenfor fremstår i en mørkegrønn farge (figur 9A). Derimot ble aggregatene i, og utenfor, utførselsgangen ved fargemetoden Perl, observert med en lik mørk farge. Aggregatene innenfor utførselsgangen har en kompakt struktur, mens aggregatene utenfor har en kornete og mer fragmentert form (figur 9B). Ved fargemetoden Rhodanin hadde aggregatene i og utenfor utførselsgangen en lik morfologi med noe fragmentert struktur (figur 9C). Aggregatene farget med fargemetoden HES, innenfor utførselsgangen hadde en rund, fragmentertstruktur med noe uklar brun farge. Utenfor utførselsgangen er aggregatene av samme farge som innenfor, men er noe kornete (figur 9D).



Figur 9: Morfologiske variasjoner i aggregater ved ulike fargemetoder. **A)** Snitt 88 Giemsa med høy kobbereksponering, 40x forstørrelse. Rød pil peker på brunt aggregat med rund struktur observert i utførselsgangen. Aggregatene utenfor utførselsgangen fremstår som mørkegrønne, vist med grønn pil. **B)** Snitt 66 Perl med høy kobbereksponering, 40x forstørrelse. Et mørkt aggregat med rund og kompakt struktur innenfor utførselsgangen er vist med rød pil. Grønn pil viser aggregat mørkt aggregat, med kornete og fragment struktur, utenfor utførselsgangen. **C)** Snitt 88-3 Rhodanin med høy eksponering, 20x forstørrelse. Tilstedeværelse av et mørkt aggregat innenfor utførselsgang med noe fragmentert struktur, vist med rød pil. Aggregatene utenfor utførselsgang har lik morfologi som den innenfor, vist med grønn pil. **D)** Snitt 89-3 HES med høy kobbereksponering, 20x forstørrelse. Rød pil peker på aggregat innenfor utførselsgang med en rund struktur med noe uklar, brun farge. Strukturen er litt fragmentert. Grønn pil peker på aggregater utenfor utførselsgangen har samme farge som innenfor, men er noe kornete.

4 Diskusjon

Hensikten med bacheloroppgaven var å vurdere effekt av kronisk kobbereksponering på milt til atlantisk laks. For dette ble det brukt histologiske fargemetoder for å vurdere kobbermengden og visuell identifikasjon av eventuelle strukturelle endringer i laksemilten forårsaket av kobbereksponering. Histologiske fargemetoder kan identifisere vevsendringer og celleendringer, og dens lokasjon i laksemilten.

4.1 Strukturelle observasjoner

Ved HES-fargemetode ble det observert generelle strukturer i milten, slik som rød og hvit pulpa. Hvit pulpa sees som mørkere lilla øyer i vevet, mens rød pulpa sees som lysere kanaler mellom øyene. Noen av områdene med hvit pulpa ved både kontroll- og høy eksponeringsgruppe, hadde en mørkere farge enn andre grunnet høyere konsentrasjon av fargete cellekjerne (figur 1A og 1D). De ulike fargenyansene i hvit pulpa kan skyldes normal biologisk variasjon av immunceller. Jevnt over var vevet relativt homogent innenfor de strukturelle komponentene mellom eksponeringsgruppene. Til tross for denne observasjonen, viser Duran et al. 2015 (65) at opptak av vannbåren kobber via gjeller tas opp, og aggregerer i ulik rekkefølge og mengde i kroppen. For afrikansk ålemalle, *Clarias gariepinus*, er det vist at kobberet akkumulerte høyest i følgende rekkefølge; først lever, nyre, gjeller, milt og muskler (65). Dette kan indikere at dersom leveren er mettet, kan kobber transporteres videre til andre metabolske vev, slik som nyrer og milt. Videre antyder det at milten ikke er det første organet som akkumulerer kobber.

Ved å sammenligne funn gjort av Duran et al. 2015 (65) og observasjoner av lite strukturelle forskjeller, kan det ikke utelukke cellulære ulikheter mellom kontrollgruppen og høy eksponering i milten. Forskning fra Federici et al. 2007 (66) har vist at skadelige effekter av kobber på et organ kan spres videre til andre organ uten observasjon av akkumulering, via oksidativt stress på cellenivå.

Oksidativt stress danner reaktive oksygenarter via fenton-reaksjoner. Antioksidanter fungerer som kroppens forsvar mot reaktive oksygenarter (ROS). Ved langvarig oksidativt stress blir antioksidanter gradvis oppbrukt, noe som fører til et overskudd av ROS og påfølgende vevsskader (67). Radikalene som blir dannet, er vist å kunne føre til nedbrytning av celler via apoptose og peroksidering av cellemembraner (37).

Det ble observert mørke aggregater ved kontroll- og høy eksponeringsgruppe ved fargemetoden HES. De observerte mørke aggregatene var hovedsakelig lokalisert i hvit pulpa (figur 1). Samtidig ble det gjort funn av et mørkt aggregat i en utførselsgang (figur 10D). Morfologisk fremstår aggregatene nokså like i begge deler av vevet. Siden aggregatene også ble observert ved kontrollgruppen, kan observasjonene tyde på at strukturene ikke har tatt til seg fargene ved fargemetoden HES. Det kan tenkes at aggregatene er kobber, fordi fisken er blitt kobbereksponert.

Det er kjent at melanomakrofager er en type immuncelle i milten. Melanomakrofagsentre er ansamling av melanomakrofager som blant annet inneholder melanin, et pigment som gir de mørk farge. Det kan derfor tenkes at aggregatene er melanomakrofager, fordi de er observert ved både kontroll- og høy kobbereksponeringsgruppe. Melanomakrofager finnes i hvit pulpa, noe som stemmer med observasjoner ved fargemetoden HES (38).

4.2 Kobberaggregat

For å påvise eventuelle kobberavleiringer, ble Rhodanin fargemetode benyttet ved alle grupper for kobbereksponering. Kobberavleiringer vil ved Rhodanin fargemetode få en rød-brun farge.

Ved mikroskopering ble det observert brunsvarte aggregater ved snittene fra alle gruppene av kobbereksponering (figur 3). Majoriteten av aggregatene fikk en brunlig farge av Rhodanin fargemetode, sammenlignet med mørkere aggregater observert ved fargemetoden HES. Det ble observert at aggregatene ved Rhodanin fargemetode hadde variasjon i ulike fargenyanser (figur 3C, 3F, 3I). Disse aggregatene varierte mellom svart, rød og brun, med ulik grad av fargeintensitet. Aggregat av mindre størrelse, hadde en gjennomgående lysere farge (figur 3F, grønn pil). Større aggregat hadde en gjennomgående mørkere farge (figur 3F, rød pil). Noen av funnene avviker med forventet resultat grunnet stor variasjon i farge. Dette kan antyde at områder har ulik opphoping med kobber.

4.2.1 Økt antall aggregat ved kronisk kobbereksponering

For å undersøke mulig sammenheng mellom antall aggregat og graden av kobbereksponering, ble det gjennomført en kvantifisering av aggregater i vevssnitt farget med Rhodanin fargemetode. Observasjonene viste en gradvis økning i antallet aggregater med økt eksponering, noe som kan tyde på en korrelasjon mellom antall aggregat og eksponeringsgrad (figur 4).

En ANOVA-test ble gjennomført for å evaluere variasjonen mellom gjennomsnittene i eksponeringsgruppene. Resultatene viste liten variasjon mellom gjennomsnittene, med en P-verdi $>0,05$ (Tabell 7). Dette indikerer at forskjellene mellom gruppene sannsynligvis skyldes tilfeldigheter, og det er ingen statistisk signifikant forskjell. Det ble imidlertid bestemt å forkaste nullhypotesen, da ulike faktorer kan ha påvirket resultatene.

Flere faktorer, som et lite datagrunnlag, høy intern variasjon, og en ustandardisert metode for telling av histologiske aggregater, kan ha påvirket resultatene. Den høye interne variasjonen innen hver eksponeringsgruppe, kan skyldes feilkilder knyttet til metoden. For eksempel er telling av histologiske aggregater en lite standardisert metode. Biologiske forskjeller i kobberopptak kan også ha resultert i ikke-lineære responsmønstre mellom eksponeringsgruppene. En studie av Perkins et al. 1997 (68) har vist at kobber kan føre til ulike fysiologiske endringer for forskjellige individer basert på kjønn. Videre viste studien at variabler slik som kroppsvekt og kroppslengde ble påvirket i ulik grad avhengig av kjønn, noe som tyder på biologisk variasjon (68). Ved å ta hensyn til kjønn, kan man redusere den store variasjonen innad i eksponeringsgruppene, og dermed senke tilfeldighetene for tilfeldig variasjon.

En kan ikke utelukke at trenden er relatert til kobbereksponeringsgrad (figur 4). Dette samsvarer med funnene fra Tabarraei et al. 2015 (69), som viser at akutt kobbereksponering for vannbåren kobber har resultert i økt opptak i ulike organer. Det er godt dokumentert at akutte nivå av kobber, fører til toksiske effekter på fisk. Dette kan inkludere ulike stressresponser, histologiske endringer i ulike vev og letalitet (70,71).

Vår bacheloroppgave har betydelig lavere konsentrasjoner av vannløselig kobber. Likevel viser statistikken en svak tendens mot økt aggregering, noe som tyder på at kroniske nivåer av kobber kan samle seg i ulike vev, på lignende måte som ved høyere konsentrasjoner (figur 4).

Miljødirektoratet har definert ulike tilstandsklasser for mengden kobber i kystvann som kan føre til toksiske effekter. Konsentrasjoner mellom 0 - 2,6 µg/l fører ikke til toksiske effekter, mens konsentrasjoner i intervallet 2,6 – 5,2 µg/l kan føre til «akutte toksiske effekter», og nivåer >5,2 µg/l kan forårsake omfattende akutt toksisitet. Forsøksindivider i vår bacheloroppgave som var utsatt for høye konsentrasjoner (10,29 µg/l), overskrider miljøkvalitetsmålet. Ut fra denne klassifiseringen er det grunn til å tro at gruppen eksponert for høy mengde kobber, kan ha opplevd «omfattende toksiske effekter» (28). Kvalitetsmålene gir ikke detaljert informasjon om spesifikke analyser, antall akvatiske organismer eller arter som er brukt direkte for å fastsette grenseverdien på 2,6 µg/l for kobber i kystvann. Likevel er denne grenseverdien relativt lik de kroniske nivåene som er undersøkt i vår bacheloroppgave, og derfor relevant. Funnene fra kobbertellingen viser en trend med økende aggregatdannelse korrelert med økende eksponering. Konsentrasjonene brukt i denne studien er relativt lik Miljødirektoratets tilstandsklasser, og klassifiseringen kan stemme overens med funnene.

Brix et al. 2022 (72) foreslår at kroniske kobbernivåer også kan føre til oksidativt stress og vevsskade. Dette kan over tid føre til systemiske effekter, som kan påvirke ulike faktorer, inkludert vekst og reproduktivitet (72). Ved å sammenfatte disse funnene, blir det tydelig at selv om lave konsentrasjoner av kobber kanskje ikke forårsaker umiddelbar toksisitet, kan kronisk eksponering føre til ugunstige effekter på fiskehelse over tid.

4.3 Kobberindusert inflammasjon

I studien gjennomført av Tummabancha et al. 2016 (73), ble fisk brukt for å undersøke toksisitet av sølvnanopartikler (AgNP). Det ble observert at fagocytisk aktivitet, antall erythrocytter og prosentandelen hematokrit ble redusert hos fisk utsatt for AgNP, spesielt hos de eksponert for den høyeste konsentrasjonen AgNP/ kg (73). Basert på Tummabancha et al. 2016 (73) sitt funn, er det interessant å undersøke miltvevet for cellulære endringer ved bruk av fargemetoden Giemsa. Formålet er å utforske om det observeres økt fagocytiske aktivitet eller endring i antall immunceller i miltvevet. Videre vurderes forskjeller i struktur og antall erythrocytter i den røde pulpaen for de ulike eksponeringsgruppene (73).

Figur 7C og F viser resultater for fargemetoden Giemsa for kontroll- og høy kobbereksponeringsgruppe. Gul pil (figur 7C og F) peker på celler som minner om beskrivelsen av erythrocytter hos fisk, hvor cellene har ovale cellekjerne i noe ulike fasonger. Dette funnet er morfologisk ulikt sammenlignet med grønn og rød pil, på bakgrunn av at de har mer rund struktur med jevn blå farge (figur 7C og F). Dette styrker tanken om at rød- og grønn pil kan tyde på leukocytter. Hvit pil i figur 7C peker på to blå intracellulære strukturer inne i en sirkulær form, som minner om en celle med to cellekjerne. Ved utvikling av inflammasjon kan man i noen tilfeller se multinukleære celler (74).

Ved figur 8 kan man se tydelige forskjeller mellom kontrollgruppen (figur 8A) og høy kobbereksponering (figur 8C). Ved å sammenligne (figur 8A) for kontrollgruppen og høy eksponering, ble det observert en utvidet rød pulpa ved høy kobbereksponering (figur 8C). Dette kommer tydelig frem mellom målestokkene for kontrollgruppen (35.6µm, 70.5µm, 101 µm) og for høy eksponeringsgruppe (115µm, 94.1µm, 137µm). Rød pulpa inneholder erythrocytter og immunceller. Dette kan bety at det er en økt mengde blodceller i rød pulpa. Det ble observert markant forskjell i fargeintensiteten i rød pulpa for kontrollgruppen (figur 8B) og høy kobbereksponering (figur 8D). Ved figur 8D, høy eksponering, ser en tydelig økt mengde erythrocytter, som har ovale blå kjerner med rosa cytoplasma.

Tydelige blå strukturer ble observert over erytrocyttene ved høy kobbereksponering, som kan være immunceller. Dette er i motsetning til Tummabancha et al. 2016 (73) som observert nedgang i antall erytrocytter og økt fagocytisk aktivitet hos fisk eksponert for metall. En annen studie av Witeska et al. 2023 (75), viser at fisk kompenserer for toksisitet ved å øke oksygentransportkapasiteten i blodet, eller øke immunresponsen. Observasjonene (figur 8D) viste en økning i blodceller i vevet utsatt for høy kobbereksponering. Dette kan tyde på at høy kobbereksponering har ført til inflammasjon.

Leukocytter er aktive deltakere i inflammatoriske prosesser, samtidig som de normalt er i hvit pulpa i milten. En høyere grad av fargeintensitet med Giemsa ble observert i hvit pulpa ved høy kobbereksponering (figur 8C), sammenlignet med kontrollgruppen (figur 8A).

Observasjonen antyder en økning i antall leukocytter. Denne observasjonen peker mot mulig inflammatorisk respons i milten. Ved sykdom i milten kan den fremstå som svullen. Milten er derimot ikke observert makroskopisk i denne bacheloroppgaven (38). En studie gjort av Seppänen et al. 2009 (76), ble miltforstørrelse foreslått å skyldes tilstrømning av leukocytter eller leukocyttsyntese. På grunn av det økte antallet leukocytter, kan det være en indikasjon på inflammatoriske reaksjoner i milten ved høy kobbereksponering.

Videre ble aggregatene studert, hvor det ble gjort observasjon av grønne-svarte aggregater ved fargemetoden Giemsa (figur 7C og F). Fargemetoden Giemsa vil ifølge fargeteori ikke farge immunceller grønt. Silveira et al. 2019 (77), har foreslått at melanin kan vises som et blå-grønt pigment i mikroskop ved bruk av fargemetoden Giemsa. Dette fenomenet gir grunnlag for spekulasjon om at de grønne-svarte aggregatene observert i denne bacheloroppgaven, kan tyde på melanin, som er et pigment i melanomakrofager. For å undersøke dette nærmere ble vevssnitt farget med fargemetoden perl. Melanomakrofager inneholder pigmentene melanin, hemosiderin og lipofuscin. Fargemetoden Perl påviser jernavleiringer i vev og kan derfor benyttes for å på vise eventuelle hemosiderin/jern avleiringer til melanomakrofager (44).

4.4 Melanomakrofager

Ved fargemetoden Perl, ble det for kontrollgruppen observert aggregater, hvor et fåtall av disse inneholdt svake blå avleiringer (figur 5C). Det er antatt at disse aggregatene representerer melanomakrofager, basert på deres innhold av jern. Observasjonene i kontrollgruppene kan derfor reflektere den naturlige forekomsten av melanomakrofager i vevet. I kontroll- og høy kobbereksponeringsgruppe har aggregatene med blå avleiringer morfologiske strukturer som minner om celler (figur 5C og F). Disse strukturene kan muligens være melanomakrofager, mens kornete og segmenterte aggregat uten blått pigment, kan ha annet opphav.

Mulige svakheter med fargemetoden Perl, kan være variasjonen i mengden av hemosiderin i melanomakrofager, påvirket av ulike faktorer som nedbrytning av erythrocytter og lokasjon i vevet (78,79). Milten er avgjørende for nedbrytning av gamle erythrocytter og resirkulering av komponenter, inkludert håndtering av jernioner. Ved bruk av fargemetoden Perl, ble det observert et opptak av svak blå avleiring av strukturer utenfor celler. Dette fenomenet kan antyde tilstedeværelsen av Fe^{2+} og Fe^{3+} -ioner som er nedbrytningsprodukter fra erythrocytter (38,80). Erythrocytter inneholder jern og har en levetid opp til 500 dager før de brytes ned. Den lange levetiden til erythrocytter, kan være årsak til funnene av en liten mengde svake blå avleiringer ved bruk av fargemetoden Perl. Dette gjelder spesielt hos yngre fisk, som kan være tilfelle for forskningsindividene i denne bacheloroppgaven (81).

4.4.1 Bristing av melanomakrofager

Funn av uspesifikke jernnedslag i vev kan skyldes kobberindusert inflammasjon med påfølgende bristing av melanomakrofager (figur 5C og figur 6).

Høy kobbereksponering kan utløse en toksisk tilstand som potensielt kan føre til bristende melanomakrofager. Når cellene brister, frigjøres celleinnholdet i vevet, noe som kan være årsaken til uspesifikke blå nedslag (38).

Bristing av melanomakrofager kan potensielt være relatert til oksidativt stress forårsaket av kobber. Kobberioner kan reagere direkte med negativt ladet grupper i proteiner og forårsake denaturering av ulike enzymer (36). Dannelse av reaktive oksygenarter via fenton-reaksjoner har vist seg å kunne føre til peroksidering av cellemembraner (37). Ferroptose er en form for

nekrotisk celledød som kan oppstå som følge av produksjon av ROS via akkumulering av metall. Denne prosessen fører til peroksidering av fosfolipider i cellemembraner. Nekrose, en irreversibel prosess, fører til celledød hvor plasmamembranen sprekker, hvor intracellulært innhold lekker ut i ekstracellulært rom. Det kan føre til skader i omkringliggende vev (82). På denne måten kan kobberioner føre til vevskade.

4.5 Uoverensstemmelse mellom Giemsa og Perl

Ved fargemetoden Giemsa ble det observert en struktur som kan minne om en utførselsgang. Her ble det observert aggregat farget brunt, med noen blå avleiringer (figur 9A). Disse aggregatene har en rund form og ser ut til å ligge over erytrocyttene i utførselsgangen (rød pil). Dette er i motsetning til aggregatene utenfor som har en mer lappet struktur og grønn farge (grønn pil). Funn i utførselsgang, i kombinasjon med morfologiske ulikheter slik som farge og struktur, kan tyde på at aggregatene består av ulikt materiale. Det kan tenkes at aggregatene som ikke er farget grønt i utførselsgangene er kobber (figur 9A, rød pil), dette på bakgrunn av Silveira et al. 2019 (77), som foreslår at melanin farges grønt ved fargemetoden Giemsa.

Fargeforskjellene mellom aggregatene inne og utenfor utførselsgangene, var ikke påfallende ulike ved de andre fargemetodene (figur 9B, C, D). På bakgrunn av dette kan det være utfordrende å fastslå om aggregatene utenfor utførselsgangene faktisk er melanomakrofager (figur 9, grønne piler). Fargemetoden Perl avslørte svakt blå avleiring i aggregatet i utførselsgangen. Dette kan indikere hemosiderin fra melanomakrofager (figur 9B).

Fargemetoden Rhodanin avslørte en variasjon i fargespekteret av aggregatene, med rød-brune nyanser og mørk svarte toner, mens fargemetode Perl viste forekomst av blå avleiring, sannsynligvis knyttet til jerninnholdet i melanomakrofager (figur 9C). Fargemetoden Giemsa avslørte grønne aggregater, antatt å være melanin (figur 9A), men disse samsvarer ikke med de blå avleiringene observert i fargemetoden Perl (figur 9B). Mengden blå avleiring i fargemetoden Perl, er mindre enn mengden grønn avleiring i fargemetoden Giemsa, selv om både melanin og hemosiderin teoretisk sett befinner seg i melanomakrofagsentre. Denne uoverensstemmelsen mellom fargene som observeres i fargemetodene Perl og Giemsa,

antyder kompleksiteten i fargeopptak og kan vanskeliggjøre en endelig identifikasjon av aggregat. På bakgrunn av overnevnte funn fra fargemetodene brukt i denne bacheloroppgaven, kan det tenkes at det er påvist både kobber og melanomakrofager.

Castro et al. 2019 (83) utforsker regnbueørrets immunrespons mot patogenet *Lactococcus garvieae* i milt og nyre. I studien ble det observert melanomakrofager med en brun-svart farge ved H&E. Det ble vist en markant økning i antall melanomakrofager i infisert milt sammenlignet med uinfisert milt (83). Dette fenomenet speiles i observasjoner fra denne bacheloroppgaven, hvor det ble registrert en jevn økning i brun-svart aggregat i vev ved økende kobbereksponering. Det er utfordrende å fastslå om økt mengde aggregat i vev skyldes kobberavleiringer i vevet eller økt mengde melanomakrofager som følge av mulig inflammasjon fra økende kobbereksponering.

5 Konklusjon

Målet med denne bacheloroppgaven var å utforske effekten av kobber på atlantisk laks, med spesielt fokus på kronisk eksponering og dens innvirkning på milten. Vårt arbeid har bidratt til økt forståelse for effekt av kobbereksponering, og avdekket en økning i aggregater som følge av økt kobbereksponering på tvers av gruppene. Det ble også antydnet inflammasjon i milten, spesielt for gruppen med høy kobbereksponering, sannsynligvis relatert til forhøyede kobbernivåer. Disse funnene indikerer at kronisk eksponering for vannbåren kobber akkumuleres og forårsaker histologiske endringer i milten hos atlantisk laks. Gitt at milten er et viktig immunologisk og hematologisk organ, tyder resultatene på at langvarig eksponering for kroniske kobbernivåer kan føre til fysiologiske effekter hos atlantisk laks. Dersom den biologiske tålegrensen overskrides ved slike kobbernivåer, er det sannsynlig at milten over tid kan få ytterligere kobberindusert skade.

Vår studie avdekket at fargemetodene i alle gruppene for kobbereksponering, viste relativt like fargenyanser og strukturer av aggregatene ved alle fargemetodene. Dette gjaldt derimot ikke for Giemsa, hvor noen aggregater var brune, mens majoriteten var grønne.

Dette skapte utfordringer med å differensiere aggregatene. Det indikerte at fargemetodene ikke er optimale for å skille mellom kobber og melanomakrofager. Histologiske metoder gir verdifull innsikt i funn, tilhørende strukturelle endringer og lokasjon av aggregater. Likevel understreker den observerte usikkerheten i metodene behovet for ytterligere og mer omfattende analyser for å bekrefte funnene og differensiere aggregatene.

For fremtidige studier kan det være hensiktsmessig å supplere histologiske fargemetoder med andre kvantitative analysemetoder. Videre finnes det andre kobberspesifikke fargemetoder som kan være mer optimale å bruke for å skille mellom kobbernedslag og melanomakrofager. Immunhistokjemi kan bidra til lokalisering og påvisning av antigener i celler og vev, noe som åpner for identifisering av kobber eller kobberassosierte proteiner, samt spesifikke proteiner assosiert med stress og celledød (84). Kvantitative analysemetoder kan også brukes til å detektere kobber. I tillegg kan molekylærbiologi benyttes for å undersøke stressrespons og genetiske endringer på cellulært nivå som følge av kobbereksponering. Hematologiske

metoder, som blodprøvetaking og analyse av blodceller, kan også være hensiktsmessige for å kvantifisere eventuelle endring i mengde immunceller eller leukocytter.

Det er viktig å erkjenne at potensielle patologiske endringer i milten som følge av kronisk kobbereksponering, kan ha konsekvenser for fiskeoppdrett. Dersom slike endringer fører til generell sykdom, nekrose eller genetiske forandringer, kan dette føre til at fisken blir uegnet for konsum og kommersielt bruk. Gitt laksens betydelige andel av Norges totale eksportverdi, blir behovet for bærekraftig bruk av kobberimpregnering i lakseoppdrett understreket. Dette er avgjørende for å sikre både langsiktig helse for havmiljøet og økonomisk stabilitet i oppdrettsnæringen.

6 Referanseliste

1. Bioakkumulasjon. I Store Norske Leksikon; 2024 [sitert 20. mai 2024]. Tilgjengelig på: <https://snl.no/bioakkumulasjon>
2. Lönn-Stensrud J. Biofilm. I Store Medisinske Leksikon; 2022 [sitert 20. mai 2024]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/biofilm>
3. Evensen S, Waage A. Hematokrit. I Store Medisinske Leksikon; 2022 [sitert 20. mai 2024]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/hematokrit>
4. Holck P. Histologi. I Store Medisinske Leksikon; 2023 [sitert 20. mai 2024]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/histologi>
5. Nordseth T. Hypoksi. I Store Medisinske Leksikon; 2023 [sitert 20. mai 2024]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/hypoksi>
6. Zawadzka Persvold A. Morfologi. I Store Norske Leksikon; 2024 [sitert 20. mai 2024]. Tilgjengelig på: <https://snl.no/morfologi>
7. Vøllestad LA. Stamfisk. I Store Norske Leksikon; 2022 [sitert 20. mai 2024]. Tilgjengelig på: <https://snl.no/stamfisk>
8. Eriksen R, Macleod C. Antifoulants in Salmonid Aquaculture: Environmental Considerations for Marine Cage Farming. I 2011. s. 49–88.
9. Grefsrud ES, Agnalt AL, Andersen LB, Diserud O, Dunlop KM, Escobar R, mfl. Risikorapport norsk fiskeoppdrett 2024 [Internett]. Havforskningsinstituttet; 2024 feb [sitert 24. april 2024]. Report No.: 2024–4. Tilgjengelig på: <https://www.hi.no/hi/nettrapper/rapport-fra-havforskningen-2024-4>
10. Finstad B, Røttereng PJ. Fiskefysiologi kapittel 21 Oppdrettsfiskens biologi, teknologi, lakselustiltak og miljøfokuset forvaltning [Internett]. NTNU; 2024 [sitert 30. april 2024]. Tilgjengelig på: https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/bitstream/handle/11250/3113208/Fiskefysiologi_Kapittel_21_3001.pdf?sequence=25&isAllowed=y
11. Gjedrem T. Fiskeoppdrett - Vekstnæring for distrikt Norge. Landsbruksforlaget; 1993.
12. Wennevik V, Hansen T. Tema: Laks [Internett]. Havforskningsinstituttet; 2019 mar [sitert 25. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/laks>
13. Bjerkestrand B, Bolstad T, Hansen SJ. Akvakultur Havbruk i Norge. 2. utg. Fagbokforlaget; 2013.
14. Jónsdóttir KE, Volent Z, Alfredsen JA. Current flow and dissolved oxygen in a full-scale stocked fish-cage with and without lice shielding skirts. *Appl Ocean Res.* 2021;108:102509.
15. Patursson O. Flow through and around fish farming nets. 2008.
16. Niño Y, Vidal K, Tamburrino A, Zamorano L, Beltrán JF, Estay G, mfl. Normal and Tangential Drag Forces of Nylon Nets, Clean and with Fouling, in Fish Farming. An Experimental Study. *Water* [Internett]. 2020;12(8). Tilgjengelig på: <https://www.mdpi.com/2073-4441/12/8/2238>
17. Jana Bannister FB, Michael Sievers, Bloecher N. Biofouling in marine aquaculture: a review of recent research and developments. *Biofouling.* 2019;35(6):631–48.

18. Exequiel P, González LG Carlos Felipe Hurtado, Augsburg A. ECONOMIC IMPACTS OF USING COPPER ALLOY MESH IN TROUT AQUACULTURE: CHILEAN EXAMPLE. *Aquac Econ Manag.* 2013;17(1):71–86.
19. Grøsvik BE, Ghebertnsae DB, Mortensen S, Sævik PN. Kunnskapsstøtte om miljøeffekter av kobber [Internett]. Havforskningsinstituttet; 2023 jan [sitert 22. april 2024]. Report No.: 2022–50. Tilgjengelig på: <https://www.hi.no/hi/nettrapporter/rapport-fra-havforskningen-2022-50>
20. Ayer N, Martin S, Dwyer RL, Gace L, Laurin L. Environmental performance of copper-alloy Net-pens: Life cycle assessment of Atlantic salmon grow-out in copper-alloy and nylon net-pens. *Aquaculture.* 2016;453:93–103.
21. Guardiola FA, Cuesta A, Meseguer J, Esteban MA. Risks of Using Antifouling Biocides in Aquaculture. *Int J Mol Sci.* 2012;13(2):1541–60.
22. Wu X, Fu Q, Kumar D, Ho JWC, Kanhere P, Zhou H, mfl. Mechanically robust superhydrophobic and superoleophobic coatings derived by sol–gel method. *Mater Des.* 2016;89:1302–9.
23. Thomas KV, Brooks S. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling.* 2010;26(1):73–88.
24. Zhang ZP, Song XF, Cui LY, Qi YH. Synthesis of Polydimethylsiloxane-Modified Polyurethane and the Structure and Properties of Its Antifouling Coatings. *Coatings* [Internett]. 2018;8(5). Tilgjengelig på: <https://www.mdpi.com/2079-6412/8/5/157>
25. Lall SP. Chapter 6 - The minerals. I: Hardy RW, Kaushik SJ, redaktører. *Fish Nutrition (Fourth Edition)* [Internett]. Fourth Edition. Academic Press; 2022. s. 469–554. Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128195871000057>
26. Dave G. Effects of copper on growth, reproduction, survival and haemoglobin in *Daphnia magna*. *Comp Biochem Physiol Part C Comp Pharmacol.* 1984;78(2):439–43.
27. Woody CA, O'Neal SL. Effects of copper on Fish and Aquatic Resources [Internett]. Fisheries Research and Consulting Anchorage, Alaska; 2012 jun. Tilgjengelig på: <https://www.conservationgateway.org/ConservationByGeography/NorthAmerica/UnitedStates/alaska/sw/cpa/Documents/W2013ECopperF062012.pdf>
28. Grenseverdier for klassifisering av vann, sediment og biota [Internett]. Miljødirektoratet; 2020 okt. Tilgjengelig på: <https://www.miljodirektoratet.no/globalassets/publikasjoner/M608/M608.pdf>
29. Arellano JM, Storch V, Sarasquete C. Histological Changes and Copper Accumulation in Liver and Gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1999;44(1):62–72.
30. Tavares-Dias M. Toxic, physiological, histomorphological, growth performance and antiparasitic effects of copper sulphate in fish aquaculture. *Aquaculture.* 2021;535:736350.
31. Axelsson M, Anttila K, Olsen RE, Farrell A. Fiskefysiologi Kapittel 8: Sirkulasjonssystemet i fisk [Internett]. NTNU, Göteborgs universitet, Universitet i Turku, University of British Columbia; 2024 [sitert 1. mai 2024]. Tilgjengelig på: https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/bitstream/handle/11250/3113208/Fiskefysiologi_Kapittel_08_3001.pdf?sequence=12&isAllowed=y
32. Wong PPK, Chu LM, Wong CK. Study of toxicity and bioaccumulation of copper in the silver sea bream *Sparus sarba*. *Environ Int.* 1999;25(4):417–22.

33. Jiang WD, Liu Y, Hu K, Jiang J, Li SH, Feng L, mfl. Copper exposure induces oxidative injury, disturbs the antioxidant system and changes the Nrf2/ARE (CuZnSOD) signaling in the fish brain: Protective effects of myo-inositol. *Aquat Toxicol.* 2014;155:301–13.
34. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012;24(5):981–90.
35. Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, Mignotte B. The Mitochondrial Pathways of Apoptosis. I: Scatena R, Bottoni P, Giardina B, redaktører. *Advances in Mitochondrial Medicine* [Internett]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. s. 157–83. Tilgjengelig på: https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_7
36. Eyckmans M, Celis N, Horemans N, Blust R, Boeck GD. Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. *Aquat Toxicol.* 2011;103(1):112–20.
37. Cervantes-Cervantes MP, Calderón-Salinas JV, Albores A, Muñoz-Sánchez JL. Copper increases the damage to DNA and proteins caused by reactive oxygen species. *Biol Trace Elem Res.* 1. mars 2005;103(3):229–48.
38. Press CMcL, Jørgensen T, Poppe T. *Fiskehelse og fiske sykdommer.* Universitetsforlaget AS; 1999.
39. Sales CF, Silva RF, Amaral MGC, Domingos FFT, Ribeiro RIMA, Thomé RG, mfl. Comparative histology in the liver and spleen of three species of freshwater teleost. *Neotropical Ichthyol.* 2017;15(1):e160041.
40. Hu CB, Wang J, Hong Y, Li H, Fan DD, Lin AF, mfl. Single-cell transcriptome profiling reveals diverse immune cell populations and their responses to viral infection in the spleen of zebrafish. *FASEB J.* 2023;37(6):e22951.
41. Sun J, Daniels RR, Balic A, Andresen AMS, Bjørgen H, Dobie R, mfl. Cell atlas of the Atlantic salmon spleen reveals immune cell heterogeneity and cell-specific responses to bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.* 2024;145:109358.
42. Janeway CJ, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* [Internett]. 5. utg. New York: Garland Science; 2001. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27090/>
43. M. M, Bedekar MK, K. V. R. Overview of Fish Immune System. I: M. M, K.V. R, redaktører. *Fish immune system and vaccines* [Internett]. Singapore: Springer Nature Singapore; 2022. s. 1–16. Tilgjengelig på: https://doi.org/10.1007/978-981-19-1268-9_1
44. Agius C, Roberts R. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J Fish Dis.* oktober 2003;26:499–509.
45. Fänge R, Nilsson S. The fish spleen: structure and function. *Experientia.* 1. februar 1985;41(2):152–8.
46. Zecca L, Bellei C, Costi P, Albertini A, Monzani E, Casella L, mfl. New melanic pigments in the human brain that accumulate in aging and block environmental toxic metals [Internett]. *PNAS;* 2008 sep. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2582310/pdf/zpq17567.pdf>
47. Boes KM, Durham AC. Chapter 13 - Bone Marrow, Blood Cells, and the Lymphoid/Lymphatic System1. I: Zachary JF, redaktør. *Pathologic Basis of Veterinary Disease (Sixth Edition)* [Internett]. Sixth Edition. Mosby; 2017. s. 724-804.e2. Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323357753000138>

48. Terman A, Brunk UT. Lipofuscin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(8):1400–4.
49. Huang Y, Liu X, Cai J, Tang J, Cai S, Lu Y, mfl. Biological characterisation, expression and functional analysis of non-specific cytotoxic cell receptor protein 1 in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 2020;104:579–86.
50. Evans DL, Jaso-Friedmann L. Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Annu Rev Fish Dis.* 1992;2:109–21.
51. Praveen K, III JHL, Evans DL, Jaso-Friedmann L. Nonspecific cytotoxic cells of teleosts are armed with multiple granzymes and other components of the granule exocytosis pathway. *Mol Immunol.* 2006;43(8):1152–62.
52. Dahle M, Gjessing M, Tsoulia T. Red Flag: Røde blodceller- er de sensorer for laksens helsetilstand. Veterinærinstituttet; 2022 mai. Report No.: 4–2022.
53. Nikinmaa M, Berenbrink M, Brauner CJ. Regulation of erythrocyte function: Multiple evolutionary solutions for respiratory gas transport and its regulation in fish. *Acta Physiol.* 2019;227(2):e13299.
54. Puente-Marin S, Thwaite R, Mercado L, Coll J, Roher N, Ortega-Villaizan MDM. Fish Red Blood Cells Modulate Immune Genes in Response to Bacterial Inclusion Bodies Made of TNF α and a G-VHSV Fragment. *Front Immunol [Internett].* 2019;10. Tilgjengelig på: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.01055>
55. Wiik J, Alm B. Histokjemi og histopatologiske teknikker. Høgskolen i Ålesund; 2000.
56. Gurina T, Simms L. Histology, Staining [Internett]. Treasue Island: StatPearls; 2023 mai. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557663/>
57. Kompendium i histokjemiske fargeteknikker. NTNU i Ålesund;
58. Giemsa stain. I *Clini Sciences*; [sitert 20. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.clinisciences.com/en/buy/cat-giemsa-stain-3967.html>
59. Mokobi F. Romanowsky Stains- Principle, Types, Applications. I *Micorbe Notes*; 2022. Tilgjengelig på: <https://microbenotes.com/romanowsky-stains/>
60. BiopSafe Formalin Solution Buffered - 4 % formaldehyde solution. I *Mermaid Medical HQ*; [sitert 7. mai 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.mermaidmedical.com/products/biopsafe-formalin-solution/>
61. Endotech- ny leverandør til FIAS. I *FIAS*; Tilgjengelig på: <https://fiasinnkjop.no/2023/05/22/endotech-ny-leverandor-til-fias/>
62. Leica TP1020 Automatic Benchtop Tissue Processor, Semi-Enclosed. I *Leica Biosystems*; Tilgjengelig på: <https://www.leicabiosystems.com/histology-equipment/tissue-processors/leica-tp1020/>
64. Digital patologi. I *Helse Sør-Øst*; 2024 [sitert 30. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.helse-sorost.no/om-oss/vart-oppdrag/hva-gjor-vi/digitalisering-og-e-helse/regionale-ikt-prosjekter/digital-patologi>
65. Duran S, Tuncsoy M, Yeşilbudak B, Ay Ö, Cicik B, Erdem C. Metal accumulation in various tissues of *ciarias gariepinus* exposed to copper, zinc, cadmium and lead singly and in mixture. *Fresenius Environ Bull.* desember 2015;24:4738–42.

66. Federici G, Shaw BJ, Handy RD. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat Toxicol.* 2007;84(4):415–30.
67. Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Tirosh O, redaktør. Oxid Med Cell Longev.* 29. april 2013;2013:956792.
68. Perkins EJ, Griffin B, Hobbs M, Gollon J, Wolford L, Schlenk D. Sexual differences in mortality and sublethal stress in channel catfish following a 10 week exposure to copper sulfate. *Aquat Toxicol.* 1997;37(4):327–39.
69. Tabarraei H. Toxicity of copper on rainbow trout: Lethal concentration or lethal dose evaluation? november 2015;
70. Chen QL, Luo Z, Zheng JL, Li XD, Liu CX, Zhao YH, mfl. Protective effects of calcium on copper toxicity in *Pelteobagrus fulvidraco*: Copper accumulation, enzymatic activities, histology. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2012;76:126–34.
71. Kavitha C, Ramesh M, Poopal RK, Ren Z, Li B. Acute and sub-lethal toxicity of a common water contaminant (copper sulfate) on edible freshwater fish: assessment of hemato-biochemical and tissue morphological biomarkers. *Comp Clin Pathol.* 1. februar 2023;32(1):67–81.
72. Brix KV, De Boeck G, Baken S, Fort DJ. Adverse Outcome Pathways for Chronic Copper Toxicity to Fish and Amphibians. *Environ Toxicol Chem.* 2022;41(12):2911–27.
73. Kubpaphas Thummabancha NO, Srisapoome P. Analysis of hematologic alterations, immune responses and metallothionein gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to silver nanoparticles. *J Immunotoxicol.* 2016;13(6):909–17.
74. Sado R, Matushima E. Histopathological, Immunohistochemical and Ultrastructural Evaluation of Inflammatory Response in Arius genus Fish under Experimental Inoculation of BCG. *Braz Arch Biol Technol - BRAZ ARCH BIOL TECHNOL.* september 2008;51.
75. Witeska M, Kondera E, Bojarski B. Hematological and Hematopoietic Analysis in Fish Toxicology—A Review. *Animals [Internet].* 2023;13(16). Tilgjengelig på: <https://www.mdpi.com/2076-2615/13/16/2625>
76. Seppänen E, Kuukka H, Voutilainen A, Huuskonen H, Peuhkuri N. Metabolic depression and spleen and liver enlargement in juvenile Arctic charr *Salvelinus alpinus* exposed to chronic parasite infection. *J Fish Biol.* 2009;74(3):553–61.
77. Luiza Silveira T, Veloso E, Gonçalves I, Ferreira E. Use of Giemsa staining for the immunohistochemical counterstaining in canine melanomas: an “old and forgotten” method. *Braz J Vet Pathol.* mars 2020;13:17–20.
78. Latoszek E, Kamaszewski M, Milczarek K, Szudrowicz H, Adamski A, Bury-Burzynski P, mfl. Histochemical Characteristics of Macrophages of Butterfly Splitfin *Ameca splendens*. *Folia Biol (Praha).* mars 2019;67.
79. Leknes IL. Melano-macrophage centres and endocytic cells in kidney and spleen of pearl gouramy and platyfish (*Anabantidae, Poeciliidae: Teleostei*). *Acta Histochem.* 2007;109(2):164–8.
80. De Barros A, Arribat G, Combis J, Chaynes P, Péran P. Matching ex vivo MRI With Iron Histology: Pearls and Pitfalls. *Front Neuroanat.* juli 2019;13.
81. Witeska M. Erythrocytes in teleost fishes: a review. *Zool Ecol.* 2013;23(4):275–81.

82. Yan B, Ai Y, Sun Q, Ma Y, Cao Y, Wang J, mfl. Membrane Damage during Ferroptosis Is Caused by Oxidation of Phospholipids Catalyzed by the Oxidoreductases POR and CYB5R1. *Mol Cell*. 2021;81(2):355-369.e10.
83. Castro R, Coll J, Blanco M del M, Rodriguez-Bertos A, Jouneau L, Fernández-Garayzábal JF, mfl. Spleen and head kidney differential gene expression patterns in trout infected with *Lactococcus garvieae* correlate with spleen granulomas. *Vet Res*. 2. mai 2019;50(1):32.
84. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. I: Yong WH, redaktør. *Biobanking: Methods and Protocols* [Internett]. New York, NY: Springer New York; 2019. s. 289–98. Tilgjengelig på: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25

7 Vedlegg

Vedlegg 1: Rhodanin fargeteknikk

Dokument «Rhodanin», ID 10596 - EQS

Rhodanin

Forfatter: Torill Halsebakke Bjørge, Hilde Guttormsen
Godkjent av: Hilde Guttormsen

Gyldig fra: 07.04.2021
Revisjonsfrist: 06.04.2024

Revisjon: 1.8
ID: 10596

Hensikt

Fargeprosedyre.

Omfang

Gjelder for alle bioingeniører ved histologi lab, Avdeling for patologi, HMR.
Omfatter alle vevssnitt som skal farges med spesialfargen Rhodanin.

Ansvar

Fagbioingeniør har ansvar for vedlikehold av prosedyren. Alle som utfører denne spesialfargingen skal gjøre det i henhold til prosedyren. Resultatet skal kontrolleres i mikroskop før glass og remisje leveres til rekvirerende patolog.

Bakgrunnsinformasjon

- Rhodanin er en spesialfarge som brukes til å påvise kobber i vev.
- Normalt finner vi kobber i mange vev. Det er ofte en komponent i enzymreaksjoner, men i så små mengder at det ikke gir utslag i noen fargereaksjon.
- Wilson's disease (lever-degenerasjon) gir økt kobbermedslag i lever og hjerne.
- Fargerresultatet svekkes/forsvinner ved lagring av objektglassene.

HMS

Bruk alltid hansker i kontakt med fargeløsninger og andre kjemikalier. Arbeid i avtrekkskap (evt vernebriller/friskluftsmaske). Ved søl på øye eller hud, skyl lunge med vann. Forhåndsregler ut over dette vil stå i tabell.

Kjemikalie	Faresymbol	Forhåndsregler	Avfallshåndtering
Xylen			Tømmes i eget avløp for formalin, etanol og Xylen
Etanol			
5-(4-dimethylaminobenzylidene) rhodanin (R3)	Ingen		Samles opp
Rhodanin stamløsning			Samles opp
Hematoxylin (Harris)			Samles opp

Arbeidsbeskrivelse

Snittykkelse 3 µm. Ta med kontrollsnitt.

Farging

1. Snitt avparafineres og rehydreres.
2. Inkuberes i Rhodanin bruksløsning i 3 timer ved 60°C (eller 18 timer ved 37°C).
3. Vaskes godt i rensa vann.
4. Hematoxylin (Harris) i 1 min.
5. Blånes i 5min.
6. Dehydres – xylen – monteres.

Oppskrift på fargeløsninger

Rhodanin stamløsning

1/2

5-(4-dimethylaminobenzylidene) rhodanin	R3	0,2 g
Absolutt alkohol		100ml
Lages ved behov. Ferdig løsning oppbevares i kjøleskap.		

Rhodanin bruksløsning		
Rhodanin stamløsning (ristes godt før bruk)		3 ml
Rensa vann		47 ml


Resultater

Kobbermedslag sees som små rødbrune korn i cytoplasma. Galle farges grønn.

Relatert/Vedlegg

Stoffkartotek, [Ecoonline](#). Firmakode 71. Du trenger ikke brukernavn og passord.

 [Håndtering av xylen, etanol og formalin](#)

 [Håndtering av kjemikalier ved Avdeling for patologi, HMRHF](#)

Papirkopi

Papirkopi i veggbok på histologi lab.

Vedlegg 2: Giemsa fargeteknikk

Dokument «Giemsa for histologi», ID 10564 - EQS

Page 1 of 3

Giemsa for histologi

Forfatter: Torill Halsebakke Bjørge, Hilde Guttormsen
Godkjent av: Hilde Guttormsen

Gyldig fra: 08.06.2021
Revisjonsfrist: 07.06.2024

Revisjon: 1.12
ID: 10564

Hensikt

Fargeprosedyre.

Omfang

Gjelder for alle bioingeniører ved histologi lab, Avdeling for patologi, HMR. Omfatter alle vevssnitt som skal farges med denne spesialfargen.

Ansvar










Fagbioingeniør har ansvar for vedlikehold av prosedyren.
Bioingeniører ved histologi lab har ansvar for å lage løsninger, samt utføre fargingen etter prosedyren når den bestilles av patolog. Resultatet skal kontrolleres i mikroskop før glass og remisje leveres til rekvirerende patolog.



Bakgrunnsinformasjon

- Vevssnitt farges med Giemsa for å kunne differensiere de forskjellige cellene i myelopoiesen.
- Spesialfargen brukes også for å se etter bakterier og parasitter.
- I hud brukes den ofte for å se etter økt antall mastceller ("kløceller"). Ved urticaria pigmentosa er mastcellene samlet i grupper så det blir gråbrune flekker i huden.

HMS

Bruk alltid hansker i kontakt med fargeløsninger og andre kjemikalier. Arbeid i avtrekksskap (evt. vernebriller/friskluftsmaske). Ved søl på øye eller hud, skylle lenge med vann. Forhåndsregler ut over dette vil stå i tabell.

Kjemikalie	Faresymbol	Forhåndsregler	Avfallshåndtering
May Grunwald bruksløsning			Samles opp
Giemsa bruksløsning			Samles opp
Etanol med eddiksyre			Samles opp
Etanol			Eget avløp. Se  Håndtering av xylene, sprit og formalin (Gyldig)
Xylen			Eget avløp. Se  Håndtering av xylene, sprit og formalin (Gyldig)
Pertex			Løses i xylen, avfall som xylen.
Eddiksyre			Samles opp

May Grunwald stamløsning			Samles opp
Giemsa stamløsning			Samles opp

Arbeidsbeskrivelse

Fargeløsninger

May Grunwald stamløsning	0,2 g løses i 100 ml metanol og filtreres.	Oppbevares i Giemsa boks i skapet for spesialfarger.
May Grunwald bruksløsning	15 ml May Grunwald stamløsning + 15 ml rensa vann. (10ml+10ml)	Holdbar 1 uke i kjøleskap
Giemsa stamløsning	Kjøper ferdig løsning, Merck, art.nr. 9204.	Står i Giemsa boks i skapet for spesialfarger.
Giemsa bruksløsning	1 ml Giemsa stamløsning + 17 ml rensa vann.	Blandes like før bruk.

Snittykkelse

- Beinmarg og lymfevev (hematologi), 1 µm.
- Andre vevstyper, 2-3 µm.
- Skjær og farg to glass.

Farging


1. Snitt avparafineres og rehydreres.
2. May Grunwaldløsning bruksløsning i 6 min.
3. Giemsa bruksløsning, 45 min.
4. Ta ut det ene snittet og differensier raskt slik:
 - Absolutt alkohol, 4 dypp
 - Absolutt alkohol med eddiksyre, 3 dypp (200 ml absolutt alkohol + 6 ml iseddik (konsentrert eddiksyre))
 - Absolutt alkohol, 1 dypp.
5. Ha snittet i xylen, legg på dekkglass og sjekk i mikroskopet. Hvis resultatet er bra, differensieres det andre snittet på samme måte og legges opp. Hvis ikke, endrer man differensieringen for det andre glasset.


Resultater

Kjerner blå
 Cytoplasma rødt
 Mastceller røde (rødkorna)

Relatert/Vedlegg

Stoffkartotek: [Ecoonline](#). Firmakode 71. Brukernavn/passord behøves ikke.

 Håndtering av xylen, etanol og formalin (*Gyldig*)

 Håndtering av kjemikalier ved Avdeling for patologi, Ålesund HMRHF (*Høringsrunde*)

Referanser

Bancroft and Gamble: Theory and Practice of Histological Techniques.

Vedlegg 3: HES fargeteknikk

HES fargemetode med Leica ST5020 Multistainer

HES fargemetode med Leica ST5020 Multistainer

Forfatter: Hilde Guttormsen
Godkjent av: Hilde Guttormsen

Gyldig fra: 06.01.2015
Revisjonsfrist: 05.01.2018

Revisjon: 2.2
ID: 13635

Hensikt

Gi oversikt over HES-farging i Leica ST5020 Multistainer.
Sørge for riktig bruk og vedlikehold av instrumentet.

Ansvar

Alle bioingeniører ved histologi lab skal kjenne prosedyren og kunne bruke instrumentet. Fagbioingeniør har ansvar for vedlikehold av prosedyren.

Arbeidsbeskrivelse

Oppstart

- Ta lokkene av fargekarene.
- Slå på maskinen og skru på vannet. Maskinen gjør først en kalibrering av stativholderen for å stille seg i riktig startposisjon.
- Sett bøyle på stativet, velg brikke etter ønsket fargeprogram. Rød for HES, gul for immun (kjernefarge) og hvit for å velge program selv. Dra ut startskuffen og sett stativet i. Lukk skuffen.
- Maskinen registrerer brikken og starter fargeprogrammet. Dette markeres med fargesymbol på displayet.
- Fargeprogrammet er ferdig etter ca 30min.
- Dra skuffen helt ut fra exit posisjon og fjern stativet. Se at symbolet for stativet forsvinner på displayet. Blir 2 stativer stående i exit posisjon samtidig kommer det en alarm. Trykk da "confirm" og ta ut stativene.

Skifte av reagens / Vedlikehold

Daglig	Tøm ut 70 % etanol, stasjon 21. Flytt frem kar i stasjon 22 og 30. Fyll ny 100 % etanol i rent kar i stasjon 30. Tøm abs. etanol i 28, flytt fram 27. Fyll på ny abs. etanol i 27. Etterfyll alle reagenser til riktig væsknivå.
Fredag	Fyll på safran. Bland erythrosin. Filtrer evt ny hematoxylin, den skal skiftes annenhver uke. Det henger liste ved maskinen. På slutten av dagen skiftes avparafineringsrekke og xylene. Vask/skure alle de gule skyllekarene. Stikk opp hullet der vann skal renne ut. Vask under fargekar.
Mandag	Før oppstart, bytt til ny erythrosin.

Fargeprogram for HES, Leica ST5020

STEP	STASJON	REAGENS	VARIGHET	EKSAKT	DIP
1	1	Xylen	2.00	No	Yes
2	2	Xylen	2.00	No	Yes
3	3	Abs alk	1.00	No	Yes
4	4	96% alk	1.00	No	Yes
5	5	70% alk	1.00	No	Yes
6	11	Vann	1.00	No	No
7	24	Hematoxylin cyt	4.00	No	Yes
8	12	Vann	5.00	No	No
9	20	Erythrosin m/hmt/hist	1.00	Yes	yes
10	9	Vann	0.15	No	Yes
11	8	Vann	0.15	No	Yes
12	21	70%alk	0.30	No	Yes
13	22	96% alk	0.30	No	Yes
14	30	Abs. alk	0.30	No	Yes
15	29	Safran	1.00	Yes	Yes
16	28	Abs. alk	0.30	No	Yes
17	27	Abs. alk	0.30	No	Yes

1/3

18	Exit	Xylen			
----	------	-------	--	--	--

Resultat

Cellekjerner blå
Muskler rød
Bindevev gult

Reagenser

Erythrosin

10g erythrosin i 1 liter dest. vann (erythrosinpulveret «støver» veldig, vask vekta etterpå).
Til fargekaret med erythrosin tilsettes 1 ml hist. hematoxylin, som står i kjøleskap på lab.

Hematoxylin cyt

Harris Hematoxylin fra Histolab.

Hematoxylin (hist)

Hematoxylin	2,5g
Glycerol	100 ml
Eddiksyre (kons)	50 ml
Perjodsyre 1 %	27,5 ml
Aluminiumkaliumsulfat (K10)	25g
Destillert vann	350 ml

Ha hematoxylin i en 1-liters kolbe. Fyll på glycerol, eddiksyre og 100 ml vann.

Rør på magnetrører til alt er oppløst. Tilsett så perjodsyre. Aluminiumkaliumsulfat løses i resten av vannet (250 ml), bruk magnetrører med varme. De to løsningene helles sammen. Oppbevares i mørket i kjøleskap. Holdbar i maksimum 2 mnd. Filtreres før bruk.

Safran

Lages av 4,0 g safran og ca 1 liter abs. alkohol.

Safran helles på en kolbe med ansats for kjølekappe, og en fyller på 150 ml av alkoholen. Dette skal så koke i 1 time på vannbad. Husk kjøling på kolben, ellers fordampes spriten. Spriten med oppløst safran filtreres opp i en flaske. Tilsett så nye 150 ml sprit i safranen, kok i 1 time til. Dette skal gjøres i alt 7 ganger. Restene av safran kastes.

Leica ST 5020 Multistainer. Diverse funksjoner.

- RMS: Reagent Management System. Holder oversikt over reagensholdbarhet og hvor mange racks som har gått igjennom. Funksjonen er avslått.
- Maskinen har 2 brukerfunksjoner som er markert med to ulike fargesymboler: **Gul bruker:** Kjører fargeprogram. Kan se på fremdriften til stativene, hvor langt de er kommet. **Rød bruker:** Alle brukerfunksjoner er aktive. Brukes når det er behov for å programmere nye parametere. OBS. Det er ikke mulig å sette inn stativer til farging når rød bruker er aktivert. Dessuten må alle farginger være avsluttet før en kan aktivere rød bruker.

Symboler i displayet

R Reagensstasjon

O Ovn

W Water

L Load

E Unload

R Reagensstasjon. Er markert med ulike fargesymboler under fargeprosessen. Hvit stripe i øvre del forteller at armen er over stasjonen akkurat nå. Midtre del viser symbol for hvilket fargeprogram som er valgt. Nedre del viser # og nummer i rekken av stativ som er farget i løpet av dagen.

W Vannstasjon. Blått merke viser at vann strømmer gjennom stasjonen. Hvitt merke markerer at det ikke er vann i stasjonen.

I øvre venstre del av displayet viser fargeprogrammene som er lagt inn i maskinen. Disse er HES, PAP og Imm. Ved å trykke på symbolene kommer det frem fargeprogramdetaljer. Se oversikt over detaljene for PAP i egen prosedyre.

Endre parametrene tid, eksakt tid og dip på reagenslista.

- Rød bruker
- Options fra hovedmeny
- Station options
- Velg PAP
- Flytt markøren med opp/ned pilene til det aktuelle reagenset som skal endres.
- Trykk på duration (legg inn ny tid), Exact eller Dip (yes/no).
- Confirm

Endre dip hastighet, frekvens eller slagstyrke.

- Rød bruker
- Options
- Movement
- Number of dips (0-9)=6
- Lift speed (1-9)=5
- Dip amplitude (1,2)=2
- Trykk på disse til ønsket effekt.
- Jo lavere nummer på lift speed (hastighet), jo lavere er farten. Lavere hastighet gjør at mindre reagens blir med over til neste kar.
- Confirm

Referanser/Vedlegg

Manual i perm på histologi lab.

Stoffkartotek: [Ecoonline](#). Firmakode 71. Du trenger ikke brukernavn/passord.

Papirkopi

Ett eksemplar ved instrumentet.

Vedlegg 4: Perl fargeteknikk

Perls

Perls

Forfatter: Hilde Guttormsen, Julianne Holmeset Slyngstadli
Godkjent av: Hilde Guttormsen

Gyldig fra: 06.04.2017
Revisjonsfrist: 05.04.2020

Revisjon: 1.6
ID: 10594

Hensikt

Fargeprosedyre. Påviser jernavleiring i vev.

Omfang

Gjelder for alle bioingeniører ved histologi lab, Avdeling for patologi, seksjon Ålesund.
Omfatter alle vevssnitt som skal farges med denne spesialfargen.

Ansvar

Fagbioingeniør har ansvar for vedlikehold av prosedyren.

Bioingeniører ved histologi lab har ansvar for å lage løsninger, samt utføre fargingen etter prosedyren når den bestilles av patolog. Resultatet skal kontrolleres i mikroskop før glass og remisse leveres til rekvirerende patolog.

Bakgrunnsinformasjon

Normalt forekommer jern i vev bundet mer eller mindre fast til proteiner (hemoglobin, ferritin og hemosiderin) og kan dermed påvises på stedet. Jern er et pigment og har egenfarge, men denne er ikke tydelig nok til diagnostikk. Når man ser pigmenter i vev som man mistenker kan være jern, kan Perl's farging brukes for å bekrefte dette. Ferritin og hemosiderin inneholder jern løst bundet. Ved lav pH vil bindingen spaltes og jernionene straks bindes til ferrocyanid-ionene i løsningen og danne et tungtoppløselig kompleks som kalles Berlinerblå. Jern bundet til hem-gruppen i erthrocytenes hemoglobin er så sterkt bundet at det ikke kan påvises ved Perl's fargemetode.

HMS

Bruk alltid hansker i kontakt med fargeløsninger og andre kjemikalier. Arbeid i avtrekksskap (evt vernebriller/friskluftsmaske). Ved søl på øye eller hud, skylle lenge med vann.

Kjemikalie	Fare-symbol	Tiltak	Avfalls-håndtering
Perl's fargeløsning		Arbeid i avtrekk, det kan utvikle seg giftig gass ved blanding med syre	Samles opp, avfallsnr 7100.
Kjernerød 0,5 %	Ikke merkepliktig		
Kaliumhexacyanoferrat(II) (K6)			Avfallsnr 7100
Aluminiumsulphat (A17)			Avfallsnr 7091
Kjernerød (K15)	Ikke merkepliktig		
Saltsyre (HCl) 37 % PA			Avfallsnr 7131
Etanol			Eget avløp. Se  Håndtering av xylene, sprit og formalin
Xylen			(Gyldig)
Pertex			Løses i xylen og kastes i eget avløp.

Arbeidsbeskrivelse

- Snittykkelse: 5µm
- Kontroll: Ta med positiv kontroll på samme objektglass som prøve. Glass med kontrollvev skal finnes på lab.

1/2

Farging

NB! Alt glassutstyr skal skylles i rensa vann.

1. **Snitt til rensa vann.**
2. **Perl's løsning 15 min. Lages ny hver gang og filtreres på snittet.**
3. **Skylles i rensa vann.**
4. **Kjernerød 0,5 %, 5 min.**
5. **Skylles i vann**
6. **Dehydreres - xylene - legges opp.**

Resultater

Jernpigment	Blått
Cellekjerner	Røde

Tillaging av fargeløsninger

Perl's løsning	
2 % Kaliumferrocyanide	1 del
2 % HCl	1 del

2 % Kaliumferrocyanide	
Kaliumhexacyanoferrat(II) (K6)	2 g
Rensa vann	100 ml

2 % HCl	
37 % HCl	2 ml
Rensa vann	98 ml

0,5 % Kjernerød	
Aluminiumsulphat (A17)	10 g
Rensa vann	200 ml
Kokes opp. Tilsett deretter:	
Kjernerød (K15)	1,0 g
Kokes i 15 min, avkjøles og filtreres.	

Referanser

Bancroft and Gamble; Theory and Practice of Histological Techniques, 5. utg. s. 245.
Wiik og Alm; Histokjemi og histopatologiske teknikker, s. 67.

Relatert/Vedlegg

Stoffkartotek, EcoOnline. Firmakode 71. Brukernavn/Passord behøves ikke.

 Håndtering av kjemikalier ved Avdeling for patologi, Ålesund HMRHF

 Håndtering av xylene, etanol og formalin

Papirkopi

Papirkopi i veggbok på histologi lab.

Vedlegg 5: Statistikk

Eksponeeringsgrad	Synsfelt	Snitt 1		Snitt 2		Snitt 3		Total mengde per gr.	Gjennomsnitt	Gj. for eksponeeringsgruppe	SD	% i forhold til gj.	Fold change	
		1	2	1	2	1	2							
Kontrollgr.	Blokk 55	25	20	40	21	25	22	509	25,50	28,28	0,50		0,90	
	Blokk 56	6	29	14	16	16	14		15,83					0,56
	Blokk 57	44	37	56	15	46	63		43,50					1,54
Medium gr.	Blokk 59	21	13	16	10	22	22	595	17,33	33,06	0,48	1,169	0,61	
	Blokk 71	41	34	41	41	33	46		39,33					1,39
	Blokk 84	28	39	18	31	22	117		42,50					1,50
Høy gr.	Blokk 66	26	22	27	33	20	24	770	25,33	42,78	0,90	1,513	0,90	
	Blokk 88	64	71	69	104	66	57		71,83					2,54
	Blokk 89	55	26	30	23	38	15		31,17					1,10
Fold change	Medium eksponeeringsgrad			Høy eksponeeringsgrad										
	Blokk 59	17,33	0,613	Blokk 66	25,33	0,896								
	Blokk 71	39,33	1,391	Blokk 88	71,83	2,540								
	Blokk 84	42,50	1,503	Blokk 89	31,17	1,102								
Gj. Fold change			1,169			1,513								

Vedlegg 6: Kontrolltelling

Vedlagt som en separat fil.

