

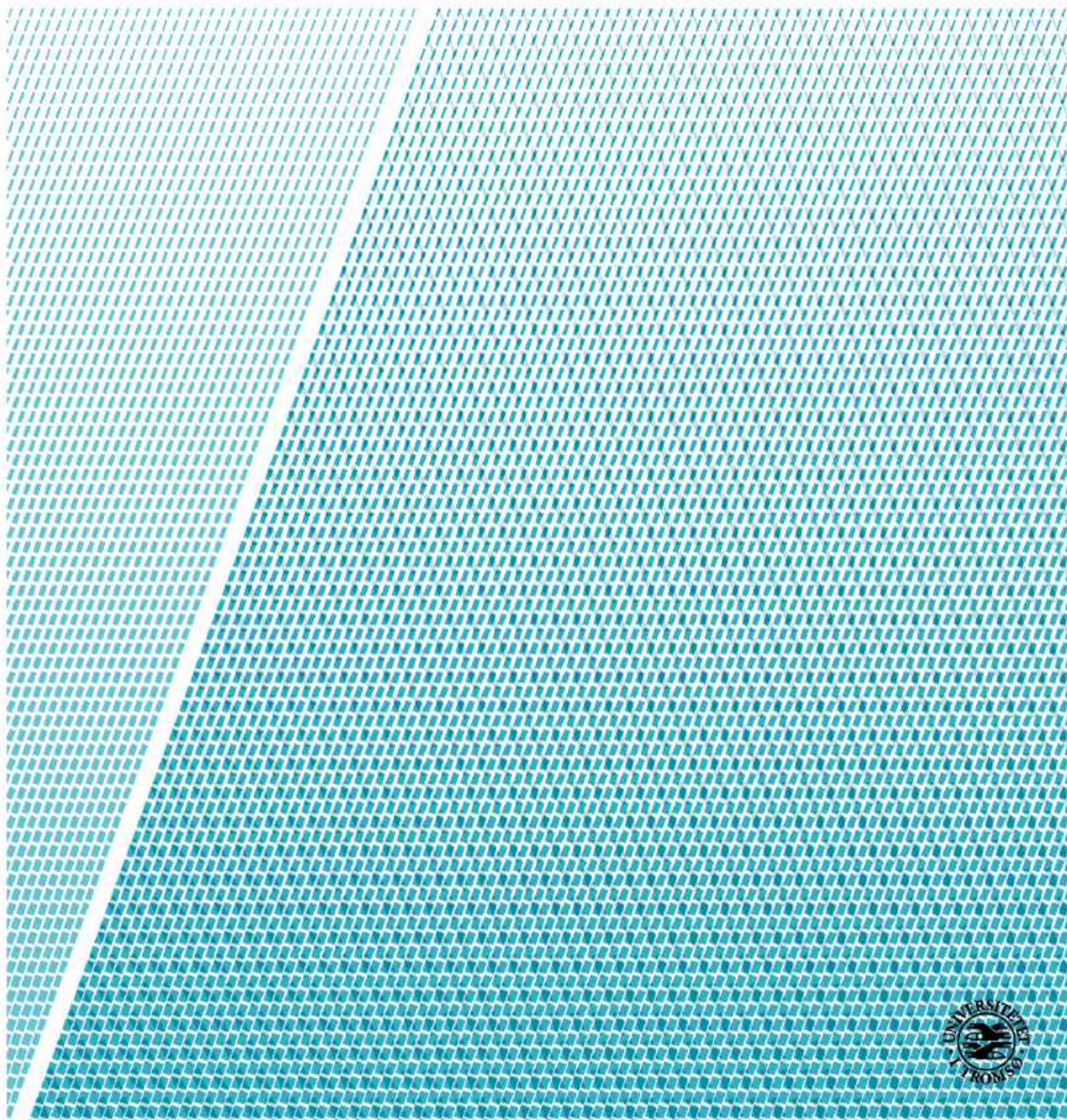
Normalhistologi hos oppdrettet rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.)

Med fokus på organene hud, gjeller, hjerte, nyre, milt, pankreas og lever

Oda Klingenberg

Masteroppgave i fiskehelse (60 stp.)

Mai 2019



Forord

Denne masteroppgaven var et delmål i det større FHF-prosjektet «Program rensefisk: Parasittisk infeksjon hos rognkjeks: Nucleospora cyclopteri» (prosjektnummer 901320). Arbeidet med oppgaven ble utført ved Universitetet i Tromsø og ved Veterinærinstituttet i Oslo og Harstad. Oppgaven ble påbegynt i januar 2018 og avsluttet i mai 2019.

Jeg ønsker å rette en stor takk til min hovedveileder Tore Seternes ved UiT. Takk for dine gode idéer og tilbakemeldinger, oppgaven hadde ikke blitt det samme uten deg og din entusiasme. Jeg ønsker også å takke mine veiledere fra Veterinærinstituttet i Oslo. Takk til Even Thoen for gode tilbakemeldinger, en super innføring og lærdom i histologi og patologi og for at jeg har fått en god innsikt i hvordan diagnostisk arbeid fungerer. Takk til Haakon Hansen for å kunne gjøre oppgave på prosjektet, gode tilbakemeldinger, for din nøyaktighet og «priking», og for initiativ til å lage postere for å presentere arbeidet på konferanser. Jeg ønsker også å takke Fride Tonning for hjelp på laboratoriet på UiT, Randi Terland og de andre ansatte på laboratoriet hos Veterinærinstituttet i Oslo, samt Toni Erkinharju og Miroslava Hansen ved Veterinærinstituttet i Harstad for god hjelp til preparering og farging av snittene mine.

En stor takk rettes også til mine nærmeste. Takk til mamma og pappa for at dere alltid er der for meg og for å ha introdusert meg for interesse for biologi og for havet. Takk til bestemor for alle gode stunder og samtaler vi har hatt. Hjertelig takk til min Martin, for at du gir meg troen på meg selv, og for at du har lest korrektur på oppgaven min. Det er hyggelig at en statsviter får litt innsikt i rognkjeksbiologi også.

En mega-takk til «Sjøpøls» (dere vet hvem dere er!). Takk for hyggelige stunder, mye latter og lærerike kollokvier. Og takk for at dere aldri går og legger dere på natta, allsang er tross alt best etter klokken 02.00. Studietiden hadde aldri blitt den samme uten dere!

Tromsø, mai 2019



Oda Klingenberg

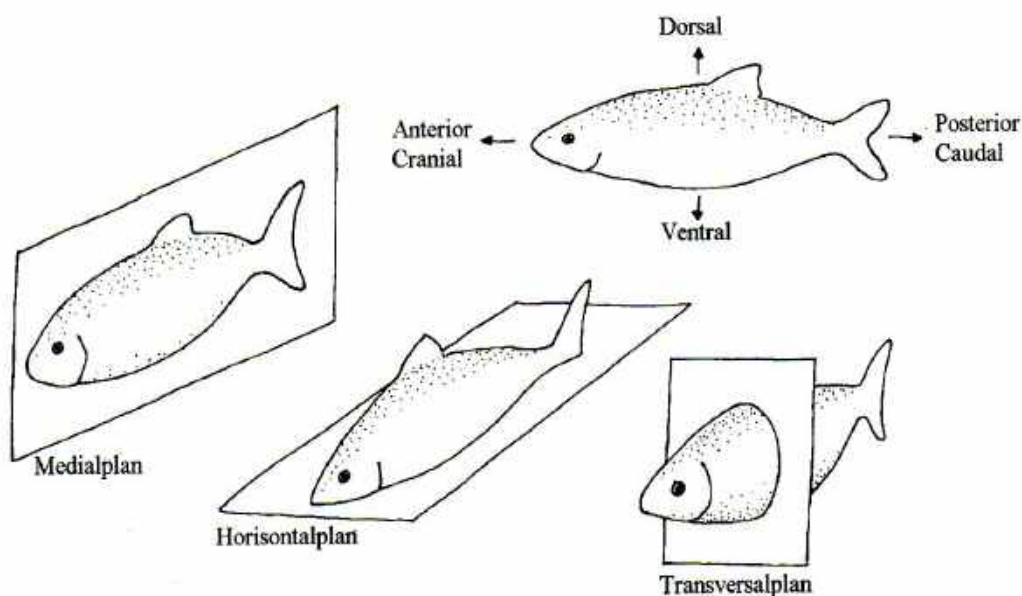
Abstract

Lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) is increasingly used as cleaner fish in intensive farming of Atlantic salmon (*Salmo salar*) with an aim to control the infection of lice on the salmon. The lumpfish is itself exposed to a number of infections, both bacterial, viral, parasitic and fungal, and there is still a lack of knowledge regarding these infections and their impact on the fish. In order to assess the importance of infections on a host and in different types of tissues, a detailed knowledge of the normal histology is crucial. One of the aims of the FHF-project “Parasitic infection in Lumpfish: *Nucleospora cyclopteri*” (project number 901320) is to describe the normal histology of the lumpfish, and this MSc thesis contributes to that aim.

50 clinically healthy Lumpfish sized <5g-132g (fry to juvenile stages) were euthanized, and samples from skin, gills, heart, kidney, spleen, pancreas and liver were fixated in formalin (>48h). The organ samples were embedded in paraffine wax and sectioned in 5µm sizes. Histological sections were made, and stained in Hematoxylin (Gill, Mayer and a variant of Harris) and Eosin (Y and G). In addition, different special dyes were used. AB-PAS staining was used in samples from skin, gills and pyloric caeca, MGG in head kidney and spleen and VG in skin and pancreatic tissue. Histological sections were analyzed using light microscope directly or on the computer after digital scanning of the stained sections. Results from the HE stains shows differences in lumpsucker skin, gills, heart ventricle and liver compared to Atlantic salmon. Lumpfish skin, liver and atrium shares similarities with cod (*Gadus morhua*). Results from special staining with AB-PAS shows numerous gill and pyloric caeca mucus cells, and some mucus cells in the lumpsucker skin. Vacuoles in lumpsucker skin did not take up any staining with AB-PAS. More research on the normal histology of organs in the lumpsucker is needed, but this thesis gives an introduction to the normal histology of several of the commonly used diagnostic organs.

Generell anatomisk inndeling

Caudal	haleretning
Cranial	hoderetning
Distal	i retning fra et sentrum
Dorsal	i retning rygg
Inferior	lavere enn et gitt sentrum
Lateral	utover fra midt
Medial	innover mot midt
Posterior	bak et definert sentrum
Proksimal	nært et definert sentrum
Rostral	mot snuten
Sagittal- /medialsnitt	lengdesnitt, av en hel eller deler av en organisme
Superior	høyere enn et gitt sentrum
Transversalsnitt	et tverrsnitt, av en hel eller deler av en organisme
Ventral	mageretning



Figur I – viser generell anatomisk inndeling på fisk, bilde hentet fra Kryvi og Totlands «Fiskeanatomi» (Kryvi et al., 1997)

Sentrale begreper

Acinær	lat. acinus – bær. Bærformet klase av celler
Adult	kjønnsmodent stadium i livssyklus hos lakselus
Artefakt	forandring i vev som følge av metodefeil
Affinitet	evnen et kjemisk stoff har til å binde seg til et annet.
Alum	kjemisk substans som er et resultat av et hydrat mellom aluminium og et monovalent kation
Ascites	væske i bukhalen.
Autolyse	forråtnelsesprosess, inntreffer pga. nedbrytning av cellens organeller vha. Cellens egne enzymer ved celledød.
Basis	i starten av et utspring eller forgreining.
Bentisk	organismer som lever på havets bunn
Biopsi	vevsprøve, et uttak av en bit av ett bestemt vev
Bløtdyr	rekke: mollusca, virvelløse dyr
Hyperplasi	unormal økning i antall celler i et område
Hypertrofi	unormal økning i cellestørrelse
Lumen	innsiden av en tubulær struktur
Mesentrie	bindevevsmembran som fester tarm til bukvegg
Nekrose	celle- og vevsdød som følge av en ytre påvirkning
Nematoder	rekke, virvelløse dyr
Patologi	sykdomslære
Pelagisk	organismer som lever i vannsøylen
Pre-adult	halvvoksent stadium i livssyklus hos lakselus. Stadium før adult
Semipelagisk	levemåte i havet som innebærer både bentisk og pelagisk adferd
Svinn	fisk tapt i produksjon, kategoriseres som: dødfisk, utkast (vraket fisk på slakteriet), rømming og som annet (fisk rapportert som tapt som følge av andre årsaker)
Tarebeltet	kystnære område med høy forekomst av havalger som tang og tare
Teleostei	underklasse i kl. strålefinnede fisker (<i>Actinopterygii</i>) ph: ryggstrengdyr (<i>Chordata</i>)
Trabekel	avrundet, sylindrisk forgreinet struktur
Vakuole	membranomsluttet hulrom uten synlig innhold.

Forkortelser

AB-PAS	alcian blue – periodic acid-Schiff, kombinert fargemetode for histologiske snitt
AGD	«amoebic gill disease», gjellesykdom hos fisk forårsaket av amøben <i>Paramoeba perurans</i>
Art	arterie
B.a	bulbus arteriosus, kammer i fiskehjertet
Chr	chondrocytt
Cp	perikard
CMS	kardiomyopatisyndrom. Virussykdom hos laks forårsaket av piscint myokardittvirus (PMCV)
Ekskr	ekskretorisk vev
End	endokard/endotel
Ep	epikard/epitel
Eso	eng. espohagus, spiserør
Fil	filament
G	gonader
Gb	gjellebue
Gjr	gjellegitterstaver
H	lat. hepar, lever
HE	hematoxylin og eosin. Fargemetode for histologiske snitt
Hem	hematopoietisk vev
HSMB	hjerte- og skjelettmuskelbetennelse. Virussykdom hos laks forårsaket av piscint orthoreovirus (PRV)
ILA	infeksiøs lakseanemi. Virussykdom hos laks forårsaket av et akvatisk orthomyxovirus
Int	eng. intestine, tarm
K	eng. kidney, nyre
Lm	lamell
MGG	May-Grünwald-Giemsa kombinert fargemetode for histologiske snitt
My	myokard
P	pankreas
PD	pankreas-disease. Virussykdom hos laks forårsaket av salmonid alphavirus (SAV)
Per	peritoneum
Py	pylorusblindsekker
RBC	rød blodcelle
S	eng. spleen, milt
S.v	sinus venosus, kammer i fiskehjertet
Ven	vene
VG	van Gieson fargemetode for histologiske snitt
Ø	øye

Innholdsfortegnelse

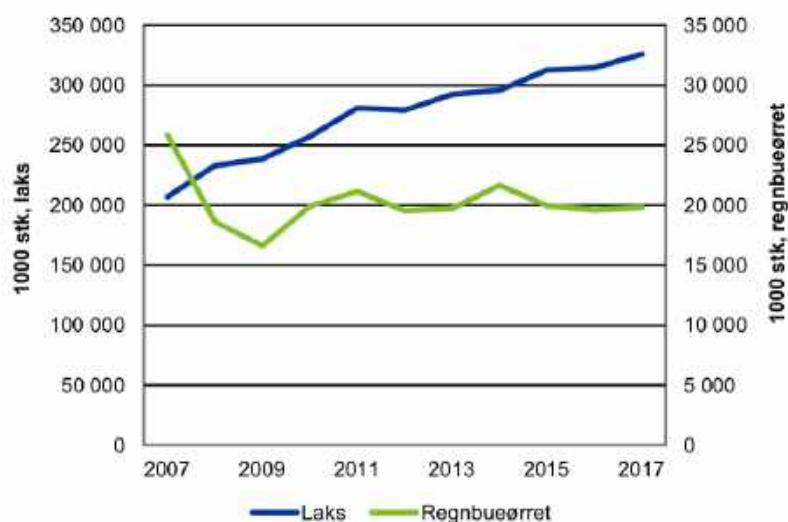
1	INNLEDNING	1
1.1	NORSK OPPDRETTSNÆRING	1
1.2	ROGNKJEKS	2
1.2.1	<i>Helse og velferd hos rognkjeks i norsk lakseoppdrett</i>	<i>4</i>
1.3	HISTOLOGI OG DENS BETYDNING FOR KUNNSKAP OM ET INDIVID.....	7
1.3.1	<i>Celler danner vev – vev danner organer.....</i>	<i>7</i>
1.4	FORMÅLET MED OPPGAVEN	10
2	MATERIALER OG METODER	11
2.1	MATERIALER	11
2.2	FORSØKSFISK.....	11
2.3	HISTOLOGISKE METODER	11
2.3.1	<i>Uttak av organer.....</i>	<i>11</i>
2.3.2	<i>Fiksering.....</i>	<i>14</i>
2.3.3	<i>Dekalsifisering</i>	<i>14</i>
2.3.4	<i>Fremføring.....</i>	<i>14</i>
2.3.5	<i>Innstøping.....</i>	<i>15</i>
2.3.6	<i>Snitting.....</i>	<i>15</i>
2.3.7	<i>Farging.....</i>	<i>15</i>
2.4	MIKROSKOPERING	24
2.4.1	<i>Fotografering</i>	<i>24</i>
2.4.2	<i>Scanning.....</i>	<i>24</i>
3	RESULTATER.....	25
3.1	KARTLEGGING AV NORMALHISTOLOGI I UTVALGTE ORGANER.....	25
3.1.1	<i>Hud.....</i>	<i>29</i>
3.1.3	<i>Gjeller.....</i>	<i>35</i>
3.1.4	<i>Hjerte</i>	<i>40</i>
3.1.6	<i>Nyre</i>	<i>47</i>
3.1.7	<i>Milt.....</i>	<i>55</i>
3.1.8	<i>Pankreas.....</i>	<i>58</i>
3.1.9	<i>Lever.....</i>	<i>64</i>
3.2	SPESIALFARGING.....	67
3.2.1	<i>AB-PAS brukt for påvisning av slimceller i hud, gjeller og pylorusblindsekker</i>	<i>67</i>
3.2.2	<i>MGG brukt for å påvise leukocytter i hodenyre og milt</i>	<i>71</i>
3.2.3	<i>Protokoller for farging med hematoxylin og eosin (HE) gir forskjellig uttrykk i vev.....</i>	<i>75</i>
3.3	ENDRET HISTOLOGISK VEVSTRUKTUR I GJELLER SOM FØLGE AV POST MORTEM BEHANDLING	77
3.4	DEKALSIFISERING	78

4	DISKUSJON	80
4.1	NORMALHISTOLOGI I UTVALGTE ORGANER HOS ROGNKJEKS	80
4.1.1	<i>Hud.....</i>	<i>80</i>
4.1.2	<i>Gjeller.....</i>	<i>83</i>
4.1.3	<i>Hjerte</i>	<i>84</i>
4.1.4	<i>Nyre</i>	<i>85</i>
4.1.5	<i>Milt.....</i>	<i>87</i>
4.1.6	<i>Pankreas.....</i>	<i>88</i>
4.1.7	<i>Lever</i>	<i>88</i>
4.2	SPESIALFARGINGER GIR PÅVISNINGER AV ØNSKET TYPE CELLER OG VEV	89
4.2.1	<i>Distribusjon av AB-PAS-positive slimceller hud, gjeller og pylorusblindsekker.....</i>	<i>89</i>
4.2.2	<i>Leukocytter i hodenyre og milt.....</i>	<i>90</i>
4.3	VALG AV METODE HAR BETYDNING FOR KVALITETEN TIL ET HISTOLOGISK SNITT	91
4.3.1	<i>Ulike protokoller for farging med HE gir fargevariasjoner.....</i>	<i>91</i>
4.3.2	<i>Viktigheten med riktig praksis for uttak for bevaring av vev.....</i>	<i>92</i>
4.3.3	<i>Syrebehandling gir mindre skade på gjellevev sammenliknet med endringer post mortem.....</i>	<i>93</i>
4.3.4	<i>Formalininnsprøytning i hjertet ga bedret histologisk vevstruktur i enkelte organer</i>	<i>93</i>
4.4	OPPSUMMERING AV VEVSFORSKJELLER MELLOM ROGNKJEKS OG LAKS.....	94
4.5	FORSLAG TIL VIDERE FORSKNING	94
5	KONKLUSJONER.....	97
	REFERANSER.....	99
	VEDLEGG I - SNITTSAMLING	104
	VEDLEGG II - REAGENSER	108
	VEDLEGG III – URL TIL QR-KODER	110
	VEDLEGG IV – BILDER AV HISTOPATOLOGI HOS ROGNKJEKS	112

1 Innledning

1.1 Norsk oppdrettsnæring

Norsk oppdrettsnæring har siden oppstarten på 1970-tallet hatt en stor teknologisk, biologisk og økonomisk utvikling. Atlantisk laks (*Salmo salar*) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) er størst i antall av oppdrettet matfisk i Norge. Siden 2007 har det vært en økning i antall lakse-smolt satt ut i merd, mens antallet regnbueørret satt ut har holdt seg mer stabilt (figur 1). I 2017 var verdien på Atlantisk laks 61,6 milliarder NOK (SSB, 2018), med en gjennomsnittspris på 50kr/kg laks (Fiskeridirektoratet, 2019b). Per januar 2019 er den stående biomassen av Atlantisk laks på over 413 millioner individer i sjø (matfisk) (Fiskeridirektoratet, 2019a).



Figur 1- viser antall smolt av laks (*S.salar*) og regnbueørret (*O.mykiss*) satt ut fra 2007 - 2017 (Fiskeridirektoratet, 2018). Antall smolt satt ut av laks har siden 2007 hatt en økning, mens antall smolt av regnbueørret har i samme tidsrom holdt seg stabilt.

Prosentvist svinn av laks og regnbueørret var i 2018 16,4%, som tilsvarer et tap på 55.3 millioner individer fisk (Barentswatch, 2019). Virusinfeksjoner som CMS, PD, ILA og HSMB gir store problemer med fiskehelse og velferd i dagens oppdrettsnæring, men det er lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) som er den største utfordringen i oppdrettsnæringen i dag. Problemet med lakselus er ikke nødvendigvis selve infeksjonen av lus, men håndtering av fisken i behandlingen mot lusa (Gismervik et al., 2019). Utviklingen av bærekraftige metoder for bekjempelse av lakselus har ikke holdt samme tempo som produksjon og økende biomasse. Den stor-skala produksjonen har gjort seg avhengig av noen få typer medikamenter for bekjempelse av lakselus, noe som blant annet har ført til en seleksjon av ervervet genetisk

resistente lakselus mot de få medikamentene som har vært tilgjengelig (Denholm et al., 2002). Dette har gitt rom for økt bruk av ikke-medikamentelle avlusningsmetoder og økt bruk av rensefisk. De ikke-medikamentelle metodene innebærer bruk av ferskvann, spyling eller høy vanntemperatur for å fjerne lusa og bringer med seg økt håndtering og trenging av fisk. Dette medfører en høy velferdsrisiko for fisken da det er stor fare for mekaniske skader på organer og økt stress, som igjen kan være svært belastende hvis fisken i tillegg er infisert av et virus (Gismervik et al., 2019).

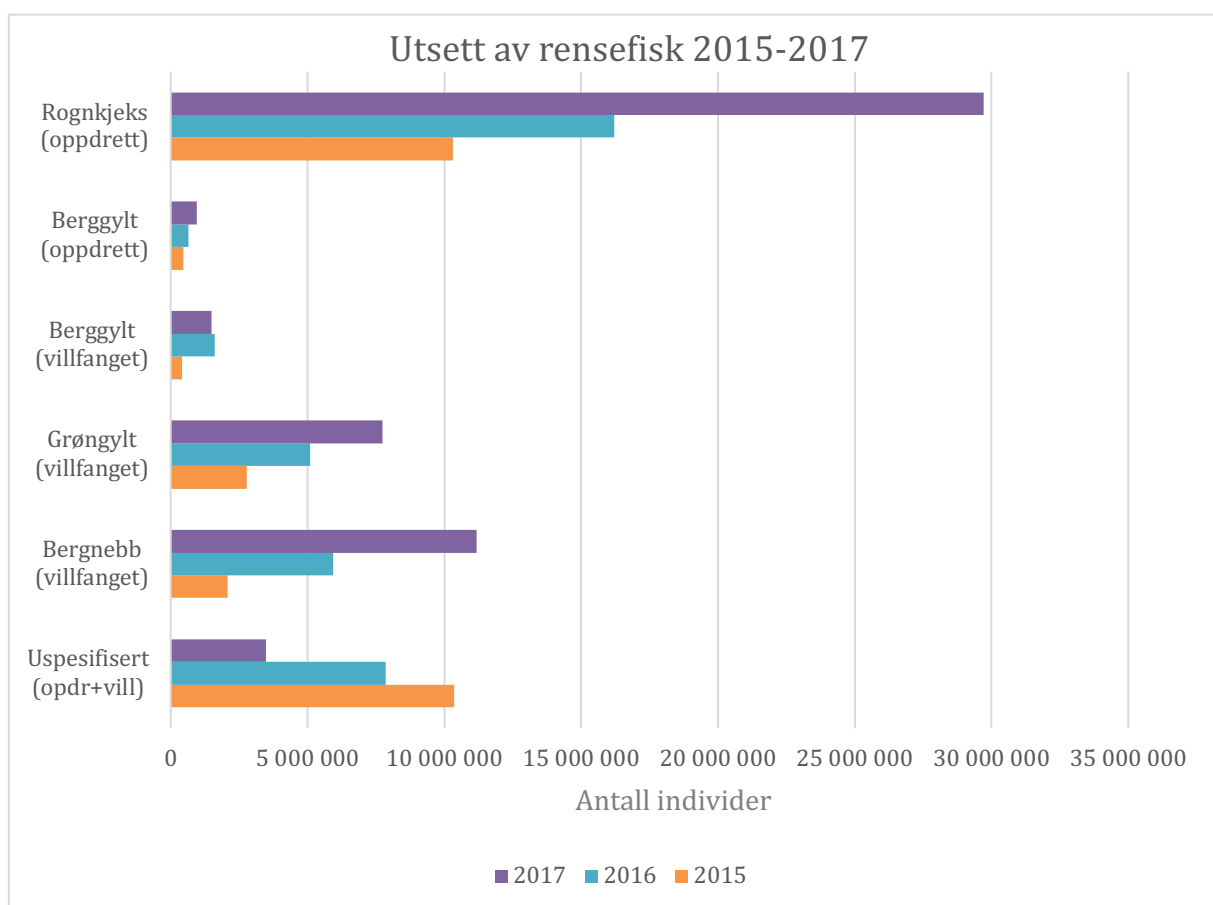
1.2 Rognkjeks

Rognkjeks (♀) / rognkall (♂) (*Cyclopterus lumpus*), tilhører rognkjeksfamilien, *Cyclopteridae* (ord: ulkefisker, u.kl: teleostei). Størrelsen kan bli opptil 5,5kg, og de kan oppnå en alder på 7-8 år (Havforskningsinstituttet, 2017). Fisken kjennetegnes ved at den har en stor sugekopp ventralt, utstående pigger i huden og en farge som kan variere fra brun/grå til lys turkis. Rognkjeks har ingen svømmeblære, og benytter seg hovedsakelig av brystfinnene og halefinnen for å opprettholde oppdrift i vannsøylen (Davenport et al., 1983). Rognkjeks har en semipelagisk livsstil. Som yngel lever fisken i tarebeltet på grunt vann ved kysten, og som voksen migrerer den ut i havet (Davenport, 1985). Fisken kan vandre opp til 49 km per dag, og migrerer ofte tilbake til fødested ved gyting (Kennedy et al., 2015). Rognkjeks er utbredt i hele det nordlige Barents- og Atlanterhavet (Havforskningsinstituttet, 2017).

I norsk oppdrettsnæring brukes rognkjeks som rensefisk, og navnet rognkjeks brukes her som en fellesbetegnelse på arten og inkluderer både hankjønn og hunkjønn. Bruk av rensefisk er et tiltak for å holde tallene på lakselus, og skottelus (*Caligus elongatus*), lave. Studier av ung vill rognkjeks i tarebeltet viser at dietten varierer til alt fra krepsdyr som hoppekreps og spøkelseskreps, til andre bløtdyr og nematoder. En stor tilstedeværelse av byttedyr i et område er viktig for hvor mye fisken spiser. Rognkjeks er med andre ord opportunistisk og altetende, og spiser det som er tilgjengelig (Ingólfsson et al., 2002). Det at rognkjeks kan inkludere krepsdyr i sin diett har gjort at den i lakseoppdrett brukes som rensefisk. I forsøk har det også vist seg at rognkjeks kan spise både lakselus og skottelus ved lave sjøtemperaturer (Imslund et al., 2014). Et storskala forsøk i kommersiell matfiskproduksjon i sjø publisert i 2018 viste et signifikant lavere nivå av pre-adulte og adulte lakselus ved innblanding av rognkjeks i laksemerd, samt lavere nivåer av skottelus (Imslund et al., 2018). Fisker fra leppefiskfamilien (*Labridae*) som berggyllt (*Labrus bergylta*), bergnebb (*Ctenolabrus rupestris*) og grønngyllt (*Symphodus melops*) har også blitt benyttet som rensefisk i over 30 år (Bjørndal, 1991), og

benyttes fortsatt, men leppefisk trives ikke ved sjøtemperaturer under 6°C (Kelly et al., 2014), i motsetning til rognkjeks.

I 2017 ble det satt ut omtrent 55 millioner rensefisk totalt. Av disse var 30 millioner rognkjeks, som hadde en verdi på 650 millioner NOK. På to år har antall rognkjeksindivider satt ut økt med tre ganger, da det i 2015 kun ble satt ut 10 millioner rognkjeks av 26 millioner rensefisk totalt. Av rensefisken benyttet er all rognkjeks og en liten del av berggyllt kultivert, mens grønngyllt og bergnebb og en andel berggyllt er villfanget (figur 2). Siden 2015 har det vært en økning i bruk og utsett av rensefisk i norsk lakseoppdrett der økningen i antall rognkjeksindivider har vært størst. Tallene fra 2018 viser enda en økning, med et produksjonstall på 40 millioner rognkjeks og 1,6 millioner berggyllt (Walde et al., 2019). Antall rognkjeks produsert er i dag høyere enn regnbueørret (figur 1), noe som betyr at rognkjeks er Norges nest viktigste oppdrettsart etter laks.



Figur 2 - viser utsett av rensefisk i norsk lakseoppdrett fra 2015-2017 (Fiskeridirektoratet, 2019c). Her vises arter og deres opprinnelse på Y-aksen, og antall individer satt ut vises på X-aksen. Det har skjedd en tredobling i bruk av rognkjeks på to år, samt en økning i bruk av rensefisk totalt siden 2015. Oppdrettet og villfanget berggyllt har holdt seg relativt stabilt, sammenliknet med utsett av grønngyllt og bergnebb som hadde en økning i 2017.

1.2.1 Helse og velferd hos rognkjeks i norsk lakseoppdrett

Det er i dag store helse- og velferdsrelaterte utfordringer ved bruk av oppdrettet rognkjeks i lakseoppdrett. Det kreves mer kunnskap om fiskens biologi, tetthetsreguleringer i sjø og på land samt kunnskap om forhold og farge på kar i settefiskfasen (Powell et al., 2018). I en spørreundersøkelse til Mattilsynet og fiskehelsetjenester, foretatt av Veterinærinstituttet i forbindelse med Fiskehelse rapporten 2018, meldes det om generelt dårlig kunnskap om rognkjeksens biologi, dårlig fiskevelferd, finneråte, og bakterielle og virale sykdommer både i settefisk- og sjøfase. I tillegg trekkes det frem at økt dødelighet i forbindelse med ikke-medikamentell avlusning av laks er et stort problem, samt problemer med infeksjon av skottelus i sjøfase (Walde et al., 2019). Det er med andre ord flere faktorer som påvirker rognkjeksens helse og velferd i norsk lakseoppdrett i dag.

Siden rognkjeks har en varierende diett kan dette føre til manglende kontroll på hva den spiser inne i laksemerden. I likhet med vill rognkjeks, som nevnt tidligere, er rognkjeks i oppdrett også opportunist, noe som betyr at det er det fôret det er mest tilgang på den spiser. Dette er i høyeste grad laksepelletts (Imsland et al., 2015), men også rognkjekspelletts, og andre små alger og krepsdyr som befinner seg inne i merden. Selv om det i studier (Imsland et al. (2014), (2018)) er vist at rognkjeks har en evne til å spise lakselus, er dette ingen garanti for at fisken holder seg kun til denne dietten. Det er også vist at evnen til å spise lus også varierer mellom ulike familiegrupper av rognkjeks (Imsland et al., 2016). Uten tilgang på optimalt fôr risikerer rognkjeks å sulte ihjel på grunn av matmangel første tiden i merd (Breck (2015) sitert i Powell et al. (2018)). Dersom rognkjeks ikke dør av sult, kan den likevel risikere å bli underernært uten tilgang på tilstrekkelig og riktig fôr. Manglende tilgang på enkelte næringsstoffer kan føre til utvikling av katarakt (Powell et al., 2018). Katarakt kan føre til blindhet, noe som påvirker fiskens generelle velferd samt evnen til å få tilgang på fôr og å kunne spise lus.

1.2.1.1 Sykdom forårsaket av mikroorganismer

Flere mikroorganismer som bakterier, virus, parasitter og sopp kan føre til infeksjoner hos rognkjeks (Karlsbakk et al., 2014). Her presenteres et utvalg av ulike bakterier, virus og parasitter som er patogene for rognkjeks, og hvilke histopatologiske endringer de kan føre til. I vedlegg IV kan bilder av histopatologiske endringer sees i noen utvalgte organer.

Infeksjoner forårsaket av bakterier

Flere bakterier forårsaker sykdom hos rognkjeks. I 2018 ble det påvist 20 tilfeller av bakterieinfeksjon med Atypisk furunkulose forårsaket av bakterien *Aeromonas salmonicida*. Sykdommen gir sårdannelse og byller på huden samt granulomer i indre organer. Andre bakterier som gir infeksjoner hos rognkjeks er *Pseudomonas aguiliseptica*, som gir bakteriell sepsis samt blødninger og vevsnekroser i indre organer, og bakteriene *Pasteurella* sp, *Vibrio anguillarum* og *Vibrio ordalii* er også patogene for rognkjeks (Walde et al., 2019). *Tenacibaculum maritimum* er kjent å være patogen for fisk verden over, og denne bakterien er også isolert hos rognkjeks, der den gir hvite nekrotiske områder i hoderegionen sammen med økt slimproduksjon (Småge et al., 2016). Bakterien blir ofte påvist i diagnostiske undersøkelser av «kratersyken», en tilstand der rognkjeksen får hvite ringstrukturer på huden som likner smultringer, og som kan falle av å danne større sårområder («krater»). Det råder imidlertid usikkerhet om dette er det eneste patogenet som fører til denne tilstanden (Walde et al., 2019).

Infeksjoner forårsaket av parasitter

Flere parasitter er påvist hos vill og oppdrettet rognkjeks, og disse kan føre til alt fra omfattende histopatologiske endringer i vev til mindre omfattende plager som påvirker fiskens helse. Den intracellulære parasitten *Nucleospora cyclopteri* kan infisere rognkjeks, og gir makroskopiske symptomer som forstørret og blek nyre (Walde et al., 2019). Histopatologiske endringer sees i nyren ved degenerasjon av ekskretorisk vev samt nekrotisk vev som omringer sporer av parasitten. Parasitten er påvist hos villfisk på Island (Freeman et al., 2013), samt hos oppdrettet rognkjeks i Norge (Alarcón et al., 2016). Et lite paradoks er at selv om rognkjeks brukes i lakseoppdrett som lusespiser, kan den selv bli infisert av skottelus (Powell et al., 2018). Den biter seg fast i huden hos rognkjeks og forårsaker små sår som igjen kan føre til sekundærinfeksjoner. I Norge er problemer med skottelus størst i Troms og Finnmark (Walde et al., 2019).

Infeksjoner forårsaket av virus

Virus kan forårsake sykdom hos rognkjeks og kan både bidra til store lidelser for fisken samt forårsake dødelighet. *Piscine novirhabdovirus* er nylig påvist i villfanget rognkjeks på Island som skulle benyttes som stamfisk (Guðmundsdóttir et al., 2019). Viruset forårsaker sykdommen viral hemoragisk septikemi (VHS), som er svært smittsomt og kjent for å skape sykdom hos laksefisk (Bruno et al., 2013). I Norge er sykdommen listeført som kategori 2, og Norge er erklært som VHS-fri for oppdrettsfisk (Veterinærinstituttet, 2019). I Norge benyttes

også villfanget rognkjeks som stamfisk. «Cyclopterus lumpus virus» (CLuV), et virus fra *Flaviviridae*-familien, er et virus som infiserer rognkjeks, som histopatologisk gir omfattende lesjoner i form av akkumulering av fett i lever og tilstedeværelse av fett i blodkar i nyre (Skoge et al., 2018). Makroskopisk kjennetegnes den av en svært blek leverfarge, og ved infeksjoner kan viruset påvises i de fleste andre vev i standard organpakke inkludert i hjerne (Skoge et al., 2019).

Mikroorganismer som er patogene for både rognkjeks og laks i oppdrett

Enkelte mikroorganismer er patogene både for rognkjeks og laks i oppdrett, og noen av dem kan i tillegg smitte mellom rognkjeks og laks i merd. I Irland er bakterien *Piscirickettsia salmonis* påvist hos rognkjeks, og kan gi omfattende betennelse og nekrose av eksokrin pankreas og i omkringliggende fettvev, samt levernekroser og ascites. Bakterieisolatet i forsøk hadde lik gensekvens hos tilsvarende bakterie påvist hos laks (Marcos-López et al., 2017). *Moritella viscosa* er en bakterie som forårsaker vintersår hos laks i oppdrett. Atlantisk laks (*S. salar*) kan bli infisert med et isolat fra bakterien fra rognkjeks. Samtidig er rognkjeks resistent mot isolatet fra samme bakterie fra laks (Einarsdottir et al., 2018). Rognkjeks har vist seg å kunne være friske bærere av den amøbiske parasitten *Paramoeba perurans* som forårsaker amøbegjellesykdom / amoebic gill disease (AGD), og kan overføre parasitten til laks. Rognkjeks kan selv utvikle sykdom, men sykdommen utvikler seg saktere hos rognkjeks sammenliknet med laks (Haugland et al., 2017). Symptomene på sykdommen er like for laks og rognkjeks med hyperplasi av gjellelammeller. I 2018 var det fire tilfeller med påvisning av AGD hos rognkjeks i oppdrett (Walde et al., 2019). Av virus er det vist at CLuV kan smitte horisontalt, noe som bringer med seg spørsmålet om viruset kan smitte over hos laks (Skoge et al., 2019). Sopp kan også gi systemiske mykoser både hos rognkjeks og hos laks. Infeksjoner med *Exophiala* spp. er en sopp som kan føre til systemiske infeksjoner både hos rognkjeks (Bornø et al., 2016) og hos laks (Pedersen et al., 1989).

1.3 Histologi og dens betydning for kunnskap om et individ

Histologi (Gr: *histo*, vev. *logos*, læren om) er læren om celler og den ekstracellulære matriks i vev (Junquiera et al., 1995). Dette er en metode som muliggjør det å se den mikroskopiske oppbygningen av forskjellige typer vev (Amin et al., 1991). Ulike celletyper har et særegent utseende og de fleste kan observeres i de histologiske snittene ved hjelp av et lysmikroskop (Weather et al., 1987). Undersøkelser av friske vevsprøver vil fortelle hvordan et organ er oppbygd. Denne basiskunnskapen er viktig å ha for å videre kunne vurdere eventuelle forandringer på cellenivå og de histopatologiske endringene som kan oppstå i en organisme ved sykdom og død. Histologi er et viktig verktøy i diagnostikk og forskning fordi det gir en forståelse av patogenese og muligheten til å kunne se, stille og vurdere diagnostiske kriterier som kjennetegner forskjellige typer sykdommer.

1.3.1 Celler danner vev – vev danner organer

Alle celler er omsluttet av en cellemembran og inneholder en cellekjerne. Cellekjernen er omgitt av en kjernemembran og inneholder cellens genetiske informasjon. Når et stort antall av samme celletype samles danner de tilsammen et vev, og flere typer vev danner tilsammen et organ. De vanligste typer vev som finnes hos høyerestående dyr er bindevev, epitelvev, muskelvev, blod og nervevev (Amin et al., 1991). Sistnevnte vev vil ikke bli beskrevet nærmere i denne oppgaven.

1.3.1.1 Bindevev

Funksjonen til bindevev er å være en strukturell og metabolsk bidragsyter til celler i et organ, med blodforsyning via blodkar som muliggjør næringsstoffer og oksygenrikt blod til å strømme til organet og å frakte karbondioksid og metabolske avfallsprodukter vekk fra organet. Fibroblaster, adipocytter, chondrocytter og osteocytter er vanlige celletyper i bindevev (Weather et al., 1987). Fibroblaster har ovale kjerner og syntetiserer fibre av kollagen og elastin, og utgjør store deler av løst og fast bindevev hos dyr. Adipocytter (fettceller) vises i histologiske snitt som store vakuoler, hvor cellekjernen ligger ut mot cellemembranen (Amin et al., 1991). De danner sammen fettvev og kan ligge alene som enkeltceller, eller i klumper innad i løst bindevev (Weather et al., 1987). Chondrocytter (bruskceller) er celletyper som finnes i bruskvev, og det finnes flere typer basert på deres oppbygning. Hyalint bruskvev er chondrocytter omgitt av kollagenfibre, elastisk bruskvev er chondrocytter omgitt av elastiske

fibre og fibrøst bruskvev består av flere lag med hyalin fast matrix samt tykke lag av tette kollagenfibre. Osteocytter (beinceller) er byggesteinene i beinvev (Amin et al., 1991).

1.3.1.2 Epitelvev

Epitelvev består av epitelceller. De har som funksjon å skille og å koble organer med deres omgivelser, og dekker derfor alle kroppens overflater, hulrom og rør. De kan deles inn i tre typer – kubisk epitel, sylindrisk epitel og plateepitel/skvamøst epitel, hvor ofte plateepitel (og i noen sammenhenger kubiske epitelceller) finnes i enten enlaget eller flerlaget form. Cellenes kjerne korresponderer med celleformen, der det kubiske epitelet har sfærisk kjerne, sylindrepitelet har en sylindrisk kjerne og plateepitelet har flat kjerne. Kjernene ligger alltid i parallelle akser med cellenes akse, og er ofte godt synlig i histologiske snitt, noe som muliggjør å telle antall epitelceller på overflaten av organer. Epitelcellene hviler alltid på en basalmembran (Junquiera et al., 1995).

1.3.1.3 Muskelvev

Muskelvevet har som funksjon å generere nødvendig kraft til å drive en bevegelse. Bevegelsen er et resultat av en kontrahering av muskelceller på signal fra en nervecelle (Junquiera et al., 1995). Det finnes tre ulike typer muskelvev: skjelettmuskulatur, glatt muskulatur og hjertemuskulatur. Skjelettmuskulaturen er den muskulaturen som står for bevegelse av skjelettet og enkelte organer, og består av langstrakte celler, ofte med flere cellekjerne med oval form perifert plassert i cellen (Amin et al., 1991). Glatt muskulatur finnes blant annet i blodkar, mage- og tarmkanalen og urinblære. Glatte muskelceller er mindre fure-rik enn skjelettmuskulaturen, har jevnere overganger mellom cellene og sentralt plasserte ovale cellekjerne. Hjertemuskulatur finnes i hjertet, og hjertemuskelcellene er lange og sylindriske og fibre forgrenes om hverandre. Cellekjernene er sentralt plassert, og det kan ofte være opptil to cellekjerne i en celle (Weather et al., 1987). Muskelfibre ligger ikke parallelt med hverandre, og forgreiningene gjør at man i histologiske snitt kan se både lengde- og tverrsnitt av hjertemusklene (Amin et al., 1991).

1.3.1.4 Blod

Blod består av blodceller og plasma. Hos fisk utgjør blodet omtrent 2-11% av kroppsvekten, og det finnes store hematologiske variasjoner av de ulike celletypene på grunn av faktorer som kjønnsmodning, alder og årstid (Amin et al., 1991). Røde blodceller (erytrocytter), hvite blodceller (leukocyter) og trombocyter er blodceller. Dannelse og modning av blodceller

kalles hematopoese (Weather et al., 1987), og hos fisk skjer hematopoesen i hovedsak i milt, hodenyre og thymus.

Røde blodceller (erytrocytter) er den blodcellen det finnes flest av hos teleoster. Cellene har en størrelse på omtrent $8 \times 12 \mu\text{m}$ og har en oval kjerne som ligger i samme retning som cellen. Erythrocytter inneholder hemoglobin (som binder oksygen), og hemoglobinet gir i eosinofile fargeegenskaper som gjør de lett gjenkjennelige i histologiske snitt (Kryvi et al., 2016).

Hvite blodceller (leukocytt) er en del av immunforsvaret, og det finnes fem hovedcelletyper av leukocytt; lymfocytter, monocytter, neutrofiler, eosinofiler og basofiler. Neutrofiler, eosinofiler og basofiler sees ofte med et kornete (granulært) utseende i cytoplasma i histologiske undersøkelser. Dette fordi deres cytoplasma har lite affinitet for syre- eller basebaserte fargemetoder. I tillegg er cellekjernene av en flikete form noe som gir inntrykk av at de har flere cellekjerne. Derfor kalles disse cellene granulocytter (Weather et al., 1987). Lymfocytter og monocytter sees ikke med granulært cytoplasma eller flikete kjerne i histologiske undersøkelser. Lymfocytter er den mest tallrike av leukocytene og utgjør 50-80% av de hvite blodcellene. De er mellom $5-8 \mu\text{m}$ i diameter og har en stor og rund kjerne (Kryvi et al., 2016).

Trombocyttenes viktigste funksjon er å delta i koagulering av blod og å forhindre blødninger, der de med sin avlange form kan legge seg som et lokk på skadet vev og forhindre tap av blod. Hos fisk varierer trombocyttenes form fra avlang, rund til oval, og kjernen har en klumpete form (Kryvi et al., 2016). Cellene er $5-8 \mu\text{m}$, og kan skille seg fra lymfocytene ved at de er litt mindre, har en mer irregulær form på kjernen og kan ha en mer avlang form og av og til forgreininger ut fra cellen (Amin et al., 1991).

1.3.1.5 Organspesifikke celler i vev hos rognkjeks

I tillegg til å bestå av de ulike vevstypene nevnt ovenfor, består enkelte organer også av særegne celletyper som utgjør det spesifikke organet. Dette blir nærmere beskrevet i kapittel 3.

1.4 Formålet med oppgaven

Nødvendigheten av å kunne ha et oppslagsverk for normalhistologi for rognkjeks i bruk i diagnostikk er stor. Per i dag finnes slike oppslagsverk på for eksempel laks (Amin et al., 1991) og torsk (Amin et al., 2012), men ikke for rognkjeks. Med tanke på at rognkjeks er blitt Norges nest viktigste oppdrettsart etter laks (figur 1 og figur 2), og at kunnskapen om normal histologi, anatomi og biologi hos rognkjeks ikke korresponderer med oppdrettsnæringens stor-skala produksjon, er etterspørselen etter slik basis-kunnskap stor.

Hovedmål

Hovedmålet med denne oppgaven var å kartlegge normalhistologien hos rognkjeks i utvalgte organer (hud, gjeller, hjerte, nyre, milt, pankreas og lever) med hensikt å kunne bruke materialet til et oppslagsverk på normalhistologi av rognkjeks for bruk i diagnostikk og videre forskning.

Delmål

- Å kartlegge normalhistologi i HE-fargede snitt av hud, gjeller, hjerte, nyre, milt, pankreas og lever i rognkjeks fra <5g (yngel) størrelse og opp til 140 gram.
- Å undersøke hvordan ulike histologiske preparater hos rognkjeks farges av ulike spesialfarginger med det mål å kunne identifisere ulike celler og vev.
- Å undersøke effekten av dekalsifisering og eventuelle post mortem endringer i spesielt utsatte vev som gjeller.
- Å ta i bruk ny teknologi i form av scanning og presentasjon av histologiske snitt

2 Materialer og metoder

2.1 Materialer

Materialer i form av reagenser er nevnt i vedlegg II. Ellers er annet materiale i form av utstyr nevnt under hvert delkapittel.

2.2 Forsøksfisk

Totalt 50 klinisk friske fisk ble tatt ut som forsøksfisk i dette prosjektet, gjennom uttak fra desember 2017 til november 2018. 45 fisk var fra settefisklokalitetene til Mowi på Vanylven (Sighaug, 62°06.213N5°29.510E), med tilhørende sjølokalitet (Brudevika, 62°06.723N5°28.010E). Fiskene var screenet og PCR var negativ for bakterier, virus og parasitter. 5 fisk ble tatt ut fra AkvaplanNivas settefisklokalitet i Tromsø (Kraknes, 69°45.265N19°02.915E). Fisken ble avlivet med en overdose Finquel vet. «Scan Aqua», pulver til bad. Størrelsen på fisken var fra <5g (yngel) til 132g (vedlegg I).

2.3 Histologiske metoder

For å lage et histologisk snitt av et vev må det tas ut en vevsbit fra et organ. Vevsbiten må gjennom prosessene disseksjon, fiksering, fremføring, innstøping, snitting og farging før det kan undersøkes (figur 3). Produktet undersøkes så i et lysmikroskop, og for at lyset skal kunne trenge gjennom cellene må det skjæres i biter i mikrometer (μm) eller nanometer (nm) størrelse (Junquiera et al., 1995).



Figur 3 - viser steg i preparering av et histologisk snitt av en ønsket prøve. Stegene er nærmere forklart i de kommende kapitlene.

2.3.1 Uttak av organer

Organuttaket ble foretatt på forskjellige måter med hensikt å få vevsprøver av de ulike organene i forskjellige retninger. Ved ett uttak ble formalin sprøytet inn i hjertet til fisken før uttak av organer, med hensikt å erstatte blod i blodkar med formalin. Rognkjeksyngel (<5g) og individer opptil 10g ble lagt hele på formalin. For å sikre tilfredsstillende fiksering av de indre organene

ble det lagt et snitt i buken samt under gjellelokket for å sikre at formalin trengte inn til henholdsvis bukhule og gjellehule. Prøvene av rognkjeksyngel (n=10) ble etter fiksering preparert og snittet hele. Fisk >10g ble dissekert på stedet. I makroskjæringen av organer ble tre forskjellige metoder benyttet: standard organpakke, transversalsnitt og en systematisk makroskjæring av hele organer.

2.3.1.1 Standard organpakke

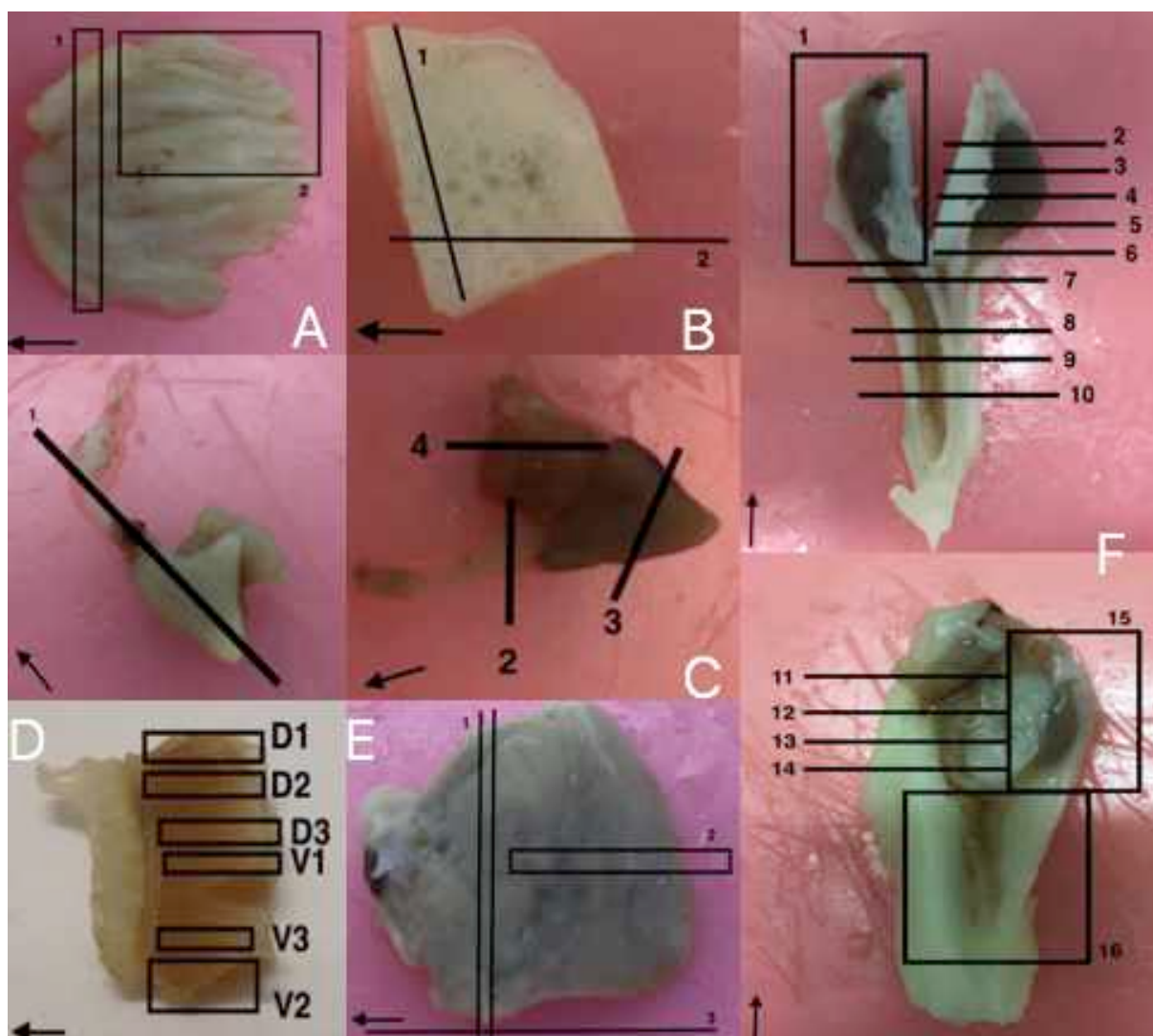
Standard organpakke brukes i diagnostiske undersøkelser ute i felt, og består av organene milt, lever, blindsekker (pylorusblindsekker) med pankreas, gjeller, hjerte, nyre, hud og skjelettmuskel (Veterinærinstituttet, 2018). Vevsprøver fra rognkjeks (n=32) i 0,4x1x1cm størrelse ble dissekert ut fra organene lever, blindtarm med pankreas, hud og skjelettmuskel. Milt og hjerte ble tatt ut hele. I gjellene ble 2.gjellebue tatt ut.

2.3.1.2 Transversalsnitt

Transversalsnitt viser snitt i transversalplan (figur I) av fisken. Rognkjeksene (n=3) ble lagt hele på formalin ute i felt, for så å makroskjæres på lab. Det var fire ulike disseksjonsområder, hvor snitt nummer 1 ble lagt rett bak gjellelokk, og nummer 2, 3 og 4 ble lagt rett bak til og med enden av bukhulen.

2.3.1.3 Systematisk makroskjæring av hele organer

Målet med å ta ut hele organer på formalin under disseksjon var å gå systematisk til verks med hvor snittene ble lagt. Organene fra rognkjeks (n=5) ble tatt ut hele og lagt på formalin ute i felt, og deretter makroskjært, som vist i figur 4, på lab. Milten ble tatt ut og preparert hel, mens de øvrige organene ble snittet i forskjellige retninger. Av pylorusblindsekker, hud og lever ble det skjært ut både lengdesnitt og tverrsnitt av organene. I hjertet ble det skjært ut et lengdesnitt av hele organet fra en fisk, samt et tverrsnitt av bulbus arteriosus (b.a), atrium og ventrikkel fra en annen fisk. I gjellene ble det systematisk skjært ut tre vevsbiter fra dorsal side (D1-3) og tre vevsbiter fra ventral side (V1-3). Nyreprøver ble tatt ut på to fisk, hvor det i den ene ble skjært ut et lengdesnitt av hodenyre, samt tverrsnitt av hodenyre og baknyre. Hos det andre individet ble det skjært ut et lengdesnitt av hodenyre og baknyre, samt tverrsnitt av hodenyre.



Figur 4 - viser oversikt over hvor snittene i de ulike organene ble lagt. A: pylorusblindsekker med pankreas med 1: tverrsnitt og 2: lengdesnitt. B: hud og skjelettmuskulatur med 1: tverrsnitt og 2: lengdesnitt. C: hjerte med 1: tverrsnitt av hele strukturen, 2: tverrsnitt av bulbus arteriosus, 3: tverrsnitt av ventrikkel, 4: tverrsnitt av atrium. D: gjeller med D1-3 dorsal side av gjellen og V1-3 ventral side. E: lever med 1: tverrsnitt, 2: lite lengdesnitt og 3: lengdesnitt av hele organet. F: nyre med 1: lengdesnitt av fornyre, 2-14: tverrsnitt fra hodenyre til baknyre, 15: lengdesnitt av hodenyre motsatt side av nr. 1, 16: lengdesnitt av baknyre. Pilen nederst i venstre hjørne indikerer fiskens retning, der cranial retning går i pilens retning.

2.3.2 Fiksering

Fiksering av vev er en prosess der målet er å unngå autolyse, bakteriell nedbrytning eller andre intracellulære prosesser som kan forekomme når vevet dør og ikke får tilført oksygenrikt blod (Junquiera et al., 1995). Prøver fra fisken ble lagt i glass med formalin med blandingsforhold vev:formalin 1:10 (Veterinærinstituttet, 2018), og fiksert i minimum 48 timer.

2.3.3 Dekalsifisering

Utvalgte gjelleprøver fra rognkjeks (n=8) ble etter fiksering lagt i syre over tid, med hensikt å gjøre gjellebuen mykere og mer egnet til snitting i mikrotomen senere, og samtidig undersøke hvor lang tid eksponert i syre gjellevevet tåler før det ikke lengre er intakt. Det ble benyttet 10% maursyre (Rolls, 2018) (ProtocolsOnline, 2016), i et 10ml reagensrør med 8ml syre i hvert rør, med blandingsforhold syre:vev 20:1 (NewcomerSupply, 2014) (IHCWorld, 2011). Dette var konstant på alle prøvene, mens tid i syre, tid i rennende vann og størrelsen på gjellevevet var variabler. Tid i syre var 12, 24, 36, 48, 60 og 72 timer. 6 gjelleprøver (fra 2. og 3. gjellebue) fra 1 fisk ble kjørt i alle tidsintervallene og 21 gjelleprøver fordelt på 7 fisk (2. gjellebue delt i tre deler) ble valgt ut til tidsintervallene 24, 36 og 72 timer, med tanke på hvilke tidspunkt det var gjennomførbart å ta prøvene ut fra syrebehandlingen.

2.3.4 Fremføring

Fremføringsprosessen av vevsbitene består av tre deler; dehydrering, klargjøring (clearing) og parafinering (tabell 1). Vevsbitene ble fremført av maskinen Citadel 2000 (Shandon), med prosedyre vist i tabell 1. Det første trinnet er dehydrering hvor formålet er å trekke vann ut fra vevet, som gjøres trinnvis med 96% og absolutt etanol (EtOH). I kar 5 er det et mellomledd mellom dehydrering og klargjøring med histoclear. Dette er et løsemiddel for å klargjøre vevet slik at parafinvoksen kan trekke inn i vevets hulrom.

Tabell 1 - viser oversikt over fremføring av vevsbitene i fremføringsmaskinen Citadel 2000 (Shandon).

Kar nr.	Innhold	Tid	Hensikt
1	96% EtOH	2 timer	Dehydrering
2	96% EtOH	2 timer	Dehydrering
3	Abs. EtOH	2 timer	Dehydrering
4	Abs. EtOH	2 timer	Dehydrering
5	1:1 100% EtOH og Histoclear	1 time	Dehydr./Klargjr.

6	Histoclear	1 time	Klargjøring
7	Histoclear	1 time	Klargjøring
8	Histoclear	1 time	Klargjøring
9	1:1 Histoclear og parafinvoks	1 time	Klargjr./Par.
10	Parafinvoks	Minimum 1 time	Parafinering
Total tid			Min. 14 timer

2.3.5 Innstøping

Kassetten med vevsbiter ble lagt ned i en varmebeholder i innstøpingsmaskinen Leica EG 1150H. Dette for at de ferdig fremførte vevsbitene løsnet lettere fra kassetten. Parafinvoks med en temperatur på 70°C ble tømt ned i metallbeholdere og så avkjølt på kuldeelement. Vevsbitene ble overført til metallbeholderen og plassert i ønsket retning. Deretter ble parafinvoks etterfylt i metallbeholderen, lokket fra kassetten lagt på og avkjølt på kjøleelement på ca. 0°C i 30 min. Voks-blokkene ble løsnet fra metallbeholderen og oppbevart i kjøleskap (4°C).

2.3.6 Snitting

Blokkene ble trimmet på 7µm i mikrotomen Leica RM 2255 til de innstøpte vevsbitene ble synlige. Deretter ble blokkene snittet ved 5µm. Objektglass dekt med vann ble lagt på varmeplate ved 38°C (Premiere Sliders warmer Xii-2002), og de ferdige snittene ble ført over på glassene for å rette seg ut. Overflødig vann ble så pipettert bort og objektglassene tørket på varmeplate og i romtemperatur før de ble overført til en lystett oppbevaringsboks.

2.3.7 Farging

Flere fargemetoder ble brukt i dette prosjektet. Farging med hematoxylin og eosin (HE) er standard fargemetode ved preparering av histologiske snitt i diagnostikk. Tre forskjellige protokoller for HE-farging ble benyttet, med hensikt å se om de utgjorde en forskjell i forskjellige typer vev og celler. Det ble benyttet tre spesialfarginger, med hensyn på å påvise ønskede celler i enkelte organer – AB-PAS, Van Gieson og May-Grünwald-Giemsa.

2.3.7.1 Hematoxylin og eosin (HE)

Av hematoxylin finnes det flere forskjellige varianter, der den mest benyttede er alum-hematoxylin, hvor alum-forbindelser fungerer som en fargebinder. Her farges komponenter som cellekjerner, i en blå-svart farge. Eosin er en fluoriserende xanten-basert syrlig farge som danner salter med positive ladninger når de binder basiske strukturer. Den binder cytoplasma i celler og bindevev, og gir disse en varierende grad av rosa, oransje og rød farge. Dette gjør det til en bra farge å bruke for å kunne skille mellom forskjellige bindevevsformer, og celletyper basert på deres farge i cytoplasma (Suvarna et al., 2019).

Det ble benyttet tre ulike protokoller for farging med hematoxylin og eosin. Protokollene har noen små forskjeller. Protokoll 2 og 3 inneholder en blåningsløsning av ammonium (NH_3) og destillert vann (dH_2O), og har som hensikt å gjøre den lilla fargen i hematoxylin en skarpere blåfarge. I tillegg har protokoll 3 en løsning med saltsyre løst i 70% etanol, der hensikten er å unngå at vevsbitene tar til seg for mye farge.

Det benyttes forskjellige alum-baserte hematoxyliner i de ulike HE-protokollene. I protokoll 2 benyttes Mayers hematoxylin (Mayer, 1903), i protokoll 3 benyttes Gills hematoxylin II (Gill et al. 1974 modifisert) (Suvarna et al., 2019), og i protokoll 1 benyttes en kombinasjon av Harris' hematoxylin (Harris, 1900), Gill og Mayers hematoxylin (Shandon Instant Hematoxylin). HE-protokollene er utført ved forskjellige institusjoner. Protokoll 1 er utført ved Norges fiskerihøgskole (NFH), UiT, protokoll 2 utført ved Veterinærinstituttet (VI) i Oslo, og protokoll 3 er utført ved VI i Harstad. Protokoll 2 og 3 benyttes som standard fargemetode på innsendte prøver for diagnostikk i henholdsvis VI Oslo og VI Harstad.

HE-protokoll 1

Snittene ble lagt i varmeskap (64°C) for deparafinering over natt. Prøvene ble så overført i histoclear i minimum 6 minutter i forkant av fargeprosessen. Fargemaskinen Leica ST 4020 ble benyttet, og oppholdstid i hver beholder var 90 sekunder (tabell 2). Etter fargemaskinen ble snittene overført til et kar med histoclear, og oppbevart der til dekkglass (24x60mm) ble limt på manuelt.

Tabell 2 – viser oversikt over steg i HE-farging i protokoll 1 ved maskinen Leica ST 4020.

Beholder nummer	Innhold	Tid	Hensikt
1	Histoclear	Minimum 6 minutter	Deparafinering/hydr.
2	Abs. EtOH	90 sekunder	Hydrering
3-4	96% EtOH	90 sekunder	Hydrering
5	Rennende vann	90 sekunder	Vasking
6-7	Hematoxylin ¹	90 sekunder	Farging
8-9	Rennende vann	90 sekunder	Vasking
10	Eosin inst.	90 sekunder	Farging
11-12	96% EtOH	90 sekunder	Dehydrering
13-14	Abs. EtOH	90 sekunder	Dehydrering
15	Histoclear	Minimum 90 sekunder	Dehydrering
Total tid			Min. 27 minutter

¹ Shandon Instant Hematoxylin, se vedlegg II

HE-protokoll 2

Snittene ble lagt i varmeskap (65°C) for deparafinering i 20 minutter. Deretter ble snittene farget i et forhåndsinnstilt program i InstrumeC fargemaskin Tribune Stainer HCS 33 for videre prosessering (tabell 3). Dekkglass ble montert på automatisk ved hjelp av maskinen Dako Coverslipper.

Tabell 3 – viser oversikt over steg i HE-farging i protokoll 2 ved maskinen Tribune Stainer HCS 33. *Blåning skjer i rennende vann.

Beholder nummer	Innhold	Total tid	Hensikt
1-3	Xylen	15 minutter	Deparafinering/hydr.
4-5	Abs. EtOH	4 minutter	Hydrering
6	96% EtOH	2 minutter	Hydrering
7	70% EtOH	2 minutter	Hydrering
8	Rennende vann	10 minutter	Vasking
9	Hematoxylin ²	4 minutter	Farging
10	Blåning*	10 minutter	Farging
11	Eosin G	1 minutt	Farging
12	Rennende vann	1 minutt	Vasking
13	70% EtOH	30 sekunder	Dehydrering
14	96% EtOH	30 sekunder	Dehydrering
15-16	Abs. EtOH	4 minutter	Dehydrering
17-19	Xylen	6 minutter	Dehydrering
Total tid			60 minutter

² Mayers hematoxylin, se vedlegg II

HE-protokoll 3

Snittene ble lagt i varmeskap (60°C) for deparafinering i minimum 20 minutter. Deretter ble de farget med et forhåndsinnstilt program i Leica Auto Stainer XL (tabell 4). Dekkglass ble montert på automatisk ved hjelp av Leica CV5030.

Tabell 4 – viser oversikt over steg i HE-farging i protokoll 3 ved maskinen Leica Auto Stainer XL.

Beholder nummer	Innhold	Total tid	Hensikt
1-3	Histoclear	14 minutter	Deparafinering/ hydrering
4-5	Abs. EtOH	5 minutter	Hydrering
6	96% EtOH	5 sekunder	Hydrering
7	70% EtOH	5 sekunder	Hydrering
8	Rennende vann	1 minutt	Vasking
9	Hematoxylin ³	3 minutter	Farging
10	Rennende vann	90 sekunder	Vasking
11	Blåning	1 minutt	Farging
12	Rennende vann	30 sekunder	Vasking
13	Saltsyre	2 sekunder	Differensiering
14	Rennende vann	30 sekunder	Vasking
15	Eosin Y	30 sekunder	Farging
16	Rennende vann	20 sekunder	Vasking
17	70% EtOH	15 sekunder	Dehydrering
18	96% EtOH	15 sekunder	Dehydrering
19-23	Abs. EtOH	Ca. 1 minutt	Dehydrering
Total tid			Ca. 34 min. 10 sek.

³ Gills II hematoxylin, se vedlegg II

2.3.7.3 AB-PAS

Periodic acid-Schiff (PAS) fargeteknikk farger karbohydratrike komponenter som slim, glykogen og soppkapsler. Schiff's reagens, som benyttes i denne fargeteknikken, reagerer med frie aldehyd-grupper i karbohydrater og danner en rød-rosa farge. Alcian blue (AB) reagerer med sure ($\text{pH} < 7$) komponenter ved lav pH (2,5). De sure komponentene i celler vil bli blåfargede. Kombinert AB-PAS vil gi påvisninger av sure (blå-fargede) komponenter samt nøytrale (rosa-fargede) komponenter og muligheten til å skille disse fra hverandre (Suvarna et al., 2019).

Snittene ble lagt i varmeskap (60°C) for deparafinerings i minimum 20 minutter. Hydrerings- og dehydreringstrinnene (1-8, 15-27) foregikk automatisk på forhåndsinnstilt program i Leica auto stainer XL, mens fargeprosedyrene (9-14) foregikk manuelt (tabell 5). Montering av dekkglass ble foretatt automatisk ved hjelp av Leica CV5030.

Tabell 5 – viser steg utført i farging med AB-PAS. Steg 9-14 foregikk manuelt, mens de resterende ble kjørt i et forhåndsinnstilt program i maskinen Leica auto stainer XL.

Steg nummer	Innhold	Total tid	Hensikt
1-3	Histoclear	14 minutter	Deparafinerings/ hydr.
4-5	Abs. EtOH	5 minutter	Hydrering
6	96% EtOH	5 sekunder	Hydrering
7	70% EtOH	5 sekunder	Hydrering
8	Rennende vann	1 minutt	Vasking
9	Alcan blue	15 minutter	Farging
10	Rennende vann	2 minutter	Vasking
11	0,5% Perjodsyre	5 minutter	Farging
12	Rennende vann	1 minutt	Vasking
13	Schiff's reagens	10 minutter	Farging
14	Rennende vann	5 minutter	Vasking
15	Hematoxylin ³	1 minutt	Farging
16	Rennende vann	90 sekunder	Vasking
17	Saltsyre	2 sekunder	Differensiering
18	Rennende vann	30 sekunder	Vasking
19	Blåning	1 minutt	Farging
20	Rennende vann	20 sekunder	Vasking

Materialer og metoder

21	70% EtOH	15 sekunder	Dehydrering
22	96% EtOH	15 sekunder	Dehydrering
23-27	Abs. EtOH	Ca. 1 minutt	Dehydrering
Total tid			Ca. 63 min. 32 sek.

2.3.7.5 Van Gieson

Farging med van Gieson (VG) teknikk er en gammel metode (1889), men er fremdeles i dag en av de mest benyttede teknikkene for farging av bindevev. Den er en del av Trikrom-fargeteknikkene og vil i reaksjon med nettverk av proteiner farge kollagenrikt bindevev, samtidig som muskel og blodceller blir ufargede. Fargeteknikken krever lav pH (1,5-3). Samtidig ved bruk av en formalinfiksert prøve må pikrinsyre benyttes for at vevet skal kunne ta opp farge. Weigert's hematoxylin benyttes fordi den er jernholdig og er med det mer motstandsdyktig mot syre sammenliknet med alum-basert hematoxylin (Suvarna et al., 2019).

Snittene ble lagt i varmeskap (60°C) for deparafinering i minimum 20 minutter. Hydrerings- og dehydreringstrinnene (1-8, 13-19) foregikk automatisk på forhåndsinnstilt program i Leica auto stainer XL, mens fargeprosedyrene foregikk manuelt (9-12) (tabell 6). Montering av dekkglass ble foretatt automatisk ved hjelp av Leica CV5030.

Tabell 6 - viser steg utført i Van Gieson fargemetode. Steg 9-12 foregikk manuelt, og de resterende i forhåndsinnstilt program på maskinen Leica auto stainer XL.

Steg nummer:	Innhold:	Total tid:	Hensikt:
1-3	Histoclear	14 minutter	Deparafinering/hydr.
4-5	Abs. EtOH	5 minutter	Hydrering
6	96% EtOH	5 sekunder	Hydrering
7	70% EtOH	5 sekunder	Hydrering
8	Rennende vann	1 minutt	Vasking
9	Hematoxylin ⁴	20 minutter	Farging
10	Rennende vann	2 minutter	Vasking
11	Pikrinsyre/syrefuksin	5 minutter	Farging
12	Rennende vann	Rask	Vasking
13	70% EtOH	15 sekunder	Dehydrering
14	96% EtOH	15 sekunder	Dehydrering
15-19	Abs. EtOH	Ca. 1 minutt	Dehydrering
Total tid			Ca. 48 min. 40 sek.

⁴ Weigerts hematoxylin, se vedlegg II

2.3.7.7 May-Grünwald-Giemsa

Farging med May-Grünwald-Giemsa (MGG) teknikk er en standard metode innen hematologi, der målcellene er erythrocytter og enkelte leukocytt. Den består av en blanding av methylen-blå fargekomponenter og eosin, der acidofile strukturer som hemoglobin og granuler i leukocytt har affinitet for eosin og farges i en rosa farge. Basofile og neutrofile strukturer, som cellekjerner, har affinitet for methylen-blå og vil få en blå farge (Piaton et al., 2016).

Snittene ble lagt i varmeskap (60°C) for deparafinering i minimum 20 minutter. Hydreringstrinnene (1-5) foregikk automatisk på forhåndsinnstilt program i Leica auto stainer XL, mens fargeprosedyrene (6-10) foregikk manuelt (tabell 7). Det ble foretatt farging både med og uten Giemsa-farging, med hensikt i å undersøke hva som ga best resultat for prøvene. Montering av dekkglass ble foretatt automatisk ved hjelp av Leica CV5030.

Tabell 7 - viser steg utført i farging med May-Grünwald/Giemsa. *Det ble utført en test uten 5%Giemsa-løsning med hensikt å se hvordan metode rognkjeksvev tar opp farge best.

Steg nummer:	Innhold:	Total tid:	Hensikt:
1-3	Histoclear	14 minutter	Deparafinering/hydr.
4-5	Abs. EtOH	5 minutter	Hydrering
6	Metanol	5 minutter	Fikserer blodceller
7	May-Grünwald løsning	5 minutter	Farging
8	5% Giemsa-løsning*	15 minutter	Farging
9	0,5% Eddiksyre	Rask	Differensiering
10	Abs. EtOH	Rask	Dehydrering
Total tid			43 minutter

2.4 Mikroskopering

Leica DM6000 B og Zeiss AXIO lab A1 ble benyttet for mikroskopering av histologiske snitt. En oversikt over de histologiske snittene som ble laget og benyttet i oppgaven ligger i vedlegg I.

2.4.1 Fotografering

Fotografering av utvalgte snitt skjedde ved hjelp av kamera Leica DFC7000T (Leica Application Suite X), Nikon Digital Sight (NIS-Elements), og Moticam 5 (Motic5.0).

2.4.2 Scanning

I disseksjon av organer (kapittel 2.3.1) ble det tatt hensyn til hvilke prøver som skulle scannes til en digital fil ved hjelp av en snittscanner. For å sikre en optimal prøve som skulle scannes inn ble det med disse organer tatt hensyn til retning i makroskjæring og i innstøping, med hensikt å vite hvilken retning organet lå i samt at det lå i plan ved innstøping i paraffinvoks. Snittene ble scannet til en digital fil ved hjelp av snittscanner Olympus Vs120, med programvare Olympus VS-ASW.

3 Resultater

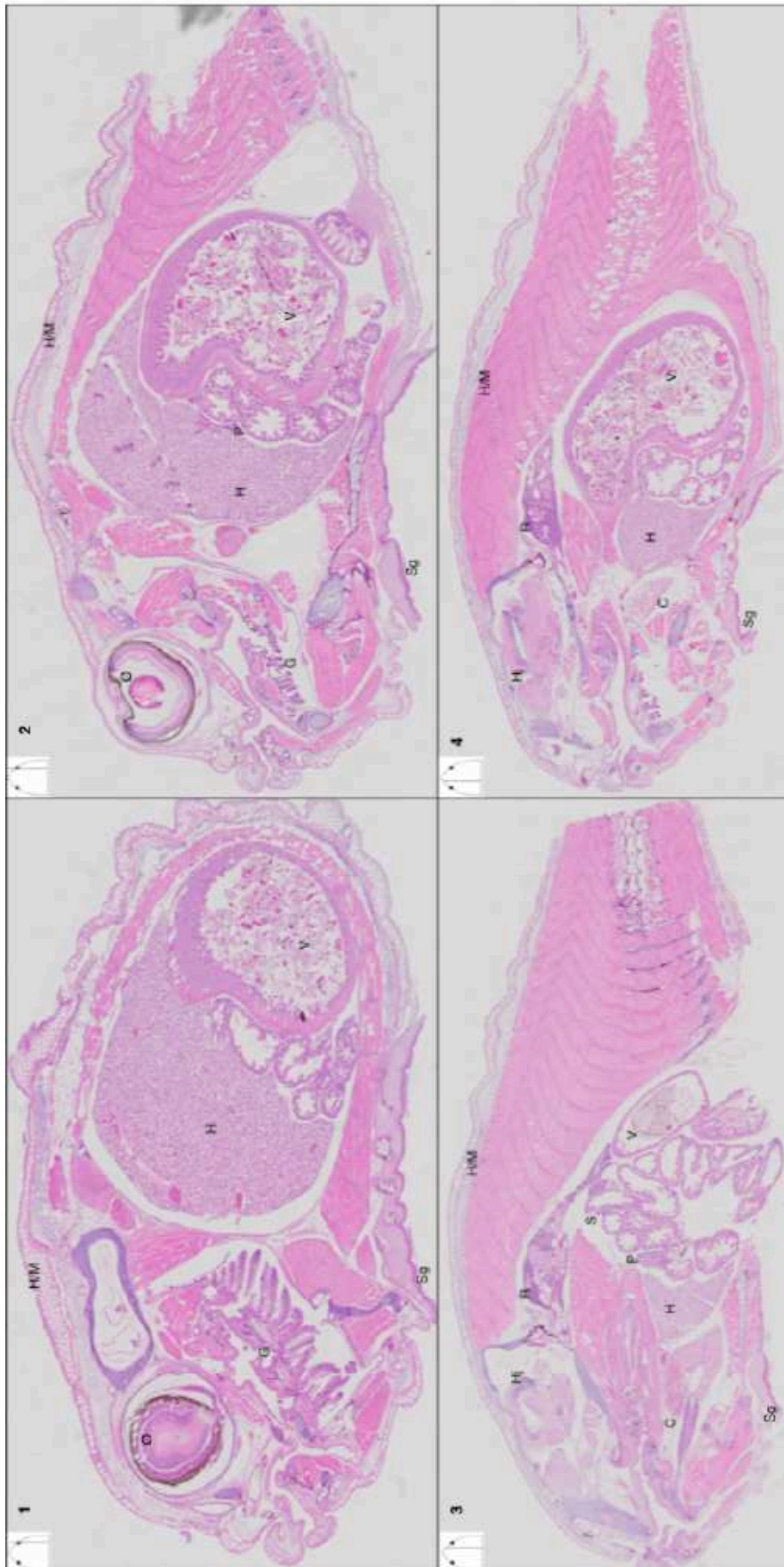
3.1 Kartlegging av normalhistologi i utvalgte organer

Den histologiske organiseringen av ulike celler og vev hos frisk rognkjeks fra oppdrett ble undersøkt i yngel og sammenlignet med større fisk. Yngel og større fisk (<10g-115g) ble tatt fra Mowi sin settefisklokalitet i Vanylven (Sighaug, 62°06.213N5°29.510E) i perioden desember 2017 til oktober 2018, i denne perioden ble det også tatt ut fisk fra lokalitetens sjøanlegg (Brudevika, 62°06.723N5°28.010E). Fisk i størrelsen 89-132g ble i november 2018 tatt ut fra AkvaplanNivas settefisklokalitet i Tromsø (Kraknes, 69°45.265N19°02.915E).

Ved obduksjon og innsending av organer for histologisk/histopatologisk undersøkelse vil et bestemt utvalg av organer sendes inn for analyse. Dette utvalget kalles en organpakke. En standard organpakke fra rognkjeks inneholder følgende organer; milt, lever, pylorusblindsekker med pankreas, mage og baktarm, gjeller (gjellebue nummer to), hjerte, nyre (midtnyre), hud og skjelettmuskulatur (Veterinærinstituttet, 2018). Av disse organene ble milt, lever, pylorusblindsekker med pankreas, gjeller, hjerte og nyre (hel) valgt ut for analyse, basert på at det er der histopatologiske endringer i stor grad inntreffer, samt at muligheten for sammenlikning med andre histologiske undersøkelser av andre fiskearter er tilstede i disse organene. I forsøket ble hel yngel preparert for histologi og snittet, det ble lagt vekt på vise ulike saggital- og transversalplan. Fra større fisk ble standard organpakke tatt ut. Ved preparering og fremføring ble det lagt vekt på å få undersøkt de enkelte organer med hensyn til anatomisk oppbygning og snittretning som beskrevet i kapittel 2.3.1 og i figur 4.

Organer i organpakken ble identifisert. Hud og skjelettmuskulatur vises rundt hele individer av yngel, der andelen skjelettmuskulatur er størst dorsalt og caudalt. Gjellene ligger plassert cranialt, og hjertet ligger i perikardialhulen, sentralt plassert i forhold til gjellene. Perikard, et lag tynt bindevev, avgrenser hjertet fra lever. Leveren hos rognkjeksyngel tar stor plass i bukhulen, og magesekken ligger caudalt for leveren. Rundt magesekken ligger tarm og pylorusblindsekker med omkringliggende pankreasvev. Milten ligger dorsalt i bukhulen, innimellom fettvev og pylorusblindsekker. Peritoneum, bukhulens omsluttende bindevevslag, skiller innholdet i bukhulen fra nyren – som ligger dorsalt, rett under ryggstølen.

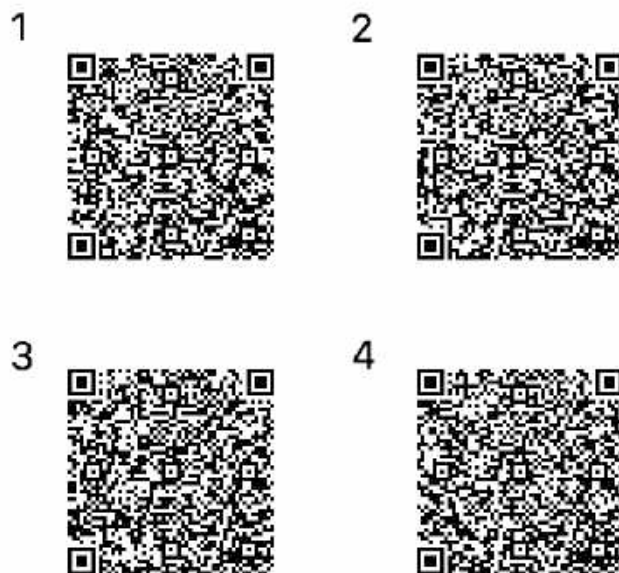
I figur 5 vises saggittalsnitt av rognkjeksyngel, med figurer i venstre hjørne i hvert bilde som indikerer hvor snittet er plassert i fisken. I prøver som ble snittet medialt (bilde 3 og 4, figur 5), vises organer som nyre, hjerte og hjerne. En liten del av lever, spiserør og større deler av mage- og tarmkanalen vises også på de mer mediale snittene. I snitt som ble lagt lateralt (bilde 1 og 2, figur 5) vises større deler av øye og gjeller. Store deler av lever og magesekk er også fremtredende i fiskens bukhule her. Sugekopp samt hud og skjelettmuskulatur kommer godt frem i alle plasseringene.



Figur 5 – viser scan av saggittalsnitt av rognkjeksyngel, farget med HE (protokoll 2). Her vises H/M: hud og skjelettmuskulatur, G: gjeller, C: hjerte, R: nyre, S: milt, P: pankreas/pylorusblindsekker og H: lever. På bilde 1 og 2 vises også Ø: øye, 3 og 4 viser Hj: hjjerne. Bildene viser også Sg: sugekkopp. I bildenes venstre hjørne vises området snittet ble lagt.

Figur 5 viser 4 lengdesnitt av hel rognkjeksyngel snittet i 4 ulike medialplan fra hode til hale. Figur 5. 1 viser ett lateralt mediansnitt og snitt gjennom øye, gjeller, lever, magesekk og sugekopp. I dette snittet kommer organer som gjeller, øye og lever frem. Figur 5.2 viser et lateralt mediansnitt og snitt gjennom øye, delvis gjeller, lever, pylorusblindsekker med pankreas, magesekk og sugekopp. Fremtredende i dette snittet er øyets linse, lever og magesekk. Legg merke til at i de to laterale mediansnittene er lever, gjeller og øye fremtredende i figur 5.1, og øyets linse, mindre utsnitt av lever og større utsnitt av magesekk fremtredende i figur 5.2. Figur 5.3 viser mediansnitt og snitt gjennom hjerne, hjerte og nyre. Figur 5.4 viser mediansnitt og snitt gjennom hjerne, delvis hjerte, nyre og magesekk. Legg merke til andel nyre og hjerte i figur 5.3 og 5.4, hvor mediansnittene er lagt på hver side av medialplanet.

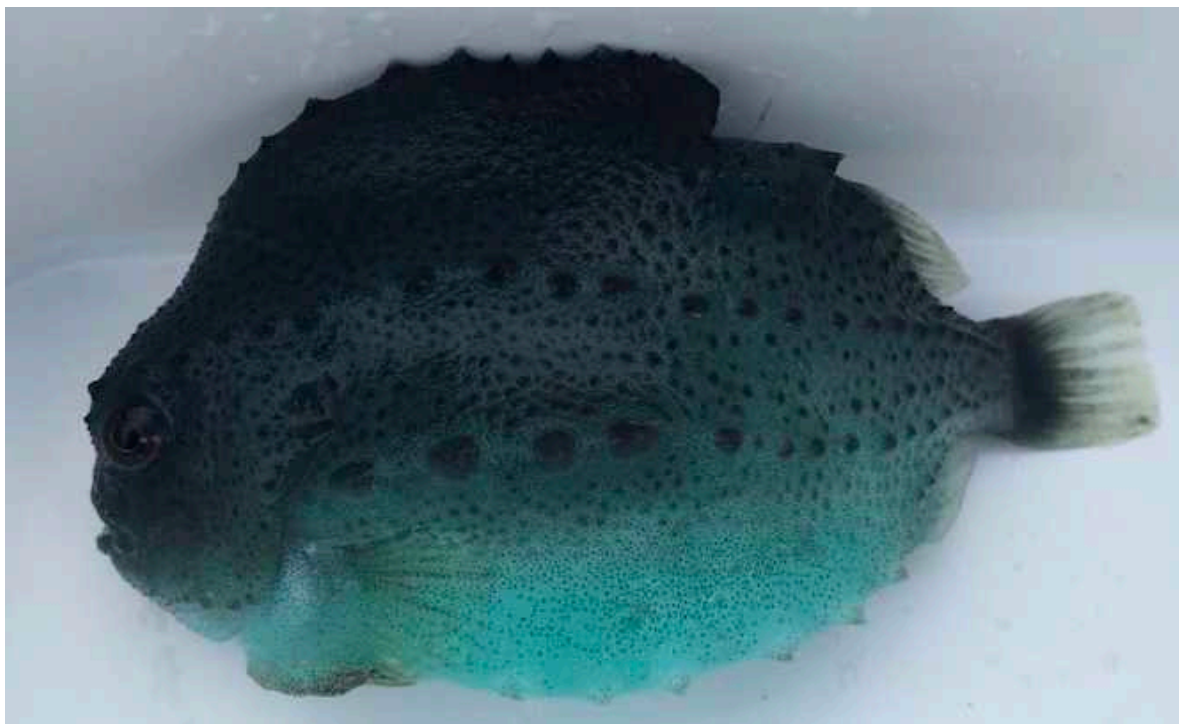
De ulike snittene ble scannet inn og kan studeres nærmere ved å følge QR-koder oppgitt under dette avsnittet, ved hjelp av en QR-kodeleser fra en applikasjon lastet ned på mobiltelefon, eller undersøkes via datamaskin ved hjelp av URL i vedlegg III. Innloggingsinformasjon til databasen der filene ligger er ved brukernavn: oda, passord: oda_vs120, og man må være pålogget UiTs nettverk for å få tilgang.



I kommende kapitler ligger flere QR-koder med tilgang til en digital fil av det scannede snittet til de aktuelle vevene som blir presentert. Brukernavn og passord som beskrevet over kan benyttes på alle QR-kodene, samt for URL i vedlegg III.

3.1.1 Hud

Hud hos fisk består av epidermis, dermis og hypodermis og er fiskens ytre forvarsbarriere mot ytre påkjenninger (Kryvi et al., 2016). Rognkjeksens hud er sammensatt av flere celletyper. Makroskopisk gjenkjennes den igjen ved en til tider blå til turkis farge, samt utstikkende pigger (figur 6). Fargen varierer fra individ til individ, fra turkis til lysere grå. Yngel og voksen rognkjeks har ofte en mer blassere farge sammenliknet med individer fra ca. 10-200g.

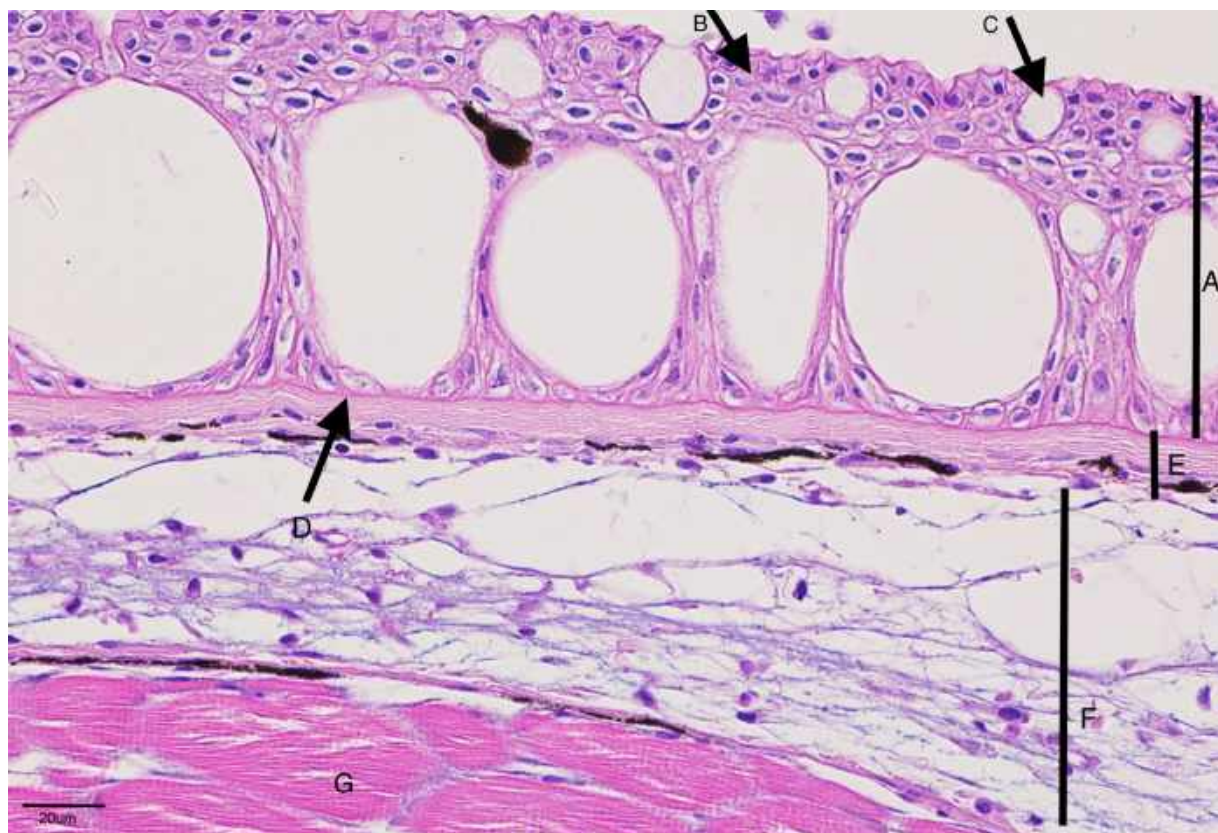


Figur 6 - viser makroskopisk bilde av rognkjeks. Fisken er fra sjø. Legg merke til turkis farge som forsterkes i ventralt område. Fargen på rognkjekshud varierer mellom individer og størrelser.

Figur 6 viser et makroskopisk bilde av rognkjeks ca. 100g, fisken er fra sjø og fra kommersiell matfiskproduksjon av atlantisk laks. Fisken har en tydelig blå farge på huden og fargen er mørkere dorsalt enn ventralt. Lateralt ligger pigger organisert i rekker langs hele fiskens side, hvor det innimellom rekkene ligger mindre pigger mer uorganisert. Brystfinnene ligger posteriort for gjellelokket. Halefinnen ligger som et utspring fra fiskekroppen på caudal side, hvor halegropen snevres inn til en tynnere forlengelse av fiskekroppen. Dorsalt ligger en større «pigg» dekt av mindre pigger, som lateralt på fisken. Posteriort for ryggpiggen ligger en ryggfinne.

Histologisk deles huden hos rognkjeksyngel opp i epidermis, dermis og skjellettmuskel (figur 7). Epidermis består av flerlaget plateepitel, som ligger ytterst mot omgivelsene. Her finnes

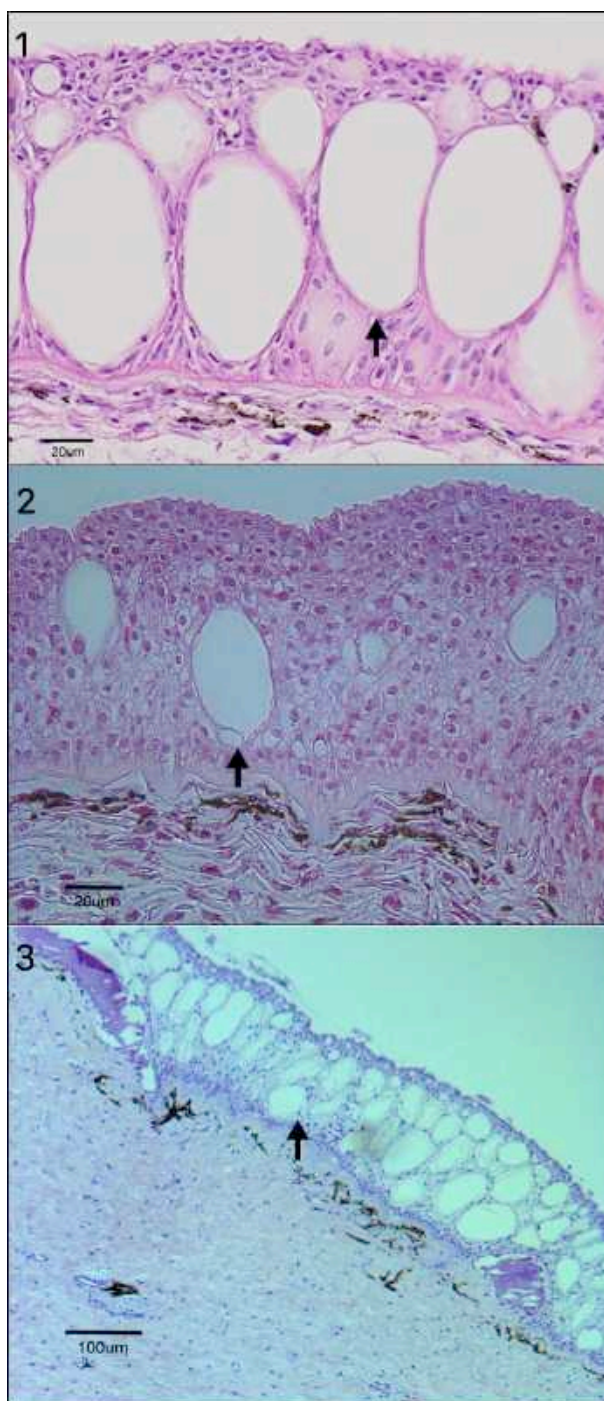
også slimceller og ovale til runde vakuoler. Epidermis hviler på en basalmembran, og under basalmembranen ligger et fast og løst lag bindevev fulgt av skjelettmuskulatur.



Figur 7 - viser histologisk snitt av hud i rognkjeksyngel (<5g), farget med HE (protokoll 2), 40x forstørrelse.. A: viser epidermis med flerlaget plateepitel. B: epitelcelle, C: slimcelle. Dette hviler på en D: basalmembran, med underliggende E: fast bindevev. Under dette ligger et lag med F: med løst bindevev, med G: skjelettmuskulatur under.

I figur 7 vises et histologisk snitt av hud til rognkjeksyngel (<5g). I epidermis ligger epitelceller lagvis med en sentral basofil cellekjerne. Innimellom ligger slimceller og flere ovale til runde vakuoler. Vakuolene er mer tallrike hos rognkjeksyngel sammenliknet med større rognkjeks. Hos yngel ligger vakuolene jevnt rundt i epidemis i de fleste områder i fiskens epidermis, mens de hos større rognkjeks ligger de mer spredt og er mindre tallrike. Epidermis hviler på en basalmembran, som får en rosa farge i HE-snitt. Under ligger et lag med bindevevst fibre tett sammen, også i en rosa farge noe lysere enn basalmembranen. Under det faste bindevevslaget ligger løst bindevev som farges lilla i HE-snitt. Her vises også celler som fibroblaster med eosinofilt cytoplasma og en basofil rund til oval cellekjerne apikalt. Skjelettmuskulaturen ligger under det løse bindevevet, organisert i tverrstripet mønster med perifere cellekjerne. Legg merke til mørkere områder av melanoformer som er gjennomgående i hele hudsnittet, fra epidermis og helt ned mot skillet mellom løst bindevev og skjelettmuskulatur.

I epidermis varierer antall, størrelse og distribusjon på vakuolene mellom individer. Hos rognkjeksyngel (<5g) er det observert tallrike vakuoler som ligger lagvis i epidermis, og hos større rognkjeks (>50g) er det observert at antall vakuoler er færre, mindre i størrelse og ligger mer spredt enn de gjør hos rognkjeksyngel. Unntak fra disse observasjonene var tilstede. Fra én prøve fra rognkjeks >50g vises mange, store vakuoler som ligger lagvis i epidermis (figur 8).



Figur 8 – viser histologiske snitt av vakuoler i epidermis hos rognkjeks, farget med HE. 1: transversalsnitt av rognkjeksyngel (<5g), 40x forstørrelse, viser store ovale vakuoler i epidermis som ligger plassert lagvis. 2: tverrsnitt av hud fra rognkjeks (75g), 40x forstørrelse, viser få vakuoler som ligger spredt i epidermis. 3: tverrsnitt fra hud fra rognkjeks 95g (fra sjø), 10x forstørrelse, viser tallrike vakuoler ligge lagvis i epidermis.

Figur 8 viser ulike observasjoner av vakuoler i epidermis hos rognkjeks. Hos rognkjeksyngel (<5g) er trenden tallrike ovale vakuoler >40µm som ligger lagvis langs hele epidermis hos fisken, ofte i flere lag. Hos rognkjeks >50g er den observerte trenden vakuoler med størrelse <40µm, som ligger enkeltvis langs epidermis. Unntak fra trendene vises i 1/11 prøver fra rognkjeks >50g der det er observert tallrike ovale vakuoler som ligger lagvis i epidermis, og i 1/11 prøver av rognkjeks >50g finnes store ovale vakuoler (>40µm) som ligger organisert i ett lag i epidermis (tabell 8).

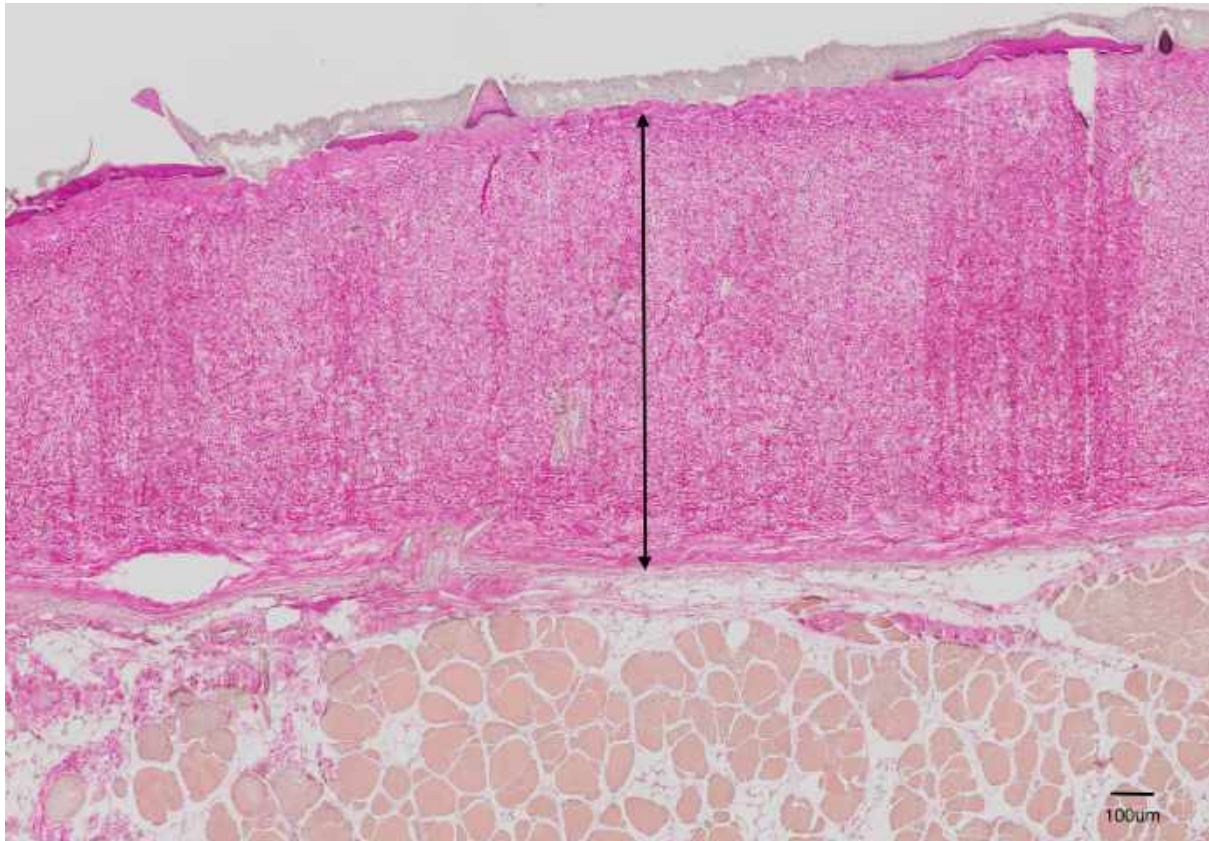
Tabell 8 – viser oversikt over observasjoner av n=22 hudprøver fra rognkjeks i forskjellige størrelser. Rognkjeksyngel (<5g) hadde mange, store vakuoler som lå lagvis i epidermis. Hos rognkjeks >50g hadde 9 individer få, enkeltvis spredte vakuoler og i mindre størrelse enn hos yngel, 1 prøve hadde noen store enkeltvis spredte vakuoler og 1 prøve hadde mange, store vakuoler som lå lagvis.

	Mange, >40µm og lagvis	Noen, >40µm, enkeltvis	Få, <40µm og enkeltvis
<5g	11	0	0
>50g	1	1	9

For å se et scannet snitt av hudprøve fra rognkjeks (103g), scann inn denne QR-koden, eller følg vedlagte URL i vedlegg III. Hud kan også studeres i scann fra rognkjeksyngel (side 28).



Hudprøver fra rognkjeks (103g) ble spesialfarget med VG, med hensikt å farge bindevev. Spesialfargingen viser en sterk rosa farge på det løse bindevevslaget, noe som indikerer at vevet er rikt på kollagen (figur 9). Bindevevslaget strekker seg fra basalmembranen under epidermis og ned mot skjelettmuskulatur.



Figur 9 - viser bindevev hos rognkjeks (103g). Farget med VG, 2,5x forstørrelse. Den klare rosa fargen indikerer innhold av kollagen. Gjennomsnittlig størrelse på bindevevslag hos rognkjeks >50g var 1185 μ m (n=6).

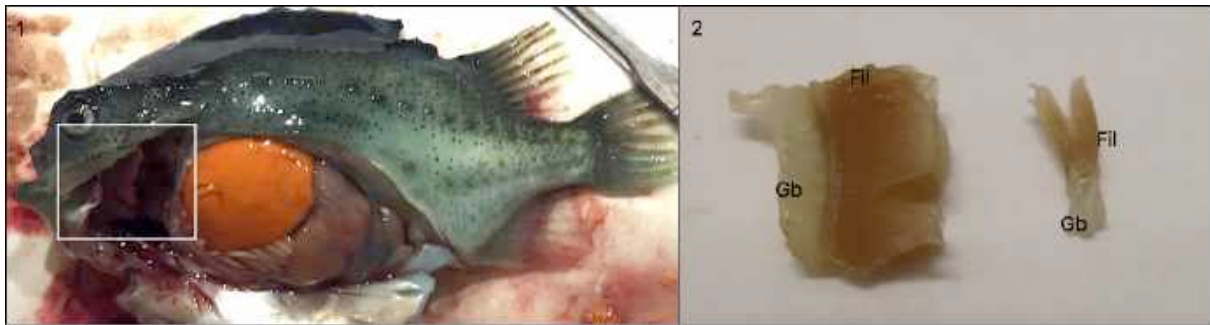
Figur 9 viser hudprøve fra rognkjeks 103g farget med VG. En klar rosa farge vises i store deler av bildet. Dette indikerer høyt innhold av kollagen (figur 9). Pigger i epidermis farges også rosa ved farging med VG, mens epitelceller i epidermis og skjelettmuskulatur farges i en brun-rød farge. Bindevev strekker seg ned mot skjelettmuskelfibrene, og omgir deler av den i overgangen mellom bindevevslaget og skjelettmuskulatur. Hos rognkjeks >50g var gjennomsnittlig størrelse på bindevevslaget 1194 μ m (n=6). I disse prøvene utgjorde bindevevslaget i gjennomsnitt 72% av huden, målt fra epidermis og frem til skjelettmuskulatur.

For å se scannet snitt av hudprøve fra rognkjeks (103g) farget med VG, bruk denne QR-koden eller se URL i vedlegg III.



3.1.3 Gjeller

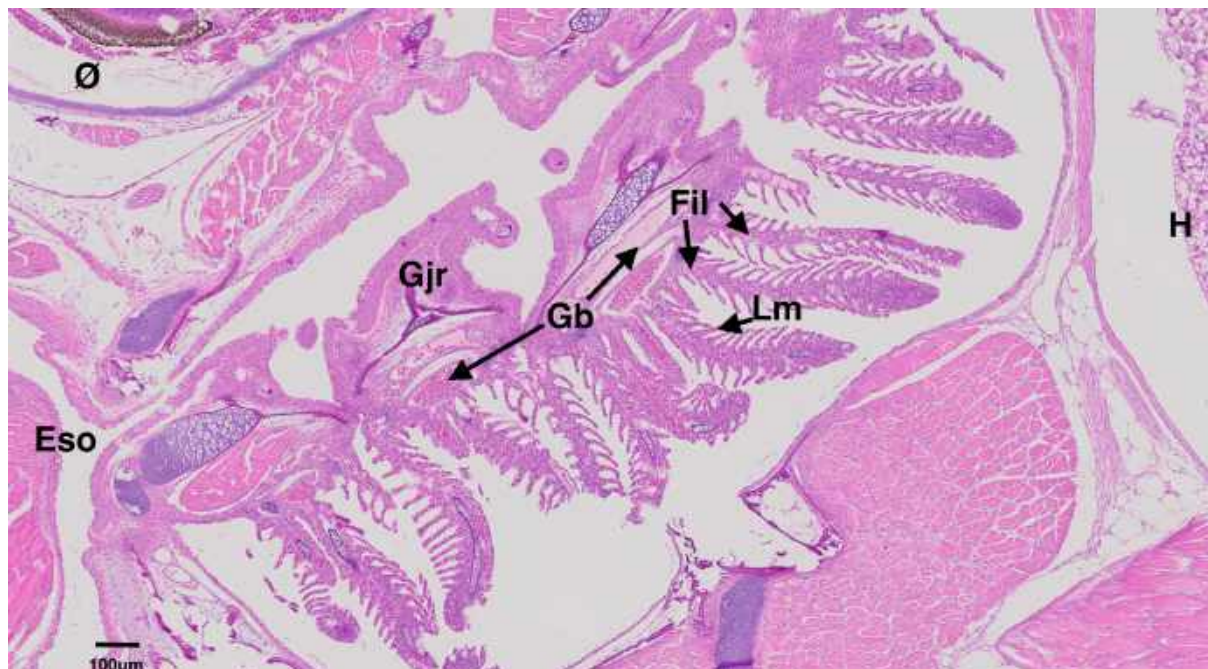
Gjeller hos fisk består av gjellebue med filamenter og lameller utstående i en retning, og gjellegitterstaver utstående i motsatt retning. Det er fire gjellebuer på hver side av fisken hos de fleste teleoster (Kryvi et al., 2016). Gjellene hos rognkjeks ligger i cranial ende av fisken, lateralt plassert (figur 10.1). Gjellene er bygd opp av en bruskholdig gjellebue, med gjellegitterstaver ut mot spiserøret på den ene siden og filamenter mot omgivelsene på den andre siden (figur 10.2).



Figur 10 - viser 1: bilde av rognkjeks under obduksjon og gjellenes plassering i fisken. 2: makroskopisk bilde av gjeller i ulike retninger med Gb: gjellebue og Fil: filamenter.

Gjellene ligger beskyttet bak operculum. Hos rognkjeks er operculum er tykt og stivt, med en liten åpning lateralt som tillater vanngjennomstrømming til gjellene. Ved obduksjon av rognkjeks er det derfor nødvendig å klippe opp bindevevet mellom operculum og huden ut mot sidene, for så å klippe vekk hele strukturen for å få tilgang, som gjort i figur 10.1. Figur 10.2 viser gjeller fra 2.gjellebue, tatt ut hel til venstre, og et tverrsnitt av gjellene vises til høyre. Gjellebuen er en bruskholdig struktur som fester gjellene til kroppen.

Mikroskopisk kan man se at inn mot spiserøret har gjellebuen et cellelag med rikt innhold av slimceller, og på motsatt side springer lameller og filamenter ut (figur 11). Filamentene ligger i gjellehulen, som er avgrenset fra omgivelsene med en bindevevsmembran.

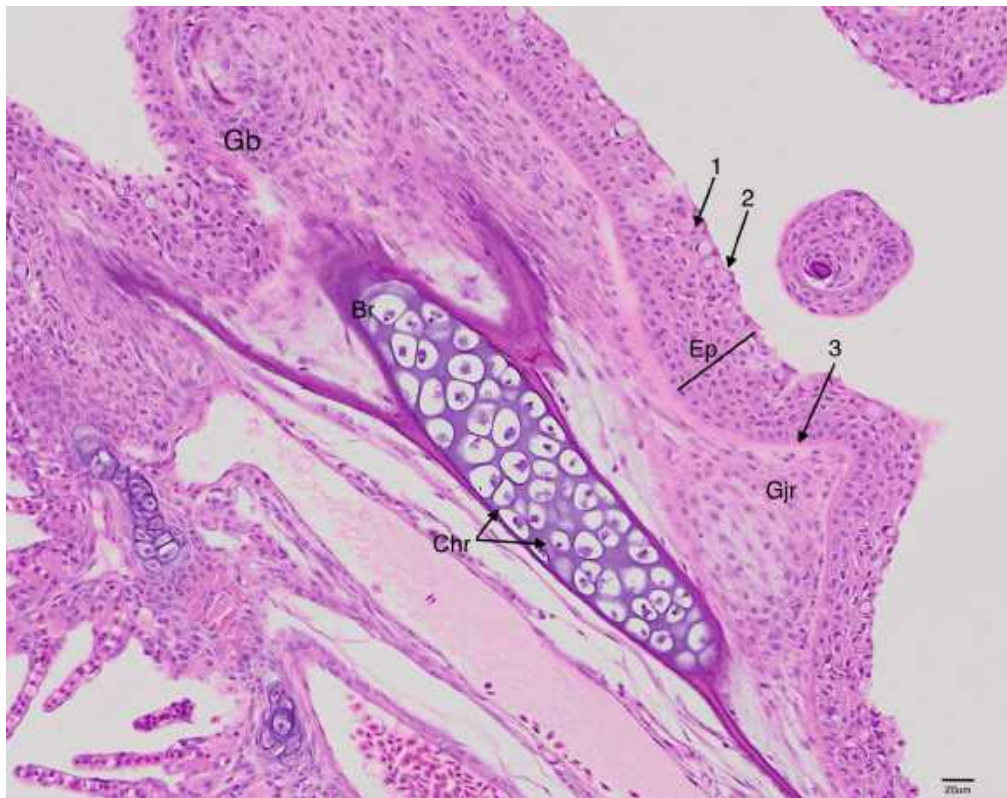


Figur 11 - viser sagittalsnitt av rognkjeksyngel (<5g). Snittet er farget med HE (protokoll 2), scannet, 5x forstørrelse.. Her vises Gb: gjellebuen med kobling til Eso: spiserør fra Gjr: gjellerakene, og på den andre siden Fil: filamenter som springer ut fra den bruskholdige gjellebuen, med Lm: lameller. Her vises også Ø: øyet øverst til venstre samt H: lever helt til høyre i bildet.

I figur 11 vises et sagittalsnitt av gjellene med omkringliggende organer hos rognkjeksyngel (<5g). Gjellegitterstavene ligger vendt mot spiserøret. Gjellebuen deler organet i to, fra gjellegitterstavene på den ene siden og filamentene på den andre siden. Filamentene ligger i gjellehulen, og en tynn bindevevsmembran kan sees rundt det rommet filamentene ligger i. Øyet ligger cranialt for gjellene, og bukhulen ligger caudalt for gjellene.

Gjellegitterstaver

Gjellegitterstavene er formet som små utstikkere mot spiserøret, og består av et tynt lag med epitelceller og slimceller. Dette hviler på en basalmembran, deretter finnes chondrocytter som danner bruskvevet i gjellebuen.

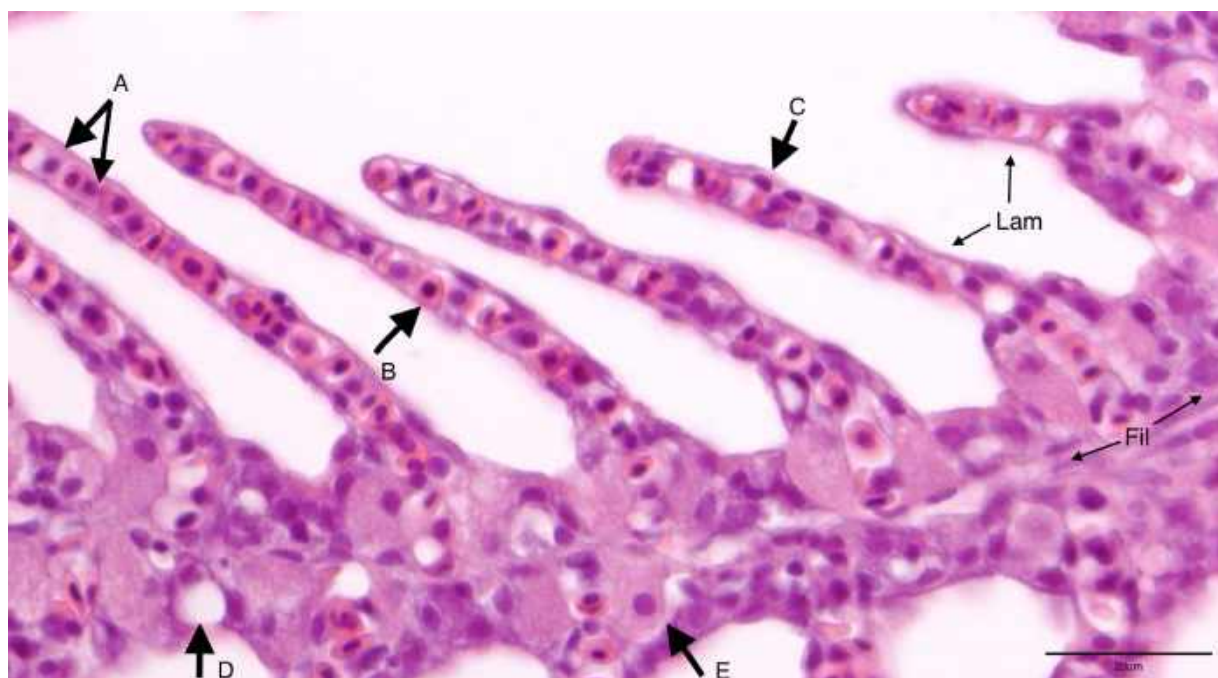


Figur 12 - viser Gb: gjellebue hos rognkjeksyngel (<5g), farget med HE (protokoll 2), scannet, 10x forstørrelse.. Her vises Br: bruskvev med innhold av Chr: chondrocytter. Gjr: gjellegitterstaver ligger mot lumen av spiserøret, og der ligger et Ep: epitelcellelag med 1: epitelceller, 2: slimceller som hviler på en 3: basalmembran.

I figur 12 vises et flerlaget epitelcellelag som farges rosa i HE-snitt, med runde til ovale basofile sentralt plasserte cellekjerne. Slimceller ligger ut mot spiserøret, og vises som større runde strukturer med svakt farget cytoplasma. Dette epitelcellelaget hviler på en basalmembran, som vises i en lys rosa farge. Selve piggen i gjellegitterstavene ligger under basalmembranen, og består av lyst rosa-fargede celler med rund mørkere cellekjerne. Chondrocytter danner bruskvev i gjellebuen, med omkringliggende løst bindevev. Blodkar kan sees rundt bruskvevet og bindevevet, med et tynt enlaget epitelcellelag (endotel) med innhold av røde blodceller. Nederst i figurens venstre hjørne kan man se mer bruskvev, i en mer lilla farge enn omkringliggende vev. Disse danner utspringene til filamentene som strekker seg ut fra gjellebuen i motsatt retning av gjellegitterstavene.

Filamenter og lameller

Gjellenes filamenter og lameller består av flere celletyper (figur 13). I filamentene ligger områder med brusk og blodkar som bygger opp organets struktur. Lamellene springer ut fra filamentet, og består av kloridceller i overgangen mellom filament og lamell, og pillarceller som bygger opp lamellens utstrakte struktur. Epitelceller dekker pillarcellene og lamellenes overflate.



Figur 13 – viser histologisk snitt av Fil: filament og Lam: lameller til rognkjeksyngel (<5g), farget med HE (protokoll 2), 40x forstørrelse.. A: pillarceller støtter lamellenes struktur, og innimellom ligger B: røde blodceller. C: epitelceller dekker lamellenes overflate. Inne mot basis finnes D: slimceller og E: kloridceller.

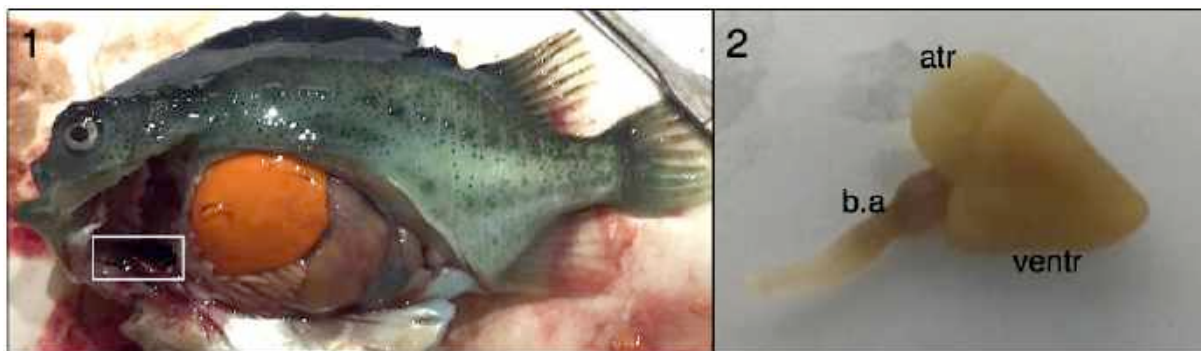
I figur 13 vises et histologisk snitt av filamenter og lameller hos rognkjeksyngel. Lamellene strekker seg ut perpendikulært fra filamentet. Kloridcellene har i HE-snitt en lys rosa cytoplasma, med en rund apikal cellekjerne, og ligger plassert i overgangen mellom filament og lamell. Slimceller ligger i overgangen mellom lamell og filamenter, og disse er også observert å ligge distalt utover i lamellen. Epitelceller dekker lamellenes overflate. Pillarcellene danner lamellens struktur, og ligger plassert som H-er stablet på hverandre. Mellom pillarcellene dannes kapillærer hvor det er plass til en enkelt rød blodcelle.

For å se et scannet snitt av gjelleprøve fra rognkjeks (90g), scann inn denne QR-koden, eller følg vedlagte URL i vedlegg III. Gjeller kan også studeres i scann fra rognkjeksyngel (1, side 28).



3.1.4 Hjerte

Hjertet hos fisk består av fire kammer; sinus venosus (s.v), atrium, ventrikkell og bulbus arteriosus (b.a). Atrium og ventrikkell består av tre lag – epikard, endokard og myokard (Kryvi et al., 2016). Hjertet til rognkjeks ligger ventralt i fisken, medialt plassert i forhold til gjellene (figur 14.1). Hos rognkjeks finnes også s.v, atrium, ventrikkell og b.a (figur 14.2). Ventrikkellen hos rognkjeks har en pyramidal form. Under prøvetaking og preparering av prøver er s.v vanskelig å få med, noe som gjorde at den ofte uteble fra prøvetaking. Det viser seg at det er mulig å få med s.v i uttak og snitting av hel yngel (figur 15).

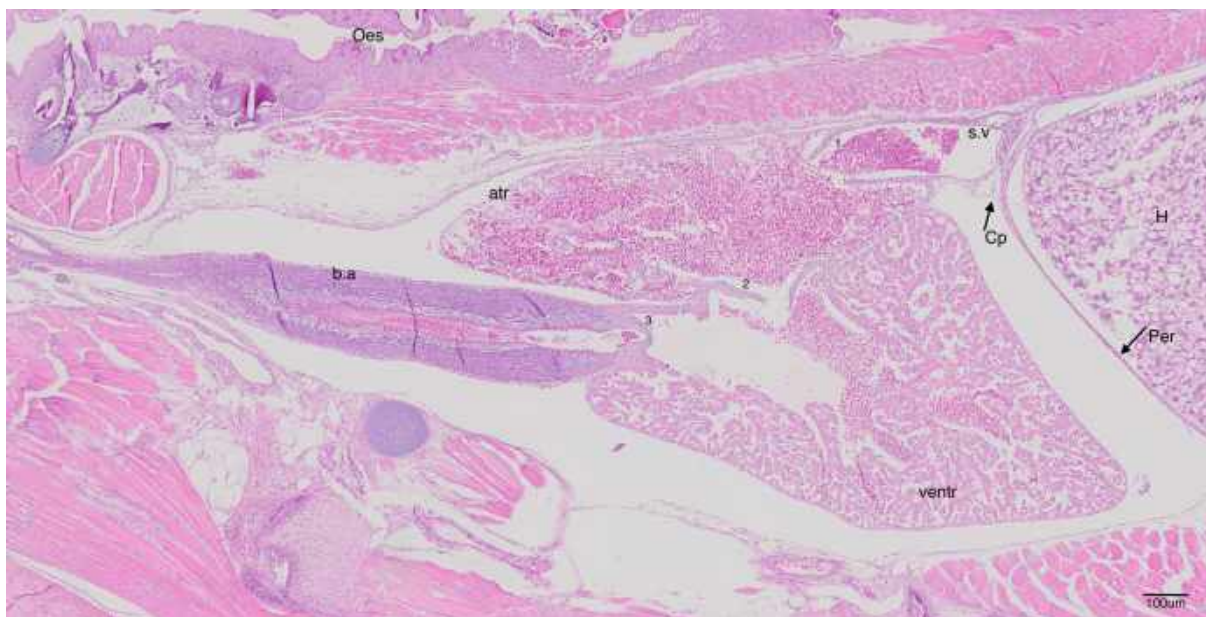


Figur 14 - viser makroskopisk bilde av hjertets plassering hos rognkjeks. 1: viser hjertets plassering på fisken. 2: viser oppbygning av hjertet med b.a: bulbus arteriosus, atr: atrium og ventr: ventrikkell.

I figur 14.1 vises hjertets plassering i rognkjeks, det ligger ventralt plassert i cranialt i fisken. I figur 14.2 vises hele organet, hvor rognkjeksens ventrikkell har en pyramidal form. Atrium ligger plassert ved siden av ventrikkellen, hvor s.v i teorien skulle ha ligget ved siden av. Bulbus springer ut fra ventrikkellen, og har en stabil struktur som går over i ventral aorta.

Sagittalsnitt av hel yngel resulterte i at alle hjertets kamre ble inkludert (figur 15).

I samme snitt ble også hjerteklaffer observert på hjertets innside, og omkringliggende organer på hjertets utside.



Figur 15 - viser sagittalsnitt av rognkjeksyngel (<5g), farget med HE (protokoll 2), scannet, 5x forstørrelse.. Her vises b.a: bulbus arteriosus, atr: atrium, ventr: ventrikel og s.v: sinus venosus. I dette snittet kan klaffer mellom hjertekamrene observeres, med 1: sinutrialklaff, 2: atrioventrikularklaff og 3: klaff mellom ventrikel og b.a. Hjertehulen er omsluttet av et bindevevslag Cp: perikard, der det i motsatt retning ligger en annen hinne – Per: peritoneum (bukhinnen). H: lever ligger inne bak bukhinnen, i bukhalen. Dorsalt ser man at hjertehulen ligger ventralt plassert i forhold til Oes: spiserør.

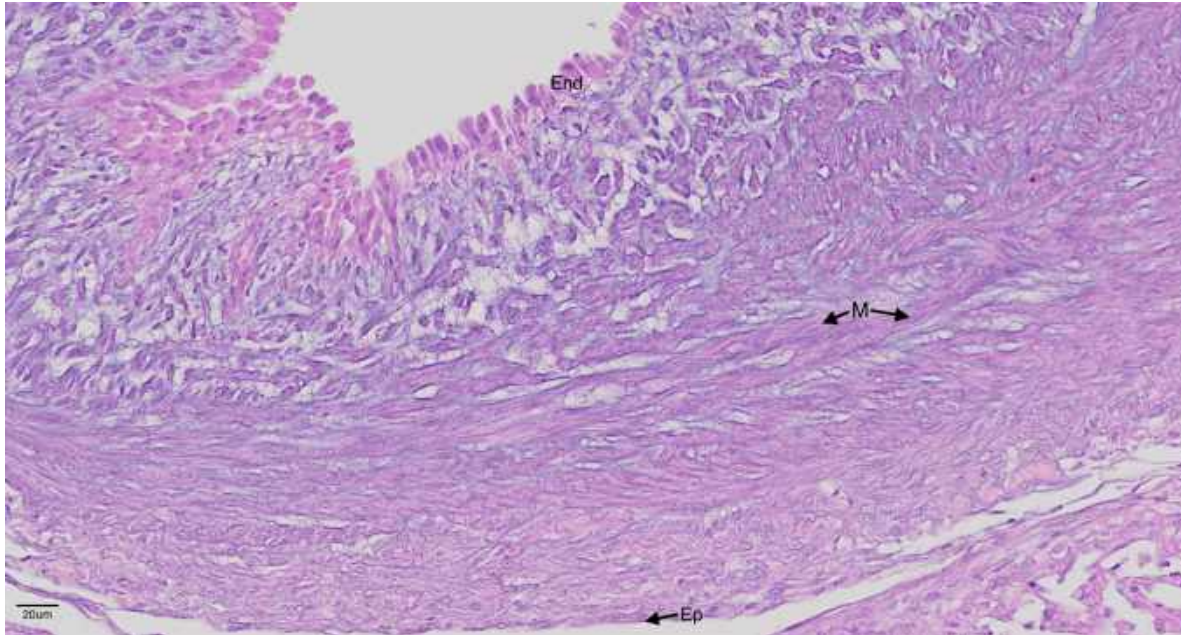
I figur 15 vises hjertets plassering inne i perikardialhulen. Perikard skiller hulrommet fra bukhalen, sammen med bukhinnen (peritoneum). Det er hulrom inne i perikardialhulen, mellom hjertet og perikard som betyr at hjertet har rom å bevege seg på. Hjertet ligger ventralt plassert i forhold til spiserøret, og på cranial side av bukhalen. B.a farges mørk lilla i HE-snitt, mens s.v, atrium og ventrikkelen farges lysere rosa. Snittet viser innhold av røde blodceller i hjertets kamre, særlig uttalt i atrium. Klaffer mellom de ulike kamrene vises i snitt av rognkjeksyngel. Disse består av bindevev, og ligger mellom s.v og atrium (sinutrialklaff), mellom atrium og ventrikel (atrioventrikularklaff) og mellom ventrikel og b.a.

For å se et scannet snitt av hjerte fra rognkjeks (75g), scann inn denne QR-koden, eller følg vedlagte URL i vedlegg III. Hjertet kan også studeres i scann fra rognkjeksyngel (3, side 28).



Bulbus arteriosus

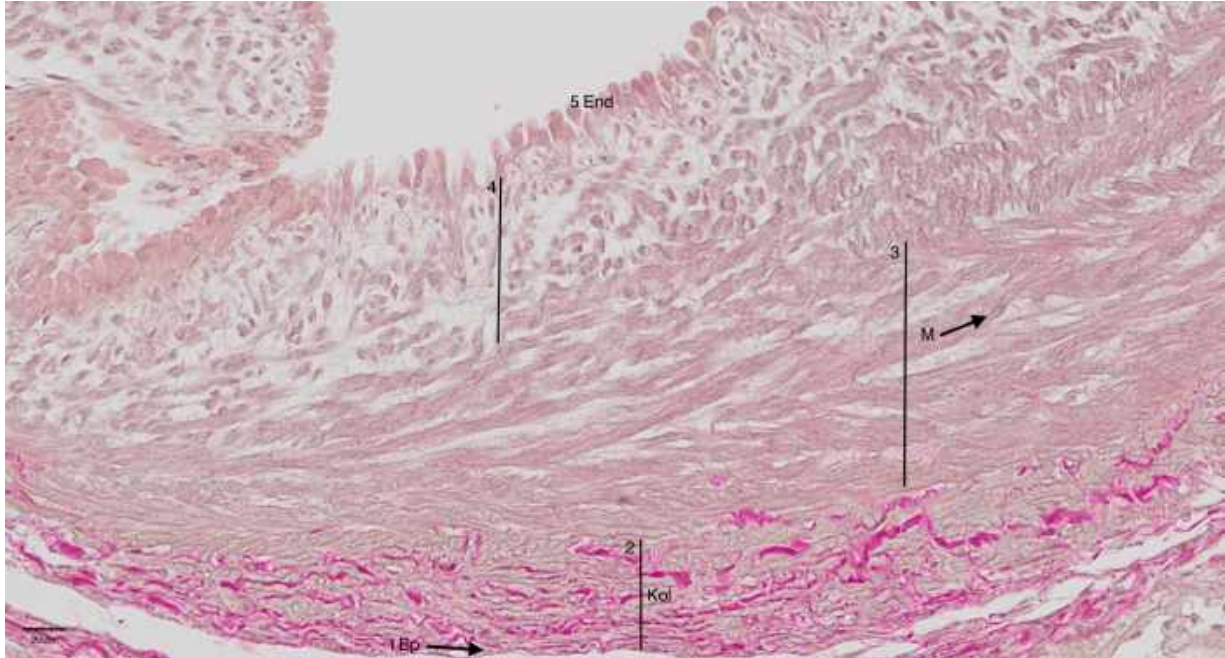
Bulbus arteriosus hos rognkjeks er en robust struktur med innhold av flere typer epitelceller, bindevevsceller og glatt muskulatur (figur 16).



Figur 16 - viser b.a hos rognkjeks (75g) farget med HE (protokoll 3), scannet, 20x forstørrelse. Ytterst vises Ep: epikard med enlaget plateepitel. M: glatt muskulatur med ovale cellekjerne. End: endokard mot lumen med sylindriske epitelceller.

Figur 16 viser at b.a består av enlaget plateepitel (epikard) som omkranser organet. Under epikard ligger et bindevevslag, med eosinofilt cytoplasma og runde basofile cellekjerne. Glatte muskelceller vises som et tykkere sammenhengende lag, også med eosinofilt cytoplasma men ovale cellekjerne. Deretter ligger løst bindevev, i et mer oppstykket lag bestående av mørkere lilla-fargede celler som ligger løst i forhold til hverandre. Mot lumen ligger sylindriske epitelceller med rund basofil kjerne (endokard), som har en mer rosa farge i cytoplasma enn vedsideliggende bindevev.

For å undersøke sammensetningen av bindevev i b.a, ble samme snitt som i figur 16 farget med VG (figur 17). Kollagenrikt bindevev farges med denne teknikken i en sterk rosa farge, og laget mellom epikard og glatt muskulatur tok til seg denne fargen. Glatte muskelceller, endokard og bindevevslaget mellom endokard og glatt muskulatur tok ikke til seg farge.



Figur 17 – viser samme histologiske utsnitt som figur 16: b.a hos rognkjeks (75g), farget med VG, scannet, 20x forstørrelse. 1: viser enlaget plateepitel. 2: viser kollagenrikt løst bindevev. 3: viser glatt muskulatur. 4: viser løst bindevev uten kollagen. 5: viser endokard med sylindriske epitelceller.

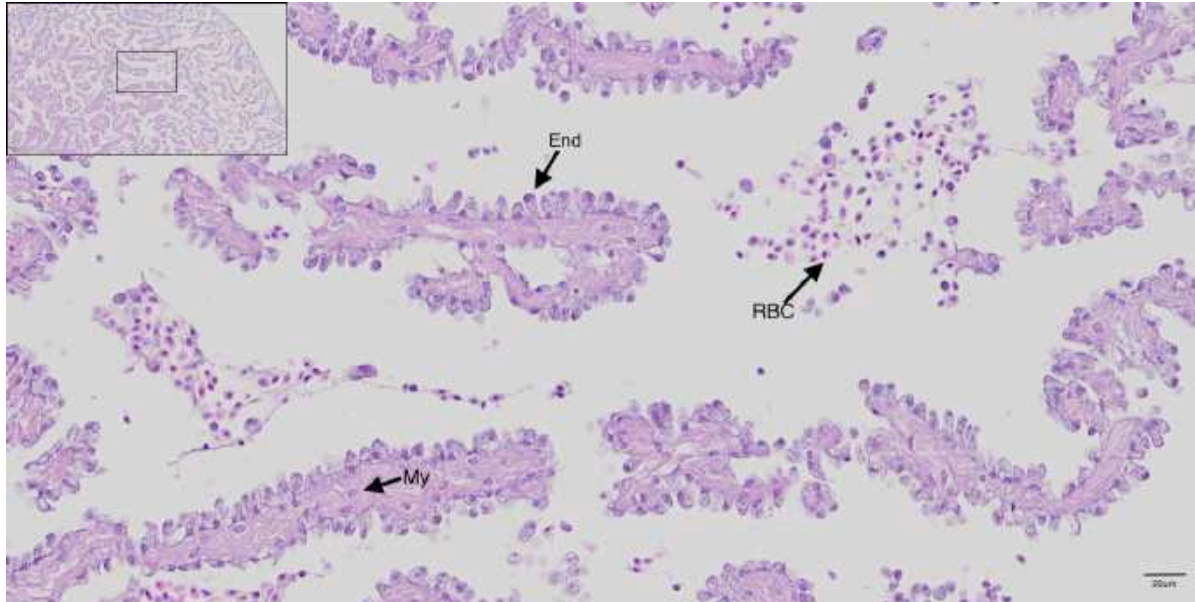
I figur 17 vises histologisk snitt av b.a fra rognkjeks 75g farget med VG. Ved denne fargemetoden farges kollagenrikt bindevev i en sterk rosa farge, og etterlater annet vev i en rødbrun farge. Et område fra epikard og til området med glatt muskulatur tar opp en sterk rosa farge, og forteller at her finnes kollagenrike forbindelser i dette bindevevslaget. Det strekker seg langsmed og innimellom epikard til et område med glatt muskulatur med ovale cellekjerner, som farges svakt rosa. Laget med løst bindevev tar ikke til seg farge, og det samme gjelder de sylindriske epitelcellene i endokard.

For å se scannet snitt av hjerte fra rognkjeks (75g) farget med VG, bruk denne QR-koden eller se URL i vedlegg III.



Atrium

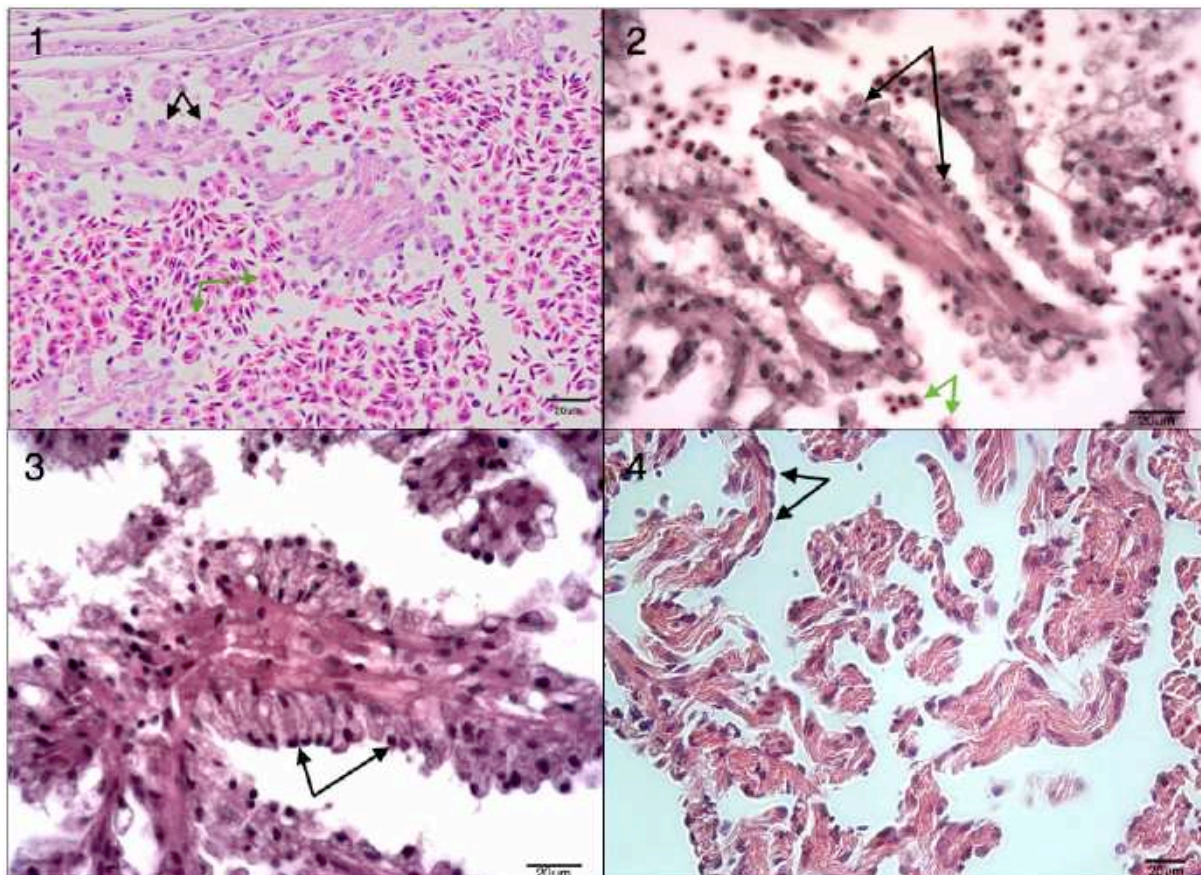
I rognkjeksens atrium vises ytterst epikard. Innenfor ligger myokard som spredte trabekler med myosittfibre, omgitt av høye endokardceller (figur 18).



Figur 18 - viser atrium hos rognkjeks (75g), farget med HE (protokoll 3), scannet, 20x forstørrelse. My: myokard vises som spredte trabekler i atriets lumen, med markerte ovale cellekjerne. End: endokard vises som høye epitelceller. RBC: røde blodceller sees her i et «cluster» med andre udefinerte cellyper.

I figur 18 vises rognkjeksens atrium. Myokardfibrene ligger organisert i trabekler gjennom hele organet med sentrale ovale cellekjerne. Myokardet er omgitt av endokard som består av enlaget epitel. Epitelcellene i rognkjeksens endokard er høye og til tider sylindriske med grumsete lilla innhold i cytoplasma. Cellene har en rund og mørk cellekjerne som ligger alt fra apikalt til basalt plasser i cellen. Røde blodceller sees i atriets lumen. Disse kan ligge alene, eller sammen i et «cluster» med andre udefinerte celler.

Størrelse og form på rognkjeksens endotelceller i atrium varierer mellom individer. De er observert til å være fra avrundet og noe butt, til å ha langstrakt og sylindrisk form. Vakuolisering rundt og i epitelcellene er også observert på enkelte individer (figur 19).

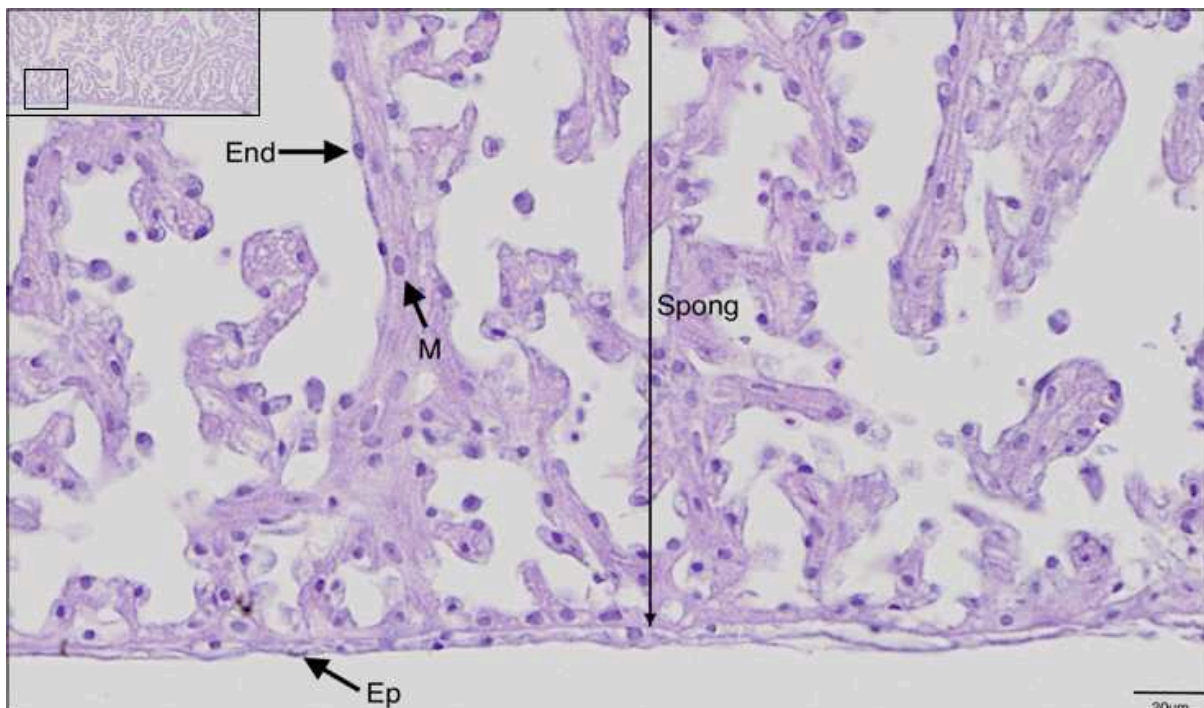


Figur 19 - viser varierende form på endokardiale celler i atrium hos rognkjeks, farget med HE (protokoll 2), 40x forstørrelse. Svarte piler viser endokard, grønne piler viser røde blodceller. 1: atrium hos rognkjeksyngel (<5g), viser avrundet form med rund til oval cellekjerne. Ansamlinger med røde blodceller, med andre udefinerte celler i lumen. 2: atrium hos rognkjeks 95g, fra sjø. Viser avrundete celler i endokard, med grumsete cytoplasma og runde cellekjerne. Vakuoledannelse opptrer i enkelte områder rundt endokard. 3: atrium hos rognkjeks 75g. Her vises høye sylindriske celler, med rund cellekjerne apikalt. 4: atrium hos laks. Her ser man enlaget flatt plateepitel i endokard.

Figur 19 viser at utseende på endokardiale celler i rognkjeksens atrium kan variere mellom individer. På rognkjeksyngel (<5g) er det observert avrundete endokardceller med en rund mørk cellekjerne. Hos rognkjeks fra sjø (95g) er det observert endokardiale celler med lik form som hos yngel, men med vakuoliserte områder innenfor cellens membran. Her er også cellekjernen liten, rund og mørkt farget, og sees ut til å presses ut mot cellemembranen ved vakuolisering inne i cellen. Hos rognkjeks på 75g fra settefisk er det observert sylindriske endokardceller, med kornete cytoplasma og en mørk rund cellekjerne som ofte ligger apikalt plassert i cellen.

Ventrikkell

Rognkjeksens ventrikkell er likt bygd opp som atrium, med et enlaget plateepitel ytterst (epikard) og hjertemuskelceller forgreinet i trabekler i myokard, omgitt av enlaget plateepitel (endokard) (figur 20). Myokardfibrene i ventrikkelen er tykkere og ligger tettere sammenliknet med atriet hvor de ligger mer spredt fra hverandre og har tynnere trabekler.



Figur 20 - viser ventrikkell til rognkjeks 75g, farget med HE (protokoll 3), 40x forstørrelse. Ep: epikard, og M: hjertemuskelceller med ovale cellerkjerner. Sp:spongiøst muskellag (stratum spongiosum) med muskelceller forgreinet i trabekler, omsluttet av End: endokard.

Histologisk vises flere celletyper i rognkjeksens ventrikkell, som vist i figur 20. Organet omslutes av epikard, et enlaget lag med plateepitel med runde cellekjerner. Under epikardet ligger myokardet organisert i trabekler, noe tettere enn i atriet. De ligger organisert i et spongiøst lag. Myokardet består av hjertemuskelceller som har sentrale ovale cellekjerner som er mørkere enn resten av muskelcellen. Endokard omslutter trabeklene, og består av et lag med tynt plateepitel. Hos rognkjeks er det ikke observert koronararterier i ventrikkelen, heller ikke et kompakt lag med hjertemuskulatur mellom epikard og det spongiøse muskellaget.

3.1.6 Nyre

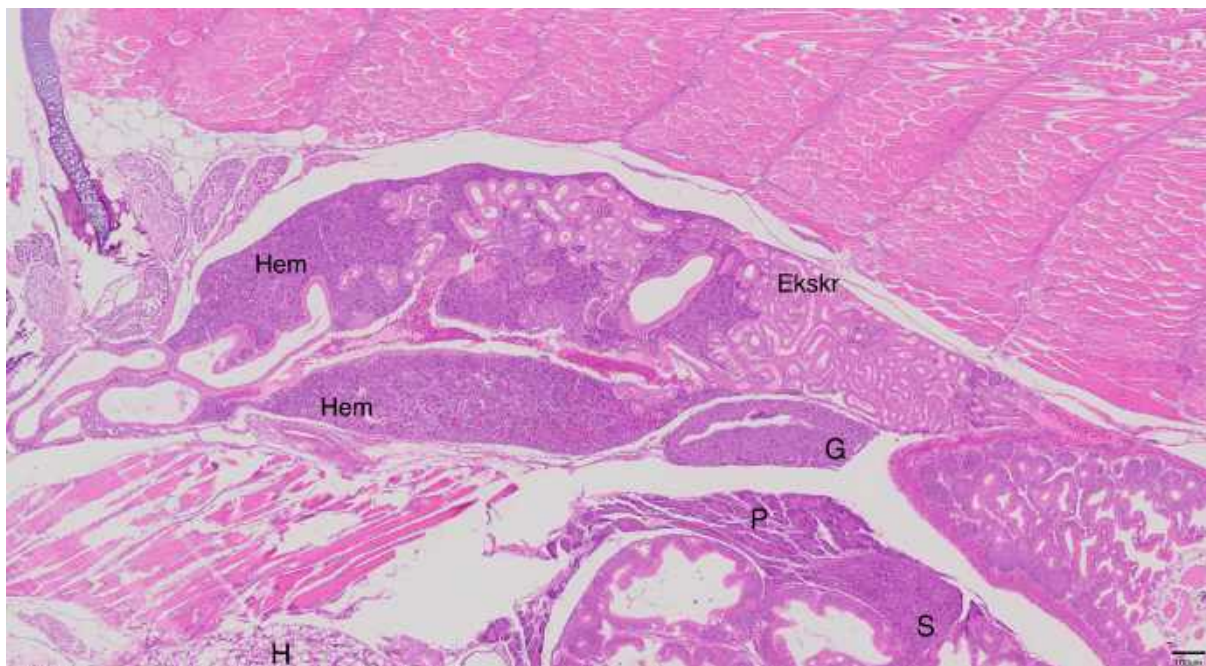
Nyren hos fisk består av en ekskretorisk del (baknyre), en hematopoietisk del (hodenyre) med bloddannende vev, og hos noen fisk endokrint vev (Kryvi et al., 2016). Hos rognkjeks ligger nyren plassert under rygg søylen, og strekker seg langs hele buk hulens retning caudalt. Organet har makroskopisk en Y-form. Omtrent midt i organet forgreines nyren i to, og posterior har organet en lang og utstrakt rett form (figur 21).



Figur 21 - viser 1: plassering av nyren i rognkjeks. 2: viser makroskopisk fremstilling av organet. Her kan man se organets Y-form. Pilens retning peker i cranial retning.

Figur 21.1 viser nyrens plassering i rognkjeks som er dorsalt for buk hulen. Figur 21.2 viser organets form, hvor pilen peker i hodets retning. Cranialt er nyren forgreinet i to avstikker og har en mørk rød farge. Mellom de to avstikkerne ligger et lag med skjelettmuskel. Caudalt har nyren en utstrakt form, og har en blek rød farge. Blodkar vises som røde striper langs organet, fra avstikkerne cranialt og langs med organet caudalt. Rundt heler organet ligger skjelettmuskulatur.

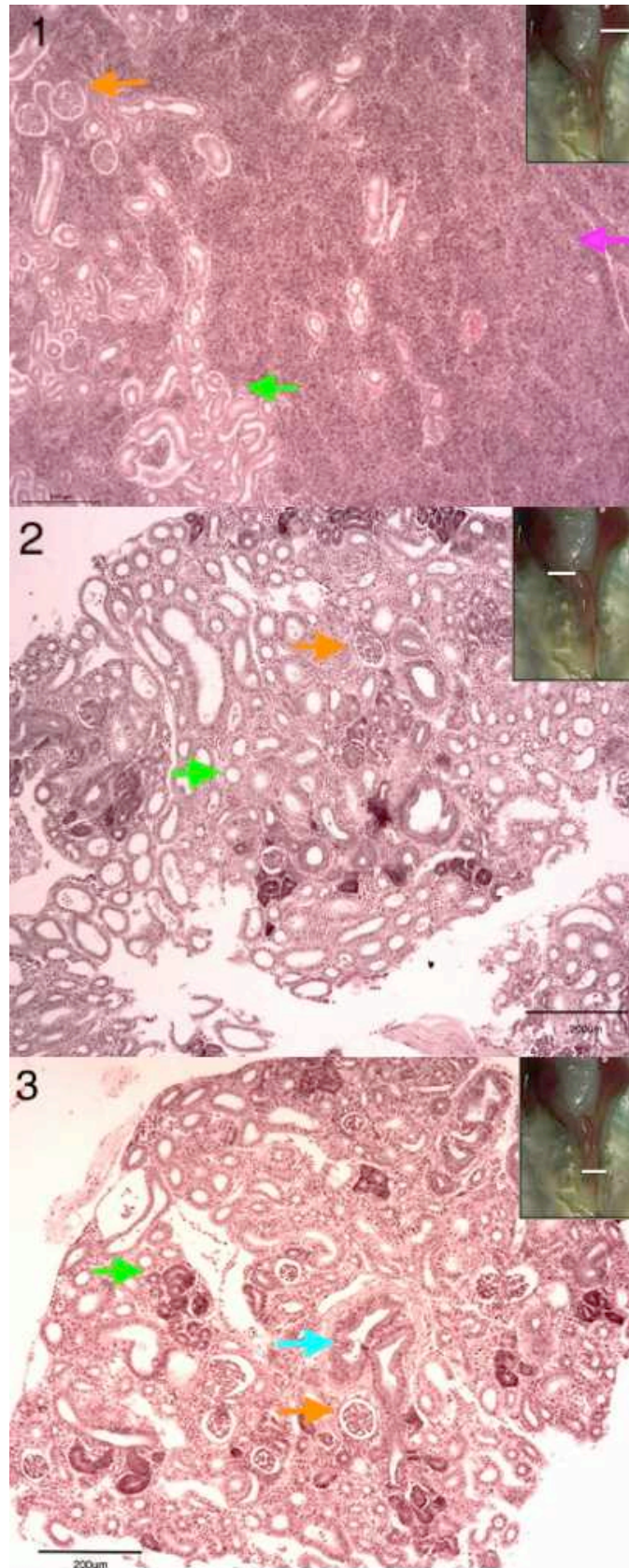
Histologisk kan nyren hos rognkjeks deles inn i to deler (figur 22). Cranialt ligger hodenyre, som er dominert av hematopoietisk vev. Caudalt er nyrevevet dominert av ekskretorisk vev. Noe ekskretorisk vev kan forekomme i hodenyre, samt at det hematopoietiske vevet også kan forekomme omtrent til midt i organet. I caudal retning bli det ekskretoriske vevet mer dominerende, og det er helt bak i nyren vanskelig å identifisere hematopoietisk vev. Hos rognkjeks yngel er det observert at hematopoietisk vev er dominerende ventralt, mens det dorsalt er en forekomst av ekskretorisk vev.



Figur 22 - viser sagittalsnitt av rognkjeksyngel (<5g), farget med HE (protokoll 2), scannet, 5x forstørrelse.. Hem: viser hematopoetisk vev i fremre del av nyren (hodenyre), og Ekskr: viser ekskretorisk vev i bakre del av nyren (baknyre). Omkring ligger andre organer, og ventralt for bakre del av nyre vises G:gonader, P: pankreas med omkringliggende pylorusblindsekker. S: milt ligger rett ved pankreas og pylorusblindsekker. H: lever vises nederst til venstre i bildet.

Figur 22 viser et sagittalsnitt av rognkjeksyngel (<5g) og et lengdesnitt av nyren. Omkringliggende organer er gonader ventralt for nyren, deretter ligger organer som er plassert dorsalt i bukhulen som pankreas og milt. Hos rognkjeksyngel er andelen hematopoetisk vev størst cranialt. Det hematopoetiske vevet er også dominerende på ventral side av fremre del av nyre. I hodenyre hos rognkjeksyngel er det også observert en forekomst av større rør-liknende strukturer med kubisk epitel, som likner store samlerør. De strekker seg ut som en forgreining fra det hematopoetiske vevet i fremre del av nyren, innimellom muskelvev og fiskens kranium. Caudalt er vevet i nyre hos rognkjeksyngel nesten utelukkende bestående av ekskretorisk vev.

Hos rognkjeks >100g vises det histologiske skillet mellom nyrens ulike deler godt. Her den histologiske inndelingen mellom hematopoetisk og ekskretorisk vev lik som hos rognkjeksyngel (figur 23). Systematisk makroskjæring av hele organer (kapittel 2.3.1.3) resulterte i tverrsnitt gjennom hele rognkjeksens nyre, og muligheten til å evaluere hvilke typer vev som var dominerende i nyrens forskjellige deler.

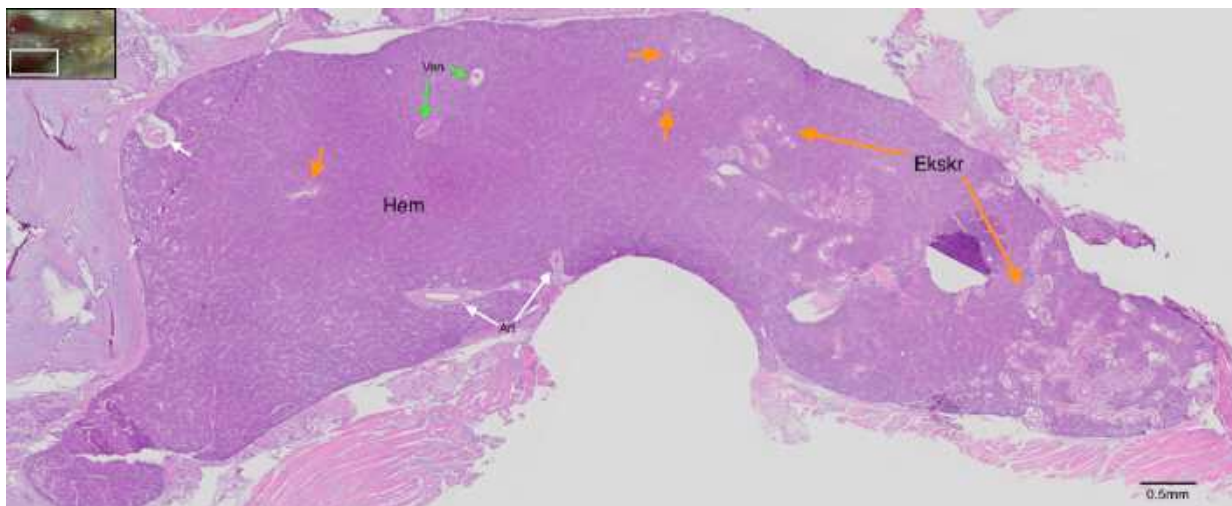


Figur 23 - viser tverrsnitt av nyre hos rognkjeks >100g, faget med HE (protokoll 1). 1: hodenyre hos rognkjeks 132g. Her vises med rosa pil hematopoetisk vev, og på motsatt side med ekskretorisk vev, markert med grønn pil er tubuli og med oransje pil glomeruli. 2: midtnyre hos rognkjeks 125g. Vevet er dominert av ekskretorisk vev, markert med grønn pil er tubuli og oransje pil glomeruli. 3: baknyre hos rognkjeks 132g. Her finnes i likhet med midtnyre, markert med grønn pil tubuli og markert med oransje pil glomeruli. Her ser man i tillegg, markert med blå pil, samlerør med glatt muskulatur rundt.

Figur 23 viser et histologisk skille mellom hematopoetisk og ekskretorisk vev i nyre hos rognkjeks, og utbredelsen av disse i forskjellige deler av organet. Hodenyre (figur 23.1) er dominert av hematopoetisk vev, med innslag av ekskretorisk vev bestående av tubuli og glomeruli. Midtneyre (figur 23.2) og bakneyre (figur 23.3) består nesten utelukkende av ekskretorisk vev som tubuli og glomeruli, hvor det i bakre del av nyre også forekommer flere samlerør. Legg også merke til at hematopoetisk vev ligger i hodenyre, som har en mørk rød farge, mens ekskretorisk vev ligger i bakre del av nyren som har en blek rød farge.

Hodenyre

Tverrsnitt av hodenyre ble scannet inn med snittscanner (figur 24). Dette gir en oversikt over hele hodenyre hos rognkjeks, og hvordan de ulike vevstypene er fordelt i de forskjellige deler av organet.



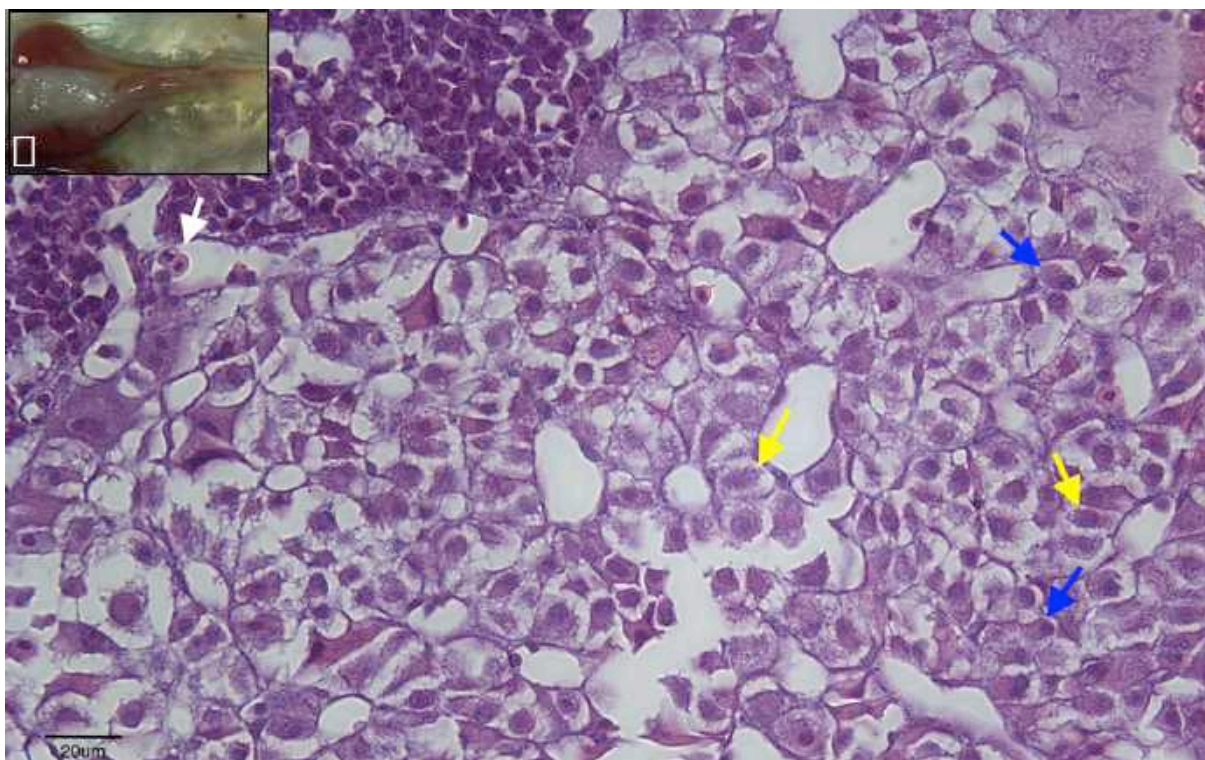
Figur 24 - viser lengdesnitt av hodenyre hos rognkjeks (132g), farget med HE (protokoll 3), scannet snitt. Her ser man at Hem: hematopoetisk vev er dominerende, og at det finnes områder med Ekskr: ekskretorisk vev (oransje pil) stedvis, mest bakover i organet. Blodkar som Art: arterier (hvit pil) og Ven: vener (grønn pil) er tilstede.

Det scannede snittet av hodenyre hos rognkjeks viser at andelen hematopoetisk vev er størst. Enkelte små områder av ekskretorisk vev opptrer fokalt, og øker i caudal retning inn mot nyrens forgreining på midten. Blodkar som arterier og vener er også tilstede, og skiller seg fra hverandre ved at arteriene har en tykkere vegg med glatt muskulatur rundt, noe som ikke finnes i like stor grad i vener. Omkring nyren ligger skjelettmuskulatur, samt bruskvev og beinvev.

For å se et scannet snitt av hodenyre fra rognkjeks (132g), scann inn denne QR-koden, eller følg vedlagte URL i vedlegg III. Nyre kan også studeres i scann fra rognkjeksyngel (3 og 4, side 28).



I hodenyre ble det observert en vevstype som skiller seg fra de andre celletypene (figur 25).



Figur 25 –tverrsnittsnitt av hodenyrevis fra rognkjeks 125g, farget med HE (protokoll 3), 40x forstørrelse. Her vises hematopoietisk vev øverst i venstre hjørne, og RBC markert med hvit pil. Her kan man se gul pil som markerer tubulære strukturer med sylindriske celler. Cytoplasma er kornete og cellekjernen tydelig avrundet sentralt i cellen. Blå pil markerer ovale celler med en rund cellekjerne mot cellemembranen, og granulært cytoplasma.

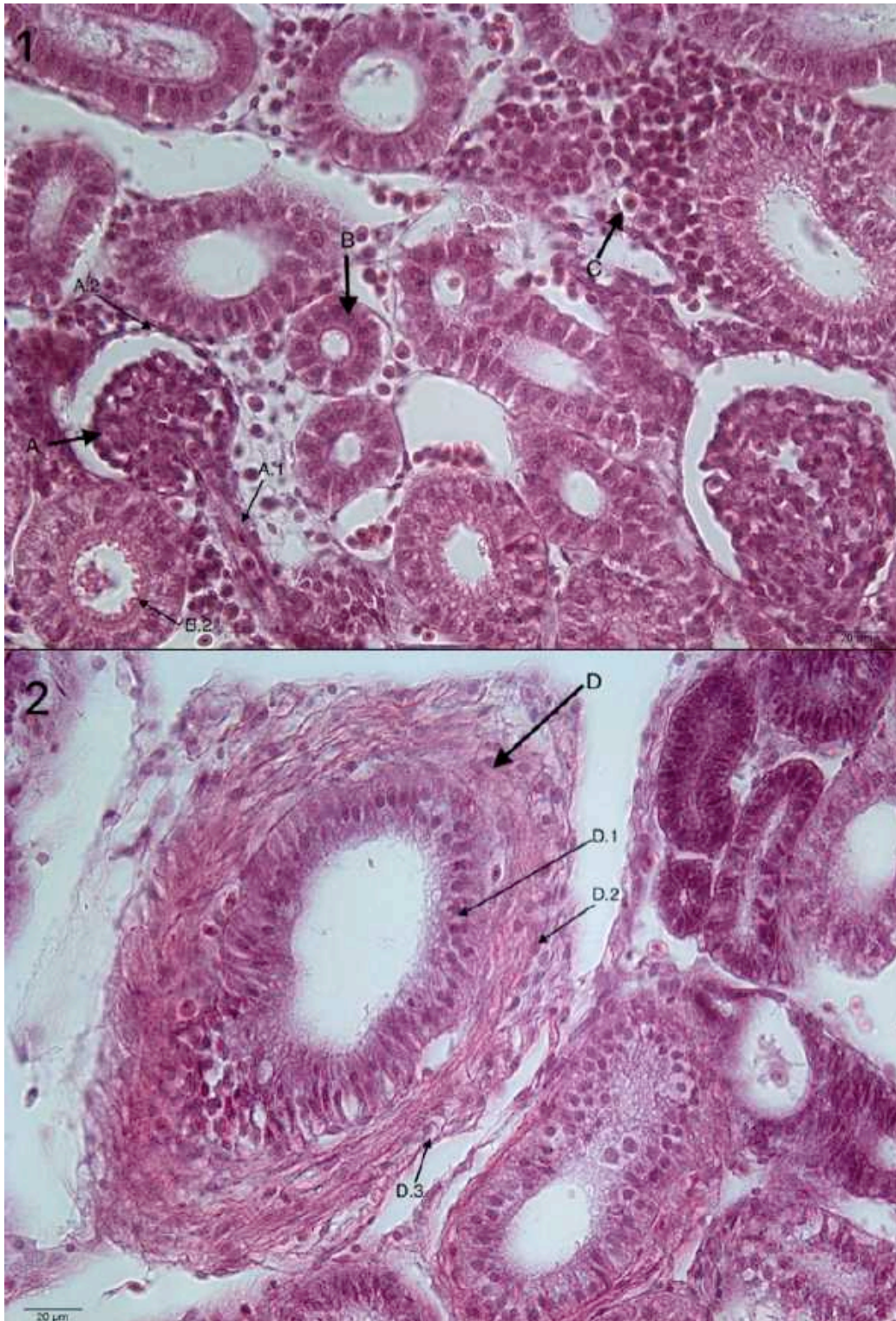
Dette området med tubulære strukturer i figur 25 skiller seg fra det ekskretoriske og hematopoetiske vevet i nyre hos rognkjeks. Gul pil viser mer segmenterte celler. Fargen i cytoplasma er her svakere og cellekjerne er større sammenliknet med det kubiske epitelet i tubuli i det ekskretoriske vevet som beskrevet i figur 26. En annen celletype med mindre celler, eosinofilt cytoplasma og en rund perifert plassert basofil cellekjerne observeres, og indikeres med blå pil i figuren.

For å se et scannet snitt av ukjent vev i hodenyre fra rognkjeks (125g), scann inn denne QR-koden, eller følg vedlagte URL i vedlegg III. Prøven er tatt i snitt nr. 11 i den systematiske makroskjæringen av nyre (kapittel 2.3.1.3, Figur 4,F).



Baknyre

Histologisk består det ekskretoriske vevet i nyre hos rognkjeks av flere celletyper (figur 26), organisert i glomeruli, tubuli og samlerør.



Figur 26 - viser midtnyre hos rognkjeks, farget med HE (protokoll 1), 40x forstørrelse. 1: viser midtnyre hos rognkjeks 115g (fra sjø), her ser man A: glomerulus med A.1: arteriole med innhold av RBC, A.2: bowmans kapsel. B: tubulus, med kubisk epitel og sentrale cellekjerne samt børstesøm inn mot lumen. Børstesømmen i tubuli vises godt i B.2. Hematopoetisk vev ligger interstistielt, mellom tubuli, og C: røde blodceller lyser opp med sin eosinofile farge. 2: viser nyre hos rognkjeks 80g. Her ser man et stort D: samlerør, med D.1: sylindriske epitelceller, med omkringliggende D.2: glatt muskulatur og D.3: bindevev.

I figur 26 vises histologiske snitt av midtnyre hos rognkjeks fra to forskjellige størrelser og opphav. Figur 26.1 viser midtnyre fra rognkjeks fra sjø, 115g. Glomeruli er et nøste av kappilærer, hvor man kan se arteriole med røde blodceller føre blod inn/ut av glomeruli. Bowmans kapsel er omsluttet med enlaget epitel, som dekker kapillærnøstet. Tubuli består av kubiske epitelceller med rund sentral til basal mørk cellekjerne. Børstesøm observeres på enkelte tubuli. Interstitielt ligger områder med hematopoetisk vev og røde blodceller kan sees med et eosinofilt cytoplasma og basofil cellekjerne. Figur 26.2 viser midtnyre fra rognkjeks fra settefisk, 80g. Her vises et stort samlerør. Et lag med sylinderepitelceller omslutter rørets lumen, hvor epitelcellene har lyst cytoplasma og en mørkere sentral cellekjerne. Samlerøret er omsluttet av glatt muskulatur, og glatte muskelceller som har en lysere og mer eosonifil farge enn sylinderepitelet. Rundt den glatte muskulaturen ligger et lag med bindevev.

3.1.7 Milt

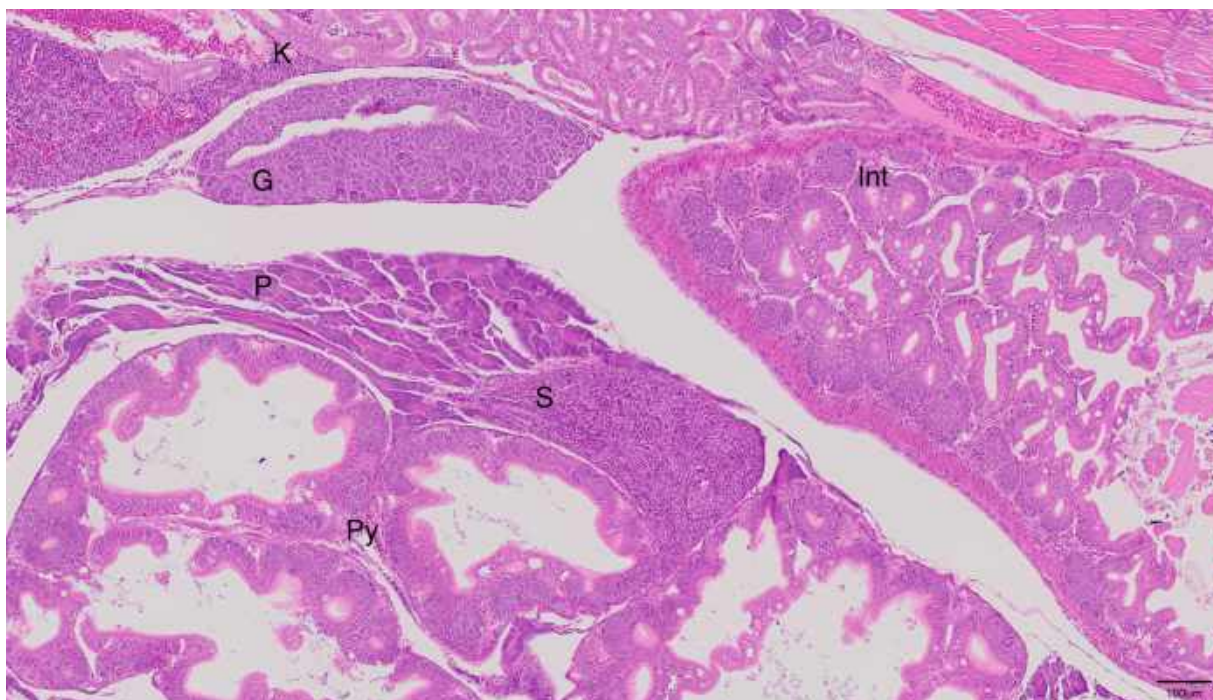
Milt hos fisk består av hematopoietisk vev som rød pulpa (erytrocyttproduserende celler) og hvit pulpa (leukocyttproduserende celler) omsluttet av en bindevevskapsel (Kryvi et al., 2016). Hos rognkjeks ligger milten plassert dorsalt i bukhulen (figur 27), innimellom fettvev blant pylorusblindsekker.



Figur 27 - viser anatomisk plassering av milt hos rognkjeks. S: milten vises i forstørrelse nede i bildets høyre hjørne, og omkring kan man se fettvev.

Figur 27 viser at miltens plassering i rognkjeks er posteriort for lever, dorsalt plassert i bukhulen. Hos små individer er milten liten og kan være vanskelig å finne. Milten ligger som en rund til oval mørk rød klump blant fettvevet som omslutter pylorusblindsekker.

Histologisk snitt av rognkjeksyngel viser miltens plassering i bukhulen. Caudalt for milten ligger tarmen, og dorsalt for milten ligger gonader og nyre (figur 28).



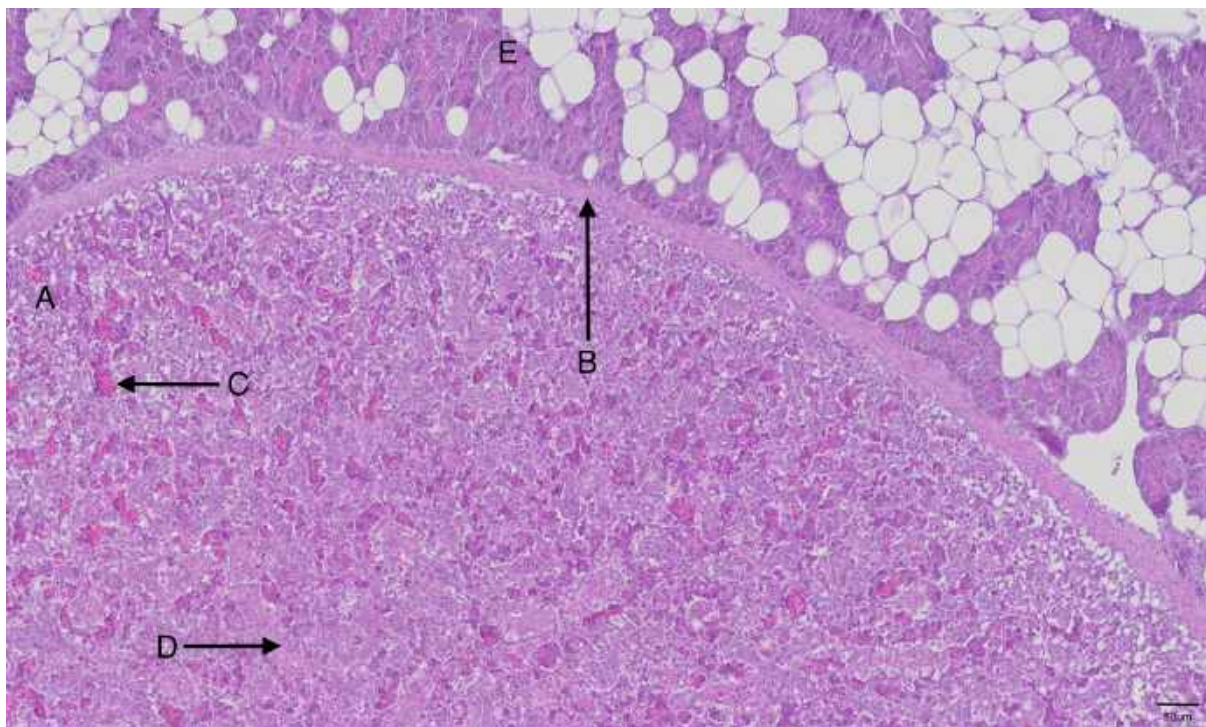
Figur 28 - viser sagittalsnitt av rognkjeksyngel (<5g), farget med HE (protokoll 2), scannet, 5x forstørrelse. S: milt vises sentralt i bildet, og ligger tett ved P: pankreas og Py: pylorusblindsekker. Int: tarm ligger i caudal retning, og K: nyre og G: gonade ligger dorsalt for milten.

Figur 28 viser et saggittalsnitt av rognkjeksyngel (<5g), med milten sentralt plassert i bildet. Dorsalt for milten ligger pankreas tett inntil, som er en del av det omkringliggende fettvevet. Gonader og nyre, ligger på dorsal side av bukhulen. Pylorusblindsekker ligger i snittet ventralt plassert i forhold til milten, og en større del av tarm/magesekk ligger i caudalt for milten.

For å se miltens plassering i rognkjeksyngel, scann inn denne QR-koden, eller følg vedlagte URL i vedlegg III.



Milt hos rognkjeks er omsluttet av en kapsel med flere lag celler og bindevev, og vevet i milt er dominert av hematopoetisk vev (figur 29).



Figur 29 - viser histologisk snitt av milt hos rognkjeks (125g), farget med HE (protokoll 3), 5x forstørrelse. Her vises A: milt med en omkringliggende B: kapsel med flere cellelag. Områder med eosinofile C: røde blodceller vises innimellom D: lysere fargede celler. Rundt miltens ligger her E: pankreas.

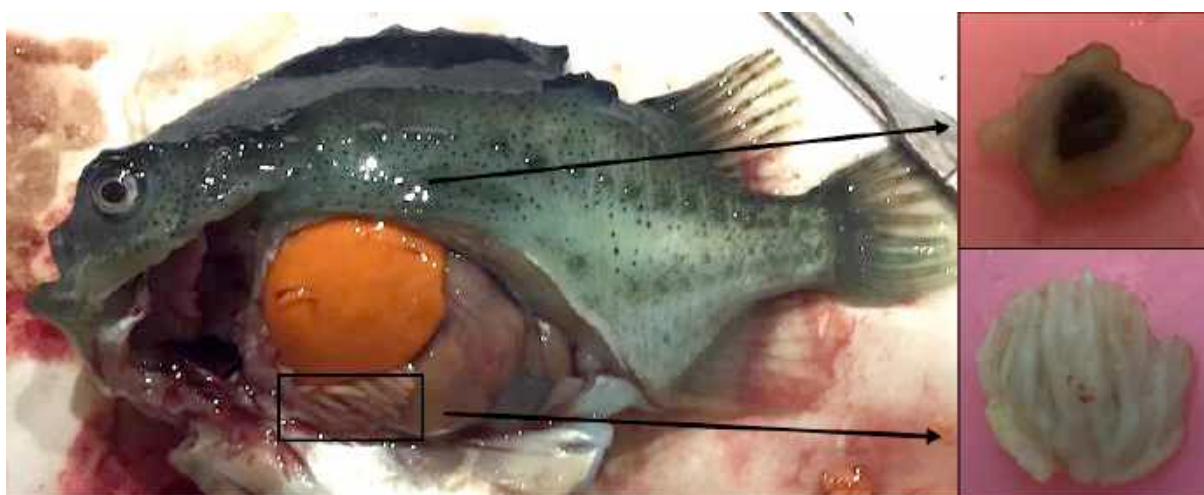
Figur 29 viser milt fra rognkjeks 125g med omkringliggende pankreasvev. Legg merke til den tykke bindevevskapselen som dekker hele miltens overflate. Røde blodceller ligger organisert samlet. De finnes det rikelig av i milt og lyser opp i HE-snitt med en eosinofil farge som skiller seg fra det omkringliggende hematopoietiske vevet. Sirkulære strukturer både med og uten innhold av blodceller observeres blant hematopoietisk vev. Celler med lysere cytoplasma sees innimellom de røde blodcellene, diffust i hele organet. Miltens struktur og vev blir videre beskrevet i kapittel 3.2.2.

For å se et scannet snitt av milt fra rognkjeks (125g), scann inn denne QR-koden, eller følg vedlagte URL i vedlegg III. I dette scannet ligger også pankreasvev rundt milt.



3.1.8 Pankreas

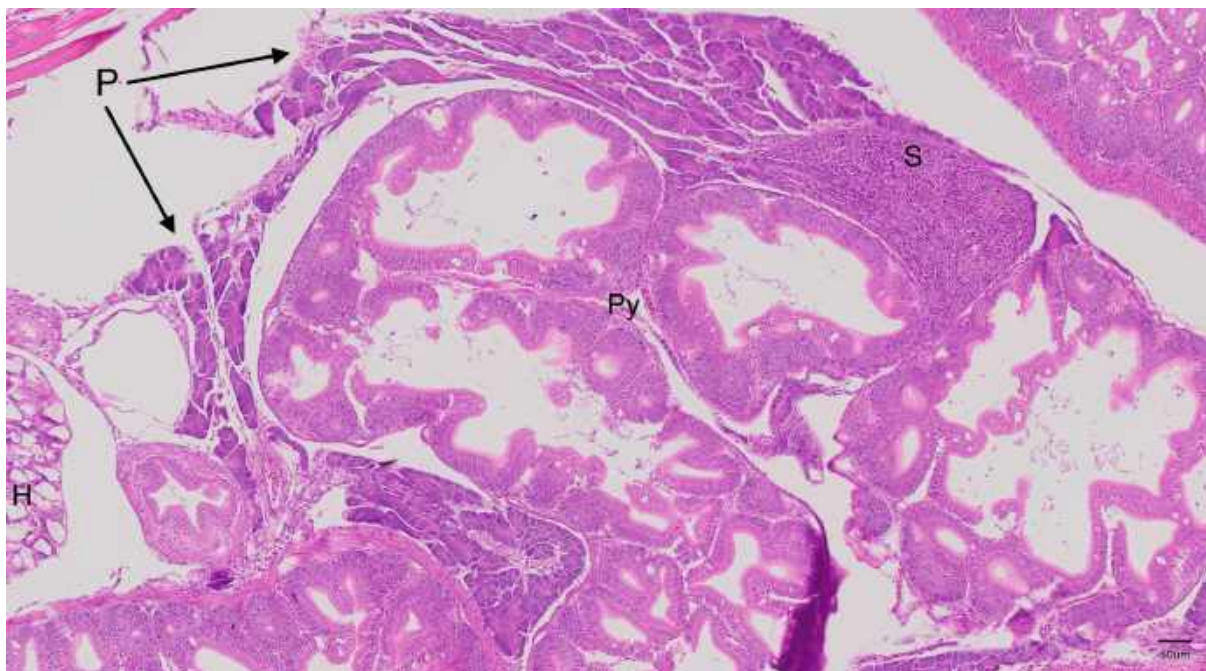
Pankreas hos fisk består av eksokrine (enzymproduserende) og endokrine (hormonproduserende) deler. Hos rognkjeks ligger pankreasvev blant fettvev rundt pylorusblindsekker og blant fettvev rundt milt (figur 30).



Figur 30 - viser plassering av pankreasvev i rognkjeks. Pankreasvev finnes i fettvev blant blindsekker og blant fettvevet rundt milt.

Pankreasvevet hos rognkjeks ligger organisert i fettvev rundt to organer; milt og pylorusblindsekker (figur 30). Makroskopisk kan man ikke se pankreasvevet i fettvevet. Rundt milt kan man i histologiske snitt se pankreasvev som omslutter miltens struktur (figur 29), og ved å inkludere fettvev rundt milten ved prøveuttak blir pankreasvev inkludert i denne prøven. Pankreasvevet kan også ligge i fettvev rundt pylorusblindsekker. Mest pankreasvev er å finne i fettvevet i basis av pylorusblindsekker, nærmest utspringet fra tarm. Det er observert etter analyse av prøveuttak at ved prøver som er tatt ut distalt fra pylorusblindsekker er pankreasvevet ofte ikke inkludert, selv om det skulle være fettvev tilstede.

I histologiske snitt av hel rognkjeksyngel kan man se pankreasvev ligge rundt pylorusblindsekker og milt (figur 31). Analyser av prøver fra den systematiske makroskjøringen av organer (kapittel 2.3.1.3) viser ingen forskjell i utseende av pankreasvev ettersom hvilken retning snittet ble lagt.



Figur 31 – viser sagittalsnitt av rognkjeksyngel (<5g), farget med HE (protokoll 2), scannet, 5x forstørrelse. Her ser man P: pankreas ligge rundt Py: pylorusblindsekker og ved siden av S: milt. H: lever sees helt til venstre i bildet, og ligger cranialt for pankreasvevet.

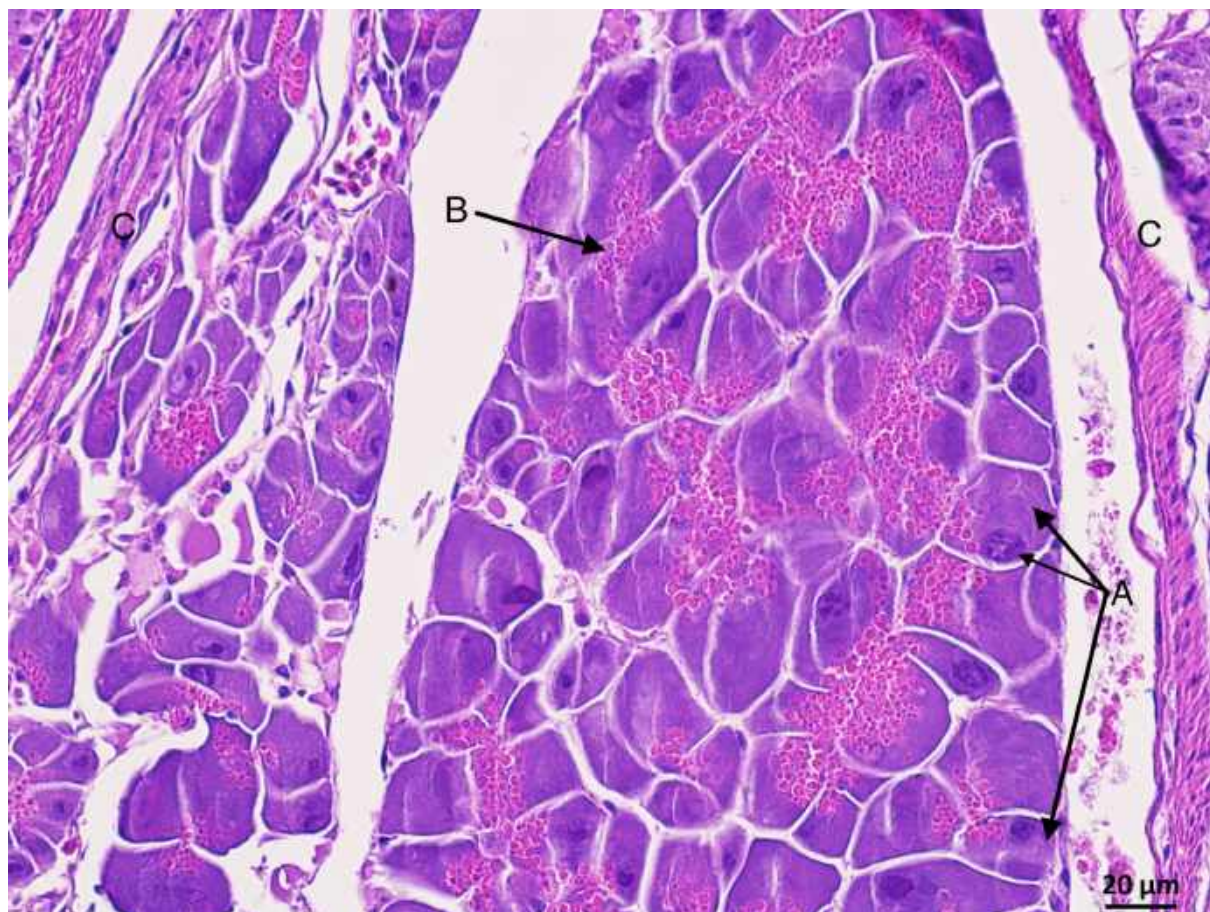
Figur 31 viser at pankreasvevet ligger inne i rognkjeksens bukhole, organisert rundt pylorusblindsekker og milt. Pankreasvevet skiller seg fra milten ved at pankreascellene er større, ofte med eosinofilt innhold, mens milten består av celler som er mindre i størrelse og er omsluttet av en kapsel. Fra pylorusblindsekker skiller pankreasvevet seg ved at pylorusblindsekker har en tydelig lumen og er sirkulære strukturer med sylinderepitel som dekker innsiden. Fettvev kan forekomme blant pankreasvevet. Dette sees som store runde vakuoler (figur 29). Det er observert mer fettvev rundt blant pankreasvev hos rognkjeks >50g enn hos rognkjeksyngel <5g.

For å se et scannet snitt av pankreas fra rognkjeks (117g), scann inn denne QR-koden, eller følg vedlagte URL i vedlegg III. Det ligger også pankreasvev i scanning av miltprøve (side 57), og i scanning av yngel (1, 2, 3 og 4, side 28).



Eksokrint pankreasvev

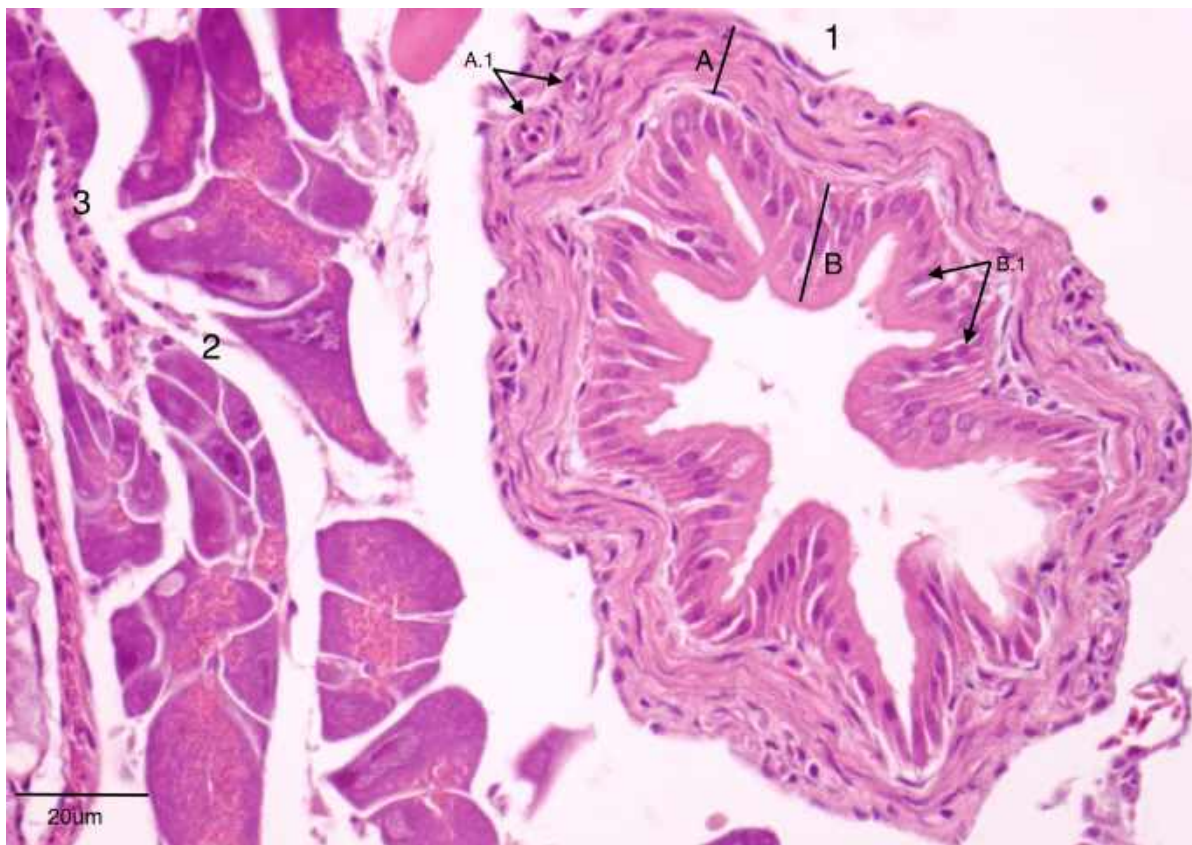
Det eksokrine pankreasvevet består av acinærceller (acinær: lat, *acinus* - «bær») med innhold av zymogenkorn (figur 32). Acinærcellene er større enn omkringliggende celler i andre organer, med en perifert plassert rund til oval cellekjerne som har en mørkere farge enn cellens cytoplasma. Acinærcellene kjennetegnes også med innhold av zymogene granula som får en eosinofil farge i HE-snitt.



Figur 32 - viser eksokrin pankreas hos rognkjeksyngel (<5g), farget med HE (protokoll 2), 40x forstørrelse. A: viser acinærceller med store runde cellekjerne apikalt i cellen. B: viser zymogenkorn, som farger eosinifilt. C: Viser serosa i omkringliggende pylorusblindsekker.

Figur 32 viser acinærceller i eksokrin pankreas fra rognkjeksyngel. Iøynefallende er eosinofilt fargete granula som i denne figuren dannet et hjerteliknende mønster (dette mønsteret er ikke tilfelle for alle resultater, kun for denne figuren). De eosinofile fargede granula er zymogenkorn, som ligger plassert apikalt inne i acinærcellene. Cellekjernene ligger plassert ut mot cellemembranen, og de har en rund til oval form, med en basofil farge.

I eksokrint pankreasvev finnes samlerør (pankreasduct), og danner sammen med acinærcellene bestanddeler i pankreas sin eksokrine del (figur 33). Samlerørene består av høyt sylindrisk epitel, omgitt av et tykkere lag med glatt muskulatur. De kan forveksles med omkringliggende pylorusblindsekker, men skiller seg fra pylorusblindsekkene ved at samlerørene ikke har børstesøm ut mot lumen.

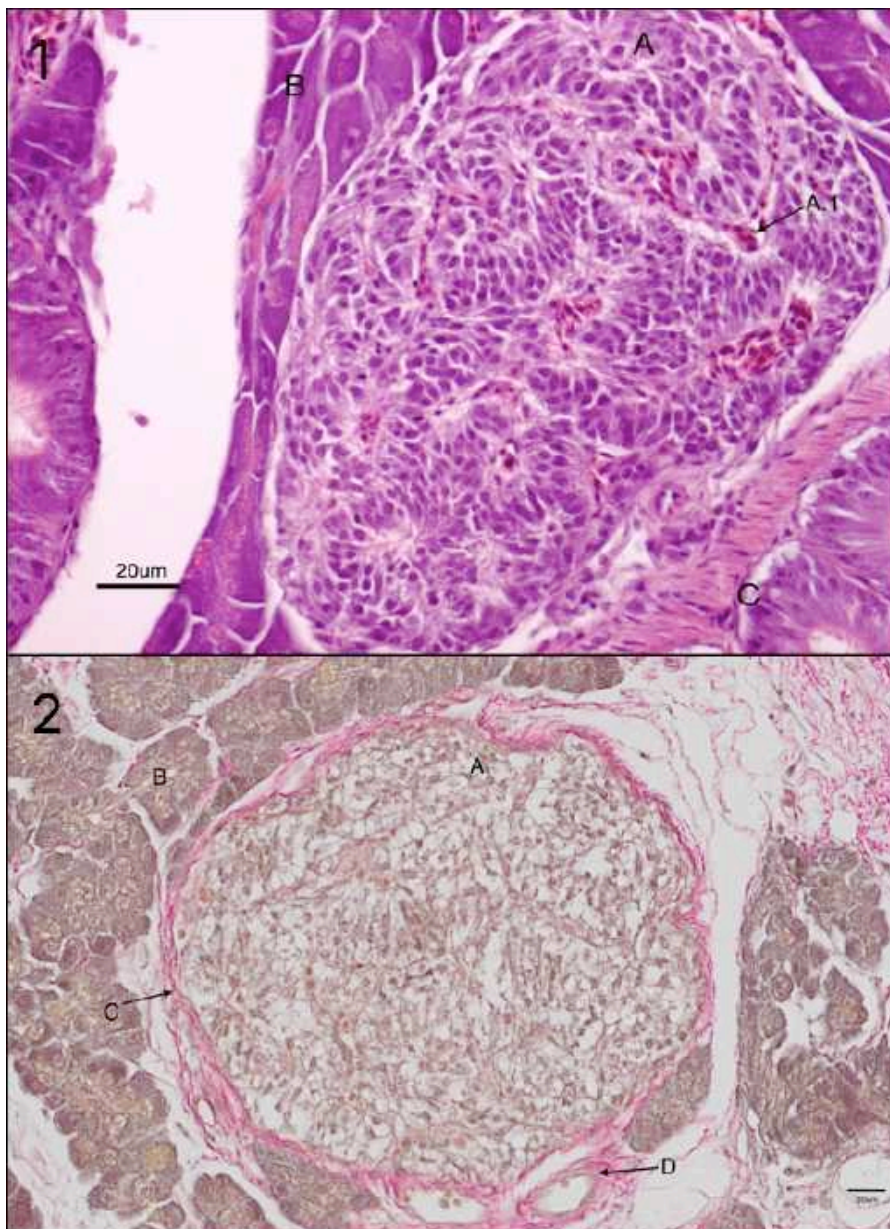


Figur 33 - viser samlerør i eksokrin pankreas hos rognkjeksyngel (<5g), farget med HE (protokoll 2), 40x forstørrelse. Her ser man 1: samlerøret med et A: tykt lag med omkringliggende glatt muskulatur. Innimellom ligger A.1: blodkar som forsyner muskelen med blod. Inn mot lumen ligger B: sylinderepitel med B.1: basale cellekjerne. Her finnes ikke børstesøm inn mot lumen. Rundt ligger 2: acinærceller og 3: blodkar.

Figur 33 viser et samlerør, foldet i en stjerneform, blant acinærceller i eksokrint pankreasvev. Inn mot lumen ligger sylindriske epitelceller med en basalt plassert rund til oval basofil cellekjerne. Epitelcellene er omsluttet av et lag med glatt muskulatur, som ligger lagvis som en sirkulær struktur rundt epitellaget. De glatte muskelcellene har ovale cellekjerne. Blodkar ligger blant den glatte muskulaturen.

Endokrint pankreasvev

Innimellom det eksokrine pankreasvevet ligger avrundete områder med endokrint pankreasvev. Det er avgrenset med en bindevevsmembran mot omkringliggende celler, og selve vevet er organisert i avrundete strukturer som kveiler seg rundt om hverandre. Cellene er lange med runde cellekjerne. I HE-preparater har disse cellene en blassere farge enn det omkringliggende eksokrine pankreasvevet (figur 34).

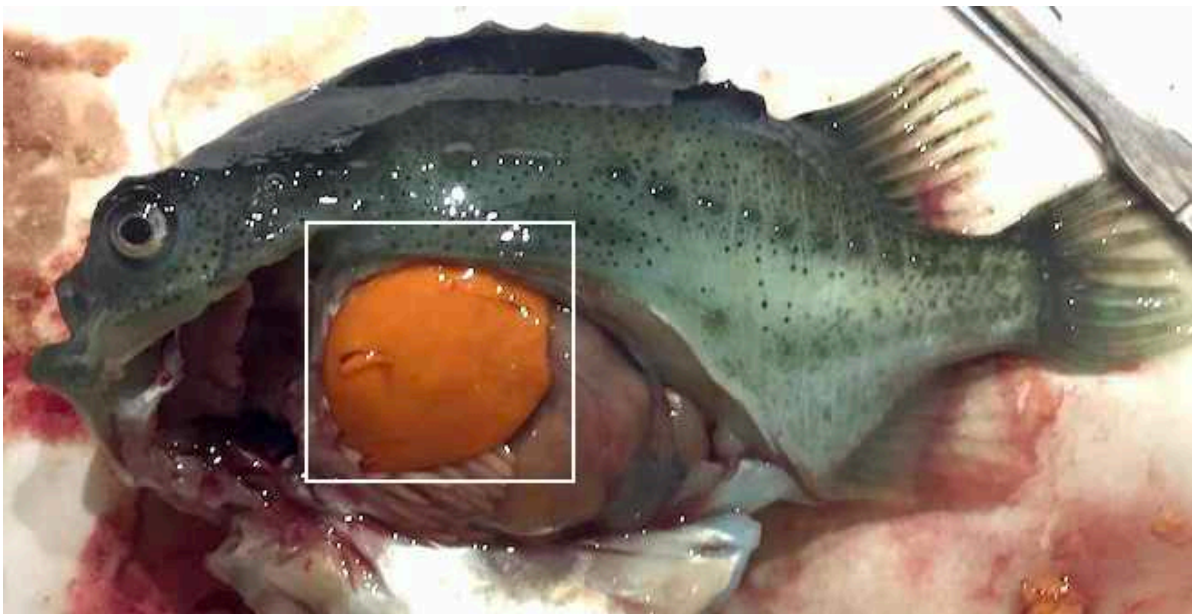


Figur 34 - viser endokrin pankreas hos 1: rognkjeksyngel (<5g) farget med 1: HE (protokoll 2), 40x forstørrelse.. Her ser man A: endokrin pankreas med A.1: røde blodceller. Rundt ligger B: eksokrin pankreas og C: pylorusblindsekker. 2: viser pankreas hos rognkjeks 90g, farget med VG, 20x forstørrelse. A: endokrin pankreas og B: eksokrin pankreas. C: bindevevsmembran rundt endokrin pankreas, og legg merke til at bindevevet strekker seg rundt i det omkringliggende vevet. D: viser blodkar med innhold av røde blodceller. Legg også merke til eksokrin pankreas (B) med zymogene granula i en lys brun farge.

Figur 34 viser områder med endokrint pankreasvev (Langerhanske øyer) fra rognkjeksyngel (<5g) og større rognkjeks (90g). De endokrine pankreascellene har en lysere farge i cytoplasma enn acinærcellene i eksokrint vev, og ligger sirkulært organisert. Cellekjernene er små og ovale, og ligger perifert plassert i cellen. Røde blodceller kan også forekomme blant de endokrine cellene. Histologiske snitt fra rognkjeks (90g) ble farget med VG, og kan sees i figur 34.2. Dette viser at en kollagenrik bindevevsmebran omslutter det endokrine pankreasvevet og avgrenser det fra eksokrint pankreasvev. Bindevevet sees også spredt rundt og blant det eksokrine vevet.

3.1.9 Lever

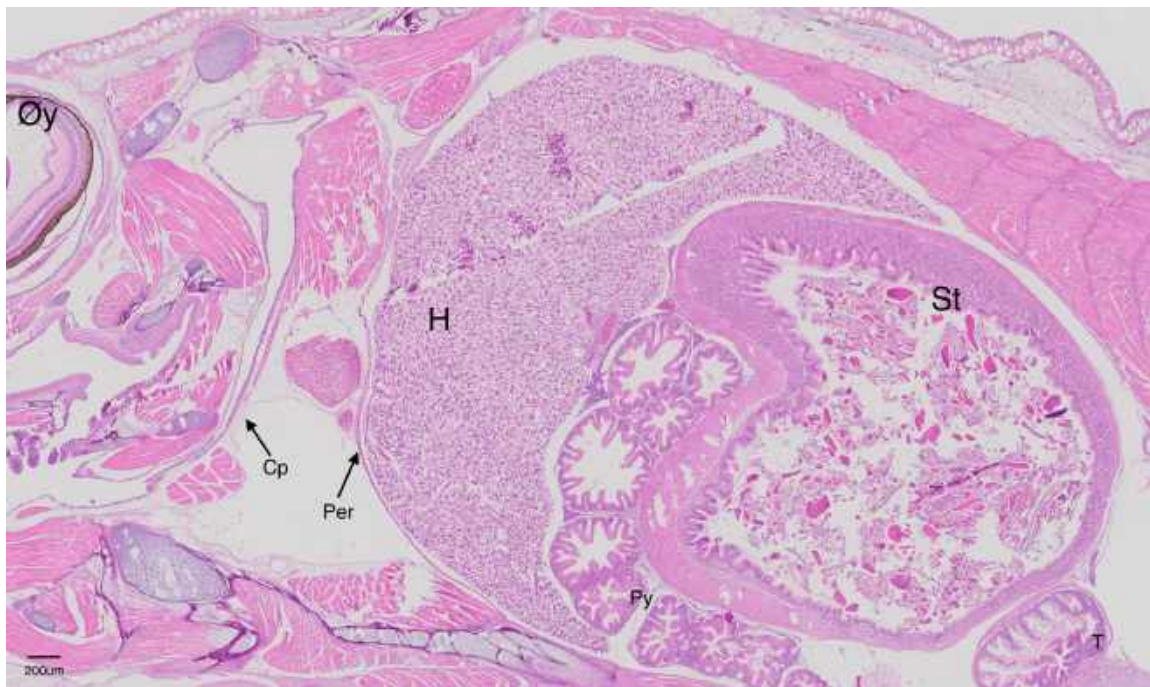
Lever hos fisk består av hepatocytter, sinusoider og galleganger. Hos noen fisk, for eksempel hos torsk, lagres fett i lever, og dette er synlig som store vakuoler uten synlig innhold i HE-snitt (Kryvi et al., 2016). Leveren hos rognkjeks er stor, og tar sammen med magesekken opp store deler av fiskens bukhule (figur 35). Plasseringen til leveren er i den craniale enden av bukhulen, strekker seg litt innover medialt, og skilles fra perikardhulen med peritoneum på caudal side. Hos rognkjeks er det observert at farge på lever varierer mellom individer.



Figur 35 - viser plassering av lever hos rognkjeks. Her vises leveren i en gul-oransje farge, men denne fargen varierer ofte mellom individer.

Figur 35 viser hvor leveren ligger plassert hos rognkjeks. Her har leveren en oransje farge. Denne fargen varierer mellom individer, hvor det er observert størst fargevariasjoner på lever fra individer ute i sjø.

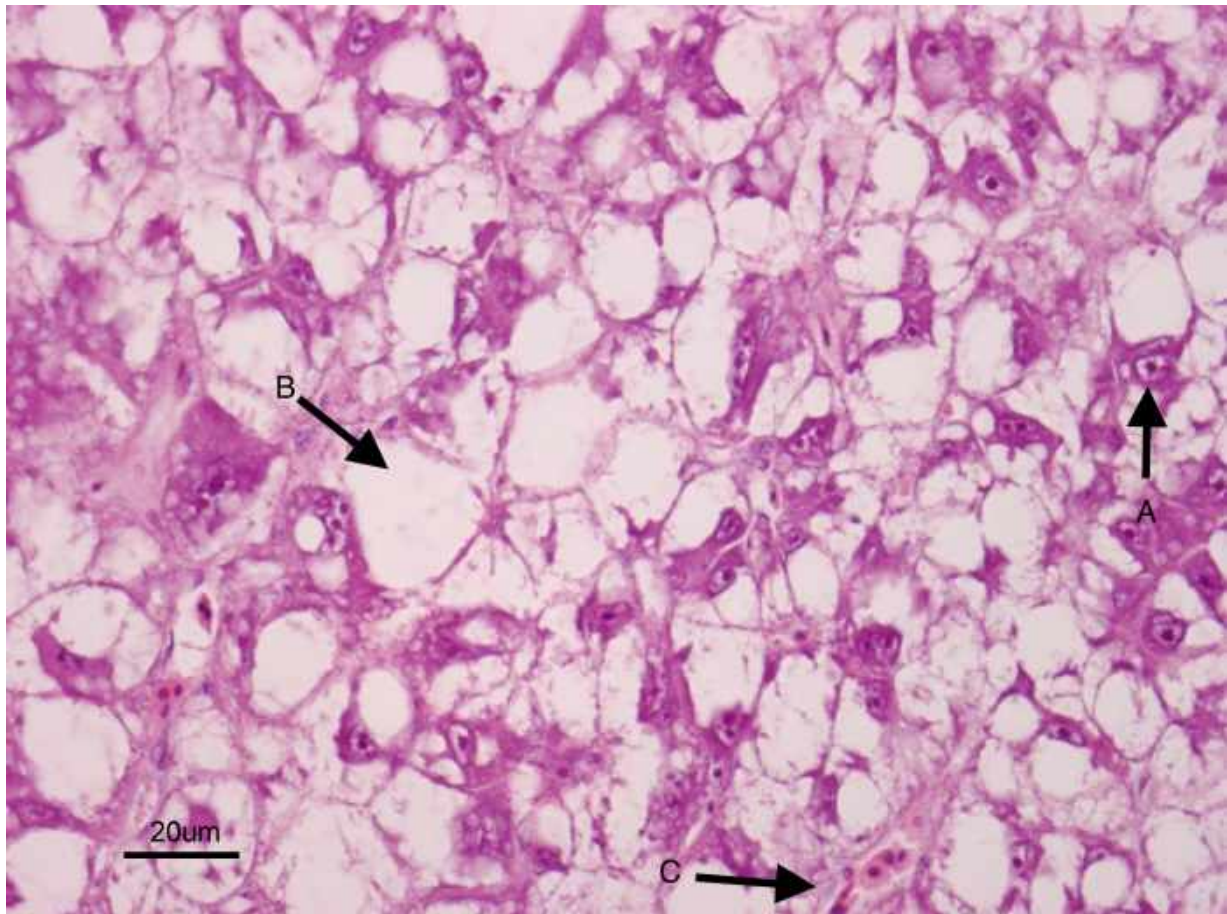
Ved sagittalsnitt av hel rognkjeksyngel (<5g) vises leverens plassering blant omkringliggende vev i bukhalen (figur 36). Leveren ligger på caudal side for hjertehulen, og på cranial side for magesekk og tarm.



Figur 36 - viser sagittalsnitt av rognkjeksyngel (<5g), farget med HE (protokoll 2), 5x forstørrelse. Her vises det at H: lever tar opp mye plass i bukhalen lateralt. På caudal side ligger St: magesekk, Py: pylorusblindsekker og T: tarm (endetarm). Per: peritoneum avgrensner hele bukhalen fra omkringliggende vev, og Cp: perikard ligger på cranial side av peritoneum. Øy: viser øyet.

Figur 36, et sagittalsnitt av rognkjeksyngel (<5g), viser lever plassert inne i bukhalen hos rognkjeks. Leveren kan skilles fra omkringliggende vev ved at vakuoler forekommer i lever, noe som ikke forekommer i mage/tarm, omkringliggende skjelettmuskulatur eller i hjertehulen. I histologiske snitt har lever en lys farge, som en årsak av at vakuolene er uten synlig innhold og ikke tar til seg farge i HE-snitt. Videre kan det observeres i dette snittet at leveren, sammen med magesekk, tar opp store deler av bukhalens volum. I sagittalsnitt i medialplan (figur 5) er lever ikke like dominant.

Histologisk bærer utseendet på rognkjekslever preg av disse store vakuolene. Vakuolene dominerer store deler av vevet, og forekommer som enkeltvakuoler som ligger tett inntil hverandre, eller danner et lite nettverk som kan minne om spindelvev, mellom hverandre. Hepatocytter sees innimellom vakuolene som runde til ovale celler, med en liten rund cellekjerne sentralt (figur 37).



Figur 37 - viser lever hos rognkjeksyngel (<5g), farget med HE (protokoll 2), 40x forstørrelse. Her vises A: hepatocytter som runde til ovale celler med en liten rund cellekjerne sentralt. B: vakuoler. C: blodkar med røde blodceller. Noen hepatocytter har to små runde cellekjerne sentralt.

I figur 37 vises levervev fra rognkjeksyngel (<5g). Snittet er farget i HE, og vakuolene, som dominerer i dette snittet, tar ikke til seg farge. Mellom vakuolene ligger leverceller (hepatocytter). Cellene har et lyst cytoplasma med en rund sentral cellekjerne. Hos rognkjeksyngel sees også hepatocytter med to, til flere, runde sentrale cellekjerne. Røde blodceller sees mellom vakuoler og hepatocytter. Disse ligger inni sinusoider, som er blodkar med endotel som dekker innsiden.

For å se et scannet snitt av lever fra rognkjeks (90g), scann inn denne QR-koden, eller følg vedlagte URL i vedlegg III. Lever kan også studeres i scannede snitt av yngel (1, 2 3 og 4, side 28).



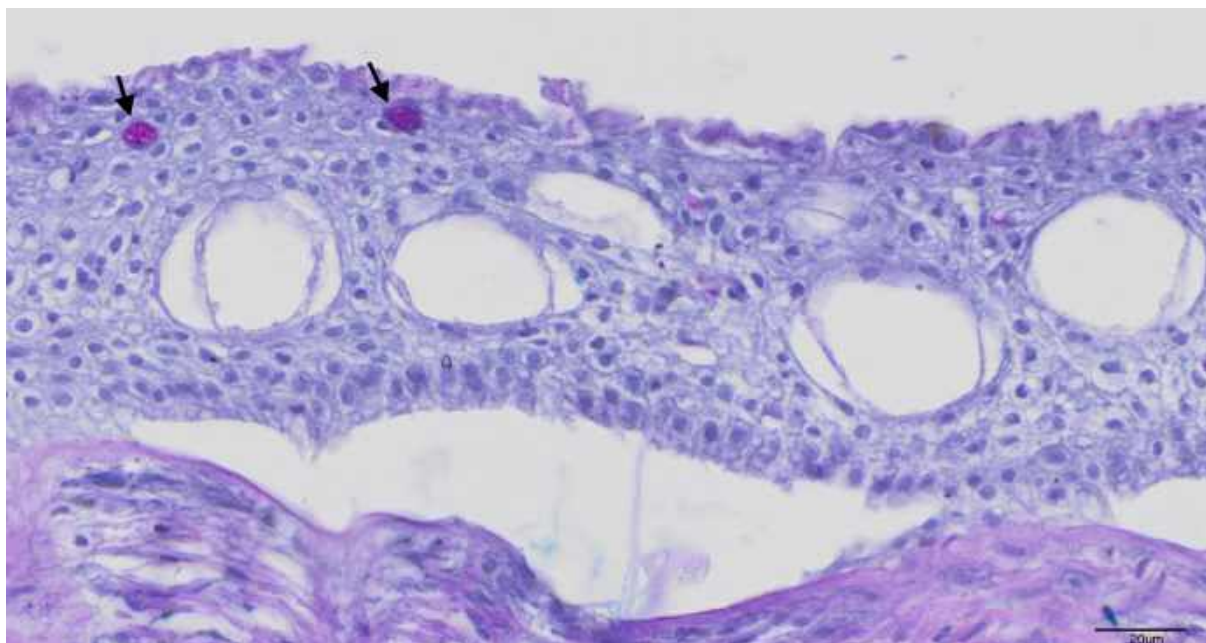
3.2 Spesialfarging

3.2.1 AB-PAS brukt for påvisning av slimceller i hud, gjeller og pylorusblindsekker

Prøver fra hud, gjeller og pylorusblindsekker ble farget med AB-PAS, med hensikt å farge nøytrale (pH=7) og sure (pH<7) slimceller.

Hud

I hudprøver fra rognkjeks (103g), farget med AB-PAS, viser resultatene påvisninger av spredte, lilla-fargede (nøytrale, pH=7) slimceller ytterst i epidermis. Vakuoler i epidermis tar ikke til seg farge (figur 38).



Figur 38 - viser epidermis hos rognkjeks (103g), farget med AB-PAS, 40x forstørrelse. Pilene markerer rosa-lilla strukturer som er nøytrale (pH=7) slimceller i epidermis.

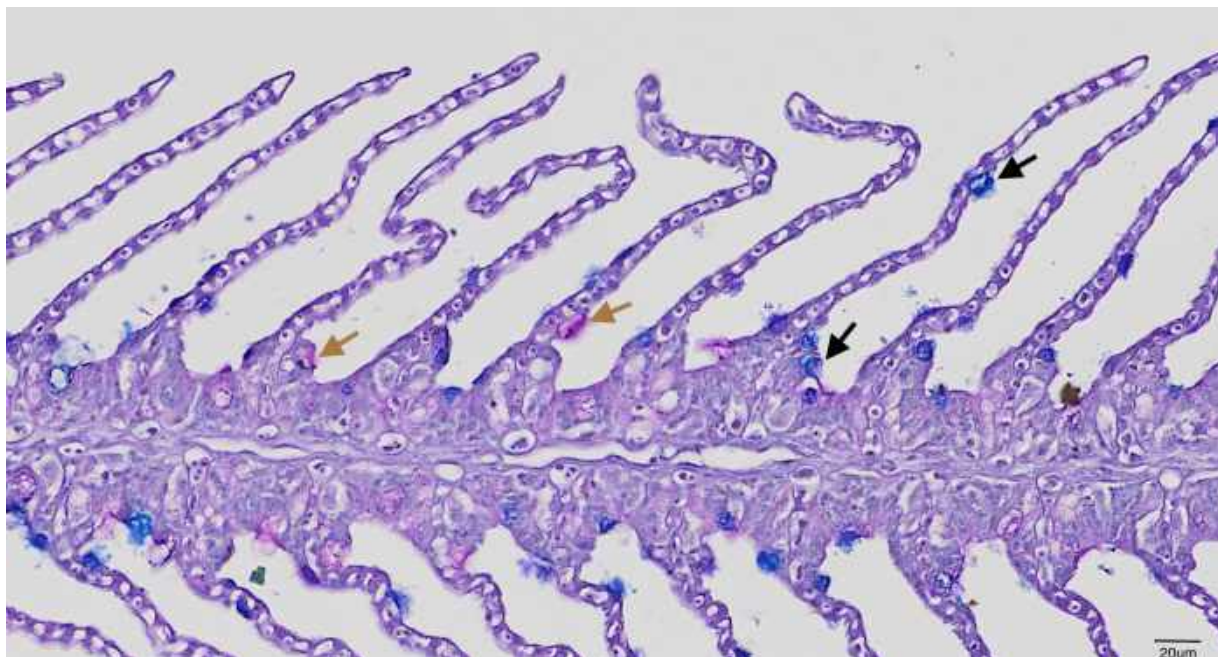
Figur 38 viser et histologisk hudsnitt fra rognkjeks (103g), tatt ut etter prosedyre som nevnt i kapittel 2.3.1.3. Epidermis sees fra toppen med flerlaget plateepitel som strekker seg nedover mot underliggende bindevev i dermis. Epitelceller i epidermis farges i en blå-lilla farge, og bindevevet sees i en purpur farge. I epidermis ligger slimceller med en nøytral pH (pH=7) som tar til seg lilla farge i dette snittet, og to enkeltstående slimceller kan sees i dette bildet. De runde til ovale vakuolene (fem stykker vises i dette bildet) tar ikke til seg farge.

For å se scannet hudprøve farget i AB-PAS fra rognkjeks (103g) følg denne QR-koden, eller vedlagte URL i vedlegg III.



Gjeller

Gjelleprøver fra rognkjeks (90g), farget med AB-PAS, viser en påvisning av slimceller med nøytralt (pH=7) og surt (pH<7) innhold (figur 39).



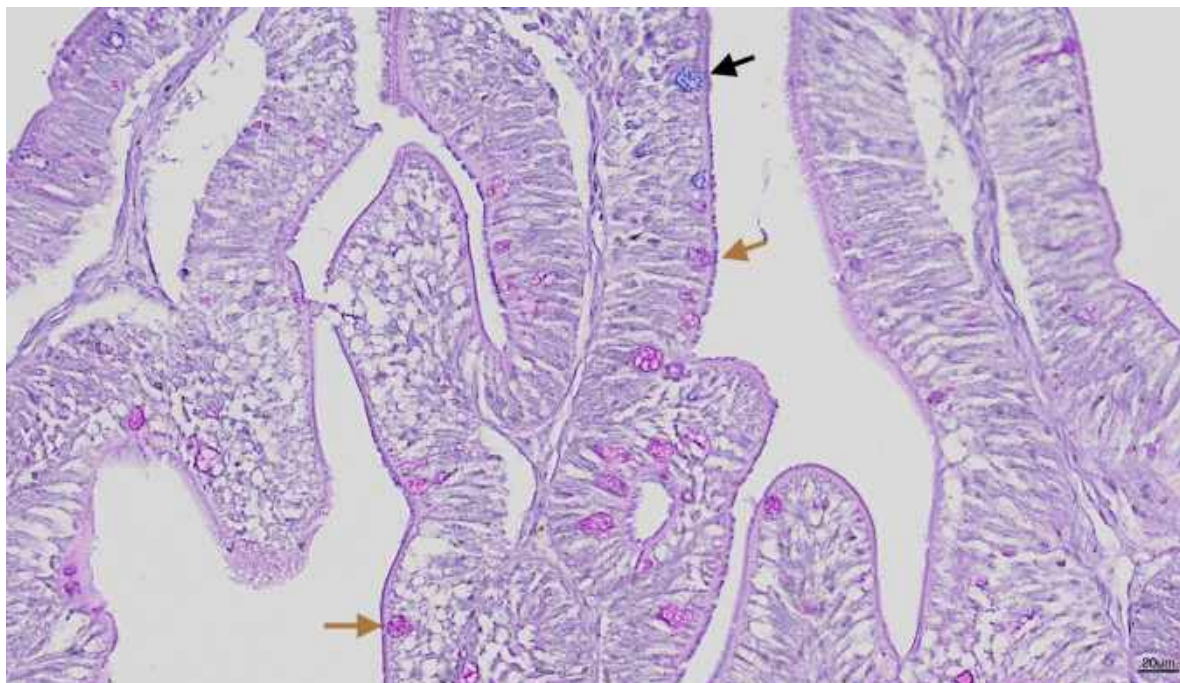
Figur 39 - viser AB-PAS farging av gjeller hos rognkjeks (90g), farget med AB-PAS, scannet, 10x forstørrelse. Brune piler viser lilla-fargede (nøytrale) slimceller, og svarte piler viser blå-fargede slimceller. Slimcellene øker i antall distalt i filamentet.

Figur 39 viser et histologisk gjellesnitt fra rognkjeks (90g), tatt ut etter prosedyre som nevnt i kapittel 2.3.1.3. I snittet sees det at filamentet strekker seg i horisontal retning og lameller som ligger i vertikal retning. Slimceller tok til seg klare blå og lilla farger, og øvrige celler i gjellene tok til seg en blassere lilla-farge. Slimcellene ligger plassert i basis av lamellen, der antall celler øker i distal retning av gjellebuen. Distalt ligger cellene langs basis av lamellen, samt distalt spredt utover. Her vises både blå-fargede (sure, pH<7) og lilla-fargede (nøytrale, pH=7) celler. Blå-fargede slimceller er mest tallrikt, og er de som øker mest i antall lengre distalt i filament og lamell. Innimellom ligger de lilla-fargede slimcellene, og disse forekommer hyppigst langs lamellens basis. I histologiske snitt observeres det at slimcellene har en tendens til å «sprekke», hvor man observerer at innholdet flyter utover cellens membran. For å se scannet gjelleprøve farget i AB-PAS fra rognkjeks (90g) følg denne QR-koden, eller vedlagte URL i vedlegg III.



Pylorusblindsekker

I prøver av pylorusblindsekker fra rognkjeks (117g), farget med AB-PAS, viser resultatene slimceller med nøytralt ($\text{pH}=7$) og surt ($\text{pH}<7$) innhold (figur 40).



Figur 40 - viser AB-PAS fargemetode på pylorusblindsekker hos rognkjeks (117g), farget med AB-PAS, scannet, 10x forstørrelse. Brune piler viser lilla-fargede mucus-celler, som er mest tallrike sammenliknet med de blå-fargede. Svart pil viser de blått fargede mucus-cellene, og forekommer enkeltvis og er ikke like tallrike som de lilla-fargede.

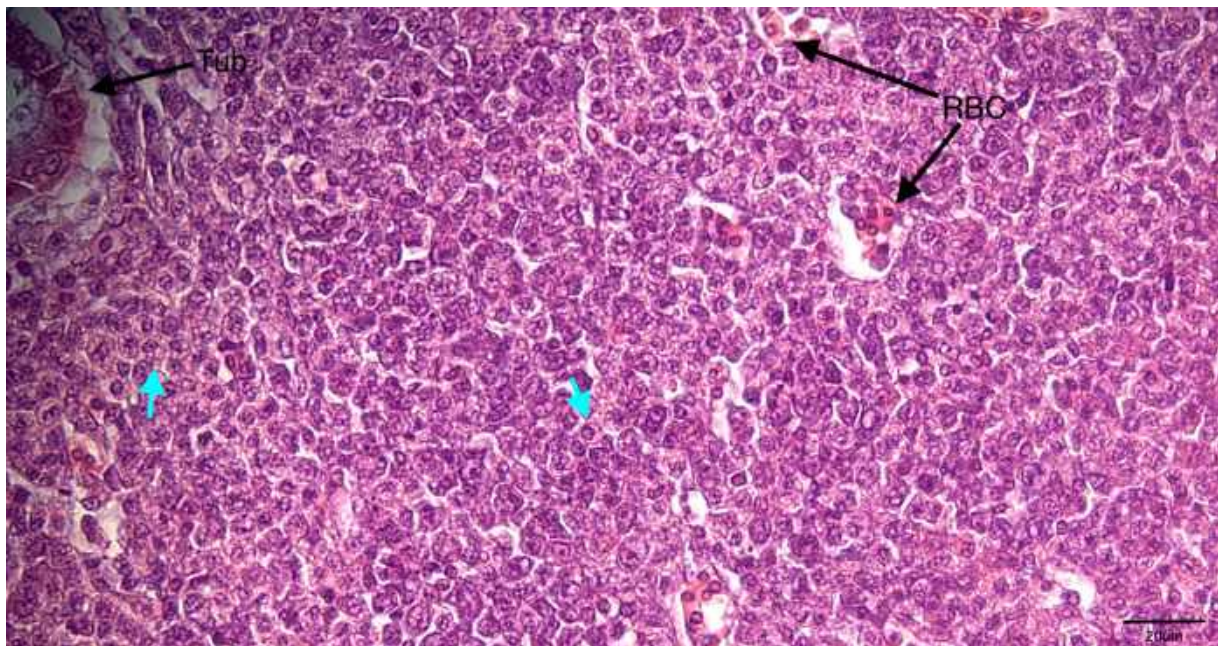
Figur 40 viser et histologisk snitt fra pylorusblindsekker fra rognkjeks (117g), tatt ut etter prosedyre som nevnt i kapittel 2.3.1.3. Her sees både lilla-fargede (nøytral, $\text{pH}=7$) og blå-fargede (sur $\text{pH}<7$) slimceller. I pylorusblindsekker er den en høyest forekomst av lilla-fargede (nøytral, $\text{pH}=7$) slimceller. Noen enkelte blå-fargede (sure, $\text{pH}<7$) forekommer enkeltvis, men er ikke like tallrike og dominerende sammenliknet med de lilla-fargede.

For å se scannet prøve av pylorusblindsekker farget i AB-PAS fra rognkjeks (117g) følg denne QR-koden, eller vedlagte URL i vedlegg III.



3.2.2 MGG brukt for å påvise leukocytter i hodenyre og milt

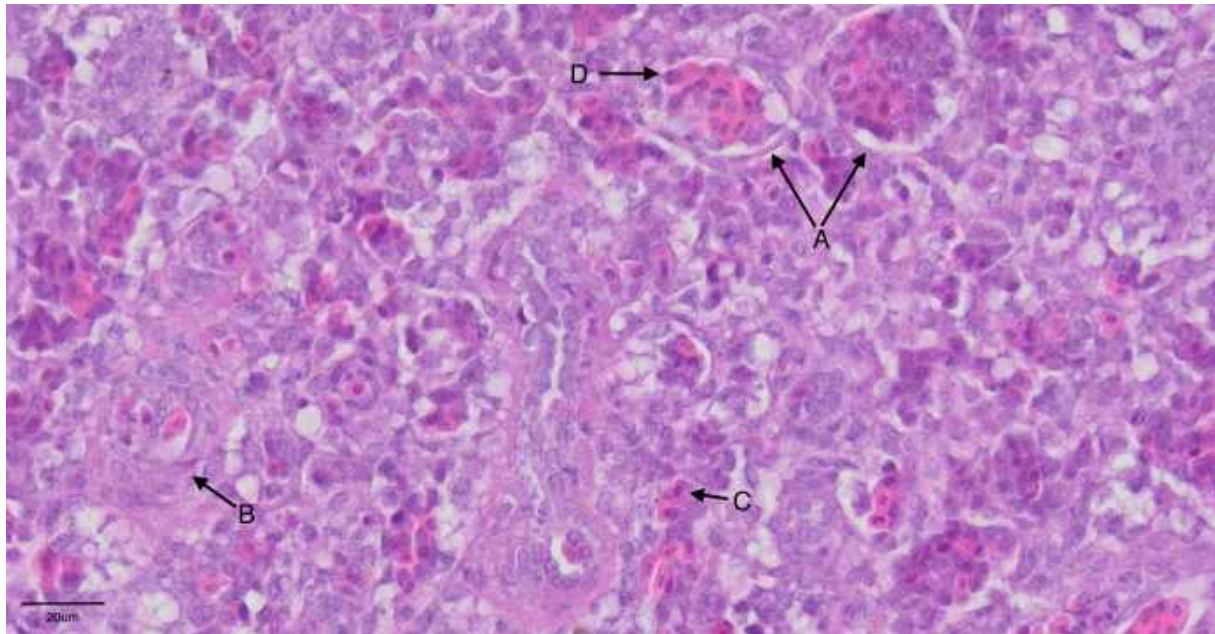
I HE-preparater av hodenyre (figur 41) og milt (figur 42) hos rognkjeks sees flere celletyper. Celler med lyst kornete cytoplasma med en stor rund perifert plassert cellekjerne er tallrike. Disse ligger blant det hematopoietiske vevet, sammen med runde til ovale basofile celler. Røde blodceller sees også, med en klar lys eosinofilt cytoplasma og rund til oval cellekjerne. Det er ikke observert melanomakrofager i hodenyre og milt hos rognkjeks i prøver brukt i denne oppgaven.



Figur 41 - viser hodenyre hos rognkjeks (132g), farget med HE (protokoll 3), 40x forstørrelse. Her vises RBC: røde blodceller med rundt til oval cellekjerne sentralt, og lys rosa eosinofil cytoplasma. En liten del av Tub: tubuli vises øverst i venstre hjørne. Markert med blå piler er celler med eosinofilt granulært cytoplasma, og en stor rund basofil cellekjerne apikalt.

Figur 41 viser hodenyre fra rognkjeks (132g) farget med HE. Det observeres celler med eosinofilt granulært innhold i cytoplasma. Hos disse cellene er cellekjernen perifert plassert, er stor i størrelsen og har rund form. Plasseringen kan være fra enkeltvis til samlet i mindre klynger, og er i figuren markert med blå pil. Basofilt fargede celler kan sees innimellom de eosinofile granulære cellene. Røde blodceller ligger i samlede grupper, ofte i blodkar men også interstitielt i hodenyre hos rognkjeks og er markert med svart pil i figuren.

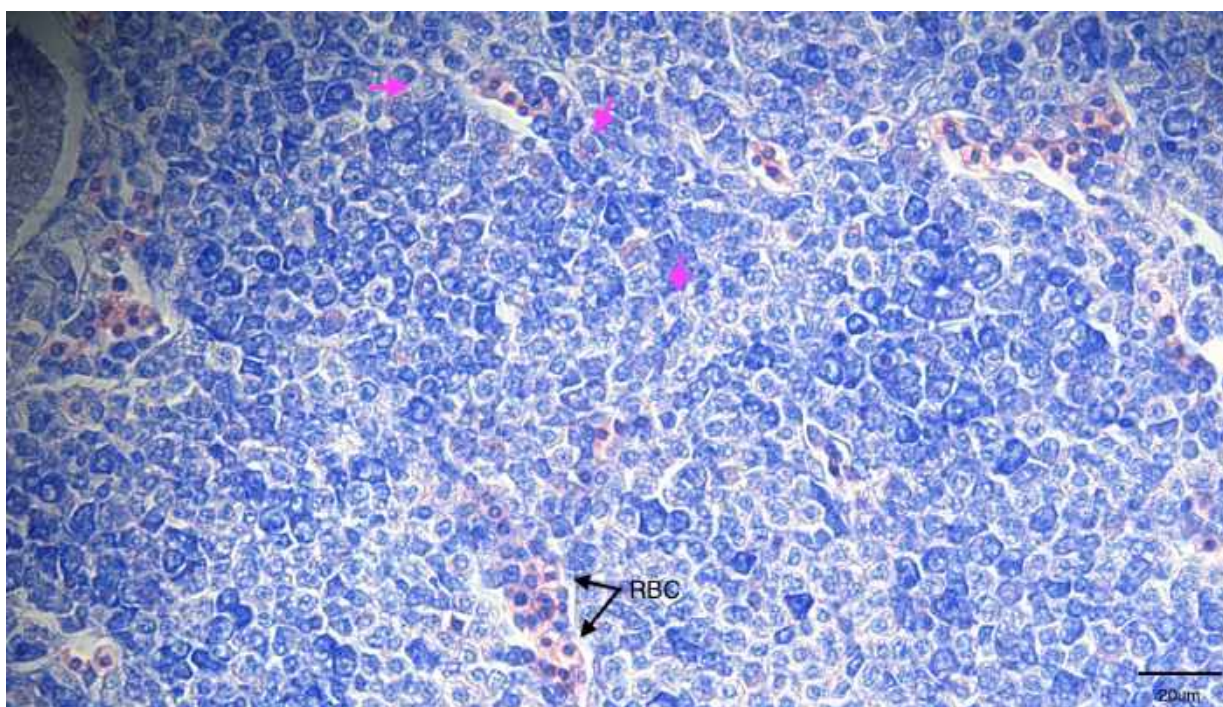
I miltprøver fra rognkjeks farget med HE observeres også celler med granulært eosinofilt cytoplasma med en rund basofil cellekjerne (figur 42). De ligger i det hematopoietiske vevet. Røde blodceller ligger samlet i blodkar, og basofilt fargede runde celler sees interstitielt.



Figur 42 - viser histologisk snitt av milt fra rognkjeks (125g), 40x forstørrelse, farget med HE (protokoll 3). Her vises A: blodkar med innhold av blodceller. B: viser nettverk av lyst fargede celler som kan danne sirkulære strukturer og forgreines rundt i hele organet. C: viser en rød blodcelle, med oval form og kjerne. D: viser celle med rund perifer cellekjerne (større enn RBC), og med granulært innhold i cytoplasma.

Figur 42 viser histologisk snitt fra milt fra rognkjeks (125g), farget med HE. Røde blodceller farges med eosinofilt cytoplasma og en basofilt farget oval sentralt plassert cellekjerne. Cellene ligger organisert gruppevis, inne i avgrensede områder av blodkar omsluttet av endotel. Blant røde blodceller kan det også sees celler med en større rund apikalt plassert cellekjerne, med rosa granulært cytoplasma. Nettverk av celler med en lys farge i cytoplasma sees rundt i vevet, og skiller seg fra omkringliggende hematopoietisk vev ved den lyse fargen. Disse cellene har en svakt farget basofil cellekjerne, og i tillegg til å tilsynelatende danne et nettverk rundt blodceller, også danner sirkulære strukturer.

For å nærmere undersøke blodceller ble utvalgte prøver fra hodenyre (figur 43) og milt (figur 44) farget med MGG. Ved denne fargemetoden viste resultater at cytoplasma i blodceller farger eosinofilt (som i HE-preparater). De uidentifiserte blodcellene (figur 41 og 42) har en lysere granulær eosinofil cytoplasma, med en basofilt farget cellekjerne. Runde basofile celler farges i en blå farge. Prøvene med HE-farging og MGG-farging i de nevnte figurene av hodenyre og milt er de samme histologiske snittene, fra samme utsnitt i organet.

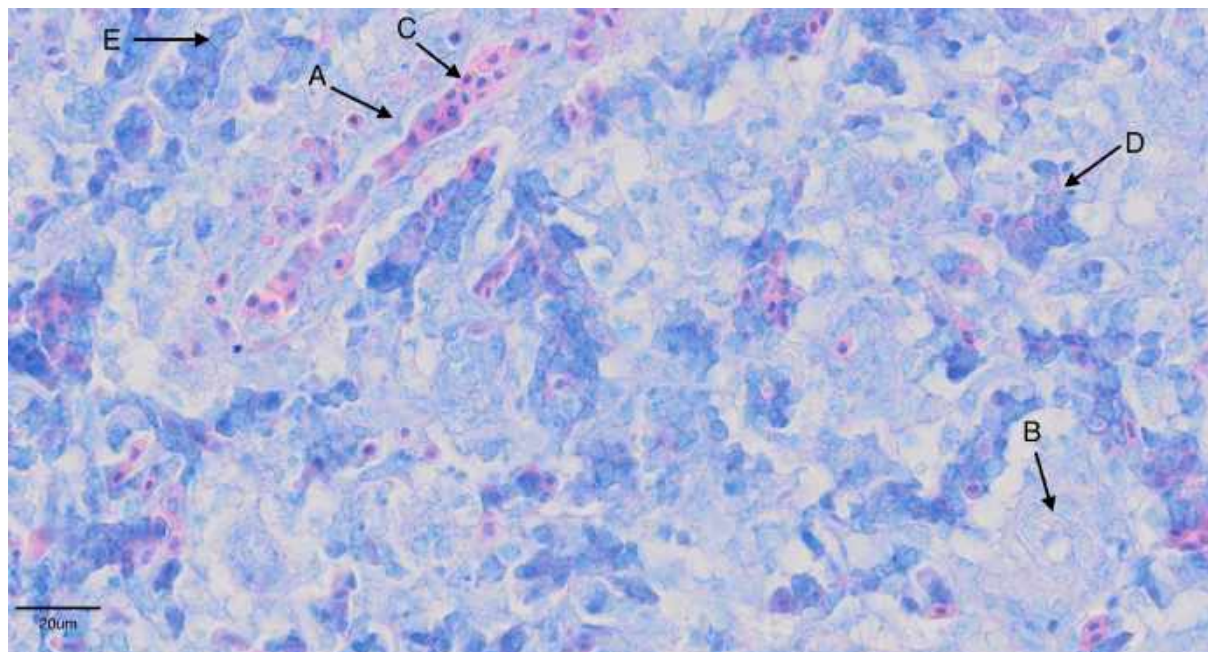


Figur 43 - viser hodenyre hos rognkjeks (132g), 40x forstørrelse, farget med May-Grünwald Giemsa. Her vises RBC: røde blodceller med rosa cytoplasma og en sentralt plassert rund kjerne. Med rosa piler vises celler med eosinofilt granulært cytoplasma, med lysere farge enn RBC. Cellekjernene er store og runde, plassert ut mot cellemembranen.

I figur 43 kan man se et histologisk snitt av hodenyre fra rognkjeks 132g. Samme utsnitt fra hodenyre sees i denne figuren som i HE-preparat i figur 41. Her observeres det diffust spredte celler med en svak eosinofil farge i cytoplasma. I disse cellene er innholdet i cytoplasma kornete, og får med det et granulært utseende. I scannet snitt av hodenyre sees disse cellene i hele organet, i samlede grupper. Øvrige celler i hematopoietisk vev i hodenyre hos rognkjeks får ved farging av MGG en basofil farge. Røde blodceller vises med en rosa eosinofil farge, ligger samlet i blodkar og skiller seg klart ut fra omkringliggende hematopoetiske vevet. For å se scannet nyreprøve farget med MGG fra rognkjeks (132g) følg denne QR-koden, eller vedlagte URL i vedlegg III.



I milt viser resultatene etter farging med MGG samme trend som i hodenyre (figur 44). Røde blodceller som ligger klumpvis organisert sammen, og en svakere eosinofilt fargede annen celletype med et granulært cytoplasma. Disse cellene har en svakt blå farge og som skiller seg fra omkringliggende celler.



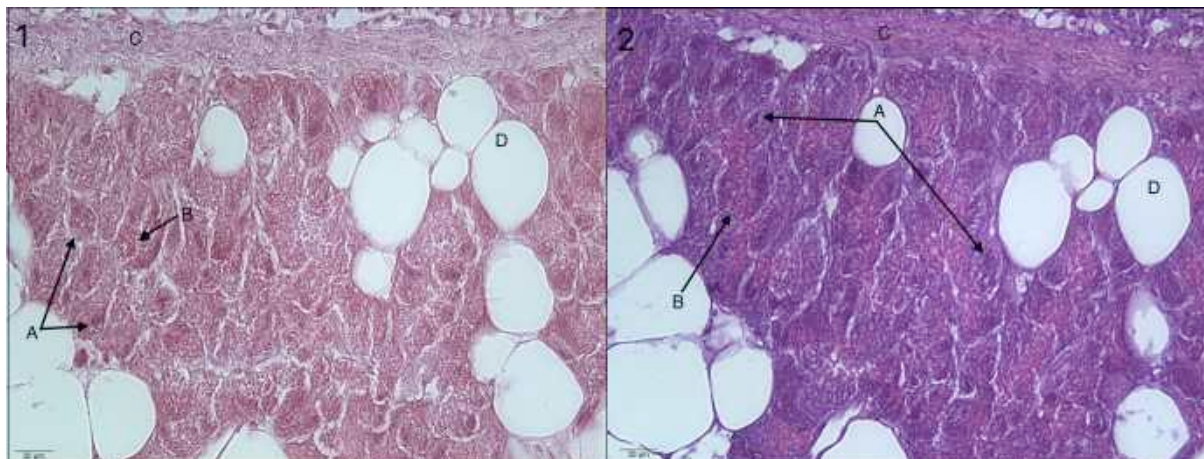
Figur 44 - viser histologisk snitt av milt fra rognkjeks (125g), farget med MGG, 40x forstørrelse. A: blodkar med innhold av blodceller. B: viser nettverk av celler som danner sirkulære strukturer og forgreines rundt i hele organet. Dette har en lysere farge enn omkringliggende vev. C: viser en rød blodcelle, med oval form og kjerne. D: viser celle med rund perifer cellekjerne (større enn RBC), og mer granulært innhold i cytoplasma sammeliknet med RBC. E: basofilt fargede runde celler.

I figur 44 kan man se et histologisk snitt av milt fra rognkjeks 125g. Samme utsnitt fra milt sees i denne figuren som i HE-preparat i figur 42. Røde blodceller skiller seg mest ut med en eosinofil farge på cytoplasma, og ligger organisert inne i blodkar. Den andre celletypen, som også blir eosinofil farget ved denne fargemetoden, er celler med granulært eosinofilt cytoplasma. I histologiske snitt ser det ut til at de er mindre tallrike enn røde blodceller, og fokalt organisert i samlede grupper. Et nettverk av svakt blå fargede celler sees rundt om i hele organet. Disse cellene danner også sirkulære strukturer, og har en svak antydning til å ta opp rosa farge. Øvrig sees basofilt fargede runde celletyper av forskjellig form og utseende. For å se scannet miltprøve farget med MGG fra rognkjeks (125g) følg denne QR-koden, eller vedlagte URL i vedlegg III.



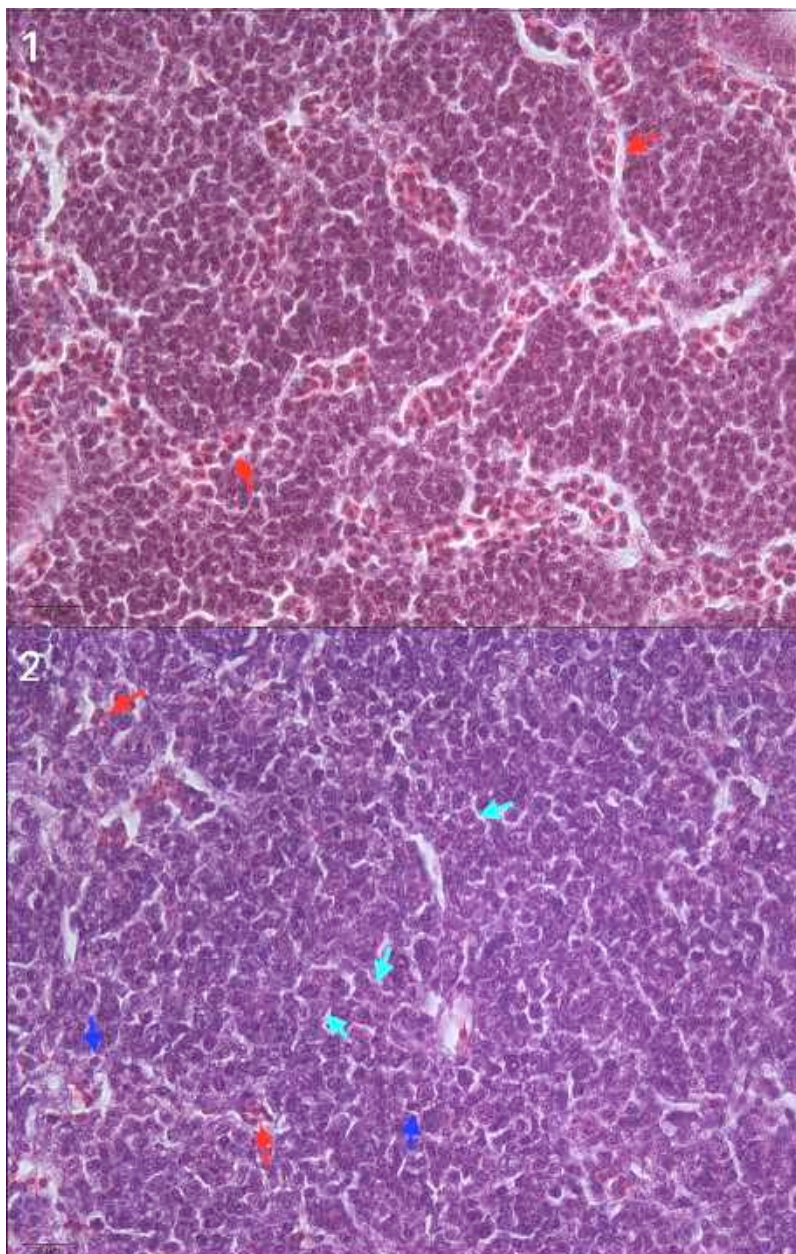
3.2.3 Protokoller for farging med hematoxylin og eosin (HE) gir forskjellig uttrykk i vev

Resultater har vist at de forskjellige protokollene for farging med HE gir ulikt utseende på ulike typer vev. Dette er fremtredende i celler som farger eosinofilt. Spesielt i zymogenkorn i eksokrin pankreas (figur 45), samt blodceller og hematopoietisk vev som hodenyre (figur 46) og milt.



Figur 45 - viser pankreas av rognkjeks (125g), 40x forstørrelse. 1: viser preparat fra HE-protokoll nummer 1, og 2: viser preparat fra HE-protokoll nummer 3. Her vises i begge bilder A: acinærceller med stor rund cellekjerne, B: zymogenkorn, C: kapsel på milt, D: fettceller. Legg merke til mindre fremtredende zymogenkorn i bilde 1. Her er det vanskeligere å skille disse fra cellene, da de sees som små granula i cellen uten å ta noe spesiell farge som skiller dem fra omgivelsene. I motsetning til bilde 2, der zymogenkornene kommer tydeligere frem og har en annen farge enn omgivelsene.

Zymogene granula i eksokrint pankreas-vev kan ta opp mye farge og få en klar eosinofil farge. I preparater farget med HE-protokoll 2 og 3 (kapittel 2.3.7.1) kommer disse cellene godt frem. De har en klar rosa eosinofil farge som skiller seg fra det omkringliggende mørkt lilla-fargede vevet. I figur 45.2 vises zymogene granula med en mer rosa farge enn resten av acinærcellen. Figur 45.1 viser samme snitt av pankreas, i samme område og fra samme fisk som i figur 45.2, men ved bruk av HE-protokoll 1. Her vises at zymogene granula ikke farger eosinofilt. De zymogene granula har her en noe mørkere farge basalt i cellen, og det er det vanskelig å skille zymogenkornene fra omgivelsene.

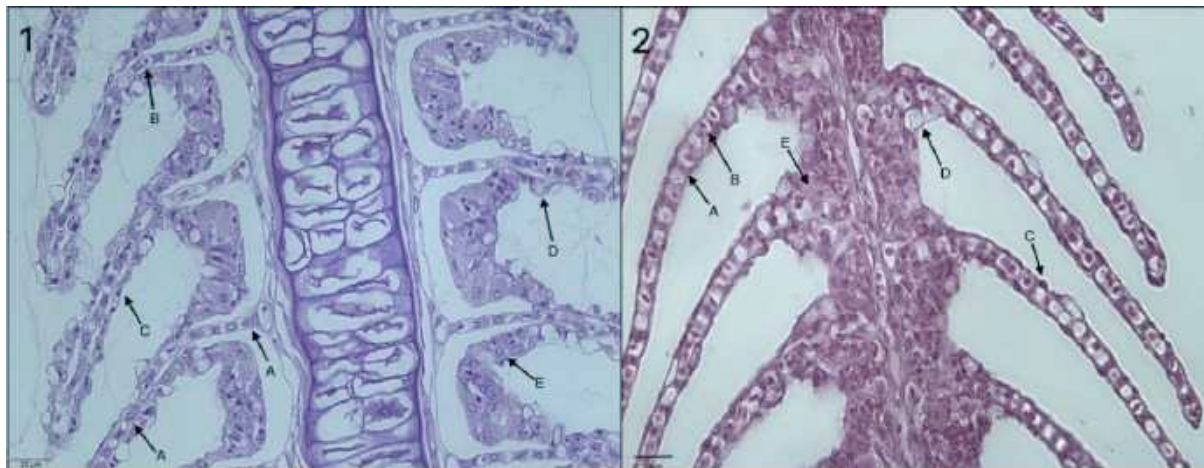


Figur 46 - viser 1: hodenyre fra rognkjeks (100g) farget med HE-protokoll 1, 40x forstørrelse. 2: hodenyre fra rognkjeks (132g), farget med HE-protokoll 3, 40x forstørrelse. Røde piler viser røde blodceller som er godt synlige i begge bilder. Lys blå piler viser eosinofile granulære celler, som er tydelige å se i bilde 2. I bilde 1 er de eosinofile granulære cellene vanskelig å skille fra de andre. Blå piler viser basofile celler som også sees godt i bilde 2, men ikke like godt i bilde 1.

Figur 46 viser prøver fra hodenyre fra forskjellige størrelser på rognkjeks. Figur 46.1 viser histologisk snitt av hodenyre fra rognkjeks (100g), farget med HE-protokoll 1. Figur 46.2 viser histologisk snitt av hodenyre fra rognkjeks (132g) farget med HE-protokoll 3. I prøver farget med HE-protokoll 1 er det vanskeligere å identifisere andre blodceller enn de røde blodcellene, da de ikke tar opp like mye eosinofil farge sammenliknet med prøver farget med HE-protokoll 2 og 3. Røde blodceller har eosinofil farge i alle protokoller og er enkle å identifisere fra omgivelsene. I prøver farget med HE-protokoll 3 vises særlig de eosinofile granulære celler samt basofile celler. Disse er ikke like synlige i preparater fra protokoll 1.

3.3 Endret histologisk vevsstruktur i gjeller som følge av post mortem behandling

Cellene i gjeller er sensitive for store endringer i de ytre omgivelsene. Ved undersøkelser av gjelleprøver av frisk fisk vises ett uttak som hadde degraderende vev i gjeller (figur 47).

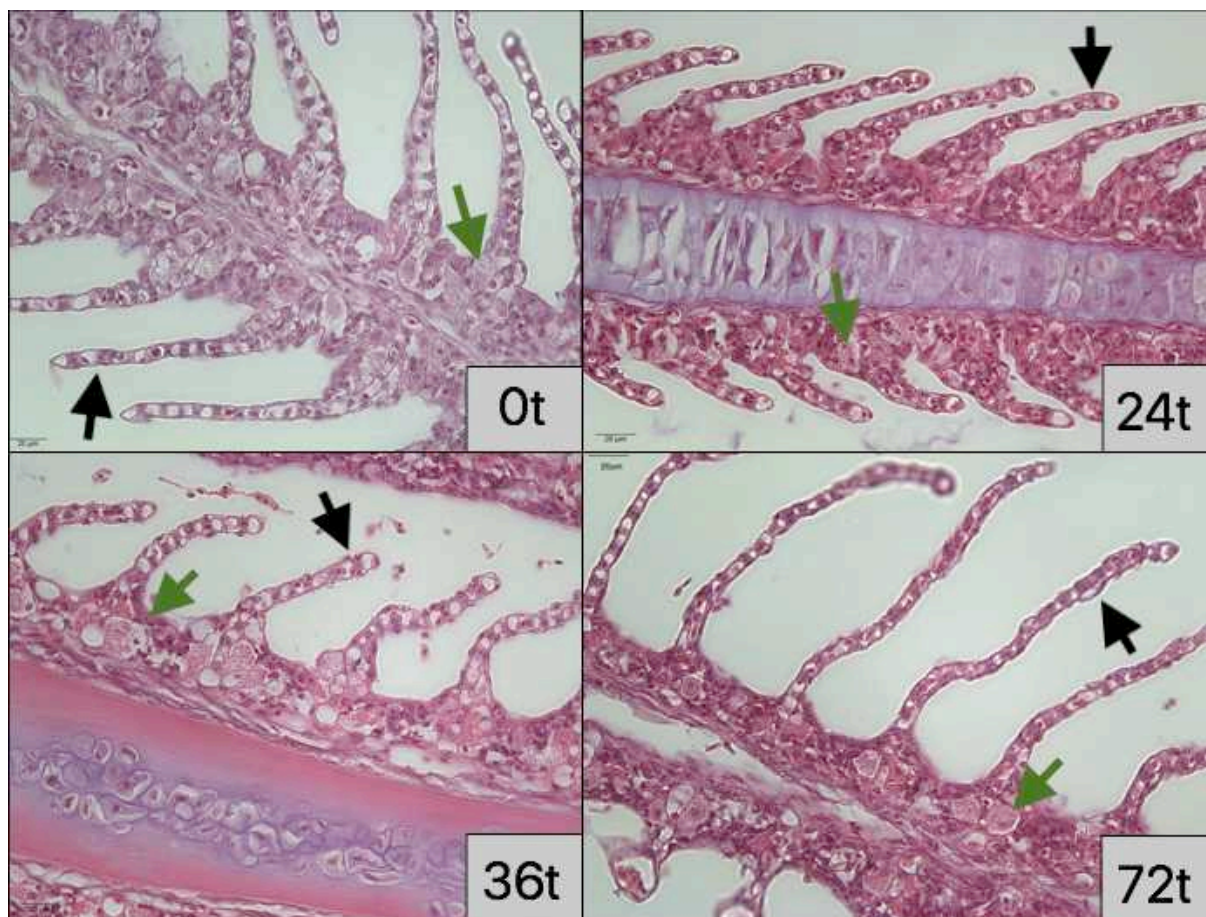


Figur 47 - viser 1: gjeller hos rognkjeks (80g), med tegn på degradering/autolyse av celler og vev, farget med HE (protokoll 2), 40x forstørrelse.. 2: viser gjeller hos rognkjeks (125g) uten autolytiske artefakter, farget med HE (protokoll 1), 40x forstørrelse. A: pillarceller, B: røde blodceller, C: epitelceller, D: mucus-celler og E: kloridceller.

I figur 47.1 og 2 vises begge normale gjeller hos rognkjeks, hvor det i Figur 47.1 kan sees gjeller med autolytiske artefakter. Her observeres hypertrofi av celler. Pillarcellene har en blassere farge på cellekjerne, og som ved lamellens basis skiller seg fra resten av omkringliggende vev (lifting). Røde blodceller med mindre avgrenset cytoplasma og nesten udefinerbar celledstruktur observeres. Epitelceller løfter seg fra underliggende celler (lifting). Slimceller har vist at de kan sprekke og flyte ut under preparering, men vises mindre definerbare og med en blassere farge ved en ikke-optimal fiksering. Kloridceller i lamellenes basis begynner å løsne fra pillarcellene, cellekjernene er små og mørk i fargen. Kloridcellene opprettholder likevel mye av den normale strukturen, som er en litt blassere farge sammenliknet med omkringliggende celler. Figur 47.2 viser gjeller uten autolytiske artefakter. Epitelcellene ligger tett inntil pillarcellene og kloridcellenes cellekjerne er store og ovale. Røde blodceller kan observeres innimellom pillarcellene, og generelt ser cellene ut til å ha sin normale størrelse.

3.4 Dekalsifisering

Gjelleprøver fra rognkjeks (132g) ble lagt i forskjellige tidsintervaller i maursyre (10%) med hensikt å dekalifisere gjellebue for å forenkle snitting med mikrotom. Ulike tidsintervaller ble valgt med hensikt å se ved hvilke tidspunkt gjellevevet eventuelt kunne ta skade, da ønsket var å få en mykere gjellebue å samtidig holde gjellevevet intakt. Resultatene viste at filamenter og lameller tar mest skade etter 72t i maursyre, men etter 36t kan små endringer begynne å observeres (figur 48).



Figur 48 – viser 0t: gjeller fra rognkjeks 90g som ikke har vært eksponert for syre. 24t: gjeller fra rognkjeks 132g som har vært eksponert for syre i 24t. Etter 24t er filament og lameller intakte, med svart pil indikert på epitelceller og grønn pil kloridceller med lys kornete cytoplasma og en rundt apikalt plassert cellekjerne. 36t: prøver fra rognkjeks 132g. Her sees epitelceller som begynner å gå i oppløsning og et hulrom dannes rundt kloridceller. 72t: gjeller fra rognkjeks 132g, 72t i syre. Her sees lifting av epitel og hulrom rundt kloridceller.

Figur 48 viser gjeller fra rognkjeks (90g) som ikke har vært eksponert for syre (0t) og gjeller fra rognkjeks (132g) som har vært eksponert for syre i 24t, 36t og 72t. Ved 0t og 24t vises intakte lameller med intakte epitel- og pillarceller. Kloridcellene har en lys kornete cytoplasma og ligger ved lamellens basis. Etter 36t dannes et hulrom rundt kloridceller, der cellene i seg selv har likt utseende som kontroll. Epitelceller ser ut til å begynne å gå i oppløsning etter 36t, og avstøtning av epitel ser ut til å skje. Etter 72t sees lifting av epitel fra pillarceller. Det var en

merkbar endring i gjellebuen under snitting av blokkene. Motstanden på knivbladet var mindre sammenliknet med 0-prøver.

4 Diskusjon

4.1 Normalhistologi i utvalgte organer hos rognkjeks

Analyser av histologiprøver fra frisk rognkjeks (n=50) gir oversikt over normale strukturer i utvalgte vev. De utvalgte organene som er analysert i denne oppgaven er prøver fra hud (n=22), gjeller (n=32), hjerte (n=24), nyre (n=29), milt (n=8), pankreas (n=26) og lever (n=32). I diskusjonen er histologisk atlas for laks (Amin et al., 1991) og torsk (Amin et al., 2012) brukt som sammenlikningsgrunnlag, sammen med et histologisk oppslagsverk på generell fiskehistologi (Mokhtar, 2017). Forskningsartikler er blitt benyttet i den grad det finnes relevant forskningslitteratur på både vill og oppdrettet rognkjeks.

4.1.1 Hud

I de undersøkte hudprøver fra rognkjeks (n=22) ble det gjort flere ulike observasjoner. Fargevariasjonene i huden er det det første man observerer på fisken, og gir rom for videre diskusjon. Vakuolene i epidermis samt bindevevslaget i dermis har og vært sentrale observasjoner i analysene.

Fargevariasjoner i hud som et resultat av omgivelser og andel melanoforer i dermis

Fargevariasjoner i huden hos oppdrettet rognkjeks er observert. Dette er også observert på vill rognkjeks. Studier av vill rognkjeks indikerer at blodplasma hos hunnfisken kan ha en grønnblå farge (Fontaine, 1941). Denne fargen skyldes et pigment som inneholder billiverdin, et biprodukt som dannes under nedbrytning av hemoglobin i røde blodceller. Billiverdin sirkulerer med plasma, avsettes i fiskens gelatin-lag og gir en grønnlig farge i fiskens hud (Mudge et al. (1986) & Davenport et al. (1989)). I denne oppgaven ble rognkjeksene ikke kjønnsbestemt. Grunnen til variasjonen på fargen kan derfor skyldes kjønnsforskjeller, og at rognkjeksindividene med turkis til blå farge som ble undersøkt i denne oppgaven da var hunnkjønn.

Rognkjeks har også evne til å endre farge basert på omgivelsene rundt (Davenport et al., 1995). Dette kan også kan være en grunn til den observerte fargevariasjon i huden. Rognkjeks har ikke skjell, og muligheten til å kamuflere seg nær vannoverflaten vha. disse er derfor ikke mulig. Muligheten til å kunne endre farge i huden vil kunne kompensere for å ikke kunne kamuflere seg med skjell. Davenport et. al viste i en studie fra 1985 at ved å endre miljøet rundt

rognkjeksens så kunne den tilpasse seg omgivelsene ved hjelp av en fargeendring i huden. Endringen var størst i ventralt område, mens dorsalt opprettholdt fisken en mørkere farge. Fargeendringen var linket til andel melanin i melanoforer (figur 7) i dorsalt område, der størrelsen og antall melanoforer varierte mellom individer (Davenport et al., 1995). Melanoforer er observert mellom epidermis og dermis i alle størrelsene av fisk i bruk i dette forsøket. Dette er mulig grunnen til den observerte variasjonen av farge også på hud til oppdrettet rognkjeks. Variasjonene ofte er observert som størst etter at fisken er merdsatt. Ute i sjø vil omgivelsene være av større variasjon sammenliknet med fargen på karet i settefiskfasen, og med det kunne bidra til at individene tilpasser fargen sin etter lys, vær og andre organismer i sjøen. Årsak til fargevariasjonene i huden hos rognkjeks kan dermed være sammensatt av farge på omgivelser og andel melanoforer i dermis.

Vakuoler i epidermis tar ikke farge ved AB-PAS

I epidermis hos rognkjeks ligger flere ovale til runde vakuoler uten synlig innhold (figur 8). Fra hudprøvene brukt i denne oppgaven er vakuolene observert til å være mer tallrike hos rognkjeksyngel sammenliknet med større rognkjeks. Samtidig er de hos yngel tallrike rundt hele fiskens overflate (figur 5), mens de hos større individer ligger mer spredt rundt i epidermis. Spesialfarging med AB-PAS viser at vakuolene ikke tar farge. Dette indikerer at det ikke finnes karbohydratrike forbindelser i vakuolene og at disse cellene derfor ikke kan være slimceller, da slike har innhold av karbohydrater (Suvarna et al., 2019). I epidermis hos fisk kan celler som klubbeceller og sacciforme celler forekomme, og i histologiske snitt sees disse cellene ofte som store vakuoler. Klubbeceller har som funksjon å skille ut alarmstoffer, og finnes hos maller, karper og ål (Kryvi et al., 2016). Funksjonen til sacciforme celler er antatt å være utskillelse av frastøtende giftige stoffer ved skade. Sacciforme celler kan av og til sees med svakt innhold av granulært materiale i histologiske snitt, og tar ikke farge ved AB-PAS (Amin et al., 2012). Hos rognkjeks virker vakuolene å være tomme. Mangel på innhold kan utelukke muligheten for at dette kan være sacciforme celler, men det kan ikke utelukkes at innholdet er vasket ut i prepareringen av snittet. En annen mulighet er at de tomme cellene er klubbeceller. Årsaken til at disse er mer tallrike hos yngel kan da være at yngelen er i større beredskap til å skille ut alarmstoffer enn større fisk fordi den er liten og mer sårbar for å bli angrepet eller spist av større predatorer. Ny forskning kaller disse vakuolene Q-celler. Cellene er fremtredende i huden hos rognkjeks, og kan være en del av et førstelinjeforsvar. Tettheten av cellene øker som en respons på miljøendringer og stress, har >10x høyere tetthet og er opptil 200x større enn slimcellene (Jonassen et al., 2019). En annen forklaring på hva vakuolene i epidermis hos rognkjeks kan

være er at de kan være fettceller. Ved preparering av et histologisk snitt kan innholdet i fettceller vaskes ut som følge av behandling med kjemikalier (Weather et al., 1987). Dette kan bety at de sees uten innhold i de undersøkte histologiske snittene i dette forsøket på grunn av at innholdet er vasket ut under prepareringen. Det råder med andre ord fortsatt usikkerhet i forskningen og litteraturen om hva vakuolene i epidermis hos rognkjeks er, og hva deres eventuelle funksjon er. Det kreves mer forskning på dette området for å bringe klarhet i dette. En metode for å undersøke om vakuolene kan være fettceller eller ikke, kan være å erstatte fiksering med formalin med frysing, for så å deretter farge med sudan-svart, som farger fettceller i en blåsvart farge (Suvana et al., 2019).

Bindevevslag som kompensasjon for manglende svømmeblære?

Fra hudprøver tatt lateralt på fisken, dorsalt for bukhulen, viser bildene tatt av bindevev i dette området at hos rognkjeks >50g var den gjennomsnittlige størrelsen på bindevevslaget på $1194\mu\text{m}$ ($n=6$), noe som utgjorde 72% av hele huden. Makroskopisk sees dette laget som et gelatinøst lag mellom huden og skjelettmuskel. En mulig forklaring på hvorfor bindevevslaget utgjør godt over halvparten av hudens størrelse kan være at det bidrar til fiskens oppdrift. En studie gjort på vill rognkjeks viser at dette tykke gelatinøse bindevevslaget hos rognkjeks kan bidra til fiskens oppdrift i vannsøylen, i tillegg til andre organer som for eksempel fettholdige kjønnsvæsker (Davenport et al., 1986). Farging av histologiske hudprøver med VG viser at bindevevslaget har et rikelig innhold av kollagen (figur 9). For at bindevevslaget skal kunne bidra til oppdrift må tettheten være lavere enn det omkringliggende vannet og dermed må det inneholde komponenter som kan bidra til dette. Fettvev er i prøvene observert mellom bindevevslaget og dermis, der bindevev strekker seg innover i fettvevet. Andelen fett er ved observasjoner av prøver lavere enn bindevevet, derfor hadde det her også vært interessant for videre forskning å undersøke om det innad i bindevevet finnes andre komponenter enn kollagen som kan bidra til oppdrift i vann, som for eksempel fett. Nevnt i forrige avsnitt er metoden for en eventuell påvisning av fett i vakuolene i epidermis, og denne metoden kunne også da eventuelt også påvise innhold av fett i det underliggende bindevevslaget, noe som hadde styrket teorien om at bindevevslaget kan bidra til fiskens oppdrift.

I oppgaven ble observasjonene på bindevevslaget gjort underveis i analysen av prøvene, og dette var ikke et mål for studiene av hud i planleggingen av oppgaven. Det ble gjort et forsøk på å kvantifisere størrelsen på bindevevslaget i yngel, men siden 10/13 yngelprøver var av sagittalsnitt kunne disse målingene ikke sammenliknes med hudprøvene fra større rognkjeks,

da disse var tatt ut lateralt på siden av fisken og snittet som tverrsnitt. Standardavvik fra målinger på bindevevslaget hos yngel var større enn gjennomsnittsverdien, noe som forteller at usikkerheten var stor og at størrelsen på bindevevslaget hos yngel varierte ut fra hvilket medialplan fisken var snittet i. For videre undersøkelser av bindevevslaget til rognkjeks hadde det vært interessant å vite om det forholdsmessig er lavere, høyere eller likt hos rognkjeksyngel sammenliknet med større rognkjeks. Et lavere forhold på bindevevet hos yngel hadde også kunne støttet opp under teorien at det bidrar til fiskens oppdrift, da yngel er bunnlevende og ikke krever like mye oppdrift som større rognkjeks som er pelagisk (Davenport, 1985).

4.1.2 Gjeller

Av undersøkte gjelleprøver fra rognkjeks (n=32) viser resultatene at gjellene består av en bruksholdig gjellebue med gjellegitterstaver på den ene siden, og lameller og filamenter med kloridceller, pillarceller, epitelceller og slimceller på motsatt side. Slimcellene vil bli diskutert nærmere i kapittel 4.2.1. I kapittel 4.3.2 vil uttakspraksisens betydning for tilstrekkelig bevaring av gjellevevet diskuteres.

Celler muliggjør effektiv diffusjon av gass og er samtidig sensitive for ytre påkjenninger
Plateepitellaget i lamellene avgrenser organet fra sine omgivelser. Pavementceller (PVC) er en type respiratorisk skvamøst epitel, som utgjør over 90% av epitelcellene i gjellene (Evans et al., 2005). Pillarcellene danner lamellenes utstrakte struktur. Det er tydelig fra histologiske undersøkelser av gjellene at én og én rød blodcelle får plass innimellom hver pillarcelle (figur 13). De røde blodcellenes størrelse er $8 \times 12 \mu\text{m}$ (Kryvi et al., 2016), noe som forteller at her finnes små avstander mellom cellene. Gjellene eksponeres for vann fra omgivelser, og er derfor sårbare for skade som følge av innhold i vannet de eksponeres for. På den ene siden muliggjør det tynne laget med epitelceller en effektiv transport av oksygen og karbondioksid mellom blodcellene og vannet. Derfor er det viktig at epitellaget er så tynt som det er. På den andre siden vil epitelcellene være utsatt for en del ytre påvirkning fra den kontinuerlige vanngjennomstrømmingen. Som nevnt i innledning kan agens som *Paramoeba perurans* føre til hyperplasi av gjellelammeller. Et økende antall lag av epitelceller på lamellene vanskeliggjør derfor muligheten for transporter av gasser over lamellene. En redusert evne til å ta opp oksygen og å skille ut karbondioksid er ikke optimalt for fiskens helse og velferd.

4.1.3 Hjerte

Undersøkelser av hjerteprøver fra rognkjeks (n=24) viser funn av flere ulike celletyper. I atrium hos rognkjeks finnes høye endokardiale celler i endotel, hvor form og størrelse på disse cellene kan variere mellom ulike rognkjeksindivider. B.a består av flere celletyper, hvor spesialfarging med VG viser kollagenrikt bindevev langs epikard.

Endokardiale celler i atrium

Hos enkelte fisk har endokard evne til å være endocytterende (Mokhtar, 2017), og omtales ofte som scavengerendotel. Noen vertebrater, som rotte (*Rattus norvegicus*) har tilsvarende typer celler i lever (Seternes et al., 2002), mens torsk (*Gadus morhua*) har slike celler i atrium (Sørensen et al., 1998). Hos torsk danner disse cellene atriets endokard, og utseendemessig likner dette på rognkjeksens endokard i atrium. Det kan være grunn til å tro at det er disse typer celler som er observert som høye endokardiale celler i atrium hos rognkjeks, en hypotese som gir mulighet for videre forskningsarbeid med rognkjeks og dens immunsystem.

Oppbygningen av b.a

Under epikard i b.a består vevet av fast bindevev, glatt muskulatur, løst bindevev og endotel ut mot lumen. Farging med VG viser at det faste bindevevet inneholder kollagen, samtidig som at det løse bindevevet ikke gjør det. Cellelagene i b.a bidrar til å holde omkretsen på organet stabilt da funksjonen til organet er å sørge for et jevnt blodtrykk til gjellene (Mokhtar, 2017). Det finnes ikke hjertemuskulatur i b.a, men glatt muskulatur, noe som indikerer at den er en forlenget del av ventralaorta (Amin et al., 1991), som også inneholder glatt muskulatur. Målsetningen med systematisk makroskjæring (kapittel 2.3.1.3) var å kunne se overgangen fra b.a til ventralaorta, men dette lyktes ikke da ventralaorta er gått tapt i fremføringsdelen.

Hos rognkjeks har endotelet som ligger ut mot lumen i b.a en sylindrisk form, med runde apikale cellekjerner. Hos fisk kan endotelceller i b.a variere fra sylindrisk til kubisk form og det er variasjoner mellom ulike arter (Mokhtar, 2017). Rognkjeksens endotel i b.a kan minne om det endotelet som finnes i atrium (som nevnt i avsnitt over). Samtidig minner de også om epitelcellene som finnes i svømmeblære. Rognkjeks har ingen svømmeblære, men hos laks ligger et lag med kubiske epitelceller mot lumen i svømmeblæren, og har som funksjon å skulle bidra til at vevet kan utvides ettersom organet fylles med luft (Kryvi et al., 2016). Det kan være grunn til å tro at det er liknende epitelceller som finnes i endotel i b.a, en type overgangsepitel,

da funksjonen med utvidelse og sammentrekning av vevsstrukturen er essensiell også i dette organet.

Blodsirkulasjon til hjertemuskulatur

Hensikten med den systematiske makroskjæringen av rognkjeksens ventrikkel var blant annet å eventuelt kunne oppdage koronararterier. Dette basert på at hos for eksempel laks ligger koronararteriene rundt ventrikkelen (Amin et al., 1991). Hos rognkjeks har koronararterier rundt ventrikkel ikke blitt observert på noen av snittene som ble undersøkt. Derfor kan det være grunn til å anta at oksygentilførselen til hjertemuskulatur hos rognkjeks skjer på en annen måte enn via koronararteriene. Hos noen fisk kan oksygentilførselen til hjertemuskelen være via blod i hjertets lumen fra det oksygenbindende proteinet myoglobin (Davie et al., 1991). Her kan det være grunn til å anta at rognkjeks kan få oksygentilførsel til hjertemuskulatur på samme måte.

4.1.4 Nyre

Undersøkelser av prøver fra nyre hos rognkjeks (n=29) viser at ekskretorisk vev i nyre består av funksjonelle enheter som glomeruli, tubuli og samlerør. Det ekskretoriske vevet er lokalisert i bakre del av nyre, fra den caudale enden frem mot hodenyre i cranial ende. Hodenyre hos rognkjeks består av hematopoietisk vev. I overgangen mellom hodenyre og baknyre finnes områder med både hematopoietisk og ekskretorisk vev. Hematopoietisk vev i hodenyre hos rognkjeks vil bli videre diskutert i kapittel 4.2.2.

Ekskretorisk vev og innhold i enkelte tubuli

Hos teleoster kan den ekskretoriske funksjonen til nyre ligge i baknyre, i hodenyre eller i hele nyren (Calderwood, 1891). Resultatene viser at hos rognkjeks er mesteparten av det ekskretoriske vevet konsentrert i bakre del av nyre, med små innslag av ekskretoriske bestanddeler i enkelte små områder i hodenyre. Det ekskretoriske vevet i nyre hos rognkjeks består av flere strukturer. Bowmans kapsel, et enlaget epitellag omslutter kapillærnøstet glomerulus (Kryvi et al., 2016). Arterioler med tilførende/fracførende blod ble observert i 1/29 prøver. Tubuli har kubisk epitel med runde kjerner. Det ble observert et uidentifisert eosinofilt innhold i enkelte tubuli i de fleste prøvene av nyre, i alle størrelser av fisk undersøkt. Dette kan skyldes flere ting. Tiden organet ligger for i formalin påvirker hvor mange av vevets celler som blir fiksert. Innhold i tubuli er likevel observert i prøver fra fisk der annet vev, som hadde ligget i samme formalinløsning over likt tidsrom, og var tilstrekkelig fiksert. Dette betyr at dette sannsynligvis ikke er årsak til innholdet i tubuli. Temperaturforskjeller mellom vann og

omgivelser ved prøveuttak kan føre til autolyse av vevet (Ferguson, 1989). Innholdet i tubuli kan skyldes epitelavstøtning som en følge av cellenedbrytning post mortem (George et al., 2016). Gjelleprøver fra ett uttak også hadde tegn på post mortem endringer (dette diskuteres videre i kapittel 4.3.2), noe som kan indikere at post mortem endringer som autolyse også kan være tilstede i andre i organer. For at det skulle være cellerester fra autolyse i nyre ville også epitelvevet være ødelagt og cellekjerner ville kunne observeres i innholdet. Tubuliepitelet i prøvene er intakt, og cellekjerner observeres ikke i innholdet i tubuli, og derfor er det lite sannsynlig at det er dette som er årsaken til innholdet. En annen årsak til grumsete innhold i tubuli kan være at dette er eksudat fra normalt døde celler andre steder i kroppen, eller urin som er i ferd med å solidifisere og dermed ikke nødvendigvis vaskes bort under preparering. Nyren skiller kontinuerlig ut avfallsstoffer fra blodet via urinen, og at det er dette vi ser i de histologiske snittene. Hos laks observeres dette innholdet også under diagnostiske undersøkelser, og er et normalfunn som ikke nødvendigvis skyldes patologi (Even Thoen pers. kom). Det er grunn til å tro at det grumsete innholdet i tubuli er normalt også hos rognkjeks, men årsaken til dette kan ikke fastslås her.

Hodenyre hos rognkjeks kan inneholde endokrint vev

I en av 29 nyrer undersøkt ble det funnet en gruppe celler i hodenyret som morfologisk var ulikt det hematopoietiske. Cellene i vevet var i en lysere farge (figur 25), og lå konsentrert i ett spesielt område helt i enden av hodenyren. Cellene likner endokrine celler funnet i mange andre fiskearter som for eksempel torsk og laks. Ved nærmere forstørrelse kunne man skille mellom to (om mulig også flere) ulike celletyper (blå og gul pil, figur 25). De gule pilene viser celler med en kornete lys cytoplasma med en svakt farget cellekerne. Blå piler viste celler som var mindre i størrelse, sammenliknet med de indikert med gul pil, med en tydeligere avgrenset basofil cellekerne og lillafarget granulært cytoplasma. Disse cellene likner endokrint vev i hodenyre hos torsk (Amin et al., 2012), og det er ikke uvanlig at endokrint vev finnes i hodenyre hos flere fiskearter (Kryvi et al., 2016). Hos torsk har interrenale celler lyst eosinofilt kornet cytoplasma. Kromaffine celler er større enn interrenale celler og har et lysere cytoplasma med ovale irregulært avgrensede cellekjerner. Likevel er det usikkerhet i histologiske undersøkelser av dette vevet, da disse cellene kan endre form som følge av den fysiologiske statusen til fisken (Amin et al., 2012), noe som skyldes at de produserer og skiller ut hormoner. De kromaffine cellene er homolog med binyremargen hos pattedyr og produserer adrenalin og noradrenalin, og interrenalt vev er homolog med binyrebarken til pattedyr og produserer kortisol (Kryvi et al., 2016). Hormonene er alle assosiert med stressreaksjoner, noe som betyr at dersom denne

fisken har vært utsatt for stressende situasjoner kan cellenes form avvike fra normalen. En mulig metode for å jobbe videre med disse cellene i hodenyre hos rognkjeks, kan være å farge med Masson-Trikrom (Amin et al., 2012), en metode opprinnelig benyttet for farging av bindevev, fra Masson i 1929 (Suvarna et al., 2019). Metoden vil farge de interrenale cellene lavendelblå, med purpurrøde cellekjerner, og kromaffine celler vil bli farget svakt basofilt eller forbli fargeløse (Amin et al., 1991).

4.1.5 Milt

Undersøkelsene av miltprøver fra rognkjeks (n=8) viser at milten består av flere celletyper. Miltens struktur og oppbygning sees best i miltprøver fra rognkjeks hvor formalin ble sprøytet inn i hjerte og videre inn i blodkar før organuttaket (kapittel 2.3.1). Blodceller i milt vil bli diskutert i kapittel 4.2.2.

Hos fisk er milten omsluttet av en fibrøs kapsel (Mokhtar, 2017). Av de analyserte miltprøver fra rognkjeks sees denne kapselen som fremtredende og tykkvegget. Milt består av to forskjellige vevstyper, rød pulpa som produserer erytrocytter og hvit pulpa som produserer leukocyter. Et nettverk av retikulære celler kan danne et bindevevsnettverk mellom den røde og hvite pulpa (Kryvi et al., 2016). Fra resultater av milt hos rognkjeks sees et nettverk av svakere fargede celler blant røde blodceller og det mørkere fargede omkringliggende vevet. Prøver som var farget med MGG viser eosinofilt fargede røde blodceller ligge organisert samlet blant basofile (blåfargede) celler. Her sees også svakt fargede eosinofile granulære celler i det lyse interstitielle vevet. En mulig teori er at de forskjellige lagene er rød pulpa (områder med røde blodceller og basofile celletyper) og hvit pulpa (svakt eosinofile celler som ligger interstitielt). For fremtidig forskning hadde det vært interessant å farge histologiske snitt fra milt fra rognkjeks med en trikrom-basert farge, som kan farge bindevev, for å undersøke om det interstitielle vevet er et bindevevsnettverk eller leukocyttproduserende vev (hvit pulpa).

I det interstitielle vevet sees sirkulære strukturer, ofte med innhold av røde blodceller. Det er observert to forskjellige slike sirkulære strukturer, en med en tynn kapsel og en annen type med større celler med runde basofilt fargede cellekjerner og et mer synlig cytoplasma. På en side kan disse være de samme strukturene, snittet i forskjellig plan. På en annen side er samtidig disse større celletypene mer organisert med flere celler rundt. Hos mollyfisk (*Poecilia sphenops*) ligger ellipsoidene i milt organisert på den sistnevnte måten (Mokhtar, 2017), noe som kan være svaret på disse sirkulære strukturene hos rognkjeks også.

4.1.6 Pankreas

Av undersøkelser av pankreasprøver (n=26) fra rognkjeks viser resultatene at av eksokrine pankreasceller er det ikke noen tydelige morfologiske forskjeller hos rognkjeks sammenliknet med laks og torsk. I endokrint pankreasvev observeres noen forskjeller mellom artene og mellom de ulike størrelsene av rognkjeks.

Den endokrine pankreas (Langerhanske øyer) hos rognkjeks har større likhetstrekk med torsk sammenliknet med laks. Endokrine celler ligger samlet i runde til ovale strukturer, og særlig hos rognkjeksyngel (<5g) sees store ovale områder med endokrin pankreas, hvor områdene er større i forhold til omkringliggende vev sammenliknet med voksen rognkjeks. Dette likner også hvordan endokrin pankreas ligger organisert hos torsk (Amin et al., 2012). Hos laks er områdene med endokrine celler av mindre størrelse enn hos rognkjeks og torsk, og cellene i Langerhanske øyer har hos laks en mer oval form med et mer kornete cytoplasma (Amin et al., 1991). Langerhanske øyer består av α -, β - og δ -celler, men disse har ved prøver brukt i denne oppgaven vært vanskelig å skille fra hverandre.

Uttak av pankreasvev fra rognkjeks viser at andelen pankreasvev er høyere ved basis av pylorusblindsekkene enn ved distale deler. Inkludering av fettvev rundt milt ved prøveuttak resulterer også i at en stor andel pankreasvev blir med. For å sikre at pankreasvev er inkludert i fettvevet i uttaksprøvene kan man enten ta prøven ved basis av pylorusblindsekkene, eller ta ut rikelig med fettvev rundt og i tillegg til milt.

4.1.7 Lever

Histologisk domineres levermorfologien hos rognkjeks av tallrike vakuoler. Dette var gjennomgående i alle analyserte leverprøver (n=32) i denne oppgaven. Makroskopisk er det i tillegg observert at fargen på lever varierer mellom individer.

Lagring av fett i lever gir forandringer i farge og histologisk utseende

Noen fiskearter lagrer fett i lever. Dette kan gjøre fargen på lever mer gulaktig (Bruslè et al., 1996). Ved preparering av et histologisk snitt kan innholdet i fettceller vaskes ut som følge av behandling med kjemikalier (Weather et al., 1987). Torsk er et eksempel på en fiskeart som lagrer fett i lever. Ved sammenlikning av histologiske bilder av torskelever med rognkjekslever er de like, med flere tomme vakuoler innimellom leverceller (hepatocytter). Det er grunn til å

tro at rognkjeks lagrer fett i lever, og at dette er en av grunnene til den store fargevariasjonen makroskopisk og vakuoledannelsen mikroskopisk.

Hepatocyttenes størrelse kan variere mellom fiskearter, og som følge av fiskens energilager av glykogen og/eller fett (Bruslè et al., 1996). Hos arter som lagrer mye fett i lever kan hepatocytterne være opptil 100µm, og kjernen være perifert plassert ut mot cellemembranen på grunn av store fett-vesikler inne i cellenes cytoplasma (Kryvi et al., 2016). I de undersøkte prøvene av rognkjekslever er hepatocytterne små i størrelse (<20µm) og har en liten sentralt plassert rund cellekjerne. Hepatocyttenes utseende i rognkjeks sees ikke å være påvirket av fett-vakuolene som ligger rundt i like stor grad som i lever hos andre arter beskrevet i litteraturen. Hos rognkjeksyngel sees også hepatocytter med to, eller flere, runde sentrale cellekjerne. Årsaken til dette kan være mitose. Yngelen er i vekstfase, og hepatocytterne gjennomgår celledeling for å øke størrelsen på organet.

4.2 Spesialfarginger gir påvisninger av ønsket type celler og vev

4.2.1 Distribusjon av AB-PAS-positive slimceller hud, gjeller og pylorusblindsekker

I dette forsøket er det påvist AB-positive (blåfargede, pH<7) og PAS-positive (lillafargede, pH=7) slimceller i flere organer. I hud var det en liten forekomst av få enkeltvis plasserte lillafargede slimceller, i gjeller fantes tallrike blåfargede og litt færre tallrike lillafargede slimceller, og i pylorusblindsekker tallrike lilla-fargede slimceller. Slimceller hos fisk har flere sentrale funksjoner. Slimlaget beskytter mot mekaniske skader forårsaket av ytre faktorer (Kryvi et al., 2016). Ytre slimceller, som i hud og gjeller, kan spille en rolle i stimdannelse, synkronisering av kjønnsmodning og alarmsignaler mellom individer i en gruppe. De kan videre produsere bioaktive molekyler som beskyttelse mot patogene mikroorganismer (Reverter et al., 2018). Indre slimceller finnes blant annet i tarm, og bidrar til fordøyelsesprosessen.

Hud

Slimcellene i hud er en del av en ytre forsvarsbarriere. I de undersøkte prøvene sees få, enkeltvis lillafargede slimceller i epidermis hos rognkjeks. Patel et. al viste i 2017 at det finnes flere antimikrobielle proteiner i epidermal slimproduksjon hos rognkjeks, som er antatt å være en del

av fiskens immunforsvar (Patel et al., 2017). Dette er ikke unikt for rognkjeks, da det i slimproduksjonen hos andre fiskearter også produseres antimikrobielle proteiner og peptider (Reverter et al., 2018). Blant annet er antimikrobielle proteiner og peptider i slimceller i huden påvist også hos torsk (Bergsson et al., 2005). Mengde og morfologi vedrørende slimceller kan dermed gi en indikasjon på fiskens fysiologiske og immunologiske status.

Gjeller

I likhet med slimcellene i huden er også slimcellene i gjeller en del av en ytre forsvarsbarriere da de også er eksponert for omgivelsene. I gjeller hos rognkjeks viser resultatene tallrike blåfargede og lillafargede slimceller, hvor de blåfargede slimcellene øker i antall distalt i filamentet og i lamellene. En mulig årsak til økningen i antall kan være at behovet for beskyttelse er størst distalt ytterst i organet mot omgivelsene. pH i sjøvann ligger også mellom 7-8, noe som kan bidra til å forklare at behovet for sure (pH<7) slimceller som forsvarsmekanisme er størst, for å kunne beskytte mot eventuelle mikroorganismer som trives i sjøvannets pH.

Pylorusblindsekker

Slimceller i pylorusblindsekker er en del av en indre barriere. Hos rognkjeks er lillafargede slimceller i pylorusblindsekker mest tallrik, og enkelte blåfargede slimceller ligger innimellom. De fleste mikroorganismer som eventuelt kommer inn via mat vil mest sannsynlig ikke overleve den lave pH-en i magesyren. Mageinnholdet nøytraliseres i tarmen (Clements et al., 2006), noe som kan være forklaringen på forekomsten av nøytrale slimceller i pylorusblindsekker. Slimceller i tarm vil også ha en mekanisk betydning for å få mageinnholdet til å bevege seg og lettere gli gjennom tarmen.

4.2.2 Leukocytter i hodenyre og milt

I prøver fra hodenyre og milt fra rognkjeks (132g, 125g) er det observert celler med eosinofilt farget cytoplasma med innhold av granula, og en rund apikalt plassert basofil cellekjerne. De røde blodcellene har en klarere eosinofil farge på cytoplasma og en mindre sentralt plassert oval basofil cellekjerne, noe som gjør at celletypene skiller seg fra hverandre. Hos fisk er hodenyre og milt bloddannende vev. Det kan være grunn til å tro at cellene med granula i cytoplasma er eosinofile granulære celler (EGC) (Haugland et al. (2017), Reite et al. (2006) Kryvi et al. (2016)). Cellene er en type hvite blodceller, som ofte sees i sammenheng med

parasittinfeksjoner (Reite et al., 2006). Ved AGD hos rognkjeks sees en økt forekomst av denne celletypen i gjeller (Haugland et al., 2017), hvor cellene har likt utseende som de som er observert i friskt vev fra hodenyre og milt hos rognkjeks.

EGC er en type hvite blodceller med granulært innhold i cytoplasma (granulocytter) (Evensen, 2018). I prøver fra hodenyre og milt farget med MGG skiller disse cellene seg ut fra omkringliggende vev. Siden hematopoietisk vev er bloddannende vev er det naturlig at leukocytter finnes her. Hos rognkjeks er de også observert i andre organer som gjeller, hjerte og lever i diagnostiske undersøkelser (E. Thoen, pers. kom). At de er tallrike i friskt hematopoietisk vev, særlig i hodenyre, kan gi en indikasjon på at rognkjeks kontinuerlig produserer disse hvite blodcellene som et beredskap for eventuelle fremtidige infeksjoner, og at EGCs hos rognkjeks er involvert i ulike immunreaksjoner ved infeksjoner. Det må tas høyde for at markerte celler (i kapittel 3.2.2) ikke nødvendigvis er EGCs, men at de for eksempel kan være umodne røde blodceller (Witeska (2013) Rønneseth et al. (2015)). Det kan være en utfordring å skille ut enkeltceller i et så cellerikt vev som hematopoietisk vev, og blodutstryk bør derfor brukes i tillegg som sammenlikning ved fremtidig forskning på EGCs/hvite blodceller hos rognkjeks.

4.3 Valg av metode har betydning for kvaliteten til et histologisk snitt

4.3.1 Ulike protokoller for farging med HE gir fargevariasjoner

I de ulike HE-protokollene var det flere forskjellige variabler mellom gruppene. Tid i fargeløsning, kjemikalier og antall kjemikalier brukt er de mest sentrale forskjellene. I figur 45 og 46 vises en forskjell i farge i henholdsvis pankreas og hodenyre mellom HE-protokollene 1 og 3. Figur 45.1 og 46.1 er begge farget med HE-protokoll 1, og viser en rødere farge sammenliknet med prøver farget med HE-protokoll 3 i Figur 45,2 og 46,2. HE-protokoll 3 inneholder et steg med blåning og saltsyre, noe som protokoll 1 ikke gjør. Alum-basert hematoxylin vil originalt farge cellekjerner i en rød farge, men ved tilsetning av blåning vil cellekjernene få den karakteristiske blå-svarte fargen. Blåning innebærer å tilsette et alkalisk stoff til fargeprosedyren (Suvana et al., 2019). I protokoll 3 er ammoniakk (NH_3) benyttet i blåningsløsning (vedlegg II). Pankreasvevet vises kun i nyanser av rød i Figur 45.1, og samme trend sees på hematopoietisk vev i Figur 46.1. Figurene 45.2 og 46.2 er begge farget med prosedyre som inneholder behandling både med blåning og saltsyre. Det kan derfor være grunn til å tro at nyanseforskjellene i celler sett i Figur 45.2 og 46.2 er et resultat av ammoniakkens

effekt til å trekke rødfargen ut av cellekjernene for å erstatte de med en blå/svart farge, og saltsyrens effekt på differensiering av fargeopptak mellom ulike cellekomponenter. For å farge vev som har innhold av blodceller vil det da være hensiktsmessig å inkludere steg med blåning og saltsyre.

4.3.2 Viktigheten med riktig praksis for uttak for bevaring av vev

Figur 47.1 viser gjeller med endret histologisk vevsstruktur. Her sees artefakter som lifting av epitel i lameller, og lifting av celler i filamenter fra bruskvev. Når døden inntreffer hos fisk som følge av avlivning før prøveuttak, blir vevets temperatur varmere som følge av den varmere omgivelsestemperaturen på land sammenliknet med vanntemperaturen den kommer fra (Ferguson, 1989). En økning i omgivelsestemperatur vil fremskynde autolytiske prosesser. Autolyse inntreffer når en organisme dør, og vevet ikke får tilførsel av oksygenrikt blod. Celler går da i oppløsning som følge av nedbrytning av dens egne enzymer (Iversen, 2018). I organer fra fisk er gjeller, tarm, lever og nyre sensitive for post mortem artefakter som et resultat av autolyse (George et al., 2016). Dette gjelder særlig for gjeller, hvor opphovning av lameller og lifting kan inntreffe kun få minutter etter avlivning (Ferguson, 1989).

Det kan være grunn til å tro at det er autolyse som forårsaker artefaktene sett i figur 47.1. Her sees cellulære ødemer, lite opptak av farge, intracellulær vakuolisering, alle tre faktorer som er med på å karakterisere autolytiske prosesser (George et al., 2016). Av andre organer fra samme fisk i samme prøveuttak sees moderate endringer i nyrevev, med vakuolisering i cytoplasma i epitelceller i tubuli. I pylorusblindsekker og lever sees ingen signifikante endringer, men lever hos rognkjeks kan være et vanskelig organ å definere autolytiske artefakter i da den allerede er svært vakuolerik. Mange endringer i figur 47.1 stemmer overens med autolytiske prosesser som inntreffer ved død. Samtidig sees ikke like store endringer i de andre av de mest sårbare organene. Gjeller er som nevnt det organet som er mest sensitivt for artefakter som følge av autolyse post mortem. Det kan være at den autolytiske prosessen da er i en startfase, og derfor ikke observeres i like stor grad i andre organer. I diagnostikk brukes gjeller og tarm ofte som indikatororganer ved tvilstilfeller for å verifisere om endringer skyldes autolyse av vev eller patologi. Ved fravær av autolytiske artefakter i gjeller og tarm kan det tenkes at endringer i vevsstruktur er patologisk betinget (E. Thoen pers. kom). For å hindre autolyse av vev, særlig gjeller, bør organuttaket skje rett etter avlivning. Fisken bør derfor avlives én og én. I dette prøveuttaket ble flere fisk avlivet samtidig, noe som kan være årsaken til post mortem artefakter

observert i gjellene, og til dels i nyre. For å bremse autolytiske prosesser bør dessuten fisk som eventuelt ikke kan tas prøver av umiddelbart oppbevares kjølig ved transport eller forsendelse.

4.3.3 Syrebehandling gir mindre skade på gjellevev sammenliknet med endringer post mortem

I figur 47.1 sees gjellevev med post mortem autolytiske forandringer. Forandringene er omfattende sammenliknet med normalt gjellevev som sees i figur 47.2. I gjellevevet som gikk gjennom behandling i maursyre, ved ulike tidsintervall, sees endringer først etter 36t, og etter 72t sees små endringer som lifting av epitel i enkeltområder. Forandringene i gjellevevet etter behandling av syre i 72t kan derfor sies å være av mindre grad enn forandringene forårsaket av autolyse. Dette betyr at på den ene siden er gjellevevet tolerant for behandling med svak syre, som maursyre i dette tilfellet, men er på en annen side er det svært sårbart for endringer ved prøveuttak post mortem.

Det ble observert en merkbar forskjell mellom syrebehandlet og ikke syrebehandlet vev ved snitting av blokker med mikrotom. Det tok lengre tid for knivbladet i mikrotomen å bli sløv ved snitting av gjelleprøver som hadde gjennomgått syrebehandling, og flere blokker kunne snittes før bytting av knivblad, sammenliknet med gjelleprøver som ikke hadde gjennomgått syrebehandling. Likevel ble optimale histologisnitt produsert fra gjelleprøver som ikke var syrebehandlet, men slitasjen på knivbladet var da større. Rognkjeks har som kjent pigger i huden som dekker kroppsoverflaten, og disse inneholder beinstrukturer. Ved snitting av hudprøver ble det en merkbar slitasje på knivblad, større enn ved snitting av de normale gjelleprøvene. Dersom dekalsifiseringsforsøket skulle blitt gjennomført på nytt hadde hudprøver vært mer relevant enn gjelleprøver. Nødvendigheten av å dekalsifisere gjelleprøver før snitting i mikrotom kan derfor sies å være lav, men kan av og til være relevant for hudprøver av rognkjeks.

4.3.4 Formalininsprøytning i hjertet ga bedre histologisk vevstruktur i enkelte organer

Ved ett prøveuttak ble det i denne oppgaven sprøytet formalin inn i rognkjeksens hjerte i tidsrommet rett etter avlivning og før organuttak. Fra dette uttaket sees særlig strukturer i nyre og milt bedre sammenliknet med prøveuttak der det ikke ble gjort. Blodkar i organene er observert som mer åpne, har en tydeligere struktur og blir lettere å gjenkjenne. I miltprøver fra

uttak der dette ikke ble gjort sees ofte en ansamling av celler, særlig røde blodceller, og det var vanskelig å gjenkjenne en struktur i organet. Miltprøver tatt ut etter formalininnspøyting i hjertet muliggjorde å se en struktur i vevet (figur 29 og 42). Det var i tillegg mindre blod i hjertet, noe som gjorde det lettere å kjenne igjen vevstrukturene.

4.4 Oppsummering av vevsforskjeller mellom rognkjeks og laks

De mest sentrale histologiske forskjellene mellom rognkjeks og laks finnes i hud, gjeller, hjerte og lever. Rognkjeks har likhetstrekk med torsk i vev fra hud og lever. Huden til rognkjeks mangler skjell. Hos laks ligger skjellene plassert i skjellommer i dermis, og kan sees i histologiske snitt. En annen forskjell mellom huden til rognkjeks og laks er at i rognkjeks ligger tallrike vakuoler i epidermis, noe som ikke er observert hos laks. Hos torsk ligger sacciforme celler i epidermis (Amin et al., 2012), som i form og størrelse kan minne om vakuolene i huden hos rognkjeks. Hos torsk derimot, sees granulært innhold i de sacciforme cellene i epidermis, noe som ikke er observert hos rognkjeks. I gjelleprøvene i denne oppgaven er det ikke observert lymfoid vev i de undersøkte prøvene, noe som finnes hos laks og flere andre fiskearter (Dalum et al., 2016). I laks finnes også et kompakt muskellag i ventrikkelen (Amin et al., 1991). Laks er en aktiv svømmer og trenger derfor kraftige kontraksjoner fra hjertemuskelen for å frakte blodet rundt i kroppen. Dette kan være med på å forklare hvorfor rognkjeks ikke har dette kompakte muskellaget, da den ikke har et like aktivt levevis som laksen og dermed ikke har behov for like kraftige kontraksjoner av ventrikkelen. Atrium hos rognkjeks har tilstedeværelse av høye endokardiale celler. Dette finnes hos torsk, og har fått navnet «scavenger-celler», men finnes ikke hos laks. Rognkjekslever kjennetegnes av tallrike vakuoler, som mulig er fettceller. Disse er ikke å observere i lakselever. I diagnostikken sees ofte rognkjekslever med få vakuoler, grunnet at fisken har et redusert næringsopptak som skyldes sykdom. Denne syke leveren kan ofte forveksles med en lakselever, nettopp på grunn av at ved fravær av vakuoler i rognkjekslever har den større likheter med en lakselever (E. Thoen pers. kom). Torsk har en fettholdig lever, og normal rognkjekslever fra frisk fisk har med dette større likheter med torsk enn med laks.

4.5 Forslag til videre forskning

Som diskutert tidligere i dette kapittelet kommer her, på grunnlag av observasjoner gjort i dette forsøket, noen forslag til videre forskning på rognkjeks.

Tallrike vakuoler i epidermis

Som diskutert i kapittel 4.1.1 råder det usikkerhet i litteraturen om årsak og funksjon av tallrike vakuoler i epidermis hos rognkjeks. Det kan være celler der innholdet har blitt vasket ut gjennom prepareringen til et histologisk snitt, eller det kan være hulrom uten innhold. Mer forskning kreves på dette området for å kunne mer konkret si hva disse vakuolene er og hvilken funksjon de har. Siden for eksempel fett kan vaskes ut som følge av kjemikaliebehandling i snittpreparering (Weather et al., 1987), kunne det vært en mulighet å begrense antall kjemikalier ved for eksempel å fryse vevsprøver istedenfor å bruke formalin til fiksering. De histologiske snittene kan farges med sudansvart. Dette er en fargemetode som blir brukt for å farge fett, og vil farge fettcellene i en blåsvart farge (Suvarna et al., 2019).

Endokardale celler i atrium

Som nevnt i kapittel 4.3.1 ble det i dette forsøket ikke tid til å undersøke de endokardiale cellene i atrium hos rognkjeks nærmere. Dersom det hadde vært tid til dette, hadde det vært aktuelt å bruke samme fremgangsmåte som gjort i forsøk med torsk (Sørensen et al., 1998). I forsøket til Sørensen et al i 1998 ble det injisert fluoriserende makromolekyler i torsken. Disse makromolekylene ble tatt opp av de endokardiale cellene ved endocytose. Å gjennomføre et liknende forsøk rognkjeks ville vært spennende og relativt enkelt å gjøre. Dette ville eventuelt påvise om de høye endokardiale cellene i atriet hos rognkjeks hadde samme funksjon som de endokardiale hos torsk. I et arbeide av Seternes et al i 2002 ble denne type celler funnet i flere dyregrupper som fugl, amfibier, krypdyr, pattedyr og fisk. Cellene ble gitt navnet scavenger-endotel, på norsk åtselater-celler, da cellene tok opp mange typer makromolekylært avfall fra sirkulasjonen fra disse dyrene.

Påvisning av endokrint vev i hodenyre

I kapittel 4.1.4 ble det diskutert om det uidentifiserte vevet i hodenyre hos rognkjeks kunne være endokrint vev i form av kromaffine og interrenale celler. For å eventuelt påvise disse cellene kan det i videre forskning forsøkes å farge med en bindevevsfarging, Masson-Trikrom (Amin et al., 2012), hvor en eventuell tilstedeværelse av interrenale celler vil farges lavendelblå med purpurrøde cellekjerner, og kromaffine celler vil bli farget svakt basofilt eller forbli fargeløse (Amin et al., 1991).

Påvisning av reticulære celler / hvit pulpa i milt

For å kunne undersøke om det interstitielle vevet i milt hos rognkjeks, som diskutert i kapittel 4.1.5, er retikulære bindevevsceller eller hvit pulpa, kunne det vært en mulighet å farge histologiske snitt med en trikrom-basert farge. Fargemetoden vil farge bindevev, og en eventuell fargeendring vil sees dersom vevet er sammensatt av bindevevsceller.

EGCs i hodenyre og milt

For å være mer sikker på at de utvalgte cellene, som diskutert i kapittel 4.2.2, er EGCs eller andre leukocytter hadde det vært en mulighet å utføre et blodutstryk for sammenlikning. Blodutstryket kan farges med MGG, som er en standard fargemetode innen hematologi (Piaton et al., 2016), og ville kunne påvise enkeltceller av leukocytter og hvordan de ser ut hos rognkjeks.

Formalininnsprøytning i hjertet ved prøveuttak

Formalininnsprøytning i hjertet er ment mer som et generelt tips fremfor konkret videre forskning, men denne teknikken kan være fin å benytte seg av i forskningssammenheng. Etter avlivning av fisken ble formalin sprøytet inn i hjertet hos enkelte forsøksfisk, noe som hadde god effekt i prøver fra milt og hodenyre brukt i denne oppgaven.

5 Konklusjoner

- Kartlegging av normalhistologi hos rognkjeks fra <5g (yngel) størrelse og opp til 140 gram ble utført. Det ble lagd histologiske snitt av organene hud, gjeller, hjerte, nyre, milt, pankreas og lever i HE-farging. Snittene ble dokumentert gjennom bilder og scannede filer, og egner seg til et større oppslagsverk på normalhistologi hos rognkjeks.
 - Hud til rognkjeks er bygd opp av epidermis og dermis. Epidermis inneholder vakuoler som varierer i antall og størrelser.
 - Gjeller hos rognkjeks består av de funksjonelle enhetene filamenter og lameller.
 - Ventrikkel i hjertet hos rognkjeks mangler et kompakt muskellag mellom epikard og myokard. Histologiske snitt av ventrikkel fra rognkjeks viser ingen funn av koronararterier, som er vanlig å finne hos enkelte andre fiskearter som for eksempel laks.
 - Nyren hos rognkjeks er todelt. Hodenyre består av hematopoetisk vev og baknyre består av ekskretorisk vev. Det ble funnet celler som likner endokrine celler i hodenyre. Spesialfarging viste at hodenyre inneholdt høy andel eosinofile granulære celler (EGC).
 - Milt hos rognkjeks er bygd opp av en tykk bindevevsrik kapsel. Rød og hvit pulpa var vanskelig å skille fra hverandre.
 - Pankreas hos rognkjeks består av eksokrin og endokrin del. Utførselsganger kunne også sees.
 - Histologiske snitt av lever hos rognkjeks viser at vevet er dominert av tallrike vakuoler. Hepatocytter ligger innimellom, og er ikke like tallrike som vakuolene. Da mange fiskearter, som for eksempel torsk, lagrer fett i lever, er det grunn til å tro at rognkjeks lagrer fett i lever, og at vakuolene i lever er fettceller.

- Farging med AB-PAS på hudprøver fra rognkjeks farger slimceller i rognkjeksens epidermis. Vakuolene tar ikke til seg farge, og er ikke slimceller. Videre forskning kreves for å kunne fortelle noe om de har innhold og eventuelt hvilke celler de er.
- For å hindre autolytiske artefakter bør organuttak skje umiddelbart etter avlivning av fisken. Dette gjelder særlig gjeller. Gjeller er mer sårbare for endringer post mortem enn behandling med maursyre (10%). Det er ikke nødvendig å dekalisifisere gjeller, men dekalisifisering kan være aktuelt for prøver fra rognkjekshud.
- Scanning som metode for å undersøke histologiske snitt gir en god oversikt over hele organet og gir samtidig detaljer på cellenivå. Dette krever at man har et utgangspunkt i en vevsprøve som er tilstrekkelig fiksert, og at det histologiske snittet er snittet tynt nok og tilstrekkelig farget.

Referanser

- Alarcón, M., Thoen, E., Poppe, T. T., Bornø, G., Mohammad, S. N., & Hansen, H. (2016). Co-infection of *Nucleospora cyclopteri* (Microsporidia) and *Kudoa islandica* (Myxozoa) in farmed lumpfish, *Cyclopterus lumpus* L., in Norway: a case report. *Journal of Fish Diseases*, 39(4), 411-418. doi:doi:10.1111/jfd.12372
- Amin, A. B., Mortensen, L., & Poppe, T. (1991). *Histologisk Atlas, Normalstruktur hos laksefisk*. Bodø: Akvapatologisk laboratorium AS.
- Amin, A. B., Ottesen, O. H., & Zhuravleva, N. (2012). *Histology of Atlantic Cod, A color atlas*. Bodø: Universitetet i Nordland (Nord universitet), Licentia Forlag.
- Barentswatch. (2019). Fiskedødelighet og tap i produksjonen. Retrieved 15.04.2019, from Nofima, SINTEF Ocean og BarentsWatch
<https://www.barentswatch.no/havbruk/fiskedodelighet-og-tap-i-produksjonen>
- Bergsson, G., Agerberth, B., Jörnvall, H., & Gudmundsson, G. H. (2005). Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *The FEBS journal*, 272(19), 4960-4969.
- Bjørndal, Å. (1991). Wrasse as cleaner-fish for farmed salmon. *Progress in Underwater Science*, 16, 17-28.
- Bornø, G., Alarcón, M., Linaker, M., Colquhoun, D., Nilsen, H., Gu, J., Gjerset, B., Hansen, H., Thoen, E., & Gulla, S. (2016). Akutt dødelighet hos rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) i 2015. *Veterinærinstituttets rapportserie. Veterinærinstituttet (The Norwegian Veterinary Institute), Oslo*.
- Breck, O. (2015). *An update from Norway*. Cleanerfish Workshop. Scottish Salmon Producers Organization. Inverness.
- Bruno, D. W., Noguera, P. A., & Poppe, T. T. (2013). Viral Haemorrhagic Septicemia. In *A Colour Atlas of Salmonid Diseases* (Vol. Second Edition, pp. 60-62): Springer.
- Bruslè, J., & Anadon, G. G. i. (1996). The Structure and Function of Fish Liver. In H. M. Dutta & J. S. Datta-Mushi (Eds.), *Fish Morphology* (pp. 77-93). USA: A.A Balkema Publishers.
- Calderwood, W. (1891). The Head Kidney of Teleostean Fishes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2(1), 43-46.
doi:10.1017/S0025315400049456
- Clements, K. D., & Raubenheimer, D. (2006). Feeding and Nutrition. In D. H. Evans & J. B. Claiborne (Eds.), *The Physiology of Fishes* (Vol. 3, pp. 47-81): Taylor & Francis Group.
- Culling, C. F. A., Allison, R. T., & Barr, W. T. (1985). *Cellular Pathology Technique* (4 ed.): Butterworth-Heinemann.
- Dalum, A. S., Griffiths, D. J., Valen, E. C., Amthor, K. S., Austbø, L., Koppang, E. O., Press, C. M., & Kvellestad, A. (2016). Morphological and functional development of the interbranchial lymphoid tissue (ILT) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Fish & Shellfish Immunology*, 58, 153-164.
- Davenport, J. (1985). Synopsis of Biological Data on the Lumpsucker, *Cyclopterus lumpus*, (Linnaeus, 1758). *FAO Fisheries Synopsis*, 147, 31 p. .
- Davenport, J., & Bradshaw, C. (1995). Observations on skin colour changes in juvenile lumpsuckers. *Journal of Fish Biology*, 47(1), 143-154.
- Davenport, J., & Kjørsvik, E. (1986). Buoyancy in the Lumpsucker *Cyclopterus Lumpus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66(1), 159-174.
doi:10.1017/S0025315400039722

- Davenport, J., Lønning, S., & Fogg, G. E. (1983). On the structure and function of the urogenital system of the female lump sucker *Cyclopterus lumpus* L. (Teleostei: Scorpaeniformes). *Proceedings of the Royal Society of London*, 218(1211), 201-210.
- Davenport, J., & Thorsteinsson, V. (1989). Observations on the colours of lumpsuckers, *Cyclopterus lumpus* L. *Journal of Fish Biology*, 35(6), 829-838. doi:10.1111/j.1095-8649.1989.tb03034.x
- Davie, P. S., & Farrell, A. P. (1991). The coronary and luminal circulations of the myocardium of fishes. *Canadian Journal of Zoology*, 69(7), 1993-2001. doi:10.1139/z91-278
- Denholm, I., Devine, G. J., Horsberg, T. E., Sevatdal, S., Fallang, A., Nolan, D. V., & Powell, R. (2002). Analysis and management of resistance to chemotherapeutants in salmon lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Pest Management Science*, 58(6), 528-536. doi:10.1002/ps.482
- Einarsdottir, T., Sigurdardottir, H., Bjornsdottir, T., & Einarsdottir, E. (2018). Moritella viscosa in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Fish Diseases*, 41(4). doi:10.1111/jfd.12884
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological Reviews*, 85(1), 97-177. doi:10.1152/physrev.00050.2003
- Evensen, S. A. (2018, 17.10.18). Hvite blodceller. Retrieved from https://sml.snl.no/hvite_blodceller
- Ferguson, H. W. (1989). *Systemic Pathology of Fish* (1 ed.). Ames, Iowa: Iowa State University Press.
- Fiskeridirektoratet. (2018). Statistikk for akvakultur 2017 - foreløpige tall. 49.
- Fiskeridirektoratet. (2019a). Biomassestatistikk etter produksjonsområde. In (21.03.2019 ed.): Fiskeridirektoratet.
- Fiskeridirektoratet. (2019b). Lønnsomhetsundersøkelse for laks- og regnbueørret. In (08.11.2018 ed.): Fiskeridirektoratet.
- Fiskeridirektoratet. (2019c). Rapportert utsett av rensefisk i merder med laks og regnbueørret fordelt på opprinnelse. In (21.01.2019 ed.).
- Fontaine, M. (1941). Recherches sur quelques pigments sériques et dermiques de poissons marins (Labridés et Cycloptéridés). *Bull. Inst. Oceanogr., Monaco*, 792, 1-5.
- Freeman, M. A., Kasper, J. M., & Kristmundsson, Á. (2013). *Nucleospora cyclopteri* n. sp., an intranuclear microsporidian infecting wild lumpfish, *Cyclopterus lumpus* L., in Icelandic waters. *Parasites & Vectors*, 6(1), 49. doi:10.1186/1756-3305-6-49
- George, J., Van Wettere, A. J., Michaels, B. B., Crain, D., & Lewbart, G. A. (2016). Histopathologic evaluation of postmortem autolytic changes in bluegill (*Lepomis macrochirus*) and crappie (*Pomoxis anularis*) at varied time intervals and storage temperatures. *PeerJ*, 4, e1943.
- Gismervik, K., Gåsnes, S. K., Nielsen, K. V., & Mejdell, C. M. (2019). Fiskevelferd. In B. Hjeltnes, B. B. Jensen, G. Bornø, A. Haukaas, & C. S. W. (red) (Eds.), *Fiskehelserapporten 2018* (Vol. 6a-2019, pp. 20-35): Veterinærinstituttet.
- Guðmundsdóttir, S., Vendramin, N., Cuenca, A., Sigurðardóttir, H., Kristmundsson, A., Iburg, T. M., & Olesen, N. J. (2019). Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) in Iceland caused by VHS virus genotype IV. *Journal of Fish Diseases*, 42(1), 47-62. doi:10.1111/jfd.12910
- Haugland, G. T., Olsen, A.-B., Rønneseth, A., & Andersenc, L. (2017). Lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) develop amoebic gill disease (AGD) after experimental

- challenge with *Paramoeba perurans* and can transfer amoebae to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 478, 48-55. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.04.001
- Havforskningsinstituttet. (2017). Rognkjeks/-kall. *Havforskningsrapporten 2017. Fisken og havet, særnr. 1-2017*.
- IHCWorld. (2011). Methods and Protocols for Decalcification of Bone Material. Retrieved from http://www.ihcworld.com/_protocols/histology/decalcification.htm
- Imsland, A., Reynolds, P., Eliassen, G., Hangstad, T. A., Nytrø, A. V., Fosse, A., Vikingstad, E., & Elvegård, T. A. (2015). Feeding preferences of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) maintained in open net-pens with Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 436, 47-51.
- Imsland, A., Reynolds, P., Eliassen, G., Mortensen, A., J.Hansen, Ø., Puvanendran, V., Hangstad, T. A., D.B.Jónsdóttir, Ó., Emaus, P.-A., Elvegård, T. A., C.A.Lemmens, S., Rydland, R., V.Nytrø, A., & Jonassen, T. M. (2016). Is cleaning behaviour in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) parentally controlled? *Aquaculture*, 459, 156-165. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.03.047
- Imsland, A. K., Reynolds, P., Eliassen, G., Hangstad, T. A., Foss, A., Vikingstad, E., & Elvegård, T. A. (2014). The use of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) to control sea lice (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer) infestations in intensively farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 424-425, 18-23. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.12.033
- Imsland, A. K. D., Hanssen, A., Nytrø, A., Reynolds, P., Jonassen, T., Hangstad, T. A., Elvegård, T. A., Urskog, T. C., & Mikalsen, B. (2018). It works! Lumpfish can significantly lower sea lice infestation in large-scale salmon farming. *Biology Open*, 7. doi:10.1242/bio.036301
- Ingólfsson, A., Kristjánsson, B., & A. Schaefer, S. (2002). Diet of Juvenile Lumpsucker *Cyclopterus lumpus* (*Cyclopteridae*) in Floating Seaweed: Effects of Ontogeny and Prey Availability. *Copeia*, 2002, 472-476. doi:10.1643/0045-8511(2002)002[0472:DOJLCL]2.0.CO;2
- Iversen, O. H. (2018, 20.04.2018). Autolyse. Retrieved from <https://sml.snl.no/autolyse>
- Jonassen, T., Pittman, K., Foss, A., & Remen, M. (2019). Stress hos rognkjeks etter transport og overføring til merd. *Norsk Fiskeoppdrett*, 2019/3, 50-57.
- Junquiera, L. C., Carneiro, J., & Kelley, R. O. (1995). *Basic Histology* (C. Langan Ed. 8 ed.). USA: Appelton & Kange, A Simon & Schuster Company.
- Karlsbakk, E., Alarcon, M., Hansen, H., & Nylund, A. (2014). Sykdom og parasitter i vill og oppdrettet rognkjeks [Diseases and parasites of lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*)]. *Fisken og Havet*, 37-39.
- Kelly, N. I., Alzaid, A., Nash, G. W., & Gamperl, A. K. (2014). Metabolic Depression in Cunner (*Tautoglabrus adspersus*) Is Influenced by Ontogeny, and Enhances Thermal Tolerance. *PLOS ONE*, 9(12), e114765. doi:10.1371/journal.pone.0114765
- Kennedy, J., Jónsson, S., Kasper, J. M., & Ólafsson, H. G. (2015). Movements of female lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) around Iceland. *ICES Journal of Marine Science*, 72(3), 880-889. doi:10.1093/icesjms/fsu170
- Kryvi, H., & Poppe, T. (2016). *Fiskeanatomi*: Fagbokforlaget.
- Kryvi, H., & Totland, G. K. (1997). *Fiskeanatomi* (Vol. 2). Bergen : Zoologisk institutt, avd. Zoologisk laboratorium, Universitetet i Bergen, 1994: Høyskoleforlaget.
- Marcos-López, M., Ruane, N. M., Scholz, F., Bolton-Warberg, M., Mitchell, S. O., Murphy O'Sullivan, S., Irwin Moore, A., & Rodger, H. D. (2017). *Piscirickettsia salmonis* infection in cultured lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Journal of Fish Diseases*, 40(11), 1625-1634. doi:10.1111/jfd.12630

- Mokhtar, D. M. (2017). *Fish Histology. From Cells to Organs* (1 ed.). Canada: Apple Academic Press Inc.
- Mudge, S. M., & Davenport, J. (1986). Serum pigmentation in *Cyclopterus lumpus* L. *Journal of Fish Biology*, 29(6), 737-745. doi:10.1111/j.1095-8649.1986.tb04989.x
- NewcomerSupply. (2014, 07.2015). Decalcifying Solution, Formic Acid 5%, Aqueous. Retrieved from <http://www.newcomersupply.com/product/decalcifying-solution-formic-acid-5-aqueous>
- Patel, D., & Brinchmann, M. (2017). Skin mucus proteins of lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*). *Biochemistry and Biophysics Reports.*, 9, 217-225. doi:10.1016/j.bbrep.2016.12.016
- Pedersen, O. A., & Langvad, F. (1989). *Exophiala psychrophila* sp. nov., a pathogenic species of the black yeasts isolated from farmed Atlantic salmon. *Mycological research*, 92(2), 153-156.
- Piaton, E., Fabre, M., Goubin-Versini, I., Bretz-Grenier, M.-F., Courtade-Saïdi, M., Vincent, S., Belleannée, G., Thivolet, F., Boutonnat, J., Debaque, H., Fleury-Feith, J., Vielh, P., Egelé, C., Bellocq, J.-P., Michiels, J.-F., & Cochand-Priollet, B. (2016). Guidelines for May-Grünwald–Giemsa staining in haematology and non-gynaecological cytopathology: recommendations of the French Society of Clinical Cytology (SFCC) and of the French Association for Quality Assurance in Anatomic and Cytologic Pathology (AFAQAP). *Cytopathology*, 27(5), 359-368. doi:10.1111/cyt.12323
- Powell, A., Treasurer, J. W., Pooley, C. L., Keay, A. J., Lloyd, R., Imsland, A. K., & Garcia de Leaniz, C. (2018). Use of lumpfish for sea-lice control in salmon farming: challenges and opportunities. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 683-702. doi:10.1111/raq.12194
- ProtocolsOnline. (2016). Paraffin Processing of Tissue. Retrieved from <https://www.protocolsonline.com/histology/sample-preparation/paraffin-processing-of-tissue/>
- Reite, O. B., & Evensen, Ø. (2006). Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 192-208. doi:10.1016/j.fsi.2005.01.012
- Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2018). Biological and ecological roles of external fish mucus: A review. *Fishes*, 3(4), 41.
- Rolls, G. (2018). An Introduction to Decalcification. Retrieved from <https://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/an-introduction-to-decalcification/>
- Rønneseth, A., Ghebretnsae, D. B., Wergeland, H. I., & Haugland, G. T. (2015). Functional characterization of IgM+ B cells and adaptive immunity in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Developmental & Comparative Immunology*, 52(2), 132-143. doi:10.1016/j.dci.2015.05.010
- Seternes, T., Sørensen, K., & Smedsrød, B. (2002). Scavenger endothelial cells of vertebrates: A nonperipheral leukocyte system for high-capacity elimination of waste macromolecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7594-7597. doi:10.1073/pnas.102173299
- Skoge, R. H., Brattespe, J., Økland, A. L., Plarre, H., & Nylund, A. (2018). New virus of the family Flaviviridae detected in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). *Archives of Virology*, 163(3), 679-685. doi:10.1007/s00705-017-3643-3
- Skoge, R. H., & Nylund, A. (2019). Virus hos rognkjeks - en trussel mot laks? *Norsk Fiskeoppdrett*, 03/2019, 44-48.
- Småge, S., Frisch, K., Brevik, Ø., Watanabe, K., & Nylund, A. (2016). First isolation, identification and characterisation of *Tenacibaculum maritimum* in Norway, isolated

- from diseased farmed sea lice cleaner fish *Cyclopterus lumpus* L. *Aquaculture*, 464, 178-184. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.06.030
- SSB. (2018, 25.10.18). Statistisk sentralbyrå, akvakultur. *Årlig, endelige tall*. Retrieved from <https://www.ssb.no/fiskeoppdrett>
- Suvarna, S. K., ayton, C., & Bancroft, J. D. (2019). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* (S. K. Suvarna, C. ayton, & J. D. Bancroft Eds. 8 ed.): Elsevier Limited.
- Sørensen, K. K., Melkko, J., & Smedsrød, B. (1998). Scavenger-receptor-mediated endocytosis in endocardial endothelial cells of Atlantic cod *Gadus morhua*. *Journal of Experimental Biology*, 201(11), 1707-1718.
- Veterinærinstituttet. (2018). Prøvetaking av fisk. Retrieved from <https://www.vetinst.no/provetaking-og-diagnostikk/hvordan-ta-ut-prover/provetaking-av-fisk>
- Veterinærinstituttet. (2019). Viral hemoragisk septikemi. Retrieved from <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/viral-hemoragisk-septikemi-vhs>
- Walde, C., Gulla, S., Hansen, H., Mjølnerød, E. B., & Bornø, G. (2019). Helsesituasjonen hos rensefisk. In B. Hjeltne, B. B. Jensen, G. Bornø, A. Haukaas, & C. S. W. (red) (Eds.), *Fiskehelserapporten 2018* (Vol. 6a-2019, pp. 119-125): Veterinærinstituttet.
- Weather, P. R., Burkitt, H. G., & Daniels, V. G. (1987). *Functional Histology: A text and colour atlas* (2 ed.). UK: Churchill Livingstone, Longman Group UK Limited.
- Witeska, M. (2013). Erythrocytes in teleost fishes: a review. *Zoology and Ecology*, 23(4), 275-281.

Vedlegg I - snittsamling

Her vises en oversikt over snittsamlingen benyttet i denne oppgaven. Forkortelser; VG: Van Gieson, ABP: AB-PAS, MGG: May-Grünwald/Giemsä. Over hvert snitt står det merket med forskjellige uttaksnummer, som indikerer forskjellige uttak, eller forskjellige prepareringer.

*Indikerer dobbelt antall HE-preparater. **Indikerer at fisken kom fra sjø.

Snitt	Størrelse	Dato, uttak	Sted	HE-protokoll	Spes.farge	Scan
18-17-59,3						
RK1	Yngel	31.01.2018	Vanylven	2		x
RK2	Yngel	31.01.2018	Vanylven	2		
RK3	Yngel	31.01.2018	Vanylven	2		x
RK4	Yngel	31.01.2018	Vanylven	2		
RK5	Yngel	31.01.2018	Vanylven	2		x
RK6	Yngel	31.01.2018	Vanylven	2		
RK7	Yngel	31.01.2018	Vanylven	2		x
RK8	Yngel	31.01.2018	Vanylven	2		
RK9	Yngel	31.01.2018	Vanylven	2		
RK10	Yngel	31.01.2018	Vanylven	2		
18-17-59,4						
RK1 kot 1,2	Yngel	31.01.2018	Vanylven	2		x
RK1 kot 3	Yngel	31.01.2018	Vanylven	2		
RK2 kot 1,2	Yngel	31.01.2018	Vanylven	2		
RK2 kot 3	Yngel	31.01.2018	Vanylven	2		x
RK3 kot 3	Yngel	31.01.2018	Vanylven	2		
17-17-1309						
RK1 H/M	<10g	04.12.2017	Vanylven	2		
RK1 S	<10g	04.12.2017	Vanylven	2		
RK1 R	<10g	04.12.2017	Vanylven	2		
RK1 H	<10g	04.12.2017	Vanylven	2		
RK1 P	<10g	04.12.2017	Vanylven	2		
RK2 G	<10g	04.12.2017	Vanylven	2		
RK2 C	<10g	04.12.2017	Vanylven	2		
RK2 H/P	<10g	04.12.2017	Vanylven	2		
RK2 R	<10g	04.12.2017	Vanylven	2		
RK2 H/M	<10g	04.12.2017	Vanylven	2		
18 4F 203						
RK1 C	75g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK1 G	75g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK1 R/S	75g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK1 H/P	75g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK1 H/M	75g	03.10.2018	Vanylven	2		

Vedlegg I – snittsamling

RK2 C	60g	03.10.2018	Vanylven	2	VG	x
RK2 G	60g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK2 R/S	60g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK2 H/P	60g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK3 C	75g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK3 G	75g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK3 R/S	75g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK3 H/P	75g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK4 C	80g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK4 G	80g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK4 R/S	80g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK4 H/P	80g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK5 C	50g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK5 G	50g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK5 R/S	50g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK5 H/P	50g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK5 H/M	50g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK13 C**	105g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK13 G**	105g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK13 H**	105g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK13 R/S**	105g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK14 G**	95g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK14 C**	95g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK14 H/P**	95g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK14 R/S**	95g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK14 H/M**	95g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK15 G**	95g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK15 C**	95g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK15 H/P**	95g	03.10.2018	Vanylven	2		
RK15 R/S**	95g	03.10.2018	Vanylven	2		
<i>UiTjan19*</i>						
RK 6 C	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 6 K/H	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 6 P/S	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 7 C	75g	03.10.2018	Vanylven	1, 3		
RK 7 K/H	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 7 P/S	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 7 H/M	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 8 C	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 8 K/H	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 8 P/S	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 8 H/M	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 9 C	80g	03.10.2018	Vanylven	1		

Vedlegg I – snittsamling

RK 9 K/H	80g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 9 P/S	80g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 10 C	65g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 10 K/H	65g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 10 P/S	65g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 10 H/M	65g	03.10.2018	Vanylven	1, 3		x
RK 11 C**	115g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 11 K/H**	115g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 11 P/S**	115g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 12 C**	100g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 12 K/H**	100g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 12 P/S**	100g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 12 H/M**	100g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK 1 K 1	132g	07.11.2018	Tromsø	1, 3	MGG	x
RK 1 K 2	132g	07.11.2018	Tromsø	1, 3	MGG	x
RK 1 K 3	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 1 K 4	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 1 K 5	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 1 K 6	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 1 K 7	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 1 K 8	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 1 K 9	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 1 K 10	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 2 K 11	125g	07.11.2018	Tromsø	1, 3	MGG	x
RK 2 K 12	125g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 2 K 13	125g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 2 K 14	125g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 2 K 15	125g	07.11.2018	Tromsø	1, 3	MGG	x
RK 2 K 16	125g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 1 C 1	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 4 C 2	90g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 4 C 3	90g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 4 C 4	90g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 1 G D1	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 1 G D2	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 1 G D3	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 1 G V1	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 1 G V2	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 1 G V3	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 4 G D4	90g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 4 G D5	90g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 4 G D6	90g	07.11.2018	Tromsø	1, 3	ABP	x
RK 4 G V4	90g	07.11.2018	Tromsø	1		

Vedlegg I – snittsamling

RK 4 G V5	90g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 4 G V6	90g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 1 H 1	132g	07.11.2018	Tromsø	1, 3		
RK 4 H 2	90g	07.11.2018	Tromsø	1, 3	VG	x
RK 4 H 3	90g	07.11.2018	Tromsø	1, 3		
RK 1 S 1	132g	07.11.2018	Tromsø	1, 3		
RK 2 S 2	125g	07.11.2018	Tromsø	1, 3	MGG	x
RK 3 P 1	117g	07.11.2018	Tromsø	1	VG, ABP	x
RK 4 P 2	90g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 3 H/M 1	117g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK 5 H/M 2	103g	07.11.2018	Tromsø	1	VG, ABP	x
G Kontr.12t	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
G Kontr.24t	132g	07.11.2018	Tromsø	1		x
G Kontr.36t	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
G Kontr.48t	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
G Kontr.60t	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
G Kontr.72t	132g	07.11.2018	Tromsø	1		
RK6 G 24t	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK6 G 36t	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK6 G 48t	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK7 G 24t	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK7 G 36t	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK7 G 48t	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK8 G 24t	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK8 G 36t	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK8 G 48t	75g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK9 G 24t	80g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK9 G 36t	80g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK9 G 48t	80g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK10 G 24t	65g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK10 G 36t	65g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK10 G 48t	65g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK11 G 24t	115g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK11 G 36t	115g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK11 G 48t	115g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK12 G 24t	100g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK12 G 36t	100g	03.10.2018	Vanylven	1		
RK12 G 48t	100g	03.10.2018	Vanylven	1		
Totalt						269

Vedlegg II - reagenser

Reagens	Konsentrasjon/innhold
Alcan Blue	1%AB + 100ml 3% eddiksyre.
Blåning	150ul NH ₃ + 450ml dH ₂ O
Etanol (VWR Chemicals)	70%, 96%, absolutt
Eosin G	10g til 1l dH ₂ O. Bruksløsning: tilsetter dH ₂ O i forholdet 1:4, og 10% eddiksyre i forholdet 1:200
Eosin Y (Merck)	0,5% (aq)
Eukitt (Sigma-Aldrich)	
Finquel vet. (Scan Aqua)	
Formalin	10%: bufret formaldehyd (4%) i PBS
³ Gills hematoxylin II	Hematoxylin: 4g Natriumjodat (NaIO ₃): 0,4g Aluminiumsulfat (Al ₂ (SO ₄) ₃): 35,2g dH ₂ O: 750ml Etylenglykol (CH ₂ OH) ₂ : 250ml Iseddiksyre (CH ₃ COO ₂ H) 20ml (Suvarna et al., 2019)
Giemsa-løsning	5%: 100% 200ul Giemsa + 4ml dH ₂ O
Histoclear (National Diagnostics)	
Maursyre (Merck)	10%: Maursyre (99%) fortynnet med milliQ-vann
May-Grünwald løsning (Sigma-aldrich)	Eosin-metylen blå løsning.

² Mayers hematoxylin	Hematoxylin: 2g dH ₂ O: 2000ml Aluminiumkaluimsulfat (KAl(SO ₄) ₂): 100g Natriumjodat (NaIO ₃): 0,2g Eddiksyre 10% (CH ₃ COOH): 10ml (Culling et al., 1985)
Metanol	
Paraffinvoks (Sigma-Aldrich)	
Perjodsyre	0,5%: 0,5ml 5% Perjodsyre + 4,5ml dH ₂ O.
Pikrinsyre/syrefuksin	10ml 1% syrefuksin + 100ml pikrinsyre (mettet).
Saltsyre	600ul saltsyre + 450ml 70% EtOH.
Schiff's reagens	1% Parafuksin, 4% Natriummetabisulfat. 0,25mol/L saltsyre
Shandon Instant Eosin (Y) (Thermo Scientific)	
¹ Shandon Instant Hematoxylin (Thermo Scientific)	
⁴ Weigert's hematoxylin	i en løsning på 50:50 WI:WII WI: 1g hematoxylin (s) + 100ml Abs. Etanol WII: 4ml 30%jernklorid (FeCl ₃) + 95ml dH ₂ O. (Culling et al., 1985)
Xylen	

Vedlegg III – URL til QR-koder

Innloggingsinformasjon til database for scannede snitt er oppgitt under. For å kunne logge inn må du være logget på UiTs nettverk. URL må kopieres og limes inn i nettleserens adressefelt.

- **Brukernavn:** oda
- **Passord:** oda_vs120

Figur	URL
Yngel 1	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=21378&layerId=10001&x=277&y=0&scale=2.3728589855115936&angle=0&vw=1024&vh=618
Yngel 2	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=21411&layerId=10001&x=84&y=0&scale=2.8324262389000285&angle=0&vw=1024&vh=618
Yngel 3	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=21400&layerId=10001&x=1035.70194342392&y=518.8791901404468&scale=2.5589004724532427&angle=177&vw=1024&vh=618
Yngel 4	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=21389&layerId=10001&x=935.5322867219857&y=689.4804884669461&scale=2.403447327404419&angle=196&vw=1024&vh=618
Hud	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=21443&layerId=10013&x=356&y=0&scale=1.3059930658741952&angle=0&vw=1024&vh=618
Hud VG	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=21588&layerId=10001&x=-114.46264884901677&y=1337.1797841969474&scale=5.000887455013038&angle=256&vw=1024&vh=618
Gjeller	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=22424&layerId=10016&x=-39.99779126218395&y=-166.64697418942242&scale=3.4242194436872166&angle=0&vw=1024&vh=618
Hjerte	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=22486&layerId=10004&x=139.6999745873636&y=55.114807289298405&scale=1.4675249986086119&angle=351&vw=1024&vh=618
Hjerte VG	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=22502&layerId=10001&x=55.774000550951314&y=-106.53157917275348&scale=1.7950057522414238&angle=0&vw=1024&vh=618

Hodenyre	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=22451&layerId=10001&x=1086.1947991841807&y=51.81147396173418&scale=2.99275879989408&angle=96&vw=1024&vh=618
Hodenyre 2	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=22472&layerId=10001&x=477.3351843768522&y=-81.9518519687727&scale=1.6373910703566477&angle=33&vw=1024&vh=618
Milt yngel	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=21378&layerId=10004&x=639.5906772031121&y=1241.8032655246284&scale=3.812198723664964&angle=217&vw=1024&vh=618
Milt	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=22493&layerId=10001&x=274&y=0&scale=1.9273444923616694&angle=0&vw=1024&vh=618
Pankreas	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=21566&layerId=10004&x=190.4647039774086&y=-220.9772973888322&scale=2.561273947380522&angle=0&vw=1024&vh=618
Lever	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=22477&layerId=10001&x=266.0001358969329&y=9.592326932761353e-14&scale=2.1020687455987668&angle=0&vw=1024&vh=618
Hud AB-PAS	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=21772&layerId=10004&x=211.21665116033483&y=437.29410376473413&scale=1.5660437123851758&angle=266&vw=1024&vh=618
Gjeller AB-PAS	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=22553&layerId=10004&x=131.16932881883548&y=1.7763568394002505e-14&scale=2&angle=0&vw=1024&vh=618
Pylorus-blindsekke r AB-PAS	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=21687&layerId=10007&x=256.3758461743106&y=-123.67187500000001&scale=2&angle=0&vw=1024&vh=618
Hodenyre MGG	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=22546&layerId=10004&x=1210.6001092955341&y=372.74084196654144&scale=3.0649638867358804&angle=123&vw=1024&vh=618
Milt MGG	http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Html5Viewer?dbId=16b953d5-5bfc-4d39-9132-30a197225c5d&recordId=22516&layerId=10001&x=433.77288725315987&y=1120.8603370794895&scale=4&angle=213&vw=1024&vh=618

Tilgang til hele databasen er via følgende URL:

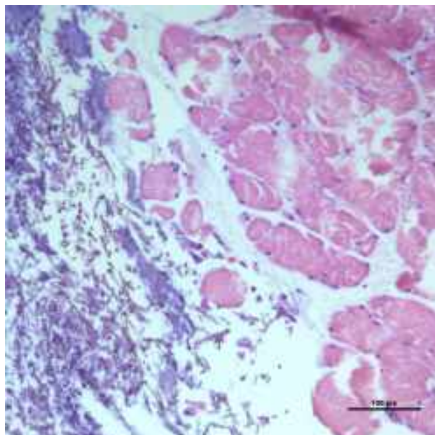
<http://olyvia.uit.no/OlyViaWeb/Folder/21376?ViewType=1&dbId=02826b5a-c972-469f-8599-0851f46162dd>

Vedlegg IV – bilder av histopatologi hos rognkjeks

Bilder av eksempler på histopatologiske forandringer i utvalgte vev hos rognkjeks blir her presentert. Bildene er fra diagnostiske undersøkelser fra rognkjeks i felt, sendt inn til VI Oslo.

Hud og skjelettmuskulatur

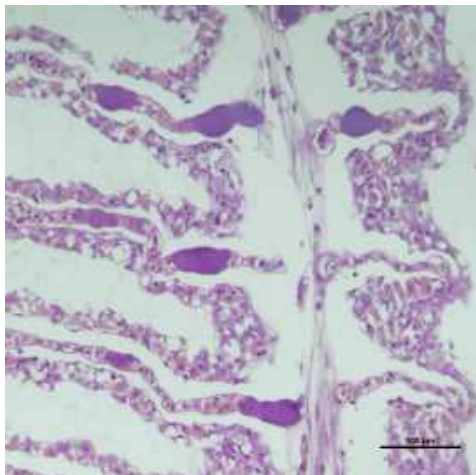
Figur 49 viser tallrike bakterier og sopphyfer i hud hos rognkjeks. De ligger i bindevevet over skjelettmuskulaturen.



Figur 49 – viser bakteriekolonier og sopphyfer (lilla farge) i hud hos rognkjeks. HE, 20x.

Gjeller

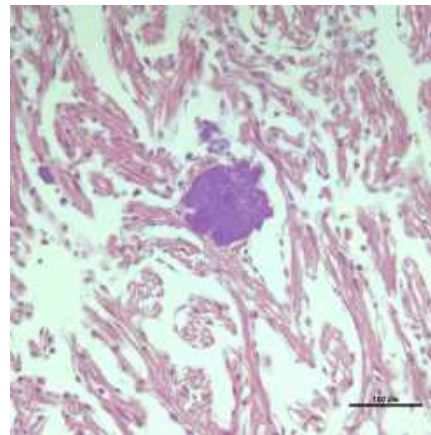
Figur 51 viser bakteriekolonier av *Aeromonas salmonicida* i gjeller hos rognkjeks. Bakterien forårsaker sykdommen atypisk furunkulose. Bakteriekoloniene har her infiltrert pillarcellene i lamellene, og blokkerer dermed muligheten for gassutveksling i dette området.



Figur 51 – viser bakteriekolonier i gjeller hos rognkjeks med atypisk furunkulose. Sykdommen forårsakes av bakterien *Aeromonas salmonicida*. HE, 20x.

Hjerte

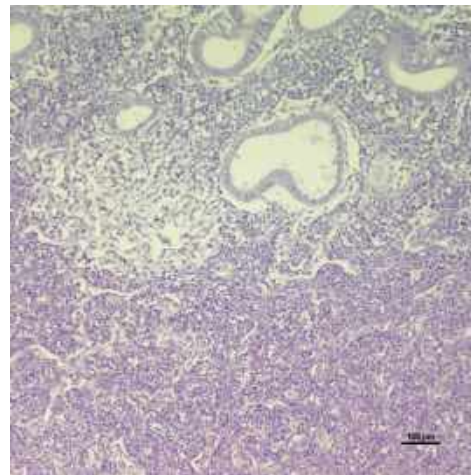
Figur 50 viser bakteriekolonier av *Aeromonas salmonicida* i hjerte hos rognkjeks. Bakterien forårsaker sykdommen atypisk furunkulose. Her sees en stor bakteriekoloni inne i hjertets myokard.



Figur 50 – viser en stor bakteriekoloni i hjertet hos rognkjeks med Atypisk furunkulose. Sykdommen forårsakes av bakterien *Aeromonas salmonicida*. HE, 20x.

Nyre

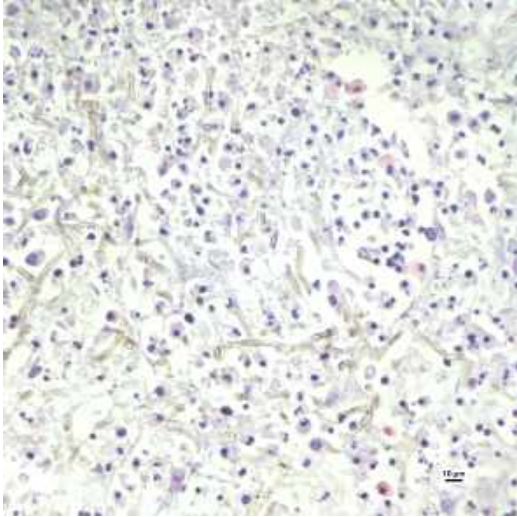
Figur 52 viser nekrose i hematopoietisk vev i nyre hos rognkjeks, forårsaket av *Nucleospora cyclopteri*. Det lyse området blant hematopoietisk vev er nekroser av vevet, der cellekjernene er pyknotiske.



Figur 52 – viser nekrose av hematopoietisk vev i nyre hos rognkjeks, forårsaket av *Nucleospora cyclopteri*.

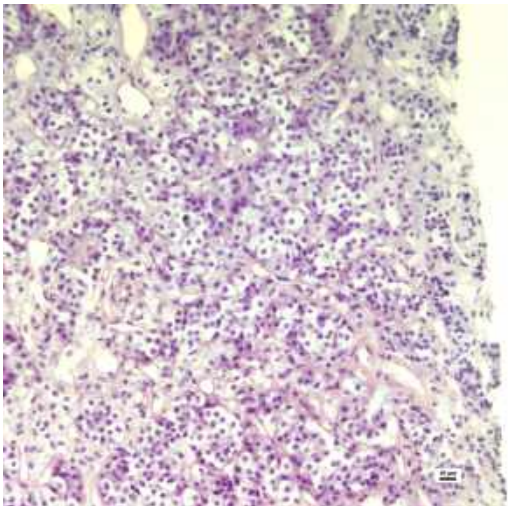
Lever

Figur 53 viser nekrose og sopphyfer i lever, forårsaket av soppen *Exophiala* spp. Hepatocytene er ugjenkjenkelige og har pyknotiske cellekjerne. Sopphyfene i en grønn/brun farge kan sees innimellom de pyknotiske cellekjernene.



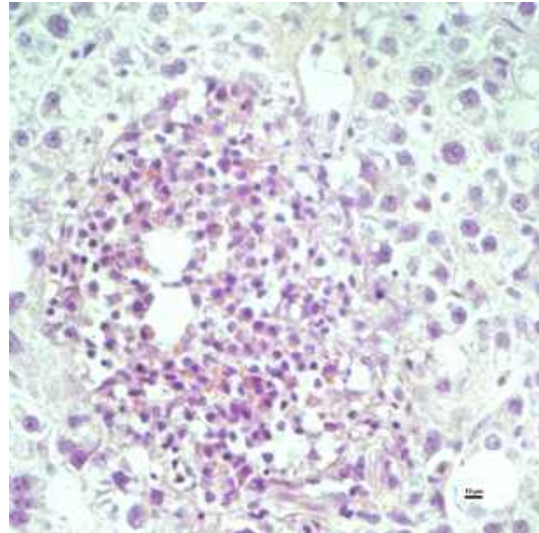
Figur 53 – viser nekrose i lever forårsaket av soppen *Exophiala* spp. Sopphyfene kan sees innimellom de nekrotiske hepatocytene i en grønn/brun farge. HE, 40x.

Figur 55 viser fibrose i lever hos rognkjeks. Her sees bindevev strekke seg ut områder, og legg merke til fravær av vakuoler som ellers sees i frisk rognkjekslever.



Figur 55 - viser fibrose i lever hos rognkjeks. Legg merke til fravær av vakuoler som ellers kan sees i frisk lever fra rognkjeks. HE, 40x.

Figur 54 viser ansamling av EGC i lever hos rognkjeks. Cellene har eosinofilt granulært innhold, med en rund basofil cellekjerne apikalt. De ligger organisert rundt et område som antageligvis er senter for et fremmedstoff.



Figur 54 - viser ansamling av EGC i lever hos rognkjeks. HE, 40x