



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Fordypningsoppgave 2023
Fakultet: Veterinærhøgskolen

Studier av reparative og regenerative prosesser i myokard ved infeksjon med piscint myokardittvirus hos atlantisk laks

Studies of Reparative and Regenerative Processes in Myocard During Infection with Piscine Myocarditis Virus in Atlantic Salmon

Martine Austad, Thea Hjemseter og Mari Finnbråten Rambøl

Innhold

Forord	- 3 -
Sammendrag	- 4 -
Definisjoner og forkortelser	- 5 -
Innledning.....	- 5 -
Om oppdrettsnæringen	- 5 -
Generelt om CMS - Forekomst, smitte, klinikk	- 7 -
Diagnostikk, differensialdiagnoser og histopatologi	- 8 -
Regenerasjon og reparasjon i hjertet	- 11 -
Problemstillinger	- 13 -
Formål	- 13 -
Materiale og metoder	- 13 -
Studieutvalg 1	- 14 -
Studieutvalg 2	- 15 -
HE-farging/snitting	- 16 -
Vurdering av HE-snitt.....	- 17 -
Kriterier og utvelgelse av snitt til videre spesialfarging	- 20 -
Spesialfarging	- 21 -
Massons Trichrome-farging	- 21 -
Elastin Van Gieson (EVG)-farging	- 22 -
Reticulin-farging	- 22 -

Vurdering av spesialfarginger.....	- 23 -
Resultater.....	- 24 -
Studieutvalg 1	- 24 -
Studieutvalg 2	- 33 -
Massons Trichrome	- 44 -
Elastin Van Gieson (EVG)	- 49 -
Reticulin.....	- 55 -
Diskusjon.....	- 59 -
Generelle histopatologiske forandringer og score	- 59 -
Forekomst og karakterisering av regenerasjon.....	- 61 -
Mekanismer bak regenerasjon	- 61 -
Makrofagens rolle	- 63 -
Forekomst og karakterisering av reparasjon.....	- 64 -
Spesialfarginger	- 65 -
Massons Trichome	- 65 -
Elastin Van Gieson	- 66 -
Reticulin.....	- 67 -
Kollagen - Sammenligning med humanmedisin	- 69 -
Begrensninger ved bruk av feltmateriale.....	- 71 -
Hva bør undersøkes videre	- 72 -
Konklusjon	- 73 -
Takk til bidragsytere.....	- 74 -

Summary - 75 -

Referanser..... - 76 -

Forord

Denne fordypningsoppgaven fokuserer på histopatologiske vurderinger ved kardiomyopatisyndrom hos atlantisk laks. Ved valg av oppgave hadde vi alle et stort ønske om at histopatologi skulle være en del av arbeidet. Histopatologi er noe vi synes er spennende, gøy og ikke minst relevant. Vi er derfor takknemlige for å ha hatt muligheten til å jobbe så spesifikt med det.

Proessen har vært veldig lærerik. Oppgaven har gitt oss mer erfaring i å vurdere histologiske snitt og en bredere forståelse for ulike fargemetoder og verdien i bruken av disse for å øke kunnskapen om en sykdom. Vi kunne gjerne ha jobbet enda mer med dette, og det har inspirert oss til fremtidig arbeid med histopatologi.

Vi har fordypet oss i eksisterende litteratur. Vi har lært mye om hvordan hjertemuskelen reagerer på skade av vev, og at dette er forskjellig både mellom arter og ulike patogener, med særlig fokus på PMCV. Her er det mye vi fortsatt ikke vet, og det har vært interessant å diskutere ulike hypoteser rundt våre resultater, og hva som kan være relevant for videre forskning.

Sammendrag

Tittel: Studier av reparative og regenerative prosesser i myokard ved infeksjon med piscint myokardittvirus hos atlantisk laks

Forfattere: Martine Austad, Thea Hjemsæter og Mari Finnbråten Rambøl

Veileder: Øystein Evensen, Institutt for parakliniske fag (PARAFAG) og akvamedisin

Kardiomyopatisyndrom (CMS) er ansett som en av de mest tapsbringende sykdommene hos oppdrettslaksen i Norge. Viruset PMCV fører til store skader på fiskens hjerte; ofte så alvorlige skader at forkammeret sprekker og fisken dør. Fisken evner egentlig i stor grad å regenerere hjertet ved celleskader, men ved CMS blir både regenerative og reparative prosesser betydelig redusert.

I denne fordypningsoppgaven har vi brukt hjerteprøver fra oppdrettslaks med påvist PMCV-infeksjon for å beskrive og score de histologiske forandringene, vurdere forekomst av reparasjon og regenerasjon, samt spesialfarge snittene videre med fargemetodene Massons Trichrome, EVG og Reticulin/Nuclear Fast Red, for å karakterisere hva slags type bindevev som avsettes hos fisken som reparerer skadene i myokard, og for å vurdere om fargemetodene er egnet til å fange opp bindevev ved CMS.

Resultatene fra HE-farging viste typiske histopatologiske forandringer ved CMS. Det ble funnet moderat forekomst av reparasjon og liten forekomst av regenerasjon. Spesialfargingene med Massons Trichrome og EVG var inkonklusive grunnet mistenkte feilkilder.

Reticulin/Nuclear Fast Red-farging indikerte avsetning av umodent bindevev (kollagen III) og fortykkelse av basalmembranen relatert til områder med skade.

Definisjoner og forkortelser

PMCV	Piscine myocarditis virus/Piscint myokardittvirus
CMS	Cardiomyopathy syndrome/Kardiomyopatisyndrom
Reparasjon	Ved celledskade erstattes vev med arrvev
Regenerasjon	Ved celledskade erstattes vev med samme type vev
PD	Pancreas disease
PDV	Pancreas disease virus
PRV	Piscine orthoreovirus
HSMB	Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse
ILA	Infeksiøs lakseanemi
EVG	Elastin Van Gieson
HE	Hematoxylin og eosin

Innledning

Om oppdrettsnæringen

Norge er i dag verdens største produsent og eksportør av atlantisk laks. Oppdrett foregår langs store deler av norskekysten. Det er av stor betydning for norsk økonomi og bidrar til et stort

antall arbeidsplasser. I tillegg til laks har Norge oppdrett av regnbueørret, torsk, kveite, røye og noen andre arter (Nærings- og fiskeridepartementet, 2021).

Forsøk med oppdrett av fisk startet i Norge på 1960-tallet, og på 1970-tallet lyktes man med å føre frem laks til slakt i sjøvann (Nærings- og fiskeridepartementet, 2021). Produksjonen vokste raskt, og reguleres i dag av blant annet trafikkløssystemet basert på lakselusbelastningen, som gir produksjonsområdene en fargekode ut fra påvirkningen lakselusa har på villaksen i området (Fiskeridirektoratet). Kun grønne områder gir anledning til å øke produksjonen (Nærings- og fiskeridepartementet, 2021).

Til tross for et stort fokus på god fiskehelse i oppdrettsnæringen er det fortsatt betydelige utfordringer knyttet til laksens helse. Tall fra Veterinærinstituttets årlige fiskehelse rapport viser at dødelighet for laks i sjøfasen i gjennomsnitt for alle produksjonsområder i 2022 var på 16,1 %, noe som er høyere enn tidligere år. Helseutfordringer i oppdrett er blant annet knyttet til infeksjøs årsaker slik som virus, bakterier og parasitter. De kan også ha en mer sammensatt årsak slik som kompleks gjellesykdom der både infeksjøs agens og miljøfaktorer har betydning for utvikling av sykdom (Sommerset et al., 2023).

Av parasitter fortsetter lakselusa å være den største utfordringen innen helse hos laks. Dette er både grunnet den direkte effekten lusa har på fisken, men også problemer som kan knyttes til selve avlusningen slik som mekaniske skader, dødelighet og økt mottakelighet for andre sykdommer. I 2022 så man en økning i antall lusebehandlinger, særlig ikke-medikamentelle behandlinger. Bakteriesykdommer hos laks holdes i de fleste tilfeller under kontroll med effektive vaksiner, men enkelte bakteriearter gir fortsatt sykdomsproblemer og spesielt infeksjon med *Moritella viscosa* (bakterien som forårsaker vintersår) har økt de siste årene (Sommerset et al., 2023). Virussykdommer som er i fokus i næringen i dag er de meldepliktige slik som infeksjøs lakseanemi (ILA) og pancreas disease (PD), men også ikke-

meldepliktige virussykdommer har fått økende fokus, og kardiomyopatisyndrom (CMS) og hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) er et økende problem med dødelighet knyttet til stressende situasjoner som medikamentell avlusning (Sommerset et al., 2023).

Generelt om CMS - Forekomst, smitte, klinikk

Kardiomyopatisyndrom (CMS), også kjent som hjertesprekk, er forårsaket av piscint myokarditt virus (PMCV). Det er en smittsom sykdom som infiserer oppdrettslaks i sjøfasen og finnes i dag langs hele norskekysten. CMS finnes også i andre land som Irland, Skottland og Færøyene. Sykdommen er et økende problem i oppdrettsnæringen og opptrer etter sjøsetting, som regel mot slutten av fremføringsperioden, men det har blitt rapportert forekomst av CMS også kort tid etter sjøsetting (Sommerset et al., 2023).

Sykdommen rammer, som nevnt, oftest stor laks i sjø, og av den grunn gir den store økonomiske tap, og det er kanskje en av de mest tapsbringende sykdommene i norsk oppdrettsnæring i dag med 122 tilfeller rapportert i 2022 (Sommerset et al., 2023).

Sykdommen er utbredt langs hele norskekysten i alle produksjonsområdene (Garseth et al., 2018). Sykdommens opptreden har endret seg med en økt forekomst hos yngre fisk. Det er ikke observert hos settefisk selv om viruset kan påvises i tidlige faser (yngel) etter klekking, men ikke i senere stadier i ferskvann (Bang Jensen et al., 2019). CMS er per dags dato ikke en listeført sykdom i Norge (ikke rapporteringspliktig), og sykdommen er trolig underdiagnostisert (Sommerset et al., 2023).

CMS som sykdom ble beskrevet allerede på 1980-tallet, men det var ikke før i 2009 at man kunne vise at det var en smittsom sykdom (Garseth et al., 2018), og viruset ble påvist og karakterisert i 2011 (Haugland et al., 2011). Selv om viruset er relativt godt karakterisert, er

det fortsatt en del grunnleggende kunnskap om viruset som mangler, særlig fordi viruset ikke kan dyrkes i cellekultur, noe som også vanskeliggjør utviklingen av en vaksine (Haugland et al., 2011). Viruset skilles ut fra infisert fisk i eksperimentelle studier (Haugland et al., 2011), men i hvor stor grad og i hvilke faser av infeksjonen viruset skilles ut hos syk laks under normale produksjonsforhold er ikke kjent. Det samme gjelder inngangsport for infeksjon, eller hvilke faktorer og mekanismer som er viktige for utvikling av sykdom og patologiske forandringer i hjertet (Fritsvold et al., 2021). Viruset smitter som nevnt horisontalt, men vertikal smitte er ikke dokumentert (Mikalsen et al., 2020).

Utbrudd med CMS er ofte kjennetegnet med akutt, høy dødelighet, særlig etter stress/håndtering, men kan også gi lavere grad av dødelighet over en lengre periode. Fisken har få ytre tegn, mens det ved obduksjon som regel er tegn til sirkulasjonssvikt og ved alvorlige tilfeller et sprukket forkammer, derav navnet hjertesprekk (Ferguson et al., 1990). Kliniske differensialdiagnoser er PD, ILA og HSMB (Garseth et al., 2017).

Som beskrevet er CMS en viktig sykdom både med tanke på fiskehelse, fiskevelferd og økonomi. Likevel er det fortsatt mye usikkerhet knyttet til både viruset og sykdommen det forårsaker. Alle kunnskapshullene rundt sykdommen og viruset gjør det vanskeligere å sette inn målrettede tiltak for å begrense smitte og sykdomsutvikling, og det fortsetter å være ett av de viktigste problemene i norsk lakseoppdrett (Sommerset et al., 2023).

Diagnostikk, differensialdiagnoser og histopatologi

Diagnosen CMS stilles ved en kombinasjon av kliniske tegn, obduksjonsfunn og histopatologiske forandringer, med tillegg av real time RT-PCR. Immunhistokjemi kan også benyttes. Det er gjort studier (Fritsvold et al., 2022) som sammenlikner histopatologi og real

time RT-PCR med IHC og RNA-scope *in situ* hybridisering for å avklare tvilstilfeller der det er lite karakteristiske kliniske sykdomstegn eller histopatologiske forandringer, eller hvor det er blandingsinfeksjoner. *In situ* hybridisering er da en egnet, men arbeidskrevende metode (Fritsvold et al., 2022).

For å kunne skille CMS fra PD og HSMB histologisk, vil det først og fremst være ulik vevsfordistribusjon av celledskader i henhold til virusets målorgan. CMS er den eneste av disse sykdommene som hovedsakelig affiserer hjertet alene,

og til en viss grad leverparenchymet, en sekundær effekt som skyldes sirkulasjonsforstyrrelser. PD og HSMB derimot, vil gi skade på vev i andre organer

(Figur 1). PD medfører f.eks. omfattende skader i pancreas, mens HSMB affiserer rød og i noen grad hvit skjelettmuskulatur i tillegg til hjertet (Garseth et al., 2017).

	Hjerte	Pankreas	Muskel
PD	Ja	Ja	Ja
IPN	Nei	Ja	Nei
CMS	Ja	Nei	Nei
HSMB	Ja	Nei	Ja

Figur 1. Oversikt over distribusjon av histopatologiske forandringer i hjerte, pankreas og muskel ved PD, IPN, CMS og HSMB. Kilde: Forelesning HSMB, Ø. Wessel.

En kan også skille sykdommene ved å se på de sekvensielle, histopatologiske forandringene i hjertet alene. CMS gir karakteristiske forandringer i forkammeret (først) og siden i spongios del i ventrikkelen (Garseth et al., 2017). HSMB gir initielt en epikarditt og senere en myokarditt. Histologisk vil man se et “teppe” av hovedsakelig lymfocytære betennelsesceller i epikard bestående hovedsakelig av T-celler (Mikalsen et al., 2012), og i senere stadier strekker forandringene seg innover mot kompaktlaget og videre til den spongiøse delen av myokard med påfølgende inflammasjon og degenerasjon/nekrose av myokard (Kongtorp et al., 2004).

PD har på sin side en distribusjon av forandringer som omfatter både det spongiøse og kompakte laget av myokard, og i mindre grad epikard og atriet. I akutte stadier er

forandringene i myokard kjennetegnet av nekrose av kardiomyocytter (enkeltvis), mest uttalt på overgangen mellom spongiøst og kompakt del av ventrikkelen, med varierende grad av betennescelleinfiltrasjon i tidlige stadier, men som senere utvikler seg til en pan-myokarditt sent i forløpet (McLoughlin et al., 2006).

Når det gjelder CMS, ser man at de patologiske forandringene i hjertet hovedsakelig rammer det spongiøse laget av myokard (ventrikkel og atrium). Epikard og stratum kompaktum har i mindre grad avvikende morfologi. En annen vesentlig forskjell mellom PMCV-infeksjon og HSMB eller PD, er at atriet blir hardt rammet samt at forandringene opptrer først i atriet (ved PMCV-infeksjon). Forandringene i akutt fase preges av mononukleær betennescelleinfiltrasjon subendotelialt med påfølgende degenerasjon og nekrose av myokard (Garseth et al., 2017), med likhet til PD i senere faser. På denne måten kan CMS og PD være utfordrende å skille histologisk basert kun på forandringer i ventrikkelen, mens forandringer i atriet klart skiller CMS og PD.

Et annet viktig poeng er at studier viser at blandingsinfeksjoner og myokarditter av ukjent årsak ikke er uvanlig. Koinfeksjoner med tilstedeværelse av flere patogener samtidig vil gjøre det vanskelig eller tilnærmet umulig å stille etiologisk diagnose på basis av histopatologi alene (Garseth et al., 2017), og kombinasjon med f.eks. PCR er nødvendig, men selv da kan det være vanskelig å avgjøre hvilken av de ulike agens som har størst betydning for sykdomsutviklingen.

For CMS er det utarbeidet en skala med score for hvor uttalte forandringene i atriet og ventrikkelen er. Denne skalaen har blitt hyppig brukt i vår fordypningsoppgave og blir omtalt i mer detalj under materiale og metoder.

Regenerasjon og reparasjon i hjertet

Infeksjon med PMCV gir, som nevnt, uttalte skader i myokard. Dersom vev i kroppen av ulike årsaker blir utsatt for en skade (uttalt nekrose) med samtidig akutt og/eller påfølgende kronisk, aktiv inflammasjon, må det enten repareres ved bindevevsproliferasjon som erstatter det opprinnelige vevet, eller regenereres (Zachary, 2017). Hos pattedyr varierer denne regenererende evnen fra vev til vev, og hjertet har svært liten regenerativ kapasitet sammenlignet med for eksempel lever og tarm (Laflamme and Murry, 2011).

Hos menneske vil faktisk så lite som 1 % av kardiomyocytene regenereres i 20-årsalderen, og 0,04 % regenereres i en alder av 75 år (Li et al., 2014). Dersom hjertet utsettes for et hjerteinfarkt, vil kardiomyocytene derfor i liten grad kunne regenerere til opprinnelig vev med normal funksjon. For å kompensere for irreversible skader vil man hos pattedyr se en reparasjon med aktivering og proliferering av fibroblaster, og det betyr at de skadede kardiomyocytene i stor grad blir erstattet av bindevev med nedsatt funksjon som resultat (Li et al., 2014).

Bindevev er en type støttevev til kroppen. Det kan deles inn i 3 histologiske underkategorier: kollagen, elastiske fibre og retikulære fibre. Kollagen er et protein som blant annet bidrar med styrke til ulike vev, elastiske fibre består av proteinet elastin, som er mer fleksibelt og bidrar blant annet til at vev som strekkes går tilbake til sin opprinnelige form, og retikulære fibre består av en type kollagen med mer delikat struktur og danner nettverk omkring ulike vev (Doan, 2022).

Bindevev kan gjenkjennes med HE-farging, men de ulike typene er vanskelig å skille fra hverandre i slike histologiske snitt og spesialfarginger kan brukes for å identifisere ulike typer

bindevev. Massons Trichrome farger bindevev bestående av kollagen, Elastin Van Gieson farger elastiske fibre og Reticulin/Nuclear Fast Red brukes for å farge retikulære fibre (Doan, 2022).

Laverestående vertebrater som noen amfibier og fisk, har en unik kapasitet til å regenerere hjertet ved celledskader, også etter embryogenesen (Curado and Stainier, 2006). Først trodde man at zebrafisk evnet dette grunnet rikelig med mesenchymale stamceller i hjertet som differensierte til nye kardiomyocytter, men nyere forskning viser at regenereringen medieres av allerede eksisterende kardiomyocytter som prolifererer (Laflamme and Murry, 2011). Dette resulterer i at hjertet kan gjenopprette tilsvarende funksjon og kapasitet som før skaden oppstod. Det er ingen eksperimentelle studier som omhandler hjerteregenerasjon hos atlantisk laks, men det er gode indikasjoner for at atlantisk laks også har denne evnen. Man ser blant annet dette hos laks utsatt for pancreas disease og hjerte- og skjelettmuskelbetennelse, i de tilfeller hvor fisken overlever den akutte fasen av infeksjonen (Øystein Evensen, professor ved NMBU, personlig meddelelse).

I en studie (Fritsvold et al., 2021) var det ingen indikasjoner for at kardiomyocytene regenereres eller avheles etter et utbrudd av CMS. Videre ser man at dersom skadene infeksjonen påfører atriet blir så uttalte at de hverken repareres eller regenereres kan atrieveggen rupturere ved økt belastning/stress/håndtering (Ferguson et al., 1990).

Det er også fortsatt uklart om syk fisk kan kvitte seg med infeksjonen og bli frisk (Fritsvold et al., 2021), men det har blitt gjort forsøk (Garseth et al., 2018) som identifiserer at typen og intensiteten på immunreaksjonen/inflammasjon har betydning for hvor alvorlig forandringene i hjertet blir.

Problemstillinger

Hvorfor er det sånn at PMCV-infeksjonen skiller seg ut i forhold til andre virusarter/patogener som rammer hjertet til atlantisk laks? Hva er det ved viruset og infeksjonen som gjør at fiskens regenerative kapasitet ikke fungerer som det pleier? Og hva er det ved de individene som tidsnok reparerer og regenerer hjertet slik at de overlever infeksjonen? Dette er store spørsmål som videre forskning kan og må gi svar på i kampen mot CMS. Kanskje man da kan finne en måte å forebygge alvorlig sykdom og dødelighet som følge av PMCV, slik at infeksjonen ikke lenger får så enorm økonomisk og velferdsmessig betydning for næringen slik situasjonen er i dag.

Formål

I denne oppgaven er hovedformålet å karakterisere reparasjon og regenerasjon i myokard hos atlantisk laks med subakutt til kronisk PMCV-infeksjon. Utgangspunktet for oppgaven er histologiske snitt fra laks med kliniske symptomer på CMS. Karakteriseringen gjøres ved å score snittene ut fra eksisterende mal med tanke på forandringer i hjertet, samt foreta spesialfarging for å kunne identifisere forekomst/opptreden av bindevev i hjertet.

Materiale og metoder

Studieutvalg 1 var i utgangspunktet prøvematerialet som skulle benyttes til videre histologisk spesialfarging. Etter vurdering av HE-snittene var det ikke mulig å finne de tilhørende

blokkene. Dette studieutvalget ble derfor ikke brukt til spesialfarging. Prøvematerialet fra Studieutvalg 2 ble dermed det nye utgangspunktet for videre histologisk spesialfarging.

I denne fordypningsoppgaven var det også ment å gå videre med markører for regenerasjon av kardiomyocytter. På grunn av den uforutsette forsinkelsen med et nytt studieutvalg, ble det for knapp tid til å utføre denne delen.

Ved vurdering av hvilke HE-snitt som inneholder fibrose og/eller celledifferensiering, har kun klare tilfeller blitt klassifisert som positive. Tvilstilfeller med eksempelvis veldig få uidentifiserbare celler og/eller veldig lite og uklare fibrotiske tegn blitt klassifisert som negative.

Studieutvalg 1

Prøveuttak ble gjort på en og samme dag, og det var kun ett uttak. Studiepopulasjonen var atlantisk laks (*Salmo salar* L.) fra et kommersielt oppdrettsanlegg i Midt-Norge, produksjonsområde 6 Nordmøre og Sør-Trøndelag. Fiskegruppen ble satt ut i sjø i august-september 2017, og ble diagnostisert med kroniske HSMB (hjerte- og skjelettmuskelbetennelse)-forandringer i november 2017, og PD (SAV2) i mai 2018.

Anlegget hadde moderat dødelighet og kliniske symptomer forbundet med HSMB, og lav mortalitet i forbindelse med påvisningen av PD.

Fiskegruppen fikk diagnostisert CMS (histopatologisk) i november 2017 og det er usikkert når fiskegruppen først ble infisert med PMCV. Det ble utført RT-qPCR for PMCV den 28. juni 2018 og alle prøver (10/10) var negative. Det ble rapportert utbrudd av CMS med kliniske symptomer i november 2018 med høy mortalitet. Prøvene ble tatt ut i februar 2019,

ca. 3-4 måneder etter påviste kliniske symptomer på CMS og PMCV-genom ble påvist ved RT-qPCR. Det ble tatt ut prøver fra hjerte fra 50 fisk (ca. 3,5-4 kg), som ble fiksert på 10 % fosfatbufret formalin i minimum 48 timer.

Studieutvalg 2

Materialet bestod av hjertevev (atrium og ventrikkel) fra 28 atlantisk laks, 1 prøve fra hver fisk. Fisken var fra to forskjellige lokaliteter; 10 fisk fra lokalitet A og 18 fisk fra lokalitet B. CMS-diagnose for begge lokalitetene er bekreftet ved PCR.

Lokalitet A: Fisk 21-30 (Snitt 787-798, (n = 10)). Prøvetaking 13/06-2017

Prøvene er tatt ut etter klinisk utbrudd av CMS, fra fisk på ca. 4 kg. Anlegget hadde tidligere mistanke om tilfeller med HSMB, men dette ble ikke bekreftet. Prøvene ble tatt fra dødfisk (samlet med dødfiskhåv) fra flere merder. Fisken ble kategorisert med tanke på postmortelle (PM) forandringer. To av fiskene brukt i vår oppgave ble kategorisert som PM1- noe tap av hudfarge, nekrose i huden, bleke gjeller og økt slim i gjeller og hud, noe lukt. Resterende fisk ble kategorisert som død <24 timer med noe tap av hudfarge, bleke gjeller og økt slim på gjeller og hud, ingen lukt. Det ble tatt ut prøver fra hjerte og nyre på RNA-later (ThermoFisher scientific, Massachusetts, USA) og prøve fra hjerte på formalin (10 % fosfatbufret formalin). Temperatur ved prøvetaking var 10 °C, transport-temperatur var 0-5 °C. Prøvene på RNA-later ble lagret ved -20 °C, mens formalinfiksert vev ble oppbevart ved 4 °C inntil vevsprøvene ble støpt inn i parafin (minimum 2 dagers fiksering).

Lokalitet B: Fisk 1-18 (Snitt 797-816 (n = 18)). Prøvetaking 22/08-2017

Prøvene er tatt fra fisk mellom 1-2 kg som var satt ut i sjø 05/10-2016. Prøveuttak ble gjort fra fersk fisk kategorisert som «fresh bleed»-prøver tatt fra slakteri, avlivet på anlegg eller av lignende kvalitet. Det ble tatt ut prøver fra hjerte, nyre, milt, gjeller og pankreas for RNA-later, og prøver fra hjerte til formalin. Temperatur ved prøvetaking var 15 °C, transportert ved mellom 5-10 °C. Prøver på RNA-later ble lagret ved 2 °C før frysing ved -20 °C. Formalinfiksert vev ble oppbevart ved 4 °C inntil vevsprøvene ble støpt inn i parafin (minimum 2 dagers fiksering).

HE-farging/snitting

Formalinfixert hjertevev fra begge studiepopulasjoner ble innstøpt i parafin og snittet med 2-3 mikrometers tykkelse etter standard metode (Veterinærinstituttet).

HE-farging: Snittene ble deparafinisert ved 56 °C i 60 minutter etter standard metode før snittene ble overført til xylene, og videre (stegvis) til 100 % etanol, 70 % etanol, 50 % etanol og til slutt vann. Farging av snittene med hematoxylin og eosin ble gjort med automatisk fargemaskin (Tissue-Tek Prisma Plus, Sakura) etter standard metode på Veterinærinstituttet. Snittene ble så vasket og montert med dekkglass. Snittene ble scannet til et digitalt bildeformat, og undersøkt med Hamamatsu digital bildebehandlingsprogramvare NDP.view 2 (Hamamatsu Photonics K.K.)

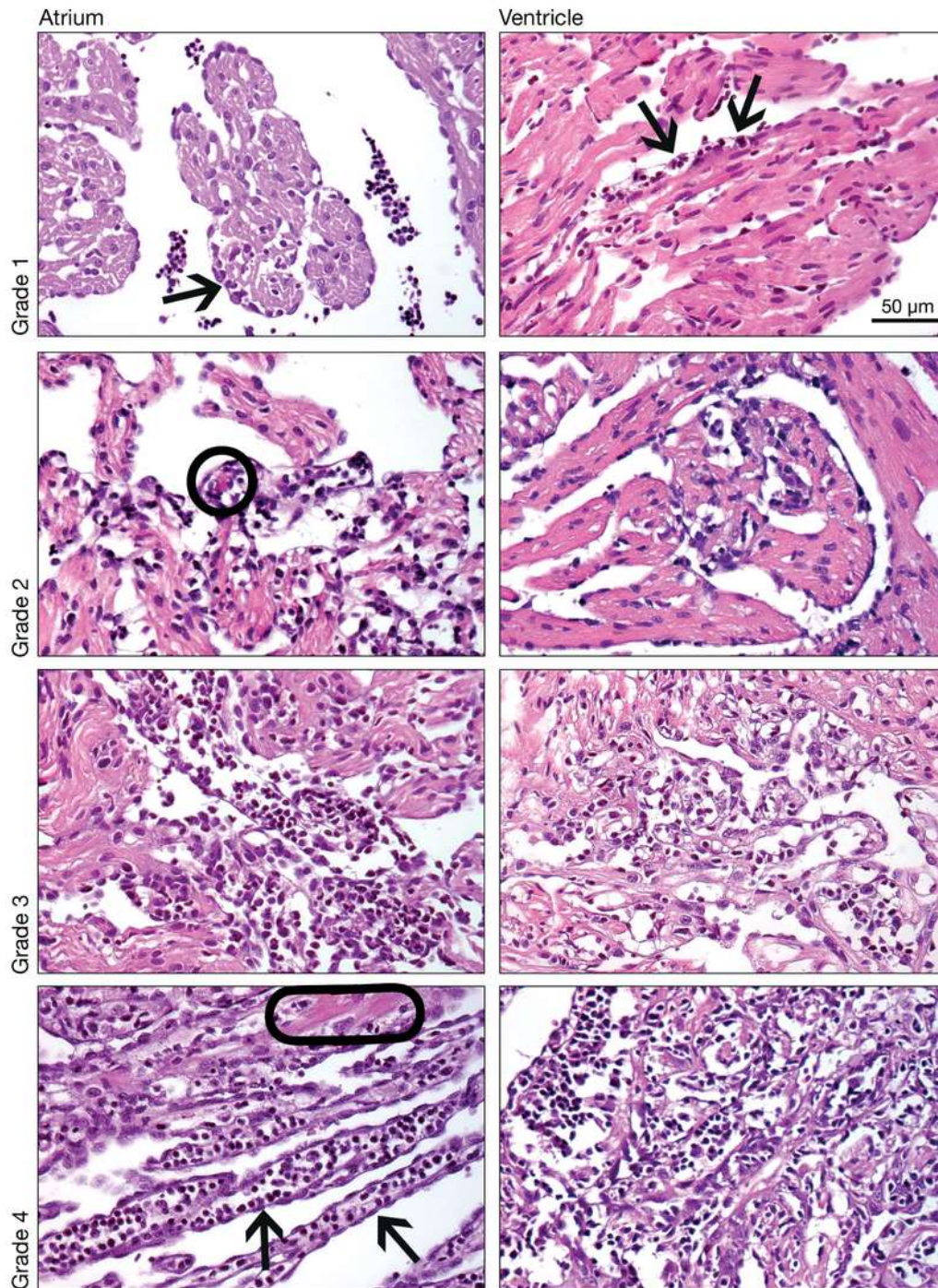
Vurdering av HE-snitt

Alle snitt er scoret etter Tabell 1, som er basert på alvorlighetsgrad og utbredelse av histologiske forandringer. Tabellen er modifisert noe for bruk til denne oppgaven (Fritsvold et al., 2009), (Haugland et al., 2011).

Score	Beskrivelse av score
0	Ingen patologiske funn
0,5	Meget milde betennelsesforandringer. Enkelte mononukleære betennelsesceller eller subendokardial vakuolisering.
1	Milde betennelsesforandringer. Små, få fokale subendokardiale infiltrasjoner av mononukleære leukocytter. Noe subendokardial vakuolisering.
1,5	Flere milde fokale subendokardiale infiltrasjoner av leukocytter. Noe subendokardial vakuolisering
2	Moderat - flere distinkte lesjoner og liten til moderat forekomst av leukocytter. Kan ha myocyttd degenerasjon og nekrose.
2,5	Multifokale lesjoner med liten til moderat grad av leukocytter. Kan ha enkelte mindre områder med endokardial hyperplasi som danner «rørstrukturer» hvor sarkoplasma er erstattet med ødem og leukocytter.
3	Utbredt - multifokale til diffuse lesjoner og moderat til stor forekomst av leukocytter.

3,5	Multifokale til diffuse lesjoner med stor forekomst av leukocytter, nekrose og endokardial hyperplasi.
4	Alvorlig - Konfluerende lesjoner som dekker over 75 % av vevet, og meget kraftige infiltrasjoner av leukocytter. Flere store områder med endokardial hyperplasi og degenerasjon/nekrose av myocytene som danner et bilde av «rørstrukturer» hvor sarkoplasma er erstattet med ødem og leukocytter.

Tabell 1. Beskrivelse av histopatologiske forandringer ved de ulike scorene.



Figur 2. Histopatologiske forandringer som grunnlag for scoring, vist som score 1-4 (Fritsvold et al., 2009).

Snitt er ytterligere karakterisert basert på klassiske histopatologiske tegn til fibrose (fibroblaster og kollagen) og utbredelse av dette. Det er også sett på udifferensierte og

uidentifiserbare celler samt mengde av disse i snittene som antydning til mulige regenerative forandringer (Sallin et al., 2015).

Kriterier og utvelgelse av snitt til videre spesialfarging

Kriterier for utvalg av HE-snitt:

- Varierende score (Tabell 1): 0-4
- Varierende grad av fibrose (inkludert fravær): Spredning og mengde av fibroblastliknende celler (avlange spolfornede celler) samt kollagenfibre som kan være en mulig indikasjon på reparative forandringer.
- Varierende grad av celledifferensiering (inkludert fravær): Spredning og mengde av uidentifiserbare celler som kan være en mulig indikasjon på regenerative forandringer.

Begrunnelse for utvalg er at det skal være en bred variasjon for å se om fargemetodene er egnet for å bedre kunne visualisere forandringer knyttet til reparasjon og regenerasjon i ventrikkelens spongiosum.

Snitt valgt ut til videre spesialfarging (Tabell 2):

Snitt	Score	Reparative/regenerative forandringer
787	4	Bindevevsproliferasjon og celledifferensiering.
788	3.5	Celledifferensiering.
789	3.5	Fravær av bindevevsproliferasjon og celledifferensiering.
791	4	Fravær av bindevevsproliferasjon og celledifferensiering.
792	4	Bindevevsproliferasjon og celledifferensiering.

794	3.5	Fravær av bindevevsproliferasjon og celledifferensiering.
797	1	Fravær av bindevevsproliferasjon og celledifferensiering.
798	2	Bindevevsproliferasjon.
803	2.5	Bindevevsproliferasjon.
808	3	Celledifferensiering.
809	4	Bindevevsproliferasjon.
812	3	Bindevevsproliferasjon og celledifferensiering.
813	3.5	Celledifferensiering.

Tabell 2. Score og tilstedeværelse/fravær av reparative og regenerative forandringer fra utvalgte snitt (Studieutvalg 2).

Spesialfarging

Utvalget vårt har blitt snittet ut fra samme blokk, i tre nye snitt for hvert formalinfikserte hjertepreparat. Disse nye snittene har blitt spesialfarget av Veterinærinstituttet med følgende fargemetoder:

Massons Trichrome-farging

Massons Trichrome fargeteknikk er mye brukt for vurdering av fibrose i hjerte og andre organer. I hjerte kan man identifisere fibrose ved at kollagenfibre farges blått mens muskelvev farges rødt (Sridharan et al., 2022). I tillegg farges fibrin rosa, kjerner blått/svart og erytrocytter farges rødlig/rødt (Agilent Technologies, 2023). Det benyttes tre forskjellige farger i metoden som farger ulike komponenter i snittet; Weigert's Iron Hematoxylin for

farging av cellekjerner, Biebrich scarlet-acid fuchsin for farging av cytoplasma, og aniline blue for farging av kollagen (Sridharan et al., 2022).

Fargingen ble gjort med fargemaskin (DAKO Artisan Link Pro, Santa Clara, CA, United States) etter standard prosedyre på Veterinærinstituttet. Snittene ble videre scannet så de er tilgjengelige for digital vurdering.

Elastin Van Gieson (EVG)-farging

EVG er en fargemetode som egner seg godt til å se på elastiske fibre i histologiske snitt da H&E ikke gjør elastin synlig. Elastin farges blått/sort, kjerner farges også blått/sort, kollagen farges rødt og øvrig vev (som muskler) farges gult (Kazlouskaya et al., 2013).

Kollagen og reticulin har sin hovedfunksjon som et henholdsvis styrkende og støttende type bindevev, mens elastin derimot gir som navnet tilsier, elastisitet og fleksibilitet i vev (Kazlouskaya et al., 2013). Elastin finner man typisk i huden, rundt blodkar (særlig aorta) og i lungene (Karsdal and Kristensen, 2016).

Fargingen ble gjort med fargemaskin (DAKO Artisan Link Pro, Santa Clara, CA, United States) etter standard prosedyre på Veterinærinstituttet. Snittene ble videre scannet for digital vurdering.

Reticulin-farging

Reticulin/Nuclear Fast Red brukes som spesialfarging for retikulære fibre, da disse ikke visualiseres i vanlige HE-snitt.

Prinsippet bak fargemetoden for retikulære fibre er bruk av sølvfarging. Argyrofilt vev har affinitet for sølv, og ved bruk av en developer («framkaller») framkalles sølvsalt til metallisk salt slik at det er mulig å se argyrofilt vev som farges sort, slik som retikulære fibre (Doan, 2022).

Fargemetoden er hovedsakelig rettet mot retikulære fibre bestående av kollagen III, men farger også laminin og kollagen IV i basalmembraner (Pernick, 2005).

Av og til farges også cellekjerner ved bruk av sølvfarging, som gjør databasert bildeanalyse vanskelig. Det finnes modifiserte metoder som forsøker å unngå dette (Schwint et al., 2004).

Spesialfargingen Reticulin/Nuclear Fast Red er gjennomført av Veterinærinstituttet med fargemaskin (DAKO Artisan Link Pro, Santa Clara, CA, United States) etter standard prosedyre. Snittene ble videre scannet for digital vurdering. Reticulinfibre farges svart og bakgrunn farges rød.

Vurdering av spesialfarginger

Spesialfargede snitt er vurdert etter hvor sterkt farget de er, hvor utbredt fargen er i snittet og hvordan fargen er fordelt i forhold til patologiske forandringer. Dette er så satt i sammenheng med resultater fra HE-vurdering for å se om de aktuelle spesialfargingene er egnede metoder for vurdering av slike snitt.

Resultater

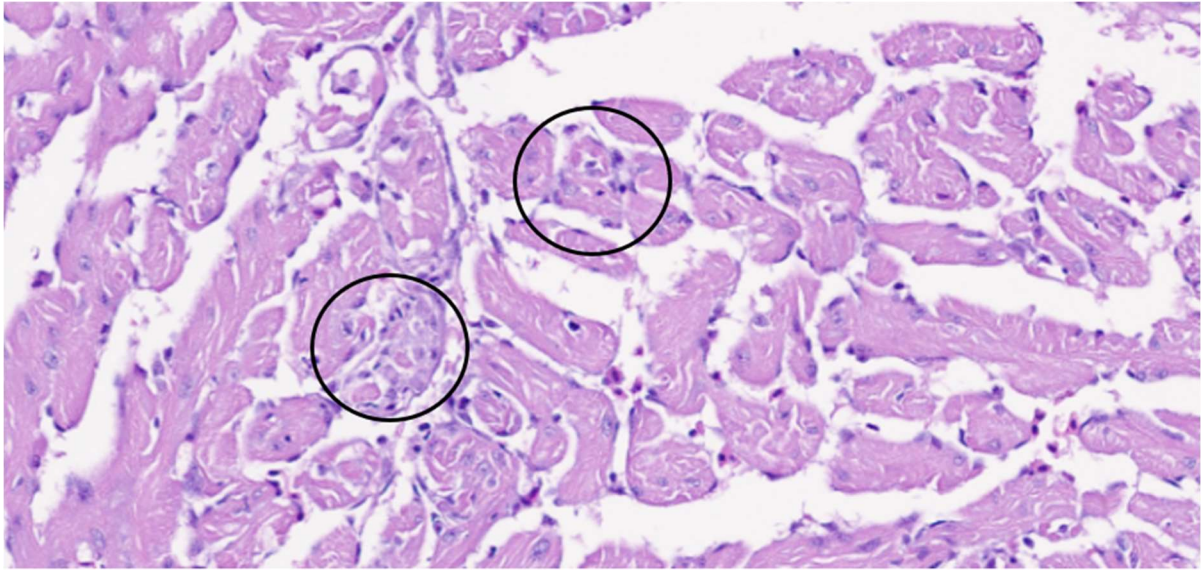
Studieutvalg 1

De 50 snittene fra prøvematerialet fra 2019 (Studieutvalg 1) som ikke kunne spesialfarges videre er av generelt god kvalitet med enkelte uoversiktlige snitt (snitt 52 og 66). Vi har sett på histopatologiske forandringer i både atriet og ventrikkelen, men brukt ventrikkelen som utgangspunkt for scoring i henhold til malen (Tabell 1) og definering av hvorvidt det er forekomst av reparasjon og/eller regenerasjon (Tabell 3).

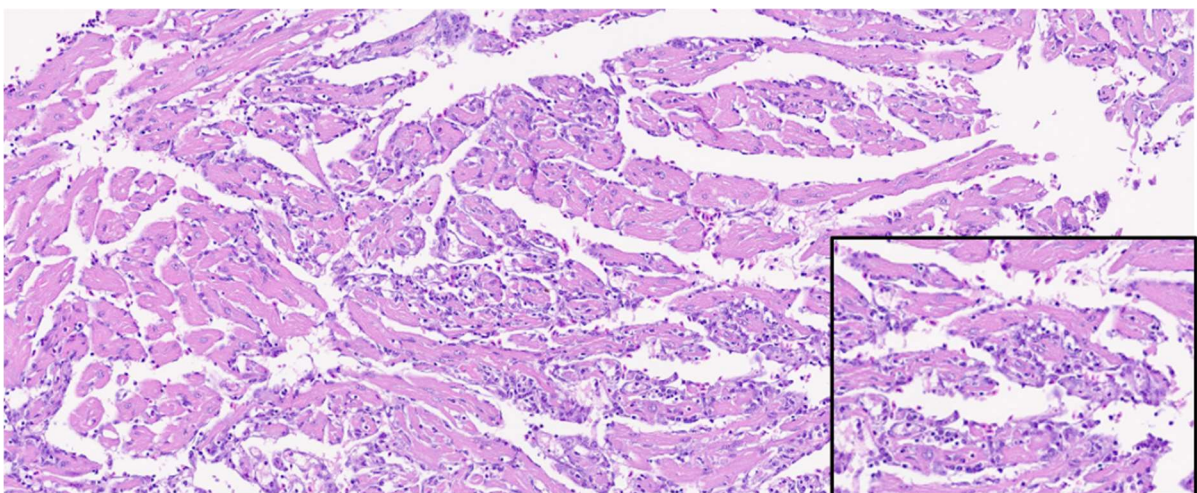
Snitt	Score	Regenerasjon	Reparasjon	Snitt	Score	Regenerasjon	Reparasjon
17	3,5	x	x	42	3	x	
18	3		x	43	3,5		x
19	3,5		x	44	4	x	x
20	2,5			45	4		x
21	4			46	3,5	x	
22	3,5		x	47	3,5	x	x
23	4			48	4		x
24	4			49	4		x
25	1,5			50	3	x	
26	4			51	2,5	x	x
27	3,5		x	52	3,5		
28	3,5			53	4		x
29	3,5		x	54	4		x
30	3		x	55	3	x	
31	4			56	4		
32	4	x	x	57	4	x	
33	3,5			58	4	x	x
34	2,5	x		59	4	x	x
35	2	x		60	4		x
36	3,5		x	61	4		x
37	4			62	4	x	
38	4		x	63	4		
39	3,5			64	4		x
40	2,5		x	65	4	x	
41	3			66	3,5		x

Tabell 3. Oversikt over studieutvalget med score og markering av funn av henholdsvis regenerasjon og reparasjon.

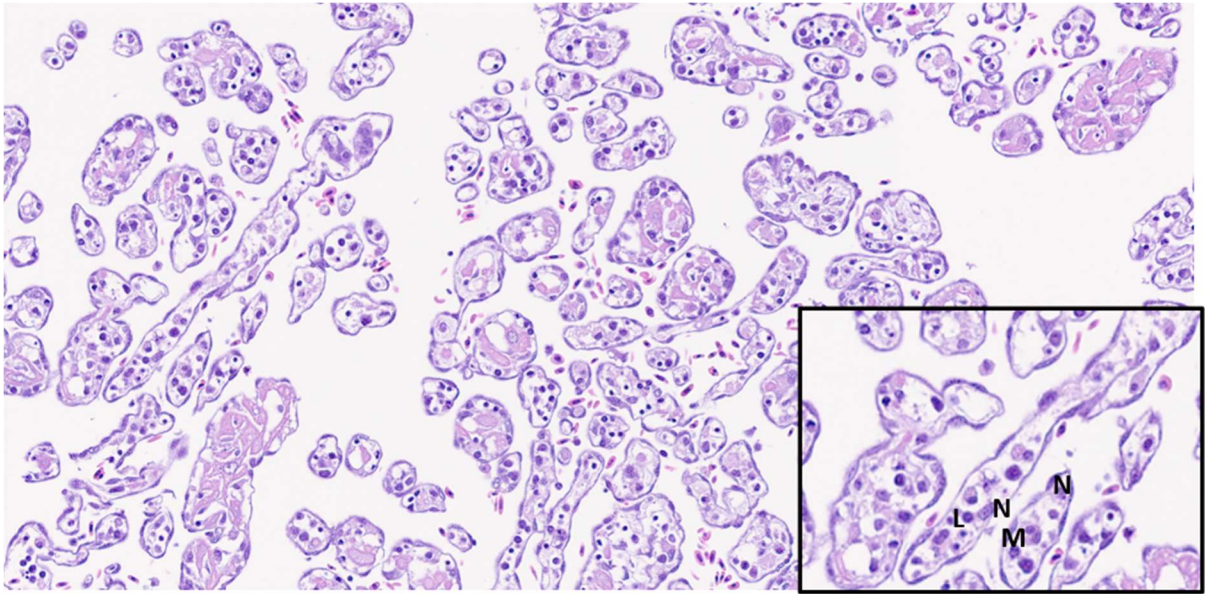
Enkelte snitt har fokale (Figur 3) eller multifokale forandringer preget av sparsom til moderat infiltrasjon med mononukleære betennelsesceller. Andre har disse forandringene diffust utbredt gjennom hele eller store deler av spongiosum (Figur 4). De mest uttale tilfellene har forekomst av leukocyt-«rørstrukturer» med få gjenværende, intakte kardiomyocytter (Figur 5).



Figur 3. Snitt 25. Relativt intakt morfologi i spongiosum, fokal degenerasjon (sirkel) og nekrose og sparsom (mild) forekomst av leukocytter. Snittet fikk score 1,5.

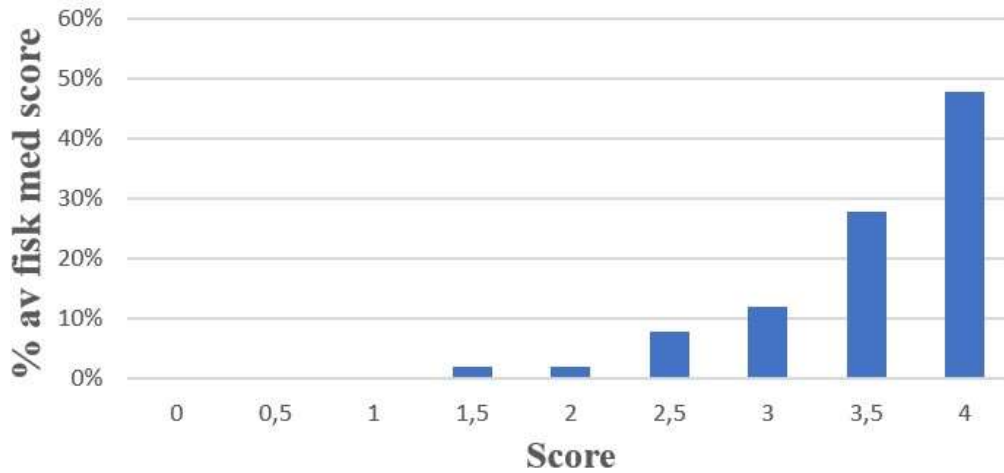


Figur 4. Snitt 20. Mer diffus infiltrasjon med mononukleære betennelsesceller, hovedsakelig lymfocytter (se utsnitt). Snittet fikk score 2,5.



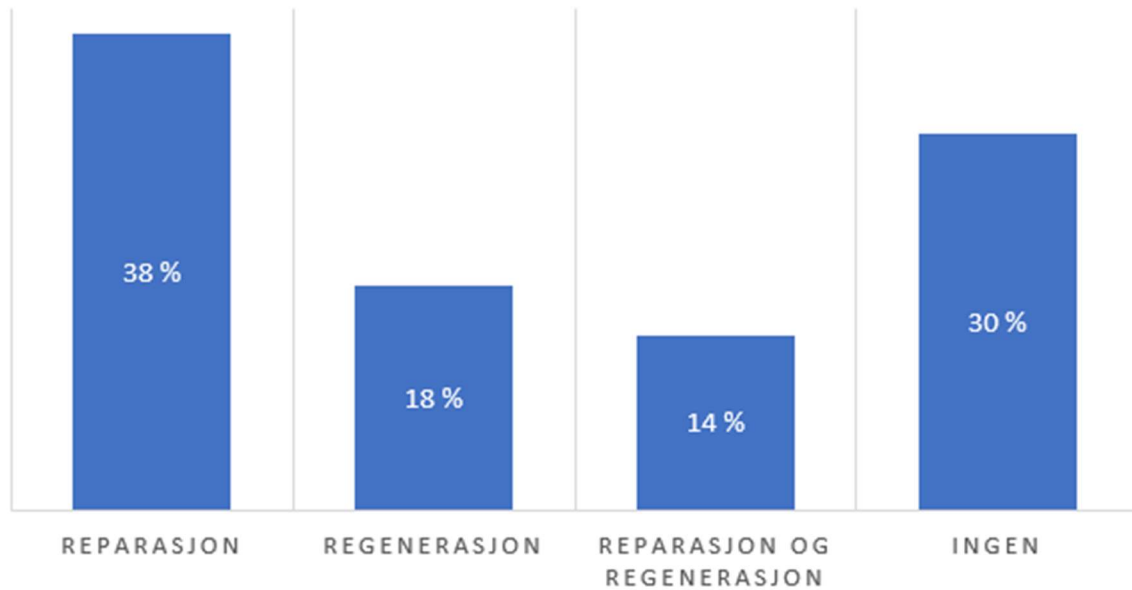
Figur 5. Snitt 60. «Rørstrukturer» kuttet på langs og på tvers har fullstendig erstattet normale kardiomyocytter. Utsnitt viser hypertrofi av endotelceller og tilnærmet tomme trabekler hvor sarkoplasma er erstattet med lymfocytter (L) og makrofager (M), muligens også med enkelte kjerner fra kardiomyocytene (N), samt noe ødem. Snittet fikk score 4.

Den generelle tendensen i dette materialet er at fiskegruppen har en høy score; 88 % av fisken fikk score 3,0 eller høyere, mens resterende 12 % fikk score 2,5 eller lavere. 2 % av fisken (n=1/50) fikk score 1,5, mens ingen fikk lavere score enn dette (Figur 6).



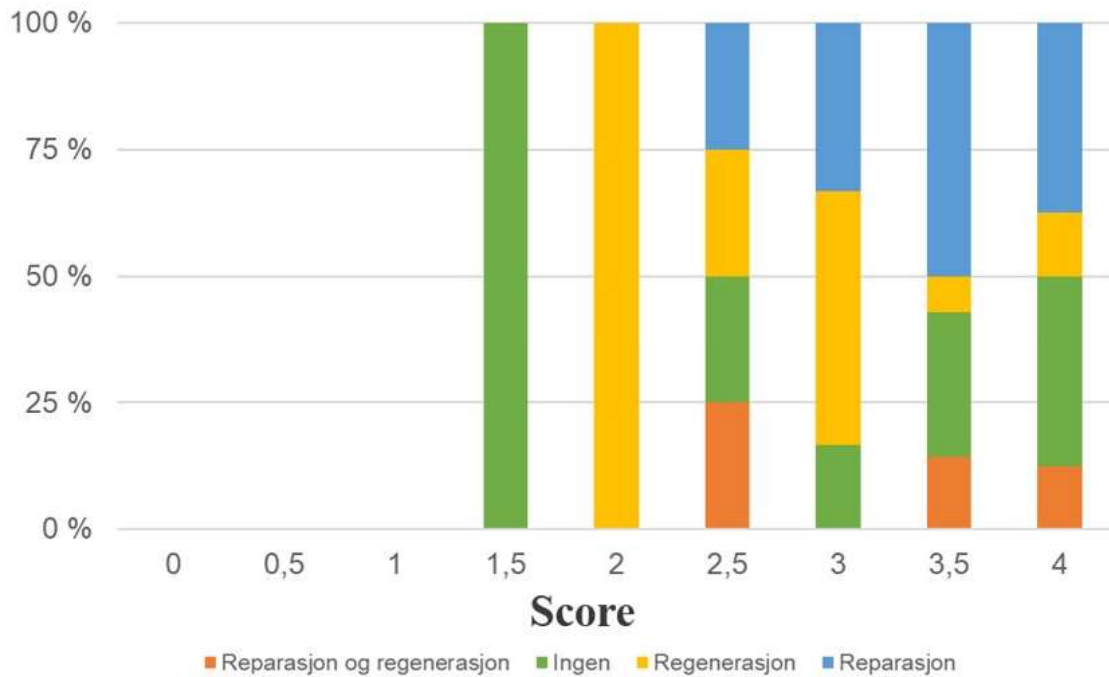
Figur 6. Fordeling av score i prosent på Studieutvalg 1 viser generelt høy forekomst av de mest uttale forandringene.

Bindevevsforekomsten varierer i utvalget. Snittene kan ha både uttalt, lite eller ingen forekomst av bindevev. Det samme gjelder for udifferensierte celler. Enkelte snitt har en del av disse cellene, mens andre har ingen eller lite tegn til udifferensierte celler. Funn av bindevev og funn av udifferensierte celler uavhengig av utbredelse/antall celler involvert, er avmerket i Tabell 3. Oppsummert har 38 % av materialet forekomst av reparasjon, 18 % har forekomst av regenerasjon, 14 % har både reparasjon og regenerasjon, mens 30 % ikke har funn av verken reparasjon eller regenerasjon (Figur 7). Summert opp vil den totale andelen av fisk som har tegn til regenerasjon være 32 % og reparasjon være 53 %.

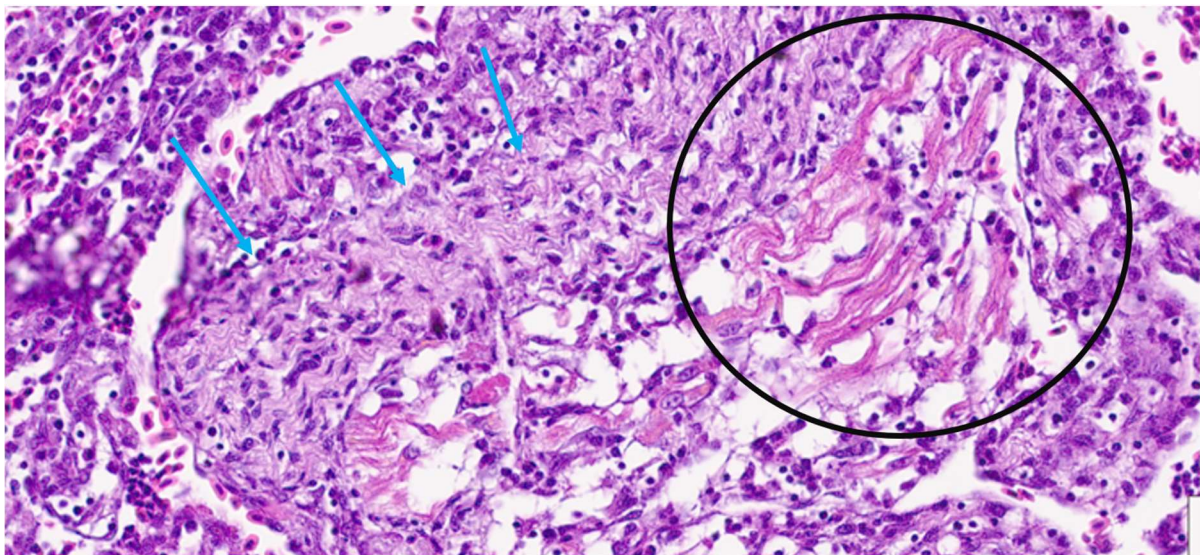


Figur 7. Fordeling av reparasjon, regenerasjon, funn av begge, eller ingen, uavhengig av snittscore.

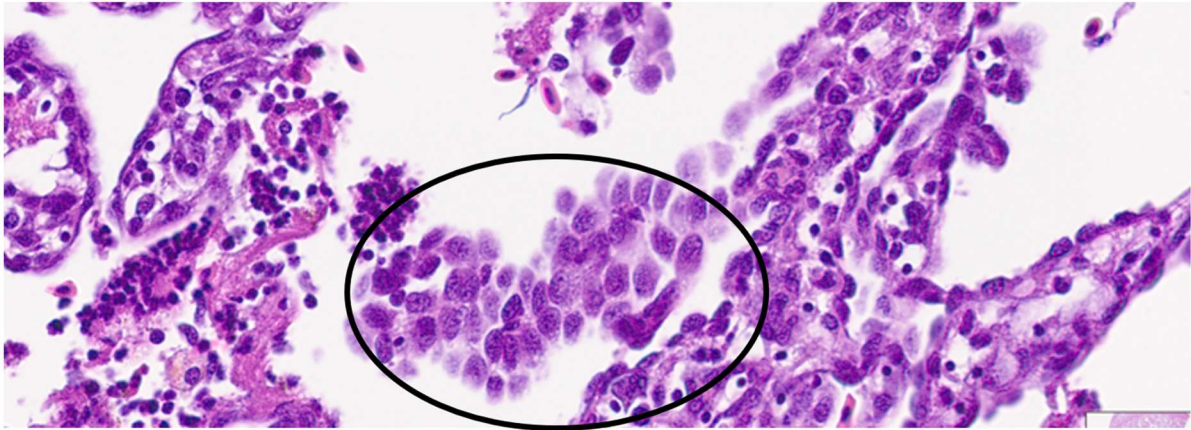
Verken reparasjon eller regenerasjon ser ut til å ha noen sammenheng med score, dvs. grad av forandring. Fisk med mildere forandringer med score 2,5, og fisk med mer uttalte forandringer på score 4, har en relativt jevn fordeling av snitt med funn av reparasjon, regenerasjon, begge deler eller verken eller. Det var bare et snitt scoret til henholdsvis 1,5 og 2, der snittet med 1,5 i score ikke hadde funn av verken reparasjon eller regenerasjon, og i snittet med score 2 ble det kun funnet regenerasjon uten reparasjon (Figur 8).



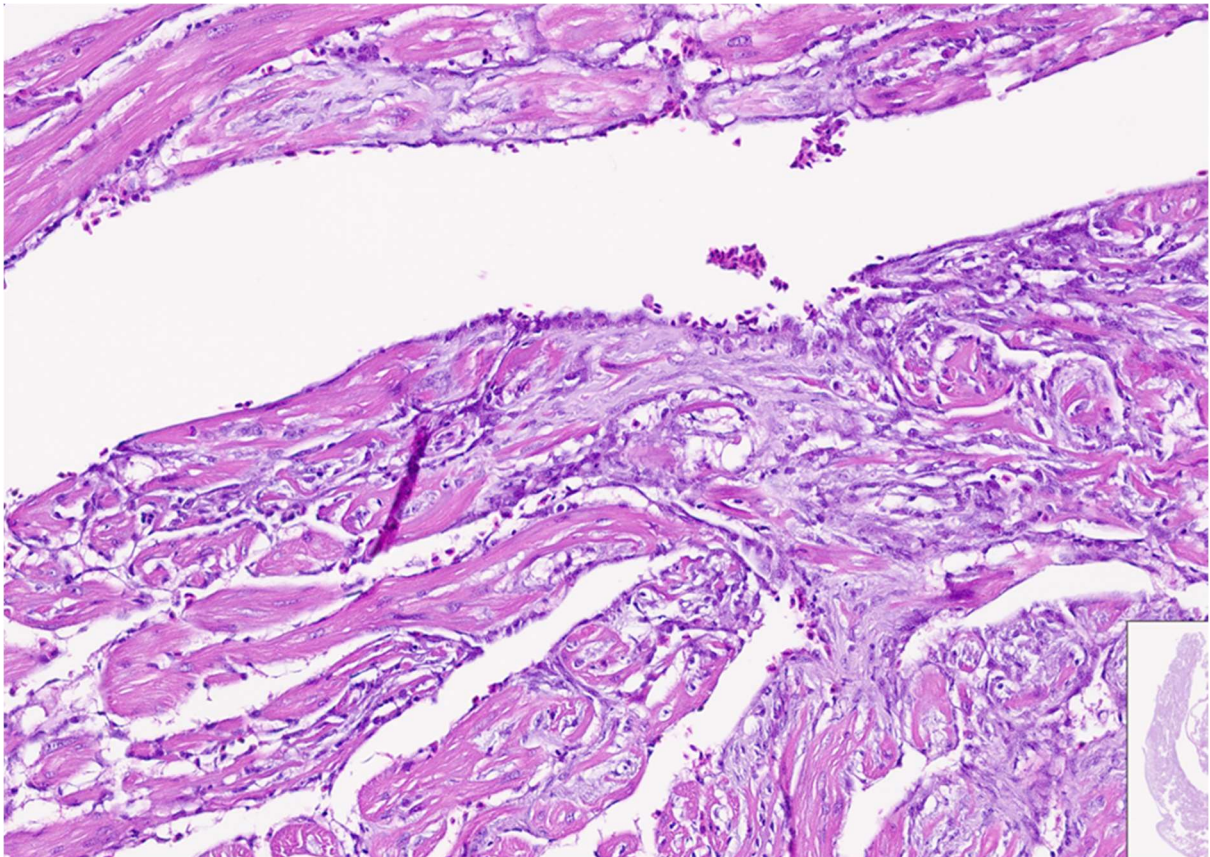
Figur 8. Fordeling av snitt med reparasjon, regenerasjon, funn av begge, eller ingen, i forhold til score.



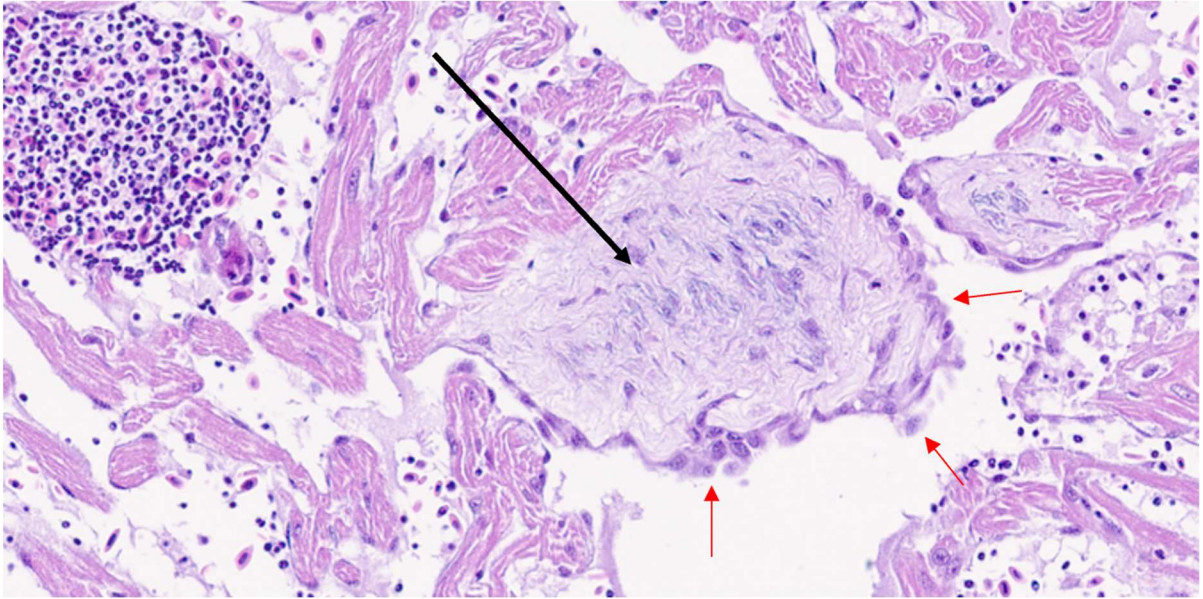
Figur 9. Snitt 32. Bindevev i form av umodent (spolformede fibroblaster markert med blå piler) og modent bindevev med kollagen (hypereosinofile tråder uten cellekjerne markert med sort sirkel). Snittet fikk score 4.



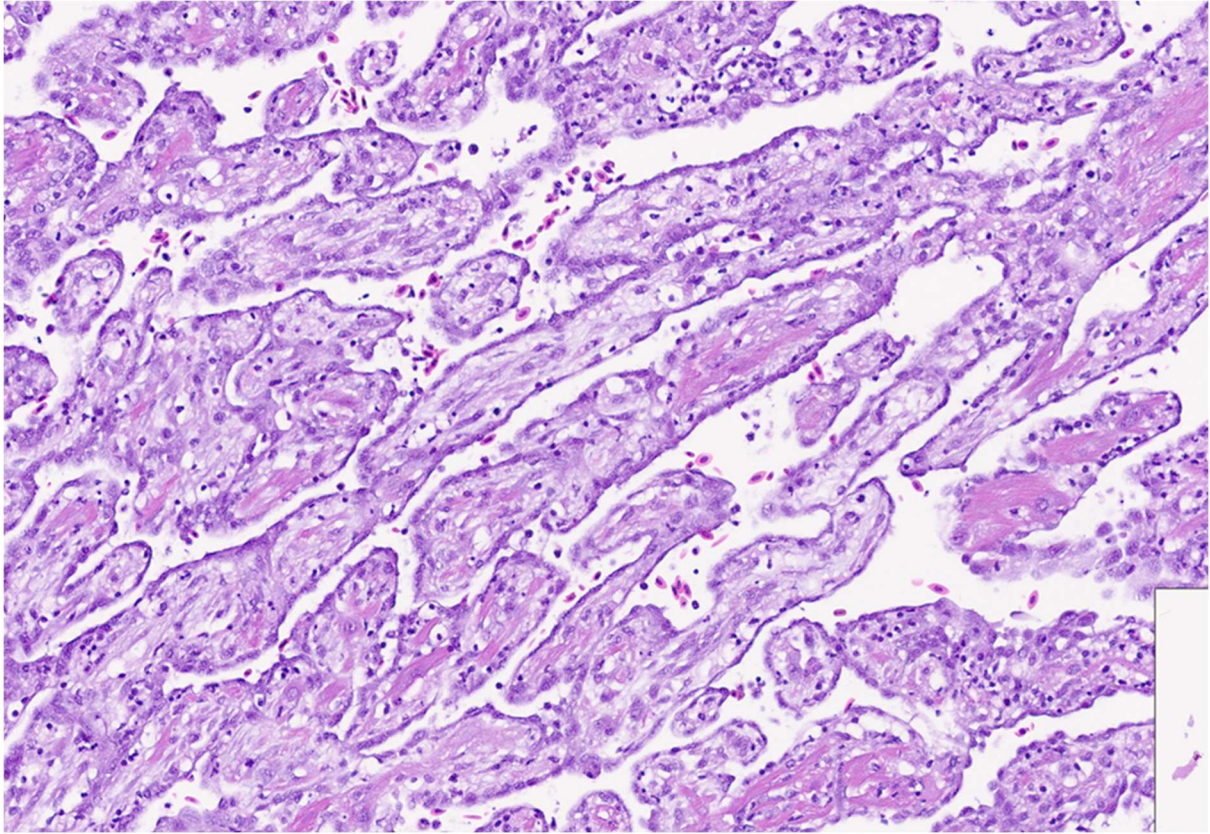
Figur 10. Snitt 32. Udifferensierte celler (sort sirkel). Snittet fikk score 4.



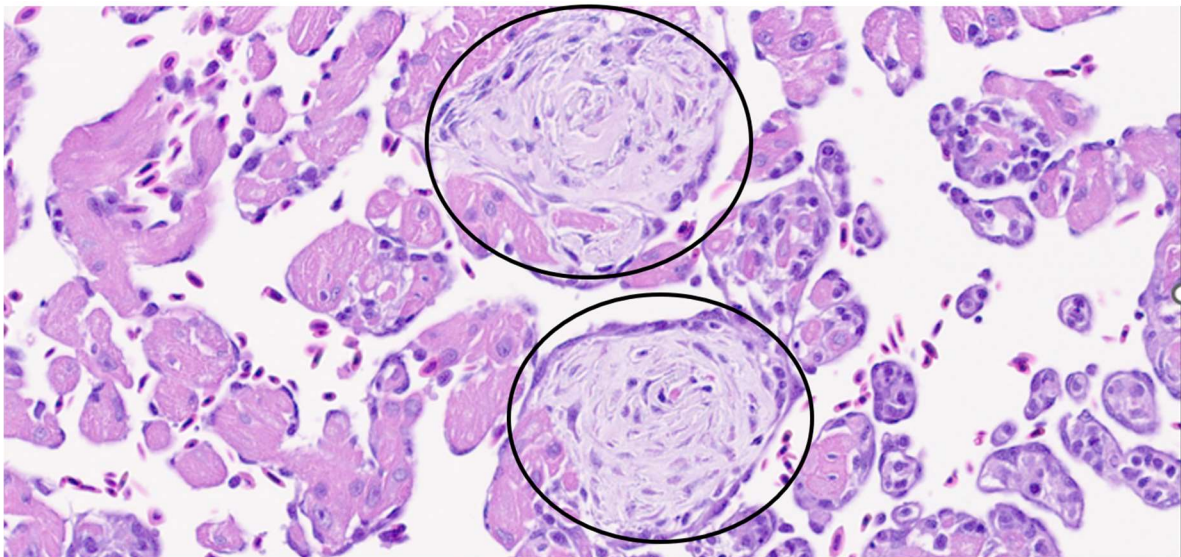
Figur 11. Snitt 36. Diffus utbredelse av bindevevsproliferasjon, med moderat forekomst av leukocytter og noe intakt myokard. Snittet fikk score 3,5.



Figur 12. Snitt 37 (atriet). Fokal utbredelse av bindevevsproliferasjon (sort pil) og endokardial hyperplasi (røde piler). Bindevev kun funnet i atriet i dette snittet. Snittet fikk score 4.



Figur 13. Snitt 38. Uttalt forekomst av «rørstrukturer» der noen er fylt av mononukleære betennelsesceller og noen har tendenser til fibroblastproliferasjon sentralt. Snittet har omtrent fullstendig fravær av intakte, funksjonelle kardiomyocytter. Snittet fikk score 4.



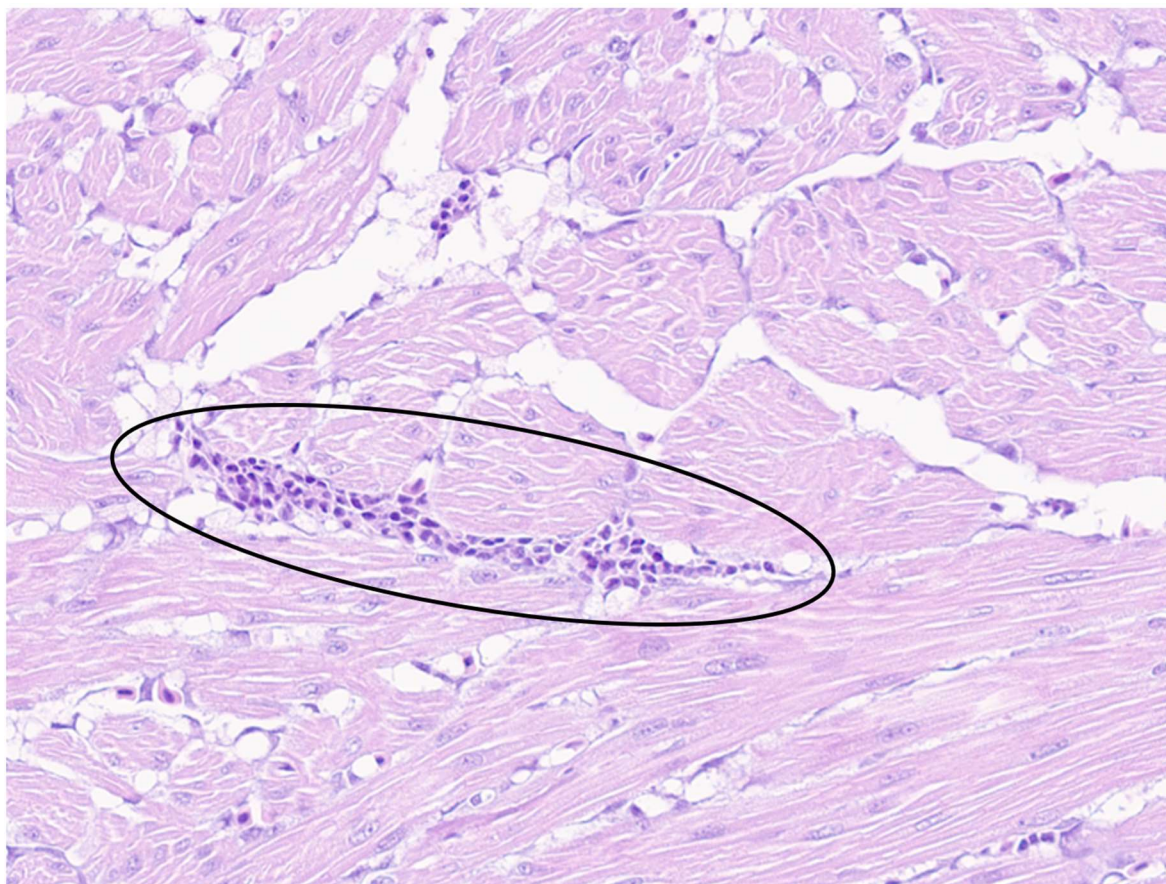
Figur 14. Snitt 40. Multifokal bindevevsproliferasjon (sorte sirkler). Snittet fikk score 2,5.

Studieutvalg 2

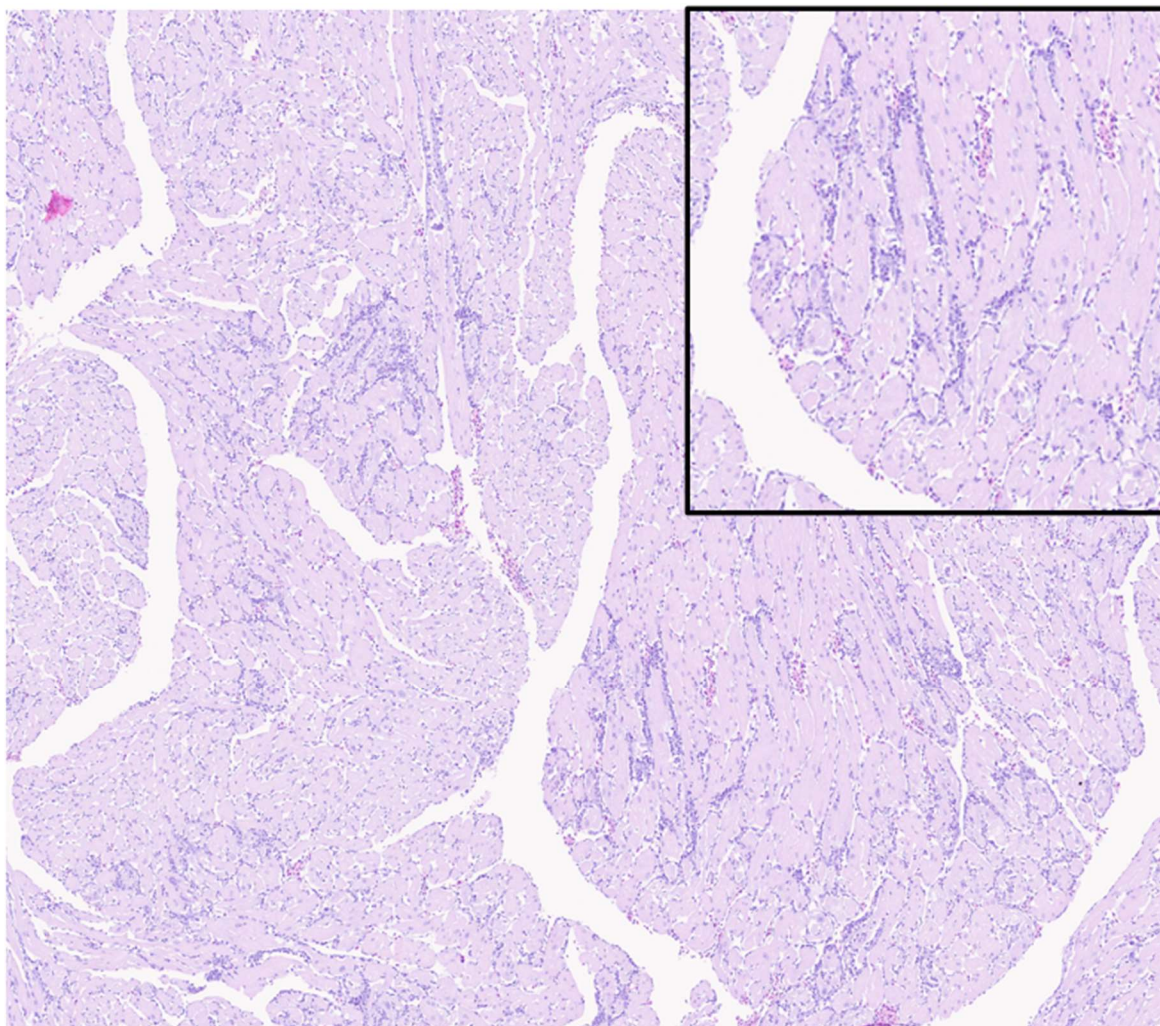
Snittene fra prøvematerialet som ble brukt videre til spesialfarging har varierende kvalitet. I enkelte snitt mangler deler av ventrikkel, hele/deler av atriet og to av snittene er snittet skjevt som vanskeliggjør vurdering (snitt 796 og 815). I vurdering av histopatologiske forandringer er det fokusert på forandringer i den spongiose delen av ventrikkelen. Det er ikke gjort spesifikk vurdering av atriet ettersom det i noen snitt er så uttalte forandringer at det er vanskelig å score, mens det i andre snitt mangler hele/deler av atriet.

Det er stor variasjon mellom snittene både med tanke på hvor utbredt og hvor uttalt vevsskaden er. I snittene med lavest score av forandring, er det hovedsakelig intakte muskelfibre med fokale områder med betennelsesceller, mononukleære og nøytrofile granulocytter (lappedelte kjerner) (Figur 15), samt eventuelt noe nekrose i de samme områdene. I snittene med moderate forandringer (score 2-3) er det mindre intakt muskelvev og multifokale til diffuse områder med betennelsesceller og nekrotisk vev (Figur 16). Det er variasjon innen snittene hvor det finnes avgrensede områder med moderat skade mens resten av hjertemuskelvevet er intakt. I andre snitt finnes diffust eller spredte (multifokale) forandringer i hele spongiosum.

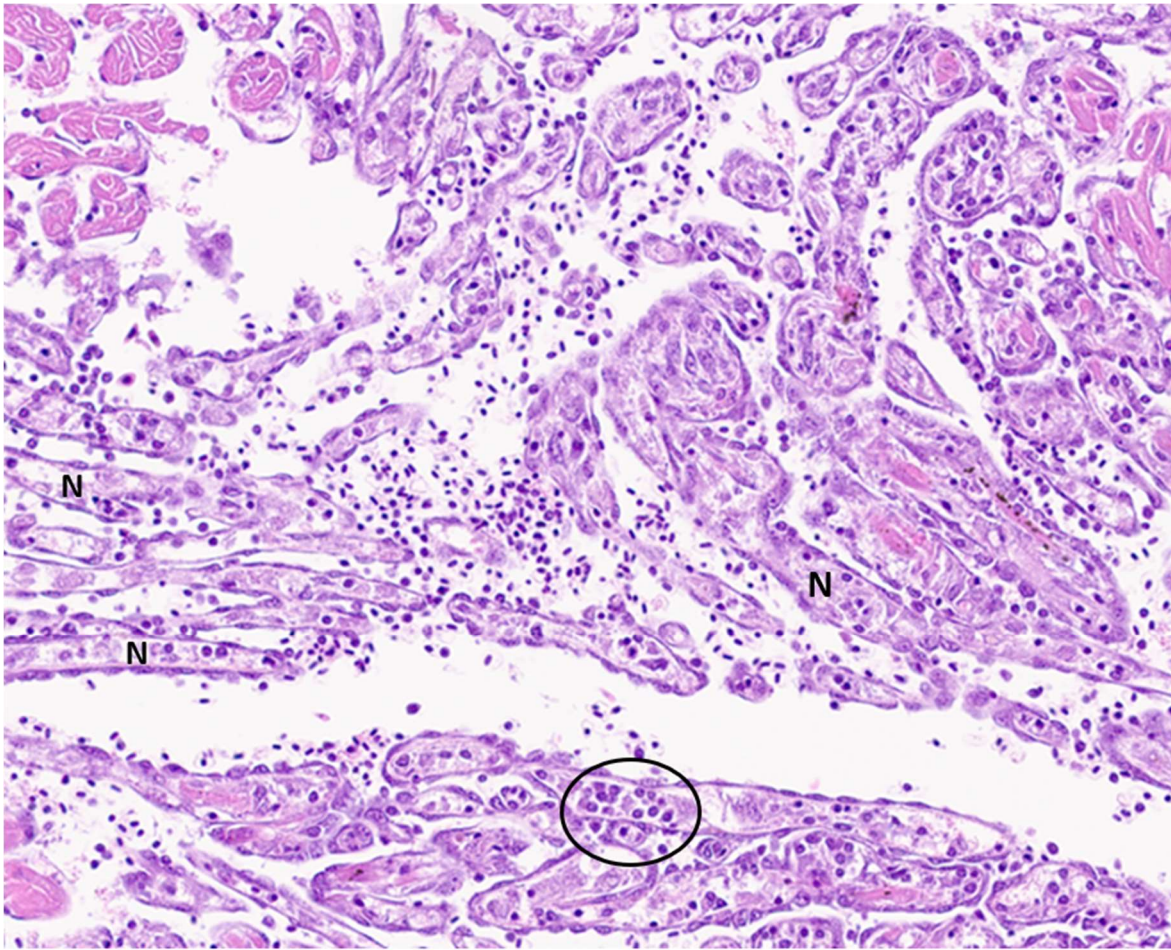
I snittene med de mest uttalte forandringene er det lite normalt spongiosum til stede, man finner kun rester av dette mellom nekrotisk vev og betennelsesceller (Figur 17). I noen av snittene med mer uttalte forandringer kan det sees såkalte «rørstrukturer», dvs. endokardial hyperplasi på hver side av en muskelfiber og hvor denne er fylt med betennelsesceller som erstatter sarkoplasma i kardiomyocytene (Figur 18).



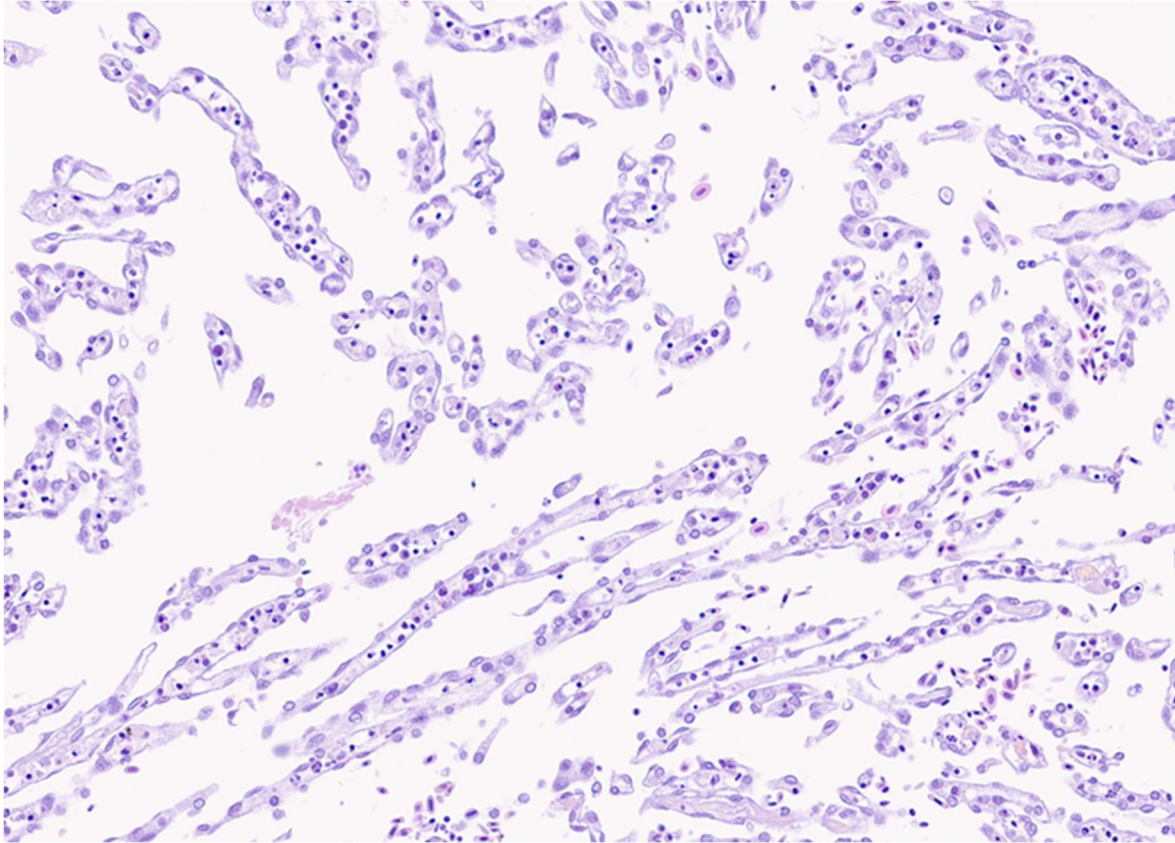
Figur 15. Snitt 795. Fokalt område med mononukleære betennelsesceller (sort sirkel). Snittet fikk score 0,5.



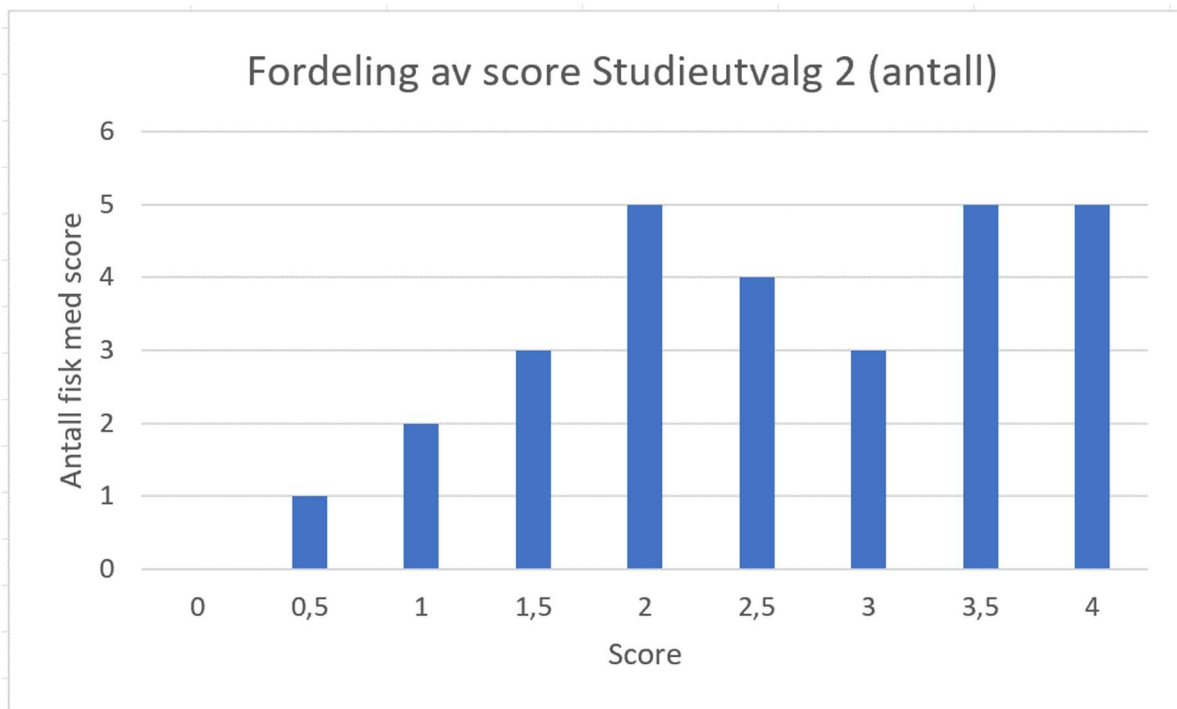
Figur 16. Snitt 799. Moderate forandringer, betennelsesceller mellom intakt vev. Snippet fikk score 2,5.



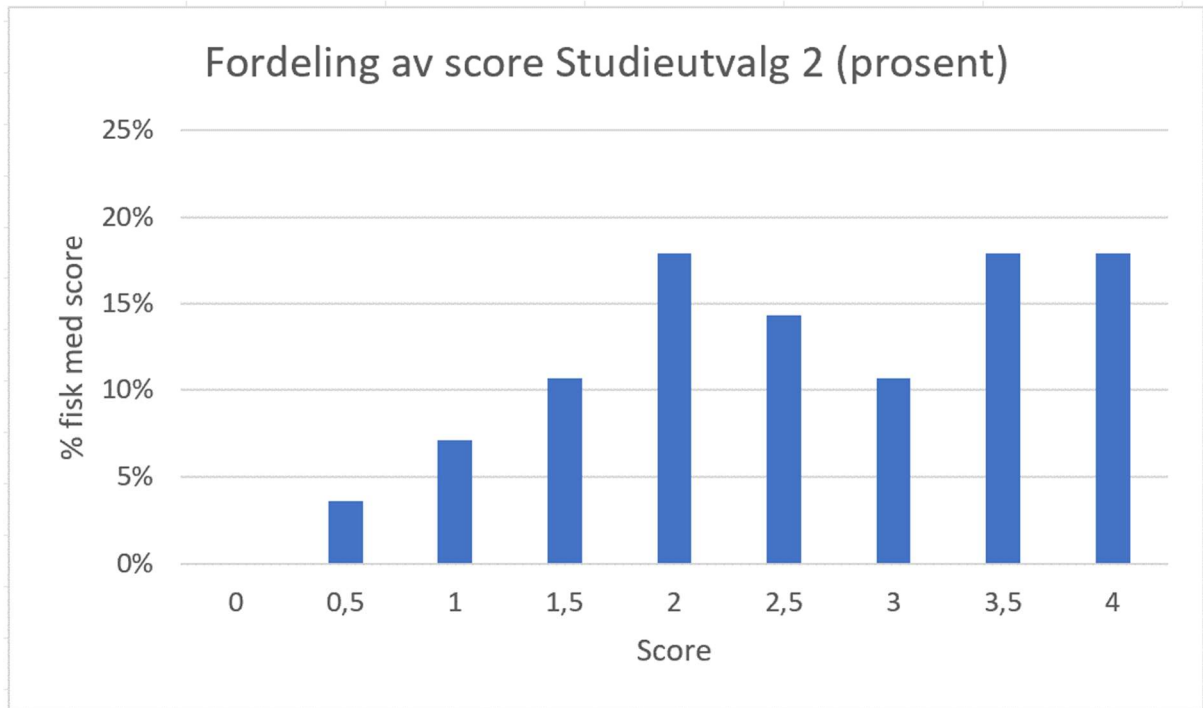
Figur 17. Snitt 789. Uttalte forandringer med mye betennelsesceller (sirkel), nekrose (N) og generelt lite av intakt normalt hjertemuskelvev. Snittet fikk score 3,5.



Figur 18. Snitt 792. Flere langs og tverskuttete «rørstrukturer». Snippet fikk score 4.



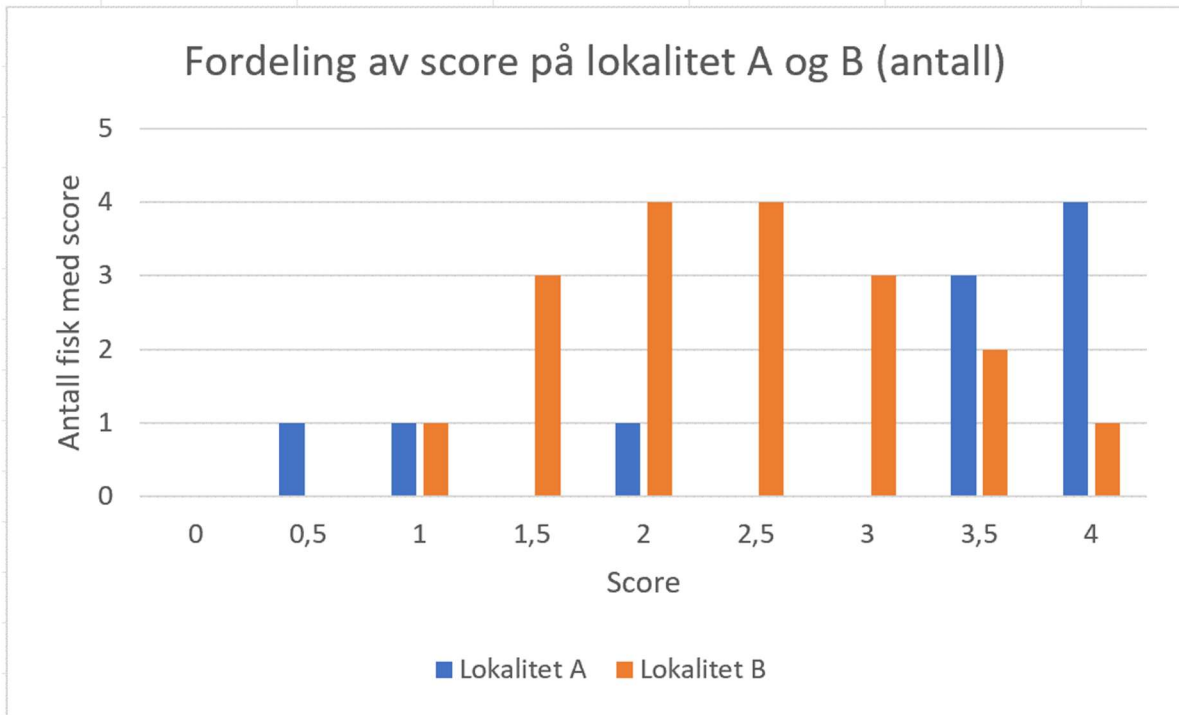
Figur 19. Fordeling av score i Studieutvalg 2 (antall).



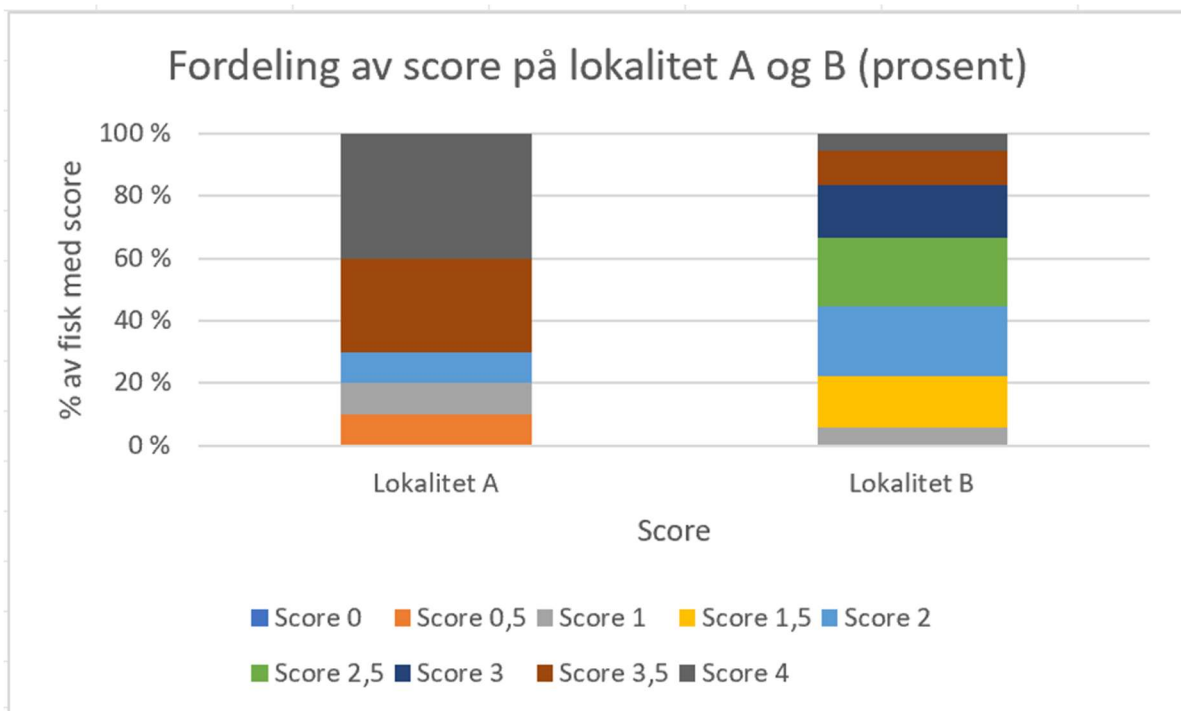
Figur 20. Fordeling av score i Studieutvalg 2 (prosent).

Figur 19 viser scoring av forandringer i HE-snitt på utvalget av fisk. Det er flest fisk (n=22/28) kategorisert fra score 2 og oppover, og 10 fisk som har de to høyeste scorene. Det er få fisk (n=6/28) i de laveste kategoriene, ingen er klassifisert som score 0 i dette utvalget.

Figur 20 viser fordeling av score i prosent.



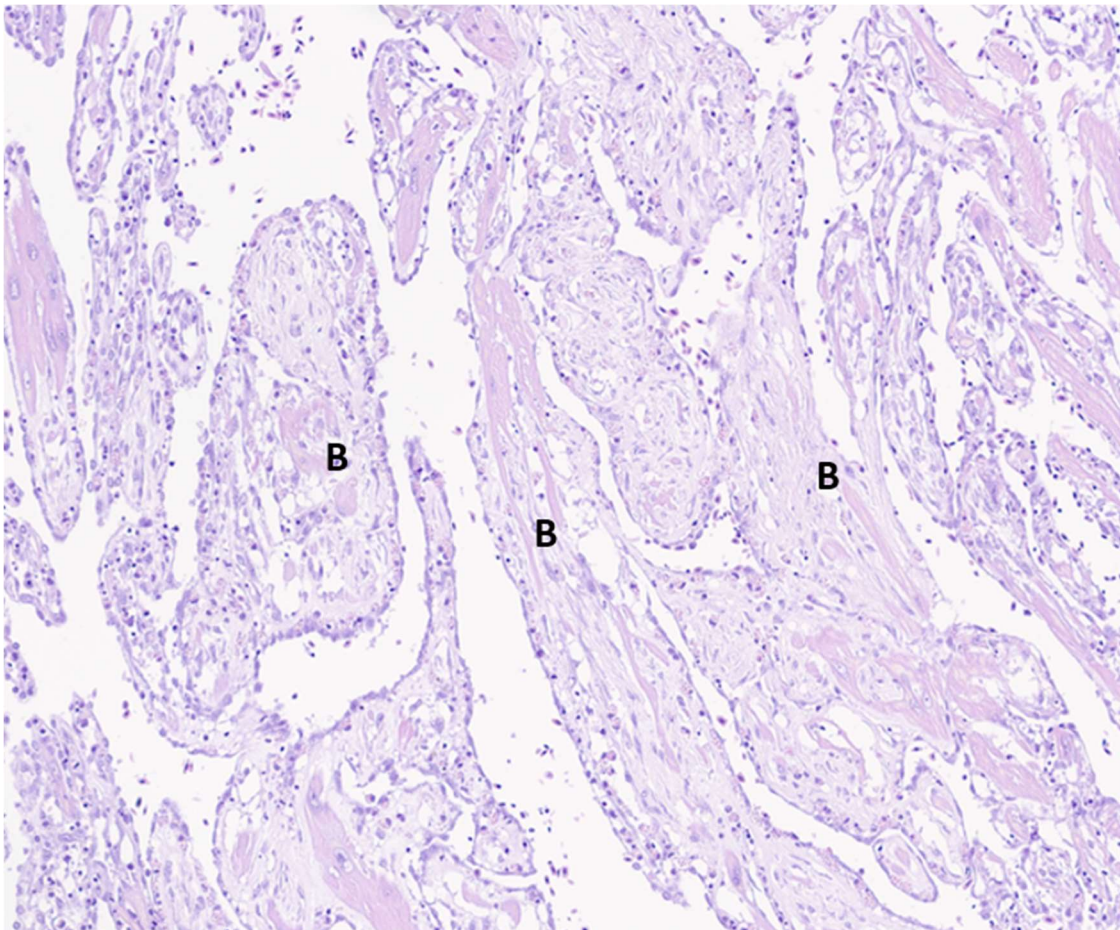
Figur 21. Fordeling av score for de to lokalitetene – antall fisk på y-aksen, score på x-aksen.



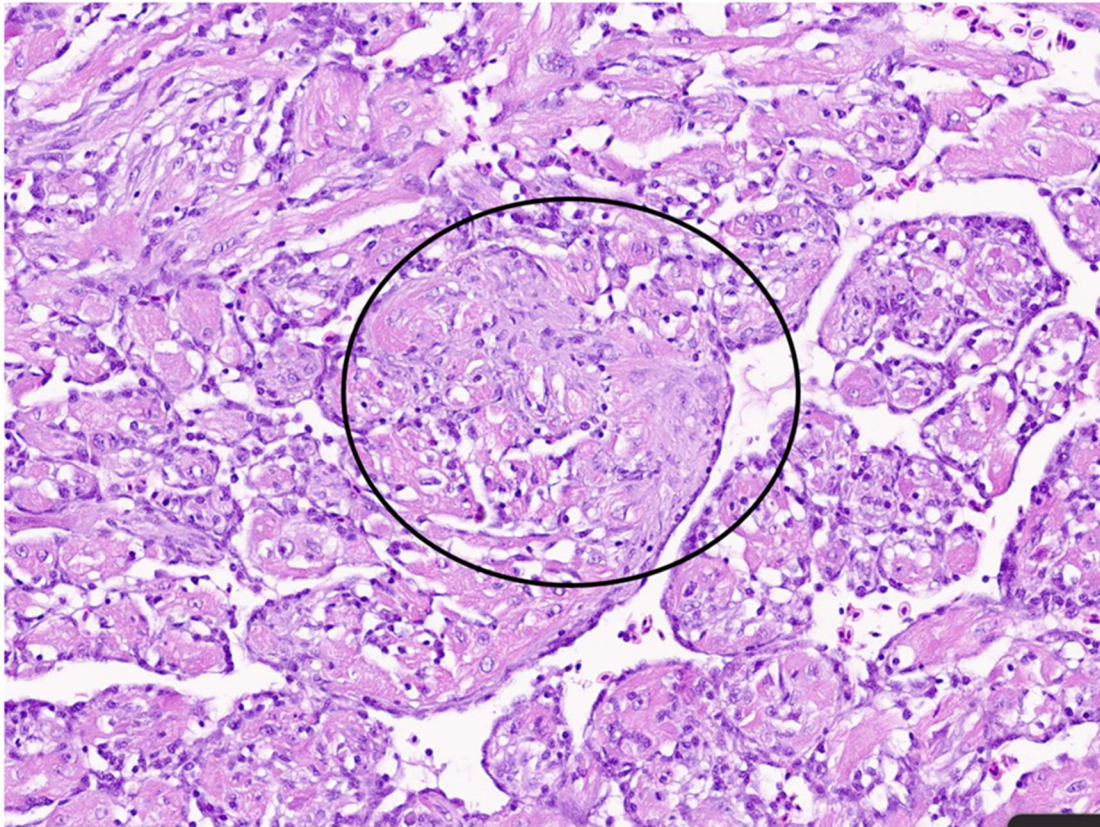
Figur 22. Scorefordeling i prosent for de to lokalitetene.

Figur 21 og Figur 22 viser fordeling av score på de to lokalitetene, A (blå) og B (oransje). Lokalitet A har 7/10 fisk på de to høyeste scorene, mens de resterende fiskene er på lavere score (2 og under). På lokalitet B ser vi en mer normalfordeling av score med flest fisk på score 2 og 2,5 (totalt 8 av fiskene, 44 %). Median score for A er 3,5 og for B 2,5.

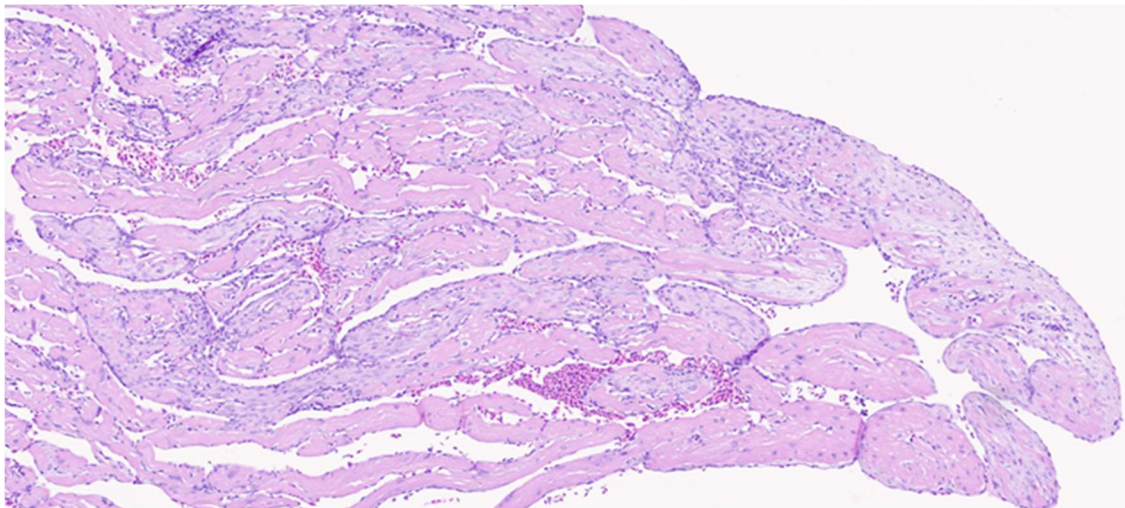
I 6 av snittene kan det sees vev som morfologisk ligner bindevev (Figur 23). Grad og utbredelse av dette vevet varierer. I noen av snittene sees kun mindre områder (Figur 24) mens i andre er det tydelige større områder som strekker seg inn mellom intakt vev (Figur 25). Både snitt gitt lavere score (2) og høyere score har slike forandringer.



Figur 23. Snitt 792. Bindevevsdannelse blandet med muskelfibre (B). Snittet fikk score 4.

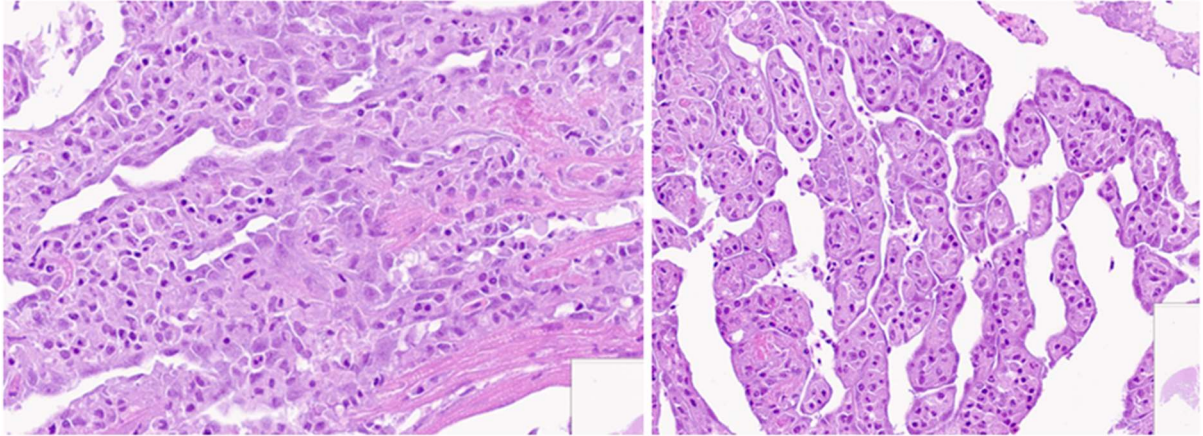


Figur 24. Snitt 809. Mindre område med bindevevsdannelse (sort sirkel). Snippet fikk score 4.



Figur 25. Snitt 803. Bindevevsdannelse blandet med normale muskelfibre. Snippet fikk score 2,5.

I 6 av snittene sees uidentifiserbare celler (store oppblåste, med lyse kjerner) som tolkes som mulig tegn på regenerasjon (Figur 26).

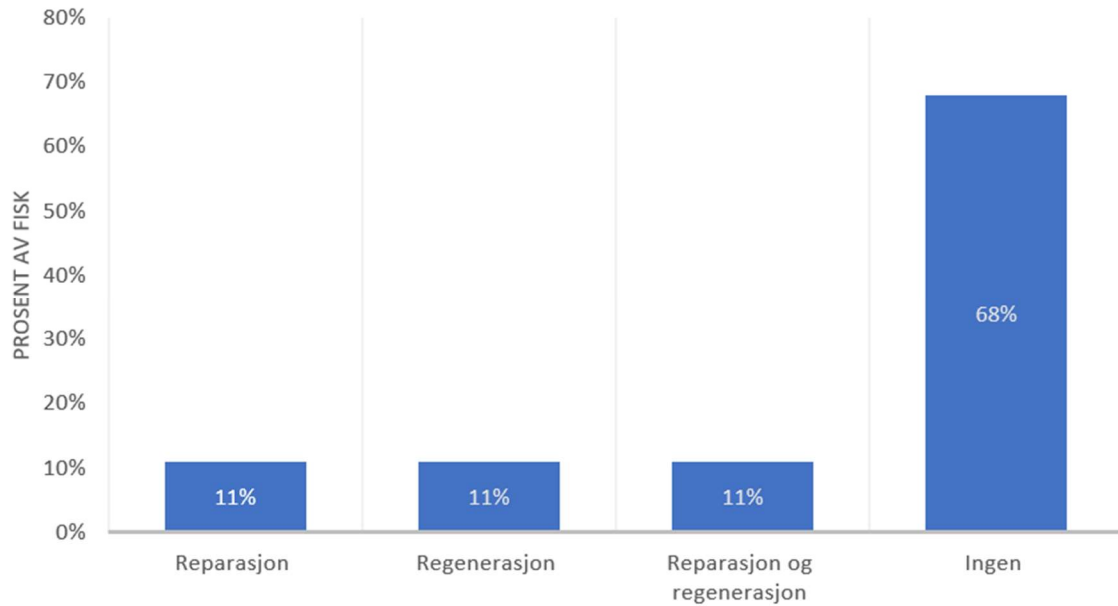


Figur 26. Snitt 788. Uidentifiserbare celler. Snittet fikk score 3,5.

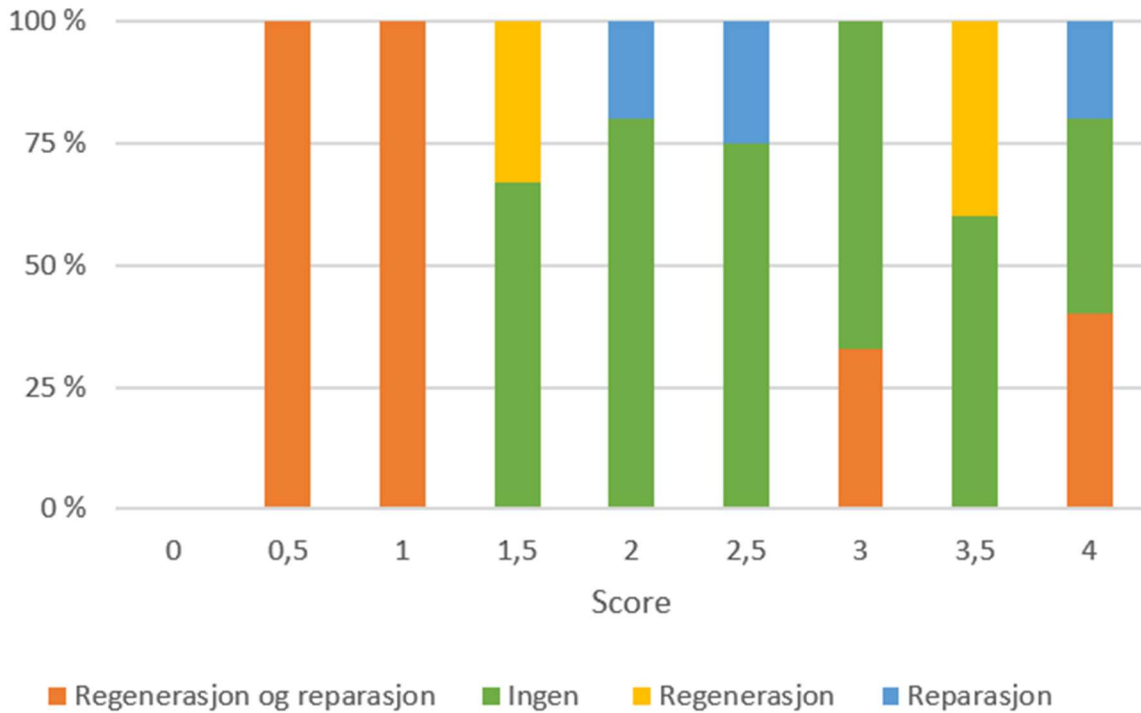
Snitt	Score	Regenerasjon	Reparasjon	Lokalitet	Snitt	Score	Regenerasjon	Reparasjon	Lokalitet
787	4	X	X	A	803	2,5		X	B
788	3,5	X		A	804	3			B
789	3,5			A	805	3,5			B
791	4			A	806	1			B
792	4	X	X	A	807	1,5			B
794	3,5			A	808	1,5	X		B
795	0,5			A	809	4		X	B
796	4			A	810	2			B
797	1			A	811	2			B
798	2		X	A	812	3	X	X	B
799	2,5			B	813	3,5	X		B
800	2			B	814	2,5			B
801	2,5			B	815	2			B
802	3			B	816	1,5			B

Tabell 4. Oversikt over snitt med tilhørende score, lokalitet og hvorvidt det er kategorisert med regenerasjon og/eller reparasjon. Regenerasjon: I lokalitet A ble 30 % av snittene kategorisert med regenerasjon, i lokalitet B 16 %- totalt 21 % i hele utvalget. Reparasjon: 20

% av snittene ble kategorisert med reparasjon i lokalitet A, 16 % i lokalitet B, totalt 18 % for hele utvalget.



Figur 27. Fordeling av reparasjon, regenerasjon, funn av begge, eller ingen, uavhengig av snittscore.

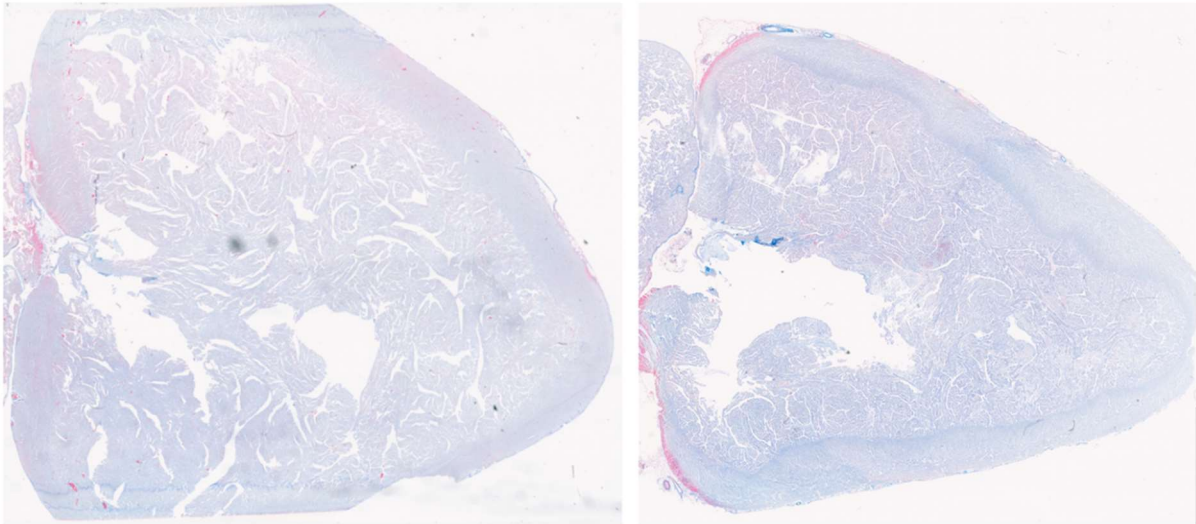


Figur 28. Fordeling av snitt med reparasjon, regenerasjon, funn av begge, eller ingen, i forhold til score.

Tilleggsbemerkninger om prøvemateriale fra lokalitet: Lokalitet A: Flere fisk var degradert, atriets hos noen fisk var kraftig degradert. Lokalitet B: Alle fiskene hadde petekier i abdominal hud. Det ble ikke funnet tegn til blod i perikardium. Det ble i tillegg bemerket svullen lever med delvis rød farge.

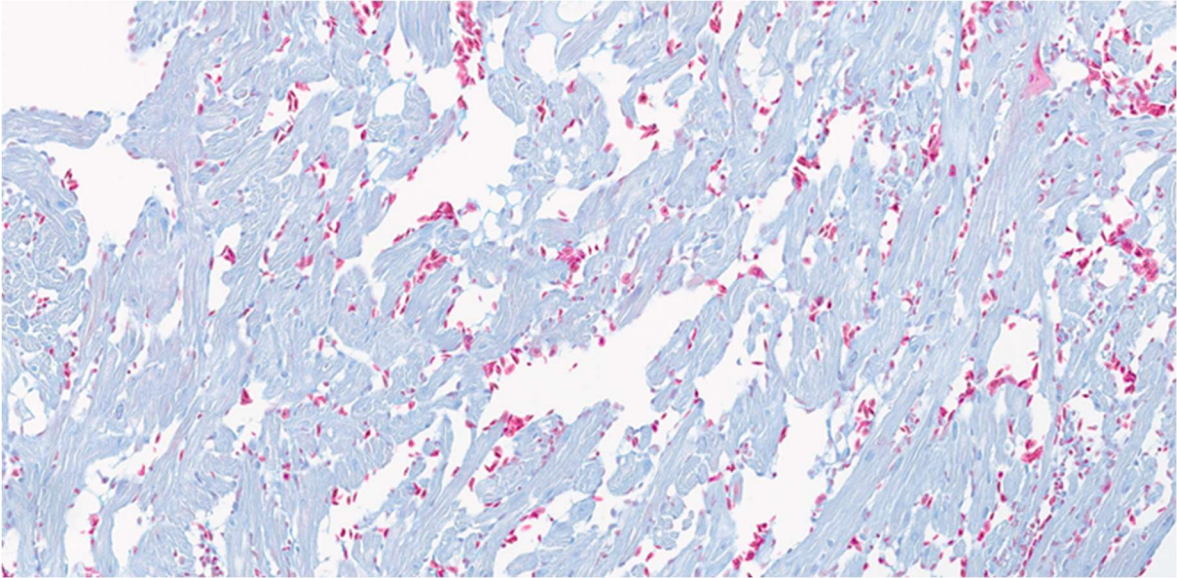
Massons Trichrome

Alle snittene spesialfarget med Massons Trichrome er dominert av en svak blåfarge av muskulatur. Dette gjelder hjertemuskel fibre med normalt utseende, snitt med lite forandringer og snitt med mer uttalte forandringer, alle farges lyseblått (Figur 29).

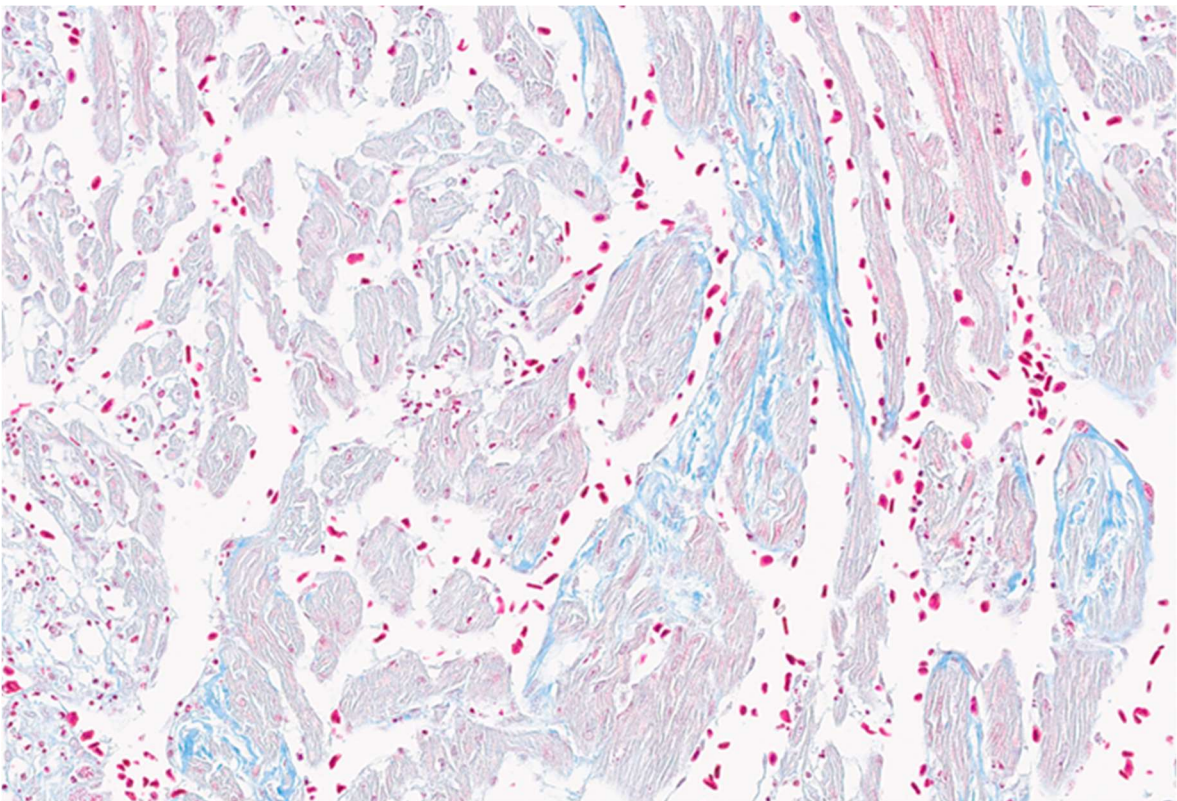


Figur 29. V: Snitt 797 (score 1). H: Snitt 791 (score 4). Begge snittene domineres av lyseblå farge.

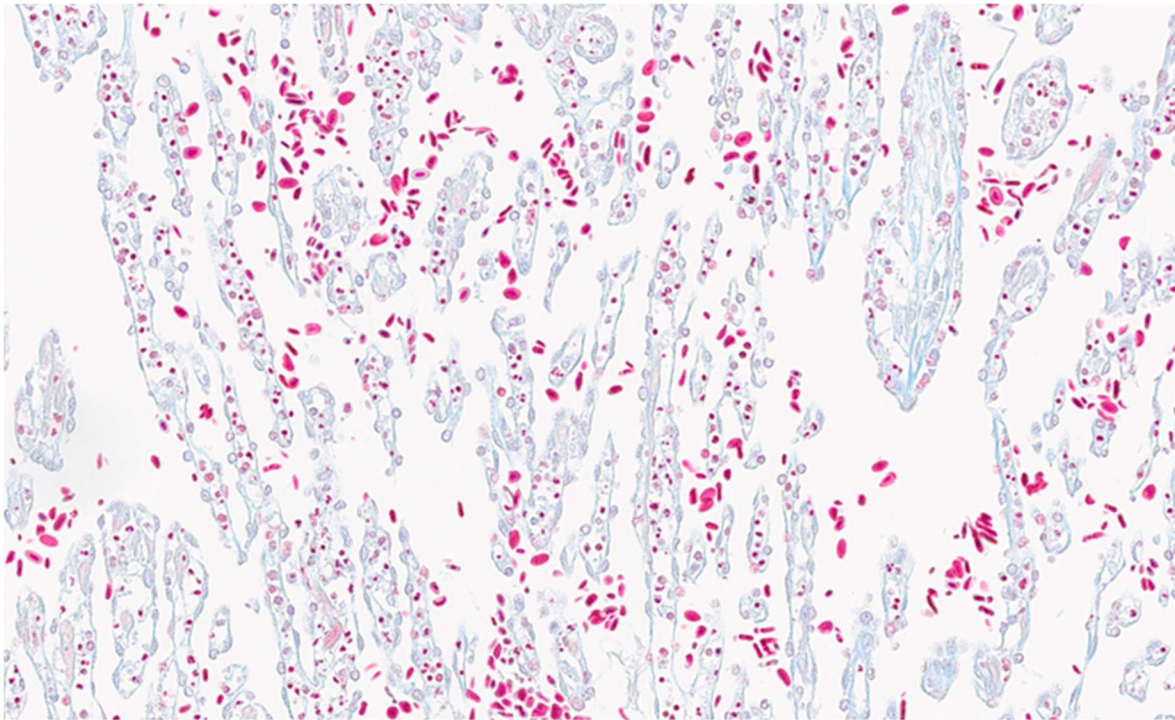
Blåfargen er jevnt fordelt i muskelvevet, både i kompaktum og spongiosum. Mens noen av snittene er nesten helt blå (Figur 30) med kun enkelte skimt av rødt/rosa, har andre et mer rosa preg (Figur 31). Massons Trichrome er angitt å farge muskelvev med rød/rødlig farge. I vev som mangler intakte muskelfibre kan man se noe som likner på tomme baner farget blått (Figur 32). Kjernene på myocytene varierer i farge; i fibre med rød farge er kjernen også farget rød, mens i fibre farget blått varierer de mellom å være blåfarget eller å ha et rosa-skjær. Massons Trichrome skal gi bindevev/kollagen en blå/blågrønn farge.



Figur 30. Snitt 797. Tilsynelatende intakte fibre farget blålig. Noen steder skimtes rosa skjær i fiberen. Erytrocytter er rød.



Figur 31. Snitt 792. Muskelfibre farget hovedsakelig rødt. Noen områder med intens blåfarge, kan skyldes ujevn farging.

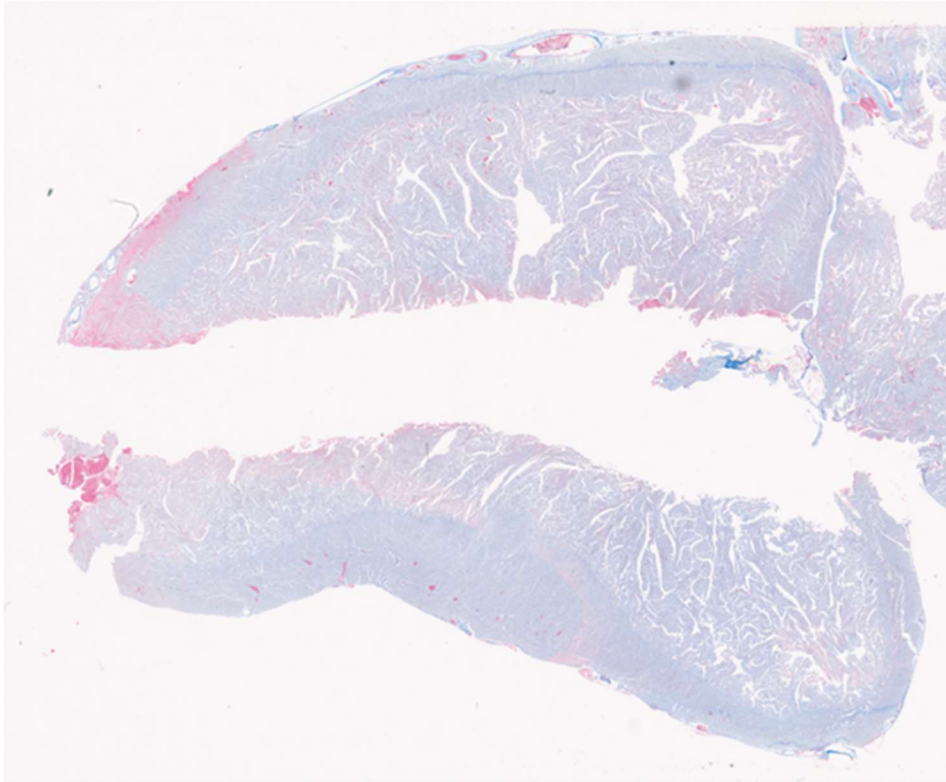


Figur 32. Snitt 792. Tomme, blå fibre uten sarkoplasma/muskelvev. Røde erythrocytter spredt i og rundt vevet.

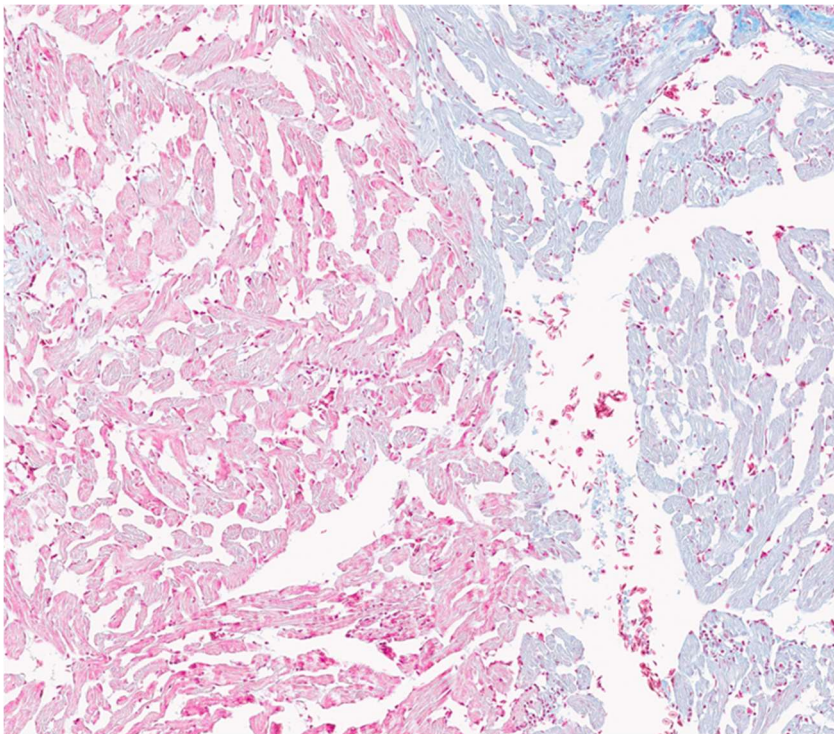
I noen av snittene er det klare, røde områder med normalt hjertemuskelvev, disse områdene er hovedsakelig i utkanten av snittet (kompaktum eller innerst mot ventrikkelhulen) (Figur 33).

Da det ved undersøkelse ikke virker å være noe som skiller disse områdene fra resten av snittet kan det tenkes at det ikke har kommet nok farge til i disse områdene under fargeprosessen. I enkelte av snittene er det noen områder med intens blåfarge som kan skyldes ujevn fordeling av farge istedenfor reell kollagenavsetning. Dette går også igjen innad i noen av snittene der det er brå overganger mellom rød og blå farge uten noen tilsynelatende sammenheng med vevsskade, og enkeltfibre kan være farget halvt rosa/blått (Figur 34).

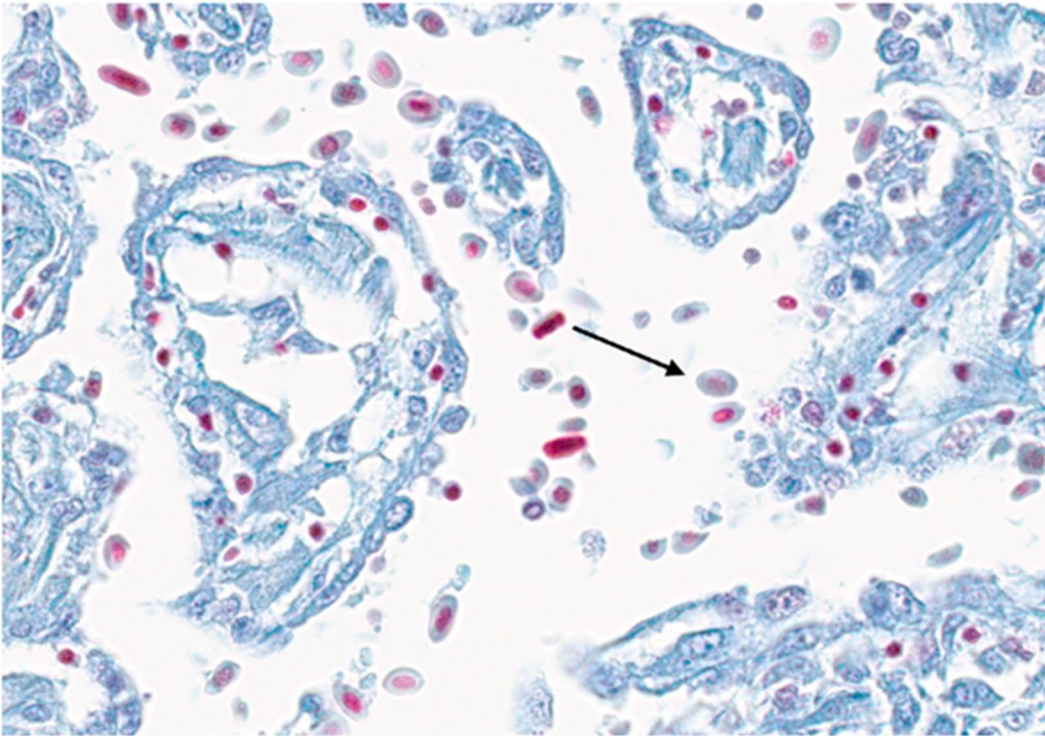
Erythrocyttene i snittene er i hovedsak farget røde, men i enkelte av snittene er cytoplasma i disse også farget blått (Figur 35).



Figur 33. Snitt 808. Rødfarge ytterst i kompaktum og innerst mot ventrikkelhulrommet.



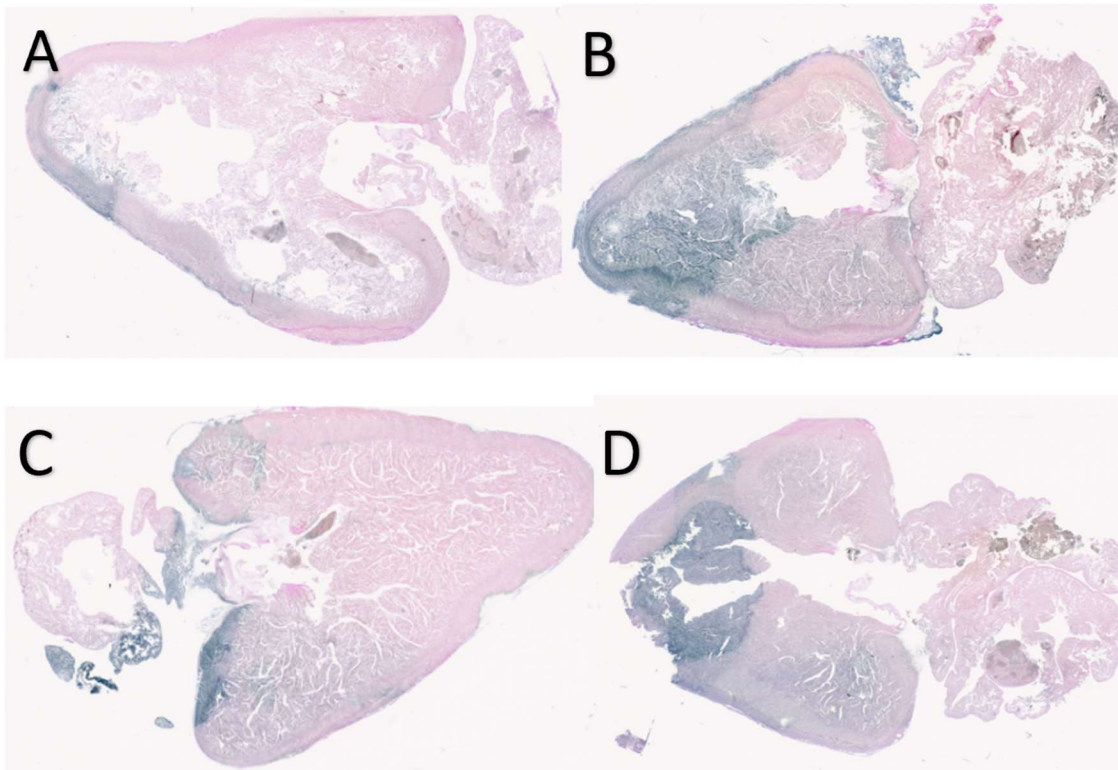
Figur 34. Snitt 803. Brå overgang mellom muskelfibre farget blått/rødt. Noen muskelfibre virker å bytte farge innad i fiberen, indikasjon på ujevn farging.



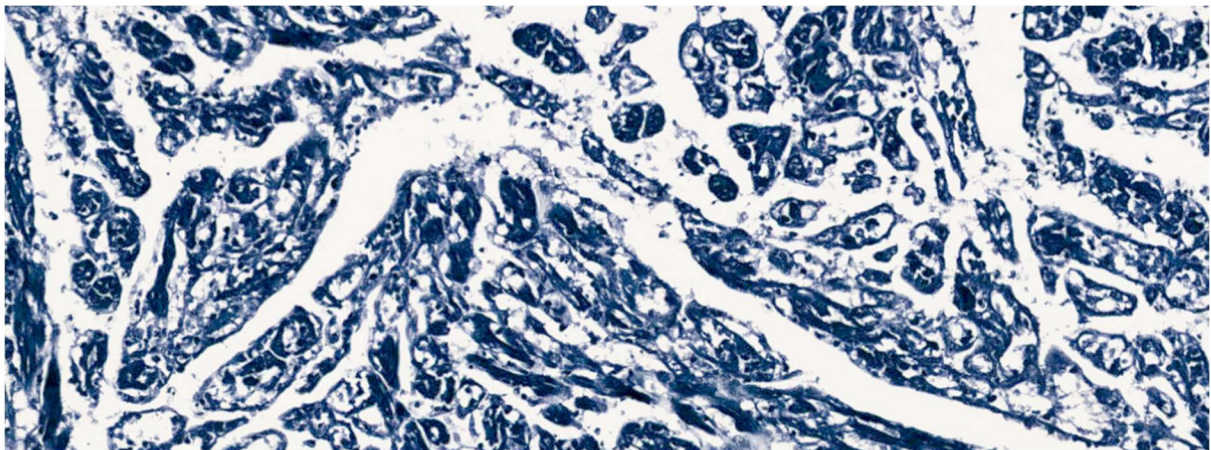
Figur 35. Snitt 787. Pil som peker på erytrocytt med blått cytoplasma.

Elastin Van Gieson (EVG)

I snittene våre farget med Elastin Van Gieson (EVG) fikk vi et noe uforventet utfall av resultatene, men også noen resultater som gir mer mening med teorien. På alle av snittene ser man på oversiktsbildene at noen tilfeldige områder har tatt til seg mye blå/svart farge der det ikke egentlig er elastiske fibre (Figur 36 og Figur 37).



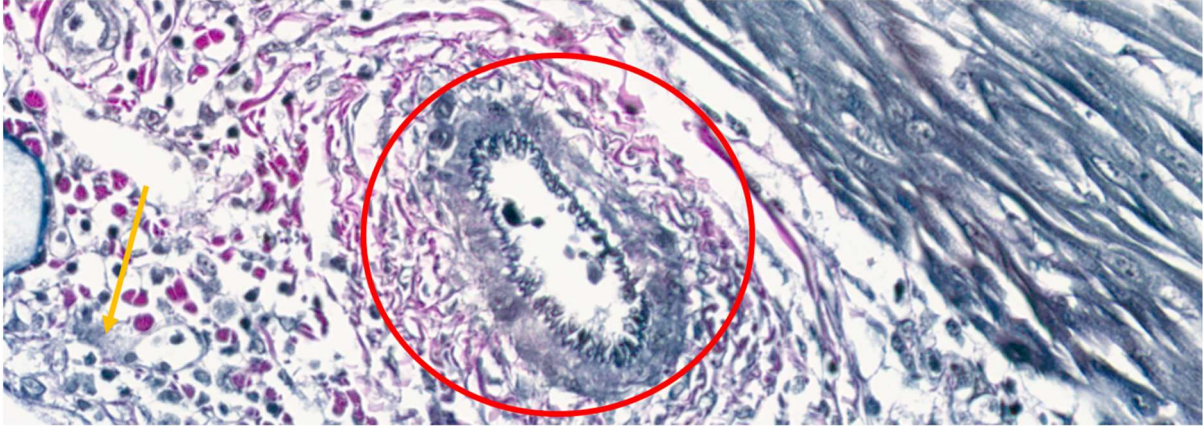
Figur 36. Tilfeldige områder farget blått/sort på samtlige snitt i studieutvalget. Eksemplene her er snitt 787 (A), 791 (B), 794 (C) og 809 (D).



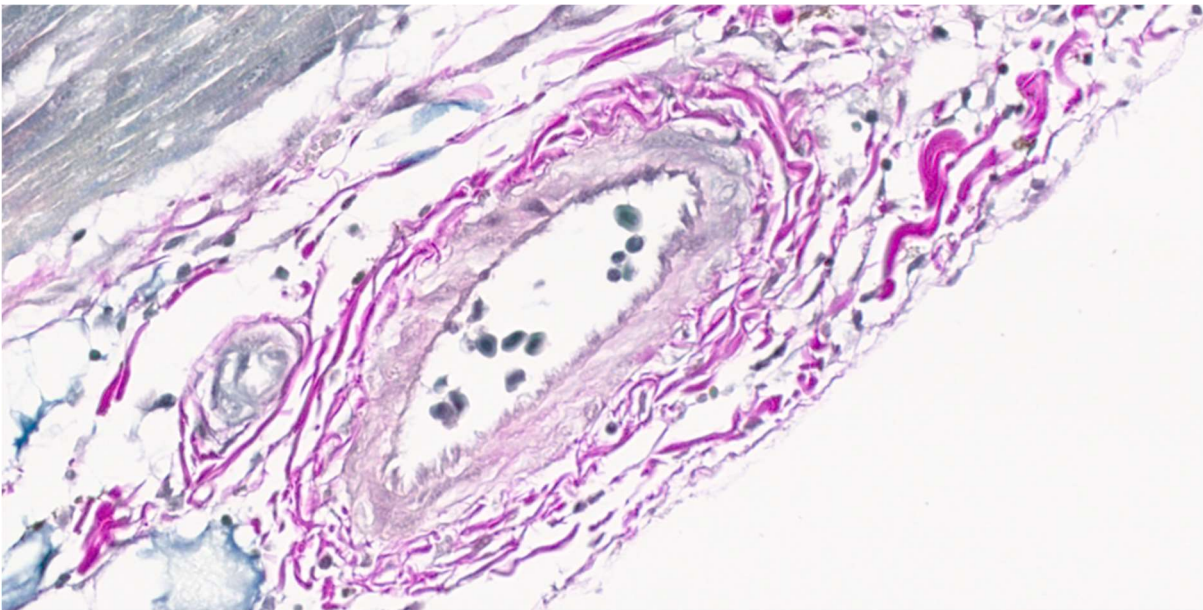
Figur 37. Snitt 791. Et område som tok til seg mye blå/sort farge.

Epikard består av en tynn hinne med bindevev som består blant annet av fett, koronararterier og elastin (LibreTexts). I våre resultater sees en tendens til blå/sort farging langs epikard på

samtligte snitt. I tillegg er veggen i enkelte koronararterier farget blå/sort (Figur 38), mens andre har blitt farget sterkt rosa, som i teorien skal indikere forekomst av kollagen (Figur 39).

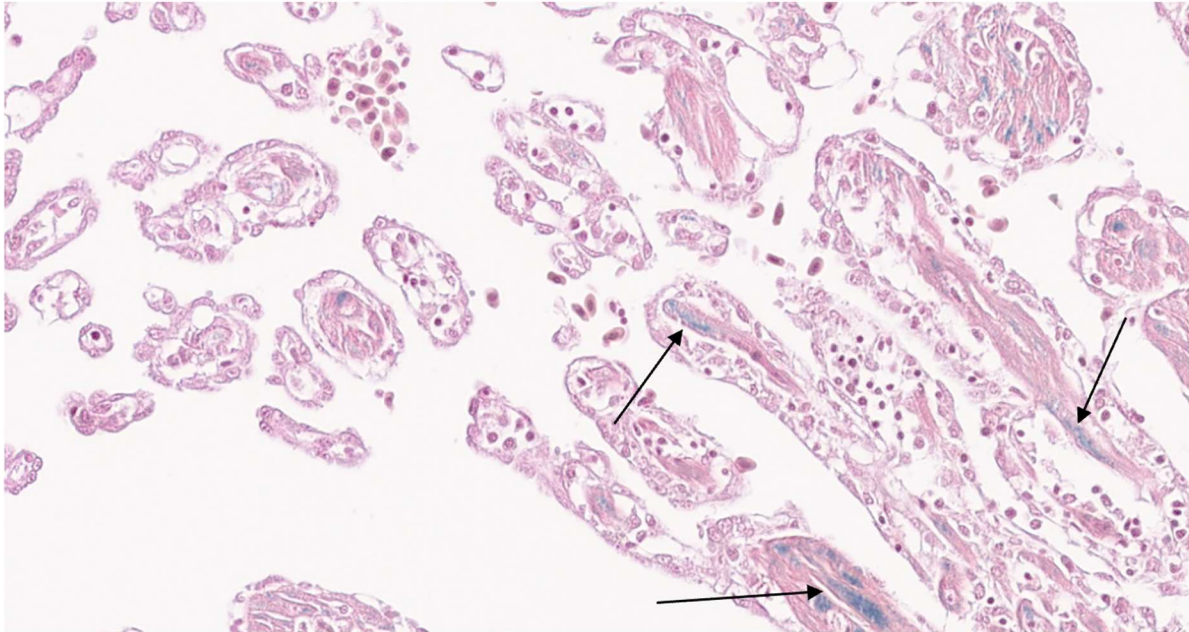


Figur 38. Snitt 787. Blå/sort farging rundt koronararterien (rød sirkel) som kan indikere forekomst av elastin. Det er også blå/sort farging av trådet materiale i epikard (gul pil).

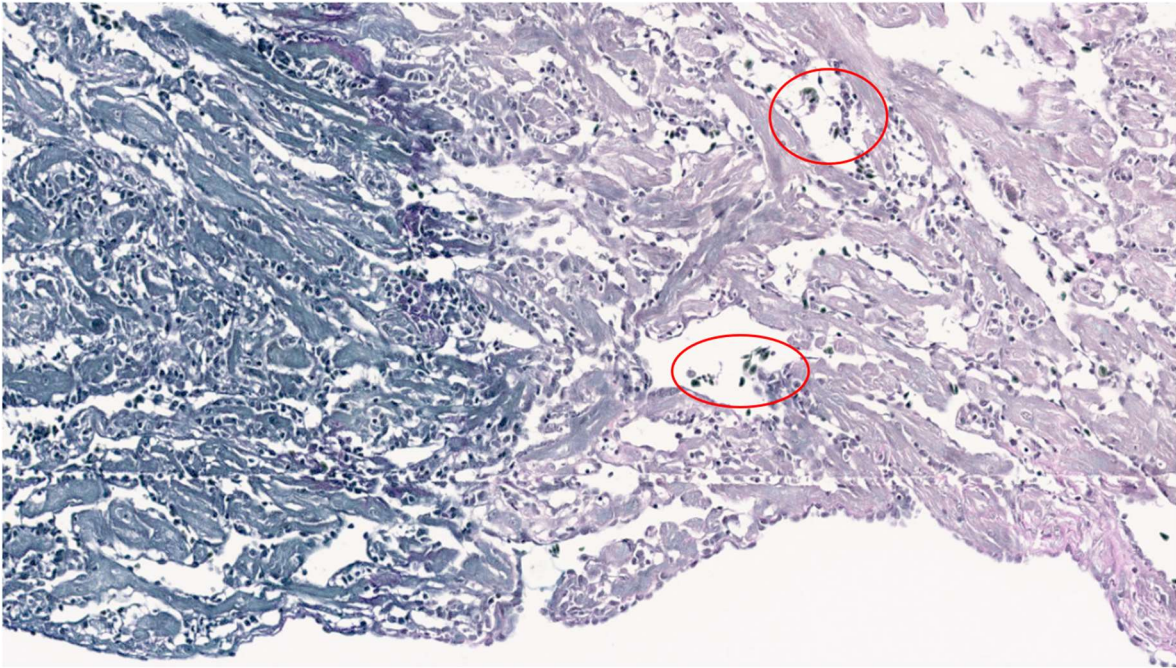


Figur 39. Snitt 794. Rosa farging rundt koronararterien som skal indikere forekomst av kollagen.

I spongiosum er tendensen på samtlige snitt at det ikke farges noe blått/sort, vevet forblir rosa. Unntaket er noen intakte cellekjerne som tar opp fargen blå/sort og stemmer med teorien (Figur 40). I teorien skal spongiosum med intakte kardiomyocytter farges gult, det er ikke tilfellet i våre resultater. Enkelte tilfeldige områder i spongiosum er farget blått/sort, med plutselig brå overgang til rosa (Figur 41).

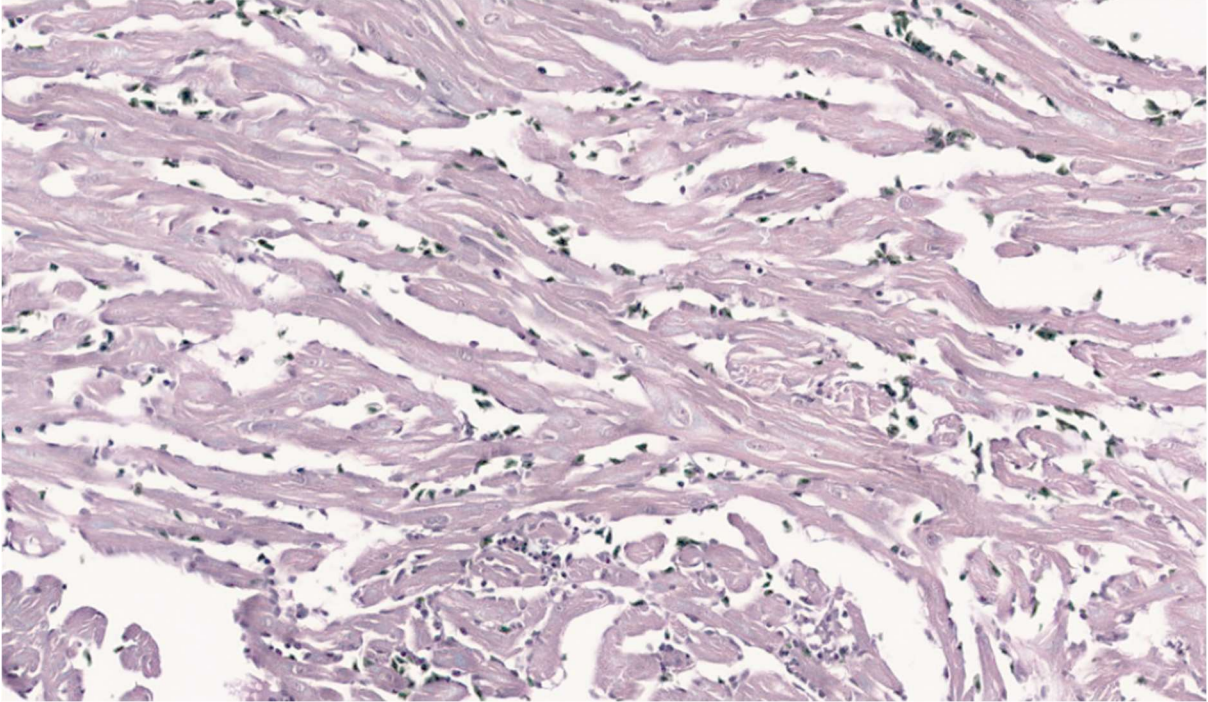


Figur 40. Snitt 787. Det ble funnet både fibroblaster og celledifferensiering. Enkelte intakte cellekjerne er farget blått/sort (piler), men ingen forekomst av reparasjon i form av elastiske fibre. Vevet forblir rosa.

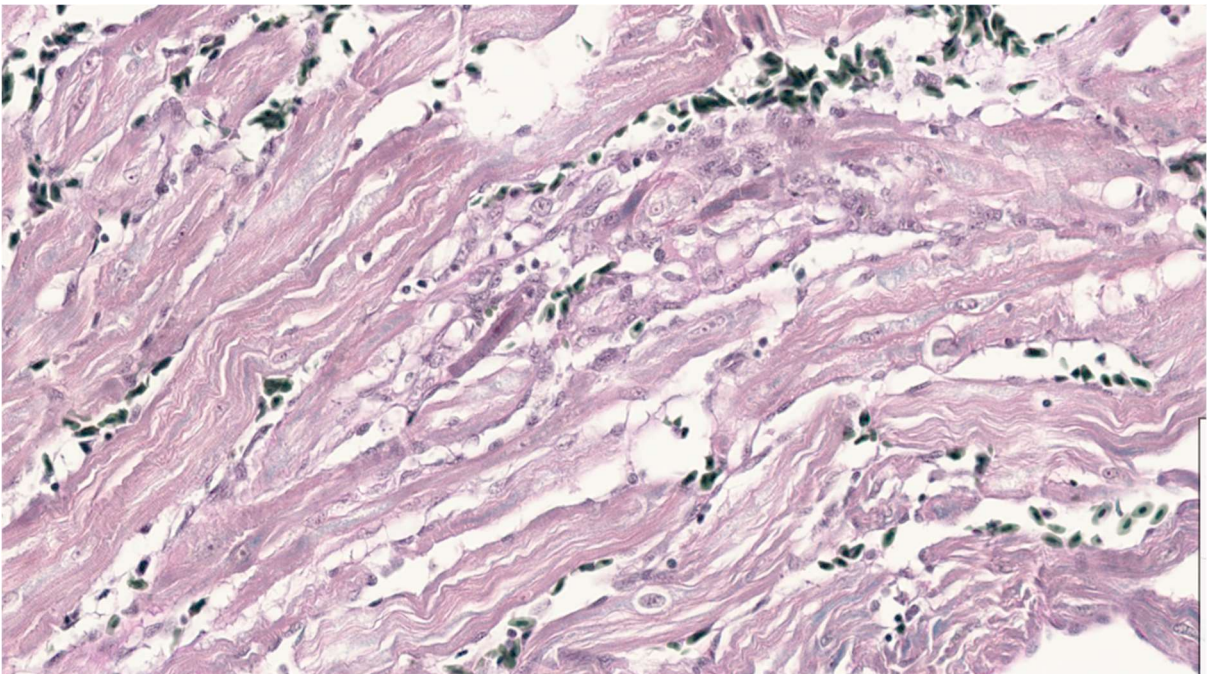


Figur 41. Snitt 809. HE-snittet hadde forekomst av bindevev. Her har et tilfeldig område av spongiosum tatt til seg mye blå/sort farge, med en relativt brå overgang til mer rosa farging igjen. Erytrocytter blir tydelig farget blått/sort (røde sirkler).

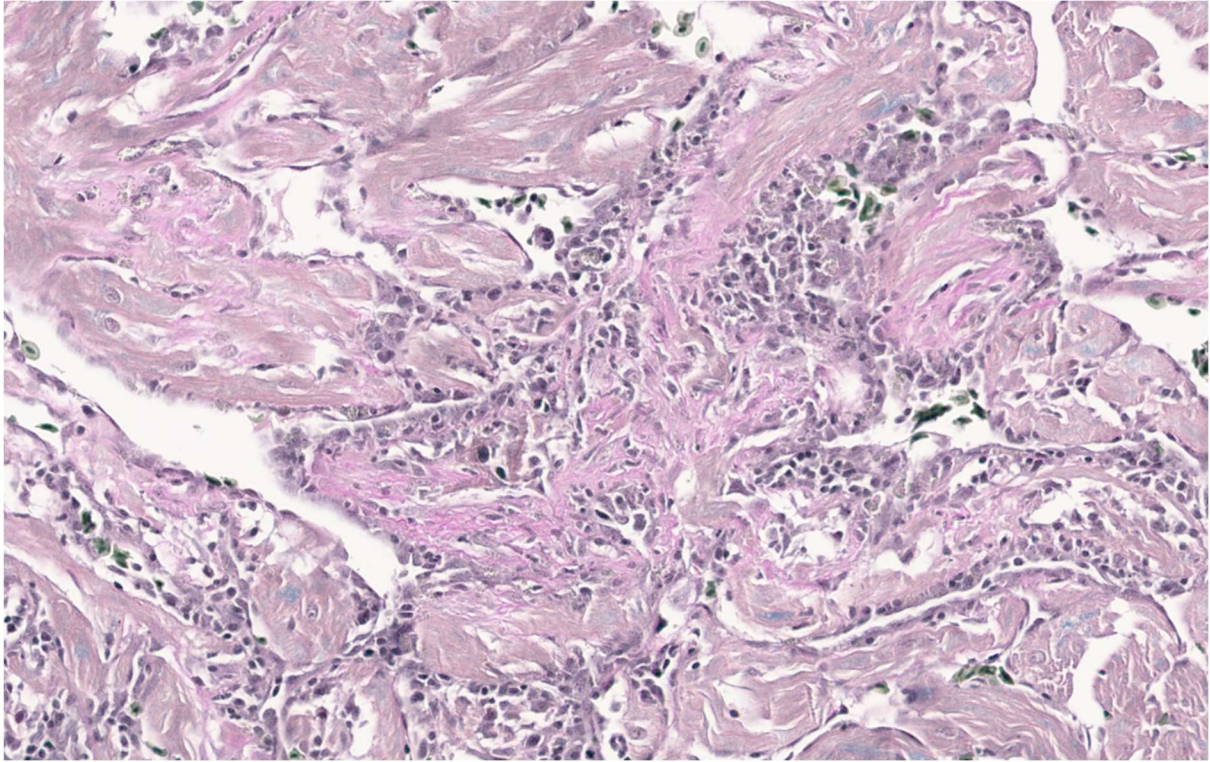
Når det kommer til rosa/rød farging av kollagen, ser man at snitt som det ikke ble funnet store skader eller bindevev i, ikke har rosa/rød farging i spongiosum (Figur 42). De av snittene med bindevevsforekomst i HE-fargingen, har sjeldent tatt til seg rød/rosa farge (Figur 43). I noen snitt med mye reparasjon er det imidlertid funnet områder med en klar, rosa farge i spongiosum som kan indikere kollagenforekomst (Figur 44).



Figur 42. Snitt 797. Her ses ingen sterk rød/rosa farge, sammenfallende med funn på HE-snitt der det ikke var tegn til reparasjon (intakte kardiomyocytter skal i teorien farges gult med EVG).



Figur 43. Snitt 812. Det var funn av mye bindevev i HE-snittet. Her et område med mye skade og bølgete fibre som kan være kollagendannelsen, men de har ikke blitt farget rosa/rødt.



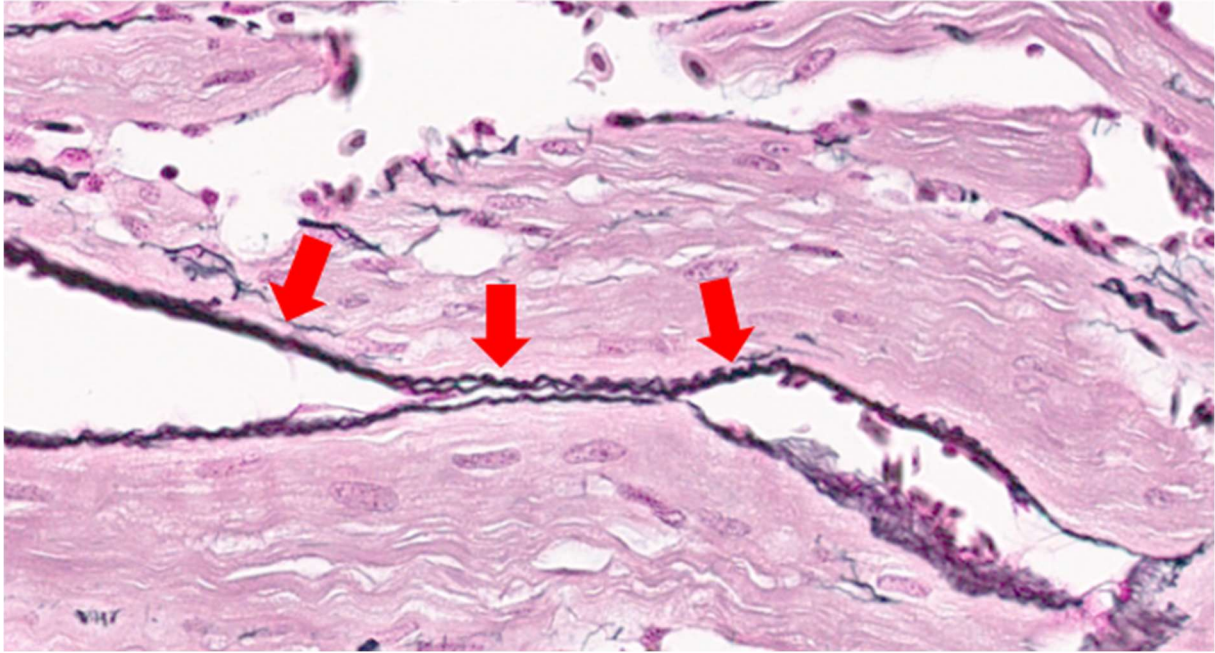
Figur 44. Snitt 803. Rosa, bølgende farging innimellom skadede kardiomyocytter, noe som indikerer avsetning av kollagen, dvs. en fibrose.

Reticulin

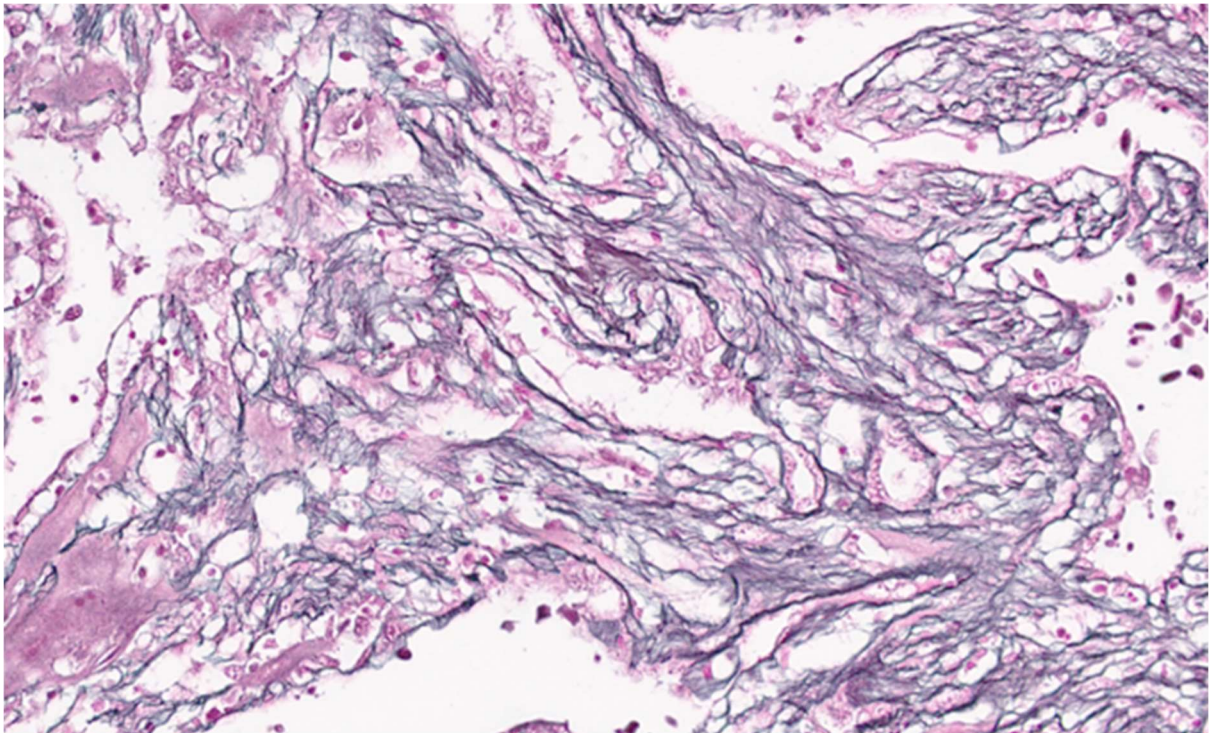
Den videre histologiske beskrivelsen fokuserer på ventrikkelens spongiøse del.

Det er stor variasjon i utvalget av snitt. Det dominerende inntrykket er mørke/svarte drag iblant røde bakgrunnsfargede kardiomyocytter. Høyere forstørrelse viser drag som følger ytterkanten av kardiomyocytterne hvor de mørkfargede fibrene har en varierende tykkelse (Figur 45). I tillegg ser man mørke drag på innsiden av kardiomyocytter som til dels i områder erstatter muskelfibrene (Figur 46).

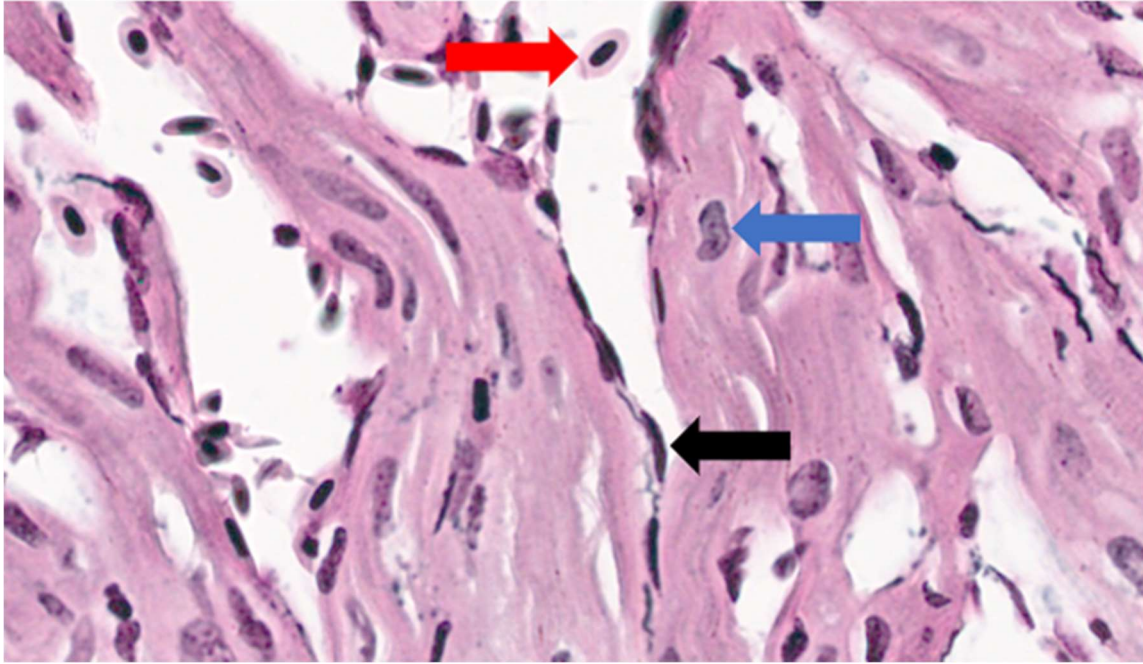
I noen snitt ser man opptak av farge i cellekjerner (Figur 47).



Figur 45. Snitt 797. Illustrerer mørke drag langs ytterkanten av kardiomyocytter (røde piler).

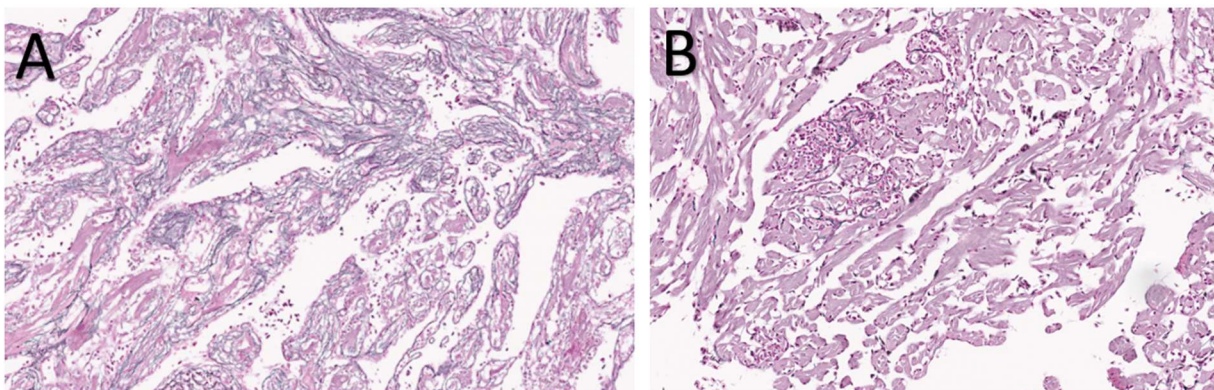


Figur 46. Snitt 787. Viser mørke drag langs ytterkanten og på innsiden av kardiomyocytter som til dels erstatter muskelfibre.



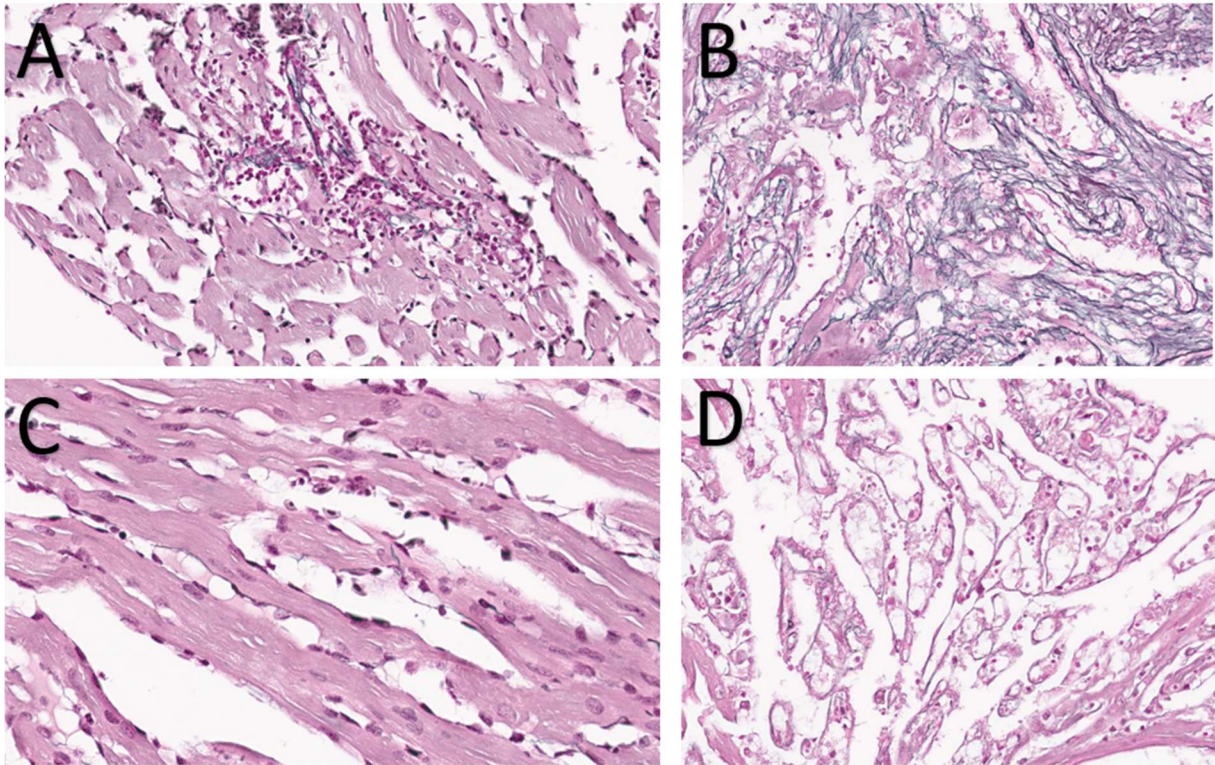
Figur 47. Snitt 798. Illustrerer fargeopptak i ulike cellekjerne. Rød pil: Erytrocytt med svart cellekjerne. Blå pil: Kardiomyocyttkjerne med svarte granula. Svart pil: Endotelcelle farget svart.

Utbredelse av farging varierer. Noen snitt har konfluerende til diffus utbredelse, eksempelvis snitt 787 (Figur 48). Andre snitt har fokal til multifokal utbredelse, eksempelvis snitt 808 (Figur 48).



Figur 48. **A:** Snitt 787. Viser diffus utbredelse av mørke drag. **B:** Snitt 808. Viser fokal område med mørke drag.

Det kan se ut til at utbredelsen ikke er helt tilfeldig, men knyttet til pågående betennelse og nekrotiske prosesser (Figur 49). I områder med mer intakte kardiomyocytter er det en tendens til lavere grad av farging. Uttalte nekrotiske forandringer med tomme «rørstrukturer» virker også å ha mindre farge enn pågående nekrotiske forandringer.



Figur 49. A: Snitt 808. Viser fokal betennelse og nekrose med mørke drag av farging. B: Snitt 787. Illustrerer økende grad av farging med samtidig nekrose av kardiomyocytter. C: Snitt 797. Viser relativt intakte kardiomyocytter med lite farging. D: Snitt 791. Viser tomme «rørstrukturer» og nekrotisk debris med lite farging.

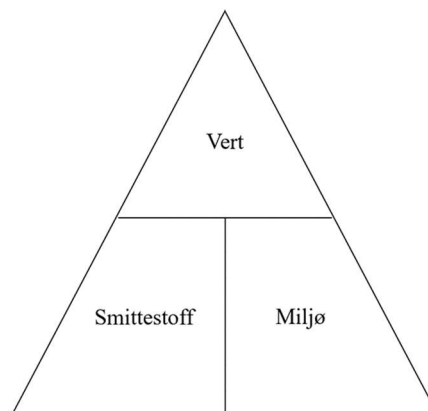
Diskusjon

Generelle histopatologiske forandringer og score

Snittene med HE-farging, både Studieutvalg 1 og Studieutvalg 2, har karakteristiske histopatologiske forandringer forbundet med PMCV-infeksjon hos atlantisk laks.

Forandringene bærer preg av varierende grad av mononukleær betennescelle-infiltrasjon, nekrose av kardiomyocytter, endokardial hyperplasi og uttalt nekrose av myokard med dannelse av såkalte «rørstrukturer» i hjertets spongiøse del, noe som er kjente og typiske funn ved subakutt til kronisk PMCV-infeksjon (Garseth et al., 2017).

I Studieutvalg 1 har det blitt påvist uttalte forandringer i hjertet, mens Studieutvalg 2 har større spredning i score. Dette har nok sammenheng med den epidemiologiske trekanten «vert, miljø, smittestoff» (Figur 50) som er avgjørende for hvor hardt et individ rammes av en infeksøs sykdom.



Figur 50. Den epidemiologiske trekanten illustrerer sammenheng mellom vert, smittestoff og miljø.

Tid er også en avgjørende faktor her, da fisk som har stått lenger i sjøen sannsynligvis vil

utvikle mer omfattende patologiske forandringer. I Studieutvalg 1 hadde fisken stått i sjøen i 1,5 år før prøveuttaket ble gjort, mens for Studieutvalg 2 fra lokalitet A var fisken ca. 4 kg ved prøveuttak, altså mot slutten av produksjonssyklusen, mens ved lokalitet B hadde fisken knapt stått 1 år i sjø før prøveuttaket.

Som nevnt i innledningen, er koinfeksjoner med blant annet PRV og/eller SAV ikke uvanlig.

Fra Studieutvalg 1 ble det opplyst om at fisken hadde fått påvist både HSMB og PD i forkant

av den histopatologiske diagnosen CMS. Det er mulig dette har påvirket resultatene våre ved å modifisere patologien i hjertet. For eksempel viser en studie at primær infeksjon med PRV reduserte prevalensen og alvorlighetsgraden av påfølgende SAV infeksjon (Rosaeg et al., 2017), men hvorvidt det er en liknende sammenheng mellom PRV og PMCV-infeksjon er ikke studert.

Studieutvalg 2 fra lokalitet A har hatt mistanke om HSMB i forkant av CMS-diagnosen, men det ble ikke bekreftet. Her kan også koinfeksjoner ha innvirkning på histopatologiske forandringer og score. For å få en oppklaring i hvilket virus som dominerte i fisken på prøvetakingstidspunktet, kunne RT-PCR vært utført. Vi har ikke hatt tilgang på slike data i vårt studieutvalg.

Til tross for en standardisert mal for scoring av histopatologiske forandringer ved CMS (Tabell 1), blir scoringen en relativt subjektiv vurdering avhengig av personen som foretar vurderingen. Vi har kompensert noe for dette ved at alle forfattere har scoret alle snitt hver for seg, for så sette et "gjennomsnitt" av scorene våre. Grad av forandringer i ventrikkelen vil også variere mye fra område til område i et snitt, noe som kan påvirke scoringen. Snitt med høyere score og mer uttalte forandringer vil sannsynligvis ha mindre variasjon i vurdering ettersom man har en høyere sannsynlighet for å treffe på ett representativt område enn snitt med lav score og mer ujevn fordeling av forandringer.

Uansett er formålet med scoringen bare å vise en trend i alvorlighetsgraden på studieutvalget, og har derfor ikke mye betydning for hovedformålet med oppgaven vår som angår beskrivelse av reparasjon og regenerasjon i hjertet ved CMS. Det kan imidlertid brukes til å vurdere om

lav, middels eller høy score har noen sammenheng med forekomst av regenerasjon og reparasjon.

Forekomst og karakterisering av regenerasjon

I Studieutvalg 1 har en relativt høy andel av fisken (32 %) mer eller mindre forekomst av udiffrensiererte celler som kan være en indikasjon på tidlig regenerasjon i fiskens hjerte. I Studieutvalg 2, både lokalitet A og lokalitet B, har en betydelig mindre andel av fisken funn av disse cellene, henholdsvis 30 % og 16 %. Forekomst av regenerasjon for begge lokalitetene blir totalt 21 %. Sett i forhold til hjertets regenerative kapasitet hos zebrafisk (Curado and Stainier, 2006), og gitt at laksens regenerative kapasitet er tilsvarende, er dette et relativt lavt tall.

Det er imidlertid stor usikkerhet knyttet til funn og karakterisering av disse «uidentifiserbare cellene». For å konkludere med funn og forekomst av regenerasjon i fiskens hjerte med vårt materiale, trengs celleproliferasjons-markører, noe som ikke har blitt prioritert i vårt arbeid, men som hadde vært veldig interessant å undersøke nærmere.

Det er tilsynelatende ingen sammenheng mellom forekomst av regenerasjon og score i våre resultater, da både lave, middels og høye scorerer kan ha fravær eller forekomst av proliferasjon av celler som settes i sammenheng med regenerasjon. Det kan virke som at andre faktorer enn alvorlighetsgrad har betydning for om fisken klarer å regenerere kardiomyocytene eller ikke.

Mekanismer bak regenerasjon

Regenerasjon av hjertemuskulatur hos zebrafisk (*Danio rerio*) har vært benyttet som en generell modell for studier av hjerteregenerasjon etter påført skade. Som nevnt i innledningen,

viser forskning at zebrafisk oppnår normal integritet og funksjon av hjertet 60 dager etter at 20 % av hjertevevet er «amputert» (Poss et al., 2002), og at det er de allerede eksisterende kardiomyocytter som prolifererer hos zebrafisk når de regenererer hjertet (Laflamme and Murry, 2011). Akkurat hvilke molekylære signalveier som favoriserer denne prosessen hos zebrafisk er foreløpig ikke fullstendig forstått. Studier (Beffagna, 2019) har oppsummert mulige sentrale signalveier, i håp om å kunne overføre dette til mennesker som har gjennomgått hjerteinfarkt.

Selve prosessen etter skade på hjertet hos zebrafisk følger sårhelingsfasene; inflammasjon, reparasjon og remodelering/regenerasjon (Richardson, 2018). Akuttfasen kjennetegnes blant annet av leukocyt-infiltrasjon, nekrose og økt mekanisk aktivitet/funksjon. Det er disse prosessene som leder til trans-differensiering av fibroblaster til myofibroblaster, som produserer kollagen og ECM-komponenter for å fylle ut det skadede vevets integritet med et midlertidig arr (Beffagna, 2019).

Hvordan dette midlertidige arret senere blir degradert og erstattet av proliferative kardiomyocytter er det ulike teorier om. Noen forfattere har sett på viktigheten av inaktivering av fibroblastene som nøkkelrolle til regresjonen av kollagenet, og dermed igangsetting av proliferasjon av kardiomyocytene (Sanchez-Iranzo et al., 2018), mens andre har sett nærmere på epikard sin rolle. Ved skade på hjertet hos zebrafisk viste en studie at cellene i epikard ble aktivert og skilte ut insulin-like growth factors (IGF)-signaler, som igjen aktiverte rat sarkoma virus/mitogen-activated protein kinases (Ras/MAPK) signaliseringsveien, essensielt for å indusere kardiomyocyt-proliferasjon og dermed komplett regenerasjon (Huang et al., 2013).

Andre har sett på rollen til matrix metalloproteinaser (MMPs). Disse blir produsert av kardiomyocytter, fibroblaster og nøytrofile granulocytter (Gamba et al., 2017), og bidrar til degradering av ECM-komponenter inkludert kollagen. Ulike MMP'er interagerer med hverandre, både i synergi og ved inhibering. Det er gjort studier som indikerer at MMP-2 og MMP-9 er proteaser som øker ved skade på hjertet hos zebrafisk, som igjen indikerer at disse kan være sentrale molekyler involvert i kollagen-degradering (Gamba et al., 2017).

Det er også observert at utilstrekkelig mekanisk signalering grunnet en reduksjon av kardiomyocytter etter skaden, ga mindre sekresjon av de spesifikke MMP'ene slik at kollagenet dannet i det midlertidige arret ikke ble degradert og beskyttet hjertet mot ruptur for senere å bli remodellert (Gamba et al., 2017). Som vi ser histologisk ved PMCV-infeksjon hos atlantisk laks, også i våre resultater, blir skadene ofte så uttalte i myokard at det er få intakte kardiomyocytter igjen. Det er få intakte kardiomyocytter og et cellebilde dominert av mononukleære celler med et fåtall nøytrofile granulocytter, men samtidig er det liten grad av fibrose, dvs. avsetning av bindevev, noe som sammen med redusert sekresjon av ulike metalloproteaser skal danne grunnlag for senere regenerering. Ruptur av atrium henger også godt sammen med en redusert kompensatorisk avsetning av bindevev (fibrose) i etterkant av skade på myokard som skal beskytte mot ruptur av hjertemuskelen (Gamba et al., 2017). Redusert fibrose kan tenkes å redusere den regenerative kapasitet ved CMS, og her trengs det flere studier for å forstå de underliggende mekanismene.

Makrofagens rolle

En annen faktor som har blitt vist å ha betydning for hvorvidt regenerasjon forekommer, er tilstedeværelse av makrofager og deres aktivitet. Som tidligere nevnt er dette en av celletypene som ofte finnes i hjertevevet ved infeksjon med PMCV. Hos zebrafisk er en

reduisert makrofag-respons satt i sammenheng med redusert regenerasjon i hjertet (Simoes et al., 2020). Ulike typer av makrofager har i studier blitt satt i sammenheng med ulike hjerteinfeksjoner hos laks. En studie (Garseth et al., 2018) indikerer at CD83+ makrofager (MHC 2+) kan ha en koordinerende rolle i utviklingen av lesjoner ved CMS-infeksjon, mens i en annen studie (Dhamotharan et al., 2020) er det funnet en assosiasjon mellom arginase 2-positive makrofag-liknende celler og regenerasjon i hjerte ved HSMB-infeksjon. Makrofager er også involvert i reparasjonsprosessen ved skade i myokard, både indirekte ved å påvirke myofibroblaster og direkte ved avleiring av kollagen, og det er fortsatt uvisst hvilke faktorer som avgjør om prosessen går i regenerativ eller reparativ retning (Simoes et al., 2020).

Forekomst og karakterisering av reparasjon

Vi fant reparasjon for Studieutvalg 1 i 53 % av snittene, mens for Studieutvalg 2 var den henholdsvis 20 % og 16 % for lokalitet A og B, gjennomsnittlig 18 % for Studieutvalg 2. Det er med andre ord mye høyere forekomst i det første prøvematerialet i forhold til det andre, men det er også store forskjeller fra individ til individ uavhengig av hvilket anlegg prøvene er hentet ut fra. Hos noen av fiskene har vi ikke med sikkerhet påvist forekomst av bindevev i det hele tatt, noen har svært lite der man må lete lenge etter fibroblaster og/eller kollagen, mens andre har kommet lenger i prosessen slik at bindevevet er lettere å påvise.

Variasjonen i forekomst av bindevev kan ha en sammenheng med hvor lenge fisken har gått med infeksjonen eller hvilken fase infeksjonen er i (subakutt eller kronisk), muligens virusets virulens, miljøbetingelser, samt vertens generelle motstandsdyktighet, immunforsvar og stressrespons - som alle kan ha betydning for igangsetning av prosesser som aktiverer

fibroblastene. I likhet med resultatene fra regenerasjon, har reparasjon heller ingen sammenheng med hva snittene har fått i score i denne studien.

Det som uansett er interessant i vårt materiale er en variabel forekomst av reparasjon og liten grad av regenerasjon. Dette er ikke studert i detalj tidligere ved CMS hos laks, men forekomst av ruptur av atrium kan settes i sammenheng med en manglende evne til å reparere skade på myokard (kompensasjon og forebygging av ruptur). Dette er et svært interessant og karakteristisk trekk ved akkurat denne infeksjonen, sammenliknet med hvordan fisken generelt håndterer celleskader i hjertet, f.eks. ved PD eller HSMB. Som nevnt innledningsvis, evner egentlig fisken i stor grad å regenerere hjertet slik at det oppnår normal funksjon igjen, men her ser vi at fisken i noen grad kompenserer med reparasjon, mens regenerasjon er nesten fraværende. Dannelsen av det ikke-kontraktile fibrotiske vevet vil gi struktur og integritet i myokard, men bevarer ikke de kontraktile egenskapene til kardiomyocytene, noe som reduserer hjertets pumpefunksjon betydelig (Beffagna, 2019). Her er også basalmembranens funksjon noe vi diskuterer senere.

Spesialfarginger

Massons Trichome

Massons Trichrome farger kollagen og er en av de vanligst brukte fargemetodene for identifisering av bindevev (Doan, 2022). Likevel ble fargingen vurdert til å ikke gi en god farging for vurdering av bindevevsdannelse i denne studien. Resultatene fra farging av snittene stemte ikke overens med det som er angitt for denne fargemetoden da tilsynelatende intakt muskelvev i mange av snittene ble farget blått istedenfor rødt som man ville forventet, samt at erytrocytter ble farget blå i enkelte av snittene (skal farges rødt). I tillegg er det mange av snittene som viser tegn til ujevn farging, noe som generelt vanskeliggjør evalueringen av

resultatene. Til sammen blir det vanskelig å vurdere om blåfargen i flere av snittene er et resultat av faktisk kollagen-avleiring, selv der hvor hjertemuskel har blitt farget som foreskrevet, men sammenholdt med en morfologisk vurdering kan det synes som dette stemmer mer overens med teorien bak fargemetoden. Den observerte variasjonen har trolig sin bakgrunn i at det benyttes en automatisk fargeprosess som ikke er fullt ut kvalitetssikret.

Det finnes også andre mulige feilkilder ved en Massons Trichrome-farging. En artikkel fra 2022 (Sridharan et al., 2022) laget en protokoll for vurdering av myokardial fibrose i frosne snitt og snitt i parafin ved bruk av Massons Trichrome-fargeteknikk og her angis flere faktorer som er viktige for å få et korrekt resultat ved farging. Blant disse punktene er: uniform deparafinisering for en jevn farging, bruk av ferske farger hver gang, ulik inkubasjonstid for forskjellige vev for en dypere rødfarge og å ikke inkubere for lenge i aniline-blue ettersom man da kan få dårlig kontrast i snittet (tiden må standardiseres for hver vevstype). Ifølge (Doan, 2022) er det også viktig med en “god” Bouin’s løsning med riktig inkubasjonstid i forhold til temperaturen som brukes. Dette er viktig ettersom Bouin’s brukes for å få fargene til å feste seg til vevet. Det nevnes også at dersom muskelvev er blekt rødt bør man sjekke holdbarheten på Bouin’s og Biebrich scarlet løsning. Med automatiske prosesser og standard løsninger som tilføres maskinen er det vanskelig å justere de ulike fasene i fargingen.

Elastin Van Gieson

EVG er regnet som den beste spesialfargingen for å detektere elastin (Kazlouskaya et al., 2013). Elastiske fibre dannes i små mengder sent i forløpet ved sårheling hos voksne mennesker, og kapasiteten reduseres jo eldre et menneske er. Elastin bidrar for eksempel med å returnere huden til sin opprinnelige form og redusere arrdannelsen. Denne egenskapen er betydelig større hos fostre, og det er antydning at avheling uten arrdannelse hos fostre skyldes

den økte produksjonen av elastin (Baumann et al., 2021). EVG kan derfor tenkes å bidra til å identifisere eldre fibrøse avhelingsprosesser. Atlantisk laks lever kortere liv og slaktes før naturlig død, så det kan også spekuleres i om de vil ha en noe større elastin-avsetning enn eldre humant.

Ved farging av snitt er differensiering den prosessen der overflødig farge fjernes selektivt fra vev som ikke binder opp fargen (StainsFile, 2023). Ulempene med EVG er at snitt bør farges individuelt da tiden som trengs til å differensiere vevet er avhengig av mengden elastin i hvert snitt (Kazlouskaya et al., 2013). Enkelte av snittene har en rødlig farge på områder med bindevevsavsetning (Figur 44), noe som stemmer overens med teorien bak fargemetoden, men også for EVG synes det som den automatiserte prosessen er for dårlig standardisert og kvalitetssikret.

Reticulin

Reticulin farger som nevnt tidligere kollagen III, kollagen IV og laminin (Pernick, 2005). Kollagen III danner retikulære fibre tidlig i sårhelingsfasen (Broughton et al., 2006), og det er derfor interessant å benytte dette som en indikasjon på tidlige fibrotiske prosesser i ventrikkelen ved CMS hos atlantisk laks. Kollagen IV og laminin er hovedbestanddelene av basalmembranen (Boland et al., 2021).

De mørke dragene i overgangen mellom kardiomyocytene og endotelet indikerer en fortykket basalmembran. I tillegg vil nettverket av mørke drag på innsiden av kardiomyocytene tyde på en begynnende sårheling og fibrose. Mengde av reticulin-farging som beskrevet synes å ha sammenheng med pågående betennelse og nekrotiske forandringer.

Basalmembranen har flere essensielle roller, både strukturelt og innenfor celledisiplinering. I humanmedisin oppsummerer artikkelen (Boland et al., 2021) det vi vet så langt om ulike roller basalmembranen har under normalfunksjon og sykdomsprosesser i hjertet.

Basalmembranen er en del av den ekstracellulære matriksen, og eksisterer hos de fleste dyr. Den består i store trekk av laminin og kollagen type IV, men også andre komponenter som varierer med vevet og celletypen de omringer/underligger. Den danner en tynn plate som celler adhererer til i tillegg til å danne et skille mellom cellene og den interstitielle ekstracellulære matriks. I hjertet finner man basalmembraner omkring kardiomyocytter, vaskulære glatte muskelceller og under endotelceller (mikrovaskulaturen). Basalmembranen er koblet til både kardiomyocyttenes sarkolemma på den ene siden og den interstitielle ekstracellulære matriksen på den andre siden via diverse komponenter, eksempelvis integriner, proteoglykaner og kollagen IV. Spredt i den interstitielle ekstracellulære matriksen finner man hjertefibroblaster (Boland et al., 2021).

Analyse av humane hjertesviktpasienter har vist at når hjertet utsettes for mekanisk stress vil ulike komponenter i basalmembranen knyttet til kardiomyocyttenes sarkolemma motta signal og sette i gang en signalkaskade. Dette kan igangsette pro-fibrotiske prosesser ved at hjertefibroblastene i den interstitielle ekstracellulære matriksen differensierer til myofibroblaster. Disse produserer ulike pro-fibrotiske komponenter i både den interstitielle ekstracellulære matriksen og basalmembranen som igjen kan endre basalmembranens morfologi og dermed føre til dårligere interaksjon mellom basalmembranen og kardiomyocyttenes og bidra til ytterligere patologi i hjertet (Boland et al., 2021). Dette indikerer altså muligheten for at patologiske prosesser kan påvirke basalmembranens funksjon

og interaksjon med kardiomyocytene. Når dette ikke fungerer som det skal vil det i seg selv kunne bidra til skade på vevet.

Snittene farget for reticulin indikerer en økt tykkelse av basalmembranen knyttet til både betennelse og nekrotiske prosesser. Hvis en slik endring fører til en reduksjon i basalmembranens funksjon vil det kunne forstyrre viktige signaliseringsveier, herunder kan muligens reparative og regenerative signaliseringsveier hemmes (Boland et al., 2021). Ved CMS ses både reduserte reparative og regenerative mekanismer når det sammenliknes med andre sykdommer som affiserer hjertemuskelen (Fritsvold et al., 2021) og som resultat ser man uttalt nekrose uten reparasjon eller regenerasjon av hjertevev. Det kan være mulig at hemmet funksjon av basalmembranen bidrar til at slike prosesser ikke fungerer som de skal, og/eller hindrer at de settes i gang.

Hvorvidt basalmembranens rolle i liknende signalkaskader og hjertepatologi i humanmedisin er overførbart til atlantisk laks er usikkert. Det hadde vært interessant å se om liknende prosesser er til stede hos laks og om en mulig involvering av basalmembranen i CMS-patologi påvirker responser som regenerative og reparative prosesser.

Kollagen - Sammenligning med humanmedisin

Artikkelen "The Basic Science of Wound Healing" (Broughton et al., 2006) beskriver gangen i normal sårheling og arrdannelse hos mennesker når skade på vev oppstår. Prosessen deles tradisjonelt inn i de tre fasene: inflammasjon, proliferasjon og remodelering. I den proliferative fasen vil fibroblaster starte å syntetisere kollagen III, slik at tidlig i prosessen vil dette være den dominerende kollagentypen i den ekstracellulære matriksen i såret. Under

remodelleringsfasen reduseres mengden kollagen type III og mengden kollagen type I øker, slik at senere i sårhelingsprosessen vil type I dominere.

Ved skade på hjertemuskel hos mennesker skjer liknende avhelingsprosesser. Regenerasjon av hjertevev og gjenopprettelse av normal vevsfunksjon er svært begrenset hos mennesker, og hjertefibrose er den dominerende prosessen. Kollagensyntese reguleres av hjertefibroblaster som aktiveres ved hjertepatologi og deponerer kollagen bestående av hovedsakelig type III og I. Resultatet er arrdannelse som erstatter funksjonelt hjertevev (Hinderer and Schenke-Layland, 2019).

Det er usikkert hvorvidt disse humanstudiene kan overføres til atlantisk laks, men det gir interessante pekepinner på hva som kan være relevant. Laks har evne til regenerasjon av hjertevev, men kan også avhele skader ved fibrose slik som hos mennesker (Curado and Stainier, 2006). Ved klassisk CMS ser man en nekrotiserende myokarditt med begrenset eller minimale reparative og regenerative avhelingsprosesser. I sammenheng med degenerasjon, inflammasjon og tidlige nekrotiske forandringer kan man se økt reticulin-farging i våre snitt; en god indikasjon på en fortykket basalmembran og en økt forekomst av kollagen III og en begynnende fibrotisk avhelingsprosess. Ved uttalte nekrotiske forandringer er det imidlertid betydelig mindre reticulin-farging sammenliknet med tidlige og mildere forandringer. Hvorvidt dette avspeiler at en uttalt skade på kardiomyocytene kan ses i sammenheng med en redusert avhelingsprosess er usikkert.

Farging med Massons Trichrome gav variabelt og usikkert resultat og kan ikke differensiere mellom ulike typer av kollagen, til dette må man benytte andre metoder.

Begrensninger ved bruk av feltmateriale

Studier utført på materiale innsamlet fra felten gjør det vanskelig å standardisere mange av de faktorene som har betydning for utvikling av sykdom sammenliknet med kontrollerte eksperimentelle studier. Flere faktorer vil variere med det naturlige miljøet fisken oppholder seg i under perioden studien utføres. Eksempelvis svingninger i temperatur, vannkvalitet, koinfeksjoner etc. Prøvematerialet brukt i denne studien er i tillegg innsamlet fra to ulike lokaliteter. Som nevnt tidligere vil dette påvirke forholdene i den epidemiologiske trekanten (Figur 50), blant annet vertens immunstatus, miljøforhold og muligens virusets virulens.

Det er en variasjon på størrelsen til fisken, fra omkring 1 kg til 4 kg. Fisken fra lokalitet A var omkring 4 kg, mens fisken fra lokalitet B var omkring 1 kg til 2 kg. Den større fisken har vært i sjøen i en lenger periode og potensielt vært infisert i en mye lenger periode. Grad av skade mellom lokalitetene er derfor vanskelig å sammenlikne da den større fisken har hatt mye lenger tid på å utvikle patologi i forhold til den mindre fisken.

Prøveuttak fra fisken hos lokalitet B var gjort etter avlivning, mens prøveuttak fra fisken hos lokalitet A var gjort fra dødfisk der de fleste hadde ligget under 24 t, med unntak av noen få som hadde ligget lengre med noe mer postmortelle forandringer (kadaverose). Høy grad av postmortelle forandringer hos fisk som har ligget lenge kan forstyrre tolkningen av reelle histopatologiske forandringer.

HSMB og PD kan som beskrevet tidligere føre til patologi i myokard (Kongtorp et al., 2004), (McLoughlin et al., 2006). Den ene lokaliteten i Studieutvalg 2 er beskrevet å ha hatt mulig HSMB tidligere, men det er uavklart. Lokaliteten i Studieutvalg 1 fikk påvist PD og HSMB i løpet av utsettet. Mulige koinfeksjoner med virus kan bidra til å modifisere patologien som er

vurdert under den histologiske beskrivelsen av snittene. Dette vil kunne forstyrre tolkningen av hva som faktisk er CMS-relaterte forandringer eller et resultat av flere virus samtidig.

Hva bør undersøkes videre

I diskusjonsdelen av denne oppgaven er det blitt tatt opp flere punkter som kan være relevante for undersøkelse i videre studier.

I forbindelse med spesialfarging av utvalgte snitt i denne oppgaven var det feilkilder knyttet til både Massons Trichrome og Elastin Van Gieson. Det ville derfor vært hensiktsmessig å gjenta disse prosedyrene for å se om fargemetodene kan egne seg for vurdering av bindevevsdannelse i myokard etter CMS-infeksjon. Reticulin-fargingen som ble gjennomført var vellykket, og det hadde vært interessant å se om våre funn knyttet til basalmembranen kan være overførbare også til andre studier. Dette gjelder både studier på histologiske forandringer ved CMS, men også studier på andre sykdommer som involverer skade på basalmembranen hos laks. I denne oppgaven ble det valgt ut tre spesialfarginger for identifisering av bindevev, men det finnes også andre metoder som kunne vært brukt, for eksempel Picrosirius red-farging kombinert med polarisasjonsmikroskopi (Bhutda et al., 2017). Framtidige undersøkelser som skiller ulike typer av kollagenavsetning ville kunne indikere et unormalt forløp i modningen av kollagen I og bidra til å forstå om remodelleringsfasen hemmes eller stopper opp slik at forholdet mellom kollagen III og kollagen I blir høyere enn normalt.

Spesialfargete snitt ble i denne oppgaven vurdert manuelt, men det finnes også automatiske digitale analyser som kan brukes for kvantitativ vurdering av fibrose (Daunoravicius et al., 2014). Det kunne vært interessant å sammenlikne våre vurderinger med resultater fra en slik metode, forutsatt at spesialfargingene var vellykket. Som nevnt ble det i denne oppgaven ikke tid til bruk av celleproliferasjonsmarkører for vurdering av regenerasjon, men dette hadde

vært høyst relevant å gjennomføre. Det kunne også vært relevant å bruke markører for ulike typer makrofager i forbindelse med vevsskade, da disse som tidligere nevnt har en viktig rolle i forbindelse med regenerasjon/reparasjon etter myokard-skade.

Materialet i denne oppgaven er hentet fra felt, og det er blitt diskutert flere begrensninger dette kan ha hatt for studien. Et kontrollert smittetest forsøk ville eliminert mange av disse usikkerhetene. Som nevnt i diskusjonsdelen i forbindelse med Elastin Van Gieson kunne det også vært hensiktsmessig å se på snitt fra CMS-infisert stamfisk for å se hvordan varighet av skade påvirker sammensetningen av bindevev og mengden regenerasjon i myokard.

Histopatologiske forandringer i vår studiepopulasjon er trolig representativ for stor fisk i sjøfasen, men vår studiepopulasjon inkluderte verken mindre fisk eller eldre stamfisk og er derfor mindre representativ for disse fiskegruppene. Inklusjon av disse i studiepopulasjonen vil øke generaliserbarheten til studien.

Konklusjon

Scoring ut fra eksisterende mal viste variasjon både innad og mellom de to studieutvalgene som ble undersøkt i denne oppgaven. Studieutvalg 1 var preget av uttalte skader i myokard, og 88 % av fisken ble kategorisert med score 3 eller over. I Studieutvalg 2 var det mer variasjon i hvor uttalte skadene var, totalt 46 % av fisken fikk score 3 eller over. Det var imidlertid forskjeller mellom de to lokalitetene som utgjorde dette studieutvalget, lokalitet A viste en tendens til høyere score enn lokalitet B der man så en mer normalfordeling av score.

Vurdering av regenerasjon og reparasjon i HE-snitt ble gjort ved å se på henholdsvis udifferensierte celler og fibroblaster/kollagen. Også her så man en forskjell mellom de to

studieutvalgene. I Studieutvalg 1 ble 32 % kategorisert med regenerasjon, og 53 % med reparasjon. I Studieutvalg 2 var i snitt 21 % kategorisert med regenerasjon og 18 % med reparasjon. Innad Studieutvalg 2 var tallene for lokalitet A 30 % for regenerasjon og 20 % for reparasjon, mens for lokalitet B var tallet for begge disse kategoriene 16 %. Generelt ble det funnet en høy forekomst av reparasjon sammenliknet med regenerasjon. Vi kunne ikke se noen sammenheng mellom score og forekomst av regenerasjon/reparasjon i våre resultater.

Spesialfarging med Massons Trichrome og EVG viste ujevn farging forenlig med feilkilder knyttet til fargemetodene, og metodene gav derfor ingen konklusive funn.

Spesialfarging med Reticulin/Nuclear Fast Red indikerer en fortykkelse av basalmembranen og avsetning av retikulære nettverk bestående av kollagen III i hjertemuskelen med fokus på ventrikkelens spongiøse del. Farging stod i sammenheng med pågående degenerasjon, inflammasjon og mildere nekrotiske forandringer. Ved fravær av nevnte forandringer eller ved uttalte nekrotiske forandringer var farging mild eller fraværende. Resultatene peker mot en begynnende fibrotisk avhelingsprosess der skaden på hjertemuskel er mildere, og en redusert kapasitet til reparasjon ved uttalt skade. Ved å trekke linjer fra humanmedisin opp mot resultatene i denne studien kan det diskuteres om endret morfologi av basalmembranen kan forstyrre viktige signalveier involvert i avhelingsprosessen ved skade på hjertemuskelen, så vel som at et økt forhold mellom avsetning av kollagen III og I i hjertemuskelen har potensial til å forstyrre korrekt sårheling. Dette er viktige funn hos atlantisk laks som har interessante paralleller til humanmedisin og det trengs mer forskning på dette området.

Takk til bidragsyttere

Vi vil takke vår veileder Øystein Evensen for god hjelp og innspill gjennom hele oppgaven. Vi ønsker også å gi en takk til Veterinærinstituttet for farging av histologiske snitt, Asgeir Østvik

for innsamling av prøvemateriale for Studieutvalg 1 og Håkon Torsvik for innsamling av prøvemateriale for Studieutvalg 2.

Summary

Title: Studies of Reparative and Regenerative Processes in Myocard During Infection with Piscine Myocarditis Virus in Atlantic Salmon.

Authors: Martine Austad, Thea Hjemsæter og Mari Finnbråten Rambøl

Supervisor: Øystein Evensen, Department of Paraclinical Sciences (PARAFAG) and Aquatic Medicine

Cardiomyopathy syndrome (CMS) is one of the most important diseases of farmed Atlantic salmon in Norway. PMCV causes severe damage to the heart, and can lead to rupture of the atrium, killing the fish. Fish usually have a great regenerative capacity after cell damage, but in the case of CMS, both regenerative and reparative processes are significantly reduced.

In this study we have used myocardial samples from farmed Atlantic salmon with a confirmed CMS-diagnosis to describe and score the histological damage, and to evaluate the presence of reparation and regeneration. We have also used special stains (Masson's Trichrome, EVG and Reticulin/Nuclear Fast Red) to characterize the type of connective tissue deposited, and to evaluate whether the special stains used are suitable for this purpose.

HE-staining showed typical histopathology aligned with CMS. We found moderate signs of reparation and little sign of regeneration. The results from Masson's Trichrome and EVG staining were inconclusive, due to suspected errors in the staining method. Reticulin/Nuclear

Fast Red showed staining concurrent with deposition of immature connective tissue (collagen III) and thickening of the basal membranes.

Referanser

AGILENT TECHNOLOGIES 2023. A One-Stop Protocol to Assess Myocardial Fibrosis in

Frozen and Paraffin Sections. *In: TECHNOLOGIES, A. (ed.)*.

BANG JENSEN, B., NYLUND, S., SVENDSEN, J. C., SKI, P. R. & TAKLE, H. 2019.

Indications for a vertical transmission pathway of piscine myocarditis virus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Fish Dis*, 42, 825-833.

BAUMANN, L., BERNSTEIN, E. F., WEISS, A. S., BATES, D., HUMPHREY, S.,

SILBERBERG, M. & DANIELS, R. 2021. Clinical Relevance of Elastin in the Structure and Function of Skin. *Aesthet Surg J Open Forum*, 3, ojab019.

BEFFAGNA, G. 2019. Zebrafish as a Smart Model to Understand Regeneration After Heart

Injury: How Fish Could Help Humans. *Front Cardiovasc Med*, 6, 107.

BHUTDA, S., SURVE, M. V., ANIL, A., KAMATH, K., SINGH, N., MODI, D. &

BANERJEE, A. 2017. Histochemical Staining of Collagen and Identification of Its Subtypes by Picrosirius Red Dye in Mouse Reproductive Tissues. *Bio Protoc*, 7, e2592.

BOLAND, E., QUONDAMATTEO, F. & VAN AGTMAEL, T. 2021. The role of basement

membranes in cardiac biology and disease. *Biosci Rep*, 41.

BROUGHTON, G., 2ND, JANIS, J. E. & ATTINGER, C. E. 2006. The basic science of

wound healing. *Plast Reconstr Surg*, 117, 12S-34S.

CURADO, S. & STAINIER, D. Y. 2006. The HeArt of regeneration. *Cell*, 127, 462-4.

- DAUNORAVICIUS, D., BESUSPARIS, J., ZURAUSKAS, E., LAURINAVICIENE, A., BIRONAITE, D., PANKUWEIT, S., PLANCOULAIN, B., HERLIN, P., BOGOMOLOVAS, J., GRABAUSKIENE, V. & LAURINAVICIUS, A. 2014. Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis and interactive stereology. *Diagn Pathol*, 9, 114.
- DHAMOTHARAN, K., BJORGEN, H., MALIK, M. S., NYMAN, I. B., MARKUSSEN, T., DAHLE, M. K., KOPPANG, E. O., WESSEL, O. & RIMSTAD, E. 2020. Dissemination of Piscine orthoreovirus-1 (PRV-1) in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) during the Early and Regenerating Phases of Infection. *Pathogens*, 9.
- DOAN, C. 2022. *Special Stains – Which One, How and Why? Part II: Connective Tissue* [Online]. Available: <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/special-stains-which-one-how-and-why-part-ii-connective-tissue/?fbclid=IwAR0IsQL6TpEwfwPOpursQPWU4auUdkWIIZFjrRgJ31Nkq89rJF24qzKukI8> [Accessed 20.03.2023].
- FERGUSON, H. W., POPPE, T. & SPEARE, D. J. 1990. Cardiomyopathy in farmed Norwegian salmon. *Diseases of Aquatic Organisms*, 8.
- FISKERIDIREKTORATET. Available: <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tildeling-og-tillatelser/Kapasitetsjustering-trafikklyssystemet> [Accessed 15.01.2023].
- FRITSVOLD, C., KONGTORP, R. T., TAKSDAL, T., ORPETVEIT, I., HEUM, M. & POPPE, T. T. 2009. Experimental transmission of cardiomyopathy syndrome (CMS) in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ*, 87, 225-34.
- FRITSVOLD, C., MIKALSEN, A. B., HAUGLAND, O., TARTOR, H. & SINDRE, H. 2022. Characterization of early phases of cardiomyopathy syndrome pathogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) through various diagnostic methods. *J Fish Dis*, 45, 1267-1279.

FRITSVOLD, C., MIKALSEN, A. B., POPPE, T. T., TAKSDAL, T. & SINDRE, H. 2021.

Characterization of an outbreak of cardiomyopathy syndrome (CMS) in young Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis*, 44, 2067-2082.

GAMBA, L., AMIN-JAVAHERI, A., KIM, J., WARBURTON, D. & LIEN, C. L. 2017.

Collagenolytic Activity Is Associated with Scar Resolution in Zebrafish Hearts after Cryoinjury. *J Cardiovasc Dev Dis*, 4.

GARSETH, A. H., FRITSVOLD, C., SVENDSEN, J. C., BANG JENSEN, B. &

MIKALSEN, A. B. 2018. Cardiomyopathy syndrome in Atlantic salmon *Salmo salar* L.: A review of the current state of knowledge. *J Fish Dis*, 41, 11-26.

GARSETH, Å. H., SVENDSEN, J., FRITSVOLD, C. & MIKALSEN, A. B. 2017.

Kardiomyopatisyndrom (CMS) hos laks. Veterinærinstituttet.

HAUGLAND, O., MIKALSEN, A. B., NILSEN, P., LINDMO, K., THU, B. J., ELIASSEN,

T. M., ROOS, N., RODE, M. & EVENSEN, O. 2011. Cardiomyopathy syndrome of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is caused by a double-stranded RNA virus of the Totiviridae family. *J Virol*, 85, 5275-86.

HINDERER, S. & SCHENKE-LAYLAND, K. 2019. Cardiac fibrosis - A short review of

causes and therapeutic strategies. *Adv Drug Deliv Rev*, 146, 77-82.

HUANG, Y., HARRISON, M. R., OSORIO, A., KIM, J., BAUGH, A., DUAN, C., SUCOV,

H. M. & LIEN, C. L. 2013. Igf Signaling is Required for Cardiomyocyte Proliferation during Zebrafish Heart Development and Regeneration. *PLoS One*, 8, e67266.

KARSDAL, M. A. & KRISTENSEN, J. H. 2016. *Biochemistry of Collagens, Laminins and*

Elastin, Academic Press.

KAZLOUSKAYA, V., MALHOTRA, S., LAMBE, J., IDRIS, M. H., ELSTON, D. &

ANDRES, C. 2013. The utility of elastic Verhoeff-Van Gieson staining in dermatopathology. *J Cutan Pathol*, 40, 211-25.

- KONGTORP, R. T., TAKSDAL, T. & LYNGOY, A. 2004. Pathology of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ*, 59, 217-24.
- LAFLAMME, M. A. & MURRY, C. E. 2011. Heart regeneration.
- LI, N., WANG, C., JIA, L. & DU, J. 2014. Heart regeneration, stem cells, and cytokines.
- LIBRETEXTS. *Layers of the Heart Walls* [Online]. Available: [https://med.libretexts.org/Bookshelves/Anatomy_and_Physiology/Anatomy_and_Physiology_\(Boundless\)/17%3A_Cardiovascular_System%3A_The_Heart/17.1%3A_The_Heart/17.1C%3A_Layers_of_the_Heart_Walls](https://med.libretexts.org/Bookshelves/Anatomy_and_Physiology/Anatomy_and_Physiology_(Boundless)/17%3A_Cardiovascular_System%3A_The_Heart/17.1%3A_The_Heart/17.1C%3A_Layers_of_the_Heart_Walls) [Accessed 29.03.2023].
- MCCLOUGHLIN, M. F., GRAHAM, D. A., NORRIS, A., MATTHEWS, D., FOYLE, L., ROWLEY, H. M., JEWURST, H., MACPHEE, J. & TODD, D. 2006. Virological, serological and histopathological evaluation of fish strain susceptibility to experimental infection with salmonid alphavirus. *Dis Aquat Organ*, 72, 125-33.
- MIKALSEN, A. B., HAUGLAND, O., RODE, M., SOLBAKK, I. T. & EVENSEN, O. 2012. Atlantic salmon reovirus infection causes a CD8 T cell myocarditis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS One*, 7, e37269.
- MIKALSEN, A. B., LUND, M., MANJI, F., KJONSTAD, M. V., BERGTUN, P. H., RITCHIE, G., ASPEHAUG, V., DEVOLD, M. & EVENSEN, O. 2020. Lack of evidence of vertical transmission of piscine myocarditis virus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Fish Dis*, 43, 715-718.
- NÆRINGS- OG FISKERIDEPARTEMENTET. 2021. *Norsk havbruksnæring* [Online]. Available: <https://www.regjeringen.no/no/tema/mat-fiske-og-landbruk/fiskeri-og-havbruk/1/oppdrettslaksen/Norsk-havbruksnaring/id754210/> [Accessed 15.01.2023].
- PERNICK, N. 2005. *Stains & CD markers Reticulin* [Online]. Available: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsreticulin.html> [Accessed 15.03.2023].

- POSS, K. D., WILSON, L. G. & KEATING, M. T. 2002. Heart regeneration in zebrafish. *Science*, 298, 2188-90.
- RICHARDSON, R. J. 2018. Parallels between vertebrate cardiac and cutaneous wound healing and regeneration. *NPJ Regen Med*, 3, 21.
- ROSAEG, M. V., LUND, M., NYMAN, I. B., MARKUSSEN, T., ASPEHAUG, V., SINDRE, H., DAHLE, M. K. & RIMSTAD, E. 2017. Immunological interactions between Piscine orthoreovirus and Salmonid alphavirus infections in Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immunol*, 64, 308-319.
- SALLIN, P., DE PREUX CHARLES, A. S., DURUZ, V., PFEFFERLI, C. & JAZWINSKA, A. 2015. A dual epimorphic and compensatory mode of heart regeneration in zebrafish. *Dev Biol*, 399, 27-40.
- SANCHEZ-IRANZO, H., GALARDI-CASTILLA, M., SANZ-MOREJON, A., GONZALEZ-ROSA, J. M., COSTA, R., ERNST, A., SAINZ DE AJA, J., LANGA, X. & MERCADER, N. 2018. Transient fibrosis resolves via fibroblast inactivation in the regenerating zebrafish heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, 4188-4193.
- SCHWINT, O. A., LABRAGA, M., CERVINO, C. O., HAFFAR, M., SEQUEIROS, P. H. & MARCOS, H. J. 2004. A modification of the staining technique of reticular fibres for image analysis of the cardiac collagen network. *Cardiovasc Pathol*, 13, 213-20.
- SIMÕES, F. C., CAHILL, T. J., KENYON, A., GAVRIOUCHKINA, D., VIEIRA, J. M., SUN, X., PEZZOLLA, D., RAVAUD, C., MASMANIAN, E., WEINBERGER, M., MAYES, S., LEMIEUX, M. E., BARNETTE, D. N., GUNADASA-ROHLING, M., WILLIAMS, R. M., GREAVES, D. R., TRINH, L. A., FRASER, S. E., DALLAS, S. L., CHOUDHURY, R. P., SAUKA-SPENGLER, T. & RILEY, P. R. 2020. Macrophages directly contribute collagen to scar formation during zebrafish heart regeneration and mouse heart repair. *Nat Commun*, 11, 600.

- SOMMERSET, I., WIİK-NIELSEN, J., OLIVEIRA, V. H. S. D., MOLDAL, T., BORNØ, G.,
HAUKAAS, A. & BRUN, E. 2023. Fiskehelse rapporten 2022. Veterinærinstituttet.
- SRIDHARAN, D., PRACHA, N., DOUGHERTY, J. A., AKHTAR, A., ALVI, S. B. & KHAN,
M. 2022. A One-Stop Protocol to Assess Myocardial Fibrosis in Frozen and Paraffin
Sections. *Methods Protoc*, 5.
- STAINSFIL. 2023. *Differentiation*
in Staining [Online]. Available: <https://www.stainsfile.com/theory/staining/differentiation/>
[Accessed 26.04.2023].
- ZACHARY, J. F. 2017. *Pathologic basis of veterinary disease*, Elsevier.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no