



Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Norges fiskerihøgskole

## **Keratocyttilignende celler fra hornhinne og hud hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.)**

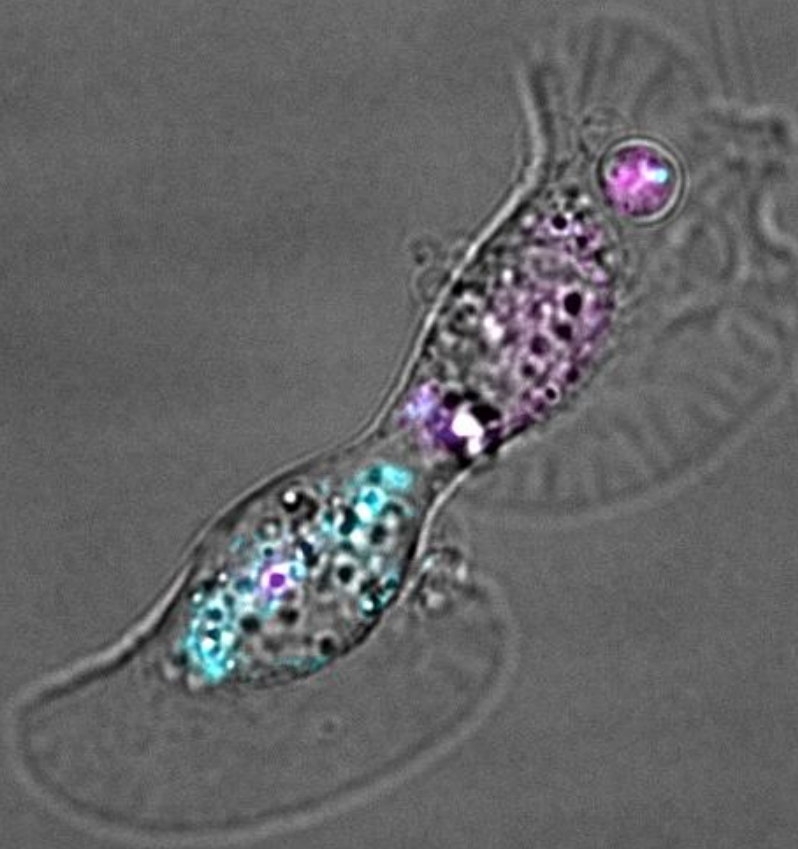
Mikro- og nanoplast, mitokondrieutveksling, fusjonering og celletunneler

—

**Eskil Mossige Kjølstad og Ole Kristian Helstad Svartaas**

*Masteroppgave i Akvamedisin (60 stp.)*

*Mai 2020*



## Forord

*Denne masteroppgaven er en videreføring av arbeidet som Åsbakk og Dalmo gjorde i 1996 da de undersøkte om keratocytter tok opp latekspartikler in vitro. Med på laget har vi hatt Deanna Wolfson som har gitt oss tilgang til avanserte mikroskoper, hjulpet oss med å bruke de og optimalisere billedtakingen. Arbeidet er utført ved Universitetet i Tromsø (UiT). Prosjektet ble påbegynt mai 2019 og avsluttet i mai 2020.*

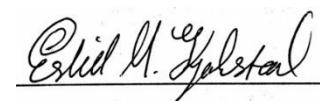
En stor takk til vår hovedveileder Roy Ambli Dalmo ved UiT som introduserte dette prosjektet for oss. Takk for god veiledning og for at vi har fått muligheten til å prøve og feile. Takk også til vår biveileder Tore Seternes som alltid har vært behjelpelig når vi har stått fast. Takk til Deanna Wolfson som med sin tålmodighet og presisjon har veiledet oss til alle døgnets tider. Takk til Ida S. Opstad som har vært med flere turer til Kårvika og hjulpet oss med prøvetakingen, spesielt på hornhinnen.

*Eskil* – Ønsker å rette en stor takk til mamma som alltid har vært der. Du har gitt meg trygghet og muligheten til å feile. Uten deg hadde jeg ikke vært der jeg er i dag. Vil også takke mormor som har vært med å forme meg til den jeg er. Takk Ole for hyggelige stunder og vennskap, samt samarbeid i Tromsø.

*Ole Kristian* – Jeg vil rette en stor takk til mamma og pappa, interessen for biologi har jeg fått fra dere gjennom utallige turer i skog og fjell fra jeg var en neve stor. Ekstra takk til mamma som korrekturleste oppgaven for oss. Takk til bestefar som jeg er så glad i. Takk også til mitt onkelbarn Emma som har vært Tromsøstudent samtidig som meg. Tusen takk til Trine for at du er den du er – det har vært fint å dele studietiden med deg. En stor takk til kompis Eskil for godt samarbeid og en minnerik tid i Tromsø.

Takk til alle på Akvamedisinstudiet for fine år sammen. Det har vært et utrolig godt miljø på tvers av trinnene. Spesielt takk til våre klassekamerater, vi har hatt en uforglemmelig tid sammen med dere.

Tromsø, mai 2020



Eskil M. Kjølstad



Ole Kristian H. Svartaas

## Sammendrag

Huden og hornhinnen utgjør fiskens forsvarsbarrierer mot ytre påkjenninger. Begge har mobile celler kalt keratocytter. Dette er en av de mest bevegelige cellene som er kjent. Cellene gjenoppretter raskt barrieren hvis vevet skades ved å vandre ut fra sårkantene mot midten av såret. Sårhelingen effektiviseres ved at cellene bedriver fagocytisk aktivitet av fremmedlegemer. Siden cellene er meget viktig i sårheling og som barriere overfor patogener og fremmedlegemer var ønsket å studere disse nærmere for å se hvordan cellene håndterte plastpartikler (polystyren i mikro- og nanostørrelse). Videre ble det observert interessante trekk med cellene, som kunne være mitokondriutveksling, cellefusjonering og tunneldannelse. Dette ble undersøkt ved bruk av avanserte konfokalmikroskop av typen «GE Delta Vision Elite» og «NanoLive 3D Cell Explorer».

Skjell og hornhinne ble høstet fra 22 stk. atlantisk laks (*salmo salar* L.). Fra prøvene vandret keratocyttilignende celler som var morfologisk ganske like, men hornhinnecellene varierte mer i størrelse. Cellene så ut som speilegg med en ellipseformet cellekropp som mobilitetsorganet lamellipodium strakk seg over 180° rundt i en kanofasong. Cellene kunne være sammenkoblet med celletunneler kalt «tunneling nanotube» (TNT). Den lengste TNT hos hudcellene ble målt til 381 µm (rundt 9,5 cellelengder) og 92 µm hos hornhinnecellene. Elleve ulike fluorescensfarger for visualisering av cellekomponenter ble testet på hudcellene. Tre farger fungerte tilfredsstillende; «MitoTracker Green» (MTG), «MitoTracker Orange» (MTO) og «LysoTracker Red» (LTR). Av disse ble MTG og LTR testet på hornhinnecellene, som så ut til å reagere på samme måte. Ved eksponering for polystyrenpartikler på henholdsvis 503 nm og 955 nm ble cellene farget med LTR. Målet var å se etter opptak av plastpartikler og dens interaksjon med lysosomer, som er kjent for å bryte ned fremmedlegemer. Dette kunne ikke verifiseres. Ut fra observasjoner kan det antas at celler fra både hornhinne og hud fusjonerte. Det ble også vist at hudcellene utveksler mitokondrier. Mitokondrie inne i TNT ble observert, men selve overføringen ble ikke observert.

## Abstract

The skin and cornea constitute the fish defense barriers to external stresses. Both have mobile cells called keratocytes. This is one of the most moving cells known. The cells quickly restore the barrier if the tissue is damaged. This is accomplished by migrating from the wound edges towards the middle of the wound. The wound healing is made more efficient by the cells conducting phagocytic activity of foreign bodies. The cells are very important in wound healing and forms a barrier to pathogens and foreign bodies. The aim was to study these more closely to see how the cells handled plastic particles (polystyrene in micro and nano size). Furthermore, interesting features were observed with the cells, which could be mitochondrial exchange, cell fusion and tunnel formation. This was investigated using advanced «GE Delta Vision Elite» and «NanoLive 3D Cell Explorer» confocal microscopes.

Scales and cornea were harvested from 22 pcs. Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). From the samples keratocyte-like cells migrated out. These were morphologically quite similar, but the corneal cells varied more in size. The cells looked like fried eggs with an elliptical cell body where the mobility organ lamellipodium extended over 180 ° in a canoe shape. The cells could be interconnected with cell tunnels called «tunneling nanotube» (TNT). The longest TNT in the skin cells was measured at 381 µm (around 9.5 cell lengths) and 92 µm in the corneal cells. Eleven different fluorescence colors for visualizing cell components were tested on the skin cells. Three colors worked satisfactorily; «MitoTracker Green» (MTG), «MitoTracker Orange» (MTO) and «LysoTracker Red» (LTR). Of these, MTG and LTR were tested on corneal cells, which appeared to respond in the same way. Upon exposure to polystyrene particles of 503 nm and 955 nm, respectively, the cells were stained with LTR. The aim was to look for uptake of plastic particles and its interaction with lysosomes, which are known to break down foreign bodies. This could not be verified. From observations, it can be assumed that cells from both cornea and skin fused. It was also shown that the skin cells exchange mitochondria. Mitochondria within TNT were observed, but the transfer itself was not observed.

# Innholdsfortegnelse

Sammendrag.....	3
Abstract.....	4
1 Innledning .....	1
1.1 Norsk oppdrettsnæring .....	1
1.1.1 Fiskehelseproblematikk for laks .....	2
1.2 Atlantisk laks.....	2
1.2.1 Huden hos fisk .....	3
1.2.2 Hornhinnen hos fisk .....	7
1.3 Cellefusjonering .....	7
1.4 Plastforsøpling .....	8
1.4.1 Plastforsøpling i oppdrettsnæringen.....	10
1.5 Mikroskop og bildebehandling .....	10
1.5.1 GE DeltaVision Elite.....	10
1.5.2 NanoLive 3D Cell Explorer.....	13
1.5.3 Redigering av bilder i Fiji.....	13
1.6 Inspirasjon.....	14
1.7 Formålet med oppgaven .....	15
2 Materialer og metoder.....	16
2.1 Materialer.....	16
2.2 Forsøksfisk.....	16
2.3 HBSS-løsning.....	16
2.4 Høsting av skjell.....	16
2.5 Prøvetaking av hornhinne .....	17
2.5.1 Behandling av celler fra hornhinnen .....	18
2.6 Behandling av celler før mikroskopering .....	18
2.6.1 Plastpartikler .....	18
2.6.2 Farging.....	20
2.6.3 Blanding av celler som ble farget ulikt.....	21
2.7 Mikroskopering .....	22
2.7.1 Prosedyre for mikroskopering av cellene .....	22
2.8 Bildebehandling .....	23
3 Resultater.....	24
3.1 Keratocyttilignende celler fra hud.....	24
3.1.1 Morfologi – <i>in vitro</i> .....	24
3.1.2 Trypsin-EDTA .....	27

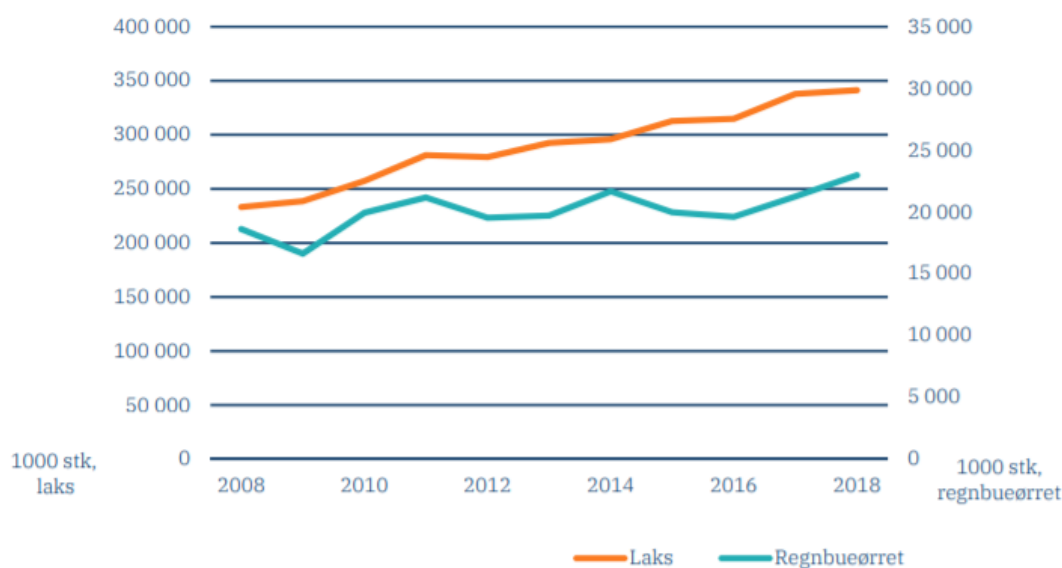
3.1.3	Farging.....	29
3.1.4	Opptak av partikler.....	31
3.1.5	Cellefusjonering .....	36
3.1.6	Mitokondrieutveksling .....	37
3.1.7	Lengde på tunneling nanotube (TNT).....	41
3.1.8	NanoLive .....	42
3.2	Keratocyttilignende celler fra hornhinne .....	43
3.2.1	Morfologi – <i>in vitro</i> .....	43
3.2.2	Farging.....	44
3.2.3	Opptak av partikler.....	45
3.2.4	Cellefusjonering .....	48
4	Diskusjon.....	49
4.1	Keratocyttilignende celler.....	49
4.1.1	Morfologi – <i>in vitro</i> .....	49
4.1.2	Trypsin-EDTA .....	51
4.1.3	Farging.....	51
4.1.4	Opptak av partikler.....	52
4.1.5	Cellefusjonering .....	53
4.1.6	Mitokondrieutveksling .....	54
4.1.7	Lengde på tunneling nanotube (TNT).....	56
4.1.8	NanoLive .....	56
4.2	Forslag til videre forskning.....	57
5	Konklusjon .....	58
	Referanser .....	60
	Vedlegg.....	63

# 1 Innledning

## 1.1 Norsk oppdrettsnæring

Oppdrettsnæringen har hatt en formidabel utvikling fra 1950-tallet og fram til i dag. På 1950-tallet var oppdrett på et forsøksstadium. Denne «prøve og feile»-perioden strakk seg til begynnelsen av 1970-tallet. Perioden kan kalles oppdrettsnæringens pionerfase. Tidlig i 1970-årene og fram til 1991 gikk oppdrettsnæringen over i en gjennombrudds- og vekstfase. Næringen var en småskala, levedyktig distriktsnæring, som hadde et stort utviklingspotensial. Stort sett hadde de regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) og atlantisk laks (*Salmo salar*) i flytemerder i sjø (Schwach, 2015). Fra 1992 til 2018 var det en enorm vekst, der produksjonen av oppdrettsarter, hovedsakelig laks, gikk fra 131 000 til 1 354 939 tonn (SSB, 2019). Veksten kom først og fremst på grunn av produksjonsforbedringer som for eksempel vaksiner, brakklegging ved sykdom, bedre smolt og miljøovervåkning (Schwach, 2015).

Førstehåndsverdien på laks i 2018 var på 64,5 milliarder NOK. Av fisk som ble produsert samme år var 94,6 prosent (%) laks og 5 % regnbueørret. I tillegg ble det oppdrettet noe røye, kveite og skalldyr av betydning (SSB, 2019). I gjennomsnitt var salgsprisen per kilo solgt laks i 2018 på 50,25 NOK (Fiskeridirektoratet, 2019a). Som figur 1 viser, har mengden utsatt laksesmolt økt jevnt fra 2008 til 2018. Utsett av regnbueørretsmolt har holdt seg på omtrent samme nivå, men vært mer vekslende i perioder. Mengden av utsatt regnbueørretsmolt var i 2018 i underkant av 25 millioner fisk, som er det høyeste tallet i perioden. Mengden utsatt laksesmolt var i 2018 i underkant av 350 millioner fisk.



Figur 1 – Antall utsatt smolt fra 2008 til 2018 av atlantisk laks og regnbueørret (Fiskeridirektoratet, 2019b). Utsett av laksesmolt har økt jevnt, mens utsett av regnbueørretsmolt har holdt seg omtrent på samme nivå.

### 1.1.1 Fiskehelseproblematikk for laks

I 2019 var det et svinn på 59,3 millioner laks. 89,1 % av dette var dødfisk, 6,6 % utkast, 4,2 % «annet» og 0,2 % rømt laks. Dette er en økning fra året før, noe som kan forklares med oppblomstringen av giftige alger i Nordland og Troms. Oppblomstringen tok alene livet av rundt 8 millioner laks i 2019 (Sommerset et al., 2020).

Avlusningen sies å være en større velferdsutfordring for laksen enn selve lakselusa (*Lepeophtheirus salmonis*). I 2019 var tiltakene imot lakselus hovedsakelig ikke-medikamentell. Det ble utført mer enn 2000 behandlinger pluss andre tiltak uten bruk av medikamenter slik som utsett av rensefisk. Det er rapportert økt dødelighet i perioden etter ikke-medikamentelle behandlinger. I tillegg ble det rapportert skader etter avlusningen. Av alle rensefiskarter lå median dødelighet på 42 %, men det antas å være store mørketall (Sommerset et al., 2020).

Virussykdommene som dominerer i dag er pankreassykdom (PD), kardiomyopatisyndrom (CMS) og hjerte- og skjelletmuskelbetennelse (HSMB). Av disse er CMS den viktigste årsaken til dødelighet i sjøfasen. Det er registrert tilfeller av infeksiøs lakseanemi (ILA), men det var færre tilfeller i 2019 enn i 2018. Bakteriesykdommer er ikke et stort problem for oppdrettsnæringen i dag. Dette på grunn av vaksiner. Det brukes lite antibiotika, og dyrkning av bakteriene viser lav forekomst av antibiotikaresistens. Av ikke-smittsomme sykdommer og helseproblemer tok som nevnt giftige alger livet av mye laks i 2019. Det er også registrert tilfeller som gjelleproblemer og nefrokalsinose samme år (nyreforkalkning, nyrestein) (Sommerset et al., 2020).

## 1.2 Atlantisk laks

Atlantisk laks, heretter kalt laks, inngår i familien Salmonidae (orden: Laksefisker, underklasse: Teleostei). Hannene kan bli opptil 150 cm og 40 kg, og har en levetid på mellom to og åtte år (Havforskningsinstituttet, 2017). Laksen er en anadrom fisk, som vil si at den går ut i havet på søk etter næring, for så å returnere til ferskvann igjen for å gyte (Webb, Verspoor, Aubin-Horth, Romakkaniemi & Amiro, 2007). Når laksen har utviklet seg til et liv i saltvann, går den ut i havet som en smolt. Da er laksen mellom ett og fem år. Grunnen til dette aldersspennet er at utviklingen styres av temperatur og næringsforhold. Utvandringen skjer mellom april og juni (Mills, 1989). Etter ett til fire år i havet kommer laksen tilbake til samme elv som den ble klekket i for å gyte. Gytingen foregår mellom oktober og januar. Laksens føde i elva er for det meste insekter, mens det i havet er plankton og fiskeyngel, og etter hvert som den vokser går



den over på ulike pelagiske fisker. Arten finnes i elver på begge sider av Atlanterhavet, og i havet over store deler av Nord-Atlanteren (Havforskningsinstituttet, 2017).

Laksen svømmer tilbake til samme elv og i samme område i elva som den vokste opp i. Dette medfører at det kan oppstå biologiske og genetiske variasjoner mellom ulike laksebestander. Undersøkelser har vist at utsett av laks fra annen bestand gir lavere overlevelse enn laks fra den lokale bestanden. Avkom av rømt oppdrettslaks sammen med villaks gir også lavere overlevelse. Noen individer, rundt fem prosent, går opp i feil elv, noe som kan opprettholde en genetisk variasjon. Bestandene av laks er nedadgående for de fleste regioner i Europa og i Nord-Amerika. Størst tilbakegang har det vært i de sørlige områdene på hver side av Atlanteren (Havforskningsinstituttet, 2017).

### **1.2.1 Huden hos fisk**

Huden er en viktig del av immunforsvaret til fisken og er den første barrieren for patogenene. Huden dekker fiskens kropp og beskytter ikke bare mot patogener, men også mot lekkasje av vann, ioner og næringsstoffer (Ángeles Esteban, 2012). Hos de fleste fiskeartene kan huden deles inn i epidermis, dermis og hypodermis. Det spesielle med fiskens hud er at den ikke har et ytre lag av døde celler, og at den ofte inneholder skjell. Huden består av flere lag, hvor figur 2 viser et histologisk tverrsnitt av huden. Det ytterste laget er epidermis som består av et flerlaget plateepitel med bare levende celler. Et samlebegrep for cellene er epidermisceller (Kryvi & Poppe, 2016). De bevegelige epidermiscellene kalles keratocytter (Cooper & Schliwa, 1986). Keratin, som gir en ytre beskyttelse i huden hos landlevende vertebrater, mangler hos de fleste fiskearter (Kryvi & Poppe, 2016). Hos mennesker dekker keratinocytter rundt 95 % av cellemassen i epidermis (Barker, Griffiths, Nickoloff, Mitra & Dixit, 1991). Dermed er det grunn til å tro at betegnelsen på disse cellene hos fisk har fått navnet keratocytter fra keratinocytter siden de fleste fiskearter som sagt ikke har keratin.



Figur 2 – Viser histologisk snitt av hud fra fisk. Del 1 er epidermis og del 2 er dermis. a=plateepitelceller (keratocytter), b=slimceller og c=skjell (Amin, Mortensen & Poppe, 1991).

All fisk har slimproduksjon fra slimceller (figur 2) i epidermis. Det er kjertelceller av ulike typer som produserer slimet. Slimet legges som et lag utenpå epidermis. Dermed blir slimlaget den første forsvarsbarrieren mot infeksjoner, hudparasitter og mekaniske skader. Slimet inneholder stoffer, hvor for eksempel enzymer kan ha en bakteriedrepende virkning (Kryvi & Poppe, 2016).

Får fisken et sår i huden kan skadelige mikroorganismer trenge inn i fisken, og den kan få problemer med å opprettholde osmotisk balanse. Derfor dekker migrerende keratocytter raskt såroverflaten slik at det på ny dannes en barriere. Beskyttelsen kan effektiviseres ved at keratocytterne samtidig kan bedrive fagocytisk aktivitet av fremmedlegemer (K Åsbakk, 2001).

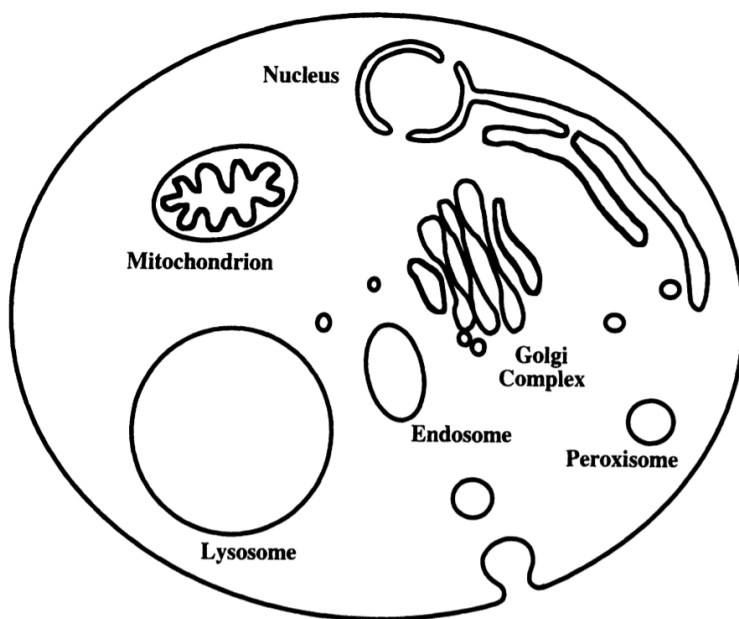
Under epidermis kommer dermis som i hovedsak består av fast bindevev. I dette laget finner vi skjellene (figur 2). Skjellene er organisert slik at de ligger på skrå og overlapper hverandre. Hos mange fisk kommer det et lag under dermis bestående av løst bindevev og fettceller. Dette laget kalles hypodermis (Kryvi & Poppe, 2016).

### 1.2.1.1 Keratocytter

I dette prosjektet ble keratocyttilignende celler i huden og hornhinnen hos laks studert. Ordet lignende blir brukt siden det ikke er funnet noen molekylærbiologisk markør for å skille cellene fra alle andre celler i huden. Cellene som undersøkes ligner cellene som Åsbakk og Dalmo

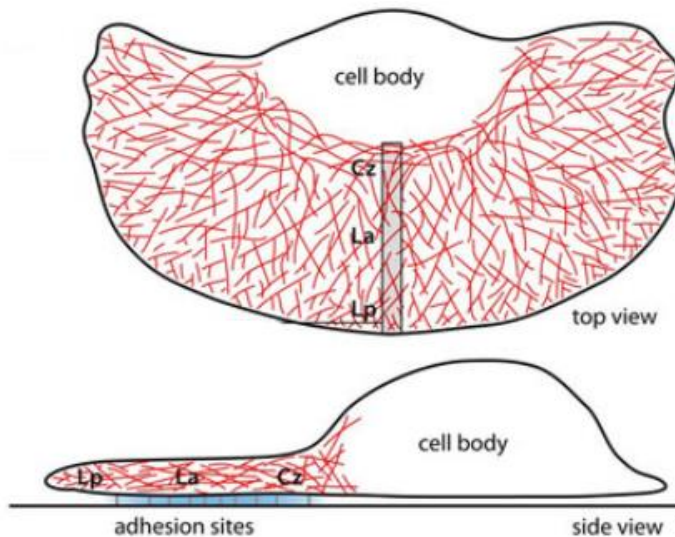
undersøkte (Kjetil Åsbakk & Dalmo, 1998). I sitt arbeid omtalte de cellene som «malpighian cells», noe som senere har blitt omtalt som keratocytter (Mogilner, Barnhart & Keren, 2020).

Når det er hensiktsmessig å undersøke ulike cellekomponenter (figur 3), kan disse markeres med fluorescerende farger. Til dette kan det brukes fargestoffer som er spesifikk for ulike cellekomponenter. I dette prosjektet ble det fokusert mest på å farge mitokondrier og lysosomer. Alle eukaryote celler har mitokondrier, mange har hundrevis av dem. De har en avlang form, ofte flere mikrometer lang. Mitokondrier produserer, under oksidativ fosforylering, adenosintrifosfat (ATP) og karbondioksid ved oksidasjon av sukker og andre energimolekyler. Lysosomer har en rund form og er 0,5-1  $\mu\text{m}$  (mikrometer) i diameter. De brukes av cellen for lagring av enzymer som kan bryte ned spesifikke biologiske molekyler som proteiner, karbohydrater eller fett. De kan også bryte ned ødelagte cellekomponenter (Hardin, Kleinsmith, Bertoni & Becker, 2012).



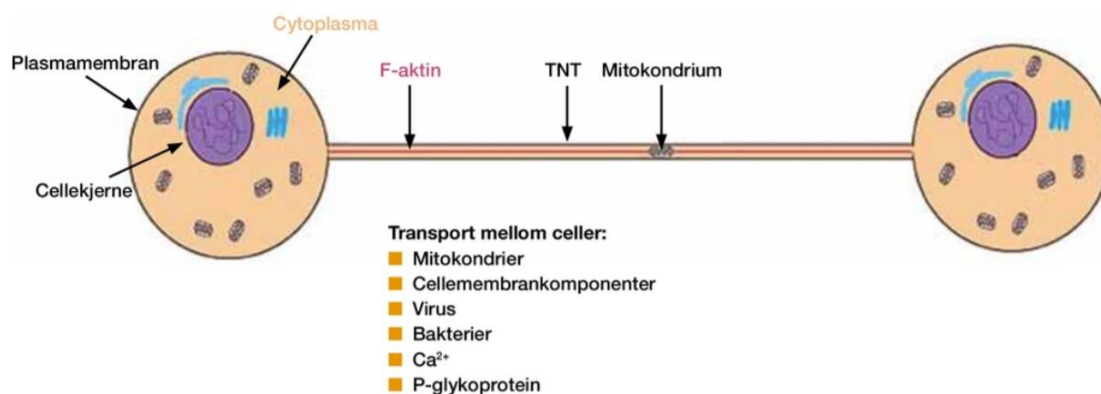
Figur 3 – Illustrasjonsbilde over en eukaryot celle sine organeller (Klionsky & Tomashek, 1999).

Keratocytter har en ellipsoformet cellekropp med lamellipodium omkranset mer enn  $180^\circ$  rundt cellen i en kanofasong. Lamellipodium er viktig for mobiliteten til cellen. Celletypen er en av de mest mobile som er kjent da de har en gjennomsnittsfart på 30-40  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Kjetil Åsbakk & Dalmo, 1998). En annen studie har målt 500  $\mu\text{m}/\text{time}$ , noe som vil si 8,34  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Morita, Tsuchiya & Sugimoto, 2011). Illustrasjon av cellen ser man på figur 4. Cellekroppen («cell body») har en forhøyning, mens lamellipodium flater ut mot underlaget.



Figur 4 – Illustrasjon av en keratocyt fra fisk. Det øverste bilde viser cellen sett ovenfra, mens det nederste er et tverrsnitt (Huber, 2011). Cz, La og Lp er ikke relevante betegnelser i denne sammenheng.

For å opprettholde en multicellulær organisme er cellene avhengig av kommunikasjon. En eller flere celler kan knytte seg sammen med en tynn tunnelligende struktur kalt «tunneling nanotube» (TNT) (figur 5). Strukturen kan være mellom 50 og 200 nanometer (nm) i diameter og ha en lengde på opptil flere cellelengder. Det er påvist innhold og transport av ulike cellekomponenter slik som vesikler og mitokondrier via TNT, i tillegg også virus og bakterier som da kan unngå immunforsvaret (Omsland, Bruserud, Gjertsen & Andresen, 2017). Mitokondriutveksling er spesielt interessant siden en mitokondrie har eget DNA (mt-DNA) som stammer fra maternale celler. mt-DNA, på dyreceller, har blitt påvist å kunne overføres horisontalt. Dette kan forårsake endringer i genuttrykk hos mottakercellen (Torralba, Baixauli & Sánchez-Madrid, 2016). TNT har blitt funnet både *in vitro* og *in vivo* (Omsland et al., 2017). Transport via TNT har ikke blitt påvist hos fiskens keratocytter.



Figur 5 – Illustrasjon av to celler som kommuniserer direkte via en «tunneling nanotube» (TNT). Organeller som for eksempel mitokondrier kan hypotetisk sett overføres fra en celle til en annen. Dette gjelder også virus, bakterier og cellekomponenter (Omsland et al., 2017).

### 1.2.2 Hornhinnen hos fisk

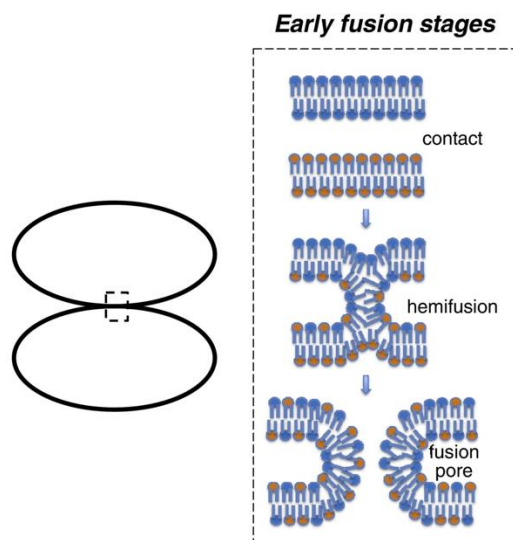
Fiskeøyet ligner et pattedyrsøye med sin generelle oppbygning. Hver fiskeart har et tilpasset øye etter miljøet fisken lever i (Amin et al., 1991). De fleste fiskearter har øynene godt beskyttet inne i hver sin øyehule (orbita) på hver side av hodet. Dette medfører at de har et bredt synsfelt. Hornhinnen (cornea) kler den ytre delen av øyet og er øyets lysbrytende medium (Amin et al., 1991). Hinnen består et flerlaget epitel ytterst som ligger mot et underliggende transparent bindevevslag kalt stroma. Stroma består av et fast bindevev, ofte todelt hos teleoster med væskefylt spalte mellom. Det innerste laget består av ett lag med medialt epitel (Kryvi & Poppe, 2016).

Det ytre hornhinneepitelet er en barriere mot ytre påkjenninger slik som huden. Laget hindrer vann og ioner i å trenge inn i øyet. Epitelet har mobile celler, og disse cellene er viktige for utviklingen og ved sårhelingen. Flere kaller disse cellene for keratocytter slik som hudcellene til fisk. I denne oppgaven beskrives de som keratocyttilignende celler siden det ikke er funnet spesifikk markør for å identifisere cellene. Sårhelingen er viktig for å opprettholde barrieren, men også for å opprettholde hornhinnens gjennomsiktighet og således synet. Sårhelingsmekanismen er i hovedsak lik for fisk og pattedyr (Ubels & Osgood, 1991).

Hos flere arter innenfor teleoster er det også noen få spredte keratocytter i stroma, men hos torskefisk *Nezumia aequalis* ser det ut til keratocytterne kun er til stede i det ytre epitelet (Collin & Collin, 1998).

### 1.3 Cellefusjonering

Cellefusjonering (membranfusjonering) er sammenkopling av to eller flere celler hvor cellemembranene (lipidbilag) fusjoneres. Fusjon har en viktig rolle i cellers overføring av viktige proteiner og ved eksocytose. Ved kontakt mellom to cellevegger blir det i de fleste tilfeller dannet en hemifusjon mellom celleveggene. Dette skaper en forankring som utvides til en pore i membranen hvor utveksling kan foregå som beskrevet på figur 6 (Kozlov & Chernomordik, 2015).



Figur 6 – Viser kontakt og opprettelse av hemifusjon etterfulgt av etablering av en pore mellom to celler (Kozlov & Chernomordik, 2015).

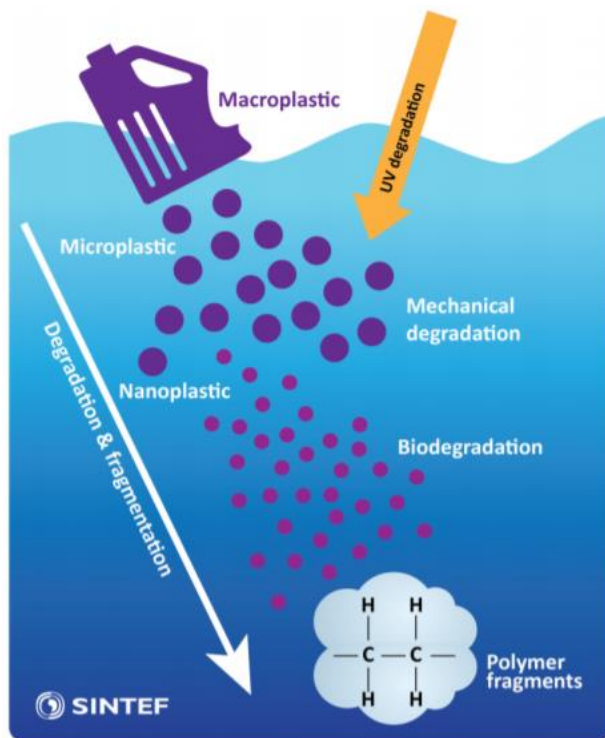
Det første stadiet av poredannelsen har poren nanometerstørrelse som utvides spesifikt for keratocyttilignende celler av aktin- og myosinkontraktile elementer i samspill med endo- og eksocytose (Kozlov & Chernomordik, 2015). Denne poren er av typen TNT, som er omtalt tidligere, og har i forskning på dyreceller vist å kunne overføre signalmolekyler, ioner og cellekomponenter (Torralba et al., 2016).

## 1.4 Plastforsøpling

Plastikk har blitt et uunnværlig materiale for oss mennesker, men den pågående plastforsøplingen er et rasktvoksende, globalt problem. Produksjonen av plast øker jevnt. Fra 1950 til 2017 antar man at det har blitt produsert rundt 8300 millioner tonn plast (Geyer, Jambeck & Law, 2017). Mye av dette kommer på avveie og ut i havet (Jambeck et al., 2015). Et tiltak mot marin forsøpling er forebygging, men det krever at man er kjent med kildene til forsøplingen (Antunes Nogueira et al., 2019).

Plast nedbrytes til mindre og mindre biter. Mikroplast blir ofte definert som plastbiter mindre enn 5 millimeter (mm) (Booth et al., 2017). Definisjonen av nanoplast i flere studier strekker seg fra 1000 nm til 100 nm (Gigault et al., 2018). Det er estimert at mer enn 90 % av den marine mikroplasten ligger i sedimenter på havbunnen, 8 % er i vannmassene, 0,2 % er i overflatevannet og mindre enn 0,001 % er i fisk. Nedbrytningen av plast varierer med henhold til plasttypen. Nedbrytningen starter med en mekanisk nedbrytning drevet av vann og/eller UV-stråling. Deretter starter den biologiske nedbrytningen. Den biologiske nedbrytningen foregår ved at mikroorganismer segmenterer opp materiale videre til metan, karbondioksid og vann.

Slik man ser på figur 7 starter nedbrytningen som regel på polymeroverflaten, deretter brytes makroplast opp i mindre og mindre biter, som videre brytes ned til meso-, mikro- og nanoplast. Til slutt ender plasten opp som polyfragmenter (Booth et al., 2017). Hele nedbrytningen tar veldig lang tid, men med tiden vil all plasten som nå er i havet bli til mindre og mindre partikler, og til slutt fragmenter. Dessverre ser det ikke ut til at dette kan gjøre så mye med (Jovanović, 2017).



Figur 7 – Nedbrytningsprosessen av plast i havet. Makroplast (mesoplast) blir nedbrutt til mikro- og nanoplast under påvirkning av lys- og bevegelsesenergi (Booth et al., 2017).

En internasjonal undersøkelse poengterer at mikroplast i drikkevann finnes de fleste steder i verden. En undersøkelse utført av NIVA viser svært lite mikroplast i det norske drikkevannet. Dermed konkluderte Folkehelseinstituttet med at det ikke er noen grunn til å tro at mikroplast i drikkevann representerer noe helseproblem i Norge (NorskVann, 2019).

Det er publisert få forskningsartikler om helsefaren knyttet til mikro- og nanoplast. Likevel pekes det på at helsefaren partiklene kan medføre, avhenger av partikkelens giftighet, kjemiske oppbygning, konsentrasjon, evnen organismen har til absorpsjon og forekomst i organismens miljø (Revel, Châtel & Mouneyrac, 2018). Eksempelvis har fisken gjennom millioner av år måttet takle partikler som den ikke kan fordøye, som for eksempel sandpartikler. Likevel er ikke de giftige, slik plastpartiklene kan være (Jovanović, 2017).



### **1.4.1 Plastforsøpling i oppdrettsnæringen**

Av typer plastforsøpling er det forsøpling fra land som dominerer globalt. I norske havområder er fiskeri, oppdrett og shipping identifisert som de største kildene til marin forsøpling (Antunes Nogueira et al., 2019). Islandske studier viser til at det produseres ett kilo plastavfall per tonn fanget fisk (Sundt et al., 2018). Anslagsvis produseres det opptil 29 000 tonn plastavfall årlig fra oppdrettsnæringen. Det er estimert at mengden plastavfall er mellom 16 000 og 29 000 tonn plast (Hognes & Skaar, 2017). Noe av platen havner på avveie. Feltstudier har vist at man kan spore mikroplast tilbake til fiskeri- og oppdrettsnæringen. Det er likevel stor usikkerhet på hvor mye søppel som kommer på avveie. De siste årene har interessen økt for mikroplast og effekten av dette på det marine miljø (Antunes Nogueira et al., 2019).

Nordlandsforskning AS og Salt Lofoten AS laget i 2019 en sluttrapport kalt «HAVPLAST – Marin plast fra norsk sjømatnæring – kartlegging, kvantifisering og handling». Målet med rapporten var å finne årsaker til forsøpling av plast og mengder plast som forsøples. Dette kan bidra til bevisstgjøring og dermed mindre utslipp. Fra oppdrettsnæringen ble det vist til utslipp fra merdkonstruksjoner og fra deler av fôrrør og tau. Fôrslinger av plast fører fôret ut til fisken i merda ved bruk av luft. Fôret sliter på slangene og fører til utslipp av mikroplast. Siden det ikke finnes fysiske måledata for utslippet er det laget en modell. Modellen viser at utslippet er mellom 10 til 100 tonn med mikroplast per år (Antunes Nogueira et al., 2019). Dermed er det grunn til å tro at oppdrettsartene og miljøet rundt eksponeres for plastpartikler. Foley et al. viste i en studie fra 2018 at det forskes mer på de laverestående artene i forhold til fisk. Derfor mener de at forskningsinnsatsen bør økes på dette området (Foley, Feiner, Malinich & Höök, 2018).

## **1.5 Mikroskop og bildebehandling**

### **1.5.1 GE DeltaVision Elite**

GE DeltaVision Elite (DV-mikroskop) er et inversmikroskop med egenskaper for visualisering gjennom lysmikroskopi, fluorescens og innsamling av data i tre dimensjoner (3D). DV ble brukt som hovedmikroskop i datainnsamlingen for prosjektet.

#### **1.5.1.1 Lysmikroskopi (POL)**

Initielt studie av cellene ble utført med mikroskopets POL-kanal (innstilling på mikroskopet). Dette er vanlig lysmikroskopi hvor upolarisert lys først blir polarisert i emisjonsfilteret før det treffer preparatet. Når lyset har passert gjennom preparatet blir lyset samlet igjen i kondensatorfilteret slik at det kan presenteres i okularet eller kan presenteres digitalt med kamera. Dette gjorde det mulig å studere bevegelsene til cellene uten å påføre dem for mye



stress. Det ble også innsamlet data i POL-kanalen for hvert enkelt bilde da det ga en god gjengivelse av cellens størrelse og orientering (GE-Healthcare, 2014).

### 1.5.1.2 Fluorescens

Prosessen ved fluorescens skjer ved absorpsjon av lysenergi i form av fotoner etterfulgt av emisjon av fotoner fra det fluorescerende mediet. Reaksjonen som skjer ilar. nanosekunder fører til en reduksjon i energi som er direkte koplet sammen med bølgelengden. Dette resulterer i at lyset som brukes for å få frem fluorescens vil ligge over det emitterte lysets bølgelengde, fenomenet «Stokes shift» (Sanderson, Smith, Parker & Bootman, 2014).

I motsetning til vanlig lysmikroskopi skinner ikke lyset gjennom prøven. I et inversmikroskop kommer lyset opp gjennom objektivet og rettes på prøven. Det emitterte lyset sendes tilbake ned i objektivet hvor det passerer flere filter for så å bli fokusert for okular eller kamera. Denne metoden hvor lyset kommer gjennom objektivet konsentrerer lyset i mye høyere grad sammenliknet med POL-kanalen. I kombinasjon med høy konsentrasjon på et gitt punkt brukes det et spekter av intensitet/bølgelengde for å oppnå den spesifikke fluorescensen man ser etter.

For å kunne studere forskjellige fluorescerende elementer i prøven har mikroskopet forhåndsinnstilte kanaler. Kanalene angir hvilken bølgelengde som blir projisert på prøven og hvilke filter som benyttes. Hver fargeløsning har en optimal bølgelengde for optimal fluorescens. Tilpassing av hvilke kanaler som skal brukes i innsamlingen av data programmeres i dataprogrammet. Kanalene, de spesifikke bølgelengdene som blir projisert og hvilke farger de egner seg til, er gitt i tabell 1.

*Tabell 1 – Navnene på kanalene har fargekode for å indikere fargen (bølgelengden) på lyset som blir emittert (emission). Eksitasjonsbølgelengden (excitation) er gitt med verdien i klammer for å kunne veilede om eksitasjonsbølgelengden ikke er helt eksakt det som er angitt av produsent. Siste linje (common dyes) angir kjente fargestoff den respektive kanalen er anbefalt å brukes på.*

	DAPI	FITC	TRITC	CY5
Excitation	405 (381-399)	488 (464-489)	568 (531-556)	642 (621-643)
Emission	411-459	501-549	574-620	662-696
Common Dyes	DAPI, AF405	Fluorescein, AF488, Cellmask Green, MitoTracker Green, GFP	AF555, AF568, Cellmask Orange, MitoTracker Orange, mCherry, LysoTracker Orange, LysoTracker Red	AF647, Atto647N, DiD, SiR, Cellmask Deep Red, MitoTracker Deep Red

### **1.5.1.3 Autofluorescens**

Ved mikroskopering utsettes hele cellen for lys med ulike bølgelengder. Dette lyset penetrerer celleveggen og påvirker intracellulære organeller og byggeblokkene til cellen. Fenomenet som har navnet endogen fluorescens (autofluorescens) blir eksitert direkte fra cellens bestanddel eller ved overføring av energi fra en annen og med dette danner endogen fluorofor (eksitert form som avgir fluorescens). Eksempler på dette er NADH, aromatiske aminosyrer av proteiner som tryptofan, tyrosin og fenylalanin, sluttprodukter fra lipidmetabolisme samt kollagen og elastin som gir autofluorescens (Prasad, 2004).

Ved bruk av fluorescens som markører for spesifikke organeller er det derfor viktig å ta høyde for at andre bestanddeler av cellen kan vise autofluorescens. Dette kan komme frem som støy og ødelegge for intensiteten på det man ønsker å studere eller gi feil inntrykk (Prasad, 2004).

### **1.5.1.4 Lysbleking**

Lysbleking («photobleaching») er et problem i bruken av fluorescens da den fluorescerende kilden vil avgi sin fluorescerende effekt i kontakt med lys. Sollys eller flytting av prøven i en godt belyst lab kan påvirke effekten negativt, men den største skaden skjer når prøven er under mikroskopet. Høy lysintensitet som gjerne brukes for å få frem fluorescens fører til fotooksidasjon som kan gjøre intensiteten på fluorescensen svakere (Prasad, 2004). Det er derfor viktig å minimere eksponering av prøver med fluorescerende materiale for lys, selv under mikroskopet.

### **1.5.1.5 Fototoksisitet**

Fototoksisitet («photo toxicity») er et fenomen ved lysmikroskopi av levende celler der lyset man bruker påvirker cellen negativt. Et komplekst fenomen hvor bølgelengde på lys, varme og biprodukter av fluorescens er hovedelementer. Ved eksitasjon av fluorescerende lys blir det produsert skadelige frie radikaler hvor cellen er avhengig av å motvirke effekten av dette. Effektiviteten på mekanismene inne i cellen avhenger igjen av mange faktorer som eksponeringstid for lys, cellens alder, tilstand og tilstedeværelse av oksygen. Påvirkningsgraden av dette fenomenet er derfor viktig både i oppsett av forsøk og under vurdering av resultatene. Dette er en faktor som kan minimeres, men ikke elimineres (Laissue, Alghamdi, Tomancak, Reynaud & Shroff, 2017).

### **1.5.1.6 3D**

For å lage et tredimensjonalt bilde av innsamling av data gjennom lysmikroskopi er man avhengig av å tilføre dybde. Fra lengde og bredde, som benevnes langs x- og y-aksen, tilføres

høyde gjennom akse y. På DV-mikroskopet er dette en automatisert prosess hvor man finner den delen av prøven man ønsker å studere, for videre å angi det laveste og høyeste fokale punkt. Det laveste punktet kan for eksempel være under cellen og det høyeste over. Hele høyden deles så inn i snitt (z-plan) som i dette forsøket var 0,25  $\mu\text{m}$ .

Når høyden er gitt og tykkelse på z-plan bestemt er det viktig å angi riktig intensitet og rekkefølge på kanalene man ønsker å bruke. I denne sammenheng er det lurt å begynne med den minst skadelige bølgelengden for å minimere fototoksisitet og bleking av prøven.

Mikroskopet tar så bilder på det angitte punktet i alle z-plan og i alle angitte kanaler og samler dataene sammen i en «tagged image file format» (.tiff-format) (Collins, 2007). Tiff-filen som er rådata i svart-hvitt hentes så ut og redigeres for å få riktig intensitet og farge på de forskjellige kanalene før man kan sette dette sammen til en 3D-modell (tredimensjonalmodell).

### **1.5.2 NanoLive 3D Cell Explorer**

NanoLive 3D Cell Explorer (NanoLive) er et moderne mikroskop som muliggjør billedtaking av levende celler uten farging med fluorescens (Cotte et al., 2013). Teknologien baserer seg på at cellens bestanddeler har forskjellig refraktiv indeks (RI). RI er en optisk parameter som beskriver lysets brytning. Brytningen av lys kommer av skillet mellom områder med forskjellig tetthet. Ved bruk av RI for studier av celler kan man differensiere organeller inne i cellen basert på forskjellen i tetthet (Liu et al., 2016). For å få 3D, roterer lyskilden rundt kameraets akse og skaper en kombinasjon av hologram (interferens mellom lysstråler i 3D) 360 grader rundt prøven (Cotte et al., 2013). Den kamerabaserte datainnsamlingen prosesseres så med datamaskin i programmet STEVE. Programmet produserer en kvantifisert farging (basert på RI og hologram) og produserer et 3D-bilde som senere kan studeres.

### **1.5.3 Redigering av bilder i Fiji**

Redigering av bildene i dette prosjektet ble utført i programmet «Fiji». Fiji er et åpent kildebasert redigeringsprogram utviklet som Macintosh-basert program ved National Institutes of Health (NIH) med Wayne Rasband som hovedutvikler. Programmet er utviklet for redigering av vitenskapelige multidimensjonale bilder og oppdateres kontinuerlig med nye funksjoner («plugins») (Collins, 2007).

#### **1.5.3.1 Målestokk og mål av lengde**

Hvert objektiv er kalibrert med mikroskopets kamera som angir størrelsen på hver piksel. Piksel er den minste enheten som brukes innen digital bildelagring. Pikselen angir lysintensiteten på ett bestemt punkt, her fra sort til hvitt. Pikslene settes så sammen til å forme et bilde på

eksempelvis størrelsen 1024x1024 (Rossen, Bratbergsengen & Pihl, 2019). Når .tiff-filen med bildet opprettes angir mikroskopet antall piksler som tilsvarer 1  $\mu\text{m}$ . Med dette som utgangspunkt kan Fiji sette inn en målestokk («scale bar») som kan brukes til å måle lengder på objekter i bildet.

## 1.6 Inspirasjon

Inspirasjonen til dette prosjektet var arbeidet «Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) epidermal Malpighian cells—motile cells clearing away latex beads *in vitro*» av Kjetil Åsbakk og Roy Ambli Dalmo (Kjetil Åsbakk & Dalmo, 1998). De undersøkte om hudceller av typen «malpighian cells», som i dag omtales som keratocytter, fra laks tok opp latekspartikler (plastpartikler) og gjærceller. Cellene tok raskt opp partiklene, men de tok ikke opp gjærceller. Dette tydet på at cellene selekterte det de tok opp. Noen celler tok opp så mye partikler at de ble fullpakket, slapp seg fra underlaget og ble flytende (Kjetil Åsbakk & Dalmo, 1998). I dette prosjektet ble samme type celler undersøkt, men med et mikroskop som ga betydelig bedre bildekvalitet. Med bedre kvalitet får man ikke bare finere bilder, men man kan også oppdage nye detaljer.

## 1.7 Formålet med oppgaven

Plastforsøpling i havet har de siste årene fått økt oppmerksomhet grunnet en større forståelse for omfanget av forurensningen. Også mikroplast har fått et økende fokus og dens effekt på det marine miljø. Feltstudier har vist at det har vært mulig å spore mikroplast tilbake til sjømatnæringen, som i Norge bidrar mest til marin forsøpling (Antunes Nogueira et al., 2019). Dermed er det grunn til å tro at oppdrettsartene og miljøet rundt også eksponeres for plastpartikler. Fiskens ytre kontakt med vannet er blant annet huden og hornhinnen, og dermed epitelcellene kalt keratocytter. Således var det interessant å studere hvordan disse keratocyttilignende cellene håndterte plastpartikler. Dette arbeidet ble en videreføring av nevnte artikkel i «1.4 Inspirasjon» av Åsbakk og Dalmo. Keratocytter fra hornhinnen har ikke blitt studert *in vitro* og fotografert tidligere. Det var interessant å undersøke om også disse cellene tok opp plastpartikler. Under mikroskopering av celler både fra hud og hornhinne ble det imidlertid oppdaget «fenomener» som kunne ligne på mitokondrieutveksling, fusjonering og tunneldannelse. Disse fenomenene ble også undersøkt.

### Hovedmål

Hovedmålet med denne oppgaven var å se hvordan plastpartikler (polystyren) ble håndtert av keratocyttilignende celler fra laksehud og hornhinne, samt undersøke forekomst av mitokondrieutveksling, cellefusjonering og tunneldannelse – med bruk av inversmikroskopene GE DeltaVision Elite og NanoLive.

### Delmål

- Beskrive og kultivere keratocyttilignende celler fra laksehud og hornhinne.
- Undersøke om cellene utveksler mitokondrier.
- Undersøke om cellene fusjonerer.
- Undersøke tilstedeværelse og lengde på tunneler.

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Materialer

Reagensene er listet under vedlegg. Utstyr nevnes under hvert delkapittel.

### 2.2 Forsøksfisk

Totalt 22 lakser ble gjennom 17 turer tatt ut ved Universitetet i Tromsø (UiT) sin forskningsstasjon «Havbruksstasjonen i Tromsø AS» (Kårvik, 69°86.8352N 18°93.1900Ø). Her ble det tatt ut én eller to fisk hver gang avhengig av forsøkene som skulle gjennomføres. Fisken var ferdig smoltifisert, gikk på sjøvann og ble gjennom forsøket tatt fra to forskjellige kar. Vekten på fisken var mellom 0,7 og 1,8 kg (snittvekt på 1,2 kg). Fisken ble hovet ut av karene med vanlig aluminiumshov med nett av plast. Fisken ble avlivet med slag mot hodet etterfulgt av veiing.

### 2.3 HBSS-løsning

Metoden for kultivering av hudceller er tidligere beskrevet (Kjetil Åsbakk & Dalmo, 1998). Løsningen som ble tilsatt i petriskålen ved høsting ble tillaget i batcher og oppbevart i fryser ved 22 °C. HBSS (Sigma) ble tilsatt antibiotika, som tabell 2 viser. HBSS med antibiotika (alle fra Sigma) blir kalt HBBS-løsning heretter. Hvert legemiddel ble veid opp og tilsatt direkte i flaska. Så ble løsningen fordelt i 50 ml plastrør med lokk. Legemidlene ble levert i pulverform og oppbevart ved 4 °C i kjøleskap. Ved blanding i løsning kunne legemidlene bli ustabile ved kjøleskaptemperatur og ble derfor oppbevart i fryser. Plastrørene ble holdt frosset og tint opp rett før bruk.

Tabell 2 – Viser oversikt over mengde antibiotika i HBSS-løsningen

HBSS (Hank's balanced salt solution) pH 5-6; 1 liter
Amphotericin B 1 µg /ml
Streptomycin 100µg/ml
Penicillin 100 IU/ml

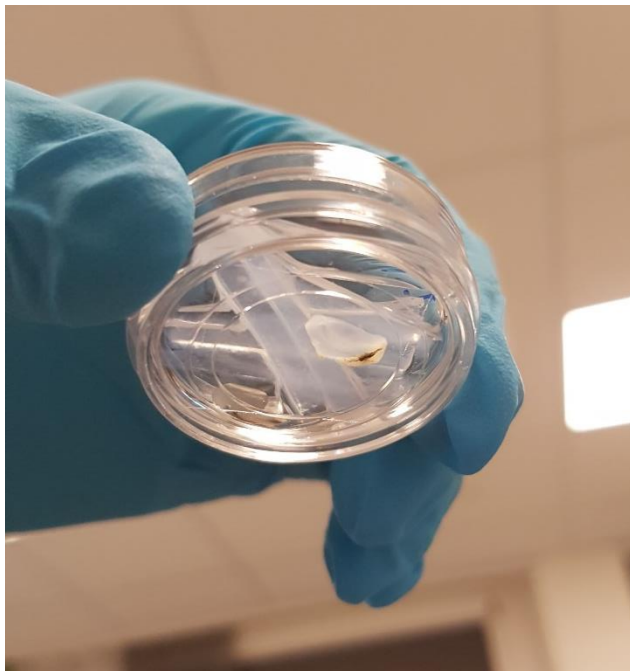
### 2.4 Høsting av skjell

Skjell ble høstet fra området anterior-posterior angitt av ryggfinner og ned til midtlinjeorganet. Skjellene ble forsiktig nappet ut ved å ta tak i den ytre delen av skjellet med pinsett, for så å

overføre dette på en tørr petriskål av plast eller plastskål med glassbunn. Skjellene lå i tørr skål 2-3 minutter for å feste seg til underlaget før HBSS-løsning ble forsiktig tilsatt med pipette. Petriskålene (10-30 stk.) ble stablet forsiktig i desinfiserte plastbokser og deretter plassert i isoporboks med kjøleelement. Temperaturen inne i boksen ble målt til en temperatur på 2°C med kjøleelement. Boksen ble så transportert 33 km på tidvis meget humpete veier med en kjøretid på 40 minutter. Plastboksen med celler ble så plassert i et temperaturkontrollert skap på mellom 7-10 °C ved Norges fiskerihøgskole (NFH) på UiT campus.

## 2.5 Prøvetaking av hornhinne

Prøvetakingen av øyet ble ved hvert tilfelle utført så fort som mulig etter avlivning av fisken. Fisken ble lagt ned på bordet med en gjenstand under gjellelokket slik at begge øyene skulle ligge fritt. Prøvetakingen ble utført ved å skjære rundt kanten av øyet ved bruk av skalpell og pinsett. Deretter ble hornhinnen løftet opp og dyppet i HBSS-løsning for å få bort så mye blodceller som mulig. På forhånd var det laget agarose. For å holde hornhinnen nede mens HBSS-løsningen ble tilsatt, ble det brukt dekkglass og agarosebiter slik man ser på figur 8. Prøvene ble inkubert i samme plastboks som hudcellene, og plassert i et temperaturkontrollert skap på mellom 7-10 °C på Norges Fiskerihøgskole (NFH) på UiT campus.



*Figur 8 – Viser hvordan hornhinnen ble holdt nede i skåla med HBSS-løsning ved bruk av dekkglass og agarose.*

Det måtte mange forsøkt til for å finne en passende prøvetakningsmetode av hornhinnen. Det ble observert at nevnte metode ga flest celler og mest sammenlignbare celler i forhold til de keratocyttilignende cellene fra huden. Likevel var det ikke hver gang det lyktes å fram noen

celler i det hele tatt, uansett metode. Andre ganger ble det relativt mange celler. Det ble forsøkt å skjære ut hele øyet og legge hornhinnen ned på glasset, støttet opp med agarose. Halve øyet ble også skjært ut og hornhinnen lagt ned på glasset, støttet opp med agarose. Dette ga altså lite eller ingen celler, selv etter flere forsøk. Med disse metodene, kunne cellene enkelte ganger få en utypisk form slik at de ikke kunne sammenlignes med celler andre forsøk. Før idéen med å bruke agarose for å holde hornhinnen/øyet nede på bunnen, ble det forsøkt å bruke limene «Dental glue» og «Poly-L-lysin». Dette lyktes ikke, og hornhinnen ble flytende i løsningen.

### **2.5.1 Behandling av celler fra hornhinnen**

Prøvene av hornhinnen ble behandlet med forsiktighet siden det ble erfart at disse cellene festet seg dårligere til bunnen enn hudcellene. Agarosen, dekkglasset og hornhinnen ble etter inkubering fjernet forsiktig med pinsett. Deretter ble væsken sugd opp forsiktig fra kanten av skåla, og ny HBSS-løsning ble tilsatt forsiktig i kanten. Dette ble gjort fire ganger. Grunnen til dette var for å fjerne grums og blodceller. Farging og tilsetning av plastpartikler ble utført på samme måte som for hudcellene, men som forklart med større grad av forsiktighet.

## **2.6 Behandling av celler før mikroskopering**

Cellene ble, som tidligere nevnt, inkubert på NFH. Rommet hvor mikroskopene befant seg (mikroskopilaben) lå på Teknologibygget på UiT campus. For å unngå for mye flytting etter behandling, ble skålene med celler farget og tilsatt plast på mikroskopilaben. Inkubasjon i lav temperatur på mikroskopilaben ble gjort i et kjøleskap på 4 °C.

### **2.6.1 Plastpartikler**

For å studere cellenes interaksjon med plast, ble cellene utsatt for plastpartikler i mediet. Det ble brukt plastkuler av typen polystyren med innbakt fluorescens for visualisering. Plastpartiklene var 955 nm og 503 nm i diameter.

#### **2.6.1.1 Tillagning av løsning med plastpartikler**

Plastpartiklene ble levert i suspensjon (1 ml) som inneholdt 1 % plast. Det var derfor hensiktsmessig å fortynne løsningen til  $10^{-5}$  (10 000x) før tilsetning til cellene. HBSS-løsning ble brukt som medium for fortynningens første steg hvor 0,5 µl plastløsning ble tilsatt i 50 µl HBSS-løsning for å oppnå  $10^{-2}$ -løsning (0,01 % plast/ml). Løsningen ble så blandet godt ved hjelp av vortexing før andre steg hvor 10 µl av denne løsningen ble tilsatt i 1000 µl med ny HBSS-løsning. Med dette som utgangsløsning, ble det i tredje steg tilsatt 200 µl av denne løsningen til de 2000 µl med HBSS-løsning som allerede var i skålen for å oppnå  $10^{-5}$ -



fortynning (0,00001 % plast/ml). I hvert steg av fortynningen ble det benyttet pipette med plastspiss blandet i 5 ml eppendorfrør av plast.

#### **2.6.1.2 Tilsetting av plast til cellene**

For å gi cellene tid til å interagere med platen, var det nødvendig å tilsette plast en stund før farging og mikroskopering. Derfor ble platen i de fleste tilfeller tilsatt dagen før. Ved overføring av partiklene til skålen, ble løsningen med plastpartiklene forsiktig tilsatt petriskålen med celler. Mediet ble så blandet ved aspirering. Dette ble gjort i kombinasjon med å bevege pipettespissen over området med celler for å sikre at partiklene ble jevnt spredt. Cellene ble så satt forsiktig i kjøleskap på mikroskopilaben ved 4 °C for å minimere bevegelse av mediet og partikler.

## 2.6.2 Farging

### 2.6.2.1 Farger

Tabell 3 viser en oversikt over fargene som ble utprøvd på keratocyttilignende celler fra laksehud.

Tabell 3 – Viser oversikt over farger som ble brukt for å farge ulike cellekomponenter i keratocyttilignende celler fra laksehud.

Navn	Fargemål	Farge	Kanal
MitoTracker™ Green FM (MTG)	Mitokondrier	Grønn	FITC
MitoTracker™ Orange CM-H2TMRos (MTO)	Mitokondrier	Oransje	TRITC
LysoTracker™ Red (LTR)	Sure organeller, slik som lysosomer	Rød	TRITC
CellMask™ Green (CMG)	Plasmamembranen	Grønn	FITC
CellMask™ Orange (CMO)	Plasmamembranen	Oransje	TRITC
Dye Aye (Dil)	Plasmamembranen	Oransje/rød	TRITC
Cytoskeleton kit	F-aktin	Rød	CY5
mCling-ATTO 647N	Plasmamembranen	Rød	CY5
Nile Red	Intracellulære lipiddråper og plasmamembranen	Rød	CY5
Hoechst 34580	Cellekjernen	Blå	DAPI
Wheat Germ Agglutinin (WGA)-Alexa594	N-acetyl-D-glukosamin og sialinsyre	Grønn	TRITC

De fargene som fungerte og ble brukt på hudceller var MTG, MTO og LTR. På celler fra hornhinnen ble kun MTG og LTR utprøvd og brukt.

### 2.6.2.2 Fargeløsning

Fargeløsningene ble i første omgang laget slik prosedyrene er for pattedyrceller. Det ble raskt oppdaget at fiskecellene trengte høyere konsentrasjon av fargestoff og lengre inkuberingstid fordi innledende farging viste seg å være for svak under mikroskoperingen. Denne utprøvingen

var tidkrevende pga. tillagning av løsningsmiddel, inkubering og mikroskopering. Det ble også forsøkt å farge samme celler med flere farger. Derfor ble det ikke tid til å kjøre mange tester på hver mikroskoperingsdag. Dette medførte at det ofte ble slik at man måtte vente til neste uttak for videre uttesting.

Keratocyttilignende celler fra hornhinne og hud fikk samme konsentrasjon av farge. Etter lengre uttesting ble det for MTG og LTR standardisert å lage en 1:1000-løsning. For MTO ble det vanligvis laget en 1:1000-løsning, men det ble etterhvert laget 1:2000-løsning, siden den også fungerte for hudcellene. Alle ble inkubert i romtemperatur under fargingsprosessen. De samme cellene ble ikke farget med flere farger, kun én farge.

### **2.6.2.3 Fargeprosedyre**

Fargingen av cellene ble i hovedsak utført etter bruksanvisningene fra produsentene, men protokollen måtte endres litt etter hvert. Fargeprosessen startet ved å suge opp medium i skåla for så å tilsette fargeløsningen. I glasskålene ble det tilsatt 300 µl fargeløsning, mens det i plastskålene ble tilsatt 500 µl. Det ble tilsatt mer i plastskålene siden de fikk flere skjell og hadde et større bunnareal. Cellene med fargeløsning ble deretter inkubert mørkt i romtemperatur i én time. Så ble skåla vasket med HBSS-løsning for å fjerne fargeløsning. Dette ved først å suge opp fargeløsningen, for så å tilsette 1 ml HBSS-løsning, suge den opp, igjen tilsette 1 ml HBSS-løsning, suge den opp og så til slutt tilsette 2 ml HBSS-løsning. Da var cellene klare til mikroskopering. Med unntak av mikroskoperingen ble cellene oppbevart mørkt og kjølig rundt 4 °C.

Ved farging av celler fra hornhinnen ble oppsuging av væske og tilsetting av væske gjort mer forsiktig. Som tidligere nevnt, ble det erfart at disse cellene ikke satt like godt til glassbunnen som hudcellene og man kunne dermed risikere å løsne cellene fra bunnen ved for hard behandling.

### **2.6.3 Blanding av celler som ble farget ulikt**

For å få fram mange celler, ble rundt 15 skjell lagt i hver plastskål. Dagen etter ble celler i ei skål farget med MTG og celler fra ei annen skål farget med MTO. Etter vasking ble det tilsatt 400 µl 0,25 % trypsin-EDTA for å få cellene til å løsne fra underlaget. Trypsin-EDTA fikk virke i fire minutter. To minutter ut i denne behandlingen ble skjellene fjernet med pinsett. Dette for å få løsnet opp celler som lå under skjellene. Etter de fire minuttene ble det tilsatt 1 ml 10 % føtalt kalveserum (FKS). Dette for å nøytralisere trypsin-EDTA. Skåla ble vendt omhyggelig for å blande løsningene godt.

Celleløsningen fra skåla farget med MTG og skåla farget med MTO ble så overført til et sentrifugerør. Løsningen ble sentrifugert på 200 x g i fem minutter. Deretter ble løsningen sugd opp slik at pelleten lå igjen. Pelleten var vanskelig å se, derfor ble det etterlatt noe væske i bunnen for å være sikker på at man ikke sugde opp pelleten. Så ble det tilsatt 1 ml HBSS-løsning og pipettert forsiktig opp og ned for å blande. Løsningen ble overført til ei glasskål og inkubert i kjøleskap på rundt 4 °C i minst i én time, men ofte lengre. Dette for å gi cellene tid til å feste seg til bunnen.

Da man så på cellene i mikroskopet var det mange flytende celler og en del grums. Dette ble fjernet ved å suge opp væsken forsiktig i kanten av skåla og forsiktig tilsette ny HBSS-løsning. Etter fire runder med dette forsvant det meste og det ble enklere å se cellene på bunnen. Hvis oppsugingen og tilsetningen ble utført med for hardt sug/trykk, ble mesteparten av cellene fjernet.

## **2.7 Mikroskopering**

For å studere cellene og for dokumentasjon i form av fotografering, ble det brukt flere forskjellige mikroskoper. Mikroskopene som ble brukt var inversmikroskop med objektiv på undersiden av det man ønsker å studere. Bildene i dette forsøket er tatt med mikroskopene GE DeltaVision Elite (DV-mikroskop) og NanoLive. Alle figurene, bortsett fra én, viser mikroskopibilder fra DV-mikroskopet. Dermed spesifiseres det ikke under hver figur hvilket mikroskop som har blitt brukt.

### **2.7.1 Prosedyre for mikroskopering av cellene**

#### **2.7.1.1 GE Delta Vision Elite**

DV-mikroskopet var utstyrt med kamera av typen Pco.edge sCMOS sensor med størrelse 2560x2160 piksler. Ved billedtaking ble det for det meste brukt en oppløsning på 1024x1024 piksler da kamera har høyere lyssensitivitet og øker kvaliteten på bildene ved denne oppløsningen.

Ved bruk av mikroskopet ble innstillinger og oppsett av forsøket gjort gjennom programmet DeltaVison SoftWoRx™. Programmet hadde full kontroll over de fleste funksjonene til mikroskopet og det var ikke nødvendig å bruke okularet, selv om dette også ble benyttet. Ved oppstart på ustudert skål med celler ble programmet brukt til å kartlegge et større område for å lettere finne cellene, da særlig frie celler. Denne teknikken hindret kontinuerlig bruk av lys på prøven og var med på å motvirke både blekende og toksisk effekt på cellene.

Funn av interessant aktivitet ble markert i programmet og studert nærmere. Kanalene som ble benyttet (bølgelengde på lyset) ble valgt ut på grunnlag av hvilken fluorescens som skulle studeres. For å begrense de negative effektene blått lys (høy intensitet) har på levende celler ble oppsettet i programmet slik at kanalene med rødt lys (lav intensitet) ble tatt før kanalene med grønt lys etterfulgt av blått lys til slutt.

Ved innsamling av bildeserie («time lapse») ble programmet innstilt med kanaler og område for billedtakingen. Gjennomføringen av denne datainnsamlingen ble ofte satt opp på kvelden slik at mikroskopet kunne jobbe ut over natten.

### **2.7.1.2 NanoLive 3D Cell Explorer**

NanoLive er ikke utstyrt med okular, men baserer seg på kamera som presenterer bilde på PC-skjerm. Ved oppstart er man derfor avhengig av direktevisning av prøven på skjerm for å lete seg frem til et interessant område man ønsker å studere nærmere. Ved funn av interessant område setter man opp billedtakingen gjennom datamaskinen som starter datainnsamlingen. Både billedtakingen og prosesseringen krever en kraftig datamaskin og filene ender ofte opp på rundt 80 gigabyte.

Mikroskopet er spesialisert for billedtaking av levende celler for å ta lengre bildeserier av cellene. Bevegelsene til cellene må derfor korrigeres manuelt ved å flytte objektbordet i riktig retning. Dette kan være en utfordring da bildene og plasseringen av cellen er forsinket med 5 sekunder før de presenteres på skjermen grunnet prosessering.

## **2.8 Bildebehandling**

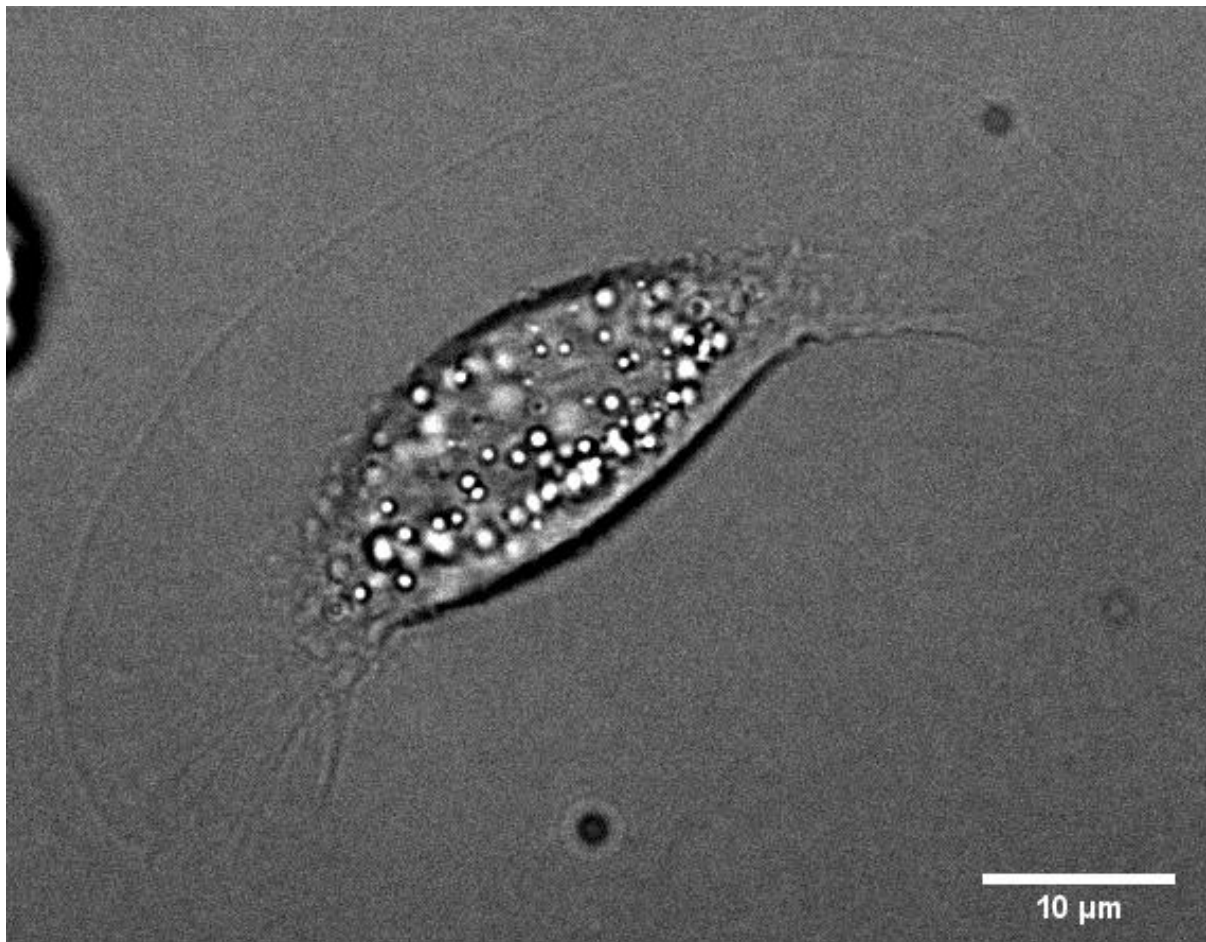
.tiff-filene som ble generert av mikroskopet ble åpnet i Fiji hvor man må angi hvordan bildet skal fremstilles. Ved redigering ble funksjonene «multicolour» og «hyperstack» benyttet når bildene ble åpnet. Multicolour farger hver kanal i forskjellige farger slik at gjenstander med forskjellig bølgelengde kan differensieres. Fargene ble endret fra oransje/rød til magenta og fra grønn til cyan med formål å gjøre det enklere for fargeblinde å skille dette fra hverandre (Okabe & Ito, 2002). Magenta ligner en rosa farge, mens cyan er turkis. Hyperstacks er en funksjon hvor programmet legger bildene med forskjellige farger oppå hverandre. Hvert z-plan blir presentert i sekvens slik at det er mulig å bla gjennom prøven i høyderetning (Ferreira & Rasband, 2012).

## 3 Resultater

### 3.1 Keratocyttilignende celler fra hud

#### 3.1.1 Morfologi – *in vitro*

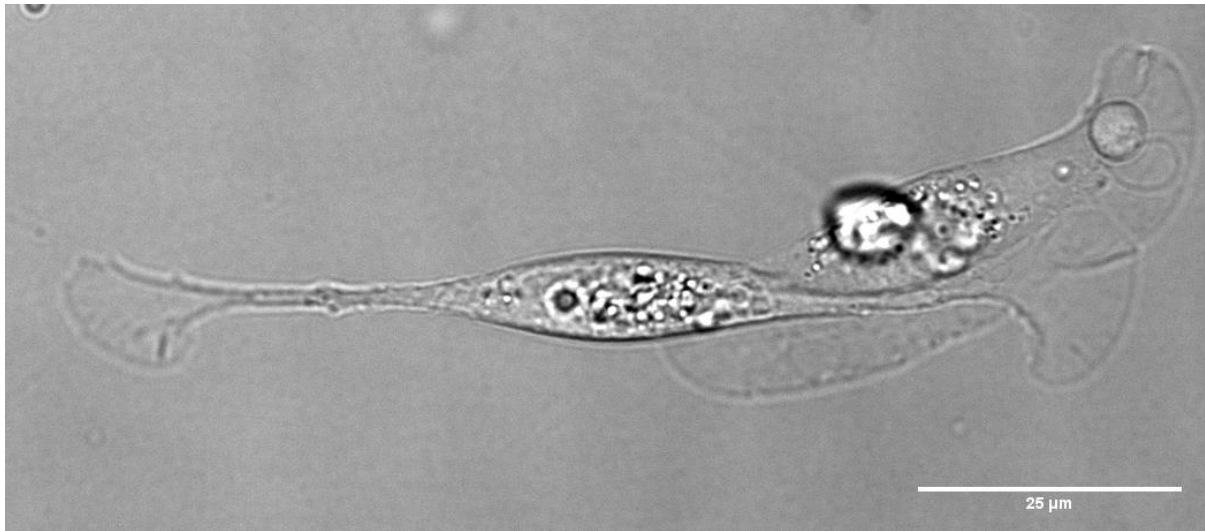
Keratocyttilignende celler vandret ut fra skjell fra laks lagt i glasskål med HBSS-løsning. Keratocytter er mobile epitelceller som kommer fra fiskens ytre hudlag kalt epidermis som er fiskens ytre forsvarsbarriere (Kryvi & Poppe, 2016). Keratocyttilignende celler hadde en ellipsoideformet cellekropp der over halvparten av cellen var omkranset av lamellipodium som er viktig for mobiliteten (figur 9).



Figur 9 – Viser et mikroskopibilde (polariseringsmikroskopi i 60x) av en typisk keratocyttilignende celle. Den mobile delen, kalt lamellipodium, dekker over halvparten av cellen i en kanofasong.

De keratocyttilignende cellene var rundt 40 µm lange og 20 µm brede i kroppen. Cellene beveget seg ved hjelp av lamellipodium som bredte seg mer enn 180° rundt den ellipsoide cellekroppen - i en kanofasong. Cellen beveget seg vinkelrett i forhold til lamellipodium. Ofte var de keratocyttilignende cellene samlet i relativt store cellemasser (figur 11) som beveget seg utover bunnen fra skjellet. Frie enkeltceller kunne også bevege seg inn og ut fra cellemassene.

De keratocyttilignende cellenes form varierte. Noen ganger trakk de seg sammen, mens andre ganger strakk de seg ut. Cellene kunne også endre plassering av lamellipodium (figur 10).

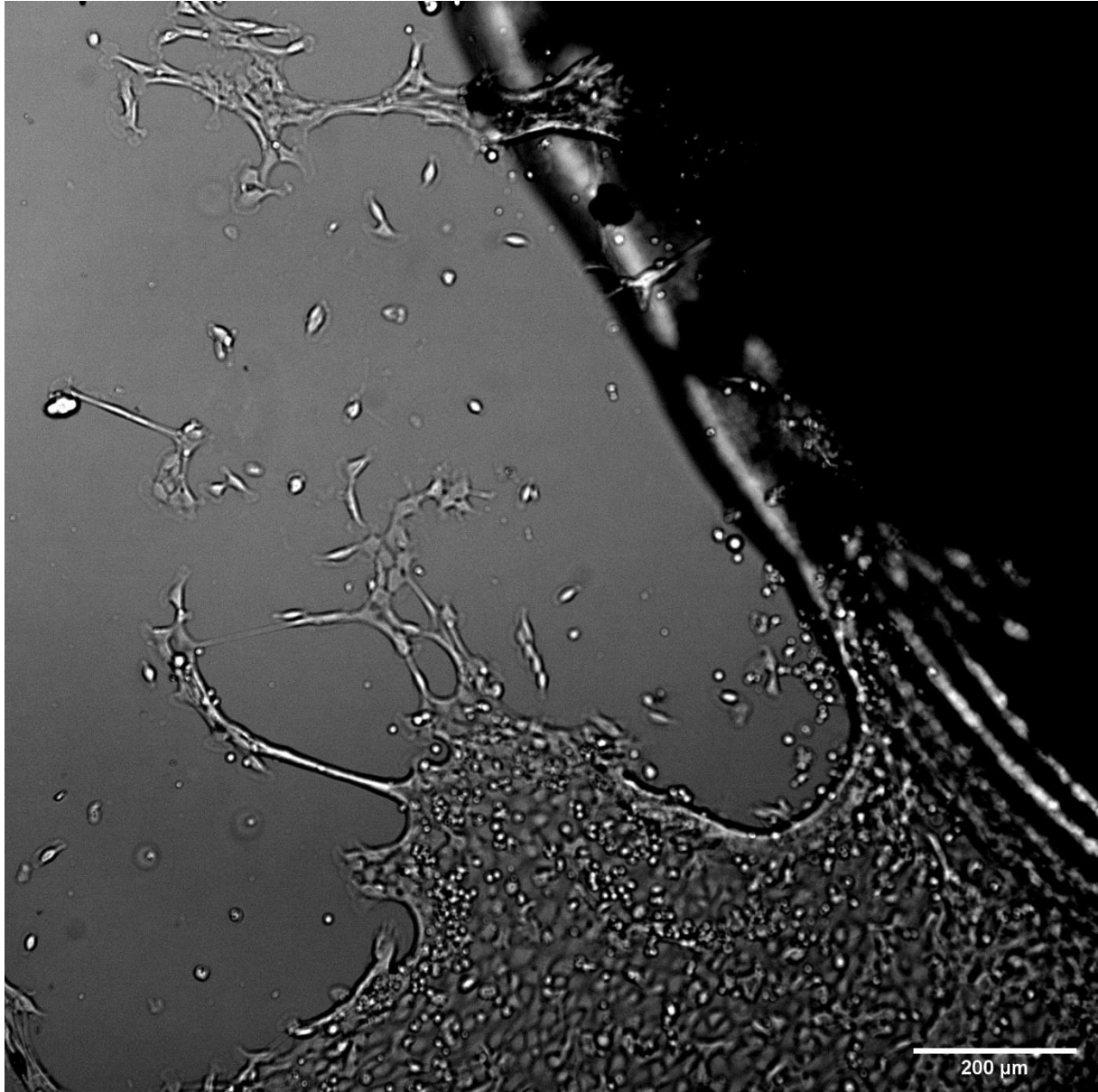


*Figur 10 – Viser et mikroskopibilde (polariseringsmikroskopi i 60x) av en keratocyttilignende celle som strekker seg ut til sidene.*

Cellen hadde en lengde på 101 µm målt fra ytterst på lamellipodium fra side til side. For sammenligning ble cellen vist i figur 9 målt på samme måte til 59 µm. På dette tidspunktet så det ut til at cellen kun hadde lamellipodium på sidene av cellen. Altså at lamellipodium hadde «delt seg i to». Det så ut som at de to delene av lamellipodium kravlet i motsatt retning og dermed strakk ut cellen.

### 3.1.1.1 Mobilitet

Enkeltceller kan som sagt bevege seg inn og ut fra cellemassen. Ved å ta et mikroskopibilde med 10x objektiv, fikk man en god oversikt over cellenes utvandring fra skjellet, slik man ser på figur 11.

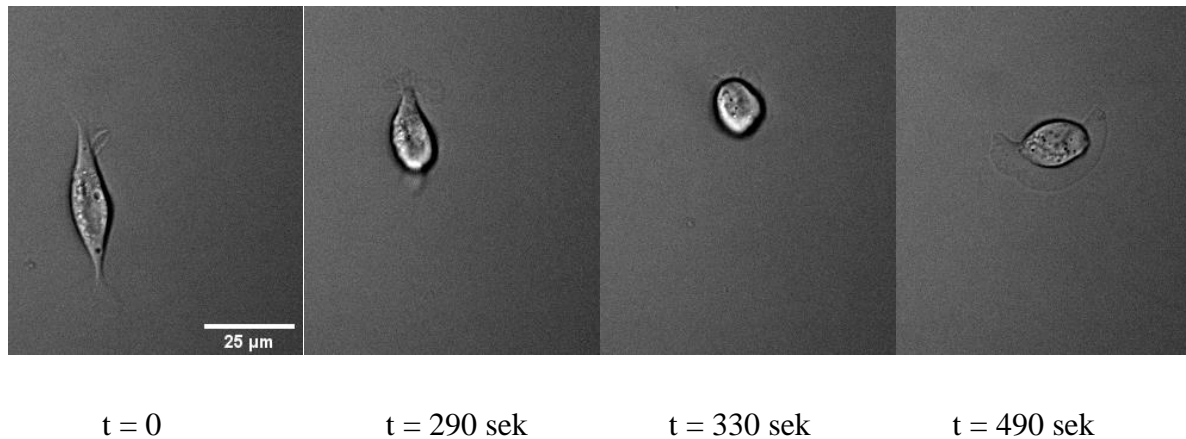


*Figur 11 – Keratocyttilignende celler som utvandrer fra lakseskjell. Skjellet er den mørke delen øverst til høyre, mens cellemassen vises i nedre bildehalvdel. Cellene opptrer også som enkeltceller. Mikroskopibilde (10x).*

Når man napper ut skjell vil det bli med deler av epidermis. Det er celler fra dette laget man ser brer seg ut fra skjellet. Skjellet er den mørke delen øverst til høyre. Cellene former lange tunneler mellom hverandre og til cellemassen.



Keratocyttilignende celler brukte lamellipodium aktivt til å trekke seg framover. Cellene kunne også virke inaktive ved at de under forflytning kunne ha midlertidige pauser. Da kunne de trekke lamellipodium til seg og bli rund (figur 12; t = 330 sek). I noen tilfeller så det ut til at de forble slik, mens de i andre tilfeller ble «normale» igjen – og utviklet lamellipodium rundt seg (figur 12; t = 0 og t = 490 sek).

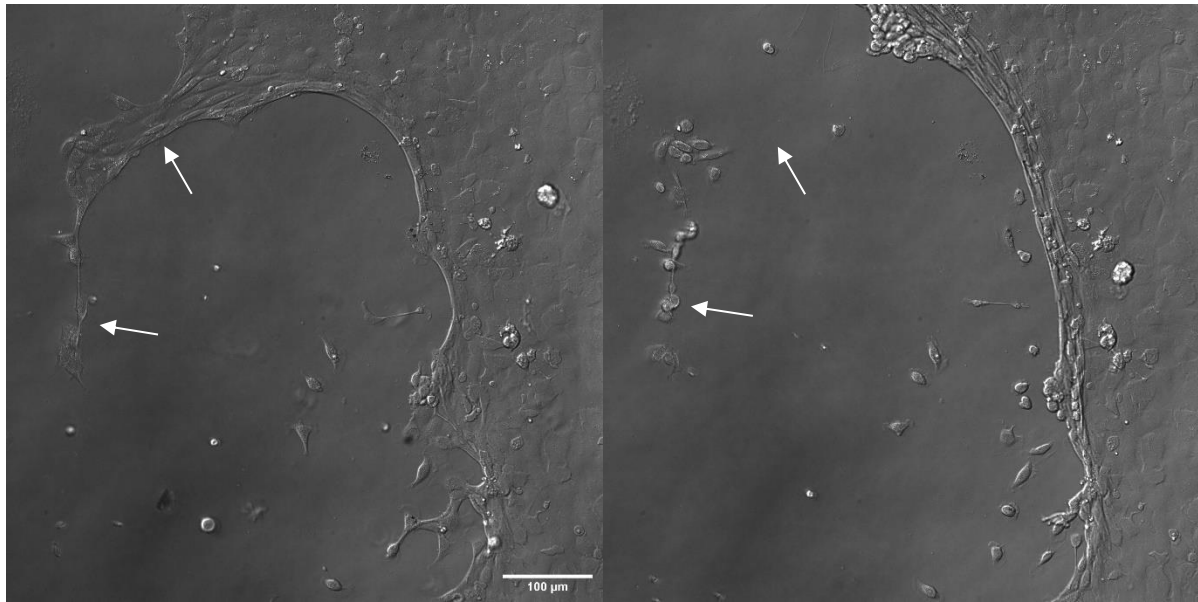


Figur 12 – Keratocyttilignende celler fra laks der cellen under forflytning endret form. Dette er bilder fra en bildeserie tatt med 20x objektiv. Video er tilgjengelig.

Ved startpunktet i bildeserien hadde cellekroppen en typisk form som en keratocyttilignende celle (figur 9), hvor lamellipodium så ut til å ha trukket seg til kortsidene. Etter 290 sekunder så det ut til at lamellipodium slapp underlaget på den ene kortsiden av cellen. Etter 330 sekunder hadde cellen fått en rund form. Etter 490 sekunder fikk cellen tilbake en mer typisk form, dog med en mer rund cellekropp i forhold til t = 0. Det ble ikke observert hindringer som påvirket cellen under forflytningen.

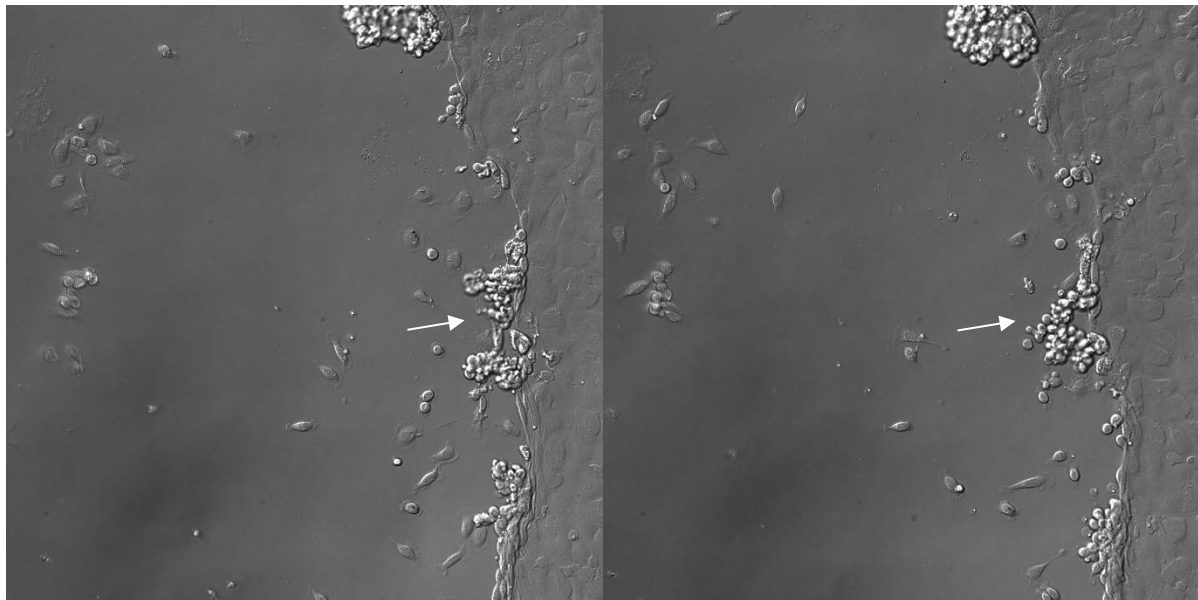
### 3.1.2 Trypsin-EDTA

For å få celler i suspensjon (løsnet de fra underlaget i petriskålene) ble hudcellene som hadde festet seg på bunnen behandlet med 0,25 % trypsin-EDTA-løsning. Dette medførte at mange celler slapp underlaget og fløt fritt i mediet. For å nøytralisere trypsin-EDTA ble det tilsatt 10 % FKS som inneholder trypsininhiberende molekyler. Behandlingen medførte at mange celler festet seg til bunnen igjen og ble mobile. Figur 13 viser celler som krøller seg sammen 95 sekunder etter tilsetning av trypsin-EDTA-løsning (figur 13; t = 95 sek) og at flere strakte seg ut igjen etter tilsetning av FKS (figur 13; t = 210 sek).



t = 0

t = 95 sek



t = 210 sek

t = 895 sek

*Figur 13 – Keratocyttilignende celler fra laks der de ved t = 0 ble eksponert for 0,25 % trypsin-EDTA og etter t = 210 sekunder ble eksponert for 10 % føtalt kalveserum. t = 0 og t = 95 sek er anvist med to piler på samme punkt, der man ser at cellemasser med tiden blir adskilt og enkeltceller krøllet seg sammen. t = 210 sek og t = 895 sek er også anvist med pil på samme punkt som viser at etter eksponering av serum blir færre celler krøllet sammen. Figuren er satt sammen av en bildeserie med mikroskopibilder tatt med 20x objektiv. Video er tilgjengelig.*

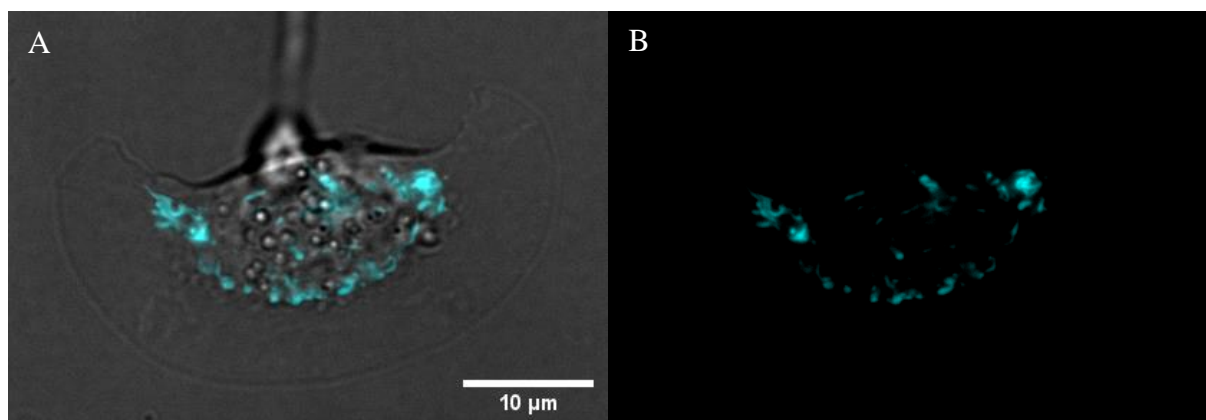
Ved t = 0 ble 0,25 % trypsin-EDTA-løsning tilsatt. Etter 95 sekunder så man tydelig at cellemassen trakk seg tilbake. En del enkeltceller og celler ytterst i cellemassen krøllet seg sammen (se piler). Etter 210 sekunder var cellemassen ytterligere tilbaketrukket. På dette tidspunktet ble 10 % FKS tilsatt. Man ser at etter 895 sekunder hadde deler av cellemassen (se

pil) og en del enkeltceller strukket seg noe mer ut igjen. Denne metoden ble brukt til å blande celler som på forhånd hadde blitt ulikt farget.

### 3.1.3 Farging

#### 3.1.3.1 MitoTracker Green

Farging av celler er en teknikk som brukes for enklere å visualisere celler og cellekomponenter/organeler ved bruk av mikroskop. For å visualisere mitokondriene ble det blant annet brukt «MitoTracker Green» (MTG). Figur 14 viser en keratocyttilignende celle mikroskopert med 60x objektiv farget med MTG. Grønnfargen ble endret i programvaren Fiji (billedigeringsprogram) til cyan slik at det skulle bli enklere for fargeblinde å se.

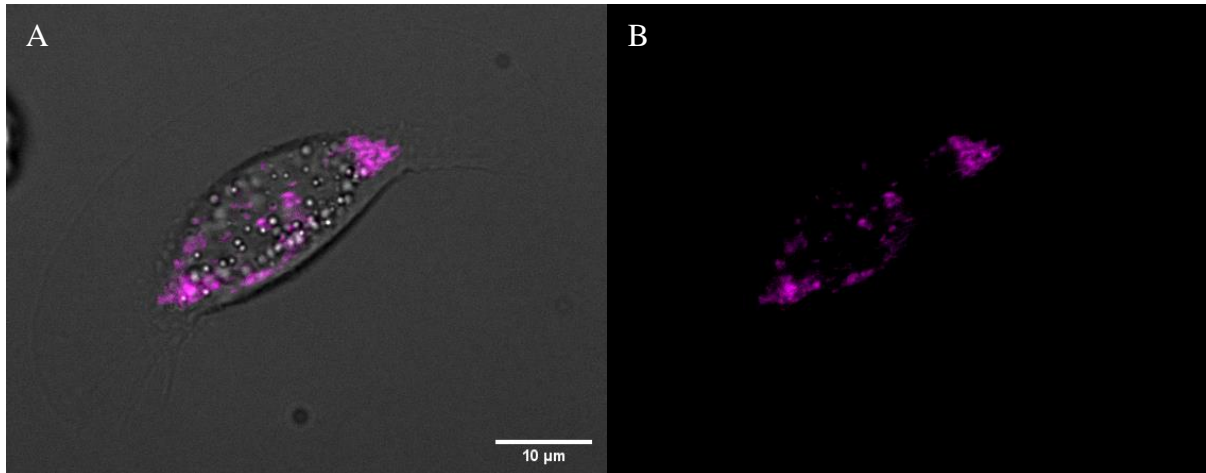


Figur 14 – To bilder av samme keratocyttilignende celle fra laks som var farget med «MitoTracker Green». Bilde A er ett polariseringsbilde satt sammen med bilde tatt med FITC-kanal da dette gjør det mulig å se mitokondrienes plassering i cellen. Bilde B viser bilde tatt med FITC-kanal alene da dette gjør det enklere å studere mitokondriene.

Bilde A (figur 14) viser to lag med bilder satt sammen. Det ene bildet er et polariseringsbilde og det andre er et bilde tatt med FITC-kanal. Man ser at mitokondriene ligger relativt spredt i hele cytoplasma, noe som ble bekreftet ved mikroskopering med kun FITC-kanal (bilde B). Rundt kanten på cellekroppen så man at mitokondriene lå ganske tette. Det var større ansamlinger på hver kortsida av cellen. I midten av cellen syntes det å være færre mitokondrier.

### 3.1.3.2 MitoTracker Orange

Mitokondriene ble også farget med «MitoTracker Orange» (MTO). Fargen ble endret i Fiji til magenta slik at det skulle bli enklere for fargeblinde å se. Figur 15 viser en keratocyttilignende celle farget med MTO.

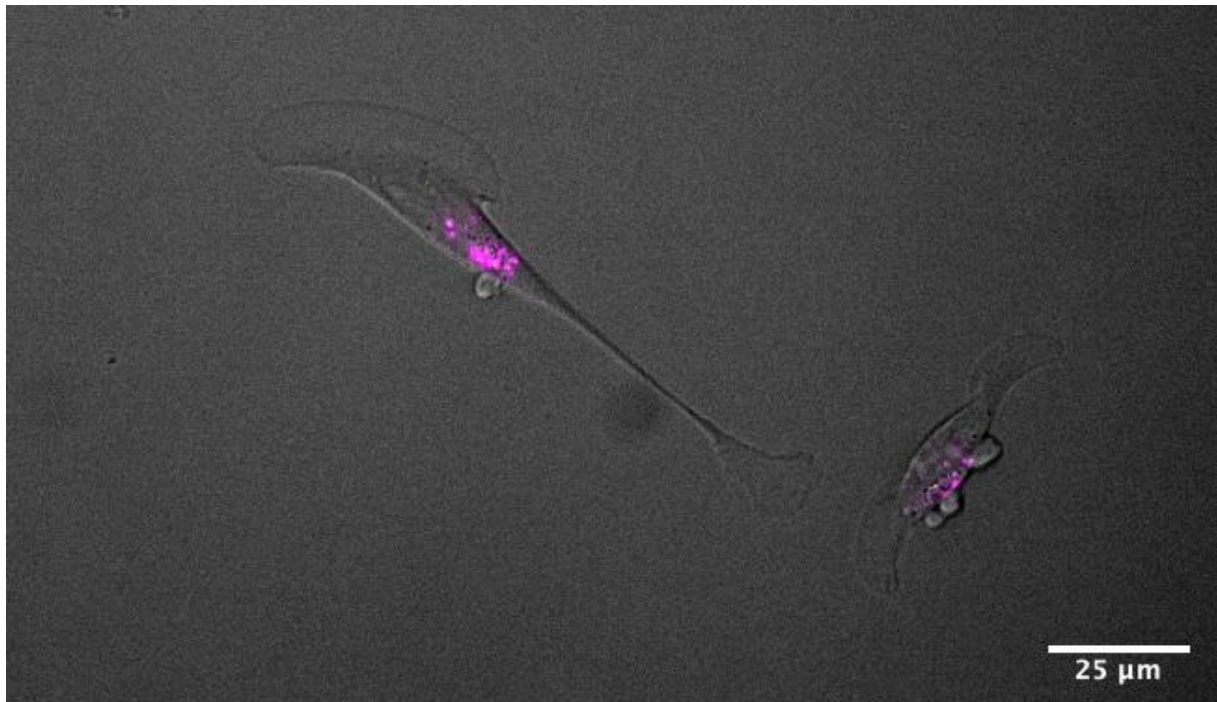


Figur 15 – To bilder av samme celle fra laks som var farget med «MitoTracker Orange». Bilde A har to lag med bilder – hhv. ett polariseringsbilde og ett tatt med TRITC-kanal da dette gjorde det mulig å se mitokondrienes plassering i cellen. Bilde B er uten polariseringsbilde da dette gjorde det enklere å studere mitokondriene. Bildene er tatt med 60x objektiv.

Bilde A (figur 15) viser to bilder satt sammen, hhv. et polariseringsbilde og et bilde tatt med TRITC-kanal. På denne måten fikk man se hvor mitokondriene var lokalisert i cellen. Mot svart bakgrunn (bilde B) ble det enklere å studere mitokondriene. Mitokondriene var spredt rundt hele cytoplasma, men mest i ytterkantene på kortsidene av cellekroppen. Det var også områder uten mitokondrier.

### 3.1.3.3 LysoTracker Red

Figur 16 viser keratocyttilignende celler farget med «LysoTracker Red» (LTR). Fargen ble endret i Fiji til magenta slik at det skulle bli enklere for fargeblinde å se. Mikroskopibildet er tatt med 20x objektiv med TRITC-kanalen for å få frem fluorescens. Bildet er kombinert med et lysmikroskopibilde for lettere å se plasseringen til lysosomene i cellene.



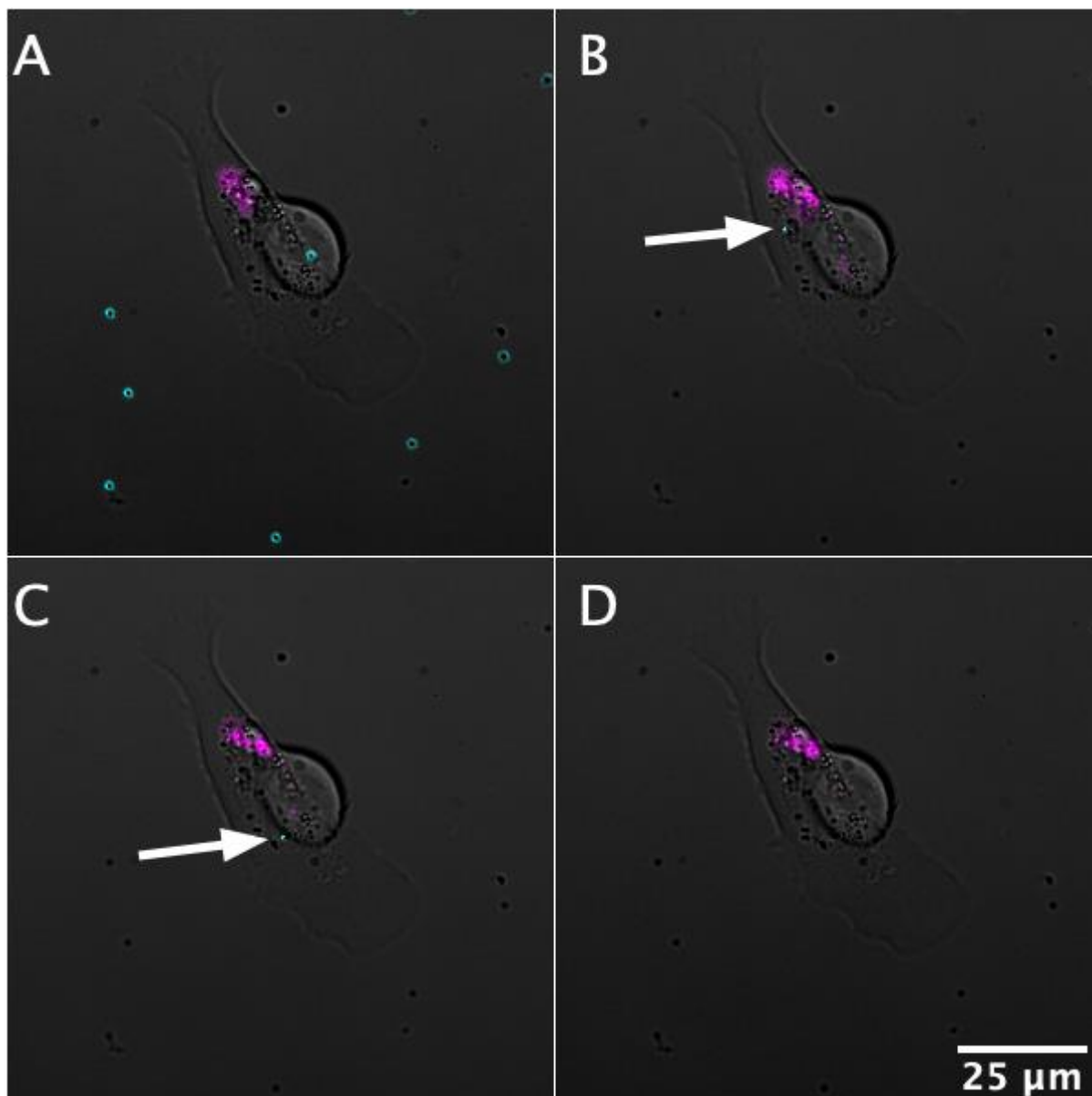
Figur 16 - Viser to celler farget med «LysoTracker Red». Lysosomene så ut til å ligge i kanten av cellen og på kortsidene.

For å frembringe fluorescensen i LTR fargingen av lysosomene ble TRITC-kanalen benyttet. Lyset påvirket i liten grad cellene slik at gjentatte bilder av cellene var uproblematisk. Lysosomene virket å være overrepresentert i kantene og kortsidene av cellene.

### 3.1.4 Opptak av partikler

#### 3.1.4.1 LysoTracker Red og Plum Purple polystyren 503 nm 2D

Keratocyttilignende celler ble eksponert for plastpartikler med 503 nm i diameter i fire timer før de ble farget med LTR. Deretter ble cellene studert med 60x objektiv hvor kanalene TRITC og DAPI ble brukt for fluorescens. Denne fremstillingen er lagt oppå et referansebilde tatt med POL-kanalen for lettere å visualisere hvor i cellen plasten befinner seg.

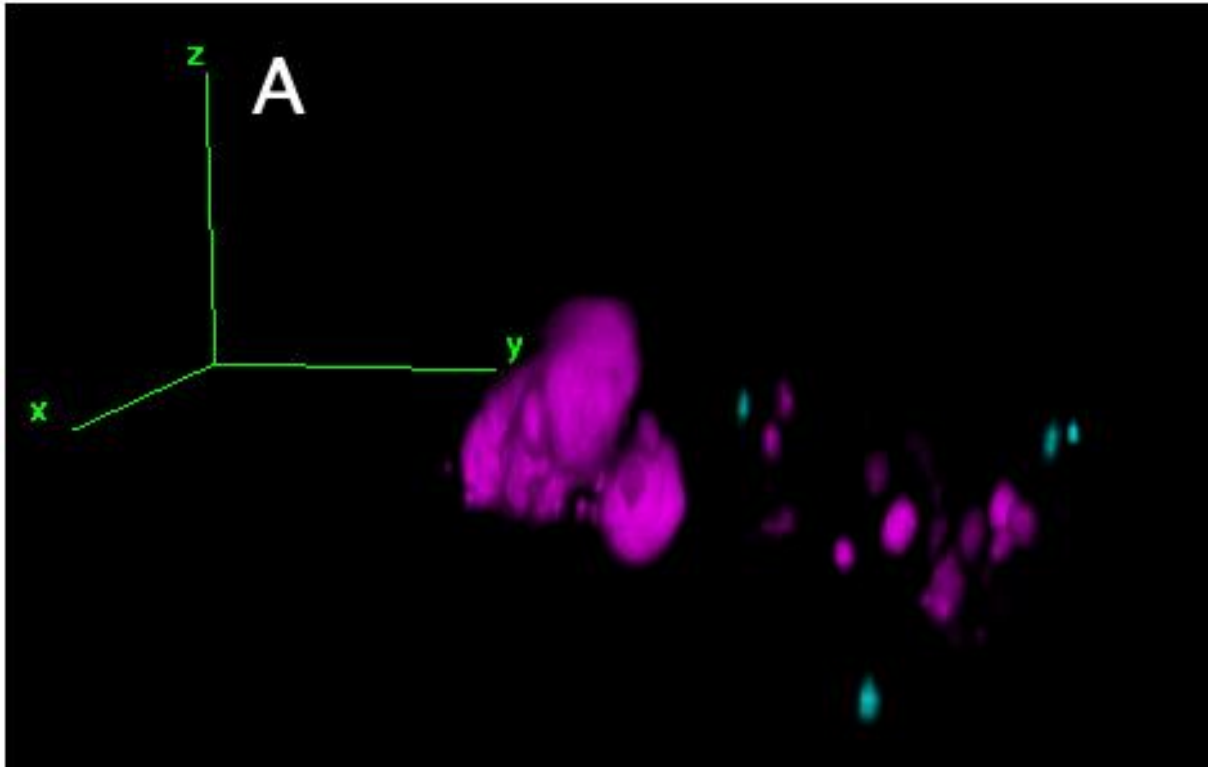


Figur 17 – A: Celle på z-plan 7 ( $1,75 \mu\text{m}$ ) som viser plastpartikler som har sunket til bunnen av skåla og ligger rundt cellen (muligens en under). B: Z-plan 32 ( $8 \mu\text{m}$ ) er høyere i cellen hvor det kan virke som plastpartikkelen ligger på cellemembranen. C: Z-plan 37 ( $9,25 \mu\text{m}$ ) viser hvor plastpartikkelen ligger på cellemembranen. D: Z-plan 43 ( $10,75 \mu\text{m}$ ) viser toppen av cellen der det er ingen plastpartikler.

Figur 17 viser en 2D-fremstilling av cellen på forskjellige plan, hvor bilde A viser cellen ved glassplaten og D viser toppen av cellen. Bilde A viser tydelig de omkringliggende plastpartiklene som ligger stasjonære på glassplaten. Bilde B og C markerer to plastpartikler som virker å ligge på cellemembranen, da i forskjellig høyde. Alle bildene viser tydelig fluorescens fra LTR som indikerer posisjonen til lysosomene. Bilde B viser at plastpartikkelen ligger nærme, men ikke i kontakt med klyngen av lysosomer.

### 3.1.4.2 LysoTracker Red og Plum Purple polystyren 503 nm 3D

Med utgangspunkt i data fra figur 17, er det generert en 3D-modell i figur 18. Modellen viser plastpartiklene i cyan og lysosomene i magenta. Perspektivet er fra siden hvor x-, y-, z-koordinatene angir orienteringen i rommet. X- og y-koordinatene angir glassplaten og z angir høyden. Figuren viser kun fluorescens da lysmikroskopibildet ikke egner seg for fremstilling i 3D.



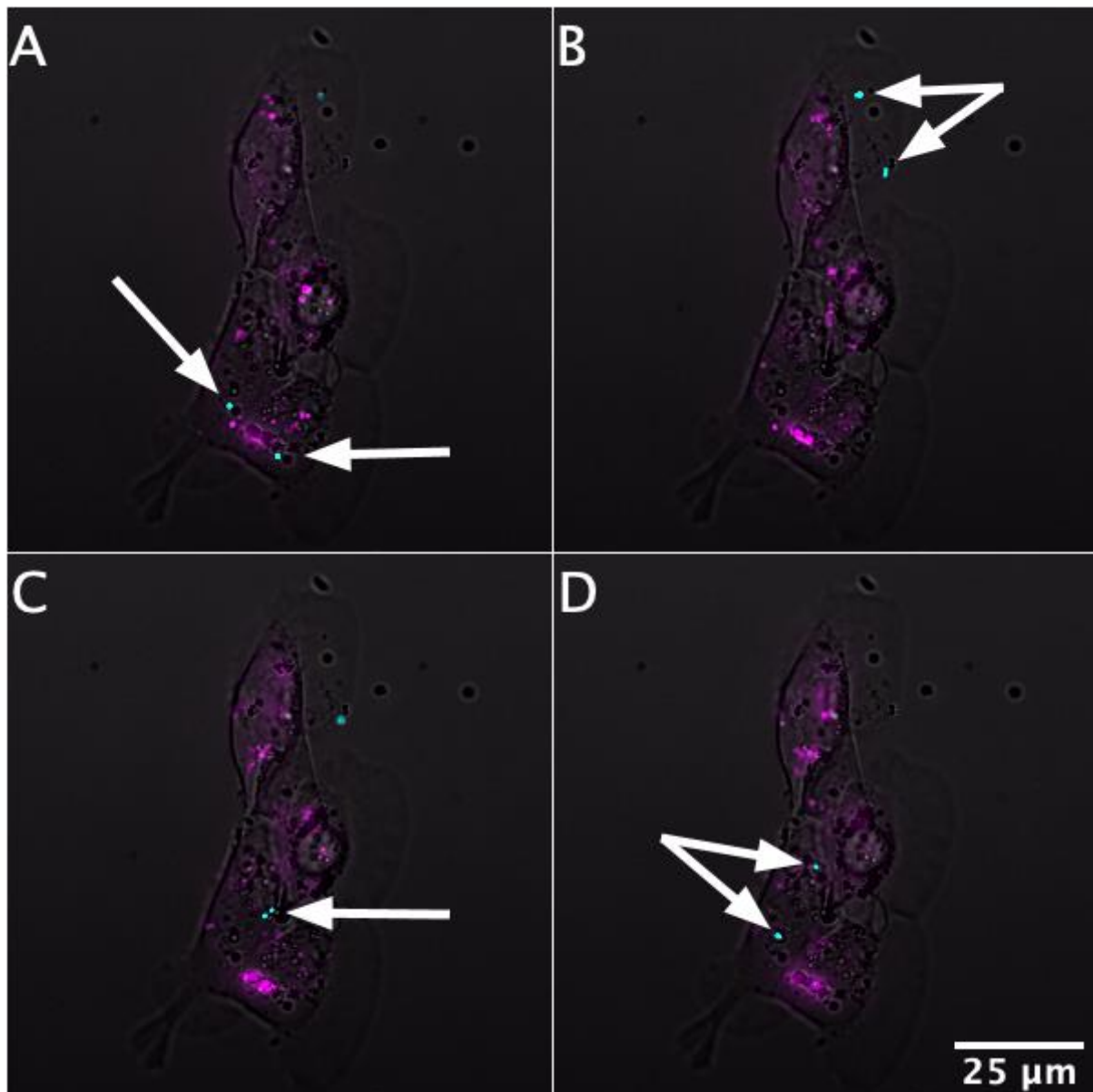
Figur 18 – Viser 3D-framstilling av cellen. Sammenlikner man med figur 17 kan man orientere seg i forhold til plassering av den store klyngen med lysosomer. Plasseringen av plastpartiklene i forhold til lysosomene blir da noe tydeligere. Ser man nøye etter er ikke plastpartiklene i kontakt med lysosomene. Video er tilgjengelig.

Man ser cellen fra siden som gjør det mulig å se plastpartiklenes plassering i forhold til lysosomene. Modellen gir inntrykk av at plastpartiklene ikke er inne i eller i kontakt med lysosomene. Internt i cellen var høyden (z-aksen) til plastpartiklene relativt lik høyden til lysosomene eller noe under. Modellen gir ikke et bilde av hvordan partiklene virker å følge konturen av cellemembranen som omgir lysosomene.

### 3.1.4.3 LysoTracker Red og Plum Purple polystyren 955 nm 2D

Keratocyttilignende celler ble eksponert for plastpartikler med diameter på 955 nm i fire timer før cellene ble farget med LTR. Deretter ble cellene studert med 60x objektiv hvor kanalene TRITC og DAPI ble brukt for fluorescens. Denne fremstillingen er lagt oppå et referansebilde tatt med POL-kanalen for lettere å visualisere hvor i cellen plasten befinner seg.





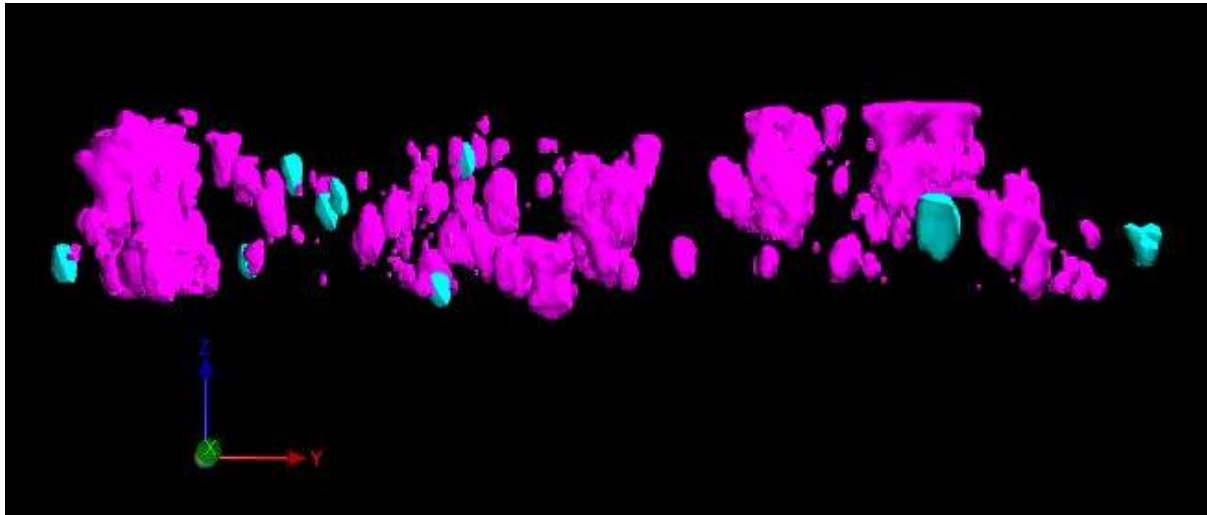
Figur 19 – A: Z-plan 12 (3  $\mu\text{m}$ ) med pil på to plastpartikler som ligger i cellen som viser opptak av plast. B: Z-plan 20 (5  $\mu\text{m}$ ) med to piler på plastpartikler hvor bildet viser at de ligger på lamellipodium. C: Z-plan 30 (7,5  $\mu\text{m}$ ) hvor pil viser plastpartikler som ligger inne i cellen. D: z-plan 39 (9,75  $\mu\text{m}$ ) hvor pil viser plastpartikler som ligger oppå cellen.

Bildene på figur 19 viser fire keratocyttilignende celler som er koblet sammen. På bilde A er det to plastpartikler markert med piler som virker å ha blitt tatt inn i cellen i et område med høy tetthet av lysosomer. På bilde B viser pilene til to plastpartikler som ligger på lamellipodium. På bilde C viser pilen til to plastpartikler som ligger i avgrensningen mellom to celler. Det er derfor vanskelig å fastslå om plasten er inne i cellen eller ligger på cellemembranen. På bilde D viser pilene til to plastpartikler som ligger på cellemembranen da høyden for fokus her er 9,75  $\mu\text{m}$ .



#### 3.1.4.4 LysoTracker Red og Plum Purple polystyren 955 nm 3D

Data fra figur 19 blir brukt til fremstilling av 3D-modell som vist i figur 20. Figur 20 viser plastpartiklenes posisjon i forhold til lysosomene. Modellen viser plastpartiklene i cyan og lysosomene i magenta. X-, y-, z-koordinatene angir orienteringen i rommet, hvor x og y er på nivå med glassplaten og z angir høyden. Figuren viser kun fluorescens da lysmikroskopibildet ikke egner seg for fremstilling i 3D.

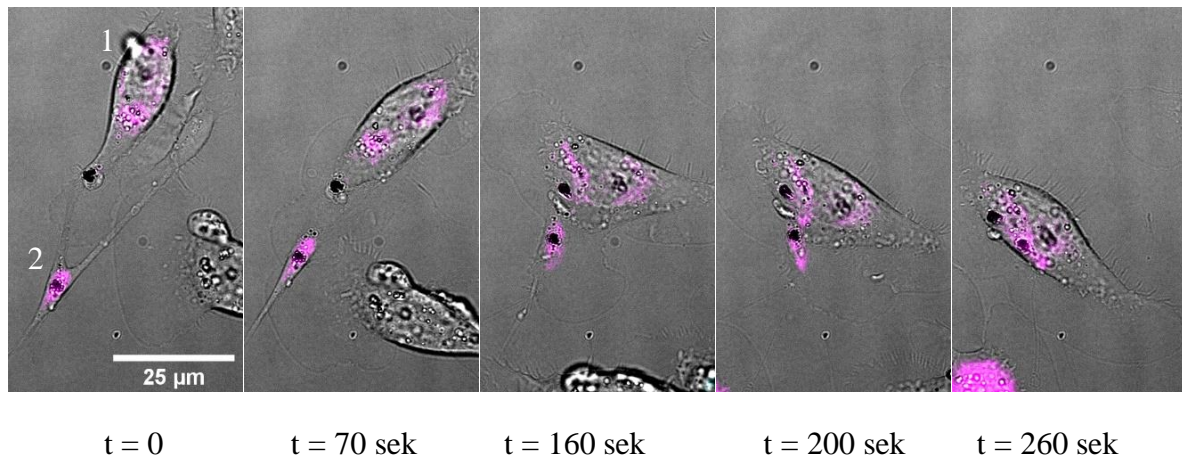


*Figur 20 – Viser 3D-framstilling av lysosomene i magenta og plastpartiklene i cyan. Her kan man tydelig se at plastpartiklene er løftet opp fra glassplaten og opp på og muligens inni cellen. Lysosomene virker å ligge veldig nær plastpartiklene. Video er tilgjengelig.*

Figur 20 viser plassering og avstand mellom plastpartiklene og lysosomene. Modellen viser cellene fra vinkel angitt av pilen i figur 19 (bilde C). Modellen kan gi inntrykk av at enkelte plastpartikler ligger i kontakt med lysosomene inne i cellen. Modellen viser også at enkelte plastpartikler er løftet opp noe som kan indikere at de ligger på cellemembranen.

### 3.1.5 Cellefusjonering

Cellefusjonering vil si at to eller flere celler sammenkobles ved at cellemembranene «smelter» sammen og fusjoneres (Kozlov & Chernomordik, 2015). Keratocyttilignende celler ser ut til å kunne fusjonere *in vitro*. Dette ble observert i bildeserien som består av mikroskopibilder tatt med 60x objektiv (figur 21).

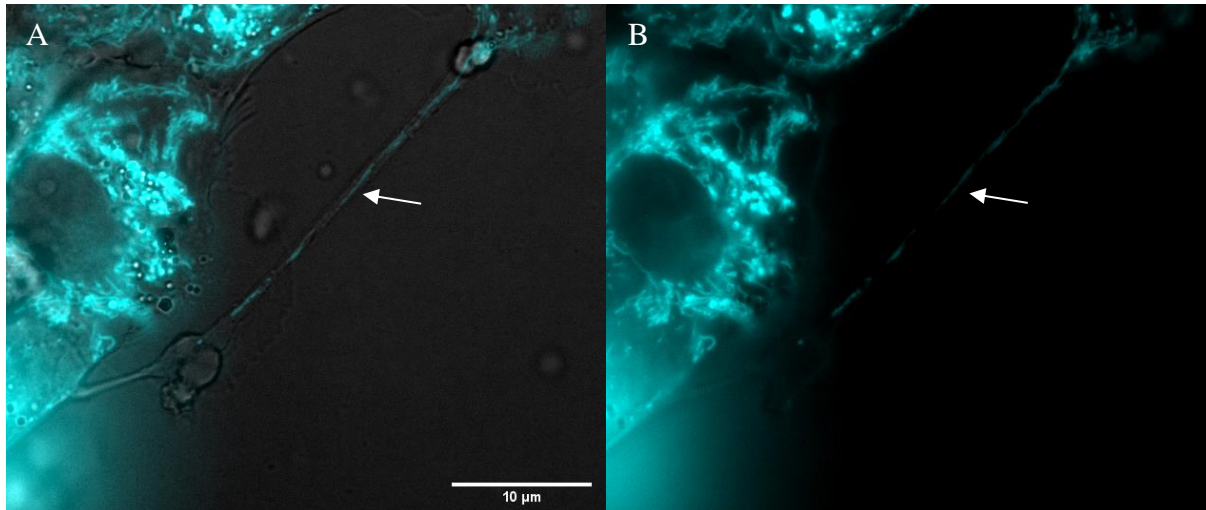


Figur 21 – Mulig fusjonering av to keratocyttilignende celler fra laks. På bilde  $t = 0$  har de to cellene fått hvert sitt nummer, hhv. celle 1 og 2. Video er tilgjengelig.

Ved  $t = 0$  så man to celler farget med MTO sammenkoblet med TNT. Den øverste cellen (celle 1) var en typisk keratocyttilignende celle (figur 9), mens den andre (celle 2) så mer utstrakt ut. Basert på innledende studier, har man sett at mitokondrier ligger spredt rundt i cytoplasma (figur 14 og figur 15). Man kan anta at det som er farget med MTO gjenspeiler mer eller mindre utbredelsen av cytoplasma. Ved  $t = 70$  sek så det ut til at celle 2 var omkranset av celle 1 sitt lamellipodium. Ved  $t = 160$  sek begynte celle 2 å nærme seg celle 1 sin cellekropp. Ved  $t = 200$  sek har celle 2 kommet i kontakt med celle 1 sin cellekropp, og ved  $t = 260$  sek ser det ut til at de to cellene har fusjonert. Det så ikke ut til å være noen avgrensende membran mellom cellene.

### 3.1.6 Mitokondrieutveksling

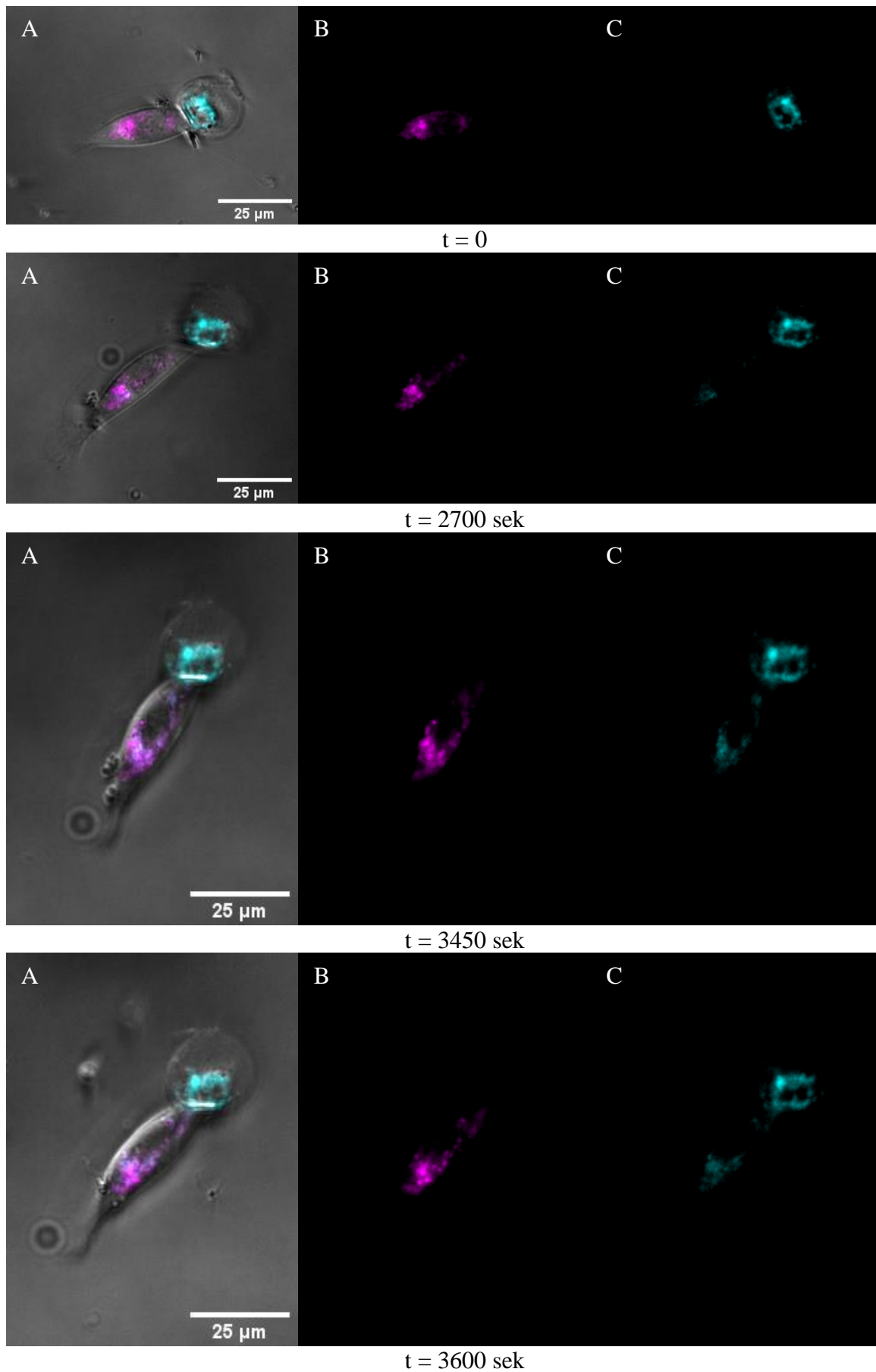
Celler kommuniserer med hverandre på ulike måter. Det kan foregå med direkte kontakt, utskillelse av ulike signalstoffer og via TNT. Sistnevnte er en tynn tunnellignende struktur mellom to eller flere celler der det kan utveksles cellulære bestanddeler. På figur 22 ser man celler farget med MTG og mitokondrier i en tunnel (se piler) mellom to eller flere celler.



Figur 22 – To bilder av keratocyttilignende celler fra laks som er farget med MTG. Bilde A består av ett polariseringsbilde satt sammen med ett bilde tatt med FITC-kanal. Bilde B er et mikroskopibilde av MTG-fargede celler uten bruk av polarisasjon. Her ser man en tunnel mellom én eller flere celler. Inne i tunnelen ser man at det ligger mitokondrier (se piler).

Figur 22 viser celler farget med MTG og at mitokondrier kan opptre i tunneler av typen TNT (se piler). Mikroskopibildet ble tatt med et 60x objektiv. Bilde A er bilde tatt i mikroskop med bruk av polariseringsfunksjon, mens bilde B er tatt uten, slik at man enklere kan studere mitokondriene. Til venstre i bildene så at det lå flere celler koblet sammen som en cellemasse. Tunnelen på figuren går mellom to eller flere celler.

Figur 23 viser to keratocyttilignende celler som så ut til å være direkte «koblet sammen». Den ene cellen hadde en typisk avlang form, mens den andre hadde en globulær utypisk form. Det så ut som at cellen med unormal morfologi (utypisk celle) overførte mitokondrier til den typiske, siden det også var MTG-fargede mitokondrier inne i cellen – i tillegg til MTO-fargede.

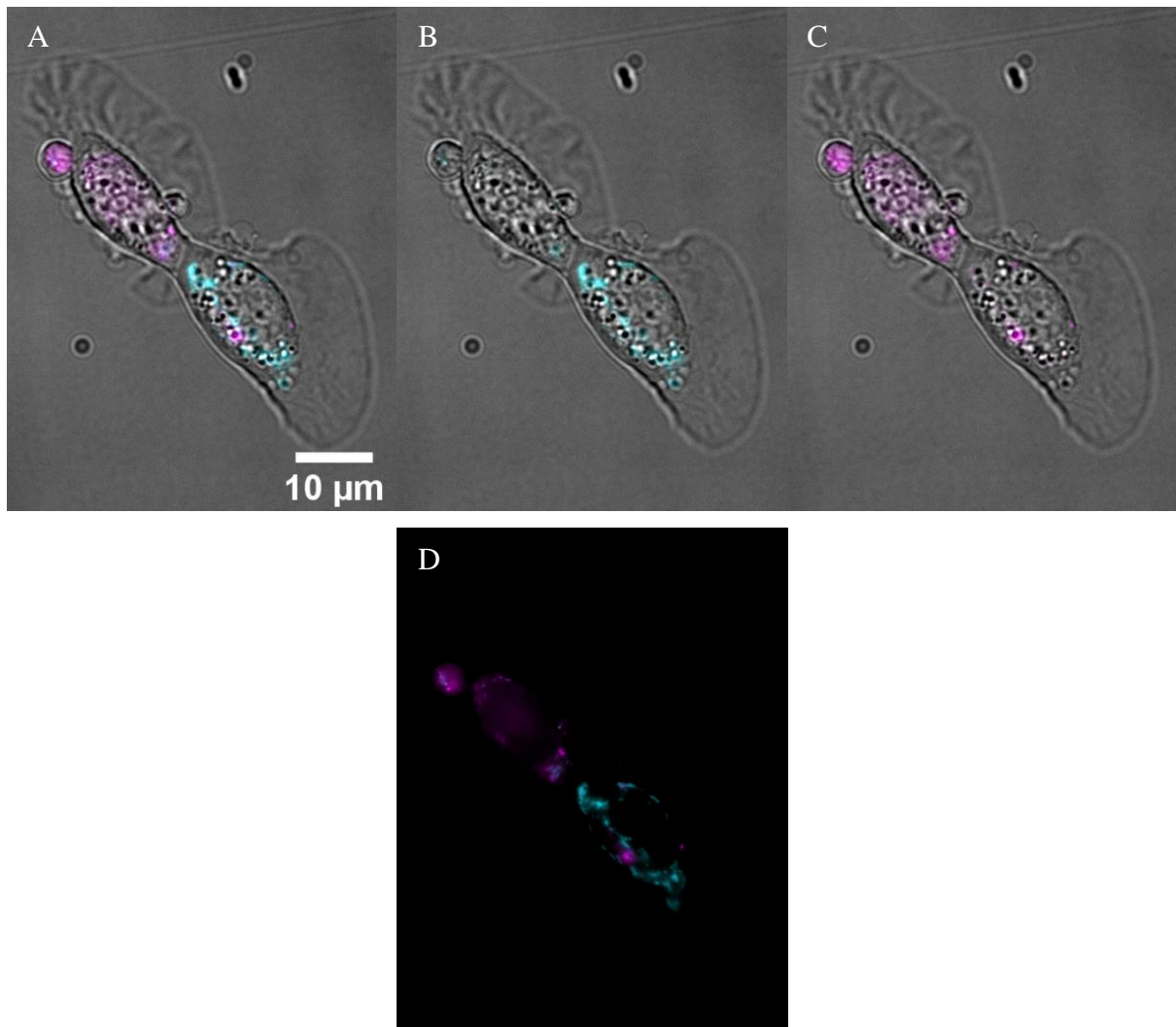


Figur 23 – Viser to ulikt mitokondriefargede keratocytllignende celler fra laks i en bildeserie. Figuren viser bilder fra fire ulike tidspunkter i bildeserien. Hvert tidspunkt har tre bilder der bilde A består av en sammensetning av tre

*bilder med polariseringsbilde, bilde tatt med FITC-kanal (viser MTG-farging) og bilde tatt med TRITC-kanal (viser MTO-farging). Bilde B er tatt med TRITC-kanal. Bilde C er tatt med FITC-kanal. Den ene cellen har en globulær, utypisk, form og er farget med MTG, mens den andre har en avlang, typisk, form, og er farget med MTG. Video er tilgjengelig.*

Figur 23 viser en typisk keratocyttilignende celle (nede til venstre) som tok opp mitokondrier fra en utypisk, globulær celle. Mikroskopibildene ble tatt med 20x objektiv. Den typiske cellen var farget med MTO, mens den utypiske var farget med MTG. Figuren er fra en bildeserie der det er plukket ut bilder fra fire ulike tidspunkt. På hvert tidspunkt ble det tatt tre bilder. Bilde A består av tre bilder lagt oppå hverandre. Det ene er et polariseringsbilde og to tatt hhv. med filtrene TRITC (viser MTO-farging) og FITC (viser MTG-farging). Bilde B er tatt med TRITC-kanal og bilde C er tatt med FITC-kanal. Utover bildeserien ser man at den typiske cellen inneholder mer fluorescens med den fargen den utypiske cellen var farget med. Man så likevel ikke at den utypiske cellen utstrålte mindre fluorescens utover bildeserien. Ved  $t = 0$  har den typiske cellen ingen MTG-fargede mitokondrier. Ved  $t = 2700$  sek har den typiske cellen tatt opp en del mitokondrier og man ser at mengden øker utover hele bildeserien. Videre undersøkte vi hvorvidt to typiske celler kunne utveksle mitokondrier.

Figur 24 viser to sammenkoblede typiske keratocyttilignende celler som kan ha utvekslet mitokondrier. Bildene er tatt med 60x objektiv.

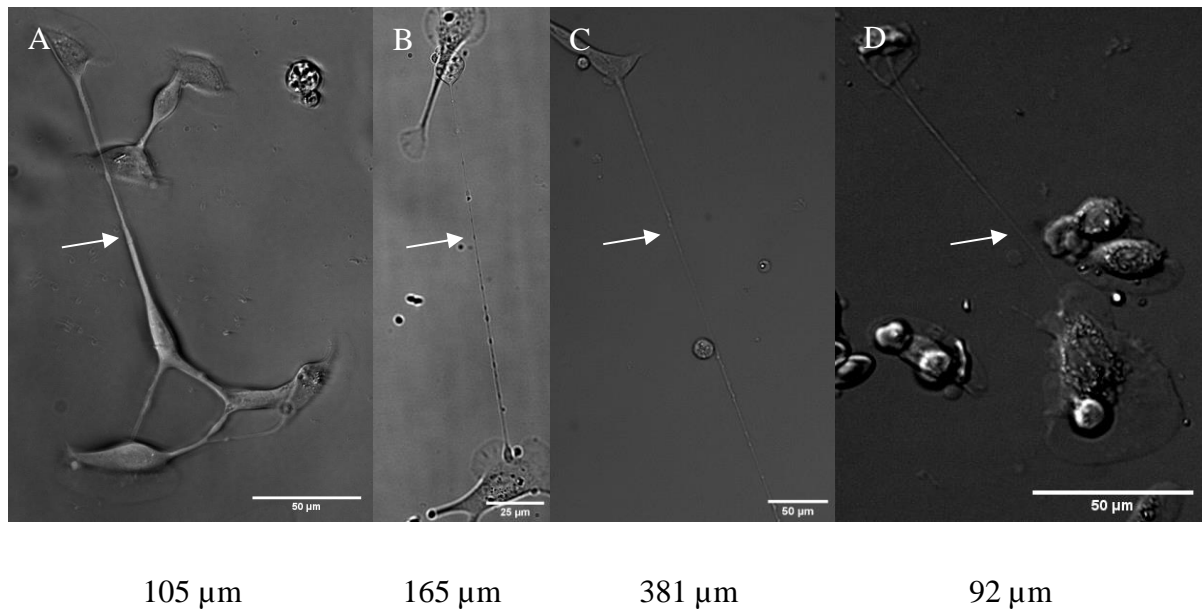


*Figur 24 – Viser bilder av keratocyttilignende celler fra laks der to celler er direkte sammenkoblet. De er opprinnelig farget ulikt med to ulike mitokondriefarginger og har tatt opp mitokondrier fra en annen celle – direkte eller indirekte. Bilde A og D viser begge fargingene, mens bilde B viser MTG-farging og bilde C viser MTO-farging. Bilde D er uten polariseringsbilde slik at man enklere skal se at cellene har mitokondrier farget med både MTO og MTG.*

Figur 24 viser to typiske keratocyttilignende celler der begge har to typer mitokondriefarginger og er direkte «sammenkoblet». Mitokondriefargingene er MTO og MTG. Cellene kan ha utvekslet mitokondrier med hverandre eller ha tatt de opp på et tidligere tidspunkt.

### 3.1.7 Lengde på tunneling nanotube (TNT)

Tunneler mellom celler, TNT, knytter en eller flere celler sammen. Figur 25 viser fire bilder av tunneler mellom celler der man ser at tunnelene varierer i tykkelse og lengde. Lengden ble målt fra der tunnelen begynner å utvide seg mot cellen.



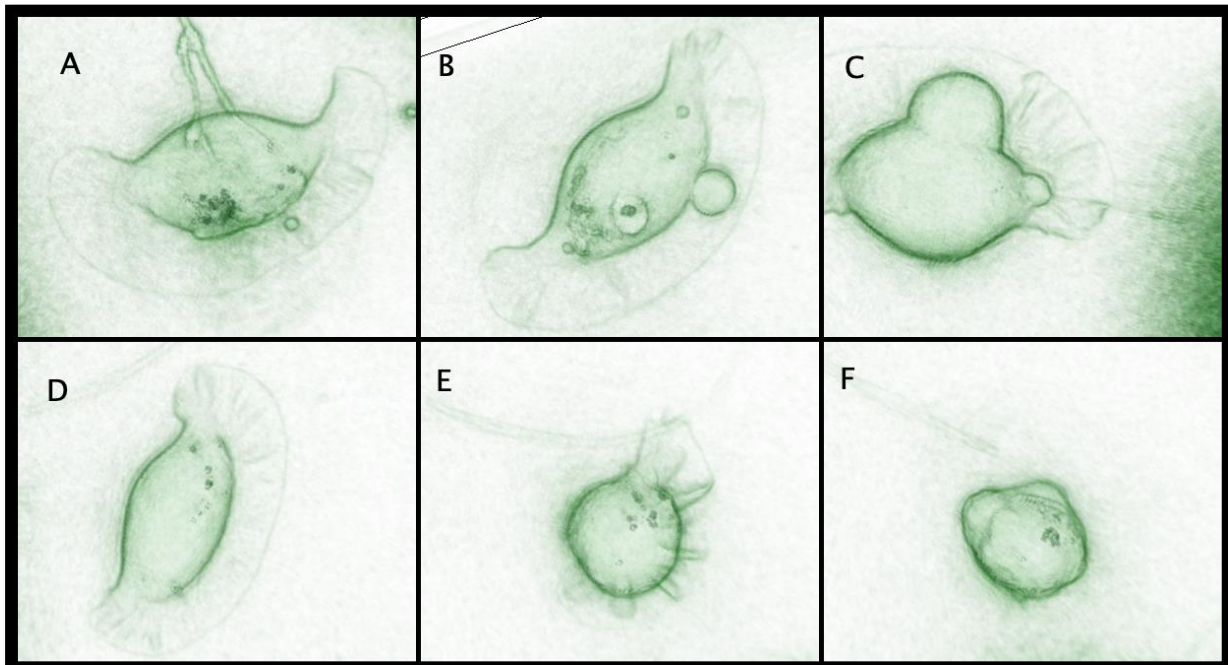
Figur 25 – Tunneler, TNT, mellom celler og lengden vist under hvert bilde. Tunnelen som er målt er anvist med pil. Bilde B er tatt med 60x objektiv, mens de andre er tatt med 20x. Bilde D er hornhinneceller.

Tunneler mellom cellene kan ha ulike lengder og være mellom to eller flere celler. De varierte både i lengde og i tykkelse. Det så ut til at de ble tynnere jo mer utstrakte de ble. Bilde A (figur 25) viser den korteste tunnelen på 105  $\mu\text{m}$  som også var den tykkeste. Tunnelen vist på bilde B hadde noe lengre tunnel (165  $\mu\text{m}$ ) og var tynnere. Likevel så denne tunnelen ut til å være omtrent like tynn som den man ser på bilde C – som var 381  $\mu\text{m}$  lang. Siden en typisk keratocyt er rundt 40  $\mu\text{m}$  lang i cellekroppen, tilsvarer tunnallengden om lag 9,5 cellelengder (bilde C). Bilde D viser at keratocyttilignende celler fra hornhinnen også kan danne lange tunneler. Denne tunnelen var på 92  $\mu\text{m}$ .



### 3.1.8 NanoLive

Figur 26 viser bilder tatt med NanoLive hvor refraktiv indeks (RI) intensitet brukes for å kunne se cellens komponenter. Cellene er derfor ikke farget. Cellene ble observert i en periode på 2 minutter og 22 sekunder der det ble tatt ett bilde hvert sekund.



Figur 26 - Viser bilder tatt med NanoLive. Bilde A og B viser keratocyttilignende celler av typisk karakter med kanoformet lamellipodium og granulelignende prikker i cytoplasma. Bilde C viser at cellen har en ekstra utposning i front over lamellipodium og viser ingen granulelignende prikker i cytoplasma som virker å være unormalt. Bilde D, E og F er av samme celle presentert i sekvens og viser cellens evne til å krølle seg sammen til en rund ball. Video er tilgjengelig.

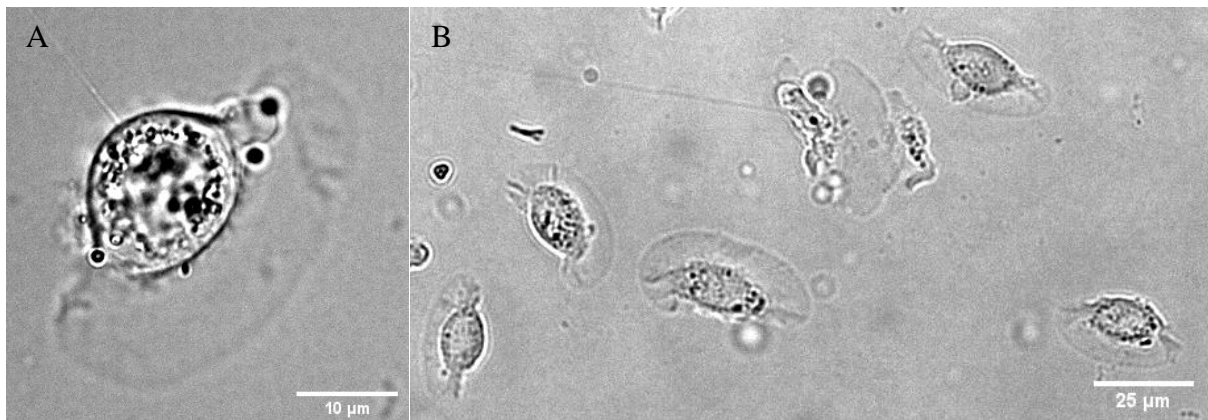
Bilde A (figur 26) viser en keratocyttilignende celle av typisk karakter med granulelignende prikker i cytoplasma og noe som kan ligne en TNT på motsatt side av lamellipodium. Bilde B viser en annen keratocyttilignende celle som også har granulelignende prikker i cytoplasma. Cellen virker også å ha en avgrenset utposning som ligger i front på lamellipodium. Bilde C viser samme fenomen, men utposningen er større og ikke avgrenset. Cellen har heller ingen granulelignende prikker inne i cytoplasma. Bilde D, E og F viser samme celle som trekker inn lamellipodium og blir til en ball. Videre i sekvensen av bilder slår den ut lamellipodium igjen og endrer form som vist på bilde D.



## 3.2 Keratocyttilignende celler fra hornhinne

### 3.2.1 Morfologi – *in vitro*

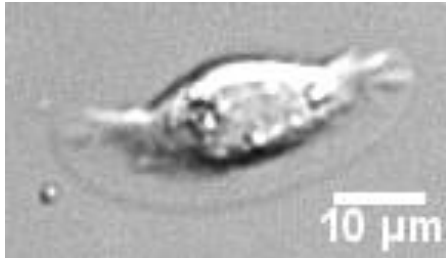
Hornhinnen (cornea) består av et flerlaget plateepitel ytterst. Innenfor der ligger fast bindevev, stroma, og et mediant enlaget kubisk epitel (Kryvi & Poppe, 2016). Siden morfologien hos cellene fra hornhinnen lignet de keratocyttilignende cellene fra huden, var det interessant å studere disse cellene også. Cellene på figur 27 viser celler fra hornhinnen fra laks. Cellene var mobile og hadde ellers ganske lik morfologi tilsvarende keratocyttilignende hudceller.



Figur 27 – Viser mobile celler fra hornhinnen (cornea) fra laks. Hornhinnen ble skjært ut og lagt med innsiden ned mot glassbunnen. Bilde A er et mikroskopibilde tatt med 60x objektiv, mens bilde B er tatt med 20x objektiv.

Figur 27 viser mobile celler fra hornhinnen fra laks. Cellene sin morfologi hadde morfologi som keratocyttilignende celler fra huden. Man så lamellipodium som strakk seg mer enn 180° rundt cellekroppen på samme måte som hos keratocyttilignende hudceller. Man så også en ellipseformet cellekropp. Størrelsen på disse cellene var noe mindre enn den typiske keratocyttilignende cellen fra laksehud (figur 9). Under mikroskoperingen ble det observert celler som skilte seg ut ved å være små og også meget store. Mobiliteten virket å være relativt lik sammenlignet mellom hudceller og hornhinneceller.

Figur 28 viser en keratocyttilignende celle fra hornhinnen. Ved å måle cellekroppen med målestokken (10  $\mu\text{m}$ ) ser man at cellen var omtrent like lang som den typiske keratocyttilignende cellen fra huden (figur 9). Begge cellene så ut til å være utstrakt på samme måte som med cellekroppen og lamellipodium.



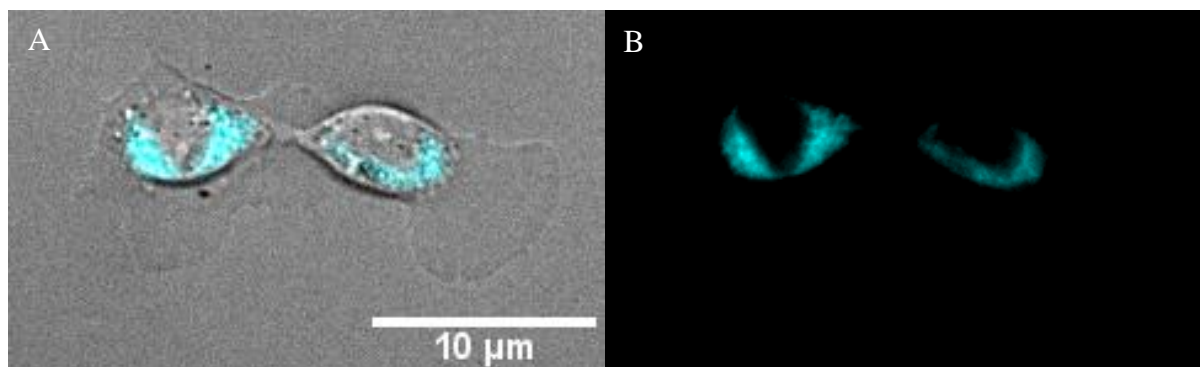
Figur 28 – Viser mikroskopibilde tatt med 20x objektiv av keratocyttilignende celle fra hornhinnen (cornea) fra laks.

Cellen var rundt 40  $\mu\text{m}$  lang i cellekroppen, noe som ligner på samme celletype fra huden hos samme art. De keratocyttilignende cellene fra hornhinnen beveget seg også vinkelrett i forhold til lamellipodium. For det meste var det mobile celler, men også enkelte immobile celler. Disse var betraktelig mindre og hadde annerledes morfologi. De var utstrakte og smale og hadde mitokondrier siden de lot seg farge med MTG. Ved mikroskopering av keratocyttilignende celler fra hornhinnen, ble det hovedsakelig observert enkeltceller og ingen store cellemasser som hos hudcellene.

### 3.2.2 Farging

#### 3.2.2.1 MitoTracker Green

Figur 29 viser to mobile ellipsoideformede keratocyttilignende celler fra hornhinnen som var farget med MTG.



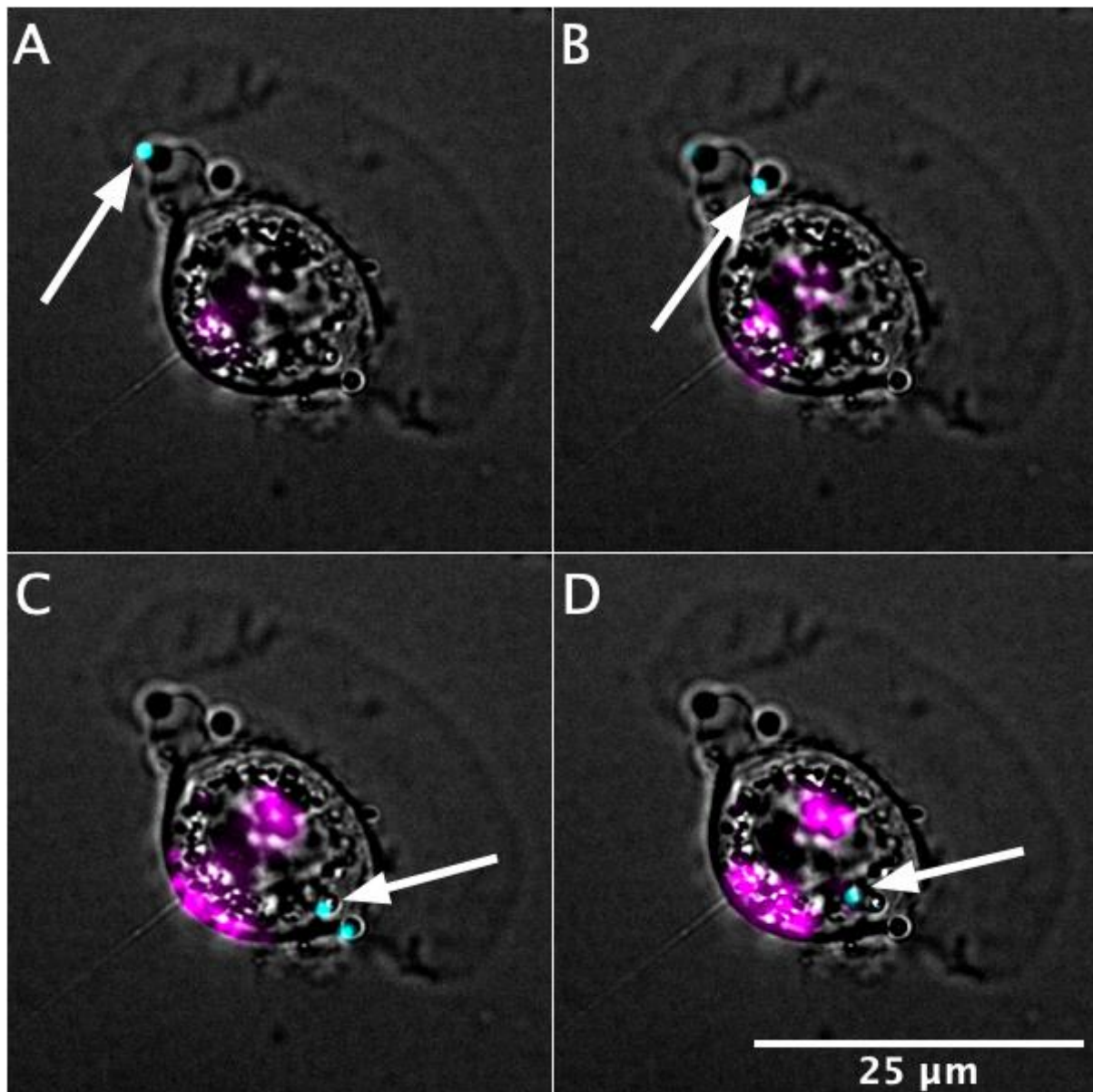
Figur 29 – Viser mobile celler fra hornhinnen (cornea) fra laks som er farget med MTG.

Det var ingen mitokondrier som var farget i den midtre delen av cellene, heller ikke midt på den ene langsiden av begge cellene. Ellers hadde cellen jevn fordeling av fargede mitokondrier. Mikroskopibildet var tatt med 20x objektiv.

### **3.2.3 Opptak av partikler**

#### **3.2.3.1 LysoTracker Red og Plum Purple polystyren 955 nm 2D**

Figur 30 viser keratocyttilignende celle fra hornhinnen som ble eksponert for plastpartikler i 4 timer etterfulgt av farging med LTR. Mikroskopibildene ble tatt med 60x objektiv. Bildene er tatt på forskjellige z-plan som angir spesifikk høyde fra glassplaten. Dette kombineres så med bilde tatt med POL-kanalen som bistår i forståelsen av plassering av de forskjellige organeller og ikke minst partiklene.

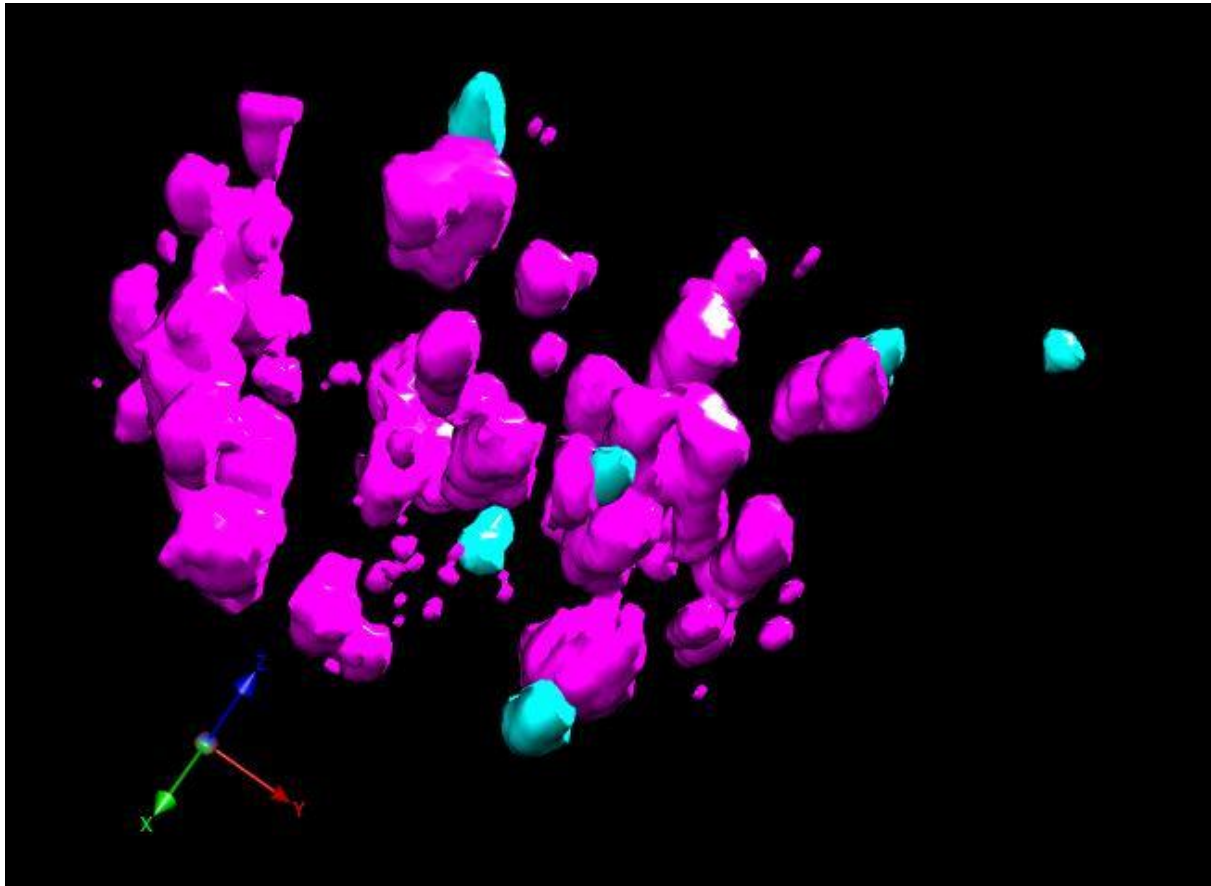


Figur 30 – A: Z-plan 5 (1,25  $\mu\text{m}$ ) hvor pil som viser plastpartikkel under lamellipodium. B: Z-plan 12 (3  $\mu\text{m}$ ) som viser plastpartikkel som ligger oppå lamellipodium. C: Z-plan 24 (6  $\mu\text{m}$ ) som viser plastpartikkel på cellemembranen. D: Z-plan 38 (9,5  $\mu\text{m}$ ) med pil som viser plastpartikkel som ligger oppå cellen.

Figur 30 bilde A og B viser plastpartikkel som ligger på lamellipodium. Den sorte skyggen som kommer frem rett ved plastpartikkelen skyldes cellens bevegelse. Skyggen er partikkelen fotografert med POL-kanalen. Årsaken er at POL-bildet blir tatt til slutt og cellen i tidsrommet mellom bildene har beveget seg fremover. Bilde C og D viser plasseringen av tre plastpartikler som virker å ligge på cellemembranen da de følger konturen av cellens høyde.

### 3.2.3.2 LysoTracker Red og Plum Purple polystyren 955 nm 3D

Data fra figur 30 ble brukt til å fremstille 3D-modell vist i figur 31. Figur 31 viser plastpartiklens posisjon i forhold til lysosomene. Modellen viser plastpartiklene i cyan og lysosomene i magenta. X-, y-, z-koordinatene angir orienteringen i rommet, hvor x og y er på nivå med glassplaten og z høyden. Figuren viser kun fluorescens da lysmikroskopibildet ikke egner seg for fremstilling i 3D.

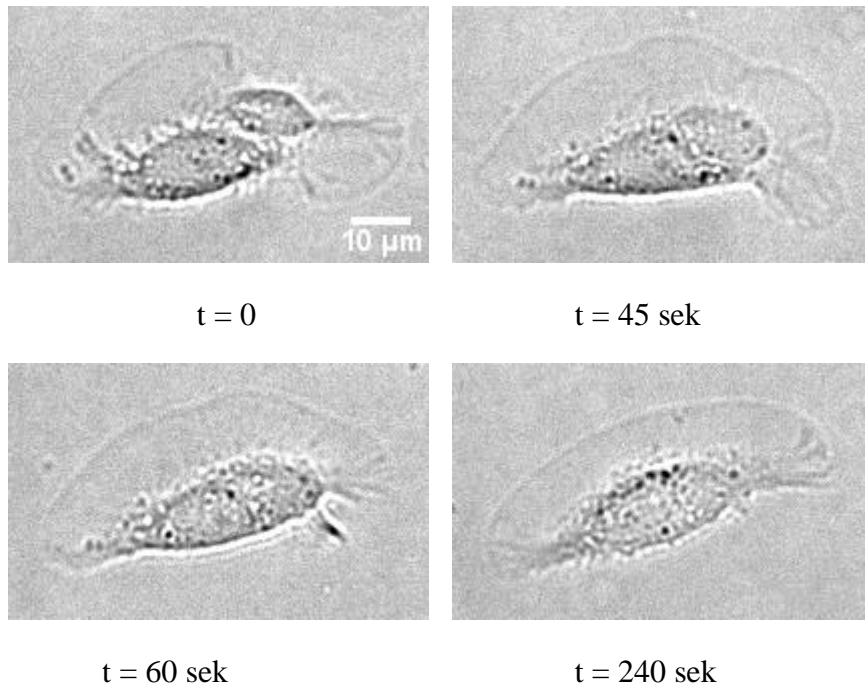


Figur 31 - 3D-modell av lysosomene i magenta og plastpartiklene i cyan. X- og y-koordinatene angir glassplaten, så synsvinkelen er valgt litt skrått ovenfra. Modellen kan gi inntrykk av at noen plastpartikler ligger inntil lysosomene. Video er tilgjengelig.

Figur 31 gir i likhet med figur 20 inntrykk av at lysosomer og plastpartikler ligger i kontakt med hverandre. Ved rotasjon av modellen kommer det frem at dette ikke er tilfelle og interaksjon mellom lysosomer og plast kan ikke bekreftes. Modellen viser at plastpartiklene har blitt løftet opp fra glassplaten og ser ut til å følge konturene av cellemembranen.

### 3.2.4 Cellefusjonering

Figur 32 er enkeltbilder fra bildeserien som viser mulig fusjon av keratocyttilignende celler fra hornhinnen. Bildene er tatt med 20x objektiv.



Figur 32 – Viser mulig cellefusjonering av mobile keratocyttilignende celler fra hornhinnen (cornea) fra laks. Video er tilgjengelig.

Figur 32 viser keratocyttilignende celler fra hornhinnen der to celler så ut til å fusjonere og bli til én celle. Ved  $t = 0$  så man tydelig to cellekropper og membraner. Lamellipodium fra cellene så ut til å gli inn i hverandre. Ved  $t = 45$  sek så man tydelig at samme lamellipodium omkranset begge cellene og begge cellekroppene lå helt inntil hverandre. Ved  $t = 60$  sek kunne man enda se en antydning av at det var to cellekropper, mens det ved  $t = 240$  sek så ut til å være én celle.

## 4 Diskusjon

### 4.1 Keratocyttilignende celler

Majoriteten av mikroskopibilder foretatt i denne oppgaven er av keratocyttilignende celler fra huden til laks. Gjennom uttakene viste det seg å være mer utfordrende å hente ut celler fra hornhinnen og mengden tilgjengelige celler har derfor ikke vært like stor. Vi ønsket å se om hornhinnens epitel også besto av keratocyttilignende celler, og om disse hadde samme egenskaper som hudens. Cellene fra hornhinnen viste ingen variasjon i form av opptak av farge, partikler, cellefusjonering eller dannelse av TNT. Variasjonen lå i størrelsen til cellene og det er derfor vist eksempler som belyser denne forskjellen i resultat- og diskusjonsdelen. Det ble ikke undersøkt om cellene fra hornhinnen utvekslet mitokondrier.

#### 4.1.1 Morfologi – *in vitro*

De keratocyttilignende cellene fra hornhinnen og huden hos laks virket å være meget like. Det eneste som ble observert som en mulig forskjell, var at cellene fra hornhinnen virket å ha noe mer størrelsesforskjeller. Det ble også observert immobile celler fra hornhinnen som antas å være en annen celletype. Disse var mindre og hadde en mer avlang og smal form. De lot seg farge med MTG, noe som forteller at det faktisk var celler som ble observert.

Keratocytter er mobile celler som beveger seg meget raskt – faktisk en av de raskeste celletypene som er kjent der studier viser til en gjennomsnittsfart på omtrent én cellelengde (rundt 40  $\mu\text{m}$ ) per minutt. Lamellipodium er deres mobilitetsorgan (Kjetil Åsbakk & Dalmo, 1998) som strekker seg mer enn 180° rundt den ellipsoide cellekroppen (figur 9 og figur 28). Disse cellene bruker organet til å trekke seg framover. Cellene beveger seg altså vinkelrett i forhold til lamellipodium. Lamellipodium endret seg ofte under forflytningen ved å skrumpe inn og strekke seg ut og i tillegg lage bølgebevegelser på langs av cellen – slik som når man rister et teppe. Formen på cellekroppen var heller ikke konstant. Slik man ser på figur 10, kunne cellene strekke seg ut til sidene. Det så ut til at cellekroppen ble utstrakt ved at lamellipodium delte seg til hver sin side, og dermed kravlet i motsatt retning. Cellen kunne også skrumpe inn til en ball slik man ser på figur 12 og 26. I enkelte tilfeller kunne cellen forbli slik og virke død, mens i andre tilfeller gikk den tilbake til en mer typisk form og adferd igjen, slik man ser er tilfellet i bildeserien i figur 12. Det er vist at celleforflytningen er raskest når cellens kontaktmønster holdes likt, mens hastigheten reduseres gradvis hvis kontaktmønsteret blir mer uregelmessig (Lee & Jacobson, 1997).

De keratocyttilignende cellene fra huden beveget seg ut fra skjellet. De opptrådte ofte i cellemasser, men også som enkeltceller. Cellene dannet tunneler (TNT) mellom seg (figur 11), noe som også ble observert hos hornhinnecellene (figur 25). Keratocytterne både fra huden og hornhinnen har en viktig oppgave med å opprettholde den ytre forsvarsbarrieren hos fisken. Oppstår et sår i huden eller hornhinnen vil disse cellene raskt dekke såroverflaten ved å vandre utover fra kanten av såret (Ubels & Osgood, 1991; K Åsbakk, 2001). Det er usikkert i dette forsøket om grunnen til at cellemassen beveget seg ut fra skjellet var celledeling eller om det var bevegelse av celler som fulgte med ved høstingen av skjellet. Ved undersøkelser av eksperimentelle sår i huden hos fisk, spredte epidermis seg fra sårkantene og mot sentrum av såret. På et sår som var én kvadratcentimeter tok det 6-7 timer før såret var helt dekket (K Åsbakk, 2001). Hvis skåla ble inkubert over flere dager kunne omtrent hele glassbunnen være dekt av cellemasse. Cellemassene fra de ulike skjellene vokste ofte sammen. Dermed forstår man at disse cellene er effektive ved sårheling.

Det kan ikke garanteres at de keratocyttilignende cellene fra hornhinnen som er presentert i denne oppgaven stammer fra det ytre epitelet. En studie om dypvannsteleoster sine hornhinner viser til at keratocytterne oftest var å finne i stroma, men at enkelt arter, som *Nezumia aequalis*, også hadde celletypen i det ytre epitelet (Collin & Collin, 1998). Som nevnt i «Materialer og metoder» ble det størst suksess ved å skjære ut hornhinnen og legge den ned på bunnen av skåla og holde den nede med dekkglass og agarose. Som nevnt ble det brukt mye tid på å finne en metode som fungerte for prøvetakingen. Siden utskjæring av hornhinnen ga mest celler, ble denne metoden brukt. Dermed kan cellene komme fra det ytre og indre epitelet av hornhinnen, men også fra stroma som ligger mellom disse lagene.

Man kunne skimte cellene under skjellet og så dermed at mange celler vandret ut fra undersiden. Tidligere forsøk av lignende karakter (Kjetil Åsbakk & Dalmo, 1998) fjernet skjellet etter en periode i inkubasjon. I dette forsøket ble skjellet beholdt i skåla. Grunnen var at det ble observert at man lett kunne dra med seg celler når man tok ut skjellet. I tillegg var det ofte store cellemasser og enkeltceller som beveget seg utover bunnen slik at det ikke var noe problem å mikroskopere med skjellet liggende i skåla. Forutsetningen var at skjellet var festet til bunnen slik at cellene hadde et underlag å vandre ut på. Skjellet ble godt festet til bunnen ved å avvente tilsetning av HBSS-løsning i 2-3 minutter etter at skjellet var lagt på bunnen av skåla. Flytende skjell så ikke ut til å gi noen celler på bunnen. Cellene fra hornhinnen virket ikke å være like godt festet til bunnen som cellene fra huden. Det var derfor viktig å passe på at oppsugingen av løsningen ikke ble gjort med for kraftig sug eller at tilsetning av medium ikke ble gjort for hardt.



### 4.1.2 Trypsin-EDTA

EDTA gjør at cellene løsner fra underlaget ved at magnesium og kalsium chelaterer (komplekserer). Trypsin er et proteolytisk enzym som kan degradere proteiner. I dette forsøket ble trypsin-EDTA brukt for å løsne cellene fra plast- og glassoverflaten i brønnene. Dette ved at de degraderer plast/glassheftende proteiner. At EDTA chelaterer vil si at de flerverdige metallionene, magnesium og kalsium, bindes til to forskjellige funksjonelle kjemiske grupper til et større molekyllkompleks (Gylseth, 1981). 0,25 % trypsin-EDTA ble kun brukt på keratocyttilignende celler fra huden. Det ble brukt for å kunne blande celler som var ulikt mitokondriefarget. Kort fortalt ved å først farge cellene, løsne de med trypsin-EDTA, tilsette føtalt kalveserum, blande de, sentrifugere og gi dem tid til å feste seg til underlaget igjen. Serumet inneholder trypsininhiberende molekyler som gjør at cellene kan feste seg til bunnen og bli normale igjen. Deretter var det mulig å studere cellene i mikroskopet for å se om de utvekslet mitokondrier. Det var også en grei metode for å undersøke enkeltceller da det sjeldent ble dannet cellemasser etter denne behandlingen. Etter behandlingen kunne cellene overleve i flere dager ved inkubering på 4 °C.

Figur 13 viser trypsin-EDTA sin effekt på cellene, og serumet sin trypsininhiberende effekt. Figuren viser en bildeserie der cellemassen trekker seg tilbake, og en del enkeltceller og celler ytterst i massen som krøllet seg sammen. Ved tilsetning av serum vokste cellemassen noe utover igjen, og en del enkeltceller strakk seg ut. Serumet sin virkning var ikke overbevisende i denne bildeserien. Det er mulig at bildeserien burde ha gått lengre for å se en større effekt. Man kan også spørre seg om det hadde vært hensiktsmessig at serumet fikk lengre virketid i nevnte forsøk der man skulle se etter mitokondriutveksling. Likevel ble det observert celler i mikroskopet etter behandlingen. Det var greit med mange celler, men heller ikke noe særlig at det ble for mange slik at det ble lite rom mellom cellene. Spesielt med tanke på å kunne observere mitokondriutveksling via TNT. TNT-forbindelsen ble ofte brutt hvis noe kom i veien, for eksempel en annen celle. Man kunne observere en slik forbindelse lengre uten slike hindringer.

### 4.1.3 Farging

Det ble brukt mye tid på å teste ut hvilke farger som fungerte hos de keratocyttilignende cellene fra huden. Tabell 3 viser en oversikt over alle de elleve fargene som ble testet. De fleste ble testet hver for seg, mens noen ble testet på samme celler – altså at samme celler ble farget med flere farger. Etter hvert ble det observert at det kun var tre farger av disse som fungerte tilfredsstillende. Disse ble kun brukt alene. Det var MitoTracker Green (MTG) (figur 14),

MitoTracker Orange (MTO) (figur 15) og LysoTracker Red (LTR) (figur 16). Etter hvert som det ble utarbeidet en metode for å kultivere celler fra hornhinnen ble det interessant å teste fargene på disse keratocyttilignende cellene også. Det ble kun tid til å teste MTG (figur 29) og LTR (figur 30), men fargestoffene så ut til å farge de samme cellekomponentene som hos hudcellene.

#### **4.1.4 Opptak av partikler**

Keratocytterne har tidligere vist evnen til å ta opp latekspartikler på gjennomsnittlig diameter 2,5  $\mu\text{m}$  (Kjetil Åsbakk & Dalmo, 1998). Polystyrenpartiklene i dette forsøket med diameter på 0,955  $\mu\text{m}$  (955 nm) og 0,503  $\mu\text{m}$  (503 nm) er da vesentlig mindre og i et annet materiale. Ved eksponering av de keratocyttilignende cellene fra hornhinnen og huden for partiklene, viste cellene liten interesse. Som vist i figur 17, 19 og 30 er det kun en håndfull partikler som kan sies å være tatt opp av cellen - om man over hodet kan fastslå det. Partiklene virket heller å feste seg til cellemembranen og fulgte med cellen som ga en oppfattelse av at plasten var internalisert.

Ved vanlig lysmikroskopi med polarisering (POL) med 60x og 955 nm plastpartikler, var plastpartiklene lett å differensiere. Dette grunnet uniform størrelse og skyggen de etterlot, slik man ser på figur 30. Det var derfor mulig å studere cellene over lengre tid og se hvordan de interagerer med 955 nm-partiklene. 503 nm-partiklene var derimot vanskeligere å differensiere uten bruk av fluorescens. Det var derfor nødvendig med bruk av fluorescens for å skille partiklene fra granulelignende komponenter som var vanlig å se inne i cellene.

Partiklenes fluorescens var til hjelp både som markør for 503 nm-plasten, men også gjennom å definere høyden på partiklene. DV-mikroskopet med konfokalkapasitet kunne med dette definere høyden ved bruk av fluorescens. Funksjonen gjør at man kan dele opp prøven i z-plan hvor hvert snitt har en gitt høyde kalibrert inn i mikroskopet. Bildene viste da at cellene løftet opp plastpartiklene med lamellipodium slik som beskrevet i arbeidet til Åsbakk og Dalmo (Kjetil Åsbakk & Dalmo, 1998). Videre ble partiklene liggende på cellenes overflate hvor den også er observert å falle av igjen.

«CellMask Green» og orange ble forsøkt brukt for visualisering av cellemembranen. Teorien bak dette var at man da kunne se om plastpartiklene fysisk var på innsiden eller på utsiden av cellemembranen. Fargen, som er effektiv for visualisering av cellemembraner hos pattedyr (ThermoFisher, 2014), viste seg å ha dårlig fargeeffekt på cellemembranen til de

keratocyttilignende cellene fra huden. Fargemetoden ble derfor ikke benyttet i forsøk med plast. LTR ble i stedet valgt som farge da cellene tok til seg fargestoffet bra og ga en god gjengivelse av lysosomenes plassering. Fargen LTR ble valgt spesifikt på grunn av lavere intensitet for produksjon av fluorescens.

Oppdelingen i z-plan muliggjorde generering av 3D-modeller som vist i figur 18, 20 og 31. 3D-modellene overført i et dokument slik vil fortsatt være i 2D (todimensjonalt), noe som begrenser fordelene 3D gir. 3D-modellene ble derfor studert nøye på datamaskin hvor man kan rotere og endre vinkler før den mest oversiktlige vinkelen ble valgt som modell. Hovedfokus ved vurdering av 3D-modellene var da å se om plastpartiklene lå i kontakt med lysosomene. Dette skyldes lysosomets tiltenkte rolle som nedbryter av fremmedlegemer i cellen (Hardin et al., 2012). Ved nøye gjennomgang av flere modeller, hvor noen er vist i denne oppgaven, kan det ikke vises til noen kontakt mellom plastpartikkel og lysosom.

Partiklene som ble brukt var av materialet polystyren og farget med den fluorescerende fargen Plum Purple. Fargen ble valgt på grunnlag av at DAPI-kanalen ikke ga fluorescensrespons på LTR. Dette ville gjøre det umulig å skille plast og lysosom. DAPI-kanalen bruker høyere intensitetslys med lavere bølgelengde som er mer skadelig for cellen. På bakgrunn av dette ble cellene kun eksponert for denne kanalen i korte perioder med minimal effekt.

Begrensningen i eksponeringstid og effekt var fortsatt ikke tilstrekkelig til å unngå skader på cellene. Fototoksisiteten ved bruk av DAPI-kanalen var tydelig etter hvert 3D-bilde og begrenset billedtakingen av hver celle. Muligheten for ytterligere oppløsning med tilgjengelig utstyr ble derfor kun forsøkt en gang, men tok livet av cellen etter en eksponering. Fotoblekingen var derimot minimal, hvor kun LTR var dårligere på prøver som ble studert 2-3 dager etter farging.

#### **4.1.5 Cellefusjonering**

Keratocyttilignende celler fra hornhinne og hud har gjennom forsøkene gitt inntrykk av evne til cellefusjonering. På figur 24 kan det virke som om cellene fra huden strekker ut deler av celleveggen ved hjelp av lamellipodium for å skape kontakt. Når kontakt er opprettet trekkes de sammen slik at det ser ut som én celle. På bilde lengst til høyre ser man ikke lenger noen avgrensende membran. Sammenlikner man med figur 19 virker cellene å ha avgrensninger tross at de er sammenkoplet.

Interaksjon mellom cellemembranene er en viktig prosess i keratocyttenes evne til å skape en ny barriere ved skade på epidermis. Denne prosessen går, som omtalt tidligere, raskt (K Åsbakk, 2001). Det er vist at disse cellene kan ha en hastighet på 500  $\mu\text{m}/\text{time}$  (Morita et al., 2011) og 2400  $\mu\text{m}/\text{time}$  (Kjetil Åsbakk & Dalmo, 1998). Studien til Morita et al. fra 2011 så spesielt på formasjonen av aktinstrenger. Membranene kommer i kontakt med hverandre ved hjelp av aktinpolymerisering. Deretter koples intracellulær myosin-II til aktin i strengene og trekker cellene sammen (Morita et al., 2011).

Keratocyttilignende celler fra hornhinnen ser ut til å fusjonere som vist på figur 32. Lamellipodium fra to celler virker å gli inn i hverandre. Cellekroppene trekkes nærmere hverandre og etter hvert ser man kun én celle.

Cellefusjoneringen virker ikke å være tilfeldig verken hos keratocyttilignende celler fra hornhinne eller hud. Flere bildeserier dokumenterer at frie celler som blir hindret av aktinstrengene kun stopper opp eller strekker strengen. Cellene fortsetter ofte videre om strengen ryker eller at cellene flytter seg. Det kan derfor tenkes at cellene presenterer forskjellige spesifikke reseptorer på cellemembranen som er med å avgjøre om cellen vil binde seg eller ikke.

#### **4.1.6 Mitokondrieutveksling**

Det ble gjennomgått et stort antall mikroskopibilder av keratocyttilignende celler fra laksehud farget med MTG og MTO med mål om å observere en utveksling av mitokondrier direkte mellom celler. Mitokondrier er cellenes kraftverk der det produseres ATP og karbondioksid (Hardin et al., 2012). Det kan godt tenkes at det er lite næring for keratocytterne som befinner seg ytterst i huden i epidermis – siden det er liten eller ingen vaskularitet. Det kan se ut til at de trives godt i næringsfattig medium da forsøk med å inkubere celler (etter høsting) med FKS var heller mislykket da det var få celler som overlevde. De trivdes bedre i kun HBSS-løsning. Mobile celler krever en viss metabolsk aktivitet for å bevege seg, imidlertid er det beregnet at mobile celler som bruker aktinpolymerisering benytter kun 1 % av ATP-energien til bevegelse *in vitro* og på flatt substrat (Li, Yao, Mori & Sun, 2019). HBSS består av ulike salter oppløst i vann, samt D-glukose (0,06 M) som da utgjør energisubstratet til cellene. Uansett, er metabolsk aktivitet viktig for disse cellene. Derfor var ett av målene å undersøke eventuell utveksling av mitokondrier, muligens via TNT. Utvekslingen kan også gi forandringer i genuttrykket til mottakercellen. Dette fordi mitokondrier har eget DNA (mt-DNA) (Torralba et al., 2016). Mitokondrieutveksling er ikke beskrevet hos fisk før, men er beskrevet hos stamceller fra mus.

Hvor musestamceller tok opp mitokondrier isolert fra menneske (Islam et al., 2012). Det ble likevel vist at de keratocyttilignende cellene fra laksehud utveksler eller tar opp mitokondrier.

#### **4.1.6.1 Mitokondrier i tunneling nanotube (TNT)**

Det ble ikke observert utveksling av mitokondrier via TNT hos keratocyttilignende celler fra laksehud. Forskningsartikler viser til at det kan skje utveksling av mitokondrier via TNT. Hos celler (cellelinje) av typen pheochromocytoma 12 (PC12) fra binyremargen hos rotter har det for eksempel blitt observert mitokondriutveksling via TNT. Utvekslingen skjedde fra friske til stressede celler slik at de ble reddet fra apoptose (Wang & Gerdes, 2015). Det ble faktisk observert mitokondrier inne i TNT hos keratocyttilignende celler i laksehud (figur 22), men som nevnt ble ingen utveksling observert. Utfordringen med å få dokumentert en slik utveksling var at cellene beveget seg meget raskt, og ofte bort fra synsfeltet. Derfor måtte det tas bilder med kort mellomrom, det vil si 15-30 sekunder, og man måtte «følge etter dem». Cellene så heller ikke ut til å like lyset fra mikroskopet og «flyktet» fra det opplyste området. Hvis to celler hadde TNT mellom seg, ble denne forbindelsen raskt brutt via cellemigrering muligens grunnet lyspåvirkning. Derfor var det vanskelig å studere de lenge nok til å se en eventuell utveksling. Best resultat for å bare observere mitokondrier i kanaler, uten utveksling, ble oppnådd med lang tid mellom bildene eller ved å ta enkeltbilder.

#### **4.1.6.2 Typisk keratocyttilignende celle tar opp mitokondrier fra utypisk keratocyttilignende celle**

Utveksling av mitokondrier mellom en typisk og utypisk keratocyttilignende celle ble observert slik som figur 23 viser. Man så en celle med en typisk keratocyttilignende morfologi og en globulær, utypisk, keratocyttilignende celle. Utover bildeserien fikk den typiske cellen mitokondrier fra den utypiske. Dette så man ved at den typiske cellen ved  $t = 0$  ikke hadde noen mitokondrier farget med MTG, men fikk det utover bildeserien. Den utypiske cellen tok ikke opp mitokondrier fra den typiske. Dette står i kontrast til nevnte artikkel fra Wang og Gerdes fra 2015 der friske celler reddet stressede celler fra apoptose ved mitokondriutveksling via TNT (Wang & Gerdes, 2015). Her kan det se ut til at en frisk celle henter ut mitokondrier fra en døende celle. Man kan ikke se at den utypiske cellen utstråler mindre fluorescens etter at den andre cellen har tatt mitokondrier fra den.

#### **4.1.6.3 Celler med mitokondrier i begge farger**

Det ble observert celler som hadde mitokondrier av begge farger (MTG og MTO), uten at selve utvekslingen eller opptaket ble observert (figur 24). Det kan tenkes at de hadde utvekslet mitokondrier med hverandre, men det kan også ha skjedd på et tidligere tidspunkt der de har

tatt opp mitokondrier fra en annen celle direkte eller indirekte. Indirekte opptak kan eksempelvis være fra frislupne mitokondrier fra døde celler.

#### **4.1.7 Lengde på tunneling nanotube (TNT)**

Tidlig under mikroskoperingen ble det lagt merke til tunneler, TNT, mellom cellene. Det ble observert at de kunne bli lange. Dermed kunne celler som var langt fra hverandre fortsatt være sammenkoblet. Cellene er avhengige av kommunikasjon. Det er påvist transport av cellekomponenter, men også bakterier og virus via TNT (Omsland et al., 2017). På grunn av den imponerende utstrekkingen av TNT, ble det foretatt måling av lengden. Tre bilder av keratocyttilignende celler fra laksehud og ett fra hornhinnen ble plukket ut (figur 25). Den lengste kanalen som ble funnet fra hudcellene var på 381  $\mu\text{m}$ . De andre bildene som ble valgt ut fra hudcellene hadde TNT-er på hhv. 105 og 165  $\mu\text{m}$ . En typisk keratocyt er rundt 40  $\mu\text{m}$  lang i cellekroppen (Kjetil Åsbakk & Dalmo, 1998). En TNT-lengde på 381  $\mu\text{m}$  vil derfor være rundt 9,5 cellelengder. Kanalene kunne også være korte, så korte at cellene nesten hadde direkte kontakt. Hvis cellene beveget seg bort fra hverandre, kunne kanalene opprettholdes, men de ble tynnere jo mer utstrakt de ble. Til slutt røk kanalene, og den ene cellen fikk en stump av kanalen som den bar med seg videre. Man kunne tydelig se at kanalen på 105  $\mu\text{m}$  var tykkere enn de på 165 og 381. Likevel må man være varsom med å sammenligne slik siden bildene er tatt med ulike objektiv og klippet ut i ulike størrelser fra originalbildet. Det ble også tatt mye mindre bilder av hornhinnecellene i forhold til hudcellene, derfor er ikke sammenligningsgrunnlaget helt reelt. Uansett ble den lengste kanalen fra hornhinnecellene målt til 92  $\mu\text{m}$ .

#### **4.1.8 NanoLive**

NanoLive viste seg å ha store muligheter for visualisering av keratocyttilignende celler. Bildene i figur 26 gir et detaljert inntrykk av konturer selv på lamellipodium. Potensialet til mikroskopet er stort siden man ikke har samme begrensninger med farging og fototoksisitet sammenlignet ved bruk av DV-mikroskopet. Det ble liten tid eller mulighet til å bruke NanoLive, derfor ble det ikke produsert mye materiale med dette mikroskopet.

## 4.2 Forslag til videre forskning

Utarbeiding av metode for dette prosjektet har ført til et stort arkiv med bilder som ikke er tatt med i denne oppgaven. Arkivet består av over 700 GB med bilder og bildeserier fra DV-mikroskopet som har blitt studert og arkivert. Forsøk på konsentrasjoner og eksponeringstider for farging utgjør hoveddelen av arkivet. Erfaringer med hva som ga gode og dårlige resultat vil bli videreført i prosjektet, med håp om at dette kan gjøre arbeidet lettere for videre forskning.

Labarbeidet ble brått avsluttet 12. mars 2020 hvor tilgang til UiT og lab ble begrenset. Dette var samme dag som NanoLive ble tilgjengelig. De tre siste timene før nedstengningen ble brukt til å mikroskopere med dette mikroskopet. Resultatene, som vist i figur 26, virker utrolig lovende hvor videre arbeid med NanoLive kan unngå tidkrevende arbeid med farging og redusere fototoksisitet.

- Forsøke å kultivere epitelceller kun fra den ytre delen av hornhinnen siden de er utsatt for eksponering av partikler.
- Undersøke om keratocytter fra hornhinne og hud håndterer partikler fra forskjellige plasttyper likt.
- Undersøke hvordan keratocytter fra hornhinne og hud håndterer ulike plastpartikkelstørrelser.
- Fortsette å ta bildeserier av keratocytter fra hornhinne og hud farget med to ulike mitokondriefarginger for å se om de utveksler mitokondrier via TNT.
- Implementere bruk av NanoLive for å unngå begrensninger i forhold til farging av cellekomponenter og fototoksisitet. NanoLive gjør det mulig å mikroskopere ufargede celler. Det kan være større mulighet for å se mitokondriutveksling via TNT med dette mikroskopet.

## 5 Konklusjon

Keratocyttilignende celler fra hornhinne og hud hos laks ble studert i mikroskop med innebygd kamera. Skjellene ble høstet for å få fram hudceller. For å få fram hornhinneceller ble hornhinnen skjært ut. Prøvene ble lagt i petriskål med plast- eller glassbunn og tilsatt HBSS-løsning. Det ble forsket fram metoder for å farge cellekomponenter på best mulig måte. Det ble lagt vekt på deres respons på mikro- og nanoplast, om de bedrev mitokondrieutveksling (undersøkt kun hos hudcellene), om cellene fusjonerte og lengdemåling av celletunneler. Mikroskopet som ble mest brukt var GE DeltaVision Elite, men NanoLive ble også brukt.

- Morfologisk var de keratocyttilignende cellene fra hornhinnen og huden meget like og så ut som et speilegg. Cellene var raske og hadde et mobilitetsorgan kalt lamellipodium. Organet strakk seg over 180° rundt den ellipsoide cellekroppen. Cellene beveget seg vinkelrett i forhold til lamellipodium. Farten var høyest når cellen var normalt utstrakt. Cellene kunne forandre form eksempelvis ved å strekke seg ut til sidene eller bli til en rund ball, men de hadde evne til å gå tilbake til opprinnelig form igjen. Cellene fra huden beveget seg ut fra skjellet i cellemasser eller som enkeltceller. Celler fra både hornhinne og hud kunne ha «tunneling nanotube» (TNT) mellom seg. Det virket som om det var mer størrelsesforskjeller hos celler fra hornhinnen i forhold til celler fra huden.
- Trypsin-EDTA fikk cellene til å trekke seg sammen og løsne fra plast- og glassoverflaten, mens føtalt kalveserum (FKS) inhiberte trypsin slik at cellene strakk seg ut og festet seg til bunnen igjen. Metoden ble brukt til å få celler i suspensjon, slik at man kunne blande celler som var ulikt organellefarget, for så å få de til å feste seg til bunnen igjen. Dette for å undersøke om de utvekslet mitokondrier.
- Det ble testet elleve farger på de keratocyttilignende cellene fra huden. Fargestoffene MitoTracker Green og MitoTracker Orange og LysoTracker Red fungerte best. Kun MitoTracker Green og LysoTracker Red ble testet på de keratocyttilignende cellene fra hornhinnen. Cellene fra disse to vevstypene virket å reagere på fargestoffene på samme måte som hudcellene.
- Plastpartikler av polystyren med fluorescensen Plum Purple fungerte godt i kombinasjon med LTR. De keratocyttilignende cellene virket ikke å ta opp disse plastpartiklene med diameter på 503 nm og 955 nm siden opptaket ikke ble dokumentert.



- Det ble observert det som ligner cellefusjonering hos keratocyttilignende celler fra både hornhinne og hud. Dette ved at lamellipodium fra to celler ser ut til å gå sammen slik at de trekkes mot hverandre og samles til én celle.
- Det ble påvist mitokondriutveksling. Det ble ikke påvist via TNT, men det ble vist at mitokondrier befinner seg inne i tunnelene. Det ble observert mitokondriutveksling mellom en typisk og en utypisk keratocyttilignende celle. Den utypiske hadde trukket seg sammen til en ball. Den typiske utstrålte fluorescens av samme type som mitokondriene til den utypiske. Det ble observert celler med to ulike mitokondriefarginger.
- Lengden på TNT-er ble målt. Den lengste hos keratocyttilignende celler fra huden ble målt til 381  $\mu\text{m}$ , men den lengste fra hornhinnen ble målt til 92  $\mu\text{m}$ .

## Referanser

- Amin, A. B., Mortensen, L. & Poppe, T. (1991). *Histologisk atlas : normalstruktur hos laksefisk*. Bodø: Akvapatologisk laboratorium.
- Ángeles Esteban, M. (2012). An overview of the immunological defenses in fish skin. *ISRN immunology*, 2012.
- Antunes Nogueira, L., Bay-Larsen, I., Vangelsten, B., Johnsen, H., Haar, M., Roland, A. & Johannessen, E. (2019). *Sluttrapport HAVPLAST – Marin plast fra norsk sjømatnæring – kartlegging, kvantifisering og handling*.
- Barker, J. N., Griffiths, C., Nickoloff, B. J., Mitra, R. & Dixit, V. M. (1991). Keratinocytes as initiators of inflammation.
- Booth, A., Kubowicz, S., Beegle-Krause, C., Skancke, J., Nordam, T., Landsem, E., . . . Jahren, S. (2017). Microplastic in global and Norwegian marine environments: Distributions, degradation mechanisms and transport. *Norwegian Environment Agency. M-918*.
- Collin, S. & Collin, H. (1998). The deep-sea teleost cornea. *Histol Histopathol*, 13, 325-336.
- Collins, T. J. (2007). ImageJ for microscopy. *Biotechniques*, 43(S1), S25-S30.
- Cooper, M. S. & Schliwa, M. (1986). Motility of cultured fish epidermal cells in the presence and absence of direct current electric fields. *The Journal of cell biology*, 102(4), 1384-1399.
- Cotte, Y., Toy, F., Jourdain, P., Pavillon, N., Boss, D., Magistretti, P., . . . Depeursinge, C. (2013). Marker-free phase nanoscopy. *Nature Photonics*, 7(2), 113.
- Ferreira, T. & Rasband, W. (2012, 23.06.2012). ImageJ User Guide. Hentet fra <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146-8.html>
- Fiskeridirektoratet. (2019a). *Lønnsomhetsundersøkelse for matfiskproduksjon*.
- Fiskeridirektoratet. (2019b). *Statistikk for akvakultur 2018 - foreløpige tall*.
- Foley, C. J., Feiner, Z. S., Malinich, T. D. & Höök, T. O. (2018). A meta-analysis of the effects of exposure to microplastics on fish and aquatic invertebrates. *Science of the Total Environment*, 631, 550-559.
- GE-Healthcare. (2014). DeltaVision Imaging System User's Manual. Hentet fra [https://cdn.southampton.ac.uk/assets/imported/transforms/content-block/UsefulDownloads\\_Download/F21A6D82AB864B598A07D487C756A92E/Delta%20Vision%20Elite%20User%20Manual.pdf](https://cdn.southampton.ac.uk/assets/imported/transforms/content-block/UsefulDownloads_Download/F21A6D82AB864B598A07D487C756A92E/Delta%20Vision%20Elite%20User%20Manual.pdf)
- Geyer, R., Jambeck, J. R. & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science advances*, 3(7), e1700782.
- Gigault, J., Ter Halle, A., Baudrimont, M., Pascal, P.-Y., Gauffre, F., Phi, T.-L., . . . Reynaud, S. (2018). Current opinion: What is a nanoplastic? *Environmental pollution*, 235, 1030-1034.
- Gylseth, B. (1981). Rapport fra et besøk ved Medical Research Council, Pneumoconiosis Unit, Penarth, Wales, i perioden 8. mars-4. april 1981.
- Hardin, J., Kleinsmith, L. J., Bertoni, G. & Becker, W. M. (2012). *Becker's world of the cell* (8th ed. utg.). Boston: Benjamin Cummings.
- Havforskningsinstituttet. (2017). *Havforskningsrapporten 2017. Fiske og havet, særnr. 1-2017*.
- Hognes, E. S. & Skaar, C. (2017). Avfallshåndtering fra sjøbasert havbruk.
- Huber, F. (2011). Emergent structure formation of the actin cytoskeleton.
- Islam, M. N., Das, S. R., Emin, M. T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., . . . Bhattacharya, J. (2012). Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nature medicine*, 18(5), 759.
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., . . . Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 768-771.

- Jovanović, B. (2017). Ingestion of microplastics by fish and its potential consequences from a physical perspective. *Integrated environmental assessment and management*, 13(3), 510-515.
- Klionsky, D. J. & Tomashek, J. J. (1999). An interactive exercise to learn eukaryotic cell structure & organelle function. *The American Biology Teacher*, 61(7), 539-542.
- Kozlov, M. M. & Chernomordik, L. V. (2015). Membrane tension and membrane fusion. *Current opinion in structural biology*, 33, 61-67.
- Kryvi, H. & Poppe, T. (2016). *Fiskeanatomi*. Bergen: Fagbokforlaget.
- Laissue, P. P., Alghamdi, R. A., Tomancak, P., Reynaud, E. G. & Shroff, H. (2017). Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging. *Nature methods*, 14(7), 657-661.
- Lee, J. & Jacobson, K. (1997). The composition and dynamics of cell-substratum adhesions in locomoting fish keratocytes. *Journal of Cell Science*, 110(22), 2833-2844.
- Li, Y., Yao, L., Mori, Y. & Sun, S. X. (2019). On the energy efficiency of cell migration in diverse physical environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(48), 23894-23900.
- Liu, P., Chin, L., Ser, W., Chen, H., Hsieh, C.-M., Lee, C.-H., . . . Liedberg, B. (2016). Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: past, present and future. *Lab on a Chip*, 16(4), 634-644.
- Mills, D. (1989). *Ecology and management of Atlantic salmon*: Springer Science & Business Media.
- Mogilner, A., Barnhart, E. L. & Keren, K. (2020). *Experiment, theory, and the keratocyte: an ode to a simple model for cell motility*. Foredrag holdt ved Seminars in cell & developmental biology.
- Morita, T., Tsuchiya, A. & Sugimoto, M. (2011). Myosin II activity is required for functional leading-edge cells and closure of epidermal sheets in fish skin ex vivo. *Cell and tissue research*, 345(3), 379.
- NorskVann. (2019). Mikroplast og vannbransjen. Hentet fra [https://www.norskvann.no/files/docs/NV\\_mener\\_Mikroplast\\_2019.pdf](https://www.norskvann.no/files/docs/NV_mener_Mikroplast_2019.pdf)
- Okabe, M. & Ito, K. (2002). How to make figures and presentations that are friendly to color blind people. *University of Tokyo*.
- Omsland, M., Bruserud, Ø., Gjertsen, B. T. & Andresen, V. (2017). Tunneling nanotube (TNT) formation is downregulated by cytarabine and NF-κB inhibition in acute myeloid leukemia (AML). *Oncotarget*, 8(5), 7946.
- Prasad, P. N. (2004). *Introduction to biophotonics*: John Wiley & Sons.
- Revel, M., Châtel, A. & Mouneyrac, C. (2018). Micro (nano) plastics: A threat to human health? *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 1, 17-23.
- Rossen, E., Bratbergsengen, K. & Pihl, R. (2019, 31.01.2019). Piksel. Hentet fra <https://snl.no/piksel>
- Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I. & Bootman, M. D. (2014). Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(10), pdb. top071795.
- Schwach, V. (2015). Edgar Hovland, Dag Møller, Anders Haaland, Nils Kolle, Bjørn Hersoug og Gunnar Nævdal: Norges fiskeri- og kysthistorie. Bind V: Over den leiken ville han rå. Norsk havbruksnærings historie. *Historisk tidsskrift*, (02), 312-317.
- Sommerset, I., Walde, C. S., Jensen, B. B., Bornø, G., Haukaas, A. & Brun, E. (2020). *Fiskehelsesrapporten 2019*: Vetrinærinstituttet.
- SSB. (2019, 24.10.2019). Akvakultur. Hentet fra <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett>
- Sundt, P., Briedis, R., Skogesal, O., Standal, E., Johnsen, H. R. & Schulze, P.-E. (2018). *Underlag for å utrede produsent-ansvarsordning for fiskeri- og akvakulturnæringen*: Miljødirektoratet. Hentet fra

- <https://tema.miljodirektoratet.no/no/Publikasjoner/2018/Mai-2018/Underlag-for-a-utrede-produzent-ansvarsordning-for-fiskeri--og-akvakulturnaringen/>
- ThermoFisher. (2014). CellMask™ Plasma Membrane Stains. Hentet fra [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?id=man0001956&version=a.0&pdfurl=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2Fassets%2Fmanuals%2FCellMask\\_Plasma\\_Membrane\\_Stains\\_PI.pdf&title=Q2VsbE1hc2sgUGxhc21hIE1lbWJyYW5lIFN0YWlucw==](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?id=man0001956&version=a.0&pdfurl=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2Fassets%2Fmanuals%2FCellMask_Plasma_Membrane_Stains_PI.pdf&title=Q2VsbE1hc2sgUGxhc21hIE1lbWJyYW5lIFN0YWlucw==)
- Torralba, D., Baixauli, F. & Sánchez-Madrid, F. (2016). Mitochondria know no boundaries: mechanisms and functions of intercellular mitochondrial transfer. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 107.
- Ubels, J. & Osgood, T. (1991). Inhibition of corneal epithelial cell migration by cadmium and mercury. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 46(2), 230-236. 10.1007/BF01691942
- Wang, X. & Gerdes, H.-H. (2015). Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. *Cell Death & Differentiation*, 22(7), 1181-1191.
- Webb, J., Verspoor, E., Aubin-Horth, N., Romakkaniemi, A. & Amiro, P. (2007). The Atlantic salmon. *The Atlantic salmon: genetics, conservation and management*, 17-56.
- Åsbakk, K. (2001). Elimination of foreign material by epidermal malpighian cells during wound healing in fish skin. *Journal of fish biology*, 58(4), 953-966.
- Åsbakk, K. & Dalmo, R. A. (1998). Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) epidermal Malpighian cells-motile cells clearing away latex beads in vitro. *Journal of Marine Biotechnology*, 6, 30-34.

## Vedlegg

Tabell 4 – Viser en oversikt over hvilke reagenser som har blitt brukt i prosjektet, innholdet, leverandøren og landet de kommer fra.

Reagens	Konsentrasjon/innhold	Produsent	Land
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Med kalsium og magnesium uten fenol rød	Corning	Virginia, USA
Amphotericin B	1 µg/µl	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
Streptomycin	100 µg/µl	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
Penicillin	100 IU/ml	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
Føtalt kalveserum	10 %, fortynnet med HBSS-løsning	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
Trypsin-EDTA	0,25 %, 2,5 g porcine trypsin, 0,2 g EDTA, 4Na per liter av HBSS med fenol rød	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
Plum Purple beads 503 nm	1 % partikler	Bangs Laboratories	Indiana, USA
Plum Purple beads 955 nm	1 % partikler	Bangs Laboratories	Indiana, USA
MitoTracker™ Green FM (MTG)	1:1000, fortynnet med HBSS-løsning	Invitrogen	Oregon, USA
MitoTracker™ Orange CM-H2TMRos (MTO)	1:1000, 1:2000, fortynnet med HBSS-løsning	Life technologies	Oregon, USA
LysoTracker™ Red (LTR)	1:1000, fortynnet med HBSS-løsning	Invitrogen	Oregon, USA
CellMask™ Green (CMG)	1:1000, fortynnet med HBSS-løsning	Invitrogen	Oregon, USA
CellMask™ Orange (CMO)	1:1000, fortynnet med HBSS-løsning	Invitrogen	Oregon, USA
Dye Aye (Dil)	1:200, fortynnet med HBSS-løsning	Invitrogen	Oregon, USA

Cytoskeleton kit	50 nM av SiR-actin og SiR-tubulin. 1 $\mu$ M av Verapamil. 1:1000, fortynnet med HBSS- løsning	Tebu-bio	Frankrike
mCling-ATTO 647N	1:75, fortynnet med HBSS-løsning	SYSY	Tyskland
Nile Red	1:1000, fortynnet med HBSS-løsning	Invitrogen	Oregon, USA
Hoechst 34580	5 $\mu$ M, fortynnet med HBSS-løsning	Invitrogen	Oregon, USA
Wheat Germ Agglutinin (WGA)-Alexa594	1:1000, 1:2000, fortynnet med HBSS- løsning	Invitrogen	Oregon, USA

