



# Røde blodceller

## – er de sensorer for laksens helsetilstand?

Det er ikke tvil om at røde blodceller er livsviktige, siden de forsyner kroppen med oksygen, og laksens blodceller frakter oksygen kanskje enda mer effektivt enn våre blodceller gjør. Men det er ikke det eneste de røde blodcellene i laksen kan. De har en cellekjerne som kan uttrykke en mengde gener – de har sensorer for virus og stresshormoner og mye mer – og endrer seg når de får signaler fra omgivelsene. Det er mye vi ikke vet om laksens røde blodcellers reaksjoner og egenskaper, og hvordan alle disse funksjonene påvirker hverandre. Og kanskje kan vi hente inn nyttig informasjon om fiskens tilstand ved å analysere de røde blodcellene?

Maria K Dahle, Mona Gjessing og Thomas Tsoulia

De røde blodcellene hos fisk og fugl har cellekjerne og er svært forskjellige fra våre. Hvis vi ser i mikroskopet på cellene i blodet fra fisk og fugl og sammenlikner med vårt eget blod er det helt åpenbare forskjeller. Fiskens røde blodceller er større enn våre, selv større enn de hvite blodcellene (figur 1). Dette er motsatt i oss mennesker, der de røde blodcellene er små og flattrykte uten cellekjerne. I fisk og fugl fyller cellekjernen fiskens blodcelle ut til en stor oval form. Men ellers er cellene fulle av rødt hemoglobin, som våre, og har som sin viktigste oppgave å frakte oksygen til kroppen.

Hva betyr det så at laksens røde blodceller har en cellekjerne? Jo, cellekjernen er nesten som cellens «hjerne» og kan styre cellens reaksjon på omgivelsene og dens evne til å forandre og tilpasse seg. Cellekjernen er cellens databank og ordresentral. Der skrives det ut oppskrifter i form av RNA som igjen produseres til proteiner som kan endre cellens funksjon og egenskaper (også godt forklart i vår forrige artikkel NF nr 3 2022).

### Blodcelleforskningsfabrikken

På det nye Veterinærinstituttet i Ås hentes det ukentlig lakseblod for å rense de røde blodcellene og studere dem. Fra ¼ ml blod kan man isolere over 100 millioner røde blodceller, og på en roterende plate ved 15 grader kan cellene overleve i flere uker i en flaske med cellemedium (figur 2). Men hvorfor er vi så interessert i laksens røde blodceller?

Jo, det har vist seg at de også er viktige under virusinfeksjoner. Mange har hørt at viruset som gir hjerte og skjelett-muskelbetennelse (HSMB), Piscine

orthoreovirus (PRV), bruker røde blodceller til å produsere nye virus, og at Infeksiøs lakseanemi-virus (ILAV), binder seg til de røde blodcellene og kan gi alvorlig anemi. I laks som er syke pga laksepoxviruset så ser vi også i mange tilfeller at de røde blodcellene brytes ned. Men har cellene i seg selv enda mer å fortelle oss? I prosjektet RED FLAG vil vi studere hvordan cellene reagerer på ytre stimuli. Vi har nemlig en hypotese om at de røde blodcellene kan fortelle oss om fisken ikke har hatt det bra eller om den er i ferd med å bli syk – også av andre grunner enn virus - derav prosjektnavnet «RED FLAG» - et varselsignal om helsetilstand.

### De røde blodcellene hos laks har flere arbeidsoppgaver enn bare å frakte oksygen

Som for oss, er de røde blodcellene livsnødvendige for laksen. Vi trenger nok av dem, og at de fungerer som de skal hvis vi skal få nok oksygen til å prestere fysisk. Laksen har et stort oksygenbehov sammenliknet med mange andre fiskearter da den er en aktiv svømmer, og den som har sett vill laks hoppe i en foss vet hva slags fysiske utfordringer den kan gå løs på. Det akutte behovet er nok noe mindre hos oppdrettslaksen, men oksygen må de jo uansett ha. Men er det da fornuftig for laksen å ha røde blodceller som ikke har oksygentransport som sin eneste jobb? Det vet vi ikke nok om i dag, så det håper vi å finne ut mer om i dette prosjektet. Som samarbeidspartner har vi den Kanadiske professoren Colin Brauner som har spesialisert seg på å studere hvordan laksen frakter oksygen og leverer den til cellene i kroppen. Han benytter også en modell der mekanismene kan

studies i laboratoriet, og blant annet studerer han hvordan akutt stress og blodets pH og innhold av CO<sub>2</sub> styrer lynkjapp levering av oksygen når det trengs mest, mer effektivt enn i oss mennesker. Dette er spesielt interessant når vi vet at laksens blodlegemer har mange andre roller og oppgaver i tillegg.

### Viruset som kan gi HSMB benytter laksens røde blodceller som kopieringssentral

Et virus er avhengig av å kunne kopiere seg i en celle, og også avhengig av å komme seg fram til den cellen de vil benytte til å lage kopier av seg selv. Noen virus trives i hjertet, andre i lever eller nyre, eller i veggene på blodårene. For å komme seg dit viruset vil, er det lurt å henge seg på en celle som farer gjennom blodbanen, og kanskje også sørge for at cellen blir stanset der viruset vil være. ILA-viruset bruker denne strategien, og i en tidligere artikkel kan man lese mer om det (1.2021). Andre virus tar det enda lenger, og sørger for å kopiere seg i blodcellene selv, mens de sirkulerer. PRV (HSMB-viruset) er et slikt virus, og stort bedre produksjonsfabrikker kan neppe noe virus få. De røde blodcellene er kroppens mest tallrike celle, og på PRV-infeksjonens toppunkt kan mer enn halvparten av dem produsere virus. PRV sine virusfabrikker inne i cellene er så store at de kan sees i et vanlig lysmikroskop som sorte flekker i cellene. Før man kjente til PRV ble slike flekker kalt for «erythrocyte inclusion body syndrome» som kan oversettes litt fritt til «syndromet med ukjente flekker i de røde blodcellene». Noen ganger når man så dette var fisken syk med anemi - andre ganger ikke - og man gjorde samme funn i ulike typer laksefisk. Nå vet man at mange av disse observasjonene var PRV-infeksjoner, men med flere forskjellige genetiske varianter av PRV som foretrekker forskjellige laks- og ørretarter.

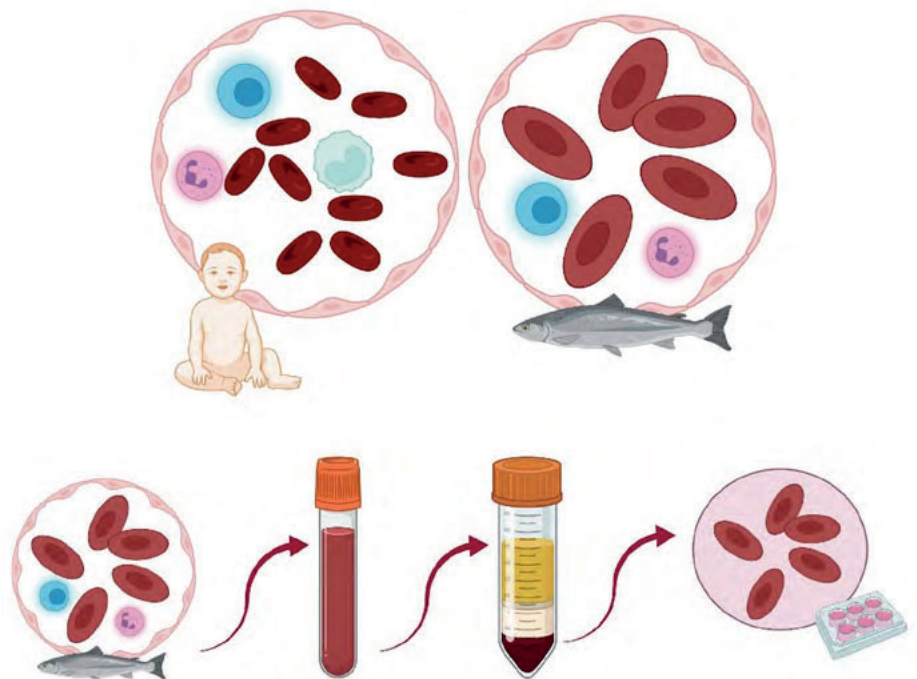
PRV infiserer også muskelceller og kan gi omfattende organskader i hjertemuskel og skjellettet (HSMB), men nå er fokuset på blodcellene. Hva skjer med dem når de blir omgjort til virusfabrikker? Overraskende nok holder de røde blodcellene seg fint i live – ja nesten øker livslengden etter PRV-infeksjon. I tillegg fungerer de fremdeles ganske godt til sin hovedfunksjon, å bære oksygen. Hvis vi

## RED FLAG

RED FLAG (Salmonid red blood cells – Sensors of stress and infection) er et forskningsrådsfinansiert grunnforskningsprosjekt som ledes av seniorforsker Maria K Dahle ved Veterinærinstituttet/Professor 2 UiT. Prosjektet har partnere ved NMBU, UiT, Universitet Miguel Hernández i Elche, Spania og Universitetet i Vancouver, Canada. Hovedmålet i prosjektet er å finne ut hvordan røde blodceller reagerer og endres når de eksponeres for virus og stress. Forsøkene gjøres både i fisken og i cellekultur. Mens forskningen i Norge stort sett skjer på blodceller fra Atlantisk laks, har den spanske partneren Maria Ortega-Villaizan et fokus på regnbueørret, og den kanadiske partneren Colin Brauner har ekspertise på oksygentransport. Ved VI, NMBU og UiT er det samlet et tverrfaglig team av veterinærer, immunologer, molekylærbiologer, virologer og bioinformatikere og selvsagt lang erfaring med forskning på laks. Prosjektnavnet RED FLAG henviser selvsagt til de røde blodcellene, men også til deres evne til å bringe budskap når noe er galt. Som et rødt varselsflagg om redusert helse!



Samling på RED FLAG prosjektmøte - her uten internasjonale partnere: Fra venstre bak: Subash Sapkota (VI), Øystein Wessel (NMBU), Arvind Sundaram (VI/UiO), Ingvild Berg Nyman (NMBU). Foran fra venstre (alle fra VI): Mona Gjessing, Thomais Tsoulia, Prosjektleder Maria K Dahle, Randi Faller og Marit Amundsen. På skjerm fra Tromsø (alle fra UiT): Ingvill Jensen, Jorunn Jørgensen og Martine Aardahl.



Figur 1 Det er påfallende stor forskjell på hvordan menneskets og laksens røde blodceller ser ut, men hos begge arter er cellene fulle av hemoglobin og bærer oksygen. Figur laget i Biorender.

måler hemoglobin ser vi en liten nedgang når virusproduksjonen er på topp, men det normaliserer seg raskt. Vi har benyttet et gen-array til å kartlegge genene som reguleres i PRV-infiserte celler, og har sett at de røde blodcellene reagerer kraftig på viruset med en typisk antiviral respons, og denne responsen varer lenge (figur 3). Det forteller oss at cellene responderer på virus og sannsynligvis sender ut signaler i blodet om at de er infisert slik at andre celler advares og kan sette seg i beredskap for et mulig angrep. Blant annet oppregulerer de systemet som skal kunne presentere deler av virus til immunforsvaret. Men kvitte seg med viruset klarer de likevel ikke. Det er vanlig at oppdrettslaksen bærer på PRV fram til slakt, og noen mener dette kan forverre dannelsen av flekker i laksefileten. I hvert fall finner man ofte virus i disse flekkene – og i blodcellene- i mange måneder etter at de ble friske etter HSMB.

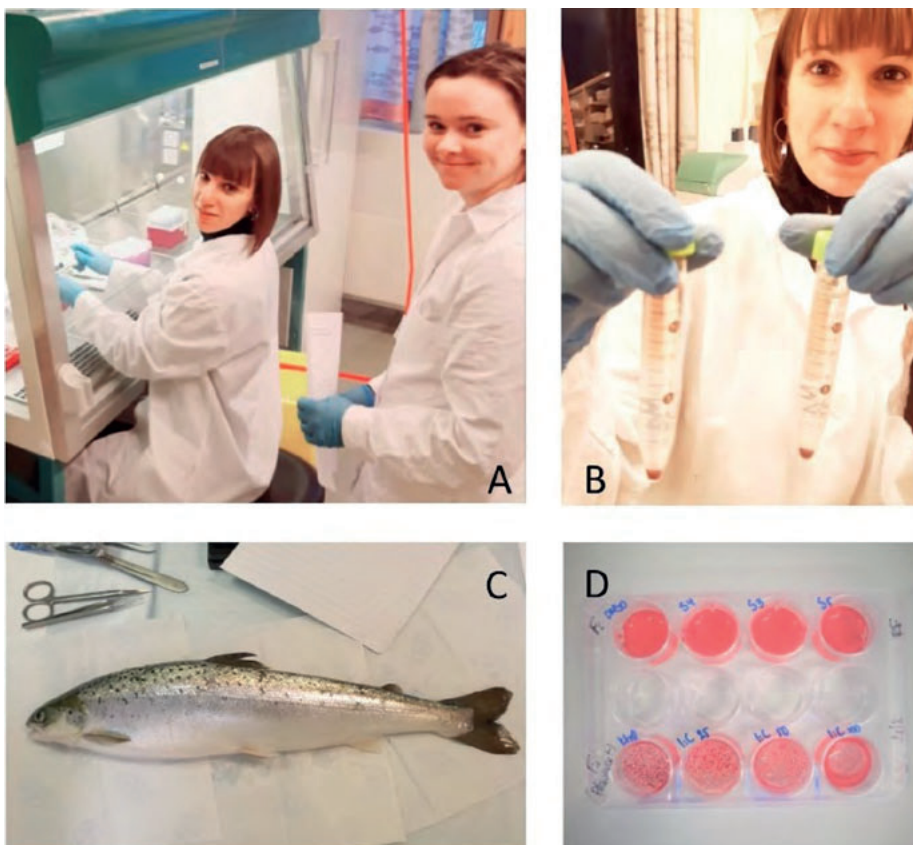
### Hos laks med laksepox ser vi noen ganger at de røde blodcellene brytes ned

Infeksjon med laksepoxviruset ser ut til, i noen tilfeller, å føre til at de røde blodcellene blir brutt ned. Vi vet ikke hvorfor dette skjer og vi har undersøkt om det er laksevirus i de røde blodcellene. Vi har så langt ikke funnet noe som tyder på at de røde blodcellene blir infisert, men vi trenger å undersøke dette i større omfang. Det kan kanskje også dreie seg om en patofysiologisk sekundær prosess i kjølvannet av infeksjonen, men uansett kan kanskje endringer i de røde blodcellene sette oss på sporet av hva som kan være forklaringen på det vi ser.

### Hva skjer når de røde blodcellene reagerer på virus?

Så vi vet at laksens og regnbueørretens celler reagerer på virus. De uttrykker gener som koder for typiske virusreseptorer, spesielt de som gjenkjenner RNA-virus (som både PRV, ILA-virus, PD-virus (salmonid alfavirus) og CMS-virus (piscine myokardittvirus) hører til. Det gjelder både toll-like reseptorene TLR3 og TLR8 som sitter i vesikler som tar opp virus, og virus-reseptorer som befinner seg i cellens cytoplasma. Når disse reseptorene gjenkjenner virus settes en kjedereaksjon av signaler i gang inne i cellen som ender opp med å slå på nye gener – blant annet interferon, og interferon slår igjen på en ny gruppe gener – de interferon-regulerte. Målet med å regulere disse genene er å stoppe viruset. Det gjør de på mange forskjellige måter, som ved å stoppe viruset i å lage kopier av seg selv, eller ødelegge virusdelen før de settes sammen til nye virus. Men det ser det ut til at PRV greier å lure seg unna disse angrepene i de røde blodcellene og fortsette å produsere virus. I alle fall i en uke eller to. Deretter bremser virusproduksjonen opp. Regnbueørretens røde blodceller har blitt rapportert å endre form etter virusinfeksjon, og vi har selv observert at de røde blodcellene i laksen endrer form og blir mer kuleformet når de er infisert med PRV.

I RED FLAG prosjektet bruker vi ikke alltid virus, men hermer etter viruseffekten ved å bruke såkalte agonister, molekyler som gir samme signal til cellen som et



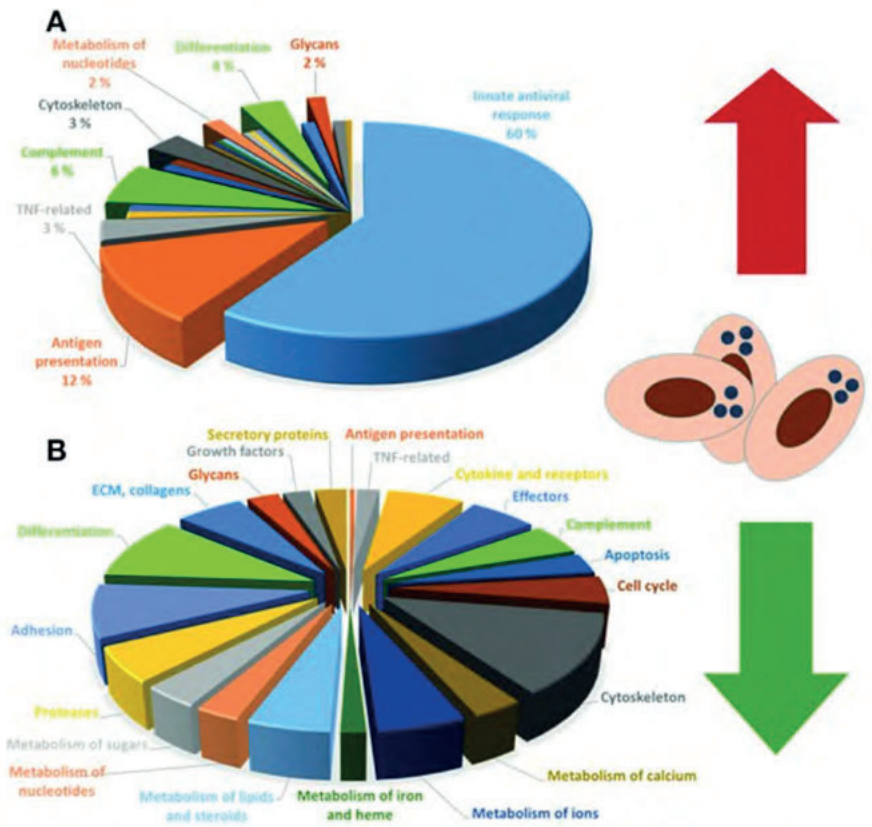
Figur 2. Isolering av røde blodceller. Her er stipendiat Thomais Tsoulia og masterstudent Martine Aardal i ferd med å isolere røde blodceller fra laks som har vært utsatt for håndteringsstress. I andre forsøk eksponeres cellene for stresshormoner og viruskomponenter i laboratoriet. Det er ekstra viktig å gjøre parallele forsøk både i og utenfor fisken for å forstå hvilke andre faktorer som spiller inn, og for å utvikle en best mulig modell for det som skjer inne i blodårene. Figur øverst illustrerer isoleringsprosessen. Blodet separeres i en gradient, før de røde blodcellene overføres til en celleskål og studeres i laboratoriet. laget i Biorender. Foto: Maria K Dahle og Thomais Tsoulia.

virus (f.eks ved å binde til virusreseptoren TLR3) (figur 4). Da kan vi måle tiden det tar før cellen reagerer, og se på om noe kan hemme eller forsterke og fremskynde antiviral respons. Kanskje vi kan bruke det vi finner til å bremse PRV-infeksjonen tidligere i de røde blodcellene?

Man vet ganske mye om signalveiene vi studerer i pattedyr allerede, men mye mindre i laks – og i hvert fall lite i laksens røde blodceller som ikke er som de vi er kjent med. Men det vi vet er at det finnes flere andre signaler som kan hindre at immunforsvaret aktiveres av en infeksjon. Et av disse signalene er stresshormonet kortisol, som slår av mange av genene som viruset vil slå på for å bremse infeksjonen.

### Er røde blodceller følsomme for stress?

Man deler vanligvis stressresponser inn i akutt og kronisk stress, som har litt forskjellig hormonprofil. For pattedyranser man katecholaminer (som adrenalin) typiske for en akutt stressrespons, mens



Figur 3: Gengrupper som opp- (rød) og nedreguleres (grønn) av en PRV-infeksjon i laksens røde blodceller. Figur fra Wessel et al, Frontiers in Immunology, 2019 Antiviral Responses and Biological Consequences of Piscine orthoreovirus Infection in Salmonid Erythrocytes .

TILGJENGELIG SOM FRITTSTÅENDE SENSOR

# DCS Blue

## HØYKVALITETS STRØMSENSOR

- Strømhastighet og strømrretning
- Tilt og temperatur
- Enkel i bruk
- Kontinuerlig sensorstatus via LED
- Intern lagring og/eller RS-232 i sanntid





For tekniske notater, opplæring og produkt informasjon, besøk: [Aanderaa.com/rcm-blue](http://Aanderaa.com/rcm-blue)



a xylem brand

kortisol skilles ut etter stress av lenger varighet. For fisk er dette mer uklart, og man ser at kortisol er den mest stabile stressmarkøren etter stresseksposering. Kortisol kan måles ikke bare i blod, men også i fiskens avføring, slimlag og til og med i vannet der fisken svømmer. Vi vet at røde blodceller uttrykker høye nivåer av genet for glucocorticoidreseptor (GR) som gir en respons på kortisol, og flere gener for de adrenerge reseptorene som gir adrenalinrespons. Også de øvrige signalmolekylene som skal til for å gi stressrespons i cellen er uttrykt på transkriptnivå i røde blodceller. Det er derfor forventet at stresshormoner fører til målbare endringer i de røde blodcellene. Både adrenalin og kortisol er kjent for å hemme immunrespons mot smittestoff, og dette ønsker vi å se nærmere på, både med stressforsøk i fisken, og i cellekulturene med hormoner. Er det slik at stress fører til at de røde blodcellene endrer sin immunfunksjon? Kan kunnskap om dette hjelpe oss å forstå hvorfor en kombinasjon av stress og virusinfeksjon

kan gi økt dødelighet i laks?

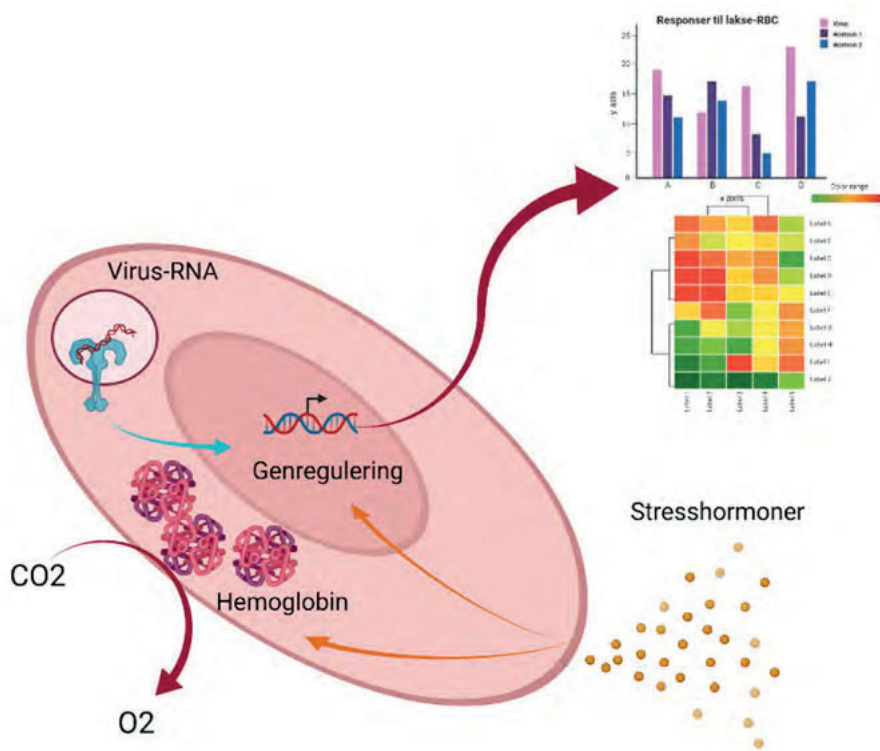
### Biomarkører – hva kan røde blodceller fortelle oss?

Det er lett å få tak i millioner av røde blodceller i en svært liten mengde blod. Disse blodcellene har sirkulert i fisken og blitt eksponert for molekyler og hormoner, som gjenspeiler hvordan fisken har det. De røde blodcellene har også reseptorer for en mengde andre molekyler man kan finne i blodplasma, som cytokiner (signalstoffer fra andre celler), antistoffer – til og med forskjellige næringsstoffer og vitaminer. En god modell utenfor fisken hjelper oss til å forstå det kompliserte bildet og kan lære oss hva som er typisk for en sunn og frisk fisk.

Derfor har de røde blodcellene en helt unik evne til å gi oss svar om laksens indre helse. I tillegg til å prøve å forstå dette bedre ønsker vi også å utvikle noen verktøy for diagnostikken ute i næringen. Det gjør vi ved å jobbe med nedskalering av hvor mye blod vi trenger til å gjøre analyser, og verktøy som skal muliggjøre analyser ute i felt. Men først må vi bli helt sikre på hva målesvarene betyr og identifisere de beste biomarkørene, og det gir dette prosjektet oss en god mulighet til, sier leder for RED FLAG prosjektet.

### Referanser

1. Nikinmaa M, Berenbrink M, Brauner CJ. Regulation of erythrocyte function: Multiple evolutionary solutions for respiratory gas transport and its regulation in fish. *Acta Physiol (Oxf)*. 2019 Oct;227(2):e13299.
2. Wessel O, Krasnov A, Timmerhaus G, Rimstad E, Dahle MK. Antiviral Responses and Biological Consequences of Piscine orthoreovirus Infection in Salmonid Erythrocytes. *Front Immunol*. 2018;9:3182.
3. Wessel O, Olsen CM, Rimstad E, Dahle MK. Piscine orthoreovirus (PRV) replicates in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) erythrocytes ex vivo. *Vet Res*. 2015;46:26.
4. Chico V, Puente-Marin S, Nombela I, Ciordia S, Mena MC, Carracedo B, et al. Shape-Shifted Red Blood Cells: A Novel Red Blood Cell Stage? *Cells*. 2018;7(4).



Figur 4. I dette prosjektet benytter vi modeller for å studere oksygentransport, virusrespons og stress-signaler kontrollert utenfor fisken. Vi ser at det skjer endringer i cellekjernens genuttrykk – som vi kan måle med RNA-sekvensering og andre RNA-analyser. Vi ser også at de forskjellige ytre signalene cellen får påvirker hverandre. Figur laget i Biorender.