

Kunnskap- og metodeutvikling for å styrke laksens robusthet og helse

Sven Martin Jørgensen, Mette Sørensen, Jacob Torgersen, Marijana Todorcevic, Tone-Kari Østbye, Øyvind Aas-Hansen, Lill-Heidi Johansen, Gerrit Timmerhaus, Marta Bao, Marta Alarcon, Turid Mørkøre, Aleksei Krasnov, Bente Ruyter og Harald Takle.





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 420 ansatte. Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på seks ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra, Averøy og Tromsø.

Hovedkontor Tromsø
Muninbakken 9–13
Postboks 6122
NO-9291 Tromsø
Tlf.: 77 62 90 00
Faks: 77 62 91 00
E-post: post@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Rapport

ISBN: 978-82-8296-036-6 (trykt)
ISBN: 978-82-8296-037-3 (pdf)

Rapportnr:
40/2012

Tilgjengelighet:
Åpen

<i>Tittel:</i> Kunnskap- og metodeutvikling for å styrke laksens robusthet og helse	<i>Dato:</i> 19.12.2012
	<i>Antall sider og bilag:</i> 31
<i>Forfatter(e):</i> Sven Martin Jørgensen ¹ , Mette Sørensen ¹ , Jacob Torgersen ¹ , Marijana Todorcevic ¹ , Tone-Kari Østbye ¹ , Øyvind Aas-Hansen ¹ , Lill-Heidi Johansen ¹ , Gerrit Timmerhaus ¹ , Marta Bao ¹ , Marta Alarcon ² , Turid Mørkøre ¹ , Aleksei Krasnov ¹ , Bente Ruyter ¹ og Harald Takle ¹ . ¹ Nofima ² Veterinærinstituttet	<i>Prosjektnr.:</i> 21078
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF # 900457
<i>Tre stikkord:</i> Fiskehelse, Robust, laks	
<i>Sammendrag:</i> Se egen side	

Sammenheng

Norsk lakseoppdrett har store utfordringer med å redusere de betydelige tapene av fisk etter sjøutsett. Parallelt med fokusert forskning på enkelt sykdommer og målrettede produksjonsoptimaliseringer pågår det viktig FoU med målsetning om å finne ut hvordan vi kan styrke laksens generelle robusthet fra et helhetlig perspektiv, med utgangspunkt i de komplekse miljøbetingelsene og varierende fysiologiske og patologiske utfordringene gjennom produksjonssyklus. Formålet med dette prosjektet var å utvikle kunnskap og verktøy for å øke laksens robusthet og på den måten forbedre fiskens velferd, redusere de økonomiske konsekvensene og bidra til å styrke omdømmet til næringen. Dette skulle realiseres gjennom aktiviteter forankret i tre delmål; 1) etablere en kunnskapsbase for utvikling av tester og markører for å måle robusthet hos laks, 2) generere kunnskap om ernæringsmessige behov for økt robusthet, 3) koordinering av aktiviteter koblet mot produksjon av robust fisk. I arbeidspakke (AP) 1 ble det utviklet to nye testmodeller for robusthet basert på pilotforsøk med uttesting av totalt fire utfordringstester, med intraperitoneal injeksjon av kontrollerte doser av ulike kjemiske stimuli under eksperimentelle betingelser. De to modellene simulerer henholdsvis hematologisk anemi ved moderat hemolyse (PHZ) og systemisk inflammasjon (LPS+zymosan), tilstander som gjenspeiler relevante patofysiologiske utfordringer hos oppdrettslaks. Fysiologiske og immunologiske responser ble validert og gen-markører identifisert (ved funksjonell genomikk) som differensierte fiskegrupper med ulik robusthet (her: svømmetrening) ved hjelp av real-time qPCR. AP2 resulterte i nye immunoassays for måling av cytokiner som er viktige markører for immunkompetanse. I AP3 ble det gjennomført et stort tilvekstforsøk på laks i sjø eksponert for ulike strømhastigheter (simulere aerobisk trening på merd-nivå) og dietter (høy vs lav energi). Ved en bred analytisk tilnærming fant vi en positiv effekt av økt strømhastighet + høy-energi diett på tilvekst og fôrutnyttelse. Videre gav høy-strøm kombinert med lav-fett bedre filetkvalitet i form av muskelfasthet og mindre gaping. Analyser av hjerte- og fettvevsmorfologi viste økt vaskularisering av både hjerte- og innvolls fettvev i laks med trening ved økt strømhastighet. Videre antydte våre data at et høyt innhold av fett i fettceller kan medføre oksidativt stress og aktivering av betennelsesfremmende cytokiner og at økt strøm (aktivitet) kan ha en positiv effekt med å redusere graden av oksidativt stress. Ved forsøk på isolerte primær-cellekulturer fra hjertene til de ulike gruppene fant vi at trening gjennom økt strømhastighet hadde en positiv effekt på fettforbrenningen og utnyttelse av energi. Kombinasjonen av høy-fett diett med lav strøm førte til nedregulering av gener involvert i energiomsetningen i hjertet, noe som kan indikere økt fare for fettdeponering i hjertet. I AP4 ble det gjennomført en rekke grunnleggende studier for å øke forståelsen av fettcellenes funksjon i forbindelse med laksens immunsystem. Våre resultater tyder på at fettsyresammensetningen av adipocytter kan påvirke immunresponsen hos laks. Omega-3 fettsyrene EPA og DHA har en tilsynelatende betennesdempende effekt i motsetning til plantefettsyre, oljesyre. I et studium hvor nesten alle laksens 20-30 000 gener ble studert i fettvev fant vi at ca 500 gener er ulikt uttrykt mellom fet og mager fisk. Fet fisk har mer nyrekuttering og differensiering av fettceller en mager fisk. En rekke gener som er kjent for å være klassiske markører for fedme hos pattedyr var blant de oppregulerte genene hos fet fisk og noen av disse kan vise seg å være nyttige markører for å studere livsstilssykdommer hos oppdrettslaks.

Prosjektet har oppfylt sitt formål om å bygge opp kunnskapsbasen for utvikling av fremtidige anvendte løsninger som bidrar til reduserte tap i sjø. Prosjektet har også bidratt med en viktig koordineringsfunksjon innen Nofima (AP5) og styrket den generelle satsingen på FoU med fokus på økt robusthet og prestasjon i sjø. Sentrale moment er etablering av industri- og forskningsrådsprosjekt, utstrakt forelesningsaktivitet for industrien og publisering i vitenskapelig tidsskrift.

Innhold

1	Forord	Feil! Bokmerke er ikke definert.
2	Problemstilling og formål	1
3	Prosjektgjennomføring	2
4	Oppnådde resultater og konklusjon	3
4.1	Arbeidspakke 1: Uttesting av kjemiske injeksjonsmodeller for å måle robusthetsegenskaper	3
4.1.1	Pilot forsøk: dose-respons tester av modeller og markøranalyser.....	3
4.1.2	Evaluering av robustmodeller	4
4.2	Arbeidspakke 2: Etablering av protein assays for å studere inflammatoriske responser	8
4.3	Arbeidspakke 3: Tilvekstforsøk på laks i sjø ved ulike strømforhold og energidietter	9
4.3.1	Effekter på vekst og kvalitetsparametere	10
4.3.2	Effekter på fettdeponering i organer, hjerte- og vevsmorfologi	11
4.3.3	Effekter på fettforbrenningskapasiteten til hjerteceller	17
4.4	AP4: Studier av fettcellers immunfunksjon i laks.....	20
4.4.1	Forsøk 1: Innledende forsøk for å studere hvorvidt nivået av de lange omega-3 fettsyrene EPA og DHA i fettceller kan påvirke immunrespons	20
4.4.2	Forsøk 2: Studie av hvordan oljesyre- og DHA-anrikede adipocytter responderer på LPS	21
4.4.3	Forsøk 3: Identifisering av bio-markører som karakteriserer høyt og lavt fettinnhold i fettvev.....	24
5	Vurdering av nytteverdi for sjømatnæringen	26
6	Leveranser	27
7	Referanser	29
8	Signatur	31

1 Forord

Dette er et prosjekt som ble etablert som en koordinert satsing på «robust fisk» mellom FHF og Nofima for i fellesskap å bedre kunnskap og metodikk for å styrke robustheten til norsk oppdrettslaks. FHF prosjektet har vært toårig (01.07.2010-31.09.2012) med total budsjett på 5 millioner kroner. I samme periode har Nofima gjennomført to strategiske prosjekt med fokus på grunnleggende forskning og kompetanseheving innen temaene «robust fisk» og «ernæring og helse». Denne rapporten omhandler det FHF finansierte prosjektet. Prosjektet var organisert i fem arbeidspakker som hver ble ledet av en forsker, under felles prosjektledelse av seniorforsker Harald Takle. Prosjektets styringsgruppe bestod av Olav Breck (Marine Harvest) og Olai Einen (Nofima), mens Kjell Maroni og Merete Bjørgan Schrøder fra FHF var observatører.

2 Problemstilling og formål

Prosjektets effektmål var å utvikle kompetanse og metodikk som kan brukes til å gjøre testing og målinger av robusthetsegenskaper hos laks, med fokus på trenings- og ernæringsbehov i felt (*in vivo*) og lab (*in vitro*) samt nye robusthets-utfordringstester og biologiske markører og immunoassays. Dette vil potensielt kunne benyttes av ulike aktører i hele verdikjeden med tanke på tidlig seleksjon av robusthetsegenskaper (både mot avl og produksjon) og forbedring av helse og ernæringsstatus i produksjonssyklus, med et ultimat mål om å øke overlevelsen og derved redusere de høye tapene av laks etter utsett i sjø.

Prosjektets leveranser (resultatmål) var definert i milepælsplanen; 1) Evaluering av pilotforsøk på utfordringstester (injeksjonstester), 2) Dokumentering av utfordringstester og markører på robusthetsgrupper, 3) ELISA og Western assays for definerte cytokiner, 4) Gjennomført tilvekstforsøk i sjø med ulik strømeksponeering og diett, 5) Analyser og evaluering av sjøforsøk, 6) Gjennomført celleforsøk og analyser, 7) Avholdt prosjektmøter og styringsgruppemøter, 8) Periode-rapporter og publikasjoner fra alle AP samt sluttrapport.

3 Prosjektgjennomføring

Prosjektgjennomføring ble utført i henhold til revidert prosjektplan og omfattet forsøksplanlegging og analyser, møtevirksomhet, koordinering og rapportering/publisering. Prosjektet var forankret i Nofimas satsing på Robust-fisk og Ernæring-helse, og erfaringer og kompetanse derfra ble benyttet inn mot prosjektet.

Alle forsøk ble omsøkt og godkjent av FDU. Basert på litteratur studium ble det valgt ut relevante fysiologiske tester som skulle evalueres i laks som modellsystemer for robusthet (AP1), først i et pilotforsøk (dose-respons tester) og deretter i pågående fiskegrupper med ulik robusthet produsert i Nofimas Robust-fisk prosjekt. Biologiske responser og markører ble analysert ved blodparametere (hematocrit), funksjonell genomikk (real-time qPCR, microarrays) og bioinformatikk. I AP4 ble det benyttet primære hjerte og fettcelle-kulturer (adipocytter), henholdsvis dyrket fra robust-grupper (*ex vivo*) eller behandlet med ulike lipider og pro-inflammatorisk stimuli (LPS) (*in vitro*). Biologiske responser ble målt ved histologi (immunhistokjemi, mikroskopering) og molekylærbiologiske/biokjemiske metoder (real-time qPCR, lipid-analyser, beta-oksidasjon). Sjøforsøket (AP3) ble utført i Tromsø som et tilvekstforsøk i 2x2 faktorielt design under standard produksjonsbetingelser, med jevnlig målinger av strømhastighet i ulike dyp. Biologiske responser ble målt ved analyse av tilvekst (SGR, TGR etc), fôrutnyttelse og fordøyelighet, blodparametere (laktat, iSTAT), proksimat (hølkropp) analyse, organosomatisk index og fettsyre-sammensetning av vev, slaktekvalitet (muskelgaping, fasthet). I løpet av forsøket ble det påvist utbrudd av CMS noe som medførte aktiv avvikshåndtering og noe mindre utbytte av forsøket enn forventet. Dataene som er presentert i denne rapporten er for øvrig vurdert til å være av vitenskapelig verdi og planlagt publisert i fagfelle journaler.

4 Oppnådde resultater og konklusjon

4.1 Arbeidspakke 1: Uttesting av kjemiske injeksjonsmodeller for å måle robusthetsegenskaper

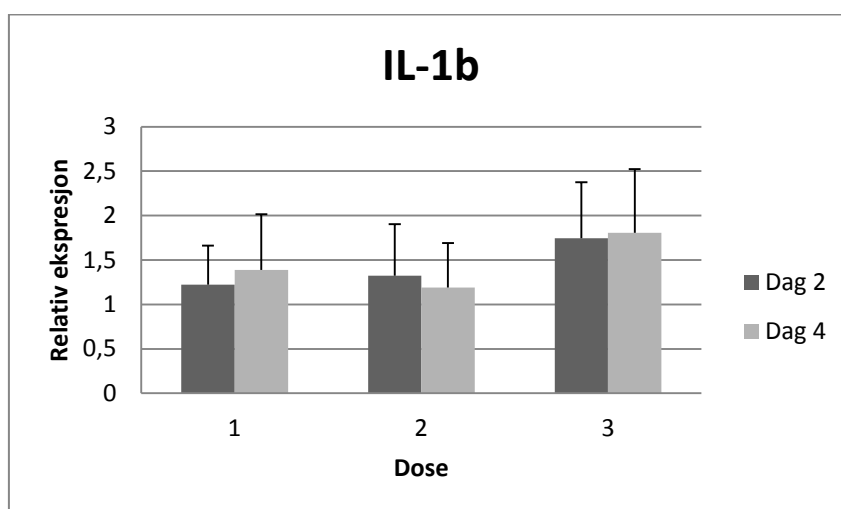
Målsetningen med denne arbeidspakken var å øke generell kunnskap om robusthetsegenskaper og evaluere potensiale for å utvikle enkle, kostnadseffektive injeksjonsmodeller og biomarkører som et nytt konsept for uttesting, evaluering og forbedring av robustheten til oppdrettslaks. Delmål var å optimalisere tre ulike injeksjonsmodeller i et pilotforsøk, evaluere modeller og identifisere endepunktsmarkører ved en bred analytisk tilnærming, samt teste og evaluere anvendelsen av modellene på grupper av laks med ulike robusthetsegenskaper i form av iboende svømmekapasitet og treningsbehandling.

4.1.1 Pilot forsøk: dose-respons tester av modeller og markøranalyser

I et pilotforsøk utførte vi en dose-respons test av fire injeksjons (i.p.) modeller på lakseparr: 1) fenylydrazin som er en kjent modell for hematologisk anemi hos fisk; 2) kombinert LPS (lipopolysakkarid fra *E. coli*) + zymosan A (glucan fra celleveggen til *S. cerevisiae*) som velkjente stimulanter av pro-inflammatoriske responser i fisk; 3) urotensin-I som induserer kardiovaskulært stress; 4) metformin som påvirker muskel og lever metabolisme. Det ble testet tre ulike doser per modell, og i tillegg hadde vi en kontroll gruppe som ble injisert med fysiologisk saltvann. Overvåking av atferd og kliniske symptomer etter ett døgn viste høy dødelighet blant gruppen som fikk høyeste dose metformin, samt uttalte blødninger under huden på dorsal side blant alle grupper som fikk urotensin. På grunn av dette samt at disse to modellene er minst dokumentert (sammenlignet med modell 1 og 2) med tanke på dosering og virkemåte i fisk, valgte vi å ikke gå videre med disse modellene. For fenylydrazin (kortnavn PHZ) og LPS/zymosan (kortnavn LPZ) ble dose-respons analyser utført på organer fra ulike tidspunkt (dag 1, 2, 3, 4). For PHZ ble effekter av dosering på hemolyse (ødeleggelse av røde blodceller med resulterende anemi) målt ved hematocrit og hemoglobin (iSTAT), som viste økt hemolyse (reduisert hematocrit) med økende dose over tid (Tabell 1, hematocrit resultater). Høyeste dose gav en kraftig hemolyse og reduksjon i hematocrit, som trolig ble patologisk (avvikende form/utseende på milt). Andre hematologiske parametre (pH, blodgasser, glukose og utvalgte ioner) viste ingen klar sammenheng med dosering og tid. Det ble også utviklet real-time RT-PCR (qPCR) assay for erythropoietin (EPO) og EPO-reseptor, og nivåer av EPO mRNA i hjerte økte med økende dose etter 1 og 2 dager, som indikerte en aktivering av nydannelse av blodceller (erythropoiesis). For LPZ ble det utført dose-respons måling basert på genuttrykk (qPCR) av tre immunologiske markører (tidligere identifiserte markører for LPS-respons, Nofima). To av markørene, interleukin 1-beta (Figur 1) og TNF decoy reseptor, viste en oppregulering (økte mRNA nivåer) med økende dose LPZ, sistnevnte kun fra dag 1 til 2. Basert på disse resultatene ble det identifisert hvilken dose og prøvetakingstidspunkt som skulle benyttes for injeksjonsmodellene. Basert på resultater av disse analysene samt på bakgrunn av patologi og dødelighet etter behandling med modell 3 og 4 (som nevnt over), valgte vi å gå videre med modell 1 (PHZ) og 2 (LPZ).

Tabell 1 Resultat fra evaluering av pilotforsøk med PHZ modellen; dose-respons måling av hematocrit ved fire tidspunkter etter PHZ injeksjon (n=5 pr dag/dose).

Dag	Kontroll	Dose 1	Dose 2	Dose 3
D1	34.3 +/- 3.6	30.0 +/- 3.0	30.3 +/- 4.7	11.6 +/- 1.5
D2	-	29.0 +/- 2.0	28.7 +/- 0.6	10.0 +/- 0
D3	-	30.4 +/- 2.2	28.5 +/- 3.1	10.0 +/- 0
D4	30.8 +/- 4.8	30.0 +/- 0.7	27.7 +/- 1.5	10.0 +/- 0

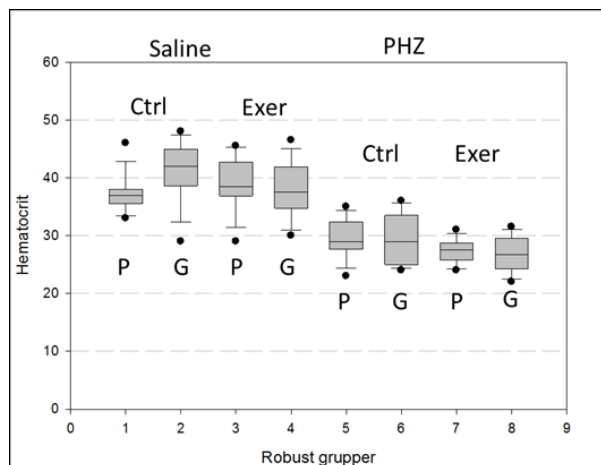


Figur 1 Resultat fra evaluering av pilotforsøk med LPZ modellen; dose-respons måling av interleukin 1-beta mRNA nivåer (kvantitativ real-time RT-PCR, n=5 pr dag/dose) ved to tidspunkter etter LPZ injeksjon.

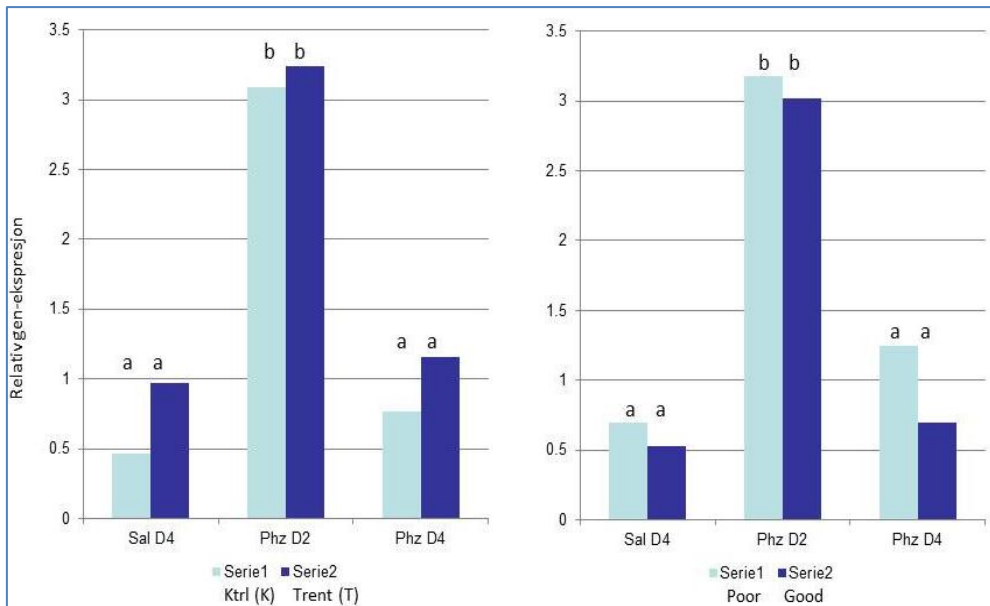
4.1.2 Evaluering av robustmodeller

For å evaluere de to injeksjonstestene som modeller for å måle robusthet i representative populasjoner av laks, ble det gjort injeksjonsforsøk (Nofima Sunndalsøra, i samarbeid med FitnessFish prosjektet) på grupper av laks (smolt) med ulik robusthet i form av: 1) *iboende, medfødt svømmekapasitet*, det vil si fisk med henholdsvis god (omtalt som 'good') og dårlig (omtalt som 'poor') svømmeutholdenhet etter rangering i en etablert svømmetest (Nofima); 2) *svømmetrening*, det vil si fiskegrupper med økt og normal fysiologisk og respiratorisk kapasitet (påvist i FitnessFish), etter behandling med henholdsvis 'myk intervalltrening' (12:12 timer med vannstrømhastighet på 0,8:1,2 kroppslengde (KL)/s) og 'lav-intensiv trening' (normal, konstant vannstrøm på 0,4 KL/s). Injeksjonsdose og prøvetakingstidspunkt etter behandling var basert på resultatene fra pilotforsøket (beskrevet over). Fra hver av modellene ble det tatt blodprøver for måling av hematocrit og hemoglobin, samt vevsprøver for analyse av gen-ekspresjonsmarkører (qPCR/microarrays). For PHZ modellen viste målinger av hematocrit i blod en moderat anemisk tilstand i fisken etter behandling (Figur 2), som forventet i henhold til resultatene oppnådd i pilot forsøket. Det var imidlertid ingen

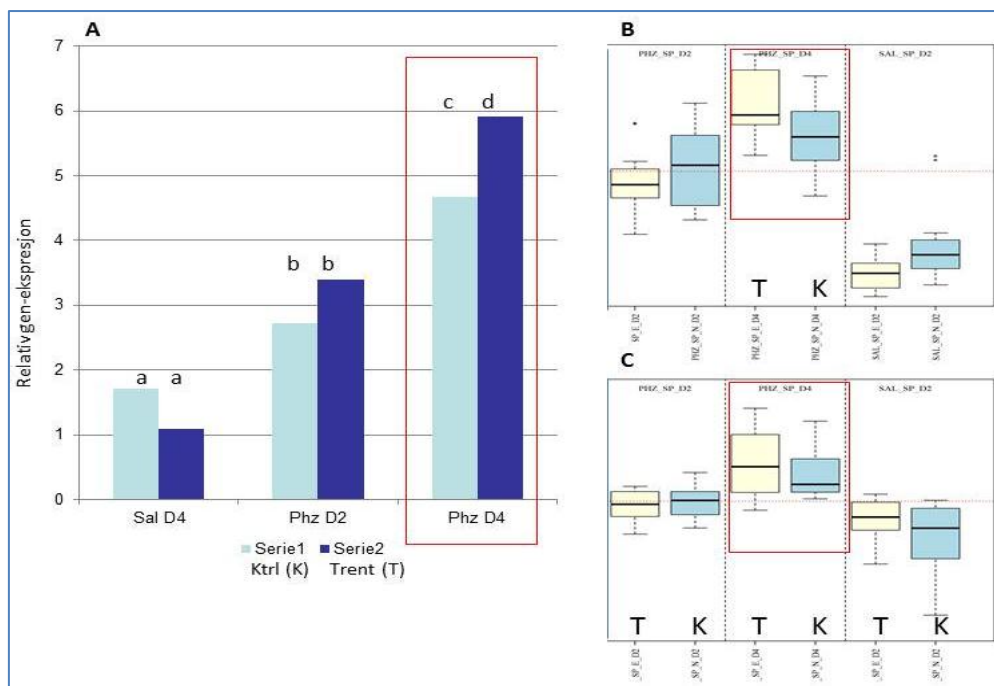
forskjell mellom de ulike robust-gruppene med tanke på hematocrit, noe som i hovedsak skyldtes betydelig individuell variasjon (Figur 2). Videre analyserte vi gen-uttrykk av EPO og EPO-reseptor (EPO-R), som viste at disse aktiveres i henholdsvis hjerte og milt for å øke produksjonen av røde blodceller som følge av PHZ behandling som induserer anemisk tilstand ved en destruksjon (hemolyse) av disse cellene. EPO i hjerte var signifikant oppregulert 2 dager etter behandling (Figur 3), men det var ingen forskjeller i responsen mellom de ulike robusthetsgruppene. Uttrykk av EPO-R var derimot signifikant høyere i trent versus utrent fisk fire dager etter PHZ injeksjon, både ved qPCR (Figur 4, venstre del) og microarray (Figur 4, høyre del) analyse, noe som indikerer en høyere kapasitet eller aktivering av nydannelse av blodceller under anemi. Rent fysiologisk kan dette understøtte de forskjellene som er påvist mellom trent og utrent laks (som observert i FitnessFish), siden EPO og dens reseptor er sentral i produksjon av røde blodceller og derved kroppens oksygentransport og respiratoriske kapasitet. Anemi er også en meget vanlig patofysiologisk tilstand under nesten alle virus-infeksjonene vi kjenner hos laks. PHZ injeksjon kombinert med EPO-R markør er i så måte en lovende modell for påvisning av fiskegrupper med ulike robusthetsegenskaper. Microarray analyser av hode-nyre viste også en interessant tendens til økt uttrykk av heme-relaterte (molekyl involvert i jern/oksygentransport) gener i trent fisk, som understøtter hypotesen om økt nydannelse av røde blodceller etter trening. Det var også interessant at stress-relaterte gener var lavere uttrykt i milt til den trente gruppen både før (kontroll/salin-behandling) og etter PHZ, som er i tråd med våre tidligere observasjoner.



Figur 2 Evaluering av PHZ modellen ved hematocrit måling i blod fra ulike robusthetsgrupper av laks (Ctrl=utrent, Exer=trent, P/G=dårlig/god svømmekapasitet) etter injeksjon med PHZ og salin (kontroll).

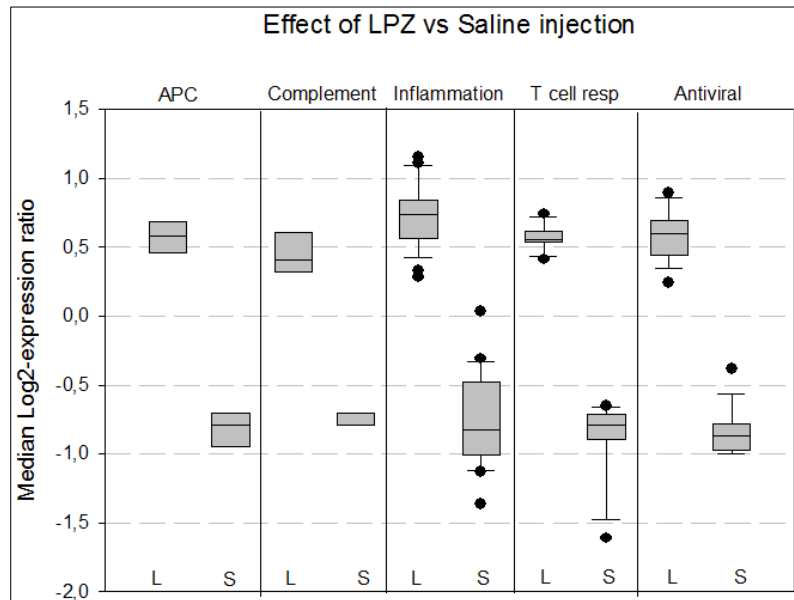


Figur 3 Analyse av EPO gen-ekspressjon i hjerte viser at nydannelsen av røde blodceller er aktivert, men det er ingen forskjell mellom ulike robusthetsgrupper (venstre graf: trent vs utrent laks, høyre graf: dårlig (poor) vs god (good) svømmekapasitet), 2-4 dager etter PHZ injeksjon.

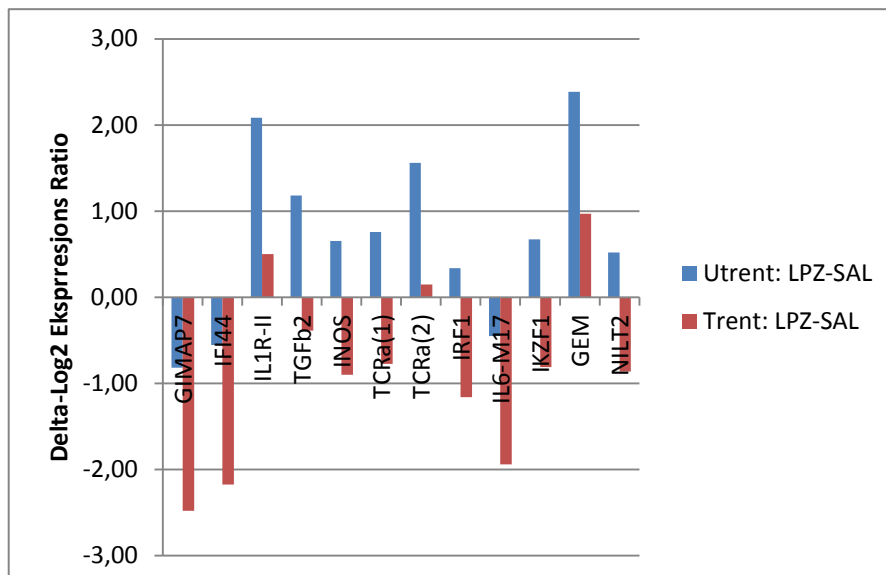


Figur 4 Gen-markører som er oppregulert og som evner å skille mellom ulike robusthetsgrupper (trente T vs utrente ktrl K, se røde bokser) 4 dager etter PHZ injeksjon. A (venstre): EPO-reseptor ved qPCR, B (høyre, over): EPO-reseptor ved microarray analyse, og C (høyre under): CD59 antigen ved microarray analyse.

Tilsvarende som for PHZ, ble LPZ modellen først evaluert med hensyn på forventede responser i fisken fra de ulike robusthetsgruppene. Microarray analyser av milt viste at valgte dose LPZ aktiverte et bredt utvalg av immunresponser, som for eksempel medførte anti-virus komponenter, antigen-presentasjon, komplement, inflammatoriske gener og T celler (Figur 5). Analyser av hjerte viste ingen klare responser, men enkelte immun-relaterte gener trolig involvert i monocyttære og lymfocyttære responser (basert på kunnskap fra pattedyr) var høyere uttrykt etter LPZ injeksjon.



Figur 5 Evaluering av LPZ modellen ved microarray analyse viser at LPZ gir en bred aktivering av immun-responser i milt. L- LPZ, S-saline.



Figur 6 Gen-markører for LPZ modellen som kan skille mellom ulike robusthetsegenskaper (trent vs utrent laks) 4 dager etter injeksjon med LPZ. Trent laks har lavere uttrykk av inflammatoriske gener. Stolpene referer til microarray log2-geneksprersjonsratio (differanse trent vs utrent >1.5), n=6 pr gruppe, p<0.05 (t-test).

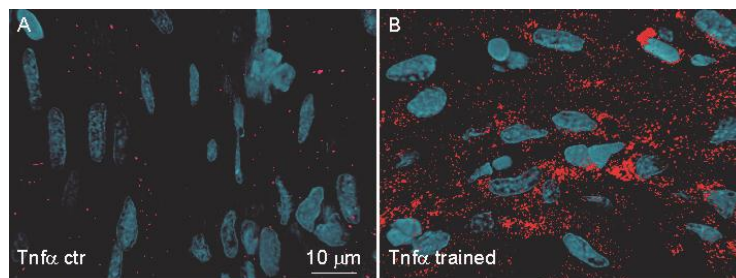
Microarray analyser av robust-gruppene viste størst forskjeller mellom gruppene med og uten trening og i milt, med en klar trend til lavere uttrykk av gener som styrer antivirus-, inflammatoriske- og T celle-responser (funksjon predikert basert på kunnskap fra pattedyr) i trent versus utrent fisk (Figur 6). Dette er i tråd med våre tidligere observerte positive anti-inflammatoriske effekter av trening (Castro et al., 2013a,b), og viser at tilsvarende kontraster kan observeres i respons på injeksjon med LPZ. Mer detaljert kunnskap om egenskaper til hver enkelt av disse genene i laks er det vanskelig å si noe om, siden ingen funksjonelle studier er gjort, men to av genene (IL-1R-II og IL-6) tilhører gruppen av interleukiner, som inneholder noen av de mest sentrale inflammatoriske cytokinene i immunforsvaret. Et interessant funn var at en av markørene (GIMAP7) viste tilsvarende forskjeller i uttrykk også i hjertevev for både utrente vs trente og dårlige vs gode svømmere (data ikke vist her), og er i så måte en lovende markør for å skille mellom robust-egenskaper ved bruk av LPZ injeksjon som modellsystem. Funksjonen til dette genet i fisk har ikke blitt studert. Vi analyserte også 5 markører, tidligere assosiert med positive treningseffekter (fra FitnessFish prosjektet), i et større antall trente/utrente individer (i milt) etter LPZ behandling ved qPCR (data ikke vist). Alle genene var signifikant oppregulert etter LPZ injeksjon, og en av disse, IL1-reseptor antagonist (IL1RA), var signifikant lavere uttrykt i trente vs utrente LPZ fisk, og i så måte en god markør for robusthetstesting ved LPZ modellen. Dette genet er involvert i reguleringen av en av de mest sentrale inflammatoriske cytokinene, interleukin 1 (IL-1). En annen interessant observasjon var at to gener kodende for EPO-R precursor og angiopoietin-like 7 var langt sterkere oppregulert i hjertet hos trente vs utrente fisk etter LPZ (data ikke vist), noe som understøtter observasjonene fra PHZ forsøket om at EPO og kardiovaskulære responser er positivt korrelert med trening.

Oppsummert har vi i denne arbeidspakken testet relevante injeksjonsmodeller som et nytt konsept for å måle robusthetsegenskaper hos laks. Fra et pilotforsøk med dose-responsforsøk på fire modeller gikk vi videre med to modeller; induksjon av hematologisk anemi ved injeksjon av fenyhydrazin og stimulering av pro-inflamasjon ved injeksjon av LPS+zymosan. Disse modellene ble evaluert i grupper av laks med ulike robusthetsegenskaper, med fokus på evaluering av mekanismer og identifisering av markører. Valgte doser og responstid gav forventede responser, og gen-markører som kan skille mellom grupper med ulik robusthet ved hjelp av real-time qPCR ble identifisert (Krasnov et al., innsendt).

4.2 Arbeidspakke 2: Etablering av protein assays for å studere inflammatoriske responser

Vi har tidligere vist at robusthet (i form av aerob trening) er forbundet med lavere basalnivå av betennelsesreaksjoner hos laks (Castro et al. 2011). Dette er også utførlig beskrevet i human medisin for en rekke patofysiologiske tilstander. Våre studier av virus-sykdommer hos laks (ILA og CMS) har også indikert at høyere uttrykk av medfødte immunforsvarsgener og inflammatoriske gener er forbundet med økt vevsskade tidligere død (bl.a. Jørgensen et al., 2008, Timmerhaus et al., 2012). Økt forståelse av basale og patologiske betennelsesreaksjoner er med andre ord meget sentralt i studier av robusthetsegenskaper hos fisk. Hittil har slike studier i laks (og fisk generelt) fokusert på genuttrykksnivå (mRNA

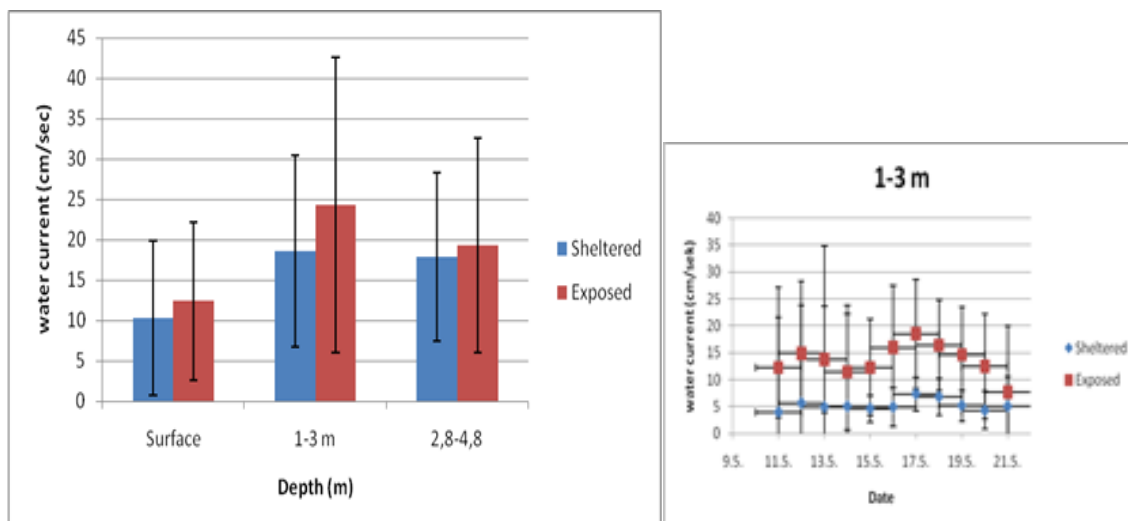
transkripsjon ved PCR), men for å forstå disse responsene på et funksjonelt nivå er det stort behov for utvikling av metodikk for å måle på proteiner. Målet med denne arbeidspakken var derfor å etablere ELISA assays for følgende cytokiner (betennelsesmolekyler): TNFa, Il-1b, Il-6, Il-8 og Il-10. Polyklonale antistoffer ble laget for oss ved Universitetet i Valparaiso (PUCV), Chile (I påvente av at PUCV publiserer nødvendig dokumentasjon på antistoffene kan Dr. Luis Mercado kontaktes vedrørende dokumentasjon på spesifisitet, kjøp etc). Til utvikling av testene brukte vi vevsmateriale fra laks med IPN-infeksjon og LPS behandling. Etter mange runder med uttesting av protokoller, ble det konkludert at antistoffene ikke virker i ELISA, og bestemt å etablere andre immunoassays. Dette resulterte i et immunohistokjemisk assay for TNF-alpha (Figur 7), som allerede er brukt inn i flere forsøk og publikasjoner (Castro et al., 2013b; Takle og Castro, 2013).



Figur 7 Immunohistokjemisk deteksjon av TNFa i hjertevev fra trent og utrent laks.

4.3 Arbeidspakke 3: Tilvekstforsøk på laks i sjø ved ulike strømforhold og energidietter

Hensikten med denne arbeidspakken var å undersøke samspillseffekter mellom fettinnhold i fôr (energistatus i fisk) og svømmeaktivitet på produksjonsegenskapene vekst, fôrutnyttelse og kvalitet. Det ble utført et sjøforsøk med stor laks (snittvekt 1,4 kg) hvor vi testet effekter av henholdsvis høyt fett (35 %) og lavt fett (25 %) i dietten samt eksponering for lav eller høy strømhastighet. Det ble brukt et 2x2 faktorielt design og med 3 replikater pr behandling over en periode på 3 måneder (august-november). Resultatene ble analysert ved hjelp av toveis ANOVA med samspillsledd. Signifikante forskjeller ($P < 0,05$) samt resultater som tenderte til å være påvirket av behandlingene ($0,05 < P < 0,10$), ble rangert vha. Duncan test. Målinger av strømhastighet viste en variasjon gjennom døgnet, men for lavstrømgruppen var hastigheten nokså stabil og lå under 10 cm/s 90 % av tiden mens den i høystrømgruppen lå under 10 cm/s halvparten av døgnet, med topper opp mot 50 cm/s (Figur 7).



Figur 7 Gjennomsnittsmålinger av strømhastighet i skjermede og eksponerte merder i etterkant av forsøket (venstre) viser typisk høyere strøm i eksponerte, men kun signifikant forskjellig fra skjermede ved 1-3 m dyp (Anova $F_{1,181}=6,49$; $P= 0,012$). Høyre- i forkant av forsøket ble det målt signifikant høyere strøm ($p<0,05$) i eksponerte merder ved alle dyp (her kun 1-3m vist).

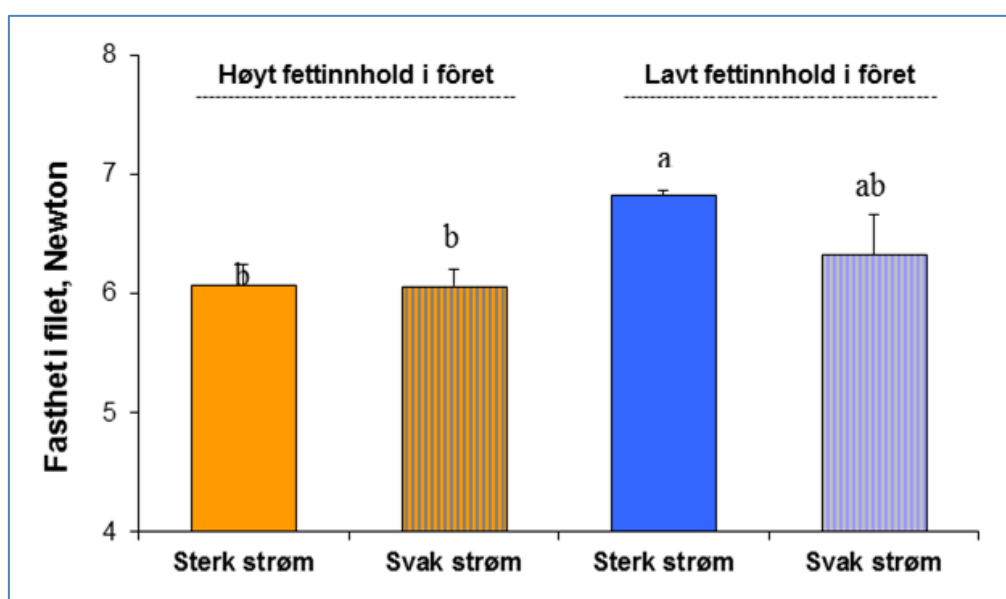
4.3.1 Effekter på vekst og kvalitetsparametere

Resultatene viste ingen effekt av fôr på tilvekst og fôrutnyttelse. Mest sannsynlig skyldes dette et generelt lavt fôrinntak på grunn av påslag av skottelus under oppstart av forsøket og påfølgende CMS utbrudd. Strømstyrke tenderte til å påvirke sluttvekt, vektøkning, tilvekst og fôrutnyttelse (Tabell 2), men også her er det knyttet usikkerhet til effekt av skottelus og CMS utbrudd. Laksen som ble holdt i høyeste strømeksposering viste de beste produksjonsresultatene. Resultatene viste også en tendens til samspill mellom fôr og strøm. Den største tilveksten ble observert hos laks fôret høy-energi fôr og holdt i høy strøm, mens den dårligste tilveksten ble observert på fisk fôret høy-energi fôr i lav-strøms merder. Slaktekvalitet ble analysert som muskelfasthet og gaping. I lav-fett gruppen ble det funnet en positiv effekt av høy strøm for både muskelfasthet og gaping (Figur 8). Videre var laksen som fikk lavfett fôret generelt fastere i kjøttet. Tidligere FHF prosjekter (2008-2012) har vist at innblanding av visse proteinkomponenter i fôret gir forbedret fasthet av laksefilet. Resultatene fra dette forsøket aktualiserer uttesting av hypotesen om at et generelt forhøyet proteinnivå i fôret kan ha en positiv effekt på fastheten. I 2008-2009 ble det utført en landsomfattende kartlegging av teksturegenskaper i oppdrettslaks med gjentatte fasthetsmålinger ved mange kommersielle lokaliteter (FHF-prosjekt 571024, "Fastere laks"). Det kan være vanskelig å oppnå entydige resultater fra storskalaforsøk ved ulike lokaliteter siden mange sammenfallende faktorer kan påvirke resultatene (geografiske-/miljøforhold mm), men det var sterke indikasjoner på at laks fra strømutsatte lokaliteter var fastere i kjøttet enn laks fra lokaliteter med lite strøm.. Dette kan tyde på at det ligger et potensial i å kombinere økt svømmeaktivitet med proteinrike dietter for å bedre produktkvalitet. Særlig kan dette være aktuelt å teste ut i perioder der laksen synes å være spesielt utsatt for å utvikle bløt tekstur, for eksempel i forbindelse med spurtvekst som gjerne er årstidsavhengig.

Hvilken årstid som er særlig kritisk vil variere med geografiske forhold og i forhold til fiskemateriale (tidspunkt og størrelse ved sjøutsett m.m.). Det ble også gjort analyser av helkropps-sammensetning (proksimat analyse), organosomatisk index (lever, hjerte), blodparametere (laktat, iSTAT), total-lipid og fettsyresammensetning i ulike vev, men foruten fettfordeling (se AP4) ble ingen effekter av strøm, diett eller begge påvist.

Tabell 2 Vektøkning og vekstrater for forsøksgruppene på lav-fett (LF) og høy-fett (HF) diett ved lav-strøm (LS) og høy-strøm (HS). Resultatene ble analysert ved hjelp av toveis ANOVA med samspillsledd. Signifikante forskjeller ($P < 0,05$) samt resultater som tenderte til å være påvirket av behandlingene ($0,05 < P < 0,10$), ble rangert vha. Duncan test.

	LFLS	HFLS	LFHS	HFHS	S.E.M	p-verdi
Vektøknin g	1070.6 ^{ab}	856.0 ^b	1074.5 ^{ab}	1508.5 ^a	163.7	0.083
SGR	0.59 ^{ab}	0.49 ^b	0.59 ^{ab}	0.76 ^a	0.07	0.077
TGC	3.33 ^{ab}	2.71 ^b	3.33 ^{ab}	4.38 ^a	0.41	0.078

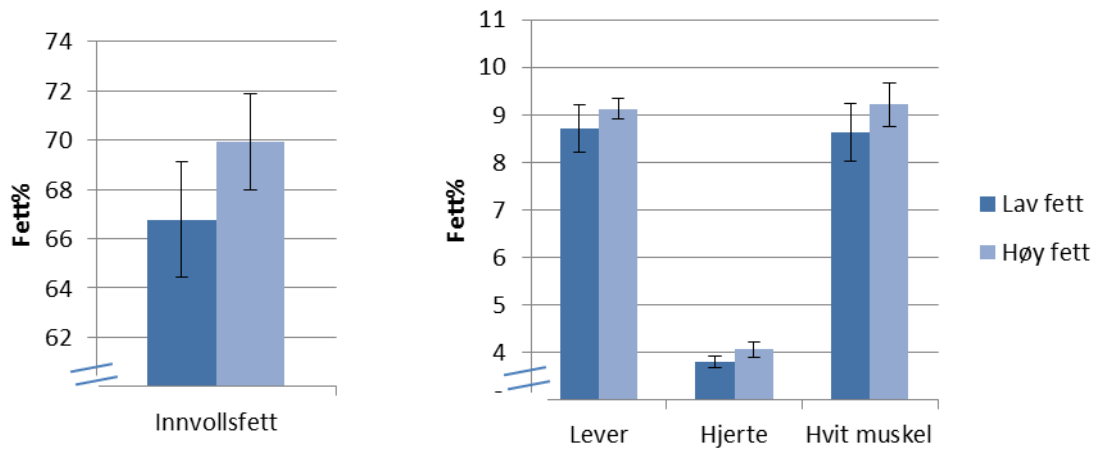


Figur 8 Laks i merder med høy strøm og lav-fett diett har bedre filetkvalitet i form av økt fasthet.

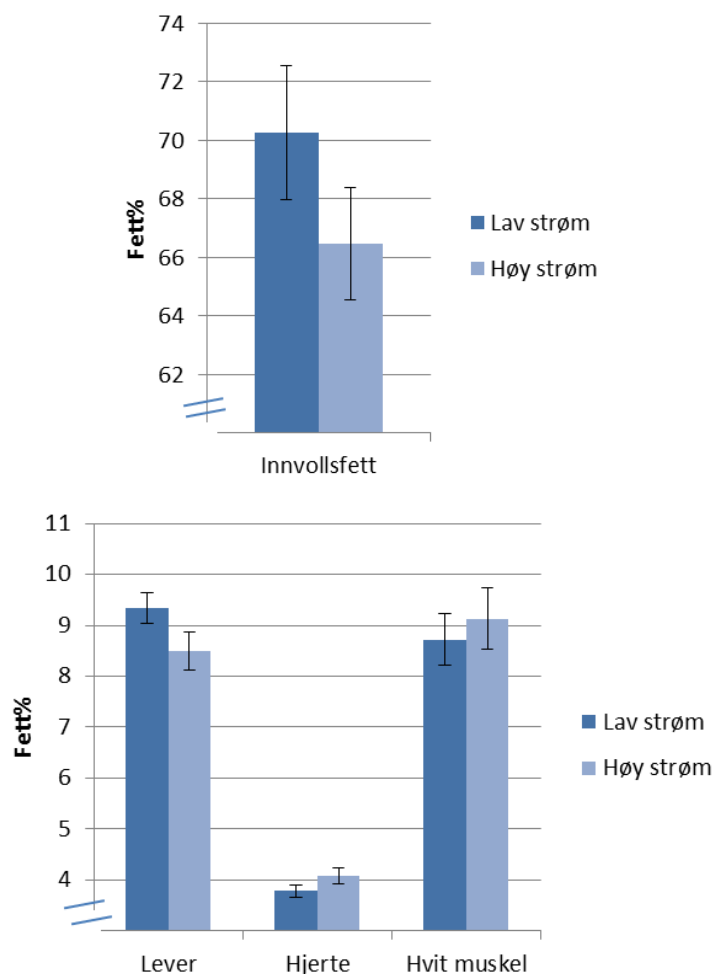
4.3.2 Effekter på fettdeponering i organer, hjerte- og vevsmorfologi

Figur 9 viser tendens til økt fettdeponering i både innvolls fett, lever, hjerte og hvit muskel i høyfettgruppen sammenlignet med lavfettgruppen. Forsøksfisker oppnådde relativt lave fettnivåer i vev og organer, noe som antagelig skyldes det lave forinntaket på grunn av påslag av skottelus og CMS utbrudd. Normalt ville man forventet langt høyere grad av fettdeponering i i muskel og innvolls fettvevet i løpet av forsøksperioden fra august til november. Resultatene viste videre en tendens til redusert fettnivå i innvolls fett og lever i

høystrømsgruppene sammenlignet med lavstrømsgruppene (Figur 10). Våre resultater viste videre en tendens til økt fettdeponering i hjerte og hvit muskel med økt svømmeaktivitet. Denne tendensen overensstemmer med lignende observasjoner fra menneske, hvor utholdenhetsidretter er vist å føre til økt fettnivå i muskel og hjerte, og viser en tilpasning til økt bruk av lipider som energikilde under aerob trening.



Figur 9 Effekt av fettnivå i fôr på fettprosent i innvollsfett, lever, hjerte og hvit muskel. Verdiene viser gjennomsnitt av fettnivåene i alle lavfett og høyfett grupper (inkludert grupper ved lav og høy strøm) \pm SE . N=3. Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene.



Figur 10 Effekt av strømhastighet på fettprosent i innvollsfett, lever, hjerte og hvit muskel. Verdiene viser gjennomsnitt av fettnivåene i alle lavstrøm og høystrøm gruppene (inkludert høy fett og lavfett). N=3. Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene

Tabell 3 viser et lite utvalg av sentrale fettsyrer som prosent av totalfettsyre i hjerte, lever, muskel og innvollsfett. Forsøket viste få forskjeller i fettsyresammensetning mellom de ulike gruppene. Det var ingen signifikante forskjeller i EPA og DHA nivået i lever, hjerte og muskel. Det var signifikant moderat lavere prosent EPA og DHA i innvollsfettet i høyfettgruppen sammenlignet med lavfettgruppen. Justeres denne verdien for det høyere totale fettnivået i gruppen, så blir det ingen signifikante forskjeller i EPA og DHA nivået per gram innvollsfettvev. Det var forøvrig signifikant høyere prosent arakidonsyre, 20:4n-6, i høyfettgruppen enn i lavfettgruppen i både hjerte, lever, muskel og innvollsfett. Vi har tidligere vist at økt nivå av denne fettsyren i fisken kan føre til økt produksjon av det pro-inflammatoriske eikosanoidet, PGE₂ (Gjøen et al., 2007, Ytteborg et al., 2009).

Tabell 3. Fettsyresammensetning (% av total fettsyre) for et lite utvalg fettsyrer i hjerte, lever, muskel og innvollsfett. Tabellen viser effekt av strøm og fettnivå. N=3. Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller ($p < 0,05$).

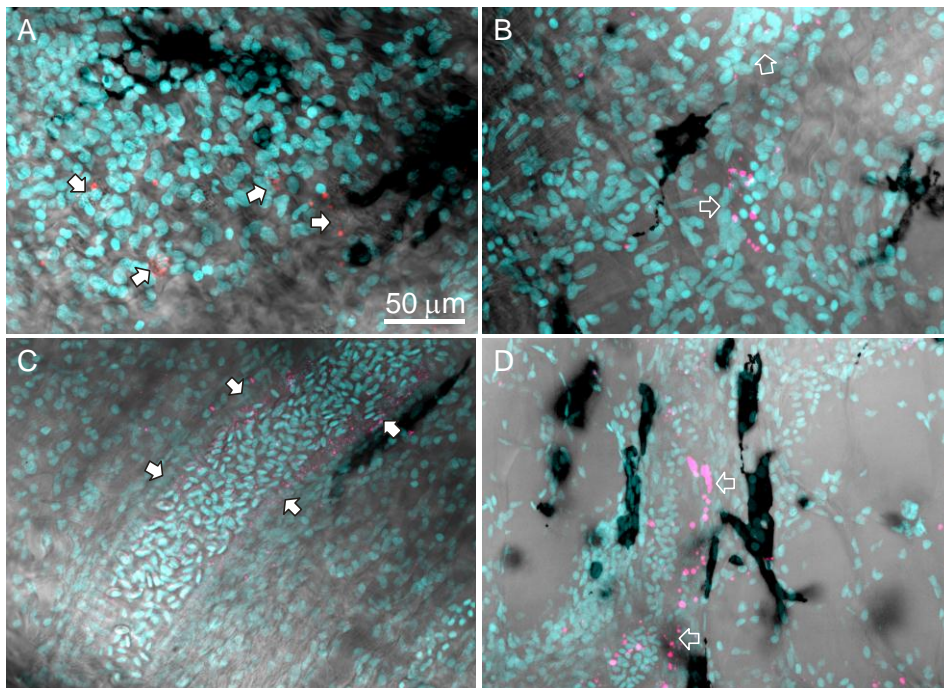
Hjerte	Strøm				Fôr			
	Lav	SE	Høy	SE	Lav	SE	Høy	SE
C18:1 N-9	20.71 ± 0.41 ^a		21.13 ± 0.67 ^a		20.36 ± 0.60 ^A		21.48 ± 0.37 ^A	
C18:2 N-6	6.99 ± 0.13 ^a		7.04 ± 0.18 ^a		6.83 ± 0.17 ^A		7.19 ± 0.10 ^A	
C20:4 N-6	5.30 ± 0.19^a		5.32 ± 0.24^a		4.96 ± 0.18^A		5.66 ± 0.10^B	
C20:5 N-3	6.09 ± 0.12 ^a		6.08 ± 0.18 ^a		6.11 ± 0.19 ^A		6.07 ± 0.10 ^A	
C22:6 N-3	17.07 ± 0.52 ^a		16.59 ± 0.61 ^a		17.10 ± 0.69 ^A		16.56 ± 0.39 ^A	
ΣEPA/DHA	23.16 ± 0.62 ^a		22.67 ± 0.78 ^a		23.21 ± 0.87 ^A		22.62 ± 0.48 ^A	
Lever								
C18:1 N-9	30.99 ± 0.51 ^a		29.95 ± 0.81 ^a		31.06 ± 0.78 ^A		29.89 ± 0.53 ^A	
C18:2 N-6	5.53 ± 0.28 ^a		5.50 ± 0.27 ^a		4.97 ± 0.13 ^B		6.05 ± 0.13 ^A	
C20:4 N-6	6.50 ± 0.34^a		6.39 ± 0.39^a		5.68 ± 0.09^B		7.22 ± 0.15^A	
C20:5 N-3	4.30 ± 0.16 ^a		4.69 ± 0.25 ^a		4.43 ± 0.27 ^A		4.56 ± 0.18 ^A	
C22:6 N-3	9.58 ± 0.29 ^a		10.32 ± 0.58 ^a		9.99 ± 0.53 ^A		9.92 ± 0.43 ^A	
ΣEPA/DHA	13.88 ± 0.40 ^a		15.01 ± 0.82 ^a		14.42 ± 0.78 ^A		14.48 ± 0.59 ^A	
Muscle								
C18:1 N-9	32.01 ± 0.20 ^a		31.97 ± 0.42 ^a		31.77 ± 0.39 ^A		32.21 ± 0.21 ^A	
C18:2 N-6	9.58 ± 0.06 ^a		9.42 ± 0.15 ^a		9.34 ± 0.07 ^A		9.67 ± 0.11 ^B	
C20:4 N-6	7.49 ± 0.13^a		7.47 ± 0.15^a		7.23 ± 0.08^A		7.73 ± 0.09^B	
C20:5 N-3	2.54 ± 0.03 ^a		2.48 ± 0.05 ^a		2.52 ± 0.05 ^A		2.50 ± 0.03 ^A	
C22:6 N-3	4.64 ± 0.11 ^a		4.64 ± 0.15 ^a		4.72 ± 0.15 ^A		4.57 ± 0.11 ^A	
ΣEPA/DHA	7.18 ± 0.13 ^a		7.13 ± 0.20 ^a		7.23 ± 0.19 ^A		7.07 ± 0.13 ^A	
Innvollsfett								
C18:1 N-9	32.20 ± 0.28 ^a		32.10 ± 0.41 ^a		31.56 ± 0.28 ^B		32.74 ± 0.17 ^A	
C18:2 N-6	9.85 ± 0.10 ^a		9.79 ± 0.15 ^a		9.62 ± 0.12 ^B		10.01 ± 0.06 ^A	
C20:4 N-6	7.53 ± 0.19^a		7.52 ± 0.17^a		7.16 ± 0.09^B		7.89 ± 0.07^A	
C20:5 N-3	2.22 ± 0.03 ^a		2.26 ± 0.03 ^a		2.28 ± 0.03 ^A		2.21 ± 0.02 ^B	
C22:6 N-3	3.38 ± 0.11 ^a		3.48 ± 0.06 ^a		3.56 ± 0.08 ^A		3.29 ± 0.06 ^B	
ΣEPA/DHA	5.60 ± 0.14^a		5.74 ± 0.09^a		5.84 ± 0.11^A		5.50 ± 0.08^B	

Effekter av strøm og diett på hjerte- og fettvevsmorfologi ble undersøkt fra tilvekstforsøket i sjø. Vev ble isolert fra fisk i de ulike gruppene og deretter fiksert og preparert for mikroskopi og RNA analyser. På grunn av CMS utbrudd i sjøforsøket, ble hjerter fra all fisk som ble benyttet i biokjemiske studier undersøkt histopatologisk og bare individ med lav histoscore ble benyttet til analysene beskrevet for fett og hjertevev.

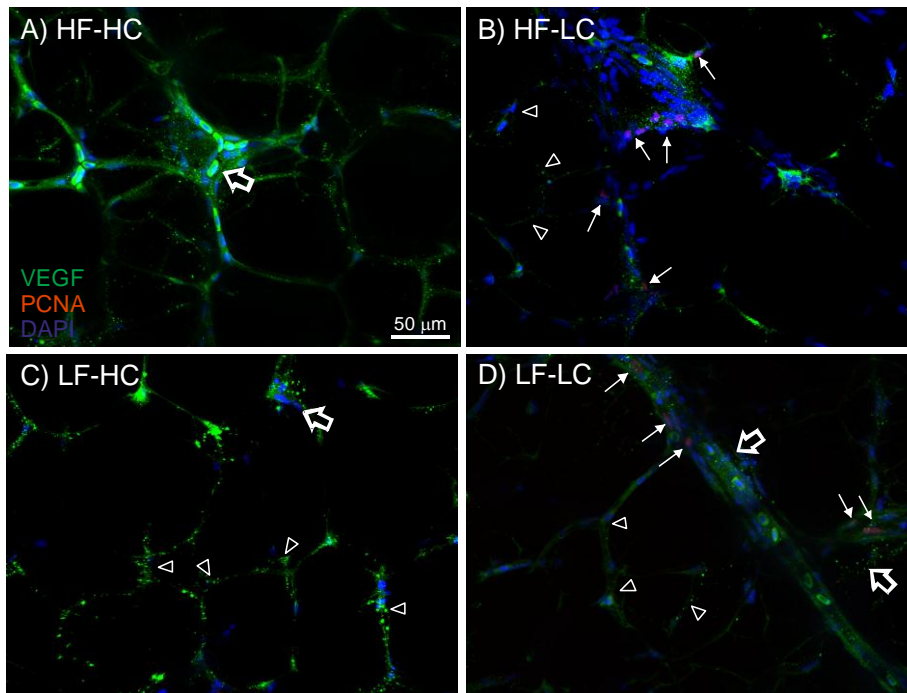
Resultatene viste at aktivitetsnivå i form av høy strøm påvirker positivt vaskularisering av hjertet. Undersøkelser av epikard fra fisk fôret med lav eller høyenergifôr viste at liten fysisk aktivitet reduserer VEGF-mediert (vascular endothelial growth factor) nydannelse av blodårer og medfører unormal proteinlokalisering i blodåreveggen på eksisterende vaskulatur (Figur 11). Tidligere forsøk har vist at laks med lavt aktivitetsnivå har 20 % lavere hjertevekt (Castro *et al*, 2013b). I dette forsøket ser vi at trening (høy strøm) stimulerer nydannelse av blodårer som følge av at den økte muskelmassen i hjertets kompaktlag trenger mer oksygen ved økt

aktivitet. I intraperitonalt fettvev var nyrekruttering av celler høyest i fisk med lavt aktivitetsnivå uansett diett. Dette indikerer økt mengde intraperitonalt fettvev i inaktiv fisk, og disse individene hadde også mindre nydannelse av blodårer (lavere grad av vaskularisering) (Figur 12). Et høyt innhold av fett i fettceller kan medføre oksidativt stress og aktivering av betennelsesfremmende cytokiner. Induserbar nitrogenoksid syntase (iNOS) er et tegn på dette, og vi fant effekt av både diett og aktivitetsnivå. Fisk på høyfett før viste høyere iNOS aktivitet enn fisk på lavenergifôr. Videre så vi en positiv effekt av aktivitet (strøm) med redusert oksidativt stress (Figur 13).

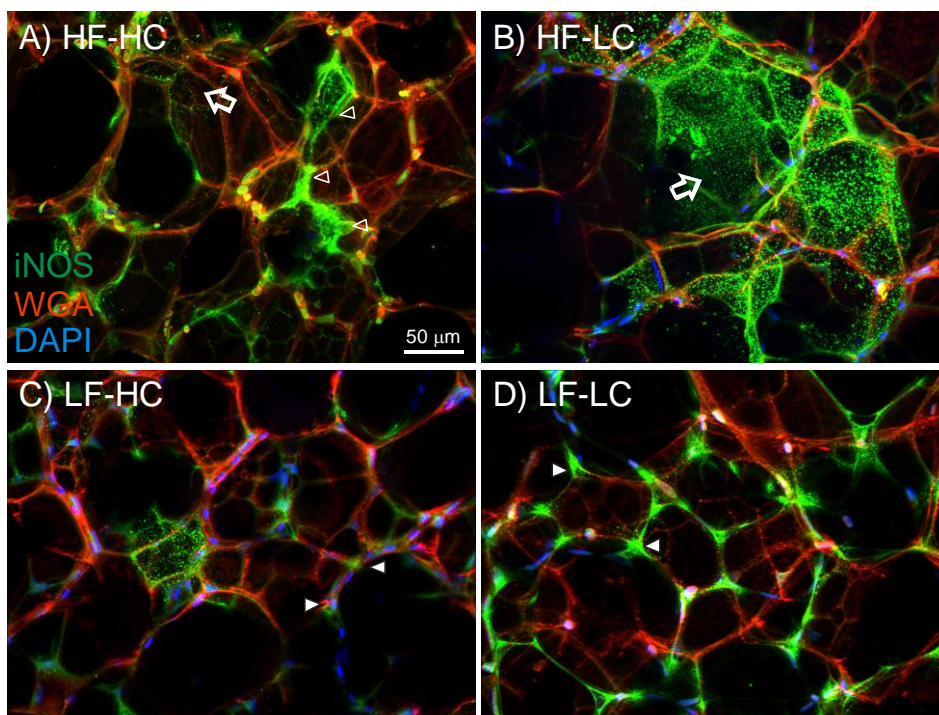
Oppsummert tydet våre funn på at trening ved økt strømhastighet fører til økt vaskularisering av både hjerte- og innvollsfettvev. Videre antydte våre data at et høyt innhold av fett i fettceller kan medføre økt risiko for oksidativt stress og aktivering av betennelsesfremmende cytokiner og eikosanoider. Økt svømmeaktivitet kan ha en positiv effekt ved å redusere grad av fettdeponering i innvollsfett og lever og dermed å redusere risikoen for oksidativt stress og systemiske betennelsesreaksjoner.



Figur 11 Mikroskopi av VEGF (rødt) aktivitet i hjerteoverflaten hos trent ($n = 5$) og utrent ($n = 8$) laks på høyfett fôr. Svarte flekker er melanocytter i epikard. A) Opphopninger av VEGF aktivitet i celledannelser som er i ferd med å danne nye blodårer i epikard hos en trent laks. B) Lavt aktivitetsnivå reduserte områdene med VEGF positive celler og disse hadde i tillegg unormale ansamlinger av proteinet. C) Jevn fordeling av VEGF signaler i en større blodåre fra trent fisk. D) Lavt aktivitetsnivå så ut til å resultere i mer ustrukturerte blodårevegger med manglende eller aggregerte VEGF signaler.



Figur 12 Mikroskopi av celleprolifisering (PCNA, rød) og vaskularisering (VEGF, grønn) i intraperitonealt fettvev. A) Høyfett diett og trening medfører ikke nydannelse av fettceller (ingen røde PCNA signaler). Nydannelse og vedlikehold av eksisterende blodårer er mediert av VEGF. B) Utrent fisk på høyfett diett har aktiv rekruttering av nye fettceller (piler). Sammenlignet med trent fisk har de lavere VEGF aktivitet utenfor allerede etablerte blodårer (pilhoder). C) Trent laks på lavenergifôr har ingen celleprolifisering og aktiv nydannelse av blodårer. D) Lavenergifôr og manglende trening resulterer i noe nydannelse av vaskulatur (piler). Eksisterende blodårer (åpen pil) vedlikeholdes mens nydannelse er meget lav. Antall analyserte prøver: HF-HC (n = 5), HF-LC (n = 8), LF-HC (n = 7), LF-LC (n = 6).



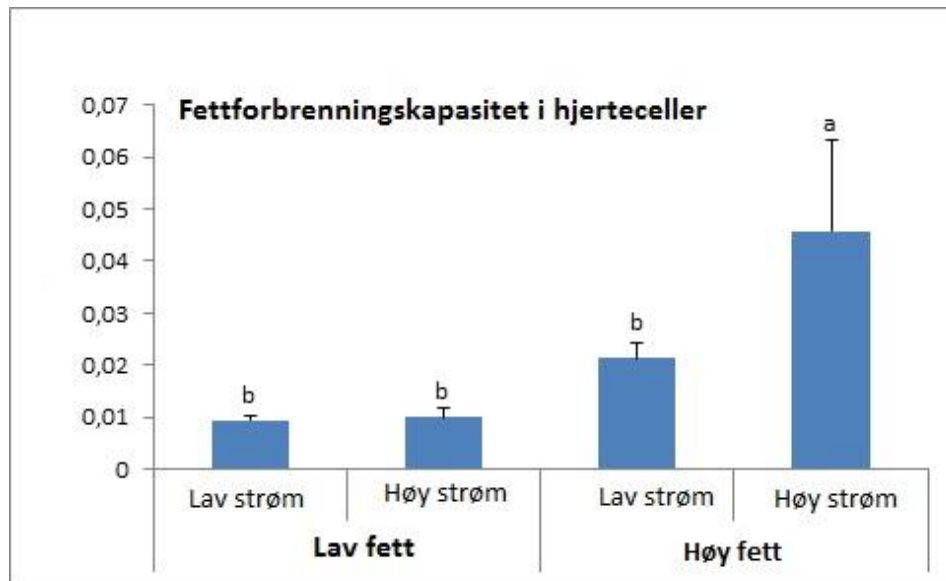
Figur 13 Mikroskopi av oksidativt stress i intraperitonealt fettvev ved hjelp av immunofluorescens påvisning av iNOS (grønn). Cellemembraner er farget med WGA (rød) og cellekjerner med DAPI (blå). A) I fisk fra høyfett diett med trening ser vi noe iNOS aktivitet i adipocytterne (hvit pil) og sterkere farging av leukocytter (pilhoder). B) Utrent laks på høyfett diett har meget sterk iNOS aktivitet i mange fettceller (pil). C) Lavfett og trening gir mindre iNOS aktivitet selv om noen celler kan vise høyere grad av oksidativt stress. D) Lavenergifôr og lav fysisk aktivitet gir endret iNOS lokalisering som kan sees i cellemembranen der flere celler er festet til hverandre (pilhoder). Antall analyserte prøver: HF-HC (n = 5), HF-LC (n = 8), LF-HC (n = 7), LF-LC (n = 6).

4.3.3 Effekter på fettforbrenningskapasiteten til hjerteceller

For at et hjerte skal fungere optimalt må det ha stor kapasitet til å utnytte ulike næringsstoff som energikilde. Hjertet hos pattedyr er vist å benytte lipider som hoved-energikilde, ca 70 % av energien kommer fra oksidasjon av fettsyrer under fysiologisk arbeidsbelastning. Hos laksefisk har vi mindre kunnskap, men en vet at fettforbrenning er viktig også for laksens hjerte (Takle og Castro, 2013). Et av målene med denne studien var derfor å videreutvikle metode for dyrking av hjerteceller i kultur for å muliggjøre inngående metabolske studier og for å undersøke om trening fører til økt utnyttelse av fett både *in vivo* og *in vitro*.

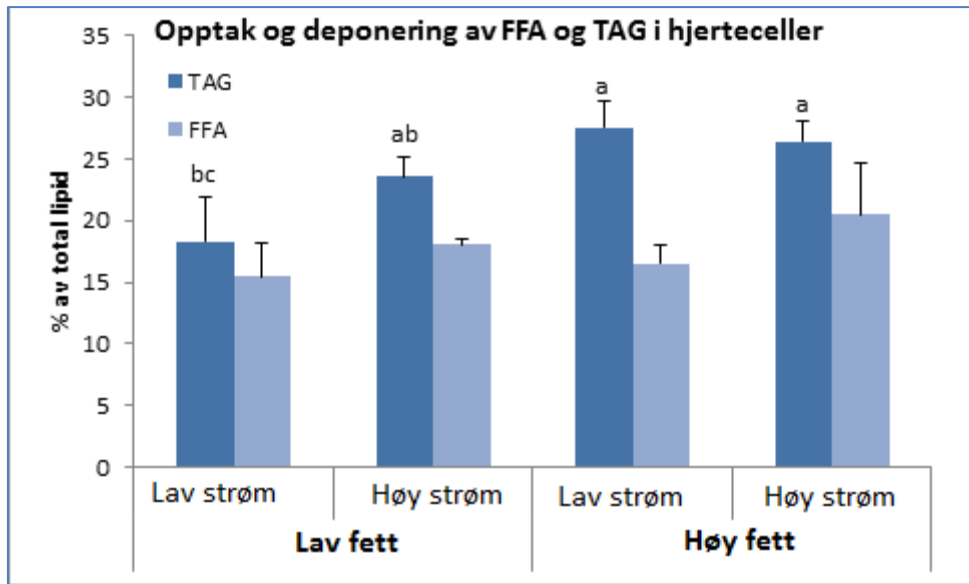
Forut for isolering av hjerteceller (cardiomyocytter) hadde laksen blitt føret med henholdsvis høyt eller lavt fettnivå og holdt i nøter med lav eller høy vannstrøm for å stimulere til ulik grad av svømmeaktivitet (trening) i henhold til beskrivelsen av tilvekstforsøket i sjø. Cardiomyocytter ble isolert fra laksehjerte fra fisk i de ulike gruppene. De isolerte hjertecellene ble deretter dyrket i vekstmedium tilsatt den radioaktivt merkede fettsyren

palmitinsyre som energisubstrat. Cellenes evne til å utnytte det radioaktive lipidsubstratet ble analysert ved å måle produksjonen av radioaktivt merkede oksidasjonsprodukter. Celler isolert fra fisk i de ulike gruppene ble også analysert for uttrykk av gener med en viktig funksjon i fettomsetning. Analyseresultatene (Figur 14) viser at hjerteceller isolert fra laks fôret med høy-fett diett har signifikant høyere fettforbrenningskapasitet i høystrøms-gruppen enn i lavstrøms-gruppen. Dette stemmer godt overens med resultat fra våre tidligere forsøk som har vist at trening av pre-smolt i kontrollerte forsøk signifikant øker uttrykket av en rekke gener som er sterkt assosiert med hjertets kapasitet til å forbrenne fett (Takle og Castro, 2013).

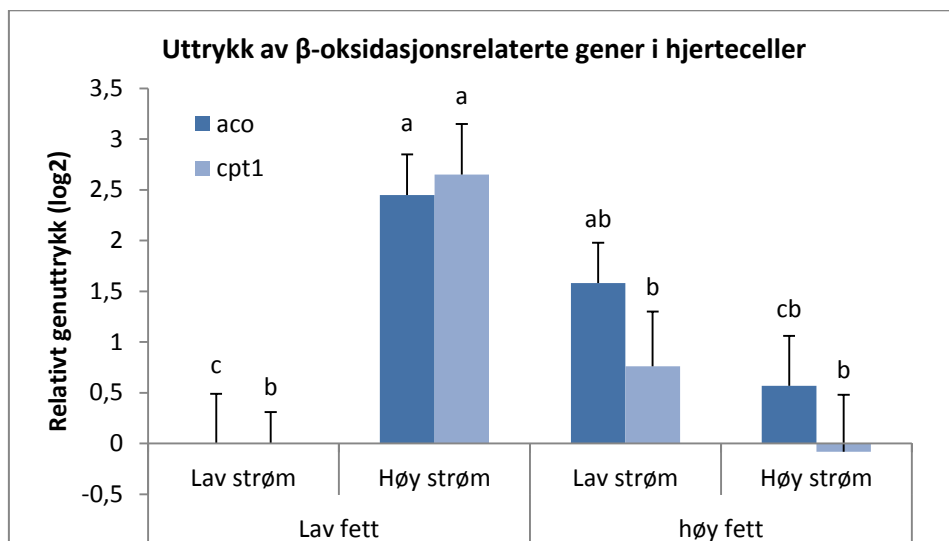


Figur 14 Figuren viser hvor mye av den radioaktivt merkede fettsyren palmitinsyre som er omdannet til kjedeforkortede β -oksidasjonsprodukter (dataene er presentert som mengde oksidasjonsprodukter/totalt opptak av palmitinsyre). ($n = 4$). Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller ($p < 0,05$).

Figur 15 viser en interessant svak tendens til økt nivå av frie fettsyrer (FFA) i høystrøms-gruppene sammenlignet med lavstrøms-gruppene, noe som kan tyde på at høyt aktivitetsnivå fører til at mer substrat er tilgjengelig for fettforbrenning i hjertecellene i disse gruppene. Dette gjenspeiles også i resultatene vist under AP4 hvor trening øker mengden intraperitonalt fett i både hjerte- og skjelettmuskulatur. Det var signifikant mer triglyserid deponert i høyfettgruppene enn i lavfettgruppen ved lav strøm.



Figur 15 Figuren viser hvor mye av den radioaktivt merkede fettsyren palmitinsyre som er tatt opp og deponert som triglyserider (TAG) og frie fettsyrer (FFA) i hjerteceller (dataene er presentert som prosent av totalt opptak av radioaktivt lipid). (n = 4). Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller ($p < 0,05$).



Figur 16 Real-time qPCR analyse av gener med viktig funksjon i peroxisomal (peroxisomal acyl-CoA oxidase = ACO) og mitokondriell (Carnitine palmitoyltransferase-1 =CPT) β -oksidasjon. resultatene er beregnet relativt til Lav strøm Lav fett gruppen. Dataene er $\log_2 \pm SE$ (n = 4). Ulike bokstaver viser signifikante forskjellers ($p < 0,05$).

Figur 16 viser at hjerteceller i høystrøms-gruppen fra laks føret med lav-fett diett har signifikant høyere uttrykk av to gener involvert i fettforbrenning sammenlignet med lav strøm. Laks på høy strøm føret med høy-fett diett viser i motsetning en tendens til reduksjon i genuttrykk i kardiomyocytter av de samme genene i forhold til lavstrøms-gruppen.

Våre data støtter opp om at lipider, i laks som i menneske, er en viktig energikilde for hjerteceller. Trening gjennom økt strømhastighet fører videre til økt utnyttelse av denne viktige energikilden.

4.4 AP4: Studier av fettcellers immunfunksjon i laks

Tidligere ble fettvevet kun betraktet som et passivt energilager for triglyserider, og vevets funksjon har derfor vært relativt lite studert. Vi har nylig vist at fettvevet i laks, som i menneske, har flere funksjoner enn tidligere antatt. Fettvevet har bl.a. en sentral endokrin funksjon med produksjon av hormonliknende stoffer som er viktige i reguleringen av både energiomsetning og betennelsesreaksjoner (Lago et al. 2007). Videre er det vist at økende grad av lipid akkumulering i fettceller (adipocytter) til laks fører til økt uttrykk av gener som koder for metabolsk stress, oksidativt stress og inflammasjon. Våre tidlige resultater antyder dermed at fettvevets sammensetning og funksjon kan ha betydning for fiskens helse.

Fettet i fôr til fisk er i stadig større grad plantebasert, noe som har ført til redusert nivå av de sunne omega-3 fettsyrene i fiskens fettvev. Vi har tidligere vist at fettsyrer som det finnes rikelig av i planteoljer fører til større grad av fettakkumulering i fettceller og høyere uttrykk av stressrelaterte gener enn fettsyrer fra marine oljer (Todorovic et al. 2009, 2010).

I motsetning til de fleste andre celler og vev har adipocytter og fettvev en betydelig evne til å ekspandere. Ekspansjon av fettvevet skyldes ikke bare økt adipocytstørrelse som følge av triglyserid akkumulering, men også økning i antall adipocytter. Vi har vist at dyrking av primære fettceller i kultur representerer et nyttig modellsystem for studier av fettcellers funksjon.

4.4.1 Forsøk 1: Innledende forsøk for å studere hvorvidt nivået av de lange omega-3 fettsyrene EPA og DHA i fettceller kan påvirke immunrespons

I fôringsforsøket, beskrevet i arbeidspakke 3, ble laks fôret med henholdsvis høyt eller lavt fettinnhold og holdt i nøter med lav eller høy vannstrøm for å stimulere til ulik grad av svømmeaktivitet (trening). Resultater fra dette forsøket tydet på at økt fettinnhold i fôr kombinert med lavt aktivitetsnivå kan føre til økt risiko for økt fettdeponering i innvollsfett, noe som igjen kan gi økt risiko for økt fettdeponering i indre organer som lever og hjerte. Videre tydet dataene på økt risiko for oksidativt stress og betennelsestilstand ved økt fettdeponering i innvollsfett. En viktig målsetting i dette prosjektet har derfor vært å undersøke hvorvidt fettinnhold og fettsyrer fra planteoljer påvirker mengde deponert fett i dyrkede adipocytter fra laks og hvordan dette videre påvirker uttrykk av stressmarkører og immunrespons.

Som et innledende forsøk ble primære adipocytter fra laks dyrket i medium tilsatt EPA og DHA eller et kontrollmedium uten fettsyretilsetning. Våre resultater viste at økt omega-3 nivå i fettcellene førte til lavere uttrykk av 8 pro-inflammatoriske gener (Figur 17), noe som kan tyde på at omega-3 fettsyrer har en anti-inflammatorisk effekt i laksens fettvev.

**Utrykk av pro-inflammatoriske gener.
(Gjennomsnitt av IL-15, STAT1, LECT2,
IL13 α 2, IL1 β , TNF α , ALOX5 og
ALOX5AP)**

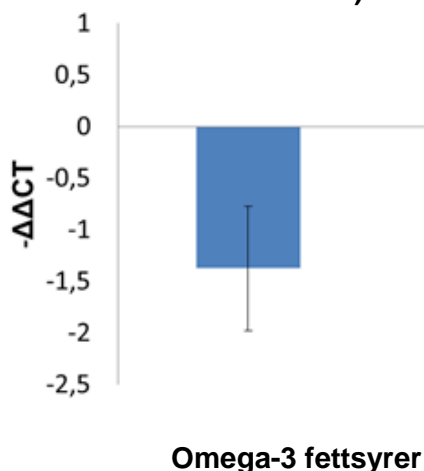


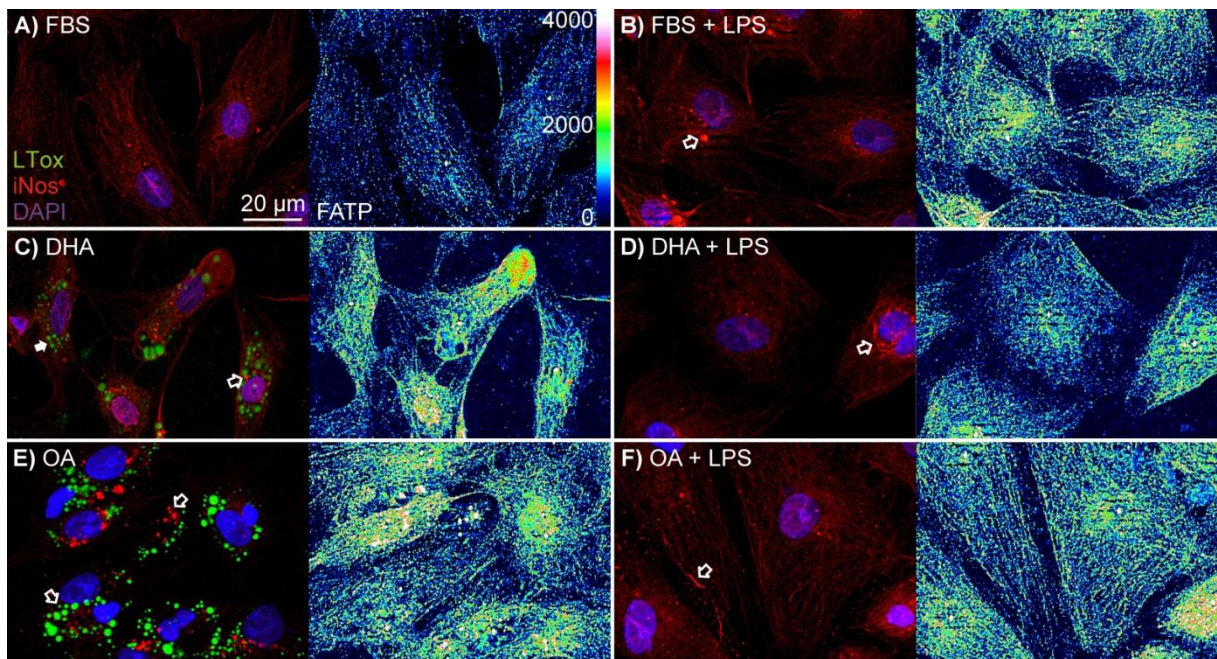
Figure 17 Real-time qPCR analyse av pro-inflammatoriske markører. Omega-3 gruppen er beregnet relativt til kontrollgruppen. Dataene er presentert som $-\Delta\Delta Ct \pm SE$ ($n = 5$).

4.4.2 Forsøk 2: Studie av hvordan oljesyre- og DHA-anrikede adipocytter responderer på LPS

Resultater fra det innledende forsøket presentert over tydet på at fettsyresammensetningen i adipocytter kan påvirke immunrespons i laks i samsvar med hva som tidligere har blitt beskrevet for pattedyr (Benatti et al., 2004). Videre har studier fra pattedyr vist at fedme kan føre til endringer og/eller skader på mitokondrienes funksjon med påfølgende økt produksjon av reaktive oksygen molekyler (ROS). Økt ROS produksjon kan igjen føre til oksidativt stress i cellen og økt produksjon av pro-inflammatoriske cytokiner, som TNF- α , IL-1 og iNOS (Spitaler and Graier, 2002). Disse prosessene er lite kjent i fisk, men vi har tidligere vist at fettsyrer som det finnes rikelig av i rapsolje, som oljesyre, kan føre til større grad av fettakkumulering i laksens fettceller og med påfølgende høyere uttrykk av oksidativt stress relaterte gener (Todorcevic et al., 2009).

Primære adipocytter fra laks ble dyrket i medium tilsatt enten oljesyre eller DHA eller kontrollgruppe uten ekstra fettsyre tilsatt. Cellene ble så tilsatt LPS (Lipopolysaccharide = substans som dannes av sykdomsfremkallende bakterier) for å studere om forskjeller i fettnivå og fettsyresammensetning påvirker oksidativt stress, mitokondrie morfologi og immunrespons etter tilsetning av LPS som tidligere er vist å kunne trigge immunforsvaret i laks (Skugor et al., 2010).

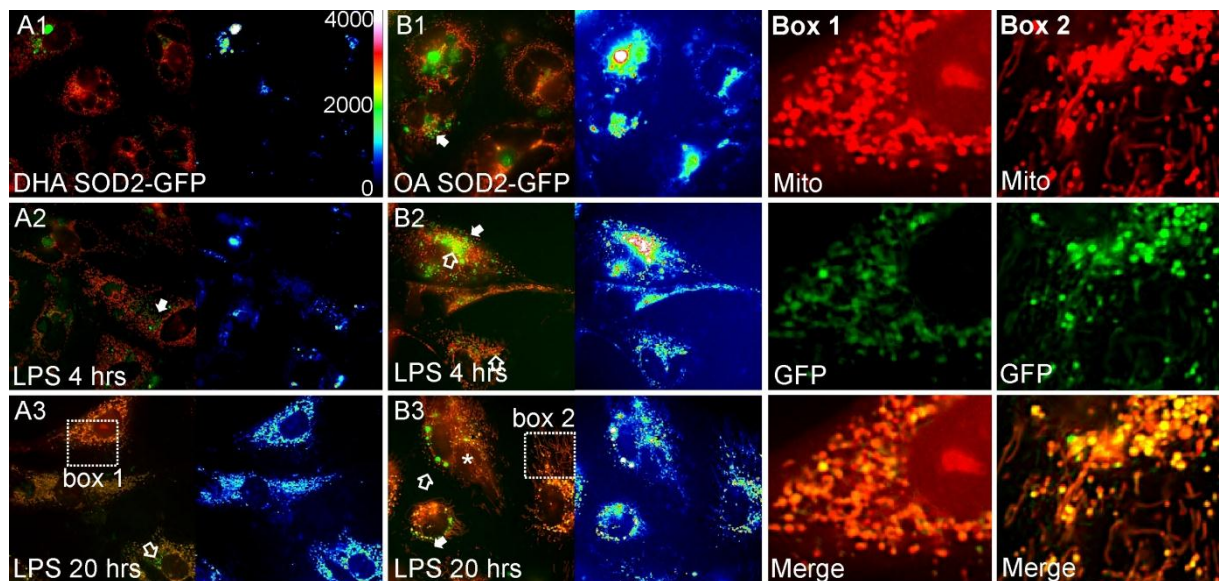
Figur 20 viser at celler dyrket i vekstmedium uten ekstra tilsetning av fettsyrer hadde ingen/få synlige fettdråper (farget grønt med Lipid Tox) i cytosol. Celler dyrket i vekstmedium tilsatt enten oljesyre (OA) eller DHA hadde relativt høyt antall lipiddråper i cytosol og høyere nivå av FATP enn kontroll (figur 18C, E). Figuren viser videre at oljesyre fører til mer intracellulært lipid og høyere FATP nivå enn DHA. Dette resultatet er i samsvar med tidligere funn som viser at fettsyrer fra vegetabilsk olje øker fettakkumulering i adipocytter i større grad enn fettsyrer fra marine lipider både in vivo og in vitro (Todorčević et al., 2008; 2009;2010).



Figur 18 *LipidTox* farging av lipiddråper (grønn) og immunfluorescens påvisning av iNOS (rød). *Immunfluorescens analyse* av FATP er vist som LUT bilde hvor høy aktivitet er rød og hvitfarget, mens mindre mengder av proteinet er blåfarget. A) FBS kontrollceller *har ikke lipiddråper* og viser uttrykk av iNOS i hele cellen. FATP er beskjedent uttrykt. B) Behandling av kontrollceller med LPS gir økt uttrykk av iNOS *i noen subcellulære strukturer (åpen pil)* og oppregulert *FATP*. C) Sammenlignet med kontroll gir DHA økt *antall* lipid dråper (hvit pil) og iNOS aktivitet i noen *subcellulære strukturer (åpen pil)*. FATP nivået er også økt. D) DHA + LPS medfører lipolyse (*ingen farging* av lipid dråper), subcellulær lokalisering av iNOS endres *i noen celler (åpen pil)* og FATP nivå reduseres i forhold til celler som bare har DHA i mediet. E) OA resulterer i store lipid dråper (*åpen pil*) *samt økt* iNOS (bildet tatt med kortere lukkertid) og FATP. F) *Stimulering av adipocytene med OA og LPS* resulterer i lipolyse, *endret* lokalisering av iNOS og opprettholdt *FATP* nivå.

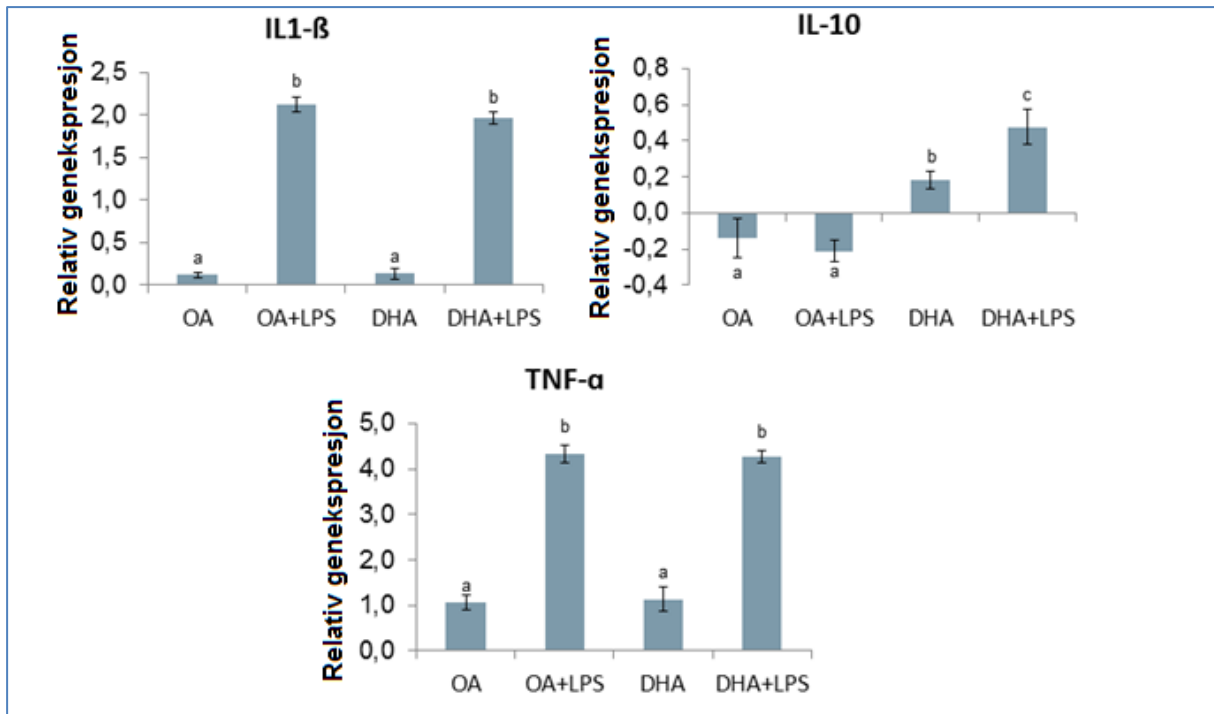
Endring av oksidativt stress ble også undersøkt ved hjelp av GFP reporter gen under kontroll av Gpx1 (glutathion peroxidase 1) og Sod2 (superoxide dismutase 2) promoterene. Konstruktene ble designet med signalproteiner for å vise subcellulær lokalisering av disse proteinene ved normal celledyrking og oksidativt stress. Mikroskopi av Sod2-GFP (Figur 19) bekreftet overveiende mitokondriell lokalisering i kontroll cellene. Behandling med fettsyrer og eller LPS medførte endret fordeling i adipocytene. I både DHA og OA gruppene ble GFP også lokalisert i noen større lipid dråper, mest i OA gruppen. Visualisering av mitokondrier ble oppnådd med CMXRos (Boks 1 & 2). Bildene viser at DHA i større grad enn OA

beskytter mitokondriene mot elongering (DHA opprettholder i større grad normal mitokondriemorfologi).



Figur 19 Adipocytter transfektert med SOD2-GFP for påvisning av oksidativt stress. Mitokondriene er i tillegg farget med CMXRos. LUT bildene viser forskjeller i GFP aktivitet; Økt oksidativt stress gir mer GFP aktivitet visualisert med økt andel rød og hvit farge. A1) Kontrollforsøk med DHA. LUT bildet til høyre viser generelt lav GFP aktivitet med unntak av noen områder i en celle. A2) Behandling med LPS i 4 timer gir økt GFP fluorescens som vist i LUT bildet til høyre. A3) Etter 20 timers LPS behandling har adipocytterne høyere GFP aktivitet som følge av oksidativt stress. Den stiplede boksen er forstørret i Box 1 bildene. B1) Kontrollceller med OA tilskudd gir økt oksidativt stress sammenlignet med DHA behandling. B2-B3) LPS behandling av celler gitt OA gir betydelig økning av GFP aktivitet sammenlignet med DHA+LPS. Box1) Forstørrelse av mitokondriene i "Box 1" (DHA + LPS 20 hrs) viser runde mitokondrier med Mitokondriefarging, GFP og sammenstilt bilde. Box 2) Forstørrelse av mitokondriene i "Box 2" (OA + LPS 20 hrs) viser fusjonerte mitokondrier (lange tråder) samt økning av GFP aktivitet utenfor mitokondriene. Dette er tegn på cellulær mistrivsel og apoptose.

Gen-ekspressjonsanalyser viste at LPS induserte pro-inflammatoriske cytokiner som TNF- α samt cytokin reseptor IL-1 β (Figur 20), noe som bekrefter at hvitt fettvev har en immunologisk funksjon i Atlantisk laks. Sammenlignet med celler som er rike på OA, så viste DHA gruppen økt ekspresjon av IL-10 et velkjent anti-inflammatorisk cytokin.



Figur 20 Real-time qPCR analyse av de pro-inflammatoriske markørene TNF- α og IL1- β viste oppregulering i LPS behandlede celler. Den anti-inflammatoriske markøren IL-10 er høyere uttrykt i DHA gruppene enn i OA gruppene. Dataene er log $2 \pm SE$ ($n = 4$). Ulike bokstaver viser signifikante forskjellers ($p < 0,05$).

Oppsummert tyder våre resultater på at fettsyresammensetningen av adipocytter kan påvirke immunrespons i laks. Gen-ekspressionsanalyser viste at LPS induerte pro-inflammatoriske cytokiner som TNF- α samt cytokin reseptor IL-1 β , noe som bekrefter den immunrollen hvitt fettvev har i Atlantisk laks. Sammenlignet med celler som var rike på plantefettsyren oljesyre (OA), så viste den marine omega-3 fettsyren DHA økt uttrykk av IL-10 et velkjent anti-inflammatorisk cytokin. Våre resultater tydet videre på at DHA i større grad enn OA beskytter mitokondriene mot elongering (DHA opprettholder i større grad normal mitokondriemorfologi).

4.4.3 Forsøk 3: Identifisering av «fedme» bio-markører i laks

I samarbeid med et internfinansiert prosjekt i Nofima (Ernæring-Helse), selekterte vi et utvalg prøver av innvolls fett fra fisk av samme størrelse med enten høyt nivå (fet fisk) eller lavt nivå (mager fisk) av innvolls fett for å påvise markører ved kartlegging av genuttrykk ved hjelp av microarray analyse.

Nærmere 500 gener var forskjellig uttrykt i fet og mager fisk og de kunne grovt inndeles i grupper av gener involvert i fett- og karbohydrat metabolismen, kommunikasjon og signaloverføring, regulering av cellyklus og stress og immunresponser. Dataene tydet på større grad a nyrekruttering av fettceller i fet fisk enn i mager fisk. I tillegg hadde fet fisk

høyere uttrykk av en rekke gener karakteristisk for differensiering av fettvev. Adipophilin for eksempel var oppregulert i fet fisk og nedregulert i mager fisk. En rekke gener som er kjent for å være klassiske markører for fedme i pattedyr var også oppregulert i fet fisk (Tabell 4). Matriksmetalloproteinase (MMP) 13 for eksempel er vist å positivt korrelere med graden av fedme hos mennesker og mus (Maquoi et al., 2002). Videre var flere bindevevsrelaterte gener (CGN), inkludert CGNVI, CD36, xantin dehydrogenase / oksidase (ABR) svært oppregulert i fet fisk. Solute carrier family 27 (SLC27A4) 27 (SLC27A4), også kjent som FABP4, kan brukes som en tidlig markør for utvikling av fedme (Gertow et al., 2004). I tillegg var et stort antall av lipid metabolske gener høyt uttrykt i fet fisk. Lipoprotein lipase (LPL) er ansett å spille en viktig rolle i initiering og / eller utvikling av fedme (Wang og Robert, 2009).

Tabell 4 Et utvalg markør-gener involvert i lipidmetabolismen i fet og mager fisk, identifisert ved microarray analyse. Prøver fra 8 fete fisk og 8 magre fisk av samme størrelse ble sammenlignet mot en normalisert kontroll bestående av en blanding av alle 16 fisk. Data er gjennomsnittlig (mean) log-ER (genuttrykk ratio).

Lipid metabolism	Mean Fat	Mean Lean	Diff
Adiponectin receptor protein 1	0.99	-0.98	1.97
LDL receptor-related protein associated protein 1	0.97	-0.97	1.94
UDP-GlcNAc:bGal b-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5	0.85	-0.85	1.70
Proteolipid protein DM beta	0.76	-0.76	1.52
1-O-acylceramide synthase	0.70	-0.70	1.41
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long ch isof 2 precur	0.70	-0.70	1.40
Serum paraoxonase/arylesterase 2	0.70	-0.70	1.39
Endothelial lipase precursor	0.62	-0.62	1.24
Lipoprotein lipase	0.58	-0.58	1.16
5-AMP-activated protein kinase gamma-1 subunit	0.56	-0.56	1.12

Oppsummert fant vi at en rekke gener som er kjent for å være klassiske markører for fedme i pattedyr var oppregulert i fet fisk. *In vivo* forsøket viste videre at både fettnivå i fôr og trening kan påvirke fettdeponering i innvolls fettvevet og *In vitro* studien viste at høyt fettnivå i fettceller kan påvirke immunrespons i laks. Disse dataene samlet kan tyde på at fôrsammensetning og trening påvirker fettdeponering i laks, noe som igjen kan ha stor betydning for fiskens helse og motstandskraft mot sykdom.

5 Vurdering av nytteverdi for sjømatnæringen

Det viktigste direkte utbytte av dette prosjektet er økt forståelse for at strømhastighet og dermed svømmeaktivitet i tilvekstfasen i sjø er av betydelig betydning for vekst, fiskehelse og produktkvalitet for Atlantisk laks. Prosjektet har dermed beredt grunnen for det som bør være et av hovedfokusområdene for anvendt forskning de nærmeste årene. Det ene tilvekstforsøket som ble gjennomført viste at høy strøm har potensiale til å øke tilvekst, redusere betennelsesnivå på grunn av redusert innvolls fett, bedre hjertekapasiteten, og sist og ikke minst bedre produktkvaliteten. Dette gir næringen indikasjon på at valg av oppdrettslokaliteter med til dels høy strøm, og dermed effektiv stimulering av svømmeaktivitet, vil være fordelaktig. Den økonomiske oppsiden av å få dette bekreftet vil være stor. I den forbindelse er det viktig å påpeke at resultatene også viser at samspillet med fôret er helt avgjørende for å oppnå positive resultat og det er derfor i særskilt grad samspillseffekter mellom ernæring og miljø som må være utgangspunktet for fremtidige studier. Det anbefales på det sterkeste at et tilsvarende forsøk blir satt opp igjen for å bekrefte samspillseffektene mellom ernæringsstatus og økt svømmeaktivitet, ikke minst på grunn av at forsøket til dels ble noe amputert av CMS utbrudd tidlig i forsøket.

Prosjektet hadde også en svært viktig dimensjon i å stimulere til ny kunnskap og metodeutvikling på et grunnleggende nivå. Økt kunnskap om robusthetsegenskaper, altså hva som definerer en robust laks ved ulike livsstadier og hvilke mekanismene og markører som er forbundet med dette, er et viktig forskningsfelt. Gjennom en tverrfaglig tilnærming er det skapt ny verdifull kunnskap om robusthet i dette prosjektet. Med utgangspunkt i de fordelaktige effektene av å trene laksen før smoltutsett har vi gjennom genomikkstudier og injeksjonsmodeller identifisert gener som responder ulikt mellom robust og sårbar fisk. Dette viser potensialet til å benytte injeksjonsmodeller som et nyttig forskningsverktøy for eksempel i optimaliseringsforsøk av ernærings- og oppdrettsbetingelser uten å gå veien om dyre og langvarige smittforsøk. Forskningen er definitivt fortsatt på et grunnforskningsnivå, men for eksempel den nye kunnskapen og forståelsen av at økt evne til å produsere og respondere på EPO, og dermed økt evne til å produsere blodceller er viktig i karakteriseringen av robust fisk. Tilsvarende er det av avgjørende betydning at vi forstår bedre i hvilken grad ulike fettsyrer og fettakkumulering påvirker laksen immunsystem og sekundært evne til å takle ulike infeksjøs sykdommer. Grunnleggende forståelse for mekanismer som forklarer *hvorfor* noen fiskegrupper vokser bra eller dårlig, har god eller dårlig overlevelse er av avgjørende betydning for at oppdrettere, fôrselskap i sammen med forskere skal lykkes med videre optimalisering av produksjonsmiljøet, fôret og genetikken. Prosjektet har generert nye gode markører som er viktige hjelpemiddel i dette optimaliseringsarbeidet og flere av markørene er allerede i bruk i store FoU satsinger som næringen står bak. Et eksempel er prosjektet «Optimalisert Post-smolt Produksjon, OPP» som har fokus på fremtidens lakseproduksjon i semi-lukka anlegg.

6 Leveranser

Fagfelle publikasjoner:

1. Takle, H. & Castro, V. Molecular adaptive mechanisms in the cardiac muscle of exercised fish. *In: Swimming physiology of fish* (2013). Palstra, A.P., Planas, J.V. (Eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. DOI: 10.1007/978-3-642-31049-2_11.
2. AP 2: Castro, V., Grisdale-Helland, B., Helland, S.J., Torgersen, J., Kristensen, T., Claireaux, G., Farrell, A.P., Takle, H., 2013. Cardiac molecular acclimation mechanisms in response to swimming induced exercise in Atlantic salmon. PlosOne, accepted.

Planlagte fagfelle publikasjoner:

1. AP 1: Krasnov A, Timmerhaus G, Afanasyev S, Takle H, Jørgensen SM. Induced erythropoiesis during acute anemia in Atlantic salmon: a transcriptomic survey. (Submitted).
2. AP 1: "Identification of markers associated with robustness in Atlantic salmon". In manus.
3. AP 3: "Effect of swimming activity and nutritional status on performance and quality of Atlantic salmon". In prep.
4. AP 3: "Cardiac lipid metabolism is enhanced upon increased swimming activity of Atlantic salmon". In prep.
5. AP 4: "The oxidative stress and inflammatory status of adipocytes are modulated by dietary lipid levels in Atlantic salmon". In prep.

Populærvitenskapelig publikasjoner:

1. Takle, H., Castro, V., Helland, S., Jørgensen, S.M., Kristensen, T., Torgersen, J., Ytteborg, E., Bæverfjord, G., Terjesen, B.F., Claireaux, G., Helgerud, J., Farrell, A.P., Krasnov, A., Grisdale-Helland, B., 2012. Trening gir mer robust smolt. Norsk Fiskeoppdrett 37, 50-53.

Foredrag:

1. Sven Martin Jørgensen og Harald Takle. «Kan vi finne markører som identifiserer robust fisk i tidlig produksjonsfase?» FHF samling, Hell, 11. mai, 2011.
2. Mette Sørensen. «Robust fisk: Etablere kunnskapsplattform for å redusere produksjons svinn i sjø». FHF samling, Hell, 11. mai, 2011.
3. Harald Takle. «Robust laks: Resultater og idèer fra FHF prosjekt». FHF samling, Gardermoen, 21. november, 2011.
4. Sven Martin Jørgensen. «Svømmeutholdenhet som mål på robusthet». Havbrukskonferansen, Stavanger, 16. april, 2012.
5. Harald Takle. «Tren fisken din!». Havbrukskonferansen, Stavanger, 16. april, 2012.

6. Harald Takle. «På tide å trimme laksen ved bruk av strømstyring og bevegelig lys?». Novartis seminarserie presentert for landets fiskehelsetjeneste og oppdrettere ved 11 anledninger mai-juni, 2012.
7. Harald Takle og Bente Ruyter. «Tap i sjø: Styring av svømmeaktivitet og diett som innsatsfaktor for å styrke laksens robusthet og helse». FHF samling, Gardermoen, 14. mai, 2012.
8. Harald Takle. «Molekylærfysiologisk overvåkning av fiskevelferd og prestasjon i RAS». 2. Resirk konferanse, Sunndalsøra, 20. oktober, 2012.
9. Harald Takle. «Molecular and physiological surveillance of fish health and welfare». Science week, Pto. Varas, Chile, 19. November, 2012.

Poster:

1. Bente Ruyter, Stanko Škugor, Harald Takle, Jacob Torgersen, Aleksei Krasnov, Mette Sørensen and Marijana Todorčević (2012). Dietary lipids and exercise influence fat deposition and inflammatory status in Atlantic salmon visceral adipose tissue. XV International Symposium on Fish Nutrition and Feeding (ISFNF), Molde Norway. 4-7 Juni

Media:

1. Intervju Harald Takle. In: Bergen Tidende, Norge. 7. Oktober, 2011.
2. Intervju Harald Takle. In: International Innovation, Nordic Focus issue. Publisher: Research Media, UK. pp.2, 2012.
3. Intervju Harald Takle. In: National Public Radio, USA. 24. September, 2012.
4. Artikkel: "It Pays to Keep Salmon Fit: Salmon Farmers Could Save Big by Exercising Their Fish More -- Without Overexerting Them". In: Science Daily, USA. 5. September, 2012.
5. Artikkel: "Better, faster, stronger". In: International Innovation, Nordic Focus issue. Publisher: Research Media. pp.3, 2012.

7 Referanser

- Benatti P, Peluso G, Nicolai R, Calvani M (2004). Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetic Properties *J Am Coll Nutr* August, 23:281-302
- Castro V, Grisdale-Helland B, Helland SJ, Torgersen J, Kristensen T, Claireaux G, Farrell AP, Takle H (2013a). Cardiac molecular acclimation mechanisms in response to swimming induced exercise in Atlantic salmon. *Plos One* (in press).
- Castro V, Grisdale-Helland B, Jørgensen SM, Helgerud J, Claireaux G, Farrell AP, Krasnov A, Helland SJ, Takle H (2013b). Disease resistance is related to inherent swimming performance in Atlantic salmon. *BMC Physiology* (in press).
- Franks P, Ling C (2011). Epigenetics and obesity: the devil is in the details. *BMC Medicine* 8:88 doi:10.1186/1741-7015-8-88.
- Gjøen T, Kleveland EJ, Moya-Falcón C, Frøystad MK, Vegusdal A, Hvattum E, Berge RK, Ruyter B (2007) Effects of dietary thia fatty acids on lipid composition, morphology and macrophage function of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) kidney. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 148(1):103-11.
- Gertow K, Pietiläinen KH, Yki-Järvinen H, Kaprio J, Rissanen A, Eriksson P, Hamsten A, Fisher RM (2004). Expression of fatty-acid-handling proteins in human adipose tissue in relation to obesity and insulin resistance. *Diabetologia.* Jun;47(6):1118-25.
- Jørgensen SM, Afanasyev S, Krasnov A (2008). Gene expression analyses in Atlantic salmon challenged with infectious salmon anemia virus reveal differences between individuals with early, intermediate and late mortality. *BMC Genomics*, 9:179
- Krasnov A, Timmerhaus G, Afanasyev S, Takle H, Jørgensen SM (2013). Induced erythropoiesis during acute anemia in Atlantic salmon: a transcriptomic survey. (Submitted).
- Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O (2007). Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nature Clinical Practice Rheumatology* 3:716-724.
- Maquoi E, Munaut C, Colige A, Collen D, Lijnen RD (2002). Modulation of Adipose Tissue Expression of Murine Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors With Obesity. *Diabetesdiabetes.* 51, 4 1093-1101
- Masson O, Chavey C, Dray C, Meulle A, Daviaud D, et al. (2009) LRP1 Receptor Controls Adipogenesis and Is Up-Regulated In Human and Mouse Obese Adipose Tissue. *PLoS ONE* 4(10): e7422. doi:10.1371/journal.pone.0007422
- Shimomura, I., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Ikemoto, S., Bashmakov, Y. et al. (1998). Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: Model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev.* 12, 3182–3194.
- Skugor S, Skugor A, Todorčević M, Torgersen J, Ruyter B, Krasnov A (2010). Exposure to lipopolysaccharide induces immune genes in cultured preadipocytes of Atlantic salmon. *Fish & Shellfish Immunology.* 1-8.

- Spiegelman BM, Flier JS (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104, 531–543.
- Spitaler M, Graier F (2002). Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 45(4):476-94.
- Takle H, Castro V (2013). Molecular adaptive mechanisms in the cardiac muscle of exercised fish. *In: Swimming physiology of fish*. Palstra, A.P., Planas, J.V. (Eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. DOI: 10.1007/978-3-642-31049-2_11.
- Timmerhaus G, Krasnov A, Takle H, Afanasyev S, Nilsen P, Rode M, Jørgensen SM (2012). Comparison of Atlantic salmon individuals with different outcomes of cardiomyopathy syndrome (CMS). *BMC Genomics*. 13:205.
- Todorčević M, Kjaer MA, Djakovic N, Vegusdal A, Torstensen BE, Ruyter B (2009). N-3 HUFAs affect fat deposition, susceptibility to oxidative stress, and apoptosis in Atlantic salmon visceral adipose tissue. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 152, 135–143.
- Todorčević M, Škugor S, Ruyter B (2010). Alterations in oxidative stress status modulate terminal differentiation in Atlantic salmon adipocytes cultivated in media rich in n-3 fatty acids. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 156, 309–318.
- Todorčević M, Vegusdal A, Gjoen T, Sundvold H, Torstensen BE, Kjaer MA, Ruyter B (2008). Changes in fatty acids metabolism during differentiation of Atlantic salmon preadipocytes; effects of n-3 and n-9 fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1781, 326–335.
- Wang H, Eckel RH (2009). Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *AJP- Endo* August 297, 2, E271-E288
- Ytteborg E, Vegusdal A, Witten PE, Berge GM, Takle H, Østbye TK, Ruyter B (2010). Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle precursor cells differentiate into osteoblasts in vitro: polyunsaturated fatty acids and hyperthermia influence gene expression and differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 1801(2):127-37.

8 Signatur

Denne prosjekt rapporten er endelig godkjent av:

Nofima:


.....

Dato: 18.01.2013
.....

Harald Takle, Seniorforsker



ISBN 978-82-8296-036-6 (trykt)
ISBN 978-82-8296-037-3 (pdf)
ISSN 1890-579X