



N I F E S
NASJONALT INSTITUTT
FOR ERNÆRINGS- OG
SJØMATFORSKNING

Rapport
2016

Analyser av rognkjeks med katarakt

Rune Waagbø, Sofie C. Remø, Miriam
Nerland Hamadi & Thor Magne Jonassen

**Nasjonalt institutt for ernærings- og
sjømatforskning (NIFES)**

27.06.2016



INNHALDSFORTEGNELSE

Forord.....	2
Sammendrag	3
English abstract	4
Bakgrunn	5
Metoder	5
Resultater.....	7
Diskusjon.....	10
Konklusjon og forslag til videre forskning.....	12
Tabeller	14
Referanser	22

FORORD

Dette studiet inngår i prosjektet «Forekomst og mulige årsak til katarakt hos rognkjeks», finansiert av Fiskeri og Havbruksnæringens Forskingsfond (FHF-prosjekt nr. 901152) og ledet av Akvaplan-niva ved Dr Thor Magne Jonassen. Kataraktscreening og prøvetaking av linser og vev på anleggene ble utført av fiskehelsebiolog Miriam Nerland Hamadi, etter opplæring fra forsker Dr. Sofie C. Remø (NIFES).

Takk til de mange samarbeidspartnere på anleggene som deltok i studien og til ingeniørene Anita Birkenes og Elisabeth Rasmussen Ødegård ved NIFES for opparbeidelse av prøver og analyser.

Samarbeidspartnere:

Dr. Thor Magne Jonassen (thor.magne.jonassen@akvaplan.niva.no) Akvaplan-niva

Fiskehelsebiolog Miriam Nerland Hamadi (miriam.hamadi@aqua-kompetanse.no), Aqua Kompetanse

Dr. Sofie C. Remø (sofie.remo@nifes.no), NIFES

Dr. Rune Waagbø (rune.waagbo@nifes.no), NIFES

SAMMENDRAG

Katarakt hos rognkjeks ser ikke ut til å være knyttet til for lite histidin i fôret. Verken muskel- eller hjertevev hadde konsentrasjoner av frie histidinforbindelser tilsvarende laksefisk. Man kan likevel ikke utelukke at fôret eller fôrinntaket i anleggene eller at andre miljøfaktorer har påvirket fiskens totale aminosyre- og histidinomsetning og kataraktutvikling.

Basert på funn av høyere NAH konsentrasjon i linser fra villfisk enn i rekrutter, en signifikant reduksjon i linsens NAH med økende katarakt-score i deler av materialet og stor variasjon i linsens NAH, er det grunn til å tro at NAH har tilsvarende funksjoner i rognkjeksens linse som hos laksefisk.

Da analysene ble utvidet til å omfatte resten av prøvematerialet fra alle anleggene (n=160; utelatt villfisk) viste det imidlertid ingen statistisk sammenheng mellom katarakt-score og NAH i linsen, trolig relatert til at kataraktutviklingen skjedde for en stund tilbake og er stagnert i kaldere perioder, eller at det i materialet er for mange alvorlige katarakter («branntomter») og variable NAH verdier.

Problemet med katarakt i rognkjeks er utfra denne studien muligens relatert til forstyrret metabolisme eller feilernæring, visualisert som svært høye verdier av utvalgte aminosyrer i ulike vev. Dette kan føre til osmotisk ubalanse i fiskens vev, inkludert kataraktutvikling, eller at kataraktutviklingen er en konsekvens av en osmotisk ubalanse.

Denne studien sammen med andre, viser at vi står overfor store utfordringer innen velferd hos rognkjeks som kan ha sammenheng med fôrinntak og ernæring. Videre forskning innen ernæring hos rognkjeks er derfor nødvendig.

ENGLISH ABSTRACT

Cataracts in lumpfish seems not to be related to insufficient histidine nutrition, like in Atlantic salmon. In contrast to the Atlantic salmon, neither muscle nor cardiac tissues had concentrations of free histidine compounds. One cannot however, exclude that the feeds or feed intake in the different sites or other environmental factors have affected the total amino acid and histidine metabolism, and cataract development.

Based on the findings of higher NAH concentration in lenses from wild lumpfish than in recruits, a significant reduction in lens NAH with increasing cataract scores in parts of the fish material, and a considerable variation in lens NAH concentration, there is reason to believe that NAH has similar functions in the lens of lumpfish as in salmonids.

When the free amino analysis was extended to include samples from all sites (n = 160; excluding wild fish), no statistical correlation between cataract score and lens NAH concentration was seen. This is probably related to the fact that the cataract development happened a while back in time and have stagnated in the colder periods, or that the material contain too many serious cataracts ("fire plots") with variable NAH values.

From this study, the problem with cataract development in lumpfish seems to be related to a severely disturbed metabolism or malnutrition, visualized by very high values of selected amino acids in different tissues. This can cause osmotic imbalances in the fish tissues, with cataract development, or the cataract development may be a consequence of an osmotic imbalance.

This study along with other shows that we are facing major challenges in the welfare of lumpfish which may be related to food intake and nutrition. Further research in nutrition with lumpfish is therefore necessary.

Analyser av rognkjeks med katarakt

Bakgrunn

Rognkjeks brukt til avlusning har ofte høy dødelighet og i en rapport fra Veterinærinstituttet (Bornø *et al.* 2016) er mulige årsaker til denne dødeligheten undersøkt nærmere. Her knyttes dødeligheten på rognkjeks i settefiskfasen hovedsakelig til sykdommer (83%) og til kvalitet på fisken (33%). De peker også på at fôringsregimer og type fôr varierer mye og at man har lite kunnskap på området.

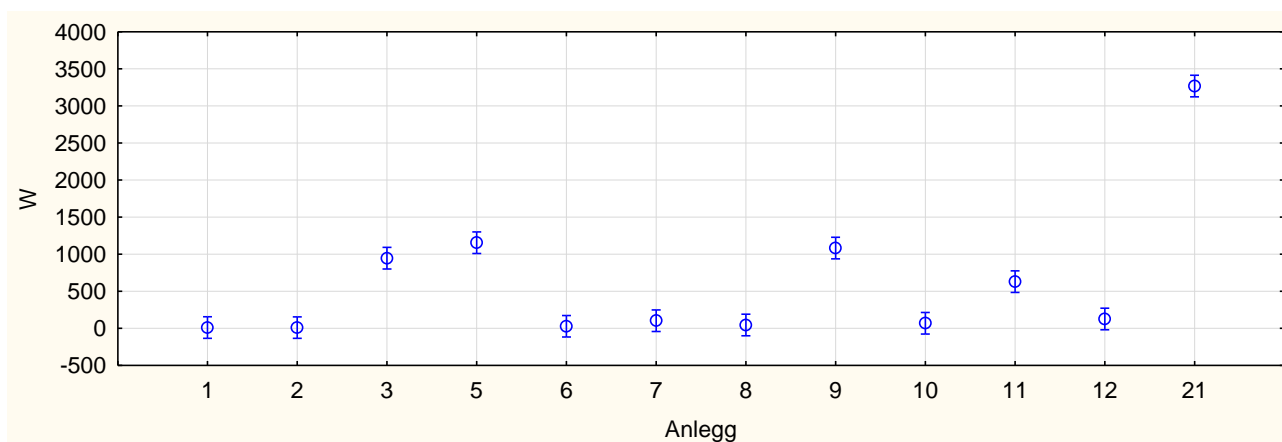
Katarakt er en blakking av linsen og kan hemme synet. Prosjektet (FHF-prosjekt 901152) undersøkte fisk fra totalt 10 anlegg, både fra fisk i kar og på fisk satt ut i laksemerder for avlusning av laks. Linsene til 30 fisk per anlegg (med unntak av ett anlegg hvor kun 27 fisk ble undersøkt) ble undersøkt ved bruk av spaltelampe med lupe (10 x forstørrelse). med tilfeldig prøveuttak av Alvorlighetsgraden øker med fiskens alder, hvor yngel hadde relativt lite katarakt, mens nesten 100% av stamfisken hadde katarakt med en gjennomsnittlig score på 7.3 av 8. Rognkjeks brukt til avlusning hadde en score på <4, mens villfisk lå på 1.13 (Jonassen *et al.* 2016).

I denne undersøkelsen ble det også tatt ut muskelvev, hjerte og linser fra den undersøkte fisken. I likhet med kataraktproblematikken hos oppdrettslaks, er det grunn til å tro at katarakt kan ha sammenheng med ernæringen av rognkjeks. Det ble derfor gått videre med kjemisk analyser av prøvene som er tatt ut for å kunne stadfeste hvordan tiknytningen er til ernæring, spesielt aminosyrer som histidinforbindelser, eventuelt andre miljø- og andre faktorer.

Metoder

Det er prøvetatt organer fra 15 fisk fra 10 anlegg, hvorav to anlegg er prøvetatt med to størrelsesgrupper, stamfisk (1-1.5 kg) og små stamfiskrekutter (66-150g). Totalt er 195 fisk, med 3 organprøver per fisk, prøvetatt. Samtidig ble det tatt aktuelle fôrprøver fra anleggene (i alt 10 fôr). Det ble inkludert 15 prøver fra nyfanget villfisk stamfisk som referanse.

Analyser av rognkjeks med katarakt



Figur 1. Gjennomsnittsvikt på den prøvetatte rognkjeksen fra ulike anlegg varierte fra rekrutter til stamfisk, hvorav villfisk (Anlegg 21) representerte den største fisken på over 3 kg.

Analysestrategi for prøvematerialet i prioritert rekkefølge:

1. Analyse av total aminosyrer i 10 fôr
2. Analyse av frie aminosyrer (FAA) og NAH i tre organer fra 10 villfisk og 10 fisk fra ett anlegg (totalt 20 fisk, 60 analyser av FAA og NAH)
3. Videre analyse av NAH i linse hos resterende fisk (n=15 per anlegg og villfisk) for å undersøke om og hvor mye denne varierer og om denne er knyttet til kataraktstatus hos fisken (n=175)

Dette analyseprogrammet vil gi informasjon om eventuelle aminosyrer, med fokus på histidin, er knyttet til kataraktutviklingen hos rognkjeks slik vi har demonstrert for laks.

På grunnlag av at det viste seg å være stor størrelsesforskjell mellom villfisk og rekrutter i punkt 2., og at de første resultatene fra linse var spesielle, ble det utført en analyse til av FAA i linse fra et anlegg med rekrutter, med omtrent lik kroppsstørrelse og kataraktstatus, for å bekrefte utfallet. Analysene bekreftet den spesielle FAA profilen i linsen hos oppdrettet rognkjeks (Tabell 2).

Metodene for analyse av aminosyrer i fôr ved hydrolyse (Kvalitetsportalen for NIFES 2016, HAA #366), analyse av frie aminosyrer (Kvalitetsportalen for NIFES 2016, FAA #232) og analyse av N-acetylhistidin (Kvalitetsportalen for NIFES 2016NAH #233) er akkrediterte metoder ved NIFES, også benyttet av Breck et al. (2005).

Statistikk

Analyser av aminosyrer i fôr og i vev fra rognkjeks er rapportert i gjennomsnitt konsentrasjoner (SD). Resultatene ble behandlet statistisk ved hjelp av Statistica ver. 12 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Analysene fra anleggene er sammenliknet med villfanget rognkjeks, og sammenholdt individuelt med alvorlighetsgrad av katarakt ved hjelp av Spearman Rank Order Correlation test (signifikante individuelle korrelasjoner på % nivå).

Resultater

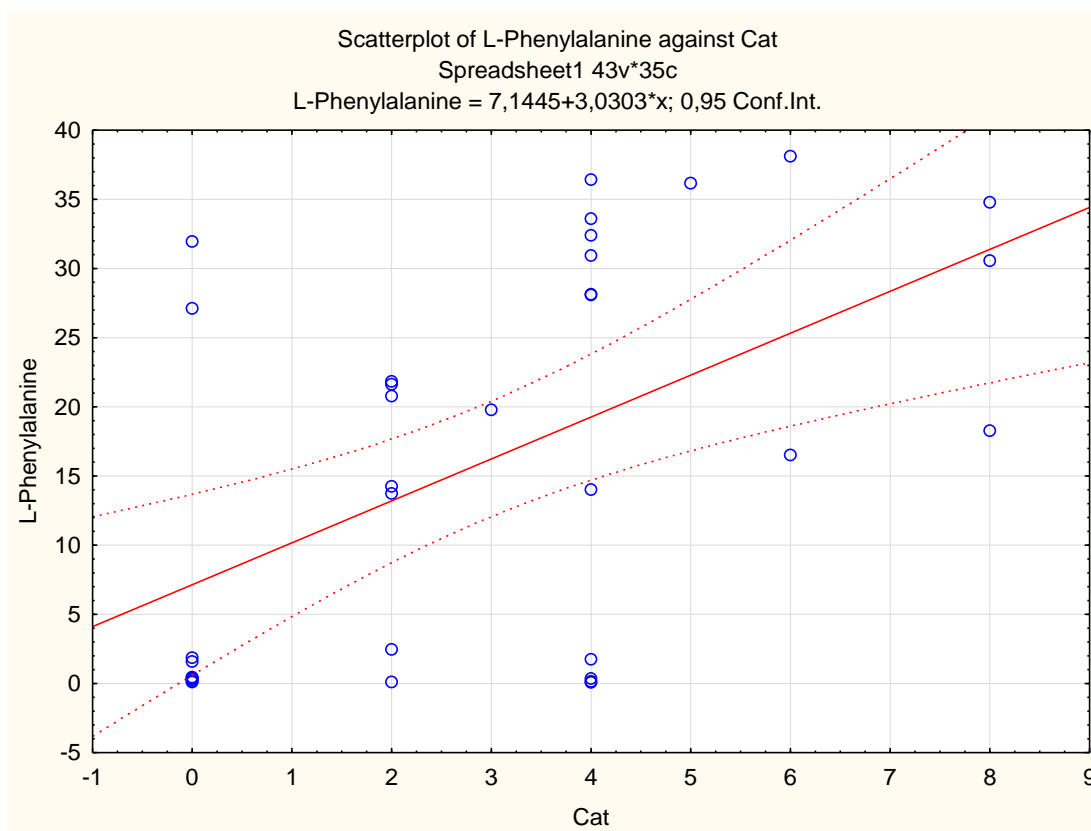
Fôranalyser

Analyse av aminosyrer i fôrene som ble benyttet til rognkjeks hadde ordinær sammensetning som tilfredstiller behovet hos kjente arter i oppdrett. Histidininnholdet varierte fra 9.3 til 12.2 g/kg (snitt 10.3 g/kg), noe som også representerer sammensetningen hos ordinære laksefôr.

Frie aminosyrer i linse, muskel og hjerte

Analysen viste at rognkjeks har histidinforbindelsen NAH i linsen, og stor variasjon mellom individuelle fisk og anlegg tyder på at den har en fysiologisk rolle tilsvarende som hos laks. Linsens NAH konsentrasjon var negativt korrelert til kataraktscore ($p < 0.05$; Spearman $R = 0.44$; $n = 35$) i dette begrensede materialet. Av andre aminosyrer som var signifikant negativt korrelert til kataraktscore og som hadde kvantitativ betydning var tyrosin ($R = -0.40$).

Analysen av linsener viste store forskjeller i nivå av frie aminosyrer, blant annet i innholdet av fenylalanin som opptrådte i svært høye konsentrasjoner i rekruttene i forhold til villfisk (Tabell 2). Denne aminosyren var positivt korrelert til kataraktscore på individuell fisk ($p < 0.05$; Spearman $R = 0.50$; $n = 35$) og negativt til NAH ($p < 0.05$; Spearman $R = -0.72$; Fig. 2). Andre aminosyrer som var signifikant positivt korrelert til kataraktscore og med kvantitativ betydning for totale aminosyrekonsentrasjonen i linsen var prolin ($R = 0.40$), glycin ($R = 0.47$), alanin ($R = 0.39$), cystin ($R = 0.42$), cystathion ($R = 0.34$) og lysin ($R = 0.38$). Totale aminosyrer var også positivt korrelert til kataraktscore ($R = 0.40$) hos rekruttene.



Figur 2. Signifikant positiv sammenheng mellom individuell total kataraktscore (0-8) og fenylalaninkonsentrasjonen i linsen.

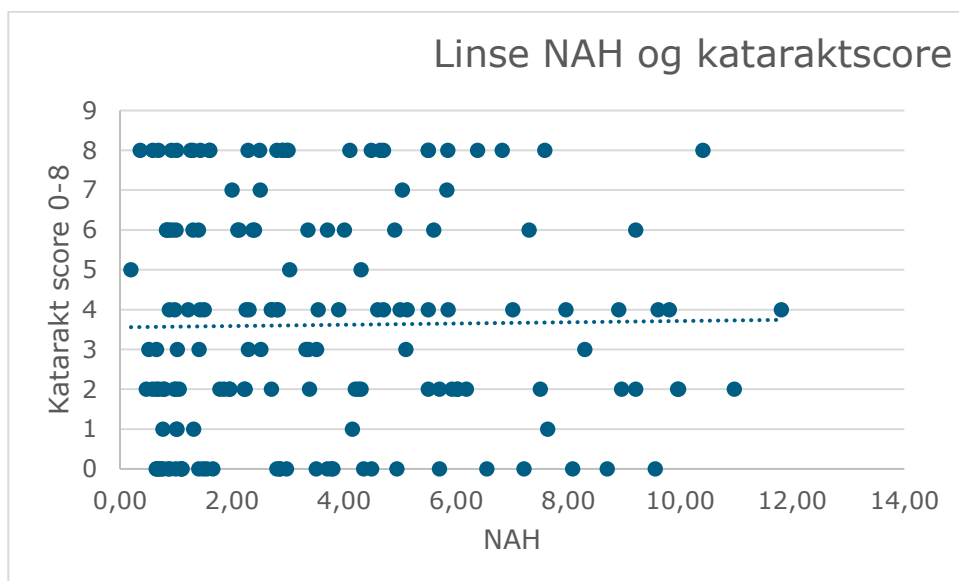
Rognkjeksens muskel (både vill og rekrutter) inneholdt ikke histidinforbindelsene anserin og karnosin som laksefisk, og heller ikke nevneverdig NAH (Tabell 3). Mengden frie aminosyrer i muskel var tre ganger høyere hos rekrutt (24.3 $\mu\text{mol/g ww}$) enn hos villfisk (8.5 $\mu\text{mol/g ww}$). Selv om de fleste aminosyre var påvirket, var forskjellen i hovedsak knyttet til de lavmolekylære aminosyrene glycin og alanin.

I hjertevev fra villfisk og rekrutter (Tabell 4) ble ingen histidinforbindelser funnet i nevneverdig grad (anserin, karnosin, histidin eller NAH). Summen av aminosyrer i hjertevev var 25% høyere i villfisk sammenliknet med rekrutter, i hovedsak knyttet til den avledete aminosyren taurin. Flere av de småmolekylære aminosyrene var høyere i rekrutter enn villfisk, trolig knyttet til utjevning av total osmolalitet.

Analyse av histidin og NAH i linser fra rognkjeks fra 11 anlegg og villfisk

Tabell 5 viser gjennomsnittsverdier (\pm SD; n=15) av histidinforbindelser i linsen hos rognkjeks fra de ulike anleggene. Variasjonen i snittverdier per anlegg strekker seg fra 0.8 til 2.5 μ mol His/g ww, og 1.0 til 8.9 μ mol NAH/g ww. Til sammenlikning hadde villfanget stamfisk i snitt 0.4 (0.1) μ mol His/g ww og 7.0 (1.1) μ mol NAH/g ww.

Analysene fra anleggene ble sammenholdt med somatiske data. Mens det var en relativt god korrelasjon mellom vekt og lengde mot total kataraktscore (begge Spearman $R=0.62$; $p<0.05$; $n=165$), var det var en negativ sammenheng mellom linsens His konsentrasjon og total score (Spearman $R=-0.38$; $p<0.05$; $n=160$). Det var ingen korrelasjon mellom NAH og totale kataraktscore (Fig. 3), i motsetning til det avgrensede materialet fra pkt 2. Histidinkonsentrasjonen i linsen hos rognkjeks var normalt mye lavere enn NAH, tilsvarende som hos laks, men det var ingen korrelasjon mellom konsentrasjonene av histidin og NAH i linsen (Spearman R ns).



Figur 3. Linsens innhold av NAH viste ingen sammenheng med kataraktscore 0 til 8 hos rognkjeks når hele materialet fra anleggene med ulik størrelse ble vurdert (n=160 individer). Villfisk er ekskludert i denne analysen..

Diskusjon

Fôranalyser

Det var liten forskjell i aminosyresammensetningen i fôrene som ble benyttet i de ulike anleggene, med fokus på histidininnholdet. Laksefôr som tar høyde for å hindre kataraktutvikling har noe høyere innhold, om lag 13-14 g histidin/kg. Like fullt var det ekstremt stor variasjon i lensens innhold av histidin og NAH i hele materialet (Tabell 5). Dette tyder på at kataraktutvikling hos rognkjeks ikke er relatert til histidininnholdet i fôret. Det er imidlertid mulig at rognkjeks hadde stor variasjon i fôrinntaket i denne kalde perioden av året. Vi får støtte for at kataraktutviklingen ikke er knyttet til histidin i fôret basert på at vi ikke finner store lagre av frie histidinforbindelser verken i den store hvite muskelen eller hjertemuskelvev. Dette i motsetning til de store mengdene anserin som laks har i muskelvevet og NAH i hjertevevet (Remø et al. 2014).

Frie aminosyrer i linse, muskel og hjerte

Laksefisk har ulike histidinforbindelser i vevene. Kataraktutvikling hos laks har vært satt i sammenheng med vevsspesifikke behov for histidin, hvor linsen med sin dominerende histidinforbindelse NAH er skadelidende i forhold til den store hvite muskelen sine store behov for histidin til proteinsyntese (vekst) under rask vekst og de frie dipeptidene anserin og karnosin (omsetning, bufring og oksidativ beskyttelse) (Andersen et al. 2016; Remø et al. 2014). Et naturlig andre steg i denne studien var derfor kartlegging av histidinforbindelser i ulike vev fra vill og oppdrettet rognkjeks. Linse, muskel og hjerte ble prøvetatt fra villfisk (kataraktinsidens på 33%) og rognkjeksrekrutter fra to anlegg med omtrent lik kataraktinsidens på 67%. Organene ble analysert for frie aminosyrer og NAH forbindelsen ved hjelp av to ulike kjemiske metoder.

Analysen viste at rognkjeks har histidinforbindelsen NAH i linsen. Den høyere konsentrasjonen hos villfisk, stor variasjon i NAH mellom individuelle rekrutter, og ikke minst at linsens NAH konsentrasjon var negativt korrelert til kataraktens score i det avgrensede materialet tyder på at NAH har en fysiologisk rolle i linsen til rognkjeks tilsvarende som hos laks. Ved mangel på NAH, kompenserer laksens linser med å øke andre aminosyrer for å ivareta osmotisk balanse (Breck et al. 2005). Analyser av linse hos rognkjeks avdekket imidlertid store forskjeller i totalinnhold av frie aminosyrer mellom vill og oppdrettet rognkjeks, hvor oppdrettet rekrutter hadde over to ganger verdien av villfisk og med høy variasjon. Vill rognkjeks hadde tilsvarende konsentrasjon av totale aminosyrer som laks (Breck et al.

2005). Dette gir antakelsen om at rognkjeks trenger NAH i linsen og at fisk som har forstyrrelser i linsens vannbalanse kan ende opp med kataraktutvikling. Dette blir støttet av at linsens totale aminosyrer var positivt korrelert til kataraktscore i det avgrensede materialet. De fleste aminosyrene var forhøyet i rekruttenes linser sammenliknet med villfisk, hvor aminosyren fenylalanin skilte seg ut med ekstremt høy og variabel konsentrasjon. Denne aminosyren var også positivt korrelert til kataraktscore på individuell fisk. Hos laks som har lav NAH status var fenylalanin blant de aminosyrene som økte betraktelig i konsentrasjon (Breck et al. 2005).

Rognkjeksens muskel inneholder ikke histidinforbindelsene anserin og karnosin slik som laksefisk, og heller ikke nevneverdig NAH (Tabell 3). Mengden frie aminosyrer i muskel var tre ganger høyere hos rekrutt (24.3 $\mu\text{mol/g ww}$) enn hos villfisk (8.5 $\mu\text{mol/g ww}$). Til sammenlikning har laks om lag 24-26 $\mu\text{mol/g ww}$, hvorav anserin kan utgjøre opptil 60% (Breck et al. 2005). Selv om de fleste aminosyrene var påvirket her, var forskjellen i hovedsak knyttet til de lavmolekylære aminosyrene glycin og alanin. Hvis muskelen normalt er lav i frie aminosyrer hos stor rognkjeks som villfisken viser, kan resultatene her indikere både forstyrret vannbalanse og energimetabolisme, siden disse ikke-essensielle aminosyrene bidrar både som osmolytter og energisubstrat. Kveitemuskel på sin side, tilsvarende høye konsentrasjoner av glycin og alanin som rekruttene, men også betraktelig høyere nivå av taurin og totale frie aminosyrer (Liakonis et al 2012).

Heller ikke i hjertevev ble noen histidinforbindelser funnet i nevneverdig grad (verken anserin, karnosin, histidin eller NAH). Hovedfunnet her var motsatt av muskel- og linsevev, ved at summen av aminosyrer i hjertevev var betraktelig høyere i villfisk sammenliknet med rekrutter (Tabell 4). Dette var i hovedsak knyttet til aminosyren taurin. Taurin er en karakteristisk aminosyre i hjertevev og utgjør også > 50% av totale frie aminosyrer humant. Ved hjertesykdom humant avtar taurinnivåene, og lavere nivå i hjertevev hos rognkjeksrekruttene kan derfor indikere forstyrrelser i osmoregulering og ionepumpeaktivitet. Det er også mulig at taurin blir forbrukt av økt oksidativt stress, siden taurin også fungerer som antioksidant og er tilknyttet fettomsetningen (Andersen et al. 2016). Moderne plantebaserte fôr inneholder lite taurin, og taurin bør derfor inngå i optimalisering av fôr til rognkjeks.

Analyse av histidin og NAH i linser fra alle anlegg

Den manglende sammenhengen mellom linsens NAH og kataraktscore hos rognkjeks i denne studien (n=160) fraviker resultatene fra det avgrensede materialet i punkt 2), og det som er sett hos laksesmolt (Remø et al. 2014) og voksen laks (Waagbø et al. 2010). Dette kan bero på at kataraktutviklingen har

skjedde for en stund siden (knyttet til veksten i varmere perioder) eller at NAH status er så lav og katarakten så markant i mange individer («branntomter») at man ikke finner sammenheng av den grunn. Det var også liten variasjon i fôrets histidininnhold (Tabell1) og det var ingen sammenheng mellom fôrnivå og gjennomsnittsverdier av linsens NAH eller sum katarakt på lokalitetsnivå (n=10). Største mengden av fisken ble undersøkt og prøvetatt rundt årsskiftet med lave vanntemperaturer. Kataraktrisikoen hos laks øker normalt med økende temperaturer og vekst (Bjerkås & Bjørnstad 1999; Bjerkås et al. 2001; Waagbø et al. 2010). I et forsøk på å finne terskelverdi for NAH i linsen i forhold til risiko for kataraktutvikling hos laksesmolt, foreslo Remø et al. (2014) en kritisk verdi på 5.8 $\mu\text{mol/g}$ for å minimere alvorlighet av katarakt, i forhold til en vevsmetning på om lag 15 $\mu\text{mol/g}$ oppnådd med høyt overskudd av histidin i fôret (nær 18 g/kg). Bare ett anlegg i denne undersøkelsen hadde snittverdi over denne grensen. Manglende korrelasjon mellom linsens histidin og NAH konsentrasjoner og stor variasjon i status tyder på at det hos rognkjeks er andre faktorer som bestemmer både syntesen av NAH fra histidin i linsen og forbruket av NAH. De høye konsentrasjonene i enkelte grupper og spennet i NAH tyder imidlertid på at NAH har tilsvarende roller for linsens funksjon (osmolytt, antioksidant) hos rognkjeks som hos laks.

KONKLUSJON OG FORSLAG TIL VIDERE FORSKNING

Katarakt hos rognkjeks ser ikke ut til å være knyttet til for lite histidin i fôret. Verken muskel- eller hjertevev hadde frie histidinforbindelser tilsvarende laksefisk. Man kan likevel ikke utelukke at fôret eller fôrinntaket i anleggene og at andre miljøfaktorer har påvirket fiskens totale aminosyre- og histidinomsetning.

Basert på funn av høyere NAH konsentrasjon i linser fra villfisk enn i rekrutter, en signifikant reduksjon i linsens NAH med økende katarakt-score i deler av materialet og stor variasjon i linsens NAH, er det grunn til å tro at NAH har tilsvarende funksjoner i rognkjeksens linse som hos laksefisk.

Når analysene ble utvidet til å omfatte resten av prøvematerialet fra alle anleggene (n=160) viste det imidlertid ingen statistisk sammenheng mellom katarakt-score og NAH i linsen, trolig relatert til for mange alvorlige katarakter og tilsvarende lave NAH verdier.

Problemet med katarakt i rognkjeks er utfra denne studien muligens relatert til forstyrret metabolisme eller feilernæring, visualisert som svært høye verdier av utvalgte aminosyrer i ulike vev. Dette kan føre til osmotisk ubalanse i fiskens vev og kataraktutvikling, eller at det er en konsekvens av en osmotisk ubalanse.

Denne studien sammen med andre, viser at vi står overfor store utfordringer innen velferd hos rognkjeks som delvis kan ha sammenheng med ernæring. Videre forskning innen ernæring hos rognkjeks er derfor nødvendig.

Oppfølging av kataraktproblematikken bør innbefatte *fôringforsøk med ulike fôrtyper* (1- et av dagens fôr som referanse; 2-marine lavenergi-fôr; 3-lav protein/energi-fôr; 4-fôr uten tilsetninger/med lavt innhold av næringsstoff; 5-fôr med funksjonelle tilsetninger som taurin). Fôrene bør gis til villinnfanget liten rognkjeks og følge denne opp med hensyn på somatiske data, sykdomsutvikling, utvikling av katarakt, måling av frie aminosyrer og osmolalitet i vev, i tillegg til å analysere fiskens stressnivå (plasma kortisol).

Fôrinntak og næringsstoffomsetning hos rognkjeks gjennom sesongen må avklares. Man bør også få klarhet i hvilken grad katarakt og andre velferdsutfordringer påvirker fiskens lusespising.

TABELLER

Tabell 1. Analyse av totale aminosyrer i fôr (g/kg ww) fra anleggene med rognkjeks.

g/kg ww	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Snitt	Max	Min
Arginin	27.1	27.2	26.0	27.1	28.9	28.3	25.3	26.3	29.2	27.9	28.5	27.4	29.2	25.3
Histidin	11.0	9.7	9.3	10.5	9.7	10.3	10.6	12.0	12.2	9.5	11.8	10.6	12.2	9.3
Treonin	19.5	18.8	18.4	20.0	20.4	20.8	19.1	21.2	22.4	19.9	22.2	20.3	22.4	18.4
Isoleucin	19.7	19.5	18.6	20.2	19.9	20.4	19.5	20.8	22.4	20.4	22.9	20.4	22.9	18.6
Leucin	36.5	36.3	35.6	37.4	37.5	37.6	35.9	37.8	40.4	37.2	40.5	37.5	40.5	35.6
Valin	26.2	25.1	24.2	26.4	24.8	26.3	25.4	26.0	28.5	25.1	28.2	26.0	28.5	24.2
Lysin	34.9	31.8	31.9	35.8	37.4	40.4	32.5	36.9	38.2	37.4	37.2	35.8	40.4	31.8
Metionin	13.2	12.4	12.0	13.3	14.0	14.1	12.9	12.6	14.6	13.8	14.5	13.4	14.6	12.0
Fenylalanin	21.3	21.9	20.8	21.3	21.6	20.9	20.8	22.8	23.7	21.2	24.8	21.9	24.8	20.8
Tyrosin	15.1	15.5	14.6	15.4	15.8	15.3	15.2	16.4	18.0	15.5	18.9	16.0	18.9	14.6
Glycin	29.5	27.7	26.8	28.5	32.3	28.7	27.8	25.4	30.1	29.9	27.3	28.6	32.3	25.4
Alanin	27.9	25.9	25.6	28.4	29.4	29.8	26.6	26.2	29.6	28.9	28.2	27.9	29.8	25.6
Serin	21.5	22.2	21.8	21.8	23.3	21.3	20.5	22.6	23.1	22.2	23.2	22.1	23.3	20.5
Aspartic acid	44.2	41.3	41.4	45.2	47.5	47.1	42.0	44.2	48.3	46.8	48.1	45.1	48.3	41.3
Glutamic acid	86.9	96.8	96.4	87.5	92.9	79.3	90.6	100.4	89.6	87.4	88.7	90.6	100.4	79.3
Prolin	26.3	29.8	29.3	26.2	27.8	23.0	29.3	30.4	27.8	25.9	27.6	27.6	30.4	23.0
OH-Prolin	4.0	3.3	3.1	3.6	4.7	3.3	3.8	2.3	3.4	3.9	2.4	3.4	4.7	2.3
Taurin	3.6	3.2	3.1	3.8	3.0	3.8	3.4	3.5	4.6	2.8	3.6	3.5	4.6	2.8

Analyser av rognkjeks med katarakt

Tabell 2. Vekt, lengde, katarakt score og analyse av histidin og NAH i linse hos villinnfanget rognkjeks stamfisk og fra rekrutter fra to anlegg (gjennomsnitt \pm SD; n=10-15). Anlegg 10 ble inkludert for å verifisere funn fra de to øvrige gruppene.

Fri aminosyre ($\mu\text{mol/g ww}$)	Villfisk n=10		Anlegg 12 Rekrutt n=10		Anlegg 10 Rekrutt n=15		Vill vs 12 t-test	12 vs 10 t-test
	Snitt	Sd	Snitt	Sd	Snitt	Sd		
O-Phospho-L-serin	0,04	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	-
Taurin	2,72	0,77	3,13	0,57	1,67	0,91	ns	0,000
O-Phosphoethanolamin	2,13	0,48	4,48	1,39	2,23	0,46	0,000	0,001
Urea	1,41	0,36	0,97	0,32	0,00	0,00	0,024	0,000
L-Aspartic acid	0,34	0,04	0,75	0,33	1,07	0,32	0,005	0,027
L-Threonin	0,18	0,07	0,62	0,29	0,51	0,17	0,001	ns
L-Serin	0,29	0,08	0,72	0,35	0,75	0,12	0,002	ns
L-Asparagin	0,05	0,03	0,38	0,46	0,07	0,08	ns	ns
L-Glutamic acid	4,15	0,21	6,56	0,79	5,62	0,83	0,000	0,010
L-Glutamin	0,42	0,24	1,34	2,30	0,02	0,03	ns	ns
L-Prolin	0,15	0,06	0,25	0,16	0,59	0,20	ns	0,000
L-Glycin	0,22	0,05	0,87	0,13	2,11	0,28	0,000	0,000
L-Alanin	0,89	0,13	2,48	0,58	2,30	0,37	0,000	ns
L-Citrullin	0,10	0,09	0,66	0,13	0,00	0,00	0,000	0,000
L-Alfa-Amino-n-Butyric acid	0,17	0,07	0,28	0,35	0,01	0,03	ns	0,033
L-Valin	0,40	0,20	0,77	0,58	0,98	0,50	ns	ns
L-Cystin	0,01	0,01	0,55	0,14	0,98	0,19	0,000	0,000
L-Methionin	0,16	0,15	0,96	0,79	2,15	0,41	0,018	0,001
Cystathionin2	0,37	0,20	1,66	0,88	9,33	3,58	0,002	0,000
L-Isoleucin	0,19	0,09	0,30	0,26	0,38	0,30	ns	ns
L-Leucin	0,56	0,16	1,13	0,77	1,69	0,75	ns	ns
L-Tyrosin	1,00	0,23	1,10	0,57	0,93	0,28	ns	ns
B-Alanin	-	-	-	-	-	-		
L-Phenylalanin	0,25	0,14	16,9	12,2	25,9	10,2	0,002	ns
DL-Beta-Aminoisobutyrat	0,02	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,041	-
Gamma-Amino-n-butyrat	-	-	-	-	-	-		-
Ethanolamin	0,06	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,029	-
Ammonium klorid	0,03	0,01	0,14	0,07	0,52	0,38	0,002	0,002
L-Lysin	0,09	0,03	0,26	0,09	0,60	0,09	0,000	0,000
1-Methyl-L-Histidin	0,02	0,01	0,25	0,10	0,14	0,07	0,000	0,016
L-Histidin	0,27	0,05	0,45	0,18	0,89	0,22	0,010	0,000
L-Tryptophan	0,52	0,15	-	-	-	-	0,000	-
Anserin	-	-	-	-	0,08	0,07		0,001
Carnosin	-	-	-	-	-	-		-

Analyser av rognkjeks med katarakt

Arginin	0,01	0,01	0,08	0,02	0,33	0,08	0,000	0,000
L-Histidin	0,44	0,07	0,91	0,20	2,14	0,34	0,000	0,000
Na-Acetyl-L-Histidin	7,15	1,18	2,55	1,73	4,25	1,44	0,000	0,020
Sum AA	24,2	1,3	50,6	10,4	66,0	10,2	0,000	0,002
Lengde (cm)	46,0	2,9	14,2	1,5	11,5	0,9	0,000	0,000
Vekt (g)	3003	548	113	36	70	15	0,000	0,004
Score VØ (0-4)	0,7	0,9	1,7	1,6	1,7	1,0	ns	ns
Score HØ (0-4)	0,7	0,9	1,7	1,6	1,9	1,0	ns	ns
Sum kataraktsscore (0-8)	1,4	1,9	3,4	3,1	3,6	1,9	ns	ns

Analyser av rognkjeks med katarakt

Tabell 3. Analyse av fri aminosyrer i muskelvev ($\mu\text{mol/g ww}$) hos rognkjeks fra villinnfanget rognkjeks stamfisk sammenliknet med rekrutter fra ett av anleggene (gjennomsnitt \pm SD; $n=10$). Det var neglisjerbare konsentrasjoner av His og NAH, mens His dipeptidene Ans og Car ikke ble funnet.

Muskel $\mu\text{mol/g ww}$	Villfisk n=10		Anlegg 12 Rekrutt n=10		t-test
	Snitt	Sd	Snitt	Sd	
O-Phospho-L-serine	-	-	-	-	
Taurine	5,00	1,50	3,70	1,11	ns
O-Phosphoethanolamine	0,09	0,02	0,19	0,06	0,000
Urea	1,17	0,39	1,26	0,33	ns
L-Aspartic acid	0,06	0,01	0,43	0,18	0,000
Hydroxy-L-Proline	0,00	0,00	0,28	0,17	0,001
L-Threonine	0,04	0,01	0,32	0,16	0,000
L-Serine	0,06	0,02	1,08	0,59	0,000
L-Asparagine	0,01	0,01	0,07	0,09	ns
L-Glutamic acid	0,17	0,06	0,49	0,14	0,000
L-Glutamine	0,06	0,03	0,06	0,04	ns
L-Sarcosine	-	-	-	-	
L-Alfa-Amino adipic acid	-	-	-	-	
L-Proline	0,04	0,01	0,95	0,84	0,007
L-Glycine	0,13	0,03	5,94	2,25	0,000
L-Alanine	0,27	0,06	4,13	2,36	0,001
L-Citrulline	0,00	0,00	0,01	0,03	ns
L-Alfa-Amino-n-Butyric acid	0,01	0,01	0,01	0,01	ns
L-Valine	0,07	0,02	0,10	0,04	0,037
L-Cystine	-	-	-	-	
L-Methionine	0,02	0,01	0,06	0,03	0,006
Cystathionine1	-	-	-	-	
Cystathionine2	0,08	0,10	1,64	1,08	0,002
L-Isoleucine	0,04	0,01	0,06	0,02	0,024
L-Leucine	0,08	0,02	0,12	0,04	0,015
L-Tyrosine	0,02	0,02	0,05	0,02	0,015
B-Alanine	0,00	0,00	0,38	0,15	0,000
L-Phenylalanine	0,02	0,01	0,71	0,70	0,013
DL-Beta-Aminoisobutyric acid	0,00	0,00	0,01	0,02	ns
Gamma-Amino-n-Butyric acid	0,20	0,04	0,00	0,00	0,000
Ethanolamine	0,00	0,01	0,00	0,00	ns
Ammonium chloride	0,71	0,16	1,32	0,43	0,002
Hydroxylysine1	-	-	-	-	
Hydroxylysine2	-	-	-	-	

Analyser av rognkjeks med katarakt

L-Ornithine	0,01	0,00	0,05	0,03	0,002
L-Lysine	0,07	0,03	0,48	0,14	0,000
1-Methyl-L-Histidine	0,00	0,00	0,03	0,02	0,000
L-Histidine	0,02	0,01	0,20	0,10	0,000
L-Tryptophan	-	-	-	-	
3-Methylhistidine	-	-	-	-	
Anserine	-	-	-	-	
Carnosine	-	-	-	-	
Arginine	0,02	0,01	0,08	0,03	0,000
L-Histidine	0,02	0,00	0,25	0,13	0,000
Na-Acetyl-L-Histidine (NAH)	0,01	0,00	0,02	0,01	0,001
Sum aminosyrer	8,47	1,73	24,25	8,58	0,000
Lengde (cm)	46,0	2,9	14,2	1,5	0,000
Vekt (g)	3003	548	113	36	0,000

Analyser av rognkjeks med katarakt

Tabell 4. Analyse av fri aminosyrer og NAH i hjertevev ($\mu\text{mol/g ww}$) hos villinnfanget rognkjeks stamfisk og rekrutter fra ett av anleggene (gjennomsnitt \pm SD; $n=10$). Det var ikke forskjell i His og neglisjerbare konsentrasjoner av NAH. His dipeptidene Ans og Car ikke ble funnet.

Hjerte $\mu\text{mol/g ww}$	Villfisk n=10		Anlegg 12 Rekrutt n=10		t-test
	Snitt	Sd	Snitt	Sd	
O-Phospho-L-serine	0,02	0,02	0,00	0,00	0,008
Taurine	31,1	7,2	12,1	1,5	0,000
O-Phosphoethanolamine	1,04	0,22	1,29	0,19	0,045
Urea	1,97	0,88	1,53	0,59	ns
L-Aspartic acid	0,79	0,24	0,67	0,13	ns
Hydroxy-L-Proline	0,00	0,00	0,26	0,19	0,002
L-Threonine	0,95	0,41	1,30	0,39	0,049
L-Serine	1,89	0,79	2,50	0,59	ns
L-Asparagine	0,78	0,56	0,74	0,40	ns
L-Glutamic acid	3,92	1,27	2,58	0,68	0,021
L-Glutamine	1,22	0,43	1,71	0,41	0,020
L-Sarcosine	-	-	-	-	
L-Alfa-Aminoadipic acid	-	-	-	-	
L-Proline	0,78	0,38	1,08	0,37	ns
L-Glycine	1,13	0,33	1,96	0,39	0,000
L-Alanine	4,62	1,55	6,93	1,23	0,002
L-Citrulline	-	-	-	-	
L-Alfa-Amino-n-Butyric acid	0,03	0,04	0,00	0,01	0,040
L-Valine	1,02	0,53	1,63	0,56	0,022
L-Cystine	0,01	0,02	0,00	0,00	ns
L-Methionine	0,82	0,48	1,01	0,31	ns
Cystathionine1	-	-	-	-	
Cystathionine2	0,15	0,08	0,46	0,27	0,005
L-Isoleucine	0,53	0,27	0,71	0,29	ns
L-Leucine	2,32	1,18	2,54	0,87	ns
L-Tyrosine	0,63	0,32	0,81	0,27	ns
B-Alanine	0,19	0,42	0,52	0,40	0,045
L-Phenylalanine	0,93	0,47	1,88	1,03	0,039
DL-Beta-Aminoisobutyric acid	0,02	0,06	0,00	0,00	ns
Gamma-Amino-n-Butyric acid	-	-	-	-	
Ethanolamine	-	-	-	-	
Ammonium chloride	1,11	0,51	0,76	0,33	ns

Analyser av rognkjeks med katarakt

Hydroxylysine1	0,02	0,04	0,06	0,03	0,019
Hydroxylysine2	-	-	-	-	
L-Ornithine	0,00	0,01	0,00	0,00	ns
L-Lysine	1,62	0,65	1,83	0,55	ns
1-Methyl-L-Histidine	0,00	0,00	0,02	0,01	0,000
L-Histidine	0,57	0,16	0,75	0,22	ns
L-Tryptophan	0,06	0,14	0,19	0,08	0,004
3-Methylhistidine	0,19	0,39	0,00	0,00	ns
Anserine	-	-	-	-	
Carnosine	-	-	-	-	
Arginine	1,08	0,55	1,30	0,43	ns
L-Histidine	0,78	0,47	0,89	0,20	ns
Na-Acetyl-L-Histidine	0,02	0,01	0,07	0,01	0,000
Sum AA	61,5	15,0	49,2	9,2	0,030
Lengde (cm)	46	3	14	1	0,000
Vekt (g)	3003	548	113	36	0,000

Analyser av rognkjeks med katarakt

Tabell 5. Vekt, lengde, katarakt score og analyse av histidin og NAH i linse hos rognkjeks fra de ulike anleggene (gjennomsnitt \pm SD; n=15).

Anlegg	n=15	Lengde	Vekt	Katarakt	Score		L-Histidin $\mu\text{mol/g}$ ww	NAH $\mu\text{mol/g}$ ww
		TL	W	VØ	HØ	SUM		
				(0-4)	(0-4)	(0-8)		
1-	mean	5.8	11	0.5	0.6	1.1	2.47	2.00
	SD	0.8	4	0.6	0.6	1.2	0.92	1.35
2-	mean	6.2	11	0.2	0.5	0.7	1.85	0.98
	SD	0.7	3	0.6	1.0	1.3	0.59	0.30
3-	mean	30.2	947	1.9	1.5	3.4	0.79	1.53
	SD	2.2	177	1.3	1.4	2.6	0.32	1.35
4-	Mangler prøver		----	----	----	----	----	----
5-	mean	28.9	1155	2.9	2.8	5.7	1.28	2.66
	SD	3.7	449	1.2	1.0	2.2	0.36	1.49
6-	mean	8.3	29	1.3	1.3	2.5	1.65	3.18
	SD	1.2	15	0.8	0.6	1.3	0.27	2.47
7-	mean	13.1	104	0.9	1.2	2.1	1.87	4.93
	SD	1.3	33	1.1	1.1	2.2	0.39	2.80
8-	mean	15.4	46	1.9	1.8	3.7	0.90	8.86
	SD	2.9	37	1.0	0.9	1.8	0.16	1.94
9-	mean	29.8	1083	3.5	3.6	7.1	0.97	2.98
	SD	3.5	417	0.5	0.5	1.0	0.23	1.97
10-	mean	11.5	70	1.7	1.9	3.6	2.14	4.25
	SD	0.9	15	1.0	1.0	1.9	0.34	1.44
11-	mean	26.3	631	3.5	3.5	7.0	1.05	4.65
	SD	3.4	396	1.1	1.1	2.2	0.22	2.22
12-	mean	14.6	127	1.6	1.6	3.2	0.95	2.58
	SD	1.6	50	1.5	1.5	3.0	0.26	1.65
Villfisk	mean	46.6	3269	1.0	1.0	2.0	0.43	6.97
	SD	2.8	640	1.1	1.1	2.1	0.07	1.12

REFERANSER

Andersen S.M., Waagbo, R. & Espe M. (2016) Functional amino acids in fish nutrition, health and welfare. *Frontiers in Bioscience, Elite* **8**,143-169.

Bjerkås E. & Bjørnestad E. (1999) Is there a connection between rapid fluctuation in water temperature and cataract development in the Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.)? *Bull Eur Assoc Fish Pathol* **19**, 166–169.

Bjerkås E., Bjørnestad E. & Breck O. (2001) Water temperature regimes affect cataract development in smolting Atlantic salmon *Salmo salar* L. *J Fish Dis* **24**, 281–291.

Bornø, G., Alarcon, M., Linaker, M.L., Colquhoun, D., Nilsen, H., Gu, J., Gjerset, B., Hamsen, H., Thoen, E., Gulle, S. and Jensen, B.B. (2016) Akutt dødelighet hos rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) i 2015, Veterinærinstituttets rapportserie, 2, 2016, pp. 44, Oslo.

Breck O., Bjerkås E., Campbell P., Rhodes J.D., Sanderson J. & Waagbø R. (2005) Histidine nutrition and genotype affect cataract development in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Fish Diseases* **28**, 357-371.

Jonassen. T.M., Hamadi. M., Reynolds P., Nytrø, A. & Imsland. A.K. (2016) Forekomst og mulige årsak til katarakt hos rognkjeks. Akvaplan-niva rapport 7708 til FHF. Aqua Kompetanse og Akvaplan-niva. pp. 54.

Liakonis K.M., Waagbø R., Foss A., Breck O. and Imsland, A.K. (2012) Effects of chronic and periodic exposures to ammonia on the eye health in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish. Physiol. Biochem.* **38**, 421-430.

Remø S.C., Erstad B., Imsland A.K. & Waagbø R. (2011) Eye health in juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L, at two commercial production densities. *Aquaculture* **321**, 21-25.

Remø, S.C. Hevrøy, E.M. Olsvik P.A., Fontanillas R., Breck O. & Waagbø R. (2014) Dietary histidine requirement to reduce the risk and severity of cataracts is higher than the requirement for growth in Atlantic salmon smolt, independently of the dietary lipid source. *Brit. J. Nutr.*, **111**, 1759-1772.

Togashi M, Okuma E & Abe H (1998) HPLC determination of N-acetyl-L-histidine and its related compounds in fish tissues. *Fish Sci* 64, 174–175.

Waagbø R., Tröbe C., Koppe W., Fontanillas R. & Breck O. (2010) Dietary histidine supplementation prevent cataract development in adult Atlantic salmon, *Salmo salar* L in sea. *Brit. J. Nutr.* 104, 1460-1470.