



Uit

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

Fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi - Norges fiskerihøgskole

Effekt av diett med ulike mengder langkjedede omega-3 fettsyrer på tarmhelse hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.) i ferskvann

—
Lisa Furnesvik

Masteroppgave i Akvamedisin (30 stp)

Mai 2018



Forord

Denne oppgaven ble utført ved Fakultetet for biologi, fiskeri og økonomi, ved Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø, Norges arktiske universitet. Oppgaven ble påbegynt mars 2017 og avsluttet mai 2018.

Først vil jeg takke min hovedveileder **Tore Seternes** som har introdusert meg til dette spennende prosjektet. Han har vært en fantastisk veileder gjennom hele prosessen, og har vist stort engasjement og positivitet som har smittet over. Til tross for stor geografisk avstand (California) har han alltid stilt opp på Skype, som jeg har satt stor pris på.

I tillegg vil jeg rette en stor takk til min bi-veileder **Roy A. Dalmo** som har vært til stor hjelp under histopatologiske undersøkelser og under skriveprosessen.

Jeg vil også takke **Toni Erkinharju** som har vært til utrolig stor hjelp under laboratoriearbeidet, både i Tromsø og på Veterinærinstituttet i Harstad. Han har også vært svært behjelpelig med å finne god og relevant litteratur, og vært til stor hjelp under skriveprosessen. Takk til min gode venninne **Christina Jensen** som har vært god støtte og gitt gode tips til skrivingen.

Jeg vil også takke de ansatte på **Veterinærinstituttet i Harstad** som vært svært behjelpelig med laboratoriearbeidet, og med tolkning av histologiske snitt.

Sist, men ikke minst, må jeg få takke mine kjære medstudenter. Dere har gjort hverdagen til en glede de siste årene.

Tromsø 15. mai 2018



Lisa Furnesvik

Sammendrag

Marine oljer og fettsyrer har blitt en begrenset ressurs, og blir dermed erstattet av plantebaserte fettsyrer i form av rapsolje i fôr til atlantisk laks (*Salmo salar* L.). I dette arbeidet har vi studert den biologiske effekten av fire forskjellige dietter på tarmhelse hos laks i ferskvannsfase. Diettene bestod av enten ren rapsolje (RO), ren fiskeolje fra ansjos (AO), en blanding av rapsolje og ansjosolje (RO/AO), eller et konsentrat av EPA/DHA (EPA/DHA) som fettsyrekilde.

I dette forsøket ble 160 laks fordelt på fire kar, et for hver diettgruppe. Det ble registrert kroppsvekt og kroppslengde av hver fisk ved prøveuttak. 10 fisk ble tatt ut på dag 0 som kontroll. De resterende uttakene (10 fisk per diettgruppe) ble tatt ut ved dag: 21, 42, 63 og 84. Ved avslutning av forsøket var det ingen statistisk signifikant forskjell i vekt og lengde mellom diettgruppene.

Det ble utført makroskopisk undersøkelse av baktarm fra diettgruppene, samt tatt vevsprøver fra tarm til histologiske undersøkelser. Ved første prøveuttak på dag 21, ble det observert morfologisk avvik i baktarm fra en fisk. Flere unormale tarmer ble observert ved senere prøveuttak, og ved forsøkets slutt på dag 84 var det flere unormale enn normale tarmer i alle diettgruppene. Det ble videre gjort en sammenligning av tilvekst (vekt/lengde) på individ med morfologisk normale og unormale tarmer, og ut ifra disse resultatene framsto individer med avvikende makroskopisk tarmmorfologi, å ha mindre tilvekst. På grunn av et lavt antall prøver i enkelte diettgrupper, ble det ikke beregnet statistikk på dette datamaterialet.

Histopatologiske undersøkelser av tarmsnitt ble utført ved hjelp av lysmikroskopi, hvor det ble benyttet et modifisert semikvantitativt graderingssystem for bedømming av inflammasjon, vakuolisering og morfologi. Resultatene viste ingen statistiske signifikante forskjeller for inflammasjon mellom diettgrupper eller uttakstidspunkter. For vakuolisering og morfologiske forandringer var det signifikante forskjeller mellom det første og det siste prøveuttaket. For morfologiske forandringer var det også signifikant forskjell mellom diettgruppe RO og AO ved avslutning av forsøket på dag 84.

Ved hjelp av flere spesialfarginger av histologiske snitt, ble det vist rekruttering av immunceller til tarmvevet og tilstedeværelse av både gram-positive og gram-negative bakteriekolonier.

Det ble utført immunhistokjemiske undersøkelser for å undersøke tilstedeværelse av inflammasjon i histologiske tarmsnitt. Antistoffene α -IgM og α -PCNA ble testet i alle

diettgrupper ved siste prøveuttak på dag 84. IgM ble påvist under basalmembranen, i mukus rundt tarmtottene, og både i og rundt bakteriekolonier. PCNA ble påvist i epitelceller og i områder hvor det var observert inflammasjon i histologiske undersøkelser. Resultatene viste positiv binding i alle diettgrupper for begge antistoffene.

Forkortelser

ARA	Arakidonsyre, 20:4n-6
ALA	α -Linolensyre, 18:3n-3
AO	Ansjosolje
BSA	Bovine serum albumin
CH ₃ OH	Metanol
CMS	Kardiomyopatisyndrom (Cardiomyopathy syndrome)
DCM	Diklorometan
DHA	Dokosaheksaensyre, 22:6n-3
DI	Baktarm (Distal intestine)
EFS	Essensielle fettsyrer
EPA	Eikosapentaensyre, 20:5n-3
FL	Fosfolipider
EtOH	Etanol
H ₂ O	Vann
H ₂ O ₂	Hydrogenperoksid
HSMB	Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse
HUFA	Høyt flerumettede fettsyrer (Highly unsaturated fatty acids)
IgM	Immunglobulin M
IPNV	Infeksiøs pancreas nekrose virus
IHC	Immunhistokjemi
LA	Linolsyre, 18:2n-6
MI	Midttarm (Mid intestine)
MUFA	Enumettede fettsyrer (Monounsaturated fatty acids)
NaCl	Natriumklorid
NFE	Nitrogen-fritt ekstrakt
PBS	Fosfat-bufret saltvann (Phosphate buffered saline)
PCNA	Prolifererende celle nukleære antigen (Proliferating cell nuclear antigen)
PUFA	Flerumettede fettsyrer (Polyunsaturated fatty acids)
PC	Pylorus blindsekkene (Pyloric caeca)
PD	Pankreassykdom (Pancreatic disease)
RO	Rapsolje
RT	Romtemperatur
SGR	Spesifikk vekstrate (Specific growth rate)
SPC	Soyaproteinkonsentrat
TAG	Triacylglycerol
TBS	Tris bufret saltvann (Tris-buffered saline)

Innholdsfortegnelse

1. Introduksjon	1
1.1 Akvakultur og produksjon av atlantisk laks	1
1.2 Endring i fôrsammensetning	1
2. Bakgrunn	3
2.1 Fettsyrer	3
2.1.1 Nomenklatur, essensielle fettsyrer og EPA og DHA	3
2.2 Fettsyrer og vekst	5
2.3 Fettsyrer og helse	6
2.3.1 Human helse	6
2.3.2 Fiskehelse	7
2.3.3 Tarmhelse hos laksefisk	8
2.4 Generell tarmanatomi hos fisk	11
2.4.1 Tarmstrukturen	11
2.4.2 Celler i tarmvev hos laks	13
2.5 Fettsyrer og inflammasjon	14
2.6 Immunforsvaret i tarm hos benfisk	16
2.6.1 Antistoffer	17
2.7 Mikrobiota	18
3. Problemstilling og formål	19
4. Materialer og metoder	20
4.1 Kjemikaler	20
4.2 Forsøksfisk, oppsett og fôringsregimer	21
4.3 Fôr	22
4.3.1 Fettsyresammensetning i forsøksfôret	24
4.4 Prøveuttak	25
4.5 Analyser	26
4.5.1 Registrering av velferdsindikatorer	26
4.5.2 Histologi	28
4.5.3 Dehydrering og innstøpning	29
4.5.4 Snitting av vevsprøver	29

4.5.5	Histologisk farging og montering	30
4.5.6	Spesialfarging	31
4.5.7	Immunhistokjemi	35
4.5.8	Antistoffer	36
4.5.9	Dehydrering, innstøping og snitting av vev	36
4.5.10	Deparafinisering og rehydrering	37
4.5.11	Blokking og immunhistokjemisk farging	37
4.5.12	Kontrastfarging og dehydrering	39
4.5.13	Histopatologiske undersøkelser	40
4.5.14	Undersøkelse av mikroorganismer	46
4.6	Statistiske analyser og grafisk fremstilling	47
5.	Resultater	48
5.1	Velferdsindikatorer	48
5.1.1	Overlevelse	48
5.1.2	Totalvekt for fisk i de ulike diettgruppene	48
5.1.3	Vekt og lengde utvikling	50
5.2	Makroskopiske undersøkelser av baktarm	52
5.2.1	Kontrollprøve	52
5.2.2	Baktarmer fra laks på forskjellige forsøksdietter	53
5.2.3	Forholdet mellom andel normale- og unormale baktarmer	57
5.2.4	Vekt- og lengdeutvikling for fisk med normal baktarm i forhold til fisk med unormal baktarm	58
5.3	Histopatologiske undersøkelser av baktarm	61
5.3.1	Kontroll prøver	61
5.3.2	Histopatologisk undersøkelse av forsøksfisk	63
5.3.3	Spesialfarging	69
5.3.4	Immunhistokjemi	70
5.4	Undersøkelse av mikroorganismer	75
	Spesialfarging med metylen- og toluidinblått for påvisning av mikroorganismer	75
5.5	Sammenligning mellom makroskopiske og histologiske funn	78
6.	Diskusjon	79
6.1	Velferdsindikatorer	80
6.1.1	Overlevelse og tilvekst	80
6.2	Makroskopiske undersøkelser av baktarm	82
6.3	Histopatologisk undersøkelse av baktarm	83

6.3.1	Spesialfarging	87
6.3.2	Immunhistokjemi	88
6.4	Undersøkelser av mikroorganismer	90
6.5	Sammenligning mellom makroskopiske og histologiske funn	92
6.6	Dyrevelferd og etikk	93
6.7	Vurdering av metodene	93
6.8	Videre arbeid	95
7.	Konklusjon	96
Referanser	97
Appendiks I	I
Appendiks II	II
Appendiks III	VI

1. Introduksjon

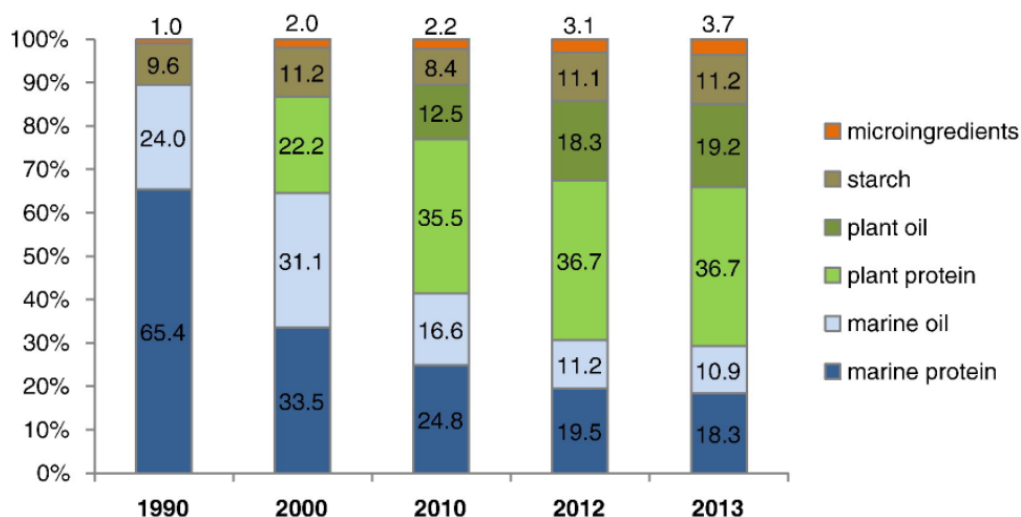
1.1 Akvakultur og produksjon av atlantisk laks

Akvakultur er for tiden den raskest voksende næringen innenfor husdyrproduksjon. Det har vært kontinuerlig ekspansjon de siste 25 årene for å klare å imøtekomme etterspørsel av fisk, noe fiskeri ikke klarer alene (Fisheries, 2011; Spoden & Nierenberg, 2013; Lazzarotto et al., 2015). Akvakultur vil fortsatt være en av de raskest voksende sektorene innenfor matproduksjon, til tross for at vekstraten synker fra 5,4 % fra forrige tiår, til 3 % i perioden 2016-25. En stor del av økningen er forventet å være innen ferskvannssarter. I 2025 er det forventet at fisk fra akvakulturnæringen skal stå for hele 57 % av fisk som konsumeres på verdensbasis (Thu & Lebailly, 2017; Tran Thi Nang & Lebailly, 2017). Laksefisk (salmonider) regnes som høyverdige fiskearter, og utgjør totalt 14 % av global fiskerihandel (Moffitt & Cajas-Cano, 2014). Norge er en ledende nasjon innen oppdrett av atlantisk laks (*Salmo salar* L.) (heretter omtalt som laks), og lakseoppdrett har vært en kommersiell suksess for landet (Hersoug, 2015).

1.2 Endring i fôrsammensetning

Laksefisk er kjøttetende (karnivore) fiskearter, og fiskemel og fiskeolje har tradisjonelt vært hovedingrediensene i fôr som benyttes til laks i oppdrett. I takt med en økende etterspørsel av fiskefôr, har det blitt økt fokus på at produksjonene skal være bærekraftig. Begrenset tilgang på marine råvarer har fått akvakulturnæringen til å søke etter alternative råvarer til bruk i fiskefôr (Powell, 2003; Torstensen et al., 2008; Naylor et al., 2009; Moldal et al., 2014). Planteolje er et eksempel på en råvare som kan erstatte noe av fiskeoljen som vanligvis benyttes i fiskefôr. Den totale andelen marine råvarer i fôret sank fra 90 % i 1990 til under 30 % i 2013 (Figur 1) (Ytrestøyl et al., 2015). Bruk av plantebaserte produkter kan være både økonomisk og bærekraftig fordelaktig, men man må også ta i betraktning hvordan slike nye næringsstoffer og eventuelle antinæringsstoffer kan påvirke fiskehelsen (Naylor et al., 2009).

Introduksjon



Figur 1. Endringer i førsammensetning til norsk oppdrettslaks mellom 1990 til 2013.

Hver ingrediens er vist i prosent av den totale dietten (Ytrestøyl et al., 2015).

I norsk lakseoppdrett er rapsolje det primære vegetabilske substituttet for fiskeolje. Rapsolje er foretrukket på grunn av stabil tilgjengelighet og et relativt lavt omga-6/omega-3 forhold sammenlignet med andre aktuelle vegetabilske oljer med en akseptabel pris (Ytrestøyl et al., 2015).

God kunnskap om fiskens ernæringsmessige behov er nødvendig. I de siste årene har det vært økt fokus og forskning på effekter av økt bruk av vegetabilske planteoljer og redusert innhold av marine råvarer i fôr (Torstensen et al., 2013), men det er fremdeles behov for mer forskning på dette området.

2. Bakgrunn

2.1 Fettsyrer

Fett, også kjent som lipider, er en gruppe organiske molekyler som ikke lar seg løse i vann, men i ulike organiske løsemidler. Eksempler på lipider er kolesterol, fosfolipider (FL) og triacylglyserol (TAG). TAG fungerer som et energilager i kroppen, og er det mest energitette av alle næringsstoffene. Sammen med kolesterol har FL en strukturell rolle og fungerer som byggesteiner i alle cellemembraner. Fett fungerer også som ulike hormoner og signalmolekyler, og fettsyrer kan regulere cellens avlesning av DNA (Torstensen et al., 2013).

Fettsyrer er hydrokarbonkjeder med et varierende antall karbonatomer, og er de viktigste byggesteinene i mange lipider. Om karbonkjeden er mettet med hydrogenmolekyler kalles det en mettet fettsyre. Dersom et hydrogenatom fjernes, dannes det en dobbeltbinding mellom karbonatomene, og det blir en umettet fettsyre. Mettet fett er antatt å være foretrukket som energisubstrat, og førte til økt fettforbrenning i et forsøk med leverceller fra laks (Stubhaug et al., 2007).

Strukturelt er fettsyrer karboksylsyrer, hvor hydrokarbonkjeden er flankert av en karboksyl- og en metylgruppe. Marine og anadrome organismer har relativ stor andel fettsyrer med lang hydrokarbonkjede (20C-22C), blant annet eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA) (Torstensen et al., 2013).

2.1.1 Nomenklatur, essensielle fettsyrer og EPA og DHA

Fettsyrer navnes ut fra antall karbonatomer i karbonkjeden, antall dobbeltbindinger og hvilken posisjon den første dobbeltbindingen har fra metylenden av karbonkjeden. For eksempel har EPA 20 karbonatomer, 5 dobbeltbindinger og den første dobbeltbindingen er i 3-posisjon fra metylenden. Navnsettingen blir da 20:5n-3, og EPA er en omega-3 fettsyre/n-3 fettsyre. Ut ifra antall dobbeltbindinger kan en fettsyre også deles inn i klasser (Torstensen et al., 2013). En fettsyre uten dobbeltbinding er umettet, fettsyrer med én dobbeltbinding er monoumettet (MUFA), fettsyrer med flere enn én dobbeltbinding er flerumettet (PUFA), og fettsyrer med flere enn fire dobbeltbindinger er høyt flerumettete (HUFA) (Waagbø, 2001).

Bakgrunn

En essensiell fettsyre er en fettsyre som ikke kan dannes i kroppen og dermed må tilføres gjennom næringsinntak. De flerumettede fettsyrene i omega-3 (18:3n-3) og omega-6 (18:2n-6) er essensielle for virveldyr. For laks er linolsyre (LA, 18:2n-6) og α -linolensyre (ALA, 18:3n-3) essensielle. Disse fettsyrene er forløpere for videre syntese av lengre fettsyrer, som for eksempel EPA, DHA og arakidonsyre (ARA, 20:4n-6) (Henderson & Tocher, 1987). Selv om det er mulig å omdanne EPA og DHA fra LA og ALA er det variasjon mellom ulike arter på hvor effektiv denne omdanningen er, og det er nødvendig å få tilført disse fettsyrene gjennom kostholdet for å dekke hele organismens behov (Torstensen et al., 2013).

EPA befinner seg i fosfolipider i cellemembranen og fungerer som en forløper til en gruppe signalstoffer i kroppen kalt eikosanoider. Det kan også dannes eikosanoider fra omega-6 fettsyren ARA. Eikosanoider fra omega-3 og omega-6 familien kan ha ulike, og i noen tilfeller motsatte effekter av hverandre. Balansen mellom EPA og ARA i cellemembranen er derfor svært viktig, siden de kan påvirke biologiske funksjoner som inflammasjon, immunrespons og blodplateaggregering (Torstensen et al., 2013).

2.2 Fettsyrer og vekst

Det er forventet at en endring i fettsyresammensetning i fôret vil få konsekvenser for fiskens tilvekst. I ferskvannsfasen er behovet for EPA og DHA satt til minimum 1 % av fôrsammensetningen for å unngå redusert tilvekst (Ruyter et al., 2000a; 2000b). Det er også vist at laks i sjøvannsfasen tolererer høyere innblandingsnivåer av ulike typer planteoljer eller planteoljemikser (Torstensen et al., 2013). Nivåer under 1 % av EPA og DHA i fôr gir ikke redusert vekst, men kan føre til en mindre robust laks (Glencross et al., 2014).

Andre studier viser at fiskeolje kan erstatte vegetabiliske oljer i fôr fullstendig uten å medføre signifikante endringer i vekst i (Bell et al., 2001; 2005). En studie som fulgte oppdrettslaks gjennom en hel produksjonssyklus fant ingen signifikante forskjeller i vekst mellom grupper fôret med 100 % vegetabilisk olje og 100 % fiskeolje i den første halvdel av produksjonen. Senere i forsøket hadde til og med gruppen fôret med vegetabilisk olje oppnådd bedre tilvekst enn gruppen fôret med fiskeolje. Dette kan skyldes at hovedkilden til proteinet i forsøksfôret var fiskemel, som inneholder noe fiskeolje, og dette kan ha vært nok til å dekke fiskens basale behov for LC n-3 HUFA under forsøket (Torstensen et al., 2005). Lazzarotto et al., (2015) viste i en studie at regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) fôret på en ren plantebasert diett over en periode på 3 år var i stand til å vokse og effektivt biotransformere planteoljer. I tillegg var fisken i stand til å produsere egg og levende avkom. Eggene var imidlertid mindre, og det var lavere overlevelse enn hos fisk fôret med andre dietter i forsøket.

2.3 Fettsyrer og helse

2.3.1 Human helse

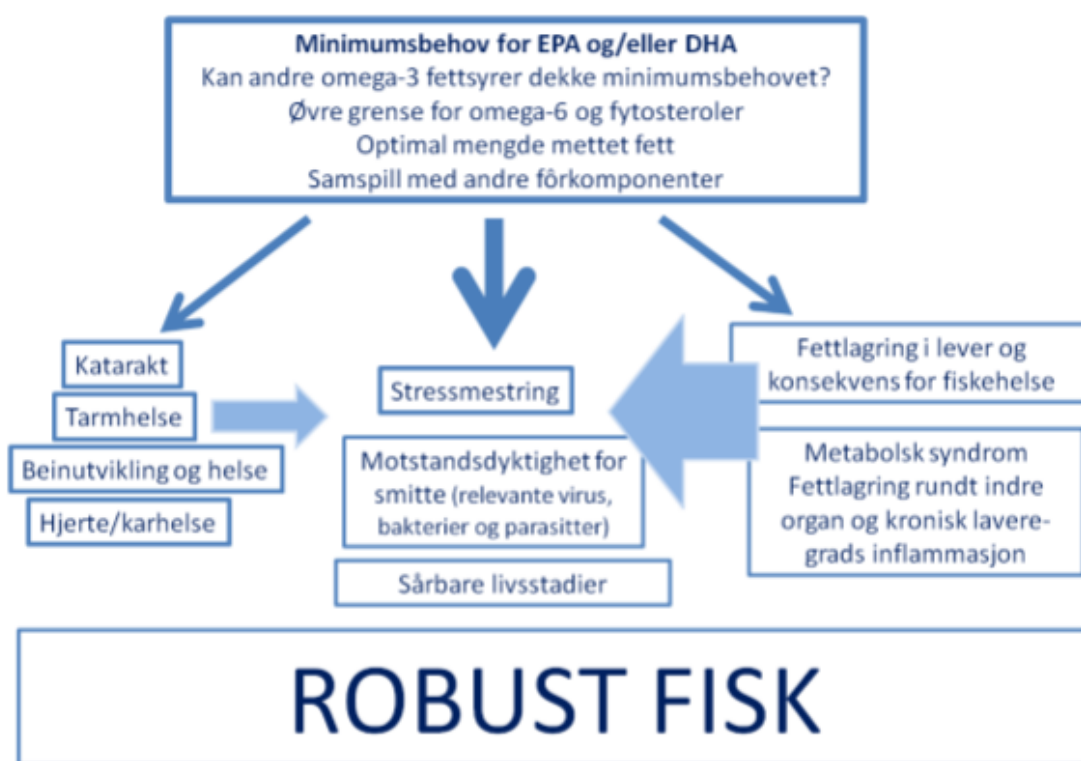
Det er dokumentert flere helsefremmende effekter for mennesker ved inntak av n-3 PUFA (Ghosh et al., 2013), og langkjedede (LC) n-3 HUFA (Cleland et al., 2005). Det kan virke forebyggende på en rekke sykdommer, for eksempel diabetes, hjerte- og karsykdommer, og flere inflammatoriske og neoplastiske prosesser, inkludert inflammatoriske tarmsykdommer og tarmkreft (Calder, 2012). En ny metastudie fra 2018, viste derimot ingen signifikant positiv effekt av n-3 fettsyrer på hjerte- og karsykdommer (Aung et al., 2018). n-3 HUFA kan ha en positiv effekt på oppmerksomhets- og hyperaktivitetsforstyrrelse, eller «Attention Deficit Hyperactivity Disorder» (ADHD) (Singh, 2005), og er viktig for utvikling av øyets netthinne, og nevrologisk og motorisk utvikling (Singh, 2005; Innis, 2007b; 2007a). Det er videre indikert at LC n-3 HUFA kan redusere lidelser relatert til fedme (Abeywardena & Belobrajdic, 2016), mild kognitiv svikt (Oulhaj et al., 2016), og har en positiv effekt på mild Alzheimers sykdom (Swanson et al., 2012). Motsetningsvis har en diett rik på n-6 fettsyrer hos pattedyr blitt assosiert med økt risiko for utvikling av ulcerøs kolitt (Investigators, 2009), og kan virke kreftfremkallende (Whelan & McEntee, 2004; Chapkin et al., 2007).

Studier har vist at fiskeoljeerstatning i moderate mengder med rapsolje, soyaolje, palmeolje eller olivenolje i formulerte dietter er godt egnet for fisk. Økt innhold av de vegetabiliske oljene i dietter vil imidlertid kunne påvirke nivået av fettsyrer i fettprofilen i kjøttet hos laksefisk. Nivået av n-3 flerumettede fettsyrer vil synke, noe som ikke er ønskelig siden disse er viktige for human helse (Bogevik, 2007). Mengden av EPA+DHA, omega-6 og enumettet fett i fileten som går til konsum endres også i takt med endring i fettsyresammensetningen i fôret. Andelen mettet fett øker derimot ikke i fileten, selv om mengden i fôret øker. Selv om det er mange negative sider ved å erstatte fiskeoljer i fôret med vegetabiliske oljer, er et positivt aspekt at det blir en reduksjon i innholdet av miljøgifter. (Bell et al., 2005). Miljøgifter som PCB og dioksin er kjent for å kunne akkumulere i både villfanget og oppdrettsfisk (Gruben, 2007).

Ved å optimalisere fôret til oppdrettslaks og -ørret, slik at minimumsbehovet av EPA/DHA er dekket, vil fisken fremdeles være en god kilde av omega-3 fettsyrer for humant konsum (Torstensen et al., 2013).

2.3.2 Fiskehelse

Det er forventet at endringer i fettsyresammensetning i fôret til salmonide arter vil føre til konsekvenser for fiskens vekst, utvikling og helse. Generelt vil erstatning av fiskeolje med vegetabiliske oljer føre til lavere nivå av EPA og DHA og et høyere nivå av 18 C fettsyrer i laks (Hardy et al., 1987; Polvi & Ackman, 1992; Bell et al., 1993; Waagbø et al., 1993). Fett og fettsyrer er sentrale for en rekke biologiske funksjoner, blant annet inflammasjonsrespons, cellens oppbygning, funksjon og avlesing av arvematerialet. Fettsyresammensetningen i fôr har blitt identifisert til å kunne påvirke flere aspekter av fiskehelse, blant annet tarmhelse, immunrespons, hjertehelse og stressresponser (Figur 2) (Torstensen et al., 2013).



Figur 2. Oppsummert fiskehelse og velferdstilstander som er dokumentert at påvirkes av fettsyresammensetning i fôret til laks (Torstensen et al., 2013).

Det er kjent at immunsuppresjon hos pattedyr er et av de første tegnene på feilernæring (Hudson et al., 1974), og dette vil sannsynligvis også gjelde for fisk (Torstensen et al., 2013). Fiskesykdommer utgjør enorme årlige tap i norsk fiskeoppdrett (Aunsmo et al., 2010). Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB), kardiomyopatisyndrom (CMS) og pankreassykdom (PD) er sykdommer som har hatt en økning siden 2005 (Hjeltnes et al., 2018). Dette er i samme periode hvor omega-3 nivået (EPA/DHA) i laksefilet begynte å gå ned (Torstensen et al., 2013).

Bakgrunn

Det er ikke vist en sammenheng mellom disse forekomstene. Det er imidlertid vist en sammenheng mellom hjertehelse og fettsyresammensetning, der innhold av EPA i fôr reduserer skade på hjertet, og reduserer betennelsesrespons hos laks med virussykdommene HSMB (Martinez-Rubio et al., 2012; 2013) og CMS (Martinez-Rubio et al., 2014). Motstandsdyktighet mot smittsomme bakteriesykdommer har også vært undersøkt i forhold til EPA/DHA innholdet i fôret, og det har blitt vist en mindre motstandsdyktighet ved lave EPA/DHA konsentrasjoner (Thompson et al., 1996).

Det er behov for mer kunnskap om konsekvensene for fiskens helse av betydelig reduksjon i andel mettett fett i fiskefôr. Det er også ønskelig å definere det optimale forholdet mellom omega-3 og omega-6 fettsyrer som både dekker minimumsbehovet for fisken, og som er innenfor øvre toleransegrense. I tillegg er det mangel på tilstrekkelig kunnskap om optimale fettsyresammensetninger i fôr hos laksefisk med tanke på sykdomsmotstand, stress og fiskens robusthet (Torstensen et al., 2013; Moldal et al., 2014).

2.3.3 Tarmhelse hos laksefisk

Tarmen hos laks er et multifunksjonelt organ med varierende fysiologiske roller som inkluderer ioneregulering og opptak av næringsstoffer. Overflaten av tarmen består av kun et lag med spesialiserte epitel celler. Disse fungerer blant annet som en barriere for patogene organismer og toksiner (Grosell, 2011; Minghetti et al., 2017). Det er flere patogene organismer som kan angripe tarmen hos laksefisk, og det er viktig med en frisk og motstandsdyktig tarm for å unngå infeksjon av mikroorganismer (Bøgwald & Dalmo, 2014).

I en studie gjennomført av Bæverfjord & Krogdahl (1996), ble patologiske symptomer i baktarm hos laks fremprovosert ved en diett rik på soyamel. Studien varte i en periode på seks uker, men etter bare tre uker på de eksperimentelle diettene kunne man se tydelige forandringer i baktarmen. De patologiske forandringene besto hovedsakelig av 1) forkortning av høyden på foldene i slimhinnen (mukosa); 2) tap av normal supranukleær vakuolisering av de absorberende cellene i tarmepitelet; 3) utvidelse av sentralt støtte/bindevev (stroma), med økt dannelse av bindevev; og 4) infiltrering av betennesceller i løst bindevev under tarmen (lamina propria). Betennelsen ble konkludert med å være en ikke-infeksiøs subakutt enteritt (tarmbetennelse), hvor en patogenese som involverer immunsystemet er sannsynlig (Bæverfjord & Krogdahl, 1996).

Bakgrunn

Fettsyreklider fra dietten har også vist seg å ha en effekt på tarm morfologi hos pattedyr. Hos gris har økt kosttilskudd med fiskeolje økt høyden av tarmtotter (villus) i tynntarmen, kombinert med en reduksjon i transkripsjonsnivåene av betennelsesrelaterte gener, sammenlignet med en diett med maisolje (Liu et al., 2012). Hos rotter er det også vist høyere villus i tarmen hos rotter føret med fiskeoljer, enn hos rotter føret med olivenolje og soyabønneolje (Rosa et al., 2010).

Andre studier har vist en signifikant forkortelse av tarmfoldene i midttarm hos fisk føret med forskjellige plantebaserte oljer, sammenlignet med fisk som har blitt føret med en diett med marine oljer (Moldal et al., 2014). Det er flere ganger blitt demonstrert både forkortelse og fortykkelse av mukosafoldene i bakre del av tarmen hos laks, kombinert med infiltrering av betennesceller i lamina propria ved dietter med relative høye mengder soyabønnemel og ertemel (Van den Ingh et al., 1991; Bæverfjord & Krogdahl, 1996; Penn et al., 2011). Sulting har også vist å kunne gi forandringer, som forkortelse og fortykkelse av mukosafoldene, og betennelsesinfiltrat i lamina propria (Bæverfjord & Krogdahl, 1996).

Tarmen er et viktig organ for omsetning av omega-3 fettsyrer hos regnbueørret. Studier har vist at tarmen (blindsekkene) var viktigere enn lever når det kom til katabolismen av isotopmerkede 18:3n-3 fettsyrer (Bell et al., 2001; 2003). Foreløpig vet man relativt lite om betydningen av lave nivåer av omega-3 fettsyrer med tanke på tarmhelse hos laksefisk. I ørrettarm har mangel på essensielle fettsyrer vist å føre til lav absorpsjon av mineraler (NA^+) (Nonnotte et al., 1987).

Det er påvist økt akkumulering av fett, i form av lipiddråper i tarmceller (enterocytter), når fiskeolje erstattes med ulike planteoljer. Dette har blitt observert hos flere fiskearter, blant annet arktisk røye (*Salvelinus alpinus*) (Olsen et al., 1998; 1999; 2000), regnbueørret (Caballero et al., 2002) og havabbor (*Sparus aurata*) (Caballero et al., 2003). Ruyter et al. 2006 har vist at en diett rik på soyaolje førte til økt fettakkumulering i tarm. Spesielt vil pro-inflammatoriske n-6 fettsyrer akkumuleres ved lave vanntemperaturer. Det fins fortsatt ingen klare bevis på at fettakkumulering i tarmceller påvirker inflammasjon i tarmen, som igjen vil påvirke fiskens velferd og helse. Det er også mulig at fettakkumuleringen etter et måltid avtar over tid, og ikke har langvarig negativ helseeffekt på fisken (Ruyter et al., 2006).

Steatoré (fett diaré) er det medisinske begrepet for flytende avføring, og er en indikasjon på ufordøyd (malfordøyd) eller dårlig absorbert (malabsorbert) fett i dietten (Penn, 2011). Histologiske observasjoner tyder på at malabsorpsjon kan skyldes problemer med transepitel transport, som resulterer i akkumulering av lipider i tarmepitelet. Hypervakuolisering har blitt

Bakgrunn

registrert hos flere forskjellige fiskearter, inkludert regnbueørret (Olsen et al., 2003; Daprà et al., 2011), røye (Olsen et al., 1999; Ringø et al., 2002) og karpe (*Cyprinus carpio*) (Fontagne et al., 1998). Vakuolene kan se ut til å fungere som et midlertidig lager for lipider (Tocher et al., 2008).

Stressmestring har blitt undersøkt i et fôringsforsøk, hvor marine råvarer ble byttet ut med vegetabiliske protein- og fettkilder (Oxley et al., 2010). Fisk fôret med 80 % planteprotein og 70 % planteolje (2,5 % EPA/DHA i fôret) hadde forøket plasma kloridverdier og forøket uttrykk av syklooksygenase, et enzym i tarmen, som omdanner ARA til prostaglandiner (et eikosanoid) etter stress. Dette tyder på osmotisk ubalanse og pro-inflammatoriske forhold i tarmen. Tarmen er den første barrieren for stressfaktorer fra fôr, og undersøkelser av tarmceller og lokal inflammasjon kan brukes som tidlige indikatorer for toksikologisk stress (Berntssen et al., 2004). Studier av laks viser at tarmen responderer med reduksjon i eikosanoider (hovedsakelig de som syntetiseres fra n-6 fettsyrer) etter fysisk stress (Olsen et al., 2012).

Man har fremdeles ikke god nok kunnskap om bakgrunnen for tarmsykdommer og tarmlidelser hos oppdrettsfisk. Fra tidligere studier er vannkvalitet, tette populasjoner, ernæring og tarminfeksjoner kjent for å forårsake inflammasjoner (Sundh et al., 2009; Niklasson et al., 2011; Oliva-Teles, 2012).

2.4 Generell tarmanatomi hos fisk

2.4.1 Tarmstrukturen

Morfologien mellom midttarm og baktarm skiller seg ikke nevneverdig fra hverandre (Kryvi & Poppe, 2016). Absorpsjon av lipider foregår hovedsakelig i fremre del av tarmen, mens absorpsjon av proteiner foregår i baktarmen (Sire & Vernier, 1992). Tarmveggen er bygget opp av flere lag (Figur 3). Innerst mot hulrommet i tarmen er slimhinnen, mukosa, som består av et enlaget epitel med sylindereformede celler, og et underliggende bindevev, lamina propria (Kryvi & Totland, 1997). Cellelaget inneholder blant annet epitelceller/enterocytter, slimceller/begerceller og flere ulike typer endokrine celler (Kryvi & Totland, 1997; Krogdahl, 2001). Cellene i mukosa bindes sammen til et kontinuerlig lag av tette celleforbindelser, «tight junctions», som blant annet har som funksjon å forhindre patogene organismer og toksiner å trenge inn i fisken (Krogdahl, 2001).

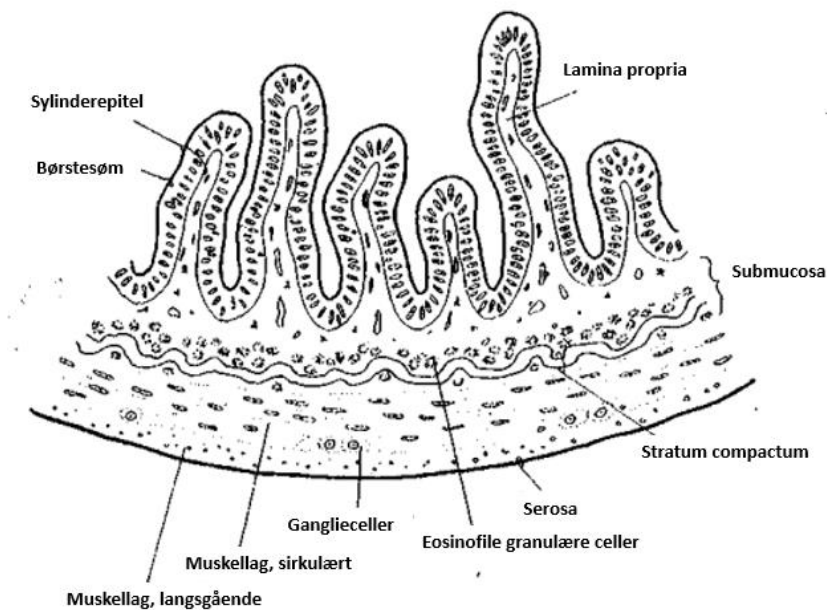
Mukosa og lamina propria danner folder som er med på å gi tarmen en stor overflate. Disse foldene kan igjen ha forgreninger kalt sekundærfolder. Enterocytterne i mukosa er sylindereformet, og siden som vender ut mot tarmlumen kalles apikalmembranen, mens motsatt side hviler på basalmembranen, som fungerer som et skille fra lamina propria. Apikalmembranen er dekket av fine hår kalt mikrovilli som øker tarmoverflaten med omlag ti ganger. Mikrovilliene er igjen dekket av et slimlag. Mukosa er et dynamisk vev, og komponenter i fôr og tarmsekreter vil ha stor innvirkning på vekst og egenskaper i mukosa (Krogdahl, 2001).

Under mukosa ligger submukosa som består av løst bindevev, fast bindevev (stratum compactum), og på begge sider fins det rikelig med granulære celler som blant annet inneholder lysozym. Lysozym spiller sannsynligvis en rolle når det kommer til tarmens forsvar mot patogene organismer. Under submukosa finner man to lag med glatt muskulatur, et indre sirkulært lag og et ytre langsgående lag. Mellom muskellagene ligger ganglieceller fra det autonome nervesystemet. Det ytterste laget i tarmveggen kalles serosa og består av enlaget plateepitel (Kryvi & Totland, 1997; Krogdahl, 2001).

Midttarmen hos laksefisk består av mukosa med enlaget sylinderepitel med børstesøm. Submukosa består av flere lag; løst bindevev, fast bindevev (stratum compactum), eosinofile granulære celler (stratum granulosum), glatt muskulatur (sørger for transport av fôr gjennom tarmsystemet med rytmiske/peristaltiske bevegelser), hvor det indre laget er sirkulært og det

Bakgrunn

ytre er langsgående, og nerveceller kan finnes mellom muskellagene. Serosa består av et enlaget plateepitel (Kryvi & Poppe, 2016). Baktarmen er ofte tykkere enn midttarmen og antallet slimceller øker bakover i tarmen for å forenkle passasje av avføring etter hvert som den blir tørrere. Det er histologisk liten forskjell mellom baktarm og midttarm. Epitelet går over fra enlaget sylinderepitel til flerlaget plateepitel et stykke innenfor gattet hos fisk (Kryvi & Poppe, 2016).



Figur 3. Skjematisk fremstilling av tarmveggen hos fisk.

Tarmveggen kan deles inn i fire lag; mukosa, som består av sylinderepitel, lamina propria, submukosa, muscularis og serosa (Kryvi & Totland, 1997).

2.4.2 Celler i tarmvev hos laks

Epitelcellene i baktarmen hos laks er avlange med store vakuoler, og er identifisert som stedet for opptak av makromolekylære proteiner (Iwai, 1968; Ezeasor & Stokoe, 1981; Rombout et al., 1985). Epitelceller fornyes raskere enn andre celler i dyr. Fornyelsen skjer imidlertid langsommere hos fisk enn hos pattedyr (Krogdahl, 2001). Selv om temperaturen blir tatt i betraktning skjer celledeling av stamceller langsommere hos fisk sammenlignet med pattedyr (Danguy et al., 1988). Enterocytene i tarmvilliene hos fisk vil være funksjonelle opptil et par uker, mens hos pattedyr har de kun en levetid på noen få dager (Mayhew, 1990).

Begerceller (også kjent som slimceller/vakuoler) er epitelceller som syntetiserer og utskiller muciner (Hayashi et al., 2012). Disse cellene er de dominerende mukus celletypene i fiskens tarmepitel. Mucingranuler dominerer innholdet i cellen, og kan være av varierende elektrontetthet. Innholdet i granuler kan frigjøres som følge av ekstracellulære stimuli gjennom høyt regulerte prosesser (McGuckin et al., 2011).

Rodletceller er også en celletype som er assosiert med epitelvev, men disse cellene er kun observert hos fisk. Cellene har forblitt en gåte i fiskebiologien (Reite, 2005). I følge Leino kan rodletceller være involvert i vann- og elektrolyttransport, eller ha funksjoner som ligner andre slimceller, for eksempel smøring, antibiotiske effekter og pH-kontroll (Leino, 1974). Det har blitt antydnet at rodletceller er granulocytter som skiller ut granulat på epiteloverflater (Duthie, 1939).

2.5 Fettsyrer og inflammasjon

Inflammasjon/betennelse er en normal og essensiell biologisk respons i en organisme. Den bidrar til beskyttelse fra patogene organismer og til tilhelingsprosess i skadet vev (Calder, 2009). I det skadete/infiserte vevet starter produksjonen av cellulære metabolitter fra makrofager, lymfocytter og dendrittiske celler etc. (som er tilstede i vevet), som rekrutterer immunceller (hovedsakelig leukocytter) til det aktuelle området. Disse immuncellene vil fjerne fremmede mikrober ved fagocytose, og sende ut cytokiner (signalmolekyler) som vil føre til apoptose (programmert celledød) av infiserte og skadete celler. Biokjemiske endringer vil kunne føre til symptomer i vevet som varmeøkning, smerte, rødhet, ødem, og tap av funksjon (Medzhitov, 2008; Calder, 2009).

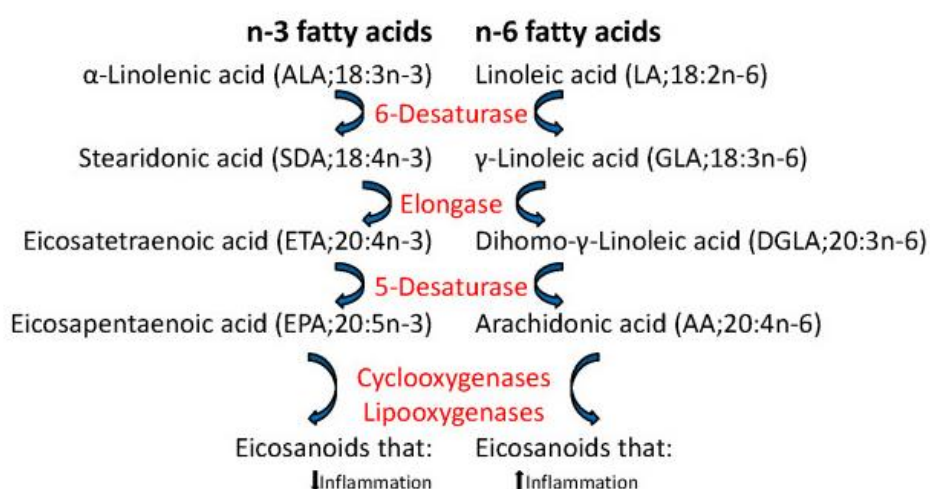
Anti-inflammatoriske prosesser inntreffer i etterkant av en inflammasjon i form av programmert celledød av immunceller, fagocytose av døde celler, og stans i rekrutteringen av nye betennesceller (Duvall et al., 1985). Disse prosessene er svært viktige, da en vedvarende inflammasjon vil føre til permanente skader på vev (Nathan, 2002). Eikosanoider er en samlebetegnelse for de parakrine hormonene; tromboksaner, lipoksiner, leukotriener og prostaglandiner. Både eikosanoider og resolviner (metabolsk biprodukt av omega-3 fettsyrer) kan virke betennelsesdempende. De nedregulerer både varighet og intensitet på inflammasjonsresponsen (Tilley et al., 2001).

Akutt inflammasjon har et kort forløp som kan vare fra et par timer til et par dager. Det er prinsipielt karakterisert ved mikrovaskulær eksudasjon av elektrolytter, væske, plasma proteiner og leukocyt migrasjon, hovedsakelig nøytrofile granulocytter, etterfulgt av rask reparasjon og vevsregenerering (Ackermann, 2013). Kronisk inflammasjon oppstår som følge av vedvarende stimulus, som forårsaket den første akutte betennelsen. Kronisk inflammasjon har lengre varighet, vanligvis uker til måneder. Den kroniske inflammasjonen karakteriseres overveiende av lymfocytter og makrofager, i tillegg til vevsnekrose. Typisk for kronisk inflammasjon er også innkapsling med fibrin av betennelsesfokus for å avgrense skaden. Det følger også med vevsreparasjon, som dannelse av fibrose og granulasjonsvev (arrvev) (Ackermann, 2013).

Sammensetningen av fettsyrer i fosfolipider hos immunceller er utgangspunkt for syntese av biologiske lipider, som er aktive under inflammasjon. Både immuncellenes signaler, reseptorer, aktiveringsnivå og genuttrykk er avhengige av fettsyreforløpere (Calder, 2009). Vegetabiliske oljer kan inneholde høye nivåer av n-6 PUFAs som blant annet LA, og LA kan metaboliseres

Bakgrunn

til arakidonsyre (ARA; 20:4n-6). Fiskeolje er derimot rik på n-3 PUFAs som dokosaheksaensyre (DHA, 22:6n-3) og eikosapentaensyre (EPA, 20:5n-3) (Figur 4). I pattedyr er det vist at n-3 fettsyrer fra kosthold fortrenger ARA i inflammatoriske cellemembraner (Chapkin et al., 2007). Dermed avtar tilgjengeligheten av forløperen til pro-inflammatoriske eikosanoider, da de samme enzymene er involvert i metabolismen av både n-3 og n-6 fettsyrer, og videre i syntesen av eikosanoider (Calder, 2006). Hos laks er det vist at lipider inntatt i dietten kan endre leukocyt fosfolipid fettsyresammensetningen og produksjonen av eikosanoider (Bell et al., 1996). Og en økning av n-6 nivåer i fôret gav en økning i n-6 fettsyrer i leukocytter i en *ex vivo* studie (Seierstad et al., 2009).



Figur 4. Metabolisme av n-3 og n-6 fettsyrer.

De samme enzymene er involvert i metabolismen av n-3 og n-6 fettsyrer og syntese av eikosanoider, men de biologiske egenskapene til eikosanoidene er forskjellige (Moldal et al., 2014).

Omega-3 og omega-6 konkurrerer om de samme enzymsystemene i syntesen av lange flerumettede fettsyrer fra 18:2n-6 og 18:3n-3. De konkurrerer også om enzymsystemene for å produsere signalstoffene eikosanoider (Figur 4) (Moldal et al., 2014). Forholdet mellom omega-3 og omega-6 har betydning for en rekke biologiske prosesser. Et optimalt forhold mellom disse, i tillegg til et minimumsbehov og øvre toleransegrense er viktig å bestemme.

2.6 Immunforsvaret i tarm hos beinfisk

Den viktigste fysiologiske funksjonen til immunsystemet er å forhindre eller bekjempe infeksjoner. Immunforsvaret deles inn i en ytre del (mukosa i hud, gjeller og, tarm) og en indre del (indre organer og hvite blodceller). Det indre forsvaret består av det medfødte og adaptive forsvaret (Press & Evensen, 1999; Abbas et al., 2016).

Beinfisk, i motsetning til høyerestående vertebrater, har ikke utviklet et immunsystem med beinmarg og lymfeknuter. Funksjonene til disse organene oppfylles i stedet av hode- og baknyre, thymus, milt og lymfoid vev i tarm og gjeller (Press & Jørgensen, 1999). Hodenyre og thymus er de primære lymfoide organene hos beinfisk. Hodenyre innehar mange av de samme egenskapene som beinmarg hos pattedyr (Hansen & Zapata, 1998). Leukocytter hos beinfisk deles morfologisk inn i granulocytter, monocytter/makrofager og lymfocytter (T- og B-celler, samt naturlige drepeceller) (Press & Jørgensen, 1999; Secombes & Ellis, 2012).

Både morfologi og slimhinner i tarm hos laksefisk er godt beskrevet, men det er fremdeles mangel på kunnskap om mekanismene bak tarmens immunforsvar. Man vet at epitellaget i tarm hos laksefisk ikke inneholder lymfoide follikler (Payer's patches), eller immunglobulin A (IgA), (Rombout et al., 2011). Andre immunceller som IgM og mukosarelatert immunglobulin T (IgT) er derimot tilstede (Zhang et al., 2011), og tarmen hos laksefisk er kjent for å inneholde et stort antall T-celler (Koppang et al., 2010; Nakanishi et al., 2015).

Det er leukocytene i slimhinnen og deres produkter som bidrar til inflammasjon i tarmen. De nøytrofile immuncellene er de første til å ankomme en infeksjon og spiller en essensiell rolle i det medfødte immunsystemet ved deres evne til både fagocytose og produksjon av reaktive oksygenmetabolitter (ROS) (Arazna et al., 2013). Derfor har nøytrofile celler og deres produkter blitt benyttet som markører for inflammasjon hos mennesker (Mirsepasi-Lauridsen et al., 2016). Makrofager, og lymfocytter, som T- og B-celler, kan også komme til infeksjonen på et senere tidspunkt (Nathan, 2006). Ved inflammasjoner i baktarm hos laks, er det observert en kraftig tilstrømming av makrofager, nøytrofile granulære celler og IgM til lamina propria (Bakke-McKellep et al., 2007b; Niklasson et al., 2011; Rombout et al., 2011).

Begerceller spiller en viktig rolle når det kommer til vedlikehold av epitelbarrierer mot forskjellige patogene organismer (Salinas & Parra, 2015). Mengden begerceller varierer i fisketarm som er infisert med parasitter, hvor antallet øker i området rundt infeksjonen (Dezfuli et al., 2011). En studie har vist at virkningen av skadelige stoffer på flere arter med laksefisk,

Bakgrunn

har ført til degranulering fra rodletcellene som en respons på vevsskader. Og kronisk inflammatoriske reaksjoner i gjelle og tarmvev har forårsaket en lokal økning i antall rodletceller (Reite, 2005).

2.6.1 Antistoffer

PCNA er et DNA-bindende protein hos alle eukaryote celler og har høy grad av sekvenslikhet, i tillegg til strukturelle og funksjonelle likheter mellom ulike taksa (Strzalka & Ziemienowicz, 2010). PCNA er en av de vanligste markørene brukt for celledeling og er surrogatmarkør for DNA-syntese, cellesyklus kontroll, DNA-reparasjon og apoptose (Eldridge & Goldsworthy, 1996; Strzalka & Ziemienowicz, 2010).

Til nå har tre klasser av immunglobuliner blitt identifisert hos beinfisk: IgM, IgT og IgD. To av disse isotypene finnes i tarmmukus hos regnbueørret i sekretorisk form, IgM og IgT. IgM dominerer det systemiske kretsløpet (blodsystemet), og spiller en viktig rolle for humoral immunitet hos beinfisk (Salinas et al., 2011). Membranbundet eller fritt sirkulerende IgM (sekretorisk) innehar evnen til å gjenkjenne antigener ved sekundær eksponering, som igjen fører til en hurtigere og kraftigere sekundær immunrespons (Abbas et al., 2016). IgM finnes i mukus sekret (Salinas et al., 2011). IgM og IgT finnes som polymerer i tarmsekret, som står i kontrast til IgD som finnes i plasma som monomerer. Immunglobuliner hos beinfisk spiller en rekke biologiske roller i tillegg til spesifikk immunitet (Zhang et al., 2010).

2.7 Mikrobiota

Fiskehelse er nøye regulert av førsammensetning og tarmflora (Nayak, 2010). Fisk har en naturlig bakterieflora i tarmkanalen i likhet med andre dyr og mennesker (Cahill, 1990; Ringø et al., 1995; Ringø & Birkbeck, 1999). Tarmfloraen hos fisk bidrar med viktige funksjoner som næringsopptak, utvikling av tarmepitelen og immunitet (Rawls et al., 2004; Bates et al., 2006). Artssammensetningen av bakterier varierer med alder, ernæring og miljøforhold i vannet. Antallet bakterier øker generelt sett bakover i tarmen. Tarmmikrobiotaen hos fisk er sensitiv ovenfor stress, antibiotika og førsammensetning (Cahill, 1990; Ringø et al., 1995; Olsen et al., 2003).

Det kommer stadig nye studier på sammenhenger mellom diett og tarmflora i human helse. Kunnskapen om bakteriesammensetningen i fisketarm er ennå sprikende, da de fleste tidligere studier har blitt utført med unøyaktige dyrkningsteknikker. Det er foreløpig et begrenset antall studier på tarmflora i laksefisk basert på DNA «fingerprinting» analyser (Pond et al., 2006; Kim et al., 2007; Desai et al., 2012; Navarrete et al., 2012). Det er også kjent at den gastrointestinale mikrobiotaen forandres ved forskjellige dietter (Bakke-McKellep et al., 2007a; Merrifield et al., 2009). Lipid nivåer og forskjellige vegetabiliske oljer i diett spiller også en viktig rolle (Ringø et al., 2002). Lav stabilitet i mikrobiotaen kan ha negative konsekvenser for fiskens motstandskraft mot sykdom, da patogene bakterier kan skade tarmepitel og konkurrere ut gunstige bakterier, som melkesyrebakterier (Einen et al., 2007). To studier har studert effekten av diett med planteingredienser i regnbueørret med dyrkningsuavhengige teknikker (Desai et al., 2012; Navarrete et al., 2012). Førstnevnte konkluderte med at tarmfloraen delvis kan være årsak til den negative påvirkningen av plantebaserte dietter. Navarrete et al., (2012) påviste at en plantebasert diett (proteiner eller oljer) medførte redusert mangfold av bakterier. Antibakteriell effekt av fettsyrene i rapsoljen kunne være en årsak til redusert diversitet med planteoljediett.

Hos fisk er det enda mye som gjenstår når det kommer til forståelse av fettsyresammensetningen i fôr, tarmflora og fiskehelse. De nyeste DNA baserte metodene vil være et viktig verktøy fremover for å kartlegge de ikke-dominerende bakteriene, hvor betydningen for fiskehelse fortsatt er uavklart.

3. Problemstilling og formål

Rapsolje er i dag den største fettsyre komponenten i norsk laksefôr (Ytrestøy et al., 2015), og denne endringen i fôrsammensetning kan påvirke både fysiologi, tarmflora og fiskens immunrespons (Calder, 2009). Det er behov for mer kunnskap angående tarmhelse hos laks når fiskeolje erstattes med planteoljer, og når det er en reduksjon av andel langkjedete fettsyrer som EPA/DHA i fôret (Moldal et al., 2014).

På grunnlag av dette var det ønskelig å studere effekt på tarmhelse over tid hos laks, fôret med dietter tillaget betydelig variasjon i mengde langkjedede omega-3 fettsyrer ($\geq C_{20}$); 100 % rapsolje (0,84 % EPA/DHA), 100 % ansjosolje (4,52 % EPA/DHA), blanding av raps- og ansjosolje (3,44 % EPA/DHA), og 100 % EPA/DHA konsentrat (9,68 % EPA/DHA).

Spesielt ønsket vi å:

1. Undersøke sammenhenger mellom tilvekst (vekt og lengde) på laks fôret med dietter som inneholder ulike mengder langkjedete omega-3 fettsyrer.
2. Undersøke makroskopiske funn i baktarm hos prøvetatt fisk, og sammenligne tilvekst på fisk med unormal- og normal tarm i de forskjellige diettgruppene.
3. Utføre histologiske undersøkelser for å studere eventuell inflammasjon, vakuolisering og morfologiske forandringer i baktarm, og gradere forandringene etter et scoringssystem.
4. Utføre spesialfarginger for å lettere kunne skille mellom forskjellige typer inflammasjons- og immunceller, og detektere mikroorganismer.
5. Utføre immunhistokjemi på tarmsnitt hvor det var mistanke om inflammasjon, for å bekrefte tilstedeværelsen av IgM.

4. Materialer og metoder

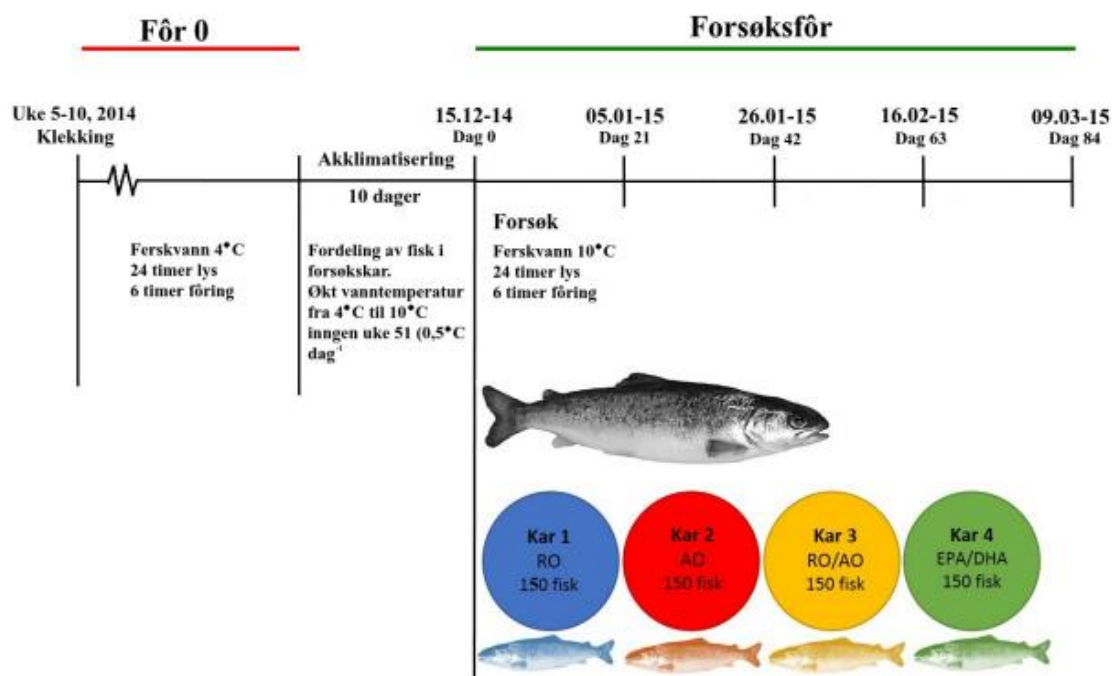
4.1 Kjemikalier

Tabell 1. Oversikt over kjemikalier/reagenser og produsenter brukt i metodene.

Reagenser	Produsent
α -IgM	University of Pennsylvania, USA
α -PCNA	Dako, Glostrup, Denmark
Aceton	E. Merck, Darmstadt, Tyskland
Ansjosolje	Nofima BioLab, Bergen, Norge
Benzokain	Europharma, Leknes, Norge
BSA	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Butylated hydroxytoluene (BHT)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Tyskland
Eddiksyre 0,5 %	VWR International, Pennsylvania, USA
Eosin Y, Alcoholic	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Etanol 96 % (C ₂ H ₅ OH)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Tyskland
Etanol \geq 99,98 % (Absolutt) (C ₂ H ₅ OH)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Tyskland
Eukitt	Fluka Analytical, Munich, Tyskland
Fast green	VWR International, Pennsylvania, USA
Fiskeoljekonsentratet (EPAX TG6000N)	Epax, Ålesund, Norge
Formaldehyde \geq 34,5 % (HCHO)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Tyskland
Giemsa	VWR International, Pennsylvania, USA
Hematoxylin Shandon Instant	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
HistoClear™	National Diagnostics, Atlanta, USA
Hydrogenperoksid (H ₂ O ₂)	VWR International, Pennsylvania, USA
ImmPACT™ Vector Red	Vector Laboratories, Ohio, USA
Kaliumhydroksid	E. Merck, Darmstadt, Tyskland
Krystall fiolett	VWR International, Pennsylvania, USA
Liquid Fast Red Substrate	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Liquid Fast Red Chromogen	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Lugo's jod oppløsning	VWR International, Pennsylvania, USA
Methanol (CH ₃ OH) 32.04 g/mol	VWR International, Pennsylvania, USA
Metylenblått	E. Merck, Darmstadt, Tyskland
MilliQ vann	Milli-Q, Merc Millipore, Darmstadt, Tyskland
Nøytralrødt	VWR International, Pennsylvania, USA
Paraffin Histowax	Histolab products AB, Västra Frölunda, Sverige
PAP-penn	VWR International, Pennsylvania, USA
PBS	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Tyskland
Perjodsyre	VWR International, Pennsylvania, USA
Pertex for automatic coverslipping	Histolab products AB, Västra Frölunda, Sverige
Poly-L-lysin (0,1 %) løsning	Histolab products AB, Västra Frölunda, Sverige
Poly-Prep Slides	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Tyskland
Primary Antibody Amplifier Quanto	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Rapsolje	Nofima BioLab, Bergen, Norge
Saltsyre 37 %	E. Merck, Darmstadt, Tyskland
Shiff's reagens	Histolab products AB, Västra Frölunda, Sverige
Toluidinblått	VWR International, Pennsylvania, USA
TRIS stamløsning pH 7,6	VWR International, Pennsylvania, USA
Tween 20	United States Biochemical Corp., Ohio, USA
UltraVision AP Polymer	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
UltraVision Protein Block	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Xylol 97 %	VWR International, Pennsylvania, USA

4.2 Forsøksfisk, oppsett og fôringsregimer

Det ble benyttet atlantisk laks fra Aqua Gens Q-TRL-stamme (IPNV resistent) i forsøket. Rognen ble klekket i Kårvika i ukene 5-10 i 2014. Startfôringen foregikk frem til den 05.12.14, hvor laksen ble fôret med 0-fôr (Tabell 2) frem til en akklimatiseringsperiode. Ved start av akklimatiseringsperioden ble totalt 610 fisk fordelt på fire kar, 150 fisk i tre kar, og 160 fisk i et fjerde kar. Fra karet med 160 fisk ble det tatt ut 10 stykker for registrering av gjennomsnittlig kroppsvekt og -lengde (46 g og 17 cm) ved dag 0. Under akklimatiseringsperioden ble temperaturen gradvis økt fra 4 °C til 10 °C over 10 dager. I denne perioden ble fisken ikke fôret. Fisken ble holdt i ferskvann med kontinuerlig vannutskiftning (300 liters sirkulærekar) gjennom hele forsøket, med et lysregime på 24 timer lys. Det ble fôret 6 timer per dag til metthet, og vannsirkulasjonen sørget for selvrenging av karene. Temperatur ble logget daglig, og oksygenivåer ukentlig. Dødelighet ble registrert daglig sammen med tilsynet av fisken. Laksen gjennomgikk smoltifisering i løpet av forsøksperioden. Det ble ikke utført vaksinerings av forsøksfisken, og det forekom ingen dødelighet i løpet av forsøksperioden. Forsøksoppsettet er illustrert i Figur 5.



Figur 5. Fremstilling av forsøksoppsettet.

Fra klekking og frem til akklimatiseringsperioden ble fisken fôret med Fôr 0. Fordeling av fisk i fire kar ble utført i begynnelsen av akklimatiseringsperioden. Fra den 15.12.2014 ble fisk i kar 1-4 fôret med dietter tilsatt henholdsvis rapsolje (RO), ansjosolje (AO), rapsolje/ansjosolje (RO/AO) og EPA/DHA-konsentrat. Uttak av fisk ble utført etter 0, 21, 42, 63 og 84 dager etter fôringsstart (Evje, 2015).

Materialer og metoder

Fisken ble gjennom perioden, fra dag 0 (15.12.14) til dag 84 (09.03.15), gitt 4 ulike dietter med ulike oljer fra planter og fisk. Automatiske fôrautomater stod for fôringen, og det ble overfôret med hensikt på å oppnå maksimalt frivillig fôropptak i hver tank.

Uttak av prøver ble gjort hver 3. uke, hvor 10 fisk fra hvert kar ble tatt ut. Det var totalt fem prøveuttak i løpet av fôringsperioden. Gjennom akklimatiseringsperioden, og to dager før hvert prøveuttak, ble fisken sultet.

4.3 Fôr

Frem til akklimatiseringen ble fisken gitt fôr produsert av Skretting AS. Fôret Nutra XP ble gitt under startfôringen frem til fisken veide 5 g. Fôret Nutra Olympic 1,5 mm ble gitt til fisk mellom 5-7 g, og Nutra Olympic 2 mm fra > 7 g frem til akklimatiseringen. Fôr 0 (Nutra Olympic, 1,5 mm og 2 mm) inneholdt råvarene: fiskemel, fiskeolje, karbohydratråvarer, soyaprotein, rapsolje, vitaminer (bla; vitamin D (1400 IU/kg), vitamin E (22 mg/kg) og vitamin C (100 mg/kg)), mineraler og astaxanthin (Tabell 2).

Tabell 2. Sammensetning i prosent av Fôr 0, Nutra Olympic, Skretting.

NFE = Nitrogen-fritt ekstrakt (karbohydrat).

Innholdskomponent	Prosent sammensetning
Protein	49-50 %
Fett	22 %
NFE	10-13 %
Trevler	0,4-3 %
Aske	12-13 %
Pigment (astaxanthin)	0,0005 %
Brutto energi	22-23 MJ/kg

Materialer og metoder

Forsøksfôret uten fett (grunnfôr) ble laget av Biomar AS, Danmark. Innholdet er vist i

Tabell 3. Fôret ble tilsatt ulike oljer fra Nofima, Bergen.

Tabell 3. Sammensetning av grunnfôret (3 mm), uten tilsatt fett, brukt i fôringsforsøket.

SPC = soyaproteinkonsentrat.

Innholdskomponent	Prosent sammensetning
Fiskemel	32,3 %
Krillmel	2 %
SPC	20 %
Hvetegluten	11 %
Monokalsiumfosfat	1 %
Pigment (astaxanthin)	0,04 %

Det ble totalt laget 4 forskjellige fôrtyper med ulik fettsyresammensetning. Oljene som ble tilsatt fôret var som følgende: Rapsolje (RO), ansjosolje (AO), en blanding av ansjos- og rapsolje i forholdet 40:60 (RO/AO), og omega-3 konsentrat i TAG-form (EPAX 6000) (EPA/DHA). EPAX 6000 TAG inneholder EPA 300 mg/g olje og DHA 200 mg/g olje. De resterende n-3 fettsyrene (100 mg/g olje) utgjøres av 18:3, 18:4, 20:4, 21:5 og 22:5. Innholdet av olje (fettprosent) i helpellet var cirka 20 %. For å unngå oksidasjon av fettsyrene, ble oljene tilsatt 200 ppm butylated hydroxytoluene (BHT) (antioksidant). 1 % palmeolje ble tilsatt oljene, for å unngå oljelekkasje fra pelletene under lagring. For å forsikre en god appetitt og lik smak, ble alle diettene tilsatt 2 % krillmel. Kontrollgruppene i oppsettet var tiltenkt diett RO/AO og AO, hvor RO/AO var ment å representere et tilnærmet kommersielt fôr som benyttes i oppdrett, og AO var ment å representere en tilnærmet kommersielt fôr fra 20 år tilbake i tid (Ytrestøy et al., 2015).

4.3.1 Fettsyresammensetning i forsøksfôret

Fettsyreanalyse for Fôr 0 som ble gitt fiskene før forsøksstart og i de 4 ulike forsøksfôrene (Tabell 4) var utført, etter tidligere publiserte metoder (Folch et al., 1957). Fôr 0 inneholdt 23,1 % mettede fettsyrer, mens fôret tilsatt rapsolje (RO), ansjosolje (AO), raps- og ansjosolje (RO/AO) og konsentrat med EPA/DHA inneholdt henholdsvis 14,7; 38,3; 25,2 og 19,1 % av denne type fettsyrer. I samme rekkefølge inneholdt fôrene 41,5; 50,3; 24,1; 37,4 og 18,4 % enumettede fettsyrer. Den dominerende mettede og enumettede fettsyren i alle fem fôrene var henholdsvis palminsyre (16:0) og oljesyre (18:1n-9) (Evje, 2015).

Tabell 4. Fettsyresammensetning (arealprosent) i de ulike fôrene.

Fôr 0 = Nutra Olympic; RO = fôr med rapsolje, AO = fôr med ansjosolje, RO/AO = fôr med både raps- og ansjosolje, EPA/DHA = fôr med konsentrat av EPA og DHA. Lc-HUFA = langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrer (20:5n-3, 22:5n-3 og 22:6n-3). De presenterte verdiene er gjennomsnittet \pm standardavvik (n = 3) (Evje, 2015).

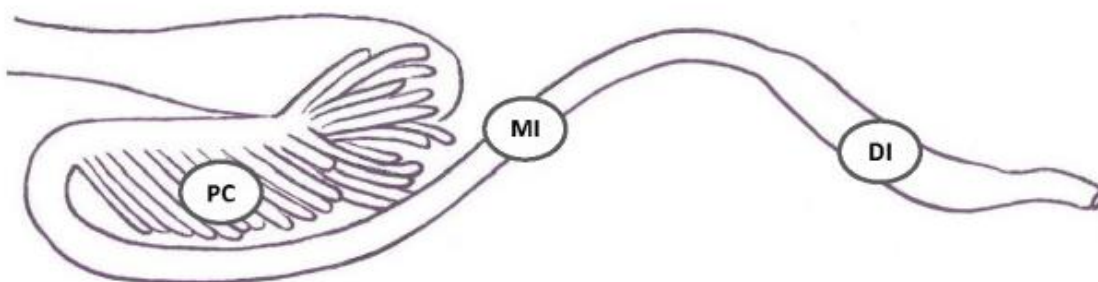
Fettsyre	Fôr 0	RO	AO	RO/AO	EPA/DHA
14:0	5,3 \pm 0,1	2,9 \pm 0,8	9,3 \pm 0,2	4,7 \pm 0,3	3,5 \pm 0,1
16:0	14,8 \pm 0,2	9,7 \pm 0,3	24,3 \pm 0,7	17,1 \pm 0,9	10,8 \pm 0,4
18:0	3,0 \pm 0,0	2,1 \pm 0,0	4,7 \pm 0,1	3,4 \pm 0,2	4,9 \pm 0,2
Σ mettet	23,1	14,7	38,3	25,2	19,1
16:1 n-7	5,8 \pm 0,0	1,4 \pm 0,1	7,0 \pm 0,0	4,8 \pm 0,0	2,4 \pm 0,0
18:1 n-7	3,1 \pm 0,0	3,0 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1	3,0 \pm 0,1	2,9 \pm 0,0
18:1 n-9	31,7 \pm 0,1	45,1 \pm 1,3	13,8 \pm 0,8	29,1 \pm 0,6	11,9 \pm 0,3
22:1 n-11	0,9 \pm 0,0	0,8 \pm 0,2	0,7 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	1,3 \pm 0,0
Σ enumettet	41,5	50,3	24,1	37,4	18,4
18:2 n-6	11,0 \pm 0,0	17,3 \pm 0,6	4,5 \pm 0,2	10,8 \pm 0,1	4,4 \pm 0,1
22:4 n-6	0,3 \pm 0,0	2,4 \pm 0,7	2,0 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2
Σ omega-6	11,4	19,7	6,5	11,4	5,8
18:3 n-3	4,6 \pm 0,0	7,9 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	4,2 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
18:4 n-3	2,3 \pm 0,0	1,4 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0	1,4 \pm 0,0
20:5 n-3	7,5 \pm 0,1	1,8 \pm 0,2	13,5 \pm 0,1	10,0 \pm 0,3	27,3 \pm 0,3
22:5 n-3	1,3 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	1,6 \pm 0,0	1,2 \pm 0,0	3,1 \pm 0,0
22:6 n-3	6,0 \pm 0,0	2,4 \pm 0,3	9,1 \pm 0,0	7,3 \pm 0,1	21,1 \pm 0,2
Σ Lc-HUFA	14,8	4,4	24,2	18,4	51,5

Fôr 0 inneholdt 13,5 % EPA/DHA av oljetilsetningen som utgjorde 20 % av fôret, og dette utgjorde totalt en prosentandel på 2,7 % EPA/DHA av dietten. De tilsvarende tallene for fôr tilsatt rapsolje (RO), ansjosolje (AO), blanding av rapsolje og ansjosolje (RO/AO), og EPA/DHA konsentrat (EPA/DHA) var henholdsvis 0,84, 4,52, 3,44 og 9,68 % EPA/DHA av dietten.

4.4 Prøveuttak

Ved prøveuttak ble fisken fanget med håv og overført til en bøtte som inneholdt en overdose av benzokain (0,2 ml/l vann). Det ble tatt bilder av hele fisken og fiskens tarm på de individene som var morfologisk avvikende fra normal fisk på uttaksdag 21 og 42. På uttaksdag 63 og 84 ble det tatt bilder av tarm på alle individer. Buken ble åpnet med saks, og mage/tarmkanalen løsnet ved magesekken og frem til gattet med skalpell. Baktarmen (DI) ble klippet opp på langs, frem til overgangen til midttarm (MI). Det ble tatt ut vevsprøver på 0,5 x 0,5 cm størrelse i firkantform, eller litt større rektangelform ca. 1 cm fra overgang til MI. MI ble kuttet av på midten av dens lengde, og videre klippet opp på langs mot pylorus blindsekkene (PC), og 0,5 cm prøver ble så tatt ca. 10 cm fra PC. Tarmene ble vasket med buffer (phosphate-buffered saline (PBS), Sigma-Aldrich, Darmstadt, Tyskland) før det ble tatt ut prøver til histologi fra; PC, MI og DI (Figur 6). Dette ble gjentatt for hver uttaksdag (dag 0, 21, 42, 63 og 84). Prøvene ble lagt i prøverør fylt med formalin og oppbevart ved romtemperatur (RT). Prøveuttaket ble utført av Gunhild Johansson og Iselin Evje ved Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø (UiT), Norges arktiske universitet.

Prøvene ble videre kuttet til på laboratoriet slik at de passet inn i plastkassetter for histologi. Kassetene ble lagret på 70 % etanol (EtOH) i kjøleskap (4 °C). Vevsprøvene var med dette klar for histologifremføring med dehydrering og innstøpning.



Figur 6. Skjematisk tegning av fordøyelsessystemet til atlantisk laks (*Salmo salar* L.).

De forskjellige uttaksområdene er merket PC = pylorus blindsekker, MI = midtre del av tarmen, DI = bakre del av tarm (Moldal et al., 2014).

4.5 Analyser

4.5.1 Registrering av velferdsindikatorer

Overlevelse

Registrering av eventuell dødelighet ble i dette forsøket utført daglig av røktere ved Havbruksstasjonen i Tromsø, eller av forsøkspersonell i sammenheng med prøveuttak.

Vekst

Syk, stresset eller skadet fisk spiser som regel mindre enn tilsvarende friske individer, noe som fører til lavere tilvekst (Waagbø, 2001). I dette forsøket ble fiskens vekt og lengde registrert før fisken ble satt på forskjellige forsøksdietter, med påfølgende registreringer ved samtlige prøveuttak etter forsøksstart. Lengde og vekt ble benyttet for å illustrere eventuelle forskjeller i tilvekst mellom diettgruppene. Vekst og lengde ble registret av Gunhild Johansson og Iselin Evje ved Norges fiskerihøgskole, UiT Norges arktiske universitet.

Fiskens spesifikke vekstrate (SGR) over tid (fra engelsk: Specific Growth Rate), er en egnet indikator på dyrevelferd (Spaho et al., 2013). SGR ble beregnet ut fra gruppevis gjennomsnittsvekt for vekstperioden 10 dager før forsøksstart (dag -10), og 60 dager etter forsøksstart (dag 60), og ved gjennomsnittsvekt fra dag 0 til dag 84. SGR ble beregnet etter følgende metode:

Spesifikk vekstrate er et uttrykk for prosentvis daglig vekst mellom to måletidspunkter, og kan beregnes ut fra følgende formel:

$$\text{SGR} = 100 \times (\ln W2 - \ln W1) / T$$

Ln W1 og Ln W2 står for den naturlige logaritmen til fiskens gjennomsnittsvekt ved henholdsvis første og andre måletidspunkt. T er tiden (antall dager) mellom disse (Einen, 2001). En SGR på mellom 1-2 regnes som god tilvekst ved 10 °C (Jobling, 2003).

Materialer og metoder

Kondisjonsfaktor for fisk betegner forholdet mellom vekt og lengde. Kondisjonsfaktor brukes ofte som en kvalitetsparameter for fisk (Barnham & Baxter, 1998).

Fulton's kondisjonsfaktor (K) ble beregnet i henhold til Htun-Han (1978) ligning:

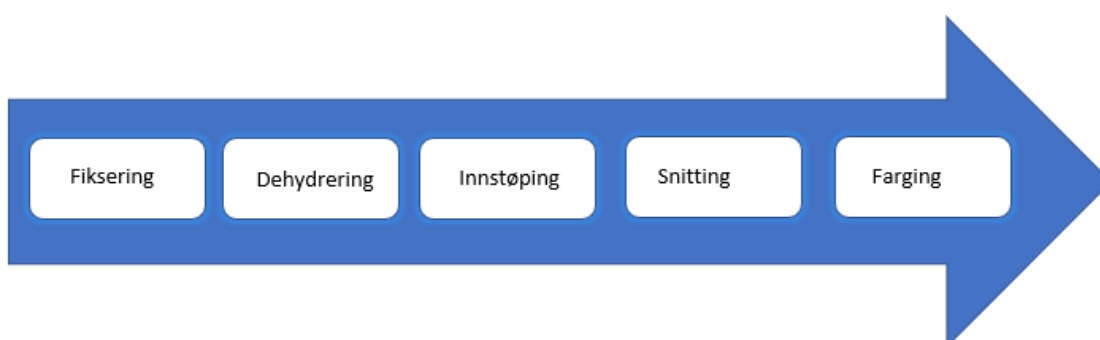
$$K = (W \times 100) / L^3$$

W står for vekt i gram, L står for lengde i cm (Htun-Han, 1978).

4.5.2 Histologi

Mikroanatomi, eller histologi, er læren om vevets naturlige oppbygging og sammensetning. For å kunne påvise patologiske endringer i vevet (histopatologi) grunnet sykdom, skade eller infeksjon, er kunnskap om vevets naturlige tilstand essensielt. Histologiske undersøkelser omfatter mikroskopering av fargede vevssnitt, og er av høy viktighet for å kunne påvise sykdom, spesielt i tilfeller der sykdomstegn er vanskelige å detektere makroskopisk (Kryvi & Poppe, 2016). Hovedstegene i histologisk fremføring er illustrert gjennom flytskjemaet i Figur 7.

I dette forsøket ble histologiske undersøkelser gjennomført med hensikt å påvise eventuelle innvirkninger av forskjellige ekstreme dietter. Det er tidligere vist at dietter med innhold av plantebaserte oljer kan føre til inflammasjon i baktarm (Bæverfjord & Krogdahl, 1996; Ruyter et al., 2006; Torstensen et al., 2013). Forskjellige grader av inflammasjon, vakuolisering og morfologiske forandringer i vevet, ble benyttet som indikator på negativ innvirkning i tarmvevet.



Figur 7. Flytskjema over hovedstegene i histologifremføring.

4.5.3 Dehydrering og innstøpning

Kassetter med vevsbitene som var lagret på 70 % EtOH var klare for dehydrering og innstøpning. Kassetene ble satt til dehydrering etter Tabell 5 i en Shandon Citadel 2000 vevsprosessor (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Påfølgende dag ble vevsbitene tatt ut og innstøpt i blokker av parafinvoks (Histowax® fra Histolab Products AB, Sverige) ved hjelp av en Leica EG 1150H innstøpningsmaskin (Leica Biosystems, Tyskland). Voksblokkene ble lagret ved romtemperatur (RT) for videre behandling.

Tabell 5. Dehydreringstrinn etter program A1 i Shandon Citadel 2000 vevsprosessor.

Kar nr.	Innhold	Tid
1	96 % EtOH	2 t
2	96 % EtOH	2 t
3	100 % EtOH	2 t
4	100 % EtOH	2 t
5	100 % EtOH	1 t
6	HistoClear™ og 100 % EtOH i (1:1)	1 t
7	HistoClear™	1 t
8	HistoClear™	1 t
9	HistoClear™ og parafinvoks (1:1)	1 t
10	Parafinvoks	3 t

4.5.4 Snitting av vevsprøver

Voksblokkene ble nedkjølt på is før snitting, som ble gjennomført i en Leica RM2235 mikrotom (Leica Biosystems GmbH, Tyskland). Voksblokkene ble først trimmet ned til en ønsket dybde i vevet, og deretter snittet ved 5 µm. Snittene ble overført til et vannbad på 40 °C, og videre overført på objektglass. Snittene ble satt i varmeskap ved 60 °C i 2 timer for tørk og avrenning av parafin, før de var klare for fargebehandling med Hematoxylin og Eosin (H&E-farging), forskjellige spesialfarger og immunhistokjemi.

4.5.5 Histologisk farging og montering

For å fjerne overflødig parafinvoks, som fører til ufullstendig farging av vev, ble snittene først inkubert 4 minutter i HistoClear™ (National Diagnostics Inc., UK). Deretter ble prøvene overført til en Leica ST4020 Small Linear Stainer (Leica Biosystems, GmbH, Tyskland) for videre deparafinisering, og farging i henhold til metoder oppført i Tabell 6. Shandon Instant Hematoxylin og Eosin (H&E-farging) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ble benyttet som standard farging av snitt. De forskjellige reagensene ble preparert i henhold til beskrivelse fra produsent. Etter farging, ble dekkglass montert på snittene ved hjelp av et ikke-vannløselig monteringsmedium (Eukitt® fra Fluka Analytical, Munich, Tyskland), før langtidslagring ved RT i påvente av videre analyser.

Tabell 6. Deparafinisering og H&E-farging i Leica ST4020 (90 sekunder i hvert kar).

Kar nr.	Innhold
1	HistoClear™
2	100 % EtOH
3	96 % EtOH
4	96 % EtOH
5	Vann
6	Hematoxylin
7	Hematoxylin
8	Vann
9	Vann
10	Eosin
11	96 % EtOH
12	96 % EtOH
13	100 % EtOH
14	100 % EtOH
15	HistoClear™

4.5.6 Spesialfarging

En rekke spesialfarger ble benyttet for å tilegne mer informasjon av de histologiske vevssnittene.

May-Grünwald / Giemsa

Spesialfargen May-Grünwald / Giemsa (VWR International, Pennsylvania, USA) ble benyttet for å lettere kunne skille mellom erythrocytter og leukocyter. Metoden benyttet er modifisert etter metoder beskrevet i Cellular Pathology Technique (Culling et al., 1985). Denne fargeteknikken skal resultere i å farge cellekjerner blå, røde blodceller rosa, nøytrofile granuler rosa, eosinofile granuler røde, og basofile granuler blå.

Snittene ble satt i tørkeskap i 20 min på 60 °C, og videre ført til program 4 (Tabell 10) i fargemaskinen for deparafinisering og rehydrering. Deretter ble snittene skylt i vann og videre skylt i destillert vann. Snittene ble inkubert i 5 % Giemsa (1 dråpe pr. ml destillert vann (50 µl +1000 µl = 5 % løsning)) i fuktekammer over natt i RT. Påfølgende morgen ble snittene skylt i destillert vann, og differensiert med 0,5 % eddiksyre i ca. 30 sek. Snittene ble raskt dehydrert (dyppet 10 x i hvert bad i alkoholrekken (70 %, 96 %, absolutt, absolutt, absolutt EtOH)) før dekkglass ble montert på med et ikke-vannløselig monteringsmedium (Eukitt® fra Fluka Analytical, Munich, Tyskland).

Toluidinblått (TB)

Spesialfargen TB ble benyttet for å kunne bekrefte tilstedeværelsen av mikroorganismer og detektere mastceller. Denne fargeteknikken skal resultere i å farge mastceller rød til rosa, og cellekjerner og øvrige vev blått. TB er et basisk metakromatisk fargestoff som har sterk affinitet til sure vevskomponenter. Det egner seg derfor godt til å farge kromosomer i mikroorganismer, og for å øke skarpheten i de histologiske snittene (Culling et al., 1985).

Metoden benyttet er modifisert ut i fra metoder beskrevet i Cellular Pathology Technique (Culling et al., 1985). Snittene ble satt i tørkeskap i 20 min på 60 °C, og videre ført til program 4 (Tabell 10) i fargemaskinen for deparafinisering og rehydrering. Deretter ble snittene skylt i vann og videre skylt i destillert vann. Snittene ble inkubert i 1-2 min i TB (1 del 1 % TB i 70 % EtOH og 9 deler 1 % NaCl). Fargen ble deretter skylt av 3 x i destillert vann, og snittene ble

Materialer og metoder

dyppet 10 x i 96 % EtOH, og 10 x i Xylol. Til slutt ble dekkglass montert på med et ikke-vannløselig monteringsmedium (Eukitt® fra Fluka Analytical, Munich, Tyskland).

Periodic Acid Schiff (PAS)

Spesialfargen PAS ble benyttet for påvisning av mucopolysakkarider og andre PAS positive substanser i vevssnittene. Metoden benyttet er modifisert ut i fra metoder beskrevet i Cellular Pathology Technique (Culling et al., 1985). Denne fargeteknikken skal resultere i å farge mukus og PAS-positive substanser rødt til rosa, og cellekjerner blå.

Snittene ble satt i tørkeskap i 20 min på 60 °C, og videre ført til program 4 (Tabell 10) i fargemaskinen for deparafinisering og rehydrering. Deretter ble snittene oksidert i 5 min i 1 % perjodsyre, før de ble overført til vann. Snittene ble inkubert 15 min i Schiff's reagens før prøvene igjen ble overført til vann i 10 min. Til slutt ble snittene satt i program 5 (Tabell 11) i fargemaskinen før dekkglass ble montert på med et ikke-vannløselig monteringsmedium (Eukitt® fra Fluka Analytical, Munich, Tyskland).

Metylenblått

Metylenblått (E. Merck, Darmstadt) (Tabell 7) ble benyttet til farging av snitt for å påvise tilstedeværelse av mikroorganismer/bakterier. Metylenblått er en kationisk farge som farger celler med en blå farge. Negativt ladede molekyler i cellen fører til farging ved at den positivt ladede fargen tiltrekkes av negativt ladede partikler, slik som polyfosfater som DNA og RNA. Fargingen ble utført etter metylenblått, Loefflers metode (Culling et al., 1985). Utvalgte snitt hvor det var mistanke om tilstedeværelse av mikroorganismer ble satt i tørkeskap (60 °C) i 2 timer, deretter ble snittene deparafinisert i HistoClear, og badet i en romtemperert løsning av metylenblått i opptil 30 sekunder. Videre ble snittene vasket i rennende vann i noen sekunder. Overflødig vann ble fjernet før dekkglass ble montert på med et ikke-vannløselig monteringsmedium (Eukitt® fra Fluka Analytical, Munich, Tyskland).

Tabell 7. Oppskrift på metylenblått for farging av mikroorganismer.

Reagenser	Mengde
Metylenblått	0,3 g
Destillert vann	100 ml
EtOH 96 %	30 ml
Kaliumhydroksid	1 ml fra 1 % løsning

Gramfarging

Det ble gjort videre undersøkelser av mikroorganismene ved hjelp av Gramfarging (Tabell 8), for å kunne avgjøre om bakteriene var gram-positive eller -negative. Gram-negative bakterier vil avfarges av alkohol, og miste den primære fargen, lilla. Gram-positive bakterier vil ikke avfarges av alkohol og vil forbli lilla. Etter avfarging ble det utført kontrastfarging for å gi en rosa farge til de gram-negative organismene. Metoden benyttet er modifisert ut i fra metoder beskrevet i Cellular Pathology Technique (Culling et al., 1985).

Tabell 8. Oppskrift på Gramfarging for påvisning av gram-positive og gram-negative bakterier.

Reagenser	
Krystall fiolett 1 %	
Lugol's jod oppløsning	
Aceton	
Fast green (0,2 g fast green pulver i 100 ml absolutt EtOH)	
Nøytralrødt (0,2 g nøytralrødt i 100 ml absolutt EtOH)	
Eddiksyre 2 % (2 ml i 98 ml absolutt EtOH)	
Twort bruksløsning	Mengde
Fast green	100 µl
Nøytralrødt	900 µl
Destillert vann	3 ml

Materialer og metoder

Utvalgte snitt med tilstedeværelse av mikroorganismer ble satt i tørkeskap (60 °C) i 20 min. Snittene ble deretter satt i program 4 i fargemaskinen (Tabell 10) for deparafinisering, men snittene ble fjernet før de kom frem til karet med rennende vann for å unngå rehydrering. Videre gjennomgikk snittene en rekke farge-trinn, illustrert i Tabell 9.

Tabell 9. Utføring av Gramfarging på histologiske snitt for deteksjon av gram-positive og gram-negative bakterier.

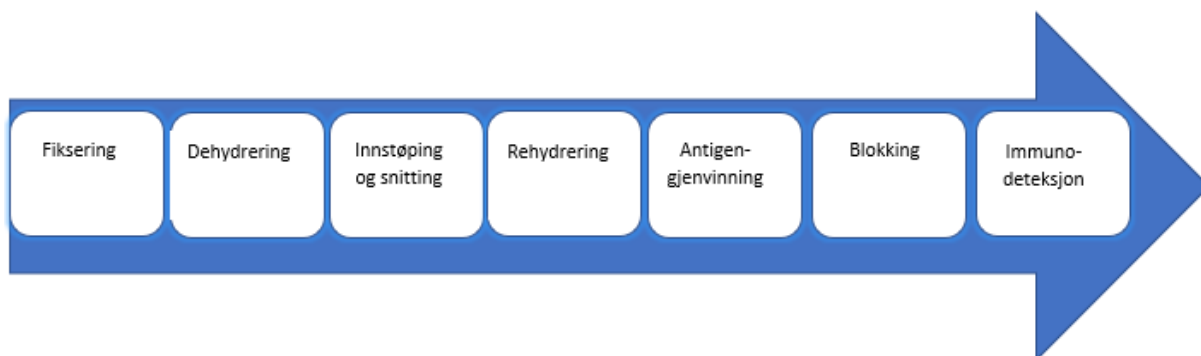
Behandling	Tid
Skyll i destillert vann	10-15 sek
Farging i krystall fiolett	3 min
Skyll i destillert vann	10-15 sek
Farging i Lugol	3 min
Skyll i destillert vann	10-15 sek
Avfarging i aceton	Ikke mer enn 1 sek
Skyll godt i destillert vann	10-15 sek
Farging i Tworts bruksløsning	5 min
Skyll i destillert vann	10-15 sek
Skyll i 2 % eddiksyre	Frem til rødfarge slutter å renne (ca. 10 sek)

Snittene ble så inkubert i alkohol (70 %, (15 sek) 96 % (15 sek), absolutt (10 sek), absolutt (10 sek), absolutt EtOH (10 sek)) og den ble avsluttet i Xylol (15 sek), før dekkglass ble montert på med et ikke-vannløselig monteringsmedium (Eukitt® fra Fluka Analytical, Munich, Tyskland).

4.5.7 Immunhistokjemi

Immunhistokjemi (IHC) er en analysemetode som benyttes for å påvise tilstedeværelse av spesifikke antigener i histologiske snitt (Ramos-Vara & Miller, 2014). Vevssnittene inkuberes med spesifikke antistoffer mot det antigenet man ønsker å detektere, etterfulgt av et sekundært antistoff koblet til et målbart reportertermolekyl. Hovedstegene i IHC er fremstilt i flytskjemaet (Figur 8). I dette forsøket ble immunhistokjemi benyttet for å påvise tilstedeværelsen av leukocytter i tarmen, for å kunne underbygge påstanden om at det er inflammasjon som ble detektert i histologiske undersøkelser.

Det ble valgt ut 3 vevssnitt fra hver av diettgruppene (siste uttak, dag 84), og fra 0-prøvene for farging med IHC. På objektglassene for hver av diettgruppene og 0-prøver ble det lagt to vevsprøver, hvor en av dem ble benyttet som negativ kontroll (tilført kun 2,5 % BSA/TBS uten tilsatt primærantistoff). Det ble i tillegg lagt ved vevssnitt fra fisk påvist fiskesykdommene kardiomyopatisyndrom (CMS) og hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB), som ble benyttet som positive kontroller.



Figur 8. Flytskjema over hovedstegene i immunhistokjemisk fremføring.

4.5.8 Antistoffer

Antistoffene som ble brukt i dette forsøket er mab PCNA 10, som indentifiserer proliferative cellekjerne antigen (PCNA) (α -PCNA, Dako, Glostrup, Denmark), og antistoffet monoklonalt mus α -regnbueørret immunoglobulin M (α -IgM), som var en gave fra Dr. Oriol Sunyer ved University of Pennsylvania.

Antistoffene ble fortynnet i 2,5 % Bovine serum albumin (BSA)/Tris bufret saltvann (TBS-buffer) (8 g NaCl tilsatt 990 ml destillert vann og 10 ml TRIS stamløsning pH 7,6 (VWR International, Pennsylvania, USA)) frem til ønsket løsning. Antistoffet α -PCNA er et kjent kommersielt antistoff, med tidligere publiserte resultater testet på laks med fortynningen 1:150 (Yousaf et al., 2013). For α -IgM var det nødvendig å lage en fortynningsrekke for å komme frem til riktig fortynningsløsning. Det ble konkludert med at fortynningen 1:20 000 gav gode resultater på IHC, og denne løsningen ble senere benyttet i forsøket.

4.5.9 Dehydrering, innstøping og snitting av vev

Dehydrering, innstøping og snitting av vev ble utført etter samme metoder som for histologi (kapittel 4.6.3-4.6.4), med unntak av at det ble benyttet både egenproduserte og kommersielle spesialobjektglass (Poly-Prep Slides) for immunhistokjemi (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Tyskland). De egenproduserte objektglassene ble laget ved å følge produsentens protokoll. Objektglassene ble først rensert i (1 % saltsyre (HCL) i 70 % EtOH), før de ble dyppet i en Poly-L-lysine løsning fortynnet 1:10 med destillert vann, og satt til tørk. Snittene var nå klare for deparafinisering og rehydrering.

4.5.10 Deparafinisering og rehydrering

Deparafinisering og rehydrering ble utført i en fargemaskin fra Leica auto stainer XL (Leica Biosystems, GmbH, Tyskland) ved program 4 (Tabell 10).

Tabell 10. Program 4 i fargemaskinen (Leica auto stainer XL) hvor vevssnittene blir deparafinisert og videre rehydrert.

Kar nr.	Innhold	Tid
1	Xylol	30 sek
2	Xylol	4 min 30 sek
3	Xylol	5 min
4	Absolutt EtOH	2 min 30 sek
5	Absolutt EtOH	2 min 30 sek
6	96 % EtOH	15 sek
7	70 % EtOH	15 sek
8	Rennende vann	1 min

Deparafinisering fjerner overflødige voksrester fra vevssnittene, mens rehydrering tilfører vann til vevet slik at det er klart for videre behandling med blokking og immunhistokjemisk farging.

4.5.11 Blokking og immunhistokjemisk farging

Overflødig væske etter rehydrering ble ristet av objektglassene, og eventuelle vannrester rundt biopsien ble fjernet ved hjelp av trekkpapper. Snittene ble deretter ringet inn (isolert) ved hjelp av en PAP-penn (VWR International, Pennsylvania, USA). TBS-buffer ble tilført objektglassene slik at de dekte over biopsien, mens merkingen av PAP-pennen fikk tørke.

Etter isolering ble snittene vasket 2 x 5 min i TBS-buffer, og videre 5 min i Tris buffered saline Tween (TBST-buffer) (100 ml TBS tilsatt 100 µl Tween 20 (United States Biochemical Corp., Ohio, USA)).

Snittene som skulle testes for α -PCNA ble påført en løsning av 3 % hydrogenperoksid (H_2O_2) i 37 % metanol (CH_3OH). Snittene ble inkubert 10 min i fuktekammer som var tildekt av aluminiumsfolie, siden løsningen er lyssensitiv. Hydrogenperoksid demper endogen peroksidaseaktivitet og vil dermed potensielt redusere bakgrunnsfarging i de histologiske preparatene (Yousaf et al., 2013).

Materialer og metoder

Alle snittene ble videre satt i fuktekammer, før proteinblokkingsmiddel (UltraVision Protein Block, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) ble tilsatt. Det ble tilsatt mellom 100-200 μ l løsning for hver etappe i prosessen, nok til å dekke hele biopsien på objektglasset. Inkuberingstid for blokking var på 5-8 min (ikke mer enn 10 min). Etter blokking, ble blokkingsmiddel ristet av objektglassene før de primære antistoffene (mus α -IgM (1:20 000), α -PCNA (1:150)) ble tilsatt på hver sine vevssnitt. Primærantistoffene ble inkubert i 60 min ved RT i et fuktekammer.

Snittene ble deretter vasket 2 x 5 min i TBS-buffer og 5 min i TBST-buffer, før tilsetting av amplifiser (Primary Antibody Amplifier Quanto, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) etterfulgt av 10 min inkubering ved RT. Snittene ble igjen vasket 5 min i TBS-buffer, før det sekundære antistoffet (UltraVision AP Polymer, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) ble tilsatt og inkubert 10 min ved RT.

Snittene ble vasket 2 x 5 min i TBS-buffer og 5 min i TBST-buffer. Fast Red (Liquid Fast Red, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) og Vector Red løsning (ImmPACT™ Vector Red, Vector Laboratories, Ohio, USA) ble klargjort ut i fra bruksanvisning i ferdig kit. Løsningene ble henholdsvis tilført snitt med α -IgM antistoff og α -PCNA antistoff. Snittene ble inkubert frem til observert farging av vevssnitt (maks 10 min), før snittene ble skylt i rennende vann i minimum 5 min. Snittene var med dette klare for kontrastfarging og dehydrering.

4.5.12 Kontrastfarging og dehydrering

Kontrastfarging med hematoxylin og dehydrering av snitt ble utført i en fargemaskin fra Leica auto stainer XL (Leica Biosystems, GmbH, Tyskland) ved program 5, demonstrert i Tabell 11.

Tabell 11. Program 5 i fargemaskinen (Leica auto stainer XL) hvor vevssnittene blir kontrastfarget og videre dehydrert.

Kar nr.	Innhold	Tid
1	Hematoksylin™	3 min
2	Rennende vann	3 min
3	Rennende vann	15 sek
4	70 % EtOH	15 sek
5	96 % EtOH	15 sek
6	Absolutt EtOH	10 sek
7	Absolutt EtOH	10 sek
8	Absolutt EtOH	10 sek
9	Xylol	10 sek

Kontrastfarging er nødvendig for å kunne se strukturene i vevssnittene tydelig i forhold til cellene farget med IHC. Dehydrering av vevssnittene er nødvendig for videre bevaring av vevet. Til slutt ble dekkglass montert på med et ikke-vannløselig monteringsmedium (Eukitt® fra Fluka Analytical, Munich, Tyskland).

4.5.13 Histopatologiske undersøkelser

Snittene var på forhånd relativt hurtig undersøkt for å ha et inntrykk over hvor omfattende de histopatologiske forandringene var, og for å kunne lage et semikvantitativt graderingssystem som var tilpasset de observerte forandringene. Det ble utviklet et graderingssystem, basert på tidligere publiserte graderingsmetoder (Carmona, 2008), for å kunne gi vevssnittene en score fra 0-3. Score 0 ble gitt ved normalt vev, score 1 ble gitt ved sparsomme forandringer, score 2 ble gitt ved moderate forandringer og score 3 ble gitt ved alvorlige forandringer. Det var ønskelig å undersøke snittene med tanke på tre forskjellige forandringer; inflammasjon, vakuolisering og morfologiske forandringer. Det ble derfor laget tre forskjellige scoringstabeller, tilpasset hver av disse forandringene. Det ble tatt bilder av histologiske snitt med forandringer i de ulike scoringsklassene (0-3) som ble benyttet som veiledning under gradering av alle vevssnittene. Hensikten var for å kvalitetssikre scoringen som ble gjort, og for å kunne sjekke snittene opp mot en referansetabell og referansefigur underveis i scoringen. Systemet ville i tillegg sikre mest mulig enighet mellom de to avleserne som skulle gradere snittene. Det ble valgt en baktarm som viste moderat grad av inflammasjon, og utført seriesnitting (100 snitt). De histologiske seriesnittene ble benyttet for å undersøke om de observerte forandringene var gjennomgående i baktarmen.

Etter graderingssystemet var etablert, ble det gjort en blindet scoring (for å redusere graden av vurderingsbias i metoden) av alle snittene basert på metoder beskrevet av Gibson-Corley et al., (2013). Snittene ble da trukket i tilfeldig rekkefølge og gitt et nummer. Scoringene ble deretter ført inn i en tabell (Appendiks II). Det ble utført en ny blindet scoring av samme person, for å kvalitetssikre den første scoringen. Til slutt ble snittene gradert av en annen person som ikke har sett snittene før. Det ble beregnet hvor mange prosent de to avleserne var enige med hverandre.

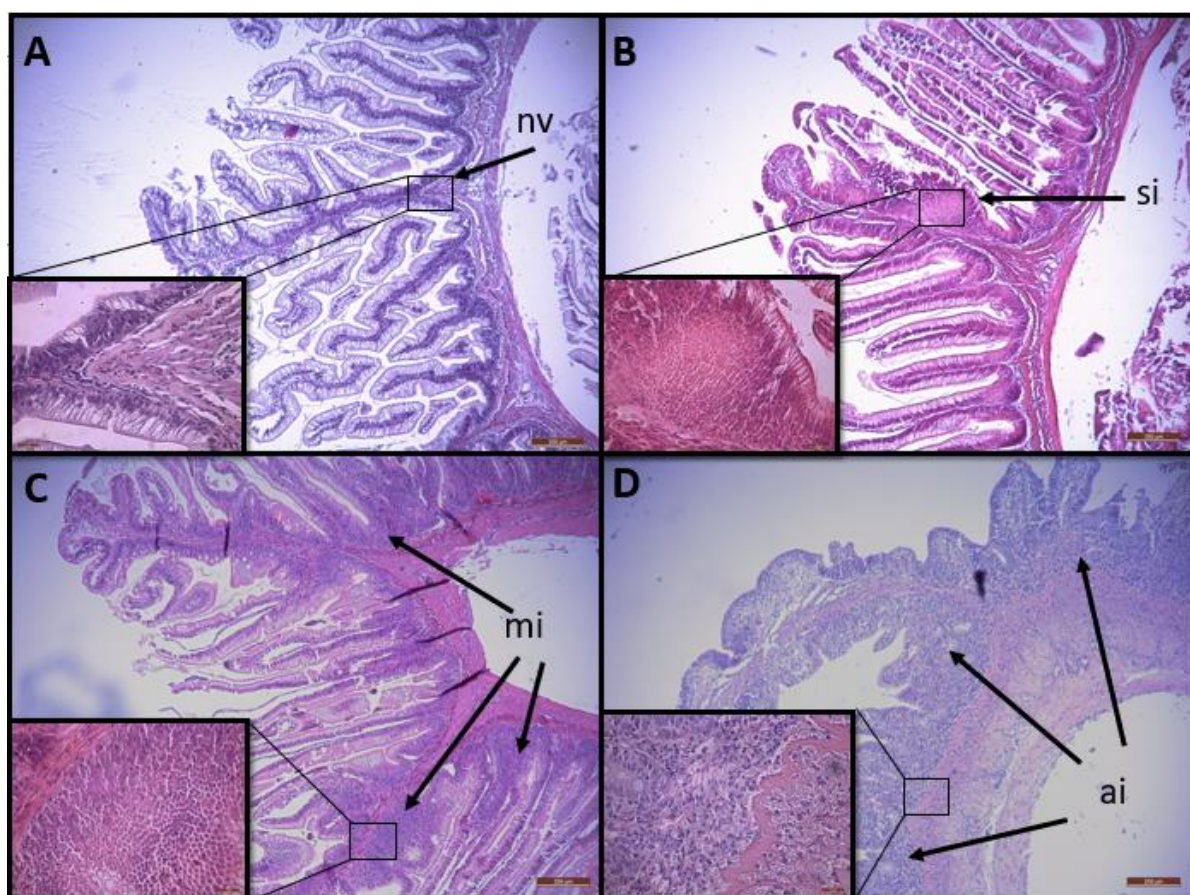
Inflammasjon

Snittene ble først vurdert ut fra et semikvantitativt graderingssystem for grad av inflammasjon (Tabell 12, Figur 9).

Tabell 12. Graderingssystem for inflammasjon i histologiske snitt av baktarm fra laks.

Graden av inflammasjon ble gitt en score fra 0-3, hvor 0 gis ved normalt vev, og 3 gis ved en gjennomgående inflammasjon i vevet.

Score	Gradering	Beskrivelse
0	Normal	Normalt tarmvev
1	Sparsom	En eller få inflammasjoner i tarmvevet, størrelsen på inflammasjonen er liten (ansamling av < 1000 cellekjerner)
2	Moderat	Flere inflammasjoner i tarmvevet, inflammasjonsområdene er store (ansamling av > 1000 cellekjerner)
3	Alvorlig	Gjennomgående inflammasjon i tarmvev



Figur 9. Histologiske snitt av baktarm fra laks med forskjellig grad av inflammasjon.

A = normalt tarmvev (nv), B = grad 1, sparsom inflammasjon (si), C = grad 2, moderat inflammasjon (mi), D = grad 3, alvorlig inflammasjon (ai). De svarte pilene peker på områder med celleansamlinger, som antyder inflammasjon. De innfelte bildene er forstørrelser av områder hvor man kan se celleansamlinger. Målestokk for de store bildene tilsvarer 200 μm , 10 x forstørrelse, mens målestokk for de innfelte bildene tilsvarer 25 μm , 40 x forstørrelse.

Materialer og metoder

Ved å påvise inflammasjon i tarmvevet til laks kan man bekrefte at det er noe som skader eller irriterer tarmen. Dette kan skyldes enten diett, mikroorganismer, stress eller andre faktorer (Torstensen et al., 2013).

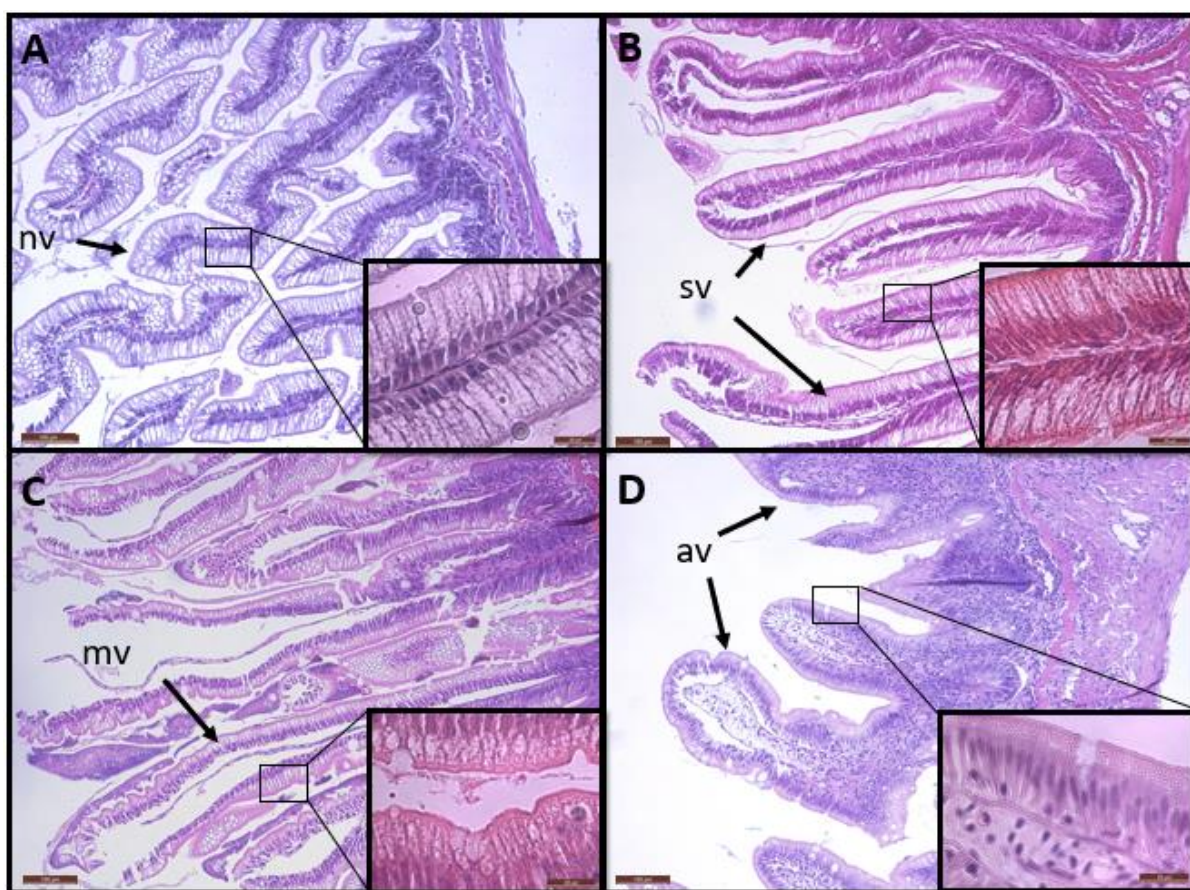
Vakuolisering

Deretter ble snittene vurdert ut fra et semikvantitativt graderingssystem for grad av vakuolisering (Tabell 13, Figur 10).

Tabell 13. Graderingssystem for reduksjon i utbredelsen av, eller fravær av vakuoler i histologiske snitt av baktarm fra laks.

Reduksjon ble gitt en score fra 0-3, hvor 0 gis ved normalt vev, og 3 gis ved fravær av vakuoler i vevet.

Score	Gradering	Beskrivelse
0	Normal	Normalt tarmvev
1	Sparsom	Færre vakuoler tilstede enn i normalt tarmvev
2	Moderat	Betraktelig færre vakuoler på store deler av tarmvevet, fravær av vakuoler lokalt
3	Alvorlig	Vakuoler er fraværende i tarmvevet



Figur 10. Bildene viser histologiske snitt av baktarm fra laks med forskjellig grad av vakuolisering.

A = normalt tarmvev (nv), B = grad 1, sparsom reduksjon i vakuolisering (sv), C = grad 2, moderat reduksjon i vakuolisering (mv), D = grad 3, alvorlig forandring/ingen tilstedeværelse av vakuoler (av). De svarte pilene peker på områder med vakuolisering som representerer forandringer typisk for den gitte graderingen. Målestokk for de store bildene tilsvarer 100 μ m, 20 x forstørrelse, mens målestokk for de innfelte bildene tilsvarer 25 μ m, 40 x forstørrelse.

Materialer og metoder

En reduksjon i antall og størrelse på vakuoler i tarmvevet er et kjent problem hos laks ved fôring av andre plantebaserte dietter, spesielt med soyabønnemel. En reduksjon i vakuolisering kan føre til helseproblemer for laksen (Bakke-McKellep et al., 2007a). Derfor er dette en viktig faktor å undersøke med tanke på tarmhelsen.

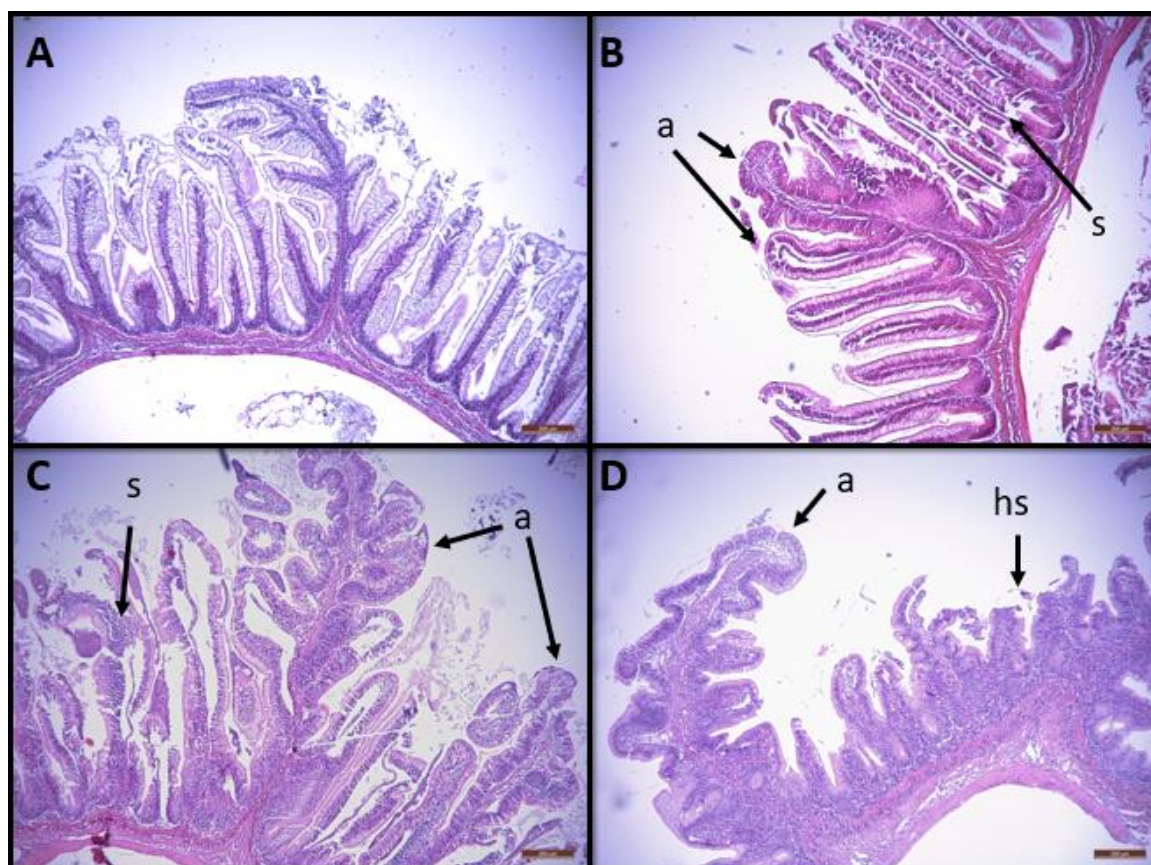
Morfologiske forandringer

Til slutt ble snittene vurdert ut fra et semikvantitativt graderingssystem mht. tarmmorfologi (Tabell 14, Figur 11). Det ble lagt vekt på et helhetlig inntrykk, da snittene ble vurdert morfologisk.

Tabell 14. Graderingssystem for morfologiske forandringer (forkortning, avrundning, sammenvoksing) i histologiske snitt av baktarm fra laks.

Graden av morfologiske forandringer ble gitt en score fra 0-3, hvor 0 gis ved normalt vev, og 3 gis ved morfologiske forandringer av alle tarmtotter i vevet.

Score	Gradering	Beskrivelse
0	Normal	Normalt tarmvev
1	Sparsom	Tarmtotter er forkortet, avrundet, sammenvokst i deler av tarmvevet
2	Moderat	Gjennomgående forandringer av tarmtottene i tarmvevet
3	Alvorlig	Alle tarmtotter er betydelig forkortet, avrundet eller sammenvokst



Figur 11. Bildene viser histologiske snitt av baktarm fra laks med forskjellig gradering av morfologiske forandringer.

A = normalt tarmvev, B = grad 1, sparsom morfologisk forandring, C = grad 2, moderat morfologisk forandring, D = grad 3, alvorlig morfologisk forandring. Graderingen ble gitt ut i fra en helhetlig vurdering av snittene. Pilene peker på avrundede områder på tarmtottene (a), sammenvokste områder (s), og helt sammenvokste områder (hs). Målestokk tilsvarer 200 μ m.

Det er viktig å gjøre undersøkelser hvor det fokuseres på form av tarmtottene også. Tarmtottene er utformet for å ha størst mulig overflate, for å kunne ta opp næringsstoffer etter beste evne. Denne evnen vil i teorien kunne påvirkes ved at tarmtottene avrundes eller vokser sammen, da dette medfører at overflaten blir mindre. Ved å undersøke morfologiske forandringer får man også et helhetlig bilde på hvordan tarmvevet ser ut. Pilene peker på avrundede områder på tarmtottene (a), sammenvokste områder (s), og helt sammenvokste områder (hs).

De histologiske snittene ble analysert med et DM6000 B (Leica Microsystems) lysmikroskop, og bildene ble tatt med et Leica DFC 320 (Leica Microsystems) digitalkamera. Bildene ble integrert med bruk av Leica Application Suite V3 programvare. Fra hvert tarmsnitt ble det lagt sammen en sum fra de tre forskjellige graderingssystemene til en totalscore, som vil kunne gi et estimat på den totale forandringen (Appendiks II).

4.5.14 Undersøkelse av mikroorganismer

Spesialfaringener ble benyttet for å påvise tilstedeværelse av mikroorganismer i de histologiske vevssnittene. Deretter ble alle de histologiske snittene registrert for tilstedeværelse eller ikke tilstedeværelse av mikroorganismer (bakteriekolonier). Resultatene ble ført inn i en tabell (Appendiks II) og grafisk fremstilt.

4.6 Statistiske analyser og grafisk fremstilling

Databasen for graderingsystemet fra de histologiske undersøkelser ble etablert i Excel 2016 for Windows (Microsoft Co., USA). Statistiske analyser ble gjennomført ved hjelp av GraphPad Prism 7, for Windows.

All innsamlet data som ble analysert og presentert i oppgaven, ble antatt normalfordelt eller tilnærmet normalfordelt. Det ble benyttet en to-faktors variansanalyse (ANOVA) med Tukey's post hoc test, for å beregne statistisk signifikans på vekt- og lengde data. Mann-Whitney test ble benyttet for å beregne statistisk signifikans mellom de ulike diettgruppene og uttaksdagene på histologisk tarmscoring. Forskjellene ble vurdert som signifikante hvis p-verdien var mindre enn 0,05 ($p < 0,05$). De signifikante forskjellene ble presentert i figurer med symboler etter Tabell 15 (Motulsky, 2003).

Tabell 15. Oversikt over hvordan ulike p-verdier blir presentert ved symbol i resultatene (Motulsky, 2003).

P-verdi	Betydning	Symbol
$P > 0,05$	Ingen signifikans	ns
$P \leq 0,05$	Signifikant	*
$P \leq 0,01$	Veldig signifikant	**
$P \leq 0,001$	Ekstremt signifikant	***

5. Resultater

5.1 Velferdsindikatorer

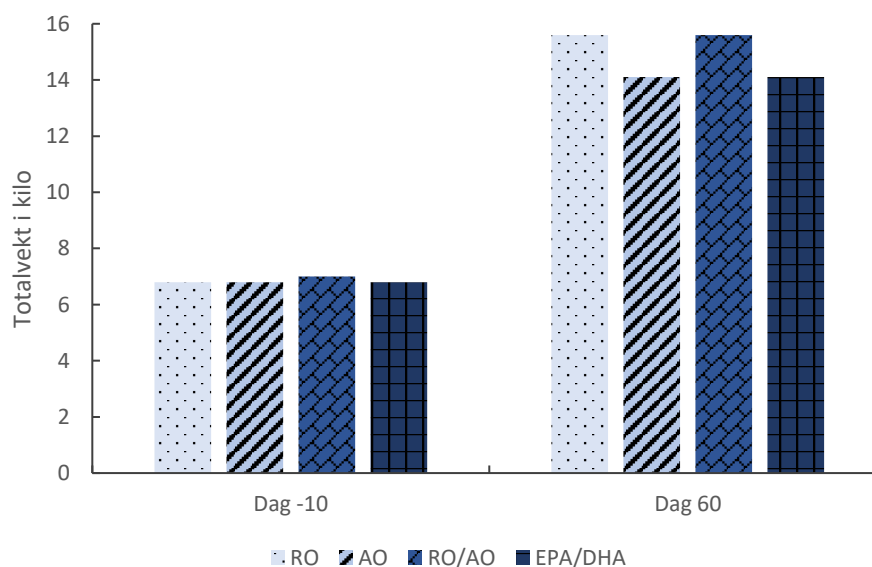
5.1.1 Overlevelse

Dødelighet ble registrert daglig gjennom hele forsøksperioden. Ingen dødelighet ble registrert fra de forskjellige diettgruppene (RO, AO, RO/AO og EPA/DHA).

5.1.2 Totalvekt for fisk i de ulike diettgruppene

Det ble målt totalvekt for hver diettgruppe $n = 150$ laks ved dag -10 (pre-forsøk), og $n = 120$ laks ved dag 60. Totalvekt ble målt av Iselin Evje ved Norges fiskerihøgskole, UIT Norges arktiske universitet.

Figur 12 viser totalvekten ved starten av akklimatiseringsperioden (dag -10) og etter 60 dagers fôring med forsøksdiettene. Alle diettgruppene var omtrent lik ved dag -10 på rundt 6,8-7,0 kg. Ved dag 60 var totalvekten for diettgruppen fôret med RO og RO/AO 15,6 kg, mens den var på 14,1 kg for diettgruppene fôret med diett AO og EPA/DHA. Snittveken på fiskene ved dag 60 var for diett RO og RO/AO = 130 g, og for diett AO og EPA/DHA = 117 g.



Figur 12. Totalvekt av laks ved dag -10 (pre-forsøk) og dag 60.

Ved dag -10 er $n = 150$, og ved dag 60 er $n = 120$.

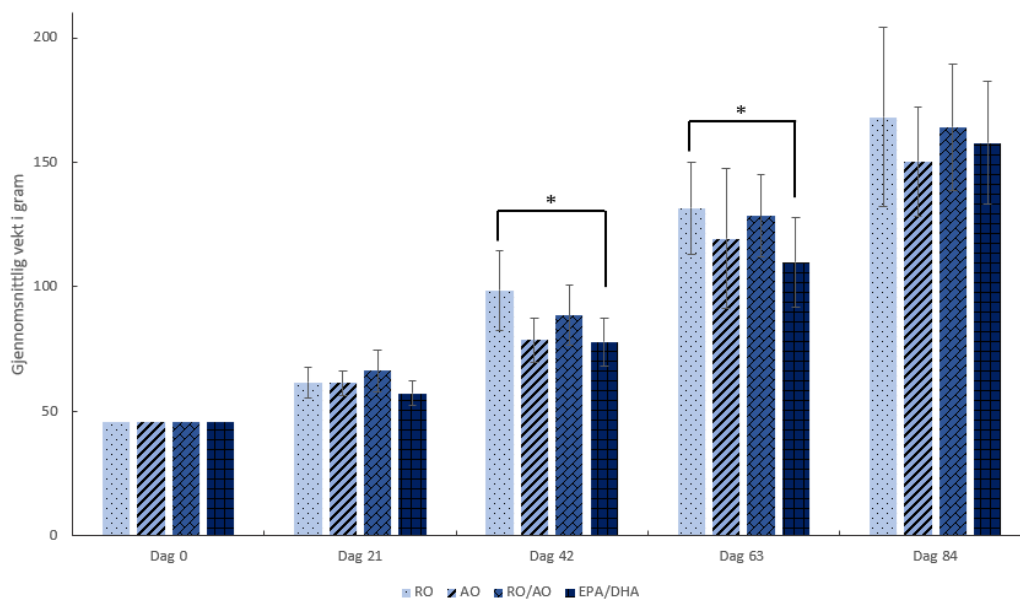
Resultater

Totalvekten av alle fiskegruppene økte i løpet av fôringsperioden (Figur 12). Den største vektøkningen var for fisk fôret med diettene RO og RO/AO, som viste en økning i snittvekt på henholdsvis 84,5 g og 83,8 g. Begge disse diettene hadde tilsatt rapsolje i fôret. Fisken som gikk på diett med fiskeolje, diett AO og EPA/DHA, hadde begge en økning i snittvekt på 71,6 g ved dag 60. Den spesifikke vekst hastigheten (SGR) fra dag -10 til dag 60 var påfølgende: RO = 1,49; RO/AO = 1,44; AO og EPADHA = 1,34.

5.1.3 Vekt og lengde utvikling

Vekt og lengde ble registrert ved alle uttak (dag- 21, 42, 63, og 84), $n = 10$ for alle diettgrupper.

Figur 13 viser gjennomsnittlig kroppsvekt av fisk fra de fire forskjellige diettgruppene RO, AO, RO/AO og EPA/DHA, ved 0, 21, 42, 63 og 84 dager etter forsøksstart.



Figur 13. Vektutvikling over en periode 84 dager for laks fôret med fire ulike dietter.

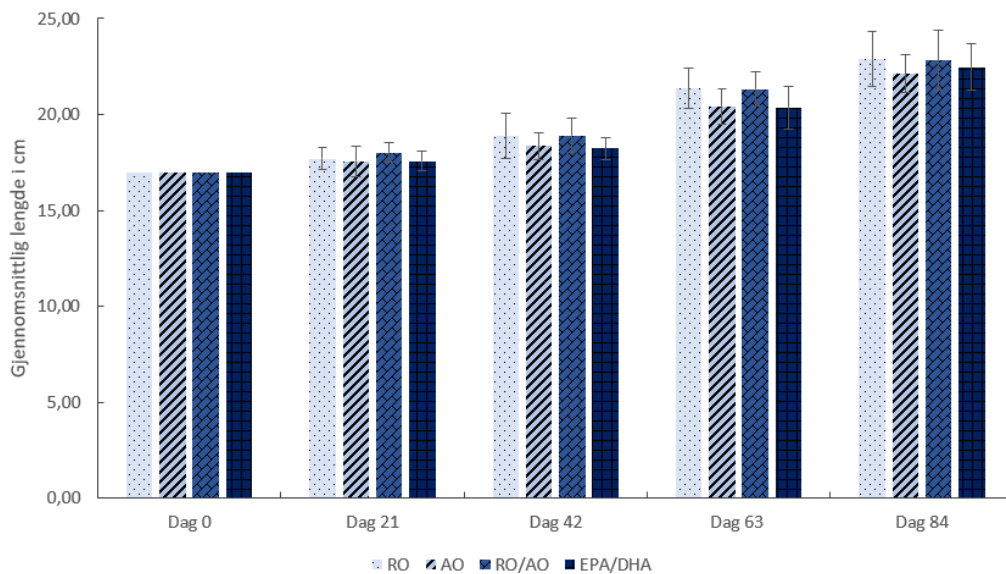
Gjennomsnittsverdier \pm standardavvik ($n = 10$). Stjerne (*) med tilhørende bro, viser grupper med statistiske signifikante forskjeller ($p < 0,05$) (ANOVA).

Resultatene viser en vektøkning for de forskjellige diettgruppene fra 46 g ved dag 0, til 168,1 g (RO), 150,3 g (AO), 164 g (RO/AO) og 157,8 g (EPA/DHA) ved dag 84. Den prosentvise veksten gjennom hele forsøket for de respektive gruppene var henholdsvis 265,2 % (RO), 226,7 % (AO), 256,5 % (RO(AO), 243 % (EPA/DHA). Det var signifikant forskjell mellom diettgruppe RO og EPA/DHA ved dag 42 og 63. På dag 84 var det fisken fôret med ansjosolje som viste den laveste gjennomsnittsvekten på $150,3 \pm 21,7$ g, mens fisk fôret med rapsolje hadde det høyeste gjennomsnittet på $168,1 \pm 36$ g (Figur 13). Men det var ingen statistisk signifikante forskjell mellom disse gruppene. SRG fra dag 0 til dag 84 var for RO = 1,54, AO = 1,41, RO/AO = 1,51, og EPA/DHA = 1,46.

Resultatene indikerer at diettene med innhold av rapsolje gav høyere vekst enn diettene med marine oljer, men det var ingen signifikante forskjeller som kunne bekrefte dette.

Resultater

Figur 14 viser gjennomsnittlig kroppslengde for fisk fra de fire forskjellige diettgruppene RO, AO, RO/AO og EPA/DHA, ved 0, 21, 42, 63 og 84 dager etter forsøksstart.



Figur 14. Lengdeutvikling over en periode 84 dager for laks fôret med fire ulike dietter.

Gjennomsnittsverdier \pm standardavvik ($n = 10$). Det var ingen statistiske signifikante forskjeller mellom diettgruppene ($p < 0,05$) (ANOVA).

Resultatene viser en lengdeøkning for de forskjellige diettgruppene fra 17 cm ved dag 0, til 22,9 cm (RO), 22,1 cm (AO), 22,8 cm (RO/AO) og 22,5 cm (EPA/DHA) ved dag 84. Den prosentvise veksten gjennom hele forsøket for de respektive gruppene var henholdsvis 34,7 % (RO), 30 % (AO), 34,1 % (RO/AO), 32,4 % (EPA/DHA). På dag 84 var det fisken fôret med ansjosolje som viste den laveste gjennomsnittslengden på $21,1 \pm 1$ cm, mens fisk fôret med rapsolje viste det høyeste gjennomsnittet på $22,9 \pm 1,4$ cm (Figur 14). Det var ingen statistiske signifikante forskjeller mellom diettgruppene på noen av uttakstidspunktene.

Kondisjonsfaktoren økte for alle diettgrupper fra forsøksstart til forsøksslutt, fra til 0,94 ved uttaksdag 0, til 1,4 (RO), 1,39 (AO), 1,38 (RO/AO) og 1,39 (EPA/DHA) ved dag 84.

5.2 Makroskopiske undersøkelser av baktarm

5.2.1 Kontrollprøve

Figur 15 viser en baktarm fra laks med normal morfologi. Denne baktarmen ble benyttet som kontroll opp mot baktarmene fra diettgruppene med forsøksfôr. Baktarmen er vrenget med innsiden ut, og vasket med buffer (PBS).



Figur 15. Baktarm med normal morfologi.

Bildet ble benyttet som kontroll mot baktarmer med morfologiske avvik. Målestokk tilsvare 1 cm.

Kontrolltarmen har en blank og jevn overflate, og en mørk brunfarge på baktarmen, som gradvis går over i en lysere brunfarge bakover mot gattet. Baktarmen har en fast struktur. I den øvre delen av baktarmen kan man se en tydelig overgang til tynntarmen, som er betraktelig smalere og lysere på farge. Tarmfoldene kan sees som vertikale, lyse striper over baktarmen.

5.2.2 Baktarmer fra laks på forskjellige forsøksdietter

Første uttak, dag 21

Ved første uttak, dag 21, ble det observert en tarm med morfologiske avvik. De andre baktarmene fra uttaket ble registrert som normale. Totalt var $n = 5$ for hver diettgruppe.

Figur 16 viser bildet av baktarmen som var morfologisk avvikende fra resten av baktarmene i uttaksgruppen. Denne baktarmen tilhørte diettgruppe EPA/DHA.



Figur 16. Morfologisk avvikende baktarm fra diettgruppen føret med EPA/DHA, første uttak, dag 21.

$n = 5$. Målestokk tilsvarende 1 cm.

Bildet viser en fisketarm med mange små, hvite flekker på den brune baktarmen. Det er så mange hvite flekker at store deler av baktarmen var lysere av farge, og det er kun et lite område på baktarmen som fremstår av normal mørkebrun farge. Baktarmen ser også ut til å være løsere i struktur sett opp mot kontrolltarmen.

Resultater

Andre prøveuttak, dag 42

Ved andre uttak, dag 42, ble det observert en baktarm med morfologiske avvik. De andre baktarmene fra uttaket ble registrert som normale. Totalt var $n = 10$ for hver diettgruppe.

Figur 17 viser bildet fra innsiden av en baktarm som var morfologisk avvikende fra resten av baktarmene i uttaksgruppen. Denne baktarmen tilhørte diettgruppe RO.



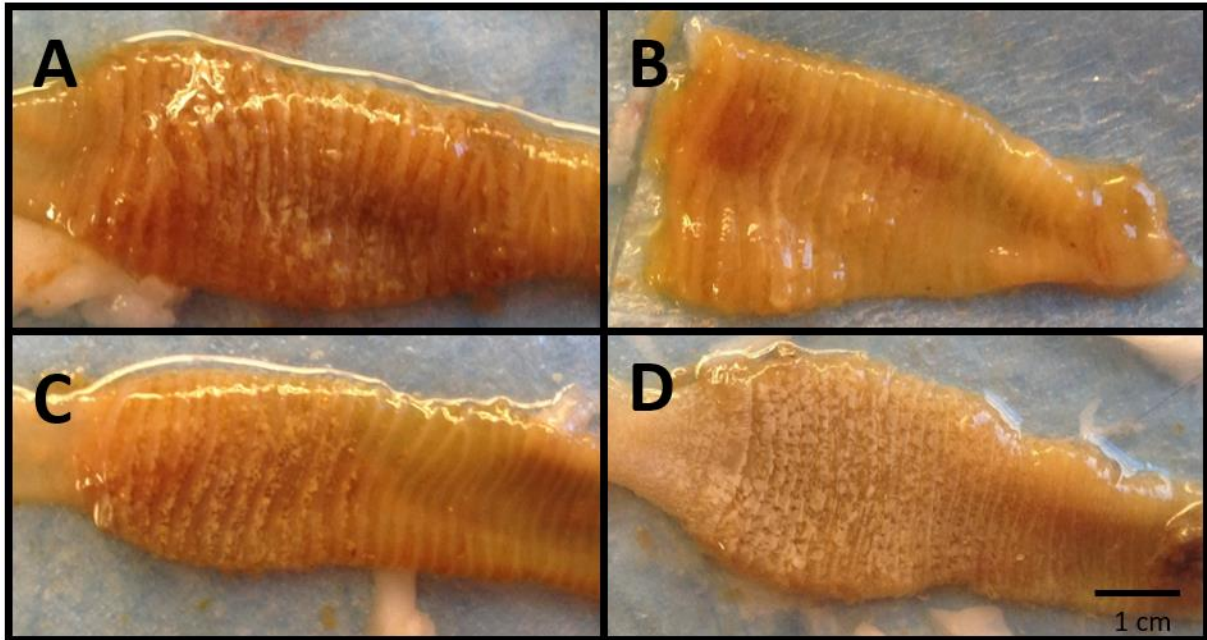
Figur 17. Morfologisk avvikende baktarm fra diettgruppen fôret med RO, andre uttak, dag 42.

Bildet ble tatt etter prøveuttaket, derfor er baktarmen kuttet i to deler. $n = 10$. Målestokk tilsvarer 1 cm.

Bildet over ble tatt etter prøveuttaket, derfor er baktarmen kuttet i to deler (Figur 17). Baktarmen har flere hvite flekker på den brune overflaten. Det er så mange hvite flekker at baktarmen fremstår som mye lysere i fargen i forhold til kontrolltarmen. Baktarmen ser også ut til å være løsere i strukturer sammenlignet med kontrolltarmen.

Tredje prøveuttak, dag 63

Figur 18 viser bilder fra innsiden av baktarmer med morfologisk avvikende utseende fra samtlige diettgrupper (RO, AO, RO/AO, EPA/DHA).



Figur 18. Morfologisk avvikende baktarm fra samtlige diettgrupper, tredje uttak, dag 63.

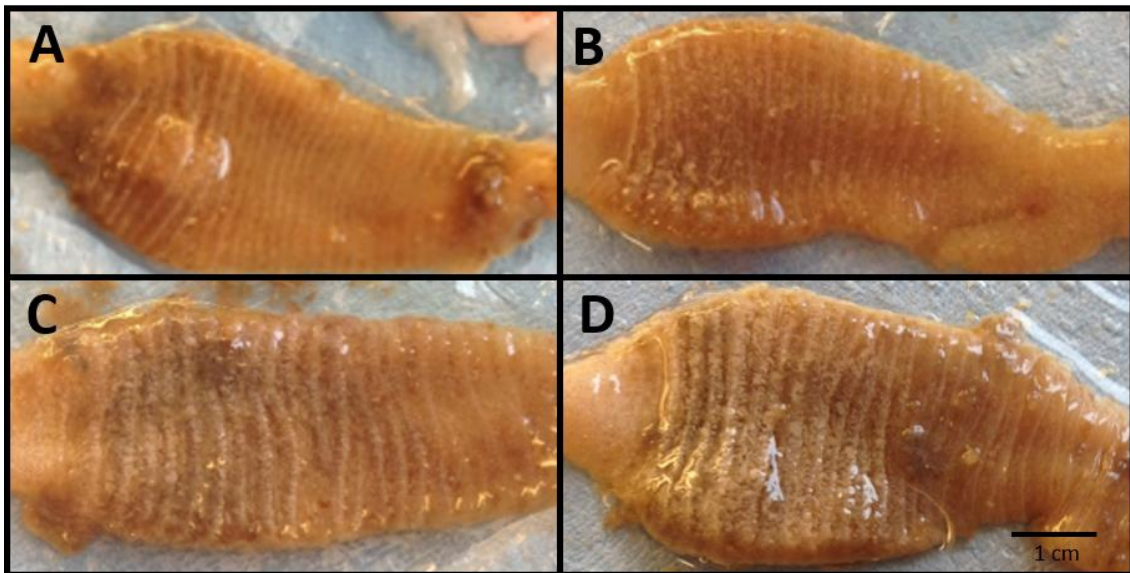
Baktarm fra laks føret med diett A = RO, B = AO, C = RO/AO, D = EPA/DHA. n = 10. Målestokk tilsvarer 1 cm.

Det var en økning i antall morfologiske avvikende baktarmer fra de to første prøveuttakene til det tredje prøveuttaket (kapittel 5.2.3). Det ble funnet morfologiske avvikende baktarmer i samtlige diettgrupper (Figur 18). Baktarmen fra diett RO (A) hadde partier med hvite flekker, men den brune fargen, som var tilsvarende farge som hos kontrolltarmen (Figur 15), var fremdeles godt synlig. I tillegg har baktarmen fast struktur i likhet med kontrolltarmen. Baktarmen fra diett AO (B) viste noen få hvite flekker på midten og fremsto noe blekere enn kontrolltarmen. I tillegg hadde baktarmen løsere struktur sammenlignet med kontrolltarmen. Baktarmen fra diett RO/AO (C) hadde tydelige hvite flekker på fremre del av baktarmen, opp mot overgangen til tynntarmen. Baktarmen så ellers ut til å ha en fast struktur, og en brunfarge som lignet kontrolltarmen. Baktarmen fra diett EPA/DHA (D) viste hvite flekker som dekket hele overflaten. På grunn av de heldekkende, hvite flekkene fremsto baktarmen mye lysere i fargen i forhold til kontrolltarmen. I tillegg var den løsere i strukturen. Totalt sett skilte baktarmene fra diett EPA/DHA (D) seg mest ut ved makroskopiske observasjonene etter tredje uttak, dag 63.

Uttak dag 84

Alle baktarmene ble registrerte som unormale, og hos to av fiskene ble det registrert diaré (vandig avføring).

Figur 19 viser bilder fra innsiden av baktarmer med morfologisk avvikende utseende fra samtlige diettgrupper (RO, AO, RO/AO, EPA/DHA).



Figur 19. Morfologisk avvikende baktarm fra samtlige diettgrupper, fjerde uttak, dag 84.

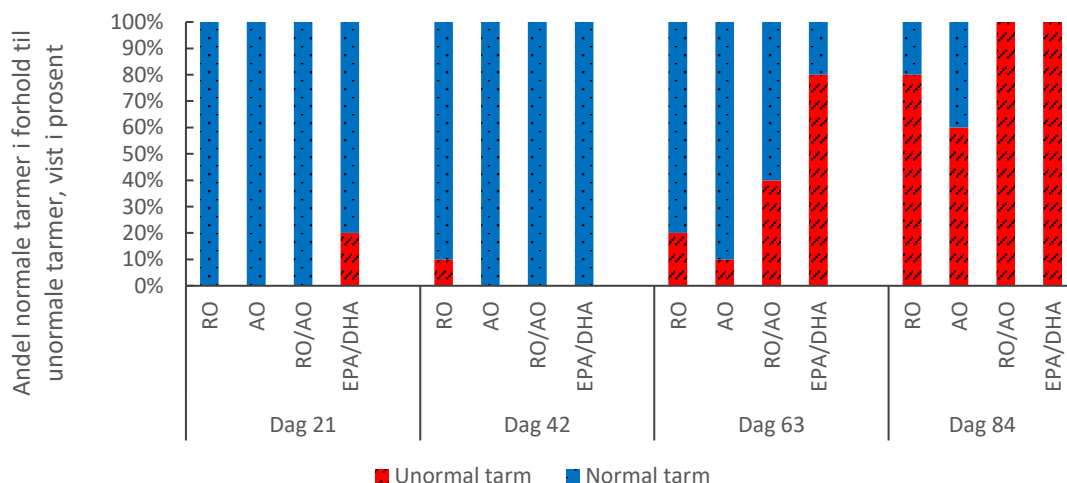
Baktarm fra fisk føret med diett A = RO, B = AO, C = RO/AO, D = EPA/DHA. n = 10. Målestokk tilsvare 1 cm.

Det var en økning i antall morfologiske avvikende baktarmer fra tredje prøveuttak, dag 63, til det fjerde og siste prøveuttaket, dag 84 (kapittel 5.2.3). På dette prøveuttaket viste flesteparten av fisketarmene morfologiske avvik fra normale tarmen i samtlige diettgrupper (Figur 19). Baktarmen fra diett RO (A) viste antydning til små hvite flekker på fremre del av baktarmen, opp mot overgangen til tynntarm. Tarmen hadde en noe lysere brunfarge enn kontrolltarmen (Figur 15), og en løs struktur. Tarmen fra diett AO (B) hadde i større grad enn (A) hvite flekker på øvre del av baktarmen, og fremsto også som noe lysere på farge, og løsere i struktur enn kontrolltarmen. Tarmen fra diett RO/AO (C) viste flere og større hvite flekker i forhold til A og B, og fremsto enda lysere på fargen og mer slapp i strukturen. Tarmen fra diett EPA/DHA (D) hadde hvite flekker som dekket over hele overflaten. På grunn av de heldekkende, hvite flekkene fremsto tarmen mye lysere i fargen i forhold til kontrolltarmen. I tillegg var den løsere i strukturen. Også her skilte tarmene fra diett EPA/DHA (D) seg mest ut ved makroskopiske observasjonene etter fjerde og siste uttak, dag 84. Fisken fremsto ellers frisk og lytefri ved utvendig morfologisk undersøkelse (Appendiks I).

5.2.3 Forholdet mellom andel normale- og unormale baktarmer

Andelen med normale og unormale baktarmer ble grafisk fremstilt, for å kunne gi en oversikt over forskjellene mellom diettgruppene og uttakstidspunktene.

Figur 20 viser en grafisk fremstilling av andel normale baktarmer (blå farge) i forhold til andel unormale baktarmer (rød farge) fra de forskjellige diettgruppene ved gitte uttaksdager. $n = 10$ ved alle uttaksdager unntatt dag 21, hvor $n = 5$.



Figur 20. Forholdet mellom andelen normale baktarmer (blåfarge), og unormale baktarmer (rødfarge).

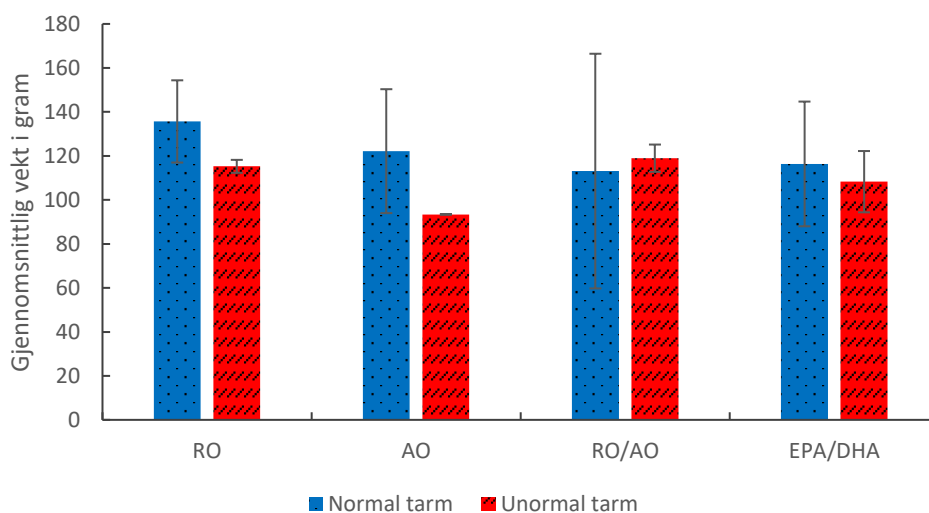
Uttaksdager: 21, 42, 63 og 84. $n = 5$ for uttaksdag 21, $n = 10$ for alle andre uttak.

Det er en økning i andel unormale baktarmer mot andel normale baktarmer fra forsøksstart til forsøksslutt (Figur 20). Ved første prøveuttak, dag 21, ble det observert en baktarm med unormalt utseende, og en til på andre prøveuttak, dag 42. På tredje prøveuttak, dag 63, ble det ble observert unormale baktarmer i alle diettgrupper. Av baktarmene fra laks som hadde gått på dietten EPA/DHA, viste hele 80 % å ha et morfologisk avvikende utseende. På det siste uttaket, dag 84, var det en større andel av unormale baktarmer i forhold til normale baktarmer ved alle diettgrupper. Ved diettene RO/AO og EPA/DHA var alle de undersøkte baktarmene (100 %) makroskopiske avvikende. Diett RO, og diett AO hadde henholdsvis 80 og 60 % unormale baktarmer, og viste minst patologiske forandringer sett opp mot kontroll.

5.2.4 Vekt- og lengdeutvikling for fisk med normal baktarm i forhold til fisk med unormal baktarm

På uttaksdag 63 ble det observert normale og unormale baktarmer i alle diettgruppene. Det var derfor interessant å sammenligne vekt- og lengdedata mellom fiskene i de ulike diettgruppene.

Figur 21 viser forholdet mellom gjennomsnittlig vekt hos fisk med normal baktarm, mot gjennomsnittlig vekt hos fisk med unormal baktarm.



Figur 21. Gjennomsnittlig kroppsvekt \pm standardavvik for laks med normalt baktarm plottet mot tarmene med unormalt baktarm for hver av de fire diettgruppene ved uttaksdag 63.

Totalt var det $n = 10$ fra hver diett, men det var forskjellig antall av normal og unormal baktarm: $n = 8$ for RO normal baktarm, $n = 2$ for RO unormal baktarm, $n = 9$ for AO normal baktarm, $n = 1$ for AO unormal baktarm, $n = 6$ for RO/AO normal baktarm, $n = 4$ for RO/AO unormal baktarm, $n = 2$ for EPA/DHA normal baktarm, $n = 8$ for EPA/DHA unormal baktarm.

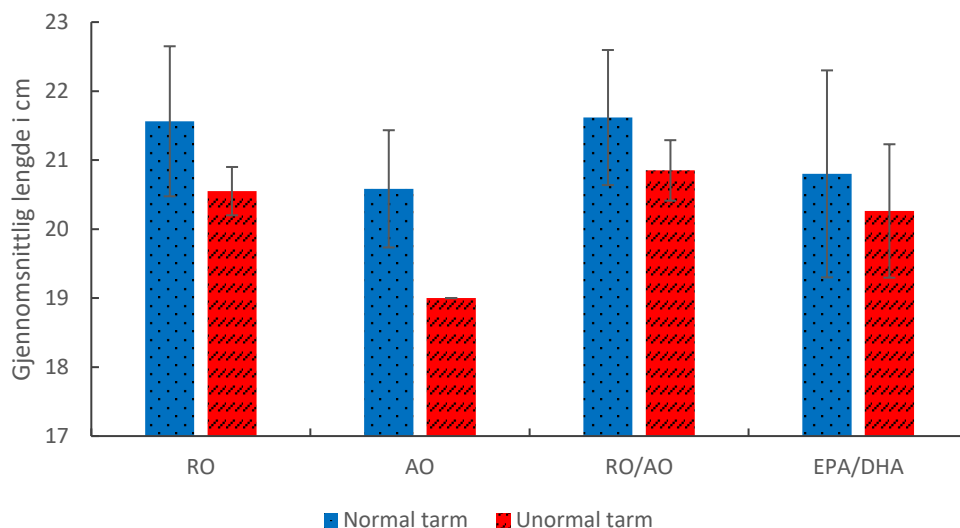
Resultatene viste en trend hvor baktarmene med avvikende morfologisk utseende har lavere vekt enn baktarmene med normalt utseende (Figur 21). For diett RO hadde fisk med normal baktarm en gjennomsnittsvikt på 135,7 g, mens fisk med unormal baktarm hadde en gjennomsnittsvikt på 115,3 g. Dette utgjorde en forskjell på 20,4 g som tilsvarer 15 %. Den største forskjellen var i dietten med AO, hvor gjennomsnittsvikt for fisk med normal baktarm var på 122,2 g og fisk med unormal baktarm var på 93,4 g. Dette utgjorde en forskjell på 28,8 g som tilsvarer 23,6 %. For diett RO/AO hadde fisk med normal baktarm en gjennomsnittsvikt på 113 g, mens fisk med unormal baktarm hadde en gjennomsnittsvikt på 119 g, og dette utgjorde en forskjell på 6 g som tilsvarte 5,3 %. For diett EPA/DHA hadde fisk med normal

Resultater

baktarm en gjennomsnittsvekt på 116,4 g, mens fisk med unormal baktarm hadde en gjennomsnittsvekt på 108,3 g. Dette utgjorde en forskjell på 8,1 g som tilsvarte 7 %. For diett RO, AO og EPA/DHA registrerte man en høyere vekt for fisk med normal baktarm. Dette gjaldt ikke for diett RO/AO, hvor fisk med unormal baktarm hadde en høyere vekt, selv om dette bare utgjorde 6 g.

På grunn av et lavt antall prøver i enkelte grupper, ble det ikke beregnet statistikk på dette datamaterialet.

Figur 22 viser forholdet mellom gjennomsnittlig lengde hos fisk med normal baktarm, mot gjennomsnittlig lengde hos fisk med unormal baktarm. Lengdedata er fra prøveuttaket på dag 63 i forsøksperioden, for diettene RO, AO, RO/AO og EPA/DHA.



Figur 22. Gjennomsnittlig kroppslengde ± standardavvik for normale baktarmer plottet mot unormale baktarmene, for hver av de fire diettgruppene ved uttaksdag 63.

Totalt er $n = 10$ fra hver diett, men det er forskjellig antall av normal og unormal tarm: $n = 8$ for RO normal baktarm, $n = 2$ for RO unormal baktarm, $n = 9$ for AO normal baktarm, $n = 1$ for AO unormal baktarm, $n = 6$ for RO/AO normal baktarm, $n = 4$ for RO/AO unormal baktarm, $n = 2$ for EPA/DHA normal baktarm, $n = 8$ for EPA/DHA unormal baktarm.

Resultatene viste en trend, hvor tarmene med avvikende morfologisk utseende har kortere lengde enn tarmene med normalt utseende (Figur 22). For diett RO hadde fisk med normal tarm en gjennomsnittslengde på 21,6 cm, mens fisk med unormal tarm hadde en gjennomsnittsvekt på 20,6 cm. Dette utgjorde en forskjell på 1 cm som tilsvarende 4,6 %. Den største forskjellen var i dietten med AO, hvor gjennomsnittslengden for fisk med normal baktarm var på 20,6 cm og

Resultater

for fisk med unormal baktarm var på 19 cm. Dette utgjorde en forskjell på 1,6 cm som tilsvarer 7,8 %. For diett RO/AO hadde fisk med normal baktarm en gjennomsnittsvikt på 21,6 cm, mens fisk med unormal baktarm hadde en gjennomsnittsvikt på 20,9 cm. Forskjellen her var 0,7 cm, noe som tilsvarer 3,2 %. For diett EPA/DHA hadde fisk med normal baktarm en gjennomsnittsvikt på 20,8 cm, mens fisk med unormal baktarm hadde en gjennomsnittsvikt på 20,3 cm. Dette utgjorde en forskjell på 0,5 cm (2,4 %). Ut ifra resultatene kan det se ut som fisk med normal baktarm har lengre kropp i forhold til fisk med unormal baktarm.

På grunn av et lavt antall prøver i enkelte diettgrupper, ble det ikke beregnet statistikk på dette datamaterialet.

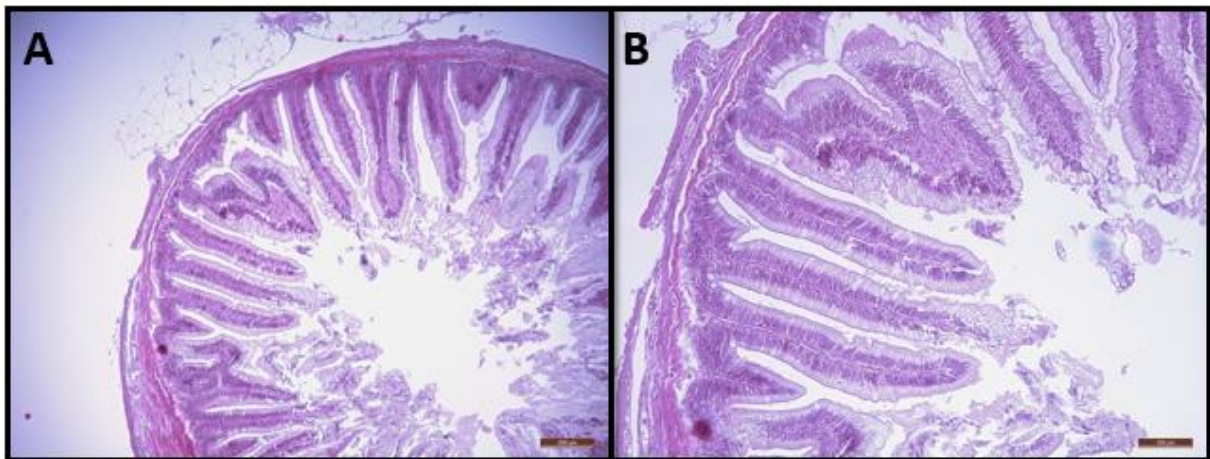
5.3 Histopatologiske undersøkelser av baktarm

Histopatologiske undersøkelser ble gjennomført for å påvise eventuelle effekter av de forskjellige diettene. Forskjellige grader av inflammasjon, vakuolisering og morfologiske forandringer ble benyttet som indikator på patologiske forandringer av vevet i baktarm.

5.3.1 Kontroll prøver

Først ble prøvene som ble tatt ut av fisk før forsøksstart (0-prøver) studert og tatt bilde av (n = 10).

Figur 23 viser histologiske snitt av baktarm fra laks tatt første dag av forsøket, før fiskene ble satt på forskjellige dietter (0-prøver). Disse prøvene ble benyttet som kontroll for sammenligning opp mot histologiske snitt fra senere uttakstidspunkter.



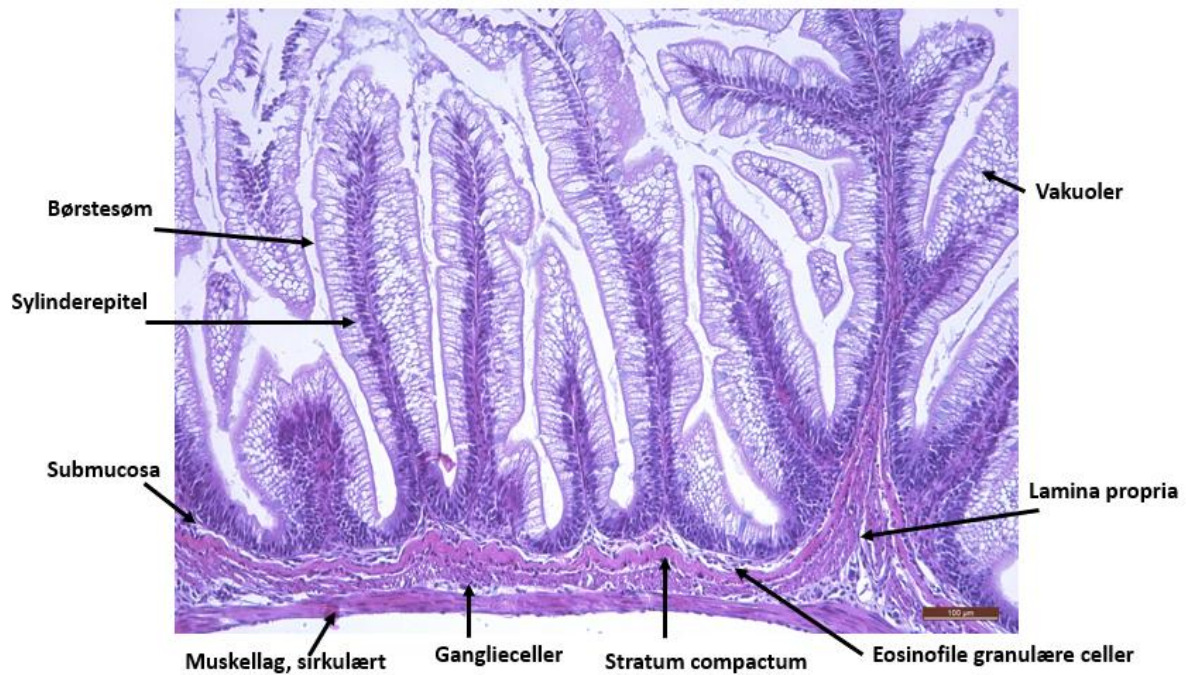
Figur 23. Histologiske snitt av baktarm fra laks tatt første dag av forsøket, før fiskene ble satt på forsøksdietter (0-prøver).

n = 10. Målestokken tilsvarer 200 μ m for bilde A (5 x forstørrelse), og 100 μ m for bilde B (10 x forstørrelse).

0-prøvene skal kunne gi et bilde på hvordan en frisk baktarm som ikke har blitt eksponert for forsøksdiett ser ut. Bildet viser normalt tarmvev uten betennelses infiltrat, vakuolene er til stede i riktig størrelse og antall, og morfologien var normal. Vevet var noen steder gått i oppløsning, noe som kan skyldes at prøvene har blitt lagret i tre år på formalin. Bildet ble benyttet som kontroll mot histologiske snitt som viste patologiske forandringer.

Resultater

Det ble i tillegg tatt bilde av en laks fra diettgruppe AO (dag 21) som ikke viste noen tegn til patologiske forandringer i baktarmen (Figur 24). Dette bildet (n = 1) ble, sammen med 0-prøvene, benyttet som en kontroll opp mot baktarmer som viste patologiske forandringer. De forskjellige vevene og cellene ble markert med piler og navngitt.



Figur 24. Histologiske snitt av baktarm fra laks uten patologiske forandringer.

Bildet presenterer en frisk tarm med normalt utseende. De forskjellige pilene peker på forskjellige vev og celler som finnes i baktarm hos laks med gitte navn. n = 1. Målestokk tilsvarende 100 µm (20 x forstørrelse).

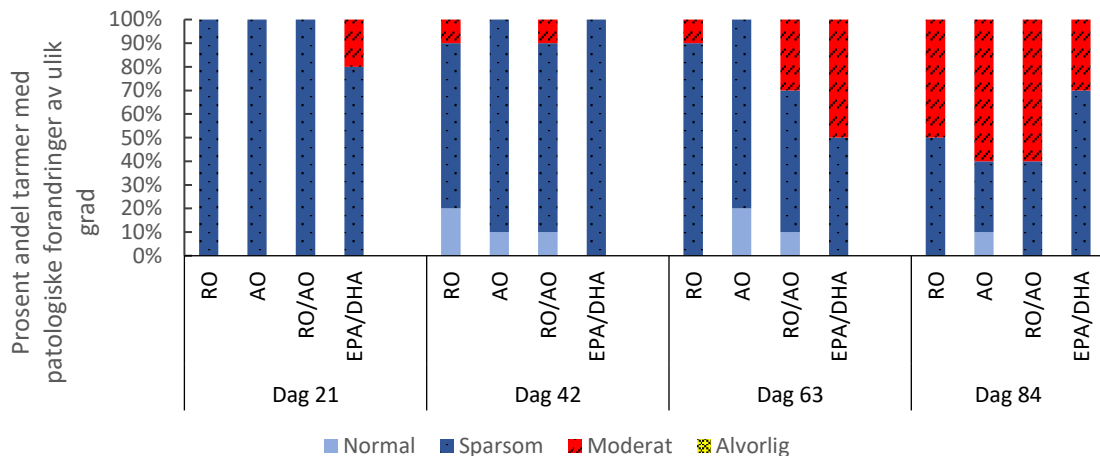
Figur 24 viser histologisk snitt av baktarm med de forskjellige lagene; submukosa, lamina propria, stratum compactum, og det sirkulære muskellaget. De forskjellige cellene som finnes i baktarm er også markert; børstesøm, vakuoler (slimceller), eosinofile granulære celler og ganglieceller.

5.3.2 Histopatologisk undersøkelse av forsøksfisk

De histologiske snittene ble analysert i henhold til inflammasjon, vakuolisering og morfologi. Ti snitt fra hver diettgruppe fra hvert uttak ble vurdert (bortsett fra dag 21, hvor det ble tatt prøver fra fem fisk). Et enkelt modifisert semikvantitativt graderingssystem ble benyttet for å gradere snittene, med hensyn til patologiske forandringer. Graderingssystemet tok utgangspunkt i kontrollvev, bilder av de forskjellige gradene av patologiske forandringer ble tatt, og en beskrivelse av disse ble utført. Forandringene ble rangert fra 0-3, hvor 0 = normalt vev, 1 = sparsom forandring, 2 = moderat forandring, og 3 = alvorlig forandring. Det var en enighet på 77 % av scoringene mellom de to personene som utførte undersøkelsen.

Inflammasjon

De histologiske vevssnittene ble først gradert ut i fra inflammasjon (Figur 25). Her ble det lagt vekt på observasjoner av ansamlinger av cellekjerne i vevet. En ansamling av cellekjerne tydet på at det er rekruttert immunceller til vevet, som vanligvis ikke er tilstede i normal, friskt vev i høyt antall (Calder, 2009).



Figur 25. Grad av inflammasjon i baktarm hos laks ved de forskjellige diettene (RO, AO, RO/AO og EPA/DHA) ved uttaksdagene; 21, 42, 63, og 84.

Grafen viser prosentvis andel av fisketarmer gradert som normal (0), sparsom forandring (1), moderat forandring (2), og alvorlig forandring (3). n = 10 for alle uttakstidspunkt, unntatt dag 21 hvor n = 5. Det var ingen statistisk signifikante forskjeller ($p < 0,05$) (Mann-Whitney test).

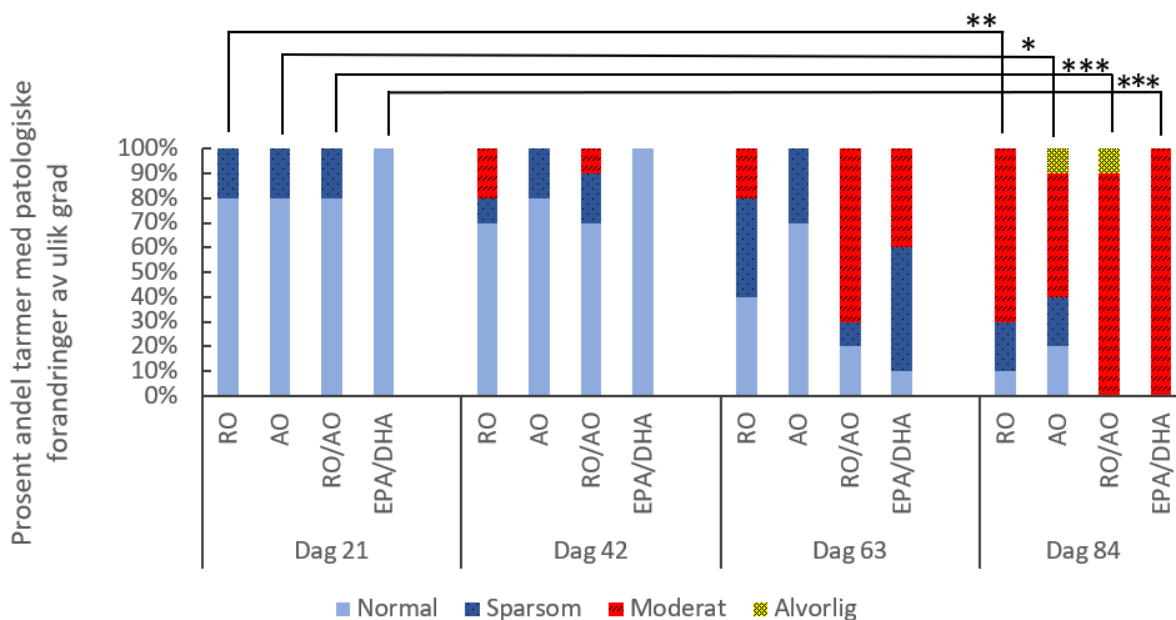
Resultater

Resultatene fra graderingen av inflammasjon viste en generell økning av alvorlighetsgrad fra dag 21 til dag 84, for alle diettgruppene. Ved uttaksdag 84 ble de største forandringene observert i diett AO og RO/AO. Ved dette tidspunktet hadde en større andel av tarmene moderat forandring (60 %) i forhold til normal og sparsom forandring (40 %). For diett RO var det 50 % med sparsom- og 50 % moderat forandring. Diett EPA/DHA viste 70 % sparsom- og 30 % moderat forandring og var den gruppen som viste minst patologiske forandringer.

Statistiske analyser ved Mann-Whitney test viste ingen signifikante forskjeller mellom grupper og uttakstidspunkter (Appendiks III).

Vakuolisering

De histologiske vevssnittene ble videre gradert i henhold til vakuolisering i baktarmen (Figur 26). Her ble det lagt vekt på tykkelse av laget med vakuoler på tarmtottene, antall celler og størrelse på cellene.



Figur 26. Grad av vakuolisering i baktarm hos laks ved forskjellige ekstreme dietter (RO, AO, RO/AO og EPA/DHA) ved uttaksdagene; dag 21, 42, 63, og 84.

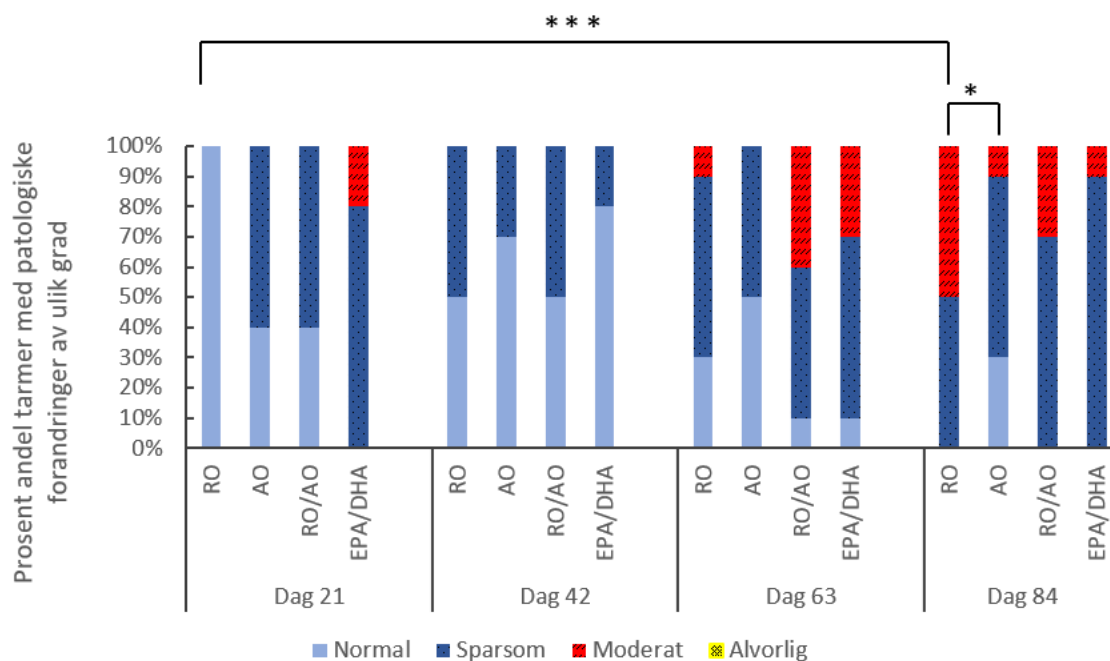
Grafen viser prosentvis andel av baktarmer gradert som normal (0), sparsom forandring (1), moderat forandring (2), og alvorlig forandring (3). $n = 10$ for alle uttakstidspunkt, unntatt dag 21 hvor $n = 5$. Stjerne (*) med tilhørende bro, viser mellom hvilke grupper det er statistiske signifikante forskjeller ($p < 0,05$) (Mann-Whitney test).

Resultatene fra graderingen av vakuolisering viser en generell økning av alvorlighetsgrad fra dag 21 til dag 84, for alle diettgrupper. Ved uttaksdag 84 ble de største forandringene observert i diett RO/AO, hvor 90 % av baktarmene hadde moderat forandring mens 10 % viste alvorlig forandring. Ved diett EPA/DHA hadde alle baktarmene moderat forandring. Diett RO hadde 70 % moderat forandring, 20 % sparsom forandring og 10 % normale baktarmer. Diett AO hadde lavest andel patologiske forandringer med 20 % normale baktarmer, 20 % sparsom forandring, 50 % moderat forandring og 10 % alvorlig forandring.

Statistiske analyser ved Mann-Whitney test viste signifikant forskjell fra uttaksdag 21 til 84 blant alle diettgrupper; RO ($p = 0.0053$), AO ($p = 0.029$), RO/AO ($p = 0.0003$), EPA/DHA ($p = 0.0003$) (Appendiks III). Det var ingen signifikante forskjeller mellom de forskjellige diettgruppene ved spesifikke uttakstidspunkt.

Morfologiske forandringer

De histologiske vevssnittene ble videre gradert i henhold til morfologiske forandringer (Figur 27). Her ble det lagt vekt på et helhetlig inntrykk av snittene. Morfologiske forandringer ble vurdert som avrunding, forkortning og sammenvoksing av tarmtotter.



Figur 27. Grad av morfologiske forandringer i baktarm hos laks ved forskjellige ekstreme dietter (RO, AO, RO/AO og EPA/DHA) ved uttaksdagene; dag 21, 42, 63, og 84.

Grafen viser prosentvis andel av fisketarmer gradert som normal (0), sparsom forandring (1), moderat forandring (2), og alvorlig forandring (3). $n = 10$ for alle uttakstidspunkt, unntatt dag 21 hvor $n = 5$. Stjerne med tilhørende bro, viser mellom hvilke grupper det er statistiske signifikante forskjeller ($p < 0,05$) (Mann-Whitney test).

Resultatene fra graderingen av morfologiske forandringer viste en generell økning av alvorlighetsgrad fra dag 21 til dag 84 for alle diettgrupper. Ved uttaksdag 84 ble de største morfologiske forandringene observert i diett RO, hvor 50 % av baktarmene hadde sparsom forandring, mens 50 % viste moderat forandring. Diett RO/AO gav også store forandringer med henholdsvis 70 % sparsom forandring og 30 % moderat forandring. Diett EPA/DHA viste 90 % sparsom forandring og 10 % moderat forandring. Diett AO viste minst patologiske forandringer med 30 % normale tarmer, 60 % med sparsom forandring, og 10 % med moderat forandring.

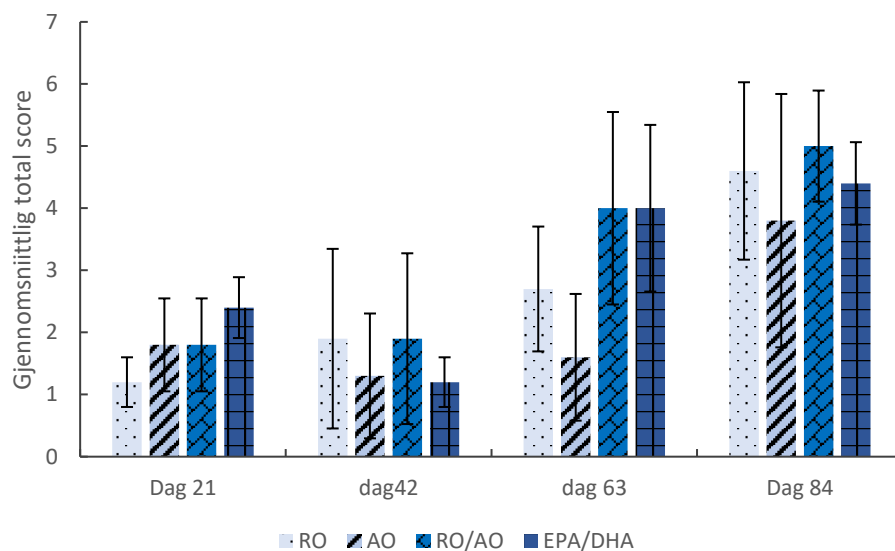
Resultater

Statistiske analyser ved Mann-Whitney test viste kun signifikant forskjell mellom dag 21 og dag 84 for diett RO ($p = 0.0007$). Ved de andre diettene var det ingen signifikante forskjeller mellom de to uttakstidspunktene. Det var også en signifikant forskjell mellom diett RO og AO ved uttaksdag 84 ($p = 0.0389$) (Appendiks III). Hos de andre diettene var det ingen signifikante forskjeller.

Resultater

Totalscore

Scoringene for inflammasjon, vakuolisering og morfologi ble lagt sammen og scoringene er gjengitt i Figur 28. Hensikten var å gi en helhetlig oversikt over de totale histologiske forandringene i tarmvevet mellom diettgruppene ved forskjellige uttaksdager.



Figur 28. Grafen viser gjennomsnittlig total score \pm standardavvik for inflammasjon, vakuolisering, og morfologiske forandringer gitt de forskjellige diettgruppene ved uttaksdagene; dag 21, 42, 63, og 84.

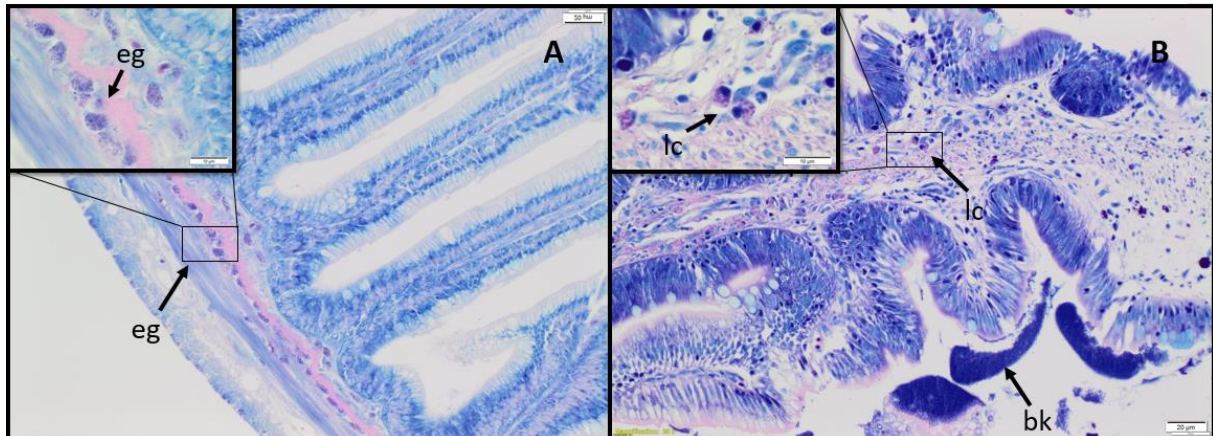
n = 10 for alle uttakstidspunkt unntatt dag 21, hvor n = 5.

Resultatene fra den gjennomsnittlige totale scoren viste en trend, hvor det var økning i scoren fra dag 21 til dag 84 for alle diettgruppene. Den maksimale verdien som kunne oppnås var 9, der hver av de tre enkeltparameterne kan scores til 3. Diett RO/AO viste den gjennomsnittlig høyeste totalscoren (score 5) ved siste uttak på dag 84. Diett RO hadde en score på 4,6, EPA/DHA = 4,4, og diett AO hadde minst patologiske forandringer med en gjennomsnittlig totalscore på 3,8. Diettgruppene med innhold av rapsolje skiller seg ut ved å ha en gjennomsnittlig høyere total score.

5.3.3 Spesialfarging

May-Grünwald Giemsa

Det ble utført spesialfarging med May-Grünwald Giemsa for å lettere detektere og skille mellom erythrocytter og leukocytter i tarmvev, hvor det var mistanke om inflammasjon (Figur 29). Fargemetoden kan også benyttes for å identifisere bakterier.



Figur 29. Histologiske snitt av baktarm fra laks farget med May-Grünwald Giemsa spesialfarging.

Bilde A viser tarmvev fra 0-prøve, pil peker på granulære celler (eg). Bilde B viser tarmvev fra uttaksdag 84, tatt fra et snitt med inflammasjon (diett AO). Pilene viser bakteriekolonier (bk), og leukocytter (lc). De innfelte bildene viser granulære celler og leukocytter ved høyere forstørrelse. $n = 1$. Målestokk for de store bildene tilsvarer $20 \mu\text{m}$ ved $20 \times$ forstørrelse, og målestokk for de innfelte bildene tilsvarer $10 \mu\text{m}$ ved $60 \times$ forstørrelse.

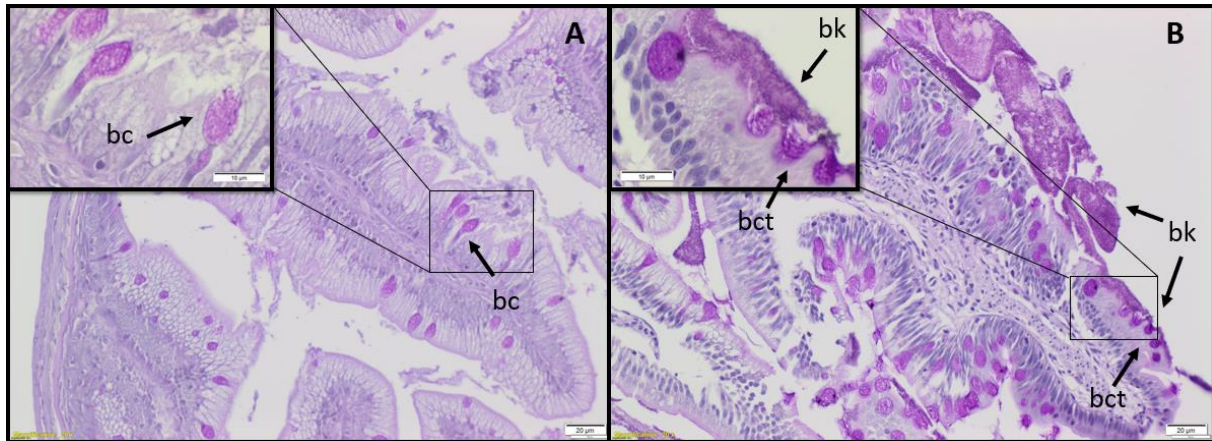
Det ble farget snitt fra alle diettgruppene på dag 84 ($n = 1$), hvor det var mistanke om inflammasjon. Det ble også farget et snitt fra 0-gruppen som ble benyttet som kontroll. Det ble oppdaget bakteriekolonier og tilstedeværelse av leukocytter i alle diettgruppene (Figur 29). Resultatene viser et bilde fra diett AO (bilde B), som representerte de observasjonene som også ble gjort i de andre diettgruppene. Pilene viser granulære celler (eg), bakteriekolonier (bk), og leukocytter (lc) i områder med inflammasjon.

May-Grünwald Giemsa farger nøytrofile granuler rosa og basofile granuler blå. I snittene fra 0-prøvene kan man se blå/lilla granuler rundt basalmembranen i tarmvevet. Dette tydet på tilstedeværelse av basofile granulære celler. Det ble også detektert rosa granuler i tarmvevet, som tydet på tilstedeværelsen av nøytrofile granulære celler. I vevssnittene fra forsøksfisken kunne man se flere granuler av lilla, rosa og blålig farge spredt rundt i tarmtottene. Dette tydet på tilstedeværelse av både nøytrofile- og basofile granulære celler. Man kan heller ikke se bort ifra at noe av det som ble observert kan være eosinofile granulære celler.

Resultater

Periodic acid-Schiff (PAS)

Det ble videre utført en spesialfarging med Periodic acid-Schiff (PAS), for å lettere detektere polysakkarider i mukus og begerceller i tarmvevet (Figur 30).



Figur 30. Histologiske snitt av baktarm fra laks farget med Periodic acid-Schiff (PAS) spesialfarging.

Bilde A viser tarmvev fra 0-prøve, pil peker på begerceller (bc). Bilde B viser tarmvev fra uttaksdag 84, tatt fra et snitt med inflammasjon, reduksjon i vakuolisering og tilstedeværelse av bakteriekolonier (diett EPA/DHA). Pilene viser bakteriekolonier (bk), og begerceller som tømmer innholdet sitt mot bakteriekoloniene (bct). De innfelte bildene viser begerceller ved høyere forstørrelse. n = 1. Målestokk for de store bildene tilsvarer 20 µm ved 20 x forstørrelse, og målestokk for de innfelte bildene tilsvarer 10 µm ved 60 x forstørrelse.

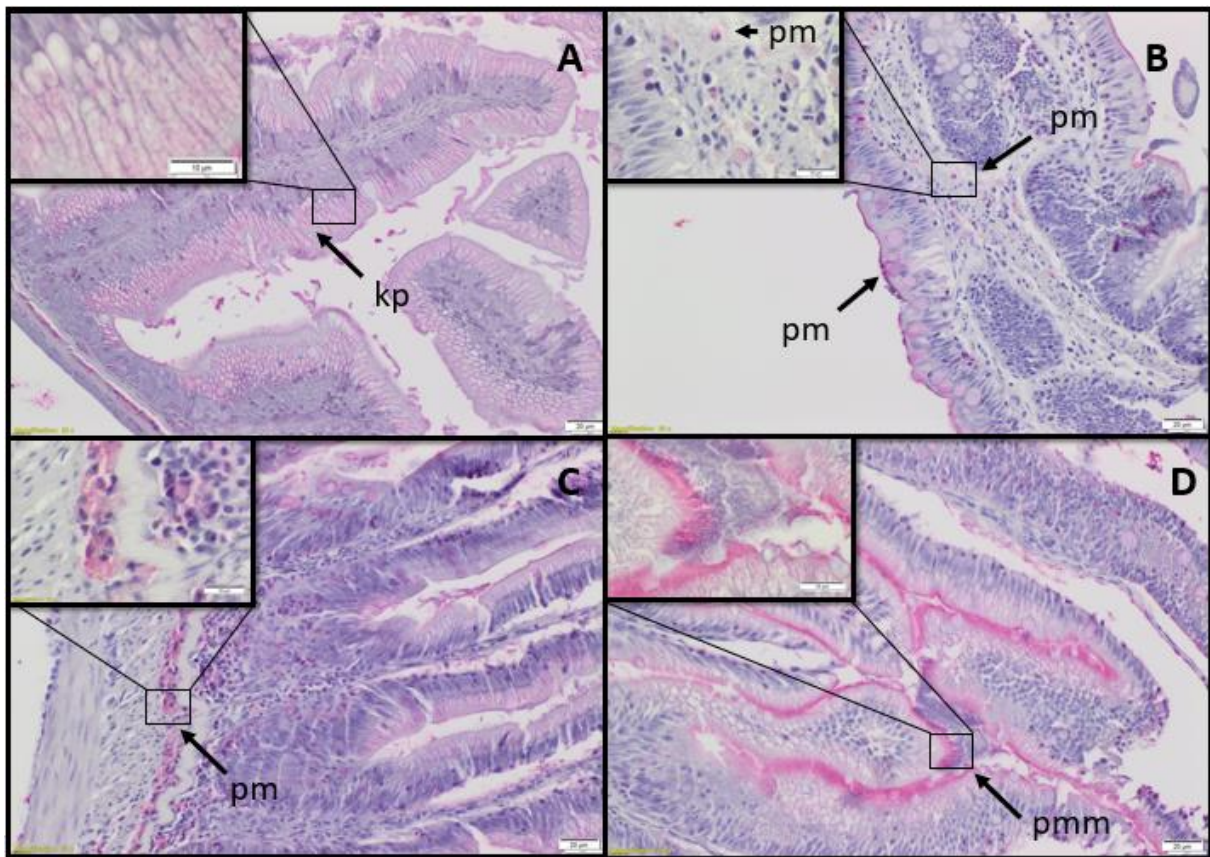
Det ble farget snitt fra alle diettgruppene (dag 84, n = 1) hvor det var mistanke om inflammasjon. Det ble også farget et snitt fra 0-gruppen som ble benyttet som kontroll. Det ble oppdaget bakteriekolonier i alle diettgruppene, og en økning i antall begerceller, spesielt i områder nært bakteriekolonier. Resultatene viser et bilde fra diett EPA/DHA (bilde B, Figur 30), som representerer de observasjonene som også ble gjort i de andre diettgruppene.

5.3.4 Immunhistokjemi

Det ble utført immunhistokjemiske undersøkelser for å kunne styrke påstanden om inflammasjon i tarmvevet, som ble gjort under øvrige histologiske undersøkelser. To forskjellige antistoffer (α -IgM og α -PCNA) ble benyttet i prøver fra alle diettgrupper.

Resultater fra immunhistokjemiske undersøkelser med bruk av α -IgM

Det ble utført immunhistokjemiske undersøkelser med bruk av antistoffet α -IgM. IgM finnes både membranbundet til B-celler og i sirkulasjonen (dvs. ekstracellulært). Det ble benyttet hjertevevssnitt fra fisk som tidligere har testet positivt for CMS som positiv kontroll, da det er visst at dette vevet inneholder lymfocytter med membranbundet IgM (Yousaf et al., 2013). Tarmvev fra alle diettgruppene ($n = 3$) ble testet for tilstedeværelse av IgM ved bruk av α -IgM (Figur 31), og for hver av gruppene ble det også tatt negativ kontroll ved å bytte ut primærantistoff med buffer.



Figur 31. Tilstedeværelse av IgM i histologiske snitt fra baktarm hos laks farget med IHC.

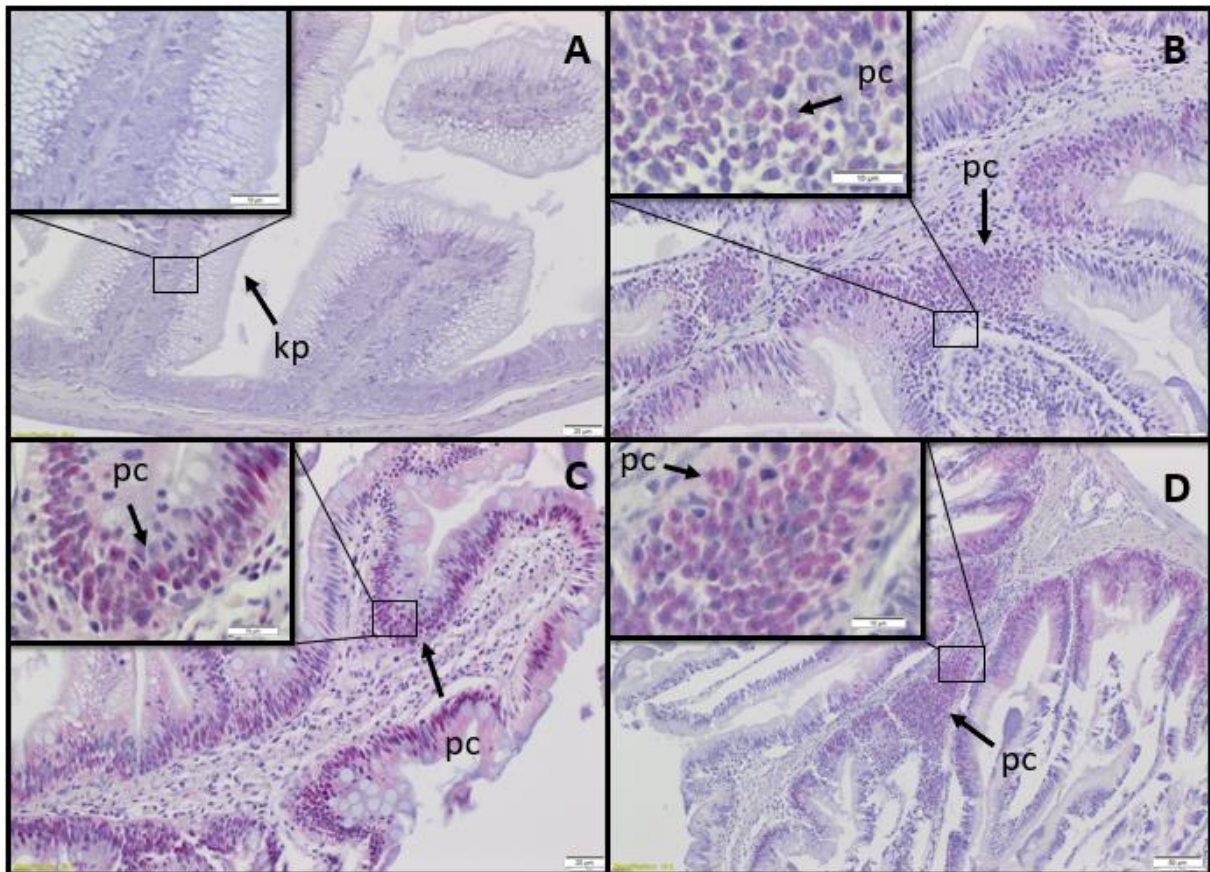
Bilde A viser tarmvev fra 0-prøve som ble benyttet som kontroll til å sammenligne mot forsøksgruppene. IgM ble detektert i vakuoler (kp). Bilde B viser svak farging av mukus (pmm) og enkeltceller i vevet (pm). Bilde C viser tilstedeværelse av IgM på og i celler under basalmembranen (pm). Bilde D viser IgM i vakuoler og mukus (pmm), spesielt rundt bakteriekolonier. De innfelte bildene viser positiv merking eller bakgrunnsfarge (kontroll) ved høyere forstørrelse. $n = 3$. Målestokk for de store bildene tilsvarer 20 μm ved 20 x forstørrelse, og målestokk for de innfelte bildene tilsvarer 10 μm ved 60 x forstørrelse.

Resultater

Resultatene fra de immunhistokjemiske undersøkelsene med bruk av antistoffet α -IgM er vist i Figur 31. Bilde A viser at hos kontroll prøvene (dag 0) er det tilstedeværelse av IgM i vakuoler. Bilde B viser svak positiv merking av mukus (pmm) og positiv merking av enkeltceller i vevet (pm). Bilde C viser positiv merking (pm) av celler eller cytoplasma på undersiden av basalmembranen. Bilde D viser positiv merking av vakuoler og mukus (pmm), spesielt rundt bakteriekolonier. Resultatene vist i bilde B, C og D er tatt fra fisk som har gått på diett EPA/DHA, som representerer de observasjonene som også ble gjort i de andre diettgruppene.

Resultater fra immunhistokjemiske undersøkelser med bruk av α -PCNA

Det ble utført immunhistokjemiske undersøkelser med bruk av antistoffet α -PCNA (PCNA: «proliferating cell nuclear antigen»). Positiv merking (rød/lilla) med α -PCNA signaliserer at cellen er i en prosess hvor den deler seg (celledeling). Celledeling finnes i stor grad i vev som naturlig må regenereres og/eller som respons på skade. Det ble benyttet hjertevevssnitt fra fisk som tidligere har testet positivt for HSMB som positiv kontroll, da dette er vev hvor man forventer å finne mye celledeling i respons på en kraftig inflammasjon (Yousaf et al., 2013). Tarmvev fra alle prøvegruppene ble testet for α -PCNA (Figur 32), og for hver av gruppene ble det også tatt negativ kontroll ved å bytte ut primærantistoff med buffer.



Figur 32. Tilstedeværelse av PCNA i histologiske snitt fra baktarm hos laks farget med IHC.

Bilde A viser tarmvev fra 0-prøve som ble benyttet som en kontroll til å sammenligne mot forsøksgruppene. Her var det få eller ingen positiv merking av celler (kp). Bilde B viser aggregerte positivt merkede celler i tarmvevet (pc). Bilde C viser positiv merking av celler i tarmepitelet (pc). Bilde D viser positiv merking av flere aggregerte celler i tarmvevet (pc). $n = 3$, diett RO (B, C og D). De innfelte bildene viser positivt merkede celler eller ikke positivmerkede celler (kontroll) ved høyere forstørrelse. Målestokk for de store bildene A = 20 μm ved 40 x forstørrelse, B og C = 20 μm ved 20 x forstørrelse, D = 20 μm ved 10 x forstørrelse, og målestokk for de innfelte bildene tilsvarer 10 μm ved 60 x forstørrelse.

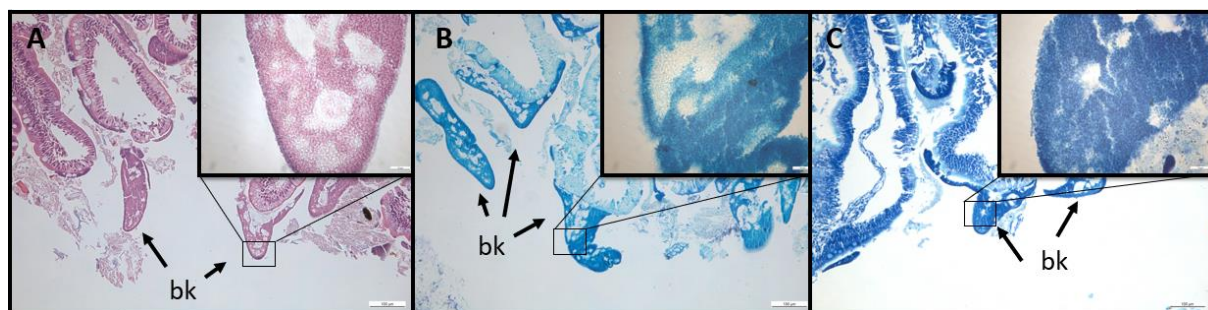
Resultater

Resultatene fra de immunhistokjemiske undersøkelser med bruk av antistoffet α -PCNA er vist i Figur 32. Bilde A viser kontrollprøvene (dag 0), hvor få eller ingen celler ble positivt merket. Bilde B og D viser positiv merking av flere aggregerte celler i tarmvevet (pc). Bilde C viser positiv merking av celler i tarmepitelet (pc). Resultatene vist i bilde B, C og D er tatt fra fisk som har gått på diett RO, som representerer de observasjonene som også ble gjort i de andre diettgruppene.

5.4 Undersøkelse av mikroorganismer

Spesialfarging med metylen- og toluidinblått for påvisning av mikroorganismer

Under gradering av de histologiske snittene ble det oppdaget noe som lignet på bakterieansamlinger på utsiden av tarmtottene. Det ble derfor plukket ut snitt ($n = 3$) hvor det var mistanke om tilstedeværelse av mikroorganismer, og disse ble farget med metylenblått (Figur 33). Metylenblått binder seg og farger DNA/RNA, og kan dermed benyttes for å påvise tilstedeværelse av bakterier i histologiske snitt.



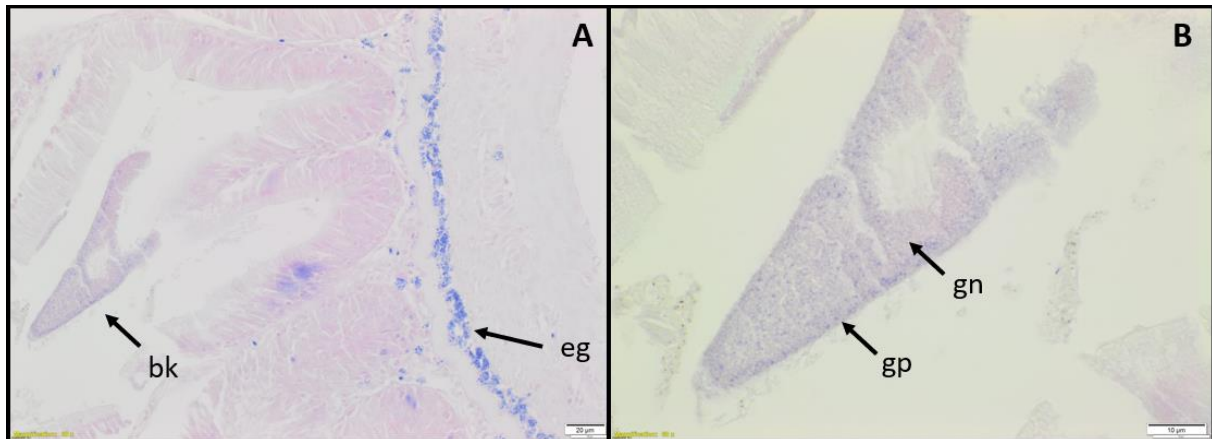
Figur 33. Bildene viser histologiske snitt av baktarm fra laks farget med H&E (A), metylenblått (B), og toluidinblått (C).

$n = 3$. De svarte pilene peker på bakteriekolonier (bk) som ble observert i mange av de undersøkte snittene. De innfelte bildene viser bakteriekoloniene ved høyere forstørrelse. Målestokk tilsvarer $100 \mu\text{m}$ for de store bildene ($10 \times$ forstørrelse), og $10 \mu\text{m}$ for de innfelte ($100 \times$ forstørrelse).

Resultatene i Figur 33 viser snitt farget med: H&E-farging (A), metylenblått (B), og med toluidinblått (C). Pilene viser bakteriekoloniene i bildene (A, B og C). Den sterke blåfargen i gitte områder (vist med piler, i bilde B og C), bekreftet mistanken om tilstedeværelse av bakteriekolonier, og ikke mukus eller rester av fôr, siden fargen metylenblått og toluidinblått binder seg til DNA og RNA.

Gramfarging

Etter at mistanken om tilstedeværelsen av bakteriekolonier ble bekreftet, ved farging med metylenblått og toluidinblått, ble det videre gjennomført en gramfarging av utvalgte histologiske vevssnitt ($n = 3$) (Figur 34). Dette kan gi mer informasjon om hva slags bakterier som befinner seg i snittene. Gramfarging fungerer på den måten at den farger gram-positive bakterier mørkeblå, og gram-negative bakterier farges lys rosa.



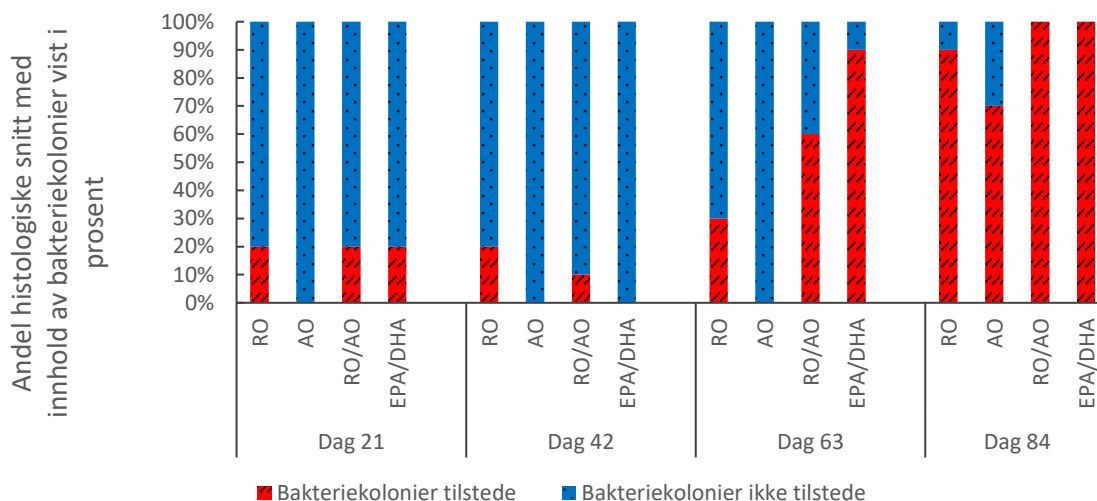
Figur 34. Bildene viser histologiske snitt av baktarm fra laks farget med gramfarging.

Bilde A viser en bakteriekoloni (bk) og granulære celler (eg). Bilde B viser et nærbilde av bakteriekolonien, hvor det er både gram-positive (gp) og gram-negative (gn) bakterier tilstede. $n = 3$. Målestokk tilsvarer 20 μm for bilde A (20 x forstørrelse), og 10 μm for bilde B (60 x forstørrelse).

Resultatene fra gram fargingene viste i bilde A en bakteriekoloni (bk) og granulære celler (eg) (Figur 34). Bilde B viser at det er tilstedeværelse av både gram-positive kokkbakterier og gram-negative stavbakterier ekstracellulært i tarminnholdet.

Undersøkelse av andel histologiske snitt med bakteriekolonier

Alle de histologiske snittene fra diettgruppene ved de ulike uttaksdagene (dag 21, 42, 63, og 84) ble undersøkte for bakterier. Resultatene ble ført inn i tabellen sammen med graderingen av snittene (Appendiks II). Resultatene ble videre presentert i en graf, som viser prosentandelen av histologiske snitt med registrerte bakteriekolonier fra hvert uttak (Figur 35).



Figur 35. Grafen viser andelen av histologiske snitt med innhold av bakteriekolonier vist i prosent.

Tilstedeværelsen av bakterier er registrert ved alle uttaksdager (dag 21, 42, 63, og 84) for de forskjellige diettgruppene; RO, AO, RO/AO og EPA/DHA. n = 10 for alle uttaksdager, unntatt dag 21 hvor n = 5.

Resultatene viser en økning i antall snitt hvor det registreres bakteriekolonier i alle diettgrupper. Ved første uttak, dag 21, ble det registrert bakteriekolonier i en baktarm fra diett RO, RO/AO, EPA/DHA, og ingen bakteriekolonier i snittene fra diett AO. Ved andre uttak, dag 42, ble det registrert bakteriekolonier i to snitt fra diett RO, og i et snitt fra diett RO/AO. Det ble ikke registrert noen bakteriekolonier fra diett AO eller EPA/DHA. Tredje uttaksdag, dag 63 ble det registrert bakteriekolonier i snitt fra alle dietter, unntatt AO, og i hele 90 % av snittene for diett EPA/DHA. Ved siste uttak, dag 84, ble det registrert bakteriekolonier i snitt fra alle diettgrupper. Det var bakteriekolonier i 90 % av snittene for diett RO, 70 % av snittene for diett AO, og 100 % av snittene for diett RO/AO og EPA/DHA.

5.5 Sammenligning mellom makroskopiske og histologiske funn

Ved å gjøre en sammenligning mellom de makroskopiske funnene som ble gjort i form av registrering av unormale tarmer, og de histologiske funnene med registrering av bakteriekolonier finner man følgende: Av totalt 51 makroskopisk unormale tarmer, inneholdt 49 av disse bakteriekolonier. Åtte snitt inneholdt bakteriekolonier, men ble ikke registrert som unormal tarm (Appendiks II). En stor andel av snittene som ble kategorisert som unormal ved makroskopiske undersøkelser inneholder altså bakteriekolonier.

6. Diskusjon

På grunn av en mer bærekraftig forvaltning av marine råvarer, har sammensetningen av fôr til salmonide oppdrettsfisk gått mer over til bruk av plantebaserte råvarer (Torstensen et al., 2008; 2013). Det er vist at økt bruk av plantebaserte råvarer gir mindre andel langkjedede ($\geq C_{20}$) omega-3 fettsyrer i fôr til laks (Ytrestøyl et al., 2015).

Diett og fettsyresammensetningen kan påvirke fiskens fysiologi, immunrespons, robusthet og evne til å stå imot sykdomspress og stress rundt håndtering (Calder, 2009). Av de fiskehelseutfordringene næringen håndterer i dagens havbruk, er følgende fiskehelse- og velferdstilstander identifisert til å bli påvirket av fettsyresammensetningen i fôr: tarmhelse, motstandsdyktighet mot infeksjonssykdommer, katarakt, beinutvikling og beinhelse, hjerte- og kar helse, stressmestring, fettlagring og lavere-grads kronisk inflammasjon (Torstensen et al., 2013). Fettsyresammensetningen i fôr vil også påvirke mengden av EPA/DHA i fiskefilet. Fisk har også et minimumsbehov på 1 % EPA/DHA for å unngå redusert tilvekst (Torstensen et al., 2013). Det er derfor viktig å ha god kunnskap om hvordan endringer i fettsyresammensetningen påvirker faktorer som fiskens robusthet, tarmhelse, og velferd.

På bakgrunn av dette har vi i dette arbeidet studert effekten av fire dietter med forskjellige langkjede omega-3 fettsyrer hos atlantisk laks. Dyrevelferdsindikatorer som tilvekst og dødelighet ble undersøkt gjennom forsøket, i tillegg ble patologiske forandringer i tarm tatt i betraktning. Fiskens tarmhelse ble undersøkt ved hjelp av makroskopiske undersøkelser, histologi, spesialfarginger og immunhistokjemi. Hensikten med disse undersøkelsene var å avdekke tilstedeværelse av inflammasjon, eller andre aktuelle forandringer i tarmen.

6.1 Velferdsindikatorer

6.1.1 Overlevelse og tilvekst

I dette forsøket ble tilvekst og overlevelse benyttet som velferdsindikatorer. I tillegg ble undersøkelsene fra tarmhelse tatt i betraktning da velferden skulle bedømmes. Ingen dødelighet ble observert fra noen av diettgruppene gjennom hele forsøket. Dette viser at ingen av fiskene fra forskjellige diettgrupper har blitt negativt påvirket av diettene, i den grad at det medførte dødelighet. Tidligere studier har vist at dødeligheten hos laks kan øke, dersom nivået av EPA/DHA i fôret blir tilstrekkelig lavt (lavere enn 0,1-1 %). Dette støtter våre observasjoner, da mengden av EPA/DHA i forsøksfôret ikke var lavere enn 0,84 % (Tabell 4) (Ruyter et al., 2000a; 2016).

Fiskens kroppsvekt og kroppslengde ble målt i forkant av forsøksstart, og ved fire uttakstidspunkt i løpet av forsøket. Det ble ikke registrert betydelig variasjon i miljøparametere (temperatur, lys og oksygenmetning) i de forskjellige karene i forsøksperioden. Resultatene for tilvekst viste ingen signifikante forskjeller for lengde eller vekt ved slutten av forsøket. Dette samsvarer med flere tidligere studier. I et forsøk ble laks på 80 g fôret med ulike oljetilsetninger (fra 100 % fiskeolje til 100 % RO) over en periode på 17 uker. Ingen signifikante forskjeller i vekst ble vist mellom diettgruppene i dette studiet (Bell et al., 2001). I en studie av Torstensen et al., (2005) ble laks delt i diettgrupper som besto av: 100 % fiskeolje, 75 % fiskeolje, 100 % RO eller 75 % RO gjennom en hel, toårig produksjonssyklus i sjø. Her ble det heller ikke påvist noen signifikante forskjeller i vekst. Tilsvarende resultater ble vist i en studie hvor laks, på om lag 3 kg, ble fôret med en diett på 100 % fiskeolje eller 100 % RO i 135 dager (Regost et al., 2004).

Rosenlund et al., (2016) konkluderte med at laks trenger mer enn 2,7 % EPA/DHA for å oppnå optimal vekst, som er høyere enn ved diett RO (0,84 % EPA/DHA) i dette forsøket. Dette samsvarer ikke med våre funn, hvor diettgruppe RO viste størst vektøkning gjennom forsøket. Nødvendigheten med langtidsstudier har blitt poengtert, for å kunne avdekke relasjonen mellom langkjedede omega-3 HUFA og tilvekst (Rosenlund et al., 2016).

Kristine Vatnan gjennomførte i sin masteroppgave ett forsøk hvor laks fikk fôr tilsatt ren rapsolje eller EPA/DHA konsentrat over en periode på 360 dager. I dette forsøket ble det heller ikke påvist signifikante forskjeller mellom gruppene før dag 335. I dette forsøket var fisken 30-

Diskusjon

40 g ved start og 600 g ved forsøksslutt. Dette tilsier en vektøkning på 15 og 20 x (Vatnan, 2017).

Fiskens spesifikke vekstrate (SGR) over tid er en egnet indikator på dyrevelferd (Spaho et al., 2013). En god SGR regnes å ligge i området 1-2 ved 10 °C (Koskela et al., 1997; Jobling, 2003), noe alle diettgruppene fra dette forsøket ligger innenfor. Resultatene fra SGR-beregningene viser ingen negativ innvirkning som følge av de forskjellige diettene.

Kondisjonsfaktoren viste en utvikling fra 0,9 ved forsøksstart til å ligge på rundt 1,4 ved forsøksslutt. Disse resultatene tydet på at de forskjellige diettene ikke har hatt noen negativ innvirkning på fiskenes tilvekst. Resultatene varierer også lite (k-verdier fra 1,38 til 1,40), som igjen bekrefter at det ikke er betydelige forskjeller mellom diettgruppene mht. tilvekst. I følge Barnham & Baxter, (1998), vil $k = 1$ anses som en fisk med dårlig kondisjon (lang og tynn), mens en $k = 1,4$ anses som en fisk med gode proporsjoner. Det må tas i betraktning at kondisjonsfaktor er et mål som ofte benyttes for større fisk, og ikke mindre fisk som i dette forsøket.

Om kun tilveksten ble benyttet som velferdsindikator, vil man få et inntrykk om at velferden til forsøksfisken var god. Man må imidlertid også vurdere om tilvekst alene er et godt nok mål på velferden. Derfor ble også de patologiske forandringene i tarm tatt i betraktning.

6.2 Makroskopiske undersøkelser av baktarm

Det var en betydelig økning i andel morfologiske avvikende tarmer fra første til siste uttaksdag. Dette tydet på at jo lengre fisketarmene blir eksponert for diettene, desto større andel tarmer blir påvirket. I tillegg fremstår det som om selve påvirkningen, i form av hvite flekker og løsere struktur, blir noe større.

Det var generelt utfordrende å skille diettgruppene fra hverandre da det kom til makroskopiske undersøkelser, men diettgruppen EPA/DHA skilte seg ut fra de andre diettgruppene ved et høyere antall hvite flekker. Ved videre arbeid kunne det vært interessant å etablere et graderingssystem for de makroskopiske observasjonene, og studere forskjellen mellom diettgruppene nærmere. Histologiske undersøkelser ble videre utført for å gi mer informasjon, blant annet om de makroskopiske forandringene.

Det ble gjort en sammenligning mellom tilvekst for laks med normal baktarm og unormal baktarm ved tredje uttaksdag, dag 63. På dette tidspunktet fantes det representative prøver for normal og unormal baktarm i alle diettgrupper. Det ble observert en trend hvor laksen med normal baktarm hadde en generelt bedre tilvekst sammenlignet med laksen med unormal baktarm. Det var vanskelig å utføre gode statistiske analyser, da det tilgjengelige datamaterialet var begrenset, for eksempel var $n = 1$ for en diettgruppe på uttaksdag 63. Det var dermed vanskelig å bedømme om de observerte forskjellene var reelle eller tilfeldige.

6.3 Histopatologisk undersøkelse av baktarm

Histopatologiske undersøkelser ble gjennomført for å undersøke eventuelle forandringer i tarmen hos laks, som har gått på dietter med ulike mengder langkjedede omega-3 fettsyrer. Det ble etablert et modifisert semikvantitativt graderingssystem, basert på et tidligere etablert graderingssystem av Carmona, (2008), som ble benyttet for å vurdere grad av enteritt (tarmbetennelse) hos laks føret en diett med soyabønnemel.

Følgende ble undersøkt: 1) om tarmen endret seg, mht. patologiske forandringer, over tid i en fôrgruppe dvs. fra dag 0 til dag 84, og 2) om det er forskjeller mellom gruppene på ett eller flere tidspunkter. Kontrollsnitt for endringer over tid var 0-prøvene, kontrollsnitt for forskjeller mellom diettene var tiltenkt diett AO og RO/AO. Men, da disse diettene også viste patologiske forandringer, var det ingen god kontroll for disse undersøkelsene. 0-prøvene og prøver uten patologiske forandringer fra dag 21 ble derfor benyttet som kontrollprøver, i tillegg til kontrollbilder av normal tarm fra andre studier som omhandler enteritt hos laks (Bakke-McKellep et al., 2007a; Carmona, 2008).

Økende grad av inflammasjon, reduksjon av vakuolisering og morfologiske forandringer i tarmvevet, ble benyttet som indikatorer på negativ innvirkning i tarmen. Totalt 140 snitt (5 snitt per diettgruppe fra uttaksdag 21, og 10 snitt per diettgruppe fra de andre uttakstidspunktene) ble evaluert av to personer. Evalueringen ble basert på en artikkel som omhandlet prinsipper for gyldig histopatologisk scoring (Gibson-Corley et al., 2013). Ved en blindet scoring var det 77 % enighet mellom de to avleserne. Det ble dermed avgjort å gå videre med dette systemet med de begrensninger det hadde. En blindet scoring vil begrense vurderingsskjevhet (bias), mens ulempene er at det er tids- og arbeidskrevende å gjennomføre (Day & Altman, 2000; Gibson-Corley et al., 2013).

Inflammasjon

Resultatene viste liten variasjon mht. grad av inflammasjon mellom diettgruppene og uttakstidspunktene, og ingen av forandringene var statistisk signifikante. Dette kan skyldes at mange av snittene ble gradert med score 1 (sparsom inflammasjon) allerede ved første uttak (dag 21), og det ble ikke gitt noen scoring med grad 3 (alvorlige inflammasjon) ved noen uttak. Forklaringen på dette kan være at de observerte forandringene ikke var av svært alvorlig grad (sett opp mot forandringer ved soyabønnemel-indusert enteritt), og dermed ikke førte til et stort utslag på scoren. Eventuelt var graderingssystemet ikke godt nok designet til å fange opp de forandringene som ble observert. Det som ble bekreftet ved histologiske undersøkelser var tilstedeværelse av inflammasjon i sparsom grad hos alle diettgrupper ved alle uttakstidspunkter, og inflammasjon av moderat grad hos alle diettgrupper ved siste prøveuttak (dag 84).

Vakuolisering

Laks har en relativ høy tetthet av slimproduserende celler i baktarmen for å lettere kunne transportere avføringen bakover i tarmen, i takt med at den blir tørrere (Kryvi & Poppe, 2016). Baktarmens epitel har også epitelceller med høy grad av vakuolisering, hvor vakuoliseringen er et tegn på stort næringsopptak fra lumen (Iwai, 1968; Ezeasor & Stokoe, 1981; Rombout et al., 1985). Det var en reduksjon av vakuolisering (antall og størrelse på vakuolene) fra forsøksstart til forsøkslutt, med signifikante forskjeller blant alle diettgrupper fra uttaksdag 21 til 84. Dermed er det tenkelig at forsøksfisken vil ha et redusert opptak av næringsstoffer. Det var ingen signifikante forskjeller mellom diettgruppene på de forskjellige uttakstidspunktene. Resultatene tyder på en reduksjon i vakuolisering ved lengre fôring med diettene. Lignende resultater har blitt vist med plantebaserte dietter tilsatt soyabønnemel (Van den Ingh et al., 1991; Bæverfjord & Krogdahl, 1996) og vegetabiliske oljer (Caballero et al., 2002). Van den Ingh et al., (1991) viste i en morfologisk studie av tarm fra laks fôret med soyamel diett, en nedgang og fravær av vakuoler fra tarmepitelet. Antinæringsstoffer i soyabønnene ble foreslått til å være årsaken til disse morfologiske forandringene (Van den Ingh et al., 1991), da disse kan påvirke fordøyelsen, tarmfunksjoner, vekst og fiskens robusthet negativt (Storebakken et al., 2000a; Francis et al., 2001; Bakke-McKellep & Refstie, 2008). Rapsfrø inneholder lave nivåer av et antinæringsstoff kalt erucinsyre (C:22) i oljen (< 5 %) (Dosanjh et al., 1988), som potensielt kunne forårsake lignende forandringer. Andre studier har vist at overfølsomheten ser ut til å være spesifikk for soyaprotein, ettersom lignende reaksjoner ikke observeres når man fôrer

Diskusjon

oljefrø som solsikke og rapsfrø, hvete og maisgluten som proteinkilde til laks (Storebakken et al., 2000b; Aslaksen et al., 2007). Resultatene viste en reduksjon i vakuolisering ved alle diettgrupper, ikke bare for de som er tilsatt rapsolje. Det ble heller ikke funnet noen statistisk signifikante forskjeller mellom diettgruppene med hensyn til vakuolisering. Det er dermed vanskelig å trekke konklusjoner hva gjelder årsakene til disse forandringene.

Det er mulig at planteproteinet SPC og hvetegluten som var tilsatt i grunnfôret i alle diettene kunne ha vært med å bidra til forandringene. Resultatene viste at ren rapsolje ikke gav en reduksjon i antall/størrelse på vakuoler sammenlignet med en miks av rapsolje og ansjosolje. Videre gav ren ansjosolje og konsentrat de samme resultatene. En annen mulighet var at vekst hos fiskene også påvirker vakuoliseringen i baktarmen. Eksempelvis er det vist at laks reduserer antall slimceller i huden ved begynnelse av smoltifisering (O'Byrne-Ring et al., 2003) eller at det er en sammenheng mellom en reduksjon av vakuoliseringen og funn av bakteriekolonier i baktarmen (kapittel 6.4).

Kommersiell oppdrettsfisk får dietter med vegetabiliske råvarer, og overføres konstant (i likhet med dette forsøket) som kan påvirke absorpsjonsevnen til fisken og medføre en vandig avføring (Hu et al., 2016). I dette forsøket ble det registrert flere fisk siste uttaksdag med løs avføring. I tidligere studier har soyabønner i diett vist å fremprovosere diaré hos laks (Refstie et al., 1998; 1999; 2000; 2001). En endring av gastrointestinal mikroflora kan også utvikle tilstand av diaré (Storebakken, 1985). Sammenhengen mellom nedsatt vakuolisering og diaré har tidligere blitt påpekt av Hu et al., (2016).

Morfologiske forandringer

Morfologiske forandringer som fører til et redusert overflateareal, vil kunne føre til et mindre opptak av næringsstoffer (Kryvi & Poppe, 2016). De histologiske undersøkelsene viste morfologiske forandringer i form av forkortninger og sammenvoksing av tarmtottene, og dermed et redusert overflateareal, hos alle diettgruppene. Kun diett RO viste signifikant forskjell mellom førsøksstart og forsøkslutt, i tillegg til en signifikant forskjell mellom diett RO og AO ved siste uttak på dag 84. Da man ikke kunne vise nedsatt tilvekst, kan man i dette forsøket konkludere med at de morfologiske forandringene i baktarmen ikke har påvirket fiskens tilvekst.

Totalscore

Totalscoren ble benyttet for å gi et oversiktlig bilde over patologiske forandringer fra forsøksstart til forsøkslutt, og forskjeller mellom de ulike diettgruppene. Det ble ikke regnet statistiske forskjeller på dette datasettet, da målet med dette datamaterialet var å illustrere forskjeller mellom uttakstidspunktene og diettgruppene. Presentasjon gjennom totalscore har tidligere blitt benyttet for patologiske forandringer i tarm (Brunvold & Hanche-Olsen, 2013).

I dette forsøket ble det observert patologiske forandringer i alle diettgrupper ved alle prøveuttak. Det var noe variasjon mellom gruppene ved enkelte uttak, men ved siste prøveuttak viste alle diettgrupper relativt store patologiske forandringer. Resultatene viste en økning av patologiske forandringer fra forsøksstart til forsøkslutt. Diettene med plantebaserte råvarer (RO og RO/AO) viste større patologiske forandringer enn diettene med marine råvarer (AO og EPA/DHA). Selv om det var forskjeller mellom diettgruppene, var ikke disse tydelige i forhold til det som var forventet. Det var forventet å finne tydelige forskjeller, spesielt mellom diettgruppe RO (0,84 % EPA/DHA) og diettgruppe EPA/DHA (9,68 % EPA/DHA) som representerer to ekstremer ytterpunkt angående innhold av langkjedede omega-3 fettsyrer. Diettgruppene AO og RO/AO hadde et relativt likt innhold av EPA/DHA med henholdsvis 4,52 % og 3,44 %, og man forventet ikke store forskjeller mellom disse.

Disse observasjonene kan forklares med eksempelvis; 1) forskjellene som observeres er så små at betydningen av de gitte mengder langkjedede omega-3 fettsyrer ikke har noen påvirkning på tarmhelse, 2) diett RO og RO/AO medfører de største patologiske forandringene siden de inneholder minst andel langkjedede omega-3 fettsyrer, 3) det er tilstedeværelsen av rapsolje (plantebasert råvare) i diett RO og RO/AO som forårsaker større patologiske forandringer i disse diettgruppene, 4) diettgruppe AO viser minst patologiske forandringer på grunn av at denne dietten inneholder den mest gunstige andel av langkjedede omega-3 fettsyrer, men EPA/DHA viser større patologiske forandringer fordi den eventuelt har for stor konsentrasjon av disse fettsyrene, 5) det kan ha oppstått en oksidering av fettsyrene i forsøksfôret, som dermed har medført patologiske forandringer (Olsen, 2017), 6) det er andre uavhengige faktorer som forårsaker de observerte patologiske forandringene (f.eks. bakterier eller vekst).

6.3.1 Spesialfarging

En økt tilførsel av immunceller i tarmvevet er observert i tidligere studier ved enteritt (Bakke-McKellep et al., 2000). Spesialfargingen med Giemsa kunne tyde på at det har foregått en rekruttering av immunceller (granulære celler) til tarmtottene. Det ble observert flere granulære celler rundt basalmembranen i 0-prøvene, men relativt få ute i tarmtottene. I tarmvevet fra siste prøveuttak observerte man flere granulære celler i tarmtottene, i tillegg til en fortykning av lamina propria. Dette samsvarer med tidligere studier som har vist rikelig med granulære celler rundt basalmembranen i normalt tarmvev, og en rekruttering av granulære celler ut i tarmtottene ved inflammasjon (Urán et al., 2009).

Det var vanskelig å konkludere med hvilke granulære celler som ble observert i tarmvevet, men det er kjent fra tidligere studier at det ved enteritt forekommer en stor tilstrømming av eosinofile granulære celler (Bæverfjord & Krogdahl, 1996; Carmona, 2008; Rombout et al., 2011). Det er dermed sannsynlig at flere av de observerte granulære cellene er eosinofile granulære celler. I og med at det ved Giemsa-farging står beskrevet at eosinofile granulære celler skal farges rødlig (Culling et al., 1985), og mange av de observerte cellene i vår studie var farget blå, rosa og lilla er det vanskelig å kunne konkludere noe mer spesifikt enn tilstedeværelse av granulære celler. Det ble ikke lagt vekt på å undersøke eventuelle forskjeller mellom diettgruppene ved Giemsa-farging.

Van den Ingh et al., (1991) viste en økning av antall begerceller i en morfologisk studie av tarm fra laks fôret med soyamel diett. I dette forsøket ble det også observert et stort antall begerceller ved PAS-farging, spesielt i områder ved bakteriekolonier. Det ble ikke lagt vekt på å undersøke eventuelle forskjeller i utbredelsen av begerceller mellom diettgruppene.

6.3.2 Immunhistokjemi

En signifikant økning av PCNA⁺ celler er en indikator på høy grad av celledeling og rekruttering. Immunhistokjemiske undersøkelser med PCNA er benyttet i tidligere studier for å påvise inflammasjon i blant annet hjertet hos laks (Yousaf et al., 2013). Dette indikerer enteritt hos laks som følge av fôr med høyt innhold av soyabønnemel (Wolf & Dittrich, 1992; Bakke-McKellep et al., 2007a). Fisk har i tillegg en langsommere regenerering av celler og vev i forhold til landdyr (Krogdahl, 2001). I histologiske snitt fra alle diettgruppene ble det observert PCNA-positive (fargede) cellekjerner, både i epitelvevet og områder med mistanke om inflammasjon. Det ble også observert positivt fargede cellekjerner for 0-prøvene, men i mindre grad. Dette tyder på et økt behov for å regenerere tarmvevet ved lengre eksponering av diettene, mens en høy ansamling av positive cellekjerner styrker påstanden om at det er inflammasjon tilstede i tarmvevet.

Det har tidligere blitt vist at benfisk har et lokalt immunsystem i slimhinnene, da intravenøs administrering av radiomerkede immunglobuliner aldri var i stand til å utskilles fra slimhinnene (Lobb & Clem, 1981; Rombout et al., 2011). Dette betyr at immunglobuliner i sekreter fra slimhinnene må produseres lokalt (Lobb & Clem, 1981; Lobb, 1987; Rombout et al., 1993). Det er dermed mulig at den IgM som observeres rundt basalmembranen skyldes lokal produksjon (sekretorisk IgM). Noe av det IgM som fremkommer ved den immunhistokjemiske undersøkelsen kan også være bundet til B-celler (membranbundet IgM) (Abbas et al., 2016). En forøket forekomst av IgM i epitelet, lamina propria og submukosa i baktarm hos laks ved soyabønnemel-indusert enteritt har tidligere blitt demonstrert av Bakke et al., (2007b).

0-prøvene viste svak positiv merking i vakuolene med bruk av IgM antistoff, noe som var forventet da det er kjent at IgM er tilstede i mukosa og mukosa sekreter (Salinas et al., 2011). Noe av fargen kan også skyldes bakgrunnsfarge. Prøvene fra siste prøveuttak (dag 84) viste derimot sterk positiv merking rundt basalmembranen, i mukus, og i mukus rundt bakerikoloniene. Det er foreslått at immunglobuliner hos laksefisk spiller flere biologiske roller enn bare spesifikk immunitet (Zhang et al., 2010). IgM har en viktig rolle til å interagere med mikrobiota og utføre immuneksklusjon av bakterier i tarmlumen, en prosess hvor immunglobulinene fester seg til bakterier, og hindrer dem i å trenge inn i tarmepitelet. IgT er hoved-immunglobulinet i mukosa og dekker mesteparten av bakteriene, mens IgM står for en liten del (Zhang et al., 2010). Man mener at IgT er strategisk designet for å hjelpe teleoster å opprettholde homeostasen av mikrobiotaen (Zhang et al., 2011). Krogdahl et al., (2000) har vist

Diskusjon

en økt konsentrasjon av IgM i tarmmukosa, da laks ble fôret på en diett med soyabønnemel. Hvorvidt α -regnbueørret IgM antistoffet som vi benyttet kryssreagerte med IgT ble ikke testet.

Resultatene i dette forsøket viste et økt innhold av IgM i mukosa og mukosasekreter fra dag 0 til dag 84. Observasjonene av store mengder IgM kan skyldes infeksjon av bakterier fra bakteriekolonier eller diettindusert inflammasjon i tarmvevet. Det var ikke forventet å observere høye konsentrasjoner av IgM. IgM og andre proteiner er vanskelig å detektere på grunn av proteaser som finnes i tarmmukus, samt enzymer fra bakterier, som er i stand til å degradere IgM i løpet av kort tid (Hatten et al., 2001). På grunn av et lavt antall prøver ($n = 3$) ble det ikke lagt vekt på å differensiere mellom de ulike diettgruppene, mht. innhold av IgM ved hjelp av immunhistokjemiske undersøkelser.

Av budsjett- og tidsmessige årsaker ble det ikke benyttet andre antistoffer, men ved videre arbeid ville det vært interessant å utføre immunhistokjemi med bruk av andre antistoffer, mot blant annet markører for makrofager og T-celler. Dette er celler som er kjent for å være tilstede under en kronisk inflammasjon (Abbas et al., 2016).

6.4 Undersøkelser av mikroorganismer

Ut i fra spesialfargingene med metylenblått og toluidinblått ble det konkludert med at det var bakteriekolonier tilstede i flere av de histologiske snittene. Videre undersøkelser med Gram-farging gav informasjon at det var blandingskulturer med både gram-negative kokkbakterier og gram-positive stavbakterier. Funnene av store mengder bakteriekolonier på overflaten av tarmen er interessant, da flere fagpersoner ikke har observert lignende forandringer i histologiske snitt av tarmvev fra laks tidligere (pers. med., Poppe, april 2017; pers. med., Bornø, mars 2018).

I flere histologiske snitt ble det observert flere bakteriekolonier som var festet ytterst på tarmtottene. Bakteriekolonier ble også observert imellom tarmtottene, og lot til å «sitte fast» i epitelet. Fisketarmene ble vasket før prøvene ble tatt ut og lagt på formalin, og dette styrker mistanken om at bakteriekoloniene var godt tilheftet tarmvevet.

Funnene i dette forsøket tyder på en reduksjon i vakuolisering i baktarmen hos laks. Det kan være en sammenheng mellom denne reduksjonen og tilstedeværelse av bakteriekoloniene ved at for eksempel; 1) reduksjon av vakuolisering gjør det mulig for bakteriekoloniene å kolonisere tarmepitelet, 2) bakteriene er grunnen til en reduksjon av vakuoliseringen. Den første forsvarsrekken mot patogene organismer er blant annet slimlaget i tarmen hos fisk. Skader på dette slimlaget vil føre til lettere inngang for infeksjonsorganismer (Bøgwald & Dalmo, 2014). Dersom bakteriene er grunnen til en reduksjon i vakuoliseringen, kan det skyldes at tarmmucus har blitt utnyttet som en næringskilde av patogene bakterier (Garcia et al., 1997).

Basert på studier fra pattedyr, er en mulig konsekvens av endret mikrobiotasammensetning tap av normal signalisering, som er nødvendig for optimal tarmbarriere funksjon. Dette kan resultere i redusert immuntoleranse til kommensale bakterier (Hooper & Gordon, 2001), men direkte bevis for disse sammenhengene mangler hos fisk. Diett med soyabønnemel har vist å forandre antall og tettheten av tarmbakterier hos laksefisk (Heikkinen et al., 2006; Bakke-McKellep et al., 2007a), og kan dermed potensielt favorisere vekst av ugunstige bakterier. Dette kan igjen forverre infeksjon og andre patologiske forandringer. Det er blant annet foreslått at soyabønnemel-indusert enteritt kan gi systemiske følger og økt mottakelighet for bakteriesykdommer (Krogdahl et al., 2000).

Det er vist at lave nivåer av EPA/DHA kan føre til immunsuppresjon etter infeksjon med bakterien *Vibrio salmonicida* (Erdal et al., 1991). Mens en økende mengde EPA/DHA i fôret

Diskusjon

har vist å gi økt motstand mot smitte fra bakteriene *Aeromonas salmonicida* og *V. anguillarum* hos laks (Thompson et al., 1996). Hvis de lave nivåene EPA/DHA har ført til immunsuppresjon i dette forsøket, kan dette ha gjort det mulig for opportunistiske bakterier å infisere tarmvevet.

Det ble gjort undersøkelse av et snitt fra midttarm fra samme individ som hadde bakteriekolonier i baktarmen. Det viste seg at bakteriologiene også var etablert i midttarmen (resultater ikke vist). Ved videre studier ville det være interessant å gjøre histologiske undersøkelser av alle prøvene fra midttarm og pylorus blindsekkene, mht. innhold av bakteriekolonier.

6.5 Sammenligning mellom makroskopiske og histologiske funn

Ved de makroskopiske funnen ble det observert hvite flekker på innsiden av tarmen, noe som ble fulgt opp ved histologiske undersøkelser.

En akkumulering av lipiddråper i enterocytene i blindsekkene og midttarm har tidligere blitt observert i arktisk røye fôret med linfrøolje (Olsen et al., 1999; 2000), og i tarm hos regnbueørret fôret med vegetabiliske oljer fra soya og raps (Caballero et al., 2002). Ut i fra disse studiene ble det stilt spørsmål om de hvite flekkene kunne være lipiddråper. Ved sammenligning mellom histologiske bilder som viser akkumulering av lipidvakuoler i tidligere studier (Caballero et al., 2002), og histologiske observasjoner fra dette forsøket, sees ingen likhet. Det er en mulighet for at lipiddråper har blitt brutt ned ved histologisk fremføring. En annen mulighet er at det ikke er noen sammenheng mellom de hvite flekkene og lipiddråper.

Ved histologiske undersøkelser kom det frem en korrelasjon mellom hvite flekker og histologiske funn av bakteriekolonier og vakuolisering. Ved uttaksdag 63 ble det oppdaget en betydelig andel tarmer med hvite flekker makroskopisk, samtidig som det ble observert en nedgang i antall/størrelse av vakuoler, og en økning i observasjoner av bakterier i de histologiske funnene. Ved totalt 51 unormale tarmer, ble det observert bakteriekolonier i 49 av disse. Ut fra disse sammenligningene er det mulig at det foreligger en sammenheng mellom hvite flekker og bakteriekolonier.

6.6 Dyrevelferd og etikk

Velferdsindikatorerne i form av overlevelse og tilvekst tyder på at dyrevelferden i dette forsøket var god. Det var ingen signifikante forskjeller å vise til innen tilvekst, noe som fra et økonomisk ståsted kan gi håp om en bærekraftig produksjon av laksefisk. Spørsmålet er om overlevelse og tilvekst alene er tilstrekkelig som velferdsindikatorer. Om en fisk lever og vokser betyr det ikke nødvendigvis at den har det bra. Selv om det ikke er mulig for mennesker å ha en fullstendig forståelse av fisks evne til å oppleve smerte og lidelse, burde man la tvilen komme fisken til gode når det gjøres vurderinger av konsekvenser rundt velferden.

Det kommer stadig frem ulike bivirkninger av plantebaserte dietter som laks fôres med (Bakke-McKellep et al., 2000). Også i dette forsøket så man patologiske forandringer i tarmen, til tross for at fisken på utsiden så frisk og lytefri ut, og at både overlevelsen og tilveksten var god. Per dags dato er det ingen etablerte velferdsindikatorer som tar tarmhelse i betraktning (Noble et al., 2018). Det var likevel ønskelig å ta tarmhelse i betraktning da velferden ble vurdert i dette forsøket hvor det ble observert patologiske forandringer. Det kan derfor konkluderes med at velferden i dette forsøket ikke var optimal.

6.7 Vurdering av metodene

Det må alltid tas høyde for at menneskelige feil kan forekomme når man arbeider med mange prøver og et stort datamateriale, selv om intensjonen er å jobbe systematisk og med størst mulig presisjon.

I forsøksoppsettet kan det stilles spørsmål ved om kontrollgruppene på de histologiske prøvene, var gode nok. Kontrollgruppene i oppsettet var diett RO/AO og AO, hvor RO/AO var ment å representere et tilnærmet kommersielt fôr som benyttes i oppdrett, og AO var ment å representere en tilnærmet kommersielt fôr fra 20 år tilbake i tid (Ytrestøyl et al., 2015). Siden disse diettgruppene også viste patologiske forandringer, kunne det vært interessant å inkludere en alternativ kontrollgruppe, eventuelt utbedre de etablerte kontrollgruppene. For eksempel kunne man opprettet en kontrollgruppe bestående av laks fôret med et kommersielt standardfôr. Dette ville kunne redusert sannsynligheten for at eventuelle feilkilder skulle ramme alle forsøksdiettene. Fôret tilsatt AO, har innhold av SPC og hvetegluten som proteinkilde, og dette kunne vært erstattet med fiskemel og dermed vært mer tilnærmet en naturlig diett.

Diskusjon

Andre mulige forklaringer på forandringene som observeres i diettgruppene kan skyldes overføring, og at dette er en stor påkjenning for tarmen. Ved å benytte baktarm fra en villaks som har levd et naturlig liv som kontroll, kunne man avdekket om eventuelle forandringer kunne skyldes for eksempel overføring. Om man da også ser forandringer i baktarmen til laks som har levd et naturlig liv, kan det tenkes at forandringene skyldes naturlige prosesser som vekst.

Svakhetene med parameterne som ble valgt til histopatologisk scoring (inflammasjon, vakuolisering og morfologiske forandringer) er at det vil kunne være stor variasjon etter hvor og hvordan snittene av baktarmen ble tatt. For eksempel kan inflammasjon være tilstede et sted i tarmen, og totalt fraværende andre steder. Det ble derfor gjort seriesnitt (100 snitt, 5 µm) av en baktarm som inneholdt moderat grad av inflammasjon, for å se om det var stor variasjon gjennom tarmen. Visuelle observasjonene av disse seriesnittene viste ingen stor variasjon i de patologiske forandringene (resultater ikke vist). Uttak av histologiske prøver ble gjennomført av forskjellige personer, noe som kan ha gitt variasjon mellom snittene. Det er også viktig å ta i betraktning at histologiske snitt bare viser en liten del av det helhetlige bildet. Hvert snitt viser kun 5 µm av en tarmprøve, og det er dermed ikke sikkert at man treffer et område som var representativt for resten av tarmen.

Sammenlignet med histopatologiske forandringer forårsaket av soyabønnemel-indusert enteritt (Bakke-McKellep et al., 2007a), ble det observert mindre grad av patologiske forandringer i dette forsøket. Studiene utført med soyabønnemel gav høyere tilstrømming av leukocytter, fortykning (dilatasjon) av lamina propria og submukosa, og det ble oftere observert totalt fravær av vakuolisering (Van den Ingh et al., 1991; Bæverfjord & Krogdahl, 1996; Bakke-McKellep et al., 2007a; Carmona, 2008). Dette var forventet, siden det er vist at saponiner i soyabønnemel fører til enteritt hos laks (Bureau et al., 1998; Bakke-McKellep et al., 2007a; Krogdahl et al., 2010), noe rapsolje ikke inneholder. Saponiner er varmemestabile amfipatiske glykosider, som trolig bidrar til plantens immunforsvar mot patogener (Morrissey & Osbourn, 1999). Det var dermed nødvendig å benytte et graderingssystem som gjorde det mulig å gradere de mindre forandringene som ble observert.

Det er viktig å ta høyde for at de statistiske analysene baserer seg på subjektive graderinger, og at det ikke er mulig å gjøre optimale statistiske analyser av semikvantitativt datamateriale.

6.8 Videre arbeid

Ved å benytte elektronmikroskopiske undersøkelser vil det være mulig å studere morfologien til bakteriekoloniene nærmere, og muliggjøre videre identifisering av bakteriene man observerer i tarmen. Ved elektronmikroskopiske undersøkelser kan man også studere om det er endringer på mikrovilliene i tarmen. Det har tidligere blitt vist at disse kan forkortes ved bruk av plantebaserte dietter (Van den Ingh et al., 1991).

Ved en inflammasjon eller infeksjon i slimhinner hos laksefisk er det flere genuttrykk som tidligere har vist å oppreguleres sterkt, for eksempel: IL-17A, IL-1 β , IFN- α , IFN- γ (Marjara et al., 2012), CD3pp, CD4 og CD8 (Bakke-McKellep et al., 2007b), SAA (serum amyloid A) og IL-8 (Evenhuis & Cleveland, 2012). I en studie ble det vist at T-bet, IL-22 og IFN-gamma nivåene ble oppregulert i baktarm ved infeksjon av *Aeromonas salmonicida* (Kumari et al., 2015). Ved hjelp av q-PCR kunne man videre testet for oppregulering av noen av genene nevnt ovenfor. Dette vil muliggjøre identifisering av inflammasjon på et tidligere tidspunkt enn ved histologiske undersøkelser, da en oppregulering av gener skjer før en rekruttering av immunceller.

Det ville vært veldig interessant, å gjenta forsøket med eventuelle modifikasjoner i fremtiden. Man vil da kunne observere om man igjen får de samme tilstandene, med høy tilstedeværelse av bakteriekolonier i tarmen hos laksen. Det vil da være mulig å hente ut levende bakterier for eventuell dyrkning, og eventuelt teste de nyeste DNA-baserte metodene, for videre informasjon om hvilke bakterier som er tilstede. Ved å kartlegge mikrobiotaen vil man få informasjon om det er liten diversitet av bakterier tilstede i tarmen, noe som tyder på patologi, eller om bakteriene tilstede er lik normalbiotaen, noe som tyder på at bakteriene har økt i antall (Rawls et al., 2004).

Nylig har den første cellelinjen på fisketarm blitt tatt i bruk, TRgutGC, som opprinnelig kommer fra regnbueørret (Minghetti et al., 2017). Det kunne vært interessant å undersøke om det hadde vært mulig å utføre et eksperiment med en slik cellelinje, ved å eksponere cellene for ulike fettsyrer eller andre næringsstoffer man kan finne i dietter. *Ex vivo* eksperimentelle metoder tillater kontrollerte variasjoner av eksperimentelle parametere på nivå med selve organet. Det tilbyr også en metode som ikke trenger å benytte levende dyr (Kawano et al., 2011).

7. Konklusjon

Statistiske analyser viste ingen signifikante forskjeller i vekst mellom diettgruppene. De makroskopiske undersøkelsene av baktarm viste at fisk gitt diett AO hadde minst antall morfologiske unormale baktarmer, mens fisk gitt diett EPA/DHA hadde flest unormale baktarmer. Det fremstod en trend hvor det er større tilvekst hos fisk med normale baktarmer. Resultatene fra den histopatologiske graderingen viste at fisk som ble gitt diett AO hadde generelt lavest score og minst forandringer, mens fisk som fikk RO/AO hadde generelt høyest score og flest forandringer. Undersøkelser med spesialfarginger viste betydelige mengder granulære celler som var rekruttert ut i tarmtottene hos forsøksfisken, og et økt antall begerceller fra dag 0 til dag 84. Bakteriekolonier var tilstede i alle diettgrupper ved forsøksslutt. Det ble funnet tilstedeværelse av IgM og PCNA ved immunhistokjemiske undersøkelser, som styrket påstandene om inflammasjon og patologiske forandringer i baktarm.

Referanser

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2016). Introduction to the Immune System. *Basic immunology: functions and disorders of the immune system* (Fifth edition ed., s. 1-25): Elsevier.
- Abeywardena, M. Y., & Belobrajdic, D. P. (2016). Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and obesity. *Obesity* (s. 29-44). Switzerland: Springer.
- Ackermann, M. (2013). Inflammation and healing. J. F. Zachary & M. D. McGavin (Eds.), *Pathologic Basis of Veterinary Disease-E-Book* (Fifth Edition ed., s. 89-135). Missouri, USA: Elsevier Health Sciences.
- Arazna, M., Pruchniak, M. P., & Demkow, U. (2013). Neutrophil extracellular traps in bacterial infections: strategies for escaping from killing. *Respiratory physiology & neurobiology*, **187**, 74-77.
- Aslaksen, M. A., Kraugerud, O. F., Penn, M., Svihus, B., Denstadli, V., Jørgensen, H. Y., Hillestad, M., Krogdahl, Å., & Storebakken, T. (2007). Screening of nutrient digestibilities and intestinal pathologies in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with legumes, oilseeds, or cereals. *Aquaculture*, **272**, 541-555.
- Aung, T., Halsey, J., Kromhout, D., Gerstein, H. C., Marchioli, R., Tavazzi, L., Geleijnse, J. M., Rauch, B., Ness, A., et al. (2018). Associations of Omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks: Meta-analysis of 10 Trials Involving 77 917 Individuals. *JAMA cardiology*, **3**, 225-234.
- Aunsmo, A., Valle, P. S., Sandberg, M., Midtlyng, P. J., & Bruheim, T. (2010). Stochastic modelling of direct costs of pancreas disease (PD) in Norwegian farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Preventive veterinary medicine*, **93**, 233-241.
- Baeverfjord, G., & Krogdahl, Å. (1996). Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases*, **19**, 375-387.
- Bakke-McKellep, A. M., Press, C. M., Baeverfjord, G., Krogdahl, Å., & Landsverk, T. (2000). Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with soybean meal-induced enteritis. *Journal of Fish Diseases*, **23**, 115-127.
- Bakke-McKellep, A. M., Penn, M. H., Salas, P. M., Refstie, S., Sperstad, S., Landsverk, T., Ringø, E., & Krogdahl, Å. (2007a). Effects of dietary soyabean meal, inulin and oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition*, **97**, 699-713.
- Bakke-McKellep, A. M., & Refstie, S. (2008). Alternative protein sources and digestive function alterations in teleost fishes. J. Cyrino, D. Bureau, & B. Kapoor (Eds.), *Feeding and digestive functions of fishes* (s. 440-472). Jersey, Plymouth: Science Publisher.
- Bakke-McKellep, A. M., Frøystad, M. K., Lilleeng, E., Dapra, F., Refstie, S., Krogdahl, Å., & Landsverk, T. (2007b). Response to soy: T-cell-like reactivity in the intestine of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, **30**, 13-25.
- Barnham, C. A., & Baxter, A. F. (1998). Condition factor, K, for salmonid fish. *Fisheries Notes* (s. 1-3). Department of Primary Industries, Melbourne, Victoria, Australia: Department of Primary Industries.
- Bates, J. M., Mittge, E., Kuhlman, J., Baden, K. N., Cheesman, S. E., & Guillemin, K. (2006). Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Developmental biology*, **297**, 374-386.

Referanser

- Bell, J. G., Dick, J. R., McVicar, A. H., Sargent, J. R., & Thompson, K. D. (1993). Dietary sunflower, linseed and fish oils affect phospholipid fatty acid composition, development of cardiac lesions, phospholipase activity and eicosanoid production in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **49**, 665-673.
- Bell, J. G., Ashton, I., Secombes, C. J., Weitzel, B. R., Dick, J. R., & Sargent, J. R. (1996). Dietary lipid affects phospholipid fatty acid compositions, eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **54**, 173-182.
- Bell, J. G., McEvoy, J., Tocher, D. R., McGhee, F., Campbell, P. J., & Sargent, J. R. (2001). Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *The Journal of nutrition*, **131**, 1535-1543.
- Bell, J. G., McGhee, F., Campbell, P. J., & Sargent, J. R. (2003). Rapeseed oil as an alternative to marine fish oil in diets of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*): changes in flesh fatty acid composition and effectiveness of subsequent fish oil "wash out". *Aquaculture*, **218**, 515-528.
- Bell, J. G., McGhee, F., Dick, J. R., & Tocher, D. R. (2005). Dioxin and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Scottish farmed salmon (*Salmo salar*): effects of replacement of dietary marine fish oil with vegetable oils. *Aquaculture*, **243**, 305-314.
- Berntssen, M. H. G., Hylland, K., Julshamn, K., Lundebye, A. K., & Waagbø, R. (2004). Maximum limits of organic and inorganic mercury in fish feed. *Aquaculture Nutrition*, **10**, 83-97.
- Bogevik, A. (2007). Nye marine fôrressurser–utfordring i bruk av oljer rike på voksestere. *Havbruk* (s. 134-135): Kyst og havbruk.
- Bornø, G. (pers. med., mars 2018). [Seksjonsleder Veterinærinstituttet].
- Brunvold, L., & Hanche-Olsen, R. (2013). *Sluttrapport – Nedsatt tarmhelse og forekomst av flytefeces hos laks 2013*. Hentet fra <http://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=900722> [Tilgjengelig 08.05.2018]
- Bureau, D. P., Harris, A. M., & Cho, C. Y. (1998). The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **161**, 27-43.
- Bæverfjord, G., & Krogdahl, Å. (1996). Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases*, **19**, 375-387.
- Bøggwald, J., & Dalmo, R. A. (2014). Gastrointestinal pathogenesis in aquatic animals. D. Merrifield & E. Ringø (Eds.), *Aquaculture nutrition: Gut health, probiotics and prebiotics* (s. 53-74). Oxford: Wiley-Blackwell Publishing.
- Caballero, M. J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M., & Izquierdo, M. S. (2002). Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, **214**, 253-271.
- Caballero, M. J., Izquierdo, M. S., Kjørsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Fernández, A. J., & Rosenlund, G. (2003). Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture*, **225**, 325-340.
- Cahill, M. M. (1990). Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial ecology*, **19**, 21-41.
- Calder, P. C. (2006). n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American journal of clinical nutrition*, **83**, 1505-1519.
- Calder, P. C. (2009). Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale. *Biochimie*, **91**, 791-795.

- Calder, P. C. (2012). Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *The Journal of nutrition*, **142**, 592-599.
- Carmona, P. A. U. (2008). Etiology of soybean-induced enteritis in fish. (Doktorgradsavhandling), Wageningen University, Nederland
- Chapkin, R. S., McMurray, D. N., & Lupton, J. R. (2007). Colon cancer, fatty acids and anti-inflammatory compounds. *Current opinion in gastroenterology*, **23**, 48-54.
- Cleland, L. G., James, M. J., & Proudman, S. M. (2005). Fish oil: what the prescriber needs to know. *Arthritis research & therapy*, **8**, 202.
- Culling, C. F., Allison, R. T., & Barr, W. T. (1985). Cellular pathology technique. In (pp. 217-346): Butterworth, London.
- Danguy, A., Kiss, R., Launoit, Y., & Lenglet, G. (1988). Cell proliferation in the digestive mucosa of fishes as revealed by autoradiography with tritiated thymidine. *Zeitschrift fuer Mikroskopisch-Anatomische Forschung*, **102**, 489-502.
- Daprà, F., Geurden, I., Corraze, G., Bazin, D., Zambonino-Infante, J.-L., & Fontagné-Dicharry, S. (2011). Physiological and molecular responses to dietary phospholipids vary between fry and early juvenile stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **319**, 377-384.
- Day, S. J., & Altman, D. G. (2000). Blinding in clinical trials and other studies. *British Medical Journal*, **321**, 504.
- Desai, A. R., Links, M. G., Collins, S. A., Mansfield, G. S., Drew, M. D., Van Kessel, A. G., & Hill, J. E. (2012). Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **350**, 134-142.
- Dezfuli, B. S., Giari, L., Squerzanti, S., Lui, A., Lorenzoni, M., Sakalli, S., & Shinn, A. P. (2011). Histological damage and inflammatory response elicited by *Monobothrium wagneri* (Cestoda) in the intestine of *Tinca tinca* (Cyprinidae). *Parasites & vectors*, **4**, 225.
- Dosanjh, B. S., Higgs, D. A., Plotnikoff, M. D., Markert, J. R., & Buckley, J. T. (1988). Preliminary evaluation of canola oil, pork lard and marine lipid singly and in combination as supplemental dietary lipid sources for juvenile fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, **68**, 325-343.
- Duthie, E. S. (1939). The origin, development and function of the blood cells in certain marine teleosts: Part I. Morphology. *Journal of anatomy*, **73**, 396.
- Duvall, E., Wyllie, A. H., & Morris, R. G. (1985). Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology*, **56**, 351.
- Einen, O. (2001). Vekst og fôrutnyttelse. R. Waagbø, M. Espe, K. Hamre, & Ø. Lie (Eds.), *Fiskeernæring* (s. 205-217). Dreggen, Bergen: Kystnæringen Forlag & Bokklubb AS.
- Einen, O., Alne, H., Grisdale-Helland, B., Helland, S. J., Hemre, G.-I., Ruyter, B., Refstie, S., & Waagbø, R. (2007). Nutritional biology in farmed fish. *Aquaculture Research: From Cage to Consumption*, 200-216.
- Eldridge, S. R., & Goldsworthy, S. M. (1996). Cell proliferation rates in common cancer target tissues of B6C3F1 mice and F344 rats: effects of age, gender, and choice of marker. *Toxicological Sciences*, **32**, 159-167.
- Erdal, J. I., Evensen, Ø., Kaurstad, O. K., Lillehaug, A., Solbakken, R., & Thorud, K. (1991). Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. *Aquaculture*, **98**, 363-379.
- Evenhuis, J. P., & Cleveland, B. M. (2012). Modulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal immune gene expression following bacterial challenge. *Veterinary immunology and immunopathology*, **146**, 8-17.

Referanser

- Evje, I. B. S. (2015). Fettsyresammensetning hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.) fôret med ulike mengder langkjedede omega-3 fettsyrer. (Mastergradsoppgave), Universitetet i Tromsø (UiT), Norges arktiske universitet,
- Ezeasor, D. N., & Stokoe, W. M. (1981). Light and electron microscopic studies on the absorptive cells of the intestine, caeca and rectum of the adult rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Rich. *Journal of Fish Biology*, **r18**, 527-544.
- Fisheries, F. (2011). *Aquaculture Department (2013)*. Hentet fra <ftp://ftp.fao.org/FI/news/GlobalAquacultureProductionStatistics2011.pdf> [Tilgjengelig den 11.05.2018]
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226**, 497-509.
- Fontagne, S., Geurden, I., Escaffre, A.-M., & Bergot, P. (1998). Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture*, **161**, 213-223.
- Francis, G., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, **199**, 197-227.
- Garcia, T., Otto, K., Kjelleberg, S., & Nelson, D. R. (1997). Growth of *Vibrio anguillarum* in Salmon Intestinal Mucus. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 1034-1039.
- Ghosh, S., DeCoffe, D., Brown, K., Rajendiran, E., Estaki, M., Dai, C., Yip, A., & Gibson, D. L. (2013). Fish oil attenuates omega-6 polyunsaturated fatty acid-induced dysbiosis and infectious colitis but impairs LPS dephosphorylation activity causing sepsis. *PLoS one*, **8**, e55468.
- Gibson-Corley, K. N., Olivier, A. K., & Meyerholz, D. K. (2013). Principles for valid histopathologic scoring in research. *Veterinary pathology*, **50**, 1007-1015.
- Glencross, B. D., Tocher, D. R., Matthew, C., & Bell, J. G. (2014). Interactions between dietary docosahexaenoic acid and other long-chain polyunsaturated fatty acids on performance and fatty acid retention in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology and Biochemistry*, **40**, 1213-1227.
- Grosell, M. (2011). Intestinal anion exchange in marine teleosts is involved in osmoregulation and contributes to the oceanic inorganic carbon cycle. *Acta Physiologica*, **202**, 421-434.
- Gruben, M. H. (2007). Etterspørsel etter laks: når negativ medieomtale påvirker salget av laks. Universitetet i Oslo (UiO), Mastergradsoppgave.
- Hansen, J. D., & Zapata, A. G. (1998). Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunological reviews*, **166**, 199-220.
- Hardy, R. W., Scott, T. M., & Harrell, L. W. (1987). Replacement of herring oil with menhaden oil, soybean oil, or tallow in the diets of Atlantic salmon raised in marine net-pens. *Aquaculture*, **65**, 267-277.
- Hatten, F., Fredriksen, Å., Hordvik, I., & Endresen, C. (2001). Presence of IgM in cutaneous mucus, but not in gut mucus of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Serum IgM is rapidly degraded when added to gut mucus. *Fish & shellfish immunology*, **11**, 257-268.
- Hayashi, D., Li, D., Hayashi, C., Shatos, M., Hodges, R. R., & Dartt, D. A. (2012). Role of Histamine and Its Receptor Subtypes in Stimulation of Conjunctival Goblet Cell Secretion Histamine Receptor Subtypes and Goblet Cell Function. *Investigative ophthalmology & visual science*, **53**, 2993-3003.
- Heikkinen, J., Vielma, J., Kemiläinen, O., Tiitola, M., Eskelinen, P., Kiuru, T., Navia-Paldanius, D., & von Wright, A. (2006). Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **261**, 259-268.

Referanser

- Henderson, R. J., & Tocher, D. R. (1987). The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progress in lipid research*, **26**, 281-347.
- Hersoug, B. (2015). The greening of Norwegian salmon production. *Maritime Studies*, **14**, 16.
- Hjeltnes, B., Bang-Jensen, B., Bornø, G., & Haukaas, A. (2018). *Fiskehelse rapporten 2017*. Hentet fra
- Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, **292**, 1115-1118.
- Htun-Han, M. (1978). The reproductive biology of the dab *Limanda limanada* (L.) in the North Sea: gonadosomatic index, hepatosomatic index and condition factor. *Journal of Fish Biology*, **1**, 351-377.
- Hu, H., Kortner, T. M., Gajardo, K., Chikwati, E., Tinsley, J., & Krogdahl, Å. (2016). Intestinal fluid permeability in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is affected by dietary protein source. *PLoS one*, **11**, e0167515.
- Hudson, R. J., Saben, H. S., & Emslie, D. (1974). Physiological and environmental influences on immunity. *Veterinary bulletin*, **44**, 119-128.
- Innis, S. M. (2007a). Fatty acids and early human development. *Early human development*, **83**, 761-766.
- Innis, S. M. (2007b). Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *The Journal of nutrition*, **137**, 855-859.
- Investigators, I. i. E. S. (2009). Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: a nested case-control study within a European prospective cohort study. *Gut*, **58**, 1606-1611.
- Iwai, T. (1968). Fine structure and absorption patterns of intestinal epithelial cells in rainbow trout alevins. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, **91**, 366-379.
- Jobling, M. (2003). The thermal growth coefficient (TGC) model of fish growth: a cautionary note. *Aquaculture research*, **34**, 581-584.
- Kawano, A., Haiduk, C., Schirmer, K., Hanner, R., Lee, L. E. J., Dixon, B., & Bols, N. C. (2011). Development of a rainbow trout intestinal epithelial cell line and its response to lipopolysaccharide. *Aquaculture Nutrition*, **17**, 241-252.
- Kim, D. H., Brunt, J., & Austin, B. (2007). Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of applied microbiology*, **102**, 1654-1664.
- Koppang, E. O., Fischer, U., Moore, L., Tranulis, M. A., Dijkstra, J. M., Köllner, B., Aune, L., Jirillo, E., & Hordvik, I. (2010). Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *Journal of anatomy*, **217**, 728-739.
- Koskela, J., Pirhonen, J., & Jobling, M. (1997). Feed intake, growth rate and body composition of juvenile Baltic salmon exposed to different constant temperatures. *Aquaculture International*, **5**, 351-360.
- Krogdahl, Å., Bakke-McKellep, A. M., Roed, K. H., & Baeverfjord, G. (2000). Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products: effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. *Aquaculture Nutrition*, **6**, 77-84.
- Krogdahl, Å. (2001). *Fordøyelsessystemet hos kaldtvannsfisk—oppbygging og funksjon*. Bergen, Norway: Kystnæringen Forlag og Bokklubb AS.
- Krogdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., & Bakke, A. M. (2010). Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture research*, **41**, 333-344.
- Kryvi, H., & Totland, G. K. (1997). Fordøyelsessystemet. *Fiskeanatomi* (s. 127-143). Høgskoleforlaget AS, Bergen.

- Kryvi, H., & Poppe, T. (2016). Fordøyelsessystemet. *Fiskeanatomi* (Andre utgave ed., s. 101-118): Fagbokforlaget.
- Kumari, J., Zhang, Z., Swain, T., Chi, H., Niu, C., Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2015). Transcription factor T-bet in Atlantic salmon: characterization and gene expression in mucosal tissues during *Aeromonas salmonicida* infection. *Frontiers in immunology*, **6**, 345.
- Lazzarotto, V., Corraze, G., Leprevost, A., Quillet, E., Dupont-Nivet, M., & Médale, F. (2015). Three-year breeding cycle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant-based diet, totally free of marine resources: consequences for reproduction, fatty acid composition and progeny survival. *PloS one*, **10**, e0117609.
- Leino, R. L. (1974). Ultrastructure of immature, developing, and secretory rodlet cells in fish. *Cell and Tissue Research*, **155**, 367-381.
- Liu, Y., Chen, F., Odle, J., Lin, X., Jacobi, S. K., Zhu, H., Wu, Z., & Hou, Y. (2012). Fish oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge. *The Journal of nutrition*, **142**, 2017-2024.
- Lobb, C. J., & Clem, L. W. (1981). The metabolic relationships of the immunoglobulins in fish serum, cutaneous mucus, and bile. *The Journal of Immunology*, **127**, 1525-1529.
- Lobb, C. J. (1987). Secretory immunity induced in catfish, *Ictalurus punctatus*, following bath immunization. *Developmental & Comparative Immunology*, **11**, 727-738.
- Marjara, I. S., Chikwati, E. M., Valen, E. C., Krogdahl, Å., & Bakke, A. M. (2012). Transcriptional regulation of IL-17A and other inflammatory markers during the development of soybean meal-induced enteropathy in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cytokine*, **60**, 186-196.
- Martinez-Rubio, L., Morais, S., Evensen, Ø., Wadsworth, S., Ruohonen, K., Vecino, J. L. G., Bell, J. G., & Tocher, D. R. (2012). Functional feeds reduce heart inflammation and pathology in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following experimental challenge with Atlantic salmon reovirus (ASRV). *PloS one*, **7**, e40266.
- Martinez-Rubio, L., Morais, S., Evensen, Ø., Wadsworth, S., Vecino, J. G., Ruohonen, K., Bell, J. G., & Tocher, D. R. (2013). Effect of functional feeds on fatty acid and eicosanoid metabolism in liver and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with experimentally induced heart and skeletal muscle inflammation. *Fish & shellfish immunology*, **34**, 1533-1545.
- Martinez-Rubio, L., Evensen, Ø., Krasnov, A., Jørgensen, S. M., Wadsworth, S., Ruohonen, K., Vecino, J. L. G., & Tocher, D. R. (2014). Effects of functional feeds on the lipid composition, transcriptomic responses and pathology in heart of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) before and after experimental challenge with Piscine Myocarditis Virus (PMCV). *BMC genomics*, **15**, 462.
- Mayhew, T. M. (1990). Striated brush border of intestinal absorptive epithelial cells: stereological studies on microvillous morphology in different adaptive states. *Microscopy Research and Technique*, **16**, 45-55.
- McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P., & Florin, T. H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, **9**, 265-278.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, **454**, 428.
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R. T. M., & Davies, S. J. (2009). Soybean meal alters autochthonous microbial populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, **32**, 755-766.
- Minghetti, M., Drieschner, C., Bramaz, N., Schug, H., & Schirmer, K. (2017). A fish intestinal epithelial barrier model established from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cell line, RTgutGC. *Cell biology and toxicology*, **33**, 539-555.

Referanser

- Mirsepasi-Lauridsen, H. C., Holmetoft, U. B., Halkjær, S. I., Krogfelt, K. A., & Petersen, A. M. (2016). Comparison of three commercial fecal calprotectin ELISA test kits used in patients with inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*, **51**, 211-217.
- Moffitt, C. M., & Cajas-Cano, L. (2014). Blue growth: the 2014 FAO state of world fisheries and aquaculture. *Fisheries*, **39**, 552-553.
- Moldal, T., Løkka, G., Wiik-Nielsen, J., Austbø, L., Torstensen, B. E., Rosenlund, G., Dale, O. B., Kaldhusdal, M., & Koppang, E. O. (2014). Substitution of dietary fish oil with plant oils is associated with shortened mid intestinal folds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC veterinary research*, **10**, 60.
- Morrissey, J. P., & Osbourn, A. E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**, 708-724.
- Motulsky, H. J. (2003). Prism 4 statistics guide - statistical analyses for laboratory and clinical researchers. *GraphPad Software Inc., San Diego, CA*, 122-126.
- Nakanishi, T., Shibasaki, Y., & Matsuura, Y. (2015). T cells in fish. *Biology*, **4**, 640-663.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, **420**, 846.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews immunology*, **6**, 173.
- Navarrete, P., Magne, F., Araneda, C., Fuentes, P., Barros, L., Opazo, R., Espejo, R., & Romero, J. (2012). PCR-TTGE analysis of 16S rRNA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota reveals host-specific communities of active bacteria. *PloS one*, **7**, e31335.
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture research*, **41**, 1553-1573.
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Bureau, D. P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A. P., Forster, I., Gatlin, D. M., Goldburg, R. J., et al. (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 15103-15110.
- Niklasson, L., Sundh, H., Fridell, F., Taranger, G. L., & Sundell, K. (2011). Disturbance of the intestinal mucosal immune system of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), in response to long-term hypoxic conditions. *Fish & shellfish immunology*, **31**, 1072-1080.
- Noble, C., Nilsson, J., Stien, L. H., Iversen, M. H., Kolarevic, J., & Gismervik, K. (2018). Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd. 2. utgave. 10-108.
- Nonnotte, G., Aubree-Pelletier, A., & Colin, D. A. (1987). Na⁺ transport in perfused intestine and in isolated enterocytes of freshwater trout deprived of essential fatty acid. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology*, **88**, 431-436.
- O'Byrne-Ring, N., Dowling, K., Cotter, D., Whelan, K., & MacEville, U. (2003). Changes in mucus cell numbers in the epidermis of the Atlantic salmon at the onset of smoltification. *Journal of Fish Biology*, **63**, 1625-1630.
- Oliva-Teles, A. (2012). Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases*, **35**, 83-108.
- Olsen, R. E., Henderson, R. J., & Ringø, E. (1998). The digestion and selective absorption of dietary fatty acids in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Aquaculture Nutrition*, **4**, 13-22.
- Olsen, R. E., Myklebust, R., Kaino, T., & Ringø, E. (1999). Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes of Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) fed linseed oil and soybean lecithin. *Fish Physiology and Biochemistry*, **21**, 35-44.
- Olsen, R. E., Myklebust, R., Ringø, E., & Mayhew, T. M. (2000). The influences of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. *Fish Physiology and Biochemistry*, **22**, 207-216.

Referanser

- Olsen, R. E., Dragnes, B. T., Myklebust, R., & Ringø, E. (2003). Effect of soybean oil and soybean lecithin on intestinal lipid composition and lipid droplet accumulation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Physiology and Biochemistry*, **29**, 181-192.
- Olsen, R. E., Svardal, A., Eide, T., & Wargelius, A. (2012). Stress and expression of cyclooxygenases (cox1, cox2a, cox2b) and intestinal eicosanoids, in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Fish Physiology and Biochemistry*, **38**, 951-962.
- Olsen, R. L. (2017). Forringelse av fett. *Lipidkjemi med vekt på fisk* (4. utgave ed., s. 54-64): Norges fiskerihøgskole, UiT, Norges arktiske universitet.
- Oulhaj, A., Jernerén, F., Refsum, H., Smith, A. D., & de Jager, C. A. (2016). Omega-3 fatty acid status enhances the prevention of cognitive decline by B vitamins in mild cognitive impairment. *Journal of Alzheimer's Disease*, **50**, 547-557.
- Oxley, A., Jolly, C., Eide, T., Jordal, A.-E. O., Svardal, A., & Olsen, R.-E. (2010). The combined impact of plant-derived dietary ingredients and acute stress on the intestinal arachidonic acid cascade in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *British Journal of Nutrition*, **103**, 851-861.
- Penn, M. H. (2011, November, 2011). Lipid malabsorption in Atlantic salmon – the reoccurring problem of floating feces. *Fagtidsskriftet Fiskehelse*, 6-11.
- Penn, M. H., Bendiksen, E. Å., Campbell, P., & Krogdahl, Å. (2011). High level of dietary pea protein concentrate induces enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, **310**, 267-273.
- Polvi, S. M., & Ackman, R. G. (1992). Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle lipids and their response to alternative dietary fatty acid sources. *Journal of agricultural and food chemistry*, **40**, 1001-1007.
- Pond, M. J., Stone, D. M., & Alderman, D. J. (2006). Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **261**, 194-203.
- Poppe, T. (pers. med., april 2017). Ekspertråd giver i histologi ved Pharmaq Analytiq.
- Powell, K. (2003). Fish farming: Eat your veg. *Nature*, **426**, 378-379.
- Press, C., & Evensen, Ø. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & shellfish immunology*, **9**, 309-318.
- Press, C., & Jørgensen, T. Ø. (1999). Fiskens immunsystem. T. Poppe (Ed.), *Fiskehelse og fisesykdommer* (s. 37-49). Oslo, Norway: Universitetsforlaget AS.
- Ramos-Vara, J. A., & Miller, M. A. (2014). When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry—the red, brown, and blue technique. *Veterinary pathology*, **51**, 42-87.
- Rawls, J. F., Samuel, B. S., & Gordon, J. I. (2004). Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 4596-4601.
- Refstie, S., Storebakken, T., & Roem, A. J. (1998). Feed consumption and conversion in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with fish meal, extracted soybean meal or soybean meal with reduced content of oligosaccharides, trypsin inhibitors, lectins and soya antigens. *Aquaculture*, **162**, 301-312.
- Refstie, S., Svihus, B., Shearer, K. D., & Storebakken, T. (1999). Nutrient digestibility in Atlantic salmon and broiler chickens related to viscosity and non-starch polysaccharide content in different soyabean products. *Animal Feed Science and Technology*, **79**, 331-345.
- Refstie, S., Korsøen, Ø. J., Storebakken, T., Baeverfjord, G., Lein, I., & Roem, A. J. (2000). Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, **190**, 49-63.

Referanser

- Refstie, S., Storebakken, T., Bæverfjord, G., & Roem, A. J. (2001). Long-term protein and lipid growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with partial replacement of fish meal by soy protein products at medium or high lipid level. *Aquaculture*, **193**, 91-106.
- Regost, C., Jakobsen, J. V., & Rørå, A. M. B. (2004). Flesh quality of raw and smoked fillets of Atlantic salmon as influenced by dietary oil sources and frozen storage. *Food Research International*, **37**, 259-271.
- Reite, O. B. (2005). The rodlet cells of teleostean fish: their potential role in host defence in relation to the role of mast cells/eosinophilic granule cells. *Fish & shellfish immunology*, **19**, 253-267.
- Ringø, E., Strøm, E., & Tabachek, J. A. (1995). Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture research*, **26**, 773-789.
- Ringø, E., & Birkbeck, T. H. (1999). Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture research*, **30**, 73-93.
- Ringø, E., Lødemel, J. B., Myklebust, R., Jensen, L., Lund, V., Mayhew, T. M., & Olsen, R. E. (2002). The effects of soybean, linseed and marine oils on aerobic gut microbiota of Arctic charr *Salvelinus alpinus* L. before and after challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *Aquaculture research*, **33**, 591-606.
- Rombout, J. H., Lamers, C., Helfrich, M., Dekker, A., & Taverne-Thiele, J. (1985). Uptake and transport of intact macromolecules in the intestinal epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the possible immunological implications. *Cell and Tissue Research*, **239**, 519-530.
- Rombout, J. H., Taverne, N., van de Kamp, M., & Taverne-Thiele, A. J. (1993). Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental & Comparative Immunology*, **17**, 309-317.
- Rombout, J. H. W. M., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G., & Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish & shellfish immunology*, **31**, 616-626.
- Rosa, D. D., Sales, R. L. d., Moraes, L. F. d. S., Lourenço, F. C., Neves, C. A., Sabarense, C. M., Ribeiro, S. M. R., & Peluzio, M. d. C. G. (2010). Flaxseed, olive and fish oil influence plasmatic lipids, lymphocyte migration and morphometry of the intestinal of Wistar rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, **25**, 275-280.
- Rosenlund, G., Torstensen, B. E., Stubhaug, I., Usman, N., & Sissener, N. H. (2016). Atlantic salmon require long-chain n-3 fatty acids for optimal growth throughout the seawater period. *Journal of nutritional science*, **5**, 1-13.
- Ruyter, B., Rosjo, C., Einen, O., & Thomassen, M. S. (2000a). Essential fatty acids in Atlantic salmon: effects of increasing dietary doses of n-6 and n-3 fatty acids on growth, survival and fatty acid composition of liver, blood and carcass. *Aquaculture Nutrition*, **6**, 119-128.
- Ruyter, B., Rosjo, C., Einen, O., & Thomassen, M. S. (2000b). Essential fatty acids in Atlantic salmon: time course of changes in fatty acid composition of liver, blood and carcass induced by a diet deficient in n-3 and n-6 fatty acids. *Aquaculture Nutrition*, **6**, 109-118.
- Ruyter, B., Moya-Falcón, C., Rosenlund, G., & Vegusdal, A. (2006). Fat content and morphology of liver and intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*): effects of temperature and dietary soybean oil. *Aquaculture*, **252**, 441-452.
- Ruyter, B., Bou, M., Bæverfjord, G., Østbye, T.-K. K., Ytrestøyl, T., Bjerke, M. T., Sigholt, T., & Berge, G. M. (2016). *Langtidseffekter av lave omega-3 nivåer i fôr på laksens helse* (8282963941). Hentet fra NOFIMA: <https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/2394844/Rapport%2b26-2016.pdf?sequence=3&isAllowed=y> [Tilgjengelig 02.05.2018]
- Salinas, I., Zhang, Y.-A., & Sunyer, J. O. (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, **35**, 1346-1365.

Referanser

- Salinas, I., & Parra, D. (2015). Fish mucosal immunity: intestine. B. Baeck & E. Peatman (Eds.), *Mucosal health in aquaculture* (s. 135-158).
- Secombes, C. J., & Ellis, A. E. (2012). The Immunology of Teleost. R. Roberts (Ed.), *Fish pathology* (Fourth edition ed., s. 144-166): John Wiley & Sons.
- Seierstad, S. L., Haugland, Ø., Larsen, S., Waagbø, R., & Evensen, Ø. (2009). Pro-inflammatory cytokine expression and respiratory burst activity following replacement of fish oil with rapeseed oil in the feed for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, **289**, 212-218.
- Singh, M. (2005). Essential fatty acids, DHA and human brain. *The Indian Journal of Pediatrics*, **72**, 239-242.
- Sire, M. F., & Vernier, J.-M. (1992). Intestinal absorption of protein in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **103**, 771-781.
- Spaho, E., Papa, L., Sallaku, E., & Gjurgji, F. (2013). The assessment of some performance and welfare indicators in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), reared under two different feeding practices. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*, **12**, 103-109.
- Spoden, K., & Nierenberg, D. (2013). Aquaculture Tries to Fill World's Insatiable Appetite for Seafood. *Vital Signs* (Vol. 20, s. 57-61). Washington, DC: Island Press.
- Storebakken, T. (1985). Binders in fish feeds: I. Effect of alginate and guar gum on growth, digestibility, feed intake and passage through the gastrointestinal tract of rainbow trout. *Aquaculture*, **47**, 11-26.
- Storebakken, T., Refstie, S., & Ruyter, B. (2000a). Soy products as fat and protein sources in fish diets for intensive aquaculture. J. Drackley (Ed.), *Soy in animal nutrition* (s. 127-170). Savoy, IL, USA: Federation of Animal Science Societies.
- Storebakken, T., Shearer, K. D., Baeverfjord, G., Nielsen, B. G., Åsgård, T., Scott, T., & De Laporte, A. (2000b). Digestibility of macronutrients, energy and amino acids, absorption of elements and absence of intestinal enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with wheat gluten. *Aquaculture*, **184**, 115-132.
- Strzalka, W., & Ziemienowicz, A. (2010). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of botany*, **107**, 1127-1140.
- Stubhaug, I., Lie, Ø., & Torstensen, B. E. (2007). Fatty acid productive value and β -oxidation capacity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed on different lipid sources along the whole growth period. *Aquaculture Nutrition*, **13**, 145-155.
- Sundh, H., Olsen, R. E., Fridell, F., Gadan, K., Evensen, Ø., Glette, J., Taranger, G. L., Myklebust, R., & Sundell, K. (2009). The effect of hyperoxygenation and reduced flow in fresh water and subsequent infectious pancreatic necrosis virus challenge in sea water, on the intestinal barrier integrity in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, **32**, 687-698.
- Swanson, D., Block, R., & Mousa, S. A. (2012). Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Advances in nutrition*, **3**, 1-7.
- Thompson, K. D., Tatner, M. F., & Henderson, R. J. (1996). Effects of dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Nutrition*, **2**, 21-31.
- Thu, T. T. N., & Lebailly, P. (2017). On Sustainable Aquaculture. *Juniper Publisher*, **1**, 1-2.
- Tilley, S. L., Coffman, T. M., & Koller, B. H. (2001). Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The Journal of clinical investigation*, **108**, 15-23.
- Tocher, D. R., Bendiksen, E. Å., Campbell, P. J., & Bell, J. G. (2008). The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, **280**, 21-34.

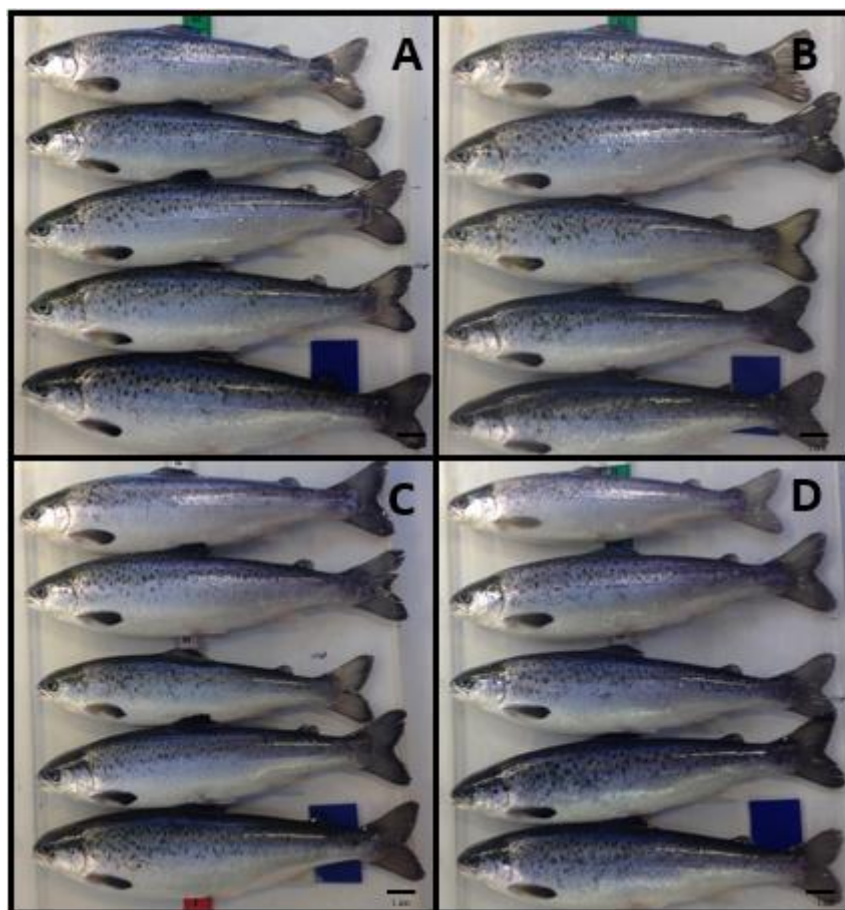
Referanser

- Torstensen, B. E., Bell, J. G., Rosenlund, G., Henderson, R. J., Graff, I. E., Tocher, D. R., Lie, Ø., & Sargent, J. R. (2005). Tailoring of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) flesh lipid composition and sensory quality by replacing fish oil with a vegetable oil blend. *Journal of agricultural and food chemistry*, **53**, 10166-10178.
- Torstensen, B. E., Espe, M., Sanden, M., Stubhaug, I., Waagbø, R., Hemre, G.-I., Fontanillas, R., Nordgarden, U., Hevrøy, E. M., et al. (2008). Novel production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein based on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends. *Aquaculture*, **285**, 193-200.
- Torstensen, B. E., Ruyter, B., Sissener, N. H., Østbye, T. K., Waagbø, R., Jørgensen, S. M., Ytteborg, E., Rud, I., Liland, N., et al. (2013). Utredning av fett for fiskehelse, effekter av endret fettsyresammensetning i fôr til laks relatert til fiskens helse og velferd (robust fisk)(Effects of Changes in Dietary Fat Level and Fatty Acid Composition of Salmon Diets on Fish Health and Welfare (Fish Robustness)). *Bergen: NIFES and Nofima*, 8-63.
- Tran Thi Nang, T., & Lebailly, P. (2017). On Sustainable Aquaculture. *Oceanography & Fisheries*, **1**, 1-2.
- Urán, P. A., Schrama, J. W., Rombout, J. H. W. M., Taverne-Thiele, J. J., Obach, A., Koppe, W., & Verreth, J. A. J. (2009). Time-related changes of the intestinal morphology of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at two different soybean meal inclusion levels. *Journal of Fish Diseases*, **32**, 733-744.
- Van den Ingh, T., Krogdahl, Å., Olli, J., Hendriks, H., & Koninkx, J. (1991a). Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. *Aquaculture*, **94**, 297-305.
- Van den Ingh, T. S. G. A. M., Krogdahl, Å., Olli, J. J., Hendriks, H. G. C. J. M., & Koninkx, J. G. J. F. (1991b). Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. *Aquaculture*, **94**, 297-305.
- Vatnan, K. (2017). Biologiske effekter hos atlantisk laks (*Salmo salar*) i ferskvannsfase ved fôring med EPA/DHA konsentrat eller rapsolje over en periode på 360 dager. (Mastergradsoppgave), Universitetet i Tromsø (UiT), Norges arktiske universitet,
- Waagbø, R., Sandnes, K., Torrissen, O. J., Sandvin, A., & Lie, Ø. (1993). Chemical and sensory evaluation of fillets from Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed three levels of n-3 polyunsaturated fatty acids at two levels of vitamin E. *Food Chemistry*, **46**, 361-366.
- Waagbø, R. (2001). Ernæring og helse. R. Waagbø, M. Espe, K. Hamre, & Ø. Lie (Eds.), *Fiskeernæring* (s. 235-258). Dreggen, Bergen: Kystnæringen Forlag & Bokklubb AS.
- Whelan, J., & McEntee, M. F. (2004). Dietary (n-6) PUFA and intestinal tumorigenesis. *The Journal of nutrition*, **134**, 3421-3426.
- Wolf, H. K., & Dittrich, K. L. (1992). Detection of proliferating cell nuclear antigen in diagnostic histopathology. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **40**, 1269-1273.
- Yousaf, M. N., Koppang, E. O., Skjødt, K., Hordvik, I., Zou, J., Secombes, C., & Powell, M. D. (2013). Comparative cardiac pathological changes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) affected with heart and skeletal muscle inflammation (HSMI), cardiomyopathy syndrome (CMS) and pancreas disease (PD). *Veterinary immunology and immunopathology*, **151**, 49-62.
- Ytrestøyl, T., Aas, T. S., & Åsgård, T. S. (2015). Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture*, **448**, 365-374.
- Zhang, Y.-A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S. E., Bartholomew, J., & Sunyer, J. O. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature immunology*, **11**, 827.
- Zhang, Y.-A., Salinas, I., & Sunyer, J. O. (2011). Recent findings on the structure and function of teleost IgT. *Fish & shellfish immunology*, **31**, 627-634.

Appendiks I

Makroskopiske funn

Figur A36 viser bilder av fem forsøksfisk som ble tatt ut siste forsøksdag, dag 84 (n = 10). Fiskene på bilde A = diett RO, B = AO, C = RO/AO, og D = EPA/DHA konsentrat.



Figur A36. Bildene viser morfologien til fem forsøksfisk som tatt ut på siste uttaksdag, dag 84.

Fiskene på bilde A = diett RO, B = AO, C = RO/AO, og D = EPA/DHA konsentrat. n = 10. Målestokk tilsvarer 1 cm.

Ut i fra observasjonene gjennom bilder av forsøksfisken, fremstår fisken fra alle diettgruppene frisk, lytefri og med god kondisjonsfaktor.

Appendiks II

Tabell A16. Tabell viser scoringer som ble gjort av de histologiske snittene ved uttaksdag 21, 42, 63, og 84.

Det ble gjort scoringer for kategoriene inflammasjon, vakuolisering, og morfologiske forandringer. Tilstedeværelsen av bakterier i snitt er markert med (+). Kommentarer påpeker andre observasjoner gjort i snittene. Total score er en sammenlagt score av gradering gjort ved inflammasjon, vakuolisering og morfologiske forandringer. Ved kommentaren «unormal tarm» menes at ved makroskopiske undersøkelser har baktarmen blitt kategorisert som unormal.

Dag 21, diett RO

Snitt	Inflammasjon	Vakuolisering	Morfologi	Bakterier	Total score	Kommentar
<i>Score</i>						
21-1-1	1	0	0		1	Adipocytter
21-1-2	1	1	0	+	2	
21-1-3	1	0	0		1	
21-1-4	1	0	0		1	
21-1-5	1	0	0		1	
Total	5	1	0		6	

Dag 21, diett AO

Snitt	Inflammasjon	Vakuolisering	Morfologi	Bakterier	Total score	Kommentar
<i>Score</i>						
21-2-1	1	0	1		2	Melanomakrofager
21-2-2	1	0	0		1	
21-2-3	1	0	0		1	Adipocytter
21-2-4	1	1	1		3	
21-2-5	1	0	1		2	
Total	5	1	3		9	

Dag 21, diett RO/AO

Snitt	Inflammasjon	Vakuolisering	Morfologi	Bakterier	Total score	Kommentar
<i>Score</i>						
21-3-1	1	0	0		1	
21-3-2	1	0	0		1	
21-3-3	1	0	1		2	
21-3-4	1	1	1	+	3	
21-3-5	1	0	1		2	
Total	1	1	3		9	

Dag 21, diett EPA/DHA

Snitt	Inflammasjon	Vakuolisering	Morfologi	Bakterier	Total score	Kommentar
<i>Score</i>						
21-4-1	2	0	1	+	3	Unormal tarm
21-4-2	1	0	1		2	
21-4-3	1	0	1		2	
21-4-4	1	0	1		2	
21-4-5	1	0	2		3	
Total	6	0	6		12	

Appendiks

Dag 42, diett RO

Snitt	Inflammasjon	Vakuolisering	Morfologi	Bakterier	Total score	Kommentar
<i>Score</i>						
42-1-1	1	1	0		2	Mange begerceller
42-1-2	1	0	0		1	
42-1-3	1	0	1		2	
42-1-4	2	2	1	+	5	
42-1-5	1	0	0		1	
42-1-6	1	0	0		1	
42-1-7	0	0	1		1	
42-1-8	0	0	0		0	
42-1-9	1	0	1		2	
42-1-10	1	2	1	+	4	Unormal tarm
Total	9	5	5		19	

Dag 42, diett AO

Snitt	Inflammasjon	Vakuolisering	Morfologi	Bakterier	Total score	Kommentar
<i>Score</i>						
42-2-1	1	0	0		1	
42-2-2	1	0	0		1	
42-2-3	1	0	0		1	
42-2-4	0	0	0		0	
42-2-5	1	0	1		2	Adipocytter
42-2-6	1	0	0		1	
42-2-7	1	0	0		1	
42-2-8	1	1	1		3	
42-2-9	1	1	1		3	
42-2-10	0	0	0		0	
Total	8	2	3		13	

Dag 42, diett RO/AO

Snitt	Inflammasjon	Vakuolisering	Morfologi	Bakterier	Total score	Kommentar
<i>Score</i>						
42-3-1	1	0	0		1	
42-3-2	1	0	0		1	
42-3-3	0	0	0		0	
42-3-4	2	2	1		5	
42-3-5	1	0	1		2	
42-3-6	1	0	0		1	
42-3-7	1	0	1		2	
42-3-8	1	1	1	+	3	
42-3-9	1	0	0		1	
42-3-10	1	1	1		3	Adipocytter
Total	10	4	5		19	

Dag 42, diett EPA/DHA

Snitt	Inflammasjon	Vakuolisering	Morfologi	Bakterier	Total score	Kommentar
<i>Score</i>						
42-4-1	1	0	0		1	
42-4-2	1	0	0		1	
42-4-3	1	0	0		1	
42-4-4	1	0	0		1	
42-4-5	1	0	0		1	
42-4-6	1	0	1		2	
42-4-7	1	0	1		2	
42-4-8	1	0	0		1	
42-4-9	1	0	0		1	
42-4-10	1	0	0		1	
Total	10	0	2		12	

Appendiks

Dag 63, diett RO

Snitt	Inflammasjon	Vakuolisering	Morfologi	Bakterier	Total score	Kommentar
<i>Score</i>						
63-1-1	2	1	2	+	5	
63-1-2	1	0	1		2	
63-1-3	1	0	1		2	
63-1-4	1	1	1		3	Mange begerceller
63-1-5	1	0	1		2	
63-1-6	1	0	1		2	Blødning
63-1-7	1	2	0	+	3	Unormal tarm
63-1-8	1	2	1	+	4	Unormal tarm
63-1-9	1	1	0		2	
63-1-10	1	1	0		2	
Total	11	8	8		27	

Dag 63, diett AO

Snitt	Inflammasjon	Vakuolisering	Morfologi	Bakterier	Total score	Kommentar
<i>Score</i>						
63-2-1	1	0	1		2	
63-2-2	1	1	1		3	
63-2-3	0	0	1		1	
63-2-4	1	1	1		3	Unormal tarm
63-2-5	1	0	0		1	
63-2-6	1	1	1		3	
63-2-7	1	0	0		1	
63-2-8	1	0	0		1	
63-2-9	0	0	0		0	
63-2-10	1	0	0		1	
Total	8	3	5		16	

Dag 63, diett RO/AO

Snitt	Inflammasjon	Vakuolisering	Morfologi	Bakterier	Total score	Kommentar
<i>Score</i>						
63-3-1	1	2	0	+	3	
63-3-2	1	0	1		2	Blødninger
63-3-3	2	2	2		6	
63-3-4	1	1	2		4	Unormal tarm
63-3-5	1	2	1	+	4	Unormal tarm
63-3-6	0	0	1		1	Blødninger
63-3-7	2	2	1	+	5	
63-3-8	1	2	2	+	5	Adipocytter
63-3-9	2	2	2	+	6	Unormal tarm
63-3-10	1	2	1	+	4	Unormal tarm
Total	12	15	13		40	

Dag 63, diett EPA/DHA

Snitt	Inflammasjon	Vakuolisering	Morfologi	Bakterier	Total score	Kommentar
<i>Score</i>						
63-4-1	2	2	1	+	5	Unormal tarm
63-4-2	1	0	0		1	
63-4-3	1	2	1	+	4	Unormal tarm
63-4-4	2	2	2	+	6	Unormal tarm
63-4-5	1	1	1	+	3	Adipocytter
63-4-6	2	2	1	+	5	Unormal tarm
63-4-7	1	1	2	+	4	Unormal tarm
63-4-8	1	1	1	+	3	Unormal tarm
63-4-9	2	1	2	+	5	Unormal tarm
63-4-10	2	1	1	+	4	Unormal tarm
Total	15	13	12		40	

Appendiks

Dag 84, diett RO

Snitt	Inflammasjon	Vakuolisering	Morfologi	Bakterier	Total score	Kommentar
<i>Score</i>						
84-1-1	1	1	1	+	3	Unormal tarm
84-1-2	2	2	1	+	5	Unormal tarm
84-1-3	1	1	1	+	3	
84-1-4	2	2	2	+	6	Unormal tarm
84-1-5	2	2	2	+	6	Unormal tarm
84-1-6	1	2	1	+	4	Unormal tarm
84-1-7	2	2	2	+	6	Unormal tarm
84-1-8	1	0	1		2	
84-1-9	2	2	2	+	6	Unormal tarm
84-1-10	1	2	2	+	5	Unormal tarm
Total	15	16	15		46	

Dag 84, diett AO

Snitt	Inflammasjon	Vakuolisering	Morfologi	Bakterier	Total score	Kommentar
<i>Score</i>						
84-2-1	1	1	1	+	3	Unormal tarm
84-2-2	1	1	0		2	
84-2-3	0	0	0		0	
84-2-4	2	2	1	+	5	
84-2-5	2	2	2	+	6	Unormal tarm
84-2-6	2	2	1	+	5	Unormal tarm
84-2-7	2	2	1	+	5	Unormal tarm
84-2-8	2	3	1	+	6	Unormal tarm
84-2-9	1	0	0		1	
84-2-10	2	2	1	+	5	Unormal tarm
Total	15	15	8		38	

Dag 84, diett RO/AO

Snitt	Inflammasjon	Vakuolisering	Morfologi	Bakterier	Total score	Kommentar
<i>Score</i>						
84-3-1	2	2	2	+	6	Unormal tarm
84-3-2	2	2	1	+	5	Unormal tarm
84-3-3	2	2	1	+	5	Unormal tarm
84-3-4	2	2	1	+	5	Unormal tarm
84-3-5	2	2	1	+	5	Unormal tarm
84-3-6	1	2	1	+	4	Unormal tarm
84-3-7	1	2	1	+	4	Unormal tarm
84-3-8	1	2	1	+	4	Unormal tarm
84-3-9	1	2	2	+	5	Unormal tarm
84-3-10	2	3	2	+	7	Unormal tarm
Total	16	21	13		50	

Dag 84, diett EPA/DHA

Snitt	Inflammasjon	Vakuolisering	Morfologi	Bakterier	Total score	Kommentar
<i>Score</i>						
84-4-1	2	2	2	+	6	Unormal tarm
84-4-2	1	2	1	+	4	Unormal tarm
84-4-3	2	2	1	+	5	Unormal tarm
84-4-4	1	2	1	+	4	Unormal tarm
84-4-5	1	2	1	+	4	Unormal tarm
84-4-6	1	2	1	+	4	Unormal tarm
84-4-7	1	2	1	+	4	Unormal tarm
84-4-8	1	2	1	+	4	Unormal tarm
84-4-9	2	2	1	+	5	Unormal tarm
84-4-10	1	2	1	+	4	Unormal tarm
Total	13	20	11		44	

Appendiks III

Mann-Whitney test

Tabell A17. Resultater av statistiske analyser (Mann-Whitney test).

De forskjellige diettgruppene og uttakstidspunktene ble testet for signifikante forskjeller ($p < 0,05$). ns = ingen signifikant forskjell.

Inflammasjon	Signifikans
RO - Dag 21 mot dag 84	ns
AO - Dag 21 mot dag 84	ns
RO/AO - Dag 21 mot dag 84	ns
EPA/DHA - Dag 21 mot dag 84	ns
RO mot AO	ns
RO mot RO/AO	ns
RO mot EPA/DHA	ns
AO mot RO/AO	ns
AO mot EPA/DHA	ns
RO/AO mot EPA/DHA	ns

Vakuolisering	Signifikans
RO - Dag 21 mot dag 84	$p = 0.0053$ **
AO - Dag 21 mot dag 84	$p = 0.029$ *
RO/AO - Dag 21 mot dag 84	$p = 0.0003$ ***
EPA/DHA - Dag 21 mot dag 84	$p = 0.0003$ ***
RO mot AO	ns
RO mot RO/AO	ns
RO mot EPA/DHA	ns
AO mot RO/AO	ns
AO mot EPA/DHA	ns
RO/AO mot EPA/DHA	ns

Appendiks

Morfologiske forskjeller	Signifikans
RO - Dag 21 mot dag 84	p = 0.0007 ***
AO - Dag 21 mot dag 84	ns
RO/AO - Dag 21 mot dag 84	ns
EPA/DHA - Dag 21 mot dag 84	ns
RO mot AO	p = 0.0389 *
RO mot RO/AO	ns
RO mot EPA/DHA	ns
AO mot RO/AO	ns
AO mot EPA/DHA	ns
RO/AO mot EPA/DHA	ns

