



UiT Norges arktiske universitet

Fakultet for biologi, fiskeri og økonomi

Effekter av immunstimulanter på transkripsjon av metabolismegener i plommeseikkeler av laks.

60 stp.

Harald Kristoffersen

Masteroppgave i Akvamedisin mai 2020



Foto forside: Roy A. Dalmo

Forord

Denne oppgaven ble skrevet ved Norges Fiskerihøgskole, Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi ved Universitetet i Tromsø. Prøveuttak ble utført ved HiT-Havbruksstasjonen i Tromsø og laboratoriearbeidet ble utført ved Norges Fiskerihøgskole.

Til å begynne med vil jeg takke mine fantastiske veiledere Roy A. Dalmo og Tore Seternes for super veiledning. Jeg tror ikke jeg kunne fått bedre veiledning! Jeg vil også takke Xiaoli Xu for all hjelp med prøveuttak, labarbeid og resultatanalyse. Det har vært veldig gøy og lærerikt å arbeide med deg!

Videre vil jeg takke Jaya K. Swain og Dhivya B. Thiyagarajan for hjelp på qPCR-laben, både med opplæring på hvordan å bruke qPCR-maskinen og hvordan å analysere resultatene.

Jeg må også takke Genetikkgruppa på Norges Fiskerihøgskole for lån og opplæring av PCR-maskinen deres.

Skriveperioden har vært preget av en spesiell tid. Som følge av dette har det ikke vært mulig å være på universitetet og da har det vært fantastisk å være i de tryggeste omgivelser hjemme hos mamma og pappa. Jeg har virkelig satt pris på alle oppmuntrende og hjelpende ord fra dere -ikke bare i masterperioden, men gjennom hele akvamedisinstudiet.

Til slutt vil jeg takke gjengen på kontoret for en fantastisk tid sammen. Jeg tror ikke jeg kunne hatt en bedre studietid uten dere og resten av gjengen i Fokale Nekroser.

Harald Kristoffersen

Sammendrag

I dette prosjektet har vi undersøkt om immunstimulantene kitosan, poly I:C, astragalus rotekstrakt, hyaluronsyre og imiquimod kunne ha effekt på transkripsjonen av en ni gener involvert i metabolisme. Nyklekkede plommesekkklarver fra atlantisk laks (*Salmo salar*) ble delt inn i 6 grupper og badbehandlet en gang i 60 minutter i immunstimulantene. Seks plommesekkklarver fra hver gruppe ble samlet for qPCR-analyse på dag 1, 2, 4, 9, 16, 32 og 45 etter badbehandling. Plommesekk og haleparti ble kuttet bort før mRNA-ekstraksjon. Fra RNAet ble det lagd cDNA som ble brukt i qPCR-analysene. Plommesekkklarver badbehandlet med kitosan døde innen en time etter badbehandling. Badbehandling med poly I:C, astragalus og imiquimod induserte genreguleringer på samtlige av de undersøkte metabolismegenene, noe som indikerte at disse hadde effekt på metabolismen til plommesekkklarver. Badbehandling med hyaluronsyre gav for usikre resultater til å trekke konklusjon om effekt på metabolismen til plommesekkklarver.

Forkortelser

cDNA- Komplementært DNA

DNA- Deoksyribinukleinsyre

IL- Interleukin

RNA- ribonykleinsyre

mRNA- messenger RNA

poly I:C- Polyinosinic-polycytidylic

LPS- Liposakkarid

CpG- 5'—C—*phosphate*—G—3'

TLR- Toll-lignende-reseptor

TNF- Tumor nekrose faktor

NF-KB- Nukleær faktor kappa-light-chain, enhancer

IFN- Interferon

ATP- Adenosintrifosfat

PCR- polymerase kjedereaksjon

RTPCR/ qPCR- Revers transkripsjon polymerase kjedereaksjon

Ct- cycle threshold

H₂O₂- Hydrogenperoksid

PAMP- Patogen associated molecular pattern

DAMP- Damage associated molecular pattern

Innholdsfortegnelse

Forord	II
Sammendrag.....	IV
Forkortelser	V
1 Innledning	1
1.1 Immunstimulering og immunstimulanter	1
1.1.1 Immunstimulering	1
1.1.2 Deacetykert kitin- kitosan.....	1
1.1.3 Polyinosinic-polycytidylic (Poly I:C)	1
1.1.4 Astragalus rotekstrakt.....	2
1.1.5 Hyaluronsyre.....	2
1.1.6 Imiquimod.....	2
1.2 Plommesekkclarver av Atlantisk laks (<i>Salmo salar</i> L.).....	3
1.3 Gener	4
1.4 Bakgrunn og problemstilling	6
2 Materialer og metoder.....	7
2.1 Materialer.....	7
2.2 Fisk.....	8
2.3 RNA-ekstrahering	10
2.4 Kvalitetssikring av RNA.....	11
2.5 cDNA-syntese	11
2.6 Primere.....	12
2.7 Kvantitativ RT-PCR (qPCR)	13
3 Resultater.....	14
3.1 Deacetykert kitin.....	14
3.2 <i>ATG1/ULK1</i>	15

3.3	<i>mTOR</i>	17
3.4	<i>HIF1-α</i>	18
3.5	<i>c-Myc</i>	20
3.6	<i>GLUT1</i>	21
3.7	<i>IL-1β</i>	23
3.8	<i>SIX1</i>	24
3.9	<i>iNOS</i>	26
3.10	<i>Cathepsin B</i>	27
4	Diskusjon.....	29
4.1	Effekt av deacetykert kitin- kitosan.....	29
4.2	Effekt av poly I:C.....	29
4.3	Effekt av Astragalus rotekstrakt.....	32
4.4	Effekt av hyaluronsyre.....	35
4.5	Effekt av imiquimod.....	38
4.6	Feilkilder.....	41
5	Konklusjon.....	42
6	Tanker til videre arbeid.....	43
7	Referanser.....	44
8	Appendiks.....	51

1 Innledning

1.1 Immunstimulering og immunstimulanter

1.1.1 Immunstimulering

Immunstimulanter er stoffer som aktiverer immunforsvaret. Slike stoffer kan være glukose, kitin og syntetisk DNA, for å nevne noen (Sakai, 1999, Bricknell and Dalmo, 2005).

Immunstimulering av fisk går ut på å aktivere fiskens immunforsvar før et eventuelt patogenangrep. Den mest utbredte administreringsruten for immunstimulering er injisering. Da injiseres det immunstimulanter, som f.eks. inaktive patogener (som innehar f. eks. LPS eller CpG-inneholdende DNA) inn i fiskens ryggmuskulatur (Chang et al., 2017) eller bukhole (Midtlyng et al., 1996). En annen administrasjonsvei for immunstimulering er å bade fisken i immunstimulanter. Da tas immunstimulantene opp gjennom gjellene, huden og i tarmepitelet (Raida and Buchmann, 2007).

1.1.2 Deacetyleret kitin- kitosan

Kitosan er et derivat av deacetyleret kitin, som har vist å gi økt vekst, antioksidantstatus og immunologiske responser i karpefisk ved oral administrering (Yan et al., 2017). I en studie på olivenflyndre (*Paralichthys olivaceus*) ble det funnet økt lysozym-aktivitet i mukos hos olivenflyndre gitt kitosanbelagt fôr (Seon et al., 2008). Også et studie på hvitreker (*Litopenaeus vannamei*) har vist at det å føre rekene med kitosan, aktiverte immunforsvaret og gav økt resistans mot bakterien *Vibrio alginolyticus* (Wang and Chen, 2005).

1.1.3 Polyinosinic-polycytidylic (Poly I:C)

Poly I:C er syntetisk dobbelttrådet RNA. Poly I:C fungerer som en "Pathogen Associated Molekylar Pattern" (PAMP), som assosieres med virale infeksjoner og gjenkjennes av toll-lignende reseptor 3 (TLR3) (Kumar et al., 2006). I en studie hvor salmonider ble injisert intraperitonalt med poly I:C viste fisken økt respons målt via økt uttrykk av Mx-protein (Lockhart et al., 2004). Også Jensen *et al.*, 2002 har studert antiviral virkning av poly I:C injisert intraperitonalt, og konkluderte med at poly I:C gir noen, ikke full, beskyttende effekter mot infeksjons lakseanemi virus (Jensen et al., 2002).

1.1.4 Astragalus rotekstrakt

Astragalus er en slekt i erteblomstfamilien. Ekstrakt fra røttene til planter i Astragalus-slekten er mye brukt innen kinesisk humanmedisin, men også som immunstimulant for fisk i akvakultur (Yin et al., 2009). Furunkulose-vaksinerte karper stimulert oralt med en blanding av *Astragalus radix* og *Ganoderma lucidum* viste økt respirasjonsaktivitet, høyere fagocytoseaktivitet hos leukocytter fra blod-, økt lysosymaktivitet, samt økt sirkulatorisk antistoff (Yin et al., 2009). Kylling som ble gitt astragalus viste ingen antibakteriell aktivitet, men det ble funnet signifikant økning i kroppsvekt, noe som indikerte at astragalus påvirket metabolismen (Zhang et al., 2009a). Et annet studie viste at polysakkarider fra astragalus induerte cytokinproduksjon fra makrofager (Wei et al., 2016). Resultatene fra alle disse studiene viser at astragalus har potensiale til å øke aktiviteten til immunforsvaret og dermed også metabolismen.

1.1.5 Hyaluronsyre

Hyaluronsyre, også kalt ("hyaluronan; ioneproduktet") er en bestanddel av et proteoglycan syntetisert av fibroblaster og andre celler (Laurent and Fraser, 1992). Det er en viktig bestanddel i ekstracellulær væske. Hyaluronsyre kan, ved økt cellulær infiltrasjon og produksjon av proinflammatoriske cytokiner (eks. *TNF- α* og *IL-1 β*), oppføre seg som en initiator for immunrespons (Raoudi et al., 2008). Shin *et al.* har funnet at å bruke hyaluronsyre i adjuvansen til kombinasjonsvaksiner kan gi økt immunrespons (Shin et al., 2017). Effekten av hyaluronsyre ser ut til å være avhengig av størrelsen på molekylet. Dette ble funnet ved en studie på *NF-KB* (nukleær faktor kappa- light-chain-enhancer of activated B cells) -aktivering i makrofager hos mus, stimulert med hyaluronsyre med høy og lav molekylvekt, -det var kun hyaluronsyre med lav molekylvekt som aktiverte DNA-bindingsaktiviteten til *NF-KB* som resulterte i økt genuttrykk (Noble et al., 1996).

1.1.6 Imiquimod

Imiquimod er en syntetisk etterligning av enkeltrådet RNA som fungerer som en agonist for TLR7. Ved binding til TLR7 vil det bli produsert og sekretert pro-inflammatoriske cytokiner, som f.eks. *IFN- α* , *TNF- α* og *IL-12* (Stanley, 2002), (Wang et al., 2005). Normalt blir imiquimod ofte brukt i humanmedisin som en immunmodulator i krem mot kjønnsvorter (Perry and Lamb, 1999), men har også blitt testet som immunstimulant i både krepsdyr og fisk. Reker har vist økt immunrespons etter å ha blitt injisert med imiquimod (Kono et al., 2015). Også i

imiquimod-stimulerte olivenflyndrer er det funnet økt uttrykk av cytokiner og *IFN*-stimulerte gener (Avunje and Jung, 2017).

1.2 Plommesecklarver av Atlantisk laks (*Salmo salar* L.)

Eggene til Atlantisk laks klekkes normalt ved ca. 500 døgngrader (Solberg et al., 2014). Ut fra eggene klekkes plommesecklarver. Plommesecklarvene har ikke ferdigutviklet mage-tarmkanal. Siden mage-tarmkanalen ikke er ferdigutviklet, er de utstyrt med plommesekk som skal gi næring til larven under utvikling (Bone and Moore, 2008). Plommesekken til plommesecklarver av laks kommer klart frem i Figur 1.



Figur 1: To dager gammel plommeseckkyngel fra atlantisk laks avlivet i Benzoak vet.. Plommesekken vises som en gul-oransje sekk med en mørk oransje ball (fett) inni. Foto: privat

I en studie av eggeplomme-nedbrytning hos killifisk, ble det funnet at flere forskjellige enzymer, blant annet *cathepsin B*. Enzymet ble vist å være med på proteinnedbrytning av plommesekken, slik at fiskelarven ble forsynt med næring (Raldua et al., 2006). På denne måten blir plommesekken fortært, til larvens fordøyelsessystem er ferdig utviklet og den kan begynne å innta eksogen næring (Bone and Moore, 2008).

1.3 Gener

Immunforsvaret hos laks er historisk blitt delt i to deler, det medfødte immunforsvaret og det adaptive immunforsvaret. Det er nå klart at det medfødte og det adaptive samspiller. Uansett hvilken del av immunforsvaret som aktiveres, vil aktivering av immunceller forårsake endret metabolsk aktivitet (Zhu et al., 2013). Når immunceller aktiveres vil glykolytisk aktivitet gi større produksjon av laktat enn ved normal glykolytisk aktivitet (oksidativ fosforylering), som gir ATP og karbondioksid. En slik metabolsk dreining kalles "Warburg effekten" (Li et al., 2018).

Det er mange gener som regulerer dette og på forskjellige måter. Endret uttrykk av et gen kan igjen føre til endringer i uttrykk av mange andre gener. Som nevnt tidligere får plommesekkklarvene næringen den trenger fra plommesekken. Da må fett og proteiner i plommesekken brytes ned slik at plommesekkklarvene kan ta i bruk disse næringsstoffene. Et gen som styrer nedbrytingen er *ATG1* (homolog av *ULK1*), som først ble karakterisert i gjær (Chan and Tooze, 2009). *ATG1* er et autofagi (intracellulær) relatert gen som er med på å regulere proteolyse av plommesekkprotein (Mizushima, 2010). Genet har blitt identifisert som sentralt i lysosomal degradering av plommesekkmasse i utviklingen av sebrafisklarver (Mathai et al., 2017).

I likhet med *ATG1/ULK1* regulerer *mTOR* ("mammalian target of rapamycin") autofagi som en respons til blant annet næringsstatus. *mTOR* er en protein kinase, som direkte regulerer *ATG1/ULK1*, hvor *mTOR* normalt blir inhibert ved sult (Jung et al., 2010). *mTOR* regulerer også transkripsjonsfaktoren *HIF1- α* , hvor høyere *mTOR*-aktivitet inducerer høyere ekspresjon av *HIF1- α* . *HIF1- α* regulerer glukoseopptak, metabolisme (Land and Tee, 2007), og genene *iNOS* og *cathepsin B* (se senere).

Videre er det flere gener som er med å regulere metabolismen, slik som *c-Myc*-proteinet. *c-Myc* er en transkripsjonsfaktor som kontrollerer flere ulike metabolismeveier, deriblant glykolysen, hvor økt *c-Myc*-aktivitet øker glykolysen, slik også *HIF1- α* gjør (Rodriguez-Enriquez et al., 2019). *c-Myc* regulerer direkte ekspresjon av transportproteinet *GLUT1*. *GLUT1* er et gen som koder for glukose transporter protein 1, som finnes på cellemembranen hos de fleste celler. *GLUT1* er essensielt for cellens opptak av glukose, og dermed også metabolisme (Robey et al., 2008).

IL-1 β er et proinflammatorisk cytokin med mange funksjoner, deriblant induksjon av glykolyse. Når en "PAMP" bindes til TLR3 vil det føre til en rekke prosesser som fører til økt uttrykk av *IL-1 β* (Yang et al., 2019). *IL-1 β* kan aktivere *c-Myc*, som igjen øker uttrykket av de fleste metabolske gener nevnt ovenfor (Zhang et al., 2014), (Lemos et al., 2018).

SIX1 er en transkripsjonsfaktor som hos sebrafisk har vært assosiert til utvikling og differensiering av muskel (Bessarab et al., 2008). *SIX1* har også blitt oppdaget til å aktivere *GLUT1* og *mTOR*- dermed er *SIX1* involvert i metabolisme-dreiningen kalt "Warburg effekten". Aktivering av *SIX1* vil derfor øke metabolismen (Li et al., 2018).

Ved stresspåvirkning genererer induserbar nitrogen oksid syntetase (*iNOS*) nitrogenoksid (NO). NO påvirker metabolismen ved å dreie den fra glykolyse til fettmetabolisme. Transkripsjonsfaktoren *HIF1- α* binder promoteren til *iNOS*, dermed øker transkripsjonen av *iNOS* (Matrone et al., 2004).

Cathepsin B er et lysosomalt proteolytisk enzym som i likhet med *ATG1/ULK1* også bidrar til metabolisme av plommesekkproteiner hos fisk. *HIF1- α* kan binde promoteren til *cathepsin B* og øke translasjonen av dette genet til å lage enzymet. På den måten er *cathepsin B* direkte regulert av *HIF1- α* , noe som gir økt metabolsk aktivitet (Xiaofei et al., 2018).

1.4 Bakgrunn og problemstilling

Det har vist seg at nyklekkede fiskelarver har medfødte forsvarsmekanismer mot patogener. Etter hvert kommer også det adaptive immunforsvaret på banen rundt startfóring, med produksjon av antistoff. Immunologisk preging av nyklekkede fiskelarver kan være en metode for å øke sykdomsbekyttelsen mot bakterier og virus. I tidligere studier var det vist at ved å immunstimulere nyklekkede fiskelarver med forskjellige immunstimulanter via bad ble pro-inflammatoriske responser indusert (Zhang et al., 2009b). Når immuncellene aktiveres, vil det bli behov for mer energi og dermed vil metabolismeaktiviteten økes.

Hovedmål

- Finne ut om immunstimulantene deacetylerert kitosan, polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C), astragalus rotekstrakt, hyaluronsyre og imiquimod, har effekter på transkripsjonen av metabolismegener hos plommesekkklarver.

2 Materialer og metoder

2.1 Materialer

Materialene som er brukt i dette forsøket kommer fram i Tabell 1.

Tabell 1: Utstyr brukt i forsøket.

Atlantisk laks (Salmobreed Salten AS)	RNase away (Thermo Scientific)
Nitrilhansker (Abena)	Eppendorfrør (2 ml) (Thermo Scientific)
Målesylinder	NanoDrop (Thermo Scientific)
Plastbøtter (10 L)	Ultrapure™ Agarose (Ultrapure™ Agarose)
Deacetyleret kitin (Kina)	Elektroforeseutstyr (Millipore)
Poly I:C (Kina)	Quantitect® Revers Transcription kit (Qiagen)
Astragalus rotekstrakt (Kina)	PCR-maskin (Thermo Scientific)
Hyaluronsyre (Kina)	qPCR-maskin (Applied Biosystems)
Imiquimod (Kina)	Fast SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)
Engangspipetter (3 ml)	Primere (Sigma-Aldrich®)
Cryorør (2 ml) (Thermo Scientific)	96-brønners cDNA-plate (Applied Biosystems)
Benzoak vet. (ACD Pharmaceuticals)	96-brønners qPCR-plate (Applied Biosystems)
Begerglass	Pipetter
Pinsett	Pipette filterspisser (VWR)

Skalpellblad	96 % etanol (VWR)
vekt	Allprep RNA/DNA extraction kit (Qiagen)
Sentrifuge (Thermo Scientific)	TissueLyser II (Qiagen)
Dithiothreitol (Sigma-Aldrich®)	

2.2 Fisk

19. september 2019 ble øyerogn, på 402 døgngader fra atlantisk laks (Salmobreed Salten AS), fraktet til Havbruksstasjonen i Tromsø, hvor de ble fordelt i 18 inkubatorer med rennende vann som holdt 6-8 °C, i påvente av klekking. Kvaliteten på rognbatchen var god, siden vi fjernet kun 10 egg (døde egg) før fordeling skjedde. Døde egg ble fjernet daglig av oss. Temperatur ble målt daglig. Rett etter klekking (ca. 530 døgngader) ble plommeseckkyngelen delt i 6 grupper (3 inkubatorer i hver gruppe), hvor hver gruppe fikk navn etter hvilken stimulus de skulle utsettes for. Immunstimulantene var deacetyleret kitin, poly I:C, astragalus rot-ekstrakt, hyaluronsyre og imiquimod. Tabell 2 viser hvilken gruppe som ble stimulert med hvilken immunstimulant og konsentrasjonen av immunstimulantene under badbehandlingen. Plommeseckklarvene ble badet i små plastbøtter (10 l) i løsninger inneholdende immunstimulantene i en time ved 8 °C. Totalt badevolum var 3 liter.

Tabell 2: Tabellen viser hvilken gruppe som ble badet i hvilken immunstimulant konsentrasjon til de ulike immunstimulantene.

Gruppenavn	Immunstimulant	Konsentrasjon under badbehandling
Kontroll	Vann (H ₂ O)	Ble ikke badet
Deacetykert kitin (kitosan)	Deacetykert kitin (10 mg/ml)	10 mg/l
Poly I:C (Kina)	Poly I:C (10 mg/ml)	10 mg/l
Astragalus rot-ekstrakt (Kina)	Astragalus rot-ekstrakt (10 mg/ml)	10 mg/l
Hyaluronsyre (Kina)	Hyaluronsyre (10 mg/ml)	10 mg/l
Imiquimod (Kina)	Imiquimod 1 mg/ml	1 mg/l

Som vist i Tabell 3, ble 10 plommeseckklarver fra kontrollgruppen samlet samme dag som badbehandling fant sted, og ellers ble det samlet 30 plommeseckklarver fra hver gruppe på dagene 1, 2, 4, 9, 16, 32, og 45, etter badbehandling. Ved sampling ble 30 plommeseckklarver fra hver gruppe pipettert over i et begerglass og avlivet med overdose av Benzoak vet.. Når plommeseckklarvene var avlivet, ble de lagret i merkede cryorør fylt med RNA-later og oppbevart ved -20°C. Etter endt sampling 45 dager etter stimulering, ble resterende plommeseckklarver avlivet med overdose av Benzoak vet. og deretter destruert.

Tabell 3: Tabellen viser hvor mange fisk fra hver gruppe, som ble preservert på RNA-later, hver prøvedag etter stimulering.

Antall dager etter badbehandling	Kontroll	Poly I:C	Astragalus rotekstrakt	Hyaluronsyre	Imiquimod
0	10 fisk				
1	30 fisk	30 fisk	30 fisk	30 fisk	30 fisk
2	30 fisk	30 fisk	30 fisk	30 fisk	30 fisk
4	30 fisk	30 fisk	30 fisk	30 fisk	30 fisk
9	30 fisk	30 fisk	30 fisk	30 fisk	30 fisk
16	30 fisk	30 fisk	30 fisk	30 fisk	30 fisk
32	30 fisk	30 fisk	30 fisk	30 fisk	30 fisk
45	30 fisk	30 fisk	30 fisk	30 fisk	30 fisk

2.3 RNA-ekstrahering

Totalt RNA ble ekstrahert fra homogenat av 6 plommeseckklarver fra hver gruppe (ikke slått sammen), fra hver samplingdag ved bruk av "Quiagen AllPrep RNA/DNA extraction mini kit". Protokollen til ekstraherings-kitet ble fulgt, med noen unntak*. Siden plommeseckklarvene hadde varierende størrelse (etttersom hvor gamle de var), ble halen kuttet bort med et snitt fra gatt til ryggfinne, og plommesekken ble kuttet bort hos samtlige plommeseckklarver for å fjerne unødvendig fett. Fett, ved bruk av kitet, kan gi lavt utbytte av RNA/DNA. For å få bedre kontroll på hvilke prøver som ble ekstrahert, ble det brukt løpenummer på prøvene etter hvert som de ble ekstrahert.

Når protokollen følges, ender en opp med 30-50 µl totalt RNA fra hver prøve. Siden det ble svært høy RNA-konsentrasjon (over 2000 ng/µl i 30 µl RNase-fritt vann), ble det fra og med løpenummer 119 til og med løpenummer 226 tilsatt 50 µl RNase-fritt vann.

* I kitets protokoll var det beskrevet at en kunne bruke opptil 20 mg vev i 600 µl ferdigblandet "RLT-plus" for homogenisering. Plommesekkclarver fra dag 32 og 45 veide rundt 100 mg etter at hale og plommesekk var kuttet bort. Derfor ble mye av ryggmusklene også kuttet bort. Plommesekkclarvene ble da veid til mellom 25 og 45 mg. Det ble derfor tilsatt 300-600 µl ekstra "RLT-plus" og fra dette homogenatet ble det brukt ca. 600 µl.

2.4 Kvalitetssikring av RNA

RNA mengde og kvalitet ble testet i NanoDrop (Thermo Scientific) ved at 1 µl RNA ble pipettert over på instrumentet. Maskinen analyserte RNAet, og oppga konsentrasjonen og renheten. Prøvene ble ansett som ren hvis A260/A280 lå mellom 1,8 og 2,1. Det ble i tillegg kjørt gel elektroforese på ca. halvparten av prøvene. Dette var for å kontrollsjekke om det var RNA i prøvene og om det eventuelt var mikro-RNA eller protein-kontaminering i prøvene.

2.5 cDNA-syntese

Det ble lagd cDNA fra hver prøve totalt RNA ved bruk av "Quantitect® Revers Transcription kit" (Qiagen). Det ble lagd 20 µl cDNA, fra 2000 ng RNA fra hver prøve. Som vist i Tabell 4, ble det for 1 reaksjon blandet 10 µl 2x RT mix, 1 µl 20x RT enzyme mix, 2000 ng RNA og resten RNase-fritt vann. RNA-volum ble regnet fra RNA-konsentrasjonen til hver enkelt prøve, som ble bestemt ved bruk av NanoDrop. Prøvene ble så inkuberte ved 37 °C (60 min), 95 °C (5 min) og 4 °C (∞) i en PCR-maskin. cDNAet ble så fryst ned ved -20 °C i vente på qPCR.

Tabell 4: Innhold i én PCR-reaksjonen

Reaktanter	Volum
2x RT mix	10 µl
20x RT enzyme mix	1 µl
Totalt RNA	Volum tilsvarende 2000 ng RNA
RNase fritt vann	Resten H ₂ O
Totalt volum i en reaksjon	20 µl

2.6 Primere

Primerene ble bestilt av oss og lagd av Sigma-Aldrich® og ble levert ferdig frysetørket. Primerene ble fortynnet til 100 µM med RNase-fritt vann etter anvisning i bruksanvisningen til primerene. De ble så fortynnet til 10 µM, for å kunne brukes i qPCR-reaksjonene. Det ble testet 3 referansegener ("housekeeping genes"): *18s*, *β-actin*, og *EF1α*, hvor *18S* var mest stabil og ble brukt som referansegen i utregningene. Hvilke primere som er brukt, samt referanser til gensekvenser (Genbank) og eventuelle referanser hvor de før er brukt kommer frem i Tabell 5.

Tabell 5: Tabellen viser de ulike sekvensene til primerene som er blitt brukt. * Primere som ikke har blitt publisert i andre rapporter.

Primer	Sekvens	Ref.	Acc. no
<i>18S</i> F	TGTGCCGCTAGAGGTGAAATT	(Soleng et al., 2019)	AJ427629.1
<i>18S</i> R	GCAAATGCTTTTCGCTTTTCG		
<i>β-actin</i> F	CAGCCCTCCTTCCTCGGTAT	(Jensen et al., 2019)	BT059604
<i>β-actin</i> R	CGTCACACTTCATGATGGAGTTG		
<i>Elongation factor 1 alpha</i> F	CGCCAACATGGGCTGG	(Johansen et al., 2016)	AN321836
<i>Elongation factor 1 alpha</i> R	TCACACCATTGGCGTTACCA		
<i>iNOS</i> F	AACGAGAGCCAACAGGTGTC	(Braden et al., 2012)	AJ300555.1
<i>iNOS</i> R	GGTGCAGCATGTCTTTGAGA		
<i>Glut1</i> F	CGCCAGCCCATCTTCATC	(Ulvestad et al., 2018a)	AF247728
<i>Glut1</i> R	GAAAACAGCGTTGATGCCAGA		
<i>C-Myc</i> F	TCTCCACCCACCAGCACAAC	*	DQ834862.1
<i>C-Myc</i> R	CTCCAGCCTCAGCCTTTTGAC		
<i>mTOR</i> F	CAGCCTGAGGCCCTGAATAA	(Olsvik et al., 2013)	BT072258
<i>mTOR</i> R	CTCCACTTGGGTTGGCACAT		
<i>ATG1/ULK1</i> F	CTAGCGTACATTGGGGCATT	*	XM_014128422.1
<i>ATG1/ULK1</i> R	CTTTCTCCTCCGTGAAGTCG		
<i>HIF1α</i> F	CCACCTCATGAAGACCCATCA	(Olsvik et al., 2013)	DY708816
<i>HIF1α</i> R	TCTCCACCCACACAAAGCCT		
<i>CathB</i> F	AGGGGGGAACCTCCTTACTGGCT	(Bahuaud et al., 2008)	DR696159
<i>CathB</i> R	CGATGCCACAGTGGTCCTTACCT		

<i>SIX1</i> F	CCAGCTCGGAAGATGAGTTC	(Ulvestad et al., 2018a)	XM_029676167.1
<i>SIX1</i> R	TAGAGGTCCCAGCAACGAGT		
<i>IL-1β</i> F	GCTGGAGAGTGCTGTGGAAGA	(Ulvestad et al., 2018a)	AY617117
<i>IL-1β</i> R	TGCTTCCCTCCTGCTCGTAG		

2.7 Kvantitativ RT-PCR (qPCR)

I qPCR-reaksjonen ble det brukt cDNA fortynt til forholdet 1:100. For hver qPCR-reaksjon ble det brukt 3 μ l cDNA med forhold 1:100, 2,5 μ l RNase fritt vann, 1 μ l 10 μ M primer F, 1 μ l 10 μ M primer R, og 7,5 μ l Fast SyBr Green mastermix. Reaksjonsblandningene ble pipettert i duplikater på en 96-brønners plate. Det ble også lagd negativ kontroll som inneholdt RNasefritt vann istedenfor cDNA, og ble kjørt i duplikater på samme plate som resten av prøvene.

Prøvene ble kjørt i qPCR-maskinen etter oppskriften vist i Tabell 6. For å få frem smeltekurven ble prøvene kjørt videre i 95 °C 15 sek., 60 °C i 60 sek., 95 °C i 15 sek., og 60 °C i 15 sek..

Tabell 6: Tabellen viser hvor lang tid og hvilken temperatur hver syklus i qPCR-maskinen hadde..

		40 sykluser					
Temperatur	95 °C	95 °C	60 °C	95 °C	60 °C	95 °C	60 °C
Tid	20 sek	3 sek	60 sek	15 sek	60 sek	15 sek	15 sek

Resultatene fra qPCR-maskinen ble oppgitt som Ct-verdier, og Pfaffl-metoden ble brukt for å finne primereffektiviteten med ligningen:

$$\text{Converted primer efficiency (E)} = \left(\frac{\text{Primer efficiency } 100\%}{100} \right) + 1$$

Og for å finne foldendring relativ til kontrollgruppa med ligningen:

$$\text{Fold change relativ to control} = \frac{(\text{E Gene of interest})^{\Delta\text{CT}(\text{Gene of interest})}}{(\text{E Housekeeping gene})^{\Delta(\text{Housekeeping gene})}}$$

Signifikans var utregnet med bruk av "Mann-Whitney-test" og "Welch t-test" med "Spearman correlation" i Graphpad. Disse beregningene var benyttet av Ulvestad et al., 2018.

3 Resultater

I dette prosjektet har vi stimulert nyklekkede plommesekkclarver med immunstimulantene poly I:C (Polyinosinic-polycytidylic acid) (100mg/L), astragalus rotekstrakt (100mg/L), hyaluronsyre (100mg/L), imiquimod (1mg/L), via badbehandling i 60 minutter og tatt prøver fra plommesekkclarvene over en periode på 45 dager etter immunstimulering. Bakgrunnen var at vi ønsket å se på metabolske effekter som funksjon av immunstimulering. Se appendiks tabell 7-15 for gjennomsnittlige Ct-verdier for qPCR analyser.

Vi undersøkte ekspresjon av en rekke gener som er direkte relatert til metabolsk aktivitet. En aktivering av immunceller medfører økt eller endret metabolsk aktivitet. Glykolytisk aktivitet vil gi større produksjon av laktat enn ved normal metabolsk aktivitet (oksidativ forsyning) som gir ATP og karbon dioksid. En slik metabolsk dreining kalles ofte for «Warburg effekten». I de følgende figurene (3-11) er uttrykket av gener til kontrollgruppa også tatt med. Dette fordi vi ønsket at den variasjonen, mht. behandling og over tid, også skulle illustreres. I statistiske beregninger er verdiene til kontrollgruppa hensyntatt, slik at signifikant forskjell er relativt mot kontrollfisk og «time-matched». Generelt medførte ikke badbehandlingene synlige endringer i plommesekkclarvenes aktivitet. Akkumulert dødelighet for behandlingsgruppene (unntatt deacetylerert kitin) er vist i appendiks (Tabell 16).

3.1 Deacetylerert kitin

En gruppe med fisk ble også stimulert med deacetylerert kitin. Fisken fikk da et hvitt slør på hud og i hoderegionen, inkludert gjelleområdet. Disse døde innen en time etter badbehandling. Dagen etter ble det rørt i bøtta med død fisk, og da så man et hvitt belegg som løsnet fra fisken (Figur 2).

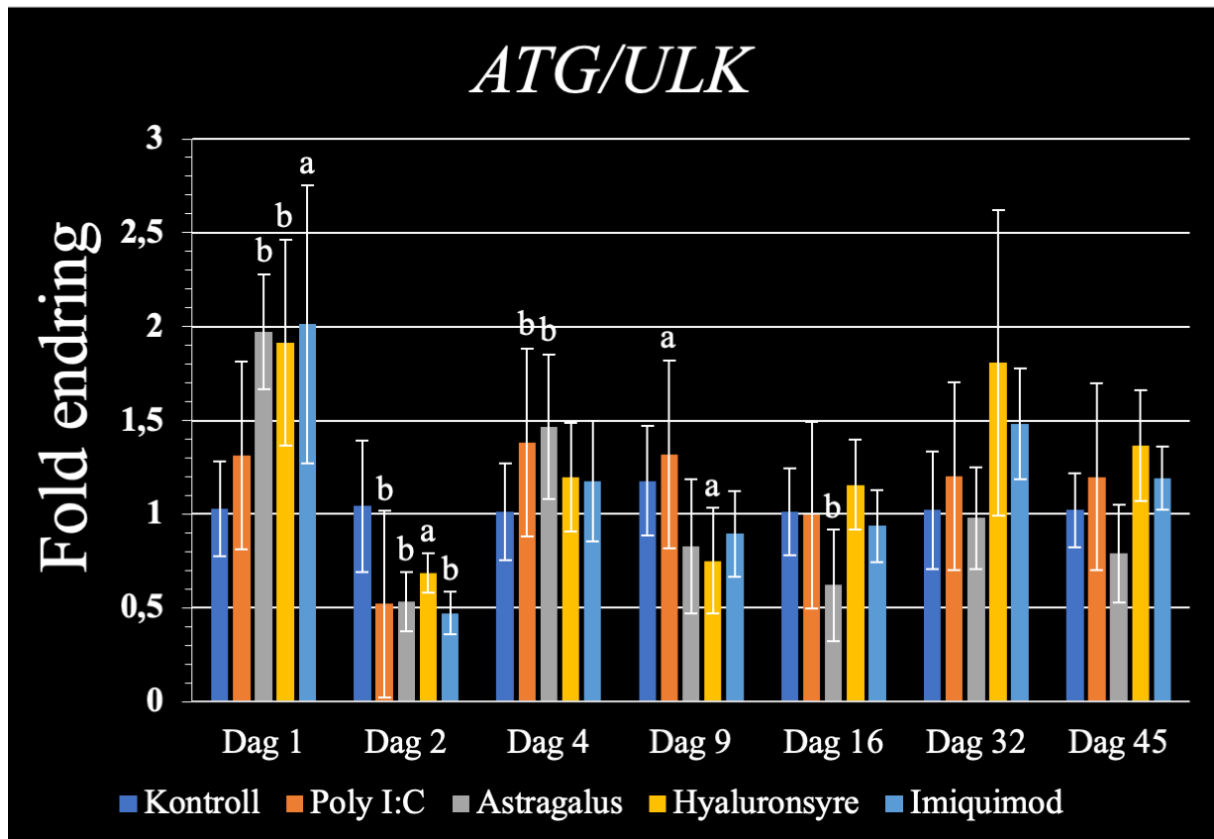


Figur 2: Fisk stimulert i deacetykert chitosan. Man så et sløret grå-hvitt belegg på larvene.

3.2 ATG1/ULK1

Figur 3 viser genuttrykk av *ATG1/ULK1* målt i homogenisert lakselarver etter stimuli med poly I:C, astragalus, og imiquimod. Resultatene er presentert som foldendringer over tid, relativt til kontrollgruppen på samme dag. Standardavvik og signifikante foldendringer er presentert i figuren.

Generelt var ekspresjonen hos fisk høyest ved dag 1 og lavest ved dag 2 (nedregulering). Etter dag 1 og 2 flatet ekspresjonen ut og noenlunde lik som for kontrollgruppa. Ekspresjonen av *ATG1/ULK1* i nyklekkede plommeseklarver som ble badet i løsning inneholdende astragalus rot-ekstrakt var generelt (ekskl. dag 4) lavere etter dag 1 – enn tilsvarende for kontrollgruppa. Det samme gjaldt for imiquimod. Poly I:C induserte generelt høyere *ATG1/ULK1* ekspresjon enn fisk i kontrollgruppa.



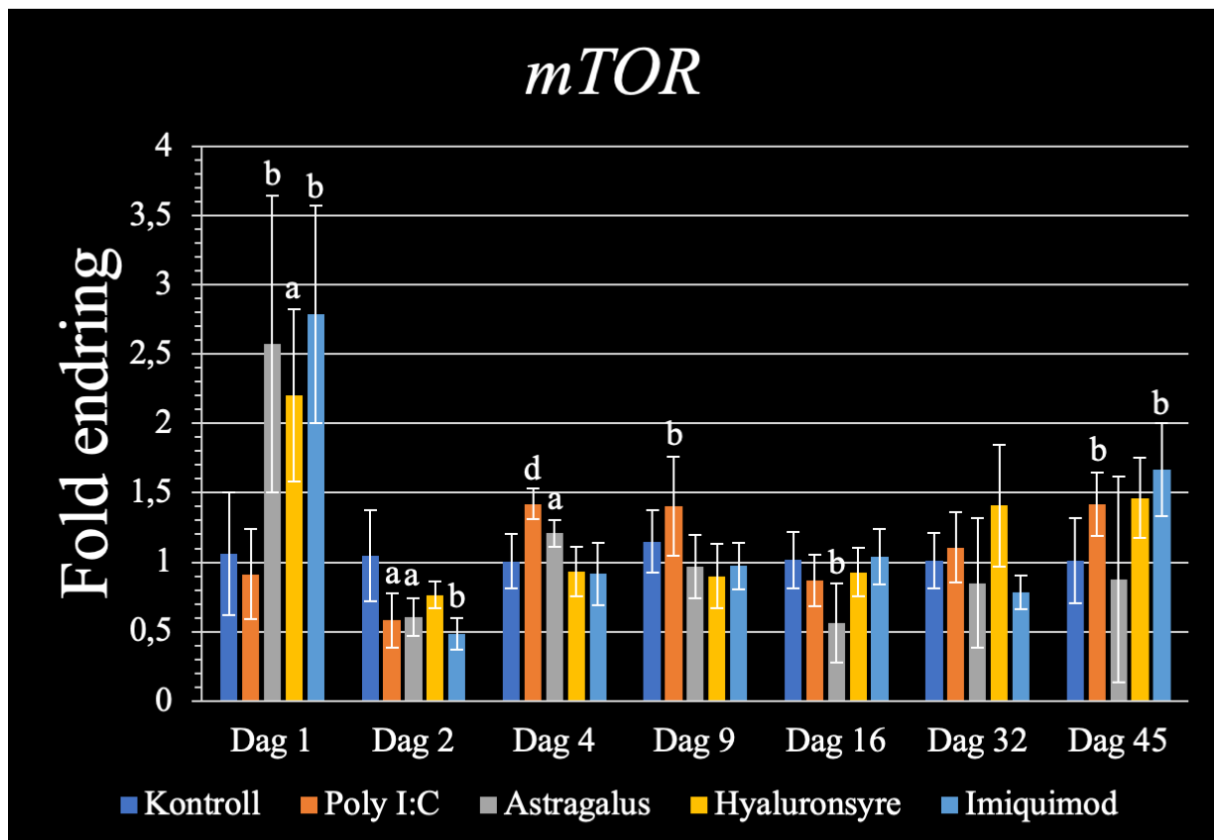
Figur 3: ATG1/ULK1's foldendringer over tid for kontroll, poly I:C, astragalus, hyaluronsyre og imiquimod, relativ til kontroll på samme dag. Signifikante foldendringer relativ til kontroll på samme dag er merket med bokstavene a og b, hvor a er $p \leq 0,05$ og b er $p \leq 0,01$. N=6.

Resultatene viste en signifikant, men lav økning i genuttrykk av *ATG/ULK1*, 1 dag etter stimulering med astragalus, hyaluronsyre og imiquimod i forhold til ustimulert fisk. Fisk badet i poly I:C -løsning viste ingen signifikant økning av *ATG/ULK1* på dag 1. To dager etter stimulering var uttrykket av *ATG/ULK1* signifikant nedregulert i forhold til kontrollfisk for alle fire stimulantene. Ved dag 4 var det kun fisk som var stimulert med poly I:C og astragalus som viste signifikant økning. Fra dag 9 til dag 45 var det få signifikante endringer i genuttrykket av *ATG/ULK1*, og hvor poly I:C var oppregulert og hyaluronsyre var nedregulert på dag 9, mens fisk stimulert med astragalus viste signifikant nedregulert uttrykk i forhold til kontrollfisk (figur 3).

3.3 mTOR

Figur 4 viser genuttrykk av *mTOR* målt i homogeniserte lakselarver etter stimuli med poly I:C, astragalus, og imiquimod. Resultatene er presentert som foldendringer over tid, relativt til fisk i kontrollgruppen på samme dag. Standardavvik og signifikante foldendringer er presentert i figuren.

Generelt var det høyere ekspresjon av *mTOR* hos immunstimulert fisk (ekskl. poly I:C) enn hos fisk i kontrollgruppen ved dag 1. Deretter var ekspresjonen hos immunstimulert fisk ved dag 2 og 16 generelt lave. Ved de andre tidspunktene var det mer eller mindre ujevn ekspresjon frem til dag 45 i forhold til fisk i kontrollgruppen (Figur 4). Ved dag 45 var ekspresjonen av *mTOR* høyere hos fisk stimulert med de antivirale stimulantene (poly I:C og imiquimod).



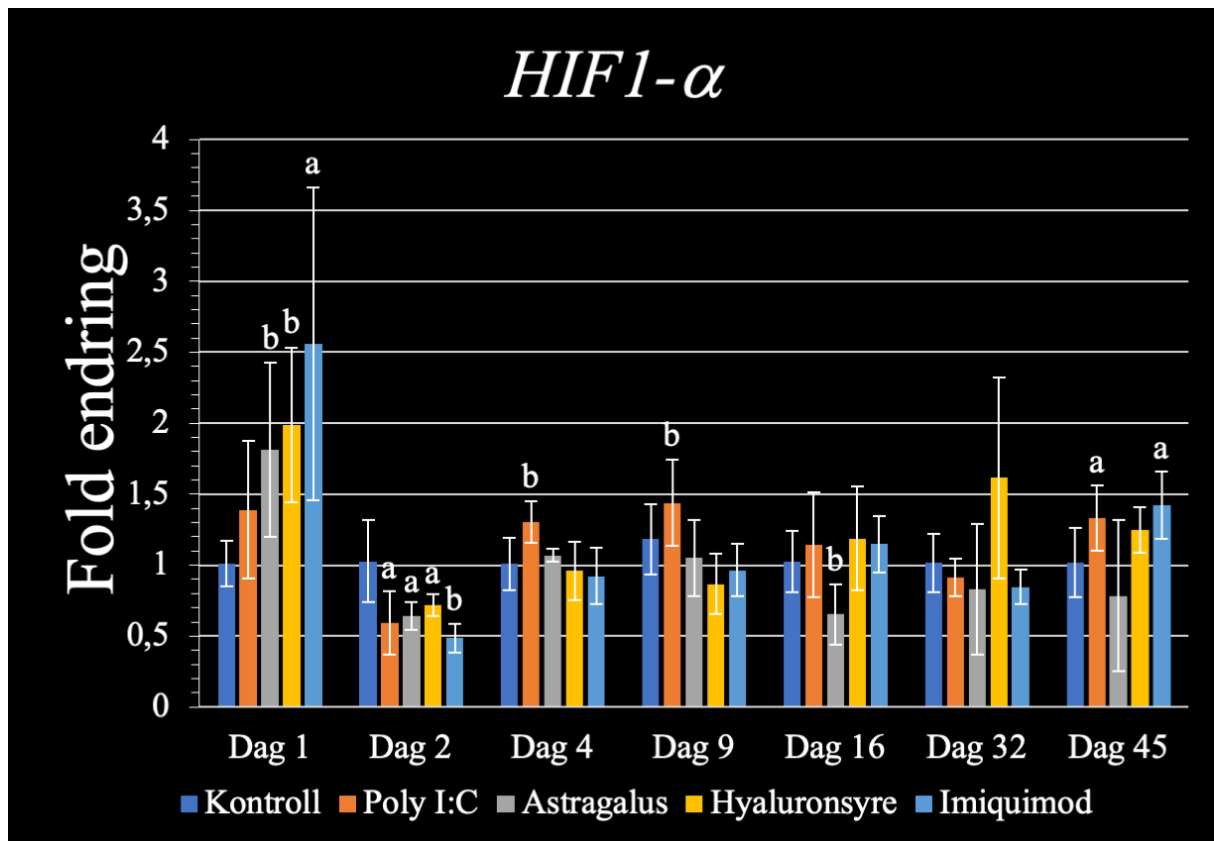
Figur 4: *mTOR*'s foldendringer over tid for kontroll, poly I:C, astragalus, hyaluronsyre og imiquimod, relativt til kontroll på samme dag. Signifikante foldendringer relativt til kontroll på samme dag er merket med bokstavene a, b og d, hvor a er $p \leq 0,05$, b er $p \leq 0,01$ og d er $p \leq 0,0001$. $N=6$.

Resultatene viste en liten, men signifikant økning i genuttrykk av *mTOR* for alle forsøksgruppene en dag etter stimulering i forhold til kontrollfisk, med unntak av fisk som ble stimulert med poly I:C, som ikke viste signifikant endring. To dager etter stimulering var uttrykket av *mTOR* signifikant nedregulert for alle forsøksgruppene, unntatt for plommeseekkyngel som ble stimulert med hyaluronsyre. Fire dager etter stimulering var det en liten, men signifikant økning i genuttrykk av *mTOR* for poly I:C- og astragalus- stimulert fisk. Hyaluronsyre og imiquimod medførte ingen signifikant endring i genuttrykk. Fra dag 9 til dag 45 var det ingen signifikante endringer i genuttrykk, med unntak av poly I:C, som medførte signifikant økning ved dag 9 og 45, og astragalus som induiserte signifikant en svak økning på dag 16. Fisk som var stimulert med imiquimod hadde signifikant økning i uttrykk av *mTOR* 45 dager etter stimulering (figur 4).

3.4 HIF1- α

Ekspresjon av *HIF1- α* målt i homogeniserte lakselarver etter stimulering med poly I:C, astragalus, og imiquimod er vist i Figur 5. Resultatene er presentert som foldendringer over tid, relativt til kontrollgruppen på samme dag. Standardavvik og signifikante foldendringer er presentert i figuren.

Generelt var ekspresjonen av *HIF1- α* høyere for immunstimulerte fisk enn hos fisk i kontrollgruppen ved dag 1, og lavere ved dag 2 (nedregulering). Deretter var det varierende uttrykk av *HIF1- α* i forhold til fisk i kontrollgruppen.



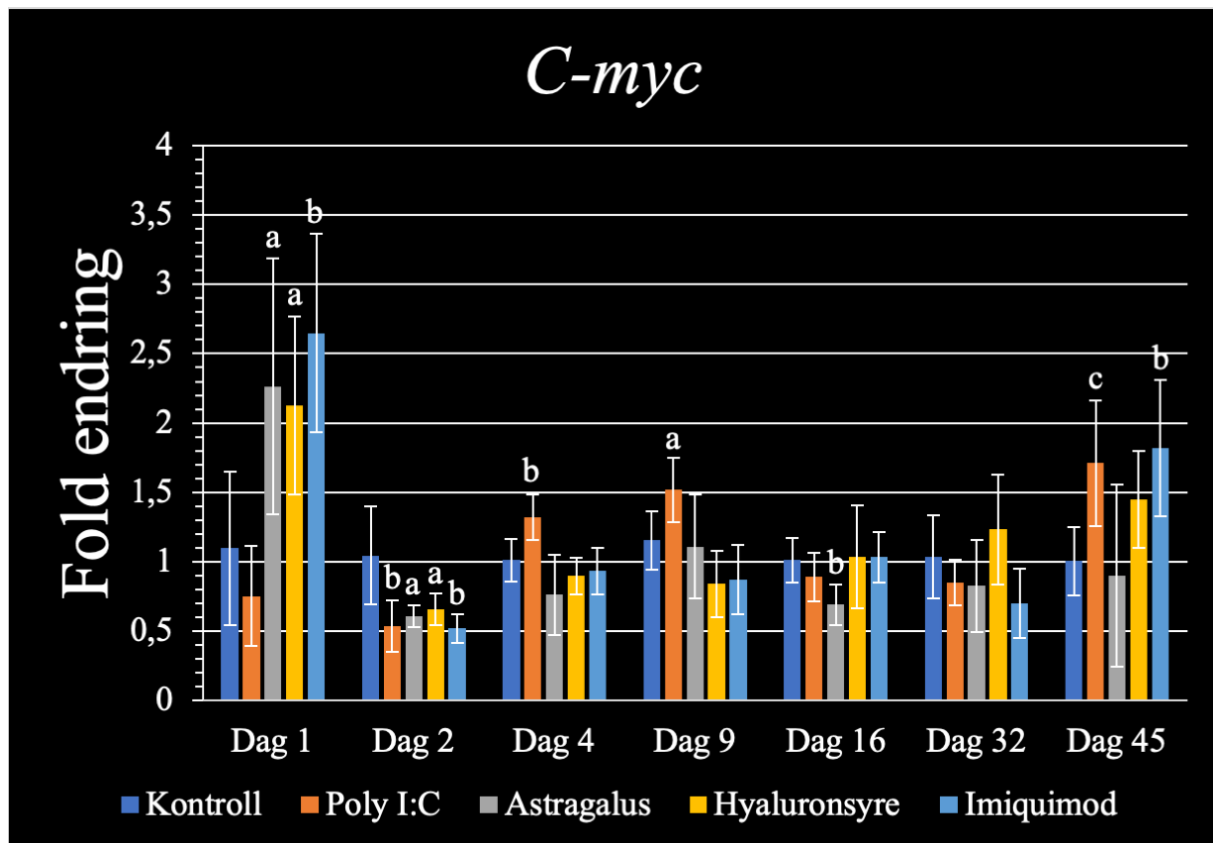
Figur 5: *HIF1- α* 's foldendringer over tid for kontroll, poly I:C, astragalus, hyaluronsyre og imiquimod, relativ til kontroll på samme dag. Signifikante foldendringer relativ til kontroll på samme dag er merket med bokstavene a og b, hvor a er $p \leq 0,05$ og b er $p \leq 0,01$. $N=6$.

Resultatene viste at det var en signifikant økning av *HIF1- α* ekspresjon en dag etter stimulering i astragalus, hyaluronsyre og imiquimod i forhold til kontrollfisk. Etter to dager var uttrykket av *HIF1- α* signifikant nedregulert i forhold til kontrollfisk for alle stimulantene. Fire og ni dager etter stimulering var det ingen signifikante endringer, med unntak av poly I:C, som var signifikant oppregulert begge dagene. 16 dager etter stimulering var det en signifikant nedregulering for fisk stimulert med astragalus, mens ingen av de andre stimulantene medførte signifikant endring. Det var ingen signifikante endringer 32 dager etter stimulering. Etter 45 dager hadde *HIF1- α* 's genuttrykk for poly I:C og imiquimod en signifikant, men svak økning, mens astragalus og hyaluronsyre hadde ingen signifikant endring (figur 5).

3.5 *c-Myc*

Figur 6 viser genuttrykk av *c-Myc* målt i homogeniserte lakselarver etter stimuli med poly I:C, astragalus, og imiquimod. Resultatene er presentert som foldendringer over tid, relativt til kontrollgruppen på samme dag. Standardavvik og signifikante foldendringer er presentert i figuren.

Ekspresjon av *c-Myc* var signifikant høyere hos fisk behandlet med astragalus, hyaluronsyre og imiquimod en dag etter badbehandling, og nedregulert hos behandlede fisk i alle gruppene ved dag 2 – relativt til kontrollfisk. Deretter var uttrykket av *c-Myc* ganske likt i forhold til kontrollfisk, med unntak av ved dag 45 hvor poly I:C og imiquimod behandlede fisk viste høyere ekspresjon (Figur 6). Uttrykkene ved dag 1 og 2 hadde ganske likt mønster som for genene *ATG1/ULK1*, *mTOR* og *HIF1- α* , samt *GLUT1* og *SIX1* (se figur 6 og 8).



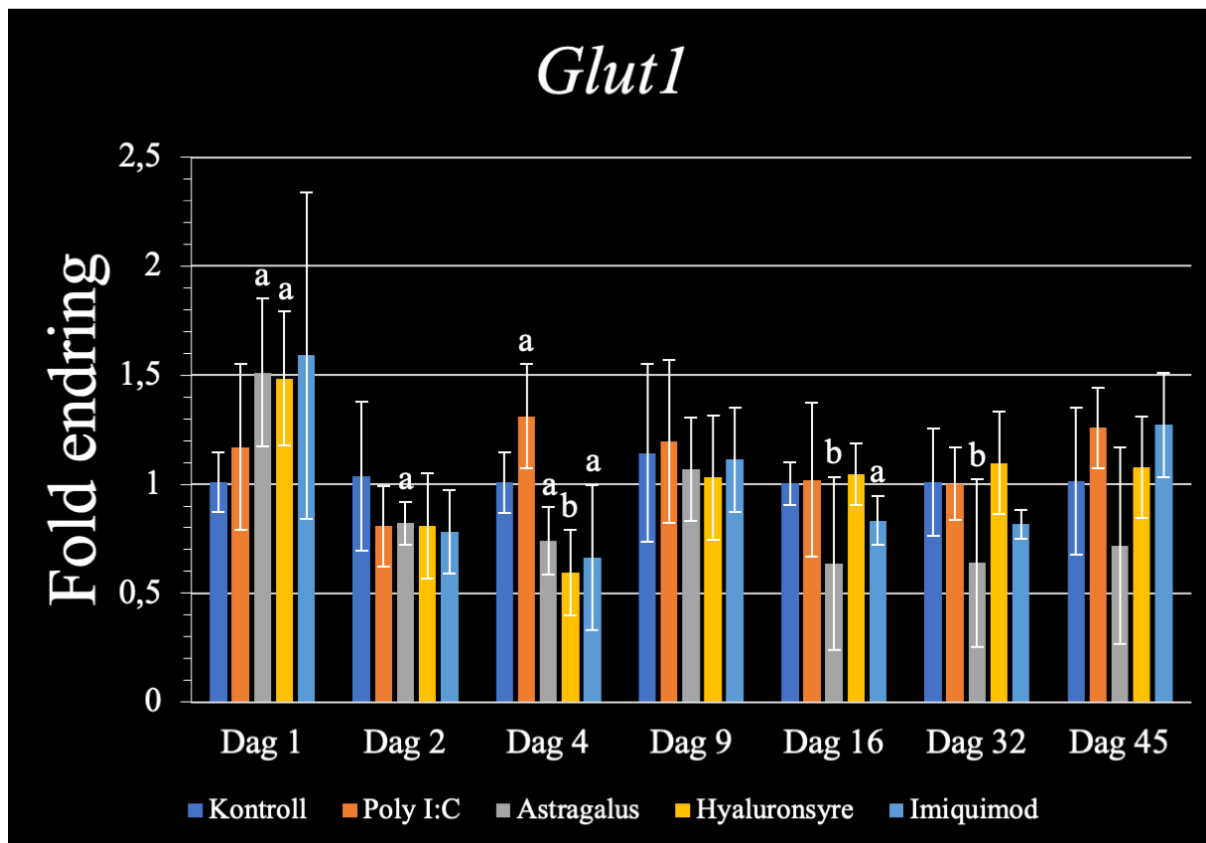
Figur 6: *c-Myc*'s foldendringer over tid for kontroll, poly I:C, astragalus, hyaluronsyre og imiquimod, relativt til kontroll på samme dag. Signifikante foldendringer relativt til kontroll på samme dag er merket med bokstavene a, b, og c, hvor a er $p \leq 0,05$, b er $p \leq 0,01$ og c er $p \leq 0,001$. $N=6$

Resultatene viser en signifikant oppregulering av *c-Myc*'s genuttrykk en dag etter stimulering for fisk behandlet med astragalus, hyaluronsyre og imiquimod i forhold til kontrollfisk. Ekspresjonen av *c-Myc* hos fisk stimulert med poly I:C medførte ingen signifikant endring i genuttrykk ved dag 1. To dager etter stimulering var ekspresjonen av *c-Myc* hos fisk i samtlige forsøksgrupper signifikant nedregulert. Det var få signifikante endringer 4-32 dager etter stimulering, med unntak av poly I:C, hvor uttrykket var oppregulert etter 4 og 9 dager, og for astragalus, hvor *c-Myc* ekspresjon var svakt nedregulert etter 16 dager. 45 dager etter stimulering medførte poly I:C og imiquimod stimulering signifikant oppregulert *c-Myc* uttrykk. Astragalus og hyaluronsyre hadde ingen signifikant endring i genuttrykk etter 45 dager.

3.6 GLUT1

Figur 7 viser genuttrykk av *GLUT1* målt i homogeniserte lakselarver etter stimuli med poly I:C, astragalus, og imiquimod. Resultatene er presentert som foldendringer over tid, relativt til kontrollgruppen på samme dag. Standardavvik og signifikante foldendringer er presentert i figuren.

En dag etter badbehandling av astragalus og hyaluronsyre økte transkripsjonen av *GLUT1* relativt til kontrollfisk. Uttrykket av *GLUT1* var generelt nedregulert ved dag 2, og nedregulert hos fisk i flere behandlingsgrupper ved dag 4, 16 og 32.



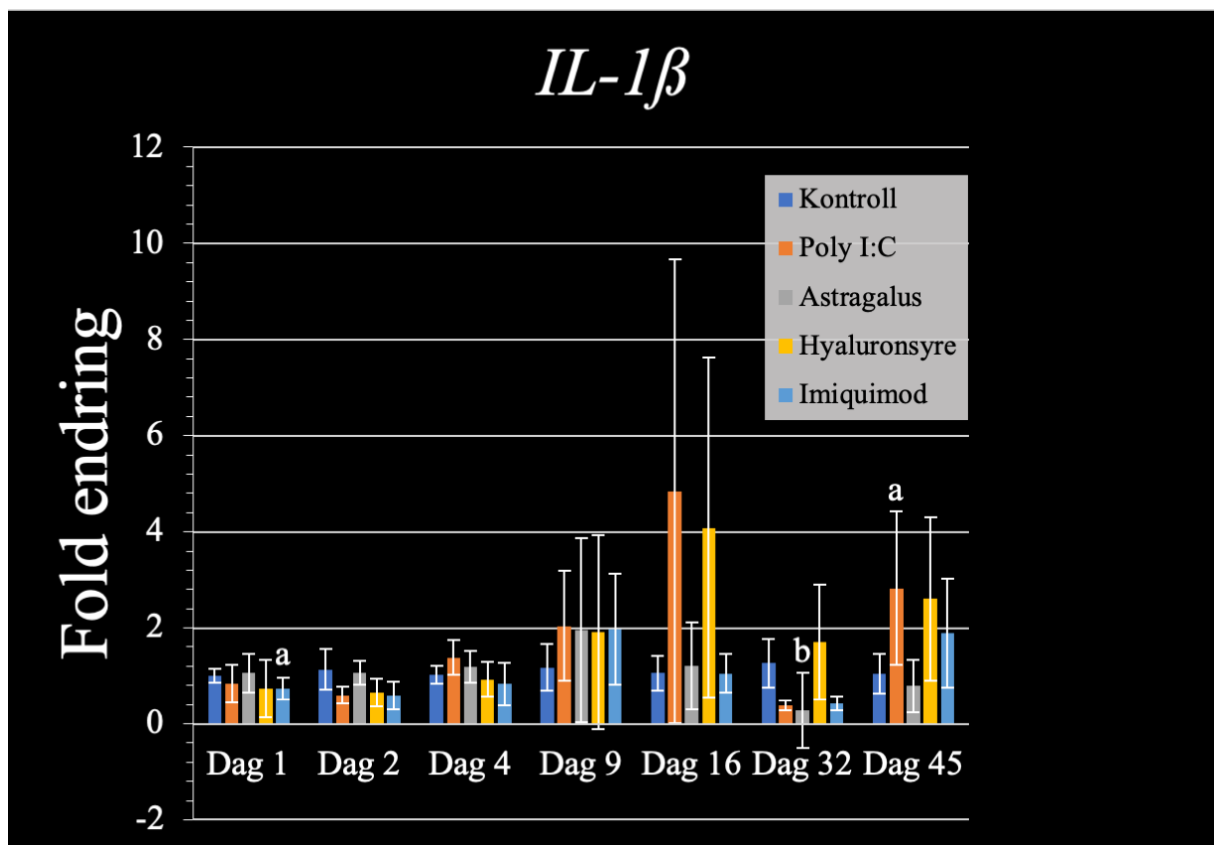
Figur 7: *Glut1*'s foldendringer over tid for kontroll, poly I:C, astragalus, hyaluronsyre og imiquimod, relativ til kontroll på samme dag. Signifikante foldendringer relativ til kontroll på samme dag er merket med bokstavene a, og b, hvor a er $p \leq 0,05$ og b er $p \leq 0,01$. $N=6$.

Resultatene viste signifikant økning i ekspresjon av *GLUT1* ved dag 1 etter stimulering med astragalus og hyaluronsyre. Uttrykket av *GLUT1* i fisk stimulert med poly I:C og imiquimod viste ingen signifikante forskjeller i forhold til kontrollfisk ved dag 1. To dager etter stimulering var det kun fisk stimulert med poly I:C som viste signifikant økning i genuttrykk av *GLUT1*. Fire dager etter stimulering viste fisk stimulert med poly I:C signifikant oppregulert ekspresjon. Også fisk som var badbehandlet med astragalus, hyaluronsyre og imiquimod viste signifikant nedregulert ekspresjon av *GLUT1* mRNA. Det var ingen signifikante endringer ved dag 9 og 45. Seksten dager etter stimulering var *GLUT1* ekspresjonen i fisk stimulert med astragalus og imiquimod signifikant nedregulert, mens fisk badbehandlet med poly I:C og hyaluronsyre ikke viste noen signifikante endringer. Etter 32 og 45 dager var det kun fisk stimulert med astragalus rotekstrakt som viste signifikant oppregulering ved dag 32.

3.7 *IL-1 β*

Figur 8 viser genuttrykk av *IL-1 β* målt i homogeniserte lakselarver etter å ha vært badbehandlet med stimulantene poly I:C, astragalus, hyaluronsyre og imiquimod. Resultatene er presentert som foldendringer over tid, relativt til kontrollgruppen på samme dag. Standardavvik og signifikante foldendringer er presentert i figuren.

Generelt var det liten variasjon og få forskjeller i ekspresjonen av *IL-1 β* de fire første dagene etter stimulering. Etter 9 dager var det alle i forsøksgruppene oppregulering av *IL-1 β* ekspresjon, mens det var store variasjoner ved dag 16, 32, og 45. Det var generelt få signifikante ekspresjonsendringer av *IL-1 β* -relativt til kontrollfisk.



Figur 8: *IL-1 β* 's foldendringer over tid for kontroll, poly I:C, astragalus, hyaluronsyre og imiquimod, relativt til kontroll på samme dag. Signifikante foldendringer relativt til kontroll på samme dag er merket med bokstavene a og b, hvor a er $p \leq 0,05$ og b er $p \leq 0,01$. $N=6$.

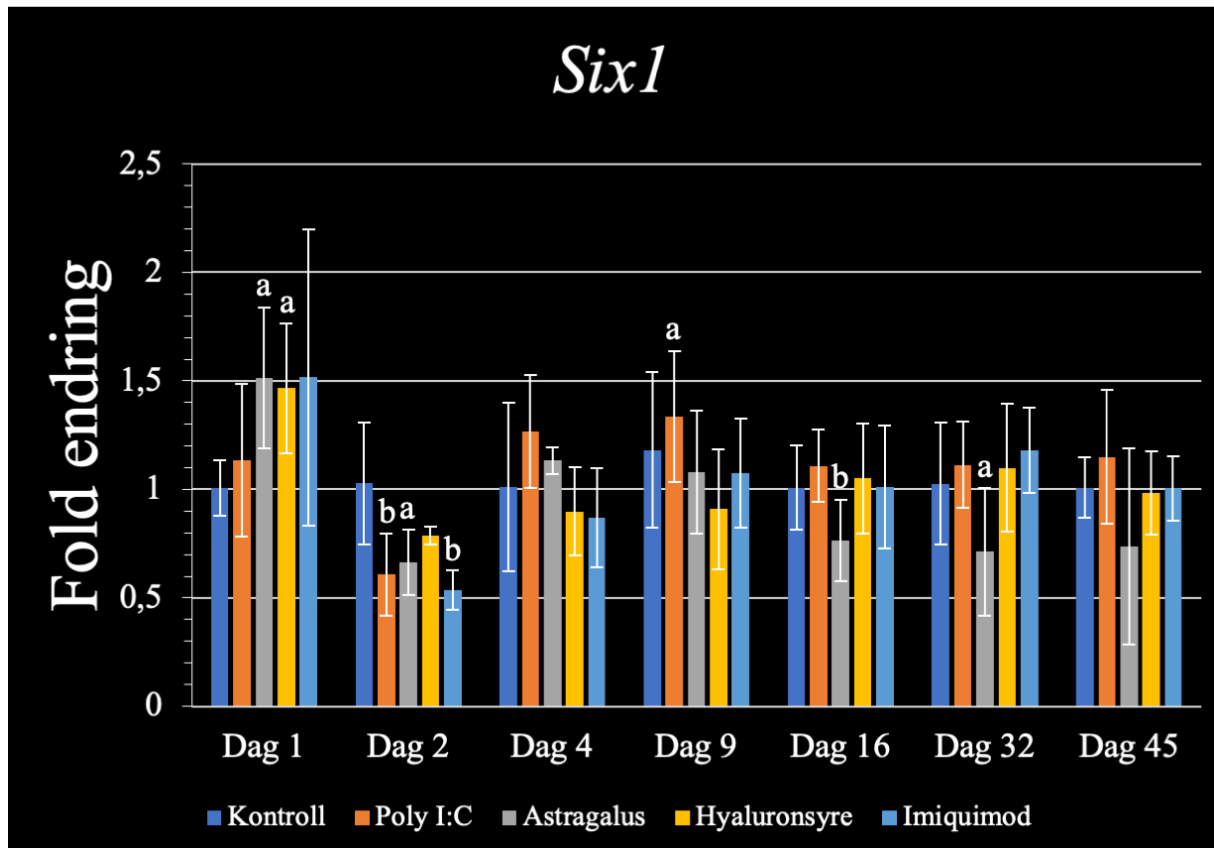
Resultatene viste at ekspresjon av *IL-1 β* var signifikant nedregulert en dag etter stimulering med imiquimod, i forhold til kontrollfisk, mens badbehandling med poly I:C, astragalus og hyaluronsyre medførte ingen signifikante endringer i genuttrykk. Fra dag 2 til og med 32 var

det ingen signifikante endringer i *IL-1 β* mRNA ekspresjon, med unntak av fisk stimulert med astragalus som medførte signifikant nedregulert ekspresjon i forhold til kontrollfisk 32 dager etter stimulering. Førtifem dager etter stimulering var *IL-1 β* 's genuttrykk signifikant oppregulert for poly I:C stimulert fisk, i forhold til kontrollfisk. Astragalus, hyaluronsyre og imiquimod stimulering induserte ingen signifikante endringer i genuttrykk ved dag 45 (Figur 8).

3.8 SIX1

Figur 9 viser genuttrykk av *SIX1* målt i homogeniserte lakselarver etter stimulering med poly I:C, astragalus, hyaluronsyre og imiquimod. Resultatene er presentert som foldendringer over tid, relativt til kontrollgruppen på samme dag. Standardavvik og signifikante foldendringer er presentert i figuren.

Det var en markert nedregulering av *SIX1* ved dag 2 hos nyklekkede fiskelarver som var badbehandlet med poly I:C, astragalus, hyaluronsyre og imiquimod. For resten av tidspunktene var det generelt nedregulering av *SIX1* for mange behandlingsgrupper og tidspunkter, men med relativt få signifikante forskjeller.



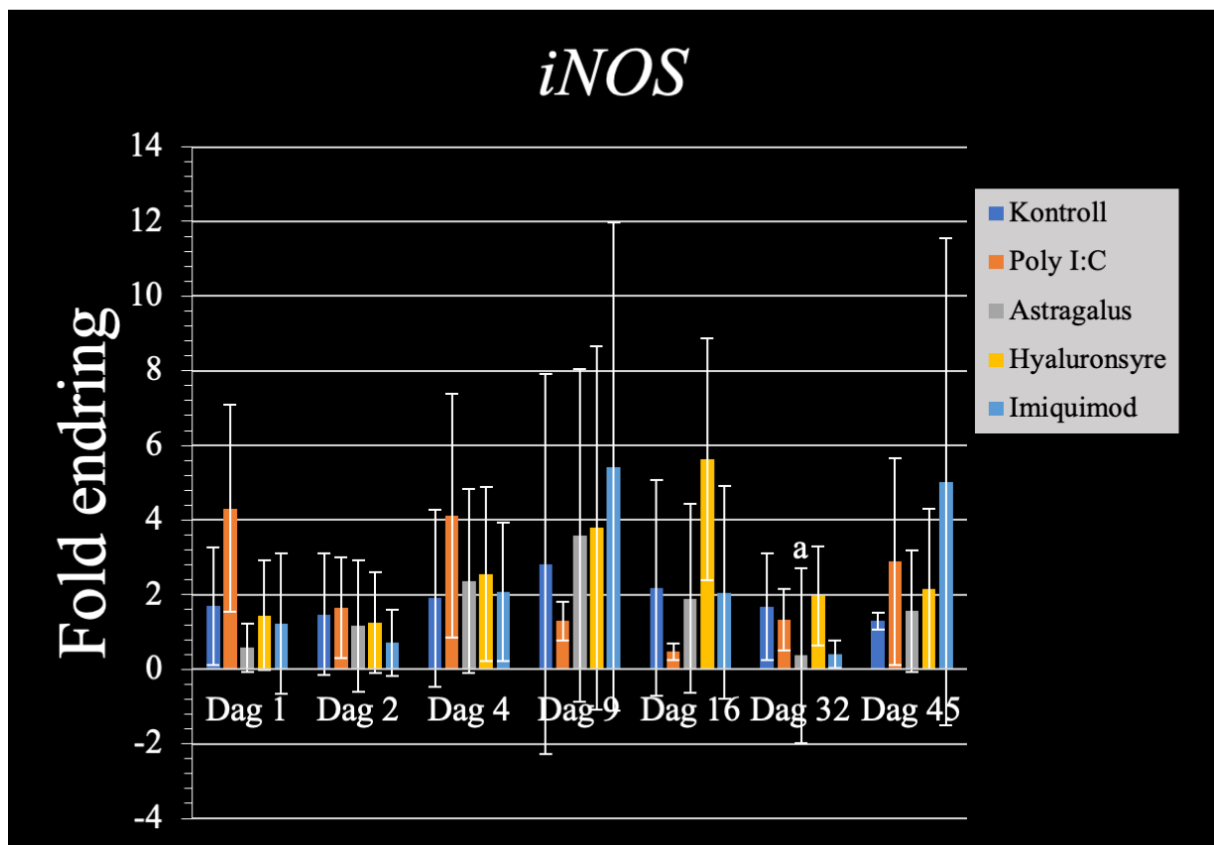
Figur 9: *SIX1*'s foldendringer over tid for kontroll, poly I:C, astragalus, hyaluronsyre og imiquimod, relativ til kontroll på samme dag. Signifikante foldendringer relativ til kontroll på samme dag er merket med bokstavene a og b, hvor a er $p \leq 0,05$ og b er $p \leq 0,01$. $N=6$.

Resultatene viste at genuttrykket for *SIX1* var signifikant oppregulert en dag etter stimulering med astragalus og hyaluronsyre i forhold til kontrollfisk, mens stimulering med poly I:C og imiquimod induserte ingen signifikante endringer. Etter 2 dager var genuttrykket for *SIX1* signifikant nedregulert for gruppene poly I:C, astragalus og imiquimod, mens badbehandling med hyaluronsyre medførte ingen signifikant effekt ved dag 2. Det var ingen signifikante endringer i *SIX1*'s genuttrykk fire og ni dager etter stimulering, unntatt for fisk stimulert med poly I:C, som viste svakt oppregulert *SIX1* ekspresjon 9 dager etter stimulering. Fra 16 til 45 dager etter stimulering var det ingen signifikante endringer unntatt for fisk stimulert med astragalus, som viste oppregulert *SIX1* uttrykk 16 og 32 dager etter stimulering (Figur 9).

3.9 *iNOS*

Figur 10 viser genuttrykk av *iNOS* målt i homogeniserte lakselarver etter stimuli med poly I:C, astragalus, hyaluronsyre og imiquimod. Resultatene er presentert som foldendringer over tid, relativt til kontrollgruppen på samme dag. Standardavvik og signifikante foldendringer er presentert i figuren.

I vårt forsøk ble det observert kun en signifikant forskjell (nedregulering) hvor fisk som var behandlet med astragalus rot-ekstrakt viste lavere *iNOS* transkripsjon ved dag 32, relativt til fisk i kontrollgruppen. Generelt var det store individuelle variasjoner mht. genuttrykk for alle gruppene (Figur 10).

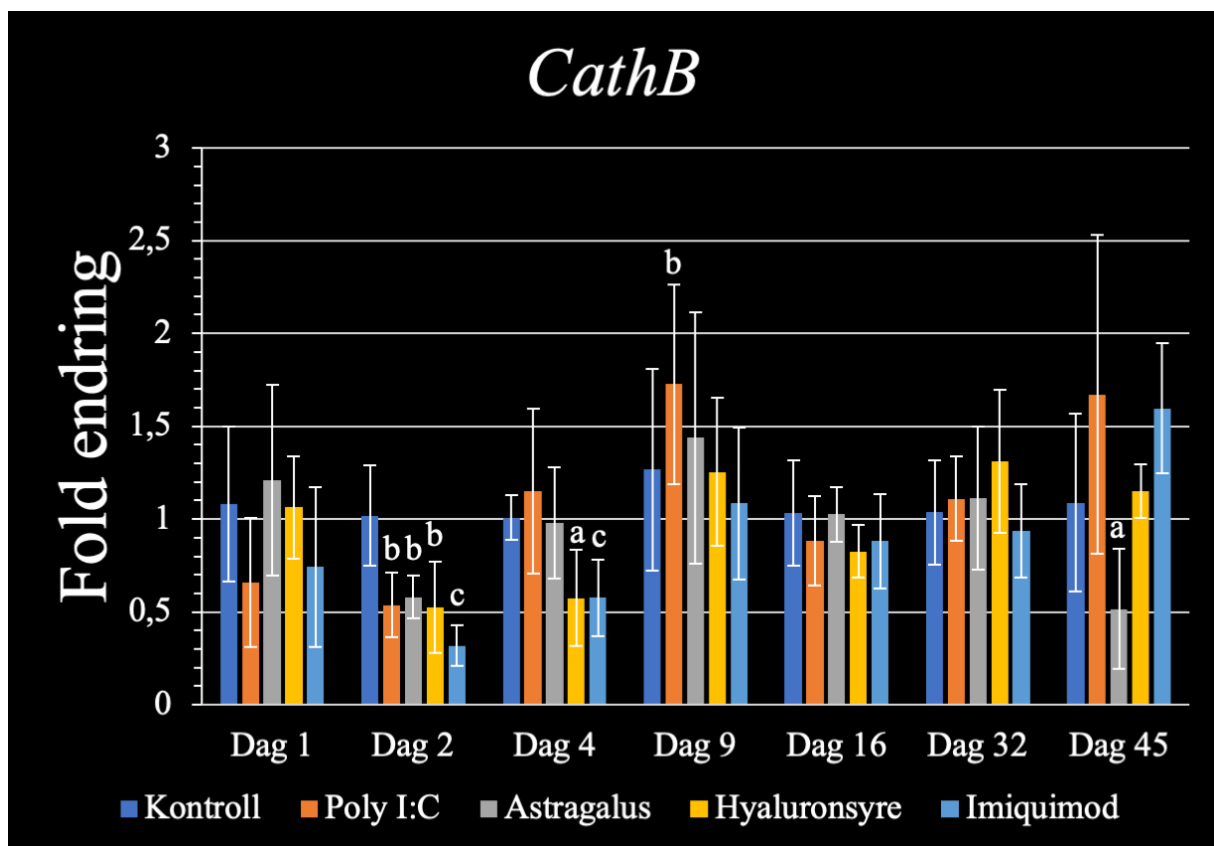


Figur 10: *iNOS*'s foldendringer over tid for kontroll, poly I:C, astragalus, hyaluronsyre og imiquimod, relativt til kontroll på samme dag. Signifikant foldendring relativ til kontroll på samme dag er merket med bokstaven a, hvor a er $p \leq 0,05$. $N=6$.

3.10 Cathepsin B

Figur 11 viser genuttrykk av *cathB* målt i homogeniserte lakselarver etter stimuli med poly I:C, astragalus, hyaluronsyre og imiquimod. Resultatene er presentert som foldendringer over tid, relativt til kontrollgruppen på samme dag. Standardavvik og signifikante foldendringer er presentert i figuren.

Det var generelt en merkbar nedgang i ekspresjonen av *cathepsin B* i plommesekklyngelen to dager etter stimulering i poly I:C, astragalus, hyaluronsyre og imiquimod. Videre var det generelt relativt store variasjoner i ekspresjonen av *cathepsin B*, i forhold til ustimulert fisk.



Figur 11: *CathB*'s foldendringer over tid for kontroll, poly I:C, astragalus, hyaluronsyre og imiquimod, relativt til kontroll på samme dag. Signifikante foldendringer relativt til kontroll på samme dag er merket med bokstavene a, b og c, hvor a er $p \leq 0,05$, b er $p \leq 0,01$ og c er $p \leq 0,001$. $N=6$.

Resultatene viste ingen signifikante endringer i uttrykket av *cathB* hos stimulerte fiskelarver ved dag 1 etter stimulering. To dager etter stimulering var ekspresjonen av *cathB* signifikant nedregulert i forhold til kontrollfisk for alle forsøksgruppene. Fire dager etter stimulering i hyaluronsyre og imiquimod, var ekspresjonen av *cathB* signifikant nedregulert i forhold til

kontrollfisk, mens poly I:C og astragalus stimulering ikke medførte signifikante endringer. Det var ingen signifikante endringer i genuttrykket 9-32 dager etter stimulering, med unntak av fisk som var badbehandlet med poly I:C, som viste signifikant oppregulering av *cathB* mRNA ekspresjon ved dag 9. Etter 45 dager var det kun fisk som var badbehandlet med imiquimod som hadde signifikant endring i genuttrykk for *cathepsin B*, og dette var en oppregulering.

4 Diskusjon

4.1 Effekt av deacetylert kitin- kitosan

All fisk badbehandlet i deacetylert kitin ble dekket av et hvitt "slør" og døde innen en time etter badbehandling, følgelig ble de ikke tatt med videre i forsøket. Grunnen til at fisken døde kan være at dette "sløret" festet seg også i gjellepartiet til fisken, slik at fisken ble kvalt. Det er vist i en studie av Naim *et al.*, 2013 at kitosan kan brukes som et flokkuleringsmiddel (stoff som samler små partikler til klumper ved å binde til dem) i høsting av mikroalger i ferskvann. Studien viste at dette var både dose og pH-avhengig, hvor høyeste flokkulering ble funnet ved 120 mg/L og pH 6 (Naim *et al.*, 2013). Med dette i bakhodet kan en mistenke at den samme flokkuleringsreaksjonen har skjedd mellom kitosanet og fiskens mukus under badbehandlingen. Når kitosan har blitt brukt som immunstimulant i andre studier har det som regel vært administrert oralt (Geng *et al.*, 2011) eller via injeksjon (Anderson and Siwicki, 1994). Ved å undersøke de kjemiske og interagerende egenskapene til kitosan før vi begynte, kunne vi kanskje unngått å bruke kitosan i forsøket og dermed spart fisken for stress og lidelse.

4.2 Effekt av poly I:C

I forhold til kontrollfisk viste våre resultater generelt økt ekspresjonen av *ATG1/ULK1* for plommeseckklarver stimulert i poly I:C gjennom hele forsøksperioden, med unntak av dag 2 etter stimulering hvor det var nedsatt ekspresjon av *ATG1/ULK1*. Resultatene samstemmer med *in vitro* studie på leukocytter fra niøye som også viste økning i ekspresjonen av *ATG1/ULK1* etter stimulering med poly I:C (Luo *et al.*, 2018).

Ekspresjonen av *mTOR* fra fisk stimulert med poly I:C var også generelt økende i forhold til kontrollfisk gjennom hele forsøksperioden, med unntak av dag 2 og 16, hvor ekspresjonen av *mTOR* var nedsatt. I en *in vitro* studie på keratinocytter fra mennesker ble det også vist at *mTOR* må aktiveres for å få TLR3 mediert cytokininduksjon som følge av poly I:C stimulering (Zhao *et al.*, 2010). Hvorvidt *mTOR* (transkripsjonsfaktor) var aktivert i vår studie er ikke vist, men resultatene kunne indikere at poly I:C hadde aktivert *mTOR*. For å få svar på dette må det utføres grundige studier for å finne ut av de andre komponentene som danner mTOR1 kompleks (mTOR1C) er tilstede og hvorvidt nedstrøms p70-SG kinase og/eller autofagi induserer

"autophagy-related protein 13" som blir fosforylert. Sistnevnte består av blant annet ATG1 (Hay and Sonenberg, 2004). Generelt vil inhibering av mTORC1 gi nedsatt metabolsk aktivitet i T-celler -via manglende aktivering av *HIF1- α* og *c-Myc*, dermed også svakere effektorfunksjon. Dette er vist hos tilapia (*Oreochromis niloticus*) hvor fisk ble infisert med *Streptococcus agalactiae* (i.p. injeksjon) sammen med rapamycin (inhibitor av mTOR1), viste nedsatt T-celleaktivitet (Wei et al., 2019).

Det var også en generell økning i ekspresjonen av *HIF1- α* i poly I:C stimulert fisk i forhold til kontrollfisk, med unntak av dag 2 og 32, hvor ekspresjonen var nedsatt. En *in vitro* studie av oralt plateepitelkarsinom viste at stimulering med poly I:C ga økt ekspresjon av *HIF1- α* 24 timer post stimulering (Han et al., 2016). I et annet studie ved bruk av cellelinjer derivert fra mus og menneske medførte poly I:C stimulering nedregulering av *HIF1- α* (Hotani et al., 2015). I en cellelinje fra mandarinfisk (*Siniperca chuatsi*) (fibroblaster, MFF-1) ble det funnet at ekspresjonen av *HIF1- α* ble induisert ved poly I:C stimulering (He et al., 2019). Dette studiet er delvis i samsvar med våre resultater ved dag 2 etter stimulering (nedregulering).

Fisk badbehandlet i poly I:C viste nedsatt ekspresjon av *c-Myc* i forhold til kontrollfisk ved dag 1, 2, 16, og 32 etter behandling, mens det var økt ekspresjon av *c-Myc* ved dag 4, 9, og 45. Ett studie hvor humane kreftceller ble stimulert med poly I:C viste resultatene at stimuleringen induiserte nedregulering av *c-Myc* ekspresjon post stimulering (Lin et al., 2016). Hos tilapia ble det vist at *c-Myc* ekspresjonen var uavhengig av mTORC1, selv om translasjonen fra mRNA til protein var økt (Wei et al., 2019). For øvrig er det ikke gjort studier på fisk som har undersøkt *c-Myc* translasjonen etter poly I:C stimulering.

GLUT1 ekspresjonen i fisk badbehandlet med poly I:C viste oppregulering en dag etter badbehandling i forhold til kontrollfisk, mens det var nedregulering ved dag 2. Fra og med 4 dager etter badbehandling i var det generelt økning i *GLUT1* ekspresjon resten av forsøksperioden i forhold til kontrollfisk. Oppregulering i ekspresjon av *GLUT1* etter stimulering i poly I:C (24 t), har før vært vist i en *in vitro* studie på humane kreftceller fra prostata. (Magnifico et al., 2019). Det er ikke foretatt studier hos fisk som har sett på transkripsjonen av *GLUT1* i forhold til poly I:C stimulering. I et annet studie var ekspresjonen av *GLUT1* mRNA uforandret i makrofager etter LPS og β -glukan stimulering- noe som tyder på at β -glukanet (curdlan) og LPS ikke økte metabolismen i særlig grad (Ulvestad et al., 2018b).

Slik som for *c-Myc*, har badbehandling med poly I:C induisert nedregulering i ekspresjonen av *IL-1 β* i forhold til kontrollfisk de to første dagene etter badbehandling og økt ekspresjon av *c-Myc* 4 dager etter badbehandling. Ved dag 4, 9 og 16 kunne en se varierende ekspresjon av *IL-1 β* . I en studie på leversykdom er det beskrevet at *IL-1 β* har positiv påvirkning på ekspresjonen av *c-Myc*, men hvor virkningsmekanismen var ukjent (Ting et al., 2015). I et studie på karpe hvor leukocytter ble stimulert *in vitro*, induserte poly I:C *IL-1 β* ekspresjon (Tanekhy and Saki, 2019). Det samme skjedde hos leukocytter fra regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) da de ble stimulerte med poly I:C (Hu et al., 2018b). Poly I:C har også blitt vist å stimulere til *IL-1 β* ekspresjon *in vivo* i stillehavstorsk (*Gadus macrocephalus*) (Hu et al., 2018a).

Det var generelt økning i *SIX1* ekspresjonen for fisk badbehandlet i poly I:C i forhold til kontrollfisk gjennom hele forsøksperioden, med unntak av 2 dager etter badbehandling, hvor ekspresjonen av *SIX1* var nedregulert. Dette er likt ekspresjonen for *GLUT1*, noe som samsvarer med resultatene fra Li *et al.*, som viste at økt aktivitet av *SIX1* i kreftceller inducerer økt ekspresjon av *GLUT1* (Li et al., 2018). *SIX1* sett i sammenheng med metabolisme i fisk er ikke studert før.

Ekspresjonen av *iNOS* for fisk badbehandlet med poly I:C, viste økt ekspresjon ved dag 1, 2 og 4 etter behandling, nedregulert ekspresjon ved dag 9, 16 og 32, og igjen økt ekspresjon av *iNOS* ved dag 45 etter behandling. Poly I:C stimulert rødhai har også vist økt ekspresjonen av *iNOS* 24 timer etter stimulering (Reddick et al., 2006). Ekspresjon av *iNOS* er ikke studert mye i fisk etter en *in vivo* stimulering med poly I:C. Den eneste studien som fantes beskrev at poly I:C injeksjon medførte høy *iNOS* ekspresjon hos koreansk steinfisk (*Sebastes schlegelii*) (Shanaka et al., 2020) Forskningsgruppa har før prøvd å analysere *iNOS* ekspresjon i laks- både *in vitro* og *in vivo* ved hjelp av qPCR, men ikke lyktes. Det har heller ikke lyktes å måle NO produksjon (fra *iNOS*) fra f. eks. makrofager hos laks. Det virker som laks ikke har fullt ut samme *iNOS* aktivitet som andre arter.

Fisk badbehandlet med poly I:C viste nedsatt ekspresjonen av *cathB* de to første dagene etter behandling i forhold til kontrollfisk, mens fra dag 4 til 45 etter badbehandling var det generelt økt ekspresjon av *cathB*. I et studie hvor Japansk flyndre (*Paralichthys olivaceus*) ble injisert med poly I:C resulterte dette i økt ekspresjon av *cathB* 1 til 96 timer etter stimulering (Zhang et al., 2008).

I likhet med andre studier som har vist regulert transkripsjon av metabolismegener induisert ved poly I:C, kan vi også konkludere med at badbehandling med poly I:C induiserte genreguleringer i noen tilfeller økt transkripsjon av samtlige av de undersøkte metabolismegenene de første dagene (ikke dag 2) etter behandling, med unntak av *cathepsin B*, som ble nedregulert. Dette kan indikere at poly I:C har en effekt på metabolismen til plommesekkclarver.

4.3 Effekt av Astragalus rotekstrakt

Plommeseckkyngel badbehandlet med astragalus rotekstrakt viste generelt nedregulert ekspresjon av *ATG1/ULK1* i forhold til kontrollfisk gjennom hele forsøksperioden, med unntak av dag 1 og 4, hvor det var ekspresjonen av *ATG1/ULK1* var oppregulert. Sammenligner man effekten av astragalus på *ATG1/ULK1* og *mTOR*, kan en se at de har likt reguleringsmønster, dvs. når ekspresjonen av *mTOR* øker, så øker også ekspresjonen av *ATG1/ULK1*. En kan da mistenke at *ATG1/ULK1* er avhengig av *mTOR*, noe som også ble foreslått av Jung et al., 2011. I ett studie hvor skjelettmyoblaster (cellelinje; C2C12) fra rotter ble inkubert i kulturmedium inneholdende astragalus (polysakkaridfraksjonen), for så å bli behandlet (24 t) med H₂O₂ og H₂O₂ + astragalus polysakkarid, ble det vist at stimulanten hadde inhiberende effekt på autofagien induisert av H₂O₂ i C2C12 celler, noe som kunne indikere på at inhiberingen gikk gjennom en *mTOR*-avhengig signalvei (Yin et al., 2015). Dette forsterker mistanken om at *mTOR* regulerer *ATG1/ULK1* og at astragalus har inhiberende effekt på *ATG1/ULK1* og *mTOR*.

I likhet med *ATG1/ULK1* var ekspresjonen av *mTOR* generelt nedregulert i forhold til kontrollfisk gjennom hele forsøksperioden, med unntak av dag 1 og 4, hvor ekspresjonen av *mTOR* var oppregulert. Et studie beskrev at humane kreftceller (HT-29) som ble, *in vitro*, behandlet med astragalus (72 t) viste nedregulering av *mTOR* (protein) ekspresjon fra 12 til 72 timer etter behandling (Auyeung et al., 2010). Et annet studie viste også nedregulering av *mTOR*

ekspresjon i humane kreftceller (HTC116) *in vitro* etter astragalusbehandling. Dette bekreftet mistanken om at astragalus gir nedsatt ekspresjon av *mTOR*, slik resultatene våre viste, med unntak av dag 1 og 4.

Fisk badbehandlet med astragalus rotekstrakt viste også for *HIF1- α* generelt nedregulert ekspresjon i forhold til kontrollfisk gjennom hele forsøksperioden, med unntak av dag 1 og 4, hvor ekspresjonen av *HIF1- α* var oppregulert. Nedregulert ekspresjon av *HIF1- α* , som følge av astragalusbehandling (i 48 t) har før vært vist i ett studie hvor endotelceller fra humant hepatocellulært karsinom (HepG2) ble behandlet med sju forskjellige konsentrasjoner av *Astragalus membranicus* (Zang et al., 2019). I dette studiet ble det vist at *mTOR* regulerte *HIF1- α* ekspresjonen. Vår studie samsvarte med dette, idet det var nedregulering av både *HIF1- α* ekspresjon og av *mTOR* ekspresjon (Land and Tee, 2007).

Det var generelt *c-Myc* nedregulering gjennom hele forsøksperioden, med unntak av dag 1, hvor det var økt ekspresjon av *c-Myc* i forhold til kontrollfisk. I vårt forsøk viste plommesekkclarver badbehandlet med astragalus likt reguleringsmønster av *GLUT1* og *c-Myc* gjennom hele forsøksperioden. Det like reguleringsmønsteret samsvarte med konklusjonen til Robey et al., 2008 at *c-Myc* regulerer direkte *GLUT1*. Det har ikke blitt foretatt analyser av *c-Myc* eller *GLUT1* ekspresjon fra fisk stimulert med astragalus rotekstrakt. Derimot er det vist i en studie hvor humane leukemiceller (U937) ble stimulert *in vitro* med fem ulike konsentrasjoner av astragalus at dette førte til nedregulering av *c-Myc* ekspresjon (Jia et al., 2013). Siden *c-Myc*, i denne studien, har vist seg å regulere *GLUT1* transkripsjon var det derfor ikke uventet å se en nedregulering i *GLUT1* ekspresjon i vår studie, hvor *c-Myc* ekspresjonen var nedregulert som følge av badbehandling med astragalus.

Plommesekkclarver badbehandlet med astragalus rotekstrakt viste økt ekspresjon av *IL-1 β* ved dag 1, 4, 9 og 16, og var nedregulert ved dag 2, 32 og 45 etter badbehandling, i forhold til kontrollfisk. Økning i *IL-1 β* transkripsjon etter astragalusbehandling (24 t) ble vist i en studie hvor karper fikk tre ulike doser astragalus polysakkarid (APS) intraperitonealt injisert. Studiet viste økt *IL-1 β* transkripsjon i hodenyre, gjeller og milt etter APS injeksjonen (Yuan et al., 2008). I et annet studie, ble makrofager fra mus (BALB/c) stimulert med *Mycobacterium tuberculosis* pluss varierende konsentrasjoner av astragalus polysakkarid og astragaloside (bestanddel av astragalus). Resultatene viste 5 timer etter tilsetning av stimulantene økt

ekspresjon av *IL-1 β* fra aktiverte makrofager (Xu et al., 2007). Også hos fisk har det blitt vist at ved å administrere astragalus øker ekspresjonen av *IL-1 β* . I denne studien ble Koreansk malle (*Pelteobagrus fulvidraco*) injisert med APS, sammen med vaksine mot edwardsiellose. APS induerte *IL-1 β* ekspresjon mer enn det vaksinen alene gjorde (Zhu et al., 2019).

I likhet med *ATG1/ULK1*, *mTOR* og *HIF1- α* viste plommeseekkyngel badbehandlet med astragalus generelt nedregulert ekspresjon av *SIX1*, i forhold til kontrollfisk, gjennom hele forsøksperioden, med unntak av dag 1 og 4, hvor ekspresjonen av *SIX1* var økt. Dette er ganske likt *GLUT1* ekspresjon, som var nedregulert gjennom hele forsøksperioden, unntatt dag 1. Dette samstemmer med resultatene til Li et al., 2018, som viste at økt *SIX1* ekspresjon induerte økt *GLUT1* ekspresjon.

Resultatene viste at ekspresjonen av *iNOS* for fisk badbehandlet med astragalus rotekstrakt var økt ved dag 4, 9 og 45, og nedregulert ved dag 1, 2, 16 og 32, i forhold til kontrollfisk. I en studie på mus (B6C3F1) og på makrofager cellelinjer fra mus (RAW 264,7) behandlet med astragalus polysakkarid *in vivo* og *in vitro*, ble det funnet at ekspresjonen av *iNOS* var økt 4 timer og forble høy 12 timer etter behandling. Resultatene fra studien indikerte at astragalus rotekstrakt økte ekspresjonen av *iNOS* (Lee and Jeon, 2005). En slik økning ble ikke observert i vårt forsøk, med unntak av dag 4, 9 og 45. Det er i en studie vist at *iNOS* reguleres av *HIF1- α* (Jung et al., 2000), noe som betyr at hvis *HIF1- α* har blitt påvirket av astragalus, så ville kanskje *iNOS* uttrykket også blitt påvirket. En slik sammenheng er vanskelig å se å våre resultater, da det var få signifikante verdier i *iNOS* ekspresjonen, og til dels store standardavvik i analyseverdiene i prøver fra hele forsøksperioden. En annen viktig faktor var at forsøksperioden Lee and Jeon, 2005 strakte seg til kun 12 timer, noe som er i korteste laget hvis en skal sammenligne studiene.

Fisk badbehandlet med astragalus rotekstrakt viste økt ekspresjon av *cathepsin B* ved dag 1, 9 og 32, nedsatt ekspresjon ved dag 2, og 45, mens ekspresjonen av *cathB* ved dag 4 og 16 var så og si uforandret i forhold til kontrollfisk. En studie hvor mus (BALB/c) med CVB3-myokarditt (hjertebetennelse forårsaket av coxackvirus) ble behandlet med carboxymetylcellulose (CMC) og ulike konsentrasjoner astragalosid (bestanddel i astragalus) (i 7 dager) viste at behandling med 9% astragalosid ga signifikant lavere *cathB* ekspresjon enn CMC (Yu et al., 2005). Dette

samsvarer for dag 2 og 45 i våre resultater. Xiaofeng et al., 2018 antydte i denne studien at *cathB* ble regulert av *HIF1- α* . I våre resultater stemmer dette kun for dag 1.

I likhet med andre studier som har vist regulert transkripsjon av metabolismegener induert ved astragalus rotekstrakt, kan vi også konkludere med at badbehandling med astragalus rotekstrakt induerte genreguleringer. Når en ser på hele forsøksperioden, var det generelt nedreguleringer for samtlige av de undersøkte metabolismegenene, med unntak av *IL-1 β* , *iNOS* og *cathepsin B* som hadde varierende genreguleringer.

4.4 Effekt av hyaluronsyre

Det er vist at hyaluronsyre (hyaluronan) oppfører seg som DAMP (damage-associated molecular patterns) og inducerer såkalt steril betennelse. Dette er sentralt ved celledød og vevsødeleggelse- noe som frigjør f.eks. hyaluronan. Hyaluronan binder seg til TLR2/TLR4 hos pattedyr (Gong et al., 2020). TLR4 er ennå ikke oppdaget hos fisk, men sekvensen for TLR2 fins i Genbank, men funksjonen er ikke undersøkt noe videre hos laks.

Plommesekkclarver badbehandlet i hyaluronsyre viste oppregulert ekspresjon av *ATG1/ULK1* ved dag 1, 4, 16, 32 og 45, og nedregulert ekspresjon av *ATG1/ULK1* ved dag 2 og 9 i forhold til kontrollfisk. Ett studie har indikert at hyaluronsyre kan påvirke makroautofagi via flere forskjellige gener og deriblant *ULK1* (Xi et al., 2019). I våre resultater samsvarer dette med dag 1, 4, 16, 32 og 45 etter behandling.

Plommesekkclarver badbehandlet i hyaluronsyre viste økt ekspresjon av *mTOR* ved dag 1, 32 og 45, og nedregulert ekspresjon av *mTOR* ved dag 2, 4, 9 og 16, forhold til kontrollfisk. Park et al., 2008 viste at hyaluronsyre induerte gliomamotilitet (bevegelse av tumor i hjernen) ved å indusere osteopontin (OPN) via *PI3K/AKT/mTOR*-veien (Park et al., 2008). Aktivering av *PI3K/AKT/mTOR*-veien medfører inhibering av *mTOR*, som igjen inducerer til økt ekspresjon av *mTOR* for å oppnå homeostase (Porta et al., 2014). Med utgangspunkt i dette kan en tenkes at badbehandling med hyaluronsyre hadde effekt på *mTOR* ekspresjonen ved dag 1, 32 og 45. Det er ellers lite forskning som undersøker effekt av hyaluronsyre på *mTOR*.

Ekspresjonen av *HIF1- α* viste oppregulering ved dag 1, 16, 32 og 45, nedregulering ved dag 2 og 9, mens ved dag 4 var ekspresjonen av *HIF1- α* så å si uforandret for plommesekkclarver badbehandlet med hyaluronsyre, i forhold til kontrollfisk. Et *in vivo* studie hvor rotter (Sprague-

Dawley) med monoartritt ble behandlet med hyaluronsyre (intra-artikulær injeksjon), viste overekspressjon av både *HIF1- α* , *iNOS* og *MMP3* i synovium (kuleleddvæske f.eks. i albue og kne) (Chou et al., 2011). Slik overekspressjon samsvarer med våre resultater ved dag 1, 16, 32 og 45, selv om det eksperimentelle oppsettet var svært forskjellig.

Ekspressjonen av *c-Myc* var oppregulert ved dag 1, 32 og 45, nedregulert ved dag 2, 4 og 9, og uforandret ved dag 16 for plommesekkclarver badbehandlet med hyaluronsyre, i forhold til kontrollfisk. I en *in vitro* studie hvor humane (U87MG) og murine (mus) (SMA560) gliomaceller (cellelinjer) ble behandlet med hyaluronan viste cellene økt *c-Myc* ekspressjon i både humane og murine gliaceller tre timer etter behandling (Tsatas et al., 2002). Et annet studie viste også at *in vitro* behandling med hyaluronan av murine cellelinje (NIH 3T3) induiserte økt ekspressjon av *c-Myc* tre timer etter behandling (Moon et al., 1998). Disse observasjonene samstemmer med våre resultater selv om de ikke undersøkte transkripsjonen over lang tid (f. eks. dag 1, 32 og 45).

Ekspressjonen av *GLUT1* var ganske lik ekspressjonen av *c-Myc* og *HIF1- α* for plommesekkclarver badbehandlet med hyaluronsyre, med oppregulering ved dag 1, 16, 32 og 45 og nedregulering ved dag 2, 4 og 9 i forhold til kontrollfisk. Et *in vitro* studie, hvor endotelceller fra hornhinnen til kveg ble stimulert med hyaluronsyre, viste at hyaluronsyren ikke stimulerte *GLUT1* ekspressjon (Ishida et al., 1995). Et annet *in vitro* studie hvor differensierte humane stamceller (iPSC-BMEC) med tilstedeværelse av hyaluronidase (fra *Streptomyces* sp) ble behandlet med hyaluronan og hyaluronsyre, viste en svak nedregulering i *GLUT1* ekspressjon (Al-Ahmad et al., 2019). Dag 1, 16, 32 og 45 i våre resultater viser, i likhet med resultatene til Al-Ahmad *et al.*, 2019, nedregulering i ekspressjonen av *GLUT1*.

I forhold til kontrollfisk viste plommesekkclarver badbehandlet med hyaluronsyre nedregulert ekspressjon av *IL-1 β* ved dag 1, 2 og 4, og oppregulert ekspressjon av *IL-1 β* ved dag 9, 16, 32 og 45 etter badbehandling. Et *in vitro* studie hvor *IL-1 β* stimulerte SSF-celler behandlet med ulike konsentrasjoner hyaluronsyre (opptil 48 t) har vist signifikant nedregulert ekspressjonen av *IL-1 β* mRNA (doseavhengig) (Mitsui et al., 2008). Våre resultater viste også nedregulering av *IL-1 β* på dag 1 og 2 etter badbehandling i hyaluronsyre. I et annet studie ble det også vist at behandling *in vitro* med hyaluronsyre (i 24 t) med høy molekylvekt induiserte nedregulering av *IL-1 β* ekspressjon der hvor *IL-1 β* allerede var oppregulert av annet stimuli (Wang et al., 2006).

Plommesekkklarver badbehandlet i hyaluronsyre viste økt ekspresjon av *SIX1* ved dag 1, 16 og 32, og nedregulert ekspresjon av *SIX1* ved dag 2, 4, 9 og 45 etter badbehandling i forhold til kontrollfisk. Ekspresjonen av *SIX1* og *GLUT1* hadde likt reguleringsmønster gjennom hele forsøksperioden, med unntak av dag 45. Det like reguleringsmønsteret antyder at det er en kobling mellom *SIX1* og *GLUT1*, slik som Li et al., 2018 viste. Det er få studier som beskriver effekt av hyaluronsyre på *SIX1* ekspresjon, men det er studier som viser at hyaluronsyre nedregulerer ekspresjonen av *GLUT1*. Nedregulert ekspresjon av *GLUT1* i respons på hyaluronbehandling, vil derfor også kunne gi nedregulert ekspresjon av *SIX1*.

Ekspresjonen av *iNOS* var nedregulert for plommesekkklarver badbehandlet i hyaluronsyre ved dag 1 og 2, og oppregulert ved dag 4, 9, 16, 32 og 45, i forhold til kontrollfisk. I et *in vivo* studie hvor mus ble injisert med blant annet hyaluronsyre med både høy- og lav molekylvekt 40 timer etter injisering av oksygen og zymosan (1%), viste at hyaluronsyre med høy molekylvekt senket *iNOS* mRNA ekspresjon etter 8 timer, og at hyaluronsyre med lavmolekylvekt økte *iNOS* mRNA ekspresjonen (Cabrera et al., 2004). Også Noble *et al.*, 1996 viste dette i en studie på *NF-KB* aktivering av makrofager stimulert med hyaluronsyre med høy og lav molekylvekt. Med utgangspunkt i dette, kan en tenkes at hyaluronsyren vi brukte hadde høy molekylvekt, siden resultatene generelt viste økning i ekspresjonen av *iNOS*. På grunn av høye standardavvik kan en ikke si noe sikkert om *iNOS* ekspresjonen som følge av immunstimulering, men en kan få en indikasjon på at hyaluronsyre har en effekt på ekspresjonen av *iNOS*.

For plommesekkklarver badbehandlet med hyaluronsyre viste ekspresjonen av *cathesin B* ingen forandringer ved dag 1 og 9, nedregulering ved dag 2,4 og 16 og oppregulering på ved 32 og 45 i forhold til kontrollfisk. En *in vitro* studie hvor isolerte kondrocytter (fra humant artikulært bruskev) fra pasienter med osteoartritt ble inkubert på et hyaluronbasert biomateriale (Hyaff®-11) i 28 dager, viste ingen endring i *cathB* ekspresjonen frem til dag 14, hvor det var økt ekspresjon av *cathB* som varte til og med dag 28 (Cavallo et al., 2009). Til sammenligning fikk vi heller ingen endring ved dag 1 og 9 og økning ved dag 32, noe som kan være en vag indikasjon på at *cathB* var påvirket av badbehandling med hyaluronsyre. Få signifikante verdier og relativt store standardavvik gjør det for usikkert å konkludere med om hyaluronsyre hadde noen effekt på *cathB*.

I våre resultater kunne man ikke med sikkerhet si at å badbehandle plommeseckklarver med hyaluronsyre har noen effekt på transkripsjonen av metabolismegenene vi undersøkte, slik andre studier har vist. Imidlertid er det utført lite forskning på virkningen av hyaluronsyre på de metabolismegenene vi har undersøkt, og enda mindre forskning på tilsvarende i fisk.

4.5 Effekt av imiquimod

Imiquimod er et syntetisk TLR/ ligand, mye benyttet innen studier på kreftceller.

Plommeseckklarver badbehandlet med imiquimod viste oppregulering i ekspresjonen av *ATG1/ULK1* ved dag 1, 4, 32 og 45, og nedregulering ved dag 2, 9 og 16 etter badbehandling, i forhold til kontrollfisk. I en studie hvor humant basalcellekarsinom-celler (cellelinje; BCC/KMC-1) ble inkubert med fem ulike doser imiquimod i 12 timer, ble det vist at imiquimod ikke påvirket ekspresjonen av *ULK1* (Wang et al., 2015). Dette samsvarer ikke med våre resultater, da vi fikk både opp- og nedreguleringer i ekspresjonen av *ATG1/ULK1*. I vår studie var fisken badbehandlet med imiquimod i 60 minutter, mens Wang et al., 2015 brukte en behandlingsperiode på 12 timer.

Plommeseckklarver badbehandlet med imiquimod viste økt ekspresjon av *mTOR* ved dag 1 og 45, nedsatt ekspresjon ved dag 2, 4, 9 og 32 og omtrentlig uforandret ekspresjon ved dag 16, i forhold til kontrollfisk. Dette er relativt likt reguleringsmønster som for *HIF1- α* , med unntak av dag 16. Nok en gang fikk vi en indikasjon på at *mTOR* ble regulert av *HIF1- α* , slik Land and Tee, 2007 har vist før (Land and Tee, 2007). I en studie hvor mus (BALB/c) ble daglig behandlet med imiquimod i 14 dager, ble det vist oppregulering i ekspresjonen av *mTOR* (Camcheu et al., 2016). Dette samstemmer ikke med våre resultater, som for det meste viste nedreguleringer for *mTOR*.

Ekspresjonen av *HIF1- α* var for plommeseckklarver badbehandlet med imiquimod oppregulert ved dag 1, 16 og 45 og nedregulert ved dag 2, 4, 9, og 32, i forhold til kontroll. I en studie hvor forskjellige svulstceller (BCC, SCC12, HeLa, MeWo og B16F10) ble behandlet med imiquimod (50 μ g/ml) i 1, 2, 4, 8, og 12 dager, ble det vist at imiquimod forårsaket økt ekspresjon av *HIF1- α* (Huang et al., 2014). Dette samsvarer kun ved dag 1, 16 og 45 i våre resultater, mens vi fikk motsatt effekt (nedregulering) i resten av forsøksperioden. En grunn til dette kan være at imiquimod-konsentrasjonen Huang *et al.*, 2014 brukte var 50 μ g/ml i en

periode på 12 dager, mens vi brukte 1mg/ml i 60 minutter. Generelt er det å sammenligne andres *in vitro* forsøk, ofte med bruk av cellelinjer, med vårt *in vivo* forsøk vanskelig.

Ekspresjonen av *c-Myc* viste oppregulering ved dag 1 og 45, og nedregulering ved dag 2, 4, 9, og 32 for plommesekkclarver badbehandlet med imiquimod, i forhold til kontrollfisk. I en studie hvor både humane (T24) og murine (MBT-2) blærekreftceller ble behandlet *in vitro* med imidazoquinoline (imiquimod), ble det vist nedregulering i ekspresjonen av *c-Myc*. *c-Myc* ekspresjonen ble også nedregulert da de i samme studie behandlet mus (C3H) med imidazoquinoline (Liu et al., 2008). Dette samstemte godt med våre resultater, unntatt for dag 1 og 45, hvor ekspresjonen av *c-Myc* var oppregulert.

Plommesekkclarver badbehandlet med imiquimod viste oppregulert ekspresjon av *GLUT1* ved dag 1 og 45, og nedregulert ekspresjon ved dag 2, 4, 9, 16 og 32, i forhold til kontrollfisk. I en studie hvor mus med psoriasiform hyperplasi (hudsykdom som gir betennelse og økt antall celler i huden) ble behandlet med imiquimod direkte på huden, ble det vist at imiquimod induerte oppregulering av *GLUT1* ekspresjon (Zhang et al., 2018). Dette samsvarte kun ved dag 1 og 45 i våre resultater. Zhang et al., 2018 brukte en behandlingsperiode på 5 dager med daglig behandling. Vi behandlet fisken 1 gang i 60 minutter, så behandlingsperioden kan være en grunn til at resultatene fra studiene ikke kan sammenlignes.

Ekspresjonen av *IL-1 β* viste for plommesekkclarver badbehandlet med imiquimod oppregulering ved dag 9 og 45, nedregulering ved dag 1, 2, 4 og 32 og var uforandret ved dag 16 i forhold til kontrollfisk. En studie hvor mus (BALB/c) ble behandlet med imiquimod direkte på huden hver dag i ti dager, viste oppregulert *IL-1 β* ekspresjon (Sun et al., 2013). Våre resultater samsvarte ikke med dette. Forskjellig behandlingstid og konsentrasjon av imiquimod kan være en faktor som spiller inn. I vårt forsøk ble fisken behandlet med imiquimod (1mg/ml) én gang i 60 minutter, i motsetning til Sun *et al.*, 2013, som brukte 20 mg/cm² daglig i 10 dager.

Plommesekkclarver badbehandlet med imiquimod viste oppregulering av *SIX1* ekspresjonen ved dag 1 og 32, nedregulering av *SIX1* ekspresjon ved dag 2, 4, og 9, og viste uforandret *SIX1* ekspresjon ved dag 16 og 45, i forhold til kontrollfisk. Ekspresjonen av *SIX1* hadde likt reguleringsmønster som *GLUT1* fram til og med dag 9. Dette samstemmer med resultatene til Li *et al.*, 2018, som viste at økt *SIX1* ekspresjon induerte økt *GLUT1* ekspresjon. Dette igjen

kan gi en indikasjon på at imiquimod har forårsaket nedregulering i både *GLUT1* og *SIX1* ekspresjon.

iNOS ekspresjonen for plommesekkklarver badbehandlet med imiquimod viste oppregulering ved dag 9 og 45, nedregulering ved dag 1, 2 og 32 og viste uforandret *iNOS* ekspresjon ved dag 4, og 16 i forhold til kontrollfisk. I en studie hvor mus (BALB/c) injisert med svulstceller, ble det vist økt ekspresjon av *iNOS* etter behandling med imiquimod (Ito et al., 2015). Blant våre resultater var det kun dag 9 og 45 som samsvarte med dette. Relativt høye standardavvik og få signifikante verdier i våre resultater gjør det vanskelig å anta noe om virkning av imiquimod på *iNOS* ekspresjon.

Plommesekkklarver badbehandlet med imiquimod viste oppregulert ekspresjon av *cathB* ved dag 45, og nedregulert ekspresjon av *cathB* ved dag 1, 2, 4, 9, 16 og 32 i forhold til kontrollfisk. I en studie hvor B-cellelinjer (M12) ble aktivert via CpG-B-indusert *NF-KB* og deretter introdusert for TLR7-liganden loxoribine (TLR7 agonist lik imiquimod) i 24 timer, ble det vist at cystein-protease aktivitet fra cathepsiner kunne være nødvendig for B-cellerespons til TLR7 (Matsumoto et al., 2008). Derfor vil det ikke være unaturlig å mistenke at *cathB* ekspresjonen går opp ved stimulering med imiquimod. Dette samstemte imidlertid ikke med våre resultater som heller tydet på at imiquimod ga nedregulering i *cathB* ekspresjonen.

I våre resultater kunne man si at å badbehandle plommesekkkyngel med imiquimod hadde negativ effekt på transkripsjonen av de fleste metabolismegenene vi undersøkte, i motsetning til andre studier på imiquimod, som har vist positiv effekt på transkripsjonen. Det er utført lite forskning på virkningen av imiquimod på metabolismegenene vi har undersøkt, og det meste av forskningen som er gjort har brukt andre konsentrasjoner og behandlingstider enn det vi har brukt.

4.6 Feilkilder

Fisk i kontrollgruppen ble ikke badbehandlet. Badbehandling kan ha ført til en stressreaksjon og dermed endret genuttrykk, som igjen kunne påvirket resultatene. En kan se en nedregulering i genuttrykk ved dag 2 for de fleste metabolismegenene i alle forsøksgruppene vi undersøkte, med unntak av kontrollgruppen. Vi vet ikke om denne nedreguleringen skyldtes immunstimulantene eller en evt. stressreaksjon. For å kunne si at det var en stressreaksjon, skulle man målt kortisol nivå i larvene, noe som ikke ble gjort. Det er bekreftet at akutt stress induserer fysiologiske endringer hos laks (parr og smolt) hvor det er vist at normalnivået etter stress var oppnådd etter 1 dag (Carey and McCormick, 1998). Det er imidlertid funnet indikasjoner på at nylig klekkede plommeseckklarver av regnbueørret var relativt resistent mot stress (målt som kortisol produksjon), kalt hyporesponsivitet over stress. Fenomenet er også kjent hos gnagere (Kloet et al., 1988).

Vi undersøkte genuttrykket til kun 6 plommeseckklarver i hver gruppe fra hver dag. Det er mulig at vi kunne fått et annet resultat hvis vi hadde analysert genuttrykk fra flere plommeseckklarver. Også individuell variasjon i responsen ovenfor immunstimulantene kan ha påvirket resultatene. Det ideelle hadde vært om vi kunne tatt prøver fra den samme fisken gjennom hele forsøksperioden, for å unngå individuelle variasjoner.

Det er mulig at mer enn kun plommeseck, haleparti, og for noen ryggmuskulatur, ble kuttet bort siden plommeseckklarvene var svært små (1-2 cm). Dette kan ha medført at organer hvor metabolismegenene blir uttrykt kan ha blitt kuttet bort. Dette ville også ha påvirket resultatene.

En skal ikke se bort fra at prøvene kan ha blitt forvekslet med hverandre under RNA-ekstraksjon og under qPCR-analysen. Forveksling av prøver kan føre til at resultatene blir ført på feil grunnlag.

Det er også mulig at det er pipetterte ulike volum i qPCR-analysen, (gjelder all pipettering) noe som kan ha ført til store standardavvik, dermed lavere signifikans. Det er to personer som har pipettert og de kan ha forskjellige pipetteringsteknikker, noe som kan ha ført til forskjellig pipetteringsvolum.

5 Konklusjon

- Badbehandling med kitosan (i hvert fall ved konsentrasjonen vi brukte) er å fraråde, da dette forårsaket flokkulering på plommesekkklarvene og mulig tettet gjellene slik at fisken ble kvelt.
- Badbehandling med poly I:C induserte genreguleringer på samtlige av de undersøkte metabolismegenene, noe som indikerte at poly I:C har en effekt på metabolismen til plommesekkklarver.
- Badbehandling med astragalus rotekstrakt induserte også genreguleringer for samtlige av de undersøkte metabolismegenene, noe som indikerte at også astragalus rotekstrakt har en effekt på metabolismen til plommesekkklarver.
- Badbehandling med hyaluronsyre gav for usikre resultater til å trekke konklusjon om effekt på metabolismen til plommesekkklarver.
- Badbehandling med imiquimod induserte genreguleringer hos samtlige av de undersøkte metabolismegenene, noe som indikerte at imiquimod kan ha en effekt på metabolismen til plommesekkklarver.

6 Tanker til videre arbeid

- Det kan være interessant å utføre samme forsøk (uten kitosan) igjen, bare over en lengre periode for å se om fisken får endringer i vekstutvikling og sykdomsbeskyttelse, og om andre gener får endringer i transkripsjonen.
- En kan også bruke samme forsøksoppsett, bare med varierende behandlingstid og konsentrasjoner av immunstimulanter for å se hvilke konsentrasjoner og behandlingstider som gir best effekt på transkripsjon av metabolismegener.
- Vi undersøkte effekten immunstimulering hadde på metabolismegener i plommesekklarver. Det vil være interessant å også undersøke immunologiske gener på samme måte, etter en slik stimulering.

7 Referanser

- AL-AHMAD, A., PATEL, R., PALECEK, S. & SHUSTA, E. 2019. Hyaluronan impairs the barrier integrity of brain microvascular endothelial cells through a CD44-dependent pathway. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the international Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 39, 1759-1775.
- ANDERSON, D. P. & SIWICKI, A. K. 1994. Duration of Protection against *Aeromonas salmonicida* in Brook Trout Immunostimulated with Glucan or Chitosan by Injection or Immersion. *The progressive Fish-Cultuist*, 56, 258-261.
- AUYEUNG, K. K., MOK, N., WONG, C., CHO, C. & KO, J. K. 2010. Astragalus saponins modulate mTOR and ERK signaling to promote apoptosis through the extrinsic pathway in HT-29 colon cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 26, 341-349.
- AVUNJE, S. & JUNG, S. J. 2017. Poly (I:C) and imiquimod induced immune responses and their effects on the survival of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) from viral haemorrhagic septicaemia. *Fish Shellfish Immunol*, 71, 338-345.
- BAHUAUD, D., MORKORE, T., LANGSRUD, O., SINNES, K., VEISETH, E., OFSTAD, R. & THOMASSEN, M. S. 2008. Effects of -1.5 degrees C Super-chilling on quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) pre-rigor Fillets: Cathepsin activity, muscle histology, texture and liquid leakage. *Food Chem*, 111, 329-39.
- BESSARAB, D. A., CHONG, S. W., SRINIVAS, B. P. & KORZH, V. 2008. Six1a is required for the onset of fast muscle differentiation in zebrafish. *Dev Biol*, 323, 216-28.
- BONE, Q. & MOORE, R. H. 2008. *Biology of fishes*, New York, Taylor & Francis.
- BRADEN, L. M., BARKER, D. E., KOOP, B. F. & JONES, S. R. 2012. Comparative defense-associated responses in salmon skin elicited by the ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis*. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 7, 100-9.
- BRICKNELL, I. & DALMO, R. A. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 19, 457-472.
- CABRERA, P., BLANCO, G., ALANIZ, L., GREZANIK, S., GARCIA, M., ALVAREZ, E. & HAJOS, S. 2004. CD44 and hyaluronic acid regulate in vivo iNOS expression and metalloproteinase activity in murine air-pouch inflammation. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society*, 53, 556-566.
- CAMCHEU, J., CHAVES-RODRIGUEZ, M., ADHAMI, V., SIDDIQUI, I., WOOD, G., LONGLEY, B. & MUKHTAR, H. 2016. Upregulation of PI3K/AKT/mTOR, FABP5 and PPAR β/δ in Human Psoriasis and Imiquimod-induced Murine Psoriasisiform Dermatitis Model. *Acta Derm Venereol*, 96, 854-856.
- CAREY, J. B. & MCCORMICK, S. D. 1998. Atlantic salmon smolts are more responsive to an acute handling and confinement stress than parr. *Aquaculture*, 168, 237-253.
- CAVALLO, C., DESANDO, G., FACCHINI, A. & GRIGOLO, B. 2009. Chondrocytes from patients with osteoarthritis express typical extracellular matrix molecules once grown onto a three - dimensional hyaluronan - based scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 93A.
- CHAN, E. Y. & TOOZE, S. A. 2009. Evolution of Atg1 function and regulation. *Autophagy*, 5, 758-765.

- CHANG, C. J., GU, J. & ROBERTSEN, B. 2017. Protective effect and antibody response of DNA vaccine against salmonid alphavirus 3 (SAV3) in Atlantic salmon. *Journal of Fish Diseases*, 40, 1775-1781.
- CHOU, L., WANG, J., CHANG, P. & HSIEH, Y. 2011. Hyaluronan modulates accumulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinase-3 in the synovium of rat adjuvant-induced arthritis model. *Arthritis research and therapy*, 13.
- GENG, X., DONG, X. H., TAN, B. P., YANG, Q. H., CHI, S. Y., LIU, H. Y. & LIU, X. Q. 2011. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish Shellfish Immunol*, 31, 400-6.
- GONG, T., JIANG, W. & ZHOU, R. 2020. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*, 20, 95–112.
- HAN, S., XU, W., WANG, Z., QI, X., WANG, Y., NI, Y., SHEN, H., HU, Q. & HAN, W. 2016. Crosstalk between the HIF-1 and Toll-like receptor/nuclear factor-kappaB pathways in the oral squamous cell carcinoma microenvironment. *Oncotarget*, 7, 37773-37789.
- HAY, N. & SONENBERG, N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Development*, 18, 1926-45.
- HE, J., YU, Y., QIN, X., ZENG, R., WANG, Y., LI, Z., MI, S., WENG, S., GUO, C. & HE, J. 2019. Identification and functional analysis of the Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) hypoxia-inducible factor-1 α involved in the immune response. *Fish & Shellfish Immunology*, 92, 141-150.
- HOTANI, T., TACHIBANA, M., MIZUGUCHI, H. & SAKURAI, F. 2015. Reovirus double-stranded RNA genomes and polyI:C induce downregulation of hypoxia-inducible factor 1a. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 460, 1041-1046.
- HU, B., CHEN, B., MAO, M., CHEN, M., LIU, X., CUI, Q., LIU, Y. & JIANG, C. 2018a. Molecular characterization and expression analysis of the interleukin 1b gene in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*). *DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY*, 88, 213-218.
- HU, Y., MAISEY, K., SUBRAMANI, P., LIU, F., FLORES-KOSSACK, C., IMARI, M., SECOMBES, C. J. & WANG, T. 2018b. Characterisation of rainbow trout peripheral blood leucocytes prepared by hypotonic lysis of erythrocytes, and analysis of their phagocytic activity, proliferation and response to PAMPs and proinflammatory cytokines. *DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY*, 88, 104-113.
- HUANG, S., KAO, J., WU, C., WANG, S., LEE, H., LIANG, S., CHEN, Y. & SHIEN, J. 2014. Targeting aerobic glycolysis and HIF-1alpha expression enhance imiquimod-induced apoptosis in cancer cells. *Oncotarget*, 5, 1363-1381.
- ISHIDA, K., YAMASHITA, H., KATAGIRI, H. & OKA, Y. 1995. Regulation of glucose transporter 1 (GLUT1) gene expression by epidermal growth factor in bovine corneal endothelial cells. *Japanese journal of ophthalmology*, 39, 225-232.
- ITO, H., ANDO, T., OGISO, H. & SEISHIMA, M. 2015. Inhibition of induced nitric oxide synthase enhances the anti-tumor effects on cancer immunotherapy using TLR7 agonist in mice. *Cancer immunology, immunotherapy : CII.*, 64, 429-436.
- JENSEN, I., ALBUQUERQUE, A., SOMMER, A. I. & ROBERTSEN, B. 2002. Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immunol*, 13, 311-26.

- JENSEN, I., OVERREIN, M. C., FREDRIKSEN, B. N., STRANDSKOG, G. & SETERNES, T. 2019. Differences in smolt status affect the resistance of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against infectious pancreatic necrosis, while vaccine-mediated protection is unaffected. *J Fish Dis*, 42, 1271-1282.
- JIA, X. H., YIN, B. H. & LI, J. C. 2013. [Effect of astragalus injection on U937 leukemia cells proliferation and apoptosis and relevant molecular mechanisms]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 15, 1128-33.
- JOHANSEN, L. H., DAHLE, M. K., WESSEL, O., TIMMERHAUS, G., LOVOLL, M., ROSAEG, M., JORGENSEN, S. M., RIMSTAD, E. & KRASNOV, A. 2016. Differences in gene expression in Atlantic salmon parr and smolt after challenge with Piscine orthoreovirus (PRV). *Mol Immunol*, 73, 138-50.
- JUNG, C. H., RO, S. H., CAO, J., OTTO, N. M. & KIM, D. H. 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*, 584, 1287-95.
- JUNG, F., PALMER, L., ZHOU, N. & JOHNS, R. 2000. Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circulation research*, 86, 319-25.
- KLOET, E. R. D., ROSENFELD, P., EKELEN, J. A. M. V., SUTANTO, W. & LEVINE, S. J. 1988. Stress, glucocorticoids and development. *Progress in Brain Research*, 73, 101-120.
- KONO, T., BISWAS, G., FALL, J., T., M., HIKIMA, J., ITAMI, T. & M., S. 2015. Adjuvant effects of poly I:C and imiquimod on the immunization of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) with a recombinant protein, VP28 against white spot syndrome virus. *Aquaaculture*, 446, 249-256.
- KUMAR, A., ZHANG, J. & YU, F. S. 2006. Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C)-induced antiviral response in human corneal epithelial cells. *Immunology*, 117, 11-21.
- LAND, S. C. & TEE, A. R. 2007. Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem*, 282, 20534-43.
- LAURENT, T. C. & FRASER, J. R. 1992. Hyaluronan. *FASEB J*, 6, 2397-404.
- LEE, K. Y. & JEON, Y. J. 2005. Macrophage activation by polysaccharide isolated from *Astragalus membranaceus*. *International immunopharmacology*, 5, 1225 - 1233.
- LEMOS, D. R., MCMURDO, M., KARACA, G., WILFLINGSSEDER, J., LEAF, I. A., GUPTA, N., MIYOSHI, T., SUSA, K., JOHNSON, B. G., SOLIMAN, K., WANG, G., MORIZANE, R., BONVENTRE, J. V. & DUFFIELD, J. S. 2018. Interleukin-1beta Activates a MYC-Dependent Metabolic Switch in Kidney Stromal Cells Necessary for Progressive Tubulointerstitial Fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 29, 1690-1705.
- LI, L., LIANG, Y., KANG, L., LIU, Y., GAO, S., CHEN, S., LI, Y., YOU, W., DONG, Q., HONG, T., YAN, Z., JIN, S., WANG, T., ZHAO, W., MAI, H., HUANG, J., HAN, X., JI, Q., SONG, Q., YANG, C., ZHAO, S., XU, X. & YE, Q. 2018. Transcriptional Regulation of the Warburg Effect in Cancer by SIX1. *Cancer Cell*, 33, 368-385 e7.
- LIN, L. L., HUANG, C. C., WU, C. L., WU, M. T., HSU, W. M. & CHUANG, J. H. 2016. Downregulation of c-Myc is involved in TLR3-mediated tumor death of neuroblastoma xenografts. *Laboratory Investigation*, 96, 719-730.
- LIU, H., SCHWARTZ, M. J., HWANG, D. H. & SCHERR, D. S. 2008. Tumour growth inhibition by an imidazoquinoline is associated with c - Myc down - regulation in urothelial cell carcinoma. *BJU international*, 101.

- LOCKHART, K., BOWDEN, T. J. & ELLIS, A. E. 2004. Poly I:C-induced Mx responses in Atlantic salmon parr, post-smolts and growers. *Fish Shellfish Immunol*, 17, 245-54.
- LUO, L., LU, J., WANG, Q., CHEN, S., XU, A. & YUAN, S. 2018. Autophagy participates in innate immune defense in lamprey. *Fish Shellfish Immunol*, 83, 416-424.
- MAGNIFICO, M. C., MACONE, A., MARANI, M., BOUZIDI, A., GIARDINA, G., RINALDO, S., CUTRUZZOLA, F. & PAONE, A. 2019. Linking Infection and Prostate Cancer Progression: Toll-like Receptor3 Stimulation Rewires Glucose Metabolism in Prostate Cells. *Anticancer Res*, 39, 5541-5549.
- MATHAI, B. J., MEIJER, A. H. & SIMONSEN, A. 2017. Studying Autophagy in Zebrafish. *Cells*, 6.
- MATRONE, C., PIGNATARO, G., MOLINARO, P., IRACE, C., SCORZIELLO, A., DI RENZO, G. F. & ANNUNZIATO, L. 2004. HIF-1alpha reveals a binding activity to the promoter of iNOS gene after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Neurochem*, 90, 368-78.
- MATSUMOTO, F., SAITOH, S., FUKUI, R., KOBAYASHI, T., TANIMURA, N., KONNO, K., KUSUMOTO, Y., AKASHI-TAKAMURA, S. & MIYAKE, K. 2008. Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 267, 693-699.
- MIDTLYNG, P. J., REITAN, L. J. & SPIELBERG, L. 1996. Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*L.) against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 6, 335-350.
- MITSUMI, Y., GOTOH, M., YMADA, T., HIGUCHI, F. & NAGATA, K. 2008. Hyaluronic acid inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines and cyclooxygenase-2/prostaglandin E(2) production via CD44 in interleukin-1-stimulated subacromial synovial fibroblasts from patients with rotator cuff disease. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.*, 26, 1032-1037.
- MIZUSHIMA, N. 2010. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 22, 132-9.
- MOON, S. O., LEE, J. H. & KIM, J. 1998. Changes in the expression of c-myc, RB and tyrosine-phosphorylated proteins during proliferation of NIH 3T3 cells induced by hyaluronic acid. *Experimental and Molecular Medicine*, 30, 29-33.
- NAIM, R., SAIF, U. R. & JONG-IN, H. 2013. Rapid harvesting of freshwater microalgae using chitosan. *Process Biochemistry*, 48, 1107-1110.
- NOBLE, P. W., MCKEE, C. M., COWMAN, M. & SHIN, H. S. 1996. Hyaluronan fragments activate an NF-kappa B/I-kappa B alpha autoregulatory loop in murine macrophages. *J Exp Med*, 183, 2373-8.
- OLSVIK, P. A., VIKESA, V., LIE, K. K. & HEVROY, E. M. 2013. Transcriptional responses to temperature and low oxygen stress in Atlantic salmon studied with next-generation sequencing technology. *BMC Genomics*, 14, 817.
- PARK, J., KWAK, H. & LEE, S. 2008. Role of hyaluronan in glioma invasion. *Cell adhesion and migration* 2, 202-207.
- PERRY, C. M. & LAMB, H. M. 1999. Topical imiquimod: a review of its use in genital warts. *Drugs*, 58, 375-90.
- PORTA, C., PAGLINO, C. & MOSCA, A. 2014. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Frontiers in Oncology*, 4.
- RAIDA, M. K. & BUCHMANN, K. 2007. Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: Effects of temperature on protection and gene expression. *Vaccine*, 26, 1050-1062.

- RALDUA, D., FABRA, M., BOZZO, M. G., WEBER, E. & CERDA, J. 2006. Cathepsin B-mediated yolk protein degradation during killifish oocyte maturation is blocked by an H⁺-ATPase inhibitor: effects on the hydration mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290, R456-66.
- RAOUDI, D. M., TRANCHEPAIN, F., DESCHREVEL, B., VINCENT, J. C., BOGDANOWICZ, P., BOUMEDIENE, K. & PUJOL, J. P. 2008. Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: Relation to wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16, 274-287.
- REDDICK, J. I., GOOSTREY, A. & SECOMBES, C. J. 2006. Cloning of iNOS in the small spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*). *Dev Comp Immunol*, 30, 1009-22.
- ROBEY, I. F., STEPHEN, R. M., BROWN, K. S., BAGGETT, B. K., GATENBY, R. A. & GILLIES, R. J. 2008. Regulation of the Warburg effect in early-passage breast cancer cells. *Neoplasia*, 10, 745-56.
- RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S., MARIN-HERNANDEZ, A., GALLARDO-PEREZ, J. C., PACHECO-VELAZQUEZ, S. C., BELMONT-DIAZ, J. A., ROBLEDO-CADENA, D. X., VARGAS-NAVARRO, J. L., CORONA DE LA PENA, N. A., SAAVEDRA, E. & MORENO-SANCHEZ, R. 2019. Transcriptional Regulation of Energy Metabolism in Cancer Cells. *Cells*, 8.
- SAKAI, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172, 63-92.
- SEON, H. C., JUNG, S. L., CHOON, B. S., KYEONG, J. L. & YOU, J. J. 2008. Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 278, 110-118.
- SHANAKA, K. S. S. N., NERANJAN THARUKA, M. D., SELLATHTHUARI, S., YANG, H. & PRIATHILAKA, T. T. 2020. Characterization and expression analysis of rockfish (*Sebastes schlegelii*) myeloid differentiation factor-88 (SsMyD88) and evaluation of its ability to induce inflammatory cytokines through NF-κB. *Fish & Shellfish Immunology*, 99, 59-72.
- SHIN, W. J., NOH, H. J., NOH, Y. W., KIM, S., UM, S. H. & LIM, Y. T. 2017. Hyaluronic acid-supported combination of water insoluble immunostimulatory compounds for anti-cancer immunotherapy. *Carbohydr Polym*, 155, 1-10.
- SOLBERG, M. F., FJELLDAL, P. G., NILSEN, F. & GLOVER, K. A. 2014. Hatching time and alevin growth prior to the onset of exogenous feeding in farmed, wild and hybrid Norwegian Atlantic salmon. *PLoS One*, 9, e113697.
- SOLENG, M., JOHANSEN, L. H., JOHNSEN, H., JOHANSSON, G. S., BREILAND, M. W., RORMARK, L., PITTMAN, K., PEDERSEN, L. F. & LAZADO, C. C. 2019. Atlantic salmon (*Salmo salar*) mounts systemic and mucosal stress responses to peracetic acid. *Fish Shellfish Immunol*, 93, 895-903.
- STANLEY, M. A. 2002. Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clin Exp Dermatol*, 27, 571-7.
- SUN, J., ZHAO, Y. & HU, J. 2013. Curcumin inhibits imiquimod-induced psoriasis-like inflammation by inhibiting IL-1beta and IL-6 production in mice. *PLoS One*, 8.
- TANEKHY, M. & SAKI, M. 2019. Inflammatory cytokines responses of common carp, *Cyprinus carpio*, leucocytes in vitro treated by immunostimulants. *IRANIAN JOURNAL OF FISHERIES SCIENCES*, 18, 847-861.
- TING, L., YU, Z., KWANG, S. K. & HEPING, Y. 2015. Interactions between Myc and Mediators of Inflammation in Chronic Liver Diseases. *Mediators Inflammation*, 2015, 12 pages.

- TSATAS, D., KANAGUSUNDARAM, V., KAYE, A. & NOVAK, U. 2002. EGF receptor modifies cellular responses to hyaluronan in glioblastoma cell lines. *Journal of Clinical Neuroscience*, 9, 282-288.
- ULVESTAD, J. S., KUMARI, J., SETERNES, T., CHI, H. & DALMO, R. A. 2018a. Studies on the effects of LPS, ss-glucan and metabolic inhibitors on the respiratory burst and gene expression in Atlantic salmon macrophages. *J Fish Dis*, 41, 1117-1127.
- ULVESTAD, J. S., KUMARI, J., SETERNES, T., CHI, H. & DALMO, R. A. 2018b. Studies on the effects of LPS, β - glucan and metabolic inhibitors on the respiratory burst and gene expression in Atlantic salmon macrophages. *Journal of Fish Diseases*, 41, 1117-1127.
- WANG, C., LIN, Y., LIN, Y. & HOU, S. 2006. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*., 14, 1237-47.
- WANG, S. & CHEN, J. 2005. The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 19, 191-204.
- WANG, S., HUANG, S., LIANG, S., CHEN, Y., CHEN, Y., WU, C. & SHIEH, J. 2015. Imiquimod-induced AMPK activation causes translation attenuation and apoptosis but not autophagy. *journal of dermatological science*., 72, 108-116.
- WANG, Y., ABEL, K., LANTZ, K., KRIEG, A. M., MCCHESENEY, M. B. & MILLER, C. J. 2005. The Toll-like receptor 7 (TLR7) agonist, imiquimod, and the TLR9 agonist, CpG ODN, induce antiviral cytokines and chemokines but do not prevent vaginal transmission of simian immunodeficiency virus when applied intravaginally to rhesus macaques. *J Virol*, 79, 14355-70.
- WEI, W., XIAO, H. T., BAO, W. R., MA, D. L., LEUNG, C. H., HAN, X. Q., KO, C. H., LAU, C. B., WONG, C. K., FUNG, K. P., LEUNG, P. C., BIAN, Z. X. & HAN, Q. B. 2016. TLR-4 may mediate signaling pathways of Astragalus polysaccharide RAP induced cytokine expression of RAW264.7 cells. *J Ethnopharmacol*, 179, 243-52.
- WEI, X., AI, K., LI, H., ZHANG, Y., LI, K. & YANG, J. 2019. Ancestral T Cells in Fish Require mTORC1-Coupled Immune Signals and Metabolic Programming for Proper Activation and Function. *Journal of Immunology*, 203, 1172-1188.
- XI, J., TING, T. L., XUE, L. & DAN, L. 2019. Effect of hyaluronic acid: Mechanistic investigations via topological and functional analysis of its protein interaction network. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 18, 1919-1025.
- XIAOFEI, C., YANQING, L., DONGKAI, Z., DONG, C., FENG, Z. & WEILIN, W. 2018. Identification of cathepsin B as a novel target of hypoxia-inducible factor-1-alpha in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 503, 1057-1062.
- XU, H., YOU, C., ZHANG, R., GAO, P. & WANG, Z. 2007. Effects of Astragalus Polysaccharides and Astragalosides on the Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by Macrophages. *Journal of International Medical Research*, 35, 84-90.
- YAN, J., GUO, C., DAWOOD, M. A. O. & GAO, J. 2017. Effects of dietary chitosan on growth, lipid metabolism, immune response and antioxidant-related gene expression in *Misgurnus anguillicaudatus*. *Beneficial Microbes*, 8, 439-449.
- YANG, Q., LIU, R., YU, Q., BI, Y. & LIU, G. 2019. Metabolic regulation of inflammasomes in inflammation. *Immunology*, 157, 95-109.
- YIN, G., ARDO, L., THOMPSON, K. D., ADAMS, A., JENEY, Z. & JENEY, G. 2009. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response

- of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol*, 26, 140-5.
- YIN, Y., LU, L., WANG, D., SHI, Y., WANG, M., HUANG, Y., CHEN, D., DENG, C., CHEN, J., LV, P., WANG, Y., LI, C., WEI, W. & LB. 2015. Astragalus Polysaccharide Inhibits Autophagy and Apoptosis from Peroxide-Induced Injury in C2C12 Myoblasts. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 73, pages433–439.
- YU, X., LI, S., ZHANG, X., WANG, S., CHEN, R. & YANG, Y. 2005. Effect of Astragaloside on Myocardial Cathepsin B mRNA Expression in Viral Myocarditic Mice. *Journal of Applied Clinical Pediatrics*, 07.
- YUAN, C., PAN, X., GONG, Y., XIA, A., WU, G., TANG, J. & HAN, X. 2008. Effects of Astragalus polysaccharides (APS) on the expression of immune response genes in head kidney, gill and spleen of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *International immunopharmacology*, 8, 51-58.
- ZANG, W., BIAN, H., HUANG, X., YIN, G., ZHANG, C., HAN, L., HAO, P., DING, S., SUN, Y., YANG, Z., HOFFMAN, R. & TANG, D. 2019. Traditional Chinese Medicine (TCM) Astragalus Membranaceus and Curcuma Wenyujin Promote Vascular Normalization in Tumor-derived Endothelial Cells of Human Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res*, 39, 2739-2747.
- ZHANG, F. T., ZHANG, Y. B., CHEN, Y. D., ZHU, R., DONG, C. W., LI, Y. Y., ZHANG, Q. Y. & GUI, J. F. 2008. Expressional induction of *Paralichthys olivaceus* cathepsin B gene in response to virus, poly I:C and lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol*, 25, 542-9.
- ZHANG, Q., JIANG, J., LI, S. & ZHONG, X. 2009a. Effect of a Chinese herbal formula Astragalus immunomodulator on immune function of chickens. *Frontiers of Agriculture in China*, 3, 209–215.
- ZHANG, X., WANG, Y., HU, W., LI, D., ZHOU, Z., PAN, D., WU, W. & XU, T. 2014. Interleukin-1/toll-like receptor-induced nuclear factor kappa B signaling participates in intima hyperplasia after carotid artery balloon injury in goto-kakizaki rats: a potential target therapy pathway. *PLoS One*, 9, e103794.
- ZHANG, Z. B., SWAIN, T., BOGWALD, J., DALMO, R. A. & KUMARI, J. 2009b. Bath immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry induces enhancement of inflammatory cytokine transcripts, while repeated bath induce no changes. *Fish & Shellfish Immunology*, 26, 677-684.
- ZHANG, Z. B., ZI, Z., LEE, E. E., ZHAO, J., CONTRERAS, D. C., SOUTH, A. P., ABEL, E. D., CHONG, B. F., VANDERGRIF, T., HOSLER, G. A., SCHERER, P. E., METTLER, M., RATHMELL, J. C., DEBARARDINIS, R. J. & WANG, R. C. 2018. Differential Glucose Requirement in Skin Homeostasis and Injury Identifies a Therapeutic Target for Psoriasis. *Nature Medicine*, 24, 617–627.
- ZHAO, J., BENAKANAKERE, M. R., HOSUR, K. B., GALICIA, J. C., MARTIN, M. & KINANE, D. F. 2010. Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates TLR3 induced cytokines in human oral keratinocytes. *Mol Immunol*, 48, 294-304.
- ZHU, L. Y., NIE, L., ZHU, G., XIANG, L. X. & SHAO, J. Z. 2013. Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Dev Comp Immunol*, 39, 39-62.
- ZHU, W., ZHANG, Y., ZHANG, J., YUAN, G., LIU, X., AI, T. & SU, J. 2019. Astragalus polysaccharides, chitosan and poly(I:C) obviously enhance inactivated *Edwardsiella ictaluri* vaccine potency in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 379-385.

8 Appendiks

Tabell 7: Gjennomsnittlige Ct-verdier for ATG1/ULK1 fra alle grupper for alle dagene.

	Kontroll	Poly I:C	Astragalus	Hyaluronsyre	Imiquimod
Dag 1	30,995	30,191	30,742	30,381	29,793
Dag 2	29,924	29,345	29,356	29,309	29,253
Dag 4	32,252	31,811	32,571	32,564	31,991
Dag 9	28,408	28,334	29,182	29,657	28,877
Dag 16	28,808	29,395	30,361	29,474	29,313
Dag 32	29,739	29,398	28,877	28,575	29,806
Dag 45	30,592	29,439	29,607	29,276	29,422

Tabell 8: Gjennomsnittlige Ct-verdier for mTOR fra alle grupper for alle dagene.

	Kontroll	Poly I:C	Astragalus	Hyaluronsyre	Imiquimod
Dag 1	28,605	28,392	28,029	27,803	26,878
Dag 2	27,447	26,755	26,708	26,707	26,737
Dag 4	27,301	26,784	27,542	27,505	26,788
Dag 9	26,595	26,448	27,089	27,571	26,776
Dag 16	26,534	27,271	28,153	27,484	26,955
Dag 32	27,829	27,607	27,191	27,015	28,849
Dag 45	29,277	27,909	28,159	27,884	27,733

Tabell 9: Gjennomsnittlige Ct-verdier for C-Myc fra alle grupper for alle dagene.

	Kontroll	Poly I:C	Astragalus	Hyaluronsyre	Imiquimod
Dag 1	27,113	27,284	26,723	26,381	25,475
Dag 2	25,993	25,407	25,242	25,472	25,144
Dag 4	25,840	25,435	26,928	26,086	25,299
Dag 9	25,217	25,050	25,457	26,304	25,560
Dag 16	25,622	26,305	26,923	26,433	26,058
Dag 32	26,689	26,841	26,104	26,059	27,875
Dag 45	28,318	26,708	27,146	26,962	26,683

Tabell 10: Gjennomsnittlige Ct-verdier for HIF1- α fra alle grupper for alle dagene.

	Kontroll	Poly I:C	Astragalus	Hyaluronsyre	Imiquimod
Dag 1	27,409	26,554	27,278	26,724	25,796
Dag 2	26,022	25,285	25,154	25,338	25,252
Dag 4	25,670	25,261	26,114	25,840	25,126
Dag 9	24,754	24,567	25,144	25,779	24,971
Dag 16	25,026	25,395	26,485	25,657	25,316
Dag 32	25,809	25,842	25,181	24,779	26,724
Dag 45	26,955	25,625	25,949	25,702	25,581

Tabell 11: Gjennomsnittlige Ct-verdier for GLUT1 fra alle grupper for alle dagene.

	Kontroll	Poly I:C	Astragalus	Hyaluronsyre	Imiquimod
Dag 1	26,801	26,229	26,900	26,550	25,980
Dag 2	26,159	24,990	25,016	25,361	24,848
Dag 4	25,238	24,637	26,177	26,103	25,280
Dag 9	24,676	24,738	25,210	25,284	24,700
Dag 16	24,863	25,371	26,265	25,635	25,512
Dag 32	25,469	25,307	25,338	24,844	26,186
Dag 45	27,052	25,914	26,200	26,131	25,938

Tabell 12: Gjennomsnittlige Ct-verdier for IL-1 β fra alle grupper for alle dagene.

	Kontroll	Poly I:C	Astragalus	Hyaluronsyre	Imiquimod
Dag 1	32,364	32,307	33,068	33,468	32,538
Dag 2	32,565	31,754	30,973	32,081	31,736
Dag 4	32,252	31,811	32,571	32,564	31,972
Dag 9	31,527	30,991	31,801	31,311	31,063
Dag 16	31,661	30,645	32,298	30,934	32,070
Dag 32	30,864	32,186	31,877	30,130	32,892
Dag 45	33,796	31,508	32,834	31,699	32,227

Tabell 13: Gjennomsnittlige Ct-verdier for SIX1 fra alle grupper for alle dagene.

	Kontroll	Poly I:C	Astragalus	Hyaluronsyre	Imiquimod
Dag 1	26,801	26,229	26,900	26,550	25,980
Dag 2	23,595	22,784	22,710	22,781	22,700
Dag 4	23,219	22,880	23,592	23,495	22,776
Dag 9	22,218	22,113	22,666	23,104	22,282
Dag 16	22,806	23,196	23,998	23,594	23,301
Dag 32	23,623	23,363	23,203	23,094	24,052
Dag 45	24,599	23,527	23,743	23,718	23,741

Tabell 14: Gjennomsnittlige Ct-verdier for iNOS fra alle grupper for alle dagene.

	Kontroll	Poly I:C	Astragalus	Hyaluronsyre	Imiquimod
Dag 1	29,745	27,558	31,952	30,261	30,177
Dag 2	30,390	28,461	29,566	29,603	29,819
Dag 4	30,093	29,068	30,202	29,565	28,863
Dag 9	30,787	31,089	30,738	30,479	30,060
Dag 16	30,128	31,980	31,575	28,628	30,883
Dag 32	29,859	30,124	31,543	29,506	32,359
Dag 45	33,097	31,306	32,023	31,513	31,040

Tabell 15: Gjennomsnittlige Ct-verdier for cathB fra alle grupper for alle dagene.

	Kontroll	Poly I:C	Astragalus	Hyaluronsyre	Imiquimod
Dag 1	22,894	23,258	23,434	23,134	23,179
Dag 2	23,410	22,779	22,707	23,297	23,293
Dag 4	23,009	22,891	23,587	24,059	23,222
Dag 9	22,699	22,178	22,847	23,192	22,718
Dag 16	22,687	23,450	23,471	23,842	23,352
Dag 32	23,191	22,954	22,149	22,434	23,992
Dag 45	24,017	22,487	23,563	22,871	22,492

Tabell 16: Dødelighet for hver gruppe 1-45 dager etter badbehandling. Høy dødelighet for fisk i kontrollgruppa etter 4 og 9 dager skyldtes døde egg. (All fisk i stimulert med deacetylert kitosandøde samme dag som de ble badbehandlet og er ikke tatt med i tabellen.). Antall fisk i kontrollgruppen var høyere enn for de andre behandlingsgruppene. Antall fisk i de øvrige gruppene var omtrent lik - 842 i hver gruppe, 287 egg i hver inkubator. ND= ikke bestemt.

Dag	kontroll	poly I:C	astragalus	hyaluronsyre	imiquimod
1	10	0	0	0	0
2	9	2	8	1	0
3	2	0	0	0	0
4	22	1	4	2	1
5	7	2	6	0	0
6	1	0	0	0	0
7	4	0	0	0	0
8	9	0	0	1	0
9	50	0	2	0	0
10	0	1	1	1	0
11	0	0	0	0	0
12	0	1	0	3	0
13	0	0	0	0	0
14	3	0	0	1	0
15	0	0	1	0	0
16	10	2	0	9	1
17	0	0	0	0	0
18	0	1	0	0	0
19	2	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
21	1	0	0	0	0
22	1	1	0	0	0
23	2	0	0	0	0
24	0	5	0	0	0
25	1	6	0	0	0
26	2	2	0	0	0
27	0	7	0	0	0
28	0	8	1	0	0
29	0	3	0	0	0
30	0	2	1	0	0
31	0	3	0	0	0
32	1	5	1	0	0
33	0	1	0	0	0
34	0	0	1	0	0

35	0	1	0	0	0
36	0	2	0	0	0
37	0	2	0	0	0
38	0	1	0	0	0
39	0	2	0	0	0
40	0	1	0	0	0
41	0	1	0	0	0
42	0	1	0	0	0
43	0	3	0	0	0
44	0	0	0	0	0
45	2	4	0	0	0
Sum	139	71	26	18	2
Akkumulert dødelighet	ND	9	3	2	0,2

