



UiT Norges arktiske universitet

Norges Fiskerihøgskole

Påvirker smoltfiseringsmetode hjerteutvikling og smoltkarakterer hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.)?

Morfologiske og molekylære forskjeller

Espen Knutsen

Masteroppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap, havbruk (60 stp.), mai 2022

Forord

Arbeidet presentert i denne masteroppgaven ble gjennomført ved Norges fiskerihøgskole, Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Universitetet i Tromsø, i samarbeid med Bremnes Seashore.

Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder Bjørn Steinar Sæther for god hjelp gjennom hele prosessen. Du har helt siden planlegging av forsøket for nesten to år siden hatt jevnlig besøk av meg på kontoret ditt. Du har alltid hatt godt humør og satt av tid til å hjelpe - både når det gjelder planlegging av uttak, teoretisk forståelse eller statistikk. Jeg vil også takke biveileder Helge Tveiten for god hjelp med utforming av studien, korrekturlesing og belysning av relevante tema for oppgaven, spesielt for delen som omhandler genuttrykk. Videre vil jeg rette en stor takk til biveileder Dhivya Borra Thiyagarajan for at du var tilgjengelig og bidro med god hjelp og veiledning gjennom hele min tid på laboratoriet.

Jeg vil også rette en stor takk til Bremnes Seashore for et godt samarbeid, og for muligheten til å skrive denne spennende masteroppgaven. Takk til Geir Magne, Inger Lise, Eldbjørg og spesielt Hege for å ha stått lange kvelder sammen med meg for å ta ut prøver, og Jonas for å besvare alle mine spørsmål angående produksjon og for uthenting av data. Thea fortjener også en stor takk for hjelp med måling og veiing av fisk i forbindelse med hennes bacheloroppgave.

Sist men ikke minst vil jeg takke mine medstudenter for en fantastisk studietid i Tromsø. Dette gjelder både det akademiske, men aller helst studielivet ellers!

Espen Knutsen

Tromsø, mai 2022

Sammendrag

Oppdrettsnæringen har i løpet av de siste årene blitt stilt ovenfor økt problematikk knyttet til hjertehelse og hjertelidelser hos oppdrettet atlantisk laks. Hjertene til atlantisk laks har høy grad av plastisitet i møte med ytre miljøpåvirkninger, og tidligere studier har vist at hjertet til oppdrettslaks avviker fra de man finner hos villaks. Hjerter fra oppdrettsfisk karakteriseres blant annet ved at de er rundere og at bulbus arteriosus har en mer spiss utgangsvinkel fra ventrikkel. Den unormale hjerteformen er vist å gi redusert slagvolum og funksjon, spesielt under krevende miljø eller stressende behandlingsoperasjoner. Denne studien har undersøkt om smoltifisering induisert via fotoperiodemanipulering eller ved bruk av saltfôr påvirker utvikling av hjertet og viktige smoltkarakterer hos atlantisk laks. Gruppene har blitt vurdert gjennom genuttrykk av en rekke gener som er relatert til hjerteutvikling, samt gjennom parametre relatert til vekst, hjertevekst og morfometri, og smoltkarakterer som kondisjonsfaktor, relativ halelengde, sølvfarging, og uttrykk av to viktige saltpumpeenzymmer (NKA α -1a og NKA α -1b) og en kloridtransportør (NKCC1a) i gjellene. Etter smoltifisering ble gruppenes ytelse i sjø sammenlignet gjennom produksjonsdata innhentet fra matfiskanlegg og slakteri. Hjertemorfologi var ikke påvirket av smoltifiseringsregime, men noen av genmarkørene for hjertehelse var forskjellig uttrykt mellom gruppene. Under forutsetning om at markørene som har blitt undersøkt har tilsvarende funksjon i hjertet til atlantisk laks som hos pattedyr, indikerer funnene at saltfôr-gruppen har utviklet hjerter som i større grad er assosiert med patologisk vekst. For første gang er det vist at irisin A, et protein som er viktig for hjertefunksjon hos pattedyr, trolig spiller en rolle i hjertet til atlantisk laks under smoltifisering. Det er også vist at viktige smoltkarakterer er tydeligere utviklet hos fisk smoltifisert med fotoperiode sammenlignet med saltfôr. Tilvekst og ytelse i sjø ble vurdert via produksjonsdata innhentet ved slakting. Resultatene viser at, til tross for en mindre størrelse ved start og en lavere tilvekst i settefiskfasen, hadde fotoperiode-gruppen høyere tilvekst i sjøfasen og var større ved slakt.

Abstract

In recent years, the aquaculture industry has been faced with an increase of problems related to cardiac health and diseases in farmed Atlantic salmon. The hearts of Atlantic salmon have a high degree of plasticity in the face of external environmental influences, and previous studies have shown that the heart of farmed salmon differs from those found in wild salmon. Hearts from farmed fish are characterized, among other things, by being rounder, and by the bulbus arteriosus protruding more sharply from the ventricle. The abnormal heart shape has been shown to reduce stroke volume and function, especially during demanding environments or stress-inducing situations. This study has investigated whether smoltification induced via photoperiod manipulation or through the use of salt feed affects development of the heart and important smolt characteristics in Atlantic salmon. The groups have been assessed through gene expression of a number of genes related to heart development, as well as through parameters related to growth, heart growth and morphometry, and smolt characteristics such as condition factor, relative caudal length, silvering, and expression of two important salt pump enzymes (NKA α -1a and NKA α -1b) and a chloride transporter (NKCC1a) in the gills. After smoltification, the groups' performance at sea was compared through production data obtained from the fish farm and processing-facility. Cardiac morphology was not affected by smoltification regimes, but some of the gene markers for cardiac health were expressed differently between the groups. Assuming that the markers that have been examined have a similar function in the heart of Atlantic salmon as in mammals, the findings indicate that the salt feed group has developed hearts that to a greater extent are associated with pathological growth. For the first time, it has been shown that irisin A, a protein that is important for heart function in mammals, probably plays a role in the heart of Atlantic salmon during smoltification. It has also been shown that important smolt characteristics are more developed in the photoperiod group compared to the salt feed group. Growth and performance at sea were assessed via production data obtained at slaughter. The results show that, despite a smaller size at the start and lower growth rate in the hatchery phase, the photoperiod group had higher growth rate in the sea phase and was larger at slaughter.

Forkortelser

18S	Sal_18S	qPCR	Real Time PCR
ANP	A-type natriuretic peptide	RAS	Resirkulerende akvakultursystem
B-aktin	Beta-aktin	SGR	Spesifikk vekstrate
bFCR	Biologisk fôrfaktor	Std	Standardfeil
BNP	B-type natriuretic peptide	SW ATPase	SaltvannsATPase
CMS	Kardiomyopatisyndrom	UV	Ultrafiolett (stråling)
CSI	Relativ hjertevekt	VEGF	Vascular endothelial growth factor
C _t	Terskelsyklus	VF3	Vekstfaktor 3
Ef1- α	Elongeringsfaktor		
FW ATPase	FerskvannsATPase		
GATA4	GATA Binding Protein 4		
GH	Veksthormon		
GSI	Gonadosomatisk indeks		
IGF-1	Insulinlignende vekstfaktor 1		
K-faktor	Kondisjonsfaktor		
MEF2C	Myocyte Enhancer Factor 2C		
NKA	Na ⁺ /K ⁺ ATPase		
NKCC1a	Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻ co-transporter		
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen		

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Hjertehelse hos atlantisk laks	1
1.2	Hjertets fysiologi og funksjon som del av sirkulasjonssystemet.....	2
1.3	Miljøeffekter på hjertets form og funksjon.....	4
1.4	Smoltifisering	6
1.5	Formålet med oppgaven	10
2	Materialer og metoder	11
2.1	Forsøksfisk og produksjonslokalitet(er)	11
2.2	Forsøksdesign	12
2.3	Oppsett og praktiske forhold i sjøfasen	13
2.4	Prøveuttak.....	14
2.5	Beregning av biomorfometriske indekser.....	16
2.6	Bestemmelse av smoltifiseringsgrad (SmoltVision og gradering av morfologiske smoltkarakterer)	17
2.7	Beregning av hjertemorfologiske indekser.....	18
2.8	Beregning av relativ halelengde (hale/kropp-ratio).....	19
2.9	Analyse av genuttrykk i hjertet.....	20
2.10	Statistiske analyser og presentasjon av data	25
3	Resultater.....	27
3.1	Fiskevekt, hjertestørrelse og synlige smoltkarakterer	27
3.2	Smoltkarakterer og sjøvannstoleranse	28
3.3	Effekter av smoltifisering på hjertet	31
3.4	Ytelse i sjøfasen.....	38
4	Diskusjon.....	39
4.1	Hvilke effekter har saltfôr- og fotoperiodebehandling på molekulære og morfologiske indikatorer på smoltutvikling og sjøvannstoleranse?.....	39

4.2	Er det forskjell/effekter i uttrykk av gener som er sentrale for vekst, funksjon og angiogenese i hjertet hos laks som smoltifiseres ved bruk av saltfôr eller fotoperiodebehandling?.....	42
4.3	Irisin er en «ny» regulatorisk faktor som har viktige funksjoner i hjertet hos en rekke dyr(emodeller): Uttrykkes irisin i hjertet hos laks, og er uttrykket påvirket av smoltifisering som induseres via saltfôr eller fotoperiodebehandling?.....	45
4.4	Hvordan påvirkes hjertevekst, relativ hjertestørrelse, og hjerteform hos laks som smoltifiseres ved bruk av enten saltfôr eller fotoperiodebehandling?.....	46
4.5	Hvilke effekter har saltfôr- og fotoperiodebehandling på ytelse (tilvekst og dødelighet) i sjøfasen?.....	49
4.6	Videre forskning/til ettertanke.....	51
5	Konklusjon	53
6	Litteraturliste	54
7	Appendiks.....	i

Tabelliste

Tabell 1. Gjennomsnittlige verdier for vannkvalitet.....	11
Tabell 2. Inndeling av forsøksgruppene, antall og snittvekt ved forsøksstart.....	12
Tabell 3. Oversikt over tidspunkt for prøveuttak.....	14
Tabell 4. Oversikt over genene som ble inkludert i dette eksperimentet.....	20
Tabell 5. PCR setup.....	24
Tabell 6. Fiskevekt, hjertestørrelse og synlige smoltkarakterer.....	27
Tabell 7. Oversikt over produksjonstall fra sjøfasen.....	38

Figurliste

Figur 1. Hjerter delt medialt. Fremstilling av hjertets 4 rom.....	4
Figur 2. Flytskjema som illustrerer de ulike fasene som fisken har gjennomgått.....	13
Figur 3. Beregning av hjertemorfologi for hjertet til atlantisk laks.....	19
Figur 4. Beregning av fiskens relative halelengde.....	20
Figur 5. Utvikling av smoltkarakterer (SW/FW ATPase ratio og smoltindeks).....	29
Figur 6. Utvikling av kroppsfasong (relativ halelengde og kondisjonsfaktor).....	30
Figur 7. Utvikling av de diagnostiske markørene ANP og BNP.....	31
Figur 8. Utvikling av GATA4 og MEF2C.....	32
Figur 9. Utvikling av PCNA.....	33
Figur 10. Utvikling av VEGF.....	34
Figur 11. Utvikling av irisin A.....	34
Figur 12. Utvikling av hjertemorfologi.....	36
Figur 13. Utvikling av CSI.....	37

1 Innledning

1.1 Hjertehelse hos atlantisk laks

Dødelighet av laks etter utsett i sjø er et stort problem for oppdrettsnæringen, og av fiskehelse rapporten for 2021 var det totale tapet av oppdrettslaks i sjø 54 millioner individer (15,5 %) (Walde & Sommerset, 2022). Den høye dødeligheten påvirkes av forutsette og uforutsette faktorer i sjøfasen, likevel er det nærliggende å anta at smoltkvalitet og robusthet også spiller en viktig rolle for overlevelse i sjø. Den høye dødeligheten fører hvert år til store økonomiske tap for næringen og det er udiskutabelt en stor utfordring knyttet til fiskevelferd (Frisk et al., 2020).

Hjertelidelser er en av de viktigste årsakene til død hos mennesker (Fuster, 2014), og i ulike former også et stort problem knyttet til oppdrett av fisk, slaktekylling og gris (Olkowski et al., 1996; Poppe et al., 2003). Når det gjelder fisk er særlig rasktvoksende fisk som atlantisk laks (*Salmo Salar* L.) utsatt, og hjertene til atlantisk laks har i tillegg høy morfologisk- og fysiologisk plastisitet (formbarhet) i kontakt med endrende miljømessige- og fysiologiske krav (Gamperl & Farrel, 2004).

I en spørreundersøkelse blant fiskehelsepersonell og i mattilsynet ble hjertesprekk (CMS) rangert som det aller største problemet i matfiskfasen for oppdrettet atlantisk laks i 2020 (Sommerset, 2021), og CMS antas å påvirke opp mot 20 % av all fisk i matfiskfasen (Garseth et al., 2018). Dødelighet forårsaket av hjertelidelser er spesielt belastende da den ofte inntreffer på stor, slakteklar fisk, som det er investert mye tid og ressurser på. Dødeligheten er spesielt høy når fisk med svake hjerter gjennomgår lusebehandling og dette kan indikere at fisken, eller hjertet, ikke innehar de fysiske egenskapene som kreves under stressende situasjoner. Akutt stress antas å gi hjertet en belastning som i mange tilfeller medfører høy dødelighet (Poppe et al., 2007). Til tross for at hjertelidelser er et stort problem i oppdrettsnæringen, vet man relativt lite om årsaker og konsekvenser hos oppdrettsfisk. Spesielt hjertelidelser som ikke skyldes bakterie- eller virusinfeksjoner har blitt tildelt lite oppmerksomhet.

Allerede tidlig på 2000-tallet rapporterte fiskehelseansvarlige langs norskekysten om store mengder tilsynelatende frisk og fin fisk som ikke tålte moderat håndtering som sortering, hoving, transport og lusebehandling. Disse funnene var spesielt interessante da det ikke ble

påvist hverken bakterier eller virus ved screening av den samme fisken. Nærmere undersøkelser av dødfisken viste en overrepresentasjon av individ med små hjerter med unormal hjertemorfologi (Poppe et al., 2003). Studien til Poppe et al. (2003) viser at det er en sterk positiv korrelasjon mellom hjertets form, og dets slagvolum og funksjon. Blant annet ble det konkludert med at hjertet hos oppdrettsfisk er rundere enn de man finner i villaks og at vinkelen mellom den ventrikulære aksen og aksen til bulbus arteriosus er spissere i villfisk enn hos oppdrettsfisk. Også annen litteratur underbygger at unormal hjertemorfologi er et utbredt problem som over lang tid har blitt oversett i oppdrett av laksefisk, som studiene til Mercier et al. (2000) for oppdrettet brunørret (*Salmo trutta* L.) og Brocklebank & Raverty (2002) for oppdrettet atlantisk laks.

Biologien til atlantisk laks har stor forskningsinteresse som følge av dens komplekse livshistorie og økonomiske verdi, likevel mangler mye kunnskap om de underliggende faktorene som fører til svake hjerter. De relativt nye funnene til Frisk et al. (2020) foreslår at det er en sammenheng mellom smoltproduksjonsregime og hjertehelse. For å bedre fiskevelferd og lønnsomhet er det derfor nødvendig å sette søkelyset på hvordan produksjonsstrategier påvirker hjertehelse og ytelse hos oppdrettslaks. Formålet med denne studien er å avdekke om smoltifisering induisert via fotoperiodemanipulering eller ved bruk av saltfôr påvirker utvikling av hjertet og viktige smoltkarakterer hos atlantisk laks.

1.2 Hjertets fysiologi og funksjon som del av sirkulasjonssystemet

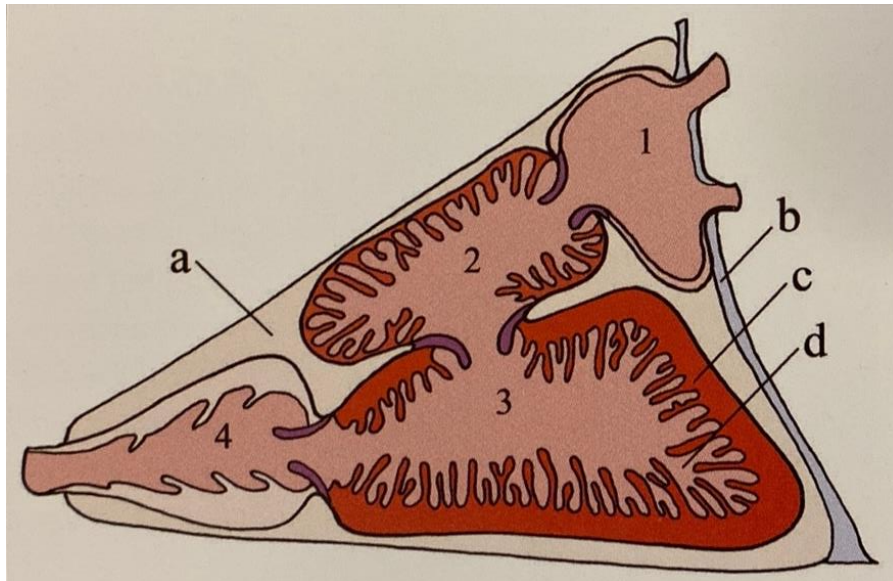
Sirkulasjonssystemet i fisk sin rolle er å levere blod til vev hvor det kan foregå utveksling av gasser og et utvalg molekyler. Blodet transporterer oksygen fra gjellene til vev, og karbondioksid i motsatt retning. Næringsstoff som tas opp fra mage/tarm transporteres til lever og videre til andre organer i kroppen, samtidig som avfallsstoff fra metabolismen transporteres fra vev til deres ekskresjonssteder. Sirkulasjonssystemet er bygget opp av fire essensielle hovedkomponenter, hvorav hjertet er den ene, sammen med blodårer, blodet og et overordnet kontrollsystem (Gamperl & Holly, 2014). I laks, som i annen fisk, er hjertet lokalisert ventralt i fisken, anterior for pektoralfinnene inne i det perikardiale hulrommet. Hulrommet er formet av en membranøs sekk (perikardet) som folder seg innover og omgir hjertet. Perikardet sekurerer væsker som bader hjertet, og varierer mellom arter i stivhet og i hvilken grad det er festet til

tilhørende strukturer (Gamperl & Holly, 2014) og er viktig for fylling av blod til hjertet (Jobling, 1995).

Hjertet er en muskulær pumpe som flytter blodet rundt i kroppen, og tradisjonelt har det blitt beskrevet at hjertet er bygget opp av fire rom som ligger etter hverandre og danner en S-form; sinus venosus, atrium, ventrikkel og bulbus arteriosus (Figur 1) (Kryvi & Poppe, 2016). I senere tid har det oppstått en alternativ beskrivelse av hjertets oppbygging med tre rom; sinus venosus, atrium og ventrikkel, i tillegg til en overgang mellom hjertet og ventrale aorta, Outflow Tract (Icardo, 2012). Rommene er arrangert i en serie, hvor blodet først strømmer inn i sinus venosus, som har en sekkliknende struktur med tynne vegger, og har som funksjon å samle opp blod og la det passere videre til atrium. Mellom de ulike rommene er det klaffer, som hindrer at blodet kan strømme tilbake. Atrium består av tynne vegger med et tynt lag hjertemuskel. Ettersom atrium fylles med blod vil det utvide seg etterfulgt av en kontrahering av musklene i atrieveggen som fører til at blodet presses videre til ventrikkelen, som er det største av de fire rommene (Gamperl & Holly, 2014) og gjør opp 65 – 85 % av den totale hjertevekten (Jobling, 1995).

Ventrikkelen er hovedpumpen i hjertet og er den delen av hjertet som viser størst variasjon i størrelse, form og blodåreforgreining mellom arter (Kryvi & Poppe, 2016). Pyramideformede hjerter med en spiss topp er generelt mest utbredt blant aktive arter som hos laksefamilien, makrellfamilien, og hai (Gamperl & Holly, 2014). Ventrikkelen består av tykke vegger med mye muskler, noe som er nødvendig for å skape den kraften som er nødvendig for å presse blodet ut fra hjertet via ventrale aorta, til gjellene og videre forsyne organ og vev med blod. Ventrikkelveggen er delt inn i et ytre kompakt lag og et indre svampaktig lag (Kryvi & Poppe, 2016).

Bulbus arteriosus fungerer som en overgang mellom hjertet og ventrale aorta, og kan anses som en fortykkelse av ventrale aorta (Kryvi & Poppe, 2016). Veggen er bygget opp av elastisk vev ispedd glatte muskelfibre og forsynt med klaffer som hindrer tilbakestrømming. Bulbus arteriosus er relativt fleksibel, og fungerer som en trykk-utjevner ved å omdanne det pulserende trykket som skapes i ventrikkelen til et mer jevnt og konstant trykk ut til ventrale aorta og videre til gjellene (Kryvi & Poppe, 2016). Bulbus arteriosus er hvit og skiller seg klart fra de andre mørke/røde delene av hjertet.



Figur 1. Hjerter delt mediallyt. Fremstilling av hjertets fire rom; sinus venosus (1), atrium (2), ventrikkel (3) og bulbus arteriosus/OFT (4). Hertet ligger i perikardialhulen (a), bakre vegg er deler av septum transversum (b), ventrikkelen (c) er fremstilt med et ytre kompakt lag (c) og et indre svampaktig lag (d). Illustrasjon fra (Kryvi & Poppe, 2016).

1.3 Miljøeffekter på hjertets form og funksjon

Hjertemorfologi påvirker hjertets funksjon (Poppe et al., 2003; Frisk et al., 2020). Dette er interessant da man vet at hjertet til laksefisk har vist høy grad av plastisitet i kontakt med endrende miljømessige- og fysiologiske krav. Hjertevekst kan skje gjennom produksjon av nye celler (hyperplasi) eller økning i størrelse av eksisterende celler (hypertrofi) (Gamperl & Farrel, 2004). I motsetning til hos pattedyr, hvor hjertevekst er assosiert med hjertesvikt (Lloyd-Jones et al., 2002), er det ikke nødvendigvis slik for fisk. Ved enkelte situasjoner vil fisk gjennomgå adaptiv hjertevekst, som ved sesongmessig kuldeakklimatisering (Klaiman et al., 2011) eller kjønnsmodning (Franklin & Davie, 1992), hvor økt hjertevekst fører til økt ytelse og pumpekapasitet (Graham & Farrell, 1989).

Flere tilfeller viser økt ventrikkelstørrelse for fisk som eksponeres for, og akklimatiserer til sesongmessige lave temperaturer (Driedzic et al., 1996; Vornanen et al., 2005). Dette har sannsynligvis en sammenheng med at ventrikkelen får en redusert kontraksjonsevne (Gamperl & Farrel, 2004) og at blodet blir mer viskøst under kulde, noe som påfører hjertet økt belastning (Gamperl & Holly, 2014). Økt ventrikkelmasse kan muligens kompensere for det økte arbeidskravet, og anses for å være fysiologisk (adaptiv) hjertevekst i møte med endrende miljø. Blant annet har Vornanen et al. (2005) vist en økning på 32,7 % i relativ hjertemasse for fire ukers kuldeakklimatisering (4 °C) sammenlignet med varmeakklimatisering for regnbueørret.

Kortisol er et viktig stresshormon i teleoster og er blitt vist å indukere patologisk hjertevekst som er assosiert med nedsatt funksjon (Johansen, et al., 2011; Johansen et al., 2017; Nørstrud et al., 2018). Kortisol spiller også en viktig rolle under smoltifisering, og sekreseres i blodsirkulasjonen som en respons på økende daglengde om våren, gjennom lys-hjernehypofyseaksen. I forbindelse med smoltifisering er kortisol derimot helt nødvendig, og er viktig for utvikling av smoltkarakterer (Stefansson et al., 2008).

Det er også blitt vist at mosjonering av atlantisk laks stimulerer til hjertevekst (Hochachka, 1961; Gallagher et al., 2001) som er regnet for å være adaptiv, der medium intensitet hadde 11,1 % høyere relativ ventrikkelstørrelse sammenlignet med kontroll, og fisk mosjonert på høy intensitet har vist 19,4 % høyere relativ ventrikkelstørrelse sammenlignet med kontroll (Castro et al., 2013). Blant annet ble høy-intensitet-gruppen, gjennom genuttrykk av bestemte gener, tilegnet forhøyet kontraktile evne og et mer effektivt blodtransportsystem, og det ble konkludert med at en høyere relativ ventrikkelmasse som følge av trim øker fiskens robusthet, og muligens øker kardiovaskulær kapasitet for å tilfredsstille kravene til vekst og aktivitet.

For å få en bedre forståelse av hvordan dagens oppdrettsregime påvirker hjertet til atlantisk laks, vil det være viktig å identifisere mekanismene som skiller adaptiv hjertevekst fra patologisk hjertevekst. Blant annet er intensiv smoltproduksjonen, som har blitt fremtredende i næringen, assosiert med endret hjertemorfologi og nedsatt funksjon (Frisk et al., 2020). Det er også vist at fotoperiode kan påvirke den plastiske effekten som temperatur har på hjertet, ved at regnbueørret holdt på 12H lys/12H mørke har ingen, eller lavere grad av økning i hjertestørrelse (< 15 %) ved eksponering for ulike temperaturer (Keen et al., 1993; Keen & Farrell, 1994; Sephton & Driedzic, 1995; Aho & Vornanen, 2001). Det er også kjent at hjertet til atlantisk laks vokser mye under smoltifisering (Leonard & McCormick, 2001), og det er derfor viktig å kartlegge hvordan faktorer som fisken er eksponert for under smoltifiseringsprosessen påvirker hjerteutviklingen.

1.3.1 Hva kjennetegner et sterkt hjerte

Det kan være vanskelig å beskrive hva som kjennetegner et sterkt og robust hjerte, da studiene som er nevnt ovenfor demonstrerer at ulike livsstadier (e.g. kjønnsmodning) og miljø (e.g. temperatur) setter krav til, og former ulik hjertemorfologi. Likevel er det noen generelle karakteristikk som har vist å ha stor påvirkning på hjertets funksjon når det gjelder oppdrett

av laksefisk. Studiene til Poppe et al. (2003) har vist at hjertene til oppdrettslaks avviker fra de pyramideformede hjertene man finner i villaks ved at de er rundere, og at bulbus arteriosus har en mer spiss utgangsvinkel fra ventrikkel. Det ble også funnet at disse var overrepresentert blant fisk som ikke håndterte stressende behandlingsoperasjoner. Lignende funn er i senere tid blitt støttet av en rekke forfattere (Claireaux et al., 2005; Brijs et al., 2020; Frisk et al., 2020) og det er blitt vist at hjerteform er nært knyttet til hjertets funksjon. Størrelse er derimot en dårligere indikator, da både store og små hjerter kan gi redusert funksjon (Poppe et al., 2003; Johansen et al., 2017).

Det er pekt på en rekke utviklingstrekk som skiller adaptiv- fra patologisk hjertevekst hos pattedyr (Nørstrud et al., 2018). Ved å anta at disse også er gjeldende for atlantisk laks vil adaptiv hypertrofi være assosiert med utvidelse av kapillærårenettverket, normal arkitektur og organisering av hjertestruktur og normal eller økt pumpekapasitet. På en annen side vil patologisk hjertevekst være assosiert med fibrotisk remodellering, redusert pumpekapasitet og at hjertet vokser uten at kapillærårenettverket utvikles (Nørstrud et al., 2018).

1.4 Smoltifisering

1.4.1 Morfologiske, fysiologiske og adferdsmessige endringer

Atlantisk laks er en anadrom fiskeart. Det innebærer at den starter livssyklusen i ferskvann før den senere i livet migrerer til sjøvann som ungfisk, for lenger eller kortere perioder (Björnsson et al., 2011). En anadrom strategi gir muligheten til å dra nytte av to vidt forskjellige økosystemer, hvor elva er et trygt sted for gyting med få predatorer, og en migrasjon til havet gir rikelig tilgang på næring for vekst og reproduksjon. For vill atlantisk laks vil ikke en adaptasjon til det marine miljø forekomme før fisken har oppholdt seg i ferskvann i hvert fall et år (Stefansson et al., 2008), hvor det ofte kreves en lengde på 10 – 15 cm (McCormick & Saunders, 1987). Prosessen der laksefisk utvikler sjøvannstoleranse, i tillegg til en rekke andre egenskaper, heter parr-smolt transformasjon, eller smoltifisering. Smoltifisering innebærer en rekke uavhengige, men koordinerte endringer (Stefansson et al., 2008) som utvikler seg over en periode på 1 – 2 måneder, som regel på våren (McCormick & Saunders, 1987). Endringene som denne utviklingen medfører er morfologiske, fysiologiske og adferdsmessige (McCormick & Saunders, 1987) og innebærer økt sjøvannstoleranse, sølvfarging, mørkere finnekant, økt lengdevekst og en tynnere kroppsfasong (reduert kondisjonsfaktor), metabolske forberedelser og en migratorisk adferd (McCormick, 2012). Blant annet forekommer det fysiologiske og

biokjemiske endringer i muskel, som kan være nødvendig for migrasjon og svømmekapasitet. Vill atlantisk laksesmolt viser 70 % økning i relativ ventrikkelmasse om våren, et fenomen som er fraværende hos parr under de samme forholdene (Leonard & McCormick, 2001). Dette indikerer at hjertevekst, og muligens også de underliggende mekanismene som initierer hjertevekst under smoltifisering, er av betydning. Disse mekanismene er imidlertid dårlig kartlagt, og hvorvidt oppdrettsfisk følger det samme vekstmønsteret under kunstige forhold, og hvordan hjertevekst reguleres, bør tildeles mer oppmerksomhet.

En av de mest karakteristiske egenskapene til smolt er dens adaptasjon til sjøvann (Prunet et al., 1989), noe som innebærer evnen til å hypo-osmoregulere. Dette er nødvendig da laksefisk, som andre teleoster, må opprettholde et osmotisk trykk i ekstracellulærvæska på 260 – 360 mOsm kg⁻¹ (Stefansson et al., 2008), uavhengig av det osmotiske trykket til det omgivende miljøet. Den økte sjøvannstoleransen er en følge av endringer i de viktige osmoregulatoriske organene; gjellene, mage/tarm og nyre, hvor en økning av spesifikke ione-transportere som Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/Cl⁻ kotransporter og apikal Cl⁻ er viktig (McCormick, 2012). Disse tilpasningene gjør at fisken kan reversere det passive tapet av vann og det uønskede opptaket av ioner ved å drikke sjøvann for å absorbere vann i tarmen, og skille ut salter (Na⁺ og Cl⁻) over gjellene (Stefansson et al., 2008).

1.4.2 Smoltifisering i naturen

Fra naturen er smoltifisering tidsbestemt med basis i endogene rytmer, og miljøsignaler fungerer som viktige «zeitgebers» for å synkronisere og fullføre smoltifiseringen (Stefansson et al., 1991; McCormick, 2001). Det er generelt akseptert at fotoperiode er den viktigste enkelte miljødeterminanten for timing av smoltegenskaper, både fysiologiske og adferdsmessige (Hoar 1988), hvor et kort-dag signal om vinteren etterfulgt av økende fotoperiode/døgnlengde om våren igangsetter smoltifiseringsprosessen (McCormick et al., 2000). En rekke forfattere har foreslått at fotoperiode er viktig for å øke aktivitet i fisken, og gi den en økt sensitivitet ovenfor andre miljømessige signaler som initierer migrasjon (McCormick et al., 1998), som vanntemperatur, strøm og turbiditet (McCormick, 2012).

Miljømessige endringer overføres gjennom sensoriske prosesser til nevroendokrine responser i hjernen, som deretter kontrollerer hypofysefunksjon og til slutt fysiologiske responser gjennom endokrine akser (Stefansson et al., 2008). Utvikling av smoltegenskaper involverer et samspill

mellom flere endokrine systemer, inkludert stimulering av GH-IGF-1-systemet, kortisol- og tyroideahormoner, og inhibering av prolaktin (Björnsson, 1997). Både veksthormon (GH) og kortisol får en signifikant økning i løpet av smoltifiseringsprosessen og er viktig for at fisk skal utvikle osmoregulatoriske egenskaper. En oppregulering av tyroideahormoner er også vist under smoltifiseringsprosessen, og er sannsynligvis viktig for utvikling av sølvfarging og migratorisk adferd (Björnsson et al., 2011). Metodene som benyttes for smoltindusering i næringen i dag etterligner ikke nødvendigvis de ytre miljøfaktorene som induserer smoltutvikling for villfisk i naturen. Blant annet er det blitt populært å benytte saltfôr for å indusere smoltifisering. Hvorvidt en slik metode gir en tilsvarende respons som fotoperiode har, for eksempel knyttet til endokrine endringer og reguleringer, er det til dags dato ingen arbeider som har vist.

1.4.3 Kommersiell smoltproduksjon

Under kommersiell smoltproduksjon har det tradisjonelt blitt brukt et naturlige lysstimuli. I nyere tid, etter innføringen av kunstige lysprogrammer, har det derimot blitt mulig å manipulere fotoperiode, uavhengig av de sesongmessige naturlige variasjonene. Manipulering av fotoperiode praktiseres ved at fisken blir utsatt for et 6 – 8 ukers langt vintersignal (6 – 12H lys), etterfulgt av et vår-signal med kontinuerlig lys (24H lys) over en periode som kan være typisk 6 uker. Overgangen fra vinter (kort dag) til vår (lang dag) er ment å simulere den naturlige overgangen mellom vinter og vår som skjer i naturen, og som initierer smoltifisering i villfisk. Når det gjelder lysstyring er det flere protokoller som benyttes, og lysstyringen har endret seg noe. Det er blitt vanlig å benytte så kort vinterperiode som mulig, og med så mye lys som mulig, under «vinterdagene». Innføringen av de kunstige lysprogrammene har gjort at det har blitt større fleksibilitet i produksjon av smolt, hvor smolt kan settes i sjø hele året – ikke bare om våren. Dette har ført til en mer stabil biomasse i sjø (Bergheim et al., 2009).

Forsøk som har blitt gjennomført på atlantisk laks viser at parr som er utsatt for et naturlig lysregime har en signifikant lavere tilvekst sammenlignet med parr som er utsatt for kontinuerlig lys fra månedene november til februar. Derimot viste fisken som var satt på kontinuerlig lys dårlig saltvannstoleranse ved eksponering for saltvann (37,5 ‰), og det ble konkludert med at denne fisken ikke var smoltifisert, til tross for at den hadde smoltlignende utseende og var tilsynelatende stor og frisk (Saunders et al. 1985). Likevel, sannsynligvis motivert av funnene om at fisk som er holdt på kontinuerlig lys vokser raskere enn fisk som

gjennomgår vintersignal, ble det undersøkt muligheter for å produsere smolt under kontinuerlig lys. Det ble funnet at bruk av salter i dietten økte Na^+/K^+ ATPase – aktiviteten i gjellene og forbedret saltvannstoleransen i flere laksefisk, blant annet regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) (Salman & Eddy, 1987; Perry et al., 2006) og atlantisk laks (Basulto, 1976; Duston, 1993). Disse funnene viste at det er mulig å produsere saltvannstolerant fisk uten bruk av mørkestimuli, noe som vil være fordelaktig da kontinuerlig lys gir høyere tilvekst (Stefansson, 1989) på grunn av at atlantisk laks er avhengig av å visuelt se maten for å kunne spise (Ali, 1959; Thorpe et al., 2006). Praktiseringen av salter i dietten er blant annet blitt realisert gjennom SuperSmolt FeedOnly, og senere også andre aktører som Biomar sitt Intro Tuning Feed.

1.4.4 Vurdering av smoltstatus

Smoltstatus kan vurderes ut fra en rekke parametre som reflekterer fiskens evne til å osmoregulere, morfologi og/eller endokrin status (Strand et al., 2018). I senere tid har det blitt vanlig å bruke alternative metoder, hvor man indirekte måler saltvannstoleranse gjennom undersøkelser av gjellene. Dette kan gjøres gjennom analyser av Na^+/K^+ ATPase, som er en enzymgruppe som er viktig for ionetransport i gjellene til laks. Endringer i aktiviteten eller mengden av disse er tradisjonelt en anerkjent indikator på fiskens sjøvannstoleranse og smoltifisering (McCormick et al., 2013).

Utviklingen av distinkte isoformer av den α -katalytiske underenheten til Na^+/K^+ ATPase hos laksefisk blitt identifisert (Richards et al., 2003), og vist å følge et forutsigbart mønster gjennom smoltifiseringsprosessen, der α -1a NKA isoformen (ferskvannsATPase) er assosiert med ferskvannsfasen og α -1b NKA isoformen (saltvannsATPase) er assosiert med sjøvannsfasen (McCormick et al., 2009; McCormick et al., 2013). På bakgrunn av disse funnene har det blitt utarbeidet et analytisk verktøy fra PHARMAQ Analytiq som kalles SmoltVision. Analysene gjennomføres ved å måle uttrykk av tre gener fra kloridcellene i gjellene, som alle er tett forbundet med endringer som skjer i gjellene til laks under smoltifiseringsprosessen. Analysen skiller mellom ferskvannsATPase og saltvannsATPase i tillegg til en annen ionetransportør, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ co-transporter (NKCC1a), også kalla kofaktor. I følge PHARMAQ Analytiq anses fisken som saltvannstolerant så lenge uttrykket av saltvannsATPase er høyere enn for ferskvannsATPase (SW/FW ratio > 1). At fisken blir bestemt å være sjøvannstolerant forutsetter også at kofaktor ligger innenfor sitt normale uttrykksområde, noe som indikerer at

det ikke er forstyrrelser på gjeller eller smoltifiseringsprosess (personlig kommunikasjon, Gamlem. I., (produksjef smolt, PHARMAQ Analytiq AS)).

1.5 Formålet med oppgaven

Hovedmål:

Hovedmålet med studien er å avdekke om smoltifisering induisert via fotoperiodemanipulering eller ved bruk av saltfôr påvirker utvikling av hjertet og viktige smoltkarakterer hos atlantisk laks.

Delmål:

- 1) Hvilke effekter har saltfôr- og fotoperiodebehandling på morfologiske og molekylære indikatorer på smoltutvikling og sjøvannstoleranse?
- 2) Er det forskjell/effekter i uttrykk av gener som er sentrale for vekst, funksjon og angiogenese i hjertet hos laks som smoltifiseres ved bruk av saltfôr eller fotoperiodebehandling?
- 3) Irisin er en «ny» regulatorisk faktor som har viktige funksjoner i hjertet hos en rekke dyr(emodeller): Uttrykkes irisin i hjertet hos laks, og er uttrykket påvirket av smoltifisering som induseres via saltfôr eller fotoperiodebehandling?
- 4) Hvordan påvirkes hjertevekst, relativ hjertestørrelse, og hjerteform hos laks som smoltifiseres ved bruk av enten saltfôr eller fotoperiodebehandling?
- 5) Hvilke effekter har saltfôr- og fotoperiodebehandling på ytelse (vekst og dødelighet) i sjøfasen?

2 Materialer og metoder

2.1 Forsøksfisk og produksjonslokalitet(er)

Forsøket ble gjennomført på Bremnes Seashore sitt settefiskanlegg ved Trovåg i Vindafjord, Rogaland. Anlegget ble bygget i perioden 2017 - 2020 og består av syv avdelinger inkludert klekkeri, startfôring 1 (0,2 - 0,5 g), startfôring 2 (0,5 – 5 g), hall 0 (5 – 40 g), hall 1 (40 - 120 g), hall 2 (120 – 500 g) og hall 3 (120 – 500 g). De tre første avdelingene benytter gjennomstrømming og de resterende fire benytter RAS. Ved første og andre uttak var fisken i hall 1, der er det totalt 12 sirkulære kar med et volum på 339 m³ hver og vannflow på 160 000 L/min. Forsøksfisken ble overført til nye kar i hall 3 i perioden 23.11 – 17.12.20, slik at fisken var i hall 3 ved de to siste uttakene (Figur 2). I hall 3 er det totalt 10 sirkulære kar med et volum på 706 m³ og vannflow på 2 200 000 L/min. Gjennomsnittlige verdier for et utvalg parametre for vannkvalitet er presentert i tabell 1, og en mer detaljert utvikling av temperatur og salinitet er presentert i appendiks (Figur A1 og A2).

Tabell 1. Gjennomsnittlige verdier for vannkvalitet gjennom forsøksperioden for perioden fisken var i hall 1 og perioden fisken var i hall 3. Verdiene for hall 1 er gjennomsnittsverdier fra perioden 14.10-2020 (første uttak) til 17.12.2020 (tidspunktet da all fisk var overført bort fra hall 1) og verdiene for hall 3 er fra perioden 23.11-2020 (tidspunktet da første fisk var overført til hall 3) til 09.03-2021 (siste uttak).

	Temperatur (°C)	pH	Oksygenmetning (%)	Salinitet (‰)
Hall 1	12,80 ± 0,95	7,16 ± 0,08	83,11 ± 2,76	0,13 ± 0,04
Hall 3	11,29 ± 1,09	7,17 ± 0,05	85,08 ± 5,30	11,75 ± 0,19

Ferskvannet som benyttes i produksjonen kommer fra Malasetvatnet og er UV-desinfisert. Sjøvatnet er desinfisert med KBAL® (vakuum) og UV. I dag har Trovåg produksjonstillatelse på 6000 tonn per år, og det produseres smolt (postsmolt) med en snittvekt på omtrent 500 g. Fisken ble klekket fra rogn fra Mowi-stammen og ble levert av Mowi Norway AS, avdeling Tveitevåg. Fra startfôring til oppstart av forsøket ble yngelen gitt kontinuerlig lys og et fôringsregime styrt etter appetitt. Fisken ble vaksinert (Alphaject Micro 6, 1 dose (0,05 ml); Alpha ERM salar, 1 dose (0,025 ml); Clynav, 1 dose (0,05 ml)) da den var 50 - 60 g, og deretter fordelt i ulike kar som la grunnlaget for inndelingen av de ulike forsøksgruppene som ble fulgt gjennom forsøket. Gjennom studien er fisken blitt fulgt fra parr med en snittvekt på omtrent 70 g (første uttak – 14 - 15. oktober 2020) til utslakt med en snittvekt på 5,3 kg (mars - april 2022).

Det innebærer at de samme gruppene har blitt fulgt i kommersiell skala både i ferskvannsfasen på settefiskanlegg og videre etter utsett i sjø på Bremnes Seashore sin matfisk lokalitet Hattasteinen på Bømlo, Hordaland.

2.2 Forsøksdesign

I forsøket ble fisken delt inn i to behandlingsgrupper: en gruppe som ble smoltifisert ved bruk av manipulering av fotoperiode (fotoperiode-gruppen), og en gruppe som ble smoltifisert ved bruk av salter i dietten (saltfôr-gruppen). Hver gruppe hadde tre replikater/enheter (n = 3) av atlantisk laks hvor hver enhet (kar/merd) inneholdt omtrent 70 000 fisk. Fotoperiode-gruppen besto av kar 109, 111 og 112 og saltfôr-gruppen besto kar 101, 105 og 108. Karene ble tilfeldig plassert i samme hall. En oversikt over gruppene er vist i tabell 2.

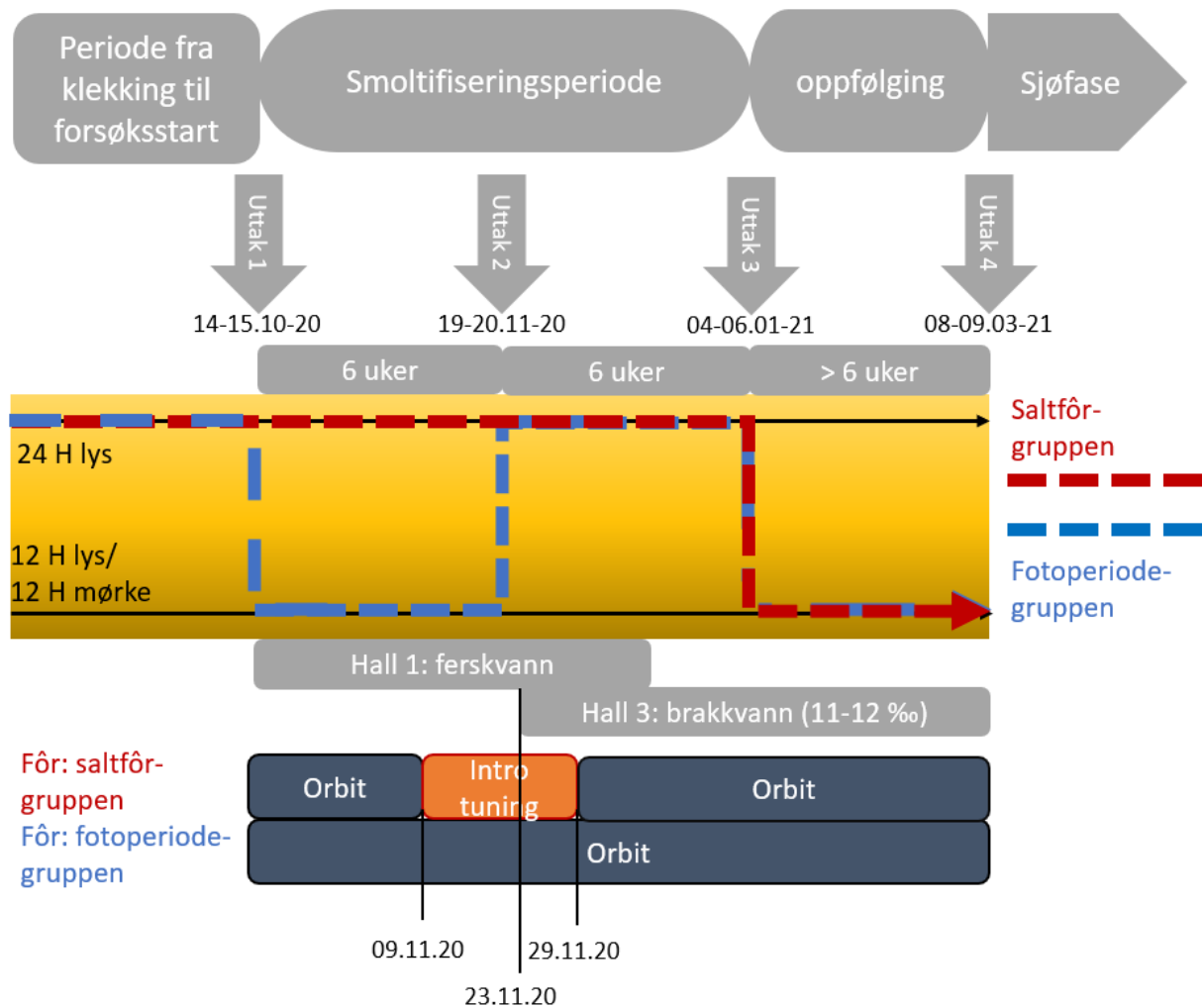
Tabell 2. Inndeling av forsøksgruppene, antall og snittvekt ved forsøksstart på Trovåg og merd nummer, dato for utsett og antall ved utsett i sjø.

Kar nr. ved start	Kar nr. i hall 3	Antall v/forsøksstart	Snittvekt v/forsøksstart	Merd nr. i sjø	Dato for utsett sjø	Antall v/utsett sjø
Fotoperiode						
Kar 109	310	71 961	72,8	12	23.03.21	69 208
Kar 111	306	72 013	60,8	4	16.03.21	71164
Kar 112	304	72 046	68,1	9	23.03.21	70 941
Saltfôr						
Kar 101	305	75 718	63,4	5	16.03.21	74 463
Kar 105	308	72 120	83,8	11	24.03.21	71 139
Kar 108	303	72 981	67,1	8	21.03.21	71 598

Fôret som ble benyttet i forsøket er levert av biomar. I hall 1 ble saltfôr-gruppen fôret med Orbit CPK 40 frem til 09.11.20, deretter ble de fôret med Intro Tuning 100 (tilsatt salter) fram til flytting til hall 3 (23 – 29.11.20 for saltfôr-gruppen – se appendiks tabell A1). Fotoperiode-gruppen ble fôret med Orbit CPK40 hele tiden den var i hall 1. I hall 3 ble gruppene fôret med det samme fôret, Orbit EX 100, frem til fisken var omtrent 300 g, deretter gikk de over på Orbit EX 500. Det ble fôret etter appetitt.

Fotoperiode-gruppen ble fra oppstart av forsøket (15.10-2020) satt på en vinterperiode (12H lys/12H mørke) i 6 uker etterfulgt av en vårperiode med kontinuerlig lys (24H lys) i 6 uker. Saltfôr-gruppen ble satt på kontinuerlig lys i 12 uker. De siste ukene før utsett ble begge gruppene satt på vintersignal (12H lys/12H mørke) for å unngå tidlig kjønnsmodning i sjøfasen.

Fisken ble overført til sjø omtrent ved vårjevndøgn for å unngå døgnrytme-ændring ved utsett i sjø.



Figur 2. Flytskjema som illustrerer de ulike fasene som fisken har gjennomgått, tidspunkt for prøveuttak, lysstyring for ved de ulike smoltinduseringsregimene og eksponering for ferskvann og brakkevann. Det er også presentert perioden hvor saltfôr-gruppen fikk intro tuning fôr. De ulike enhetene ble overført fra ferskvann (hall 1) til brakkevann (hall 3) i løpet av perioden 23.11 – 17.12.20, derfor er det en overlapp mellom hall 1 og hall 3 hvor det i løpet av overføringsperioden var fisk i begge hallene (appendiks Tabell A1). Figuren illustrerer en akutt overgang fra settefiskanlegg til sjøfase etter siste uttak, i realiteten ble de forskjellige karene overført til sjø i perioden 16.03 – 23.03.2021 (Tabell 2). Viktige tidspunkt (datoer) i forbindelse med gjennomføringen er lagt inn i figuren.

2.3 Oppsett og praktiske forhold i sjøfasen

Etter settefiskfasen ble fisken satt ut på Bremnes Seashore sin matfisklokalitet, Hattasteinen på Bømlo. Her ble de overført til merder hvor replikatene ble plassert slik at eventuelle stressfaktorer (lusepåslag, strøm, daglig drift etc.) skulle påvirke begge gruppene tilnærmet likt. Dato for utsett i sjø er presentert i tabell 2, og oversikt over plassering av merdene er presentert i appendiks (Figur A3).

Praktiske forhold som tidspunkt for overføring til sjø og slakt, samt stressende avlusingsoperasjoner, ble forsøkt å gjøres så likt som mulig for behandlingsgruppene. Dette innebærer at utsett og slakt etter beste evne ble gjort slik at det ble satt ut eller slaktet én enhet fra fotoperiode-gruppen og én enhet fra saltfôr-gruppen samtidig (i praksis ble det gjerne 1-2 dager i forskjell). I og med at avlusing kan virke stressende for fisken, og medfører sultedager i forkant (ofte 4) samt svakere fisk med redusert appetitt i dagene etter – ble avlusing organisert på samme måte. Altså, ved avlusing ble alltid en merd fra fotoperiode-gruppen og en fra saltfôr-gruppen behandlet samtidig (under samme operasjon).

Synkronisering av utsett, behandlinger, sultedager og slakt medfører at behandlingsgruppene hadde et tilnærmet likt antall fôringsdager (gjennomsnitt \pm std) - med $327,67 \pm 32,33$ dager for fotoperiode-gruppen, og 328 ± 31 for saltfôr-gruppen. Likt antall fôringsdager er en viktig forutsetning for å kunne sammenligne gruppenes tilvekst.

Fisken ble fôret fra fôringsentral, og dette ble gjort uten at operatørene på fôringsentralen var oppmerksom på hvilke merder som tilhørte hvilken gruppe. Likevel visste de at fisk fra lokaliteten var del i et forsøk. Slaktedata er hentet fra slakteriet til Bremnes Seashore, og dataene representerer all slaktefisk fra de respektive merdene.

2.4 Prøveuttak

Det ble gjennomført totalt fire prøveuttak fra behandlingsgruppene i løpet av perioden fisken var på RAS-anlegget på Trovåg (Tabell 3). Det første uttaket ble gjort like før forsøket/lysstyringen startet, noe som medfører at gruppene var behandlet likt fram til dette tidspunktet. Etter at første prøveuttak var gjennomført startet den ulike smoltinduseringsbehandlingen, som forklart og illustrert over.

Tabell 3. Oversikt over tidspunkt for prøveuttak.

Gruppe:	Uttak	Dato
Fotoperiode	1	14.10.2020
Saltfôr		15.10.2020
Fotoperiode	2	19.11.2020
Saltfôr		20.11.2020
Fotoperiode	3	04-05.01.2021
Saltfôr		05-06.01.2021
Fotoperiode	4	08.03.2021
Saltfôr		09.03.2021

Fisk ble tatt opp fra deres respektive enheter ved bruk av håv, og ettersom fisken ble større og flyttet til avdeling med større kar ble det benyttet en større, nedsenkbar håv. Da det skulle tas ut 25 fisk fra hvert kar (15 til qPCR + 10 til histologi) ble det tatt ut fisk i tre omganger per kar. I første og andre omgang ble det tatt ut henholdsvis 7 og/eller 8 fisk om gangen for de som skulle på RNA-later for qPCR-analyse og deretter 10 for de som skulle på formalin til histologi. Ved å gjøre det på denne måten ble det sørget for at hjertene ble satt på RNA-later innen 30 minutter etter at fisken ble avlivet. Det ble håvet et tilfeldig utvalg fisk som ble overført til en bøtte med vann (omtrent 10 L) som var tilsatt 25 mL benzokain (stock: 100 g/L in 96 % ethanol). Dette gjorde at fisken var avlivet innen den var transportert opp til laboratoriet for måling og disseksjon. Det ble arbeidet kaldt gjennom hele prosessen, hvor fisk ble lengdemålt, veid og fotografert fortløpende ettersom de ble plukket ut av bøtta. Videre ble de lagt i rekkefølge i en form/et kar hvor temperaturen ble holdt nede ved hjelp av kaldt vann, isbiter og kjøleelementer frem til disseksjon. All fisk (25 per kar per uttak = totalt 600 stk) legger grunnlag for vekt, lengde, hjertebilder og helfisk-bilder. Av disse ble 360 brukt til analyse av genuttrykk fra hjertet (15 per kar per uttak) med qPCR, scoring av synlige morfologiske smoltkarakterer og SmoltVision-analyse.

2.4.1 Veiling, lengdemåling og fotografering av fisk

Det ble benyttet en vekt beregnet for laboratoriearbeid fra Ohaus (Valor™ 2000W Series) og målingene ble bestemt til nærmeste gram. Fisken ble lengdemålt fra snutespiss til enden av halefinnens midtstråle (gaffellengde), og ble bestemt til nærmeste millimeter. Hver fisk ble deretter overført til et fotograferingsoppsett hvor fisken ble fotografert ovenfra mens den var liggende på siden, slik at fiskens venstre lateralside ble avbildet. Bildene ble tatt med iPhone 11 pro. På fotograferingsoppsettet var det montert på lys slik at det var lik belysning ved hvert uttak. Kamera var fastmontert, noe som sikret en lik vinkel på alle bildene.

2.4.2 Disseksjon, veiling, fotografering og oppbevaring av hjertet

Disseksjon av hjertet ble gjort ved å legge fisken med dens ventrale side opp, og forsiktig skjære opp buken fra posterior til anterior, med inngang i gattet. Deretter ble hjertet tatt ut av fisken ved å kutte bulbus arteriosus i overgangen mellom bulbus og ventrale aorta ved bruk av en saks. Ved å forsiktig dra ut hjertet ble overgangen mellom sinus venosus og atrium brytt (i noen tilfeller ved hjelp av saks), slik at hjertene som ble tatt ut var bestående av bulbus arteriosus, ventrikkel og atrium. Etter disseksjon ble hjertet vasket med sterilt vann og det ble brukt et

tørkepapir for å tørke bort blod. For å tømme ventrikkelen for blod ble hjertet trykket lett ned mot et papir slik at blodet ble presset ut av hjertet. Deretter ble hjertet overført til kameraoppsettet (der kontaktoverflaten ble holdt kjølig ved hjelp av kjøleelement mellom fotograferingene) hvor hjertet ble avbildet ovenfra og liggende på siden (Figur 3). Videre ble hjertet overført til et 15 mL sterilt VWR sentrifugerør fylt med 5 mL RNA-later (R0901 Sigma Aldrich). Hjertene ble veid ved å finne differansen av prøveglasset fylt med RNA-later før og etter at hjertet ble overført til glasset. Veiking av hjertet ble gjennomført med en mikroanalysevekt med veierom fra Sartorius (Sartorius ENTRIS124i-1S; målenøyaktighet nærmeste 0,1 mg) gitt i milligram. Som beskrevet av leverandør av RNA-later, ble prøvene satt i kjøleskap i et døgn før de ble nedfrost (-20 °C) inntil arbeidet med RNA-ekstraksjon startet. Forsendelse av prøvene fra Trovåg til Norges Fiskerihøgskole ble gjort med flyfrakt fra Bring Express (over natten), hvor prøvene var pakket i isolerende isoporbokser med fryseelement. Pakkingen ble gjort av ansatte ved Trovåg.

2.5 Beregning av biomorfometriske indekser

Spesifikk vekstrate

Spesifikk vekstrate (SGR) er et uttrykk for den daglige vektøkningen. SGR kan beregnes med følgende formel, der V1 og V2 er vekten (g) ved hhv. tidspunkt T1 og T2:

$$SGR = \left(\frac{\ln V2 - \ln V1}{T2 - T1} \right) * 100$$

Kondisjonsfaktor

Kondisjonsfaktor (K-faktor) er et uttrykk for forholdet mellom fiskens vekt og lengde. Kondisjonsfaktor kan beregnes ved å benytte Fulton's formel, der W er fiskens vekt (g) og L er fiskens lengde (cm).

$$K = \left(\frac{W}{L^3} \right) * 100$$

Relativ hjertevekt

Relativ hjertevekt (CSI) er et begrep som brukes om hjertets vekt i forhold til fiskens kroppsvekt. CSI kan beregnes ved følgende formel, der W er fiskens vekt (g) og H er hjertevekt (g), bestående av atrium, ventrikkel og bulbus arteriosus.

$$CSI = \left(\frac{H}{W}\right) * 100$$

Hjertets høyde/bredde-ratio

Høyde/bredde-ratio er forholdet mellom hjertets høyde (H) og bredde (W). Høyde/bredde-ratio kan beregnes ved følgende formel, der H er hjertets høyde og W er hjertets bredde. Se avsnitt 2.7 for metode for måling av hjertehøyde og -bredde.

$$\frac{H\text{øyde}}{Bredde} \text{ ratio} = \left(\frac{H}{W}\right)$$

Relativ halelengde

Hale/kropp-ratio er forholdet mellom fiskens bakre del (kaudalfinnen) og resten av fiskens lengde (fiskelengde – halelengde). Hale/kropp-ratio kan beregnes ved følgende formel, der X er den kaudale finnens lengde og Y er kroppens lengde. Se avsnitt 2.8 for metode for måling av hale og kropp.

$$\frac{Hale}{kropp} \text{ ratio} = \left(\frac{X}{Y}\right) * 100$$

2.6 Bestemmelse av smoltifiseringsgrad (SmoltVision og gradering av morfologiske smoltkarakterer)

For 15 fisk fra hvert kar ved hvert uttak (totalt 360 fisk) ble det gjennomført SmoltVision analyser fra fiskens gjeller. Gjelleprøvene ble tatt fra fiskens andre gjellebue på venstre side, ved hjelp av pinsett og saks som ble sterilisert med gassbrenner mellom hvert individ. Prøvene ble lagt i hvert sitt egnet PCR-rør med 1 mL RNA-later. Gjelleprøvene ble satt et døgn i kjøleskap før de ble overført til frys for oppbevaring inntil de ble sendt til SmoltVision analyse hos PHARMAQ Analytiq i Bergen.

Samtidig som gjelleprøvene ble tatt ble det også vurdert smoltindeks ved å vurdere synlige morfologiske smoltkarakterer. Det ble undersøkt grad av parrmerking, sølvfarging og mørkhet på finnekanter hver for seg, hvor hver av de undersøkte morfologiske smoltkarakterene ble

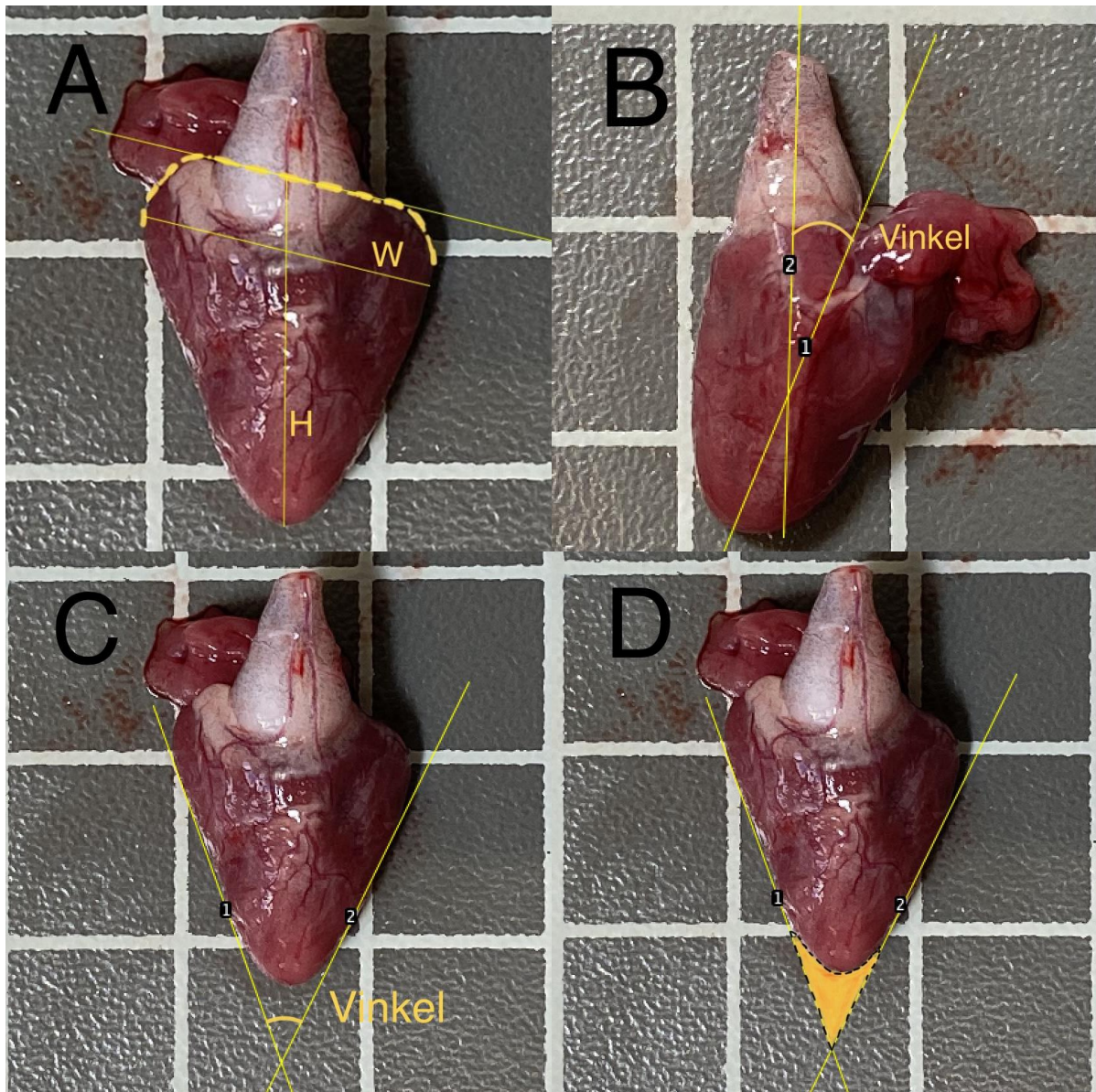
scoret fra en til fire. Ett poeng betyr at fisken ikke har startet utvikling av synlige smolttrekk (ingen sølvfarge, sterke parrmerker og ingen finnekanter), og fire poeng betyr at fisken har utviklet smolttrekk (sølvfarget, ingen parrmerker og mørke finnekanter). De enkelte vurderingene av sølvfarging, parrmerker og finnekanter vil gi en gjennomsnittsverdi for hver fisk, som er fiskens smoltindeks og indikerer fiskens samlede vurdering av synlige morfologiske smoltkarakterer. Vurderingene ble gjort av ansatte ved Trovåg, som en del av deres prosedyre for å vurdere smoltstatus.

2.7 Beregning av hjertemorfologiske indekser

Morfologiske mål av hjertet for hver fisk ble gjennomført med bildebehandlingsprogrammet imageJ. På bildene fotografert ovenfra ble det stiptet en linje (baselinje) rundt ventrikkel slik at bulbus arteriosus og atrium ble ekskludert. Dette muliggjorde måling av ventrikkelhøyde og -bredde. Høyde (H) ble beregnet ved å trekke en linje fra hjertespissen til baselinja, og bredden (W) ble beregnet ved å trekke en linje på det bredeste, parallelt med basen (Figur 3A). Høyde/bredde-ratio ble beregnet etter formel gitt i avsnitt 2.5. Lignende metoder er brukt av Poppe et al. (2003), Brijs et al. (2020) og Perry et al. (2020).

For å bestemme innrettingen av bulbus arteriosus på ventrikkelen ble det målt vinkel mellom den langsgående ventrikulære aksene og aksene til bulbus arteriosus bestemt fra bilder hvor hjertet ligger på siden. Den langsgående ventrikulære aksene ble tegnet fra hjertespissen gjennom baselinja med utgang mellom bulbus arteriosus og atrium ved overgang/start av bulbus arteriosus. Aksene til bulbus arteriosus ble tegnet sentralt langs bulbus arteriosus ned til strekene krysses (Figur 3B). Lignende metoder er brukt av Poppe et al. (2003) og i senere tid også av andre forfattere som og Brijs et al. (2020).

Ventrikkelens form har også blitt bestemt ved å trekke to linjer langs ventrikkelens sider, og deretter bestemme vinkel mellom strekene som krysses, og ved å beregne areal av området som dannes mellom linjene foran ventrikkelspissen (Figur 3C og 3D). Arealet er beregnet av imageJ og er et relativt areal.

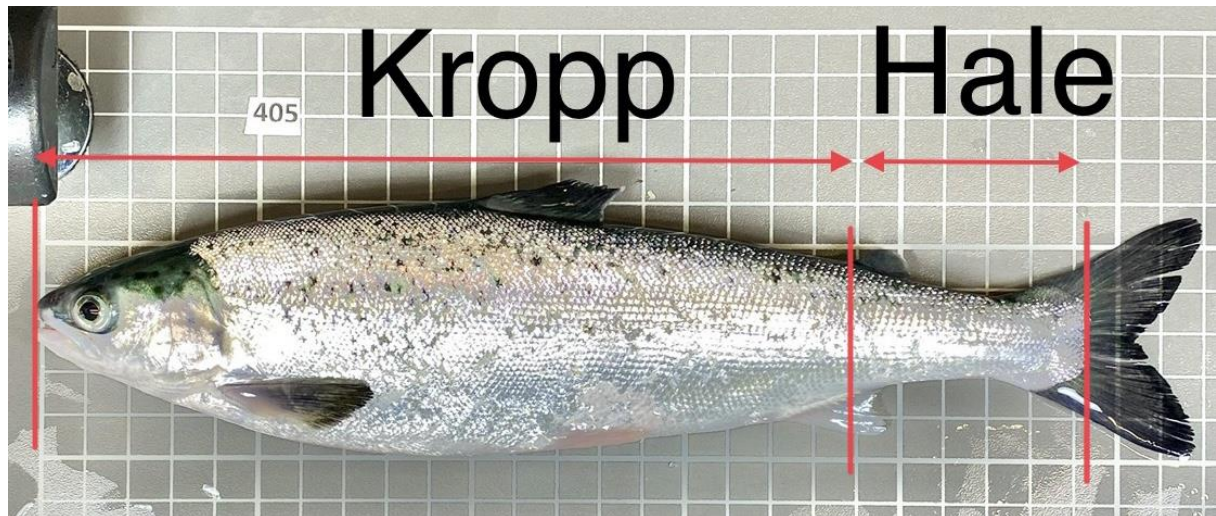


Figur 3. Beregning av hjertemorfologi for hjertet til atlantisk laks. Bildene illustrerer metode for måling av hjerte/bredde-ratio (3A), bulbus innretting på ventrikkel (3B) og «rundhet» på ventrikkelspissen gitt som vinkel og areal i henholdsvis figur 3C og 3D. Høyde/bredde-ratio og rundhet er målt fra hjertebilder tatt forfra. Vinkel på bulbus innretting er beregnet fra bilder der hjertet er lagt på siden. Analysene er gjort med bildebehandlingsprogrammet imageJ. Rutene i bakgrunnen av figuren er 1 x 1 cm.

2.8 Beregning av relativ halelengde (hale/kropp-ratio)

Beregning relativ halelengde ble gjennomført ved å analysere bilder av hel fisk i bildebehandlingsprogrammet imageJ ved hjelp av relative mål. Fiskens hale er i denne studien definert som lengden fra overgangen mellom fiskens kropp og halefinne til sentralt på fisken under starten av fiskens fettfinne (Figur 4). Det samme målet for fiskens hale er brukt i annet arbeid for å finne hale/kropp-ratio for et utvalg laksefisk i forbindelse med smoltifisering (Kuzishchin et al., 2019). Kropp er definert som resten av fisken (fra snuten til starten på

fettfinnen). Formel for relativ halelengde (hale/kropp-ratio) (avsnitt 2.5) ble benyttet for å finne forholdet gitt i prosent.



Figur 4. Viser hvilke mål som ble brukt for å bestemme fiskens relative halelengde (hale/kropp-ratio). Halen regnes fra sentralt på fisken rett under starten på fettfinnen, til overgangen mellom halen og kaudalfinnen. Kroppen regnes som resten av fisken. Samme metode for å finne lengde på halefinnen er brukt av bl.a. Kuzishchin et al. (2019) (kontrast og glans er endret på bildet for å gjøre fettfinnen mer synlig). Rutene i bakgrunnen av figuren er 1 x 1cm.

2.9 Analyse av genuttrykk i hjertet

Tabell 4 presenterer en oversikt over genene som ble benyttet i denne studien, og deres funksjon.

Tabell 4. Viser en oversikt over genene som ble inkludert i dette eksperimentet.

Gen	Funksjon/markør
Sal_18S	Referansegen (housekeeping gene)
B-aktin	Referansegen (housekeeping gene)
Elongeringsfaktor (EF)	Referansegen (housekeeping gene)
A-type natriuretic peptide (ANP)	Hjertestress
B-type natriuretic peptide (BNP)	Hjertestress
GATA Binding Protein 4 (GATA4)	Hjertevekst (hypertrofi)
Myocyte Enhancer Factor 2C (MEF2C)	Hjertevekst (hypertrofi)
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Angiogenese (dannelse av blodårer)

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	Hjertevekst (hyperplasia)
Irisin A	Hjertefunksjon og hjertelidelser (arteriosklerose/infarkt)
Irisin B	Hjertefunksjon og hjertelidelser (arteriosklerose/infarkt)

2.9.1 RNA-ekstraksjon fra hjerter

For ekstraksjon av RNA fra hjertene ble det benyttet RNeasy® Plus Universal Kit fra Qiagen (cat. no. 73404). Hele hjerter ble homogenisert i 2 mL eppendorfrør som inneholdt 900 µL QIAzol Lysis Reagent og en magnetisk kule, ved å bruke en Tissuelyser II (2 x 2 minutter). Oppsettet/boksene som prøvene var satt i ved homogenisering i Tissuelyser var på forhånd nedkjølt i -20 °C -fryser for å forhindre at det akkumuleres varme som kan påvirke RNA i prøvene. Homogeniserte prøver ble inkubert i romtemperatur i 5 minutter før det ble tilsatt 100 µL gDNA eliminator solution for å fjerne gDNA fra prøvene. Løsningen ble ristet/blandet i 15 sekund ved å bruke en vortex. Deretter ble løsningen tilsatt 180 µL kloroform, før de ble ytterligere blandet/ristet og inkubert i 2 - 3 minutter, etterfulgt av 15 minutter sentrifugering på 12000 rpm i 4 °C. Sentrifugeringen, sammen med tilsetningen av kloroform, forårsaket en fase-separasjon i løsningen der protein ekstraheres til den organiske fasen og RNA løses i den vandige fasen. Ved å pipettere ut den øverste, vandige fasen, vil man kunne isolere RNA fra prøven. Den vandige fasen var mellom 550 – 600 ul, og ble pipettert ut og tilsatt i nye eppendorfrør (1,5 ml), sammen med 600 µL 70 % ethanol og blandet med vortex i 15 sekund. Løsningen ble videre overført til RNeasy Mini Spin Column med et 2 mL oppsamlingsrør (inkludert i kitet) og sentrifugert i 15 sekund på 8000 rpm. Denne prosessen ble gjentatt to ganger slik at hele løsningen ble brukt, da Mini Spin Column maksimalt rommet et volum på 700 ul. Deretter ble 700 µL Buffer RWT (inkludert) tilsatt RNeasy Mini Spin Column, og sentrifugert (15 sekund, 8000 rpm) og «flow-through» kastet. Den samme prosessen ble gjentatt to ganger for 500 µL buffer RPE (inkludert). Til slutt ble det byttet til et nytt oppsamlingsrør og kjørt en ekstra runde med sentrifugering på 1 minutt, for å ytterligere tørke membranen/filteret (8000 rpm). RNA ble overført til en 1,5 mL DNA Lobind tube (Z666548-250EA) ved å sette RNeasy Mini Spin Column oppi Lobind tube, hvor det ble tilsatt 30 µL

RNase-fritt vann før den ble inkubert i 10 minutter og deretter sentrifugert i 1 minutt på 8000 rpm.

Da RNeasy® Plus Universal Kitet fra Qiagen er basert på vevprøver opp til 100 mg ble det nødvendig å endre på fremgangsmåten for homogenisering av de større hjertene (uttak 2, 3 og 4). Dette ble gjort ved at hjertene ble delt i flere mindre biter, og fordelt i opp til tre eppendorf-rør med QIAzol Lysis Reagent ved homogenisering. I tillegg til å kutte hjertene i mindre biter, ble det tilsatt økt volum QIAzol Lysis Reagent, samt kjørt flere runder i Tissuelyser ved homogenisering. Ved et senere tidspunkt i protokollen ble løsningene satt sammen, slik at genmateriale fra alle delene av hjertet inngikk i qPCR analysene.

RNA kvaliteten ble bestemt ved bruk av nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer). Renheten til RNAet ble bestemt basert på forholdet 260/280 som er 1,8 - 2,0. Forholdet 230/260 bestemmer DNA/protein-forurensning i prøven. Basert på disse forholdene ble det bestemt hvorvidt ytterligere DNase behandling var nødvendig.

2.9.2 DNase behandling

Gjennom nanodrop ble det bestemt hvilke prøver som hadde kontaminasjon, og som skulle gjennom en DNase behandling (11 prøver). Til DNase behandling ble det benyttet Routine TURBO DNA-free Kit fra Invitrogen (AM1907). Prøvene hadde et volum på 30 µL hver fra RNA-ekstraksjonen. Det ble tilsatt 0,1 av volumet (3 µL) med 10X TURBO DNase™ buffer og 1 µL TURBO DNase™ Enzym til RNAet. Løsningene ble forsiktig mikset sammen, og satt på inkubering i 37 °C i 20 - 30 minutter. Deretter ble det tilsatt 0,1 av volumet (3 µL) DNase Inactivation Reagent for å stoppe reaksjonen. Videre ble prøvene inkubert i romtemperatur i 5 minutter samtidig som de ble flikket tre ganger hver, for å skape bevegelse og blande inaktiveringsenzymet til hele prøven. Til slutt ble prøvene sentrifugert på 10 000 rpm i 2 minutter for å felle ut det genomisk DNAet i bunnen av røret. Supernatanten som inneholdt RNA ble forsiktig pipettert ut og overført til en ny DNA Lobind tube. De fleste prøvene fikk ikke særlig mye bedre kvalitet som følge av DNase behandlingen. Dette er kanskje på grunn av for lav mengde enzym i «Routine DNase treatment», og at det med fordel kunne blitt benyttet «Rigorous DNase treatment». Prøvene ble igjen fryst på -80 °C frem til cDNA syntese.

2.9.3 cDNA syntese

Syntese av cDNA ble gjort ved å bruke High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit fra Applied Biosystems (4387406). 200 ng RNA ble brukt til cDNA-syntese, og basert på konsentrasjonen ble RNAet fortynnet til 1:20, 1:40 eller 1:60. Et volum på mindre enn 2 µL ble ikke akseptert da pipettering av små volum kan medføre unøyaktighet. Et volum på over 9 µL ble ikke akseptert da reaksjonen bare tilsa et volum på opptil 9 µL RNA. For prøvene som hadde en konsentrasjon som gjorde at et volum lavere enn 9 µL inneholdt 200 ng RNA, ble det resterende volumet erstattet med vann slik at det samlede volumet (RNA + vann) ble 9 µL. Prøvene med RNA ble tint på is, og 9 µL RNA + vann fra hver prøve ble pipettert over i et 96-brønners brett og tilsatt 11 µL buffermix, slik at totalt reaksjonsvolum ble 20 µL. Buffermixen består av 10 µL 20X RT Buffer Mix og 1 µL 2X RT Enzyme Mix. Som anbefalt i protokollen ble det laget buffermix for flere reaksjoner, på grunn av eventuell pipetteringsfeil. Det ble laget et brett om gangen, og totalt fire brett ble benyttet til cDNA syntese - som hver representerte uttak 1, 2, 3 og 4. For hvert brett ble det laget negativ kontroll og genomisk DNA (gDNA)-kontroll. Negativ kontroll ble tilsatt vann og buffermix (med enzym) og ble gjort for å utelukke kontaminering i vann eller buffermix. Genomisk DNA-kontroll ble tilsatt RNA og buffer (uten enzym) for å utelukke at prøvene er kontaminert av gDNA. Under hele prosessen ble det arbeidet på is for å holde prøvene kalde. Platene ble deretter forseglest med lokkstriper, og spunnet ned før brettet ble satt i PCR-maskin (Applied Biosystems GeneAmp® PCR systems 2700) hvor platene ble inkubert på 37 °C i 60 minutter, 95 °C i 5 minutter og til slutt nedkjøling på 4 °C. cDNA prøvene ble lagret på -20 °C.

2.9.4 Primere

Primerne ble testet ved å lage en standardkurve som viser primernes effektivitet ved ulike fortyngninger av cDNA. Dette ble gjort ved å mikse cDNA fra et utvalg ulike prøver, hvor den ble testet i triplikater med en fortyngingsserie på 7 fortyngninger, fra 1:10 – 1:640 (gjort ved en two-fold dilution serie). cDNA ble fortynnet med nuclease-fritt vann (dH2O). Standardkurven ble kjørt i qPCR-program som beskrevet under, og fra qPCR ble det dannet en standardkurve ved å plote C_T -verdiene mot fortyngningens log-verdi, og stigningstallet ble beregnet. Ved bruk av følgende formel ble primerens effektivitet (E) regnet ut:

$$E = 10 \left(\frac{1}{\text{stigningstall}} \right)$$

Primer blast og IDT ble brukt til å designe spesifikke primere for hvert gen. Primerne ble designet av biveileder, Dhivya. Det ble laget en stamløsning på 100 µM som ble fortynnet til en bruksløsning på 5 µM og lagret på -20 °C. Primerne som er benyttet i denne studien er presentert i appendiks (Tabell A2).

Det ble benyttet tre referansegener (housekeeping genes); 18S, Aktin og Elongeringsfaktor (EF). Det geometriske gjennomsnittet av disse ble benyttet for å beregne uttrykk av genene som ble undersøkt i hjertet til atlantisk laks.

2.9.5 Real-time PCR analyse

Fra cDNA syntese ble det gjort en 1:40 fortynning av cDNAet som videre ble brukt til qPCR. Ved qPCR ble det laget duplikater av hver prøve, og for hver reaksjon (prøve) ble det tilsatt 5 µL cDNA og 10 µL mastermix (bestående av 7,5 µL Fast Sybr Green, 1,25 µL FP og 1,25 µL RP) noe som utgjorde et totalt reaksjonsvolum på 15 µL. cDNAet (5 µL) ble på forhånd pipettert over i egnede plater for qPCR (MicroAmp Fast 96-well Reaction Plate (0,1 ml), applied biosystems (cat. no. 4346907)) med en multikanalpipette (8-kanalerspipette ved bruk av filterspisser), før de ble oppbevart på -20 °C. Under qPCR-arbeidet ble platene tatt ut etter behov, og tilsatt mastermix med en multikanalpipette før de ble forseglet med egnede lokkstriper og analysert ved bruk av 7500 Fast Real-Time PCR System (applied biosystems, CA, USA). Tabell 5 viser setup som ble benyttet til å kjøre qPCR og standardkurver.

Tabell 5. Viser normal PCR setup som ble benyttet til å kjøre qPCR (Fast SYBR® Green Reagents) og standardkurver.

	Hold-fasen		PCR-fasen		Smeltekurv-fasen		
Temperatur	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C	95 °C	60 °C	95 °C
Tid (min:sek)	02:00	10:00	00:15	01:00	00:15	01:00	00:15
Repetisjoner (totalt)			40x				
Temperatur- økninger	1,6 °C/s	1,6 °C/s	-	1,6 °C/s	1,6 °C/s	1,6 °C/s	0,075 °C/s

2.10 Statistiske analyser og presentasjon av data

For hver av de vurderte variablene er det enhetene/karene som legger grunnlag for grafisk fremstilling i excel (2202 versjon) og statistiske analyser ($n = 3$ per behandlingsgruppe) i SYSTAT (13.2 versjon). Enkelte variabler (genuttrykk, smoltvision (ATPase ratio) og smoltindeks) baserer seg på gjennomsnittsverdier fra 15 fisk per enhet (totalt 45 fisk per behandlingsgruppe per uttak). De øvrige variablene baserer seg på gjennomsnittsverdier fra 25 fisk per enhet (75 fisk per behandlingsgruppe per uttak).

Ettersom utgangspunktet for de statistiske analysene er gjennomsnitt fra kar, gir det liten mening i å teste for normalfordeling på gruppenivå ($n = 3$). For å vurdere om datasettene tilfredstilte krav til normalfordeling og homogen varians, og dermed grunnlag for bruk av parametrisk statistikk, ble residualene vurdert visuelt for hver enkelt modell. Dersom data er normalfordelt, og den statistiske modellen som benyttes gir en adekvat beskrivelse av data, vil også residualene fordele seg homogent rundt 0. Til dette formålet ble studentiserte residualer benyttet for å redusere eventuell bias fra enkeltverdier. Den statistiske modellen ble også justert, ved å introdusere en eksponent, eller et ekstra ledd (polynomial tilpasning), i tilfeller der det gav en bedre forklaringsgrad sammenlignet med en lineær modell. For CSI var det ikke mulig å tilpasse modellen, eller transformere data (log), og her ble gruppene sammenlignet ved bruk av ikke-parametriske Mann-Whitney med Bonferroni-justert sannsynlighet (p - verdi) for å kompensere for gjentakende tester (4). På grunn av begrensninger knyttet til ikke parametriske tester, ble det ikke skilt på gruppe ved undersøkelser av signifikant forskjell i tid for CSI (mellom uttakene). Dette er heller ikke nødvendig da det ikke ble funnet signifikant forskjell mellom gruppene i utvikling av CSI. Utvikling i tid for CSI ble undersøkt ved Kruskal-Wallis test.

De ulike modellene som ble vurdert for hver variabel er 1) uttak*gruppe, 2) uttak²*gruppe*uttak, 3) uttak*gruppe med log 2 transformert Y-variabel og 4) uttak*gruppe med log 10 transformert Y-variabel. Det ble valgt den modellen som beskrev dataene best, og dersom flere modeller beskrev en variabel like godt ble den enkleste modellen valgt. Forskjeller ble bestemt å være signifikant når $p < 0,05$. Etter ANOVA, ble det gjennomført Post Hoc Tukey's test for å undersøke for eventuell signifikans mellom gruppene ved hvert uttak (*), eller forskjell mellom uttak for hver gruppe (bokstaver).

Statistiske tester for ytelse i sjø ble gjort med ANOVA. For SGR, bFCR og VF3 ble det også undersøkt muligheten for å bruke vekt ved utsett som kovariat, men dette endret ikke funnene.

3 Resultater

3.1 Fiskevekt, hjertestørrelse og synlige smoltkarakterer

Tabell 6 presenterer en rekke variabler som legger grunnlag for beregning av kondisjonsfaktor, CSI og smoltindeks. Gruppene har et relativt likt utgangspunkt når det gjelder lengde, vekt og hjertevekt, der saltfôr-gruppen lå noe høyere på alle parametrene – stort sett gjennom hele forsøket. Beregning av daglig tilvekst viser at saltfôr-gruppen har en marginalt høyere tilvekst med en SGR på 1,34 mot 1,33 for fotoperiode-gruppen i settefiskfasen. Dette gir en 7,6 % høyere kroppsvekt ved siste uttak for saltfôr-gruppen mot 6,3 % høyere ved forsøksstart. Gradering av synlige morfologiske smoltkarakterer viser et noe ulikt utgangspunkt for behandlingsgruppene når det gjelder parrmerking og sølvfarging, noe som påvirker smoltindeks (Figur 5) tidlig i forsøket. Ved tredje og fjerde uttak har begge gruppene stort sett full score på alle de synlige morfologiske smoltkarakterene.

Tabell 6. Gjennomsnittsverdier (\pm stdv) for målinger og vurderinger i løpet av smoltifiseringsperioden til atlantisk laks smoltifisert ved manipulering av lys (fotoperiode-gruppen) og tilsetning av salter i fôret (saltfôr-gruppen) ved fire tidspunkt gjennom smoltifiserings- og tilvenningsfasen i RAS anlegg. Disse målingene legger grunnlag for beregning av kondisjonsfaktor, CSI og smoltindeks. For lengde, vekt og hjertevekt er det benyttet tre kar per behandlingsgruppe ($n = 3$) med gjennomsnittet av 25 fisk fra hvert kar. Ved vurdering av parrmerker, sølvfarging og finnekant ble det benyttet tre kar per behandlingsgruppe ($n = 3$) med 15 fisk fra hvert kar.

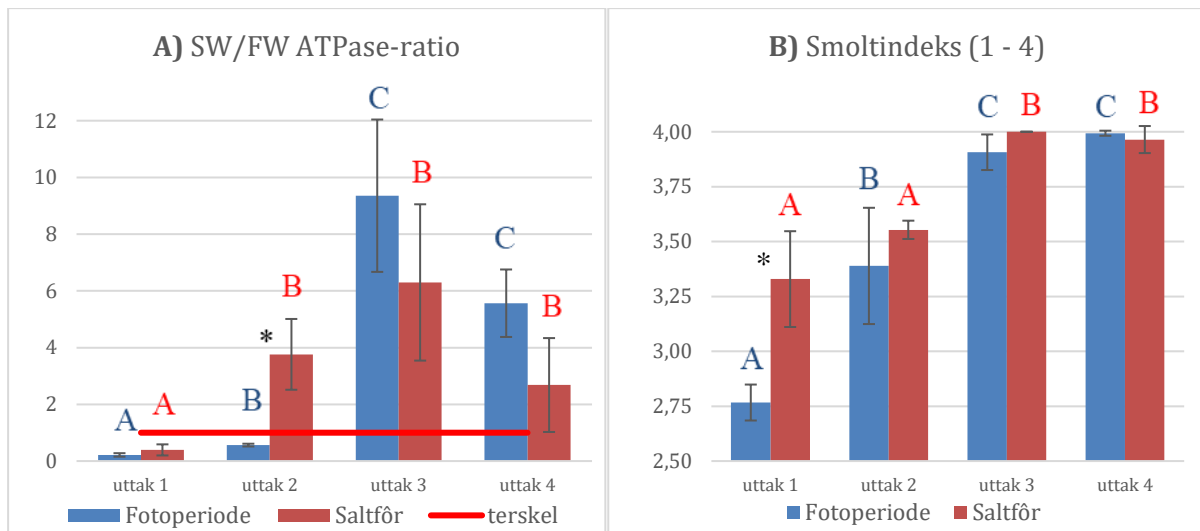
Variabel	Behandling	Uttak 1	Uttak 2	Uttak 3	Uttak 4
Lengde (cm) gj. snitt (+/- std)	Fotoperiode	17,2 \pm 0,4	21,3 \pm 1	25,2 \pm 1,3	32,6 \pm 0,9
	Saltfôr	17,3 \pm 0,7	21,5 \pm 1,5	26,5 \pm 1,7	32,9 \pm 2,2
Vekt (g) gj. snitt (+/- std)	Fotoperiode	67,2 \pm 6,1	135,5 \pm 15,8	200 \pm 33,2	462,9 \pm 42,3
	Saltfôr	71,4 \pm 10,8	132,8 \pm 23,3	242,6 \pm 43,5	498,5 \pm 104,5
Hjertevekt (g) gj. snitt (+/- st)	Fotoperiode	0,078 \pm 0,004	0,159 \pm 0,028	0,289 \pm 0,052	0,609 \pm 0,062
	Saltfôr	0,083 \pm 0,013	0,163 \pm 0,036	0,354 \pm 0,075	0,647 \pm 0,150
Parrmerker gj. snitt (+/- std)	Fotoperiode	2,84 \pm 0,3	3,40 \pm 0,37	3,98 \pm 0,04	4 \pm 0
	Saltfôr	3,82 \pm 0,2	3,73 \pm 0,07	4 \pm 0	3,91 \pm 0,15
Sølvfarging gj. snitt (+/- std)	Fotoperiode	2,87 \pm 0,13	3,38 \pm 0,34	3,87 \pm 0,13	3,98 \pm 0,04
	Saltfôr	3,62 \pm 0,23	3,69 \pm 0,04	4 \pm 0	3,98 \pm 0,04

Finnekanter gj.	Fotoperiode	2,56 ± 0,31	3,40 ± 0,41	3,87 ± 0,12	4 ± 0
snitt (+/- std)	Saltfôr	2,53 ± 0,29	3,20 ± 0,20	4 ± 0	4 ± 0

3.2 Smoltkarakterer og sjøvannstoleranse

Figur 5 viser utvikling av variabler tilknyttet smoltifisering og saltvannstoleranse. Figur 5A illustrerer ratioen mellom saltvannsATPase og ferskvannsATPase. Fisk/grupper med høyere uttrykk av saltvannsATPase enn ferskvannsATPase (ratio > 1) regnes som saltvannstolerant. Ved første uttak var ingen av gruppene sjøvannstolerant. Videre viser resultatene at saltfôr-gruppen utvikler saltvannsATPase tidligere enn fotoperiode-gruppen, men når fotoperiode-gruppen starter utviklingen av saltvannsATPase så er økningen kraftigere, og ved de siste to uttakene er det fotoperiode-gruppen som har høyest ratio. Forskjellen i utvikling av ATPase isoformene er statistisk signifikant ($p = 0,000$; $f = 19,753$), og post Hoc Tukey's test viser at det er størst forskjell ved uttak 2 ($p = 0,000$). For at fisken kan bli bestemt å være sjøvannstolerant forutsetter det også at kofaktor ligger innenfor sitt normale uttrykksområde. Oversikt over kofaktor for de ulike karene er presentert i appendiks (Figur A4 – A9).

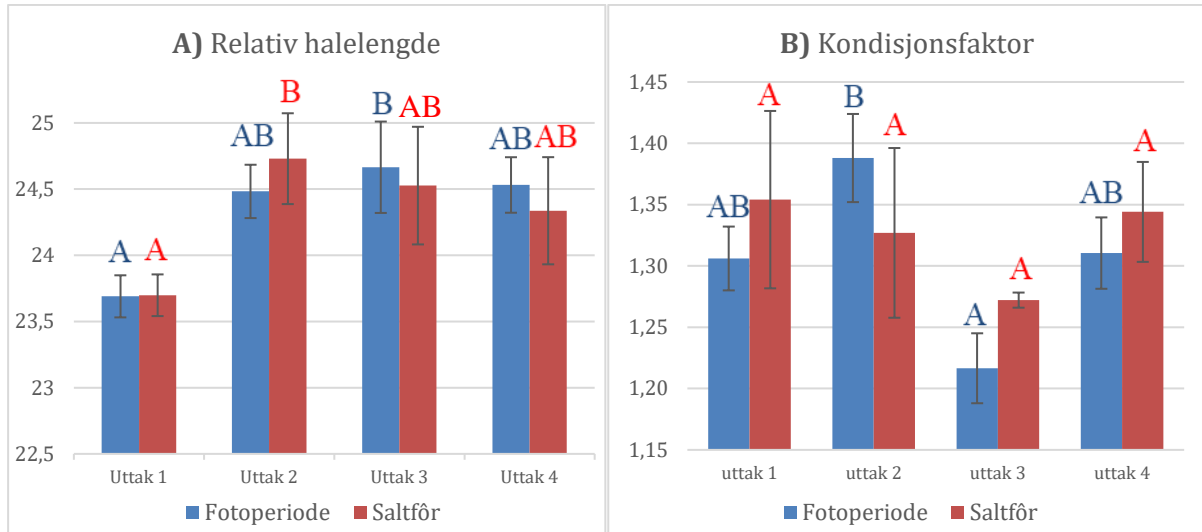
Figur 5B viser utvikling av smoltindeks beregnet på bakgrunn av vurdering av parrmerker, sølvfarging og finnekanter (Tabell 6). Resultatene viser at saltfôr-gruppen starter med en høyere smoltindeks en fotoperiode-gruppen, før gruppene er jevnere ved uttak 2, og begge har tilnærmet toppscore ved uttak 3 og 4 – noe som vil si at begge gruppene har utviklet synlige morfologiske smoltkarakterer som tilsvarer en smolt. Statistiske analyser viser en signifikant forskjell i utvikling av smoltindeks mellom gruppene ($p = 0,007$; $f = 5,745$). Tukey's test viser at den statistiske forskjellen kommer av forskjellen mellom gruppene ved første uttak (før behandlingen startet), noe som gjør at man ikke kan konkludere med statistisk signifikans i utvikling av smoltindeks som respons av ulik behandling.



Figur 5. smoltkarakterer hos atlantisk laks smoltifisert ved manipulering av lys (fotoperiode-gruppen) og tilsetning av salter i fôret (saltfôr-gruppen) ved fire tidspunkt gjennom smoltifiserings- og tilvenningsfasen i RAS-anlegg. Figur 5A illustrerer gjennomsnittlig ratio (\pm stdv) mellom saltvannsATP-ase og ferskvannsATPase fra kloridceller i gjellene. I følge PHARMAQ Analytiq er fisk sjøvannstolerant når uttrykket av saltvannsATPase er høyere enn uttrykket av ferskvannsATPase (ratio over 1). I figuren er det lagt inn en terskelverdi for å enklere se hvilke målinger som regnes som saltvannstolerant. Figur 5B viser gjennomsnittlig smoltindeks (\pm stdv) og er beregnet på bakgrunn av en samlet vurdering av fiskens synlige morfologiske smoltkarakterer (parrmerker, finnekant og sølvfarging (Tabell 6)). Fisken er vurdert på en skala fra en til fire (1 = parr, 4 = smolt). Hver behandlingsgruppe består av tre kar per uttak ($n = 3$) der verdien for hvert kar er funnet ved å ta gjennomsnittet av 15 fisk. Ulike store bokstaver angir signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom måletidspunkt innenfor samme gruppe. Stjerne (*) angir signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom grupper innenfor et måletidspunkt.

Figur 6 viser utvikling av kroppssform. Relativ halelengde (Figur 6A) er lik ved første uttak. Videre er det en økning for begge gruppene frem til uttak 2, med en tendens til reduksjon mot slutten av forsøket. Saltfôr-gruppen har lengst relativ halelengde ved uttak 2, før fotoperiode-gruppen har lengst relativ halelengde ved de siste uttakene. Til tross for statistisk signifikans i utvikling av relativ halelengde ved ANOVA ($p = 0,002$; $f = 5,538$) klarer ikke Tukey's test å påvise statistisk signifikans mellom gruppene ved noen av uttakene. Dette kan være fordi Post Hoc Tukey's er en svakere test som krever tydeligere forskjeller for å påvise statistisk signifikans.

Vurderinger av kondisjonsfaktor er vist i figur 6B. Saltfôr-gruppen har en liten reduksjon i kondisjon allerede ved andre uttak, og fotoperiode-gruppen får først redusert kondisjon ved uttak 3. Begge gruppene har den klart laveste kondisjonsfaktoren ved tredje uttak, før det skjer en økning mot slutten av forsøket. Fotoperiode-gruppen har den slankeste kroppformen ved begge de siste to uttakene. Forskjellene i utvikling av kondisjon er ikke statistisk signifikant ($p = 0,117$; $f = 2,292$).

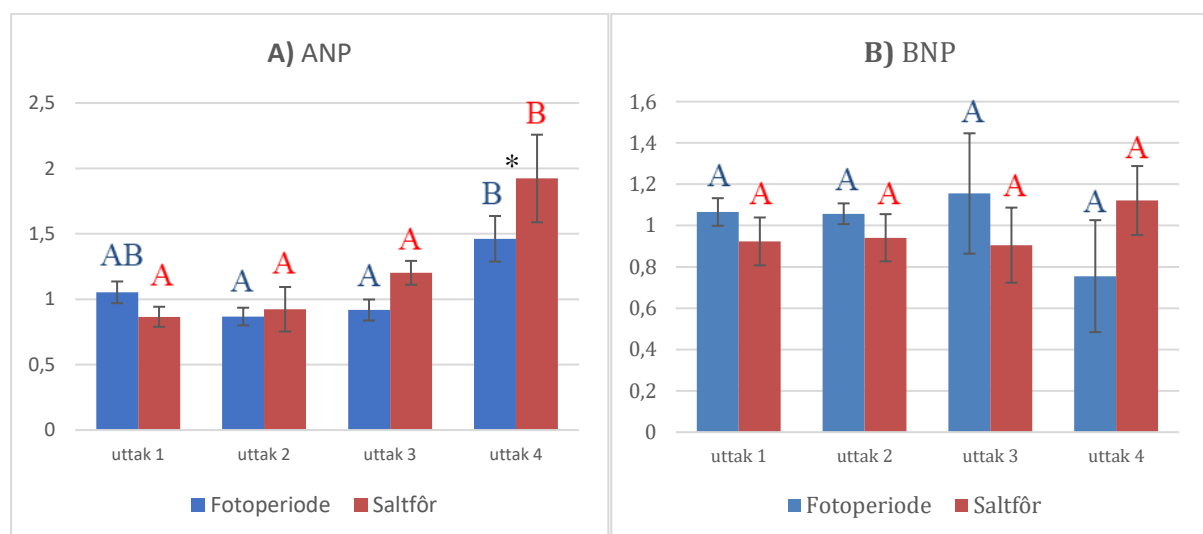


Figur 6. Utvikling av kroppsfasong hos atlantisk laks smoltifisert ved manipulering av lys (fotoperiode-gruppen) og tilsetning av salter i fôret (saltfôr-gruppen) ved fire tidspunkt gjennom smoltifiserings- og tilvenningsfasen i RAS-anlegg. Figur 6A viser gjennomsnittlig relativ halelengde (\pm stdv), funnet gjennom analyse av bilder i imageJ. Figur 6B viser gjennomsnittlig kondisjonsfaktor (\pm stdv). Fiskens lengde og vekt, brukt til å beregne kondisjonsfaktor, er presentert i tabell 6. Hver behandlingsgruppe består av tre kar per uttak ($n = 3$) der verdien for hvert kar er funnet ved å ta gjennomsnittet av 25 fisk. Ulike store bokstaver angir signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom måletidspunkt innenfor samme gruppe. Stjerne (*) angir signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom grupper innenfor et måletidspunkt.

3.3 Effekter av smoltifisering på hjertet

3.3.1 Molekylære endringer

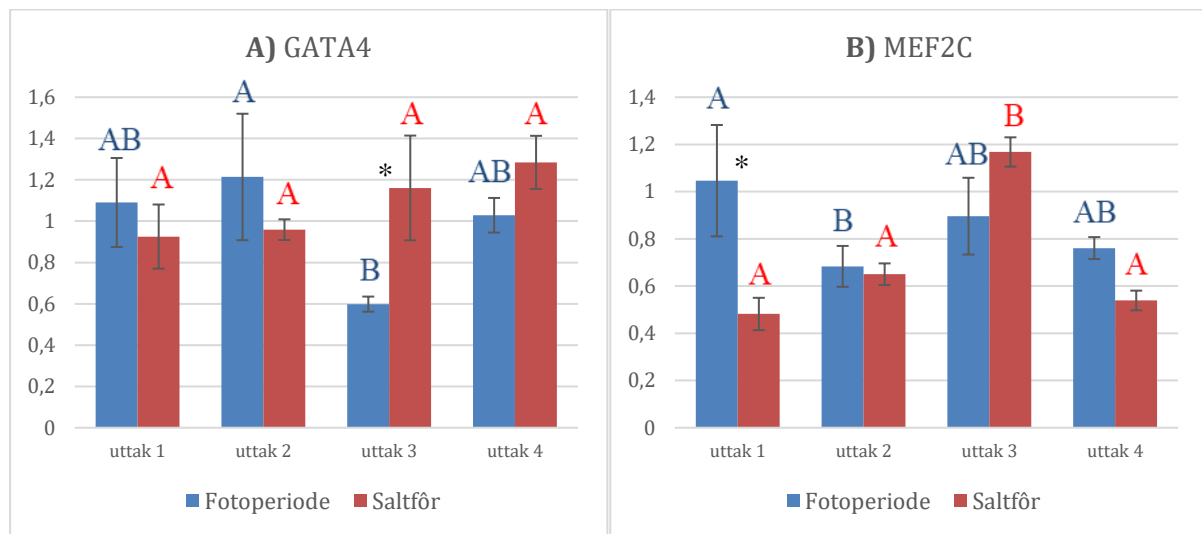
A-type natriuretic peptide (ANP) og B-type natriuretic peptide (BNP) fungerer som diagnostiske markører i hjertet til pattedyr og laks, der en oppregulering av disse genene kan indikere utvikling av svakere hjerter. Uttrykk av ANP (Figur 7A) er relativt likt ved de første uttakene, før det skjer en signifikant oppregulering for begge gruppene ved siste uttak. Utviklingsforløpet viser også at fisk smoltifisert med saltfôr uttrykker høyere nivå ANP sammenlignet med fotoperiode-gruppen. Utviklingen av ANP er signifikant forskjellig ($p = 0,000$; $f = 16,386$). Tukey's test viser at forskjellen mellom gruppene er størst ved det siste uttaket ($p = 0,043$). Uttrykk av BNP (Figur 7B) viser et relativt jevnt uttrykk med trend til høyere uttrykk for fotoperiode-gruppen ved de første 3 uttakene, før trenden snur ved uttak 4 slik at saltfôr-gruppen ender med et noe høyere uttrykk ved siste uttak. Utvikling i uttrykk av BNP er statistisk signifikant ($p = 0,038$; $f = 3,567$). Post hoc Tukey's test viser at forskjellene er størst mellom gruppene ved siste uttak ($p = 0,253$), likevel klarer den ikke å påvise statistisk signifikans. Resultatene viser at begge de patologiske markørene er høyere uttrykt i saltfôr-gruppen ved forsøkslutt.



Figur 7. Utvikling av gjennomsnittlig uttrykk (\pm stdv) av de diagnostiske markørene A-type natriuretic peptide (ANP) (Figur 7A) og B-type natriuretic peptide (BNP) (Figur 7B) fra hjertet til atlantisk laks smoltifisert ved manipulering av lys (fotoperiode-gruppen) og tilsetning av salter i fôret (saltfôr-gruppen) ved fire tidspunkt gjennom smoltifiserings- og tilvenningsfasen i RAS anlegg. Hver behandlingsgruppe består av tre kar per uttak ($n = 3$) der genuttrykket for hvert kar er funnet ved å ta gjennomsnittet av 15 fisk. Ulike store bokstaver angir signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom måletidspunkt innenfor samme gruppe. Stjerne (*) angir signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom grupper innenfor et måletidspunkt.

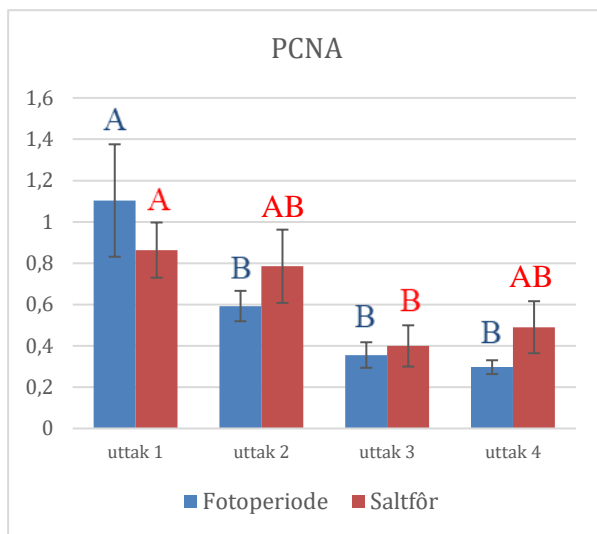
GATA4 og MEF2C er markører for hjertevekst gjennom hypertrofi (økning i størrelse av eksisterende celler). Uttrykket av GATA4 (Figur 8A) viser at fotoperiode-gruppen har et høyere

uttrykk ved de første 2 uttakene, før saltfôr-gruppen er klart høyere ved uttak 3, samt noe høyere ved uttak 4. Forskjellene i utvikling av uttrykt GATA4 er signifikant ($p = 0,004$; $f = 6,794$), der Tukeys's test avdekker signifikans mellom gruppene ved uttak 3 ($p = 0,024$). Uttrykket av MEF2C (Figur 8B) variere noe gjennom uttakene, og det er vanskelig å se en generell trend og forskjell i utvikling mellom gruppene. ANOVA viser signifikant forskjell mellom gruppene ($p = 0,000$; $f = 14,137$), men Tukey's test (samt figur) viser at forskjellen kommer av uttak 1 ($p = 0,000$), og forskjellen mellom gruppene kan derfor ikke sies å være et resultat av ulikt smoltifiseringsregime.



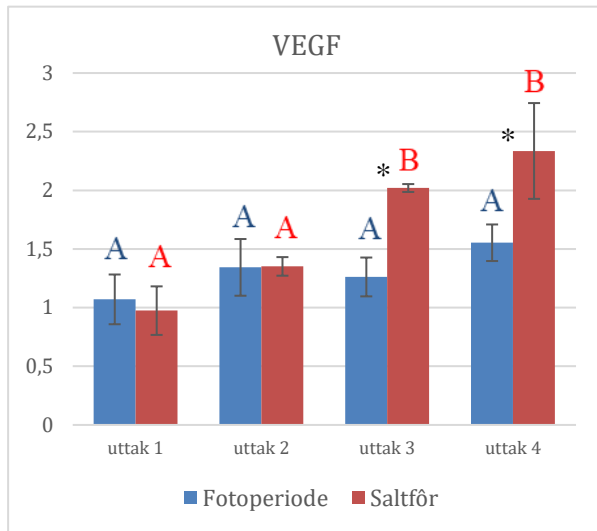
Figur 8. Utvikling av gjennomsnittlig uttrykk (\pm stdv) av GATA Binding Protein 4 (GATA4) og Myocyte Enhancer Factor 2C (MEF2C) fra hjertet til atlantisk laks smoltifisert ved manipulering av lys (fotoperiode-gruppen) og tilsetning av salter i fôret (saltfôr-gruppen) ved fire tidspunkt gjennom smoltifiserings- og tilvenningsfasen i RAS anlegg. Hver behandlingsgruppe består av tre kar per uttak ($n = 3$) der genuttrykket for hvert kar er funnet ved å ta gjennomsnittet av 15 fisk. Ulike store bokstaver angir signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom måletidspunkt innenfor samme gruppe. Stjerne (*) angir signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom grupper innenfor et måletidspunkt.

PCNA er markør for hjertevekst gjennom hyperplasia/proliferasjon (økning i antall celler). Den generelle trenden for begge gruppene er at uttrykk av genet reduseres i løpet forsøksperioden der det er funnet signifikant forskjell mellom uttak 1 og 4 for fotoperiode-gruppen, og nesten signifikant forskjell for saltfôr-gruppen ($p = 0,076$) (Figur 9). Fotoperiode-gruppen går inn i forsøket med et noe høyere uttrykk, før saltfôr-gruppen har det høyeste uttrykket ved uttak 2, 3 og 4. Resultatene indikerer at saltfôr-gruppen har en oppregulering av PCNA i forhold til fotoperiode-gruppen, men det er ingen statistisk signifikans i utvikling mellom gruppene, til tross for en sterk trend ($p = 0,055$; $f = 3,134$).



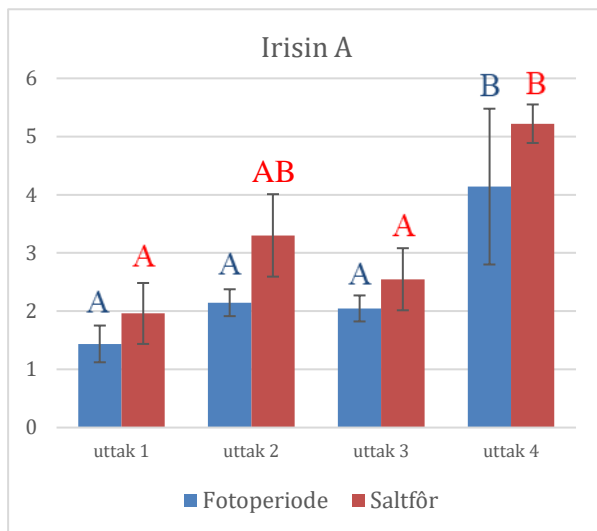
Figur 9. Utvikling av gjennomsnittlig uttrykk (\pm stdv) av Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) fra hjertet til atlantisk laks smoltifisert ved manipulering av lys (fotoperiode-gruppen) og tilsetning av salter i fôret (saltfôr-gruppen) ved fire tidspunkt gjennom smoltifiserings- og tilvenningsfasen i RAS anlegg. Hver behandlingsgruppe består av tre kar per uttak ($n = 3$) der genuttrykket for hvert kar er funnet ved å ta gjennomsnittet av 15 fisk. Ulike store bokstaver angir signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom måletidspunkt innenfor samme gruppe. Stjerne (*) angir signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom grupper innenfor et måletidspunkt.

VEGF er markør for angiogenese (dannelse av blodårer). Den generelle trenden er at uttrykket øker for begge gruppene gjennom forsøksperioden, med en klart større økning for saltfôr-gruppen (Figur 10). Det er lite som skiller gruppene når det gjelder uttrykk av genet ved de to første uttakene, men deretter skjer det en signifikant økning for saltfôr-gruppen ved uttak 3, og denne oppreguleringen vedvarer også ved det fjerde og siste uttaket. Forskjellene er statistisk signifikant ($p = 0,003$; $f = 7,189$) og Tukey's test avdekker signifikans mellom gruppene ved uttak 3 og 4 ($p = 0,010$ og $0,008$).



Figur 10. Utvikling av gjennomsnittlig uttrykk (\pm stdv) av Vascular endothelial growth factor (VEGF) fra hjertet til atlantisk laks smoltifisert ved manipulering av lys (fotoperiode-gruppen) og tilsetning av salter i fôret (saltfôr-gruppen) ved fire tidspunkt gjennom smoltifiserings- og tilvenningsfasen i RAS anlegg. Hver behandlingsgruppe består av tre kar per uttak ($n = 3$) der genuttrykket for hvert kar er funnet ved å ta gjennomsnittet av 15 fisk. Ulike store bokstaver angir signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom måletidspunkt innenfor samme gruppe. Stjerne (*) angir signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom grupper innenfor et måletidspunkt.

Uttrykk av irisin A er presentert i figur 11, og den generelle trenden er økende gjennom forsøksperioden, der begge gruppene har en signifikant oppregulering. Det viser en trend der genet er uttrykt høyere for saltfôr-gruppen enn fotoperiode-gruppen ved alle uttakene, men forskjellene er ikke statistisk signifikant ($p = 0,854$; $f = 0,259$). Irisin B, som også ble undersøkt, var ikke uttrykt (C_t verdier > 33) i hjertet hos noen av behandlingsgruppene.



Figur 11. Utvikling av gjennomsnittlig uttrykk (\pm stdv) av irisin A fra hjertet til atlantisk laks smoltifisert ved manipulering av lys (fotoperiode-gruppen) og tilsetning av salter i fôret (saltfôr-gruppen) ved fire tidspunkt gjennom smoltifiserings- og tilvenningsfasen i RAS anlegg. Hver behandlingsgruppe består av tre kar per uttak ($n = 3$) der genuttrykket for hvert kar er funnet ved å ta gjennomsnittet av 15 fisk. Ulike store bokstaver angir signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom måletidspunkt innenfor samme gruppe. Stjerne (*) angir signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom grupper innenfor et måletidspunkt.

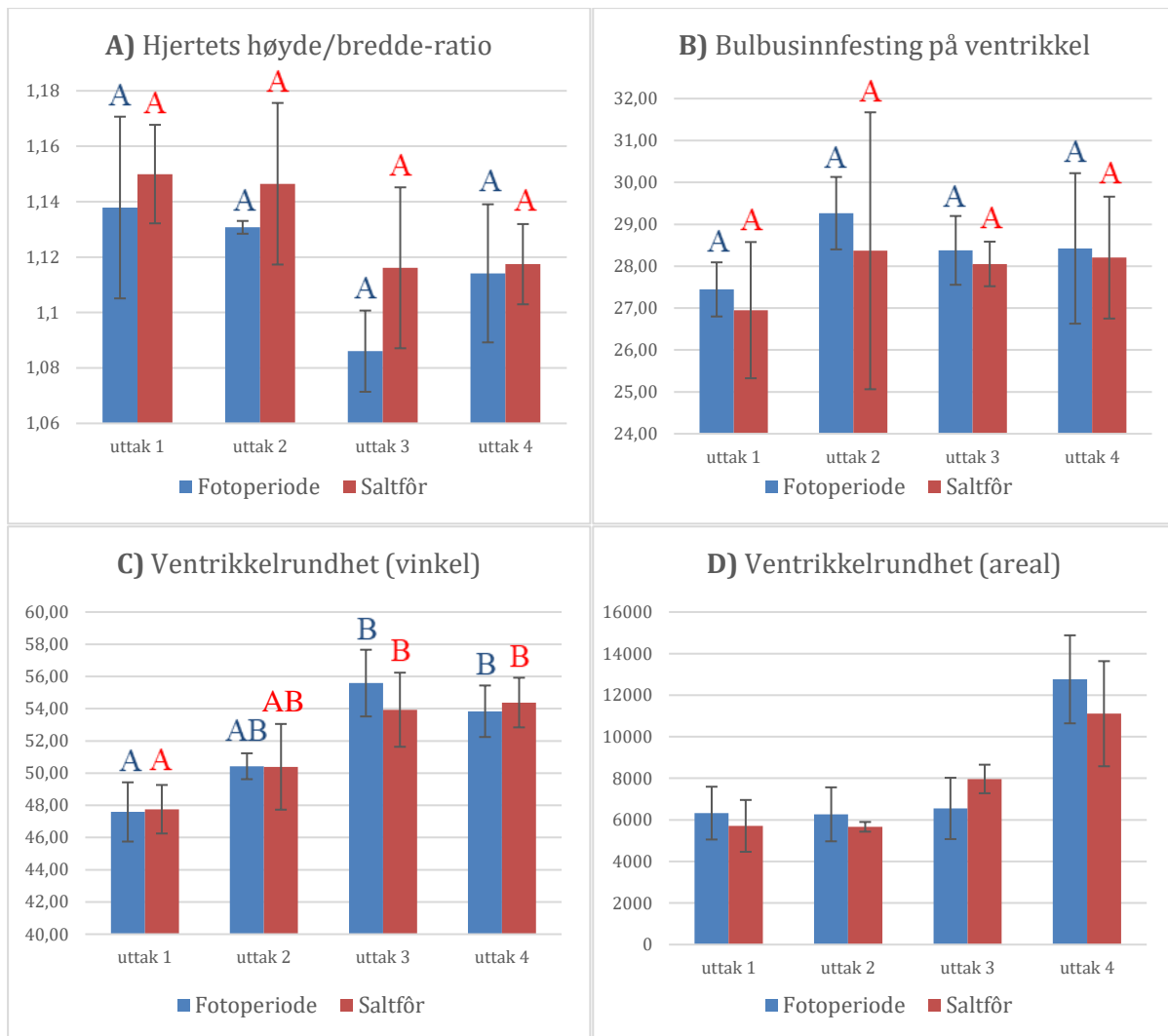
3.3.2 Hjertemorfologi

Figur 12 viser utviklingen av et utvalg morfologiske mål fra hjertet til atlantisk laks, der det ikke er funnet statistisk signifikans for noen av de morfologiske målene. Figur 12A viser utviklingen av hjertets høyde/bredde-ratio. Til tross for ingen statistisk signifikans mellom utvikling av høyde/bredde ratio mellom gruppene ($p = 0,782$; $f = 0,361$), viser resultatene at fotoperiode-gruppen har noe lavere ratio enn saltfôr-gruppen (bredere hjerter) gjennom hele forsøket, med den største forskjellen mellom gruppene ved uttak 3 og den minste forskjellen ved uttak 4. Generelt er det en trend der hjertene er bredere ved de senere uttakene, men signifikans er ikke påvist for noen av gruppene når det gjelder utvikling over tid.

Målingene for innretting av bulbus på ventrikkel (Figur 12B) viser heller ingen signifikante forskjeller i utvikling mellom gruppene ($p = 0,984$; $f = 0,051$). Det er heller ikke signifikant endring over tid for noen av gruppene, men likevel viser resultatene en noe større vinkel for innretting av bulbus ved slutten av forsøket sammenlignet med starten.

Figur 12C illustrerer utvikling av ventrikkelens bredde gitt som en vinkel mellom kryssende stiplede linjer langs ventrikkelens sider. Disse målingene viser (i likhet med høyde/bredde-ratio) ingen signifikant forskjell i utvikling mellom gruppene ($p = 0,752$; $f = 0,404$), men ventrikkelrundhet gitt som vinkel viser en signifikant endring for begge gruppene i tid, der det ved uttak 3 og 4 er funnet bredere hjerter (større vinkel) enn ved uttak 1 og 2.

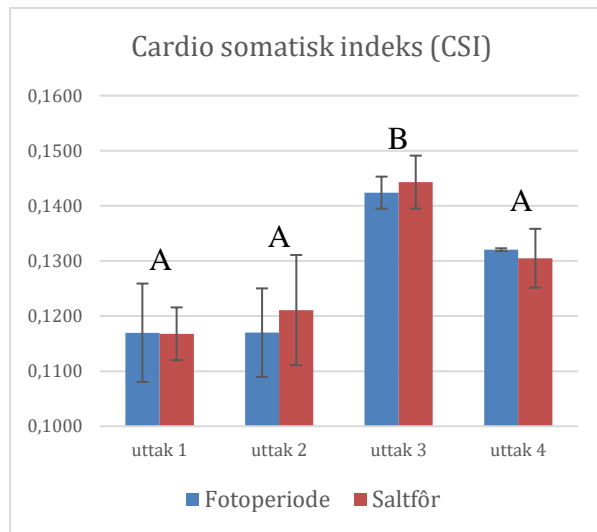
Arealet som dannes i forkant av ventrikkelspissen (12D) demonstrerer utvikling av ventrikkeltuppen, der et stort areal er tenkt å være assosiert med bredere hjerter. Det er ikke funnet signifikant forskjell i utvikling mellom gruppene ($p = 0,234$; $f = 1,586$). På grunn av at arealet som dannes i forkant av ventrikkelspissen påvirkes av hjertestørrelse ($p = 0.001$ for kovarians for hjertevekt), er det brukt kovariat for å korrigere for ulik størrelse på hjertene, slik at den statistiske modellen sammenligner gruppene over tid. Figuren er ikke korrigert for hjertestørrelse. Figur 12D kan derfor ikke brukes til å undersøke hjerteutvikling over tid, bare mellom grupper uttak for uttak.



Figur 12. Utvikling av hjertemorfologi hos atlantisk laks smoltifisert ved manipulering av lys (fotoperiode-gruppen) og tilsetning av salter i fôret (saltfôr-gruppen) ved fire tidspunkt gjennom smoltifiserings- og tilvenningsfasen i RAS anlegg. Bilder av hjertet fra to forskjellige vinkler (ovenfra og fra siden) har blitt analysert i imageJ. Figuren viser gjennomsnittsverdier (\pm stdv) av hjertets høyde/bredde-ratio (Figur 12A), vinkelen for innfesting av bulbus på ventrikkel (Figur 12B), ventrikkelens rundhet målt som ventrikkeltuppens vinkel (Figur 12C) og ventrikkelens rundhet målt som areal i trekanten som dannes mellom to kryssende streker langs ventrikkelens sider (Figur 12D). Ved bildeanalysene er det brukt relative lengder og areal som er beregnet av imageJ. Hver behandlingsgruppe består av 3 kar per uttak ($n = 3$) der gjennomsnittsverdier for hvert kar er funnet ved å ta gjennomsnittet av 25 fisk (totalt 75 fisk per behandlingsgruppe per uttak). NB: økningen av areal som kommer frem i figur 13D kan forklares av at hjertene blir større (p -verdi = 0,001 for kovarians av hjertevekt), og at arealet som dannes i forkant av ventrikkel derfor også blir større, uten at ventrikkelens form nødvendigvis er endret. Ved tolkning av ventrikkelrundhet gitt som areal bør det derfor kun ses på forholdet mellom gruppene, ikke hvordan arealet/ventrikkel endres over tid (derfor er bokstaver utelatt i figur 12D). For figur 12A, B og C angir store bokstaver signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom måletidspunkt innenfor samme gruppe. Stjerne (*) angir signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom grupper innenfor et måletidspunkt.

Figur 13 viser utvikling av relativ hjertevekt gjennom smoltifiseringsprosessen. Målingene viser at relativ hjertevekt var lavest ved de to første uttakene før det skjer en signifikant økning frem mot uttak 3, etterfulgt av en reduksjon i løpet av tilvenningsfasen. Relativ hjertevekt ved uttak 4 er nesten signifikant forskjellig fra uttak 1 ($p = 0,051$). Det er liten forskjell i CSI mellom

gruppene gjennom hele forsøket (mann-whitney; p-verdi = 0,827 – 0,275 – 0,513 – 0,827), hvor saltfôr-gruppen er noe høyere ved uttak 2 og 3, og fotoperiode-gruppen ender så vidt høyere ved siste uttak.



Figur 13. Utvikling av gjennomsnittlig CSI (\pm stdv) hos atlantisk laks smoltifisert ved manipulering av lys (fotoperiode-gruppen) og tilsetning av salter i fôret (saltfôr-gruppen) ved fire tidspunkt gjennom smoltifiserings- og tilvenningsfasen i RAS anlegg. Hver behandlingsgruppe består av tre kar per uttak ($n = 3$) der CSI for hvert kar er funnet ved å ta gjennomsnittet av 25 fisk (totalt 75 fisk per behandlingsgruppe per uttak). Fiskevekt og hjertevekt, brukt til å beregne CSI er presentert i tabell 6. Det ble benyttet man-whitney test (ikke-parametrisk) for å undersøke statistiske forskjeller av CSI da dataene ikke møtte forutsetningene for å utføre parametriske analyse (ANOVA). Bonferroni justering av p-verdi for korreksjon av antall tester (4) krever p-verdi $< 0,0125$ for hvert uttak for å kunne påvise signifikans. Ulike store bokstaver angir signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom uttak uten å skille på gruppe.

3.4 Ytelse i sjøfasen

Statistiske analyser viser ingen signifikante forskjeller mellom gruppene når det gjelder spesifikk vekstrate ($p = 0,274$, $f = 1,605$), biologisk fôrfaktor ($p = 0,083$, $f = 5,295$), vekstfaktor 3 ($p = 0,422$, $f = 0,8$) eller dødelighet ($p = 0,820$, $f = 0,059$). Likevel er det en klar tendens til lavere biologisk fôrfaktor for fotoperiode-gruppen enn saltfôr-gruppen (8,28 % lavere), samtidig som vekstrate og vekstfaktor 3 er funnet å være noe høyere. Resultatene viser at fotoperiode-gruppen hadde en slaktevekt som var 2,59 % høyere enn saltfôr-gruppen, til tross for at vekten var 7,55 % lavere ved utsett i sjø. Dette indikerer en trend hvor fisk smoltindusert med fotoperiode har høyere tilvekst i sjøfasen enn fisk smoltindusert med saltfôr. Også dødeligheten var noe lavere for fotoperiode-gruppen ($p = 0,820$, $f = 0,059$).

Tabell 7. Oversikt over produksjonstall fra sjøfasenfasen (vekt ved utsett i sjø, vekt ved slakt, spesifikk vekstrate (SGR), biologisk fôrfaktor (bFCR), vekstfaktor (VF3) og dødelighet (%)) for atlantisk laks smoltfisiert med fotoperiodemanipulering (fotoperiode-gruppen) og saltfôr (saltfôr-gruppen). Det er vist forholdet mellom fotoperiode-gruppen og saltfôr-gruppen (gitt i prosent) for å enklere tolke eventuelle forskjeller mellom behandlingsgruppene.

	Vekt (g) v/utsett	Vekt (g) v/slakt	SGR	bFCR	VF3	Dødelighet (%)
Fotoperiode-gruppen	522 ± 66	5349 ± 377	0,64 ± 0,02	1,23 ± 0,05	2,39 ± 0,07	6,5 ± 1,1
Saltfôr-gruppen	564 ± 102	5214 ± 423	0,61 ± 0,03	1,34 ± 0,06	2,31 ± 0,14	6,7 ± 1,1
Fotoperiode-/saltfôr-gruppen - ratio (%)	92,45 (-7,55)	102,59 (+2,59)	103,97 (+3,97)	91,72 (-8,28)	103,54 (+3,54)	96,81 (-3,19)

4 Diskusjon

4.1 Hvilke effekter har saltfôr- og fotoperiodebehandling på molekylære og morfologiske indikatorer på smoltutvikling og sjøvannstoleranse?

Resultatene viser at begge gruppene utviklet smoltkarakterer som er forenlig med god saltvannstoleranse og smolttegenskaper, og funnene indikerer at både smoltindusering gjennom salter i fôret og fotoperiodemanipulering gir fisk som er antatt å være smoltifisert. Likevel viser denne studien, gjennom signifikante forskjeller mellom gruppene i utvikling av SW/FW ATPase og relativ halelengde og trend for kondisjonsfaktor, at fisk som smoltinduseres ved bruk av fotoperiodemanipulering utvikler tydeligere smoltkarakterer enn fisk som smoltinduseres med saltfôr. Dette kommer til uttrykk gjennom høyere SW/FW ATPase ratio, en slankere kroppsform, og lenger relativ halelengde mot slutten av settefiskfasen, som alle er typiske utviklingstrekk for en smolt (Figur 5 og 6) (McCormick, 2012). Det er også en trend som viser at fisk smoltindusert ved bruk av saltfôr starter utvikling av smoltkarakterer tidligere enn fotoperiode-gruppen. Dette kan skyldes at gruppene har blitt smoltindusert ved bruk av to ulike smoltproduksjonsregimer som ikke er synkronisert med hensyn til tid, og at dette medfører et noe ulikt tidsforløp i forhold til når gruppene initierer/gjennomfører smoltifiseringen. En direkte sammenligning av smoltkarakterer uttak for uttak kan derfor være noe missvisende. Som vist i figur 2 vil det bety at saltfôr-gruppen har gjennomført halve saltfôrdietten ved andre uttak, mens fotoperiode-gruppen ikke ble eksponert for kontinuerlig lys før etter uttaket. Dette medfører at utvikling av smoltkarakterer kan ha startet før uttak 2 hos saltfôr-gruppen. For fotoperiode-gruppen vil det gjennom eksponering for «lang dag» skje en gradvis utvikling av smoltkarakterer og sjøvannstoleranse, og det er vist at det tar omtrent 350 døgngader ($d \text{ } ^\circ\text{C}$) etter eksponering for lang dag før fisken har utviklet god sjøvannstoleranse og anses som smoltifisert (Handeland et al., 2004). I dette forsøket vil det tilsvare omtrent 30 dager, noe som medfører at vurdering av smoltkarakterer for fôtoperide-gruppen (som «fullverdig» smolt) er mest relevant/hensiktsmessig ved uttak 3. Karene fra saltfôr-gruppen ble også overført til brakkvann (11-12 ‰) tidligere enn fotoperiode-gruppen (appendiks Tabell A1) og kan bidra til å forklare en tidligere utvikling av smoltkarakterer for saltfôr-gruppen sammenlignet med fotoperiode-gruppen. En bør imidlertid kunne anta at den kombinerte/fulle effekten av både saltfôrbehandling og eksponering for brakkvann var kommet til uttrykk ved uttak 3. Til tross for at produksjonsregimet som er benyttet i studien ikke tilrettelegger for direkte sammenligning mellom gruppene uttak for uttak (spesielt uttak 2), så er den i tråd med

produksjonprotokollen som benyttes på Trovåg og vil derfor gi grunnlag for en helhetlig sammenligning mellom smoltifiseringsregimene slik de gjennomføres i næringen.

Utviklingen av ATPase ratio viser en nedadgående trend for begge gruppene fra uttak 3 til uttak 4. Dette kan indikere at fisken (eller gjellene) får en redusert sjøvannstoleranse som følge av en viss desmoltifisering, til tross for at de holdes på brakkvann. Med utgangspunkt i at atlantisk laks når et toppunkt for Na^+/K^+ ATPase-aktivitet etter 350 d °C etter eksponering for lang dag vil det (forbeholdt at SmoltVision viser samme utviklingsforløp som Na^+/K^+ ATPase analyse) tilsvare omtrent 14 dager før tredje uttak for fotoperiode-gruppen. For saltfôr-gruppen som ble smoltindusert tidligere enn fotoperiode-gruppen kan man anta at det faktiske toppunktet i gjelleaktivitet var enda tidligere. Dette demonstrerer at man ikke kan vite sikkert om målingene fra uttakene i studien faktisk viser det virkelige forholdet mellom gruppene i utvikling av sjøvannstoleranse, da uttakene bare er gjort på gitte tidspunkt i et ellers langt utviklingsforløp. Det er mulig at en lavere topp i SW/FW ATPase ratio, som er funnet for saltfôr-gruppen, kommer som en følge av høyere grad av desmoltifisering frem til uttak 3 på grunn av en tidligere smoltindusering enn fotoperiode-gruppen. Videre kan målingene indikere at fisk fra begge smoltinduseringsregimene ikke blir overført til sjø ved det optimale tidspunktet med hensyn til sjøvannstoleranse. Likevel har studier vist at toppnivå av Na^+/K^+ ATPase-aktivitet ikke nødvendigvis korrelerer med toppnivå av hypo-osmoregulatorisk evne (Madsen & Naamansen, 1989; Solbakken et al., 1994).

Etter litteraturen å dømme er det gjort lite forskning på eventuelle fysiologiske forskjeller mellom fôrindusert- og fotoperiodeindusert smoltifisering. Fra naturen er smoltifisering tidsbestemt med basis i endogene rytmer, og miljøsignaler fungerer som viktige «zeitgebers» for å synkronisere og fullføre smoltifiseringen (Stefansson et al., 1991; McCormick et al., 2001) og det er generelt akseptert at økende fotoperiode om våren er den viktigste enkelte miljødeterminanten for timing av disse (Hoar, 1988). Tydeligere utvikling av smoltkarakterer for fotoperiode-gruppen kan derfor indikere at smoltindusering gjennom saltfôr ikke fungerer som fullverdig erstatning for smoltindusering gjennom mørke-lys-stimuli, og det kan være fristende å peke på fravær av fotoperiode-induserte hormonelle signaler som en mulig forklaring. For de nevnte smoltkarakterene (kondisjonsfaktor, relativ halelengde og SW/FW-ATPase ratio) viser saltfôr-gruppen også større variasjon mellom karene, ved både uttak 2, 3 og 4. En mulig forklaring kan være at saltene tilføres via dietten, og at en synkron smoltifisering

derfor er avhengig av appetitt, i motsetning til stimuli gjennom fotoperiode der man sikrer en helt lik eksponering. Det er også fristende å peke på muligheten for at saltfôr gir en dårligere stimuli som i mindre grad sikrer synkron initiering mellom fisk og grupper. Dette til tross for at aktørerene som produserer saltfôr nevner synkron smoltifisering som en av fordelene.

Det er vanskelig å si noe sikkert om smoltregimene sin effekt på utvikling av smoltindeks, da gruppene hadde et noe ulikt utgangspunkt ved inngangen til forsøket (uttak 1), og begge gruppene raskt utviklet en smoltindeks som er helt oppe på, eller i nærheten av toppscore allerede ved tredje uttak. Arbeidet til Handeland et al. (2013) viser at utvikling av smoltkarakterer til en viss grad kan forklares av fiskestørrelse, og med omtrent 4 g større fisk i saltfôr-gruppen ($71,44 \pm 10,83$ mot $67,21 \pm 6,07$) ved første uttak kan man ikke utelukke at dette bidrar i retning økt smoltindeks for saltfôr-gruppen ved forsøksstart. Likevel er dette en relativt liten forskjell i størrelse, og ulik smoltindeks ved start kan være tilfeldig. Smoltindeks ble ikke nedregulert fra uttak 3 til 4, til tross for at SW/FW ATPase ble nedregulert. Dette kan indikere at det ikke nødvendigvis er samsvar mellom antatt god sjøvannstoleranse, målt som SW/FW ATPase ratio, og andre smoltkarakterer.

Som nevnt innledningsvis innebærer smoltifisering et komplekst samspill av ulike prosesser som involverer en rekke uavhengige, men koordinerte endringer. I næringen i dag blir smoltstatus og sjøvannstoleranse stort sett evaluert ut i fra indirekte parametre som reflekterer fiskens evne til å osmoregulere, som Na^+/K^+ ATPase-aktivitet i gjellene eller SmoltVision analyser. Til tross for at disse funnene ofte ses i sammenheng med øvrige smoltkarakterer (sølvfarging, parrmerker, finnekanter, kondisjonsfaktor osv.) så vet man lite om hvordan de indre fysiologiske prosessene påvirkes. Det er ikke utenkelig at viktige fysiologiske prosesser som finner sted under smoltifiseringen i naturen er fraværende, eller skjer til feil tid hos oppdrettsfisk. Denne hypotesen er kanskje spesielt gjeldende for fisk hvor smoltifisering induseres gjennom andre metoder enn fotoperiode. Kanskje bør man skille mellom fisk som er saltvannstolerant og fisk som er smoltifisert. Det er også slik at de metodene som benyttes i dag ikke måler den faktiske sjøvannstoleransen til fisk. Det er lang vei fra genuttrykk til faktisk ytelse. Sannsynligvis vil den tradisjonelle sjøvannstesten hvor fisk blir satt på sjøvann for en gitt periode, etterfulgt av plasma kloridmålinger, gi et tryggere svar på hvorvidt fisken har utviklet sjøvannstoleranse.

Det kan argumenteres for at det er nødvendig med sjøvannstest etterfulgt av kloridmålinger for å avgjøre om en fisk er fullverdig smolt (og kanskje også målinger av hormonelle endringer). Likevel indikerer denne studien at fisken, ved bruk av de gitte kriterier, smoltifiserer under begge de nevnte smoltregimene. Den videre diskusjonen som omhandler endringer i hjertet som skjer under de nevnte smoltproduksjonsregimene antas derfor å være representativt for det som skjer under smoltifisering.

4.2 Er det forskjell/effekter i uttrykk av gener som er sentrale for vekst, funksjon og angiogenese i hjertet hos laks som smoltifiseres ved bruk av saltfôr eller fotoperiodebehandling?

Forsøket viser at gener som fungerer som kjente markører for hjertehelse i pattedyr, påvirkes av ulikt smoltifiseringsregime hos atlantisk laks. Gener som koder for A-type natriuretisk peptide (ANP) og B-type natriuretisk peptide (BNP) har blitt brukt som markør i en rekke publikasjoner som omhandler hjertehelse i pattedyr (Lerman et al., 1993; Hama et al., 1995; Lear & Boer, 1995; Volpe et al., 2014) og i senere tid også hos atlantisk laks (Johansen et al., 2011; Johansen et al., 2017; Nørstrud et al., 2018; Frisk et al., 2020) og man kan dermed anta at de diagnostiske markørene fungerer likt for laksefisk som for pattedyr, der en oppregulering av genene er assosiert med redusert hjertehelse. I denne studien ble det funnet signifikante forskjeller for utvikling av både ANP og BNP mellom fisk smoltifisert med saltfôr og fotoperiode. For ANP viser begge gruppene en oppregulering fra uttak 3 til uttak 4, der den største økningen i uttrykt ANP er funnet for saltfôr-gruppen, og medfører til en signifikant forskjell mellom gruppene ved siste uttak. For BNP er det funnet et mer jevnt uttrykk, og til tross for at det ble funnet høyere uttrykk for fotoperiode-gruppen ved uttak 1,2 og 3, ble trenden snudd ved siste uttak slik at saltfôr-gruppen hadde høyest uttrykk også av BNP ved forsøksslutt. Disse funnene kan indikere at saltfôr-gruppen har utviklet svakere hjerter sammenlignet med fotoperiode-gruppen. Til tross for at det er funnet størst oppregulering hos saltfôr-gruppen, har også fotoperiode-gruppen en liten økning i uttrykt ANP (men ikke BNP) og kan til en viss grad indikere patologisk utvikling også for denne gruppen. Til sammenligning er en oppregulering av ANP og BNP også funnet for laksefisk produsert intensivt sammenlignet med smolt produsert med en protokoll som gir en langsommere vekst og utvikling (Frisk et al., 2020). Den «intensive fisken» hadde økt sannsynlighet for å dø under stressende håndteringssituasjoner, der redusert hjertefunksjon som følge av endret hjerteform ble pekt på som mulig forklaring. Oppregulering av genene er også funnet for kortisol/stress-indusert hjerteutvikling som også

var forbundet med redusert hjertefunksjon og fysisk ytelse (i.e. svømming) (Johansen et al., 2017; Nørstrud et al., 2018).

Til tross for at både ANP og BNP er assosiert med patologisk hjertevekst, er det også funnet tilfeller av økt uttrykk av BNP i forbindelse med kuldeakklimatisering (Vornanen et al., 2005; Keen et al., 2016) som er generelt akseptert å være en adaptiv tilpasning hos laksefisk. Dette viser at oppregulering eller nedregulering av et bestemt gen bør tolkes med forsiktighet. Det er også en lang vei fra uttrykk av enkelte gener til den faktiske egenskapen er utviklet.

Hjertestørrelse er svært formbart i møte med endrende miljø og livsstadier (anemia, kjønnsmodning, kuldeakklimatisering, stress). Kardiomyocytter hos pattedyr mer eller mindre mister evnen til å proliferere etter fødsel og vokser hovedsakelig gjennom hypertrofi (Soonpaa et al., 1996), og hjertevekst hos pattedyr er assosiert med hjertepatologi/ redusert funksjon (Lloyd-Jones et al., 2002). I motsetning til pattedyr er det hos fisk vist at hjertevekst kan skje som en rutinemessig endring (både ved hypertrofi og proliferasjon), og er ikke nødvendigvis assosiert med nedsatt funksjon (Farrell et al., 1988). Dette forsøket indikerer at hjertevekst under begge smoltifiseringsregimene hovedsakelig ble drevet av hypertrofi (økning i cellediameter) siden markøren for celleproliferasjon (PCNA) ble nedregulert (Figur 9) samtidig som genuttrykk av markørene for hypertrofi (GATA4 og MEF2C) var mer stabil (Figur 8). Sammenligning mellom behandlingsgruppene viser at saltfôr-gruppen har et høyere uttrykk av hypertrofi-markørene GATA4 ved uttak 3 og 4 og MEF2C ved uttak 3 – og indikerer at hjertevekst drevet av hypertrofi er noe mer forbundet med saltfôr-gruppen (GATA4 viser trend til oppregulering for saltfôr-gruppen fra uttak 1 – 4 med $p = 0,064$). Til sammenligning er det vist at adaptiv vekst ved kuldeakklimatisering (Klaiman et al., 2011), kjønnsmodning (Franklin & Davie, 1992) eller mosjonering (Castro et al., 2013) er funnet å vokse både gjennom hypertrofi og proliferasjon, og at hjertevekst forårsaket av stress (Johansen et al., 2017) eller intensiv smoltproduksjon (Frisk et al., 2020) er vist å skje kun gjennom hypertrofi (ikke proliferasjon) og er regnet for å være patologisk. Det noe forhøyede uttrykket av markørene for hypertrofi kjennetegner patologisk vekst, og kan indikere at begge gruppene har startet utvikling av svake hjerter, som tidligere også er funnet ved intensiv produksjon og stress. Det noe høyere uttrykket funnet for saltfôr-gruppen, kombinert med det høyere uttrykket av andre markører som er assosiert med hjertepatologi, kan indikere utvikling av svakere hjerter for fisk smoltifisert med saltfôr sammenlignet med fotoperiode. Basert på målinger av gonader og

vurdering av GSI på fisken (ikke presentert i resultater), kan man utelukke kjønnsmodning og den effekten en slik prosess kunne hatt på hjertet for begge behandlingsgruppene.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) er den viktigste faktoren knyttet til angiogenese (dannelse av nye blodårer) hos pattedyr (Yancopoulos et al., 2000), og er også nært knyttet til angiogenese (dannelse av nye blodårer) hos laksefisk. Resultatene indikerer en oppregulering av genet hos saltfôr-gruppen sammenlignet med fotoperiode-gruppen, og kan indikere et mer utviklet blodtransportsystem for fisk smoltifisert med saltfôr. Annen litteratur viser at oppregulering av genet er funnet både for adaptiv hjertevekst hos laksefisk i forbindelse med mosjon (Castro et al., 2013), samt patologisk hjertevekst i forbindelse med kortisolbehandling (Johansen et al., 2011) og intensivert oppdrettsregime (Frisk et al., 2020). Oppregulering av VEGF har sannsynligvis en sammenheng med økt hjertestørrelse, der et utviklet blodtransportsystem er nødvendig for å forsyne et større hjerte med blod. Selv om hypertrofi-markøren GATA4 ble uttrykt noe høyere mot slutten av forsøket for saltfôr-gruppen i denne studien, viste veiingene av hjertet en relativt lik hjertestørrelse mellom gruppene, og en oppregulering av VEGF for saltfôr-gruppen er kanskje derfor mindre forventet. Til tross for at den økte vaskulariseringen, vist gjennom økt uttrykk VEGF, som ble funnet for fisk smoltifisert med saltfôr ikke kan forklares av forhøyet hjertevekst, så indikerer likevel et mer utviklet blodåresystem at det er økt krav til blodtilførsel for fisk i denne gruppen. Økt uttrykk av VEGF kan derfor indikere at saltfôr-indusert smoltifisering resulterer i at hjertene får en høyere belastning. Tatt i betraktning at denne gruppen også har forhøyet uttrykk av molekylære markører som er karakteristiske for patologisk hjerteutvikling, kan funnene indikere at økt vaskularisering for denne gruppen er følge av patologisk utvikling.

Johansen et al. (2011) påpeker at den økte vaskulariseringen som var assosiert med uttrykk VEGF i deres studie også var klart synlig gjennom visuell sammenligning av gruppene. I dette forsøket var det imidlertid ikke mulig å se noen sammenheng mellom vaskularisering og uttrykk av VEGF, til tross for at det ble funnet forhøyet uttrykk av VEGF for saltfôr-gruppen. Årsaken til dette kan være at behandlingsgruppene i studien til Johansen et al. (2011) hadde 266 % forskjell i uttrykk av markøren, og det i dette forsøket bare er 50 % forskjell mellom gruppene.

4.3 Irisin er en «ny» regulatorisk faktor som har viktige funksjoner i hjertet hos en rekke dyr(emodeller): Uttrykkes irisin i hjertet hos laks, og er uttrykket påvirket av smoltifisering som induseres via saltfôr eller fotoperiodebehandling?

Irisin er et nylig oppdaget myokin som ikke tidligere har vært undersøkt i hjertet til atlantisk laks. Det er proteolytisk spaltet fra fibronectin type III domain-containing protein 5 (FNDC5) (Li et al., 2020), og er oppregulert i hjerte- og skjelettmuskulatur hos pattedyr i forbindelse med mosjon (Pérez-Sotelo et al., 2017), og er involvert i regulering av hjertefunksjon og angiogenese hos menneske og mus (Boström et al., 2012; Timmons et al., 2012). Irisin er også vist å være involvert i kardiovaskulær fysiologi og funksjon, samt spille en viktig rolle for fôrinntak og modulering av appetittregulerende hormoner i sebrafisk (Sundarrajan et al., 2017; Sundarrajan et al., 2021). Dette forsøket demonstrerer et relativt jevnt uttrykk av irisin ved de første 3 uttakene, før det skjer en signifikant økning for begge gruppene mellom uttak 3 og 4. Et forhøyet uttrykk av irisin er vist å nedregulere viktige regulatoriske faktorer uttrykt i hjerte- og skjelettmuskel hos sebrafisk, samtidig som det medfører til økt diastolisk volum, hjerterytme og hjertevolum (Sundarrajan et al., 2017). En knockdown av irisin viste motsatt effekt på hjertefunksjon, og samlet viser disse resultatene at irisin er viktig for kardiovaskulær fysiologi i sebrafisk. Forbeholdt at irisin har samme funksjon i atlantisk laks, kan funnene indikere at irisin spiller en rolle for utvikling av hjertet til atlantisk laks både under saltfôr- og fotoperiode-indusert smoltifisering, spesielt mot sluttfasen. Til tross for ingen statistisk signifikans mellom gruppene når det gjelder utvikling av irisin, er uttrykket funnet å være noe høyere for saltfôr-gruppen. Studier på mennesker har funnet at høye irisin-nivåer i blodet er assosiert med store uønskede kardiovaskulære hendelser (MACE) hos pasienter som allerede har påvist koronararteriesykdom (Aronis et al., 2015) og at pasienter med akutte hjertelidelser som hadde høye irisin-nivå hadde høyere ett-års dødelighet (Shen et al., 2017). Også Kalkan et al. (2018) har vist forhøyede sirkulerende irisin-nivåer for pasienter med utfordringer (cardiac cachexia) knyttet til hjertehelse, der irisin ble funnet å korrelere med den diagnostiske markøren for hjertehelse, BNP. De nevnte studiene demonstrerer at forhøyede uttrykk av irisin er assosiert med hjertelidelser, likevel vet man ikke sikkert hvorvidt irisin er årsak til, eller en konsekvens av hjertelidelser (Li et al., 2020). Man vet at den har en viktig rolle knyttet til både metabolsk regulering og hjertelidelser, og at den derfor kan fungere som en kobling mellom disse. I motsetning til skjelettmuskel, produserer hjertemuskel store mengder irisin hele tiden – ikke

bare etter mosjon (Aydin et al., 2014). Dersom irisin som markør for hjertehelse har samme funksjon i laksefisk som for mennesker (og sebrafisk) kan funnene fra denne studien indikere at saltfôr-gruppen i større grad er assosiert med redusert hjertefunksjon enn fotoperiode-gruppen. Spesielt dersom funnene av irisin ses i sammenheng med oppreguleringen av de andre molekylære markørene som også er assosiert med redusert hjertefunksjon for saltfôr-gruppen.

4.4 Hvordan påvirkes hjertevekst, relativ hjertestørrelse, og hjerteform hos laks som smoltifiseres ved bruk av enten saltfôr eller fotoperiodebehandling?

Hjertehelse og unormal hjertemorfologi er et utbredt problem som over lang tid har blitt oversett i oppdrett av laksefisk (Mercier et al., 2000; Brocklebank & Raverty, 2002; Poppe et al., 2003). Det er udiskutabelt et stort problem knyttet til fiskevelferd, og dødeligheten er spesielt forhøyet når svak fisk gjennomgår stressende behandlingsoperasjoner, da akutt stress antas å gi hjertet en belastning som fisken ikke innehar de fysiske forutsetningene for å tåle (Poppe et al., 2007). Gjennom tidligere arbeid er det funnet sterk positiv korrelasjon mellom hjertets form og funksjon, og hjerter med unormal hjertemorfologi er overrepresentert blant fisk som ikke tåler stressende behandlingsoperasjoner (Poppe et al., 2003). De relativt nye funnene til Frisk et al. (2020) og Brijs et al. (2020) viser at det er en sammenheng mellom smoltproduksjonsregime og hjertehelse. Et av kjennetegnene ved dagens oppdrettsnæring er rask vekst gjennom selektiv avl og intensiverte produksjonsregimer, og dette gjør det spesielt aktuelt å undersøke smoltproduksjonsregimer sin effekt på hjerteutvikling.

Målingene av hjertemorfologi fra denne studien viser ingen klare trender eller forskjeller mellom behandlingsgruppene for hverken høyde/bredde-ratio, bulbusvinkel eller ventrikkelrundhet (areal og vinkel). Poppe et al. (2003) foreslår at bulbus feiljustering er en direkte konsekvens av endret hjerteform, derfor kan det stemme at det ikke er klare forskjeller mellom behandlingsgruppene når det gjelder bulbus feiljustering, når det heller ikke er klare forskjeller i andre hjertemorfologiske variabler (e.g. hjertevekst og ventrikkelform). Hjertets høyde/bredde-ratio viser at hjertene, uavhengig av smoltregime, blir bredere i løpet av settefiskfasen, og dette stemmer godt overens med målingene av ventrikkelens rundhet (gitt som vinkel), som også ble funnet å være bredere ved de siste uttakene. At hjertene utvikler en bredere form i løpet av settefiskfasen samsvarer også med funnene til Poppe et al. (2003) som fant at oppdrettsfisk har bredere hjerter enn villfisk, med større vinkel på bulbus arteriosus. Ved

siste uttak hadde både fotoperiode-gruppen og saltfôr-gruppen en høyde/bredde-ratio opp mot 1,12 og bulbus feiljustering i overkant av 28° (Figur 12).

Til sammenligning har studiene til Brijs et al. (2020), ved bruk av samme måle-metoder, demonstrert at oppdrettet regnbueørret ved ulike produksjonsregimer på omtrent samme størrelse som dette forsøket (~ 500 g) har høyde/bredde-ratio på 1,0 – 1,1 og bulbus innretning på ventrikkel på 28 - 31°. Disse målingene er relativt like funnene i denne studien, og hjertene ble bestemt å ha avvikende hjertemorfologi sammenlignet med villfisk. Ventrikkler med lav høyde/bredde-ratio (som er funnet hos oppdrettsfisk) er vist å være overrepresentert blant dårlige svømmere sammenlignet med gode svømmere ved en kritisk svømmehastighets-test (Claireaux et al., 2005), og forhøyet vinkel av bulbus innretning på ventrikkel har til stadighet blitt vist å redusere hjertefunksjon ved stressende behandlingsoperasjoner. Dette er sannsynligvis forbundet med økt arbeidsbelastning på hjertet på grunn av at det blir en større vinkel på blodets transportbane ut fra hjertet (Pope et al. 2003). I pattedyr medfører økt arbeidsbelastning en kompensatorisk, men patologisk, hjertevekst (Shimizu & Minamino, 2016), og kan dermed støtte sammenhengen mellom feiljustering av bulbus og redusert hjertefunksjon som er funnet hos oppdrettet laksefisk. En reduksjon i hjertefunksjon blir spesielt kritisk under krevende miljø, som ved grodde eller skitne nøter, algeoppblomstring, rask vekst/økt oksygenkrav, høye temperaturer, eller ingen strøm mellom flo og fjære (Pope et al., 2003) – og spesielt en kombinasjon av krevende miljø under stressende behandlingsoperasjoner.

Pope et al (2003) har også beregnet høyde/bredde-ratio og bulbusjustering på ventrikkel, og funnet høyde/bredde-ratio på 1,05 og bulbus innretning på 40,23° for oppdrettslaks, og høyde/bredde-ratio på 1,15 og bulbus innretning på 33,39° for villfisk. Funnene fra dette forsøket er likere de funnene som Pope et al (2003), fant for villfisk enn oppdrettsfisk. Disse sammenligningene må derimot tolkes med forsiktighet, da Pope et al. (2003) benyttet større fisk i deres studier (villfisk = 0,5 – 6,4 kg og oppdrettsfisk = 3 – 5 kg), og dette kan påvirke til at deres målinger avviker fra de som er funnet i denne studien, samt i studien til Brijs et al. (2020).

I denne studien ble det utarbeidet/benyttet to «nye» metoder for å vurdere ventrikkelens form; gjennom vurdering av vinkel av to stiplede linjer langs sidene av ventrikkelen og av arealet i

trekanten som dannes i forkant av ventrikkelen mellom de kryssende linjene. Målingene av ventrikkelens form gitt som vinkel viser generelt den samme trenden som den mer anerkjente og brukte høyde/bredde-ratio metoden som demonstrerer en tendens til utvikling av bredere hjerter i løpet av smoltifiseringsperioden. Bruk av forholdstall (som høyde/bredde-ratio) har blitt mye kritisert i litteraturen (Albrecht et al., 1993), ved at de ofte ikke fjerner størrelseskorrelasjon fra morfologiske data, og derfor medfører til type 1 feil. Dette kan være tilfelle i denne studien, illustrert ved at funnene fra ventrikkelform gitt som vinkel viser signifikant forskjell i utvikling i tid, noe som er fraværende for målingene av høyde/bredde-ratio. Det ble forsøkt å korrelere for hjertestørrelse, men dette endret ikke resultatet. Dette kan indikere at høyde/bredde ratio som et mål på hjertets rundhet (som er mye brukt i litteraturen) i enkelte tilfeller ikke plukker opp forskjeller – og at vinkel av ventrikkel er en god metode for å beregne og plukke opp utvikling/forskjeller i ventrikkelform.

På grunn av at ventrikkelform gitt som areal ikke kan brukes til å undersøke utvikling i tid (mellom uttak) og det heller ikke er store forskjeller mellom gruppene uttak for uttak, er det vanskelig å sammenligne denne målemetoden med de andre. Dette gjør at en ikke kan vite sikkert om ventrikkelform gitt som areal (Figur 12D) fungerer godt for å undersøke utvikling i hjertemorfologi. Gjennom arbeidet med bildeanalysene ble det derimot erfart at ventrikkelrundhet forklart gjennom areal ikke nødvendigvis samsvarer med hjertets egentlige form, noe som gjør at en kanskje bør ha større tiltro til resultatene fra høyde/bredde-ratio og ventrikkel vinkel. Det kan være fordi tuppens form og avrunding ikke trenger å ha sammenheng med resten av ventrikkelformen.

Det er ikke utenkelig at den avvikende hjerteformen som er funnet for oppdrettet laksefisk har manifestert seg før smoltifiseringsprosessen, og at det derfor vil utvikles svake hjerter uavhengig av smoltproduksjonsregime. En rekke forfattere har pekt på avl som en mulig forklaring for de misdannede hjertene hos oppdrettsfisk, men en relativt ny studie fra Perry et al. (2020) viser at dette trolig ikke er tilfelle – og styrker hypotesen om at hjertemorfologi påvirkes av produksjonsregime. Studien til Perry et al. (2020) skiller seg fra andre studier som har undersøkt forskjeller mellom vill – og oppdrettet laksefisk ved at fisken ble produsert under common garden design. Tidligere studier (Pope et al., 2003) som har påvist forskjell i hjertemorfologi mellom oppdrettsfisk og villfisk, har sammenlignet villfisk fra naturen på 0,5 – 6,4 kg med oppdrettsfisk på 3 – 5 kg. Det kan argumenteres for at en sammenligning av disse

gruppene ikke vil være særlig relevant for å undersøke avl sin effekt på hjerteutvikling, da villfisk på opp mot 5 kg kan ha vært mange år i havet, hvor de kan ha akklimatisert for flere vintre, gytt flere ganger og gjennomført flere migrasjoner i motstrøm opp elvene. Dette er viktige hendelser i forbindelse med plastisitet i hjertet, og en slik sammenligning vil heller avdekke plastisitet i hjertet som følge av miljø (som man allerede vet er tilfelle), heller enn effekten av avl på hjertet. Studiene til Perry et al. (2020) sikret et identisk miljø mellom forsøksgruppene og det ble funnet store forskjeller i kroppsvekt og vekst, men ikke hjertemorfologi mellom fisk fra villfiskstamme og oppdrettsstamme av atlantisk laks. Dette viser at villfisk og oppdrettsfisk i utgangspunktet er lik med hensyn til hjertemorfologi.

Under smoltifisering i naturen skjer det store endringer i hjertet til laksefisk, der det kan forekomme en ventrikkeløkning på opp mot 70 % i vill atlantisk laksesmolt om våren (Leonard & McCormick, 2001). I denne studien ble det funnet en økning i relativ hjertevekt på 123 % og 119 % for henholdsvis fotoperiode- og saltfôr-gruppen, i løpet av den simulerte våren (perioden fra uttak 2 til 3 for begge gruppene). Det vil ikke være riktig å direkte sammenligne disse resultatene, da denne studien undersøkte økning i relativ hjertevekt i stedet for relativ ventrikkelvekt, og den simulerte våren bare er 6 uker. Likevel vil en slik sammenligning belyse den forhøyede veksthastigheten for hjerter i oppdrettsfisk, ved at det er funnet større økning i relativ hjertevekt hos oppdrettsfisk i løpet av 6 uker sammenlignet med det som er funnet hos villfisk i løpet av hele våren. Det er ikke funnet statistisk signifikans mellom gruppene når det gjelder utvikling av CSI mellom gruppene, likevel er det en liten tendens som indikerer at saltfôr-gruppen har høyere relativ hjertevekt i starten av forsøket, før fotoperiode-gruppen får en noe høyere relativ hjertevekt mot slutten av forsøket (Figur 13). Denne utviklingen korrelerer med utvikling av viktige smoltkarakterer, hvor saltfôr-gruppen generelt har hatt en tidligere utvikling men fotoperiode-gruppen har tatt igjen og hatt tydeligere utvikling, men utslagene er mindre for CSI.

4.5 Hvilke effekter har saltfôr- og fotoperiodebehandling på ytelse (tilvekst og dødelighet) i sjøfasen?

Til tross for at det ikke ble funnet signifikante forskjeller mellom gruppene når det gjelder spesifikk vekstrate, biologisk fôrfaktor eller vekstfaktor 3, viser resultatene (Tabell 7) at fotoperiode-gruppen hadde en noe høyere slaktevekt (+ 2,59 %) til tross for en lavere vekt ved utsett i sjø (- 7,55 %) og ved forsøksstart (- 6,3 %). Forskjellene i biologisk fôrfaktor var nesten

statistisk signifikant ($p = 0,083$). Dette kan indikere en trend der fisk smoltifisert med fotoperiode vokser saktere i settefiskfasen, men raskere i sjø sammenlignet med fisk smoltifisert med saltfôr – og at total vekst ser ut til å være noe høyere for fisk smoltifisert med fotoperiode. Under forutsetning om at saltfôr-gruppen har gjennomgått en mer intensiv produksjon i forhold til fotoperiode-gruppen, er disse funnene sammenlignbare med studien til Frisk et al. (2020). De viste at smolt som er produsert intensivt i settefiskfasen har redusert tilvekst i sjøfasen. De fant en større andel hjerter med avvikene form for fisk som var produsert intensivt i settefiskfasen, og pekte på hjertedeforviteter som en mulig årsak for redusert ytelse i sjø. Til tross for at det ikke ble funnet noen klare forskjeller i hjertemorfologi mellom behandlingsgruppene i dette forsøket, så viser genuttrykk hos saltfôr-gruppen en oppregulering av flere gener som er karakteristiske for patologisk hjertevekst. Man kan ikke utelukke at utvikling av svake hjerter (som genuttrykk indikerer) er en mulig årsak til trenden som viser lavere tilvekst for saltfôr-gruppen i sjøfasen.

Dødeligheten i sjø ble funnet å være lav for begge behandlingsgruppene med 6,45 % for fotoperiode-gruppen og 6,66 % for saltfôr-gruppen, mot en gjennomsnittlig dødelighet for laks på 15,5 % på landsbasis, og 19,9 % for det respektive produksjonsområdet (Walde & Sommerset, 2022). En mulig årsak til den lave dødeligheten i sjø som er funnet i denne studien sammenlignet med det som er presentert i fiskehelse rapporten for 2021 er at sjøfasen er kortere enn det som er vanlig for mange andre produsenter, ved at fisken ble satt ut i sjø som postsmolt på over 500 g. Til tross for ingen signifikant forskjeller mellom gruppene, er det en noe lavere dødelighet for fotoperiode-gruppen. Nærmere undersøkelser av årsaker til dødeligheten viser at saltfôr-gruppen har større dødelighet knyttet til avlusing enn fotoperiode-gruppen. For fotoperiode-gruppen er 9,94 % av total dødelighet som følge av avlusing, og for saltfôr-gruppen er 14,95 % av total dødelighet som følge av avlusing. Dødelighet under stressende avlusingsoperasjoner er et kjennetegn for fisk med svake hjerter (Poppe et al., 2003) og disse funnene kan støtte mistanken om at hjertene til saltfôr-gruppen i større grad er assosiert med patologisk utvikling, som ble funnet gjennom genuttrykk av molekylære markører knyttet til hjertehelse.

4.6 Videre forskning/til ettertanke

Til tross for at det har vært økt fokus på hjertehelse i oppdrettsnæringen det siste tiåret, mangler det fortsatt mye kunnskap om sammenhengen mellom produksjonsregimer og hjertehelse for atlantisk laks. Til forskjell fra en rekke andre studier har denne studien sett på utvikling av hjertet og smoltkarakterer gjennom flere uttak, noe som kan se ut til å være av betydning for tolkning av resultatene, da utvikling av smoltkarakterer og genuttrykk har blitt vist å variere mye med hensyn til smoltifiserings-stadie (uttakstidspunkt). Spesielt interessant har det vært å se hvordan de ulike behandlingsgruppene utvikler seg i et storskala, kommersielt produksjonsregime, både i settefisk- og sjøfase. Dette gir god tyngde for funnene i denne studien. Til videre forskning kunne det vært interessant å undersøke smoltifiseringsmetode (e.g. fotoperiode vs saltfôr) samtidig som vekst reduseres i fotoperiode-gruppen gjennom redusert temperatur og/eller fôring for å ytterligere redusere veksthastigheten i de tidlige livsstadiene og etterligne slik det er i naturen.

Det er også nærliggende å anta at tidligere stadier enn det som er undersøkt i dette forsøket kan ha påvirkning på hjerteutvikling i oppdrettslaks. Blant annet har studiene til (Takle et al., 2005) demonstrert at lakseembryo som er eksponert for 10 °C (høy temperatur) frem til fôring både induserer avvikende utvikling av hjertet og tilhørende strukturer og oppregulering av ANP under embryogenesen (fosterutviklingen) sammenlignet med lakseembryo eksponert for 8 °C (lav temperatur). Dette er utviklingstrekk som er assosiert med nedsatt hjertefunksjon, som tidligere diskutert, og demonstrerer at produksjonsregime under tidlige utviklingsstadier også krever mer oppmerksomhet knyttet til hjertehelse. Til sammenligning ble fisken som er benyttet i dette forsøket eksponert for 3,7 °C i klekkeskapet, og omtrent 12 °C grader ved startfôring. Temperaturen under klekking bør dermed ikke ha vært en avgjørende faktor for fisken i dette forsøket. Tatt i betraktning at funnene i denne studien indikerer at kontinuerlig lys under smoltifisering er assosiert med en oppregulering av flere gener som er karakteristiske for patologisk hjerteutvikling, kan det også tenkes at kontinuerlig lys i perioden fra startfôring til smoltifisering kan ha en negativ effekt på hjertet. Kontinuerlig lys i perioden før smoltifisering er ikke tilfelle i naturen, da laks smoltifiseres om våren etter en naturlig vinterperiode.

En generell oppfatning i næringen er at god tilvekst i mange tilfeller gjenspeiler gode produksjonsvilkår og sunn fisk. Likevel kan studiene til Frisk et al. (2020), som er nevnt ovenfor, og kanskje til dels også denne, indikere at rask vekst ikke nødvendigvis medfører god

kvalitet og robusthet. En hypotese kan være at de effektive produksjonsregimene har gjort at anleggets ønskede produksjonshastighet i realiteten overskrider fiskens faktiske utviklingspotensiale, og rask vekst derfor går på kompromiss med kvalitet.

Det kunne også vært spennende å undersøke om perikardialhulrommet til oppdrettslaks har avvikende form når hjertene har det. Perikardialhulrommet har en viktig funksjon for fylling av blod til hjertet (Jobling, 1995; Gamperl & Holly, 2014), og det kan tenkes at en eventuell mismatch mellom hjertet og perikardialhulrommet vil redusere denne effekten, slik at hjertet får en økt belastning i forbindelse med fylling av blod.

Arteriosklerose er en betegnelse på tilstander med fortykket arterievegg med tap av elastisitet, og kunne også vært interessant for videre forskning. Allerede i 2003 ble arteriosklerose foreslått å være et problem for oppdrettslaks (Poppe et al., 2003). Disse mistankene har blant annet gjennom studiene til Brijs et al. (2020) blitt grundigere undersøkt, der 92 – 100 % av oppdrettet regnbueørret ble funnet å ha redusert funksjon i koronararteriene, og ble estimert til å gi en reduksjon i «blodflow» på 34 – 54 %.

For denne oppgaven ble det også tatt ut hjerter for å undersøke histologi, som i utgangspunktet skulle analyseres og vurderes i forbindelse med denne studien. Det ble ikke nok tid til å gjennomføre disse analysene, men histologiprøvene vil bli analysert av en annen student i forbindelse med deres masteroppgave. Det vil da være interessant å undersøke hvorvidt en oppregulering av gener knyttet til patologisk hjertevekst, og økt vaskularisering (som er funnet hos fisk smoltifisert ved bruk av saltfôr) er synlig gjennom endret histologi.

Til slutt ville det også vært interessant å inkludere genuttrykk og plasmaverdier for ulike smoltrelaterte hormoner eller reseptorer (IGF, kortisol, thyroideahormoner) i hjertet, for å undersøke hvorvidt smoltindusering gjennom saltfôr og fotoperiode påvirker utviklingen av disse. Resultatene fra denne studien viser en ulik utvikling når det gjelder smoltkarakterer, og derfor kan man kanskje anta at det vil være en ulik utvikling i disse smoltrelaterte hormonene, også på hjertet.

5 Konklusjon

Denne studien demonstrerer ulik utvikling mellom atlantisk laks smoltindusert med saltfôr og fotoperiode når det gjelder et utvalg gener som er assosiert med hjertepatologi og for utvikling av viktige smoltkarakterer. Under forutsetning om at markørene som har blitt undersøkt har tilsvarende funksjon i hjertet til atlantisk laks som hos pattedyr, indikerer funnene at saltfôrgruppen har utviklet hjerter som i større grad er assosiert med patologisk utvikling. Til tross for dette, er det ikke funnet forskjell i utvikling av hjertemorfologi mellom gruppene. For første gang er det vist at irisin A, et protein som er viktig for hjertefunksjon hos pattedyr, trolig spiller en rolle i hjertet til atlantisk laks under smoltifisering. Resultatene indikerer også at fisk som er smoltifisert under fotoperiodemanipulering har en tydeligere utvikling av viktige smoltkarakterer, sammenlignet med fisk smoltifisert ved bruk av saltfôr. Til tross for at fotoperiode-gruppen var så vidt mindre ved forsøksstart, samt viste en trend til lavere tilvekst i settefiskfasen, indikerer data fra slakteriet at fotoperiode-gruppen hadde en høyere tilvekst i sjøfasen, og var størst ved slakt. De nevnte funnene indikerer at smoltindusering ved bruk av saltfôr er assosiert med økt tilvekst i settefiskfasen, som kan gå på bekostning av tilvekst i sjøfasen.

6 Litteraturliste

- Aho, E., & Vornanen, M. (2001). Cold acclimation increases basal heart rate but decreases its thermal tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Comparative Physiology (171)*, ss. 173-179. doi:10.1007/s003600000171
- Albrecht, G. H., Gelvin, B. R., & Hartman, S. E. (1993). Ratios as a size adjustment in morphometrics. *American Journal of Physical Anthropology (4)*, ss. 441-468. doi:10.1002/ajpa.1330910404
- Ali, M. A. (1959). The ocular structure, retinomotor and photo-behavioral responses of juvenile pacific salmon. *Canadian Journal of Zoology (37)*, ss. 965-996. doi:10.1139/z59-092
- Aronis, K. N., Moreno, M., Polyzos, S. A., Moreno-Navarrete, J. M., Ricart, W., Delgado, E., . . . Mantzoros, C. S. (2015). Circulating irisin levels and coronary heart disease: association with future acute coronary syndrome and major adverse cardiovascular events. *International Journal of Obesity (39)*, ss. 156-161. doi:10.1038/ijo.2014.101
- Aydin, S., Kuloglu, T., Aydin, S., Eren, M. N., Celik, A., Yilmaz, M., . . . Dabak, O. (2014). Cardiac, skeletal muscle and serum irisin responses to with or without water exercise in young and old male rats: cardiac muscle produces more irisin than skeletal muscle. *Peptides (52)*, ss. 68-73. doi:10.1016/j.peptides.2013.11.024
- Basulto, S. (1976). Induced saltwater tolerance in connection with inorganic salts in the feeding of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture (8)*, ss. 44-55. doi:10.1016/0044-8486(76)90018-1
- Bergheim, A., Drenstig, A., Ulgenes, Y., & Fivelstad, S. (2009). Production of Atlantic salmon in Europe - Current characteristics and future trends. *Aquacultural Engineering (41)*, ss. 46-52. doi:10.1016/j.aquaeng.2009.04.004
- Björnsson, B. T. (1997). The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiology and Biochemistry (17)*, ss. 9-24. doi:10.1023/A:1007712413908
- Björnsson, B. T., Stefansson, S. O., & McCormick, S. D. (2011). Environmental endocrinology of salmon smoltification. *General and Comparative Endocrinology (170)*, ss. 290-298. doi:10.1016/j.ygcen.2010.07.003
- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., . . . Spiegelman, B. M. (2012). A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature (481)*, ss. 463-368. doi:10.1038/nature10777
- Brijs, J., Hjelmstedt, P., Berg, C., Johansen, I. B., Sundh, H., Roques, J. A., . . . Gräns, A. (2020). Prevalence and severity of cardiac abnormalities and arteriosclerosis in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture (526)*, ss. 1-11. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735417
- Brocklebank, J., & Raverty, S. (2002). Sudden mortality caused by cardiac deformities following seining of preharvest farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) and by cardiomyopathy of postintra-peritoneally vaccinated Atlantic salmon parr in British Columbia. *Canadian Veterinary Journal (43)*, ss. 129-130.
- Castro, V., Grisdale-Helland, B., Helland, S. J., Torgersen, J., Kristensen, T., Claireaux, G., . . . Takle, H. (2013). Cardiac molecular-acclimation mechanisms in response to

- swimming-induced exercise in Atlantic salmon. *PLoS ONE* (8), ss. 1-10. doi:10.1371/journal.pone.0055056
- Claireaux, G., McKenzie, D. J., Genge, A. G., Chatelier, A., Aubin, J., & Farrell, A. P. (2005). Linking swimming performance, cardiac pumping ability and cardiac anatomy in rainbow trout. *The Journal of Experimental Biology* (208), ss. 1775-1784. doi:10.1242/jeb.01587
- Driedzic, W. R., Bailey, J. R., & Sephton, D. H. (1996). Cardiac adaptations to low temperature in non-polar teleost fish. *The Journal of Experimental Zoology* (275), ss. 186-195. doi:https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19960601/15)275:2/3<186::AID-JEZ10>3.0.CO;2-I
- Duston, J. (1993). Effects of dietary betaine and sodium chloride on seawater adaptation in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* (105), ss. 673-677. doi:10.1016/0300-9629(93)90267-8
- Farrell, A. P., Hammons, A. M., Graham, M. S. & Tibbits, G. F. (1988). Cardiac growth in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Canadian Journal of Zoology* (66), ss. 2368-2373. doi: 10.1139/z88-351
- Franklin, C. E., & Davie, P. S. (1992). Sexual maturity can double heart mass and cardiac power output in male rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* (171), ss. 139-148. doi: https://doi.org/10.1242/jeb.171.1.139
- Frisk, M., Høyland, M., Zhang, L., Vindas, M. A., Øverli, Ø., & Johansen, I. B. (2020). Intensive smolt production is associated with deviating cardiac morphology in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* (529), ss. 1-10. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735615
- Fuster, V. (2014). Global burden of cardiovascular disease: time to implement feasible strategies and to monitor results. *Journal of the American College of Cardiology* (64), ss. 520-522. doi:10.1016/j.jacc.2014.06.1151
- Gallaugh, P. E., Thorarensen, H., Kiessling, A., & Farrell, A. P. (2001). Effects of high intensity exercise training on cardiovascular function, oxygen uptake, internal oxygen transport and osmotic balance in chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*) during critical speed swimming. *Journal of Experimental Biology* (16), ss. 2861-2872. doi: https://doi.org/10.1242/jeb.204.16.2861
- Gamperl, A. K. & Farrel, A. P. (2004). Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. *Journal of Experimental Biology* (207), ss. 2539-2550. doi:10.1242/jeb.01057
- Gamperl, A. K. & Holly, A. S. (2014). Cardiovascular System. I Evans, D. H., Claiborne, J. B., & Currie, S. *The physiology of fishes* (4. utg.), ss. 33-43. CRC Press.
- Garseth, Å. H., Fritsvold, C., Svendsen, J. C., Jensen, B. B., & Mikalsen, A. B. (2018). Cardiomyopathy syndrome in Atlantic salmon *Salmo salar* L.: A review of the current state of knowledge. *Journal of Fish Diseases* (41), ss. 11-26. doi:10.1111/jfd.12735
- Graham, M. S., & Farrell, A. P. (1989). The effect of temperature acclimation and adrenaline on the performance of perfused trout heart. *Physiological Zoology* (62), ss. 38-61. doi:10.1086/physzool.62.1.30159997

- Hama, N., Itoh, H., Shirakami, G., Nakagawa, O., Suga, S., Ogawa, Y., . . . Nakao, K. (1995). Rapid ventricular induction of brain natriuretic peptide gene expression in experimental acute myocardial infarction. *Circulation* (6), ss. 1558–1564. doi:10.1161/01.CIR.92.6.1558
- Handeland, S. O., Imsland, A. K., Björnsson, B. T., & Stefansson, S. O. (2013). Long-term effects of photoperiod, temperature and their interaction on growth, gill Na⁺, K⁺-ATPase activity, seawater tolerance and plasma growth-hormone levels in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology* (83), ss. 1197-1209. doi:10.1111/jfb.12215
- Handeland, S. O., Wilkinson, E., Sveinsbø, B., McCormick, S. D., & Stefansson, S. O. (2004). Temperature influence on the development and loss of seawater tolerance in two fast-growing strains of Atlantic salmon. *Aquaculture* (233), ss. 513-529. doi:10.1016/j.aquaculture.2003.08.028
- Hoar, W. S. (1988). The Physiology of smolting salmonids. *Fish Physiology* (11), ss. 275-343. doi:10.1016/S1546-5098(08)60216-2
- Hochachka, P. W. (1961). The effect of physical training on oxygen debt and glycogen reserves in trout. *Canadian Journal of Zoology* (36), ss. 234-241. doi:10.1139/z61-073
- Icardo, J. (2012). The teleost heart: A morphological approach. I Sedmera, D. & Wang T., *Ontogeny and Phylogeny of the Vertebrate Heart*, ss. 35-53. doi:10.1007/978-1-4614-3387-3_2
- Jobling, M. (1995). Vascular transport and gaseous exchange: the circulatory and respiratory systems: The heart. I Jobling, M. *Environmental Biology of Fishes*, ss. 104-107. Chapman & Hall.
- Johansen, I. B., Lunde, I. G., Røsjø, H., Christensen, G., Nilsson, G. E., Bakken, M., & Øverli, Ø. (2011). Cortisol response to stress is associated with myocardial remodeling in salmonid fishes. *The Journal of Experimental Biology* (214), ss. 1313-1321. doi:10.1242/jeb.053058
- Johansen, I. B., Sandblom, E., Skov, P. V., Gräns, A., Ekström, A., Lunde, I. G., . . . Øverli, Ø. (2017). Bigger is not better: cortisol-induced cardiac growth and dysfunction in salmonids. *Journal of Experimental Biology* (220), ss. 2545-2553. doi:10.1242/jeb.135046
- Kalkan, A. K., Cakmak, H. A., Erturk, M., Kalkan, K. E., Uzun, F., Tasbulak, O., . . . Celik, A. (2018). Adropin and irisin in patients with cardiac cachexia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* (111), ss. 39-47. doi:10.5935/abc.20180109
- Keen, A. N., Fenna, A. J., McConnel, J. C., Sherratt, M. J., Gardner, P., & Shiels, H. A. (2016). The dynamic nature of hypertrophic and fibrotic remodeling of the fish ventricle. *Frontiers in Physiology* (6), ss. 1-13. doi:10.3389/fphys.2015.00427
- Keen, J., & Farrell, A. (1994). Maximum prolonged swimming speed and maximum cardiac performance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, acclimated to two different water temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* (108), ss. 287-295. doi: 10.1016/0300-9629(94)90097-3

- Keen, J., Vianzon, D., Farrell, A., & Tibbits, G. (1993). Thermal acclimation alters both adrenergic sensitivity and adrenoceptor density in cardiac tissue of rainbow trout. *The Journal of Experimental Biology* (181), ss. 27-48.
- Klaiman, J. M., Fenna, A. J., Shiels, H. A., Macri, J., & Gillis, T. E. (2011). Cardiac remodeling in fish: Strategies to maintain heart function during temperature change. *PLoS One* (6), ss. 1-11. doi:10.1371/journal.pone.0024464
- Kryvi, H., & Poppe, T. (2016). Kapittel 6: Sirkulasjonssystemet. I Kryvi, H. & Poppe, T. *Fiskeanatomi* (2. utgave), ss. 73-91. Fagbokforlaget.
- Kuzishchin, K. V., Gruzdeva, M. A., Pichugin, M. Y., & Pavlov, D. S. (2019). Features of the change in external morphology and axial skeleton in juvenile salmonid fishes (salmonidae) associated with smoltification. *Journal of Ichthyology* (59), ss. 664-679. doi:10.1134/S0032945219050084
- Lear, W., & Boer, P. H. (1995). Rapid activation of the type B versus type A natriuretic factor gene by aortocaval shunt induced cardiac volume overload. *Cardiovascular Research* (29), ss. 676-681. doi:10.1016/S0008-6363(96)88640-8
- Leonard, J. K., & McCormick, S. D. (2001). Metabolic enzyme activity during smolting stream- and hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* (58), ss. 1585-1593. doi:10.1139/F01-105
- Lerman, A., Gibbons, R. J., Rodeheffer, R. J., Bailey, K. R., McKinley, L. J., Heublein, D. M., & Burnett Jr, J. C. (1993). Circulating N-terminal atrial natriuretic peptide as a marker for symptomless left-ventricular dysfunction. *The Lancet* (341), ss. 1105-1109. doi: 10.1016/0140-6736(93)93125-k
- Li, J., Xie, S., Guo, L., Jiang, J., & Chen, H. (2020). Irisin: linking metabolism with heart failure. *American Journal of Translational Research* (12), ss. 6003-6014.
- Lloyd-Jones, D. M., Larson, M. G., Leip, E. P., Beiser, A., D'Agostino, R. B., Kannel, W. B., . . . Framingham Heart Study. (2002). Lifetime risk of developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* (106), ss. 3068-3072. doi:10.1161/01.cir.0000039105.49749.6f.
- Madsen, S. S., & Naamansen, E. T. (1989). Plasma ionic regulation and gill Na⁺/K⁺-ATPase changes during rapid transfer to sea water of yearling rainbow trout, *Salmo gairdneri*: time course and seasonal variation. *Journal of Fish Biology* (34), ss. 829-840. doi:10.1111/j.1095-8649.1989.tb03367.x
- McCormick, S. D. (2001). Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American Zoologist* (41), ss. 781-794. doi:10.1093/icb/41.4.781
- McCormick, S. D. (2012). Smolt Physiology and Endocrinology. *Fish Physiology* (32), ss. 199-251. doi:10.1016/B978-0-12-396951-4.00005-0
- McCormick, S. D., & Saunders, R. L. (1987). Preparatory physiological adaptations for marine life of salmonids: Osmoregulation, growth, and metabolism. *American Fisheries Society Symposium* (1), ss. 211-229.
- McCormick, S. D., Hansen, L. P., Quinn, T. P., & Saunders, R. L. (1998). Movement, migration, and smolting of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* (55), ss. 77-92. doi:10.1139/d98-011

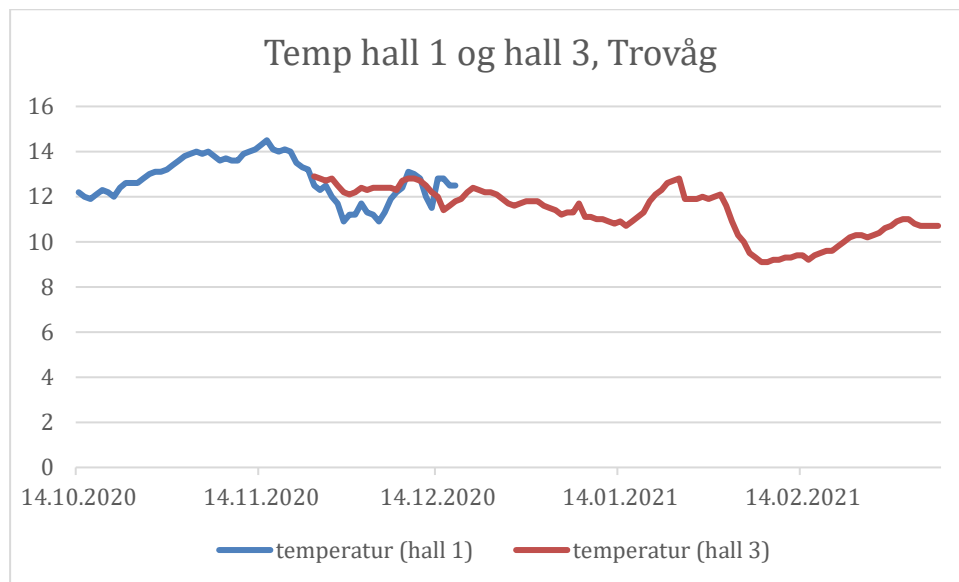
- McCormick, S. D., Moriyama, S., & Björnsson, B. T. (2000). Low temperature limits photoperiod control of smolting in Atlantic salmon through endocrine mechanisms. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* (278), ss. 1352-1361. doi:10.1152/ajpregu.2000.278.5.R1352
- McCormick, S. D., Regish, A. M., Christensen, A. K., & Björnsson, B. T. (2013). Differential regulation of sodium-potassium pump isoforms during smolt development and seawater exposure of Atlantic salmon (216), ss. 1142-1151. doi:10.1242/jeb.080440
- McCormick, S. S., Regish, A. M., & Christensen, A. K. (2009). Distinct freshwater and seawater isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase in gill chloride cells of Atlantic salmon (212), ss. 3994-4001. doi:10.1242/jeb.037275
- Mercier, C., Aubin, J., Lefrancois, C., & Claireaux, G. (2000). Cardiac disorders in farmed adult brown trout, *Salmo trutta* L. *Journal of Fish Diseases* (23), ss. 243-249. doi:10.1046/j.1365-2761.2000.00237.x
- Nørstrud, K. S., Vindas, M. A., Nilsson, G. E., & Johansen, I. B. (2018). Short-term cortisol exposure alters cardiac hypertrophic and non-hypertrophic signalling in a time-dependent manner in rainbow trout. *Biology Open* (7), ss. 1-9. doi:10.1242/bio.037853
- Olkowski, A. A., Classen, H. L. & Kumor, L. (1996). Changing epidemiology of ascites in broiler chickens. *Canadian Journal of Animal Science* (76), ss. 135-140. doi:doi.org/10.4141/cjas96-018
- Pérez-Sotelo, D., Roca-Rivada, A., Baamonde, I., Baltar, J., Castro, A. I., Domínguez, E., . . . Pardo, M. (2017). Lack of adipocyte-fndc5/irisin expression and secretion reduces thermogenesis and enhances adipogenesis. *Scientific Reports* (7), ss. 16289. doi:10.1038/s41598-017-16602-z
- Perry, B. W., Solberg, M. F., Brodie, C., Medina, A. C., Pillay, K. G., Egerton, A., . . . Glover, K. A. (2020). Disentangling the effects of sex, life history and genetic background in Atlantic salmon: growth, heart and liver under common garden conditions. *Royal Society Open Science* (7), ss. 1-17. doi:10.1098/rsos.200811
- Perry, S. F., Rivero-Lopez, L., McNeill, B., & Wilson, J. (2006). Fooling a freshwater fish: how dietary salt transforms the rainbow trout gill into a seawater gill phenotype. *Journal of Experimental Biology* (209), ss. 4591-4596. doi:10.1242/jeb.02558
- Poppe, T. T., Johansen, R., Gunnes, G., & Tørud, B. (2003). Heart morphology in wild and farmed Atlantic salmon *Salmo Salar* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Disease of Aquatic Organisms* (57), ss. 103-108. doi:10.3354/dao057103
- Poppe, T. T., Taksdal, T., & Bergtun, P. H. (2007). Suspected myocardial necrosis in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a field case. (30), ss. 615-620. doi:10.1111/j.1365-2761.2007.00841.x
- Prunet, P., Boeuf, G., Bolton, J. P., & Young, G. (1989). Smoltification and seawater adaptation in Atlantic Salmon (*Salmo salar*): Plasma prolactin, growth hormone, and thyroid hormones. *General and Comparative Endocrinology* (74), ss. 355-364. doi:10.1016/S0016-6480(89)80031-0

- Richards, J. G., Semple, J. W., Bystriansky, J. S., & Schulte, P. M. (2003). Na⁺/K⁺-ATPase alpha-isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. *Journal of experimental Biology* (206), ss. 4475-4486. doi:10.1242/jeb.00701
- Salman, N. A., & Eddy, F. B. (1987). Response of chloride cell numbers and gill Na⁺/K⁺ -ATPase activity of freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to salt feeding. *Aquaculture* (61), ss. 41-48. doi:10.1016/0044-8486(87)90336-X
- Saunders, R. L., Henderson, E. B., & Harmon, P. R. (1985). Effects of photoperiod on juvenile growth and smolting of Atlantic salmon and subsequent survival and growth in sea cages. *Aquaculture* (45), ss. 55-66. doi:0044-8486/85/\$03,30
- Sephton, D. H., & Driedzic, W. R. (1995). Low temperature acclimation decreases rates of protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. *Fish Physiology and biochemistry* (14), ss. 63-69. doi: 10.1007/BF00004291
- Shen, S., Gao, R., Bei, Y., Li, J., Zhang, H., Zhou, Y., . . . Li, X. (2017). Serum irisin predicts mortality risk in acute heart failure patients. *Cellular Physiology and Biochemistry* (42), ss. 615-622. doi:10.1159/000477867
- Shimizu, I., & Minamino, T. (2016). Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (97), ss. 245-262. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.06.001
- Solbakken, V. A., Hansen, T., & Stefansson, S. (1994). Effects of photoperiod and temperature on growth and parr-smolt transformation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and subsequent performance in seawater. *Aquaculture* (121), ss. 13-27. doi: 10.1016/0044-8486(94)90004-3
- Sommerset, I. (2021). *Fiskehelsesrapporten 2020*. Veterinærinstituttet.
- Soonpaa, M. H., Kim, K. K., Pajak, L., Franklin, M., & Field, L. J. (1996). Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *American Journal of Physiology* (271), ss. 2183-2189. doi:10.1152/ajpheart.1996.271.5.H2183
- Stefansson, O. S., Björnsson, B. T., Ebbesson, L. O., & McCormick, S. D. (2008). Smoltification. I R. N. Finn, & B. G. Kapoor, *Fish Larval Physiology*, ss. 639-681. CRC Press.
- Stefansson, S. O., Björnsson, B. T., Hansen, T., Haux, C., Taranger, G. L., & Saunders, R. L. (1991). Growth, parr-smolt transformation, and changes in growth hormone of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) reared under different photoperiods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* (48), ss. 2100-2108. doi:10.1139/f91-249
- Stefansson, S. O., Naevdal, G., & Hansen, T. (1989). The influence of three unchanging photoperiods on growth and parr-smolt transformation in Atlantic salmon, *Salmo Salar* L. *Journal of Fish Biology* (35), ss. 237-247. doi:10.1111/j.1095-8649.1989.tb02973.x
- Strand, J. T., Hazlerigg, D., & Jørgensen, E. H. (2018). Photoperiod revisited: is there a critical day length for triggering a complete parr-smolt transformation in Atlantic salmon *Salmo salar*? *Journal of Fish Biology* (93), ss. 440-448. doi:10.1111/jfb.13760
- Sundarrajan, L., Rajeswari, J. J., Weber, L. P., & Unniappan, S. (2021). The sympathetic/beta-adrenergic pathway mediates irisin regulation of cardiac functions in zebrafish.

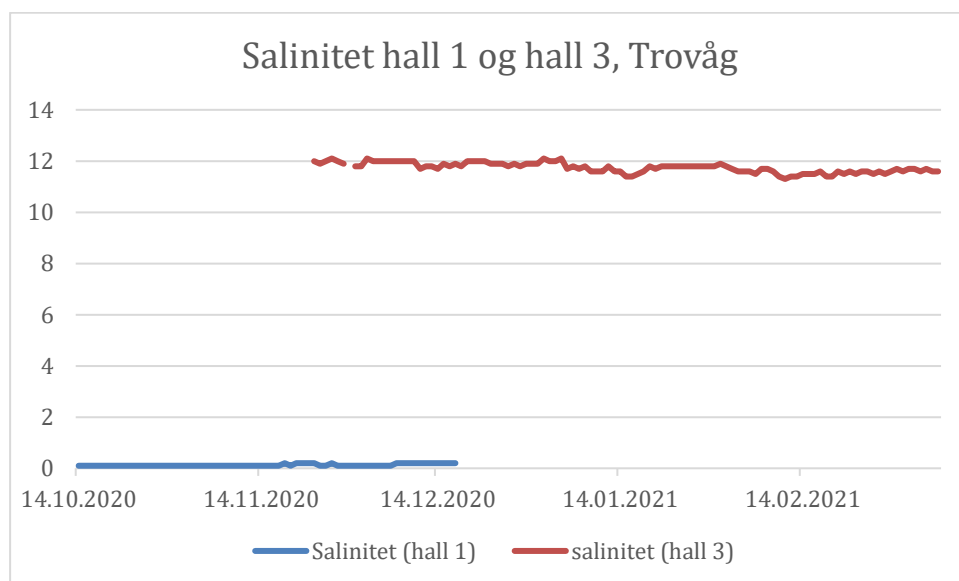
- Comparative Biochemistry and Physiology* (259), ss. 111016.
doi:10.1016/j.cbpa.2021.111016
- Sundarrajan, L., Yeung, C., Hahn, L., Weber, L. P., & Unniappan, S. (2017). Irisin regulates cardiac physiology in zebrafish. *PLoS ONE* (12), ss. 1-19.
doi:10.1371/journal.pone.0181461
- Takle, H., Baeverfjord, G., Helland, S., Kjorsvik, E., & Andersen, O. (2005). Hyperthermia induced atrial natriuretic peptide expression and deviant heart development in Atlantic salmon *Salmo salar* embryos. *General and Comparative Endocrinology* (147), ss. 118-125. doi:10.1016/j.ygcen.2005.12.017
- Thorpe, J. E., Morgan, R. I., Pretswell, D., & Higgins, P. J. (2006). Movement rhythms in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Biology* (33), ss. 931-940.
doi:10.1111/j.1095-8649.1988.tb05542.x
- Timmons, J., Baar, K., & Davidsen, P. (2012). Is irisin a human exercise gene? *Nature* (488), ss. E9-E10. doi:10.1038/nature11364
- Volpe, M., Rubattu, S., & Burnett, Jr, J. (2014). Natriuretic peptides in cardiovascular diseases: current use and perspectives. *European Heart Journal* (35), ss. 419-425. doi:10.1093/eurheartj/eh466
- Vornanen, M., Hassinen, M., Koskinen, H., & Krasnov, A. (2005). Steady-state effects of temperature acclimation on the transcriptome of the rainbow trout heart. *American Journal of Physiology* (289), ss. 1177-1184. doi:10.1152/ajpregu.00157.2005
- Walde, C., & Sommerset, I. (2022). *Fiskehelsesrapporten 2021*. Veterinærinstituttet.
- Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., & Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* (407), ss. 242-248.
doi:10.1038/35025215

7 Appendiks

7.1 Vannkvalitet



Figur A1. Temperatur i hall 1 og hall 3 i RAS anlegget på Trovåg, i perioden hvor fisken var i de respektive hallene.



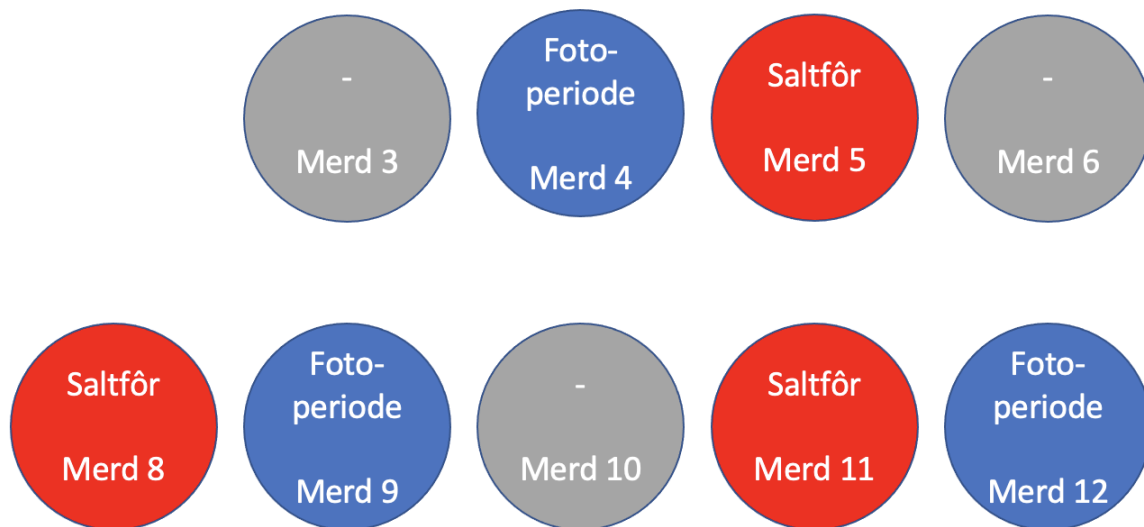
Figur A2. Salinitet i hall 1 og hall 3 i RAS anlegget på Trovåg, i perioden hvor fisken var i de respektive hallene.

7.2 Dato for overføring fra ferskvann til brakkvann

Tabell A1. Oversikt over dato for flytting fra ferskvann (hall 1) til brakkvann (hall 3) for de ulike enhetene. Merk at fotoperiode-gruppen har en noe senere flytting enn saltfôr-gruppen.

Behandling	Enhet	Dato
Fotoperiode-gruppen	109	15.12.2020
	111	17.12.2020
	112	16.12.2020
Saltfôr-gruppen	101	29.11.2020
	105	23.11.2020
	108	23.11.2020

7.3 Merdoppsett i sjø



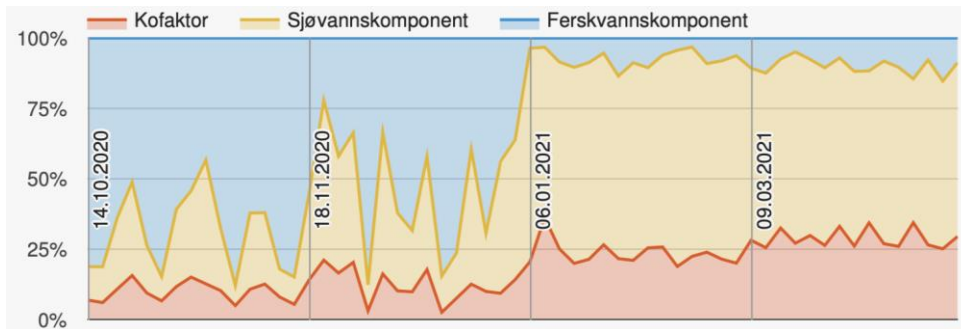
Figur A3. Merdoppsett for behandlingsgruppene i sjø, ved matfisk anlegget til Bremnes Seashore, Hattasteinen. Merdene til behandlingsgruppene ble spredt etter beste evne.

7.4 Tilgangsnummer, Primerfrekvens og effektivitet

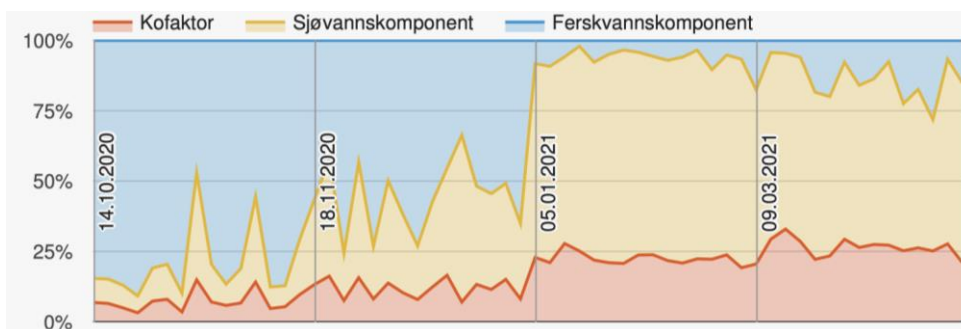
Tabell A2. Oversikt over tilgangsnummer, primerfrekvens (FP: forward primer, RP: reverse primer), effektivitet (E) og tilgangsnummer.

Gen (Tilgangsnummer)	Primer	Primerfrekvens	E (E%)	R ²
Sal_18S (AJ427629)	FP: RP:	TGTGCCGCTAGAGGTGAAATT CGAACCTCCGACTTTCGTTCT	98	0,99
B-aktin (BT059604)	FP: RP:	CAGCCCTCCTTCCTCGGTAT CGTCACACTTCATGATGGAGTTG	103	0,99
Elongeringsfaktor (Efl- α) (AF321836)	FP: RP:	CGCCAACATGGGCTGG TCACACCATTGGCGTTACCA	102	0,99
A-type natriuretic peptide (NM_001123545.2)	FP: RP:	ATGGAATCAAGAATGGTGAGGA CCAAGTCGCTATCAGGGTATG	108,64	0,99
B-type natriuretic peptide (XM_014136528.1)	FP: RP:	GGGCAAAGGATGGACCGAAT GTTGCTGTTCCAGGTTGTGT	96,86	0,99
GATA Binding Protein 4 (XM_014205425)	FP: RP:	CCAAGAACCTCAACAAGTC GGCTCCTCTGAGTTACAA	86,13	0,98
Myocyte Enhancer Factor 2C (XM_014172378.1)	FP: RP:	TGATGAAGAAGGCGTATGA TTGTTGGTACTGTTGAAGATG	79,2	0,98
Vascular endothelial growth factor (XM_014169157)	FP: RP:	AGACAGCCCACATACCCAAG GAAGACGTCCACCAGCATCT	89,35	0,98
Proliferating cell nuclear antigen (XM_014161524.2)	FP: RP:	CTGGTGGTGGAGTACAAGATAG GGAAGTTTGGATCAGAGAGGTT	107,68	0,99
IrisinA (XM_014210550.1)	FP: RP:	GTGGCTGTCACTGCTCTAAT GGCCATGTTTATATCTCCTCTC	98,42	0,99
IrisinB (XM_014160786.1)	FP: RP:	CACAGGCCTCCAAGAGTAAAG TCAGCACCACCACGATAATG	108,7	0,99

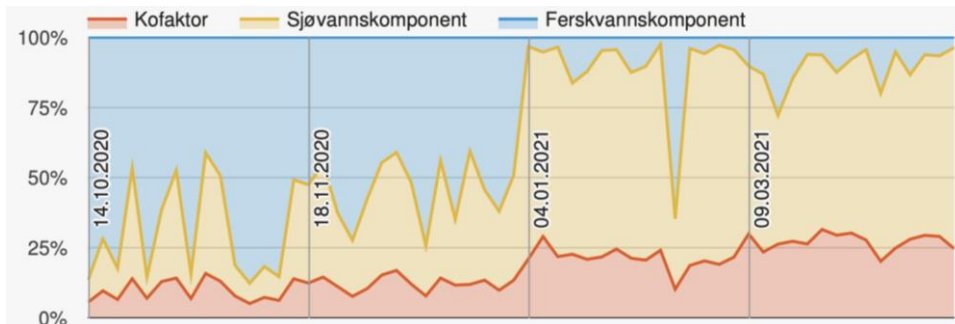
7.5 saltvannsATPase, ferskvannsATPase og kofaktor



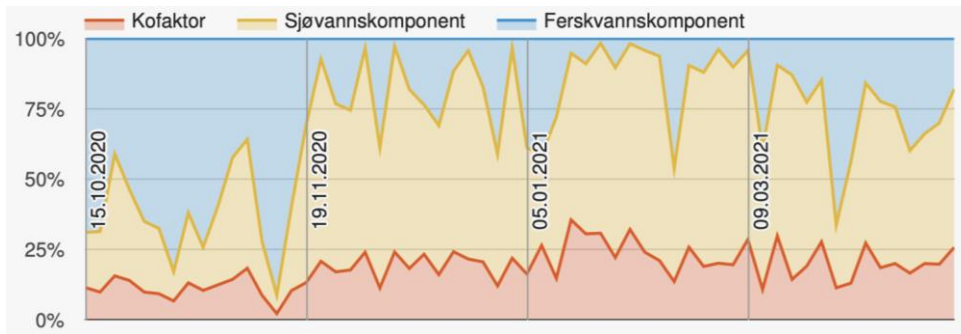
Figur A4. Viser genuttrykk for saltvannsATPase, ferskvannsATPase og kofaktor for kar nr 109 (fotoperiode). Kofaktor regnes som innenfor normalen når den er lavere enn 20 %.



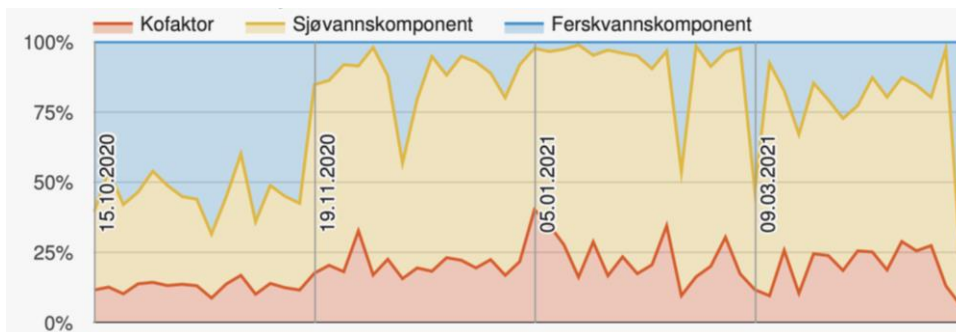
Figur A5. Viser genuttrykk for saltvannsATPase, ferskvannsATPase og kofaktor for kar nr 111 (fotoperiode). Kofaktor regnes som innenfor normalen når den er lavere enn 20 %.



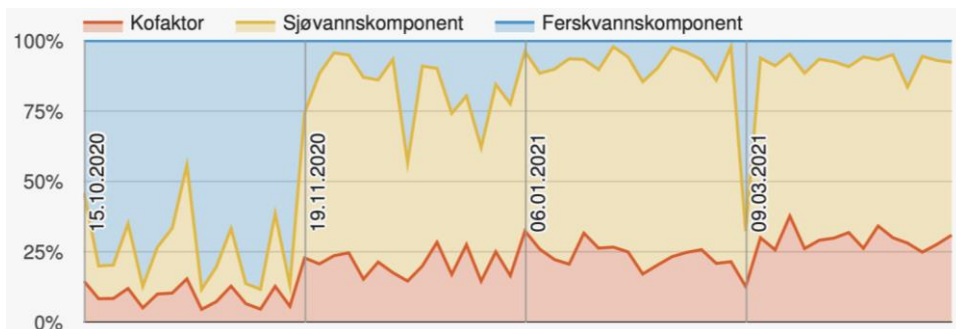
Figur A6. Viser genuttrykk for saltvannsATPase, ferskvannsATPase og kofaktor for kar nr 112 (fotoperiode). Kofaktor regnes som innenfor normalen når den er lavere enn 20 %.



Figur A7. Viser genuttrykk for saltvannsATPase, ferskvannsATPase og kofaktor for kar nr 101 (saltfôr). Kofaktor regnes som innenfor normalen når den er lavere enn 20 %.



Figur A8. Viser genuttrykk for saltvannsATPase, ferskvannsATPase og kofaktor for kar nr 105 (saltfôr). Kofaktor regnes som innenfor normalen når den er lavere enn 20 %.



Figur A9. Viser genuttrykk for saltvannsATPase, ferskvannsATPase og kofaktor for kar nr 108 (saltfôr). Kofaktor regnes som innenfor normalen når den er lavere enn 20 %.

