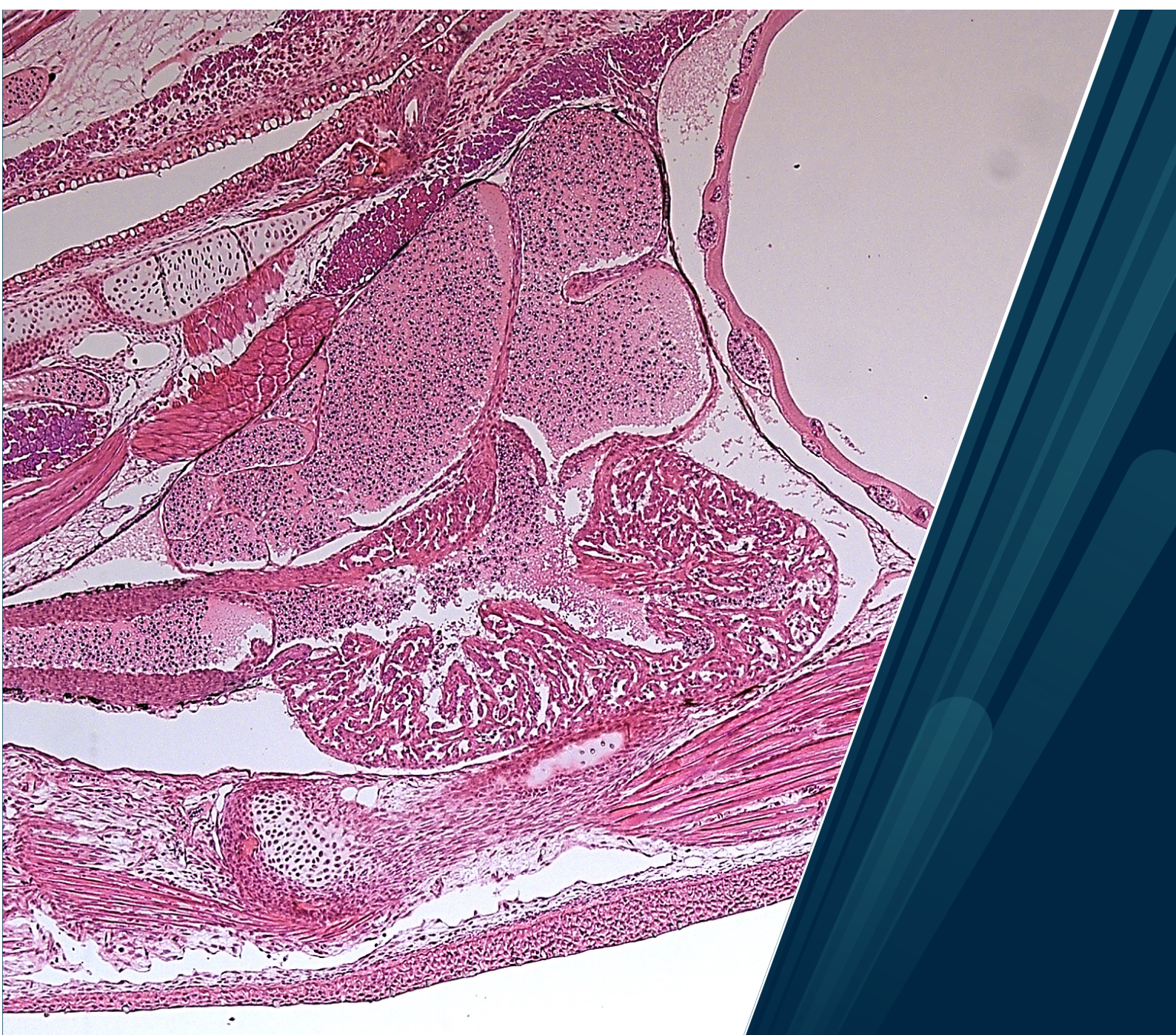


Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Norges fiskerihøgskole

Effekter av temperatur gjennom tidlig utvikling på histologi og genuttrykk i hjertet til startfôringsklar atlantisk laks (*Salmo salar* L.)

Elise Kathinka Rønningen

Mastergradsoppgave i akvamedisin juni 2020



Sammendrag

Norsk oppdrettslaks skal igjennom en intensiv produksjonsprosess som setter høye krav til fiskens helse. En robust fisk med god hjertehelse er viktig for at fisken skal tåle påkjenninger som smittepress og håndtering. Det er tidligere observert en økning i deformiteter i skjelett ved inkubasjonstemperatur i de tidlige livsstadier på over 8°C, men hvordan temperatur påvirker hjerteutvikling er ikke kjent. I dette arbeidet har man derfor undersøkt hvordan inkubasjonstemperaturer på 4°C og 8°C påvirker effekten på hjertet ved å undersøke morfologi og sammenligne hjertelaterte gener i de to temperaturgruppene.

I gjennomføring av forsøket ble rogn fordelt i to temperaturgrupper med tre replikat for hver gruppe. Eggene ble holdt ved konstant temperatur fram til klekking og videre til startføring. Like før startføring ble det gjort uttak av gruppene for analysering av histologi og genuttrykk. Dødelighet ble notert under hele forsøket, og kroppsvekt og kroppslengde ble tatt av gruppene ved prøveuttak. Resultatene viste at det var ingen signifikant forskjell i dødelighet eller lengde mellom temperaturgruppene. Vekten var signifikant høyere ved inkubasjonstemperatur på 4°C enn ved 8°C.

Histologi av hjertet ble undersøkt ved bruk av fikseringsmediumet PAXgene Tissue Fix, og som en forutsetning for videre analyser ble HE-farget vev fiksert på PAXgene sammenlignet med HE-farget vev fiksert på formalin. Resultatene viste en betydelig forskjell ved morfologisk uttrykk med forandringer i enkelte vev som kan knyttes til autolyse. Hjertet ble vurdert som intakt og det ble derfor besluttet å gå videre med analyseringen. Ventrikkelareal, bulbusbredde og compactum tykkelse ble målt for en semi-kvantitativ analyse. Resultatene viste ingen signifikant forskjell mellom gruppene.

Det ble gjennomført qPCR for genuttrykk av utvalgte gener sentral i hjerteutvikling og funksjon. Disse genene inkluderer Nppa, GATA, troponin, MEF2, MYBPC, NXK2.5 og VEGF. Resultatene viste ingen signifikant forskjell mellom gruppene i uttrykk av GATA, troponin, MEF2, MYBPC, NXK2.5 og VEGF. Det var en svak, men signifikant oppregulering av Nppa i gruppe 4°C, noe som kan indikere et stressindusert uttrykk.

Forord

Denne masteroppgaven var et delmål i prosjektet “The effect of light and temperature on the development of Atlantic salmon (Salmo salar) from fertilization to first feeding”. Prosjektet var ledet av PhD-stipendiat Marie Emilie Bue, og ble utført ved Universitetet i Tromsø og Havbruksstasjonen i Tromsø AS, Kårvika. Oppgaven ble påbegynt februar 2019 og avsluttet juni 2020.

Jeg ønsker å rette en stor takk til min hovedveileder Helge Tveiten ved UiT for tildelingen av oppgaven, og for god veiledning. Takk til biveileder Tore Seternes for at du alltid deler av din kunnskap og erfaringer, og er raus med din egen tid. Jeg ønsker også å rette en takk til PhD-stipendiat Marie Emilie Bue som har introdusert meg for forskningen. Du er ekstremt dyktig, grundig og klok, og har inspirert meg mye i arbeidet med prosjektet. Ønsker deg masse lykke til videre i fiskebiologiens verden. Takk til overingeniør Dhivya Borra Thiyagarajan ved Norges Fiskerihøgskole for all hjelp på laboratoriet, og til Fride Tønning for utlån og opplæring av histologisk utsyr.

Takk til min søster for korrekturlesing og grubling over matematikkens store mysterium. Og min samboer som står rak i ryggen og holder koken hjemme. Stor klem til hunden min som lot være å spise på veggene i en tid med mindre aktivitet og oppmerksomhet.

Sist, men ikke minst, ønsker jeg å takke for en flott studietid hvor jeg har blitt kjent med mange fine og unike medstudenter. Særlig vil jeg nevne Harald og Elisabeth for flere fantastiske turer med gode minner og opplevelser. Håper vi får videreført tradisjonen også etter studietiden.

Tromsø, juni 2020

Elise Kathinka Rønningen

Sentrale begreper		Forkortelser	
Morfologi	Oppbygging og form på vev, organer og individer	RNA	Ribonukleinsyre
Sagittal	Lengdesnitt av en hel eller deler av en organisme	cDNA	Komplementær DNA
Ligand	Kompleksforbindelse	Ct	«Cycle threshold value»
Indusere	Påvirkning til økt effekt	HE	Hematoksylin & eosin
Autolyse	Selvfordøyelse av celler og vev	ANP	«atrial natriuretic peptid»
Teleostei	Underklasse i kl. Strålefinnede fisker (<i>Actinopterygii</i>)	RTK	«Reseptor Tyrosin Kinaser»
Hypertrofi	Hver enkelt celle øker i størrelse, mens antall celler er uforandret	RBC	Røde blodceller
Hyperplasi	Celler som øker i antall	Nppb	Gen som koder for «Brain Natriuretic Peptide»
Cranial	Indikerer mot kraniet		
Ventral	Indikerer nedover eller mot buk.		

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	II
Forord.....	IV
1 Innledning	1
1.1 Norsk oppdrettsnæring.....	1
1.2 Atlantisk laks	1
1.3 Fra rogn til startfôringsyngel i oppdrett	2
1.4 Hjertets anatomi	2
1.5 Temperaturinduserte deformiteter	3
1.6 Temperatureffekter på hjertet	3
1.7 Gener involvert i hjerteutvikling og funksjon.....	5
1.7.1 Nppa.....	5
1.7.2 GATA4	5
1.7.3 Troponin T	5
1.7.4 MEF2C.....	6
1.7.5 MYBPC3.....	6
1.7.6 NKX-2.5.....	6
1.7.7 VEGF	6
1.8 Problemstilling.....	8
2 Material og metode	9
2.1 Valg av temperaturer.....	9
2.2 Forsøksfisk.....	9
2.3 Uttak av organer og fiksering av vev	11
2.4 Lengde og vekt.....	12
2.4.1 Lengde.....	12
2.4.2 Vekt.....	13
2.5 Histologi.....	13

2.5.1	Fremføring	13
2.5.2	Innstøpning	14
2.5.3	Snitting.....	14
2.5.4	HE-farging	15
2.5.5	Måling av hjerter.....	17
2.5.6	Utregning av hjertemålinger	18
2.5.7	Vurdering av autolyse forårsaket av fikseringsmedium	19
2.6	Genetikk.....	19
2.6.1	RNA-isolering.....	19
2.6.2	DNasebehandling	20
2.6.3	cDNA-syntese	20
2.6.4	Real-time qPCR	22
2.6.5	Analysering av resultater	25
2.6.6	Dataanalysering.....	26
3	Resultater	27
3.1	Dødelighet.....	27
3.2	Lengde og vekt.....	27
3.3	Målinger av hjerte	29
3.4	Morfologi av hjertet til yngel av atlantisk laks	30
3.5	Seriesnitt av hjertet	32
3.6	Utrykk av gener relatert til hjerteutvikling	33
3.7	Autolyse forårsaket av fikseringsmedium	34
3.7.1	Hjerte.....	34
3.7.2	Røde blodceller	36
3.7.3	Tarm.....	37
3.7.4	Gjeller	39
3.7.5	Oppsummering av forandringer	40

4	Diskusjon	42
4.1	Dødelighet.....	42
4.2	Effekter av temperatur på vekst	42
4.3	Effekter av temperatur på hjertemorfologi	43
4.3.1	Målenøyaktighet	44
4.3.2	Hjerteanatomi hos startfôringsklar yngel.....	44
4.4	Utrykk av gener i hjertet	45
4.5	Fikseringsmedier.....	46
4.5.1	Hjerte.....	46
4.5.2	Røde blodceller	46
4.5.3	Tarm.....	47
4.5.4	Gjeller	47
4.5.5	Forandringer ved ulikt fikseringsmedium.....	48
5	Konklusjon.....	49
	Litteratur	50
	Vedlegg I.....	56
	Vedlegg II	57

1 Innledning

1.1 Norsk oppdrettsnæring

Siden oppstarten på 1970-tallet har norsk oppdrettsnæring hatt en enorm vekst i produksjon og økonomi. I 2018 viste næringen til et samlet resultat på 23,6 milliarder kroner før skatt (Fiskeridirektoratet, 2019). Rekordåret for norsk oppdrettsnæring var et resultat av høye laksepriser, men likevel har næringen stagnert i utviklingen av produsert biomasse de siste årene (Fiskeridirektoratet, 2020). For å opprettholde en god vekst og bærekraftig næring er det viktig å finne faktorene som bidrar til å effektivisere produksjonen og opprettholde god dyrevelferd. Lenge har det vært kjent at oppdrettere av laks sliter med høy dødelighet. Tall fra fiskehelse rapporten publisert i 2018 viser til en dødelighet på 14,7% etter at fisken har kommet i sjø (Fiskehelse rapporten, 2018). I tillegg til påvisningsdyktige sykdommer er det rapportert om hjertebetennelser som av ukjent årsak antas å være viktige komponenter som bidrar til uforklarlig dødelighet og dødelighet under håndtering (Fiskehelse rapporten, 2017). Det er viktig å øke forståelsen for den sammensatte årsaken som dødelighet i oppdrett omfatter. Både når det gjelder sykdom og smittespredning, men også metode og oppdrettsforløp.

1.2 Atlantisk laks

Atlantisk laks (*Salmo salar*) tilhører gruppen teleoster. Den er en anadrom fiskeart som er utbredt i det nordlige Atlanterhavet. Som anadrom fiskeart lever laksen sine tidlige livsstadier i ferskvann, før den migrerer til havet på leting etter næringsrik mat. Etter to til tre år i havet kommer den gyteklare laksen tilbake til elva på senhøsten. Eggene utvikler seg i grusen hvor de har tilgang på frisk og oksygenrikt vann, før de klekker på senvinteren (Saltveit & Brabrand, 2013). Den atlantiske laksen regnes som heteroterm, som betyr at omgivelsestemperaturen påvirker vevets fysiologiske prosesser. Tiden det tar for et lakseegg å bli ferdig utviklet er temperaturavhengig baserer seg på antall døgngrader (d°C), og vi regner med at det tar omlag 500 d°C fra befruktning til nyklekt lakselarve (Gorodilov, 1996). Dette vil si at ved en konstant temperatur på 8°C tar det omlag 63 dager fra befruktning til klekking. I naturen foregår en stor del av embryonalutviklingen ved en gjennomsnittstemperatur på 2-3°C (Saltveit & Brabrand, 2013).

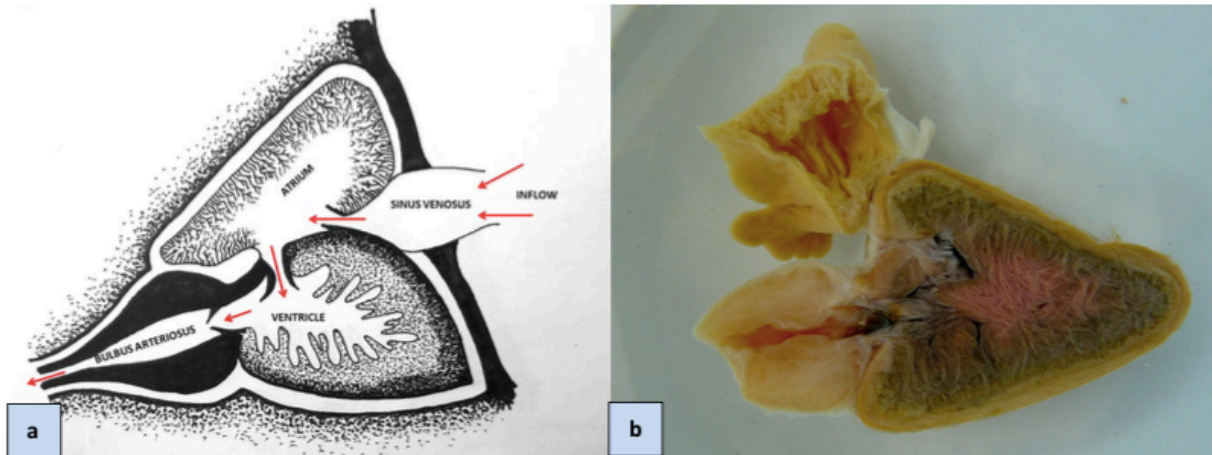
1.3 Fra rogn til startfôringsyngel i oppdrett

Oppdrett av laks starter med rogn som befruktes og inkuberes til øyerogn i stamfiskanleggene. Inkubasjonstemperaturen varierer, men standarden er aldri over 8°C for diploid fisk, da det erfaringsmessig er kjent med økt antall tilfeller av skjelletdeformiteter (Rosten, Åtland, Kristensen, Rosseland, & Braathen, 2004). Ved stadiet øyerogn transporteres rogn til settefiskanleggene (Benchmark Genetics, n.d.). Transporttemperaturen er vanligvis i området 2-5°C, noe som også bør holdes ved mottak. Når rogn er innlagt i klekkeriet bør vanntemperaturen justeres sakte til ønskelig temperatur. Dette innebærer en øknings-temperatur på 1°C per døgn, men ikke over 3°C per døgn. Dette gjelder også ved temperaturjusteringer for å manipulere klekketidspunkt og klargjøring for startfôring. Ved klekking rundt 500 d°C bør plommeseckyngelen holdes i en temperatur fra 2-8°C. Når yngelen nærmer seg startfôring økes temperaturen opp til 10°C over en periode på 10-14 dager for god vekst og appetitt ved overføring.

1.4 Hjertets anatomi

Laksen er en aktiv fisk og bygd for eksplosiv bevegelse. Dette er en tilpasning til det karnivore kostholdet hvor kroppen må kunne manøvreres raskt etter byttedyr. En slik livsstil krever at muskulaturen består av en stor andel eksplosive hvite muskelfibre, og en mindre andel røde utholdende muskelfibre, som en tilpasning til laksen levemåte. Hjertet er også anatomisk og morfologisk tilpasset en aktiv livsstil. Aktive fiskearter som salmonider har et pyramidal-formet hjerte som normalt henger sammen med stor pumpekapasitet i hjertet (Viegas, Carvalho, Pardal, & Jone, 2012), samt har et tykkere, kompakt myocard (compactum) i ventrikkelen (Icardo, 2012). Myocardet består av myocytter, hjertets muskelceller, som med aksjonspotensial sørger for sammentrekning av hjertet (Gillis, 2011).

Hjertets viktigste funksjon er å pumpe friskt, oksygenrikt blod ut til cellene i vevet og tilbakeføre oksygenfattig blod for reoksygenering i gjellene (T. Poppe et al., 2004). Laksens hjerte består av fire kamre: sinus venosus, atrium, ventrikkel og bulbus arteriosus. Disse ligger etter hverandre i en S-form omgitt av perikardialhulen som ved septum transversum skiller hjertet fra de omliggende organene (figur 1)(Farrell & Pieperhoff, 2011; Kryvi, Harald, Poppe, 2016b). Ventrikkelen hos aktive laksefisker består, som tidligere nevnt, av compactum som omkranser det indre laget spongiosum. Spongiosum bukter seg med mange indre hulrom og gir stort pumpevolum (Farrell & Pieperhoff, 2011).



Figur 1: Normalanatomi av laksehjerte. A) skjematisk oversikt av de fire hjertekamre. B) Gjennomskåret formalinfiksert villakshjerte. Gjengitt fra Veterinærinstituttet v/ T. Poppe (Garseth, Svendsen, Fritsvold, & Mikalsen, 2017).

1.5 Temperaturinduserte deformiteter

Temperatur er en viktig faktor for utvikling av beinfisk. Økt temperatur øker enzymaktiviteten, gir en raskere utviklingsrate og redusert tid til klekking. Motsatt vil en lavere temperatur redusere enzymaktivitetene og gi lengre tid til klekking (Pavlov, 1984). Tidligere forskning har vist at inkubasjon ved lavere temperaturer gir økt vekt like før startfôring (Ojanguren, Reyes-Gavilán, & Rodríguez Muñoz, 1999).

Det er altså tydelig at temperatur påvirker utviklingen av beinfisk. Samtidig har det lenge vært rapportert om deformiteter i skjelett hos oppdrettet atlantisk laks. Dette er ikke bare et velferdsproblem, men svært deformerte laks vil kommersielt sett også få en lavere gradering med påfølgende økonomisk tap. I oppdrett har man sett at forekomsten av slike deformiteter har økt ved høy temperatur i settefiskfasen. Forsøk som er blitt gjort knyttet til problematikken bekrefter at fiskegrupper med høyere temperatur (10°C) ga en markant økt forskjell i skjelettdeformiteter i motsetning til grupper med lavere temperatur (6°C) (T. W.K. Fraser, Hansen, Fleming, & Fjellidal, 2015).

1.6 Temperatureffekter på hjertet

Noen fiskearter opplever store temperatursvingninger i sitt naturlige habitat (Keen, Klaiman, Shiels, & Gillis, 2017). For laksen er det ikke uvanlig at temperaturen varierer opp til 20°C i løpet av året (Jørgensen et al., 2014). Fisken kan respondere på temperatursvingningene ved å

enten endre atferd (flytte seg til en foretrukket temperatur), akseptere, eller tilpasse fysiologien til temperaturen (Graham & Farrell, 1989). Temperaturinduserte hjertetilpasninger er vanlig hos fiskearter som holder seg aktiv gjennom de ulike sesongavhengige temperaturene, slik som laks, ørret og zebrafisk (Keen et al., 2017).

Innen fiskeriforskning og humanstudier er zebrafisk (*Dania rerio*) en veletablert forskningsmodell (Sprague, 2006), hvor tidligere studie har vist at temperaturen påvirker svømmeferdighet, lengde på bulbus, samt ventrikkelform hos zebrafisk hanner, også lenge etter normalisering av temperaturen (Dimitriadi, Beis, Arvanitidis, Adriaens, & Koumoundouros, 2018). En slik temperaturindusert hjerteforandringen hos hannkjønnet zebrafisk har vist seg å være forårsaket av kjønnehormonet 11-ketotestosteron (Franklin & Davie, 1992).

Det skjer også akutte temperaturinduserte påvirkninger på hjertet hos vertebrater. Eksempelvis har det vist seg at økt vanntemperatur påvirker den atlantiske torskens (*Gadus morhua*) hjertefrekvens (Gollock, Currie, Petersen, & Gamperl, 2006). Dette kan forklares med at cellenes oksygenforbruk økes ved økt temperatur, mens hemoglobin-oksygenbindingen avtar ved samme stimulans. En slik ubalanse i de metabolske prosessene gir et økt stress, hvor fisken kompenserer med økt gjelle- og hjertefrekvens (Portz, Woodley, & Cech, 2006). Et annet forsøk på atlantisk torsk viste at larver inkubert ved 8°C hadde en deformert morfologi av arterier, og uttrykket av MEF2 varianter var betraktelig høyere enn larver inkubert ved 4°C (Torgersen, Takle, & Andersen, 2010).

Temperaturforsøk gjort på regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) viste at lave temperaturer økte hjertes slagstyrke (Graham & Farrell, 1989). Det ble spekulert i om årsaken var økt stress på hjertet forårsaket av lav temperatur som øker viskositeten i blodet. Det kan tenkes at et viskøst blod vil være tyngre å pumpe gjennom sirkulasjonssystemet og dermed gi kraftigere kontraksjoner som over tid bygger opp viktige komponenter i hjertet. Likevel viser litteraturen at kalde temperaturer reduserer også Ca^{2+} fluksen i ionekanalene lokalisert i myocytene (Keen et al., 2017), noe som kan redusere pumpekraften i hjertet. Hvordan temperaturer påvirker hjertet virker derfor å være kompleks. Forsøk med fisk holdt ved lave temperaturer har vist seg å øke hjertets masse som et resultat av hyperplasi og hypertrofi av myocytene (Gamperl & Farrell, 2004; Graham & Farrell, 1989). Noe som bekreftes av annen forskning som viser at ventrikkelmassen hos voksen regnbueørret på lave temperaturer er betydelig større enn hos fiskegrupper på høy temperatur (Klaiman, Fenna, Shiels, Macri, &

Gillis, 2011). Disse gruppene ga et tynnere kompakt lag og tykkere spongiøst lag ved lave temperaturer, og motsatt ved høyere temperaturer.

Tidligere observasjoner fra norsk lakseoppdrett viste parr og smolt med redusert vekst, unormal atferd og tegn til sirkulasjonssvikt. Ved obduksjon var det tegn på fettavleiring rundt hjertet og redusert ventrikkelmasse sammenlignet med frisk fisk, og de histologiske undersøkelsene viste økte mengder melanomakrofager og inflammasjon i ventrikkelen. Årsaken var ikke kjent, men et høyt antall deformerte fisk fra samme populasjon indikerte forhøyet temperatur under embryogenesen (T. T. Poppe & Taksdal, 2000).

1.7 Gener involvert i hjerteutvikling og funksjon

1.7.1 Nppa

Nppa er et gen som koder for «Atrial natriuretic peptid» (ANP). Dette er et viktig hormon som skilles ut fra hjertet og gir økt utskillelse av natrium i nyrene for å redusere trykket i den ekstracellulære væsken. Nppa uttrykkes tidlig i den embryoniske utviklingen og er derfor en god markør for hvor fungerende myokardet er i den tidlige fase (Houweling, Van Borren, Moorman, & Christoffels, 2005). Nppa har vist en signifikant oppregulering ved lave temperaturer på zebrafisk (Dimitriadi et al., 2018).

1.7.2 GATA4

GATA4 er et viktig gen for endoderm utvikling av en rekke organer hos fisk. Disse inkluderer kjønnsorganer, lever, tarmsystem og hjerte (Li et al., 2012). Embryoer av zebrafisk med mangel på GATA4 har vist en fraværende morfogenese i dannelsen av hjertet (Holtzinger & Evans, 2006).

1.7.3 Troponin T

Hjarterelatert troponin består av et kompleks på tre proteiner. Disse tre inkluderer kalsiumbindende (Ca^{2+}) troponin C, inhiberende troponin I og tropomyosin-bindende troponin T. Komplekset regulerer actomyosinens kryssbindings-interaksjoner ved hjelp av Ca^{2+} . Dette medierer sammenhengen mellom kontraksjon og avspenning av hjertet (Gordon, Homsher, & Regnier, 2000). Ca^{2+} er viktig for initiering og regulering av sammentrekningene i tverrstripet muskulatur. Aksjonspotensialet hos pacemakerceller i hjertet forårsaker en depolarisering av membranene i myocyttene i hjertet. Dette fører til at Ca^{2+} kanalene åpner seg og gir en Ca^{2+} innstrømming som samhandler direkte med myofilamentene (Keen et al., 2017). Studier har

vist at det er en direkte sammenheng mellom temperatur og Ca^{2+} avhengig ATPase-aktivitet, men det er usikkerhet rundt hvordan troponin-komplekset blir påvirket (Churcott, Moyes, Bressler, Baldwin, & Tibbits, 1994).

1.7.4 MEF2C

MEF2C er en transkripsjonsfaktor i MEF2-familien. Disse genene binder til en konservert A-T (Adenin-Tymin) rik sekvens som er assosiert med de fleste genene knyttet til hjertemuskelatur (Lin, Schwarz, Bucana, & Olson, 1997). MEF2C styrer også utviklingen av chondrocytter i beinvev. Temperaturforsøk på laks viste en sammenheng mellom høy temperatur, utvikling av beinvevsdeformiteter og oppregulering av MEF2C (Ytteborg, Baeverfjord, Torgersen, Hjelde, & Takle, 2010). Et annet studie undersøkte gener knyttet til hjerte ved ulike svømmeregimer på laks hvor høy-intensitets trening ga en betydelig oppregulering av MEF2C (Castro et al., 2013).

1.7.5 MYBPC3

MYBPC3 er et gen som koder for dannelsen av «cardiac myosin binding protein C» (cMyBPC). cMyBPC er et isoform av MyBPC, hvor MyBPC er et protein som ligger på overflaten av det tykke filamentet i tverrstripet muskulatur. Oppregulering av MYBPC3 virker å ha en sammenheng med hypertrofisk kardiomyopati (fortykket hjertemuskelatur). Proteinet spiller også en viktig rolle i den strukturelle- og regulatoriske styringen av hjertemuskelaturen (Flashman, Korkie, Watkins, Redwood, & Moolman-Smook, 2008).

1.7.6 NKX-2.5

NKX-2.5 er et gen som finnes hos en rekke arter. Hos vertebrater har den betydning for utvikling av normal hjertestruktur (V. George, Colombo, & Targoff, 2015). NKX-2.5 er et medlem i en familie av transkripsjonsfaktorer som benytter seg av protein svært likt proteinet «*Drosophila tinman protein*», et protein som er viktig i dannelsen av dorsalåren til insekter. Mutasjoner på genet er blant de vanligste genetiske årsakene til medfødte hjertesykdommer hos mennesker (Bartlett, Veenstra, & Weeks, 2010). Hos vertebrater vil slike mutasjoner gi unormale hjerteformasjoner.

1.7.7 VEGF

«Vascular endothelial growth factor» (VEGF) er en familie av polypeptider med en konservert reseptorbinding og en cytinknute-struktur (løkker av tre disulfidbindinger) (Holmes & Zachary, 2005). VEGF danner ligander med «reseptor tyrosin kinaser» (RTK)

som finnes i endotelcellene. Disse stimulerer videre til blant annet blodåredannelse. RTK-signaler er svært viktige gjennom hele den tidlige utviklingen, inkludert gastrulasjon og vevs- og organdannelse (Mohammadi & Zinkle, 2018). VEGF molekyler finner vi hos blant annet pattedyr, men også enkle virvelløse dyr.

1.8 Problemstilling

Norsk oppdrettsnærings er preget av høye dødelighetstall og en krevende produksjonsprosess hvor stress og fysiske påkjenninger påvirker velferden (Fiskeridirektoratet, 2018). Dette krever en sterk og robust laks med god helsestatus. Ved oppdrett av laks blir det i dag benyttet en maks inkuberingstemperatur på 8°C i kontinuerlig mørke. Dette har vist seg å være en terskeltemperatur hvor inkubering over dette gir økt grad av deformiteter i skjelett (Rosten et al., 2004).

Påvirkningen temperatur har på hjerteutvikling ved tidligere livsstadier er ikke avklart enda. Oppgavens hovedmål er derfor å studere effekten av to ulike temperaturer gjennom tidlig utvikling på hjertet til startfôringsklar atlantisk laks.

Delmål:

1. Undersøke effekten av to temperaturer gjennom tidlig utvikling på dødelighet, vekt og lengde.
2. Undersøke effekten av to temperaturer gjennom tidlig utvikling på hjertets morfologi ved hjelp av histologiske undersøkelser.
3. Undersøke effekten av to temperaturer gjennom tidlig utvikling på utvalgte gener sentrale i utviklingen av hjertet ved hjelp av qPCR.

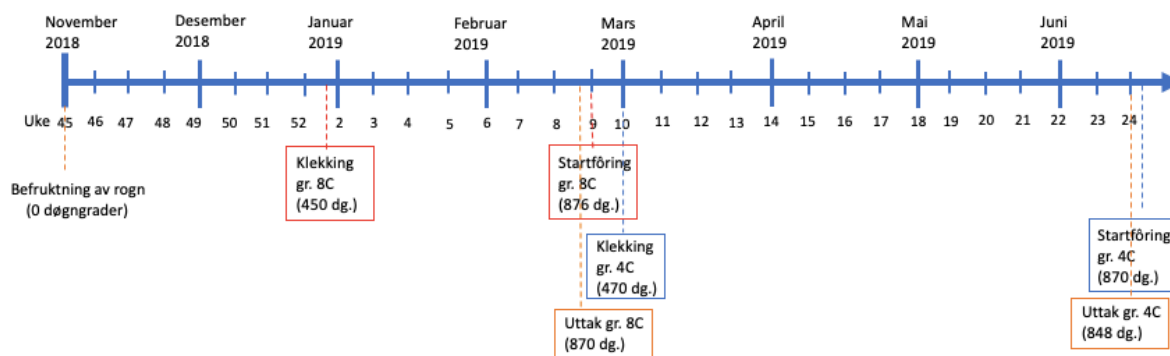
2 Material og metode

2.1 Valg av temperaturer

Ved oppdrett av laks i dag blir det benyttet en maks inkubasjonstemperatur på 8°C, der temperaturer over dette har gitt økt grad av skjellettdeformitet (Thomas W K Fraser, 2014). Den høyeste temperaturen i dette forsøket ble derfor satt til 8°C for å undersøke om dagens inkubasjonstemperatur påvirker hjertet til startfôringsklar atlantisk laks. Den laveste temperaturen ble satt til å være 4°C. Bakgrunnen for avgjørelsen var at 4°C er nærmere temperaturen laksen opplever i naturen, samtidig som forsøket var gjennomførbart med tanke på utviklingshastighet og døgngrader.

2.2 Forsøksfisk

Forsøket ble gjennomført ved Havbruksstasjonen i Tromsø AS (Kårvika). Rogn og melke ble levert fra leverandøren Salmobreed Salten AS, fraktet på is og målt til 2°C ved ankomst. Forsøket var basert på en helsøkengruppe for å minske sannsynligheten for genetisk påvirkning. Etter ankomst ble melk og rogn varmet sakte opp til 6°C og befruktet. Forsøket disponerte totalt 6 inkubatorer, hvor halvparten (totalt 3 stykk) holdt en vanntemperatur på 4°C og den andre halvparten av inkubatorene (totalt 3 stykk) holdt en vanntemperatur på 8°C. Etter befruktning ble det overført omlag 800 egg til hver av inkubatorene, som da gav totalt tre replikater i hver temperaturgruppe. Under hele forsøket ble rogn og larver inkubert uten påvirkning av lys. Røkting foregikk hver dag der døde rogn og larver ble plukket ut med pipette. Under røktingen ble det benyttet hodelykt med svakt rødt lys. Replikatene var under hele forsøket koblet på samme streng (vanntilførsel) og hadde derfor like temperaturvariasjoner. For å sikre stabil og god vanngjennomstrømming ble det jevnlig skiftet partikkelfilter. Like før startfôring, ved ca. 850 d°C, ble det gjennomført uttak av yngel. Grunnet ulik utvikling av de to temperaturgruppene ble uttakene utført på forskjellige tidspunkt (se figur 2).



Figur 2: Tidslinje for forsøk med to grupper på 4°C og 8°C. Uttak ble gjennomført rundt 850 døgngrader.

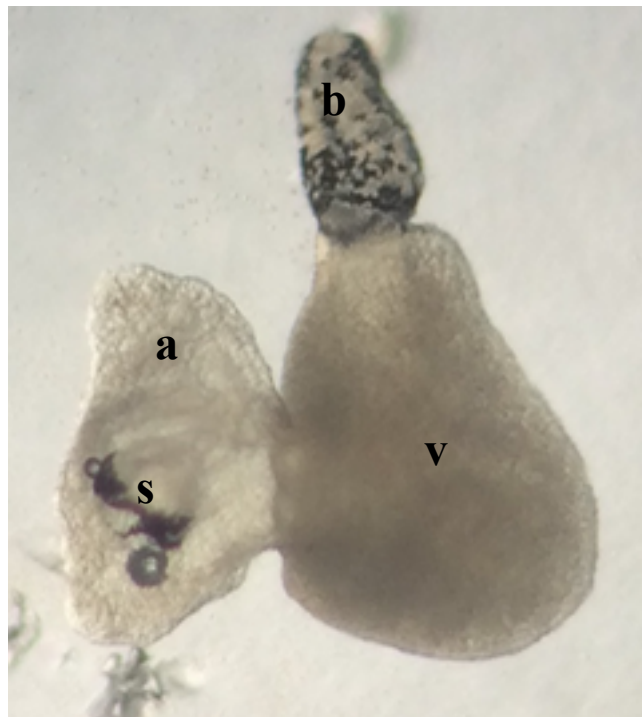
Ved uttaket ble den startfôringsklare yngelen fiksert på RNAlater™ Stabilization Solution (ThermoFisher Scientific, U.S), formaldehyd 4% (formalin) (Sigma-Aldrich, Tyskland) og PAX gene Tissue System (PAXgene) (PreAnalytiX, Qiagen, Sveits). Antallet fisk fra hvert replikat vises i tabell 1.

Tabell 1: Oversikt over antall fisk tatt fra ulike inkubatorer for hver av gruppene.

Temperatur	Inkubator nr.	PAXgene	Formalin	RNAlater
4°C	10	5	-	5
	11	12	10	10
	12	20	20	15
Totalt antall:		37 stykk	30 stykk	30 stykk
8°C	7	5	-	5
	8	7	-	7
	9	20	15	15
Totalt antall:		32 stykk	15 stykk	27 stykk

2.3 Uttak av organer og fiksering av vev

Fisken ble avlivet overdose av benzokain i avløpsvann med lik temperatur som de var inkubert med. Konsentrasjonen av benzokain var 100g/L etanol fortynnet videre 2.5 mL/L avløpsvann. Etter avlivning ble de umiddelbart nummerert og lagt på is. De ble deretter lengdebestemt, før de ble lagt på rør med PAX gene Tissue System (PreAnalytiX, Quagen, Sveits) og formalin (Sigma-Aldrich, Tyskland) for histologisk framstilling. For både formalin og PAXgene gjaldt forholdet 1:10 for vev og fikseringsmedium. Hjerter ble også dissekert ut og overført til rør med RNAlater™ Stabilization Solution (ThermoFisher Scientific, U.S). Se figur 3 for mikroskopisk bilde av hjerte. Rørene ble deretter satt i kjøleskap for fiksering i minimum 24 timer før de ble oppbevart i fryser ved -20°C.



Figur 3: Mikroskopisk bilde av laksehjerte ved 848 d°C. Ufiksert og makroskopisk hadde samtlige hjerter i forsøket en størrelse på 1 millimeter. b; bulbus, v; ventrikkel, a; atrium, s; sinus venosus.

Fiksering av vev er en prosess der målet er å unngå autolyse, bakteriell nedbrytning eller cellulære prosesser som forekommer når vevet dør og ikke blir tilført friskt, oksygenrikt blod (S. Suvarna, Kim Layton, Christopher D. Bancroft, 2018). Fikseringstiden ble beregnet etter PAXgene-protokollen som beskriver fikseringsraten 1 mm per 30 minutt og minimum 2 timer. Fisken ble målt til å være 3 mm i hodeskallen. For å unngå underfiksering ble fisken fiksert på PAXgene Tissue Fix ved romtemperatur i 24 timer før den ble overført på PAXgene

Tissue Stabilizator og kjølt ned i fryser ved -20°C. Den formalinfikserte fisken ble oppbevart i fikseringsmediumet i kjøleskap ved 4°C fram til framføring.

2.4 Lengde og vekt

2.4.1 Lengde



Figur 4: Lakselarve på millimeterpapir. Lakselarven er fra gruppe 4°C og var 848 d°C med en lengde på 2,77 cm. Bildet viser at plommesekken var fortært og ikke lengre synlig utenfor kroppen.

Når uttaket ble gjennomført ble det tatt bilder av fisken på millimeterpapir (figur 4). Opptil 15 fisk ble lagt på millimeterpapiret ved fotografering. Disse bildene ble senere analysert i programmet ImageJ 2.0. Metoden baserer seg på måling av antall piksler i bildet. På grunn av forskjellen i avstanden fra mobilkamera til objektet vil antallet piksler variere på ulike områder i bildet. Det ble derfor målt antall piksler på en kjent avstand (1 cm) i umiddelbar nærhet til hver enkelt fisk, samt antall piksler for hele lengden til fisken. Disse data ble overført til Excel og det ble utregnet lengden i centimeter for hver enkelt fisk etter følgende formel:

$$\frac{\text{Antall piksler hel fisk}}{\text{Antall piksler 1 cm}} = \text{Lengde fisk i cm}$$

2.4.2 Vekt

Før uttaket ble de forhåndsmerkede rørene veid før fisken ble fiksert. Etter fiskene ble lagt i rørene ble de veid på nytt. Vekten per fisk ble deretter utregnet etter følgende formel:

$$Vekt_{før} - Vekt_{etter} = Vekt_{fisk}$$

Prøver med usannsynlig lav eller høy vekt indikerte feil og ble tatt vekk fra datasettet før videre analysering.

2.5 Histologi

2.5.1 Fremføring

Fremføringsmaskinen som ble benyttet var av typen Citadel 2000 (ThermoFischer Scientific, U.S). Protokollen ble gjennomført ved program A (tabell 2). I dette forsøket ble det totale prøveantallet delt i to grupper og kjørt separat i maskinen.

Tabell 2: Protokoll for fremføring av prøver ved program A i maskinen Citadel 2000 (ThermoFischer Scientific, U.S).

Beholder nr.	Innhold	Tid (time)	Hensikt
1	Empty/pass	-	-
2	Empty/pass	-	-
3	96 % EtOH	2 timer	Dehydrering
4	96% EtOH	2 timer	Dehydrering
5	100% EtOH	2 timer	Dehydrering
6	100% EtOH	2 timer	Dehydrering
7	1:1 EtOH and HistoClear	1 time	Dehydrering /klargjøring
8	HistoClear	1 time	Klargjøring

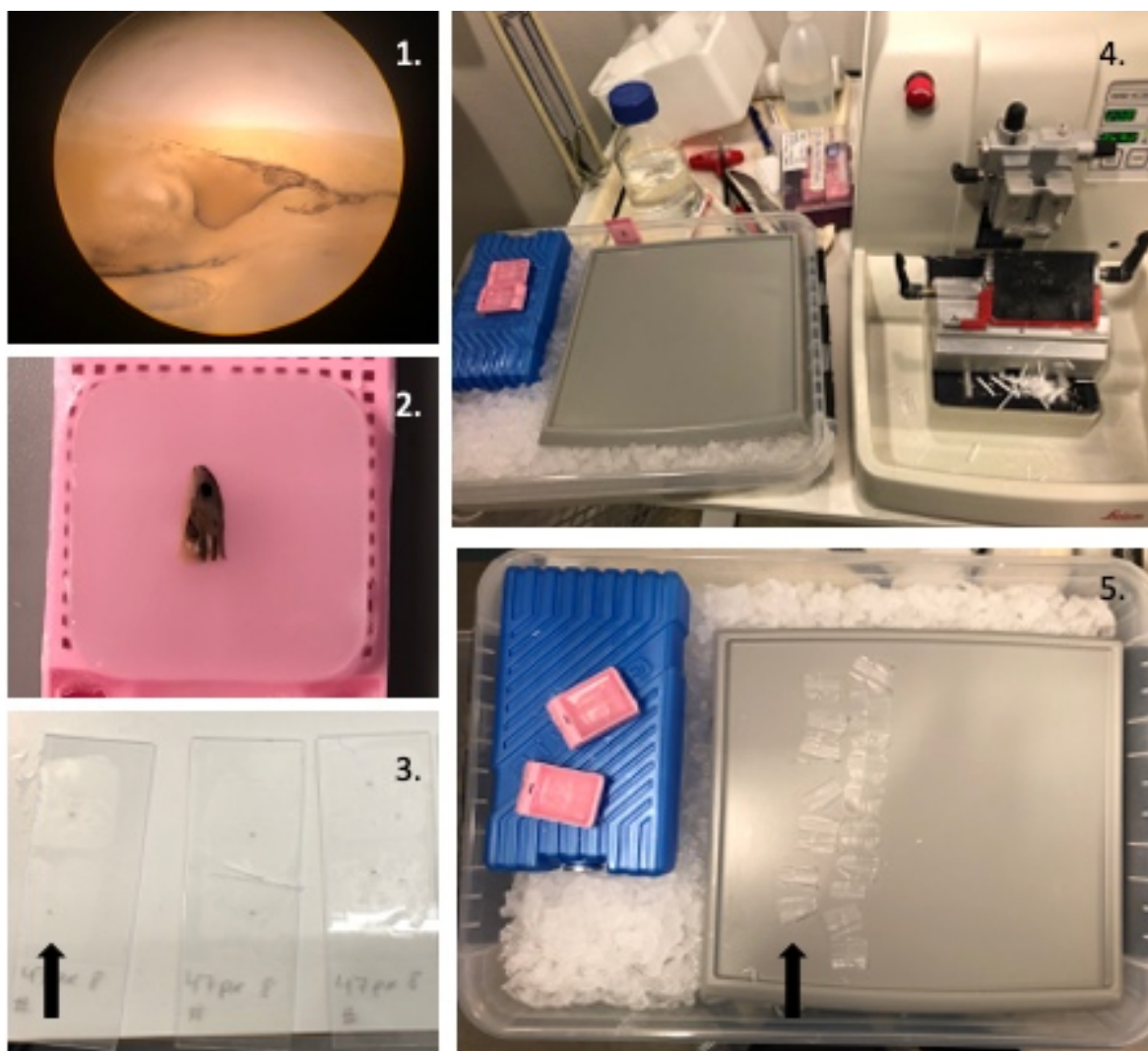
9	Histoclear	1 time	Klargjøring
10	histoclear	1 time	Klargjøring
11	1:1 histoclear og parafinvoks	1 time	Klargjøring /parafinering
12	Parafinvoks	Minimum 1 time	Parafinering

2.5.2 Innstøpning

Etter framføringen ble prøvene umiddelbart støpt inn med maskinen Leica EG1150H og Histowax (Histolab Products AB, Sverige). Fiskens bakpart ble kuttet med skalpell like bak brystfinnen, samt brystfinnene kuttet av. Bakparten ble støpt inn i egen kassett og merket likt sin respektive forpart. Forparten ble lagt på siden med buken ned og kraniet mot skrivefeltet slik at snittene senere ble sagittalorientert. Deretter ble det fylt i Histowax og plassert i korrekt posisjon. Etter innstøyping ble de kjølt ned på kjølemaskin og videre oppbevart i kjøleskap.

2.5.3 Snitting

Snitting av vevsblokkene ble gjennomført med Leica RM2255 (Leica Biosystems Division of Leica, U.S) og Feather microtomblades S35 type (pfm medical, UK). I framstillingen av disse resultatene ble det snittet seriesnitt. Hovedfokuset var å snitte i området før, under og etter bulbus. For å gjennomføre dette ble det utviklet en systematisk metode som muliggjorde det å snitte opptil 200 snitt på en blokk i korrekt rekkefølge og med riktig merking (figur 5).



Figur 5: Metode seriesnitt. 1. Mikroskopisk bilde av blokk snittet ned til hjerte med bulbus. 2. Makroskopisk bilde av blokk snittet ned til hjerte med bulbus. 3. Organisering av snitt på objektglass. Første snitt starter nederst til venstre og videre mot høyre. 4. Plate for oppbevaring av snittremser. Nedkjøling på is for å unngå smelting av parafin. 5. Organisering av snittremser på kjøleplate. Første snitt starter nederst til venstre ved pil og videre mot høyre.

2.5.4 HE-farging

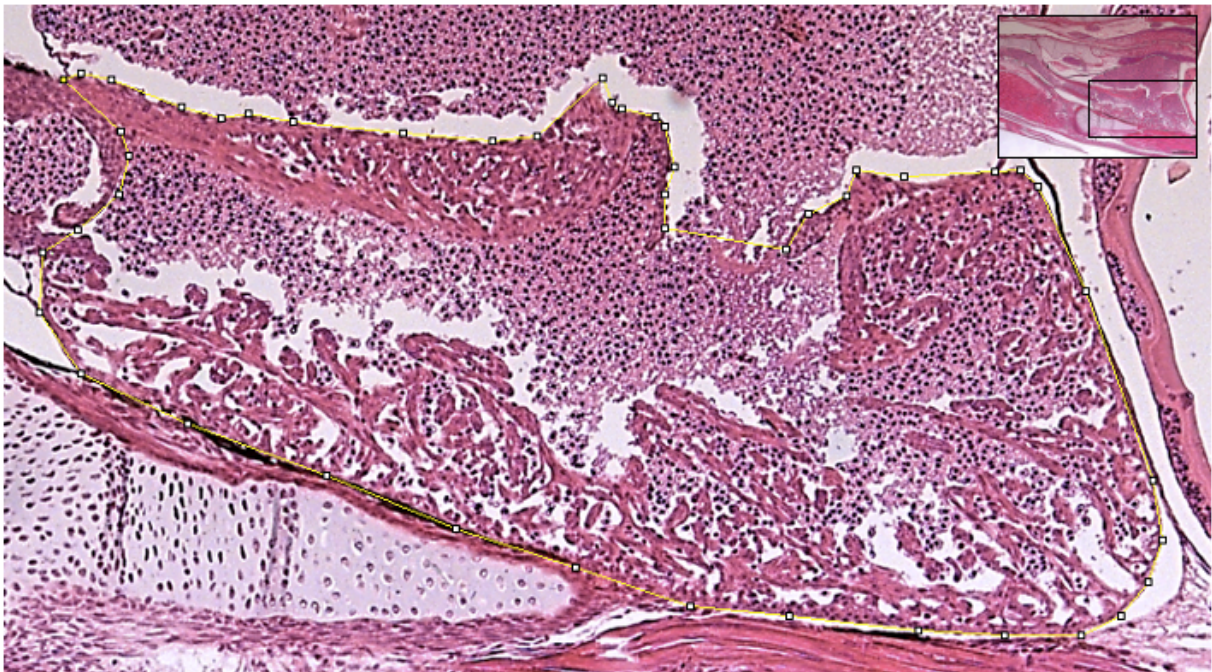
Magasinene med objektglass og snitt ble behandlet i varmeskap på 64°C over natt for avsmelting av overflødig voks. Disse ble deretter farget med metoden HE-farging (Hematoksylin & Eosin) etter standard protokoll (tabell 3).

Tabell 3: HE-farging protokoll.

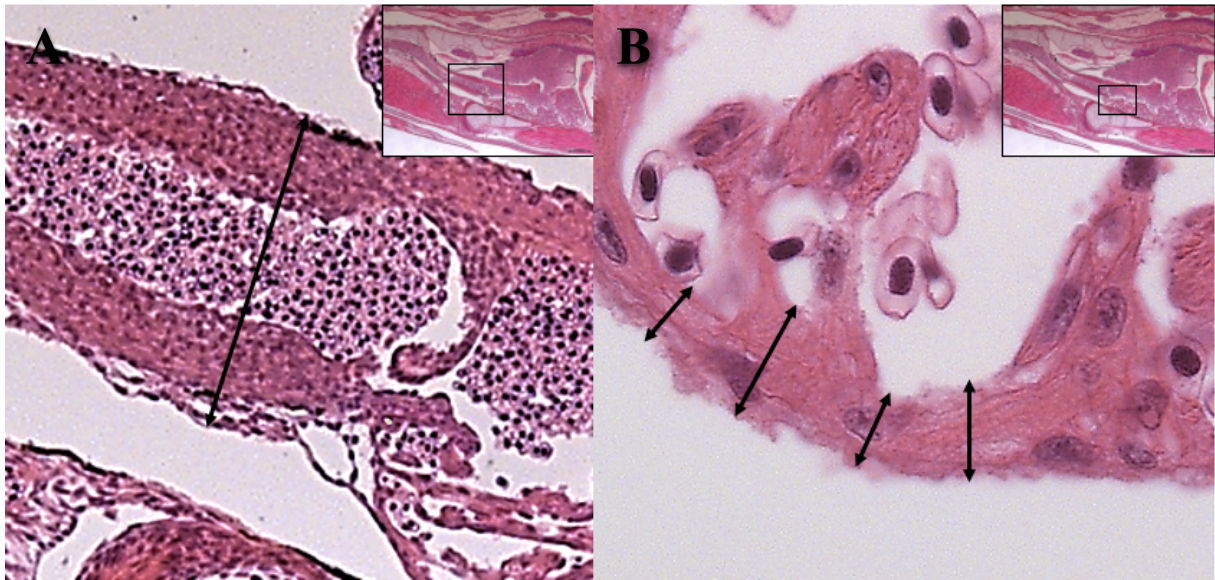
Beholder nr.	Innhold	Tid	Hensikt
1	Histoclear	Minimum 6 minutter	Deparafinering/hydr.
2	Abs. EtOH	90 sekunder	Hydrering
3-4	96% EtOH	90 sekunder	Hydrering
5	Rennende vann	90 sekunder	Vasking
6-7	Hematoxylin ¹	90 sekunder	Farging
8-9	Rennende vann	90 sekunder	Vasking
10	Eosin inst.	90 sekunder	Farging
11-12	96% EtOH	90 sekunder	Dehydrering
13-14	Abs EtOh	90 sekunder	Dehydrering
15	Histoclear	Min. 90 sekunder	Dehydrering
Total tid		Min. 27 minutter	

2.5.5 Måling av hjerter

Totalt var det 10 stykk prøver fra gruppe 4°C og 12 prøver fra gruppe 8C som var gode nok for videre analysering (se vedlegg I for oversikt over snittsamling). Årsaken til det lave antallet vellykkede prøver i forhold til totalt antall uttatte prøver, var vanskeligheter med snittemetode. I tillegg ble halvparten av prøvene ødelagt etter problemer med innstøpingsmaskinen. Siden hver prøve var snittet i seriesnitt rundt hjertet ble det valgt ut ett snitt omkring bulbus' midtområde. Dette snittet ble valgt ut på bakgrunn av snittene før og etter økte og minket på hver side. Snittene ble fotografert med kamera Leica DF7000T (Leica applications Suite X) og analysert i ImageJ 2.0. Vevsområdene som ble målt var compactum i området nedenfor bulbus (figur 7, A), bulbus (figur 7, B) og det totale ventrikkelareal (figur 6). Omlag 10 målinger ble gjort av compactum. Bulbus ble målt fem ganger, og ventrikkelarealet tre ganger.



Figur 6: Utklipp fra måling av ventrikkelareal. 5x forstørrelse.



Figur 7: Lengdemålinger av A: bulbus med 5x forstørrelse, B: Compactum med 40x forstørrelse. Pilene viser hvor lengdemålingene ble satt for hvert vevsområde.

2.5.6 Utregning av hjertemålinger

Ved bruk av programmet ImageJ kan metoden benyttet i forsøket måle antall pixler. Ved å vite en kjent lengde kan man beregne lengde og areal av en pixel. Alle bildene var stemplet ved fotografering med en lengdebar av kjent størrelse.

Lengde av en pixel blir beregnet etter følgende regel:

$$\text{Pixellengde} = \frac{\text{lengde}}{n}$$

Der *lengde* er den kjente lengden og *n* er antall målte pixler i den kjente lengden.

Tykkelsen av compactum og bulbus ble da regnet ved:

$$\text{Tykkelse} = \text{antall pixler} \times \text{pixellengde}$$

Arealet av én pixel regnes etter formelen:

$$\text{pixelareal} = \text{pixellengde}^2$$

Arealet av ventrikkelen beregnes da ved formelen:

$$\text{ventrikkelareal} = \text{antall pixler} \times \text{pixelareal}$$

For å beregne prosentvis andel compactum i ventrikkelen ble ventrikkelarealet satt inn i en sirkelkalkulator (www.kalkuler.com) som beregnet radius. Ved bruk av radius og compactum tykkelse ble det beregnet et indre og ytre sirkelareal ved formelen:

$$\text{sirkelareal} = \pi r^2$$

Radiusen for den indre sirkelen blir radius subtrahert med compactumtykkelsen. Trekker man den indre sirkelen fra den ytre vil man få totalarealet av compactum. Prosentvis andel compactum i ventrikkelen regnes med formelen:

$$\text{Prosent} = \frac{\text{compactumareal} \times 100\%}{\text{ventrikkelareal}}$$

Dette er en forenklet matematisk utregning av prosentvis andel compactum, og resultatet kan derfor ikke sies å være nøyaktig.

2.5.7 Vurdering av autolyse forårsaket av fikseringsmedium

I denne oppgaven, som en del av et større prosjekt, ble PAXgene benyttet som fiksering for histologi. Dette var for å preservere både morfologi og biomolekyler. Under preparering av prøvene ble det funnet tegn på autolyse. Det ble derfor besluttet lage en subjektiv vurdering av PAXgene-fiksert fisk og fisk fiksert på formalin. Noen typer vev og celler er mer eller mindre utsatt for autolyse. I forsøket ble derfor tre typer vev som er kjent for å være utsatt for autolyse vurdert. Disse tre typer vev inkluderer røde blodceller (RBC), tarm og gjeller. I tillegg ble hjertet vurdert som en del av vurderingsgrunnlaget for videre undersøkelser. Alle undersøkte snitt var farget med HE-farging.

2.6 Genetikk

2.6.1 RNA-isolering

RNA-isoleringen ble gjennomført med TRIzol™-metoden. Hjertet ble homogenisert i et 2ml rør med en metallkule og 1000 µl TRIzol™ (ThermoFisher Scientific, U.S) i maskinen Tissue Lyser II (Qiagen, Tyskland) for oppløsning av celler og frigjøring av DNA og RNA. Lysatet ble tilsatt 500 µl kloroform på 4°C og mikset i vorex før inkubasjon i fem minutter ved

romtemperatur. Prøven ble så sentrifugert ved 12000 rpm i fem minutter ved 4°C for utskilling av ulike faser. Vannfasen ble overført til et nytt rør og tilsatt 500 µl TRIzol™ og 200 µl chloroform og blandet i vortex før inkubasjon i fem minutter ved romtemperatur. Også denne gang ble den centrifugert ved 12000 rpm i 15 minutter ved 4 °C. Vannfasen (RNA-fasen) ble pipettert til et nytt rør og tilsatt nedkjølt isopropanol på -20°C og inkubert ved -20°C i 30 minutter. Prøven ble sentrifugert ved 12000 rpm i 10 minutter ved 4°C for utfelling av RNA-pellet. Supernatanten ble pipetert og kastet, mens RNA-pelleten ble vasket ren for isopropanol med 80% etanol før den ble tørket i romtemperatur og deretter løst opp med nukleasefritt vann og inkubert på 55°C i 10 min.

2.6.2 DNasebehandling

DNasebehandlingen ble gjennomført med TURBO DNA-free™ Kit (ThermoFisher Scientific, U.S) etter leverandørens protokoll. Dette ble gjort for å rense RNAet for kontaminerende DNA og kationer. En mastermix bestående av DNase-buffer og Turbo DNase enzym ble blandet etter beregning av mengden volum av isolert RNA. Etter DNasebehandlingen ble RNAet undersøkt ved et spektrofotometer (ND-1000, ThermoFischer Scientific, U.S), for å undersøke mengden forurensende protein samt konsentrasjonen av RNA som prøven inneholder. Ideelt ønsker man verdier mellom 1,8 og så nær 2 som mulig ved et forhold av bølgelengdene A260/A280, noe som indikerer en ren prøve bestående av RNA. Dette samsvarer med verdiene i forsøket.

2.6.3 cDNA-syntese

For at de utvalgte primerne skal binde seg til genene som det undersøkes, må det isolerte RNA omgjøres til cDNA. Dette er en enzymatisk prosess som kalles revers transkripsjon (cDNA syntese), der det enkeltrådig mRNA benyttes som templat for å lage komplementært DNA (cDNA).

For å etterligne denne naturlige prosessen ble det benyttet High-capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems, U.S). Reaksjonen krever 200ng RNA, men ofte er konsentrasjonen i RNA høyere. For å få rett konsentrasjon i cDNA syntesen må hver enkelt prøve beregnes på forhånd. I reaksjonen kan det maks være 9 µL fortynnet RNA. Fortynningen blir da gjort etter følgende formler:

$$\frac{RNA(ng)/1\mu L}{200 ng} = \text{antall } \mu L \text{ konsentrert RNA}$$

Mengden nukleasefritt vann som skal tilsettes i fortynningen blir da regnet ut fra formelen:

$$9\mu L - \text{antall } \mu L \text{ konsentrert RNA} = \text{volum } dH_2O$$

Fortynningene ble deretter pipettert i brønnene på en PCR-plate sammen med resterende komponenter i kitet (tabell 4).

Tabell 4: Mengder og komponenter i High-capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems, U.S)

Komponent	Volum
200 ng fortynnet RNA og dH ₂ O	9 μ L
20x RT Buffer Mix	10 μ L
2x RT Enzyme Mix	1 μ L
Totalt:	20 μL

Brettet med ferdig fylte brønner ble så plassert i PCR maskinen (Thermal Cycler, Applied Biosystems) og kjørt på følgende program (tabell 5):

Tabell 5: Programmet cDNA-syntesen ble gjennomført ved bruk av Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Settings	Steg 1	Steg 2	Steg 3
Temperatur	37°C	95°C	4°C
Tid	60 minutt	5 minutt	∞ minutt

Etter cDNA-syntesen er cDNAet stabilt og kan oppbevares i kjøleskap i opptil en uke, men mest hensiktsmessig er det å fryse prøvene så raskt som mulig ved -20°C i tilfellet cDNAet er kontaminert av DNaser.

2.6.4 Real-time qPCR

Før tilsetningen av cDNA i qPCR-reaksjonen må cDNAet fortynnes 1:40 med nukleasefritt vann. Etter dette pipetteres det fortynnede cDNA på en MicroAmpT Fast Optical 96-well Reaction Plate (ThermoFischer Scientific, U.S) i duplikater.

På forhånd ble det laget en mastermiks bestående av FastSYBR®Green (ThermoFischer Scientific, U.S) og Forward og Reverse Primer. Mengden av denne miksen ble beregnet etter antallet brønner som ble fylt. Tabell 6 viser mengden reagens per reaksjon. Den ferdig pipetterte platen ble så kjørt i maskinen Applied biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR (ThermoFischer, U.S).

Tabell 6: Komponenter og volum i qPCR-reaksjonen.

Reagens	Volum pr. Reaksjon
Mastermiks:	
Fast Sybr Green	7.5 µL
F primer (5 µM)	2.5 µL
R primer (5 µM)	2.5 µL
cDNA	5µL
Totalt volum	15 µL

FastSYBR®Green er et fargestoff som binder seg til dobbelt-trådig DNA. Dette medfører en økt fluorescens som er proporsjonal til mengden PCR produkt som blir produsert. Dette stoffet er svært sensitiv for lyspåvirkning, og det er derfor viktig å holde mastermiksen mørkt, kjølig og være rask med å kjøre RT-qPCR etter tilsetning til cDNA. De utvalgte primerne binder seg til den spesifikke nukleinsyresekvensen og oppformeres i sykluser. Når fluorescensen øker til et nivå over den såkalte bakgrunnsstøyen kalles det terskel. Dette indikerer at også oppformeringssyklusen av cDNA har nådd dette nivået. Når antallet oppformeringssykluser stiger over terskelen kalles det terskelsyklus (Ct-verdi). En lav Ct-verdi indikerer et høyt uttrykk av genet, mens en høy Ct-verdi indikerer et lavere uttrykk.

For å beregne troverdigheten av resultatene til de utvalgte genene ble Ct-verdiene normalisert mot tre referansegener. Dette er gener som uttrykkes i alle celler og regnes som livsnødvendige for cellens eksistens og uttrykkes ideelt sett likt mellom vev over tid. Målet er å finne en intern standard som brukes for å normalisere resultatene for de genene man ønsker å studere (O. Thellin a et al., 1999). I dette forsøket er det benyttet tre ulike gener av denne typen: β -actin, EF1-a og 18S rRNA. β -actin er et protein som er involvert i cellens struktur og motilitet. Den er i familien actiner og regnes som konserverte proteiner. Dette betyr at proteinene finnes i alle typer eukaryote celler på tvers av arter, også hos vertebrater (Behera & Narayan, 2014). EF1-a er et annet referanse gen som spiller en viktig rolle i translasjon ved å katalysere GTP-avhengig binding av aminoacyl-tRNA til akseptorsetet på ribosomer, mens 18S ribosomal RNA er det strukturelle RNA for små komponenter av eukaryote cytoplasmiske ribosomer (Olsvik, Lie, Jordal, Nilsen, & Hordvik, 2005). Primere for referansegenene og de genene som ble studert presenteres i tabell 7. Primerdesignet av de utvalgte genene i forsøket ble utført av overingeniør Dhivya Borra Thiyagarajan ved Norges Fiskerihøgskole og levert fra Sigma-Aldrich.

Tabell 7: Primere benyttet i forsøket.

Primer	Gensekvens (5-3')	Aksesjonsnummer	Amplifikasjonseffektivitet (%)
b- Actin FW	CAGCCCTCCTTCCTCGGTAT	AF321836	103.14
b- Actin RW	CGTCACACTTCATGATGGAGTTG		
EF1-a FW	CGCCAACATGGGCTGG	BT059604	102.12
EF1-a RW	TCACACCATTGGCGTTACCA		
Sal-18s FW	TGTGCCGCTAGAGGTGAAATT	AJ427629	94.76
Sal-18s RW	CGAACCTCCGACTTTCGTTCT		
GATA4 FW	CCAAGAACCTCAACAAGTC	XM_014205425	84.28
GATA4 RW	GGCTCCTCTGAGTTACAA		
Troponin T FW	GGCTACTGAACTGTGGAA	XM_014166072	78.97
Troponin T RW	TCTGATGATCGCTGACTC		
Nppa FW	GATGAGAGTGAGCAACAAC	XM_014145990	88.64
nppa RW	TTGAGCCAATTCGGTCTA		
MEF2C FW	TGATGAAGAAGGCGTATGA	XM_014160851	81.5
MEF2C RW	TTGTTGGTACTGTTGAAGATG		
MYBPC3 FW	TCGTAACTCTAAGGTCTACAC	XM_014175898	93.37
MYBPC3 RW	CTCGCTTCCATCCATACT		
NXK-2.5 FW	CCCAGTACGTCCACACCCTT	XM_014213104	73.38
NXK-2.5 RW	GGAGGTCGGTAAGGCACAGT		
VEGF FW	AGACAGCCCACATACCCAAG	XM_014169157	90.35
VEGF RW	GAAGACGTCCACCAGCATCT		

2.6.5 Analysering av resultater

Ct-verdiene fra rådata justeres etter en lik terskel. Denne verdien settes på bakgrunn av den høyeste terskelverdien man har i datasettet. Årsaken til dette er for å få likt grunnlag for analysering av de ulike genene. Ct-verdiene overføres så til Microsoft Excel hvor utregningene utføres videre etter Pfaffl-metoden (Pfaffl, 1984). Se vedlegg II for oversikt over gjennomsnittlige Ct-verdier.

2.6.5.1 Beregning av primer-effektivitet

Effektiviteten til primere kan beregnes ved å lage en fortynningsserie av minst fem fortynninger og tre replikater. Ct-verdiene plottes mot logaritmen av fortynningen, noe som skal gi en lineær sammenheng. Dette vil gi en standardkurve der man kan analysere stigningstallet.

Amplifikasjonseffektiviteten beregnes ved formelen:

$$E = 10^{-1/slope}$$

Der E er amplifikasjonseffektiviteten og *slope* er stigningstallet i standardkurven.

Amplifikasjonseffektiviteten bør være nær 2, noe som gir en dobling av produkt for hver syklus. Dette samsvarer med verdiene i forsøket.

2.6.5.2 Effektivitetskorreksjon av Ct-verdiene

Det tas et gjennomsnitt av duplikatene som benyttes i videre utregninger. Ct-verdien og den beregnede amplifikasjonseffektiviteten settes inn i følgende formel for utregning av 100% effektivitet.

$$Ct_{E=100\%} = Ct \frac{\log(E)}{\log(2)}$$

Der E er amplifikasjonseffektiviteten og Ct er Ct-verdien.

2.6.5.3 Beregning av ΔCt

Et gjennomsnitt ble tatt av effektiviteten til referansegeneene. Dette er et geometrisk gjennomsnitt som brukes for å normalisere forskjellene til målgenene. Denne forskjellen beregnes videre med formelen:

$$\Delta Ct_{sample} = Ct_{target} - Ct_{reference}$$

Der Ct_{target} er Ct verdien til målgenet korrigert for effektivitet og $Ct_{reference}$ er det geometriske gjennomsnittet for referansegene korrigert for effektivitet.

2.6.5.4 Beregning av $\Delta\Delta Ct$ og foldchange

Det ble gjort et gjennomsnitt av ΔCt verdiene for kalibratorgruppen for å se forandringen til målgenet i sammenheng med forandringen til denne gruppen. I dette forsøket ble kalibratorgruppen valgt til å være 8°C gruppa. Bakgrunnen for avgjørelsen var på grunnlag av at denne temperaturen er standard i norsk oppdrettsnæring for inkubering av egg og larver. Gjennomsnittet regnes ut ved formelen:

$$\overline{\Delta Ct}_{calibrator} = \frac{Ct_1 + Ct_2 + \dots + Ct_x}{x}$$

$\Delta\Delta Ct$ regnes etter følgende formel:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{sample} - \overline{\Delta Ct}_{calibrator}$$

Foldchange eller «expression ratio» blir da slik:

$$FD = ER = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Foldchange ble videre benyttet som endelig resultat, og gruppene ble testet for normalfordeling og signifikans.

2.6.6 Dataanalyse

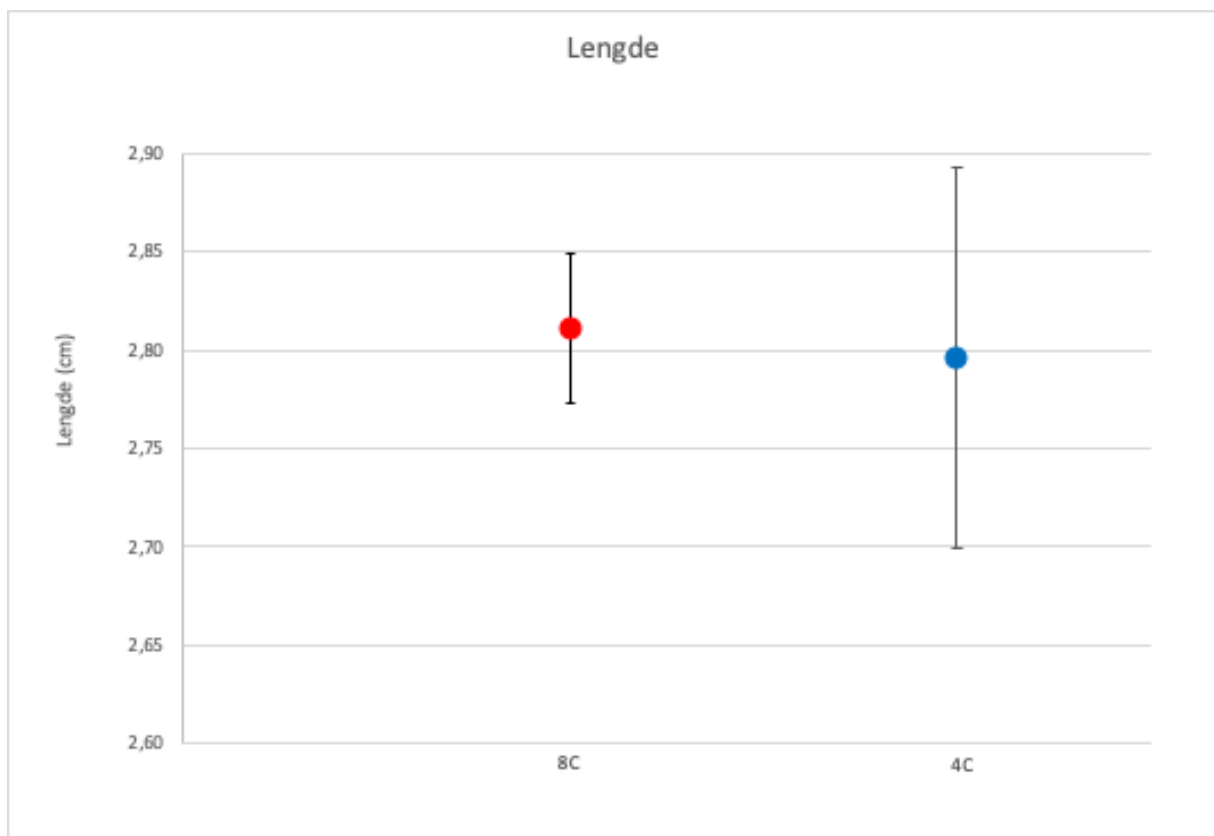
For å vurdere om effekten som ble observert i forsøket skyldtes tilfeldigheter ble data analysert ved bruk av analyseringsprogrammet Prism 8, GraphPad Software, LLC. Dataene ble testet for normalfordeling, hvorav ikke-normalfordelte data ble testet med den ikke-parametriske Mann-Whitney testen og normalfordelte data testet med Welch's t-test. Nullhypotesen ble satt til $H_0 =$ ingen forskjell mellom gruppen og signifikansen ble satt på grunnlag av grensenivået $p=0,05$. Ved verdier under grensenivået ble det ansett at tallgruppene var signifikant forskjellige og nullhypotesen forkastet. Framstillingen av resultatene ble gjennomført i Microsoft® Excel.

3 Resultater

3.1 Dødelighet

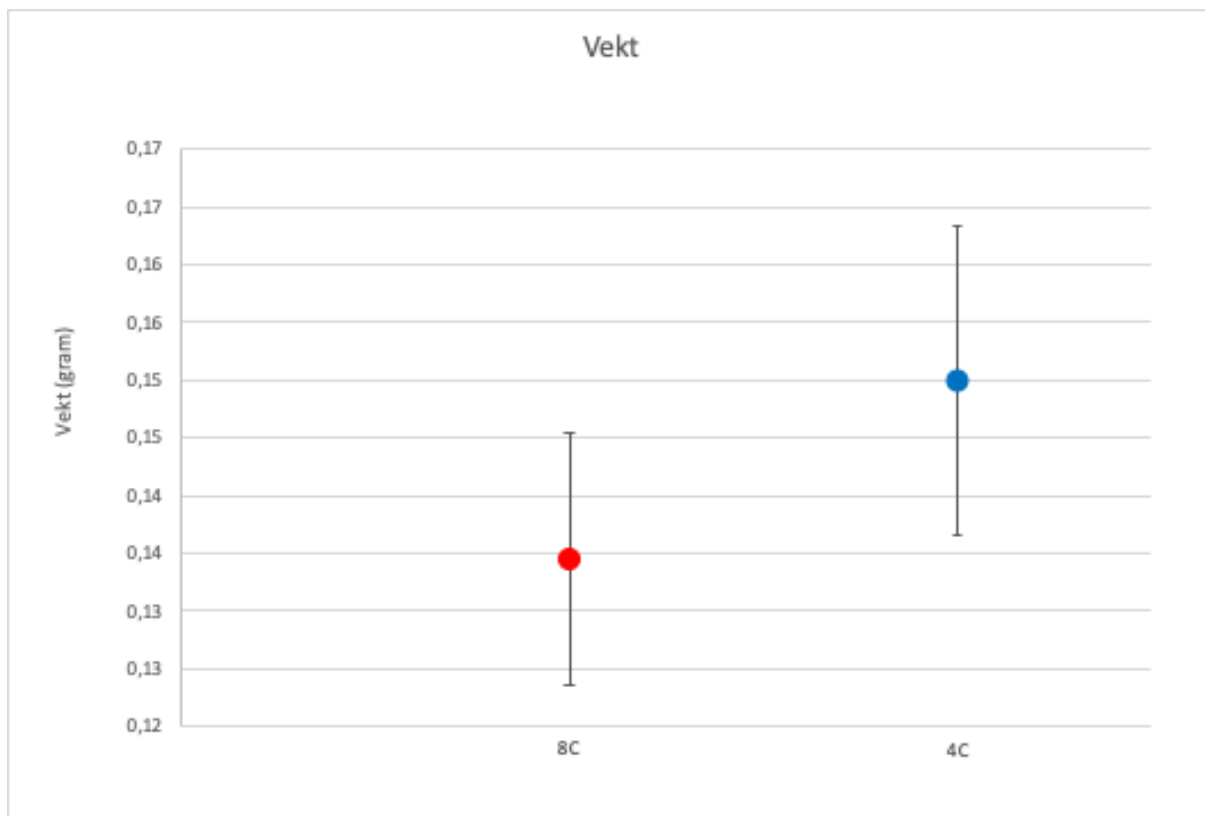
Fra eggene ble befruktet og fram til startfôring ble dødeligheten for hver gruppe registrert. Befruktningen skjedde ved 0 d°C i uke 45 2018 og startfôringen ved 876 d°C i uke 9 2019 for gruppe 8°C og ved 870 d°C i uke 24 2019 for gruppe 4°C. Total dødelighet i gruppe 4°C var på $10.48\% \pm 2.02$ og total dødelighet i gruppe 8°C var $10.12\% \pm 0.57$. Det var ingen signifikant forskjell i dødelighet mellom gruppene.

3.2 Lengde og vekt



Figur 8: Gjennomsnittslengde for temperaturgrupper med standardavvik. Gruppe 8°C = rød sirkel. Gruppe 4°C = blå sirkel. Det var ingen signifikant forskjell mellom gruppene. Antall fisk (n) pr. gruppe: 8°C: n=45, 4°C: n=73. Gruppe 8°C ble målt ved 870 d°C i uke 9 2019 og gruppe 4°C ble målt ved 848 d°C i uke 24 2019.

Resultatene viser at det var ingen signifikant forskjell mellom gruppene like før startfôring. Gjennomsnittslengden for gruppe 8°C var på 2.81 cm \pm 0,04 og gjennomsnittslengden for gruppe 4°C var 2.80 cm \pm 0,10. Standardavviket for gruppe 4°C viser en markant større variasjon i lengden, der noen individer ble målt fra 2.7 til 2.9 cm. Gruppe 8°C hadde tilsvarende mindre variasjon og mer jevnstore individer fra 2.77 cm til 2.85 cm.



Figur 9: Gjennomsnittsvekt for temperaturgrupper med standardavvik. Gruppe 8°C = rød sirkel. Gruppe 4°C = blå sirkel. Det var en signifikant forskjell mellom gruppene. Antall fisk (n) pr. gruppe: 8°C: n=45, 4°C: n=73. Gruppe 8°C ble målt ved 870 d°C i uke 9 2019 og gruppe 4°C ble målt ved 848 d°C i uke 24 2019.

Figur 9 viser at det er en signifikant forskjell på vekten til de to ulike gruppene like før startfôring. Larver inkubert ved 4°C i tidlige livsstadier ga en høyere vekt enn larver inkubert ved 8°C i tidligere livsstadier. Gjennomsnittsvekten for gruppe 8°C var på 0.13 gram ±0.01 og gjennomsnittsvekten for gruppe 4°C var på 0.15 gram ±0.01.

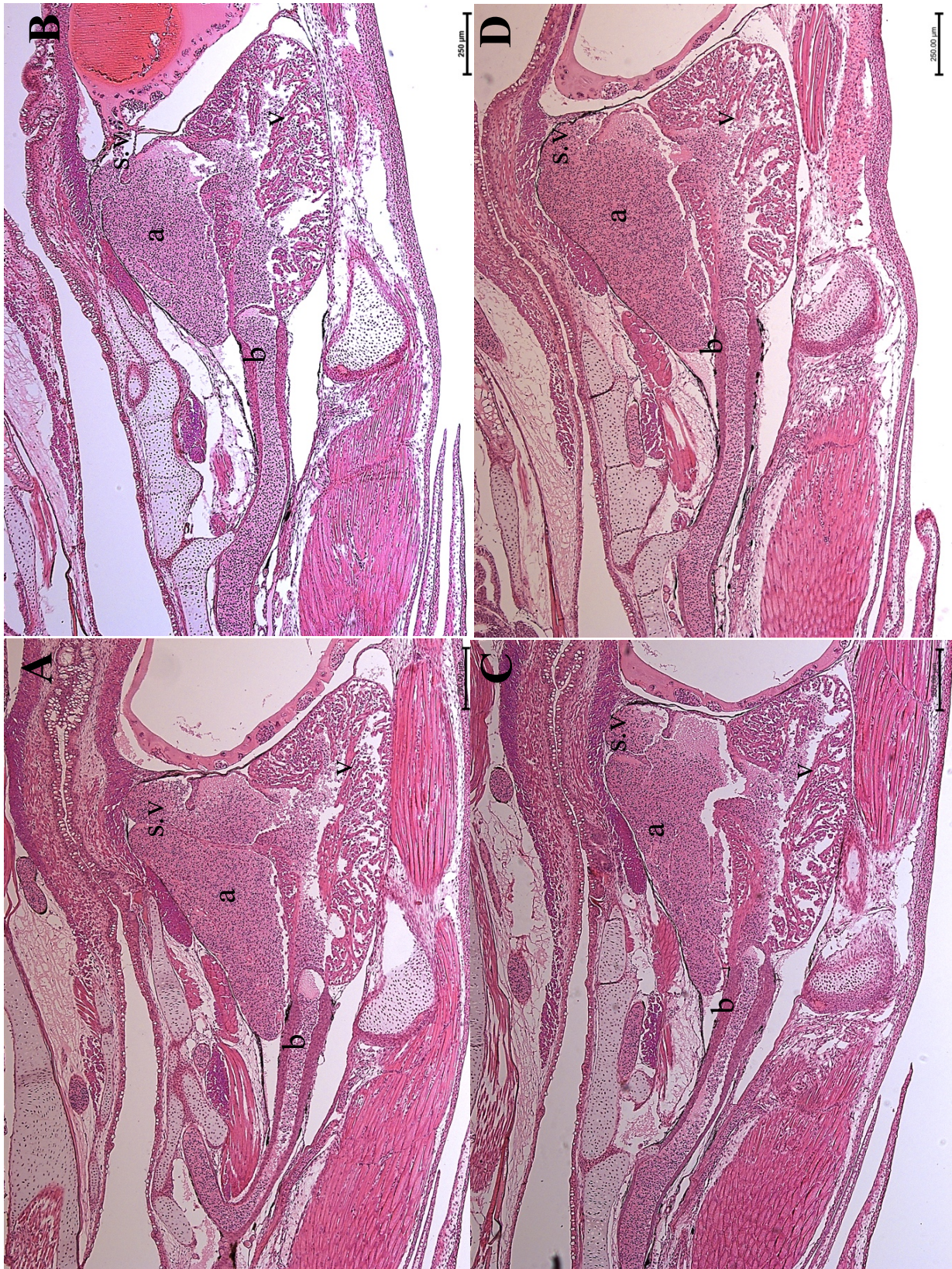
3.3 Målinger av hjerte

Tabell 8: Målinger av hjertet til gruppene 4°C og 8°C. Tabelloversikt over gjennomsnittlige målinger gjort på compactum, ventrikkelareal og bulbusbredde. Antall prøver (n) pr. gruppe: 4°C: n=10. 8°C: n=12. Samtlige verdier er målt i μm .

	4C	8C
Compactum (μm)	10.63	10.97
SD	4.37	2.08
p-verdi	0,8236, ikke signifikant	
Ventrikkelareal (μm^2)	151 981	154 205
SD	10 537	25 113
p-verdi	0,1510, ikke signifikant	
Bulbus (μm)	202.72	196.09
SD	14.92	13.20
p-verdi	0.2816, ikke signifikant	

Resultatene i tabell 8 viser at temperaturforskjellen ikke har medført en signifikant forskjell på compactum. Gruppe 4°C hadde en gjennomsnittlig tykkelse på $10.63 \mu\text{m} \pm 4.37$ og gruppe 8°C en gjennomsnittlig tykkelse på $10.97 \mu\text{m} \pm 2.08$. P-verdien var 0.8236 og derfor ikke signifikant. Ventrikkelarealet på gruppe 4 °C var $151\,981 \mu\text{m}^2 \pm 10\,537$. Gruppe 8 °C hadde et gjennomsnittlig ventrikkelareal på $154\,205 \mu\text{m}^2 \pm 25\,113$. P-verdien for gruppene var 0.1510 og dermed har temperaturen ikke hatt en signifikant påvirkning på ventrikkelarealet. Bulbusbredden i gruppe 4 °C var gjennomsnittlig $202.72 \mu\text{m} \pm 14.92$, mens gruppe 8 °C hadde et gjennomsnitt på $196.09 \mu\text{m} \pm 13.20$. P-verdien for gruppene var 0.2816 og derfor ga ikke temperaturforskjellene en signifikant endring på bulbusbredden. Det ble forsøkt gjort målinger av bredde, lengde, bulbusvinkel og ventrikkelvinkel uten at det lot seg gjennomføre.

3.4 Morfologi av hjertet til yngel av atlantisk laks

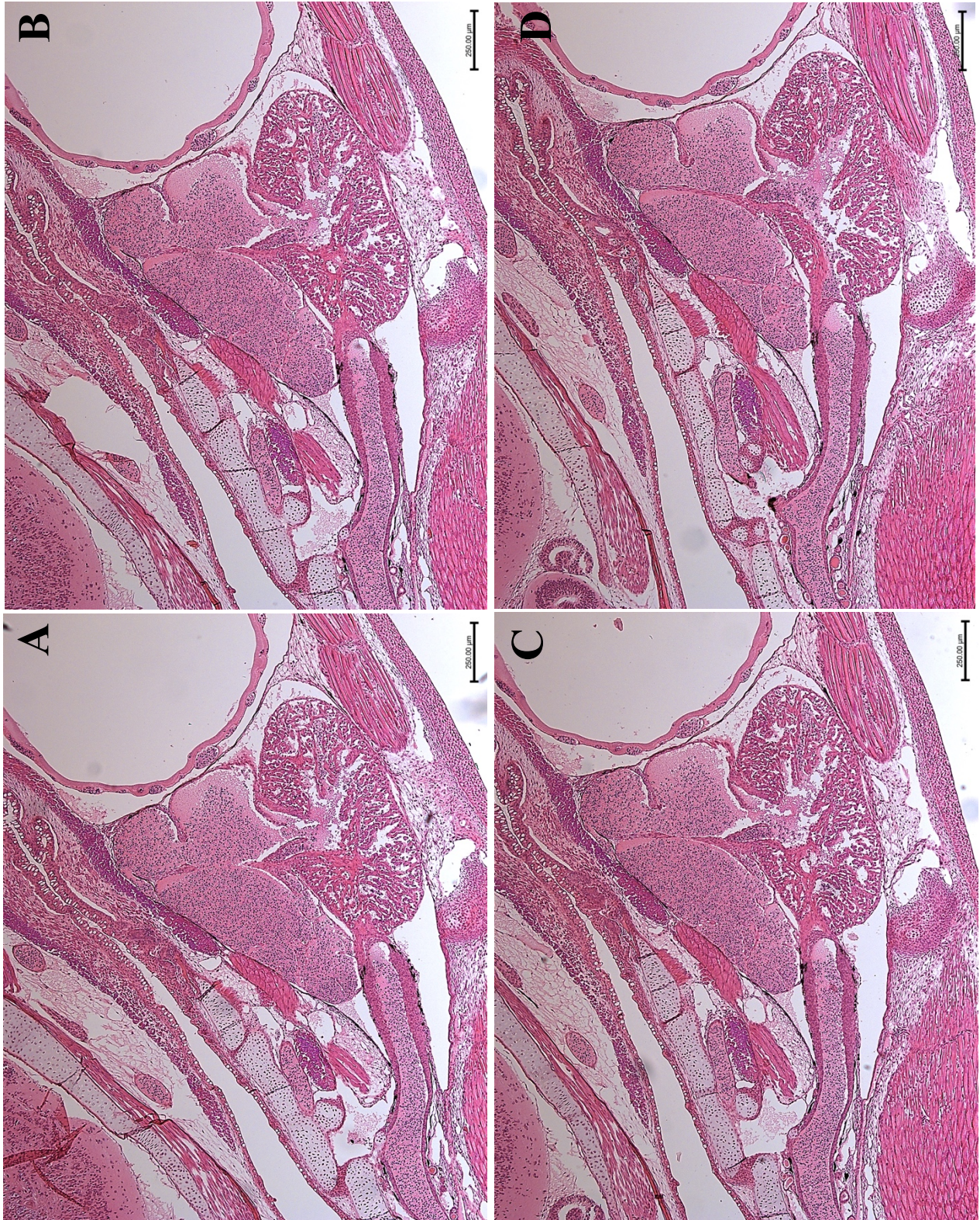


Figur 10: Hjerter fra fire ulike startfôringsklar yngel inkubert ved 8°C. d°C ved uttak = 870. a: atrium, b: bulbus, s.v: sinus venosus, v: ventrikkel. Lengdebar = 250 µm.

Figur 10 viser hjerter fra fire ulike startfôringsklare yngel snittet med sagittalsnitt. Hjertene ligger plassert inne i perikardialhulen med septum transversum som skiller de fra bukhulen. Hjertene er plassert på cranial side av bukhulen og ventralt i forhold til spiserør. Sinus venosus og atrium er oppfylt av røde blodceller og fyller ut mot hjertehulen. I overgangen fra sinus venosus til atrium, og fra atrium til ventrikkelen, er klaffer plassert. Størrelsen på atrium varierer mellom individene, men ligger hos samtlige fra bulbus og bakover mot bukhulen.

Man ser stor variasjon i hjertes form mellom individene. Ventrikkelens form varierer fra spiss (figur 10A) til en rundenere form (figur 10D). I ventrikkelens spiss og rundt bulbus ses et hulrom hos samtlige individer. Ventrikkelen består hovedsakelig av spongiusum omkranset av et tynt lag compactum. Compactum ble beregnet til å være omlag 9.7% av det totale ventrikkelarealet. Enkelte individer viser et hakk i ventrikkelens spiss (10B).

3.5 Seriesnitt av hjertet

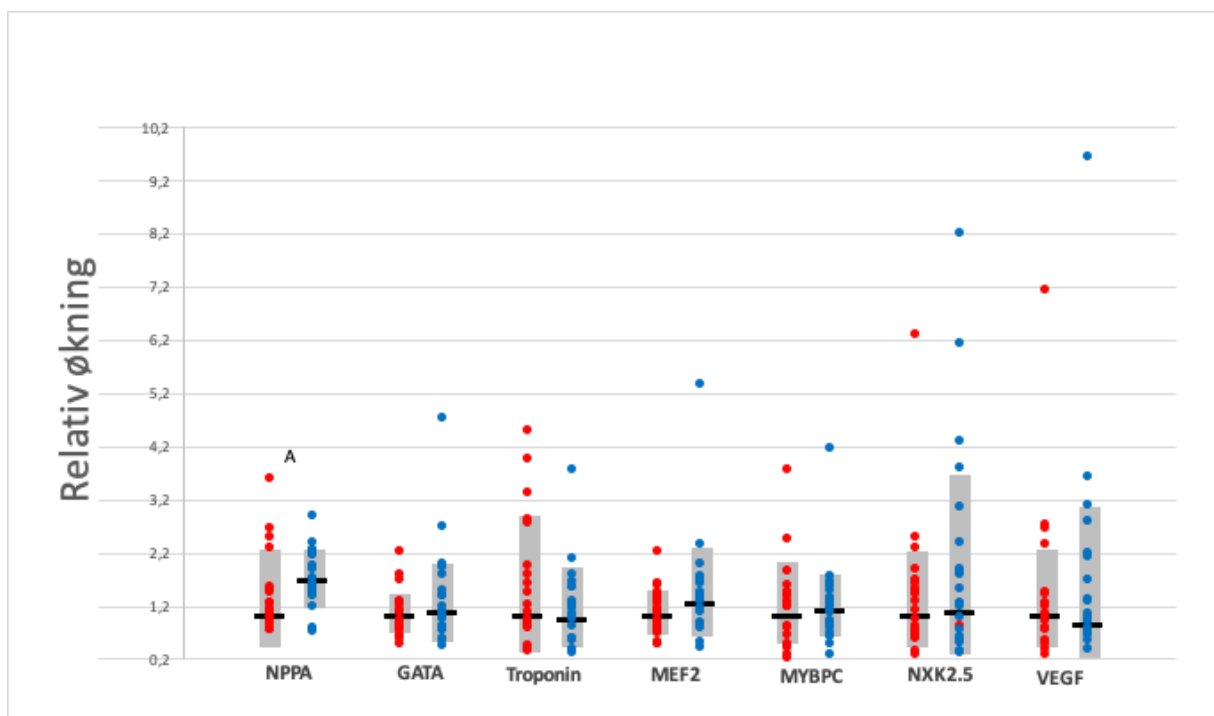


Figur 11: Seriesnitt av hjertet til startføringsklar yngel fra gruppe 4°C (848 d°C). Seriesnittet A-D viser hvordan hjertet og omliggende organers morfologi endrer seg i de ulike snittene. Bulbusbredde: A: 202.86 µm, B: 199.78 µm, C: 206.61 µm, D: 206.80 µm. SD=3.35 µm. Ventrikelareal: A: 151 367 µm². B: 150 831 µm². C: 150 305 µm². D: 151 726 µm². SD = 607 µm². Mellom snitt C og D har fire snitt falt bort. Lengdebar = 250 µm

Figur 11 viser et seriesnitt av hjertet med fire snitt. Bulbusbredden mellom snittene målte A=202.86 μm , B=199.78 μm , C = 206.61 μm , D: 206.80 μm . Standardavviket mellom snittene var 3.35 μm . Ventrikkelareal ble målt til A: 151 367 μm^2 , B: 150 831 μm^2 , C: 150 305 μm^2 , D: 151 726 μm^2 . SD = 607 μm^2

3.6 Utrykk av gener relatert til hjerteutvikling

Det ble ikke detektert Ct-verdier av betydelig størrelse (<6 Ct-sykluser) i vannprøvene. Dette er en god indikasjon på at tilsetning av mastermiks ikke inneholdt kontaminering av genomisk DNA.



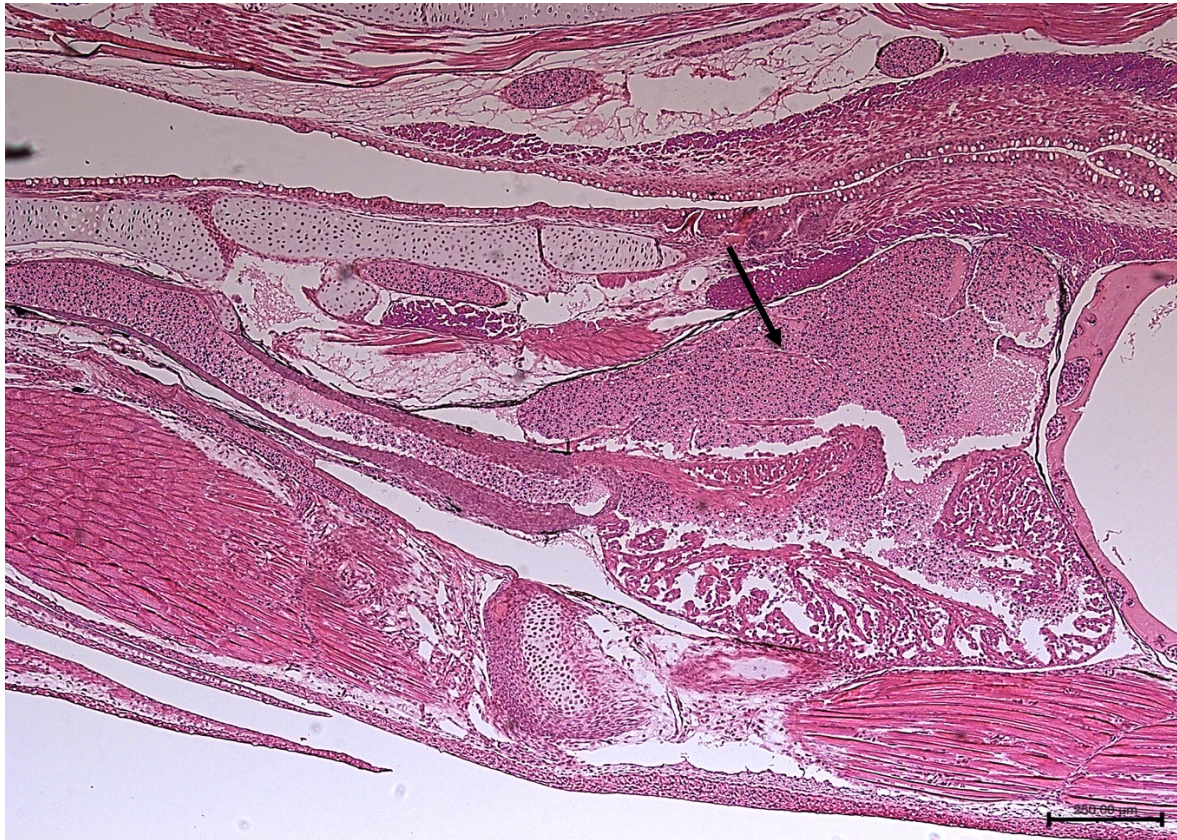
Figur 12: Relativt genuttrykk av NPPA, GATA, troponin, MEF2, MYBPC, NKX2.5 og VEGF med standardavvik og individuelle verdier. Figuren viser det gjennomsnittlige relative uttrykket av utvalgte gener til yngel rett før overføring til startføring (ca. 850 d°C). Rød = 8°C, blå = 4°C, grått part i = standardavvik, svart strek = gjennomsnitt for gruppen. A = signifikant forskjell. Y-aksen representerer verdier som foldchange: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ der gruppe 8°C er satt som normal. Antall prøver (n): 8°C: n=22, 4°C: n=23.

Resultatene i figur 12 viste ingen signifikant forskjell mellom gruppene i uttrykket av GATA, troponin, MEF2, MYBPC, NKX2.5 eller VEGF ($p > 0,05$, Mann-Whitney test). Nppa viste en signifikant, men liten forskjell, der gruppe 4°C var noe mer oppregulert til sammenligning med gruppe 8°C ($p > 0,05$, Mann-Whitney test). Figuren viser at det var store individuelle forskjeller i uttrykk av genene troponin, NKX2.5 og VEGF. Særlig skilte NKX2.5 seg ut med flere uteliggere i gruppe 4°C, der gruppe 8°C kun hadde en uteligger. I uttrykket av VEGF

hadde begge gruppene kun en uteligger som forårsaket et relativt stor standardavvik. Uteliggeren til 4°C hadde en svært høy foldchange-verdi på 9.65 mot gjennomsnittet på 0.82.

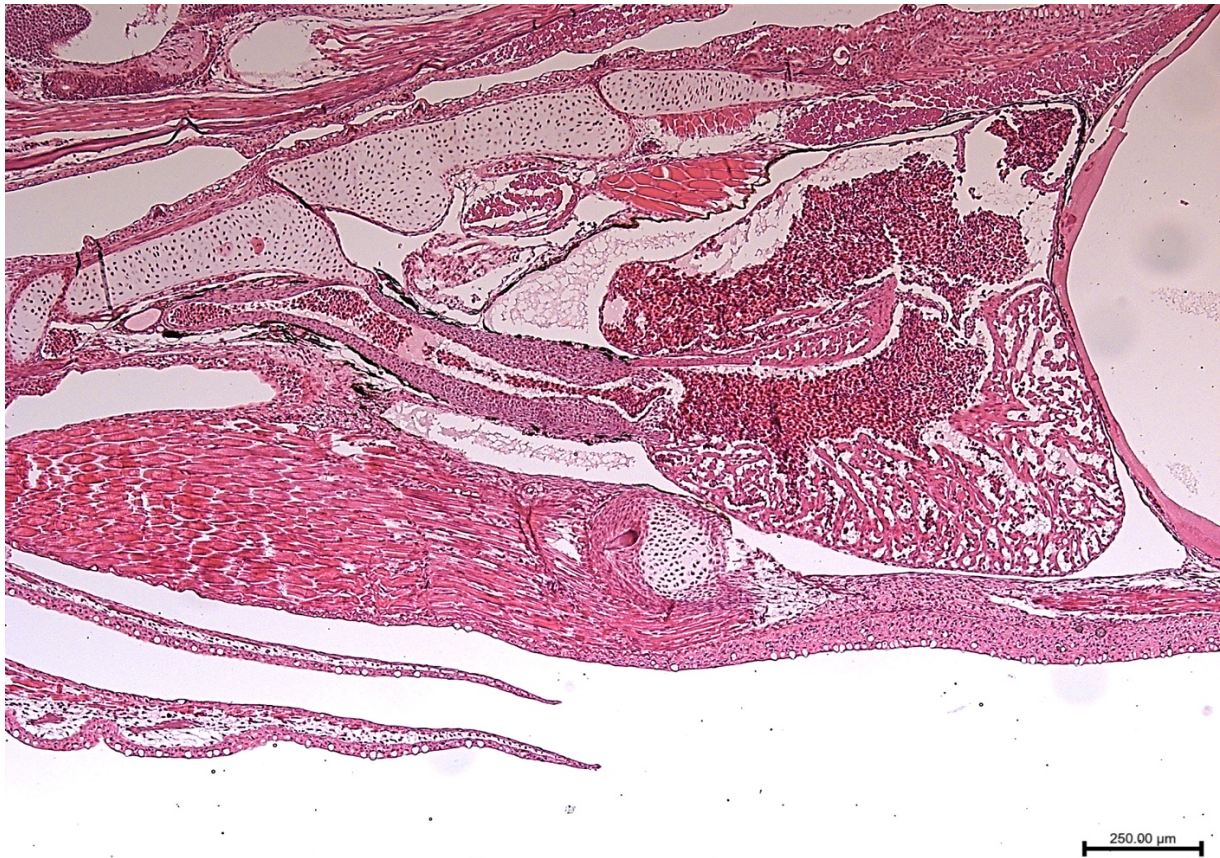
3.7 Autolyse forårsaket av fikseringsmedium

3.7.1 Hjerte



Figur 13: PAXgene-fiksert laksehjerte. Viser hjertet til yngel fra gruppe 8°C snittet med sagittalsnitt. Viser alle hjertets fire kamre og deler av hjerteklaffene. Bildet viser også de omkringliggende organene på perikardialhulens utside. Pilen peker mot atrium et blodfylt atrium. Lengdebar = 250µm.

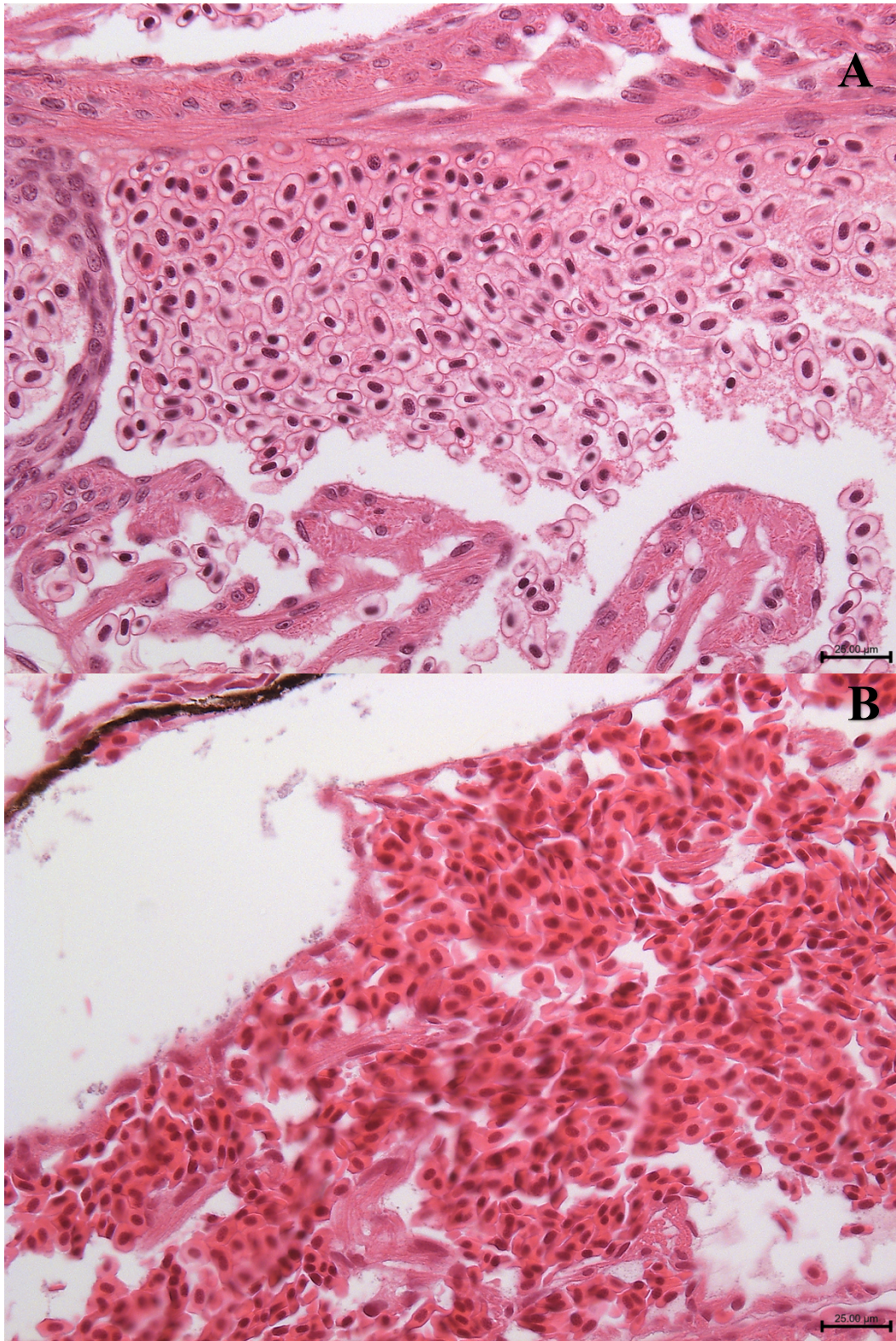
Figur 13 viser hjerte fiksert på PAXgene med omkringliggende organer. Hjertet var intakt, strukturert og tydelig. Vevet var farget jevnt i de undersøkte snittene. Ventrikkelenes vev virket ikke å være påvirket negativt av fikseringen. Atrium hos PAXgene fiksert hjerte var oppfylt av blodceller. Samtlige undersøkte snitt hadde intakt septum transversum.



Figur 14: Formalinfiksert laksehjerte. Viser hjertet til yngel fra gruppe 8°C snittet med sagittalsnitt. Bildet viser også de omkringliggende organene på perikardialhulens utside. Lengdebar = 250μm.

Figur 14 viser hjerte fiksert på formalin med omkringliggende organer. Hjertet var intakt, strukturert og tydelig. Vevet var farget jevnt i de undersøkte snittene. Ventrikelens vev virket ikke å være påvirket negativt av fikseringen. Atrium hos formalinfiksert hjerte hadde lite oppsamling av blodceller og store hvite parti. Samtlige undersøkte snitt hadde intakt septum transversum.

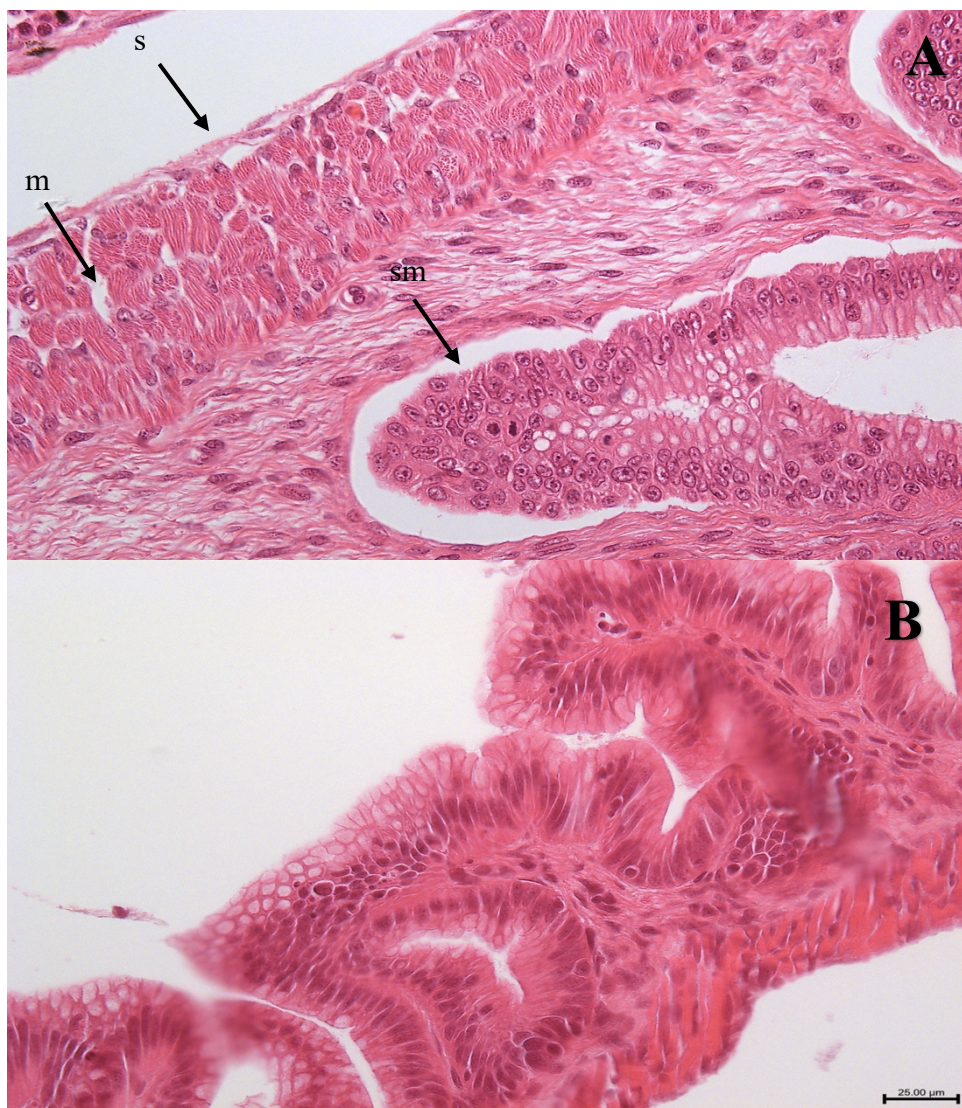
3.7.2 Røde blodceller



Figur 15: Sammenligning av RBC fiksert på ulike medium. A: PAXgene-fiksert. B: Formalinfiksert. Lengdebar = 25 µm.

Figur 15A viser røde blodceller fiksert på PAXgene. PAXgene fikserte blodceller hadde et tydelig påvirket cytoplasma med kun enkeltceller som viste svak rød farge. Celleformen varierte, der noen var avlang og andre runde. Flere celler hadde også typisk bulkete ytterlinje. Cellekjernene var mer svullen i sammenligning med formalinfiksering, og samlet sett var kjernene heterogen i utseende. Det betyr at størrelsen, tydeligheten og formen varierte. Disse forandringene ble observert i samtlige undersøkte snitt. Figur 15B viser blodceller fiksert på formalin med normale eosine fargeegenskaper og et tydelig rødt cytoplasma. Cellekjernene var avgrenset og viste ingen tegn til oppløsning, og celleformen var homogen i de undersøkte cellene. Disse observasjonene var gjennomgående i samtlige undersøkte snitt.

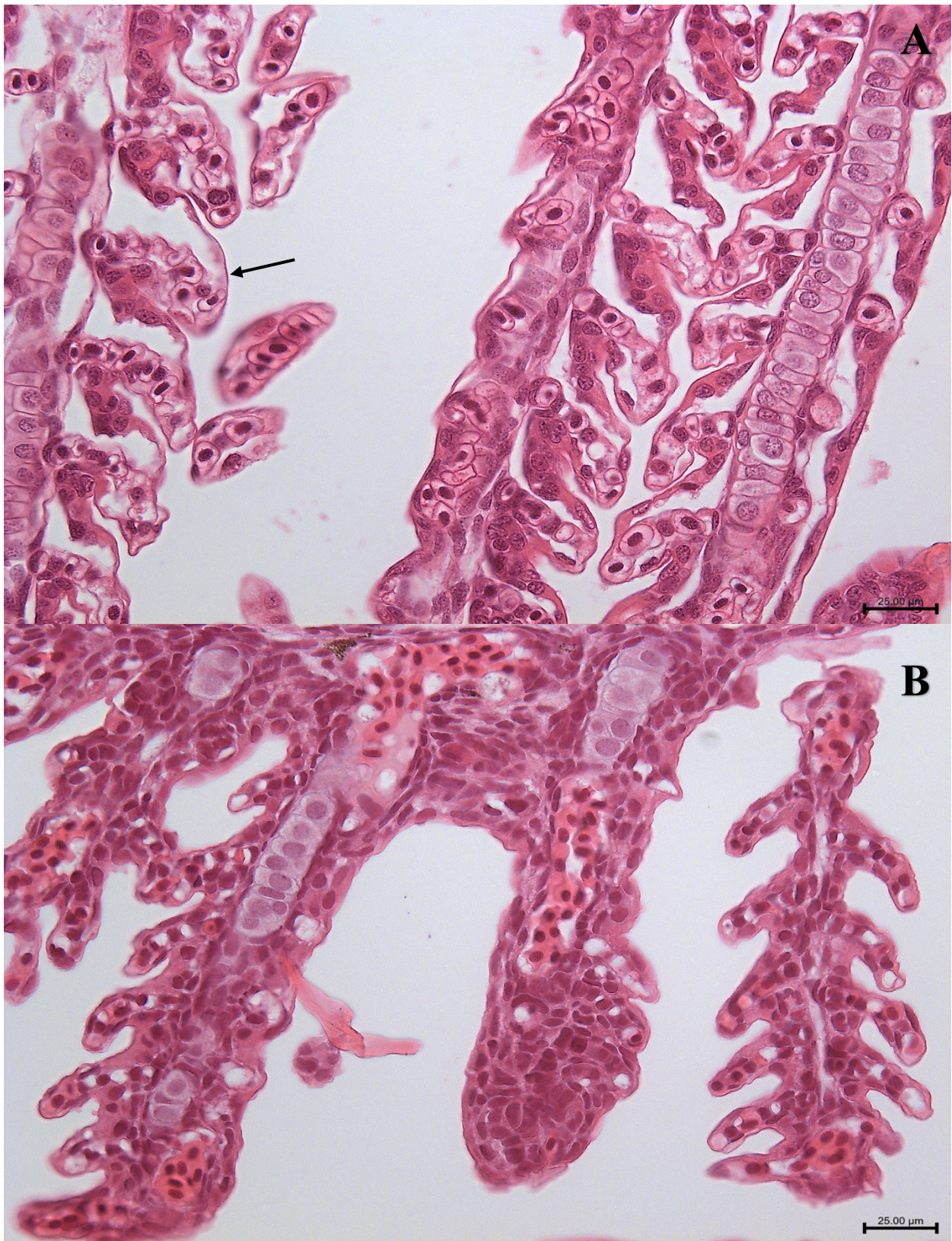
3.7.3 Tarm



Figur 16: Sammenligning av tarm fiksert på ulike medium. A: PAXgene-fiksert. Pilene viser forandringer. s: Løstnet serosa. m: hulrom i muskularis. sm: Mucosa løstnet fra submucosa. B: Formalinfiksert. Lengdebar = 25 µm.

Figur 16A viser tarm fiksert på PAXgene. Bildet viser alle de observerte forandringene i PAXgene-fiksert tarm. Serosa var løsnet fra muskularis på samtlige undersøkte snitt. Den tverrstripede muskulaturen kan beskrives som spaltet med hulrom. Langsgående muskulatur hadde tydelig bølgete linjer med stor grad av hvite mellomparter. Enkelte av snittene fiksert med PAXgene hadde et løsnet mucosa fra submucosa med et klart hvitt mellomparti. Overgangen fra mucosa var også noe utydelig på disse snittene med tegn til denaturering. Enterocytene i mucosa hadde en mørk ytterlinje med et svakere farget cytoplasma. Cellekjernene var tydelig, men framsto som mørke og fortettede. Figur 16B viser tarm fiksert på formalin. Ingen av tarmens fire lag virket å være påvirket negativt av fiksering med formalin i noen av de undersøkte snittene.

3.7.4 Gjeller



Figur 17: Sammenligning av gjeller fiksert på ulike medium. A: PAXgene-fiksert. Pilen viser løsnet epidermis. B: formalinfiksert. Lengdebar = 25 µm.

Figur 17A viser gjeller fiksert på PAXgene. Epitellaget som dekker filamentene og lamellene var løsnet fra basalmembranen og dannet et ekstracellulært hulrom, også kalt lifting, fra de omkringliggende cellene. Gjelle viste også delvis innskrumpede og fortettede epitelcellekjerner. Det generelle uttrykket var uryddig og uten naturlig struktur. Figur 17B viser gjeller fiksert på formalin. Ingen av de undersøkte snittene viste tegn på unormale forandringer.

3.7.5 Oppsummering av forandringer

Tabell 9: Oppsummering av antall prøver med forandringer i røde blodceller (RBC), tarm, gjeller og hjerte ved fiksering i PAXgene og formalin. Tabellen viser en systematisk gjennomgang av ulike komponenter i de fire celle/vevstypene: RBC (cellekjerne, cytoplasma, celleform), tarm (mucosa, submucosa, muskularis, serosa), gjeller (epidermis, epitelcellekjerner, slimceller), hjerte (compactum, spongiosum, septum transversum). Antall prøver (n): formalin n=4, PAXgene n=6.

	Formalin	PAXgene
RBC		
Cellekjerne	0/4	6/6
Cytoplasma	0/4	6/6
Celleform	0/4	6/6
Tarm		
Mucosa	0/4	2/6
Submucosa	0/4	0/6
Muskularis	0/4	2/6
Serosa	0/4	6/6
Gjeller		
Epidermis	0/4	6/6
Epitelcellekjerner	0/4	6/6

	Slimceller	0/4	6/6
Hjerte	Compactum	0/4	0/6
	Spongiosum	0/4	0/6
	Septum transversum	0/4	0/6

Resultatene viser at ingen av de formalinfikserte blodcellene viste unormale forandringer. Hos PAXgene-fikserte blodceller hadde alle de seks undersøkte prøvene forandringer i celleform, cellekjerne og hadde et tomt cytoplasma uten tegn til eosinfarging.

Ingen av tarmens fire lag var påvirket av autolyse i de fire snittene undersøkt på formalin. Ved PAXgene fiksering kunne man observere at mucosa var løsnet fra submucosa i to av seks snitt. I disse to prøvene ble det også sett åpne hulrom i muskularis. Serosa hos tarmer fiksert med PAXgene var løsnet på samtlige seks snitt.

Gjellene var helt tydelig påvirket av fiksering med PAXgene, der alle seks undersøkte snitt viste forandring i epidermis, epitelcellekjerner og slimceller. Ingen av de fire undersøkte formalinfikserte gjellene var påvirket i lik måte.

Ved vurdering av hjerter ble det ikke notert endringer av morfologi hos noen av de undersøkte snittene.

4 Diskusjon

Dødelighet i norsk oppdrett er preget av hjarterelaterte lidelser, patogener og uforklarlig død (Sommerset, 2020). Oppdrettslaksen skal igjennom en krevende produksjonsprosess hvor stress og fysiske påkjenninger preger velferden. Termisk lakselusbehandling er et godt eksempel på en operasjon der man bør håndtere syk eller svak fisk med varsomhet (Grøntvedt et al., 2015).

Optimalisering av lakseproduksjonen er svært viktig for et kostnadseffektivt produkt og en bærekraftig næring. Bruk av ulike temperaturbetingelser benyttes aktivt for å manipulere blant annet utviklings- og veksthastighet, appetitt og sårheling. Hos atlantisk laks har det vist at inkubasjon av egg og larver ved temperaturer over 8°C gir en økt grad av skjelettdeformiteter (Rosten et al., 2004). Hos beinfisk, inkludert laks, utvikles hjertet tidlig i embryogenesen og de første rytmiske hjerteslagene observeres allerede ved ca. 170d°C (Gorodilov, 1996). Temperatur gjennom tidlige livsstadier kan derfor potensielt også ha effekter på hjerteutvikling hos laks, særlig sett i forhold til at temperatur er kjent for å modulere struktur og funksjon av hjertet hos voksen laksefisk (Klaiman et al., 2011). Om temperatur kan ha tilsvarende effekt på hjerteutvikling gjennom egg- og yngelfasen er i midlertidig lite studert. I denne oppgaven ble derfor egg og larver inkubert ved 4°C og 8°C, fra befruktning til startfôring, for å undersøke om temperatur kan påvirke hjertets morfologi og/eller uttrykk av gener som er involvert i hjertets utvikling og funksjon. Histologiske undersøkelser ble gjennomført for å avdekke eventuelle morfologiske forandringer.

4.1 Dødelighet

I begge temperaturgruppene var dødeligheten rundt 10%, noe som indikerer at temperaturforskjellene ikke har påvirket overlevelses- eller utviklingsevnen. En overlevelse på 90% fram til startfôring regnes som et godt resultat under kommersielle forhold (H. Tveiten pers. med.)

4.2 Effekter av temperatur på vekst

I begge temperaturgruppene var den gjennomsnittlige yngellengden ca. 2.8 cm, og det var ingen signifikant forskjell i lengde mellom behandlingene. Den observerte lengden er i god overenstemmelse med tidligere observasjoner av lakselarver i dette utviklingsstadiet (Gorodilov, 1996).

I dette forsøket ble det funnet at gjennomsnittsvekten var signifikant høyere (ca. 0.02 gram) hos individer inkubert ved en temperatur på 4°C sammenlignet med yngel holdt ved 8°C. Dette stemmer godt med tidligere funn (Ojanguren et al., 1999), der egg inkubert ved høyere temperaturer hadde lavere vekt etter oppbrukt plommesekk i forhold til egg inkubert på lavere temperaturer. Forklaringen på dette ligger trolig i den økte metabolske aktiviteten ved høyere temperaturer, og mer energispill grunnet metabolisme (Ojanguren et al., 1999).

4.3 Effekter av temperatur på hjertemorfologi

I denne oppgaven var det et mål å undersøke om utvalgte strukturer som vil bidra til hjertets morfologi og funksjon var påvirket av temperatur i embryo- og plommesekkfasen. Det ble derfor gjort målinger av bulbusbredde, ventrikkelareal og tykkelse av compactum. Slike målinger av histologisk materiale anses å være en semi-kvantitativ analyse (Petersen, Sandberg, Fraser, & Goldschmidt, 2000), men vil likevel kunne gi viktig informasjon både om hjertes oppbygging generelt, men også i forhold til mulige temperatureffekter spesielt.

Målingene ble gjort på et utvalg av snitt omkring hjertets sentrum. Det ble i midlertidig ikke funnet noen signifikant forskjell i hverken ventrikkelareal, bulbusbredde eller compactumtykkelse mellom temperaturbehandlingene. Disse funnene indikerer derfor at, gitt betingelsene i dette forsøket, temperatur har liten effekt på hjertets morfologi i de målte områdene. Et forsøk med voksen regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) viste at fisk akklimatisert ved 5°C hadde en større ventrikkelmasse enn fisk akklimatisert ved 15°C (Graham & Farrell, 1989). Dette underbygges også av et annet forsøk som også observerte økt ventrikulær masse hos hannfisk holdt ved lave temperaturer (Klaiman et al., 2011). I samme studie ble det dokumentert et tynnere compactum i ventrikkelen, og økt masse i spongiosum ved lave temperaturer. Voksen fisk tilpasser altså hjertet etter temperaturpåvirkninger, men det er tilsynelatende ingen effekt på tidlige livsstadier, med de temperaturene denne oppgaven undersøkte.

Tidligere undersøkelser på hele hjerter hos atlantisk laks har vist at voksen oppdrettslaks hadde et mindre forhold mellom ventrikkelens høyde og bredde, og en større vinkel mellom bulbus og ventrikkelaksen enn voksen villaks (T. T. Poppe, Johansen, Gunnes, & Tørud, 2003). Om temperatur gjennom tidlige livsstadier kunne indusere lignende effekter hos startfôringsklar yngel var derfor interessant å undersøke. Registrering og kvantifisering av tilsvarende morfometriske mål ble derfor forsøkt i denne oppgaven, men dette viste seg å være vanskelig med hensyn på å gjennomføre alle målingene med bruk av samme kriterier på

alle prøvene. Det ble blant annet forsøkt å måle vinkelen til ventrikkelspissen. I de utvalgte snittene varierte ventrikkelformen så mye mellom individene på tvers av grupper at plasseringen av målingene ikke ble konsekvent i alle hjertene. Det var enkelt å sette vinkelens linjer hos noen hjarter, da ventrikkelen hadde rette kanter på hver side. Andre hjarter var avrundede med ingen tydelig linje og det ble derfor også vanskelig å bestemme hvor linjene til vinkelen skulle plasseres. Av samme grunn var det vanskelig å bestemme lengde og bredde på ventrikkelen.

4.3.1 Målenøyaktighet

I denne undersøkelsen ble vevet snittet med en tykkelse på 4 μm , og hjertet målt til en makroskopisk størrelse på 1 mm. Dette gjør at hjertet teoretisk sett er totalt omlag 250 snitt, og midten av hjertet anslås til å være ca. 10-20 snitt (egne observasjoner). En utfordring ville derfor være å treffe nøyaktig samme plan for hver prøve som skulle måles. Som et forarbeid for å verifisere om målingene ville gi representative resultater ble en serie på fire påfølgende snitt i ulike plan rundt midten av hjertet målt for å bestemme ventrikkelareal og bulbusbredde. Uavhengig hvilket snitt som ble brukt i dette området viste målingene minimal størrelsesvariasjon (mindre enn 1.5 %) for de nevnte strukturene. Undersøkelsen er vist mer i detalj presentert i figur 11 under kapittel 3 Resultater. Undersøkelsen viser at valg av snitt i dette området trolig ikke har gjort utslag på målingene.

4.3.2 Hjertereanatomi hos startfôringsklar yngel

Hjertet til startfôringsklar yngel av atlantisk laks viste stor variasjon mellom individene (figur 10). Ventrikkelspissen varierte fra svært spiss til mer rund form. Likevel var det ingen som skilte seg ut med en ekstrem rund som tidligere observert hos sjøsatt atlantisk laks (T. T. Poppe et al., 2003). Størrelsen på atrium varierte også, der noen var mindre enn andre. Compactum hos startfôringsklar yngel ble beregnet til 9,7% av det totale ventrikkelarealet, og ses kun som et tynt omkransende lag. Dette til motsetning av voksen laksefisk som beskrives med opptil 30-40% andel compactum i ventrikkelen (Gamperl & Farrell, 2004). Forskning på regnbueørret viste at fisk i ferskvann hadde en stor ventrikkel med mindre andel compactum, og motsatt hadde fisk i sjø en ventrikkel med større andel compactum (Graham & Farrell, 1992). Dette viser at hjertets utvikling påvirkes av miljø og aktivitetsnivå og skjer trolig i senere i livet hos anadrom fisk som atlantisk laks.

4.4 Utrykk av gener i hjertet

I dette forsøket var Nppa uttrykt signifikant høyere i gruppe 4°C enn gruppe 8°C. Dette stemmer godt med litteratur på juvenil zebrafisk der Nppa viste en signifikant oppregulering ved lave temperaturer (Dimitriadi et al., 2018). Nppa er knyttet til cardiomyocyt hypertrofi og hjertesvikt (Becker et al., 2012). I en studie på tidlig utvikling av hjertet til zebrafisk viste det seg at nppa-nppb dobbeltmutanter hadde en ekspansjon i cardiomyocyttenes basalmembran av gelelignende substans (Grassini et al., 2018). Funksjonen til den gelelignende substansen er ikke fullstendig kartlagt, men studier indikerer at den har en svært viktig embryonal funksjon i morfogenesen av hjertet og dannelsen av hjerteklaffer og pumpefunksjon (Zucker, 2011).

I denne oppgaven var det ingen forskjell i temperaturgruppene i uttrykk av NKX2.5. En overekspressjon av NKX2.5 hos embryo av zebrafisk har tidligere vist seg å føre til et forstørret hjerte med en unormal økning av antall celler (Chen & Fishman, 1996). Forsøk på genmodifiserte mus med inaktivert NKX2.5 gen viste en nedregulering av Nppa-Nppb, noe som indikerer at NKX2.5 regulerer uttrykket av Nppa og Nppb (Warren et al., 2011). Likevel ble det vist at et stressindusert genuttrykk av Nppa, forårsaket av økt hjertetrykk, ikke var avhengig av NKX2.5 som en transkripsjonsregulator. Fraværet av opp- eller nedregulering av NKX2.5 i denne oppgaven sannsynliggjør muligheten for at Nppa reguleres uavhengig av NKX2.5 under stress. At en oppregulering av Nppa hos atlantisk laks inkubert på 4°C potensielt kan være relatert til stress er et interessant funn.

Resultatene viste ingen signifikant forskjell mellom gruppene i uttrykk av GATA, troponin, MEF2, MYBPC eller VEGF. I dette forsøket ga altså ikke temperaturforskjellene effekt på genuttrykkene. MYBPC har tidligere blitt bevist oppregulert ved lave temperaturer i studier på juvenil zebrafisk (Dimitriadi et al., 2018). Genet regulerer sammentrekning og avslapning i hjertemuskelen, men det har ikke påvirket resultatene i arbeidet på tidlige livsstadier hos atlantisk laks. GATA4 og MEF2C har i litteraturen vært bevist signifikant oppregulert under høyintensitets treningsregimer hos atlantisk laks (Castro et al., 2013). Det ble foreslått at treningsregimet økte størrelsen på hjertemuskulaturen, økt kontraksjon og en blanding av hyperplasi og hypertrofi. Dette kan indikere at temperaturforskjellene i dette forsøket på tidlig utvikling av atlantisk laks ikke har påvirket kontraksjonen i hjertet og medført hyperplasi eller hypertrofi. Dette bekreftes også av hjertemålingene diskutert i avsnitt 4.3 da det ikke ble målt

noen signifikant forskjell i ventrikkelareal. Uttrykket av troponin viste ingen forskjell i gruppene, og det gjorde heller ikke det blodårestimulerende genet VEGF.

4.5 Fikseringsmedier

I dette forsøket ble et nytt medium for fiksering av vev benyttet. PAXgene Tissue FIX markedsføres med en forbedret preservering av både morfologi og biomolekyler som RNA, uten bruk av formalin (Qiagen, 2020.). PAXgene har tidligere kun vært benyttet på menneskevev og andre pattedyr, og det har trolig ikke blitt gjennomført PAXgene-baserte forsøk på fisk før dette forsøket. Dette gir et annet vurderingsgrunnlag for videre undersøkelser. Underveis i forsøket ble det observert forandringer som kan relateres til autolyse. Autolyse forekommer når vevet brytes ned bakteriologisk eller enzymatisk, og tiden det tar varierer fra vev til vev (J. George, Van Wettere, Michaels, Crain, & Lewbart, 2016). Histologisk vurdering ble gjennomført med den hensikt å påvise eventuelle innvirkninger på morfologien til vev fiksert på PAXgene. I dette forsøket viste forskjellene mellom PAXgene-fiksert vev og formalinfiksert vev å være store, både makroskopisk og mikroskopisk. Morfologien hadde ulik struktur og grad av detaljer.

4.5.1 Hjerte

Hjertene virket å være lite påvirket av forandringer som kan knyttes til autolyse. Mikroskopisk var PAXgene-fikserte hjerter mer svullen i motsetning til de mer kompakte formalinfikserte hjertene. Dette var særlig synlig i atrium som var oppfylt av blodceller hos det PAXgene-fikserte vevet. Makroskopisk framsto PAXgene-fikserte hjerter som mer likt ferske hjerter, enn formalinfikserte hjerter. Muskulatur bruker gjerne lengre tid før autolysering forekommer (Mukundan, Antony, & Nair, 1986). Årsaken er at det finnes færre enzymer i muskelvev enn i eksempelvis andre vev. Hjertet er oppbygd av hjertemuskulatur, noe som kan være en årsak til at de viste mindre grad av forandringer og autolyse i forsøket. I tillegg ligger hjertet godt beskyttet i perikardialhulen fra de omkringliggende, enzymholdige organene.

4.5.2 Røde blodceller

Røde blodceller, gjeller og tarm fiksert på PAXgene hadde endringer i vevet som kan relateres til autolyse. Kaldtvannsfisk er særlig utsatt for autolyse ved fiksering. Årsaken er at innstrømning av fikseringsmedium i cellene er direkte avhengig av temperaturen. En høyere

temperatur under fiksering gir en raskere fiksering og stabilisering av vev (Thavarajah, Mudimbaimannar, Elizabeth, Rao, & Ranganathan, 2012).

Tidligere sammenligninger gjort på menneskevev har beskrevet lungevev fiksert på PAXgene som mer svullent enn lungevev fiksert på formalin (Kap et al., 2011). Det ble spekulert i om årsaken var at de røde blodcellene framsto som tomme, skadet og i enkelte tilfeller lyserte. De røde blodcellene har naturlig et homogent cytoplasma som inneholder en stor andel hemoglobin. Hemoglobinet i blodcellene bidrar til at cellene har gode eosine fargeegenskaper og farger cytoplasma i en rødlig farge (Kryvi, Harald, Poppe, 2016a; Witeska, 2013). Dette viste seg tydelig i resultatene der formalinfikserte blodceller farget rødt, i motsetning til PAXgene-fikserte som fikk et blekere og tomt cytoplasma. PAXgene inneholder eddiksyre som i fikseringssammenheng brukes sammen med alkoholer for å hindre innskrumpent vev. Litteratur beskriver eddiksyre som lyserende for røde blodceller (Pomara, B. Karch, & Fineschi, 2010). Eddiksyre kan altså være årsaken til blodceller med et ufarget cytoplasma.

Cellekjernene hos PAXgene fikserte røde blodceller viste unormal form i forhold til formalinfiksert. PAXgene-fikserte cellekjerner framsto som mer svullen, større og tydeligere i utseende enn formalinfiksering (figur 15A). Formalinfikseringen (figur 15B) viste en lik variasjon i form, men at totalbildet ga et mer homogent uttrykk. Dette var fordi cellekjernene framsto som mer kompakt og lik i størrelse.

4.5.3 Tarm

Tarmen hos fisk inneholder en mengde ulike fordøyelsesenzymer. Når fisken avlives mister den evnen til å regulere disse enzymene, samt at oksygentilførselen stoppes til det perifere vevet (Yadav, Angadi, Kale, & Yadav, 2015). Dette betyr at nedbrytningen av vevet starter raskt etter avlivning. I en vurdering av autolyse er derfor tarmsystemet verdifullt å se nærmere på. Resultatene viser at serosa som er et tynt bindevev rundt tarmen var løsnet fra muskularis i større eller mindre grad ved samtlige snitt fiksert på PAXgene (figur 15A). I enkelte snitt hadde mucosa løsnet fra submucosa og ga et stort hvitt hulrom. Slike hulrom kunne man også observere i den tverrstripede muskulaturen. Dette var i stor motsetning til formalinfiksering, der ingen snitt viste slike forandringer (figur 15B).

4.5.4 Gjeller

Gjellene er i likhet med serosa i tarm bestående av svært tynt vev. Dette er for at gasser raskt skal diffundere fra blod til omgivelser og motsatt. Selv om gjellene er beskyttet under

gjellelokk vil de fremdeles være svært sensitive for eksponering av miljøavhengige faktorer som luft og temperatur. Gjeller er en av de første vevene hvor autolyse oppdages først (J. George et al., 2016). Observasjonene som ble sett i PAXgene-fikserte gjeller med lifting i epidermis og ustrukturert morfologi er typiske tegn på slik autolyse. Pilar- og epitelceller kan også ødelegges under autolyse, men tradisjonelt mikroskop gir ikke høy nok oppløsning for at det kan bestemmes nøyaktig. Dette krever andre verktøy for å undersøke.

4.5.5 Forandringer ved ulikt fikseringsmedium

Årsaken til forandringene som kan knyttes til autolyse kan ikke fastslås med sikkerhet. Likevel er det flere faktorer som kan nevnes. PAXgene er et nytt og lite benyttet fikseringsmedium enn det tradisjonelle formalinmediumet. PAXgene er også trolig kun benyttet på jevnvarmt vev, noe som potensielt forbedrer inntrengingsevnen til fikseringsmediet. Dette gir trolig bedre forutsetninger for god fiksering og et godt histologisk resultat. I PAXgene-protokollen beskrives det at fikseringen skal foregå i romtemperatur (15-25°C). I dette forsøket var forsøksdyrene vekselvarme med temperaturer på 4°C og 8°C, noe som er lave temperaturer i fikseringssammenheng. Fikseringsmediumene var likevel romtempererte og man kan anslå tiden å være kort for at 3 mm tynt vev skal å få samme temperatur som fikseringsmediumet.

Formalin er en løsning med innhold av formalaldehyd (Thavarajah et. al, 2012). Formalaldehyd fikserer vev med kryssbinding av proteiner og man regner med at kryssbindingen av proteinene skjer innen 24-48 timer. PAXgene har et innhold som er unntatt fra offentligheten, men to av stoffene er kjent; metanol og eddiksyre. Metanol er et alkoholmolekyl og et ikke-kryssbindende fikseringsmedium. I stedet fungerer den ved å dehydrere og denaturere proteiner. Forsøk på hjerte av storfe viste at metanol penetrerte vevet raskere enn formalin (Steicke et al., 2018). Man kan derfor anta at autolyse observert i PAXgene ikke har vært forårsaket av en dårligere kjemisk effekt og påfølgende lengre fikseringstid.

At samtlige prøver fiksert med PAXgene viste tegn på forandringer knyttet til autolyse, kan sies å ikke være tilfredsstillende i histologisk sammenheng. Det kan bety at PAXgene ikke fungerer på fiskevev og/eller at forutsetningene i forsøket ikke var tilfredsstillende for denne typen fiksering.

5 Konklusjon

Effekten av temperaturene 4°C og 8°C gjennom tidlig utvikling på hjertet til startfôringsklar atlantisk laks ble undersøkt. Dødelighet, vekt og lengde ble registrert for en vurdering av velferd og vekst. Det ble også utført qPCR for å sammenligne uttrykkelsen av genene NPPA, GATA, troponin, MEF2, MYBPC, NKX2.5 og VEGF i de to temperaturgruppene. Målinger av utvalgte deler i hjertet ble gjennomført ved hjelp av histologiske bilder og dataverktøy. Resultatene viser:

- De to ulike temperaturene hadde ingen signifikant forskjell i dødelighet.
- De to ulike temperaturene hadde ingen signifikant forskjell i lengde.
- Larver inkubert ved 4°C ga en signifikant høyere vekt enn larver inkubert ved 8°C.
- De to ulike temperaturene ga ingen signifikant forskjell i ventrikkelareal, bulbusbredde eller compactumtykkelse.
- Av genene Nppa, GATA, troponin, MEF2, MYBPC, NKX2.5 og VEGF var det kun Nppa som hadde en signifikant forskjell i genuttrykkelse.

Litteratur

- ©Qiagen. (n.d.). PAXgene Tissue FIX. Retrieved May 26, 2020, from <https://www.qiagen.com/no/products/discovery-and-translational-research/sample-collection-stabilization/tissue-ffpe/paxgene-tissue-fix-container-50-ml/#orderinginformation>
- Bartlett, H., Veenstra, G. J. C., & Weeks, D. L. (2010). Examining the cardiac NK-2 genes in early heart development. *Pediatric Cardiology*, *31*(3), 335–341. <https://doi.org/10.1007/s00246-009-9605-0>
- Becker, J. R., Robinson, T. Y., Sachidanandan, C., Kelly, A. E., Coy, S., Peterson, R. T., & MacRae, C. A. (2012). In vivo natriuretic peptide reporter assay identifies chemical modifiers of hypertrophic cardiomyopathy signalling. *Cardiovascular Research*, *93*(3), 463–470. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr350>
- Behera, S. K., & Narayan, S. (2014). Sequence and structural Analysis of β - actin Protein of fishes, using Bioinformatics Tools and techniques. *International Journal of Biosciences (IJB)*, (June), 249–256. <https://doi.org/10.12692/ijb/4.11.249-256>
- 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*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055056>
- Chen, J. N., & Fishman, M. C. (1996). Zebrafish tinman homolog demarcates the heart field and initiates myocardial differentiation. *Development*, *122*(12), 3809–3816.
- Churcott, C. S., Moyes, C. D., Bressler, B. H., Baldwin, K. M., & Tibbits, G. F. (1994). Temperature and pH effects on Ca²⁺ sensitivity of cardiac myofibrils: A comparison of trout with mammals. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *267*(1 36-1). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1994.267.1.r62>
- Dimitriadi, A., Beis, D., Arvanitidis, C., Adriaens, D., & Koumoundouros, G. (2018). Developmental temperature has persistent, sexually dimorphic effects on zebrafish cardiac anatomy. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25991-8>
- Farrell, A. P., & Pieperhoff, S. (2011). Design and physiology of the heart | Cardiac Anatomy in Fishes. In *Encyclopedia of Fish Physiology* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00139-8>
- Fiskeridirektoratet. (2018). *Lønnsomhetsundersøkelse for produksjon av laks og regnbueørret*. Retrieved from <http://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Statistikk-akvakultur/Statistiske-publikasjoner/Loenksomhetsundersokelser-for-laks-og-regnbueoerret>
- Fiskeridirektoratet. (2020). *Biomassestatistikk etter fylke*. Retrieved from <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Biomassestatistikk/Biomassestatistikk-etter-fylke>

- Flashman, E., Korkie, L., Watkins, H., Redwood, C., & Moolman-Smook, J. C. (2008). Support for a trimeric collar of myosin binding protein C in cardiac and fast skeletal muscle, but not in slow skeletal muscle. *FEBS Letters*, *582*(3), 434–438. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.01.004>
- Franklin, B. Y. 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*(1), 139–148.
- Fraser, T. W.K., Hansen, T., Fleming, M. S., & Fjelldal, P. G. (2015). The prevalence of vertebral deformities is increased with higher egg incubation temperatures and triploidy in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, *38*(1), 75–89. <https://doi.org/10.1111/jfd.12206>
- Fraser, Thomas W K. (2014). *Deformities and morphology of the heart and skeleton in triploid Atlantic salmon : The influence of production ...*
- Gamperl, A. K., & Farrell, A. P. (2004). Cardiac plasticity in fishes: Environmental influences and intraspecific differences. *Journal of Experimental Biology*, *207*(15), 2539–2550. <https://doi.org/10.1242/jeb.01057>
- Garseth, Å. H., Svendsen, J., Fritsvold, C., & Mikalsen, A. B. (2017). *Kardiomyopatisyndrom (CMS) hos laks.*
- Genetics, B. (n.d.). *Klekkerihåndbok for oppdrett av Atlantisk laks - fra rogn til startføring.* Retrieved from https://www.benchmarkplc.com/wp-content/uploads/2019/08/Atlantic-Salmon-Hatchery-Manual_A5_NO.pdf
- George, J., Van Wettere, A. J., Michaels, B. B., Crain, D., & Lewbart, G. A. (2016). Histopathologic evaluation of postmortem autolytic changes in bluegill (*Lepomis macrochirus*) and crappie (*Pomoxis anularis*) at varied time intervals and storage temperatures. *PeerJ*, *2016*(4). <https://doi.org/10.7717/peerj.1943>
- George, V., Colombo, S., & Targoff, K. L. (2015). An early requirement for nkx2.5 ensures the first and second heart field ventricular identity and cardiac function into adulthood. *Developmental Biology*, *400*(1), 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.12.019>
- Gillis, T. E. (2011). Design and physiology of the heart | Cardiac Excitation-Contraction Coupling: Calcium and the Contractile Element. In *Encyclopedia of Fish Physiology* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00176-3>
- Gollock, M. J., Currie, S., Petersen, L. H., & Gamperl, A. K. (2006). Cardiovascular and haematological responses of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to acute temperature increase. *Journal of Experimental Biology*, *209*(15), 2961–2970. <https://doi.org/10.1242/jeb.02319>
- Gordon, A. M., Homsher, E., & Regnier, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological Reviews*, *80*(2), 853–924. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.853>
- Gorodilov, Y. N. (1996). *Description of the early ontogeny of the Atlantic salmon , Salmo salar , with a novel system of interval (state) identification.* (1944), 109–127.

- Graham, M. S., & Farrell, A. P. (1989). The Effect of Temperature Acclimation and Adrenaline on the Performance of a Perfused Trout Heart. *Physiological Zoology*, *62*(1), 38–61. <https://doi.org/10.1086/physzool.62.1.30159997>
- Graham, M. S., & Farrell, A. P. (1992). Environmental influences on cardiovascular variables in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Biology*, *41*(5), 851–858. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1992.tb02713.x>
- Grassini, D. R., Legendijk, A. K., De Angelis, J. E., Da Silva, J., Jeanes, A., Zettler, N., ... Smith, K. A. (2018). Nppa and nppb act redundantly during zebrafish cardiac development to confine AVC marker expression and reduce cardiac jelly volume. *Development (Cambridge)*, *145*(12). <https://doi.org/10.1242/dev.160739>
- Grøntvedt, R., Nerbøvik, I. K., Viljugrein, H., Lillehaug, A., Nilsen, H., & Gjevre, A. G. (2015). Termisk avlusning av laksefisk - dokumentasjon av fiskevelferd og effekt. *Rapport 13*, 1–33. Retrieved from <http://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2015/termisk-avlusning-av-laksefisk-dokumentasjon-av-fiskevelferd-og-effekt>
- Holmes, D. I. R., & Zachary, I. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: Angiogenic factors in health and disease. *Genome Biology*, *6*(2). <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-2-209>
- Holtzinger, A., & Evans, T. (2006). Erratum: Gata4 regulates the formation of multiple organs (*Development* vol. 132 (4005-4014)). *Development*, *133*(1), 181. <https://doi.org/10.1242/dev.02227>
- Houweling, A. C., Van Borren, M. M., Moorman, A. F. M., & Christoffels, V. M. (2005). Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene Nppa during development and disease. *Cardiovascular Research*, *67*(4), 583–593. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.06.013>
- Icardo, J. M. (2012). The Teleost Heart: A Morphological Approach. In D. Sedmera & T. Wang (Eds.), *Ontogeny and Phylogeny of the Vertebrate Heart* (pp. 35–44). Springer International Publishing.
- Jørgensen, S. M., Castro, V., Krasnov, A., Torgersen, J., Timmerhaus, G., Hevrøy, E. M., ... Takle, H. (2014). Cardiac responses to elevated seawater temperature in Atlantic salmon. *BMC Physiology*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6793-14-2>
- Kap, M., Smedts, F., Oosterhuis, W., Winther, R., Christensen, N., Slotta-huspenina, J., ... Riegman, P. (2011). *Histological Assessment of PAXgene Tissue Fixation and Stabilization Reagents*. *6*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027704>
- Keen, A. N., Klaiman, J. M., Shiels, H. A., & Gillis, T. E. (2017). Temperature-induced cardiac remodelling in fish. *Journal of Experimental Biology*, *220*(2), 147–160. <https://doi.org/10.1242/jeb.128496>
- 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*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024464>

- Kryvi, Harald, Poppe, T. (2016a). Sirkulasjonssystemet - Blodceller. In *Fiskeanatomi* (pp. 75–76). Fagbokforlaget.
- Kryvi, Harald, Poppe, T. (2016b). Sirkulasjonssystemet - Hjertet. In *Fiskeanatomi* (pp. 80–83). Fagbokforlaget.
- Li, J., Chen, W., Wang, D., Zhou, L., Sakai, F., Guan, G., & Nagahama, Y. (2012). GATA4 is involved in the gonadal development and maturation of the teleost fish tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Reproduction and Development*, *58*(2), 237–242. <https://doi.org/10.1262/jrd.11-131S>
- Lin, Q., Schwarz, J., Bucana, C., & Olson, E. N. (1997). Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science*, *276*(5317), 1404–1407. <https://doi.org/10.1126/science.276.5317.1404>
- Mohammadi, M., & Zinkle, A. (2018). A threshold model for receptor tyrosine kinase signaling specificity and cell fate determination [version 1; referees: 4 approved]. *F1000Research*, *7*(0), 1–15. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14143.1>
- Mukundan, M. K., Antony, P. D., & Nair, M. R. (1986). A review on autolysis in fish. *Fisheries Research*, *4*(3–4), 259–269. [https://doi.org/10.1016/0165-7836\(86\)90007-X](https://doi.org/10.1016/0165-7836(86)90007-X)
- O. Thellin a, b, W. Zorzi a, *, B. Lakaye c, & B. De. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and. *Journal of Biotechnology*, *75*, 291–295.
- Ojanguren, A. F., Reyes-Gavilán, F. G., & Rodríguez Muñoz, R. R. (1999). Effects of temperature on growth and efficiency of yolk utilisation in eggs and pre-feeding larval stages of Atlantic salmon. *Aquaculture International*, *7*(2), 81–87. <https://doi.org/10.1023/A:1009214804949>
- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Jordal, A. E. O., Nilsen, T. O., & Hordvik, I. (2005). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*, *6*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-6-21>
- Pavlov, D. A. (1984). Effect of temperature during early ontogeny of Atlantic salmon, *Salmo salar*. 1. Variability of morphological characters and duration of development of Atlantic salmon under different temperatures. *Journal of Ichthyology*, *24*(6), 30–38.
- Petersen, P. H., Sandberg, S., Fraser, C. G., & Goldschmidt, H. (2000). A model for setting analytical quality specifications and design of control for measurements on the ordinal scale. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *38*(6), 545–551. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2000.080>
- Pfaffl, M. W. (1984). Quantification strategies in real-time PCR. *Journal of Geophysical Research*, *89*(A5), 2945–2954. <https://doi.org/10.1029/JA089iA05p02945>
- Pomara, C., B. Karch, S., & Fineschi, V. (2010). *Forensic autopsy - A Handbook and Atlas* (C. Pomara, S. B. Karch, & V. Fineschi, Eds.). Taylor & Francis Group.
- Poppe, T., Johansen, R., Sverdrup, A., Helle, K. B., Kongtorp, R. T., Krogdahl, Å., ... Brun, E. (2004). “Hjerte-rapporten” 2004. Rapport om hjertelidelser hos laks og regnbueørret.

- 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*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57(1–2), 103–108. <https://doi.org/10.3354/dao057103>
- Poppe, T. T., & Taksdal, T. (2000). Ventricular hypoplasia in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 42(1), 35–40. <https://doi.org/10.3354/dao042035>
- Portz, D. E., Woodley, C. M., & Cech, J. J. (2006). Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 16(2), 125–170. <https://doi.org/10.1007/s11160-006-9012-z>
- Rooban Thavarajah, Vidya Kazhiyur Mudimbaimannar, Joshua Elizabeth, Umadevi Krishnamohan Rao, and K. R. (2012). *Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3519217/>
- Rosten, T., Åtland, A., Kristensen, T., Rosseland, B. O., & Braathen, B. (2004). *Vannkvalitet relatert til dyrevelferd*.
- S. Suvarna, Kim Layton, Christopher D. Bancroft, J. (2018). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*.
- Saltveit, S. J., & Brabrand, Å. (2013). Incubation, hatching and survival of eggs of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in spawning redds influenced by groundwater. *Limnologia*, 43(5), 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2013.05.009>
- Sommerset, I. (2020). *Fiskehelsesrapporten 2019*.
- Sprague, J. (2006). The Zebrafish Information Network: the zebrafish model organism database. *Nucleic Acids Research*, 34(90001), D581–D585. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj086>
- Steicke, M., Yang, G., Dinh, T. N., Dunster-Jones, M., Sargisson, O., Ahmady, F., ... Wang, Y. (2018). The penetration of methanol into bovine cardiac and hepatic tissues is faster than ethanol and formalin. *European Journal of Histochemistry*, 62(1), 1–6. <https://doi.org/10.4081/ejh.2018.2880>
- Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V. K., Elizabeth, J., Rao, U. K., & Ranganathan, K. (2012). Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 16(3), 400–405. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.102496>
- Torgersen, J. S., Takle, H., & Andersen, Ø. (2010). Differential spatial expression of mef2 paralogs during cardiac development in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 158(2), 181–187. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.11.006>
- Viegas, I., Carvalho, R. de A., Pardal, M. Â., & Jone, J. G. (2012). 2.4 Lifestyle demands. In H. Türker (Ed.), *New Advances and Contributions to Fish Biology* (p. 225).
- Warren, S. A., Terada, R., Briggs, L. E., Cole-Jeffrey, C. T., Chien, W.-M., Seki, T., ... Kasahara, H. (2011). Differential Role of Nkx2-5 in Activation of the Atrial Natriuretic

- Factor Gene in the Developing versus Failing Heart. *Molecular and Cellular Biology*, 31(22), 4633–4645. <https://doi.org/10.1128/mcb.05940-11>
- Witeska, M. (2013). Erythrocytes in teleost fishes: A review. *Zoology and Ecology*, 23(4), 275–281. <https://doi.org/10.1080/21658005.2013.846963>
- Yadav, A. B., Angadi, P. V., Kale, A. D., & Yadav, S. K. (2015). Histological assessment of cellular changes in postmortem gingival specimens for estimation of time since death. *Journal of Forensic Odonto-Stomatology*, 33(1), 19–26.
- Ytteborg, E., Baeverfjord, G., Torgersen, J., Hjelde, K., & Takle, H. (2010). Molecular pathology of vertebral deformities in hyperthermic atlantic salmon (*Salmo Salar*). *BMC Physiology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6793-10-12>
- Zucker, S. (2011). Cardiac Jelly and Its Roles in Heart Development. *The Science Journal of the Lander College of Arts and Sciences*, 4(4), 23–29. Retrieved from <https://touro scholar.touro.edu/cgi/viewcontent.cgi?referer=https://www.google.co.uk/&httpsredir=1&article=1164&context=sjlcas>

Vedlegg I

Tabell 10: Snittsamling av prøver brukt i oppgaven. Samtlige snitt er farget med HE-farging. Rød kolonne indikerer gruppe 8°C, blå kolonne indikerer gruppe 4°C. FISK ID = prøvenavn. Fiksering = fikseringsmedium, måling = måling av hjertekomponent, vurdering = vurdering av fikseringsmedium, serie = seriemåling. # indikerer nummer i seriesnitt. x indikerer prøve inkludert i undersøkelse. Fig. = figur.

FISK ID	Fiksering	Måling	Vurdering	Serie	Annet
44px #33	PAXgene	x	x		
45px #17	PAXgene	x	x		Fig. 10C
47px #21	PAXgene	x			Fig. 10D
48px #20	PAXgene	x			
50px #35	PAXgene	x	x		
52px #6	PAXgene	x			Fig. 10B
54px #17	PAXgene		x		Fig. 13
54px #25	PAXgene	x			
56px #18	PAXgene		x		fig. 17A
56px #76	PAXgene	x			
63px #11	PAXgene	x			
66px #39	PAXgene	x			Fig. 10A
68px #11	PAXgene	x			
70px #30	PAXgene	x	x		Fig. 15A
31F #10	Formalin				Fig. 17B
31F #49	Formalin		x		Fig. 15B
36F #17	Formalin		x		Fig. 16
135px #47	PAXgene	x			
144px #54	PAXgene	x			
146px #43	PAXgene	x			
152px #32	PAXgene	x			
155px #145	PAXgene	x			Forsidebilde
155px #137	PAXgene			x	Fig. 11A
155px #138	PAXgene			x	Fig. 11B
155px #139	PAXgene		x	x	Fig. 16A, 11C
144px #143	PAXgene			x	Fig. 11D
155px #91	PAXgene	x			
158px #14	PAXgene	x			
160px #31	PAXgene	x			
162px #30	PAXgene	x			
167px #31	PAXgene	x			
168px #51	PAXgene	x			
106F #29	Formalin		x		Fig. 14
130F #19	Formalin		x		

Vedlegg II

Tabell 11: Oversikt over gjennomsnittlige Ct-verdier. FISK ID er prøvenavn. Rød kolonne indikerer gruppe 8°C, blå kolonne indikerer gruppe 4°C.

FISK ID	Nppa	GATA	Troponin	MEF2	MYBPC	NKX2.5	VEGF
1RNA	26,86	30,61	30,66	30,44	25,66	28,59	32,30
2RNA	26,56	29,29	30,02	29,33	24,75	26,56	30,28
3RNA	26,51	30,52	30,08	30,13	25,90	28,11	32,31
4RNA	26,37	28,80	28,01	28,56	24,29	28,28	32,14
5RNA	25,89	30,21	30,32	29,61	25,05	26,96	31,63
6RNA	27,87	31,00	29,31	29,60	25,97	27,44	31,65
7RNA	27,60	30,70	30,71	30,22	26,09	29,60	34,43
8RNA	26,93	29,92	28,95	28,85	24,98	27,53	31,70
9RNA	26,89	30,04	28,36	29,31	24,95	27,94	32,70
10RNA	27,83	31,53	31,97	30,62	27,40	27,76	32,95
11RNA	28,30	32,11	31,56	30,70	27,62	29,25	33,50
12RNA	27,07	31,46	31,57	30,32	26,50	29,35	33,38
13RNA	29,98	30,86	34,15	29,46	28,09	29,02	33,69
14RNA	27,25	30,45	29,77	29,36	25,42	27,86	31,94
15RNA	30,26	30,57	32,68	29,92	27,92	28,53	33,29
16RNA	29,27	29,81	32,93	29,30	27,87	27,29	32,09
17RNA	26,16	29,57	29,66	29,17	24,70	28,06	31,76
19RNA	23,90	27,26	27,45	26,70	22,15	25,36	28,89
20RNA	26,31	29,25	29,22	28,43	24,93	27,75	32,01
21RNA	26,77	30,15	30,07	29,63	26,21	29,11	32,86
22RNA	28,95	32,02	32,45	31,10	27,33	29,91	34,62
23RNA	27,45	30,48	31,28	29,05	26,84	28,97	33,33
FISK ID	Nppa	GATA	Troponin	MEF2	MYBPC	NKX2.5	VEGF
75RNA	27,58	31,48	31,02	29,94	26,25	30,27	34,23
76RNA	29,32	32,41	31,63	31,54	27,92	30,29	35,75
77RNA	27,84	31,91	30,78	30,12	26,55	29,49	34,96
80RNA	24,05	27,95	28,35	26,59	23,59	25,75	29,98
81RNA	24,22	27,95	28,99	27,11	24,45	26,57	30,30
84RNA	27,44	31,29	32,19	29,64	26,34	27,98	32,93
85RNA	25,54	29,69	29,69	28,54	24,83	26,61	31,51
86RNA	26,53	30,36	32,08	29,25	25,74	28,48	33,73
88RNA	26,54	30,41	31,38	29,90	26,03	30,43	35,28
89RNA	25,81	29,64	29,29	28,22	25,14	27,64	32,31
90RNA	26,50	30,06	30,24	29,56	25,51	26,81	31,89
91RNA	26,61	31,11	29,98	29,18	25,87	28,31	32,90
93RNA	26,21	30,64	31,19	29,71	25,90	27,98	31,92
94RNA	27,41	28,83	29,44	28,02	24,61	26,17	31,31
95RNA	25,96	29,17	29,37	28,04	24,90	27,11	31,08
96RNA	26,69	28,45	30,19	28,37	25,14	27,01	31,47
97RNA	26,34	28,61	29,22	27,71	24,35	26,76	31,67
98RNA	25,70	31,38	31,89	30,32	26,27	28,74	33,62
99RNA	27,61	30,74	31,12	30,24	26,52	28,81	33,83
100RNA	26,83	30,25	30,70	29,53	26,02	28,53	31,44
101RNA	26,48	29,64	30,04	29,47	26,09	27,61	30,91
102RNA	26,59	30,88	31,53	30,49	26,74	26,66	31,09
103RNA	27,22	29,33	30,59	29,20	25,66	26,42	30,75

