



UiT Norges arktiske universitet

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Norges fiskerihøgskole

**Effekt av ulike temperaturregimer på hjerteutvikling hos Atlantisk laks
(*Salmo salar* L.) i resirkuleringsanlegg (RAS)**

Morfologiske og molekylære ulikheter

Camilla Jacobsen

Masteroppgave i akvamedisin, BIO-3955, mai 2024

Forord

Denne masteroppgaven er skrevet som en avslutning på min tid som student ved UiT. Gjennom studiet i akvamedisin har det hele veien vært oppdrett i settefiskfasen og produksjonsrelaterte lidelser som har fanget min interesse. Å forebygge sykdom og jobbe for bedre fiskehelse vil være mitt største mål i min kommende jobb som fiskehelsebiolog. Da vi skulle velge tema for masteroppgaven var det dette som lå til grunn for valg av tema, og heldigvis fant jeg veiledere som delte interessefelt og engasjement med meg.

November 2023 ble det klart at det opprinnelige prosjektet jeg skulle delta på, måtte utsettes og jeg måtte derfor bytte oppgave. Av den grunn har det siste halve året vært mer enn intenst. Heldigvis har arbeidet vært interessant og givende, og med veiledere som hele veien har lagt til rette for at jeg skulle komme i mål med oppgaven. Jeg vil derfor rette en stor takk til mine veiledere:

Takk til hovedveileder Jelena Kolarevic som hele veien har hatt tro på meg og oppgaven min. Dine oppløftende ord og positive innstilling har hjulpet meg til å jobbe godt og målrettet gjennom våren. Takk til biveileder og statistikk guru Bjørn Steinar og Anja Striberny ved Nofima som begge har måtte forklare meg ting jeg absolutt ikke har forstått. Jeg vil også takke Hanne Brenne og Malene Soleng ved Akvalab på Nofima for å ha gjort lab-arbeidet til en hyggelig opplevelse. Jeg håper jeg treffer dere alle igjen i min videre karriere.

Sist, men ikke minst, vil jeg takke PhD og biveileder Marsela Alvaopoulou. Marsela har fulgt meg gjennom hele oppgaven og vært en god diskusjons- og samarbeidspartner. Marsela har tilpasset sitt eget arbeid, og jobbet kvelder og helger, for at jeg skulle komme i mål med min oppgave. Tusen takk Marsela!

I tillegg må det deles ut takknemlighet er de som har hjulpet til på hjemmebane: Takk til mamma for korrekturlesing, til Mikkel (1,5 år) for å ha hjulpet meg til å utnytte tiden godt og takk til verdens fineste samboer, Jørn, som har fungert både som husfar og superpappa i perioden.

Camilla Jacobsen
Tromsø, mai 2024

Sammendrag

Økt dødelig i oppdrettsnæringen ansees som et betydelig problem både for omdømme, økonomi og mest av alt for fiskevelferden. Det spekuleres i om nedsatt smoltkvalitet grunnet intensiv drift i settefiskfasen kan være en medvirkende årsak til den økende dødeligheten.

Oppdrett av settefisk i RAS kommer med en rekke fordeler, men det er lite studert hvilken påvirkning ulike miljøfaktorer i RAS har for den fysiologiske utvikling til laksen.

Temperatur, som er en av de viktigste innsatsfaktorene i RAS, er forbundet med høyere veksthastighet og dermed mer lønnsom drift. Denne oppgaven tar derfor for seg laks som er produsert på 8 °C, 12 °C og 14 °C fra startfôring (ca. 10 gram) og frem til fisken er ferdig smoltifisert. Funnene i denne oppgaven viser at fisk produsert på 12 °C og 14 °C har høyere vekstrate enn fisk produsert på 8 °C. Tykkelsen på kompaktum øker også signifikant for temperaturgruppe 12 og 14, men for temperaturgruppe 14, utvikler fisken et kompaktum tynnere relativt til fiskens vekt. Vekst i hjerte kan karakteriseres som fysiologisk eller patologisk. Temperaturgruppe 14 har utviklet et signifikant rundere hjerte, og har ett forhøyet uttrykk av hjertemarkøren *anp*. Begge disse funnene er sett i sammenheng med patologisk utvikling. Likevel er det ikke funnet ulikhet i kardiosomatisk index eller sykdomsmarkøren *bnp* som svekker mistanken om patologi. Med utgangspunkt i funnene i denne oppgaven vil det være naturlig å foretrekke produksjon av laks i RAS på 12 °C. Da får man de positive effektene av temperatur knyttet til vekst, samtidig som man unngår potensiell utvikling av negativ hjertehelse.

Forkortelser

RAS	Resirkulerende akvakultursystem
FHF	Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering
<i>anp</i>	<i>A-type natriuretic peptide</i>
<i>bnp</i>	<i>B-type natriuretic peptide</i>
<i>pcna</i>	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
SGR	Specific Growth Rate
TGC	Thermal growth coefficient)
CSI	Cardio somatic index
PCR	Polymerase chain reaction
RT	Reverse transcriptase
qPCR	Quantitative PCR
Ct	Terskelsyklus
mRNA	Messenger RNA
ANOVA	Variansanalyse
rpm	Omdreiningshastighet
NCBI	National Center for Biotechnology Information

Innholdsfortegnelse

1	Oppgavens bakgrunn og problemstilling	1
1.1	Oppdrett i settefiskfasen	2
1.1.1	Resirkuleringsanlegg	2
1.1.2	Temperatur som innsatsfaktor i produksjon av settefisk.....	3
1.2	Utvikling og betydningen av et friskt hjerte.....	3
1.2.1	Hjertets fysiologi og anatomi	3
1.2.2	Temperaturpåvirkning på utvikling av laksehjertet	5
1.3	Molekylære indikatorer på hjertesykdom	5
1.4	Problemstilling	6
2	Materialer og metode	8
2.1	Forsøksdesign og fisk.....	8
2.1.1	Prøveuttak.....	9
2.2	Beregning av vekstrelaterede data	9
2.3	Histologi	10
2.3.1	Dehydrering.....	10
2.3.2	Trimming og veiing.....	10
2.3.3	Vevsprosessering.....	11
2.3.4	Innstøping	12
2.3.5	Farging	13
2.3.6	Skanning.....	13
2.3.7	Valg av snitt til målinger	13
2.3.8	Morfometriske målinger.....	14
2.4	Genuttrykk.....	15
2.4.1	Valg av gener	16
2.4.2	RNA-ekstraksjon.....	16
2.4.3	cDNA	17

2.4.4	Standardkurver	17
2.4.5	Databehandling.....	18
2.5	Statistiske analyser	19
3	Resultat.....	20
3.1	Vekstdata.....	20
3.2	Histologi	22
3.3	RT-qPCR.....	25
4	Diskusjon.....	27
4.1	Har temperaturene brukt i forsøket påvirket individ- og hjertevekst?	27
4.2	Vekst i hjertets kompakte lag	28
4.3	Kan den observerte veksten betegnes som fysiologisk eller patologisk?.....	28
4.4	Andre faktorer som kan ha påvirket resultatet	30
4.5	Diskusjon av metode	30
4.5.1	Sammenligningsgrunnlag	30
4.5.2	Genuttrykk.....	30
4.5.3	Unøyaktigheter ved histologi som metode.....	31
4.6	Til ettertanke	32
5	Konklusjon	34
	Referanseliste	35
	Vedlegg I – Primersekvenser	i
	Vedlegg II -Resultat fra standardkurve	ii
	Vedlegg III – Gel-elektroforese	iii
	Vedlegg IV – Ct-verdier.....	iv

Tabelliste

Tabell 1: Protokoll for prosessering av vevsprøver	12
Tabell 2: Primere benyttet i forsøket.....	16
Tabell 3: Komponenter brukt i hver enkelt qPCR-reaksjon.....	18
Tabell 4: Gjennomsnittsvekt \pm SEM ved start av forsøket (S1) og ved uttak (S4).....	20
Tabell 6: Primersekvenser for de ulike genene som er testet	i
Tabell 7: Resultat fra standardkurve	ii
Tabell 8: Resultat fra qPCR fremstilt ved hjelp av gel-elektroforese	iii
Tabell 9: Ct verdier for de ulike genene.....	iv

Figurliste

Figur 1: Skjematisk tegning av laksehjertets fire kamre delt medialt.	5
Figur 2: Bilde A: Trimming av atrium og veiing av resten av hjertet.....	11
Figur 3: Viser hvordan hjertene ble orientert under støpning i parafinvoks.	12
Figur 4: Viser hvordan måling av bulbus-bredde ble gjennomført.	14
Figur 5: Oversikt over hvordan morfometriske målingen ble gjennomført.	15
Figur 6: CSI for fisk tatt ut til histologi prøver ved uttak S4.	21
Figur 7: Vekst i kompaktum målt histologisk.....	22
Figur 8: Høyde: bredde – ratio.	23
Figur 9: Histologiske snitt av hjerter	24
Figur 10: Relativt genuttrykk av anp og bnp.....	25
Figur 11: Relativt genuttrykk for hjertemarkøren pcna	26

1 Oppgavens bakgrunn og problemstilling

God fiskehelse bør være grunnlaget i ethvert fiskehold. Verdens helseorganisasjon definerer helse som en *tilstand av komplett fysisk (...) velvære og ikke bare fravær av sykdom eller lidelse*. Definisjonen er ment for mennesker, men kan være et fint utgangspunkt for å omtale god helse hos fisk. For å oppnå god fiskehelse, må vi i tillegg til å diagnostisere og behandle allerede oppståtte sykdommer, også jobbe forebyggende, og legge til rette for at fisken skal ha gode fysiologiske forutsetninger. For å oppnå dette kreves det en del kunnskap hos alle involverte i oppdrettsnæringen.

I 2023 døde 62,8 millioner laks i merdene. Det tilsvarer 16,7% av all sjøsatt fisk og er de høyeste tallene som noen gang er registrert (1). Tallene tyder på et alvorlig velferdsproblem som i tillegg har store økonomiske konsekvenser. God fiskevelferd har økende betydning for omdømmet av oppdrettslaks både i det norske markedet, men også globalt. Nærings- og fiskeridepartementet oppgir derfor fiskehelse og -velferd som viktig satsningsområde i havbruksforskningen og ønsker at Norge skal være foregangsland for god fiskehelse og -velferd (2).

Hjertesykdom beskrives som et økende problem i oppdrettsnæringen, og det rapporteres i økt grad om at problemstillinger knyttet til hjertelidelser og sirkulasjonsforstyrrelser hos fisk som dør i forbindelse med stressende intervensjoner (3). Som eksempel er det observert at fisk med avvikende hjertemorfologi er de første som viser tegn til utmattelse under operasjoner der trening og behandling er involvert (4). Det kan derfor være naturlig å tenke at fisk med utfordringer knyttet til hjertehelse er svakere og har større sjanse for å dø i løpet av produksjonssyklusen. Det er i oppdretters interesse at flest mulig fisk overlever produksjonen og kan sendes til slakt. Å kartlegge hvilke faktorer som har betydning for god hjertehelse kan ha betydning både for fiskens helse og velferd, men også for en god og bærekraftig økonomi for oppdretter.

Intensiv drift i settefiskfasen er foreslått som en av årsaken til hjertelidelsene observert hos oppdrettslaks (3). Tidligere forsøk har vist intensiv drift under smoltifisering har en negativ påvirkning på laksen velferd og overlevelse i sjøvannsfasen. (3). Med intensiv drift menes i denne sammenheng et produksjonsregime med bruk av relativt høy vanntemperatur og lys for å fremme rask vekst.

1.1 Oppdrett i settefiskfasen

Det første delen av produksjon av laks foregår i settefiskanlegg. I denne fasen er fisken fysiologisk tilpasset et liv i ferskvann, og den holdes derfor i landbaserte anlegg med ferskvannstilgang. I slutten av settefiskfasen, vil laksen smoltifisere eller sjøvannstilpasses, før den er klar til å flyttes over til sjø. Tradisjonelt har slik produksjon foregått i gjennomstrømningsanlegg der vann brukes kun en gang, før det slipper ut i resipient. Dette krever tilgang til en ferskvannskilde av betydelig størrelse. Ferskvann kan være en begrenset ressurs, og vannkvaliteten og vannmengde vil variere gjennom året (5). Med tiden har det blitt vanligere med resirkulerende akvakultursystemer (RAS), som krever mindre tilførsel av vann og der vannkvaliteten kan holdes mer stabil (5).

I settefiskfasen legges grunnlaget for at laksen skal kunne møte de utfordringene som måtte oppstå senere i livet. Å ha kunnskap om hvilke forhold som legger til rette for en fordelaktig fysiologisk utvikling hos laks i denne fasen, kan være viktig for å få ned dødelighet i både settefisk- og sjøvannsfasen, samt å styrke fiskehelsen gjennom hele produksjonsløpet.

1.1.1 Resirkuleringsanlegg

I RAS gjenbrukes vannet fra produksjonen. For at dette skal la seg gjøre må det brukte vannet renses for avfallsstoffer, og tilføres oksygen, før det føres tilbake til fiskekarene. Graden av gjenbruk varierer, og i de mest effektive tilfellene holder det å tilføre den mengden av det vannet som fordampes fra systemet (4).

En av fordelene med RAS er at man har stor kontroll over vannmiljøet fisken lever i. Det er mulig å skape et stabilt miljø med vannkvalitet som spiller på lag med fisken og kan gi høyere vekst enn i gjennomstrømningsanlegg (5). Dette fordrer at man har kunnskap om hvilket vannmiljø som fremmer vekst uten å gå på bekostning av fiskens egen fysiologi.

Etter hvert som næringen har utviklet seg har det blitt et større fokus på å redusere tiden det tar å produsere sjøklar settefisk (smolt). Dette kan være nødvendig for at produksjonen skal holdes økonomisk bærekraftig. RAS-teknologi har vært med å drive denne utviklingen da man i større grad, og med mindre energi, kan styre temperaturen. Effektive settefiskanlegg kan bruke så lite som seks måneder på å produsere 100grams smolt ved hjelp av høy vanntemperatur (4).

1.1.2 Temperatur som innsatsfaktor i produksjon av settefisk

I et gjennomstrømningsanlegg vil inntaksvannet holde samme temperatur som ferskvannskilden og temperaturen i fiskekarene vil dermed variere med sesong. Å øke eller senke temperaturen på dette vannet er svært energikrevende, og dermed kostbart. I RAS vil temperaturen naturlig øke gjennom produksjonssyklusen grunnet energi som frigjøres fra fiskens metabolisme, aktivitet i biofilteret og friksjonsvarme fra pumper og andre tekniske installasjoner (6). Vanntemperatur i RAS, som ligger i isolerte bygninger, kan være 5 °C høyere enn temperaturen på råvannet (7). Dette gjør at det vil være mindre behov for å varme opp vannet enn i et gjennomstrømningsanlegg, og produksjon av smolt kan foregå ved høyere temperaturer uten ekstra kostnad. I motsatt fall, i sommermånedene når omkringliggende miljø er varmt, vil det være kostbart om behovet for å senke temperaturen skulle oppstå (5). Likevel gjør oppdrett i RAS det mulig å produsere fisk under stabile temperaturforhold og muliggjør og regulerer temperaturen til et nivå som er gunstig for fisken. Det er derfor spesielt viktig å undersøke hvordan ulike temperaturer påvirker fiskehelse i RAS, slikt at det kan etableres konkrete anbefalinger.

1.2 Utvikling og betydningen av et friskt hjerte

Å ha et sterkt hjerte er viktig for laksens helse og velferd. Det vil hjelpe den i den krevende overgangen fra ferskvann til sjøvann, og i møte med sykdom og andre situasjoner med økt stress som oppstår i sjøvannsfasen. Grunnlaget for et sterkt hjerte legges i settefiskfasen, og miljøforholdene her vil kunne påvirke den morfologiske utviklingen av hjertet (3). Det er derfor viktig å vite noe om hvilke miljømessige forhold som ligger til rette for et godt utviklet hjerte, og hvilke forhold som eventuelt ikke gjør det.

Villaks er tilpasset et liv der den skal vandre over store avstander, men også kunne utvikle kraft for å passere strie elver og fosser. For å tåle belastningen som dette levesettet medfører, har villaksen utviklet et pyramideformet hjerte. En slik hjerterform er typisk for aktive fiskearter (8). Hos oppdrettslaks ser man ofte avvikende fasong og plassering på hjertet. Hjertet er dessuten mindre enn hos villaksen. Man kan derfor anta at et slikt hjerte vil ha dårligere forutsetning for å møte stressende situasjoner som sykdom, håndtering og ikke-medikamentell avlusning (4).

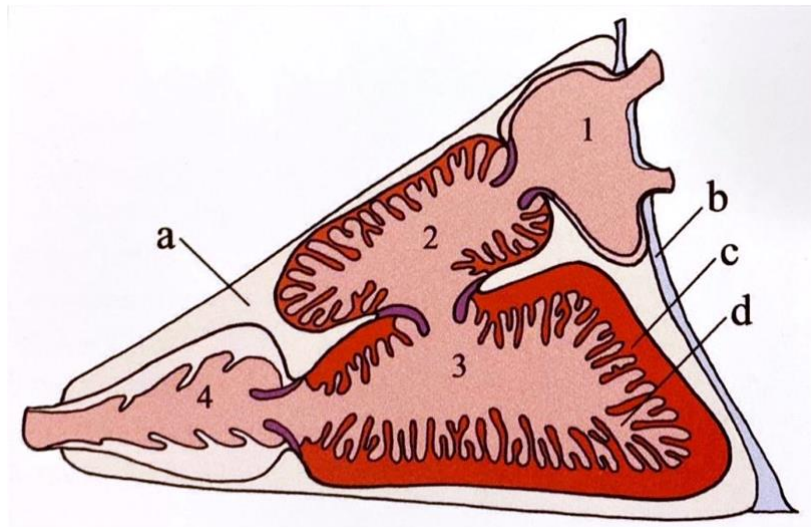
1.2.1 Hjertets fysiologi og anatomi

Hjertet spiller en sentral rolle i kroppens sirkulasjonssystem der det utvikler den kraften som skal til for å pumpe blod gjennom kroppens sirkulasjonssystem. Hovedoppgaven til

sirkulasjonssystemet er å forsyne kroppens vev med oksygen, og å transportere karbondioksid fra vev til gjeller der det blir fjernet fra kroppen ved hjelp av gassutveksling. I tillegg transporterer sirkulasjonssystemet næringsstoffer, hormoner og immunkomponenter rundt i kroppen. For de fleste fisk utgjør hjertet bare 0,1% av kroppsmassen. Aktiv fisk, og kaldtvannstilpassede arter, har derimot større hjerter for å møte disse kravene. Hjertets ventrikkel er hos fisk nokså plastisk (i motsetning til menneskets) og kan øke eller minske i masse når det kreves (4).

Fiskehjertet består av fire kamre med ulike funksjoner som ligger etter hverandre. Blodet entrer hjertet gjennom sinus venosus (Figur 1), der det samles opp før det støtvis entrer hjertets neste kammer, atriet. Atriet er relativt tynnvegget, med tallrike hjertemuskelceller ordnet i trabekler. Det indre laget av atriet inneholder tallrike makrofager og har derfor en immunologisk betydning. Når hjertet slår, vil muskulaturen i trabeklene forkortes, og veggene i atriet trekkes seg sammen, og dermed skyve blodet over i neste kammer, ventrikkelen. Ventrikkelen består hos laksefisk av to muskulære lag; ett indre lag kalt spongiosum og ett ytre lag kalt kompaktum. Som atriet, består også spongiosum av en rekke trabekler. Disse er tykkere enn i atriet, og ventrikkelen mangler derfor et egentlig sentralt lumen (9).

Ventrikkelens ytre lag, kompaktum, har en tettere struktur av muskelfibre, og det er her kraften i hjerteslagene dannes. Tykkelsen på kompaktum modelleres etter belastningen fisken utsettes for (10). Der høyere belastning medfører behov for større kraft i hjerteslagene, og dermed en tykkere hjertevegg. Tykkelsen på kompaktum øker med alder og er tykkere hos hannfisk (11). Det siste kammeret kalles bulbus arteriosus (heretter bulbus) og skal jevne ut trykket som dannes mellom ventrikkelen og ventralaorta. De fire hjertekamrene ligger i perikardhulen som er skilt fra bukhulen med en kraftig vegg av bindevev kalt septum transversum (9).



Figur 1: Skjematisk tegning av laksehjertets fire kamre delt medialt. 1: Sinus venosus. 2: Atrium. 3: Ventrikkel. 4: Bulbus arteriosus. a: perikardhulen. b: septum transversum. c: kompaktum. d: spongiosum. Hentet fra boka Fiskeanatomi (9)

1.2.2 Temperaturpåvirkning på utvikling av laksehjertet

Laksefisk er ektoterme, og kroppstemperaturen bestemmes av temperaturen i miljøet den lever i (12). Laksefisk må likevel ha en tilpasning til ulike temperaturer og dette skjer gjennom endring i metabolisme, vekst, kjønnsmodning, smoltifisering og andre interne prosesser (13). Som tidligere nevnt er hjertets ventrikkel plastisk, og kan naturlig endre seg etter behov. Det innebærer at hjertet remodelleres for å møte endrende miljøfaktorer som for eksempel temperatur (4;13;14). Blant annet ser man at hjertets kompakte lag øker i tykkelse i møte med varmere miljø, og minker i tykkelse i møte med kaldere omgivelser (15).

Laksen foretrukne miljøtemperatur vil variere mellom de ulike livsstadiene (4). Vanlig anbefaling for laks i settefiskfasen ligger rundt 12-14 °C (4). Temperaturer i dette området skal fremme god vekst, uten det oppstår misdannelser (16). Rask tilvekst kan gi avvikende hjertemorfologi, som igjen kan gi overbelastning på hjertet og dermed redusert hjertefunksjon senere i livet (3). Det er vist at temperatur påvirker hjertets morfologi, der raskt voksende smolt gjerne har et hjerte som er større relativt til kroppsstørrelse samt rundere og med hyppigere feilstilling på bulbus enn smolt som var produserte ved lavere temperaturer (10).

1.3 Molekylære indikatorer på hjertesykdom

I forskning rettet mot hjertehelse hos fisk er det tidligere brukt en rekke molekylære markører for å påvise uohensiktsmessig utvikling eller hjertesykdom. Undersøkelse av hjertecellenes ekspresjonsprofil kan gi informasjon om molekylære ulikheter som oppstår som følge av

ulike temperatur. I denne oppgaven undersøkes uttrykket av mRNA som koder for proteiner knyttet til hjerteutvikling hos fisk.

A-type natriuretic peptide (*anp*) og b-type natriuretic peptide (*bnp*) tilhører samme familie av vasoaktive peptider, har strukturelle likhetstrekk og produseres i hjertes myocytter.

Oppregulering av *anp* og *bnp* er forbundet med hjertesvikt. Forhøyet *bnp* er også sett i sammenheng med myocardiell ischemi og nekrose (17). Det er vist at *anp* er signifikant oppregulert ved akklimatisering til kulde, sammenlignet med akklimatisering til høyere temperaturer hos sebrafisk (18) og regnbueørret (19). *anp* brukes også som markør for hypertrofi (20).

Proliferating cell nuclear antigen (pcna) spiller en sentral rolle i replikasjon og reparasjon av DNA i celler og finnes derfor i alle cellekjerner. *pcna* oppreguleres i kreftceller med høygradig celledeling. (21). *pcna* brukes gjerne som en markør for celle-proliferasjon i forbindelse med vekst (10;19;22).

1.4 Problemstilling

Norsk lakseoppdrett opplevde i 2023 den høyeste registrerte dødeligheten noensinne. Å fremme optimal utvikling i settefiskfasen er foreslått som tiltak for å kunne bedre fiskevelferd og få ned dødelighet, også i sjøvannsfasen. Temperatur er en viktig innsatsfaktor i settefiskfasen, og kunnskap om hvordan temperatur påvirker fysiologi utover vekst er derfor nødvendig.

Oppdrett i RAS-anlegg gir oppdretter mulighet til å styre en rekke miljøparameter, deriblant temperatur. Høy temperatur gir raskere vekst og det kan derfor være fristende å øke temperaturen og dermed senke produksjonstiden. På sensommeren vil temperaturen dessuten være naturlig høyere, og det vil være energikrevende (og dermed medføre ekstra kostnader) å senke temperaturen i fiskekarene. For å hjelpe oppdrettere med å produsere robust laks med god fiskevelferd er det derfor viktig å kunne komme med konkrete forskningsbaserte anbefalinger som angår temperatur.

Denne oppgaven tar for seg hvordan det kompakte laget i ventrikkelen i laksehjertet modelleres når settefisk eksponeres for ulike temperaturer. Vekst vil måles morfometrisk ved hjelp av histologi. I tillegg vil enkelte genuttrykk i hjertet undersøkes og underbygge de histologiske målingene, samt bidra til å vurdere om veksten kan betegnes som fysiologisk eller patologisk.

Med bakgrunn i dette vil problemstillingen for oppgaven være som følger: Vil temperaturer forbundet med intensiv drift i resirkuleringsanlegg for Atlantisk laks i settefiskfasen forårsake hjerteutvikling forbundet med nedsatt hjerte helse?

For å svare på dette er det definert følgende delspørsmål som skal besvares:

- Har temperaturene brukt i forsøket påvirket individ- og hjertevekst
- Hvordan påvirker ulike temperaturer i RAS utviklingen av hjertets kompakte lag histologisk og molekylært?
- Kan utvikling betegnes som fysiologisk eller patologisk?

2 Materialer og metode

Prøvemateriale brukt i denne oppgaven er hentet fra prosjektet Temp-Intens ledet av Nofima og finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF). Hovedmålet for Temp-Intens er å finne anbefalinger for optimalisering av innsatsfaktorene temperatur og salinitet i settefiskfasen. Temp-Intens er en livsløpsstudie som enda ikke er avsluttet når denne oppgaven skrives. Her beskrives derfor kun den delen av studien som er relevant for oppgaven.

Settefiskfasen av forsøket ble utført ved Nofimas forskningsstasjon på Sunndalsøra (*Forskningsstasjon for bærekraftig akvakultur*). Prøveuttakene var gjennomført før denne oppgaven ble påbegynt, og derfor kun beskrevet i korthet. Informasjon om forsøksdesign og fisk er hentet fra prosjektbeskrivelsen.

2.1 Forsøksdesign og fisk

All rogn stammer fra samme produksjonsbatch som er levert av SalmoBreed, og er inkubert på råvannstemperatur under 8 °C. All fisken startfôres på 10 °C i gjennomstrømming (FT) frem til de ble fordelt i de ulike temperaturgruppene:

- Gruppe 1: Konstant 8 °C
- Gruppe 2: Konstant 12 °C
- Gruppe 3: Konstant 14 °C

Temp-Intens følger fisken fra den er ca. 10 gram.

Fisken ble fordelt i gruppe 1-3, med 4 paralleller for hver gruppe (Totalt 12 kar). Hvert RAS-kar hadde lik utforming, med et volum på ca. 0,5m³ og var individuelt tilknyttet en RAS-enhet. Ved oppstart var det ca. 200 fisk i hvert kar, som vil ville gi en tetthet på 31kg/m³ ved slutten av settefiskfasen. Fisken ble smoltifisert ved hjelp av lyssignal som beskrevet av Handeland og Stefansson (23).

Alle fiskegruppene skulle overføres til sjø samtidig. For å forhindre store ulikheter i størrelse mellom gruppene ved utsett, ble lengde på kort dag justert for de ulike gruppene. Denne fremgangsmåten ble valgt da det var metoden som var mest relevant for næringen.

2.1.1 Prøveuttak

Ved hvert prøveuttak ble det tatt ut 5 individer fra hvert kar, totalt 20 fisk for hver behandlingsgruppe. 10 hjerter ble lagt på formalin, og 10 på RNA-later. Hjertene som ble lagt på RNA-later fikk en snitt fra om lag midten av hjertet ut til apex. Ved S1 og S4 ble det målt lengde og vekt på individnivå.

Prøveuttak ble utført samtidig som annen håndtering

S1 – Startuttak ved utsett på de ulike temperaturgruppene (ca. 10g)

S2 - Uttak i forbindelse med PIT-tagging. Ca. 20 g

S3 – Uttak i forbindelse med vaksinerings. Ca. 50g.

S4 - Uttak ved avslutning av smoltifisering.

Denne oppgaven undersøker fisken fra uttak S4 der fisken er ferdig smoltifisert. Forsøket har da pågått i ca. 22 uker.

2.2 Beregning av vekstrelaterte data

Spesifikk vekstrate (SGR)

SGR (engelsk: *Specific Growth Rate*) er ett mål for daglig vektøkning i prosent kroppsvekt. SGR vil minke med økende kroppsvekt (24). Det ble målt individvekt av fisken ved S1 og S4 det var derfor mulig å regne ut SGR på individnivå for all fisk i forsøket. Følgende formel for SGR er brukt:

$$SGR (\%) = 100(\ln w_2 - \ln w_1) / (t_2 - t_1)$$

Der w_1 og w_2 er kroppsvekt (g) ved henholdsvis t_1 og t_2 . $t_2 - t_1$ = antall dager mellom uttakene.

Vekstfaktor 3 (TGC)

TGC (engelsk *Thermal growth coefficient*) er ett mål på hvor fort fisken vokser, uavhengig av temperatur og størrelse på fisken (24). Beregnes med følgende formel:

$$TGC = 1000 \cdot (w_2^{\frac{1}{3}} - w_1^{\frac{1}{3}}) / (T \cdot t)$$

Der w er vekt (g), T er temperatur i °C og t er tid i antall dager

Relativ hjertevekt

Relativ hjertevekt (Cardio somatic index, CSI) beskriver hjertestørrelsen i gram relativt til fiskens størrelse i gram. CSI er i dette forsøket utregnet basert på kroppsvekt ved uttak S4. Hjertevekten er målt av hjerter som er formalinbehandlet og der atrium er fjernet. CSI er beregnet med følgende formel:

$$CSI = \frac{\text{Hjertevekt (g)}}{\text{fiskens vekt (g)}} * 100$$

2.3 Histologi

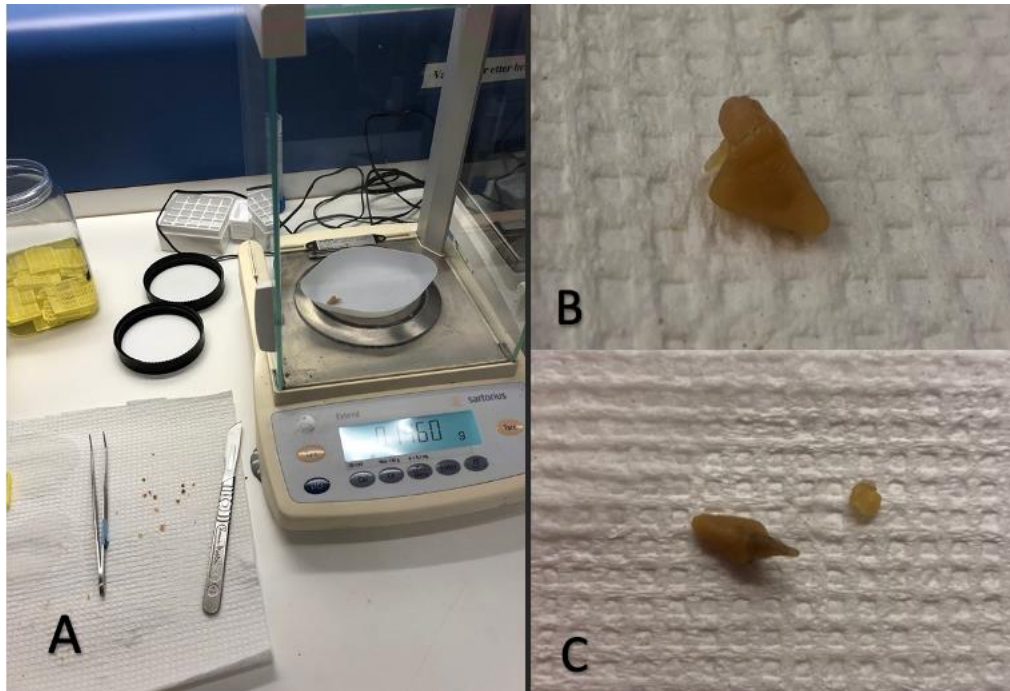
Histologi ble gjennomført på hjertene som ble lagt på formalin etter uttak (10 hjerter per temperaturgruppe). Forberedelsen av histologiske snitt ble utført ved histologilaben ved Norges fiskerihøgskole.

2.3.1 Dehydrering

Prøvene ble levert til UiT i biopsafe-beholdere med formalin. Hjerteprøvene ble overført til kassetter for vevsprosessering og innstøpning, og merket med uttak- og prøvenummer samt H for hjerte (eks: S4XXXH). Prøvene ble deretter lagt i etanol 70% i et par døgn før videre behandling.

2.3.2 Trimming og veiing

Etter dehydreringen ble artium trimmet bort ved hjelp av skalpell og preparatene veid ved hjelp av analysevekt (Figur 2A, C). Det ble notert dersom hjertene hadde forkortet eller manglende bulbus (Figur 2B), eller andre uvanlig karakteristika. Tre av hjertene manglet bulbus og ble derfor ikke veid, men ekskludert fra forsøket.



Figur 2: Trimming av atrium og veiing av resten av hjertet. Bilde A: Viser utstyr brukt i forbindelse med trimming og veiing. Bilde B: Hjerte med forkorta bulbus. Bilde C: Viser et hjerte etter at atrium er trimmet bort. Det fjerna vevet ligger til høyre for hjertet i bildet.

2.3.3 Vevsprosessering

Etter dehydrering, trimming og veiing, ble prøvene behandlet i vevsprosessoren Citadel 2000 (ThermoFisher Scientific U.S), program A (Tabell 1). Alle hjerteprøvene fra samme prøveuttak ble prosessert sammen.

Tabell 1: Protokoll for prosessering av vevsprøver i prosesseringsmaskinen Citadel 2000, program A

Beholder	Innhold	Tid	Hensikt
1	Tom	-	
2	Tom	-	
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	1:1 100% EtOH og HistoClear	1 timer	Dehydrering og klaring
8	HistoClear	1 timer	Klaring
9	HistoClear	1 timer	Klaring
10	HistoClear	1 timer	Klaring
11	1:1 HistoClear and parafinvoks	2 timer	Klaring og parafinering
12	Parafinvoks	Minimum 2 timer	Parafinering

2.3.4 Innstøping

Preparatene ble støpt i Histowax (Histolab Products AB, Sverige) ved hjelp av Leica EG1150H parafininnstøper. Hjertene ble orientert ved hjelp av kjøleplate. Etter støpning ble preparatene oppbevart i kjøleskap ved 4°C. For å sikre at hjertene hadde så like utgangspunkt som mulig ved snitting, ble hjertene lagt ned i formen hvilende på den ene siden, med apex pekende nedover, og bulbus mot venstre (Figur 3).



Figur 3: Viser hvordan hjertene ble orientert under støpning i parafinvoks. Bulbus peker opp mot venstre og hjertespiessen, apex peker nedover

Hjertene ble snittet i sagittalplan med mikrotomet Leica RM225 og et MX35 Ultra Microtome Blade-knivblad. Blokkene ble først trimmet på 10 µm til bulbus kom til syne. Deretter ble det laget snitt på 6 µm gjennom bulbus. 5 etterfølgende snitt ble spart, før de neste 10 ble forkastet. Preparatene ble deretter lagt i varmeskap på 64 °C for å smelte bort overflødig voks.

2.3.5 Farging

Det ble vurdert flere typer farging for snittene. For å møte problemstillingen måtte fargemetoden ideelt sett vise tydelig omriss av cellene. Opprinnelig skulle oppgaven også undersøke kollagenavsetning i hjertet, og fargemetoden som ble valgt måtte derfor også farge kollagen. Det finnes flere fargemetoder som møter disse kravene, men av praktiske hensyn falt valget på Massons Trichrome Staining (MTS). MTS brukes for å identifisere kollagen-fiber i vev som hjerte, lunge, hud og muskulatur, og er foretrukket når man skal påvise fibrose i hjertemuskulatur da man lett kan differensiere skadet fibrøst vev fra friskt vev. I MTS farges vevet med tre ulike metoder: *Weigert's Iron Hematoxylin* farger cellekjerner, *Biebrich scarlet-acid fuchsin* farger cytoplasma og *aniline blue* farger kollagen (25).

Farging av snitt ble utført ved *kjernefasilitet for avansert mikroskop* ved UiT etter protokoll besørget av Randi Olsen og Antimi Palara.

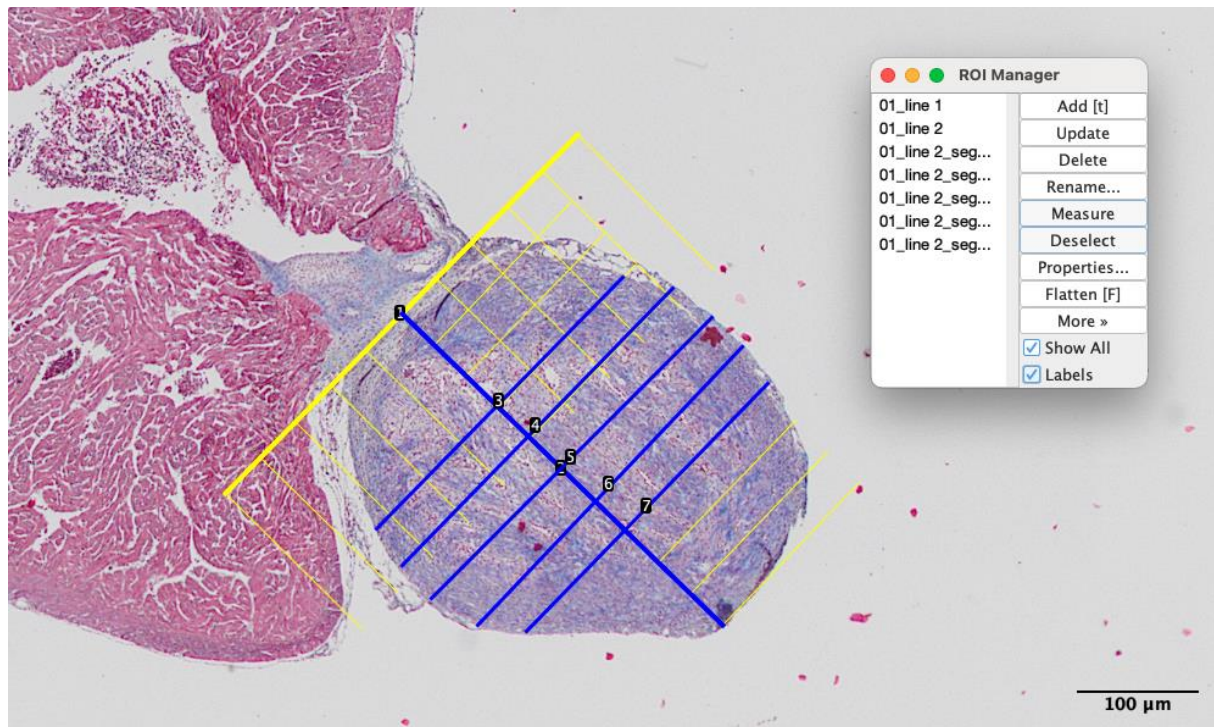
2.3.6 Skanning

Snittene ble fotografert med *Automatic Virtual Slide Scanning System VS120 (Olympus Life Science)*. Det ble først skannet et oversiktsbilde (20x) av de objektglassene med snitt som lå mot midten av hjertet (se 2.2.7 Valg av snitt til målinger). Disse bildene ble brukt til å velge ut 1 snitt per fisk som skulle brukes videre i morfometriske målinger. Når ønsket snitt var valgt, ble dette skannet i en høyere oppløsning (20x). Disse bildene ble videre brukt til morfometriske målinger.

2.3.7 Valg av snitt til målinger

De morfometriske målingene burde gjennomføres omtrent på samme plass i hjertet for alle prøvene. Snittet der bulbus var bredest skulle derfor brukes som en standardisering. Dette snittet ble funnet ved først å skanne 1-3 av de objektglassene som antageligvis lå nærmest midten. Deretter ble bulbus på disse hjertene målt på følgende måte (Se figur 4): En guide-linje (Linje 1) ble laget i basen av bulbus. Deretter ble det trukket en linje som 90° på guide-linjen på langs av bulbus (Linje 2). Fra linje 2 ble det trukket ti 90° målelinjer fra kant til kant gjennom bulbus. Hver av linjene ble individuelt merket. Lengden på disse linjene ble overført

til Excel der de ble sortert. Snittet med den bredeste bulbus ble valgt til videre morfometriske målinger.

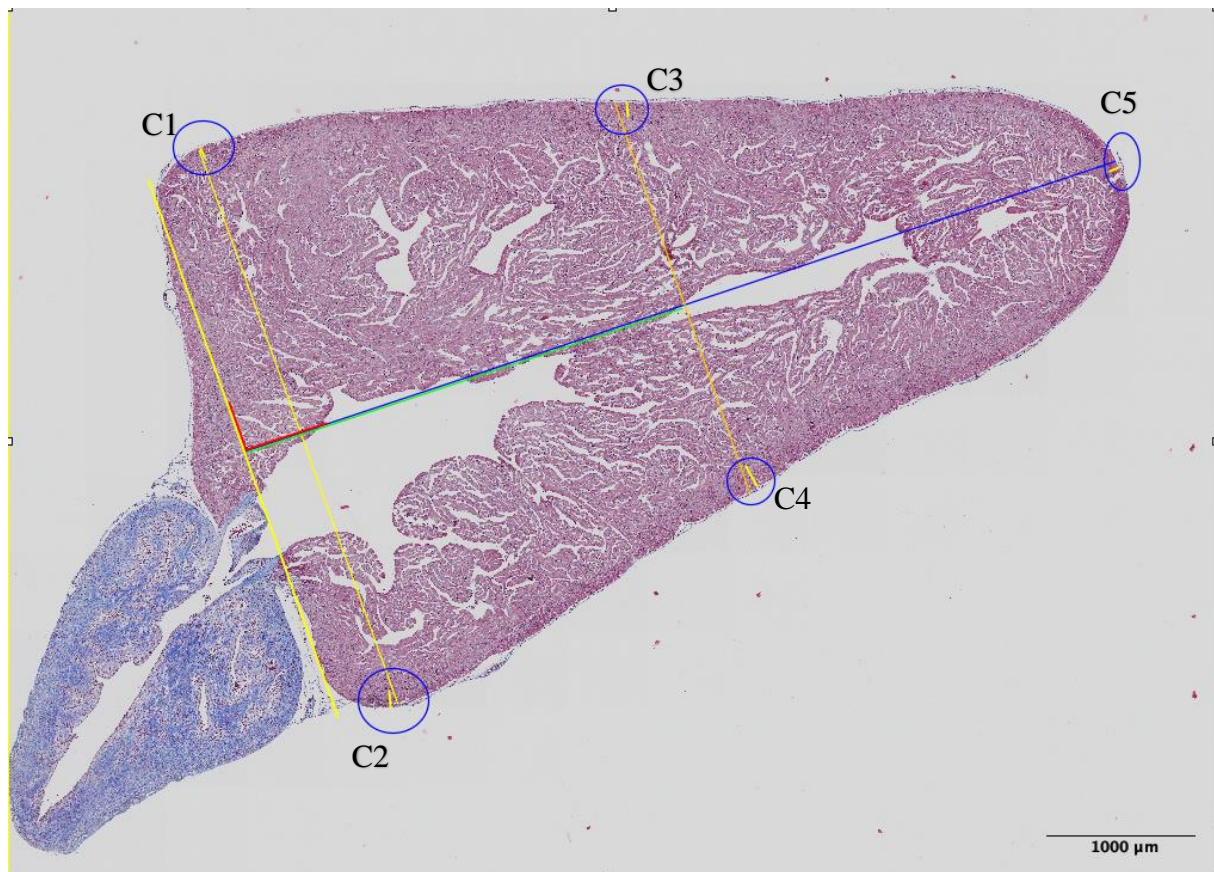


Figur 4: Viser hvordan måling av bulbus-bredde ble gjennomført i ImageJ. Den tykke gule linjen er guidelinjen (linje 1), den tykke blå linjen som står 90° på linje er Linje 2. Ut fra Linje 2 dannes ti målelinjer i 90°vinkel. Snittet er farget med masson's trichrome staining. Målestokken=100µm.

2.3.8 Morfometriske målinger

Målingene ble gjennomført ved hjelp av den åpne tilgjengelige programvaren ImageJ. Før målingene ble målestokken for bildene stilt slik at målingen ble oppgitt i µm i stedet for pixel.

Høyde og bredde av ventrikkel ble målt basert på metoden beskrevet av Poppe et al. (26). Tykkelsen av kompaktum ble målt på fem ulike plasser (Figur 5, C1-C5). Det ble først trukket en hjelpelinje som tangerte de to spissene av hjertet som er nærmest bulbus. Deretter ble det trukket en 90° målelinje fra hjelpelinje til apex for å måle høyden av ventrikkelen. Parallelt med hjelpelinjen ble det trukket en linje der ventrikkel var bredest for å måle bredde (Figur 5).



Figur 5: Oversikt over hvordan morfometriske målingen ble gjennomført i Image J. Den blå linjen og den gule linjen mellom C1 og C2 representerer hhv lengden og bredden av ventrikkelen. Den grønne og den oransje linjen er hjelpelinjer der den grønne er halve lengde av den blå og oransje. Blå sirkler indikerer områder der kompaktum ble målt (Korte gule linjer). C1-5 angir navn på de ulike målepunktene. Snittet er farget med massons trichrome staining. Målestokk=1000 μm

Ratioen mellom høyde og bredde ble regnet ut basert på Poppe (26). Et lavt tall indikerer en rundere form enn et høyt tall:

$$\text{Høyde: bredde} - \text{ratio} = \frac{\text{Høyde } (\mu\text{m})}{\text{Bredde } (\mu\text{m})}$$

Tykkelsen av kompaktum ble målt på 5 plasser, og gjennomsnittet av disse målingene ble brukt til videre utregninger. Tykkelsen av kompaktum relativt til fiskens vekt ble funnet ved følgende formel:

$$\text{Relativ kompaktum tykkelse} = \frac{\text{Tykkelse av kompaktum } (\mu\text{m})}{\text{fiskens vekt } (g)}$$

2.4 Genuttrykk

For å undersøke uttrykket av mRNA, brukes det reverse transcriptase (RT) kvantitativ PCR (qPCR). RNA er ustabil, og for å øke stabiliteten brukes enzymet reverse transcriptase for å

lage en komplementær tråd til mRNA-tråden. Produktet man ender opp med kalles komplementær DNA (cDNA). Dette produktet brukes videre i qPCR reaksjonen.

2.4.1 Valg av gener

Det finnes mange gener som påvirker utvikling av laksehjertet. Denne oppgaven tar for seg tre av dem (Tabell 2). Utvalget er gjort på grunnlag av ønsket problemstilling for oppgaven, samt hva som var praktisk gjennomførbart. Genene er kjent fra tidligere publikasjoner som omhandler samme tematikk (10;27;28). Primerparene ble sekvensert i *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sin database, for å verifisere at de ville amplifisere de riktige cDNA-sekvensene (29). Primersekvensene tilhørende de ulike genene finnes i Vedlegg I.

I tillegg til målgenene som skulle testet, ble det valg ut to referansegen.

Tabell 2: Primere benyttet i forsøket, tilgangsnummer) , samt funksjon.

Gen (Tilgangsnummer)	Funksjon
<i>Elongeringsfaktor (EF1-a)</i> (AF321836)	Referansegen
<i>β-aktin</i> (BT059604)	Referansegen
<i>A-type natriuretic peptide</i> (NM_001123545.2)	Hjertestress
<i>B-type natriuretic peptide (BNP)</i> (XM_014136528.1)	Hjertestress
<i>Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)</i> (XM_014161524.2)	Hyperplasi

2.4.2 RNA-ekstraksjon

Atrium og bulbus ble trimmet bort før hele hjertet ble delt opp i mindre biter og most med en skalpell. Deretter ble hjerte lagt i 500 µl lysesbuffer (Lysis LBE, Beckman Coulter) i 1 ml eppendorfrør sammen med to metallkuler. Prøvene ble homogenisert i 3x2 minutter, 1800 rpm før de ble sentrifugert i 1 min på 19000 omdreininger (Eppendorf Centrifuge 5804).

Videre ble det laget til et nytt sett med eppendorfrør med 2 metallkuler og 350 μ l lysesbuffer før 100 μ l av prøvematerialet ble pipettert over i de nye rørene. Etter som prøvematerialet fortsatt inneholdt mindre biter, måtte pipettespissene klippes for å få dette til. Til slutt ble det tilsatt 20 μ l proteinase K (Beckman Coulter) ved hjelp av multipipette før prøvene ble homogenisert (2 min, 1800 rpm), sentrifugert (1 min, 1000 rpm) og inkubert i varmeskap i 30 minutter. Etter denne prosessen var det fortsatt antydning til vevsbiter i lysatet. Prøvene ble derfor homogenisert, sentrifugert og inkubert på samme måte en gang til.

Selve RNA-ekstraksjonen ble utført av pipetteringsrobot, Biomek i5. Protokollen for denne ble fulgt. Etter ekstraksjonen ble prøvene oppbevart på is for å hindre RNA-ase aktivitet.

Kvaliteten på RNA ble målt ved hjelp av Nanodrop 8000 spektrofotometer (Thermo Fisher). RNA-fritt vann ble brukt som «blanking». Kvaliteten ble vurdert på bakgrunn av tre ulike forhold: Renhet, DNA/protein-forurensing og konsentrasjon av RNA.

2.4.3 cDNA

RNA ble fortynnet mot nukleasefritt vann til en konsentrasjon på 22,2ng/ μ l. Deretter ble det laget til ett 96-brønners PCR-brett med innhold som vist i Tabell 3. I tillegg til hjerteprøvene ble det laget dubletter av positiv kontroll, en negativ kontroll uten RNA(NTC) og en negativ kontroll uten revers transkriptase (NoTR). Prøvene ble ristet og sentrifugert før cDNA-syntesen ble gjennomført i Applied biosystems 2720 Thermal Cycler (ThermoFischer scientific, USA).

c-DNAet ble videre oppbevart ved -20 °C.

2.4.4 Standardkurver

Primerne ble levert fra *Eurogentec* som frysetørret pulver og måtte derfor løses i nukleasefritt vann til en stock-løsning på 100 μ M. Deretter ble det laget en 1000 μ l arbeids-stock (5 μ M) som ble brukt videre.

For å kontrollere effektiviteten til primerne ble det laget standardkurver; 2 μ l fra ti ulike cDNA-prøver ble blandet og deretter brukt til å lage en to-fold-fortynningsserie, der cDNA ble fortynnet mot nukleasefritt vann. Det ble laget syv fortynninger (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640), i duplikat for hver av primerne.

Tabell 3: Komponenter brukt i hver enkelt qPCR-reaksjon og mengden av disse per reaksjon

Reagens	Mengde (µl) per reaksjon
Mastermiks:	
Fast SYBR Green	5
Forward primer (5µM)	0,6
Revers primer (5µM)	0,6
H ₂ O	0,3
cDNA	3,5
Totalvolum	10

Mastermiksen ble fordelt i en 384-brønners plate før 3,5ml av de syv fortyningene av cDNA ble tilsatt i duplikat. Det ble også laget to negative kontroller der det kun tilsattes mastermiks uten cDNA for å utelukke kontaminering av DNA. Prøvene ble analysert med QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fischer scientific, USA). Resultatene fra standardkurven var oppgitt som ett stigningstall og korrelasjon (R^2). Effektivitet ble også regnet ut og resultatene vises i Vedlegg II

Det ble også gjennomført en gel elektroforese for å undersøke om primerne hadde binding til flere produkter. Resultat fra dette finnes i Vedlegg III.

2.4.5 Databehandling

Terskelverdi for Ct ble satt til 0,1 for alle datapunkter som vil gi likt grunnlag for analyse av de ulike genene. Alle verdier ble gjennomgått og i de tilfellene avviket mellom to tekniske duplikater var høyere enn 0,5 ble prøven ekskludert. I ett tilfelle var det grunnlag for å ekskludere så mange av prøvene at det ble gjennomført en ny qPCR-kjøring av dette brettet. Kontrollgruppen i dette forsøket ble valgt til å være 8°C. Videre databehandling foregikk i Microsoft Excel etter Pfaffl metoden (30), korrigert for flere enn ett referansegen (31):

$$\text{Relativt genuttrykk} = \frac{E_{\text{målgen}}^{\Delta CT_{\text{målgen}}(\text{kontrollgruppe} - \text{prøve})}}{\text{GeoMean}((E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{Ref}}})}$$

E viser til effektiviteten for genet, ΔCt regnes ut som $Ct_{\text{kontrollgruppe}} - Ct_{\text{prøve}}$ for både målgen og referansegen og geometrisk gjennomsnitt (Geomean) brukes for å regne ut gjennomsnittet for begge referansegenene.

Det relative genuttrykket ble log transformert for bruk i statistiske analyser.

2.5 Statistiske analyser

Statistiske analyser og fremstilling av grafer ble gjort ved hjelp av analyseprogrammet *Prism 10*, *GraphPad Software LLC*.

De ulike datasettene ble testet for normalfordeling med en Shapiro-Wilk test. Datasettene ble videre statistisk analysert med en-veis ANOVA med signifikansnivå på $p < 0,05$. Tukey test ble gjennomført post hoc påvise signifikans. Data for høyde: bredde relativ tykkelse er analysert med en mixed effect- analyse etter som de tre gruppene inneholdt ulike antall data.

qPCR er vurdert statistisk ved hjelp av log-transformerte data, mens grafisk fremstilling er det brukt det geometrisk gjennomsnittet for ikke-log transformerte data.

3 Resultat

3.1 Vekstdata

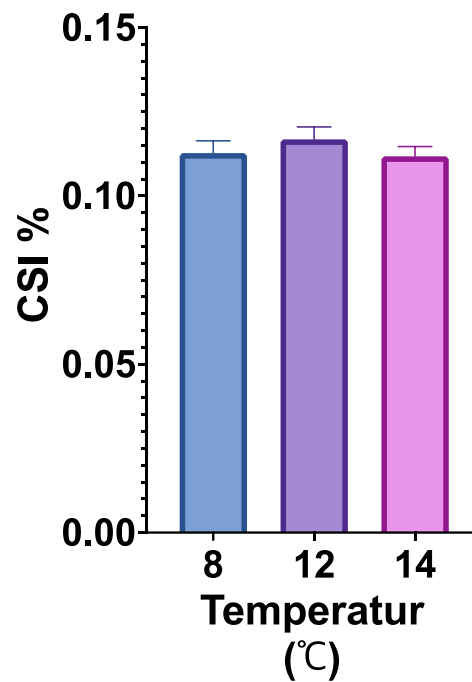
Tabell 4 viser hvordan utvikling av vekt for de ulike fiskegruppene (n=20) har vært gjennom forsøket frem til uttak. Antall dager mellom S1 og S4 var på 95, 97 og 96 for hhv temperaturgruppe 8, 12 og 14.

SGR er ett mål for daglig vekst i % av kroppsvekt. Fisk fra temperaturgruppe 12 og 14 har signifikant høyere vekstrate enn temperaturgruppe 8 ($p < 0,0001$ for begge grupper) i perioden mellom S1 og S4. Når vekstraten justeres for temperatur (TGC) finner vi ingen signifikante forskjeller mellom gruppene.

*Tabell 4: Viser vektutvikling for atlantisk laks produsert i RAS ved tre ulike temperaturer (8°C, 12°C og 14°C). Gjennomsnittsvikt ± standard error og the mean (SEM) ved start av forsøket (S1) og ved uttak (S4) for hver temperaturgruppe (n=20), samt spesifikk vekstrate (SGR) og thermal growth coefficient (TGC). * indikerer signifikant forskjell fra de andre gruppene ($p < 0,05$). Signifikans er testet post hoc med Tukey test.*

Temperatur (°C)	Vekt S1 (g)	Vekt S4 (g)	SGR S4 (%)	TGC S4
8	16,35 ± 0,36	44,70 ± 1,29	0,73 ± 0,03*	1,03 ± 0,04
12	20,10 ± 0,48	80,96 ± 2,38	0,99 ± 0,04	1,12 ± 0,04
14	20,35 ± 0,76	97,23 ± 4,60	1,98 ± 0,04	1,02 ± 0,04

Utrekning av CSI er basert på hjerter som er tatt ut for histologi, der ett hjerte fra temperaturgruppe 8 og to hjerter fra temperaturgruppe 14 ble ekskludert da bulbus manglet. Figur 6 viser at det ikke fantes noe signifikant forskjell i CSI mellom de tre gruppene. CSI for temperaturgruppe 8 var $0,11 \pm 0,00\%$, for temperaturgruppe 12 $0,12 \pm 0,00\%$ og for temperaturgruppe 14 $0,11 \pm 0,00\%$.



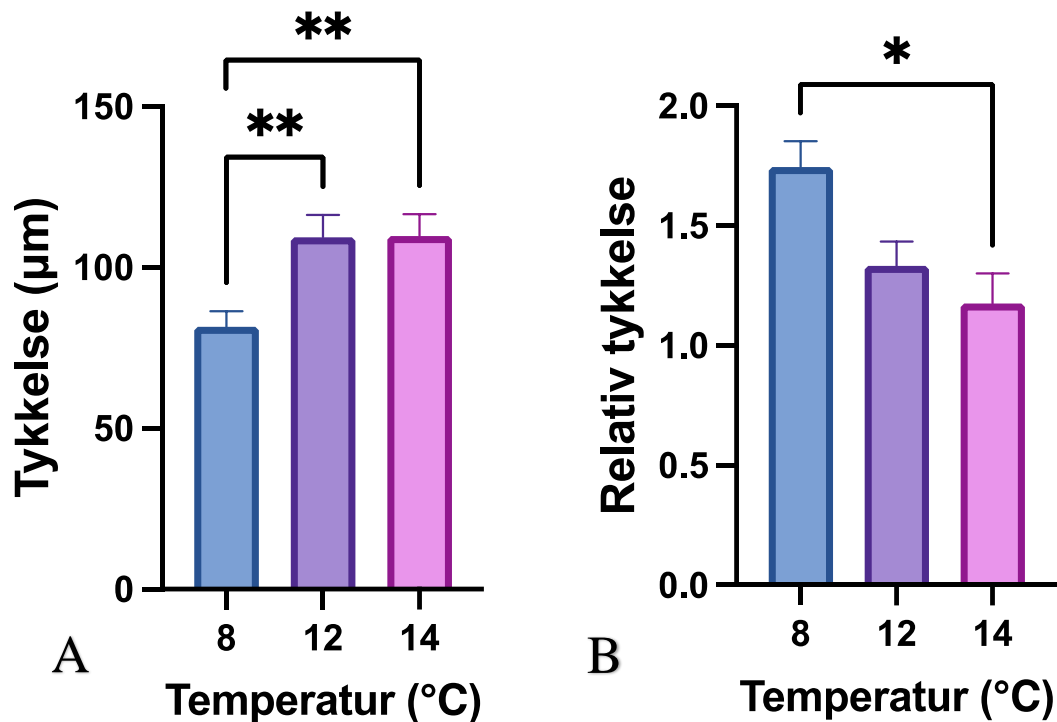
Figur 6: Cardiosomatisk index (CSI). målt hos atlantisk produsert ved tre ulike temperaturer (8°C, 12°C og 14°C) (n=10) i RAS. Prøveuttak er gjort etter at fisken er smoltifisert. Grafen viser gjennomsnitt av målingene, samt standard error of the mean (SEM). Det er ikke funnet signifikans mellom gruppene.

3.2 Histologi

De histologiske målingene er basert på seks individer fra temperaturgruppe 8 og 12 og åtte individer fra temperaturgruppe 14.

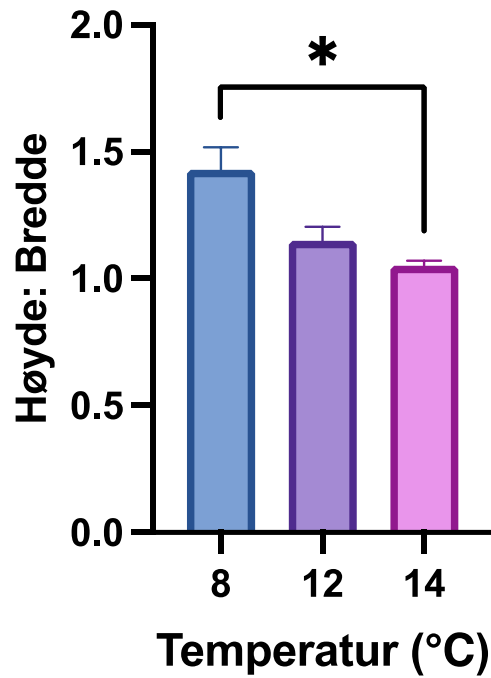
Fisk i temperaturgruppe 12 og 14 hadde en gjennomsnittlig tykkelse på hhv $109,4 \pm 38,1 \mu\text{m}$ og $109,7 \pm 43,2 \mu\text{m}$ og skilte signifikant fra temperaturgruppe 8 med en gjennomsnittstykkelse på $81,5 \pm 26,8 \mu\text{m}$ (hhv $p=0,0021$, $p=0,0025$) (Figur 7A).

Kompaktum er også målt relativt til fiskens vekt (Figur 7B). Her ser man signifikant forskjell ($p=0,0047$) mellom temperaturgruppe 8 ($1,75 \pm 0,26$) og 14 ($1,15 \pm 0,35$). Temperaturgruppe 12 ($1,33 \pm 0,25$) skiller seg ikke signifikant fra de to andre gruppene.



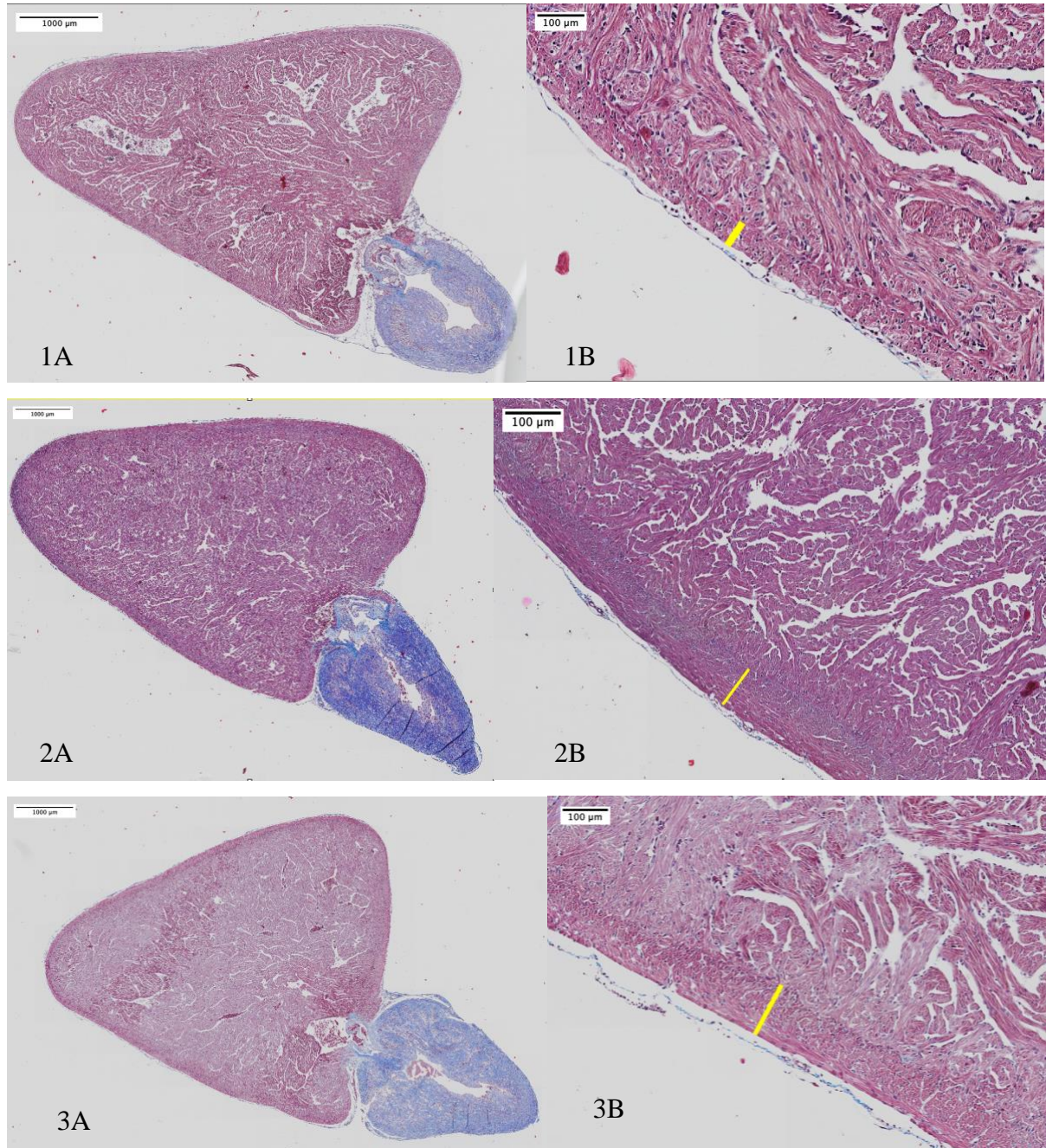
Figur 7: Vekst i kompaktum målt histologisk hos atlantisk laks produsert på 8°C (n=6), 12°C (n=6) og 14°C (n=8). Uttak er gjennomført etter endt smoltifisering. Figur 7A viser tykkelsen på kompaktum oppgitt i μm . Figur 7B viser tykkelse på kompaktum relativt til fiskens vekt (g). Alle verdier er oppgitt som gjennomsnitt med standard error of the mean (SEM). Signifikans er testet post hoc med Tukey test og indikert med * (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$)

Høyde: bredde-ratio er målt for å kunne kvantifisere hjertets form der en lavere verdi indikerer et rundere hjerte (26). Temperaturgruppe 14 har ved uttaket (S4) utviklet signifikant ($p < 0,05$) lavere høyde: bredde-ratio ($1,050 \pm 0,05$) enn temperaturgruppe 8 ($1,43 \pm 0,2$). Temperaturgruppe 12 ($1,15 \pm 0,14$) skiller seg ikke signifikant fra de to andre gruppene (Figur 8).



Figur 8: Høyde: bredde – ratio av hjertet målt hos atlantisk laks produsert på tre ulike temperaturer; 8°C (n=6), 12°C (n=6) og 14°C (n=8) i RAS. * indikerer signifikans mellom gruppene. verdiene er presentert som gjennomsnittsverdi og standard error of the mean (SEM). Signifikans er testet post hoc med Tukey test og indikert med * ($p < 0,05$).

Figur 9 viser ett representativt hjerte fra hver av de tre temperaturgruppene, samt måling av kompaktum ved C4 for det samme hjertet. Bilde 1A, 2A og 3A1 illustrer hvordan hjertet får en rundere form når temperaturen øker. Dette stemmer overens med funnene for høyde: bredde-ratio (Figur 8). Bilde 1B, 2B og 3B skal illustrere hvordan kompaktum øker i tykkelse ved høyere temperatur. Dette er også vist i Figur 7A.



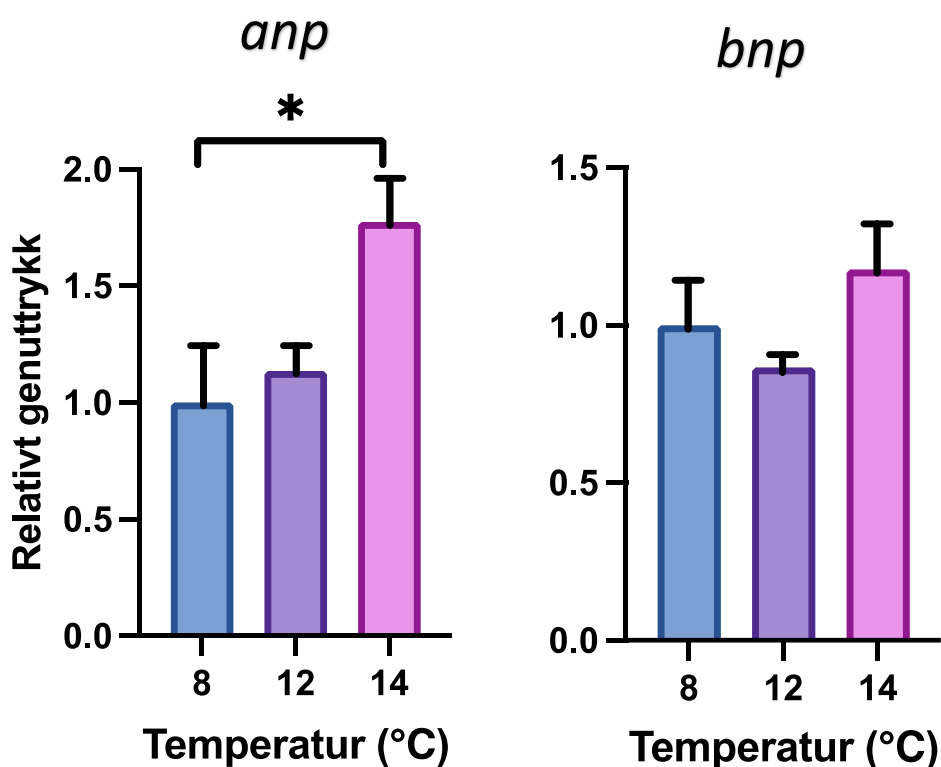
Figur 9: Histologiske snitt av hjerter fra atlantisk laks produsert ved tre ulike temperaturer; 8°C (1A-B), 12°C (1A-B) og 14°C (3A-B) i RAS. Bilde 1A, 1B og 1C illustrerer typisk hjertefasong funnet i de ulike temperaturgruppene. Bilde 1B, 2B og 3B viser måling av kompaktum ved punkt C4. Snittene er farget med masson's trichrome staining. Målestokk for 1A-C =10000µm, 2A-C=1000µm.

3.3 RT-qPCR

For å beskrive veksten i kompaktum, og vurdere betydningen av denne, er genuttrykk fra tre gener knyttet til cellevekst i hjertet undersøkt. Grafene er basert på det geometriske gjennomsnittet av Ct-verdier for de ulike genuttrykkene. Temperaturgruppe 8 er referansegruppe og har derfor ett relativt genuttrykk på 1,00 i alle grafene.

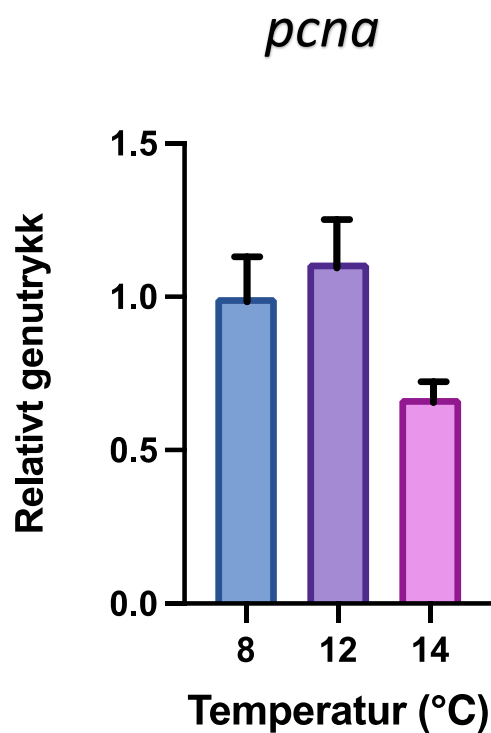
Anp som blant annet er knyttet til hjertesvikt, er signifikant høyere uttrykt i temperaturgruppe 14 (n=9) sammenlignet med temperaturgruppe 8 (n=9) ($p < 0,0371$), med relativt genuttrykk på hhv 1,77 og 1,00. Temperaturgruppe 12 (n=9) med relativt genuttrykk på 1,34, skiller seg ikke signifikant fra de andre gruppene.

Det er ikke funnet noen signifikante forskjeller i det relative genuttrykket av *bnp* for de ulike gruppene. Temperaturgruppe 8 (n=9) 12 (n=9) og 14 (n=8) har relativt genuttrykk på hhv 1,00, 0,90 og 1,25. Temperaturgruppe 12 bryter med trenden fra de andre målingene der relativt genuttrykk øker med temperatur



Figur 10: Relativt genuttrykk av *anp* og *bnp* målt hos atlantisk laks som er produsert på 8°C, 12°C og 14°C i RAS. Uttaket er gjort etter endt smoltifisering. Oppgitt verdi er geometrisk gjennomsnitt av relativt genuttrykk og standard error of the mean (SEM). Temperaturgruppe 8 er referansegruppe for utregningene. Signifikans er testet post hoc med Tukey test og indikert med * ($p < 0,05$).

Selv om det visuelle inntrykket av grafen for *pcna* gir inntrykk av forskjell mellom temperaturgruppe 14 (n=9) og temperaturgruppe 8 (n=9) og 12 (n=10), er det ikke funnet statistisk signifikans mellom disse (hhv $p=0,17$, $p=0,059$). Selv om det er en tydelig tendens mellom gruppe 12 og 14. Temperaturgruppe 12 skiller seg ut og følger ikke den forventede trenden sammenlignet med temperaturgruppe 8 og 14.



Figur 11: Relativt genuttrykk for hjertemarkøren *pcna* for de tre temperaturgruppene 8, 12 og 14. Oppgitt verdi er geometrisk gjennomsnitt av log-transformerte verdier og standard error of the mean (SEM). Temperaturgruppe 8 er referansegruppe for utregningene. Signifikans er testet post hoc med Tukey test og indikert med * ($p<0,05$).

4 Diskusjon

4.1 Har temperaturene brukt i forsøket påvirket individ- og hjertevekst?

Temperatur kan brukes aktivt i RAS for å korte ned produksjonstiden gjennom økt vekst. Formålet med denne oppgaven er å undersøke om temperaturer forbundet med slik intensiv drift kan forårsake hjerteutvikling forbundet med nedsatt hjertehelse. For å kunne svare på problemstillingen for oppgaven må det først etableres om temperaturene brukt i forsøket faktisk har gitt en forskjell i vekst hos fisken.

I dette forsøket er vekstraten for tre ulike temperaturgruppene undersøkt. Gruppe 12 °C og 14 °C har signifikant høyere vekstrate enn 8 °C. Den høye vekstraten gjenspeiles i høyere gjennomsnittsvekt som er registrert for fisken i disse temperaturgruppene ved S4. Det er ingen signifikant forskjell i SGR mellom temperaturgruppe 12 og 14. Dette funnet støttes av Crouse et al. som i 2022 undersøkte hvordan vekst hos atlantisk laks i RAS ble påvirket av vanntemperatur på 12 °C og 14 °C. Heller ikke her ble det funnet signifikant forskjell i vekst mellom de to gruppene (32). Når vekstraten for fisken i dette forsøket justeres for temperatur og vekt (TGC), ser vi ingen signifikante forskjeller mellom gruppene. Forskjell i SGR, samtidig med stabil TGC, kan tyde på at vekst i temperaturgruppe 12 og 14 skyldes nettopp temperatur. Det vil derfor være naturlig å tenke at temperaturforskjellene i dette forsøket har påvirket fisken fysiologisk på tidspunktet for uttak (S4).

Det ble ikke funnet signifikant forskjell i CSI mellom de tre temperaturgruppene. Dette er i kontrast til funnene fra HELSMOLT-prosjektet (3) der smolt produsert ved høy temperatur (12,5 °C, kontinuerlig lys) hadde signifikant høyere CSI på slutten av smoltifiseringsperioden, enn gruppen produsert ved lav temperatur (7,9 °C, naturlig lys-syklus). Grunnen til de ulike funnene ligger muligens i forsøksdesignet: Der fisken i HELSMOLT ble utsatt for to ulike lysregimer, hadde fiskegruppene i dette forsøket tilnærmet lik fotoperiode (med noen modifikasjoner). Fotoperiode er vi å ha innvirkning på vekst i ventrikkelmasse hos regnbueørret (13). En mulig forklaring på det ulike resultatet kan derfor være at fotoperioden også har en innvirkning på hjertet til atlantisk laks.

I dette forsøket er hjertevekt målt etter formalinbehandling. Som regel ønsker man å bruke vekt av ferske hjerter til slike målinger, og resultatene fra denne oppgaven kan derfor ikke uten videre brukes til å sammenligne med andre forsøk. Ettersom dette er gjort for alle

hjertene i denne oppgaven, kan man likevel bruke disse tallene til å sammenligne CSI mellom gruppene.

4.2 Vekst i hjertets kompakte lag

Det er i laksehjertets kompakte lag kraften som skal til for å pumpe blod rundt i kroppen dannes. Både hos mennesker og fisk, kan tykkelse på hjertemuskulatur endres for å tilpasse seg individets behov. Stress (27) eller kuleakklimatisering (15) er eksempler der man ser naturlig vekst i hjertemuskulatur hos fisk.

Det er vist både i denne oppgaven og i tidligere studier at tykkelsen på kompaktum øker med økt temperatur hos laksefisk (15). Dette kan være et dirkete resultat av den økte temperaturen, men kan også være relatert til den generelle veksten hos fisken. For å undersøke denne faktoren nærmere, er det i denne oppgaven målt tykkelse på kompaktum relativt til fiskens vekt. Det viser seg at fisken fra temperaturgruppe 14 har signifikant tynnere kompaktum relativt til fiskens vekt enn temperaturgruppe 8. Dette kan bety at fiskens kroppsmasse i gram øker mer enn det hjerte klarer å tilpasse seg. Det er ikke funnet studier der dette tidligere er undersøkt.

Når det kommer til hjertehelse en det mange faktorer som spiller inn. Det er likevel naturlig å tenke at tykkelse på kompaktum, som spiller en sentral rolle i hjertets pumpekraft, er av betydning når vi skal vurdere hjertehelsen.

4.3 Kan den observerte veksten betegnes som fysiologisk eller patologisk?

Hjertevekst kan være fysiologisk, der fisken gjennomgår en naturlig modellering av hjertet for å kunne håndtere det miljøet fisken lever i. Eller hjertevekst kan være patologisk, der modellering av hjerte skjer på en måte som har negativ påvirkning på fiskehelsen på kort eller lang sikt.

Fysiologisk, eller naturlig vekst kan skje gjennom en kombinasjon av hypertrofi og hyperplasi. Slik vekst oppstår for eksempel ved kundetilpasning (15), kjønnsmodning (33) eller kondisjonering (34). Hjertevekst forårsaket av intensiv drift og/eller stress forekommer hovedsakelig gjennom hypertrofi, og regnes som patologisk (10;22). I dette forsøket har fisken fra temperaturgruppe 14 et signifikant høyere uttrykk av *anp* som er knyttet til hypertrofisk vekst, men ingen signifikant forskjell i uttrykket av *pcna* knyttet til hyperplasi. Dette tolkes som at den observerte hjerteveksten hos temperaturgruppe 14 kommer i hovedsak

som følge av hypertrofi. Temperaturgruppe 12 har ikke et genuttrykk som skiller seg signifikant fra temperaturgruppe 8. For *bnp* og *pcna*, har temperaturgruppe 12 et uttrykk som later til å gå motsatt vei av gruppe 14 og funn i Frisk et al. (10). Det avvikende resultatet kan skyldes det lave antallet individer, der avvikende eller feil resultater knyttet til ett individ eller et fåtall individer kan utgjøre en markant forskjell på resultatene. Utslagene av dette er likevel ikke signifikante, og vurderes som å ikke påvirke konklusjonen i denne oppgaven.

De molekylære funnene har likhetstrekk med funnene til Johansen et al. (22) som undersøker hvordan stresshormonet kortisol påvirker hjerteutvikling hos regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) etter førbehandling med kortisol. Også i denne studien er det påvist signifikant økning i *anp* uttrykk, uten vesentlig forskjell i uttrykk av *pcna* eller *bnp*. Hjerteveksten ble tolket som patologisk med nedsatt aerob svømmekapasitet. Selv om denne studien er utført på en annen art i laksefamilien, er det nærliggende å spekulere i om stresshormonet kortisol også spiller en rolle i denne oppgaven.

Poppe et al. viste i 2004 at oppdrettet atlantisk laks hadde rundere hjerte enn vill fisk, og problematiserte dette som en mulig årsak for hjertesvikt i forbindelse med stressende situasjoner (26). Her poengteres det at et svakt hjerte også vil yte suboptimalt ved normal aktivitet. Et rundere hjerte ses også i sammenheng med nedsatt pumpekraft (35). I denne oppgaven er det funnet at fisken i temperaturgruppe 14 hadde signifikant lavere høyde: bredde-ratio enn temperaturgruppe 8 og dermed en rundere form på hjerte. Den runde formen kan også observeres visuelt i de histologiske snittene. Dette medfører at fisken fra temperaturgruppe 14 potensielt har høyere sjanse for å utvikle hjertesvikt og generell suboptimal ytelse enn fisken i temperaturgruppe 8.

Så langt er det listet opp en rekke funn som peker på at observert hjertevekst i temperaturgruppe 14 er av patologisk karakter. Det er likevel gjort funn som ikke er forbundet med patologi for denne gruppen; Det er ikke funnet signifikant forskjell i uttrykket av *bnp* mellom de tre temperaturgruppene. Et forhøyet uttrykk av *bnp*, er sett i sammenheng med ischemi og nekrose (17). Det er heller ikke funnet noe signifikant forskjell i CSI. Johansen et al., har undersøkt dette i to av sine studier der det er funnet at kortisol er knyttet til økt CSI, og dette knyttes videre til nedsatt hjertehelse (22;27).

4.4 Andre faktorer som kan ha påvirket resultatet

Hos salmonider påvirker kjønn hjerteutvikling, der hannfisk utvikler større hjerter med tykkere kompaktum enn hunnfisk (11). Antagelig er dette som følge av høyere testosteronnivå (11;15), og det kan derfor tenkes at denne veksten er spesielt fremtredende i forbindelse med kjønnsmodning (33). Det kunne likevel vært interessant å vite kjønnnet på fisken inkludert i denne oppgaven for å vurdere om ratioen mellom hannfisk og hunnfisk har påvirket resultatet.

Det er tidligere vist at fotoperioden har innvirkning på vekst i ventrikkelmasse hos regnbueørret (13). Fisken i dette forsøket var smoltifisert ved hjelp av lys. For å sikre at de tre temperaturgruppene ikke hadde for stor variasjon i størrelse ved utsett, med lengden på kort dag regulert, slik at fisken eksponert for høye temperaturer hadde kortere intervall med dagslys. Selv om litteraturgjennomgangen til Gampler & Farrell (13) er gjort for regnbueørret, kan man ikke utelukke at ulik fotoperiode kan ha påvirket resultatet i dette forsøket.

4.5 Diskusjon av metode

Det ligger i masteroppgavens natur at valg og utførelse av metode gjøres med begrenset for forståelse for forskningsteknikk, og det er derfor naturlig i etterkant å diskutere metode, hvilken påvirkning denne kan ha hatt på resultatet og hva som eventuelt kunne være gjort annerledes.

4.5.1 Sammenligningsgrunnlag

En del av de studiene som er vist til gjennom oppgaven er utført på andre arter av laksefisk. Det kan være store variasjoner i hvordan ulike arter responderer på ulike temperaturregimer, og det er derfor suboptimalt å sammenligne funn gjort hos andre arter av laksefisk med atlantsik laks (13). Utvalget av studier som tar for seg laksehjertets utvikling er smalt, og for settefiskproduksjon i RAS finnes det relativt få fagfellevurderte artikler.

4.5.2 Genuttrykk

Utvalg av gener

I tillegg til genuttrykkene inkludert i oppgaven, var det ved forsøkets start ønskelig å inkludere noen flere gener;

Myocyte endothelial growth factor 2C (*mef2c*) og GATA binding protein 4 (*gata4*) er tidligere brukt i masteroppgaver ved UIT, for å vurdere hypertrofisk vekst. Standardkurve

laget for primere i dette forsøket viste ingen uttrykk for *mef2c*, og lav effektivitet for *gata4* (Vedlegg II). Genuttrykk *mef2c* og *gata4* kunne styrket resultatet relatert til vekst i kompaktum, men ble ekskludert.

Det var også tiltenkt å inkludere genuttrykk fra *COL1a1* og *COL1a2* som kan brukes til å vurdere fibrose (27). Disse genene kunne bidratt til å vurdere om veksten kan betegnes som patologisk eller ikke. Grunnet begrenset med tid, ble det besluttet at oppgaven ikke skulle omhandle fibrose i hjertevev, verken histologisk eller molekylært.

Gel-elektroforese

For å sikre at PCR-resultatene kun var basert på uttrykk av ett enkelt gen, ble det gjennomført en gel-elektroforese. Resultatet fra denne finnes i Vedlegg III. Hvert bånd indikerer uttrykk av ett spesifikt gen med en molekylvekt, og man ønsker derfor ikke fremstilling av flere bånd per gen.

Ved økt eksponering observeres det to bånd for *GATA4* og *BNP*. Dette indikerer at det er et annet produkt (med annen størrelse) til stede som også amplifiseres. Dette kan det påvirke resultatet fra q-PCR som ikke skiller mellom størrelse på amplifiserte produkter.

For å få unngå det uspesifikke båndet kan man forsøke å endre metode ved å ha lavere konsentrasjon av primer, eller å heve annealing-temperaturen i PCR reaksjonen (36). Dette ble ikke gjennomført i forbindelse med denne oppgave, grunnet begrenset tid. Det er viktig å ta dette med i tolkningen av genuttrykk for disse genene, selv om båndet for det ukjente produktet er svakt.

4.5.3 Unøyaktigheter ved histologi som metode

For å kunne fremstille så gode data som mulig, er det viktig at de histologiske målingene ble utført så likt som mulig for alle hjertene. Dette har vært utfordrende og kan ansees som en svakhet ved histologi som metode for kvantitative målinger. Underveis i arbeidet, ble det forsøkt ulike metode for å lage så like histologi snitt som mulig.

I denne oppgaven ble valg av snitt basert på bulbus. Seks av hjertene endte opp med å bli ekskludert fra forsøket da de enten manglet eller hadde forkortet bulbus. Fire hjerter ble ekskludert av andre årsaker (Dårlige bilder, manglende hjertevev ol). Valg en annen metode for å utvalg av snitt, kunne derfor ført til ett høyere antall inkluderte individer, og derfor bedre datagrunnlag.

Kvantitative målinger av histologiske snitt er utført manuelt, og en menneskelig faktor spiller derfor inn. Eksempel: Når snittet med den bredeste bulbusen skulle finnes, ble det forsøkt å legge linje 1 der bulbus var på det smaleste i overgangen til ventrikkelen. Dette var en god måte på mange av snittene, men for de hjertene som skilte seg anatomiske måtte man bruke mer skjønn når denne linjen skulle tegnes. I denne oppgaven er det samme person som har utført alle målingene, og som dermed har vurdert alle hjertene på samme måte. Dette er en styrke til metoden når målinger skal utføres manuelt.

4.6 Til ettertanke

Som tidligere nevnt er det et behov for mer forskning som undersøker faktorer som påvirker hjertehelse hos Atlantisk laks i ett produksjonsmiljø, og da kanskje særlig i RAS. Denne oppgaven har hatt ett begrenset omfang, og underveis i arbeidet har det dukket opp mange tanker om hva som kunne vært interessant å undersøke nærmere; Under arbeid med de morfometriske målingene, ble det observert stor forskjell i celletetthet i overgang kompaktum spongiosum og i spongiosum. Det ble også observert større forskjeller i tykkelsen av kompaktum innad i samme hjerte hos fisken fra temperaturgruppe 14. Dette er ikke videre beskrevet i denne oppgaven, men det kunne vært interessant å se om dette hadde sammenheng med temperatur og hvilken klinisk betydning det har for fisken.

Diskusjonen i denne oppgaven har i hovedsak fokusert på temperaturgruppe 14 da det først og fremst er her det er observert signifikant forskjell fra temperaturgruppe 8. Likevel er det verdt å merke seg at selv om temperaturgruppe 12 som regel ikke skiller seg signifikant fra temperaturgruppe 8, skiller den seg helle ikke signifikant fra temperaturgruppe 14.

Ved starten av forsøket var en av målsetningene å undersøke dannelse av bindevev i form av kollagen i hjertemuskulaturen (Fibrose). Fibrose oppstår gjerne i etterkant av en skade eller infeksjon. Fra humanmedisin assosieres økt bindevevsdannelse i hjerte med nedsatt hjertefunksjon og økt sjanse for hjerterelaterte sykdommer (37). Bindevevsdannelse var tiltenkt undersøkt ved hjelp av qPCR av gener knyttet til dannelse av kollagen og histologi. De histologiske snittene i denne oppgaven er derfor farget med MTS for å kunne kvantifisere eventuell kollagenavleiring. Dette er ikke blitt gjennomført i forbindelse med denne oppgaven, men det visuelle inntrykket av de fargede snittene er at det ikke er store forekomster av kollagenavleiring i noen av temperaturgruppene. Ettersom fibrose oppstår i etterkant av en skade eller infeksjon kunne det vært interessant å følge fiskegruppen videre for å se om eventuell fibrose oppstår på et senere tidspunkt.

I tillegg til gener forbundet med kollagen, ble det også ekskludert to gener knyttet til cellevekst. Dersom tiden hadde tillatt det, hadde det vært interessant å forsøke å finne grunnen til at *mef2c* ikke ble uttrykt, og å optimalisere protokollen for qPCR-analyse av *gata4*. Å kunne inkludere disse to genene i forsøket, kunne vært med å styrke resultatet.

Til slutt vil det være interessant å følge videre utvikling i Temp-Intens og se om resultatene i denne oppgaven kan knyttes til hvordan fisken klarer seg i sjøfasen.

5 Konklusjon

I denne oppgaven har vi sett på hvordan ulike temperaturer påvirker utvikling av laksens hjerte. Det er viktig å ha kunnskap om hvordan temperatur påvirker laksens fysiologi, spesielt i RAS der driften av anlegget bidrar til å øke temperaturen på vannet uten ytterligere forbruk av energi. En slik forutsetning, gjør det gunstig for oppdretter å holde en høy vanntemperatur for å fremme vekst. Kunnskap og anbefalinger vedrørende temperatur vil hjelpe oppdretter å ta gode bærekraftige valg som også fremmer fiskehelsen på kort og på lang sikt.

Vi kjenner til at personer med nedsatt hjertekapasitet har lavere toleranse for stress og fysiske påkjenninger (38). Selv om hjerte og sirkulasjonssystemet hos fisk er ulikt menneskers, har det også en del likhetstrekk. Det er derfor naturlig å se for seg at fisk med nedsatt hjertehelse, har dårligere forutsetninger for god fiskehelse i sjøfasen av produksjonen. Kort oppsummert viser funnene i denne oppgaven at:

- Høyere temperatur gir høyere vekstrate ($14\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\text{ }^{\circ}\text{C} > 8\text{ }^{\circ}\text{C}$), men ingen forskjell i CSI
- Høyere temperatur fører til et tykkere kompaktum, men som er tynnere relativt til fiskens vekt ($14\text{ }^{\circ}\text{C} > 8\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Høyere temperatur fører til en rundere form på hjertet ($14\text{ }^{\circ}\text{C} > 8\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Høyere temperatur gir et genuttrykk forenelig med hypertrofisk vekst ($14\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- Det er ikke sett forskjell uttrykk av sykdomsmarkøren *BNP*

Hjertehelse handler om mer enn de faktorene denne oppgaven rommer. Patologisk hjertevekst er blant annet assosiert med fibrose, celledød og kardiell dysfunksjon. (39). Dette er ikke studert i dette forsøket, men basert på funnene presentert kan det likevel gjøres noen antagelser. Forsøket er gjort på et lite antall individer og selv om noen av faktorene tyder på patologisk vekst, er det andre funn som ikke er forenelig med dette.

Skal man likevel komme med en temperaturanbefaling basert på funnene i dette forsøket, ville det vært naturlig å anbefale å ikke bruke temperaturer over 12°C . Ved 12°C oppnår man signifikant høyere vekstrate enn ved 8°C , samtidig som man unngår risikoen for utviklingen av svakere hjertehelse.

Referanseliste

1. Sommerset I, Wiik-Nielsen J, Moldal T, Oliveira V, Svendsen J, Haukaas A, Brun E. Fiskehelse rapporten 2023. Veterinærinstituttet; 2024. Veterinærinstituttets rapportserie nr 8a/2024.
2. Et hav av muligheter - regjeringens havbruksstrategi. Nærings- og fiskeridepartementet; 2021.
3. Johansen IB, Romstad H, Dalum AS, Frisk M, Kavaliauskiene S. Varige effekter av forbedret hjertehelse hos laksesmolt - Faglig sluttrapport. 2023.
4. Olsen RE, Finstad B. Fiskefysiologi. Trondheim2024. Tilgjengelig fra: <https://hdl.handle.net/11250/3113208>
5. Lekang o-I. Aquaculture engineering. 3. utg. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2020.
6. Bregnballe J. A guide to Recirculation Aquaculture. København, Danmark: the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) og EUROFISH International Organisation; 2015.
7. Noble C, Nilsson J, Stien LH, Iversen MH, Kolarevic J, Gismervik K. Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd 2018.
8. Evans DH, Claiborne JB, Currie S. The Physiology of fishes. 4th utg. Boca Raton, Fla: CRC Press; 2014.
9. Kryvi H, Poppe T. Fiskeanatomi. Bergen: fagbokforlaget; 2016.
10. Frisk M, Høyland M, Zhang L, Vindas MA, Øverli Ø, Johansen IB. Intensive smolt production is associated with deviating cardiac morphology in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 2020;529:735615.
11. Bruno DW, Noguera PA, Poppe TT. A Colour Atlas of Salmonid Diseases. 2nd 2013. utg. Dordrecht: Springer Netherlands : Imprint: Springer; [lest].
12. Schulte PM. TEMPERATURE | Effects of Temperature: An Introduction. I: Farrell AP, red. *Encyclopedia of Fish Physiology*. San Diego: Academic Press; 2011. s. 1688-94. Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123745538001593>
13. Gamperl AK, Farrell AP. Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. *Journal of Experimental Biology* 2004;207(15):2539-50.
14. Klaiman JM, Pyle WG, Gillis TE. Cold acclimation increases cardiac myofilament function and ventricular pressure generation in trout. *J Exp Biol* 2014;217(Pt 23):4132-40.
15. Klaiman JM, Fenna AJ, Shiels HA, Macri J, Gillis TE. Cardiac remodeling in fish: strategies to maintain heart function during temperature Change. *PLoS One* 2011;6(9):e24464.
16. Fjellheim AJ, hess-Erga O-K, Attramadal k, Vadstein O. Resirkulering av vann i settefiskproduksjon. 2. utgave utg2016.
17. Nohria A, Creager MA. The Peripheral Circulation in Heart Failure. I: Hosenpud JD, Greenberg BH, red. *Congestive Heart Failure*. 3. utg. United States og America: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
18. Dimitriadi A, Beis D, Arvanitidis C, Adriaens D, Koumoundouros G. Developmental temperature has persistent, sexually dimorphic effects on zebrafish cardiac anatomy. *Scientific Reports* 2018;8(1):8125.
19. Keen AN, Fenna AJ, McConnell JC, Sherratt MJ, Gardner P, Shiels HA. The Dynamic Nature of Hypertrophic and Fibrotic Remodeling of the Fish Ventricle. *Frontiers in Physiology* 2016;6.

20. Becker JR, Robinson TY, Sachidanandan C, Kelly AE, Coy S, Peterson RT, MacRae CA. In vivo natriuretic peptide reporter assay identifies chemical modifiers of hypertrophic cardiomyopathy signalling. *Cardiovascular Research* 2011;93(3):463-70.
21. Gilljam KM. DNA repair protein complexes, functionality and significance for repair efficiency and cell survival. Trondheim: NTNU; 2010.
22. Johansen IB, Sandblom E, Skov PV, Gräns A, Ekström A, Lunde IG, et al. Bigger is not better: cortisol-induced cardiac growth and dysfunction in salmonids. *Journal of Experimental Biology* 2017;220(14):2545-53.
23. Handeland SO, Stefansson S. Photoperiod control and influence of body size on off-season parr-smolt transformation and post-smolt growth. *Aquaculture* 2001;192:291-307.
24. Thorarensen H, Farrell AP. The biological requirements for post-smolt Atlantic salmon in closed-containment systems. *Aquaculture* 2011;312(1):1-14.
25. Sridharan D, Pracha N, Dougherty JA, Akhtar A, Alvi SB, Khan M. A One-Stop Protocol to Assess Myocardial Fibrosis in Frozen and Paraffin Sections. *Methods Protoc* 2022;5(1).
26. Poppe T, Johansen R, Gunnes G, Tørud B. Heart morphology in wild and farmed Atlantic salmon *Salmo salar* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of aquatic organisms* 2004;57:103-8.
27. Johansen IB, Lunde IG, Røsjø H, Christensen G, Nilsson GE, Bakken M, Øverli Ø. Cortisol response to stress is associated with myocardial remodeling in salmonid fishes. *Journal of Experimental Biology* 2011;214(8):1313-21.
28. Knutsen E. Påvirker smoltifiseringsmetode hjerteutvikling og smoltkarakterer hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.)? : Universitetet i Tromsø; 2022.
29. Primer-Blast [Database]. Maryland, USA: National Center for Biotechnology Information [lest 6.mars 2024]. Tilgjengelig fra: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome
30. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):e45.
31. Bradburn S. How to analyse aPCR results with multiple reference genes: Tip Top Bio [lest april]. Tilgjengelig fra: <https://toptipbio.com/qpcr-multiple-reference-genes/>
32. Crouse C, Davidson J, Good C. The effects of two water temperature regimes on Atlantic salmon (*Salmo salar*) growth performance and maturation in freshwater recirculating aquaculture systems. *Aquaculture* 2022;553:738063.
33. Franklin C, Davie P. Sexual Maturity Can Double Heart Mass and Cardiac Power Output in Male Rainbow Trout. *Journal of Experimental Biology* 1992;171.
34. Castro V, Grisdale-Helland B, Helland SJ, Torgersen J, Kristensen T, Claireaux G, et al. Cardiac molecular-acclimation mechanisms in response to swimming-induced exercise in Atlantic salmon. *PLoS One* 2013;8(1):e55056.
35. Claireaux G, McKenzie DJ, Genge AG, Chatelier AI, Aubin JI, Farrell AP. Linking swimming performance, cardiac pumping ability and cardiac anatomy in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 2005;208(10):1775-84.
36. Ruiz-Villalba A, van Pelt-Verkuil E, Gunst QD, Ruijter JM, van den Hoff MJ. Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). *Biomol Detect Quantif* 2017;14:7-18.
37. Espeland T, Lunde IG, Amundsen BH, Gullestad I, Aakhus S. Myokardfibrose. *Todsskrift for den norske legeförening* 2018;138.
38. Mann DL, Felker GM. Heart failure: A companion til Braunwald's heart disease. 3. utg. United States of America: Elsevier; 2016.

39. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & Therapeutics* 2010;128(1):191-227.

Vedlegg I – Primersekvenser

Tabell 5: Primersekvenser for de ulike genene som er testet under forsøket, samt for to gener ekskludert underveis. Tabellen viser også tilgansnummer og funksjon.

Gen (Tilgansnummer)	Funksjon	Primerfrekvens (F: forward sekvens, R: reverse sekvens)
<i>Elongeringsfaktor-α</i> (AF321836)	Referansegen	F: CGCCAACATGGGCTGG R: TCACACCATTGGCGTTACCA
<i>β-aktin</i> (BT059604)	Referansegen	F: CAGCCCTCCTTCCTCGGTAT R: CGTCACACTTCATGATGGAGTTG
<i>A-type natriuretic peptide (anp)</i> (NM_001123545.2)	Hjertestress	F: ATGGAATCAAGAATGGTGAGGA R: CCAAGTCGCTATCAGGGTATG
<i>B-type natriuretic peptide (bnp)</i> (XM_014136528.1)	Hjertestress	F: GGGCAAAGGATGGACCGAAT R: GTTGCTGTTCCAGGTTGTGT
<i>Proliferating cell nuclear antigen (pcna)</i> (XM_014161524.2)	Hyperplasi	F: CTGGTGGTGGAGTACAAGATAG R: GGAAGTTTGGATCAGAGAGGTT
<i>Gata4</i> (XM_014205425)	Hypertrofi	F: CCAAGAACCTCAACAAGTC R: GGCTCCTCTGAGTTACAA
<i>Mef2c</i> (XM_014172378.1)	Hypertrofi	F: TGATGAAGAAGGCGTATGA R: TTGTTGGTACTGTTGAAGATG

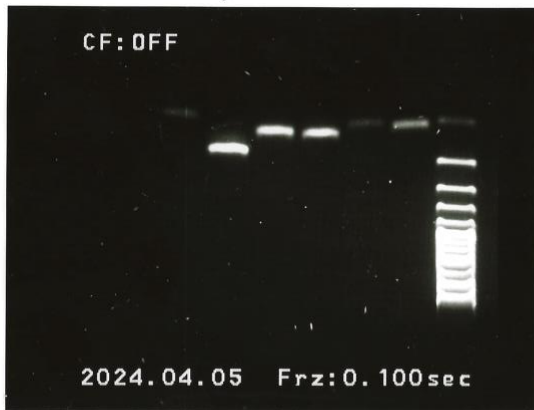
Vedlegg II -Resultat fra standardkurve

Tabell 6: Resultat fra standardkurve (stigningstall, korrelasjon (R^2)) samt utregnet effektivitet for primere.). Dersom ett primerpar har effektivitet=2, vil stigningstallet = -3,300. Når effektivitet mellom 1,9 og 2,1, kan man bruke disse videre, uten videre beregninger. R^2 forteller noe om hvor nærmer de ulike datapunktene ligger linjen for stigningstallet. Lav R^2 betyr at det er stor variasjon i verdiene (Zar, 1999). R^2 bør derfor ikke være lavere enn 0,98. *gata4* (markert med gult) ble ekskludert fra øvelsen basert på disse resultatene.

Primer	Stigningstall	R^2	Effektivitet
<i>pcna</i>	-3,382	0,981	1,97
<i>anp</i>	-3,330	0,996	1,99
<i>bnp</i>	-3,510	0,994	1,92
<i>Gata4</i>	-3,796	0,877	1,83

Vedlegg III – Gel-elektroforese

Tabell 7: Resultat fra qPCR fremstilt ved hjelp av gel-elektroforese på agarosegel. Bildene er av samme fremstilling, men med ulike eksponering. Rekkefølgen på de ulike båndene fra venstre mot høyre: Cola 2X3, Col1a1a, BNP, ANP, GATA4, PCNA.



Vedlegg IV – Ct-verdier

Tabell 8: Ct verdier for de ulike genene for hver individuelle fisk. Verdiene er ett gjennomsnitt av to replikater.

Gruppe	Fisk nr	PCNA	GATA4	ANP	BNP
8	H 581	28,1	32,3	21,3	22,4
8	H 582	26,9		20,1	21,8
8	H 583	29,0	32,3	22,3	24,3
8	H 584	28,8	32,2	22,2	24,3
8	H 585		34,4	26,5	27,9
8	H 586	29,4	32,2		24,6
8	H 587	29,3	32,4	22,9	
8	H 588	27,6	31,6	21,3	23,6
8	H 589	28,6	32,8	21,4	22,8
8	H 590	29,5	32,2	22,0	23,2
12	H 661	28,8	34,1	23,2	24,1
12	H 662	30,1	34,3	24,1	25,3
12	H 663	28,9	31,8	21,4	23,1
12	H 664	29,3	32,0	22,4	24,5
12	H 665	30,1	32,3	23,1	24,7
12	H 666	29,3	31,4	22,1	23,8
12	H 667	29,4	32,2	24,6	29,1
12	H 668	29,9	33,3	23,4	25,3
12	H 669	30,1	34,5	23,5	24,0
12	H 670	31,5	35,8		25,9
14	H 621	30,9	32,7	24,1	25,7
14	H 622	31,5	33,5	24,8	25,9
14	H 623	29,1	30,8	21,8	
14	H 624	28,0	30,1	20,8	23,0
14	H 625	29,5	34,1	23,1	23,9
14	H 626	30,1	34,1	24,4	24,6
14	H 627	30,0	33,2	23,5	24,6
14	H 628	30,6	33,2		25,6
14	H 629	30,9	33,4	24,8	25,7
14	H 630		34,3	25,8	27,4

