

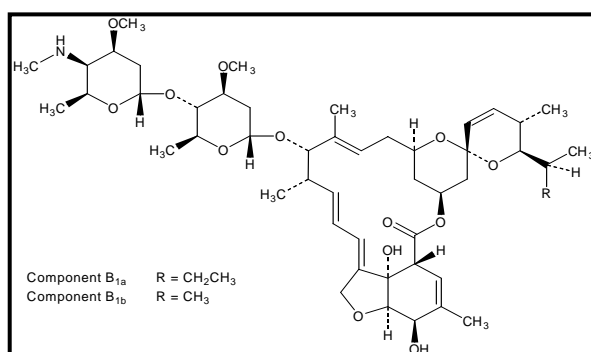
Sluttrapport for FHF - prosjektet

Sjømattrygghet – medisinrester

Farmakokinetikk og stressinduksjon av emamectin benzoat hos laks

FHF - Prosjektnummer 232014

Oktober 2006



Emamectin benzoat

Bjørn Tore Lunestad og Pål A. Olsvik
Nasjonalt institutt for ernærings og sjømatforskning (NIFES)
Postboks 2029 Nordnes, 5817 Bergen
Tlf. 55 90 52 00
E-post: blu@nifes.no, pal.olsvik@nifes.no

Sammendrag

Emamectin benzoat er det dominerende legemidlet for behandling av "lakselus" på oppdrettsfisk i kalde farvann. Denne rapporten beskriver to forsøk der laks ble behandlet med emamectin benzoat. I det ene forsøket ble stoffets farmakokinetikk undersøkt, mens det andre hadde som mål å undersøke ekspresjon av stressgener.

Forsøksfisken som ble benyttet til farmakokinetikkundersøkelser ble holdt i sjøvann (32 ‰) ved en snittemperatur på 9,1°C og behandlet peroralt med en standard dosering på 50µg emamectin benzoat pr. kilo fisk i syv dager. Fiskevekten varierte fra 37,7 til 86,3 g. I våre forsøk målte vi konsentrasjoner i muskel på mellom 40 til 50 ng/g (ppb) syv dager etter avsluttet behandling. Dette samsvarer godt med tidligere funn. Gjennomsnittshalveringstid ($T_{1/2}$) i muskel var 12,7 dager.

For å undersøke om medisinerings med emamectin benzoat påvirker fisken, ble transkripsjonen av to mye brukte biomarkørproteiner i lever kvantifisert med real-time RT-PCR teknikk 7, 14 og 35 dager etter avsluttet medisinerings. Heat shock protein 70 (HSP70) indueres lett i celler etter mange typer ytre påvirkning, og har derfor blitt foreslått brukt som en generell indikator på stress i dyreceller. På samme måte har glutathione S-transferaser (GST), en enzymfamilie som utnytter glutathione i reaksjoner som detoksifiserer en rekke kjemiske forbindelser som carcinogener, terapeutiske forbindelser og produkter av oksidativt stress, blitt foreslått brukt som biomarkører for organiske miljøgifter og medisiner. I dette arbeidet ble det utviklet ett assay for å måle mRNA nivåene av disse proteinene i laks. Forsøket viste at medisinerings med emamectin benzoat signifikant økte transkripsjonen av både HSP70 og GST i lever av laks over en tidsperiode på 35 dager, sammenlignet med laks som ikke ble medisineret. Resultatet indikerer at medisinerings med emamectin benzoat medfører et visst stress hos fisken, og at dette aktiverer enzymer involvert i detoksifisering via fase II konjugering i leveren.

Bakgrunn

Emamectin benzoat har vist seg effektivt mot infeksjoner med ektoparasittiske kopepoder som *Lepeophtheirus salmonis* og *Caligus elongatus* hos fisk (Stone et al. 2000a; Stone et al. 2000b; Stone et al., 2002), og er det dominerende legemidlet for behandling av slike infeksjoner på oppdrettsfisk i kalde farvann. Bruken av stoffet er utbredt i de store produsentlandene som Norge, Skottland og Chile. Stoffet markedsføres i mange land under handelsnavnet *Slice*, og er karakterisert ved høy virkningsgrad pr. vektenhet (farmakologisk potens). Grunnet overgang fra lavpotente til høypotente komponenter, blant annet emamectin, kan det se ut som om mengden av lakselusmidler brukt i Norge er kraftig redusert i de seneste år. Dersom en imidlertid korrigerer for ulik virkningsgrad har den reelle behandlingsintensiteten faktisk økt. Som en følge av den utbredte bruken emamectin, sammen med stoffets høye potens og mulige effekter på fisken eller viltlevende marine organismer, har stoffet vært i fokus både nasjonalt og internasjonalt.

Nye molekylærbiologiske metoder som real-time RT-PCR har funnet økende bruk for å beskrive effekter av kroppsfremmede stoffer på fisk. Disse undersøkelsene baserer seg på endringer i genuttrykk karakterisert ved økt produksjon av bestemte proteiner. Den cellulære stressresponsen kjennetegnes ved biokjemiske og fysiologiske effekter av ytre påvirkninger, og er blant annet karakterisert ved økt produksjon av en familie av proteiner kalt "heat shock proteins" (HSP's). Induksjon av ulike HSP familier har vært observert i cellelinjer, primærkulturer av celler, og i mange vev fra ulike dyr. Det er i dag en økende interesse for hvordan HSP's virker beskyttende i fisk eksponert for ulike kroppsfremmede stoffer. I dette arbeidet kvantifiserte vi mRNA-uttrykkene av HSP70, det mest studerte HSP-proteinet, som en biomarkør på emamectin-indusert stress i lever hos laks etter en standard behandling med stoffet (50 µg emamectin benzoat pr. kg. fisk daglig i 7 dager). Tidligere forsøk har vist at emamectin benzoat delvis skilles ut fra fisk i omdannet form som metabolitter. Vi undersøkte derfor også om mRNA uttrykkene av glutation-S-transferase (GST), et sentral fase II konjugeringsenzym, ble endret som en følge av emamectin benzoat eksponering. Målet med disse undersøkelsene var å finne ut om HSP70 og GST kan brukes som effekt-biomarkører for emamectin benzoat eksponering i laks.

Metoder

Behandling av fisk for undersøkelse av farmakokinetikk

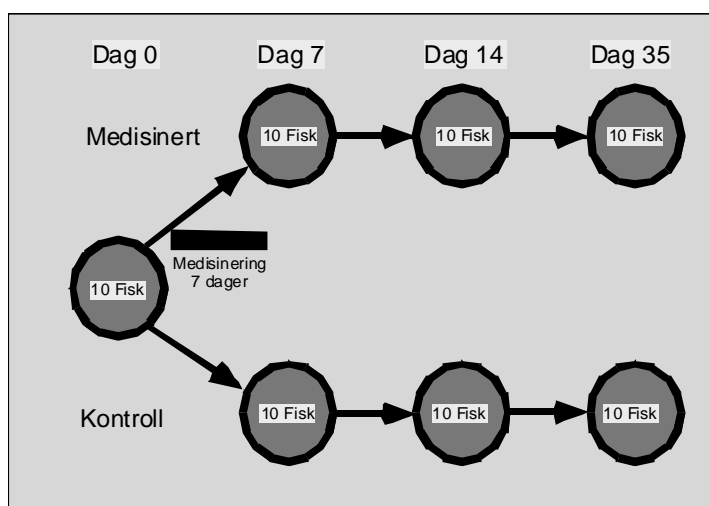
Forsøksfisken som ble benyttet til farmakokinetikkundersøkelser ble holdt i tanker med sjøvann (32 ‰, snittemperatur 9,1°C) og behandlet peroralt med en standard dosering på 50µg emamectin benzoat pr. kilo fisk i syv dager. Fiskevekten varierte fra 37,7 til 86,3 g. Før behandling ble fiskene delt tilfeldig i tre grupper som ble holdt i tre atskilte kar. Etter avsluttet behandling ble det tatt ut prøver av muskel (n=6) fra hver av gruppene ved tidene 7, 14, 28, 42 og 56 dager.

Analyse av emamectin benzoat i laksemuskel

Prøver av muskel (1.5 g) ble homogenisert sammen med 1 ml 0.9 % NaCl i vann, sammen med ivermectin i metanol som intern standard. Etter homogenisering ble emamectin benzoat ekstrahert og rensset gjennom flere trinn med tilsats av acetonitril og n-heptan, med påfølgende miksing og sentrifugering. Ytterligere opprensning ble gjennomført med solid phase extraction kolonner (OASIS HLB 6 cc cartridge, Waters Corporation, Milford, Mass. USA) med tilhørende eluenter og påfølgende sentrifugering. Produktet fra denne opprensningen ble så filtrert og injisert til analyse i HPLC/MS (APCI, Agilent 1100 series high performance liquid chromatographic system/Agilent MSD Quadropole mass-spectrometer). Gjeldende metode hadde en deteksjonsgrense (LOD) på 2.0 ng/g (ppb), og en kvantifiseringsgrense på (LOQ) på 5.0 ng/g (ppb).

Sampling av vev og RNA ekstraksjon

Det ble samlet levervev fra totalt 100 fisk i dette forsøket; 10 fisk ble tatt ut ved oppstart (tid 0), 30 fisk etter 7, 14 og 35 dager fordelt på to kar, der 15 fisk hadde blitt medisinerert med emamectin benzoat og 15 fisk ble holdt som kontroll. For genekspressjonsanalyse ble 70 av disse fiskene brukt. Figur 1. viser eksperimentelt design for denne delen av forsøket. Gjennomsnittelig (\pm st.dev.) vekt var 132 ± 21 g ved start, og 147 ± 25 g, 147 ± 27 g og 189 ± 28 g etter henholdsvis 7, 14 og 35 dager. Laks ble hovet opp fra karene og avlivet med et kakk i hodet. Umiddelbart etter avlivning av fisken ble omlag 100 mg av leveren skåret ut og frosset ned i 1.5 ml kryorør på flytende nitrogen. Rørene ble lagret ved -80°C før RNA ekstrahering. Total RNA ble ekstrahert fra vevsprøvene med Trizol reagent (Invitrogen, Life Technologies), i henhold til produsentens instruksjoner. RNA ble løst i 50 μl RNase fritt MilliQ H_2O , og lagret ved -80°C før videre prosessering.



Figur 1. Eksperimentell design for genekspressjonsstudier. Figuren viser en oversikt over forsøket og antall fisk som ble brukt i genekspressjons-eksperimentet.

PCR primere og TaqMan MGB prober

Kvantitative real-time RT-PCR assay'ene ble utviklet med programmet Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Assay'ene med optimale PCR primere og TaqMan prober ble utviklet fra kjente laksegener. PCR primer og TaqMan probesekvenser som ble brukt er vist i Tabell 1.

| Gen | Øvre primer | Revers primer | TaqMan MGB probe | Amplikon (bp) |
|----------------|--------------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| HSP70 | TCAACGATCAGGTCGTGCAA | CGTCGCTGACCACCTTGAA | CCGACATGAAGCACTGG | 60 |
| GST | ATTTGGGACGGGCTGACA | CCTGGTGCTCTGCTCCAGTT | TTCTCGACAAAGCTC | 81 |
| β -actin | CCAAAGCCAACAGGGAGAAG | AGGGACAACACTGCCTGGAT | TGACCCAGATCATGTTT | 91 |
| EF1B | TGCCCTCCAGGATGTCTAC | CACGGCCACAGGTAAGT | CCAATACCGCCGATTTT | 59 |
| ARP | TCATCCAATTGCTGGATGACTATC | CTTCCACAGCAAGGACAGA | CAAATGTTTCATTGTCGGCG | 101 |

Tabell 1. PCR primer og probe sekvenser brukt til å kvantifisere mRNA nivåene av to målgener og tre referansegener i dette arbeidet.

RNA sekvensene for HSP70, GST og referansegenene β -actin, elongeringfaktor 1 β (EF1 β) og acidic ribosomalt protein (ARP) ble tatt fra følgende GenBank accession nummer: **AJ632154**, **BQ036247**, **BG933897**, **BG933853** og **AY255630**. Da disse sekvensene er mRNA-sekvenser, ble PCR primerne ikke lagt over exon-exon grenser, som normalt gjøres for å forhindre at en amplifiserer genomisk DNA som ko-ekstraheres i lag med RNA. I stedet ble potensielt kontaminerende genomisk DNA fjernet med DNase behandling (Ambion) i henhold til produsentens instruksjoner. Amplifiserte PCR produkter ble sekvensert og

evaluert med BLAST-søk for å forsikre seg om de riktige mRNA transkriptene ble kvantifisert. Fragmentene ble siden sekvensert med BigDye version 3.1 fluorescenskjemi (Applied Biosystems) og kjørt på et ABI PRISM® 377 DNA apparat tilhørende sekvenseringsfasiliteten ved Universitet i Bergen.

Kvantitativ real-time RT-PCR

To-trinns real-time RT-PCR protokoller ble utviklet for å måle transkripsjonsnivåene av de studerte proteinene i leveren hos laksen som inngikk i dette forsøket. TaqMan MGB kjemi ble brukt til dette formålet. cDNA ble laget i triplikate brønner å en 96-brønners plate ved hjelp av en GeneAmp 9700 PCR maskin (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) med TaqMan Reverse Transcription reagens som inneholder Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/ μ l). To-folds fortyningsserier med total RNA ble analysert for å kalkulere PCR effektiviteten. Fire serielle fortyninger med total RNA (1000 - 125 ng) fra den samme prøven ble analysert i separate brønner med qRT-PCR på hver enkelt plate. cDNA ble laget med revers transkriptase (RT) ved 48°C i 60 min. med oligo dT primer (2.5 μ M). 500 ng total RNA ble brukt som input i hver reaksjon. Endelig konsentrasjon av de andre kjemikalene i RT-reaksjonene var: MgCl₂ (5.5 μ M), dNTP (500 μ M av hver), 10 X TaqMan RT buffer (1 X), RNase inhibitor (0.4 U/ μ l) og Multiscribe Reverse Transcriptase (1.67 U/ μ l).

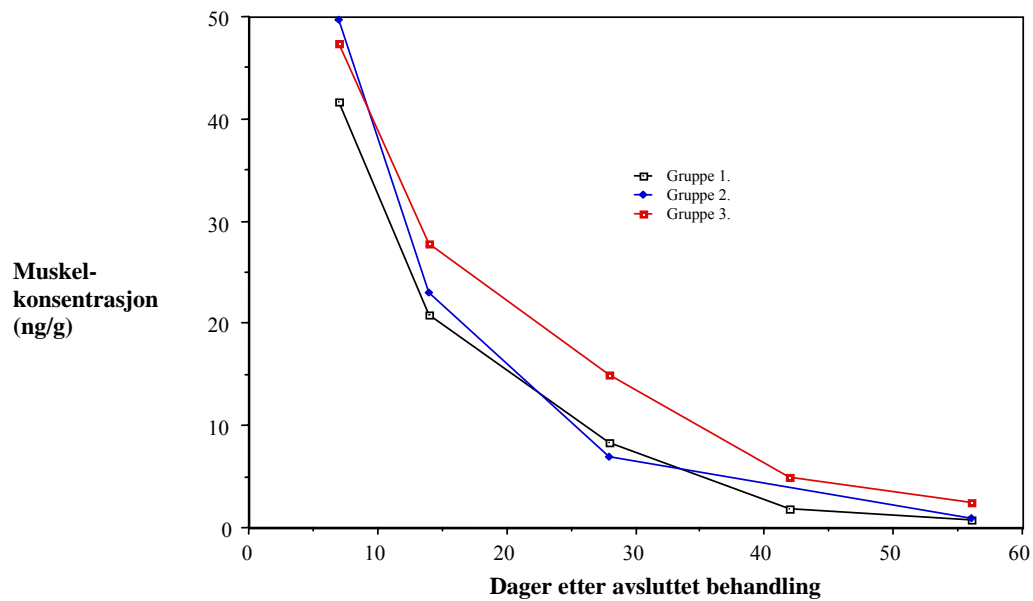
2.5 μ l med cDNA fra hver RT reaksjon ble overført til nye 96-brønners brett, og real-time PCR kjørt på en ABI Prism 7000 Sequence Detection System fra Applied Biosystems. Real-time PCR ble kjørt med TaqMan Universal PCR Master Mix, som inneholder AmpliTaq Gold® DNA polymerase, og gen-spesifikke primere (900 nM). Fluorescence merkete TaqMan MGB prober (200 nM) ble brukt for datainnsamling under den log lineære fasen av reaksjonen. PCR var som følger: 10 min. aktivering og denaturering ved 95°C, fulgt av 50 syklor a 15 sekunder ved 95°C og 60 sekunder ved 60°C. Baseline og threshold for Ct kalkulerer ble satt automatisk med ABI Prism 7000 SDS software versjon 1.1, eller satt manuelt når det var nødvendig.

geNorm VBA applet for Microsoft Excel ble brukt til å finne de mest stabile endogene referansegener til normalisering av dataene. Denne programvaren ble utviklet av Vandesompele et al., (2002) som hjelp til å velge riktig referansegene for normalisering av real-time PCR data. geNorm kalkulerer en genespresjons stabilitets indeks (M) for et referansegene som en parvis variasjon V for det genet mot alle andre testete referansegene. Av de tre undersøkte referansegene viste det seg at EF1 β var mest stabil, men stabiliteten til alle referansegene var relativt lik. Stabilitetsindeksen M var 0.68 for EF1 β , 0.71 for ARP og 0.76 for β -actin (jo lavere M -verdi, desto mer stabilt referansegene). geNorm kalkulerer en normaliseringsfaktor basert på alle valgte referansegene, og siden de tre studerte referansegene hadde omtrent lik stabilitet, ble alle brukt i beregningen av gjennomsnittelig normalisert ekspresjon i dette arbeidet.

Resultater

Eliminasjonskurver

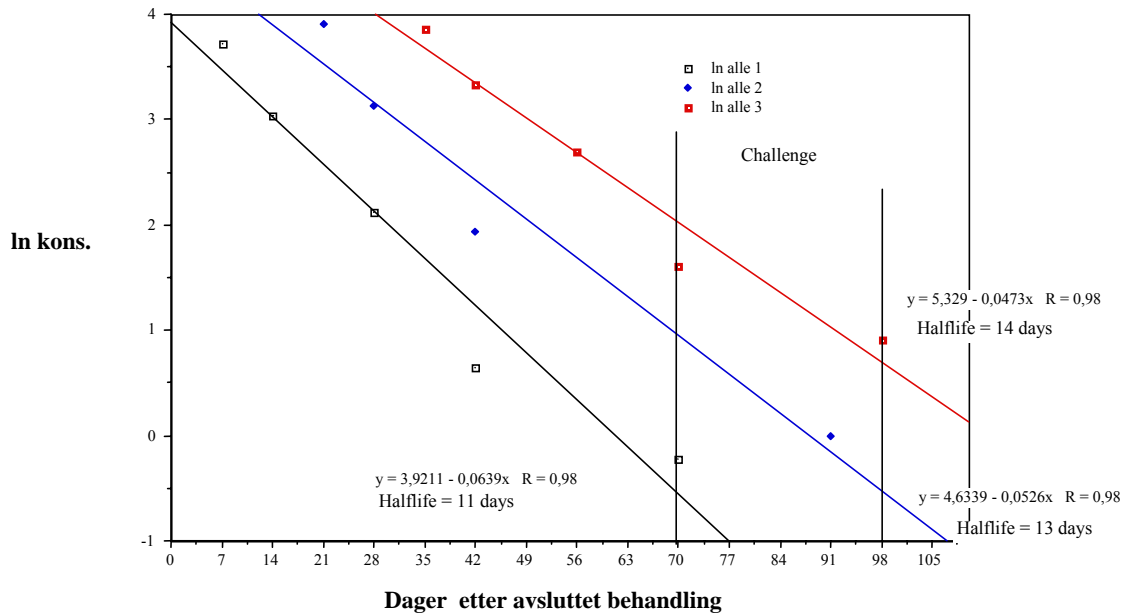
Snittkonsentrasjonen av emamectin benzoat i 6 muskelprøver fra hver gruppe etter 7, 14, 28, 42 og 56 dager etter avsluttet behandling er vist i Figur 2. Det er god overensstemmelse mellom kurvene i de tre gruppene som ble undersøkt. Det var som forventet en individ-til-individ forskjell på målte konsentrasjoner (data ikke vist).



Figur 2. Elimineringsskurver for tre grupper laks behandlet med en standard dosering med emamectin benzoat. Analyser av muskel ($n=6$) fra tre grupper av laks ble gjennomført ved dag 7, 14, 28, 42 og 56 etter en avsluttet behandling med $50\mu\text{g}$ emamectin benzoat per kg fisk i syv dager.

Halveringstid

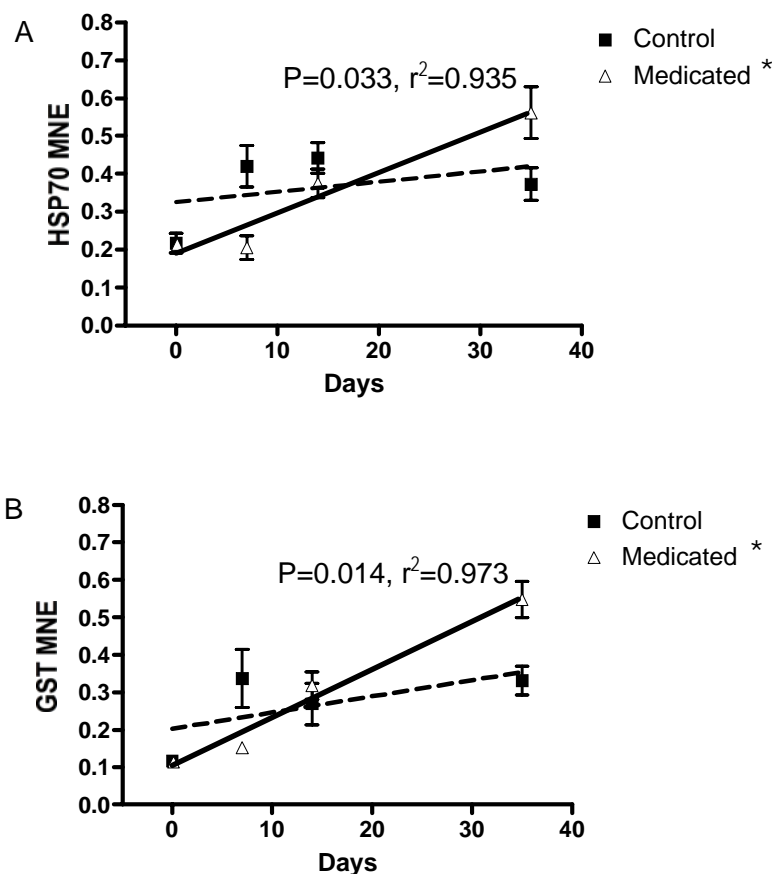
Det farmakologiske begrepet halveringstid ($T_{1/2}$) er et mål for hvor lang tid det vil ta før konsentrasjonen av et legemiddel i en organsime blir halvert. Ved å lage ett log plot av nedgangen i konsentrasjonen mot tiden, vil man få en lineær kurve. Dett er vist i Figur 3. Halveringstidene i de tre gruppene var henholdsvis 11, 13 og 14 dager. Kurvene er forskjøvet på tidsaksen, siden de tre gruppene ble behandlet med noen ukers mellomrom.



Figur 3. Kurve for beregning av halveringstid ($T_{1/2}$) i de tre gruppene av laks som ble behandlet med emamectin benzoat.

Genekspresjon

Real-time PCR assay'ene for alle 5 undersøkte genene fungerte optimalt, dvs. effektiviteten lå mellom 1.92 og 2.10 (med stigningstall mellom -3.11 og -3.52). En normaliseringsfaktor ble kalkulert med geNorm programvare basert på de tre referansegene β -actin, EF1 β og ARP. Gjennomsnittelig normalisert ekspresjon av HSP70 og GST ble kalkulert individuelt for alle de 70 undersøkte fiskene. Resultatene viste at transkripsjonen av både HSP70 og GST økte i lever i gruppene som hadde blitt behandlet med emamectin benzoat i løpet av forsøksperioden på 35 dager, sammenlignet med kontrollgruppen (analysert med lineær regresjon) (Figur 4.). For begge genene var denne økningen signifikant; for HSP70 ($P=0.033$, $r^2=0.935$) og for GST ($P=0.014$, $r^2=0.973$).



Figur 4. Normalisert mRNA ekspresjon av heat shock protein 70 (HSP70) (A) og glutathione transferase (GST) (B) i lakselever i fisk medisinert mot lakselus med emamectin benzoat (Slice®) i 7 dager. Stiplet linje viser tidsbestemt utvikling i mRNA ekspresjon i kontrollfisk som ikke ble medisinert, mens heltrukket linje viser tidsbestemt utvikling i mRNA ekspresjon hos fisk som ble medisinert. En stjerne angir om mRNA ekspresjonen i gruppene fra null til 35 dager signifikant avviker fra 0 (lineær regresjon). $n=10$ i alle gruppene, unntatt i GST kontrollfisk etter 35 dager, hvor $n=7$. Felles startgruppe (startuttak).

Diskusjon

Emamectin benzoat er ett semi-syntetisk insectisid som hørte til stoffgruppen avermektiner. Avermectinene ble opprinnelig funnet som produkter fra jordbakterien *Streptomyces avermitilis* ("strålesopp") (Treves-Brown, 2000). Virkningsmekanismen for avermectinene hos evertebrater, inkludert lakselus, er ennå ikke helt klarlagt. Det er likevel vist at avermectinene binder seg til såkalte glutamatregulerte ionekanaler i muskelceller, noe som fører til at kloridioner strømmer inn i cellene og dermed påvirker cellens evne til å motta nerveimpulser. En annen mekanisme for avermectinene er at de fører til økt produksjon av en hemmende neuro-transmittor (GABA), som binder seg til egne reseptorer på celler og gir depolarisering (Sevatdal et al., 2005). Begge mekanismene virker ved å gi muskellammelser hos lusen. Hos pattedyr passerer ikke avermectinene blod-hjerne-barrieren, og har derfor ikke samme giftvirkning.

Farmakokinetikk

Flere tidligere undersøkelser er utført for å vurdere og farmakokinetikk, behandlingseffektivitet og tilbakeholdelsestider for emamectin benzoat hos salmonider (Kim-Kang et al., 2004; Roy et al., 2006; Sevatdal et al., 2005). I våre forsøk målte vi

konsentrasjoner på mellom 40 til 50 ng/g (ppb) syv dager etter avsluttet behandling. Dette samsvar godt med funn som er gjort av Kim-Kang et al. (2004) og Roy et al. (2006).

I dette studiet beregnet vi den gjennomsnittlige halveringstiden i muskel til 12,7 dager. Denne verdien er høyere enn det som er rapportert av Sevatdal et al. (2005), som oppgav en halveringstid i muskel på 9,2 dager hos fisk med en snittvekt på 135 g. Kim-Kang et al. (2004) oppgir også en seinere eliminasjon av emamectin benzoat enn det som er vist i våre undersøkelser, men også her på større fisk (1,3 kg). I begge tilfeller kan fiskestørrelsen forklare seinere eliminasjon.

I henhold til gjeldende EU regelverk, er den høyeste lovlige konsentrasjonen (Maximum Residue Limit, MRL) av emamectin benzoat i fisk til konsum nå 100 ng/g (<http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/086303en.pdf>). For å oppnå dette med en god sikkerhetsmargin praktiseres den i Norge nå en tilbakeholdelsestid på 175 døgngrader (Roy et al, 2006). Med en temperatur på 9,1°C (som i vårt forsøk) vil dette tilsvare en tilbakeholdelsestid på omlag 20 dager etter avsluttet behandling. Ved dette tidspunktet kunne det observeres konsentrasjoner i muskel på mellom 18 og 24 ng/g, altså ca 25% av MRL-verdien.

Genekspresjon

HSP70

Heat shock proteiner (HSP'er) er en familie med konserverte intracellulære proteiner, som har fått navnet sitt etter tidlige studier som viste at disse proteinene ofte var oppregulert etter hypertermieksponering (Iwama et al., 1998). HSP'er virker ved å beskytte cellene mot cytotoxiske effekter av proteinnedbrytning. En lang rekke faktorer som kan bidra til denaturering av proteiner kan derfor indusere nysyntese av disse proteinene. Faktorer som osmotisk stress, oksygenstress, tungmetaller og organiske miljøgifter kan medføre økt syntese av HSP'er i fisk (Smith et al., 1999, Basu et al., 2003, Wegele et al., 2004). HSP70 er uten tvil en av de mest studerte HSP-familiene. Denne familien består av to proteiner, en type som er kontinuerlig uttrykt (heat shock cognate 70, HSC70) og en induserbar type (heat shock protein 70, HSP70). Transkripsjonen av HSP70 reguleres av "heat shock factor 1" (HSF1), en promoter som ligger oppstrøms HSP70 genet. Vi har tidligere vist at mRNA sekvensen som ble brukt til å designe HSP70-assayet brukt i dette arbeidet er induserbar i laksefisk (upubliserte resultater), slik at vi vet at det koder for den induserbare HSP70 formen. Den signifikante tidsbestemte økningen av HSP70 transkriptet i lever hos laks medisinerert med emamectin benzoat påvist i dette arbeidet antyder det samme. Også i kontrollgruppen ble det observert høyere uttrykk av HSP70 etter dag 7, 14 og 35, sammenlignet med startgruppen ved tid 0. Denne økningen var imidlertid ikke signifikant over tid. Våre HSP70 resultater antyder at medisineringen har medført semi-kronisk stress i fisken, selv om økt transkripsjon av et enkeltstående stress-responsivt gen ikke gir noe definitivt svar på effekten av stoffet eller om økt HSP70 transkripsjon er en god biomarkør for emamectin benzoat eksponering i laksefisk.

GST

Glutathione S-transferaser (GST) er en familie enzymer som katalyserer nukleofile substanser med redusert glutathione (Hayes et al., 2005). GST har vært mye studert av toksikologer og farmakologer siden de metaboliserer kreftmedisiner, insektisider, herbisider, carcinogener og sekundære bi-produkter av oksidativt stress. Overekspresjon av GST har vært knyttet til toleranse mot insektisider og den selektive virkning av herbisider. mRNA sekvensen som ble brukt til å utvikle GST assayet i dette arbeidet, koder for GST π , en cytosolisk GST som ofte viser økt uttrykk i tumorer induert av genotoksiske kjemikalier, hoved-isoformen av GST funnet i laksefisk (Donham et al., 2005). Den semi-kroniske økningen av GST transkript

påvist i dette arbeidet antyder at emamectin benzoat påvirker detoksifiseringssystemene gjennom aktivisering av fase II konjugeringsenzymmer i lever hos laks. Oppfølgende studier kreves før en kan si noe om dette har negativ effekt f.eks. på veksten i perioden etter medisinerings, og om GST mRNA uttrykk er en mulig biomarkør for emamectin benzoat eksponering. Tidligere arbeider har vist at emamectin benzoat hovedsakelig skilles ut fra fisk via galle, og at stoffet kan reabsorberes i tarmen på fisken (Kim-Kang et al., 2004). Kim-Kang et al., (2004) fant høye nivåer av emamectin benzoat i tarm-mukosa i laks 56 dager etter oral administrasjon, noe som antyder at stoffet kan påvirke fisken i flere måneder etter medisinerings.

Økt transkripsjon av stress-responsive gener kan skje bare timer etter ekstern påvirkning. At en for både HSP70 og GST påviser økt transkripsjon i lever av genene som koder for dem over et såpass langt tidsspann som 35 dager var uventet hvis en betrakter medisineringsen som en akutt stressrespons. I så fall ville en mer naturlig utvikling ha vært om en hadde påvist økte mRNA nivåer etter 7 dager, for så å se en nedgang fram mot dag 35. Tidligere forsøk har imidlertid vist at emamectin benzoat etter oral administrasjon distribueres via blodet til mange organer i fisk og absorberes i disse (Sevatdal et al., 2005). Høyest nivåer ble påvist i nyre, men også i lever ble emamectin benzoat akkumulert til høye nivåer. I lever ble høyeste mengde emamectin benzoat påvist 7 dager etter administrasjon, mens høyeste mengde i nyre ble påvist etter 28 dager. Forsøket viste at emamectin benzoat akkumuleres i indre organer og at konsentrasjonen kan forbli høy over flere uker etter administrasjon (Sevatdal et al. 2005). Dette vil i så fall forklare at transkripsjonen av HSP70 og GST i lever økte i laks medisinert med emamectin benzoat over en periode på 35 dager. Det er for tidlig å konkludere at emamectin benzoat medisinerings fører til akutt økt stress i fisken. Våre resultater viser at emamectin benzoat kan påvirke transkripsjonen av sentrale stress-responsive gener opptil 1 måned etter oral administrasjon.

Videre forskning:

Som en del av vår strategi for utvikling av genekspressjon i fisk som biomarkører for ulike ernæringsstoffer, medisiner og miljøgifter, vil NIFES arbeide videre med deler av prøvematerialet fra dette prosjektet. Materialet vil bli brukt i fullskala microarray analyser, der planen er å benytte et laksefisk array som består av ca. 16.000 cDNA kloner. Arrayet er utviklet av GRASP-konsortiet i Canada. I stedet for å undersøke transkripsjonen til et utvalgt antall gener, undersøker en da ekspresjonen til store deler av genomet samtidig. Disse oppfølgende undersøkelsene vil kunne gi mer utfyllende informasjon om virkningen av emamectin benzoat på laksen.

Referanser

- Basu, N., Kennedy, C.J. and Iwama, G.K. 2003. The effects of stress on the association between hsp70 and the glucocorticoid receptor in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology A. Molecular and Integrated Physiology*, 134(3), 655-663.
- Donham, R.T., Morin, D., Jewell, W.T., Lame, M.W., Segall, H.J. and Tjeerdema, R.S. 2005. Characterization of cytosolic glutathione S-transferases in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquatic Toxicology*, 73(3), 221-229.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U. and Jowsey, I.R. 2005. Glutathione transferases. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology*, 45, 51-88.
- Iwama, G.K., Thomas, P.T., Forsyth, R.B. and Vijayan, M.M. 1998. Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8, 35-56.
- Kim-Kang, H., Bova, A., Crouch, L.S., Wislocki, P.G., Robinson, R.A. & Wu, J. 2004. Tissue distribution, metabolism, and residue depletion study in Atlantic salmon following administration of 3H-emamectin benzoate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2108-2118.
- Roy, W.J., N. Gillan, L. Crouch, R. Praker, H. Rodger and R. Endris. 2006. Depletion of emamectin residues following oral administration to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Aquaculture*, 259, 6-16.
- Sevatdal, S., Magnusson, Å., Ingebriksen, K., Haldorsen, R. and Horsberg, T.E. 2005. Distribution of emamectin benzoate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 28, 101-107.
- Smith, T.R., Tremblay, G.C. and Bradley, T.M. 1999. Characterization of the heat shock protein response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 20, 279-292.
- Stone, J., Sutherland, I.H., Sommerville, C., Richards, R.H., and Varma, K.J. 2000a. Field trials to evaluate the efficacy of emamectin benzoate in the control of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) and *Caligus elongates* (Nordmann), infestations in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*, 186: 205 – 219.
- Stone, J., Sutherland, I.H., Sommerville, C., Richards, R.H., and Varma, K. J. 2000b. Commercial trials using emamectin benzoate to control sea lice *Lepeophtheirus salmonis* infestations in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat Org* 41: 141-149.
- Stone, J., Roy, W. J., Sutherland, I. H., Ferguson, H. W., Sommerville, C., and Endris, R. 2002. Safety and efficacy of emamectin benzoate administered in-feed to Atlantic salmon, *Salmo salar* L., smolts in freshwater, as a preventative treatment against infestations of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer). *Aquaculture*, 210: 21-34.
- Treves-Brown, K.M. 2000. *Applied fish pharmacology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, ISBN 0-412-62180-0.
- Vandesompele, J., Preter, K.D., Pattyn, F., Poppe, B., Roy, N.V., Paepe, A.D. & Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, research0034.1-0034.11.
- Wegele, H., Muller, L. and Buchner, J. 2004. Hsp70 and Hsp90 - a relay team for protein folding. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 151, 1-44.